

**INFLUENCE OF THE NITROGEN OXIDE SYNTHESIS MODULATORS ON THE CATHEPSIN B, L, H ACTIVITY IN MONONUCLEAR LEUCOCYTES OF RATS**

Yu.V. Abalenihina, Assistant Professor  
M.A. Fomina, Candidate of Medical Science, Associate Professor  
Ryazan State Medical University, Russia

The influence of nitrogen oxide synthesis modulators on cathepsin B, L, H activity in mononuclear leukocytes was studied. It was found out, that cathepsin B, L, H activity in mononuclear leukocytes insignificantly decreases in case of excess of NO synthesis substrate and increases in case of the lack of NO synthesis, and also in case of combined injection of L-Name and L-arginine.

**Keywords.** cathepsins B, L, H, mononuclear leukocytes, nitrogen oxide synthesis modulation, L-NAME, L-arginine.

Conference participants, National championship in scientific analytics

**ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА НА АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОВ B, L, H В МОНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ КРЫС**

Абаленихина Ю.В., ассистент  
Фомина М.А., канд. мед. наук, доцент  
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Россия

Изучено влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность катепсинов B, L, H в моноядерных лейкоцитах крыс. Обнаружено, что активность катепсинов B, L, H в моноядерных лейкоцитах снижается при избытке субстрата синтеза оксида азота L-аргинина и возрастает при моделировании дефицита синтеза NO, а так же при совместном введении L-NAME и L-аргинина.

**Ключевые слова:** катепсины B, L, H, моноядерные лейкоциты, модуляция синтеза оксида азота, L-NAME, L-аргинин.

Участники конференции, Национального первенства по научной аналитике

Монооксид азота представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер. Важная роль оксида азота заключается в том, что он регулирует не только физиологические (нейротрансмиссия, снижение агрегации тромбоцитов [12], регуляция тонуса гладких мышц [13], реакции иммунной системы [12]), но и патологические процессы (развитие воспалительной реакции, окислительного стресса) [14]. Оксид азота является свободным радикалом, который синтезируется из аргинина с помощью NO-синтазы [6], одним из блокаторов синтеза является аналог L-аргинина, N-нитро-L-аргининметилловый эфир (L-NAME) [9].

Известно, что ингибиторы синтеза NO увеличивают количество лейкоцитов более чем в 15 раз [11]. Эти данные свидетельствуют о том, что NO – важный эндогенный модулятор деятельности лейкоцитов. Синтез NO приводит к адгезии лейкоцитов и их миграции в ткани. Кроме этого оксид азота регулирует функциональную активность, рост и смерть иммунных клеток [8], включая макрофаги, Т-лимфоциты, тучные клет-

ки, нейтрофилы [7]. Тем не менее, роль монооксида азота в формировании иммунитета, а так же его эффекты и механизмы воздействия на клетки иммунной системы, в том числе и моноядерные лейкоциты, пока остается относительно неизвестными. Именно поэтому внимание исследователей привлекают моноциты, которые обладают широким спектром иммунной защиты, регулируют апоптоз и выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток, а так же активацию других форменных элементов крови [1]. Одним из диагностически значимых показателей воспалительного процесса, апоптоза и иммунного ответа является степень активации лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Экспрессия лизосомальных протеаз, например, катепсинов B и L, часто связывают с развитием апоптоза, пролиферацией опухолевых клеток, инвазией, метастазированием [2]. Так же активация лизосомальных протеаз свидетельствует об иммунном ответе организма. Катепсины представляют очень важную часть иммунной системы и должны находиться под контролем, чтобы избежать патологических повреждений

клеток и тканей. Они участвуют в активации врожденного и приобретенного иммунитета, регулируют хронические воспаления и аутоиммунные расстройства [15]. Именно поэтому действие модуляторов синтеза оксида азота на активность катепсинов B, L, H в моноядерных лейкоцитах является центральной темой текущего исследования.

**Цель.** Определить влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность катепсинов B, L, H в моноядерных лейкоцитах.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 36 половозрелых беспородных белых крысах одного возраста. Контрольная группа состояла из 12 крыс, средней массой 319±16,3 граммов. Крысы содержались в обычных условиях вивария, без введения каких-либо препаратов.

