



ИЗМЕНЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

М.А.Фомина¹, А.А.Терентьев²

1. ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, Российская Федерация, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9
2. ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Российская Федерация, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Резюме

Цель исследования. Изучить влияние неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) и субстрата синтеза оксида азота L-аргинина на активность катепсинов В, L, Н и ее субклеточное распределение в ткани печени, почек и легкого.

Материалы и методы. Объект исследования – крысы-самцы линии Wistar, материалом послужили цитоплазматическая и лизосомальная фракции гомогенатов ткани печени, почки, легкого. Неселективный ингибитор индукцельной NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) применен в дозе 25 мг/кг, субстрат синтеза оксида азота L-аргинин – в дозе 500 мг/кг. Активность катепсинов В, L, Н определялась отдельно в цитоплазматической и лизосомальной фракции спектрофлуориметрической регистрацией количества продукта расщепления специфических субстратов 7-амидо-4-метилкумарина.

Результаты. Подавление синтеза оксида азота неселективным ингибитором NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг, 7 сут) в ткани почки приводит к снижению активности катепсинов В, L, Н в лизосомальной фракции с параллельным нарастанием внелизосомальной активности катепсина L, в ткани печени – к нарастанию лизосомальной активности катепсина Н и снижению внелизосомальной активности катепсина L. Субстрат синтеза оксида азота L-аргинин (500 мг/кг, 10 сут) в ткани печени вызывает лишь нарастание активности катепсина L во внелизосомальной фракции, а в ткани почки – приводит к повышению лизосомальной активности катепсина Н; при этом ткань легкого демонстрирует существенное нарастание активности всех изучаемых катепсинов во внелизосомальной фракции, сопровождающееся для катепсинов В и Н повышением лизосомальной активности. Выявленные изменения ассоциированы с признаками изменения соотношения проферментных и активных форм катепсинов.

Заключение. Эффекты неселективного ингибитора и субстрата синтеза оксида азота на общую активность катепсинов В, L и Н в паренхиматозных органах и ее субклеточное распределение являются тканеспецифичными и в ряде случаев разнонаправленными и сопровождаются признаками изменения соотношения проферментных и энзиматически активных форм преимущественно за счет повышения доли проферментных.

Ключевые слова:

катепсин В, катепсин L, катепсин Н, оксид азота, аргинин, L-NAME

Оформление ссылки для цитирования статьи

Фомина М.А., Терентьев А.А. Изменения субклеточного распределения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота. Исследования и практика в медицине. 2018; 5(3): 28-39. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-3-3

Для корреспонденции

Фомина Мария Алексеевна, к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 390026, Российская Федерация, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9

E-mail: marya.fom@yandex.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5550-0625>

Информация о финансировании. Исследование выполнено в соответствии с планом научной работы ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 11.06.2018 г., принята к печати 31.08.2018 г.

CHANGES IN SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF LYSSOMAL CYSTEINE PROTEINASES ACTIVITY IN PARENCHYMATOUS ORGANS OF RATS UNDER THE ACTION OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

M.A.Fomina¹, A.A.Terent'ev²

1. Ryazan State Medical University, 9 Vysokovol'naya str., Ryazan 390026, Russian Federation

2. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova, Moscow, 117997, Russian Federation

Abstract

Aim. To study the effect of non-selective inhibitor of NO-synthase N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and substrate of nitric oxide synthesis L-arginine on the activity of cathepsins B, L, H and its subcellular distribution in liver, kidney and lung tissues.

Materials and methods. The object of study – male rats Wistar line, the material was the cytoplasmic and lysosomal fraction of homogenates of liver, kidney, lung tissues. A non-selective inhibitor of inducible NO-synthase N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) was applied at a dose of 25 mg/kg, the substrate of NO synthesis L-arginine – at a dose of 500 mg/kg. Activity of cathepsins B, L, H was defined separately in the cytoplasmic and lysosomal fractions by spectrofluorometry quantitative determination of the specific substrate cleavage product 7-amido-4-methylcoumarin.

Results. Suppression of nitric oxide synthesis by non-selective inhibitor of NO-synthase L-NAME (25 mg/kg, 7 days) in the kidney tissue leads to a decrease in the activity of cathepsins B, L, H in lysosomal fraction with a parallel increase in non-lysosomal activity of cathepsin L, in the liver tissue leads to an increase in lysosomal activity of cathepsin H and a decrease in non-lysosomal activity of cathepsin L. The substrate of nitric oxide synthesis L-arginine (500 mg/kg, 10 days) only causes increased activity of cathepsin L in non-lysosomal fraction of liver tissue, leads to increased lysosomal activity of cathepsin H in kidney tissue, the lung tissue shows a significant increase in the activity of the all studied cathepsins in non-lysosomal fraction, accompanied by an increase in lysosomal activity of cathepsins B and H. The revealed changes are associated with the signs of changes in the ratio of pro-enzyme and active forms of cathepsins.

Conclusion. The effects of non-selective inhibitor and substrate of nitric oxide synthesis on the total activity of cathepsins B, L and H in parenchymatous organs and its subcellular distribution are tissue-specific and multidirectional in some cases and are accompanied by signs of changes in the ratio of pro-enzyme and enzymatically active forms mainly due to an increase of pro-enzyme forms.

