

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

БУРДИН

Дмитрий Валерьевич

Физиологические и биохимические эффекты
сверхэкспрессии
аланин-глиоксилат аминотрансферазы 2

03.03.01 - физиология

диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. проф. А.Г. Марков

Санкт-Петербург

2018

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Оксид азота как важнейший биологический регулятор физиологических процессов в организме человека и животных.....	11
1.1.1 Молекулярные механизмы действия оксида азота.....	12
1.1.2 Синтазы оксида азота и их физиологическая роль в организме.....	18
1.1.3 Ферментативные и неферментативные механизмы регуляции гомеостаза NO в организме. Эндогенные ингибиторы NO-синтаз.....	23
1.2 Метилированные производные L-аргинина и их физиологическая роль в организме.....	26
1.2.1 Источники метилированных производных L-аргинина в организме.....	31
1.2.2 Пути метаболизма и выведения ADMA и SDMA	33
1.2.3 Клинические состояния, вызванные повышением уровня ADMA и SDMA в плазме крови	39
1.2.4 Модели для изучения физиологической роли асимметричного диметиларгинина.....	46
1.3 Аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 и ее роль в метаболизме аминокислот.....	49
1.3.1 Открытие AGXT2 и ее участие в метаболизме глиоксилата.....	51
1.3.2 Участие AGXT2 в метаболизме метиларгининов.....	54
1.3.3 Участие AGXT2 в синтезе предшественников гемоглобина.....	56
1.3.4 Участие AGXT2 в метаболизме бета-аминоизобутирата.....	57
1.3.5 Другие аминотрансферазные активности AGXT2.....	59
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	61
2.1. Генерация трансгенной линии мышей по hAGXT2.....	61
2.2. Манипуляции с ранними эмбрионами и хирургические процедуры на мышцах.....	63
2.3 Генотипирование мышей.....	64
2.4 Сбор биологического материала.....	66

2.5	Клинический анализ крови.....	66
2.6	Изучение содержания мРНК транскриптов AGXT2, DDAN1 и DDAN2 методом ПЦР в реальном времени.....	67
2.7	Анализ белковой экспрессии трансгенного hAGXT2 методом Вестерн-блот.....	70
2.8	Культивирование и инфицирование аденовирусом клеток HUVEC.....	73
2.9	Выделение и культивирование первичных эндотелиальных клеток трансгенных мышей.....	74
2.10	Иммуноцитохимическое исследование первичных эндотелиальных клеток трансгенных мышей для изучения локализации трансгенного hAGXT2.....	75
2.11	Измерение содержания L-аргинина, ADMA, SDMA, ADGV и креатинина в плазме, моче и тканях методом жидкостной хроматографии высокого разрешения-тандем масс-спектрометрии (HPLC-MS/MS).....	76
2.12	Измерение артериального давления.....	77
2.13	Физиологическое исследование эндотелиальной функции сосудов <i>ex vivo</i> методом изометрии.....	78
2.14	Статистический анализ полученных данных.....	80
	ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ AGXT2 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ И ИХ ОБЩАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.....	81
3.1	Анализ результатов трансгенеза в линии мышей hAGXT2.....	81
3.2	Фенотипический анализ трансгенной линии мышей hAGXT2.....	82
3.3	Клинический анализ крови трансгенной линии мышей hAGXT2.....	85
	ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ТРАНСГЕНА В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ МЫШЕЙ ЛИНИИ hAGXT2.....	87
4.1	Анализ экспрессии генов AGXT2, DDAN1, DDAN2 на уровне транскрипции в тканях трансгенных мышей и мышей дикого типа.....	87
4.2	Анализ белковой экспрессии трансгенного AGXT2 в тканях трансгенных мышей.....	97
4.3	Изучение клеточной локализации трансгенного hAGXT2 в тканях аорты.....	102

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МЫШЕЙ ЛИНИИ hAGXT2.....	104
5.1 Влияние трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на метаболизм аргинина, ADMA и SDMA у мышей.....	104
5.2 Изучение физиологических особенностей сердечно-сосудистой системы трансгенных мышей линии hAGXT2.....	108
ОБСУЖДЕНИЕ.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Последовательность конструкции, использованной для создания трансгенных мышей по hAGXT2.....	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологически активных веществ, вовлеченных во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер в большинстве клеток организма. Ему принадлежит первостепенная роль в поддержании тонуса сосудов кровеносной системы; оксид азота также участвует в реализации других важных физиологических функций, таких как нейротрансмиссия, реакции иммунной системы и др. (Davis et al., 2001; Li, Fostermann, 2000). Данный медиатор синтезируется при участии фермента NO-синтазы, которая катализирует отщепление от аминокислоты L-аргинина концевой аминогруппы с образованием цитруллина и NO. Показано, что изменение уровня биосинтеза NO связано с развитием таких сердечно-сосудистых заболеваний, как инфаркт миокарда, атеросклероз, инсульт, гипертония и других (Li, Fostermann, 2000). Таким образом, регуляция уровня NO в организме является необходимым условием для нормальной физиологии сердечно-сосудистой и других систем организма.

Одним из факторов регуляции уровня NO, защищающих организм от его гиперпродукции в нормальных физиологических условиях, является ассиметричный диметиларгинин (ADMA). ADMA, являясь продуктом распада белков, проникает из цитоплазмы клеток в плазму крови и вступает в непосредственный контакт с эндотелием сосудов, где, имея химическую структуру схожую с L-аргинином, конкурирует с ним за активный сайт ферментов синтаз оксида азота (NOS), ингибируя NOS и предотвращая гиперпродукцию NO. В то же время, при патологическом увеличении уровня ADMA в организме наблюдается нарушение механизмов продукции оксида азота. В настоящее время опубликовано значительное количество экспериментальных и клинических исследований, показывающих тесную взаимосвязь между повышенным уровнем ADMA в крови и различными патологическими состояниями и системными расстройствами,

такими как атеросклероз, гипертония, ишемия, а также почечная недостаточность и сахарный диабет. Во всех указанных исследованиях повышение концентрации ADMA в плазме было ассоциировано со снижением уровня оксида азота, что позволило авторам постулировать основополагающую роль ADMA в регуляции этого эндотелий-релаксирующего фактора (Arrigoni et al., 2010). На животных моделях и волонтерах было показано, что внутривенное введение ADMA способно индуцировать дисфункцию эндотелия, сниженный сосудистый кровоток, повышать сосудистое сопротивление и системное кровяное давление. Таким образом, негативный эффект ADMA в развитии сердечно-сосудистых заболеваний не вызывает сомнений, а поиск молекулярных механизмов его регуляции в организме является актуальной задачей современной физиологии и биохимии.

Помимо экскреции метилированных производных L-аргинина с мочой (~20%) идентифицировано несколько путей метаболизма ADMA. Одним из таких путей является цитоплазматический гидролиз ADMA ферментами диметиларгининдиметиламиногидролазами 1 и 2 (DDAH1 и DDAH2) с образованием цитруллина и диметиламина. Данный путь открыт в 1987 году и к настоящему времени достаточно хорошо изучен (Ogawa et al., 1987a).

Второй известный метаболический путь разрушения ADMA – это трансаминирование ADMA с образованием диметилгуанидино-валериановой кислоты (ADGV) при помощи фермента аланин-глиоксилат аминотрансферазы-2 (AGXT2). AGXT2 – митохондриальная аминотрансфераза, экспрессируемая преимущественно в печени и почках. Помимо ADMA, AGXT2 способна метаболизировать симметричный диметиларгинин (SDMA) (Rodionov et al., 2010a), увеличение содержания которого в плазме крови у человека в настоящее время также связывают с повышенной общей смертностью и предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям (Schlesinger et al., 2016). Исследование физиологической роли данного фермента представляет особый научный интерес, поскольку, с одной стороны, AGXT2 мало изучен, а с другой – метаболизирует сразу несколько субстратов, связанных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

Для того чтобы ответить на вопрос о возможности регулировать уровень ADMA и SDMA, воздействуя на ферментативные реакции с их участием, требуются всесторонние биохимические, физиологические и молекулярно-биологические исследования. Так, несколькими группами исследователей были разработаны подходы, позволяющие понизить его уровень у лабораторных животных *in vivo*. В частности, были созданы мыши, трансгенные по DDAH, осуществляющему цитоплазматический гидролиз ADMA. Однако, существенным недостатком данной трансгенной модели является наличие у нее ряда ADMA-независимых внутриклеточных эффектов. Например, показано, что сверхэкспрессия DDAH стимулирует онкогенез, что ограничивает возможный терапевтический потенциал DDAH при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, ассоциированных с повышенным содержанием ADMA (Kostourou et al., 2002). Создание мышей, трансгенных по AGXT2, позволяет изучить эффекты снижения уровня ADMA и SDMA на сосудистый тонус и в перспективе разработать методы лечения сердечно-сосудистых заболеваний, основанные на сверхэкспрессии данного фермента, при отсутствии дополнительных эффектов на внутриклеточные сигнальные пути.

Целью данного исследования является изучение физиологических и биохимических эффектов трансгенной сверхэкспрессии аланин-глиоксилат аминотрансферазы 2 человека у мышей

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получение линии мышей, трансгенной по hAGXT2, и ее общая фенотипическая характеристика
2. Изучение особенностей экспрессии и локализации гена hAGXT2 на уровне транскрипции и на белковом уровне в различных тканях трансгенных мышей и мышей дикого типа
3. Сравнительный анализ содержания L-аргинина, его метилированных производных (ADMA, SDMA) и продукта их метаболизма ADGV в крови, моче и тканях у трансгенных мышей и мышей дикого типа

4. Исследование влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на эндотелиальную функцию сосудов и параметры кровяного давления у мышей

Научная новизна. В данной диссертационной работе впервые применен комплексный подход, сочетающий в себе молекулярно-биологические, биохимические и физиологические методы, позволяющий делать выводы о физиологической роли hAGXT2. Впервые создана и охарактеризована трансгенная линия мышей по hAGXT2 для изучения эффектов его сверхэкспрессии *in vivo*. Данные о влиянии трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на фенотипические особенности мышей, полученные в результате проведенного исследования, не имеют аналогов в литературе. Получены также новые данные о том, что усиление деградации ADMA с помощью hAGXT2 приводит к улучшению эндотелиальной функции у мышей. Впервые показано, что сверхэкспрессия hAGXT2 не приводит к изменениям параметров кровяного давления у мышей. Новыми и оригинальными являются данные о влиянии AGXT2 на тканевой метаболизм ADMA и SDMA.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование направлено на изучение фундаментальной проблемы физиологии сердечно-сосудистой системы – роли ферментативных механизмов регуляции гомеостаза NO в организме, ключевая роль в которых принадлежит ADMA и метаболизирующим его ферментам (в частности, AGTX2). Характеристика линий мышей с трансгенной сверхэкспрессией hAGXT2, выполненная в рамках данной работы, открывает возможности для изучения новых аспектов физиологических функций AGXT2. Созданная трансгенная модель позволяет не только более детально изучить функции фермента AGXT2, но и дополнить понимание биохимических путей метаболизма ADMA и SDMA. Исследования в рамках данной диссертационной работы представляют несомненный практический интерес, поскольку могут стать базисом для разработки лекарственной терапии, способной модулировать активность AGXT2 и тем самым влиять на уровни ADMA, SDMA и NO в крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Результаты диссертации

используются в курсах лекции по физиологии, читаемых на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета.

Методология и методы исследования. Для выполнения поставленных задач с помощью молекулярно-биологических методов была создана трансгенная линия мышей hAGXT2. Всесторонний анализ экспрессии трансгена проводили с помощью методов ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот. Данные о локализации hAGXT2 получены с помощью иммуноцитохимии с оценкой иммунофлуоресценции на флуоресцентном микроскопе. Изучение влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на метаболизм ADMA и SDMA проводили с помощью метода жидкостной хроматографии высокого разрешения-танDEM масс-спектрометрии (HPLC-MS/MS). Для оценки физиологических эффектов сверхэкспрессии hAGXT2 проводили анализ эндотелиальной функции сосудов *ex vivo* с помощью метода изометрии. Регистрация кровяного давления осуществлялась инвазивно с помощью специальных имплантируемых сенсоров PhysioTel®.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биохимические эффекты трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 включают снижение уровня ADMA в крови, а также увеличение метаболизма ADMA и SDMA в некоторых тканях.
2. Трансгенная сверхэкспрессия hAGXT2 приводит к улучшению эндотелий-зависимой вазодилатации у мышей

Апробация результатов исследования. Результаты исследования были представлены для обсуждения на VII Международном симпозиуме по асимметричному диметиларгинину (2014, Санкт-Петербург, Россия) и Международных конференциях американской ассоциации по сердечно-сосудистым заболеваниям и болезням периферических сосудов (AHA/PVD scientific sessions, 2014 год, Чикаго, США; 2015 год, Сан-Франциско, США).

По теме диссертации опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, и 5 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 309 источников. Диссертация содержит 3 таблицы и 35 рисунков.

Работа поддержана грантом СПбГУ №1.42.515.2013 и DAAD №50024759.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Оксид азота как важнейший биологический регулятор физиологических процессов в организме человека и животных

Оксид азота (NO) - уникальная по своей структуре и свойствам сигнальная молекула, принимающая участие в регуляции огромного числа физиологических и патофизиологических процессов. Он является ключевым регулятором процесса вазодилатации (Moncada et al., 1991), а также участвует в запуске процессов воспаления и регуляции иммунных реакций (Петенкова и др., 2015; Marletta, 1989), нейротрансмиссии (Snyder, Bredt, 1991), модуляции работы нервной системы (Рыжова и др., 2016) снижении агрегации тромбоцитов (Riddel, Owen, 1999), обеспечивает нормальную работу гладкой мускулатуры (Zuckerbraun et al., 2007).

Основным толчком к открытию NO послужили эксперименты, проведенные Furchgott и соавторами в 1980 году на изолированной аорте кролика (Furchgott, Zawadzki, 1980). Было показано, что повреждение или удаление эндотелиальных клеток предотвращает вазодилатацию, вызванную воздействием ацетилхолина. Релаксирующий эффект ацетилхолина также блокировался атропином - известным к тому времени антагонистом мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. Исследователи предположили, что клетки эндотелия в ответ на воздействие ацетилхолина выделяют в окружающую среду вещество, которое взаимодействует с клетками гладкой мускулатуры сосудов и вызывает их расслабление. Данное вещество было названо эндотелиальным релаксирующим фактором (EDRF) (Furchgott et al., 1984). Выработка EDRF стимулировалась также многочисленными гормонами и медиаторами - гистамином, адреналином, норадреналином, серотонином и другими (рис. 1). Позднее, в 1986 году было показано, что EDRF активирует в клетках гладкой мускулатуры растворимую форму гуанилатциклазы - фермента, катализирующего превращение гуанозинтрифосфата (ГТФ) в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) (Ignarro et al., 1986). При этом EDRF быстро разрушался под воздействием супероксид анионов (Rubanyi, Vanhoutte 1986). В то же время, в 1987 в журнале Nature Palmer и соавторами была

опубликована статья, показывающая абсолютно идентичное по временным и количественным характеристикам действие NO и EDRF на сосудистую стенку аорты (Palmer et al., 1987). Все эти экспериментальные факты дали основания предполагать, что EDRF и NO это одна и та же молекула (Vanhoutte, 2009).

Дальнейшие исследования показали важнейшую роль NO в многочисленных биологических процессах в организме, что послужило поводом для того, чтобы назвать оксид азота в 1992 году Молекулой Года (Koshland, 1992).

1.1.1 Молекулярные механизмы действия оксида азота

Физиологическое действие NO обусловлено его химическим строением и большой реакционной способностью. Оксид азота является растворимым в воде бесцветным газом с выраженными липофильными свойствами, молекула которого состоит из одного атома азота и одного атома кислорода и имеет непарный электрон, что превращает ее в высоко реактивный радикал с периодом полураспада 2-30 с, свободно проникающий через биологические мембраны и легко вступающий в реакции с другими соединениями. Характерной особенностью NO является его способность быстро диффундировать через мембрану синтезировавшей его клетки в межклеточное пространство и свободно проникать в клетки-мишени. В этих клетках он выступает в качестве сигнальной молекулы, вызывая пост-трансляционные модификации белков-мишеней, путем различных химических реакций (Малкоч и др., 2000)

В настоящее время общепринятой считается концепция, согласно которой все физиологические эффекты NO разделяются на два типа: прямые и непрямые (рис. 2). При этом прямые эффекты NO преобладают при низких концентрациях последнего ($<1 \mu\text{M}$); непрямые эффекты, напротив, наблюдаются при высоких концентрациях оксида азота ($>1 \mu\text{M}$). Последние опосредованы взаимодействием NO с кислородом (O_2) или супероксид радикалом (O_2^-) с последующим образованием активных форм азота (Davis et al., 2001).

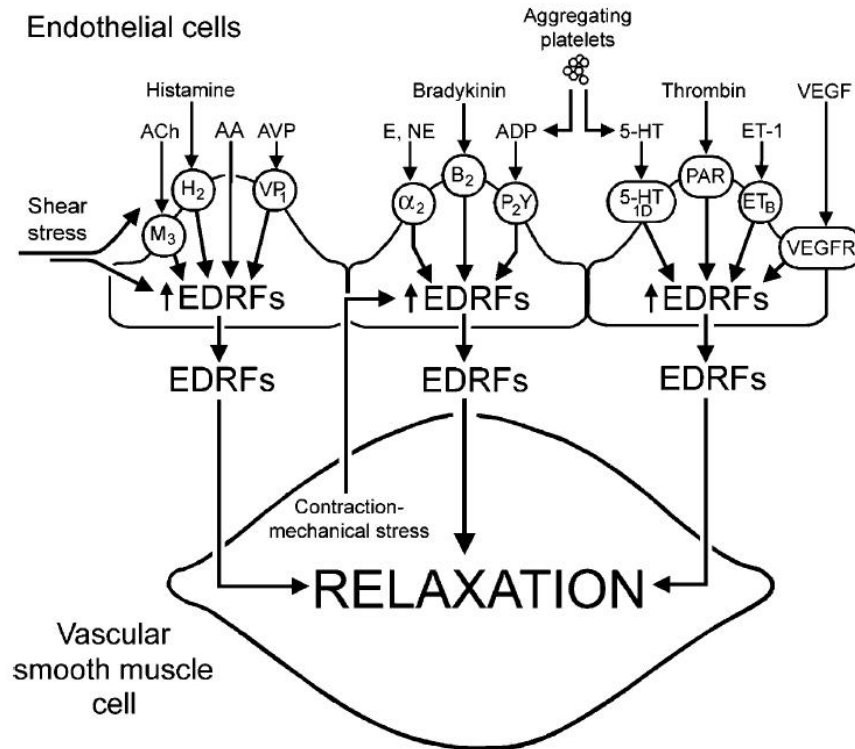


Рисунок 1. Гормоны и медиаторы, которые вызывают выделение EDRF (NO) эндотелиальными клетками через активацию специфических эндотелиальных рецепторов (обозначены кружками) и последующую вазодилатацию

Е - адреналин, АА - арахидоновая кислота, Асh - ацетилхолин, АDР - аденозиндифосфат, α - альфа адренергический рецептор, АVР - аргинин вазопрессин, ЕТ - рецептор эндотелина, Н - рецептор гистамину, 5-НТ - рецептор к серотонину, M_3 - мускариновый холинорецептор, NЕ - норадреналин, Р - пуринергический рецептор, Т - тромбиновый рецептор, VEGF - фактор роста эндотелия, VP_1 - рецептор к вазопрессину) (Vanhoutte et al., 2009b)

Прямые эффекты NO наиболее часто обусловлены его взаимодействием с металлами (Fe^{3+} и Zn^{2+}) железосодержащих и цинк-содержащих белков (Davis et al., 2001). Примером таких взаимодействий является активация с помощью NO растворимой формы гуанилатциклазы, одной из основных молекулярных мишеней оксида азота. Связывание NO с катионом железа в простетической группе гуанилатциклазы приводит к конформационным изменениям и последующей активации данного фермента (Ignarro, 1999; Wolin et al., 1982). Дальнейшее

увеличение уровня цГМФ в клетках-мишенях опосредует огромное количество физиологических эффектов NO - снижение агрегации тромбоцитов, кардиопротекторные эффекты, в том числе вазодилатацию, снижение адгезии лейкоцитов, снижение токсичности TNF и др. (Ignarro, 1999).

Непрямые эффекты NO включают следующие химические реакции: нитрозилирование (присоединение NO^+ к амино-, тиоло- или гидроксигруппам в составе белков), окисление (перекисное окисление липидов, окисление азотистых оснований ДНК), нитрование (присоединение NO_2^+ к остаткам тирозина в составе белков) (Wink, Mitchell, 1998). В водных растворах может происходить аутоокисление NO (с помощью O_2) с образованием азотистого ангидрида (N_2O_3) и дальнейшим гидролизом до нитрозотиолов (Ford et al., 1993). Поскольку скорость аутоокисления NO зависит только от концентрации кислорода и NO, а NO и O_2 в 6-20 раз более растворимы в липидах, чем в воде, то предполагается, что процессы образования N_2O_3 , нитрозилирования тиолов и аминов происходят преимущественно в примембранном пространстве. В дополнение к аутоокислению, NO способен также реагировать с супероксидрадикалом (O_2^-) с образованием пероксинитрита (ONOO^-) (Huie, Padmaja, 1993). Пероксинитрит, обладает ярко выраженными окислительными свойствами, а также является нитрующим агентом и способен вступать в перекисное окисление липидов, модифицировать белки и нуклеиновые кислоты (Рис. 2). Для более глубокого понимания механизмов действия оксида азота целесообразно отдельно рассмотреть химические реакции, в которых он принимает участие.