**Эксперимент №1:** группа из 8 крыс, средней массой 313±21 граммов. Крысам на протяжении 10 дней перорально вводили аргинин в дозе 500 мг/кг.

**Эксперимент №2:** группа из 8 крыс, средней массой 282±60 граммов. Крысам ежедневно, в течение 7 дней, внутривенно вводили L-NAME в дозе

**Таблица 1**

**Значения активностей катепсинов B, L, H (нмоль/чх10<sup>6</sup> клеток) контрольной и экспериментальных групп (M±s)**

	B	L	H
Контроль	2,04±0,88	39,49±18,39	8,17±2,85
L-аргинин	0,90±0,37	19,44±5,98*	8,08±3,02
L-NAME	1,96±1,12	50,97±30,14*	27,69±18,99*
L-аргинин + L-NAME	2,62±0,52	40,55±9,36	13,01±6,02*

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

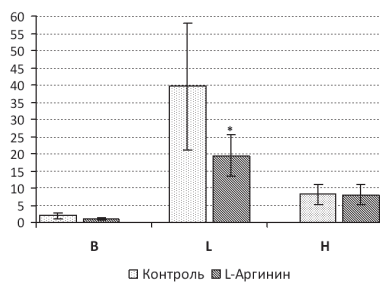


Рис. 1. Изменение активности катепсинов В, L, H после введения L-аргинина

на 25 мг/кг.

**Эксперимент №3:** группа из 8 крыс, средней массой 300±30 граммов. На фоне перорального введения раствора L-аргинина проводилось внутрибрюшинное введение раствора L-NAME в указанных дозах.

Взятие крови выполняли из брюшной аорты под легким эфирным наркозом. Эритроциты осаждали 6% раствором декстрана, после чего плазму со взвешенными в ней лейкоцитами подвергали изопикническому центрифугированию на градиенте плотности урографин – полиглюкин. При этом получали две фракции лейкоцитов: интерфазный слой содержал моноядерные лейкоциты, представленные лимфоцитами и моноцитами, осадок – полиморфноядерные гранулоциты. Клетки отмывали раствором хлорида натрия, пропускали через капроновый фильтр для удаления конгломератов клеток [4].

Активность катепсинов В, L и H изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett & Kirschke [5].

Статистический анализ данных проводили по U-критерию Манна-Уитни [3].

### Результаты

Обсуждение результатов

Действие аргинина на активность катепсинов В, L, H.

При сопоставлении активностей катепсинов В и H контрольной и первой экспериментальной группы были получены результаты, не имеющие статистически значимых различий, однако наблюдается тенденция к незначительному снижению активности. При сравнении активности катепсина L выявлено статистически значимое снижение активности.

Незначительная степень снижения активности может объясняться, по-видимому, низкой чувствительностью катепсинов В и H к аргинину, особен-

но катепсина H, так как его активность почти не изменилась. NO-синтаза является индуцибельным ферментом и для её сборки необходим определенный интервал времени, то есть вполне вероятно, что из субстрата (L-аргинина) не успевает синтезироваться избыток оксида азота и поэтому активность катепсинов резко не изменяется. Так же снижение активности катепсина L может происходить вследствие активации цистатина С [10].

Важно отметить, что L-аргинин является не только субстратом для синтеза NO, но и используется в организме как строительный материал – увеличивает синтез белка, способствует нормализации соединительной ткани, уменьшает рост патогенной микрофлоры, снижает

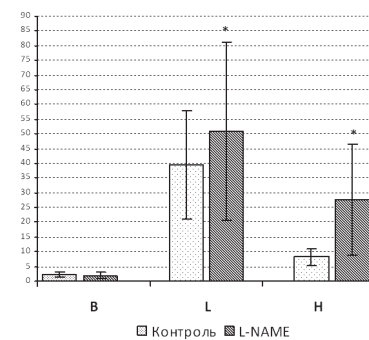


Рис. 2. Изменение активности катепсинов В, L, H после введения L-NAME

частоту апоптоза клеток. Перечисленные факты могут говорить о том, что L-аргинин способствует заживлению и укреплению биологических мембран и уменьшению секреции катепсинов.