Keywords:

cathepsin B, cathepsin L, cathepsin H, nitric oxide, arginine, L-NAME

For citation

Fomina M.A., Terent'ev A.A. Changes in subcellular distribution of lysosomal cysteine proteinases activity in parenchymatous organs of rats under the action of nitric oxide synthesis modulators. Research'n Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2018; 5(3): 28-39. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-3-3

For correspondence

Mariya A. Fomina, MD, PhD, associate professor of biological chemistry with the course of CDL, FAPE, Ryazan State Medical University

Address: 9 Vysokovol'naya str., Ryazan 390026, Russian Federation

E-mail: marya.fom@yandex.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5550-0625>

Information about funding. The study was carried out in accordance with the plan of scientific work of the FSBEI HO "I.Pavlov Ryazan State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Conflict of interest. Authors report no conflict of interest.

The article was received 11.06.2018, accepted for publication 31.08.2018

Оксид азота является биоактивной молекулой, образующейся в основном ферментативным путем из L-аргинина при участии изоформ NO-синтазы [1]. Среди множества эффектов оксида азота и его производных наибольшее внимание в настоящее время уделяется его про- и антиоксидантным свойствам и двойственному участию в апоптозе [2]. Актуальным направлением исследований механизмов апоптоза является «лизосомальная клеточная смерть», важнейшей частью реализации которой считают изменение компартментализации лизосомальных ферментов [3]. Наиболее перспективными в этом аспекте представляются лизосомальные цистеиновые протеиназы из-за их способности выходить за пределы лизосом без разрушения мембраны [4]. Эти соображения в настоящее время создали активно развивающееся направление поиска веществ, способных воздействовать на данную группу ферментов, однако следует отметить, что пока большинство исследований связано с изучением потенциальных ингибиторов их активности в целом без учета возможностей влияния на внутриклеточное распределение [5, 6]. Кроме того, поскольку изучение тканевых и клеточных эффектов оксида азота на данный момент является достаточно новым направлением, практически отсутствуют сведения о воздействии ингибиторов и субстрата его генерации на состояние лизосомального цистеинового протеолиза. Поскольку известно, что клетки печени, почек и легкого содержат достаточные количества ферментов генерации оксида азота, представляется целесообразным провести подобное исследование именно на этих тканях [7–9]. В связи с вышеизложенным, **целью исследования** явилось изучение влияния неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) и субстрата синтеза оксида азота L-аргинина на активность катепсинов B, L, H и ее субклеточное распределение в ткани печени, почек и легкого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 32 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Содержание и выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с протоколами, изложенными Международным Советом Медицинских Научных Обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.), и правилами лабораторной практики – Приложением к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н.

Для моделирования дефицита синтеза оксида азота (Эксперимент 1, $n = 8$) осуществляли внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25 мг/кг [10] в виде водного раствора 1 раз в сутки в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Выведение из эксперимента осуществлялось на 8-е сутки. Контрольной группе животных осуществляли внутрибрюшинное введение физиологического раствора по аналогичной схеме (Контроль 1, $n = 8$).

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота субстратом NO-синтазы (Эксперимент 2, $n = 8$) осуществляли путем внутривентрикулярного введения раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9% растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [11] 1 раз в сутки до утреннего кормления ежедневно в течение 10 дней. Выведение из эксперимента осуществляли на 11-е сутки. Контрольной группе в течение 10 дней внутривентрикулярно вводили физиологический раствор (Контроль 2, $n = 8$).

Эвтаназия животных осуществлялась после 12-часового ночного голодания методом обескровливания посредством пересечения брюшного отдела аорты под эфирным рауш-наркозом при сохраненном дыхании и сердцебиении. Немедленно после обескровливания извлекали печень, почку и легкое, которые раздельно помещали в 0,25 М раствор сахарозы и затем очищали от остатков жировой и соединительной ткани, промывали средой выделения и готовили точные навески с использованием электронных весов (AJH-220 SE, Япония). Гомогенизацию измельченных навесок осуществляли в холодном 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1/10 в стеклянном стакане гомогенизатора «Potter S» (Sartorius, Германия) тefлоновым пестиком при зазоре в пределах 0,16–0,24 мм. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4°C.

Субклеточное фракционирование осуществляли методом дифференциального центрифугирования [12]. Полученные гомогенаты центрифугировали 15 мин при 800 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14 000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20 000 g в течение 30 мин (центрифуга рефрижераторная K 24 D, ГДР). Полученный после центрифугирования при 20 000 g супернатант представлял собой неседиментируемую (цитоплазматическую) фракцию гомогената ткани и использовался в этом качестве для измерения изучаемых показателей. Осадок, содержащий грубую фракцию лизосом

(седиментируемая фракция), дополнительно ресуспендировали в 0,25 М сахарозе с добавлением Тритона X-100 в конечной концентрации 0,1% и также использовали для исследований.

Содержание метаболитов оксида азота определяли в неседиментируемой фракции гомогенатов фотометрией в видимой области спектра с использованием реактива Грисса [13].

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ – катепсинов В, L и Н изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [14] с регистрацией продукта гидролиза специфических субстратов 7-амидо-4-метилкумарина. В качестве субстратов использовались: N α -CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина В; N α -CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина L; Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина Н («Sigma», США). Активность каждого фермента определялась отдельно в неседиментируемой (цитоплазматической) и седиментируемой (лизосомальной) фракциях гомогената и обозначалась как неседиментируемая активность (HCA) и седиментируемая активность (CA) соответственно. Общая активность (OA) каждой протеиназы рассчитывалась как сумма HCA и CA.