S-нитрозилирование. В настоящее время выявлена значительная роль реакций S-нитрозилирования в регуляции активности многих белков и ферментативных систем клетки. S-нитрозилирование - это посттрансляционная модификация белков, которая заключается в присоединении NO^+ группы к цистеиновым остаткам белков. При этом не все остатки цистеина в белках способны претерпевать нитрозилирование. Например, у малой ГТФазы $\text{p}21^{\text{Ras}}$ только один из пяти остатков цистеина нитрозилируется (Lander et al., 1995), а у

рианодинового рецептора - 12 из 84 (Xu et al., 1998). Предполагается, что существует определенная консенсусная последовательность для нитрозилирования XYCZ, где X - глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагиновая кислота или глутамин; Y - лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, а Z - аспарагиновая или глутаминовая кислота (Stamler et al., 1997).

GAPDH был одним из первых белков, для которого была показана регуляция активности с помощью реакции нитрозилирования (Molina y Vedia et al., 1992). GAPDH содержит цистеиновый остаток в активном центре фермента, нитрозилирование которого приводит к ингибированию фермента (Molina y Vedia et al., 1992). При этом нитрозилирование GAPDH обратимо и может быть вовлечено, таким образом, в регуляцию гликолиза. Некоторые другие ферментативные системы, включая альдолазу, альдегиддегидрогеназу, гамма-глутамилцистеинил синтетазу подвержены, подобно GAPDH, нитрозилированию в активном сайте и последующей обратимой инактивации (Stamler, 1994).

В настоящее время также показано, что реакции нитрозилирования регулируют работу NMDA рецепторов в мозге. Известно, что активация NMDA рецепторов в мозге опосредует вход ионов кальция в нейроны и последующую продукцию в них оксида азота. Manzoni и соавторы в 1993 году показали, что активность NMDA рецепторов снижается под воздействием эндогенного оксида азота в нейронах (Manzoni, Vockaert, 1993). Позже с помощью экспериментов с сайт направленным мутагенезом было показано, что в основе данных эффектов лежит нитрозилирование цистеина 399 в NR2A субъединице NMDA рецептора (Choi et al., 2000). Такая регуляция активности NMDA рецепторов может лежать в основе нейропротекторной роли NO, а также влиять на процессы синаптической пластичности в мозге.

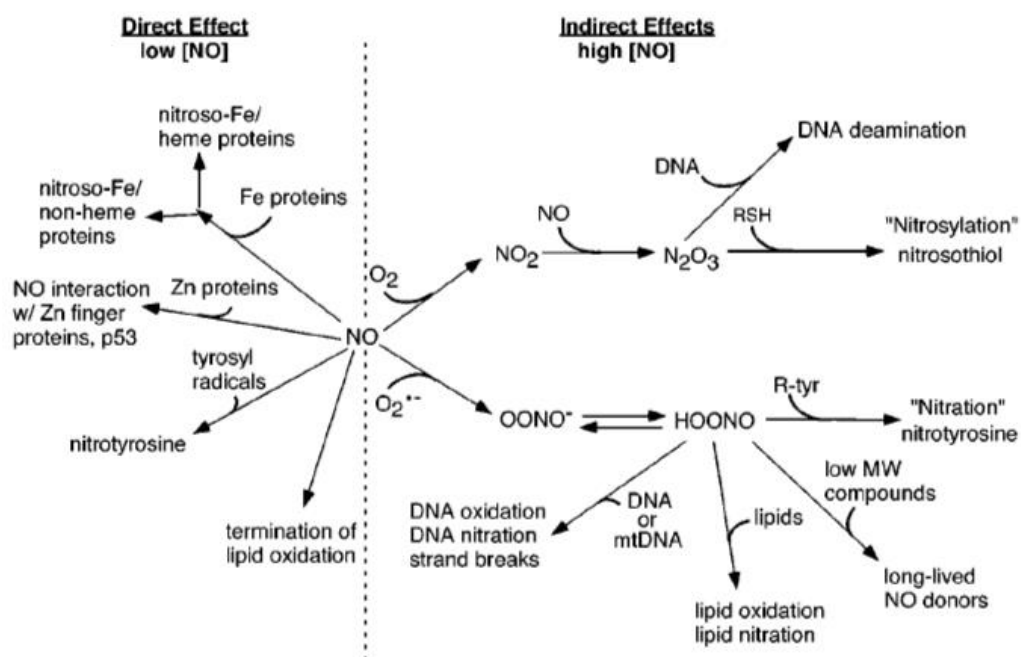


Рисунок 2. Химические реакции, в которые вступает оксид азота (Davis et al., 2001)

В дополнение к GAPDH и NMDA рецепторам, нитрозилирование показано для ряда других белков. Так, нитрозилирование малой ГТФазы p21^{Ras} по цистеину 118 приводит к ее активации и активации MAP-киназного каскада, что в конечном счете увеличивает выживаемость клеток (Lander et al., 1997). Данный эффект NO может усиливаться ингибированием каспаз-1, -2, -3, -4, -6, -7 и -8 также с помощью обратимого нитрозилирования (Li et al., 1997).

Нитрование тирозина. Нитрование тирозиновых остатков с образованием нитротирозина было показано на различных животных моделях и человеке преимущественно при патологии. Данная химическая реакция осуществляется при участии реактивных форм азота, таких как пероксинитрит и оксид азота (IV), а также некоторых ферментативных систем клетки, в частности миелопероксидазы (Mohiuddin et al., 2006). В настоящее время считается, что нитротирозин является маркером NO-зависимого оксидативного стресса и вырабатывается при различных патологических состояниях человека, таких как атеросклероз (Buttery et al., 1996), боковой амиотрофический склероз (Abe et al., 1995), хроническая почечная

недостаточность (Fukuyama et al., 1997), ревматоидный артрит (Kaur, Halliwell, 1994) и ряде других. При этом выработка пероксинитрита и последующее образование нитротирозина показано также и для моделей данных заболеваний человека на животных (Ara et al., 1998; Bruijn et al., 1997). Одним из белков, подверженному нитрованию тирозиновых остатков является простаглицинсинтаза, фермент, отвечающий за образование высокоактивного метаболита арахидоновой кислоты и вазодилатанта - простаглицина. В коронарных артериях быка с помощью моноклональных антител к простаглицинсинтазе и нитротирозину было показано нитрование простаглицинсинтазы, при этом увеличенная иммунореактивность к нитротирозину и эндотелиальная дисфункция наблюдалась в артериях, подверженных атеросклерозу. Данный факт позволил авторам предположить, что нитрование тирозиновых остатков простаглицинсинтазы приводит к ее ингибированию и снижению выработки простаглицина, что в конечном счете изменяет сосудистый тонус в этих сосудах (Zou et al., 1999). Помимо простаглицинсинтазы, нитрованию тирозиновых остатков также подвергаются SERCA2a изоформа кальциевой АТФазы скелетных мышц (Viner et al., 1996), марганец зависимая супероксиддисмутаза SOD (MacMillan-Crow et al., 1996) и ряд других белков, что чаще всего приводит к их ингибированию или нарушению их функционирования.

Свободнорадикальное (перекисное) окисление липидов. Цепные реакции перекисного окисления липидов являются свободнорадикальными и постоянно происходят в организме, при этом важная роль в этих процессах отводится оксиду азота и его высокореактивным производным, которые могут взаимодействовать с ненасыщенными липидами (O'Donnell et al., 1999). Реакции, лежащие в основе данных процессов можно разделить на два типа - окисление и нитрование. В данный момент мало что известно о факторах, определяющих протекание тех или иных реакций, однако ясно одно - роль NO при взаимодействии с липидами различается в зависимости от наличия или отсутствия активных форм кислорода (Rubbo et al., 1994). При отсутствии супероксидрадикалов NO может блокировать окисление липидов, активируя самые разнообразные механизмы - захват

алкильных, пероксильных и алоксильных радикалов, оказывающих повреждающее воздействие на липиды; регуляцию активности циклокси- и липоксигеназ, подавление выработки гидроксил-радикалов и т. д. В присутствии супероксидрадикалов и NO происходит формирование химически активных форм азота, преимущественно пероксинитрита, оказывающих, напротив, разрушающее действие на липиды, что может служить одной из причин атерогенеза и цитотоксичности NO (Radi et al., 1991). В частности, показано, что миелопероксидазная система моноцитов способна преобразовывать липопротеины низкой плотности в NO₂-связанную форму, которая впоследствии деградируется макрофагами с образованием больших количеств холестерина, что впоследствии приводит к образованию атеросклеротических бляшек (Podrez et al., 1999).

Помимо приведенных типов химических реакций оксид азота и его производные могут вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами (преимущественно ДНК) (Burney et al., 1999), вызывая разрыв цепей и мутации, углеводами (Moro et al., 1995) и некоторыми другими классами веществ. Такое широкое разнообразие регуляторных механизмов, в которых принимает участие NO свидетельствует о его центральной роли в работе клеточных систем и обуславливает его чрезвычайно широкий спектр физиологического действия.

1.1.2 Синтазы оксида азота и их физиологическая роль в организме

В клетках млекопитающих синтез оксида азота осуществляется путем аэробного окисления аминокислоты L-аргинина до L-цитруллина и NO (рис. 3). Данный процесс зависит от NADPH и катализируется ферментом - синтазой оксида азота (NOS, NADPH:кислород оксидоредуктаза, EC 1.14.13.39). В настоящее время идентифицировано 3 изоформы NO синтазы - нейрональная (nNOS; NOS I), индуцибельная (iNOS; NOS II) и эндотелиальная (eNOS; NOS III). При этом nNOS и eNOS являются конститутивными изоформами и постоянно экспрессируются преимущественно в мозге и эндотелии сосудов соответственно, а экспрессия iNOS индуцируется в макрофагах и некоторых других типах животных клеток в ответ на инфекционные факторы (Li, Fostermann, 2000). Отличительной особенностью

конститутивных изоформ NOS является их способность активироваться за счет повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (до 200-400 нМ), присоединяя комплекс Ca^{2+} -кальмодулина. В свою очередь, активность iNOS не зависит от концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , так как кальмодулин связывается с ферментом при значительно более низких концентрациях Ca^{2+} (менее 40 нМ), что обусловлено другой аминокислотной последовательностью кальмодулин-связывающего сайта (Hemmens, Mayer, 1998).

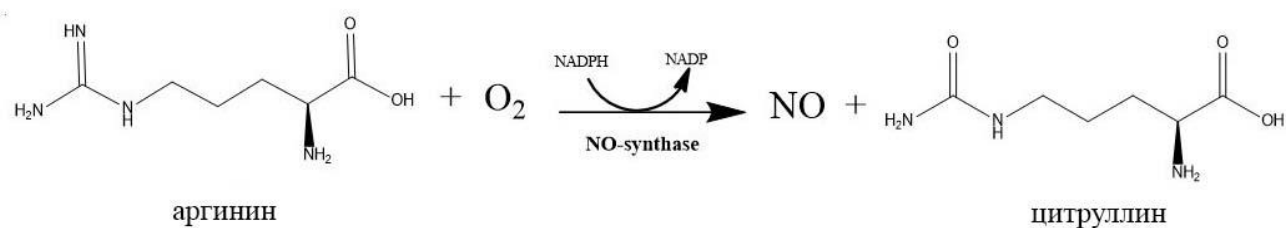


Рисунок 3. Схема синтеза оксида азота с помощью NO синтаз

Все функционально активные изоформы NO синтазы являются гомодимерами, при этом каждая субъединица имеет в своем составе редуктазный (С-концевой) и оксигеназный (N-концевой) домены. Кофакторами для NOS являются NADPH, FAD, FMN и BH_4 (Mayer et al., 1991). Синтез оксида азота протекает в два этапа. На первом этапе NOS гидроксилирует L-аргинин с образованием N^{ω} -гидрокси-L-аргинина, который остается связанным с активным комплексом фермента. Во время второго этапа NOS окисляет N^{ω} -гидрокси-L-аргинин до L-цитруллина и NO. Электрон-транспортная цепь при этом проходит от NADPH через FAD и FMN в редуктазном домене первой субъединицы к иону железа в составе гема оксигеназного домена соседней субъединицы (Stuehr et al., 2001). Следует также отметить, что каждая субъединица NOS содержит ион цинка, который принимает участие в димеризации, но не влияет на энзиматическую активность фермента (Hemmens et al., 2000).

Поскольку действие оксида азота ввиду его короткого периода полураспада реализуется преимущественно паракринно и аутокринно, а изоформы NOS

различаются паттернами экспрессии и механизмами регуляции, физиологическая роль каждой из изоформ NOS также различается.

Нейрональная NO-синтаза. nNOS конститутивно экспрессируется в нейронах головного мозга, а также в спинном мозге, симпатических ганглиях, в эпителиальных клетках внутренних органов, клетках островков Лангерганса поджелудочной железы и скелетных мышцах. Отличительной особенностью строения nNOS по сравнению с другими NOS является наличие PDZ домена, с помощью которого осуществляется взаимодействие nNOS с другими цитоплазматическими белками, которые могут влиять на внутриклеточную локализацию и активность nNOS (Alderton et al., 2001).

Многочисленные исследования последних лет выявили значительный вклад nNOS в модуляции синаптической передачи и участии, таким образом, в процессах обучения, формирования памяти, а также нейрогенеза (Zhou, Zhu, 2009). В частности на животных моделях показано, что введение специфических ингибиторов nNOS снижает обучаемость и приводит к возникновению амнезии. (Böhme et al., 1993) В центральной нервной системе nNOS включается в регуляцию процессов долговременной синаптической пластичности (долговременную потенциацию и долговременную депрессию) (Schuman, Madison, 1991).

В настоящее время считается, что NO, который формируется в клетках центральной нервной системы посредством nNOS участвует также и в центральной регуляции кровяного давления. Так, при прямом введении в мозг крыс ингибитора NO синтаз монометиларгинина наблюдалось увеличение кровяного давления и повышение частоты сердечных сокращений, а также значительное увеличение симпатического тонуса сосудов. При транссекции спинного мозга данный эффект пропадал, в связи с чем был сделан вывод о центральной регуляции оксидом азота системного кровяного давления путем снижения симпатического тонуса сосудов (Sakuma et al., 1992; Togashi et al., 1992).

Помимо центральных механизмов регуляции кровяного давления с помощью nNOS, существуют и периферические механизмы. Оксид азота, вырабатываемый nNOS периферических нитергических нервов рассматривается как атипичный

нейротрансмиттер, который активирует гуанилатциклазу в гладкомышечных клетках и снижает, таким образом, сосудистый тонус. Например, исследования Melikian и соавторов показали, что при введении селективного конкурентного ингибитора nNOS S-метил-тиоцитруллина наблюдалось снижение кровотока в верхних конечностях и коронарной артерии человека. При этом, данный эффект ингибировался введением L-аргинина и не затрагивал классического механизма вазодилатации с помощью eNOS (см. ниже), что позволило сделать вывод о независимом вкладе nNOS в регуляцию тонуса периферических сосудов (Melikian et al., 2009).

Индукцибельная NO-синтаза. iNOS является Ca^{2+} -независимой высокопродуктивной NO-синтазой, экспрессия которой индуцируется в различных тканях и клетках цитокинами, бактериальными липополисахаридами и другими агентами. Показано, что индуцированная iNOS продуцирует в 100-1000 раз больше NO, чем eNOS и nNOS, и ее активность может сохраняться после индукции в течение многих часов (Soskić et al., 2011). Первоначально выявленная в макрофагах iNOS при развитии воспаления, данная изоформа NO-синтазы имеет важнейшее значение для реакций иммунной системы и защиты организма от патогенов. Оксид азота, вырабатываемый макрофагами в высоких концентрациях, способен повреждать ДНК патогенных микроорганизмов, вызывая их фрагментацию и мутации. Кроме того, в связи с высокой афинностью к ионам железа в каталитических центрах многих ферментов оксид азота может ингибировать ключевые процессы транспорта электронов в митохондриях, репликации ДНК и другие. Такая комбинация цитотоксических и цитостатических эффектов NO формирует основу для воздействия на паразитические микроорганизмы, а также некоторые опухолевые клетки. Помимо макрофагов и других клеток иммунной системы, индукция iNOS показана в эндотелии сосудов, где она приводит к лизису опухолевых клеток (Li et al., 1991), а также в гепатоцитах, где активация iNOS приводит к уничтожению спорозоитов малярийного плазмодия (Green et al., 1990). Нарушения механизмов индукции iNOS приводят к различным патологическим состояниям человека, в частности, сердечной недостаточности, сахарному диабету

2 типа, а также к развитию септического шока при инфекционных заболеваниях (Soskić et al., 2011).

eNOS и сердечно-сосудистая система. Эндотелиальная NO синтаза впервые была обнаружена в эндотелии сосудов, а в дальнейшем - в миокарде, эндокарде, а также в некоторых нейронах центральной и периферической нервной системы (Förstermann et al., 1998). Многочисленные исследования показали, что тонус сосудистой стенки в организме обеспечивается постоянным динамическим равновесием между процессами вазоконстрикции, основная роль в которых принадлежит симпатической иннервации и ренин-ангиотензиновой системе, и вазодилатации, ключевым участником которых является NO. Оксид азота, вырабатываемый eNOS в стенках сосудов, является мощным вазодилататором, который по данным Halbrugge и соавторов может компенсировать до 70% базального выброса норадреналина (Halbrügge et al., 1991). При этом блокирование синтеза оксида азота с помощью монометиларгинина приводит к существенной вазоконстрикции периферических сосудов и увеличению кровяного давления до 30% (Rees et al., 1989a; Tresham et al., 1991). Дополняет эти данные также тот факт, что у мышей, нокаутных по eNOS наблюдалась хроническая гипертензия и отсутствие ответа на эндотелий-зависимые релаксанты сосудистой стенки (в частности, ацетилхолин) (Huang et al., 1995).

Помимо вазодилататорных свойств, оксид азота, продуцируемый eNOS, проявляет множество защитных и антисклеротических эффектов на сосуды и играет ведущую роль в защите организма человека от ишемической болезни сердца. При агрегации тромбоцитов в коронарной артерии сердца происходит их активация и последующий выброс серотонина и ADP, что посредством сигнального каскада через G-белки стимулирует выделение NO в эндотелии. Оксид азота, как мощный вазодилататор, вызывает расширение коронарной артерии и приводит к прекращению коагуляционного процесса. Выработка оксида азота не только предотвращает спазм коронарных артерий сердца и их последующий тромбоз, но также ингибирует выработку мощного вазоконстриктора и митогена эндотелина-1. Все эти эффекты сопровождаются снижением агрегации

тромбоцитов и их адгезии к сосудистой стенке. При нарушении работы данной системы наблюдается дисфункция коронарных сосудов сердца и, как следствие, многократно повышается риск инфаркта миокарда (Michel, Vanhoutte, 2010; Vanhoutte et al., 2009a).

Показана также роль оксида азота в контроле экспрессии генов, ответственных за атерогенез. Так, при увеличении активности eNOS в эндотелии сосудов снижается экспрессия белка-хемоаттрактанта MCP-1, молекул клеточной адгезии P-селектина, и ICAM-1, таким образом предотвращается адгезия лейкоцитов и их миграция через стенку эндотелия (что является маркером ранних стадий атерогенеза) (Gauthier et al., 1995). В дополнение к этому наблюдается снижение интенсивности процессов окисления липопротеинов низкой плотности, что также может являться причиной анти-атерогенных свойств NO. Более поздние стадии атерогенеза блокируются NO по цГМФ-зависимому пути через снижение пролиферации гладкомышечных клеток (Dubey et al., 1995). Все вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что eNOS является одним из ключевых защитных факторов для сердечно-сосудистой системы.

1.1.3 Ферментативные и неферментативные механизмы регуляции гомеостаза NO в организме. Эндогенные ингибиторы NO-синтаз

Поскольку NO и его производные опосредуют широкий спектр физиологических эффектов в норме и при многих патологических состояниях, необходимым условием для функционирования данной сигнальной системы является существование тонких регуляторных механизмов, ответственных за поддержание гомеостаза NO в организме. Основными мишенями таких механизмов являются NO-синтазы, активация или ингибирование которых приводит к изменению выработки NO.

Белок-белковые взаимодействия. Одним из первых белков, способных к взаимодействию с NO-синтазами и модуляцией их работы стал кальмодулин. В 1990 году Bredt и Snyder показали, что активность очищенной pNOS из мозжечка крысы напрямую зависит от наличия кальмодулина и ионов Ca^{2+} (Bredt, Snyder,

1990). Дальнейшие исследования показали, что комплекс Ca^{2+} -кальмодулин увеличивает интенсивность транспорта электронов от NADPH к FMN в редуктазном домене конститутивных NO-синтаз, а также опосредует дальнейший перенос электронов к иону Fe^{3+} (Alderton et al., 2001).

Еще одним белком, регулирующим активность NOS оказался молекулярный шаперон Hsp90. Так, активность очищенной eNOS увеличивалась при добавлении к ней очищенного Hsp90 за счет белок-белковых взаимодействий (Bender et al., 1999). В отличие от Hsp90, прямое взаимодействие eNOS с кавеолином-1 в микродоменах плазматической мембраны кавеолах приводило к снижению активности eNOS и ее преимущественной локализации в кавеолах (Ju et al., 1997).