**Действие L-NAME на активность катепсинов В, L, H.**

После введения L-NAME активность катепсинов увеличилась по сравнению с контрольной группой, эти данные имеют статистически значимые различия для катепсинов L и H.

Дефицит NO вызывает апоптоз клеток, увеличивает воспалительные процессы, поэтому активация катепсинов L и H в моноядерных лейкоцитах является показателем иммунного ответа на ингибирование синтеза оксида азота.

Увеличение активности катепсинов может быть следствием регуляции функциональной активности моноядерных лейкоцитов оксидом азота, и может согласовываться с известными данными о способности модуляторов дефицита NO, в частности L-NAME, увеличивать количество лейкоцитов в крови [11].

Важно учесть, что лизосомальные протеазы участвуют не только в процессе апоптоза, антиген-презентации, воспаления, но и в активации белков (например, прогормоны). Поэтому тенденция увеличения активности катепсинов после введения L-NAME может быть показателем потребности в белковых молекулах. Дефицит монооксида азота может вызывать повреждение лизосомальных мембран, что является основным путем экспрессии катепсинов. Еще одной причиной экспрессии катепсинов при моделировании дефицита NO может быть инактивация цистатина, который является эндогенным ингибитором лизосомальных цистеиновых протеиназ.

**Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ В, L, H после введения L-NAME на фоне L-аргинина.**

При сопоставлении данных контрольной и третьей экспериментальной группы получен следующий результат: активность катепсинов В, L, H увеличивается по сравнению с контрольной группой и уменьшается по сравнению с группой L-NAME, но не достигает контрольных значений, что говорит о преобладании эффекта ингибирования.

### Выводы

На основании полученных результатов можно отметить, что монооксид азота, по-видимому, не участвует в регуляции активности катепсина В, так как его активность по сравнению с контрольной группой практически не изменяется под действием модуляторов синтеза оксида азота. При совместном введении модуляторов была получена следующая тенденция - активность катепсинов В, L, H увеличивается по сравнению с контрольной группой и уменьшается по сравнению с группой L-NAME, но не достигает контрольных

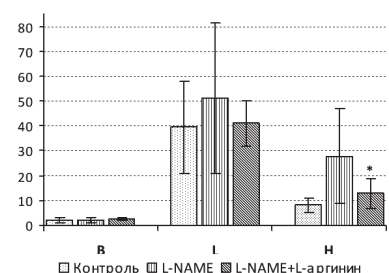


Рис. 3. Сравнение активности катепсинов В, L, H третьей экспериментальной группы по сравнению с группой L-NAME и контролем

значений, что говорит о преобладании эффекта ингибирования.

L-аргинин не оказал влияния на активность катепсина H, а введение L-NAME привело к достоверному повышению активности, в то же время, активность катепсина L при избытке субстрата достоверно снижалась и при моделировании дефицита оксида азота достоверно повышалась, что свидетельствует о регуляции функциональной активности моноядерных лейкоцитов оксидом азота.

### References:

1. Barinov E.F. Изменение метаболизма L-аргинина в моноцитах крови при синдроме диабетической стопы [Changing the metabolism of L-arginine in blood monocytes in terms of the diabetic foot syndrome] E.F. Barinov, O.N. Sulaeva., M.E. Barinova., *Klinicheskaya laboratornaya Diagnostika.*- 2010., No 5., pp. 16-19.

2. Korovin M.S. Rol' lizosomal'nykh tsisteinovykh proteinaz v opukholevoi progressii. [The role of lysosomal cysteine proteases in tumor progression]., M.S. Korovin, V.V. Novitskii, O.S. Vasil'eva., *Byulleten' Sibirskoy Meditsiny* [Bulletin of Siberian Medicine]. - 2009., No 2., pp. 85-91.

3. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometrics]., G.F. Lakin. - Moskva., Vysshaya shkola, 1990., pp. 130-132.

4. Novikov D. K. Kletochnye metody immunodiagnostiki [Cell immunodiagnosics methods] D.K. Novikov, V.I. Novikova. - Minsk, 1979. - 222 p.

5. Barrett A.J. Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L and H. Kirschke., *Methods in Enzymol.* - 1981., Vol. 80. pp. 535-561.