В качестве показателя изменений компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ использовалась доля внелизосомальной активности, традиционно обозначаемая как коэффициент лабильности (C_{lab}): рассчитывалась как отношение HCA соответствующего фермента к его общей активности [15] и обозначалась HCA%.

Аутокаталитическое действие катепсинов оценивалось по коэффициенту отношения значения активности каждого фермента после 15-минутной

прекаталитической инкубации к параллельно определяемому значению активности без преинкубации [16] (K_{aca} – коэффициент аутокаталитического действия), показатель позволяет косвенно оценить соотношение проферментных и энзиматически активных форм каждого катепсина в изучаемом материале.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10.0. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка (W-критерий). Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, в качестве характеристик использовали медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1 и Q3 соответственно), результаты представляли в формате Me [Q_1 ; Q_3], для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна–Уитни (U-тест).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При измерении концентрации метаболитов оксида азота в изучаемых тканях (табл. 1) ингибирование синтеза оксида азота неселективным ингибитором NO-синтазы подтверждено статистически значимыми снижениями показателя. При этом на фоне введения субстрата синтеза NO L-аргинина концентрация метаболитов оксида азота не претерпела статистически значимых изменений в ткани печени и легкого и статистически значимо снизилась в ткани почки: подобное снижение мы ранее наблюдали для мышечных тканей [17], наиболее вероятной причиной здесь представляется ингибирование NO-синтазы избытком субстрата.

Таблица 1. Содержание метаболитов оксида азота в тканях для экспериментальных и контрольных групп, нмоль/мг белка (Me [Q_1 ; Q_3])

Table 1. The content of nitric oxide metabolites in the tissues for experimental and control groups, nmol/mg protein (Me [Q_1 ; Q_3])

	Печень	Почка	Легкое
Контроль 1	0,198 [0,185; 0,225]	0,192 [0,174; 0,207]	0,703 [0,637; 0,752]
Эксперимент 1 (L-NAME 25 мг/кг, 7 сут)	0,154 [0,130; 0,158]* $p = 0,02$	0,139 [0,120; 0,166]* $p = 0,04$	0,178 [0,155; 0,257]* $p = 0,003$
Контроль 2	0,204 [0,183; 0,213]	0,190 [0,177; 0,215]	0,729 [0,649; 0,757]
Эксперимент 2 (L-аргинин 500 мг/кг, 10 сут)	0,174 [0,167; 0,238]	0,143 [0,136; 0,154]* $p = 0,008$	0,725 [0,644; 0,773]

*статистически значимые отличия от соответствующего контроля.

*statistically significant differences from control.

При оценке активности катепсинов В, L, Н и ее субклеточного клеточного распределения в ткани печени (табл. 2) обнаружено статистически значимое нарастание общей активности катепсина Н за счет лизосомальной фракции и статистически значимое снижение внелизосомальной активности

катепсина L под действием ингибитора NO-синтазы; введение аргинина при этом привело к статистически значимому нарастанию внелизосомальной активности катепсина L. Статистически значимых изменений доли внелизосомальной активности изучаемых ферментов не зафиксировано.

Таблица 2. Изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ печени в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q₁; Q₃])
Table 2. Changes in the compartmentalization of activity of lysosomal cysteine proteinase of the liver in experimental and control group (Me [Q₁; Q₃])

Показатель	Группа		
	Контроль 1		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,35 [0,25; 0,43]	1,51 [0,8; 2,12]	1,43 [1,3; 1,45]
СА, нкат/г белка	0,34 [0,24; 0,42]	1,49 [0,76; 2,1]	1,34 [1,23; 1,37]
НСА, нкат/г белка	0,0072 [0,0051; 0,0079]	0,0262 [0,0216; 0,0364]	0,0760 [0,0654; 0,0969]
НСА, %	2,11 [1,58; 2,37]	1,95 [1,34; 3,46]	5,97 [5,34; 6,2]
	Эксперимент 1 (L-NAME 25 мг/кг, 7 сут)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,51 [0,41; 0,72]	1,29 [0,83; 2,17]	2,20 [1,82; 2,77]* <i>p</i> = 0,01
СА, нкат/г белка	0,50 [0,40; 0,72]	1,27 [0,83; 2,15]	2,13 [1,73; 2,7]* <i>p</i> = 0,01
НСА, нкат/г белка	0,0038 [0,0022; 0,0082]	0,0103 [0,0072; 0,0175]* <i>p</i> = 0,03	0,0917 [0,0578; 0,0955]
НСА, %	0,88 [0,33; 1,55]	0,99 [0,38; 3,75]	3,56 [2,23; 5,14]
	Контроль 2		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,33 [0,23; 0,50]	0,71 [0,35; 1,51]	1,10 [0,87; 1,28]
СА, нкат/г белка	0,31 [0,22; 0,49]	0,71 [0,34; 1,49]	1,03 [0,8; 1,2]
НСА, нкат/г белка	0,0125 [0,0091; 0,0148]	0,0089 [0,0035; 0,0199]	0,0721 [0,0645; 0,0917]
НСА, %	4,06 [3,01; 5,31]	1,27 [0,98; 1,72]	7,60 [7,24; 7,92]
	Эксперимент 2 (L-аргинин 500 мг/кг, 10 сут)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,28 [0,16; 0,39]	0,96 [0,87; 1,11]	1,21 [1,01; 1,39]
СА, нкат/г белка	0,26 [0,15; 0,38]	0,93 [0,84; 1,08]	1,11 [0,92; 1,28]
НСА, нкат/г белка	0,0096 [0,0094; 0,0108]	0,0261 [0,0232; 0,0344]* <i>p</i> = 0,045	0,0884 [0,0788; 0,1025]
НСА, %	2,99 [2,39; 4,83]	2,68 [2,6; 2,72]	8,18 [6,84; 9,09]