Ковалентные модификации NOS. Показано, что фосфорилирование nNOS и eNOS может влиять на активность данных изоформ NO-синтазы. Например, фосфорилирование eNOS по серину 1179 с помощью протеинкиназы Akt (PKB) приводит к усилению транспорта электронов через ее редуктазный домен, вследствие чего наблюдается повышение уровня синтеза NO. Данная регуляция имеет особенно важное физиологическое значение, поскольку она проявляется при увеличении напряжения сдвига эндотелиальных клеток в случае вазоконстрикции сосудов (в частности, коронарных). Компенсаторная выработка оксида азота ведет в вазодилатации и восстановлению нормального кровоснабжения (Dimmeler et al., 1999).

Эндотелиальная изоформа NOS способна присоединять остатки жирных кислот посредством пальмитоилирования и миристоилирования. Данные процессы происходят котрансляционно и пост-трансляционно и регулируют цитоплазматическую локализацию eNOS и ее активность (Zhou, Zhu, 2009).

Эндогенные ингибиторы NOS. Эндогенный субстрат NOS – L-аргинин сам по себе является ингибитором конститутивной eNOS (Su et al., 1997). Авторы предположили, что фермент eNOS имеет второй центр, имеющий сродство к субстрату (не участвующий непосредственно в процессе окисления субстрата), при связывании с которым стерически ингибируется взаимодействие с тем активным центром, где происходит окисление L-аргинина. В результате такого

взаимодействия исключается возможность связывания L-аргинина с активным центром фермента и ингибируется его каталитическая активность.

В ряде экспериментальных исследований было показано, что введение L-аргинина оказывает влияние на интенсивность вазомоторных реакций *in vivo* (Böger, 2004; Böger et al., 1995; Creager et al., 1992) несмотря на то, что концентрация эндогенного L-аргинина в плазме крови в норме в 30 раз выше константы Михаэлиса-Ментен (K_m) для L-аргинина в реакции, катализируемой очищенной NOS (Creager et al., 1992; Pollock et al., 1991). Сохраняющееся влияние L-аргинина на сосудистый тонус в этих условиях поначалу считалось парадоксальным, поскольку предполагалось, что NOS исходно полностью насыщена субстратом (L-аргинином), и, таким образом, дополнительное экзогенное его введение не должно влиять на интенсивность образования оксида азота (Böger, 2004). Несколько позднее были описаны такие эндогенные гуанидин-метилированные аналоги L-аргинина, как монометил-L-аргинин (L-NMMA), асимметричный диметиларгинин (ADMA) и симметричный диметиларгинин (SDMA) (рис. 4). В настоящее время известно, что два из них, NMMA и ADMA, способны конкурентно ингибировать NOS (Faraci et al., 1995; Rees et al., 1990). Этот факт позволяет объяснить "аргининовый парадокс", поскольку для насыщения NOS в присутствии ее эндогенных ингибиторов может требоваться гораздо более высокая концентрация субстрата, обеспечиваемая, в частности, экзогенным введением последнего.

При физиологических концентрациях L-аргинина и ADMA во внеклеточной среде, внутриклеточные NOS в достаточной степени насыщены L-аргинином, что приводит к нормальной выработке оксида азота. При патологическом повышении концентрации ADMA вне клетки, происходит последующее снижение активности NOS, что ведет к нарушению механизмов выработки оксида азота. Однако, исследования показали, что внутриклеточная концентрация ADMA в норме может быть в 5-20 раз выше таковой в плазме крови (Teerlink et al., 2009). Таким образом, активность NOS зависит от локального соотношения концентраций L-аргинина/ADMA внутри клетки, при этом данный баланс может сдвигаться в ту

или иную сторону при повышении экстраклеточного уровня ADMA или L-аргинина. SDMA, в отличие от ADMA, неспособен оказывать прямого ингибиторного воздействия на NOS, однако является конкурентным ингибитором транспорта L-аргинина (Bode-Böger et al., 2006).

1.2 Метилированные производные L-аргинина и их физиологическая роль в организме

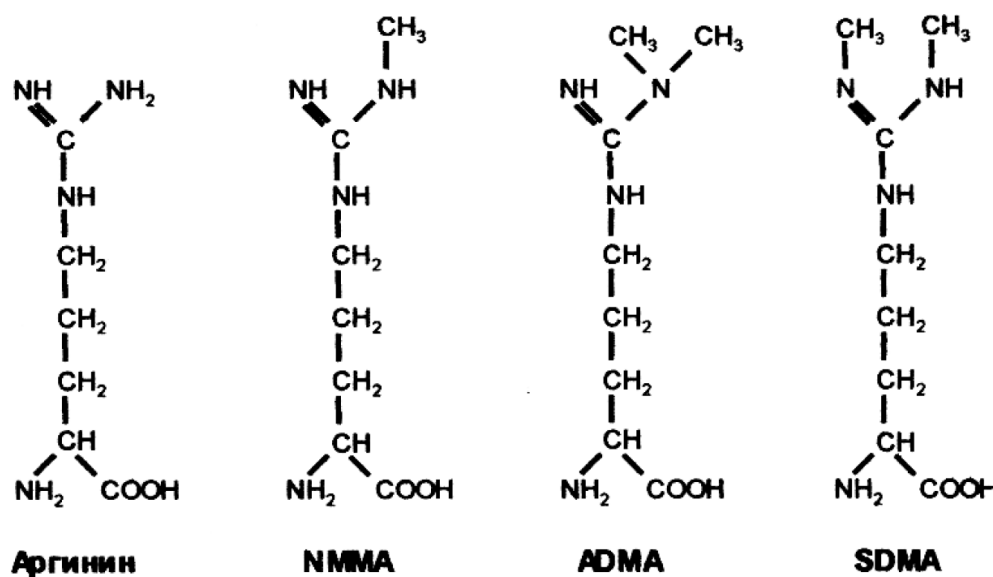


Рисунок 4. L-аргинин и его метилированные производные

L-NMMA. Первоначально L-NMMA был открыт как фармакологический ингибитор NOS в 1988 году на культуре клеток эндотелия, о его эндогенной выработке к тому времени не было известно (Palmer et al., 1988). В дальнейшем этой же группой авторов было описано ингибирование синтеза NO и увеличение системного артериального давления на кроликах (Rees et al., 1989b) и крысах (Whittle et al., 1989). При исследованиях на человеке зафиксировали снижение сосудистого кровотока в легочной артерии на 50% после введения L-NMMA (Vallance et al., 1989). Впоследствии аналогичные эффекты были показаны для ADMA, в то время как действие SDMA на сосудистый кровоток не удалось зафиксировать (Vallance et al., 1992). На интактной аорте крысы было показано дозозависимое увеличение тонуса при введении ADMA. Идентификация ADMA в

плазме крови человека в концентрации в 5 раз выше таковой, чем у L-NMMA, при одинаковом ингибирующем эффекте, позволила постулировать основополагающую роль ADMA как эндогенного регулятора в механизмах выработки оксида азота (Nonaka et al., 2005; Ueno et al., 1990). К сожалению, в настоящее время практически отсутствуют литературные данные по L-NMMA, поскольку подавляющее большинство фундаментальных и клинических исследований сосредоточено на изучении ADMA и SDMA.

ADMA. Асимметричный диметиларгинин был впервые выделен в 1970 году (Maas, 2005) и на данный момент является одним из наиболее активно изучающихся ингибиторов NO-синтаз. Поскольку ADMA является производным L-аргинина, это соединение способно конкурентно ингибировать все известные изоформы синтазы оксида азота. Впервые этот эффект был показан в 1992 году (Vallance et al., 1992). В дальнейшем была показана корреляция уровня ADMA в плазме крови с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (Böger et al., 2005). В настоящее время повышенный уровень ADMA в плазме крови широко признан как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, однако роль ADMA в этиологии и патогенезе данных заболеваний остается невыясненной до сих пор. Относительный вклад ADMA в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний может быть оценен в комбинированных экспериментально-клинических исследованиях посредством определения эффекта терапии, направленной на снижение уровня ADMA, и оценки результатов данной терапии на течение и прогноз заболевания. животных. Этиологическая роль ADMA в сердечно-сосудистых заболеваниях может быть убедительно доказана после разработки специфической терапии, направленной на снижение уровня ADMA. По этой причине разработка препаратов, снижающих уровень ADMA, является в настоящее время одной из наиболее приоритетных задач.

Несмотря на то, что большинство исследований концентрируются на отрицательных эффектах ADMA, необходимо отметить, что данное соединение имеет исключительно важное физиологическое значение в защите организма от гиперпродукции оксида азота, которая крайне негативно сказывается на

функционировании всех систем клетки. Кроме того, предполагается, что существование ингибиторного воздействия на NOS в организме позволяет осуществлять более тонкую регуляцию выработки оксида азота (Kielstein et al., 2009).

SDMA. Поскольку SDMA, в отличие от L-NMMA и ADMA, не может взаимодействовать с NOS напрямую, он долго оставался вне научного поля зрения, и исследований его физиологической роли практически не проводилось вплоть до начала 2000-х годов. Одна из первых работ, показавших ингибиторный эффект SDMA на продукцию оксида азота в культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC, была проведена Bode-Böger и соавторами в 2006 г. (Bode-Böger et al., 2006). Этот эффект был дозозависимым и исчезал при добавлении в клеточную среду L-аргинина. Авторы предположили, что отрицательное воздействие SDMA на выработку оксида азота опосредовано использованием одинаковых транспортеров семейства CAT для L-аргинина и SDMA (Closs et al., 1997) с последующим конкурентным ингибированием транспорта L-аргинина и снижением таким образом его биодоступности для NOS. В настоящее время SDMA рассматривается как фактор риска при сердечно-сосудистых заболеваниях и как независимый маркер для оценки почечной функции в норме и при патологии (Schlesinger et al., 2016; Zoccali et al., 2001).

Исследования внутриклеточного уровня ADMA и SDMA. Несмотря на то, что многие заболевания человека, в том числе, сердечно-сосудистые, ассоциированы с повышенным содержанием ADMA и SDMA в плазме крови (см гл. 1.2.3), мало что известно об их внутриклеточном уровне. При этом общепризнанным считается тот факт, что внутриклеточная концентрация ADMA превышает внеклеточную в 8-12 раз и составляет по данным различных авторов 8-40 мкМ (Böger et al., 2000; Vogle et al., 1995)

Недавние работы показали повышенное содержание ADMA в почках и легких породы крыс, развивающих спонтанную гипертензию (Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2014). Повышение внутриклеточного уровня ADMA было также показано в аортах диабетической модели мышей линии db/db (Li Volti et al., 2011) и в почках

диабетической модели крыс, вызванной стрептозотоцином (Tain et al., 2013), причем эти эффекты сопровождалась хронической гипертензией и почечной недостаточностью у животных. Данные факты свидетельствуют об исключительно важной роли внутриклеточного ADMA в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Недавнее исследование распределения ADMA и SDMA среди различных тканей мышей показало, что ADMA и SDMA максимально детектируются в почках, печени, поджелудочной железе и селезенке, слабо выражены в легких и сердце и практически отсутствуют в мозге (Saigusa et al., 2011). Такие тенденции распределения, вероятнее всего, могут объясняться различной экспрессией ферментов, ответственных за их метаболизм (прежде всего DDAH-1). Несмотря на то, что DDAH-1 экспрессируется согласно данным литературы в почках, печени и мозге, почка и печень считаются основными органами метаболизма избыточных количеств циркулирующего ADMA (Wilcken et al., 2007), что объясняет его повышенное внутриклеточное содержание в этих органах.

В 2010 г. в исследованиях Tain, Sheen и соавторов на модели холестатического повреждения печени у мышей было показано, что изменения плазматических и внутриклеточных концентраций ADMA в различных органах не всегда коррелируют на фоне одного и того же заболевания (Sheen et al., 2010; Tain et al., 2010). Данные работы демонстрируют особую важность одновременного исследования системных и внутриклеточных уровней ADMA для лучшего понимания его роли в патофизиологии различных заболеваний человека.

NO-независимые эффекты ADMA и SDMA. Отдельно стоит отметить наличие альтернативных путей, в которых участвуют метилированные производные L-аргинина. Так, действие ADMA и L-NMMA включает ингибирование цитохрома C, антагонизм мускариновых рецепторов, изменение цикла мочевины и индукцию выработки различных цитокинов (Arrigoni et al., 2010). Значимость таких путей была продемонстрирована на мышах, нокаутных по eNOS: при введении ADMA таким мышам наблюдалось формирование атеросклеротических бляшек и повреждение коронарных сосудов сердца (Suda et al., 2002, 2004). В то же время

экспрессии pNOS и iNOS в данных сосудах обнаружено не было, что исключило возможность ингибирования других изоформ NOS. Интересным также представляется тот факт, что мыши нокаутные по ферменту, метаболизирующему ADMA - DDANH1 летальны на ранних стадиях эмбриогенеза, в то время как тройные нокауты по всем изоформам NOS жизнеспособны, что косвенно подтверждает физиологическую роль ADMA в альтернативных путях (Leiper et al., 2007).

Особую роль в исследованиях NO-независимых эффектов ADMA сыграли транскриптомные исследования Smith и соавторов (Smith et al., 2005). На культуре эндотелиальных клеток человека было продемонстрировано, что патофизиологические концентрации ADMA приводят к изменению экспрессии >50 генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, клеточную пролиферацию, регуляцию транскрипции и метаболизм. В недавнем исследовании Tain и соавторов было показано изменение экспрессии 1221 генов в почках под воздействием ADMA, причем эти изменения задействовали различные сигнальные пути, в том числе MAP-киназный и NOD-like рецепторный (Tain, Hsu, 2016). Все эти факты свидетельствуют о том, что патофизиологическая роль ADMA не ограничивается прямым ингибиторным воздействием на NOS и включает в себя гораздо более сложные механизмы.

Значительно меньше известно о патофизиологической роли SDMA, независимой от NO. Было показано, что SDMA имеет провоспалительные эффекты, способен увеличивать дифференциацию и адгезию лейкоцитов к эндотелию, усиливать экспрессию молекул клеточной адгезии CD11a, CD11b и CD14 в моноцитах и CD18 в гранулоцитах (Schepers et al., 2010). Более того, SDMA участвует в генерации активных форм кислорода в моноцитах, опосредованной внутриклеточным входом кальция (Schepers et al., 2009) и увеличением активности NADPH-оксидазы через Toll-like receptor-2 (Speer et al., 2013). Таким образом, SDMA может быть вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний прямо или опосредованно, обладая прооксидантными и провоспалительными свойствами.

1.2.1 Источники метилированных производных L-аргинина в организме

Метилирование белков представляет собой посттрансляционную модификацию присоединения метильной группы к полипептидной цепи белков с помощью ферментов метилтрансфераз. Эти ферменты утилизируют S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы и катализируют большое число модификаций, которые можно разделить на две группы. Первая группа реакций модифицирует карбоксильную группу с образованием метильных эфиров. Функционально данные реакции регулируют активность белков-мишеней аналогично, например, фосфорилированию и являются обратимыми. Вторая группа реакций, которая обсуждается в настоящей главе, является необратимым присоединением метильной группы к атомам серы или азота некоторых аминокислот. Физиологическая роль таких реакций менее исследована. Метилирование L-аргинина по атому азота принадлежит к данной группе реакций и осуществляется с помощью ферментов протеин-аргинин метилтрансфераз (PRMTs) (Tran et al., 2003).

Активность PRMTs была первоначально идентифицирована Paik и Kim в 1968 году (Paik, Kim, 1968). В настоящее время открыто 9 различных изоформ PRMT, кодируемых разными генами, при этом метилтрансферазная активность показана для всех изоформ, кроме PRMT2 (Anthony et al., 2005; Morales et al., 2016). Как было показано в исследовании Tang и соавт., выполненном на мышах, ведущую роль в продукции ADMA играет первая изоформа PRMT I (Tang et al., 2000).

Известно, что субстратами PRMT являются, в частности, белки процессинга РНК, гистоны и транскрипционные факторы (Anthony et al., 2005). Выделяют три типа PRMT: PRMT I, II и III (рис. 5). Метилтрансферазы первого типа (PRMT-1, 3, 4, 6 и 8) монометируют и ассиметрично диметируют L-аргинин, входящий в состав белков, что приводит к образованию NMMA и ADMA, в то время как PRMT второго типа (PRMT-5 и 9) монометируют и симметрично диметируют L-аргинин, в результате чего образуются NMMA и SDMA (Ghosh et al., 1988; Morales et al., 2016; Rawal et al., 1994). PRMT-7 участвует только в реакциях

монометилирования и приводит к образованию NMMA. Таким образом, PRMT первого типа являются единственными известными ферментами, ответственными за генерацию ADMA у млекопитающих.

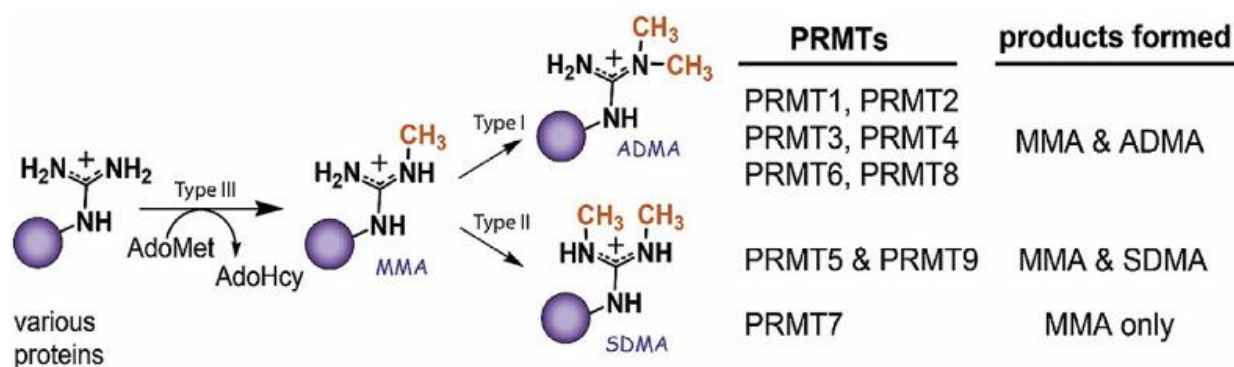


Рисунок 5. Классификация PRMTs (Morales et al., 2016)

Единственным известным на данный момент ферментом, способным осуществлять деметилирование L-аргинина внутри полипептидной цепи, является JMJD6 (Böttger et al., 2015; Chang et al., 2007), однако ее функциональная роль остается невыясненной к настоящему времени.

Метилированные производные L-аргинина могут быть метаболизированы в клетке или транспортированы в межклеточное пространство и плазму крови. Данный транспорт осуществляется с помощью катионных транспортеров аминокислот семейства CAT, среди которых основную роль играют CAT-1, CAT-2A и CAT-2B (Teerlink et al., 2009). Было показано, что данные транспортеры селективны в отношении ADMA, SDMA и L-аргинина и способны осуществлять их Na-независимый транспорт по типу у+ (Teerlink et al., 2009). Однако детальные механизмы этого транспорта и их регуляция неизвестны и активно изучаются в настоящее время.

1.2.2 Пути метаболизма и выведения ADMA и SDMA

Организм человека вырабатывает в сутки примерно 60 мг (~300 мМ) ADMA. При этом $\approx 20\%$ экскретируются вместе с мочой (Achan et al., 2003). Остальные 80% метаболизируются с помощью специальных ферментативных систем, куда входят белки DDAH1, DDAH2 и AGXT2 (Rodionov et al., 2010a). Концентрация SDMA в плазме крови в несколько раз ниже и его клиренс почти полностью зависит от почечной экскреции (Böger, 2003; Tain, Hsu 2017). Единственным на данный момент ферментом, способным метаболизировать SDMA, является AGXT2 (Rodionov et al., 2014a, b). Относительно L-NMMA литературные данные практически отсутствуют, за исключением того, что его содержание в плазме крови и тканях значительно ниже, чем у ADMA и SDMA (Ueno et al., 1992). Дегградация L-NMMA может осуществляться также с помощью ферментов DDAH1, DDAH2 и AGXT2 (Rodionov et al., 2014a). Отдельного внимания заслуживает третий путь метаболизма метилированных производных L-аргинина, открытый нашей группой, – ацетилирование ADMA и SDMA, которое происходит преимущественно в почках, печени и тонком кишечнике (Rodionov et al., 2016). Однако ферменты, ответственные за осуществление данных реакций, к настоящему времени не открыты, а физиологическая роль данного пути остается неизученной до сих пор.

Таким образом, в настоящее время идентифицировано три пути метаболизма метилированных производных L-аргинина: цитоплазматический гидролиз с помощью DDAH1/2, трансаминирование с помощью AGXT2 и ацетилирование, механизмы которого к настоящему моменту неизвестны. При этом, первый путь ферментативной дегградации ADMA является наиболее изученным (Maas, 2005; Singh, 2007).

DDAH1 был открыт в 1987 году (Ogawa et al., 1987a, 1987b, 1989), а DDAH2 был открыт независимо в 1999 году (Leiper et al., 1999; Tran et al., 2000). Показано, что DDAH2 демонстрирует 62% гомологию аминокислотно последовательности и 63% гомологию нуклеотидной последовательности по отношению к DDAH1 (Tran et al., 2003). Ген DDAH1 человека локализован на 1 хромосоме (локус 1p22), а ген DDAH2 на 6 хромосоме (локус 6p21.3) (Tran et al., 2000). Обе DDAH человека имеет

молекулярную массу 30 кДа и состоят из 285 а.о., функционируя в виде гомодимеров (Ogawa et al., 1987b). На данный момент DDAH1 изучен намного больше, чем DDAH2. Факт, что DDAH1 способен метаболизировать ADMA в настоящее время доказан, в то время как сведения относительно DDAH2 носят противоречивый характер.