6. Arginine: New and exciting developments for an «old» amino acid., L. Beaumier et al., *Biomed. Environ. Sci.* - 1996., No 2-3., pp. 296-315.

7. Coleman J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation., *J.W. Coleman., PubMed* - 2001., URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515807>.

8. Fortin C.F. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair., S.F. Fortin., *PubMed* - 2010., Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789465>.

9. Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits., T. Hayashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2005., Vol.102., No 38., pp.13681-13686.

10. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients., Kos J. et al., *Clin. Cancer Res.*-1997., Vol. 3., pp. 1815-1822.

11. Kubes P. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion., P. Kubes, M.Suzuki, D.N. Granger., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1991., Vol. 88., pp. 4651-4655.

12. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology., S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs., *Pharmacol. Rev.* - 1991., Vol. 43., pp. 109-142.

13. Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum oesophageal muscle., J. Murray et al., *Amer. J. Physiol.* - 1991., Vol. 261., pp. 401-406.

14. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells., S. Nathan., *FASEB J.* - 1992., Vol. 6., pp. 3051-3064.

15. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses., S. Conus, S. Hans-Uwe., *Swiss medical weekly.* - 2010., pp. 1-12.

### Литература:

1. Баринов Э.Ф. Изменение метаболизма L-аргинина в моноцитах крови при синдроме диабетической стопы/ Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева., М.Э. Баринова// *Клин. лаб. Диагностика.*- 2010.-№5.-С. 16-19.

2. Коровин М.С. Роль лизосомальных цистеиновых протеиназ в опухолевой прогрессии/ М.С. Коровин, В.В. Новицкий, О.С. Васильева// *Бюл. Сиб. Медицины.* 2009.-№2.-С. 85-91.

3. Лакин Г.Ф. *Биометрия*/ Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - С. 130-132.

4. Новиков Д. К. Клеточные методы иммунодиагностики/ Д.К. Новиков, В.И. Новикова. - Минск, 1979. - 222с.

5. Barrett A.J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L/ A.J. Barrett., H. Kirschke // *Methods in Enzymol.* - 1981. - Vol. 80. - P.535-561.

6. Arginine: New and exciting developments for an «old» amino acid / L. Beaumier [et al]// *Biomed. Environ. Sci.* - 1996. - № 2-3. - P.296-315.

7. Coleman J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation/ J.W. Coleman // *PubMed* - 2001. - URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515807>.

8. Fortin C.F. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair/C.F.

Fortin// *PubMed*- 2010. - URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789465>.

9. Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits/ T. Hayashi [et al]//*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2005.- Vol.102.- N 38.- P.13681-13686.

10. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients/ Kos J. [et al.] *Clin. Cancer Res.*-1997.- Vol. 3.- P. 1815-1822.

11. Kubes P. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion/ P. Kubes, M.Suzuki, D.N. Granger *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -1991. - Vol. 88. - P. 4651-4655.

12. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology/ S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs. *Pharmacol. Rev.* - 1991. - Vol. 43.- P. 109-142.

13. Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum oesophageal muscle. J. Murray [et al.] *Amer. J. Physiol.* - 1991.- Vol. 261.- P. 401-406.

14. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells/ C. Nathan// *FASEB J.* - 1992.- Vol. 6.- P. 3051-3064.

15. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses/ S. Conus, S. Hans-Uwe // *Swiss medical weekly.* - 2010. - P. 1-12.

### Information about authors:

Yulia Abalenihina - assistant professor, Ryazan State Medical University; address: Russia, Ryazan city; e-mail: [abalenihina88@mail.ru](mailto:abalenihina88@mail.ru)

Maria Fomina - Candidate of Medical Science, Associate Professor, Ryazan State Medical University; address: Russia, Ryazan city; e-mail: [6260203@gmail.com](mailto:6260203@gmail.com)

### Сведения об авторах:

Абаленихина Юлия - ассистент, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; адрес: Россия, Рязань; электронный адрес: [abalenihina88@mail.ru](mailto:abalenihina88@mail.ru)

Фомина Мария - кандидат медицинских наук, доцент, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; адрес: Россия, Рязань; электронный адрес: [6260203@gmail.com](mailto:6260203@gmail.com)