*статистически значимые отличия от соответствующего контроля.

*statistically significant differences from control.

Наиболее яркие изменения показателей активности изучаемых катепсинов были выявлены для ткани почки (табл. 3). Так, внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг привело к статистически значимому снижению общей активности катепсинов В, L и Н за счет снижения седиментируемой (лизосомальной) активности в сочетании со статистически

значимым нарастанием значений доли внелизосомальной активности, при этом статистически значимое повышение неседиментируемой активности зарегистрировано только для катепсина L. Введение L-аргинина привело к нарастанию общей и лизосомальной активности, статистически значимыми оказались изменения для катепсина Н.

Таблица 3. Изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ почки в экспериментальных и контрольных группах (Me [Q₁; Q₃])
Table 3. Changes in the compartmentalization of activity of lysosomal cysteine proteases of the kidney in experimental and control groups (Me [Q₁; Q₃])

Показатель	Группа		
	Контроль 1		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,99 [0,89; 1,03]	2,5 [2,14; 2,96]	2,89 [2,63; 3,08]
СА, нкат/г белка	0,95 [0,85; 1,00]	2,45 [2,10; 2,90]	2,82 [2,58; 3,01]
НСА, нкат/г белка	0,0373 [0,0287; 0,0424]	0,0582 [0,0453; 0,0635]	0,0727 [0,0576; 0,0764]
НСА, %	3,88 [2,84; 4,63]	2,01 [1,89; 2,17]	2,26 [2,04; 2,45]
	Эксперимент 1 (L-NAME 25 мг/кг, 7 сут)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,62 [0,56; 0,80]* <i>p</i> = 0,03	1,70 [1,41; 1,96]* <i>p</i> = 0,02	1,48 [1,31; 1,65]* <i>p</i> = 0,002
СА, нкат/г белка	0,59 [0,53; 0,76]* <i>p</i> = 0,03	1,63 [1,34; 1,88]* <i>p</i> = 0,01	1,42 [1,26; 1,59]* <i>p</i> = 0,002
НСА, нкат/г белка	0,0388 [0,0342; 0,0433]	0,0711 [0,0632; 0,0725]* <i>p</i> = 0,045	0,0512 [0,0435; 0,0662]
НСА, %	5,50 [4,65; 5,76]* <i>p</i> = 0,03	4,27 [3,79; 4,41]* <i>p</i> = 0,006	3,77 [3,45; 4,27]* <i>p</i> = 0,006
	Контроль 2		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,88 [0,63; 1,02]	3,10 [3,02; 3,48]	2,67 [2,533; 0,4]
СА, нкат/г белка	0,84 [0,59; 0,97]	3,02 [2,93; 3,39]	2,61 [2,48; 2,97]
НСА, нкат/г белка	0,0496 [0,0434; 0,0549]	0,0883 [0,0788; 0,0943]	0,0595 [0,0553; 0,0663]
НСА, %	5,38 [4,94; 7,20]	2,54 [2,35; 2,89]	2,23 [2,17; 2,49]
	Эксперимент 2 (L-аргинин 500 мг/кг, 10 суток)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	1,82 [0,84; 2,79]	3,19 [2,59; 4,49]	3,98 [3,78; 5,10]* <i>p</i> = 0,02
СА, нкат/г белка	1,76 [0,78; 2,73]	3,10 [2,51; 4,42]	3,90 [3,70; 5,03]* <i>p</i> = 0,03
НСА, нкат/г белка	0,0617 [0,0534; 0,0715]	0,0763 [0,0729; 0,0844]	0,0844 [0,0751; 0,0856]
НСА, %	3,21 [2,39; 7,73]	2,63 [1,72; 3,20]	2,06 [1,61; 2,26]

*статистически значимые отличия от соответствующего контроля.

*statistically significant differences from control.