DDAH1 метаболизирует асимметричные диметиларгинины (ADMA и NMMA) с ADMA с образованием диметиламина (в случае разрушения ADMA) или метиламина (в случае разрушения NMMA) (EC 3.5.3.18) (рис. 6). На данный момент отсутствуют данные, свидетельствующие о необходимости кофакторов в этой реакции. Очищенный DDAH1 имеет оптимум pH по разным данным от 5,2 до 6,5 (Ogawa et al., 1987b, 1989). Его температурный оптимум 55°C (Ogawa et al., 1989). Очищенный фермент стабилен при 37°C при нейтральном pH в течение приблизительно 1 часа (Leiper et al., 1999; Ogawa et al., 1987a, 1989; Tran et al., 2000). DDAH1 содержит атом Zn(II), который не задействован в катализе, но значим для стабилизации фермента. При этом освобождение Zn(II) приводит фермент в активную конформацию (Knipp et al., 2001).

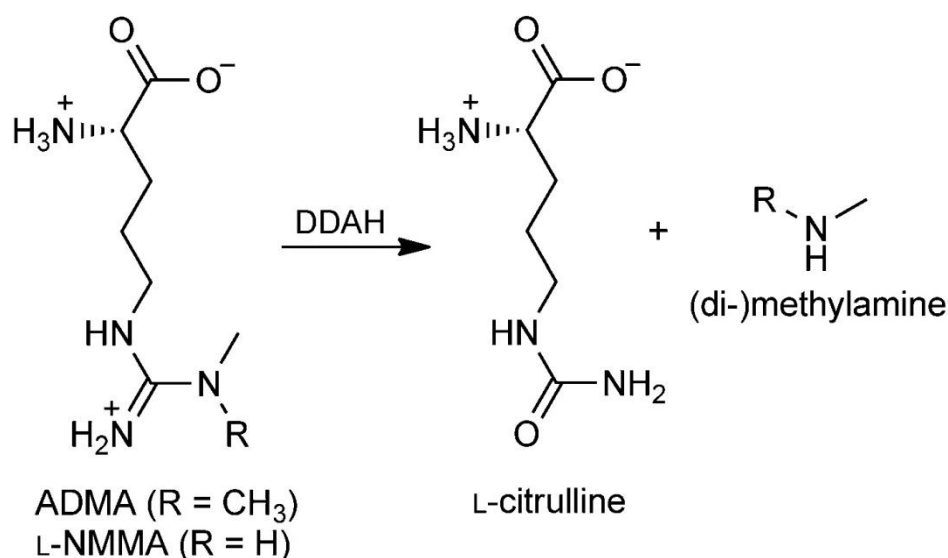


Рисунок 6. Гидролиз ADMA или NMMA с образованием L-цитруллина и диметиламина (в случае разрушения ADMA) или метиламина (в случае разрушения NMMA) с помощью DDAH (Altmann et al., 2012).

Детальная схема метаболизма L-аргинина, ADMA и NO представлена на рис. 7. DDAH1 специфичен по отношению к ADMA, но он неспособен метаболизировать SDMA (симметричный диметиларгинин). Это объясняется пространственной структурой DDAH1. Активный центр данного фермента формирует пору, которая при связывании неметилированной аминокислоты ADMA закрывается петлёй, закоривая таким образом ADMA. Поскольку в случае SDMA обе аминокислоты метилированы, он не может связаться с активным сайтом DDAH1 (Murray-Rust et al., 2001). Кристаллическая структура DDAH1 на данный момент подробно изучена (Leiper et al., 2007). Белок имеет форму пятилопастного пропеллера (5 $\beta\alpha\beta$ «лопастей») с отрицательно заряженным каналом в центре, в которого и расположен активный сайт фермента. Он содержит остатки гистидина, аспарагиновой кислоты и цистеина, которые катализируют гидролиз боковой цепи L-аргинина (Murray-Rust et al., 2001) (рис. 8). Эта триада аминокислот активного центра консервативна среди всех видов, последовательности DDAH1 которых сравнивались на данный момент (Frey et al., 2006; Leiper et al., 2002; Murray-Rust et al., 2001). Предполагается, что в силу консервативности пространственная структура DDAH2 аналогична таковой у DDAH1 (Palm et al., 2007)

Обе изоформы DDAH локализуются в цитоплазме клетки (Birdsey et al., 2000; Murray-Rust et al., 2001). В то же время недавно были получены сведения, что DDAH2 способен транслоцироваться в митохондрии под действием IL-1 β (Cillero-Pastor et al., 2012). DDAH1 экспрессируется преимущественно в почках (Ogawa et al., 1987a, 1989), перитонеальных нейтрофилах и макрофагах, а также в печени и мозге (Kimoto et al., 1993; Tran et al., 2000), в то время как DDAH2 - преимущественно в клетках эндотелия сосудов (Achan et al., 2002; Wang et al., 2007). Таким образом, предполагается, что DDAH1 играет ключевую роль в понижении уровня циркулирующего ADMA в плазме крови системно, а DDAH2 - на уровне отдельных клеток эндотелия, что может играть важную физиологическую роль, т.к. в этих клетках функционирует эндотелиальная изоформа NO-синтазы, ингибитором которой является ADMA (Palm et al., 2007).

Обе изоформы DDAH колокализуются в клетке с NO-синтазами (Onozato et al., 2008; Tojo et al., 1997, 2000).

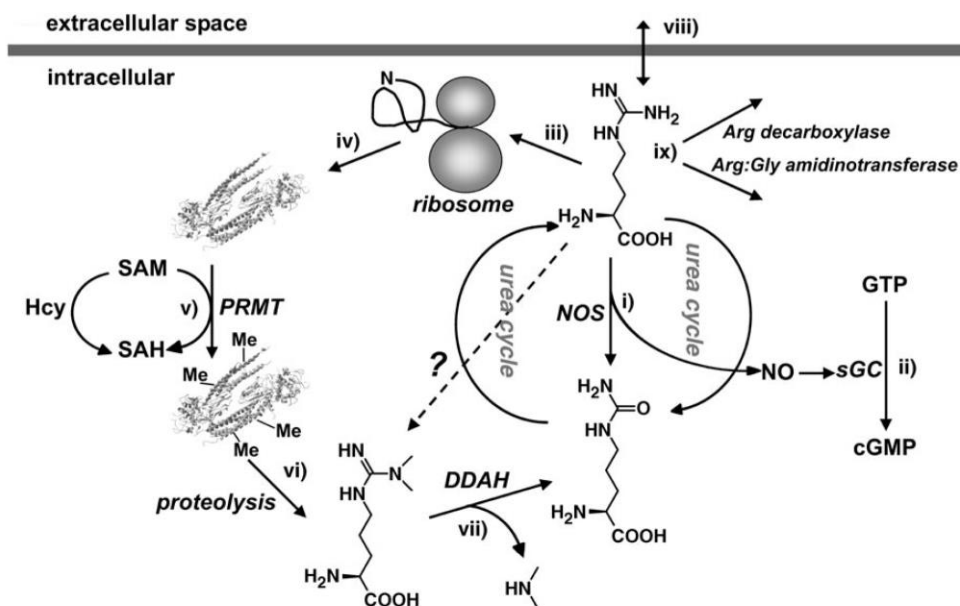


Рисунок 7. Схема метаболизма L-аргинина, ADMA и NO. i) NO-синтаза разрушает L-аргинин с образованием L-цитруллина и NO; ii) NO активирует гуанилатциклазу (sGC), которая преобразует ГТФ в циклический ГМФ; iii) аргинин-тРНК-синтаза образует L-аргинин-тРНК; iv) L-аргинин-тРНК используется рибосомой при синтезе белка; v) PRMT посттрансляционно метилируют остатки L-аргинина в белках, при этом образуются остатки NMMA, SDMA и ADMA. S-аденозилметионин (SAM) используется как донор метильной группы в этой реакции. При отщеплении метильной группы он превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH); vi) NMMA, SDMA и ADMA (показан только ADMA) освобождаются при протеолизе; vii) DDAH гидролизует ADMA с образованием L-цитруллина и $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$, активируя таким образом продукцию NO; ?) метаболический путь прямого метилирования свободного L-аргинина пока не выявлен; viii) Внутриклеточная концентрация NMMA, SDMA и ADMA регулируется также за счёт их транспорта в межклеточное пространство и обратно. Кроме того, преобразование L-аргинина в L-цитруллин и обратно происходит также в цикле мочевины; ix) L-аргинин также является субстратом для аргинин-декарбоксилазы и аргинин-глицин аминотрансферазы (Knipp, 2006)

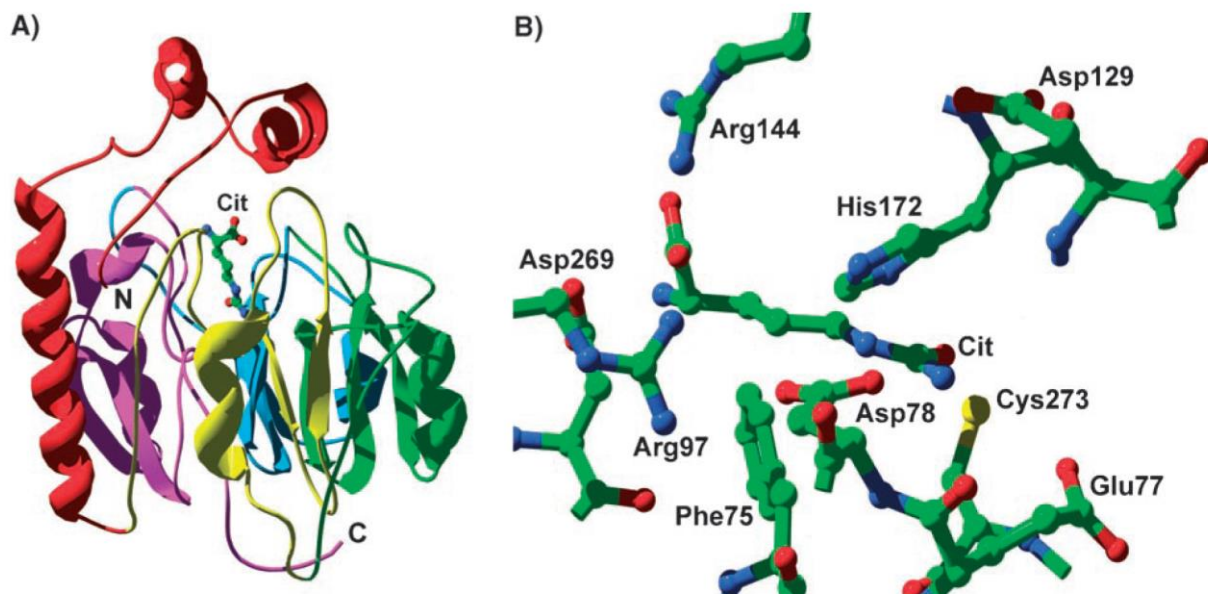


Рисунок 8. Структура и механизм действия DDANH1 млекопитающих. А) Структурная модель DDANH1 быка (Knipp et al., 2003). 5 $\beta\alpha\beta$ «лопастей» отмечены красным, жёлтым, зелёным, синим и фиолетовым, начиная с N-конца. L-цитруллин изображён в активном центре белка. В) Палочно-шаровая модель связывания L-цитруллина в активном центре DDANH1 (окраска атомов: C – зелёный, N – синий, O – красный, S – жёлтый). Карбоксильная группа L-цитруллина связана водородными связями с Arg144 и Arg97, аминогруппа с Asp269. Asp78 образует водородную связь с N_z и N_h , Глу77 с N_h L-цитруллина (Knipp, 2006).

Известны медицинские последствия некоторых мутаций в гена DDANH1 и DDANH2. Носители гомозиготной мутации 449G в кодирующей области гена DDANH2 имеют вдвое повышенный шанс сосудистых осложнений после операций на сердце, что связывается с пониженной устойчивостью сосудов к стрессу вследствие недостатка активности DDANH2 (Ryan et al., 2006). Известен SNP в кодирующей области DDANH1, у носителей которого в 50 раз чаще наблюдается коронарная недостаточность и повышенное кровяное давление, что также связывается с повышением уровня ADMA в плазме крови (Valkonen et al., 2005).

Гомозиготная делеция гена DDANH1 у мышей приводит к их смерти ещё до рождения, а у мышей +/- по DDANH1 наблюдается повышенный уровень ADMA и пониженный уровень NO (Leiper et al., 2007). Линий мышей с делецией DDANH2 на

данный момент пока не получено. В связи с нежизнеспособностью нокаутных мышей по DDAN1, были проведены опыты по его временному нокауту. Уровень экспрессии DDAN1 был понижен на 30-40% при помощи введения малых интерферирующих РНК (siRNA). При этом концентрация ADMA в плазме крови увеличивалась на 20-30% (Wang et al., 2007). Аналогичный эксперимент с использованием siRNA к DDAN2 достоверного эффекта на системные уровни ADMA не показал (Wang et al., 2007).

Напротив, эндотелиальная функция сосудов брыжейки у мышей с нокаутом DDAN1 не изменялась, в то время как нокаут второй изоформы DDAN приводил к значительному снижению их ацетилхолин-зависимой вазодилатации и снижению выработки NO. В другом исследовании не было показано активности DDAN2 по отношению к метиларгинам: в лизатах тканей свиней, экспрессирующих DDAN2, но не экспрессирующих DDAN1 (селезёнка, сердце, мозг, щитовидная железа) не было детектировано (ди)метиларгинин-(ди)метиламиногидролазной активности (Altmann et al., 2012). При этом консервативность последовательности DDAN2 между различными видами млекопитающих составляет приблизительно 95%, поэтому есть основания полагать, что это наблюдение можно экстраполировать на людей (Altmann et al., 2012).

Таким образом, на данный момент ключевая роль DDAN1 в метаболизме ADMA доказана, в то время как в случае DDAN2 этот факт ещё вызывает сомнения. Всё это делает DDAN1 перспективной мишенью для коррекции уровня ADMA в плазме крови. В то же время, существуют данные, что повышение активности DDAN1 способствует васкуляризации раковых опухолей, что способствует их ускоренному росту и метастазированию (Kostourou et al., 2002, 2003, 2004). Это накладывает серьёзные ограничения на возможности применения таких подходов в клинике.

Таким образом, в настоящее время сформировалась необходимость в поиске альтернативных подходов к манипуляции уровнем ADMA в крови и последующей разработке на их основе новых лекарственных препаратов широкого спектра

действия для терапии гипертензии и связанных патологических состояний.

Одним из таких подходов явилось изучение другого фермента, ответственного за метаболизм ADMA, SDMA и L-NMMA - аланин-глиоксилат аминотрансферазы 2 (AGXT2) (Rodionov et al., 2010a). Данный фермент был открыт сравнительно недавно и лишь в 2013 году было показано его участие в регуляции уровня асимметричного диметиларгинина в плазме крови мышей *in vivo* (Kittel et al., 2013). Детальному описанию данного фермента посвящена глава 1.3.

1.2.3 Клинические состояния, вызванные повышением уровня ADMA и SDMA в плазме крови

Согласно литературным данным физиологическая концентрация ADMA в плазме крови человека колеблется от 0,3 до 1,4 мкМ (Jacobi, Tsao, 2008). При этом концентрация ADMA не зависит от пола, однако, выявлены достоверные различия среди разных возрастных групп у людей (Tsikas, 2008). У новорожденных концентрация ADMA составляет 1.06 М и снижается ко второму постнатальному дню до значения 0.6 мкМ (Vida et al., 2007). У детей содержание ADMA в плазме крови в среднем выше, чем у взрослых людей и снижается вплоть до 25 лет со скоростью около 15 нМ в год (Lücke et al., 2007). При этом, у взрослых здоровых людей средняя концентрация ADMA составляет 0.4-0.6 мкМ (Horowitz, Heresztyn, 2007). Согласно исследованиям Faraci и соавторов на лизатах головного мозга крыс концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) активности NO-синтаз с помощью ADMA составила 2 мкМ (Faraci et al., 1995). В то же время в макрофагах, индуцированных липополисахаридом, аналогичной концентрации ADMA было достаточно для ингибирования iNOS лишь на 17% (Fickling et al., 1993). С другой стороны, известно, что внутриклеточные концентрации ADMA значительно превышают таковые в плазме крови, в частности в клетках эндотелия сонной артерии кролика концентрация ADMA может достигать значений в 5 мкмоль/л (Masuda et al., 1999). Таким образом, есть все основания полагать, что ADMA присутствует в организме человека в физиологически активных концентрациях и регулирует гомеостаз NO как на системном, так и на локальном уровне.

В экспериментах на здоровых добровольцах и лабораторных животных было показано, что при инфузии ADMA происходит дисфункция эндотелия плечевой артерии (Vallance et al., 1992), снижение кровотока в почках (Kielstein et al., 2004), снижение перфузии головного мозга (Kielstein et al., 2006a) и другие эффекты, связанные с вазоконстрикцией. Эти и некоторые другие работы спровоцировали огромный всплеск клинических исследований, направленных на поиск взаимосвязей уровня ADMA в крови с патологическими состояниями и заболеваниями человека.

В настоящее время известно, что повышение уровня ADMA в плазме крови ассоциировано с развитием эндотелиальной дисфункции и прогрессированием на ее фоне различных сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений, в том числе повышенным кровяным давлением (Fleck et al., 2003; Surdacki et al., 1999), гиперхолестеринемией (Böger et al., 1998), гипергомоцистеинемией (Korandji et al., 2007; Rodionov, Lentz, 2008), сахарным диабетом 2 типа (Abbasi et al., 2001; Stühlinger et al., 2002), гипертриглицеридемией (Lundman et al., 2001), хронической почечной недостаточностью (Fleck et al., 2003; Zoccali et al., 2001) и другими патологиями. Была также выявлена повышенная смертность у пациентов, перенёсших инфаркт миокарда и имеющих повышенный уровень ADMA, по сравнению с пациентами с нормальным его уровнем (Dückelmann et al., 2007; Korandji et al., 2007; Schnabel et al., 2005). При этом увеличение уровня ADMA в плазме крови на фоне перечисленных выше заболеваний составляло от 2 до 10 раз.

Стоит отметить, что большая часть заболеваний, ассоциированных с повышением ADMA, поражает как мужчин, так и женщин, однако, некоторые из них встречаются только у женщин, в частности, преэклампсия (Pettersson et al., 1998), синдром поликистоза яичников (Charitidou et al., 2008) и первичная дисменорея (Akdemir et al., 2010). Кроме того, идентифицировано несколько патологий у детей, протекающих на фоне увеличенной концентрации ADMA в плазме крови: недоношенность (Wang et al., 2006), наследственные дефекты ферментов цикла мочевины (Nagasaka et al., 2009) и транзиторное тахипноэ новорожденных (Isik et al., 2016). Полный список патологических состояний и

заболеваний человека, которые сопровождаются повышением ADMA в плазме крови представлен в таблице 1.

Таблица 1. Клинические состояния, ассоциированные с повышением ADMA

Заболевание	Число исследованных пациентов	Дата первого упоминания в литературе	Ссылка на исследование
Хроническая болезнь почек	>1500	1992	(Schlesinger et al., 2016; Vallance et al., 1992)
Шизофрения	16	1996	(Das et al., 1996)
Детская гипертензия	38	1997	(Goonasekera et al., 1997)
Периферическая артериальная окклюзионная болезнь	77	1997	(Böger et al., 1997)
Гиперхолестеринемия	49	1998	(Böger et al., 1998)
Застойная сердечная недостаточность	84	1998	(Usui et al., 1998)
Преэклампсия	12	1998	(Pettersson et al., 1998)
Сахарный диабет 2 типа	50	2000	(Fard et al., 2000)
Врожденный порок сердца	20	2001	(Gorenflo et al., 2001)
Инсульт	52	2001	(Yoo, Lee, 2001)
Тиреотоксикоз	19	2002	(Hermenegildo et al., 2002)
Критические состояния в реанимации	52	2003	(Nijveldt et al., 2003)

Цирроз печени	11	2004	(Lluch et al., 2004)
Сахарный диабет 1 типа	408	2004	(Tarnow et al., 2004)
Ожирение	563	2004	(Eid et al., 2004)
Заболевание	Число исследованных пациентов	Дата первого упоминания в литературе	Ссылка на исследование
Системная красная волчанка	107	2005	(Bultink et al., 2005)
Идиопатическая легочная артериальная гипертензия	57	2005	(Kielstein et al., 2005)
Гепаторенальный синдром	11	2006	(Lluch et al., 2006)
Ишемическая болезнь сердца	145	2006	(Wang et al., 2006)
Недоношенность детей	19	2006	(Mittermayer et al., 2006)
Системный склероз	21	2006	(Dooley et al., 2006)
Синдром поликистоза яичников	106	2008	(Charitidou et al., 2008)
Синдром обструктивного апноэ	34	2008	(Ozkan et al., 2008)
Врожденные дефекты ферментов цикла мочевины	15	2009	(Nagasaka et al., 2009)
Ревматоидный артрит	25	2009	(Turiel et al., 2009)
Серповидноклеточная анемия	177	2009	(Kato et al., 2009)

Врожденные портосистемные венозные шунты	14	2010	(Nagasaka et al., 2010)
Первичная дисменорея	33	2010	(Akdemir et al., 2010)
Воспалительные заболевания кишечника	63	2010	(Owczarek et al., 2010)
Астма	17	2011	(Scott et al., 2011)
Неалкогольная жировая болезнь печени	35	2011	(Kasumov et al., 2011)
Псориазный артрит	22	2011	(Atzeni et al., 2011)
Заболевание	Число исследованных пациентов	Дата первого упоминания в литературе	Ссылка на исследование
Фибромиалгия	27	2011	(Topal et al., 2011)
Острая лимфобластная лейкемия у детей	25	2012	(Sulicka et al., 2012)
Глаукома	210	2012	(Javadiyan et al., 2012)
Феохромоцитома	18	2013	(Vasilev et al., 2013)
Бруцеллез	39	2014	(Mengeloglu et al., 2014)
Глубокий венозный тромбоз	34	2015	(Senol et al., 2015)
Низкий рост	66	2015	(Langen et al., 2015)
Хроническая обструктивная болезнь легких	58	2015	(Aydin et al., 2015)

Ноктурия	262	2015	(Obayashi et al., 2015)
Неонатальный сепсис у новорожденных	31	2015	(Aydemir et al., 2015)
Транзиторное тахипное новорожденных	36	2016	(Isik et al., 2016)
Идиопатическая болезнь Паркинсона	82	2016	(Kirbas et al., 2016)

Несмотря на то, что большая часть клинических исследований посвящена роли ADMA в сердечно-сосудистых патологиях, роль SDMA в этих заболеваниях также активно изучается в последнее время. В 2006 году мета-анализ SDMA Kielstein и соавторов показал корреляцию его системного уровня с функцией почек (Kielstein et al., 2006b), что позволило авторам в дальнейшем использовать его в качестве маркера почечной недостаточности (Kielstein et al., 2011). Как и в случае с ADMA, повышенные уровни SDMA отмечены при гипертензии (Hermenegildo et al., 2002), ишемической болезни сердца (Wang et al., 2006), сахарном диабете (Krzyzanowska et al., 2007), преэклампсии (Braekke et al., 2009), инсульте (Schulze et al., 2010), синдроме поликистоза яичников (Lakhani et al., 2011) и гиперурикемии (Tenderenda-Banasiuk et al., 2013). Аналогично ADMA, повышение SDMA в плазме крови связано с повышением общей смертности и частотой сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений (Kielstein et al., 2006b; Schlesinger et al., 2016). Полный список клинических состояний человека, в которых показано повышенное содержание SDMA представлен в таблице 2.