Таблица 4. Изменения компартментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ легкого в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q ₁ ; Q ₃])			
Table 4. Changes in the compartmentalization of the activity of lysosomal cysteine proteases of the lung in experimental and control groups (Me [Q ₁ ; Q ₃])			
Показатель	Группа		
	Контроль 1		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,11 [0,09; 0,20]	1,10 [0,83; 1,18]	0,25 [0,20; 2,01]
СА, нкат/г белка	0,11 [0,08; 0,19]	1,06 [0,80; 1,16]	0,25 [0,20; 1,96]
НСА, нкат/г белка	0,0038 [0,0037; 0,0046]	0,0122 [0,0082; 0,0300]	0,0045 [0,0018; 0,0488]
НСА, %	3,57 [2,36; 4,40]	1,45 [0,95; 2,87]	1,57 [0,91; 2,35]
	Эксперимент 1 (L-NAME 25 мг/кг, 7 сут)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,20 [0,16; 0,23]	0,84 [0,78; 1,06]	0,57 [0,46; 0,80]
СА, нкат/г белка	0,20 [0,16; 0,22]	0,82 [0,77; 1,05]	0,56 [0,45; 0,79]
НСА, нкат/г белка	0,0020 [0,0009; 0,0024]	0,0118 [0,0051; 0,0138]	0,0094 [0,0062; 0,0131]
НСА, %	0,85 [0,54; 1,54]	1,22 [0,53; 1,54]	1,65 [1,18; 1,89]
	Контроль 2		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	0,27 [0,15; 0,46]	1,68 [1,50; 1,92]	1,82 [1,79; 2,05]
СА, нкат/г белка	0,26 [0,15; 0,46]	1,67 [1,49; 1,90]	1,76 [1,74; 2,00]
НСА, нкат/г белка	0,0016 [0,0015; 0,0019]	0,0120 [0,0058; 0,0185]	0,0564 [0,0519; 0,0652]
НСА, %	0,99 [0,61; 1,17]	0,76 [0,37; 1,03]	2,97 [2,89; 3,20]
	Эксперимент 2 (L-аргинин 500 мг/кг, 10 сут)		
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
ОА, нкат/г белка	1,08 [0,99; 1,18]* <i>p</i> = 0,005	1,72 [1,22; 2,30]	3,64 [3,19; 3,81]* <i>p</i> = 0,005
СА, нкат/г белка	1,07 [0,98; 1,17]* <i>p</i> = 0,005	1,71 [1,20; 2,27]	3,54 [3,09; 3,71]* <i>p</i> = 0,005
НСА, нкат/г белка	0,0125 [0,0121; 0,0133]* <i>p</i> = 0,005	0,0265 [0,0236; 0,0287]* <i>p</i> = 0,03	0,0953 [0,0842; 0,0976]* <i>p</i> = 0,005
НСА, %	1,12 [0,7; 1,22]	1,29 [0,92; 1,92]	2,61 [2,51; 2,78]

*статистически значимые отличия от соответствующего контроля.

*statistically significant differences from control.

В ткани легкого (табл. 4) применение неселективного ингибитора NO-синтазы не отразилось на показателях активности катепсинов и ее распределения, однако применение аргинина, напротив, привело к выраженному статистически значимому нарастанию общей активности катепсинов В и Н за счет как лизосомальной, так и внелизосомальной фракции без изменения доли внелизосомальной активности; для катепсина L статистически значимым оказалось только нарастание неседиментируемой активности.

Анализ изменений коэффициента аутокаталитического действия изучаемых ферментов в цитоплазматической и лизосомальной фракциях (табл. 5) демонстрирует, что подавление синтеза оксида азота под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит преимущественно к повышению показателя, что можно трактовать как увеличение доли проферментных

форм катепсинов. Так, статистически значимое повышение значений K_{aca} относительно контроля зарегистрировано для катепсина Н в лизосомальной фракции всех трех органов, кроме того, для внелизосомальной фракции K_{aca} статистически значимо возрастал в печени для катепсина L, в почке – для катепсинов В и L, в легком – для катепсинов В и Н. Интересно, что для катепсина В в лизосомальной фракции K_{aca} при данной модели имел тенденцию к снижению, причем в ткани легкого изменения оказались статистически значимыми. На фоне L-аргинина в дозе 500 мг/кг в ткани печени наблюдалось статистически значимое нарастание K_{aca} для катепсина В в лизосомальной фракции и статистически значимое снижение показателя для катепсина L в цитоплазматической фракции. В ткани почки обнаружено статистически значимое нарастание K_{aca} для катепсинов В и L внелизосомальной фракции.

Таблица 5. Значения коэффициента аутокаталитического действия (K_{aca}) для катепсинов В, L, Н в экспериментальных и контрольных группах (Ме [Q_1 ; Q_3]) Table 5. The values of the coefficient autocatalytical action (K_{aca}) for in vitro, L, H in the experimental and control group (Ме [Q_1 ; Q_3])			
Показатель	Группа/орган		
	Контроль 1		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	1,22 [0,61; 1,33]	0,47 [0,28; 0,71]	0,97 [0,73; 0,98]
Катепсин В, СА	1,15 [0,4; 1,83]	1,18 [0,99; 1,35]	1,14 [0,98; 1,53]
Катепсин L, НСА	0,97 [0,82; 1,08]	0,74 [0,66; 0,78]	1,28 [1,01; 3,11]
Катепсин L, СА	1,23 [0,93; 1,81]	0,8 [0,73; 0,88]	1,46 [1,06; 1,54]
Катепсин Н, НСА	0,65 [0,57; 0,76]	1,01 [0,92; 1,15]	0,87 [0,66; 0,98]
Катепсин Н, СА	0,34 [0,28; 0,41]	1,01 [0,93; 1,12]	0,39 [0,32; 0,41]
	Эксперимент 1 (L-NAME 25 мг/кг, 7 сут)		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	1,82 [0,85; 4,78]	1,27 [0,78; 1,57]* $p = 0,01$	2,02 [1,81; 2,43]* $p = 0,03$
Катепсин В, СА	0,78 [0,64; 1,63]	1,00 [0,87; 1,22]	0,01 [0,01; 0,02]* $p = 0,04$
Катепсин L, НСА	1,61 [1,19; 3,92]* $p = 0,02$	0,98 [0,93; 1,03]* $p = 0,02$	1,18 [1,07; 6,07]
Катепсин L, СА	1,24 [1,03; 4,94]	0,94 [0,82; 1,06]	2,49 [1,51; 3,2]
Катепсин Н, НСА	0,79 [0,73; 0,83]	1,68 [1,06; 2,40]	2,67 [1,68; 4,32]* $p = 0,008$
Катепсин Н, СА	0,56 [0,43; 0,70]* $p = 0,02$	1,78 [1,14; 2,46]* $p = 0,045$	1,02 [0,78; 1,29]* $p = 0,003$
	Контроль 2		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	0,35 [0,26; 0,54]	0,88 [0,77; 0,95]	0,00 [0,00; 0,48]
Катепсин В, СА	0,38 [0,20; 0,56]	0,72 [0,59; 0,86]	0,90 [0,81; 0,98]
Катепсин L, НСА	2,15 [2,11; 17,63]	0,8 [0,61; 0,89]	0,52 [0,12; 1,70]
Катепсин L, СА	1,12 [0,95; 1,19]	0,66 [0,56; 0,93]	0,57 [0,42; 0,78]
Катепсин Н, НСА	0,61 [0,60; 0,67]	0,99 [0,89; 1,06]	0,70 [0,56; 0,73]
Катепсин Н, СА	0,42 [0,34; 0,59]	0,58 [0,37; 0,88]	0,30 [0,27; 0,33]
	Эксперимент 2 (L-аргинин 500 мг/кг, 10 сут)		
	Печень	Почка	Легкое
Катепсин В, НСА	1,21 [0,58; 1,63]	1,39 [1,34; 1,51]* $p = 0,005$	0,15 [0,14; 0,20]
Катепсин В, СА	1,47 [1,28; 4,23]* $p = 0,03$	1,2 [0,57; 2,17]	1,16 [0,77; 1,26]
Катепсин L, НСА	0,84 [0,66; 1,00]* $p = 0,005$	1,03 [0,95; 1,26]* $p = 0,02$	0,57 [0,50; 0,58]
Катепсин L, СА	0,89 [0,68; 0,99]	0,89 [0,69; 0,99]	0,94 [0,73; 1,16]
Катепсин Н, НСА	0,58 [0,5; 0,71]	1,16 [1,00; 1,31]	0,58 [0,52; 0,61]
Катепсин Н, СА	0,40 [0,34; 0,55]	0,71 [0,59; 0,88]	0,27 [0,27; 0,34]

*статистически значимые отличия от соответствующего контроля.
 *statistically significant differences from control.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, данное исследование вносит вклад в развитие нового и актуального для медицины направления: изучение факторов, способных изменять активность и компартментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ, участвующих в столь значимых и взаимосвязанных процессах, как окислительный стресс и апоптоз [18]. Особенности структуры, создающие возможность проявления не только внутри-, но и внелизосомальных эффектов и высокую чувствительность к регуляции активности [19], привлекают внимание исследователей и дают повод рассматривать данную группу ферментов в качестве потенциальной терапевтической мишени для целого ряда патологий [20]. Однако на данный момент данная тема находится на этапе накопления экспериментальных данных, причем основная часть исследований связана с экспериментальной и клинической онкологией, особое внимание при этом уделяется внелизосомальным, а чаще внеклеточным эффектам лизосомальных цистеиновых протеиназ [21–23] и в качестве агентов воздействия рассматриваются лишь природные и синтетические ингибиторы этих ферментов [24]. Описание воздействия на активность и компартментализацию цистеиновых катепсина в паренхиматозных органах ингибитора и субстрата синтеза оксида азота, сведения о роли которого в различных физиологических и патологических процессах экспоненциально расширяются, составляет научную новизну нашего исследования и может в дальнейшем найти применение как в понимании патогенеза, так и в поиске новых направлений терапевтических воздействий. Важным наблюдением является тот факт, что эффекты ингибитора и субстрата синтеза оксида азота на активность и внутриклеточное распределение лизосомальных цистеиновых протеиназ имеют тканеспецифичность и могут проявляться даже без значительных изменений концентрации метаболитов оксида азота, что ранее было показано нами для ткани тимуса и селезенки [25], а также для

мышечных тканей [26]. Наиболее интересным в данном исследовании мы считаем обнаружение тканеспецифической способности изучаемых веществ изменять внелизосомальную активность катепсина, при этом повышающий активность эффект ингибитора синтеза NO для катепсина L в ткани почки совпадает с ранее обнаруженным нами для ткани селезенки [27], а снижающий для ткани печени — с таковым для миокарда [28]. Поскольку важным фактором регуляции активности изучаемых лизосомальных цистеиновых протеиназ является аутокаталитический процессинг [29–31], обнаруженные нами изменения коэффициента аутокаталитического действия, указывающие на преимущественное повышение доли проферментных форм, могут как объяснять изменения активности ферментов, так и указывать на повышение их резервного синтеза, без включения на данном этапе в каталитические процессы. Интересно, что данные эффекты тоже, по-видимому, тканеспецифичны. Так, обнаруженная в данном исследовании способность L-NAME преимущественно повышать показатель коэффициента, что можно трактовать как повышение доли проферментных форм в материале, была ранее продемонстрирована для ткани грудной аорты [32], а аналогичный эффект аргинина в отношении катепсина B в ткани печени совпадает с таковым, описанным для тимоцитов и спленоцитов в условиях *in vitro* [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффекты неселективного ингибитора и субстрата синтеза оксида азота на общую активность катепсина B, L и H в паренхиматозных органах и ее субклеточное распределение являются тканеспецифичными и в ряде случаев разнонаправленными и сопровождаются признаками изменения соотношения проферментных и энзиматически активных форм преимущественно за счет повышения доли проферментных.