Таблица 2. Клинические состояния, ассоциированные с повышением SDMA

Заболевание	Число исследованных пациентов	Дата первого упоминания в литературе	Ссылка на исследование
Хроническая болезнь почек	10	1996	(Kielstein et al., 2006b; MacAllister et al., 1996a)
Детская гипертензия	38	1997	(Goonasekera et al., 1997)
Тиреотоксикоз	19	2002	(Hermenegildo et al., 2002)
Критические заболевания в реанимации	52	2003	(Nijveldt et al., 2003)
Гепаторенальный синдром	11	2006	(Lluch et al., 2006)
Ишемическая болезнь сердца	145	2006	(Wang et al., 2006)
Сахарный диабет 2 типа	103	2007	(Krzyzanowska et al., 2007)
Заболевание	Число исследованных пациентов	Дата первого упоминания в литературе	Ссылка на исследование
Алкогольный гепатоз	52	2007	(Mookerjee et al., 2007)
Сердечная недостаточность	132	2008	(Tang et al., 2008)
Преэклампсия	47	2009	(Braekke et al., 2009)

Инсульт	394	2010	(Schulze et al., 2010)
Синдром поликистоза яичников	16	2011	(Lakhani et al., 2011)
Глаукома	210	2012	(Javadiyan et al., 2012)
Гиперурикемия	58	2013	(Tenderenda-Banasiuk et al., 2013)
Малярия	123	2014	(Weinberg et al., 2014)

Принимая во внимание вышесказанное, на данный момент роль ADMA и SDMA как независимых факторов риска развития сердечно-сосудистых и других заболеваний, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией и пониженным уровнем NO в плазме крови, считается доказанной, однако их роль в этиологии и патогенезе данных заболеваний еще предстоит выяснить. Для того, чтобы определить терапевтическую и прогностическую эффективность снижения уровня ADMA и SDMA, потребуются комплексные клинические и экспериментальные исследования.

1.2.4 Модели для изучения физиологической роли асимметричного диметиларгинина

В целях изучения физиологической роли ADMA, а также для выяснения патогенетических механизмов заболеваний, так или иначе связанных с изменениями метаболизма ADMA, несколькими группами исследователей были разработаны подходы, позволяющие повысить или понизить его уровень у лабораторных животных. Подобные стратегии могут привести к появлению новых диагностических и терапевтических методов борьбы с сердечно-сосудистыми

заболеваниями, которые сохраняют лидирующую позицию среди причин смертности в большинстве стран мира.

Модели повышения уровня ADMA. В 1992 году Vallance и соавторы в пионерской работе показали, что внутривенная инфузия ADMA вызывает эндотелиальную дисфункцию плечевой артерии у здоровых волонтеров (Vallance et al., 1992). В дальнейшем Kielstein и соавт. продемонстрировали, что внутривенное введение ADMA у людей вызывает снижение кровотока в почках с одновременным повышением сопротивления сосудистой сети почки, что вызывало задержку натрия и повышение артериального давления (Kielstein et al., 2004). Той же группой авторов на здоровых лицах было показано, что инфузия ADMA приводит к снижению перфузии головного мозга и увеличению ригидности мозговых артерий. Во всех проведенных исследованиях увеличение концентрации ADMA в крови было связано со снижением биодоступности NO, что позволило авторам постулировать ключевую роль ADMA в регуляции активности NOS (Родионов и др., 2008).

Другой подход, используемый для увеличения уровня ADMA в эксперименте, базируется на снижении экспрессии DDANH и AGXT2. В 2007 году Vallance и соавторы на модели нокаутных мышей продемонстрировали, что снижение экспрессии DDANH1 приводит к увеличению уровня ADMA в плазме и впоследствии к эндотелиальной дисфункции (Leiper et al., 2007). Кроме того, используя siRNA для блокады DDANH2, Wang и соавторы обнаружили, что прекращение функционирования фермента вызывает эндотелиальную дисфункцию артериол брыжейки у мышей (Родионов и др., 2008). В то же время, в результате исследований Carlin и соавторов на модели AGXT2-нокаутных мышей было показано увеличение в плазме крови содержания всех трех метиларгининов: ADMA, SDMA и L-NMMA. При этом на фоне эндотелиальной дисфункции и пониженной выработки оксида азота у мышей развивалась хроническая гипертензия.

Таким образом, уменьшение активности какой-либо из изоформ DDANH или AGXT2 вызывает эндотелиальную дисфункцию, однако, в случае с DDANH, сложно

определить взаимосвязь наблюдаемого фенотипа с ADMA и ADMA-независимыми эффектами DDАН. Комбинированные методы модуляции уровнем ADMA (например, изменение активности AGXT2 при увеличении экспрессии PRMTs) могут помочь выяснить причинную роль ADMA в патогенезе сосудистых заболеваний (Родионов и др., 2008)

Модели снижения уровня ADMA. Исследования Dayoub и соавторов на трансгенных мышях показали, что сверхэкспрессия DDАН1 снижает уровень ADMA в плазме крови и тканях, а также увеличивает продукцию оксида азота (Dayoub et al., 2003). Кроме того, у трансгенных по DDАН1 животных отмечалось усиление образования оксида азота в аорте и значительное ослабление вызванной ADMA эндотелиальной дисфункции в артериолах мозга (Dayoub et al., 2008). Сверхэкспрессия DDАН2 также понижала уровень ADMA *in vivo* и предупреждала повышение артериального давления (Hasegawa et al., 2007)

Существенные изменения фенотипа трансгенных по DDАН1/2 мышей свидетельствуют об эффективности данных моделей, демонстрирующих исключительно важную роль ADMA в метаболизме оксида азота. Однако необходимо учитывать важный недостаток таких моделей, связанный с наличием у ADMA-независимых внутриклеточных эффектов. В частности, имеются сведения о способности DDАН связываться с регулятором внутриклеточной передачи сигнала нейрофибрином 1 (НФ1) и повышать его взаимодействие с протеинкиназой А, что ведет к усилению фосфорилирования НФ1 (Tokuo et al., 2001). Поскольку НФ1 регулирует пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, логично предположить, что изменения сосудистого фенотипа, наблюдаемого у DDАН-трансгенных мышей, могут быть частично связаны с изменением функциональной активности НФ1 (Li et al., 2006). Кроме того, в опытах на культуре клеток, сверхэкспрессирующих DDАН2, также были обнаружены изменения внутриклеточных сигнальных каскадов в эндотелиальных клетках, ведущие к активации транскрипционного фактора Sp1 и последующей сверхэкспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (Hasegawa et al., 2006). Нарушения этих и, возможно, других внутриклеточных путей передачи

сигнала могут лежать в основе эффектов сверхэкспрессии DDAH, не зависящих от ADMA.

Первым исследованием, продемонстрировавшим возможность снижения уровня ADMA на системном уровне с помощью сверхэкспрессии другого фермента - AGXT2, была работа, опубликованная Rodionov и соавторами в журнале биологической химии (Rodionov et al., 2010a). В качестве подхода для сверхэкспрессии AGXT2 использовали аденовирусную инфекцию мышей вектором, содержащим hAGXT2 с FLAG-эпитопом на С-конце (аналогичная конструкция использовалась в настоящей работе). Инфицированные adAGXT2 мыши показали снижение уровня ADMA в плазме крови и лизатах тканей печени на 30% по сравнению с контролем. При этом инфицирование с помощью AdAGXT2 мышинных эндотелиальных клеток линии MS-1 приводило почти к 40% увеличению интенсивности продукции оксида азота, что было соизмеримо с результатами инфицирования аналогичных клеток с помощью AdDDAH1. Эти данные свидетельствовали о том, что экзогенно экспрессированный hAGXT2-FLAG обладал высокой биохимической и физиологической активностью в отношении ADMA.

Создание мышей, трансгенных по AGXT2, которые показывают постоянный и стабильно высокий уровень экспрессии AGXT2, послужит следующим шагом в изучении эффектов снижения уровня ADMA на сосудистый тонус. Основными отличиями данного подхода является значительно большая физиологичность в сравнении с экспериментами, основанными на аденовирусной инфекции, и отсутствие независимых от ADMA эффектов на внутриклеточные сигнальные пути, как это происходит в случае с DDAH1 (Родионов и др., 2008).

1.3 Аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 и ее роль в метаболизме аминокислот

Аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 (AGXT2) была впервые идентифицирована в 1978 году, и большая часть того, что известно о ее биохимических свойствах, основано на экспериментах, проведенных более трех

десятилетий назад (Noguchi et al., 1978a). Однако, совсем недавно в условиях современных геномных и метаболомных технологий, появились совершенно новые данные о ее физиологической и патофизиологической роли, которые спровоцировали очередной толчок к исследованиям данного фермента. Стало очевидно, что некоторые субстраты и продукты AGXT2 могут принимать участие в патогенезе сердечно-сосудистых, почечных, неврологических и гематологических заболеваний, что позволяет рассматривать AGXT2 как перспективную фармакологическую мишень.

В настоящее время идентифицировано 2 изофермента, обладающих аланин-глиоксилат аминотрансферазной активностью: AGXT1 и AGXT2. Оба фермента способны катализировать перенос аминогруппы с аланина на глиоксилат с образованием глицина и пирувата, участвуя в реакции трансаминирования (рис. 9, А). При недостаточной активности данной реакции развивается первичная гипероксалурия 1 типа, которая характеризуется хронической экскрецией с мочой избыточных количеств щавелевой кислоты, почечными камнями из оксалата кальция и нефрокальцинозом. При этом, ключевая роль в патогенезе данного заболевания принадлежит именно AGXT1, который является основным ферментом метаболизма глиоксилата в организме (Danpure et al., 1989). В отличие от AGXT1, изофермент второго типа способен принимать участие в других реакциях трансаминирования и имеет альтернативные названия. Эти названия включают в себя: D-3-аминоизобутират-пируват аминотрансфераза (Kontani et al., 1993), (R)-3-амино-2-метилпропионат-пируват аминотрансфераза (Tamaki et al., 1990) и бета-аминоизобутират-пируват аминотрансфераза (Kakimoto et al., 1969) – в связи со способностью AGXT2 метаболизировать бета-аминоизобутират (рис. 9, В); диметиларгинин-пируват аминотрансфераза (Ogawa et al., 1990) – в связи с использованием метиларгининов в качестве донора аминогрупп в реакциях трансаминирования с пируватом или глиоксилатом (рис. 9, С) и аланин-гамма, дельта-диоксвалерат аминотрансфераза (Varticovski et al., 1980) – в связи с участием в реакции переноса аминогруппы с аланина на гамма, дельта-диоксвалериановую кислоту (рис. 9, D).

1.3.1 Открытие AGXT2 и ее участие в метаболизме глиоксилата

Аланин-глиоксилат аминотрансферазная активность была впервые обнаружена в ткани печени крыс в 1955 году (Павлова, 1955), В 1978 году Noguchi вместе с коллегами идентифицировали 2 различные изофермента (в настоящее время известные, как AGXT1 и AGXT2), которые демонстрировали различную внутриклеточную локализацию и обладали разными биохимическими свойствами (Noguchi et al., 1978a). Позднее данной группой было обнаружено присутствие аналогичных ферментов и в других млекопитающих, включая человека (Noguchi et al., 1978b; Takada, Noguchi, 1982). AGXT1 представляет собой пиридоксальфосфат-зависимую аминотрансферазу, которая функционирует в качестве гомодимера с молекулярной массой субъединицы 40 кДа (Noguchi, Takada, 1978; Takada, Naguchi, 1982). Экспрессия AGXT1 наблюдается преимущественно в печени (Kobayashi et al., 1989; Noguchi et al., 1979). AGXT1 принимает основное участие в детоксикации глиоксилата, предотвращая его окисление до оксалата, который является слаборастворимым метаболитом.

Интересно, что внутриклеточная локализация AGXT1 различается у различных видов млекопитающих, в зависимости от места выработки глиоксилата. Так, у травоядных животных основным предшественником глиоксилата является гликолат, который метаболизируется в глиоксилат в пероксисомах; соответственно основным депо AGXT1 у травоядных являются пероксисомы (Birdsey et al., 2004). Напротив, у плотоядных животных основным предшественником глиоксилата является гидроксипролин, накапливающийся и превращающийся в глиоксилат в митохондриях, которые являются основным местом экспрессии AGXT1 (Birdsey et al., 2004). У всеядных животных AGXT1 представлен как в пероксисомах, так и в митохондриях, однако, у человека основным местом локализации данного фермента все-таки являются пероксисомы (Birdsey et al., 2004). Данные особенности обусловлены видоспецифичными различиями в N-концевой и C-концевой сигнальной последовательностях фермента, которые определяют внутриклеточную локализацию белка.

экспрессируется преимущественно в почках и печени (Kontani et al., 1993; Lee et al., 1999; Ogawa et al., 1990; 1982; Takada, Noguchi, 1982). В других тканях обнаруживаются только следовые количества мРНК AGXT2 (Lee et al., 1995; Rodionov et al., 2010a), при этом в почке данный фермент экспрессируется исключительно в проксимальной части петли Генле (Lee et al., 1999). AGXT2 кодируется ядерным геном, расположенным на 5 хромосоме (локус 5p13.2), ген имеет протяжённость более 50 тысяч пар оснований и имеет 14 экзонов. мРНК транслируется в цитоплазме (Rodionov et al., 2010a) с образованием белка-предшественника, состоящего из 514 а.о. и имеющего N-концевой транспортный пептид длиной 41 а.о. для транслокации в митохондрии (Rodionov et al., 2010a). После транслокации транспортный пептид отрезается (Neupert, Herrmann, 2007; Rodionov et al., 2010a). Зрелый белок локализуется в матриксе митохондрий (Rodionov et al., 2010; Takada, Noguchi, 1982).

Единственным исследованием, в котором проводился сравнительный анализ биохимической активности AGXT1 и AGXT2 в отношении аланина и глиоксилата, была работа Noguchi и соавторов (Noguchi et al., 1978b). Авторы показали, что константа Михаэлиса (K_m) для глиоксилата у AGXT2 крысы была в 14 раз выше, чем у AGXT1, а у AGXT2 мыши – соответственно в 4 раза выше. Эти данные свидетельствовали о том, что как минимум у грызунов, AGXT1 значительно более эффективно метаболизирует глиоксилат, чем AGXT2.

Основным фактом, свидетельствующим о том, что именно AGXT1 служит основным ферментом метаболизма глиоксилата у людей являются исследования наследственных дефектов AGXT1. Показано, что мутации в гене AGXT1 приводят к увеличению образования оксалата вследствие окисления глиоксилата, накоплению нерастворимых камней из оксалата кальция в почках и последующей почечной недостаточности, что приводит к развитию первичной гипероксалурии 1 типа (Cellini et al., 2010). Аналогичные патологии наблюдаются в AGXT1-нокаутных мышях (Salido et al., 2006), при этом AGXT2 неспособна компенсировать недостаток активности AGXT1. Полученные результаты наводили исследователей на мысль о том, что AGXT2 выполняет в организме другие

функции. Последующее открытие других субстратов AGXT2, кроме аланина и глиоксилата, полностью подтвердили эту теорию.

1.3.2 Участие AGXT2 в метаболизме метиларгининов

Как уже было сказано выше, AGXT2 является на данный момент единственным ферментом, способным одновременно метаболизировать все три изоформы метилированных производных L-аргинина: ADMA, SDMA и L-NMMA. Трансаминирование ADMA и аланина с помощью AGXT2 идет с образованием диметилгуанидиновалериановой кислоты (ADGV) (Martens-Lobenhoffer et al., 2011).

Исследованиям каталитической активности AGXT2 в отношении метиларгининов придавали мало значения вплоть до 2010 года, в котором Rodionov и соавторы произвели первое клонирование гена AGXT2 человека и доказали его роль в системной и тканевой регуляции уровня ADMA (Rodionov et al., 2010a). Позднее исследования Carlin и коллег на модели AGXT2-нокаутных мышей подтвердили непосредственное участие AGXT2 в регуляции уровня всех трех метиларгининов *in vivo* (Carlin et al., 2012). Недостаток экспрессии фермента приводил к эндотелиальной дисфункции, выраженной нехватке оксида азота и хронической гипертензии у мышей на фоне увеличенного ADMA, SDMA и L-NMMA в плазме крови. Похожий фенотип наблюдался при введении мышам бета-аминоизобутирата, что, вероятнее всего, было связано конкурентным ингибированием активности AGXT2 в отношении метиларгининов (Kittel et al., 2013). Другое недавнее исследование продемонстрировало, что уровень ADMA и SDMA в плазме крови человека отрицательно коррелирует с уровнями экспрессии AGXT2 в трансплантатах почек человека (Carlin et al., 2012). Наконец, было показано, что полиморфизм rs37369 в гене AGXT2 был ассоциирован с увеличением содержания SDMA в плазме крови и моче здоровых людей (Kittel et al., 2014). Все эти данные свидетельствуют об исключительно важном физиологическом значении AGXT2 в метаболизме метиларгининов у животных и людей.

Вышеперечисленные результаты исследований, однако, находятся в серьезном противоречии с наблюдениями Ogawa и коллег, которые рассчитали константу Михаэлиса очищенного AGXT2 крысы для ADMA в диапазоне 10 мМ (Ogawa et al., 1990), что примерно на 4 порядка превосходит физиологические концентрации ADMA в организме человека и грызунов (Caplin, Leiper, 2012; Rodionov et al., 2010b; Wang et al., 2007). Одним из возможных объяснений этого парадокса может быть то, что внутриклеточные концентрации ADMA могут быть значительно выше таковых в плазме крови (Masuda et al., 1999). Возможно также, что кинетика реакции переаминирования ADMA с помощью AGXT2 *in situ* в митохондриях может различаться в сравнении с очищенным ферментом ввиду присутствия пока неустановленных кофакторов.

В настоящее время предполагается, что почки являются основным местом метаболизма ADMA с помощью AGXT2 у людей (Rodionov et al., 2014b). Ogawa вместе с коллегами в экспериментах с меченым ADMA установили, что основная радиоактивность в моче мышей через 12 часов после инфузии приходится на три соединения: ADMA, ADGV и диметилгуанидинобутировую кислоту (ADGB), которая является метаболитом ADGV (Ogawa et al., 1987b). Данные наблюдения свидетельствуют о наличии двух механизмов почечного клиренса ADMA – прямого, в котором ADMA напрямую выводится почками вместе с мочой и непрямого, в котором ADMA вначале метаболизируется с помощью AGXT2, а затем экскретируется в мочу в виде ADGV или родственного ей метаболита ADGB. Интересным является тот факт, что в лизатах почек соотношение меченого ADMA к ADGV/ADGB составляло 8:1, в то время как в моче это соотношение было 1:1 (Ogawa et al., 1987b). Таким образом, не прямой почечный клиренс ADMA через AGXT2 обладал значительно большей эффективностью, чем прямая экскреция вместе с мочой. Роль AGXT2 в почечном клиренсе ADMA впоследствии косвенно подтвердилась специфической локализацией данного фермента в эпителии петли Генле (Lee et al., 1999).