Список литературы

1. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs304
2. Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, et al. Nitric Oxide in Cell Survival: A Janus Molecule. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2717-39. DOI: 10.1089/ARS.2009.2721.
3. Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci*. 2013 May 1;126(Pt 9):1905-12. DOI: 10.1242/jcs.091181.

4. Repnik U, Česen MH, Turk B. Measuring Cysteine Cathepsin Activity to Detect Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 May 2;2016(5). DOI: 10.1101/pdb.prot087114
5. Wang D, Bromme D. Drug delivery strategies for cathepsin inhibitors in joint diseases. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005 Nov;2(6):1015-28. DOI: 10.1517/17425247.2.6.1015

6. Dana D, Davalos AR, De S, et al. Development of cell-active non-peptidyl inhibitors of cysteine cathepsins. *Bioorg Med Chem*. 2013 Jun 1;21(11):2975-87. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.062
7. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)*. 1998 Jul;63(7):766-81.
8. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006 Aug;187(4):433-46. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x
9. Huang HJ, Isakov W, Byers DE, Engle JT, Griffin EA, Kemp D, et al. Imaging Pulmonary Inducible Nitric Oxide Synthase Expression with PET. *J Nucl Med*. 2015 Jan;56(1):76-81. DOI: 10.2967/jnumed.114.146381
10. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И., Артюшкова Е.Б. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008;71(2):29-31.
11. Дорохина Л.В., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия Биологических Наук. 2000;4:83-86.
12. Покровский А.А., Тутьельян В.А. Лизосомы. М.: Издательство Наука, 1976.
13. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2005;6:15-18.
14. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L. *Methods Enzymol*. 1981;80 Pt C:535-61.
15. Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. Новосибирск: Издательство Наука СО, 1987.
16. Борискина М.А. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания. Дисс. ... канд. мед. наук. Рязань, 1996.
17. Арапова А.И. Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Рязань, 2017.
18. Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):22-33. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.08.016
19. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):68-88. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002
20. Siklos M, BenAissa M, Thatcher GRJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Nov;5(6):506-19. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.08.001
21. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cystein proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: marker for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):84-9.
22. Yang Z, Cox JL. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. *Cancer Cell Int*. 2007 May 8;7:8. DOI: 10.1186/1475-2867-7-8
23. Tu C, Ortega-Cava CF, Chen GS, Fernandes ND, Cavallo-Medved D, Sloane BF, et al. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res*. 2008 Nov 15;68(22):9147-56. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5127.
24. Silva DG, Ribeiro JFR, De Vita D, Cianni L, Franco CH, Freitas-Junior LH, et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Nov 15;27(22):5031-5035. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.002
25. Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота. Дисс. ... канд. биол. наук. Рязань, 2014.
26. Арапова А.И. Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота. Дисс. ... канд. мед. наук. Рязань, 2017.
27. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Исаков С.А. Окислительная модификация белков и изменение активности катепсина L селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013;1:44-48.
28. Арапова А.И., Фомина М.А. Изменение активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ сердечной мышцы под действием карнитина и регуляторов синтеза оксида азота. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2015;4:69-75.
29. Васильева О.С., Серебров В.Ю., Турк Б., и др. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина H in vitro. Электронный журнал «Исследовано в России». 2002: 1092-1102. Режим доступа: <http://docplayer.ru/31006556-Izuchenie-mehanizma-autokataliticheskoy-aktivacii-prokatepsina-h-in-vitro.html>
30. Menard R, Carmona E, Takebe S, Dufour E, Plouffe C, Mason P, Mort JS. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J Biol Chem*. 1998 Feb 20;273(8):4478-84.
31. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):944-51.
32. Арапова А.И., Фомина М.А. Аутокаталитические эффекты лизосомальных цистеиновых протеиназ гладкой мышцы аорты крыс. Наука молодых – Eruditio Juvenium. 2015;4:27-32.
33. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина В иммунокомпетентных органов крыс в условиях in vitro. Наука молодых – Eruditio Juvenium. 2014;1:53-59.