Особенно интересными представляются недавние клинические исследования, показывающие ассоциации специфических аллелей гена AGXT2 с

взаимосвязанными изменениями в работе сердечно-сосудистой системы. Так, группа исследователей во главе с Anderssohn установила статистически значимую корреляцию полиморфизма rs28305 с синдромом перемежающейся хромоты у 783 пациентов с сахарным диабетом (Anderssohn et al., 2014). Данный синдром обычно связывают с ранними проявлениями болезни периферических артерий и с последующим прогрессированием в критическую ишемию нижних конечностей. Более того, Seppälä и соавторы установили связь полиморфизмов rs37369 и rs16899974 у AGXT2 с уровнем SDMA и частотой сердечных сокращений у молодых индивидов (Seppälä et al., 2014). Позже той же группой авторов были установлены ассоциации данных полиморфизмов с частотой проявлений мерцательной аритмии и ишемическим инсультом в 4 независимых исследуемых когортах (Seppälä et al., 2016). Представленные выше исследования наводят на мысль о существовании эндогенного механизма, с помощью которого AGXT2 осуществляет защиту сердечно-сосудистой системы и выполняет кардиопротекторную функцию у человека, регулируя содержание метиларгининов на системном уровне.

1.3.3 Участие AGXT2 в синтезе предшественников гемоглобина

Образование дельта-аминолевулиновой (ALA) кислоты является одной из ключевых химических реакций биосинтеза порфиринов, который приводит к синтезу гемов. ALA синтезируется из глицина и сукцинил-кофермента А с помощью митохондриального фермента ALA-синтазы (Bonkovsky et al., 2013; Dailey, Meissner, 2013). Однако, существует альтернативный путь синтеза ALA, открытый в 1980х, - трансаминирование между аланином и гамма, дельта-диоксвалериановой кислотой (DOVA) с образованием ALA и пирувата. Этот альтернативный путь был открыт группой Varticovski, которая изолировала пиридоксальфосфат-зависимую DOVA трансаминазу из печени коровы (Varticovski et al., 1980). Okuno и соавторы показали аналогичную реакцию синтеза ALA в печени крыс, кроликов и людей, что подтверждало гипотезу о важности данного пути в синтезе порфиринов *in vivo* (Okuno et al., 1983). Впоследствии

Noguchi с коллегами показали идентичность DOVA трансминазы с AGXT2 (Noguchi, Mori, 1981), хотя данный факт был поставлен под сомнение другой группой исследователей (Tyagi, Datta, 1993). Таким образом, к настоящему моменту времени существует неопределенность относительно участия AGXT2 в трансминировании DOVA. Потенциальную роль данного фермента в биосинтезе порфиринов и гемов еще предстоит установить на основе будущих результатов комплексных биохимических и молекулярно-биологических исследований.

1.3.4 Участие AGXT2 в метаболизме бета-аминоизобутирата

В 1951 году Crumpler с коллегами продемонстрировали присутствие ранее неизвестного метаболита в моче человека – бета-аминоизобутирата (БАИВ) (Crumpler et al., 1951), который через 5 лет был идентифицирован как продукт катаболизма тимины (Fink et al., 1956). В 1953 году было показано, что аутосомально-рецессивная мутация в неизвестном гене приводит к увеличению содержания БАИВ в моче (Harris, 1953) и связанной с этим бета-аминоизобутировой гиперацидурии. Частота данной мутации составляла менее 10% в европейской популяции (Harris, 1953), однако, превышала 30% в азиатских популяциях (Yanai et al., 1969). Kakimoto с коллегами установили в 1969 году, что пациенты с подобной ацидурией страдали от изменений в активности фермента, ответственного за метаболизм БАИВ, который был назван D-бета-аминоизобутират-пируват аминотрансфераза (Kakimoto et al., 1969). Спустя 24 года группа Kontani показала идентичность данного фермента с AGXT2 (Kontani et al., 1993). Деаминирование БАИВ с помощью AGXT2 приводит к образованию метилмалонового полуальдегида, причем в качестве акцепторов аминогруппы в данной реакции могут выступать как глиоксилат, так и пируват (Ogawa et al., 1990). Рассчитанная константа Михаэлиса для реакции трансминирования БАИВ с глиоксилатом при pH 7.3 была в 18 раз ниже таковой для аланина, что говорит о предпочтительной роли БАИВ в качестве субстрата для AGXT2 в физиологических условиях (Kontani et al., 1993). С другой стороны, Ogawa и коллеги показали, что при pH 10.0 активность AGXT2 в отношении аланина была в 60 раз выше, чем в

отношении ВАИВ, что говорит о различной субстратной специфичности фермента в зависимости от pH (Ogawa et al., 1990). Современные исследования показывают, что уровень pH внутри матрикса митохондрий варьирует в диапазоне от 7.5 до 8.2 (Santo-Domingo, Demaurex, 2012). В то же время при определенных условиях pH митохондриального матрикса может изменяться, в частности, при стимуляции глюкозой (Wiederkehr, 2009). Тем не менее, остается неизвестным, могут ли физиологические изменения pH внутри митохондриального матрикса влиять на специфичность AGXT2 по отношению к ее субстратам.

Недавние геномные исследования спровоцировали повышенный интерес к изучению патофизиологии ВАИВ и его метаболизма с помощью AGXT2. Suhre и соавторы показали в 2011 году, что бета-аминоизобутировая гиперацидурия ассоциирована с одиночным полиморфизмом rs37369 в гене AGXT2, который приводит к аминокислотной замене валина на изолейцин в положении 140 (Val140Ile) (Suhre et al., 2011). Nicholson с коллегами независимо показали, что данный диагноз ассоциирован с двумя полиморфизмами гена AGXT2 - rs37369 и rs37370 (Nicholson et al., 2011), что являлось признаком сниженной активности мутантных форм AGXT2. Аналогичным образом, ассоциации полиморфизма rs37370 и уровня ВАИВ в плазме крови были найдены в результате исследований на когорте Framingham Heart Study (Rhee et al., 2013). В недавнем исследовании были также показаны ассоциации полиморфизмов rs37369 и rs16899974 (Val496Leu) в гене AGXT2 с увеличенным содержанием ВАИВ в плазме крови и моче у здоровых людей европеоидной расы (Kittel et al., 2014). Несмотря на тот факт, что уровень ВАИВ у здоровых людей варьирует в диапазоне 2.3 ± 1.9 мкМ (van Kuilenburg et al., 2008), что значительно ниже рассчитанной константы Михаэлиса для очищенного фермента, проведенные масштабные исследования полногеномного поиска ассоциаций наглядно демонстрируют ключевую физиологическую роль AGXT2 в регуляции уровня ВАИВ у людей *in vivo*.

Физиологическая и патофизиологическая роль ВАИВ и возможные последствия его накопления слабо изучены к настоящему моменту. При анализе когорты Framingham Heart Study повышенные уровни ВАИВ были ассоциированы с

пониженным уровнем триглицеридов в плазме крови (Rhee et al., 2013). Более того, временное снижение экспрессии гена *AGXT2* у *zebrafish* приводило к связанным изменениям содержания триглицеридов и холестерина в тканях (Rhee et al., 2013). Интересными в этом плане представляются также наблюдения Spitsyn и Afanas'eva, которые показали увеличенную частоту аминоизобутировой ацидурии у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий в двух независимых выборках (Spitsyn, Afanas'eva, 2001). Кроме того, недавнее метаболомное исследование идентифицировало ВАИВ как «миокин», выделяющийся активно работающими миоцитами и стимулирующий преобразование белой жировой ткани в бурую. Авторы предположили, что ВАИВ может принимать таким образом участие в защите организма от метаболических заболеваний в ответ на увеличенные физические нагрузки (Roberts et al., 2014). Так или иначе, для всестороннего понимания описанных выше механизмов требуется масштабное проведение дополнительных исследований.

1.3.5 Другие аминотрансферазные активности *AGXT2*

В дополнение к перечисленным выше субстратам *AGXT2* способна использовать в качестве доноров аминокрупп бета-аланин (продукт катаболизма урацила), L-орнитин (метаболит цикла мочевины), альфа-аминобутировую кислоту (предшественник офтальмовой кислоты) и некоторые другие эндогенные аминоксодержащие соединения (Rodionov et al., 2014a). Более того, *ex vivo* эксперименты показали, что *AGXT2* способна проявлять аминотрансферазную активность по отношению к экзогенным субстратам, в частности – альфа-фтор-бета-аланину (метаболиту 5-фторурацила, который является распространенным противоопухолевым препаратом) и бета-хлор-L-аланину (Porter et al., 1995). Физиологическое значение данных реакций также еще предстоит установить.

Подводя итог данному литературному обзору, можно сделать вывод о том, что изучение физиологической роли *AGXT2* представляет собой огромную область исследований, результаты которых интересны не только с

фундаментальной точки зрения, но в перспективе могут открыть новые методы для лечения сердечно-сосудистых, метаболических и других заболеваний. Стоит отметить, что в настоящее время ферментативная кинетика мышиной AGXT2 изучена мало, а человеческой AGXT2 до сих пор не изучалась вообще. Кристаллическая структура для этих белков не была изучена и картирование активного центра ферментов не проводилось. Отсутствие физиологических моделей для изучения роли AGXT2 в метаболизме ADMA и регуляции оксида азота осложняет проведение научных исследований, и создание и характеристика мышей, трансгенных по AGXT2, может способствовать, таким образом, решению ряда вопросов, связанных с данной проблематикой.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Генерация трансгенной линии мышей по hAGXT2

Для создания hAGXT2 трансгенной линии мышей из библиотеки кДНК почки человека (Ambion, США) с использованием праймеров PrF 5'-ATGACTСТААТСТGGAGAC-3' и PrR 5'-СТGАСААТGТТАСТТАGСТС-3' была клонирована кДНК гена AGXT2 человека (NCBI Reference Sequence: NM_031900.3), содержащая полноразмерную открытую рамку считывания для белковой последовательности AGXT2 (с 244 по 1785 нуклеотид). Затем методом ПЦР (см. далее) к 3'-концу была присоединена последовательность FLAG эпитопа с терминаторным кодоном (5'-GATTACAAGGATGACGAC GATAAG-3') и сигнал полиаденилирования вируса SV40 человека (рестрикция эндонуклеазами EcoRI и HindIII с последующим лигированием T4-лигазой (Thermo Scientific, США)) (Kim et al., 2003). Для обеспечения высокого и стабильного уровня экспрессии трансгенного hAGXT2 5'-конец данной конструкции был совмещен с фрагментом Козака (GCCACC) и CAG промотором, который является комбинацией энхансерного элемента цитомегаловируса (CMV) и промотора бета актина курицы. Данный промотор широко используется для создания трансгенных мышей с высокой интенсивностью экспрессии трансгена в подавляющем большинстве тканей (Okabe et al., 1997). Для амплификации трансгенной конструкции было произведено ее клонирование в вектор pUC57 (Invitrogen) по сайтам рестрикции BglII и MluI и ее дальнейшая наработка в E.coli. Плазмиды очищали с использованием набора "Qiagen EndoFree plasmid kit". Генетическую конструкцию вырезали из вектора с помощью эндонуклеаз рестрикции BglII и MluI (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя с последующим электрофорезом ДНК в 1% агарозном геле (протокол электрофореза см. далее). Амплифицированный ДНК-фрагмент очищали с использованием набора "Qiagen- II agarose gel extraction method" согласно инструкции фирмы-производителя и растворяли в буфере, содержащем 5 mM Tris, 0.1 mM EDTA (pH7.6) до конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Концентрацию ДНК определяли в объеме раствора 1 мкл с помощью спектрофотометра для микропланшет Synergy HT (Biotek, США) по поглощению при длине волны 260 нм. Общий вид трансгенной конструкции представлен на рис. 10, ее полная последовательность приведена в приложении.

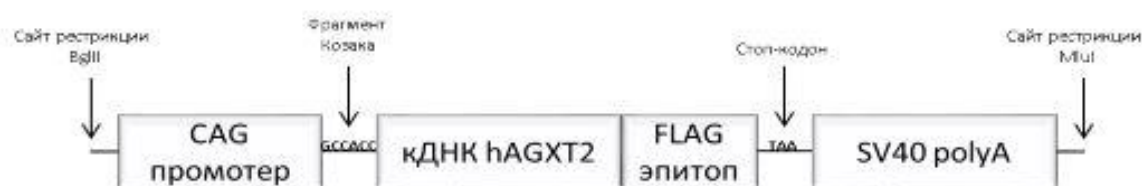


Рисунок 10. Схематическое изображение трансгенной конструкции, использованной для создания hAGXT2 трансгенных мышей.

Полученную генетическую конструкцию использовали для генерации трансгенных мышей путем пронуклеарной микроинъекции (объем 2 пл) в зиготу линии C57BL/6 (Jackson Laboratories, США). Микроинъекции проводили на оборудовании Nikon-Leitz (Германия). Яйцеклетки трансплантировали в яйцеводы псевдобеременных самок-реципиентов линии C57BL/6 в тот же день (протоколы работы с ранними эмбрионами и хирургических процедур на мышах см. далее). Генотипирование животных проводили с помощью ПЦР (протокол см. далее). Впоследствии одного из полученных таким образом трансгенных самцов скрещивали с самкой дикого типа линии C57BL/6 и получали поколение F1 (рис. 11). Аналогичным образом скрещивали животных F1 и F2, получая F2 и F3 поколения соответственно. Полученные F1, F2 и F3 трансгенные животные и животные дикого типа использовались в настоящей работе (рис. 11). Контролем во всех экспериментах служили животные дикого типа, соответствующие по весу, возрасту и полу трансгенным животным того же поколения. Животные содержались в виварии Центра теоретической медицины Технического университета Дрездена (Германия) в клетках по 3-4 особи при регулируемом световом режиме (12/12 ч) и температурном режиме (22—24°C), имели свободный доступ к пище и воде.

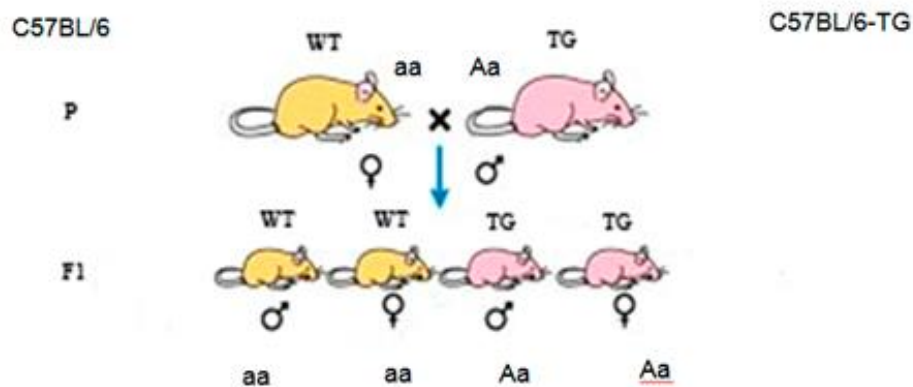


Рисунок 11. Схема получения поколения F1 трансгенных AGXT2 мышей
WT- мышь дикого типа; TG - трансгенная мышь

2.2 Манипуляции с ранними эмбрионами и хирургические процедуры на мышцах

Для увеличения числа ранних эмбрионов и синхронизации их созревания проводили гормональную стимуляцию самок-доноров по протоколу:

1 День, 14.00: Самкам-донорам в возрасте 23-28 дней линии C57BL/6 вводили гонадотропин сыворотки жеребой кобылы (СЖК) в количестве 5 МЕ на особь в объеме 100 мкл внутривенно.

3 День, 12.00: Тем же самкам вводили хорионидный гонадотропин человека в количестве 5 МЕ на особь в объеме 100 мкл внутривенно. В тот же день через 2 часа после инъекции проводили скрещивание с фертильными половозрелыми самцами линии C57BL/6.

4 День, 8.00: Производили отбор самок с вагинальными пробками для последующего извлечения зигот.

Извлечение зигот на стадии двух пронуклеусов. После цервикальной дислокации вскрывали брюшную полость и извлекали часть рога матки вместе с яйцеводом и яичником. Яйцеводы отделяли и помещали в чашку Петри с M2 средой (Sigma). Под биноклем локализовали воронку яйцевода, производили ее вскрытие и высвобождали зиготы. Фоликулярные клетки, окружающие зиготу, отмывали последовательным переносом в свежую порцию среды. Во время

последней стадии отмывок в среду к зиготам добавляли раствор гиалуронидазы до конечной концентрации 0.1%. Под биноклем производили сортировку полученных клеток, отбирали зиготы, находящиеся на стадии 2 пронуклеусов и имеющих ярко выраженную *zona Pellucida* и использовали их для дальнейших манипуляций, которые включали микроинъекции в пронуклеус раствора ДНК трансгенной конструкции.

Реимплантацию ранних эмбрионов проводили ложнобеременным самкам-реципиентам в день обнаружения вагинального плага после спаривания с вазэктомизированными самцами. Все хирургические манипуляции проводили под общей анестезией: раствор авертина в дозе 0,3 мг/г, внутрибрюшинно. Подход к яйцеводу осуществляли со спины. Эмбрионы переносили в воронку яйцевода, накладывали 1-2 шва и держали мышь на теплом столике до полного выхода из наркоза.

Вазэктомия самцов. Самцов в возрасте 8 недель подвергали общей анестезии: раствор авертина в дозе 0,3 мг/г, внутрибрюшинно. Подход к семенным канатикам осуществляли через брюшную полость. Затем рассекали оба канатика, накладывали 1-2 шва и держали самца на теплом столике до полного выхода из наркоза. Через 2 недели обеспечивалась полная стерильность самцов.

2.3 Генотипирование мышей

Для детекции трансгенной конструкции hAGXT2 мышатам возраста 3-4 недели отрезали кончики хвостов, помещали их в 2 мл пробирки (Eppendorf, Германия) и растворяли в буфере SNET (0,186 % Na₂EDTA*2H₂O, 1% SDS, 2,34 % NaCl, 20 mM Tris, pH8) (Invitrogen, США) с добавлением протеиназы К (17 мкг/мл) (Sigma, Германия). Для полного растворения образцы инкубировали в 300 мкл SNET и 20 мкл протеиназы К в течение 45 минут при температуре 55°C, перемешивая на вортексе каждые 10 минут. После этого из раствора выделяли ДНК с помощью набора DNeasy kit (Qiagen, США) и использовали ее для ПЦР в амплификаторе PTC-100 (MJ Research, США). Реакцию ПЦР проводили в объеме 20 мкл с использованием Taq полимеразы (Invitrogen, США) и праймеров,

специфически распознающих трансгенную конструкцию hAGXT2 (дизайн и последовательность праймеров см. ниже).

Программа для амплификации:

1. 1 цикл: 94 °C – 3 мин (первичная денатурация ДНК)
2. 35 циклов: 94 °C – 30 сек (денатурация ДНК)
60 °C – 1 мин (отжиг праймеров)
72 °C – 1 мин (элонгация)
3. 1 цикл: 72 °C – 2 мин (финальная элонгация)
4. 4 °C - ∞ (хранение)

Отрицательным контролем служил пустой вектор pUC57, положительным контролем - вектор pUC57 с hAGXT2-трансгенной вставкой. Для разделения и визуализации продуктов амплификации ДНК использовали метод горизонтального гель-электрофореза. Агарозный гель концентрации 2.5% (Sigma, Германия) готовили на основе буфера TBE (89 mM Tris-борат, 2 mM ЭДТА). К образцам ДНК добавляли 6-кратный буфер для нанесения DNA Loading Dye (Fermentas, США). Гель-электрофорез проводили в камерах Bio-Rad в буфере TBE при напряжении 150 В в течение 45 мин. Для визуализации фрагментов ДНК в гель добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл (BioRad, США). В качестве маркера для определения молекулярных весов фрагментов ДНК использовали ДНК-маркер GeneRuler 1 kb (Fermentas, США). Наличие в геноме мыши человеческого гена hAGXT2 определяли по наличию специфической полосы на геле при освещении в ультрафиолетовом спектре на трансиллюминаторе GelDoc XR+ (BioRad, США).

2.4 Сбор биологического материала

За 72 часа до сбора крови и тканей зрелых трансгенных мышей и мышей дикого типа из поколения F1 возрастом 8 недель помещали в метаболические клетки (Tecniplast, Италия) для сбора мочи. По прошествии 24 часов, мышей помещали обратно в стандартные клетки. Сбор крови и тканей проводили на наркотизированных животных (внутрибрюшинное введение 0.5 мг кетамина и 0.1

мг ксилазина (Sigma, Германия) /10 г веса). Образцы крови забирали с помощью инсулинового шприца из аорты и немедленно переносили в 1.5 мл пробирки (Eppendorf, Германия) с заранее внесенными 20 мкл EDTA (Sigma, Германия) для предотвращения свертывания крови. Цельную кровь использовали для клинического анализа, а плазму крови, полученную центрифугированием со скоростью 2500 об/мин при 4°C в течение 10 мин, и мочу - для анализа содержания аргинина и его метилированных производных (см. далее). С целью очистки тканей от форменных элементов крови проводили перфузию путем инъекции физиологического раствора в левый желудочек сердца (Sigma, Германия). Ткани аорты, мозга, сердца, почки, печени, легкого, селезенки, скелетной мышцы были аккуратно извлечены из животных, помещены в пробирки CryoTubes (Thermo Scientific, США) и немедленно заморожены в жидком азоте (-195°C). Хранение мочи, плазмы крови и тканей осуществляли при температуре -80°C.

2.5 Клинический анализ крови

Для определения возможного влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на процессы кроветворения проводили клинический анализ крови. Цельную кровь самцов трансгенных животных помещали в автоматический гематологический анализатор PCE-90Vet (Erma, Япония) и определяли следующие параметры:

WBC (white blood cells — белые кровяные тельца) — абсолютное содержание лейкоцитов

RBC (red blood cells — красные кровяные тельца) — абсолютное содержание эритроцитов

HGB (Hb, hemoglobin) — концентрация гемоглобина в цельной крови (ммоль/л)

PLT (platelets — кровяные пластинки) — абсолютное содержание тромбоцитов

MCV (mean cell volume) — средний объем эритроцита (фл)

МСНС (mean corpuscular hemoglobin concentration) — средняя концентрация гемоглобина в эритроците мМоль/л

2.6 Изучение содержания мРНК транскриптов AGXT2, DDAH1 и DDAH2 методом ПЦР в реальном времени

Для определения содержания мРНК транскриптов трансгенного hAGXT2, эндогенного mAGXT2, общего (эндогенного+трансгенного) AGXT2, а также DDAH I и DDAH II в тканях аорты, мозга, почки, печени, селезенки, скелетной мышцы, легкого и сердца трансгенных мышей (n=7) и мышей дикого типа (n=6) использовали метод ПЦР в реальном времени (количественной ПЦР). Фрагмент каждой ткани (около 50 мкг) помещали в 2-х мл стерильную пробирку (Qiagen, США) с металлическим шариком и 900 мкл предварительно добавленного реагента TRIzol (Life Technologies, США). Гомогенизацию проводили с использованием прибора Tissue Lyser (Qiagen, США) при 50 Гц в течение 10 мин. Экстракцию РНК из тканей осуществляли с помощью RNeasy Plus Universal Mini kit (Qiagen, США), следуя протоколу производителя. Для определения количества выделенной РНК 1 мкл растворенной РНК брали для обработки на спектрофотометре Synergy HT (Biotek, США), измеряя поглощение при длине волны 260 нм. Раствор РНК разводили водой, очищенной от нуклеаз (Qiagen, США) до конечной концентрации 200 нг/мкл. Разведенный раствор РНК хранили при -80 °С до дальнейшего использования.

Обратную транскрипцию осуществляли в амплификаторе PTC-100 (MJ Research, США). с использованием набора High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems, США) в конечном объеме 20 мкл по протоколу компании-производителя. В каждую пробирку помещали 10 мкл разведенной РНК (2 мкг) и 10 мкл реакционной смеси. Режим инкубации: 10 мин при 25 °С, 120 мин при 37 °С, 5 мин при 85 °С. После окончания реакции пробирки с реакционной смесью хранили при -80 °С.

Разработку праймеров для количественной ПЦР проводили на основании данных GeneBank с помощью программы OligoArchitect

(<http://www.oligoarchitect.com>) в соответствии с требованиями, представленными компанией "Corbett research" (Австралия). Для дизайна праймеров были использованы известные последовательности генов AGXT2 мыши (NCBI Reference Sequence: NM_001031851.1) и человека (NCBI Reference Sequence: NM_031900.3), а также DDAH I (NCBI Reference Sequence: NM_026993.3) и DDAH II (NCBI Reference Sequence: NM_001190449.1) генов мыши. Дизайн праймеров был проведен таким образом, чтобы температура отжига каждой из пар праймеров была 60 °С. Праймеры были изготовлены в компании "biomers.net" (Германия). Нуклеотидные последовательности использовавшихся праймеров (прямой/обратный) в направлении 5' - 3' приведены ниже:

Трансгенный hAGXT2 - PrF 5' GTTGGCAGAGGCAGCATT 3'
 PrR 5' GTCGTCATCCTTGTAATCCTTAGC 3'

Эндогенный mAGXT2 - PrF 5' GTTGTGACCACTCCAGAA 3'
 PrR 5' TATCTTGTCTTGAACCATCTCT 3'

Общий AGXT2 (m+h) - PrF 5' TGGGCTCTCACTTCTGGG 3'
 PrR 5' CACCTCAAGCACAGCAGAT 3'

Эндогенный mDDAH I - PrF 5' CTACGCAGTCTACAGT 3'
 PrR 5' TCATAACGATCACTCA 3'

Эндогенный mDDAH II - PrF 5' CTACGCAGTCTACAGT 3'
 PrR 5' TCATAACGATCACTCA 3'

Реакцию проводили в конечном объеме 15 мкл со следующим составом реакционной смеси: 1 мкл кДНК, 7.5 мкл SYBR Green Buffer (Thermo Scientific, США), 5 мкл очищенной от нуклеаз H₂O (Thermo Scientific, США), 1.5 мкл смеси праймеров в концентрации каждого 10 пмоль/мкл. Образцы помещали в амплификатор в реальном времени Applied Biosystems 7300 (США) и задавали следующую программу нагрева:

1. 1 цикл: 95 °С – 10 мин (первичная денатурация кДНК и активация Hot-Start).
2. 40 циклов: 95 °С – 15 с (денатурация кДНК),

60 °C – 1 мин (отжиг праймеров и элонгация),

3. 1 цикл: 95 °C – 15 с (денатурация)

4. 1 цикл 60 °C - 1 мин (определение кривой плавления образовавшегося фрагмента)

Для построения контрольной стандартной кривой с целью определения эффективности ПЦР реакции пять разведений кДНК почки трансгенной мыши включали в реакцию с каждой парой праймеров, использованных в работе. Наиболее концентрированным считалось кДНК почки. Каждая последующая концентрация достигалась разведением 1: 5 предыдущего стандарта. При этом во все серии реакций включали негативный контроль. Все стандарты и негативный контроль загружали в трехкратном повторении в каждой серии ПЦР в реальном времени.

Количественную ПЦР каждой из тканей проводили одновременно для всех экспериментальных групп (трансгенные самцы, трансгенные самки, контрольные самцы, контрольные самки) с использованием одинаковых условий и компонентов в 96-луночных планшетах (Applied Biosystems, США). Все образцы загружали в трехкратном повторении. В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии m18s рРНК (при множественных сравнениях) (коммерческие праймеры Qiagen quantitect qt01036875, США) и mHPRT (коммерческие праймеры Invitrogen, США), поскольку согласно данным сервиса RefGenes (<http://refgenes.org>) их экспрессия наиболее однородна в исследуемых в данной работе тканях. Негативным контролем служила реакционная смесь, в которой экспериментальный образец заменяла вода. Схема загрузки планшетов представлена на рис. 12.

Определение эффективности ПЦР реакции с каждой парой праймеров и обработку полученных результатов для каждой группы животных (трансгенные самцы, трансгенные самки, контрольные самцы, контрольные самки) проводили с помощью программы 7500 software v.2.0.5 (Applied Biosystems, США). Полученные относительные величины экспрессии исследуемых генов, нормализованные по содержанию m18s и mHPRT использовали для дальнейшей статистической обработки.

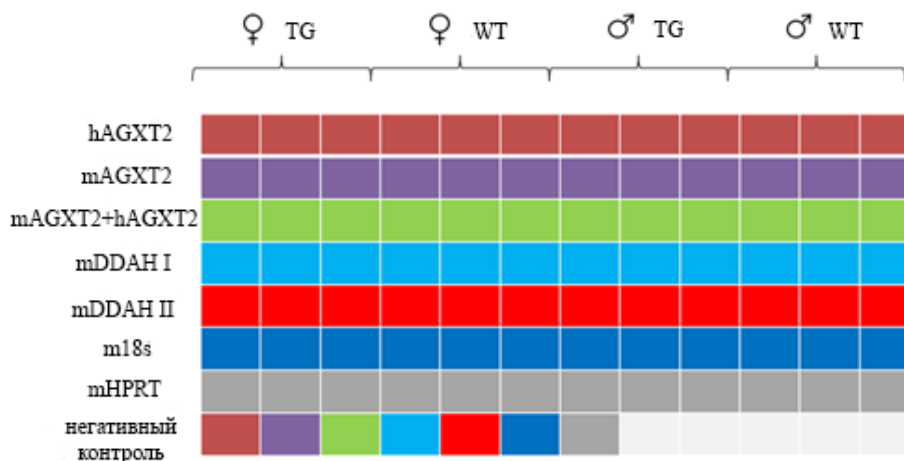


Рисунок 12. Схема размещения образцов в 96-луночных планшетах для проведения ПЦР в реальном времени

TG - образцы кДНК анализируемой ткани трансгенной мыши, WT - образцы кДНК аналогичной ткани мыши дикого типа

2.7 Анализ белковой экспрессии трансгенного hAGXT2 методом Вестерн-блот

Методом Вестерн-блот проводили определение и сравнение экспрессии трансгенного hAGXT2 в различных тканях (аорта, мозг, почка, печень, селезенка, скелетная мышца, легкое и сердце) трансгенных мышей. При этом отрицательным контролем служили аналогичные ткани мышей дикого типа и клетки HUVEC, инфицированные аденовирусным вектором без вставки (см. далее), а положительным контролем - клетки HUVEC, инфицированные вектором, содержащим hAGXT2 (см. далее).

При подготовке проб белка для Вестерн-блота ≈ 50 мкг исследуемой ткани каждого животного (за исключением тканей аорты) помещали в отдельную 2 мл пробирку (Eppendorf, Германия), добавив 1 мл стандартного лизирующего буфера RIPA для мембранных белков (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris, 1% NP₄₀, 0.5% деоксихолата натрия, 0.1% SDS) с ингибитором протеаз Complete cocktail (Roche; 1 таблетка на 10 мл буфера.) Ткани аорты, полученные от 4 животных каждой группы совмещали ввиду недостаточного количества биологического материала,

получаемого от одного животного. Ткани гомогенизировали ультразвуком на приборе UP-100H (Dr. Hielscher, Германия) в течение 5 мин циклами по 20 с. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин (4°C) для осаждения оставшихся фрагментов. Растворимую фракцию, содержащую выделенные белки помещали в новые 1.5 мл пробирки (Eppendorf, Германия) и хранили при -80 °C до дальнейшего использования.

Концентрацию белков, содержащихся в растворе определяли с использованием набора BCA Protein Assay Kit (Pierce, США) согласно протоколу производителя. Стандартную кривую разведения строили с использованием известных концентраций бычьего сывороточного альбумина (Pierce, США). В качестве контроля использовали лизирующий буфер. Измерение концентрации белка проводили на спектрофотометре Synergy HT (Biotek, США) при облучении длиной волны 560 нм. На основе полученных данных производилось разведение образцов до конечной концентрации 500 мкг/мл.

Перед вертикальным электрофорезом аликвоты белков с добавлением 4x SDS-буфера Laemmli (0.25 M Tris-HCl, 40% глицерола, 8% SDS, 20% бета-меркаптоэтанол, 0.02% бромфеноловый синий) нагревали на термостате (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин при температуре 95°C. В каждую лунку полиакриламидного геля (4% концентрирующий гель, 10% разделяющий гель) вносили пробы исследуемых растворов белков в объеме 20 мкл (что соответствует ≈7 мкг белка). В качестве маркера молекулярного веса использовали BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Германия), добавляя его в количестве 10 мкл в лунку. Гели помещались в буферный раствор для электрофореза (0.025 M Tris, 0.19 M глицина, 0.1% SDS). Затем в течение 90 мин через гели пропускали электрический ток с напряжением 110 В на оборудовании BioRad (Германия).

Гели с вертикально распределенными в соответствии с массой белками клеточной мембраны помещали в буфер для электропереноса на мембрану (0.025 M Tris, 0.192 M глицина, 20% метанола). PVDF мембраны (PolyScreen, Perkin Elmer Life Sciences, Германия) предварительно обрабатывали 100% этанолом в течение 2

мин. Под воздействием электрического тока с постоянным напряжением 100 В белки с геля переносили на гидрофобную мембрану (60 мин, 22 °С).

Для определения экспрессии трансгенного hAGXT2 в тканях трансгенных мышей мембрану с осажденными белками блокировали в 5% растворе сухого молока (Sigma, Германия) на TBS/Tween буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Tween) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными моноклональными AntiFLAG антителами (Sigma, Германия) (разведение 1:800 в 5% сухом молоке на TBS/Tween) в течение 60 мин при комнатной температуре, трижды по 10 мин промывали в TBS/Tween и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:2000 в 5% сухом молоке на TBS/Tween, 60 мин) (BD Biosciences, США). После этого мембраны трижды по 10 мин промывали в TBS/Tween и на 5 мин помещали в раствор Lumi-Light^{PLUS} (Roche Diagnostics, Германия). Визуализацию белков проводили методом хемилюминесценции на анализаторе Fusion FX7 (Peqlab, Германия).

После предварительных экспериментов в качестве внутреннего контроля иммуномечения был выбран белок GAPDH, поскольку его экспрессия оказалась наиболее однородной в исследуемых тканях. Процедуру иммунодетекции проводили аналогичным образом с использованием первичных кроличьих антител к GAPDH (Trevigen, США) в разведении 1:2000 и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Labs, США) в разведении 1:5000. Уровень экспрессии трансгенного hAGXT2 нормировали относительно GAPDH.

Для сравнения интенсивности сигналов исследуемых белков использовался метод денситометрии. Сравнительный анализ проводился с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institute of Health, США). Об изменении уровня искомым белков по отношению к контролю судили по разнице в плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

2.8 Культивирование и инфицирование аденовирусом клеток HUVEC

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (Lonza, США) были использованы в качестве положительного и отрицательного контроля Вестерн-блота. Культивирование клеток проводили в 9-луночных планшетах (NUNC, США) в среде EGM-2 (Lonza, США), содержащей 20% эмбриональную бычью сыворотку (Sigma, Германия). Плотность клеточной популяции составляла примерно 800 клеток на 1 лунку. Клетки инкубировали в среде роста в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. По достижении клетками 80% конфлюэнтности их промывали в фосфатном буфере (Sigma, Германия) и инфицировали пустым аденовирусным вектором рacAd5CMV-IRES-GFP (Cell Biolabs, USA) (отрицательный контроль), или аналогичным аденовирусным вектором, содержащим hAGXT2FLAG (положительный контроль). Аденовирусные векторы растворяли в среде EGM-2 до для достижения множественности заражения 100 БОЕ/кл. Через 5 часов клеточную среду меняли на среду, свободную от аденовирусного вектора. По прошествии 72 часов после заражения проводили лизис клеток в буфере RIPA (см. выше). Создание аденовирусных векторов было проведено по методике описанной ранее (Rodionov et al., 2010c).

2.9 Выделение и культивирование первичных эндотелиальных клеток трансгенных мышей

Для подтверждения локализации трансгенного hAGXT2 в эндотелиальных клетках было произведено их выделение из аорты в первичной культуре согласно протоколу Kobayashi и соавторов (Kobayashi et al., 2005) с дальнейшим иммуномечением на белки hAGXT2 и маркер эндотелиальных клеток CD31 (протокол см. ниже). Для выделения первичной культуры эндотелиоцитов самцов трансгенных мышей возраста 12 недель наркотизировали с помощью внутрибрюшинной инъекции 0.3-0.4 мл пентобарбитала натрия (10 мг/мл), затем полностью извлекали грудную аорту и помещали ее в среду DMEM (Sigma, Германия), содержащую 20% эмбриональную бычью сыворотку (Sigma, Германия) и 1000 U/мл гепарина. После этого аорту очищали от фрагментов соединительной

ткани и жира с помощью хирургических щипцов и вставляли канюлю диаметром 0.5 мм в проксимальную часть аорты. После нанесения лигатуры с помощью шелковой нити на эту часть внутреннюю полость аорты промывали средой DMEM. Затем лигатуру наносили на противоположную часть аорты и заполняли ее раствором коллагеназы 2 (2 мг/мл), растворенной в среде DMEM. После инкубации в течение 45 мин при температуре 37°C эндотелиальные клетки вымывали из аорты с помощью 5 мл DMEM, содержащей 20% эмбриональную бычью сыворотку. Полученную суспензию клеток осаждали с помощью центрифугирования (5 мин, 1200 g). Затем преципитат клеток ресуспендировали в 2 мл DMEM, содержащей 20% эмбриональную бычью сыворотку и помещали на чашку Петри, покрытую коллагеном 1 типа (Nunc, США). Через 2 ч инкубации при температуре 37°C полученную культуру клеток на чашках Петри промывали подогретым до 37°C фосфатным буфером и добавляли среду, содержащую 20% эмбриональную бычью сыворотку, 100 U/мл пенициллина (Sigma, Германия), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, Германия), 2 mM L-глутамина, раствор заменимых аминокислот (Sigma, Германия), 25 mM буферный раствор HEPES, 1x ECGS (Sigma, Германия) и среду DMEM. Культивацию клеток проводили в течение 1 недели, полученную культуру использовали для дальнейшей иммуноцитохимии.

2.10 Иммуноцитохимическое исследование первичных эндотелиальных клеток трансгенных мышей для изучения локализации трансгенного hAGXT2

Для выявления локализации трансгенного hAGXT2 непосредственно в эндотелиальных клетках проводили двойное иммуномечение первичной культуры клеток аорты антителами к FLAG-эпитопу, являющимся фрагментом трансгенного белка hAGXT2, и антителами к CD31, являющимся согласно данным литературы специфическим маркером эндотелиальных клеток (Newman et al., 1990). Для этого полученную первичную культуру клеток аорты фиксировали с помощью 1:1 раствора ацетона-метанола в течение 10 мин при температуре 4°C, промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером и блокировали раствором Dako (Dako Protein Blocking solution, Dako, США) в течение 20 мин при комнатной

температуре. Затем клетки инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C с разведенными 1:100 первичными кроличьими поликлональными AntiFLAG антителами (Sigma Catalog #7425, США), промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с разведенными 1:250 вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой (Jackson, США). Далее, клетки промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером и инкубировали аналогичным образом с разведенными 1:100 первичными крысиными AntiCD31 антителами (Biolegend, Catalog # 102401, США) и разведенными 1:250 вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой (Jackson, США). Затем клетки промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером, окрашивали разведенным 1:1000 DAPI и помещали в препятствующую фотовыцветанию среду Moviol (Германия).

Для оценки специфичности действия вторичных антител использовали негативный контроль. Для этого проводили стандартные процедуры иммуноцитохимии по методике, описанной выше, при этом клеточные культуры окрашивали только вторичными антителами.

Полученные образцы клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000.

2.11 Измерение содержания L-аргинина, ADMA, SDMA, ADGV и креатинина в плазме, моче и тканях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (HPLC-MS/MS)

Для определения содержания L-аргинина и его метилированных производных SDMA и ADMA в плазме крови, моче и лизатах тканей (печени, почки, сердца и легких) трансгенных мышей и мышей дикого типа использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (HPLC-MS/MS) согласно протоколу описанному ранее (Schwedhelm et al., 2005). Данный метод позволяет измерить очень низкие

концентрации различных веществ вплоть до наномолярных и используется многими авторами для определения ADMA, SDMA и других метаболитов L-аргинина (Maas et al., 2007; Schwedhelm et al., 2005). В качестве внутренних стандартов для определения содержания L-аргинина использовали меченые дейтерием молекулы $[^2\text{H}_7]$ -L-аргинина (Sigma, Германия), а для определения содержания ADMA и SDMA – меченые дейтерием молекулы $[^2\text{H}_6]$ -ADMA (Sigma, Германия). 5 мкл внутреннего стандарта, растворенного в метаноле добавляли к 45 мкл исследуемого образца для достижения конечной концентрации $[^2\text{H}_7]$ -L-аргинина 50 мкМ и $[^2\text{H}_6]$ -ADMA 2 мкМ. Белки осаждали путем добавления 100 мкл ацетона, и супернатант высушивали. Дериватизацию супернатанта проводили с добавлением 100 мкл раствора 1М соляной кислоты в бутаноле (Sigma, Германия) в течение 30 мин при температуре 65°C с последующим высушиванием, в результате чего образовывались сложные бутиловые эфиры ADMA и SDMA. После ресуспендирования образцов в 100 мкл 50% раствора метанола в бидистиллированной воде (pH 4.5) 20 мкл образца вводили в жидкостной хроматограф-тандем масс спектрометр Varian 1200 (Германия).

Определение содержания ADGV в плазме крови, моче и лизатах тканей (печени, почки, сердца и легких) трансгенных животных и животных дикого типа проводили также с использованием метода HPLC-MS/MS согласно протоколу, описанному Martens-Lobenhoffer и соавторами (Martens-Lobenhoffer et al., 2011). Внутренним стандартом при этом являлся меченый дейтерием $[^2\text{H}_6]$ -ADGV (Sigma, Германия). К 100 мкл исследуемого образца добавляли 20 мкл 1М хлорной кислоты и центрифугировали полученный раствор для отделения преципитированных белков в течение 5 мин при 11 000g. К 50 мкл супернатанта добавляли 50 мкл внутреннего стандарта $[^2\text{H}_6]$ -ADGV, растворенного в воде до концентрации 250 нМ и 100 мкл буферного раствора 0.1% муравьиной кислоты и 0.1% формиата аммония (pH 3.5). 20 мкл образца вводили в жидкостной хроматограф-тандем масс спектрометр Varian 1200 (Германия).

Концентрацию креатинина в моче определяли с помощью метода жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC), описанному ранее Marsilio

и соавторами (Marsilio et al., 1999). Содержание L-аргинина, ADMA, SDMA и ADGV в моче нормализовывали по креатинину, что является общепринятым подходом при количественной оценке уровня данных веществ в моче (Rodionov et al., 2016). Обработку полученных результатов проводили в программе Varian 1200 v.1.0, поставляющейся в комплекте с оборудованием.

2.12 Измерение артериального давления

Для определения возможных эффектов трансгенной сверхэкспрессии AGXT2 у мышей на один из важнейших параметров, характеризующих работу кровеносной системы, – артериальное давление, проводили его измерение у мышей с помощью имплантируемых сенсоров PhysioTel®, TA11PAC10 (Data Sciences International DSI, США). Для этого использовали самцов трансгенных мышей и мышей дикого типа возрастом 16 недель. Артериальный катетер, подключенный к сенсору артериального давления имплантировали в левую общую сонную артерию под изофлурановой анестезией. При этом сам сенсор помещали подкожно в районе брюшной полости. Артериальное давление измеряли в течение 2 недель с помощью автоматизированной компьютерной системы Dataquest A.R.T. TM System (Data Sciences International DSI, США). Обработку результатов проводили в программе Dataquest® (США).