References

1. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304
2. Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, et al. Nitric Oxide in Cell Survival: A Janus Molecule. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2717-39. DOI: 10.1089/ARS.2009.2721.
3. Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci*. 2013 May 1;126(Pt 9):1905-12. DOI: 10.1242/jcs.091181.
4. Repnik U, Česen MH, Turk B. Measuring Cysteine Cathepsin Activity to Detect Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 May 2;2016(5). DOI: 10.1101/pdb.prot087114
5. Wang D, Bromme D. Drug delivery strategies for cathepsin inhibitors in joint diseases. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005 Nov;2(6):1015-28. DOI: 10.1517/17425247.2.6.1015
6. Dana D, Davalos AR, De S, et al. Development of cell-active non-peptidyl inhibitors of cysteine cathepsins. *Bioorg Med Chem*. 2013 Jun 1;21(11):2975-87. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.062
7. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)*. 1998 Jul;63(7):766-81.
8. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006 Aug;187(4):433-46. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x
9. Huang HJ, Isakov W, Byers DE, Engle JT, Griffin EA, Kemp D, et al. Imaging Pulmonary Inducible Nitric Oxide Synthase Expression with PET. *J Nucl Med*. 2015 Jan;56(1):76-81. DOI: 10.2967/jnumed.114.146381
10. Pokrovskii MV, Pokrovskaya TG, Kochkarov VI, Artyushkova EB. Endothelioprotective properties of L-arginine on a nitric oxide deficiency model. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2008;71(2):29-31. (In Russian).
11. Dorokhina LV, Zinchuk VV. The prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia and a correction of L-arginine-NO system. *Proceedings of the National Academy of sciences of Belarus*. 2000;4:83-86. (In Russian).
12. Pokrovskii AA, Tutel'yan VA. *Lizosomy [Lysosomes]*. Moscow: "Nauka" Publ., 1976. (In Russian).
13. Metelskaya VA, Gumanova NG. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2005;6:15-18. (In Russian).
14. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, cathepsin L. *Methods Enzymol*. 1981;80 Pt C:535-61.
15. Panin LE, Mayanskaya NN. *Lizosomy: rol' v adaptatsii i vosstanovlenii [Lysosomes: role in adaptation and recovery]*. Novosibirsk: "Nauka" Publ., 1987. (In Russian).
16. Boriskina MA. Changes in the activity of lysosomal cysteine proteinases in patients with chronic leukemia in the dynamics of the disease. *Diss. Ryazan*, 1996. (In Russian).
17. Arapova AI. Lysosomal cysteine proteolysis of muscle tissues in the conditions of changes in the synthesis of nitric oxide. *Ryazan*, 2017. (In Russian).
18. Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):22-33. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.08.016
19. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):68-88. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002
20. Siklos M, BenAissa M, Thatcher GRJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Nov;5(6):506-19. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.08.001
21. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cystein proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: marker for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):84-9.
22. Yang Z, Cox JL. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. *Cancer Cell Int*. 2007 May 8;7:8. DOI: 10.1186/1475-2867-7-8
23. Tu C, Ortega-Cava CF, Chen GS, Fernandes ND, Cavallo-Medved D, Sloane BF, et al. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res*. 2008 Nov 15;68(22):9147-56. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5127.
24. Silva DG, Ribeiro JFR, De Vita D, Cianni L, Franco CH, Freitas-Junior LH, et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Nov 15;27(22):5031-5035. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.002
25. Abalenikhina YuV. Oxidative modification of proteins and lysosomal cysteine proteolysis of rat immunocompetent organs in conditions of modulating nitric oxide synthesis. *Diss. Ryazan*, 2014. (In Russian).
26. Arapova AI. Lysosomal cysteine proteolysis of muscle tissues in the conditions of changes in the synthesis of nitric oxide. *Diss. Ryazan*, 2017. (In Russian).
27. Abalenikhina JV, Fomina MA, Isakov SA. Oxidizing updating of proteins and change of activity cathepsin I rats spleen in the conditions of modeling deficiency of nitric oxide synthesis. *I.P.Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2013;1:44-48. (In Russian).
28. Arapova AI, Fomina MA. Change in activity and compartmentalization of lysosomal cysteine proteinases of cardiac muscle subjected to carnitine action and regulators of nitric oxide synthesis. *Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health»*. 2015;4:69-75. (In Russian).
29. Vasil'eva OS, Serebrov VYu, Turk B, et al. Izuchenie mekhanizma autokataliticheskoi aktivatsii prokatepsina H in vitro. Investigated in Russia. 2002: 1092-1102. Available at: <http://docplayer.ru/31006556-Izuchenie-mekhanizma-autokataliticheskoy-aktivatsii-prokatepsina-h-in-vitro.html> (In Russian).
30. Menard R, Carmona E, Takebe S, Dufour E, Plouffe C, Mason P, Mort JS. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J Biol Chem*. 1998 Feb 20;273(8):4478-84.

31. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):944-51.
32. Arapova AI, Fomina MA. Autocatalytic effect of lysosomal cysteine proteases smooth muscle rat aorta. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2015;4:27-32. (In Russian).
33. Abalenihina JuV, Fomina MA. The impact of modulators of the synthesis of nitric oxide in the activity, autoproducting cathepsin in immunocompetent organs of rats in conditions of in vitro. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2014;1:53-59. (In Russian).

Информация об авторах:

Фомина Мария Алексеевна, к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5550-0625>

Терентьев Александр Александрович, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2453-8377>

Information about authors:

Mariya A. Fomina, MD, PhD, associate professor of biological chemistry with the course of CDL, FAPE, Ryazan State Medical University

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5550-0625>

Aleksandr A. Terentyev, corresponding member of RAS, MD, PhD, DSc, professor of the department of biochemistry and molecular biology of the faculty of medicine, Pirogov Russian National Research Medical University

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2453-8377>