2.13 Физиологическое исследование эндотелиальной функции сосудов *ex vivo* методом изометрии

Для анализа влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на функцию эндотелия проводили исследование вазоактивных реакций аорты методом изометрии. Данный метод является одним из общепринятых подходов в изучении физиологической активности эндотелия в осуществлении вазоактивных реакций сосудов *ex vivo* (Максимович и др., 2004). Для исследований использовали кольцевидные сегменты грудной аорты самцов трансгенных мышей и мышей дикого типа длиной 3 мм, наркотизированных с помощью внутрибрюшинного введения 100 мг кетамина и 10 мг ксилазина (Sigma, Германия) /кг веса. Кольца

аорты, предварительно очищенные от соединительной ткани и висцерального жира, помещали в отдельные ячейки 48-луночных планшетов, содержащие 0.5 мл DMEM, 5 mM глюкозу (Sigma, Германия), 120 U/мл пенициллина (Sigma, Германия), 120 г/мл стрептомицина (Sigma, Германия) и 50 г/мл полимиксина В (Sigma, Германия).

Исследуемые кольцевидные сегменты аорты подвешивали между стальными проволочными держателями, помещенными в водяную баню типа “organ bath” (Schuler Organ bath Type 809, Hugo Sachs Elektronik, Германия), представляющую двухстенный стеклянный сосуд (рис. 13). При этом один держатель укрепляли на дне сосуда, а другой прикрепляли к датчику, соединенному с устройством, регистрирующим величину изометрического напряжения сосудистых колец (F30-sensor, Hugo Sachs Elektronik, Германия). Внутренний цилиндр сосуда заполняли буферным раствором Кребса. В раствор Кребса производилась непрерывная подача газовой смеси, содержащей 95% кислорода и 5% углекислого газа, а во внешнем цилиндре водяной бани обеспечивалась постоянная циркуляция воды, и с помощью водяного термостата поддерживалась постоянная температура 37°C.

Исследуемые кольца аорты выдерживали при изометрическом натяжении в 0.5 грамма в течение одного часа для развития в них стабильного напряжения. Изучение вазодилататорной активности эндотелия производилось на сосудистых кольцах, предварительно спазмированных α_1 -адреностимулятором фенилэфрином (10^{-7} - 10^{-6} М) до уровня 60% от максимальной вазоконстрикции.

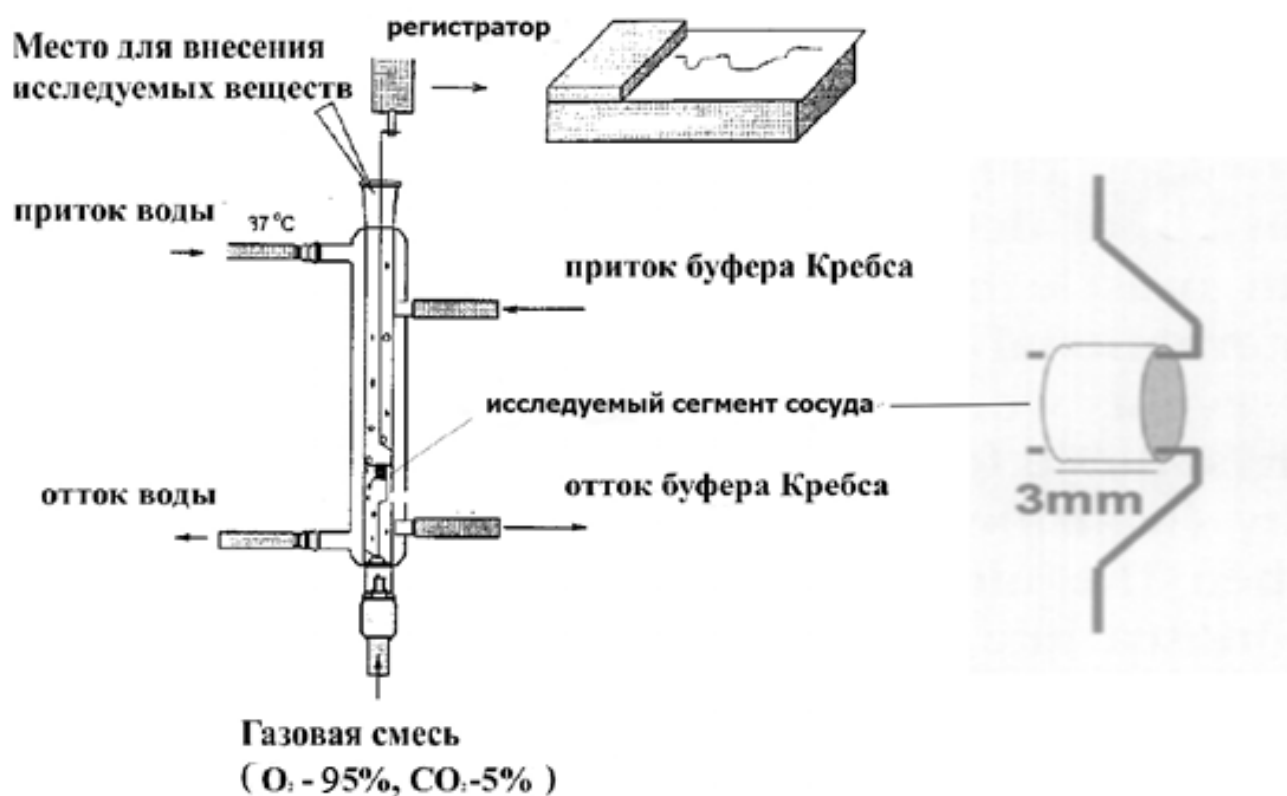


Рисунок 13. Схема устройства для исследования вазоактивных реакций эндотелия сосудов *ex vivo* методом изометрии (Максимович и др., 2004)

С целью исследования обусловленной эндотелием NO-зависимой дилатации на кольца аорты воздействовали ацетилхолином, стимулирующим синтез NO в эндотелии. Для построения дозозависимой кривой ацетилхолин последовательно вносили в водяную баню со ступенчатым возрастанием концентрации от 10^{-9} до 3×10^{-5} М. Сосудорасширяющие ответы, независимые от эндотелия, оценивали путем использования эндотелий-независимого вазодилататора нитропрусида натрия в концентрациях от 10^{-11} до 3×10^{-5} М. Величину вазодилатации колец аорты под влиянием ацетилхолина и нитропрусида натрия выражали в процентах от величины вазоконстрикторного ответа, на фоне которого регистрировался сосудорасширяющий эффект. Математическую обработку результатов проводили с помощью нелинейного регрессионного анализа: для каждой кривой, выражающей зависимость доза-эффект вычисляли индивидуальную величину EC_{50}

- концентрации агониста, введение которой вызывает эффект равный половине максимального значения.

2.14 Статистический анализ полученных данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США) с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, который используется для оценки значимости различий двух групп количественных признаков при ограниченном объеме выборки. В случае анализа сосудистых ответов аорты на эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые релаксанты, а также для анализа динамики изменений массы тела использовался двухфакторный дисперсионный анализ для связанных групп (two-way repeated measures ANOVA) после проверки распределений на нормальность. Анализ множественных сравнений проводился с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Сравнение проводилось в следующих группах: трансгенные самцы - трансгенные самки, самцы дикого типа - самки дикого типа, трансгенные самцы - самцы дикого типа, трансгенные самки - самки дикого типа, трансгенные мыши - мыши дикого типа. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Поскольку в дальнейшем статистический анализ не выявил значимых различий по всем исследуемым параметрам между особями разного пола внутри каждой из групп трансгенные мыши - контрольные мыши (за исключением динамики изменения массы тела), для удобства представления данных было принято решение объединить самцов и самок каждой из групп.

Для построения диаграмм и графиков использовался программный пакет GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены с указанием среднего значения исследуемой величины, стандартной ошибки среднего и количества исследуемых образцов n .

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ AGXT2 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ И ИХ ОБЩАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

3.1 Анализ результатов трансгенеза в линии мышей hAGXT2

Модификацию генома модельных мышей осуществляли путем введения раствора ДНК трансгенной конструкции в пронуклеус ранних эмбрионов методом микроинъекций с последующей их трансплантацией псевдобеременным самкам-реципиентам. Всего было имплантировано 330 эмбрионов. Для выживших потомков в количестве 17 особей был проведен генетический анализ методом ПЦР с помощью специфической пары праймеров, которая позволяла синтезировать фрагмент ДНК размером 138 п.н. на матрице ДНК, выделенной из животных, несущих трансгенную конструкцию (Рис. 14).

Из 17 генотипированных особей лишь у 2 было выявлено присутствие трансгенной конструкции (Таблица 3). Таким образом было выделено 2 фаундера, обозначенные впоследствии как особь 180 и особь 210.

Таблица 3. Количество животных, полученное при трансгенезе конструкции, содержащей ген AGXT2 человека

Общее число пересаженных ранних эмбрионов	330
Количество рожденных животных после операций по пересадке модифицированных ранних эмбрионов	17
Количество первичных фертильных фаундеров	2
Общее количество животных, использованных в работе	389

Каждый из фаундеров был способен передавать трансгенную конструкцию потомству. На основе фаундеров 180 и 210 были получены две независимые трансгенные мышинные линии. В данной работе была использована линия, полученная от фаундера 180. В экспериментах использовались гибриды первого, второго и третьего поколения, полученные в результате скрещивания

оригинальной трансгенной линии с C57BL/6 линией лабораторных мышей (рис. 11). Последующий биохимический анализ активности AGXT2 не выявил различий в характере наследования трансгена в ряду различных поколений. Всего в рамках данного исследования было получено 389 животных в F1, F2 и F3 поколениях, которые имели общих производителей и общий генетический фон. Животные трансгенной линии hAGXT2 как в поколении F1, так и в последующих поколениях после возвратных скрещиваний с C57BL/6, рождались без внешних признаков патологии: они нормально развивались, были фертильны и оставляли жизнеспособное потомство.

В потомстве F1 у трансгенного фаундера 180 и самки дикого типа обнаружено 18 трансгенных мышей (7 самцов и 11 самок) и 19 мышей дикого типа (10 самцов и 9 самок). Таким образом расщепление поколения F1 составило 1:1 (рис. 14). Аналогичная картина скрещивания наблюдалась и в последующих поколениях. Дальнейшие исследования не выявили различий между самками и самцами, что свидетельствует об аутосомном типе наследования.

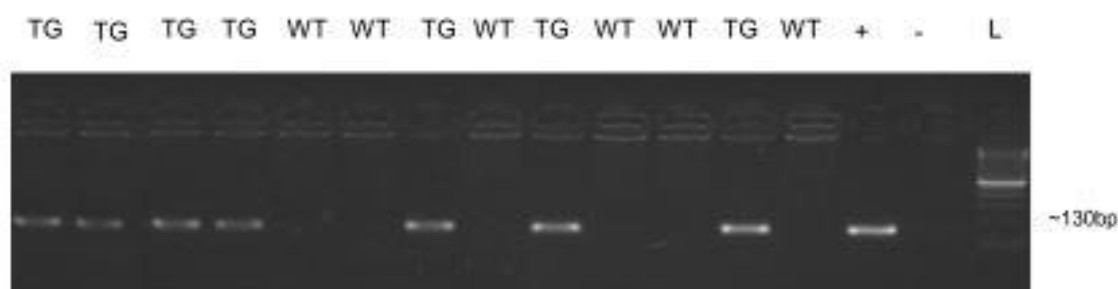


Рисунок 14. Генотипирование потомства F1 от трансгенной самки и самца дикого типа.

TG - трансгенная мышь; WT - мышь дикого типа; "+" - положительный контроль; "-" - отрицательный контроль; L - молекулярный маркер

3.2 Фенотипический анализ трансгенной линии мышей hAGXT2

Трансгенные мыши не отличались по внешнему виду от мышей дикого типа (рис. 15). Детальная некропсия внутренних органов не выявила никаких анатомических отклонений. Постнатальное развитие трансгенных мышей было

аналогично мышам дикого типа. Средняя продолжительность жизни трансгенных мышей не отличалась от мышей дикого типа и составляла более 2-х лет.

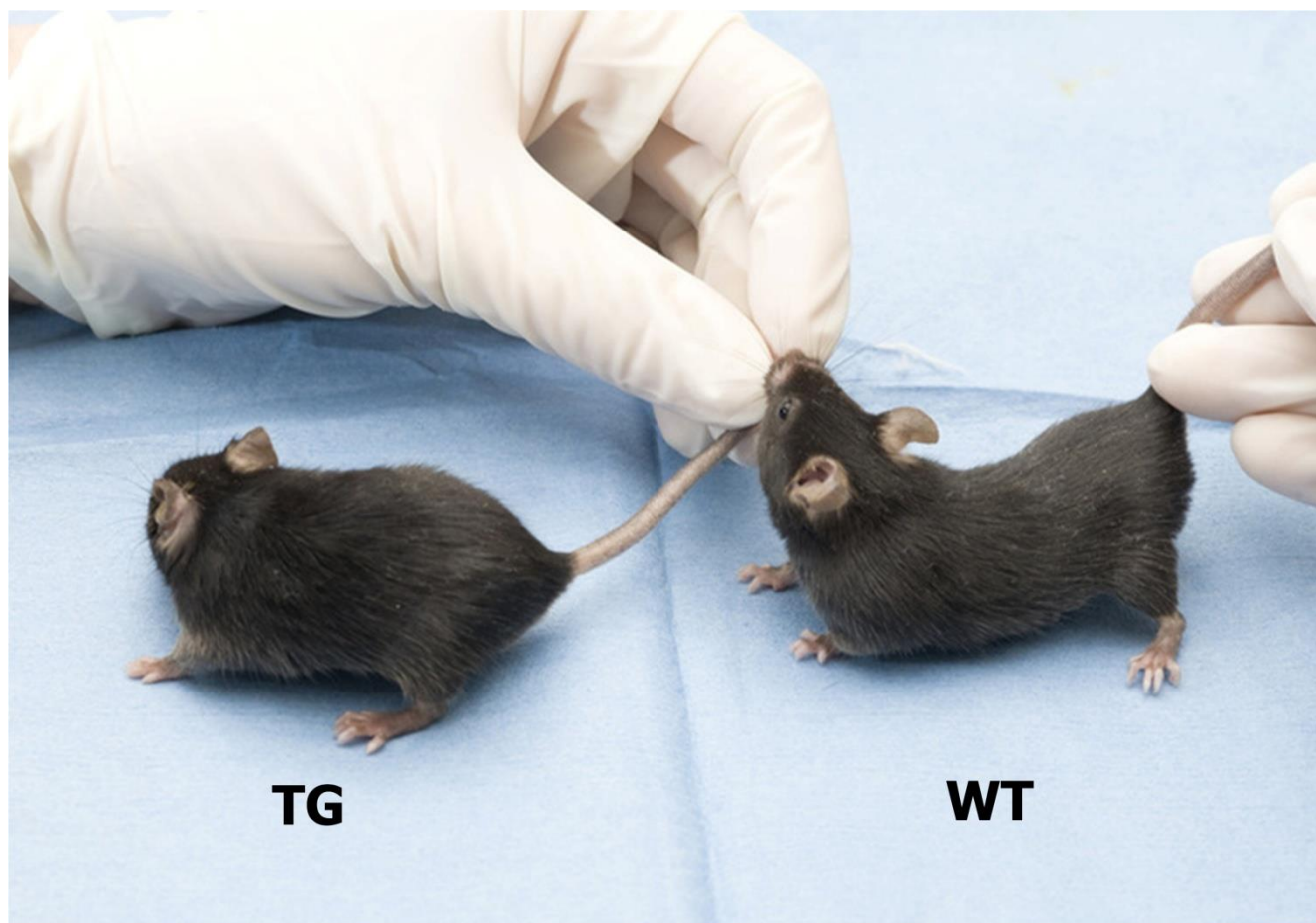


Рисунок 15. Общий вид AGXT2 трансгенных мышей и мышей дикого типа.

Сравнение динамики изменений массы тела у трансгенных животных и животных дикого типа также не выявило достоверных различий (рис. 16) ($p > 0.05$; $n = 9$; двухфакторный дисперсионный анализ)

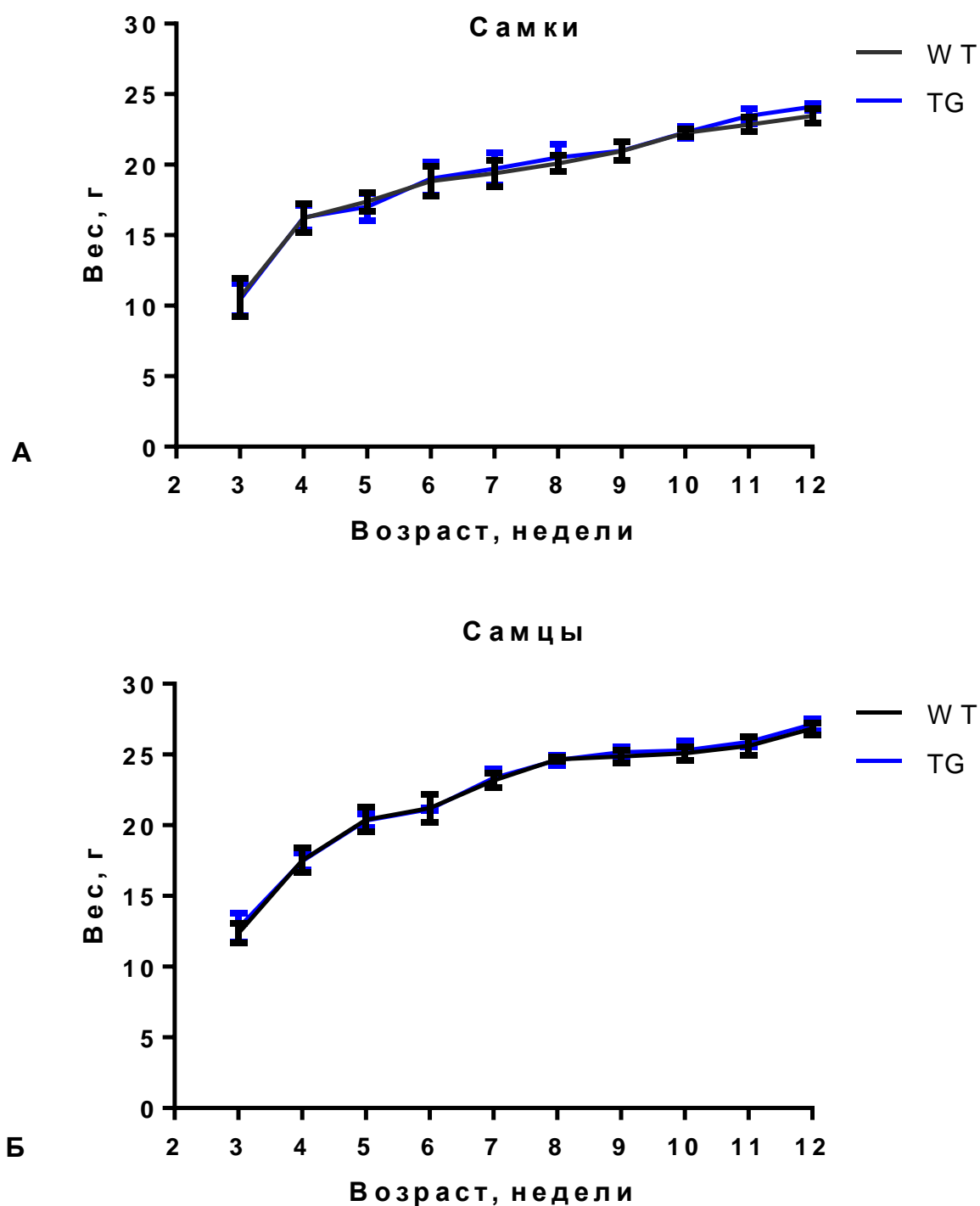


Рисунок 16. Сравнение динамики изменений массы тела у самок (А) и самцов (Б) hAGXT2 трансгенных мышей (TG) и животных дикого типа (WT) $p > 0.05$; $n=9$; двухфакторный дисперсионный анализ

3.3 Клинический анализ крови трансгенной линии мышей hAGXT2

В настоящее время существуют данные о том, что AGXT2 может участвовать в реакции трансаминирования δ -Аминолевулиновой кислоты, которая является первичным компонентом синтеза тетрапирролов - порфиринов, входящих в состав гемсодержащих белков (Noguchi, Mori, 1981; Varticovski et al., 1980), в том числе гемоглобина. Для того чтобы проверить гипотезу о том, что концентрация гемоглобина в крови, концентрация гемоглобина в эритроците и другие параметры могут изменяться в связи с трансгенной сверхэкспрессией hAGXT2, мы провели клинический анализ крови. Кроме того, клинический анализ крови использован как одна из важных фенотипических характеристик hAGXT2 трансгенных мышей.

Результаты клинического анализа крови трансгенных мышей и мышей дикого типа представлен на рис. 17. Достоверных различий при анализе абсолютного количества лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов, а также содержанию гемоглобина среднего объема эритроцита и средней концентрации гемоглобина в эритроците между трансгенными мышами и мышами дикого типа не выявлено ($p > 0.05$; $n=4$; U-критерий Манна-Уитни). Данные результаты свидетельствуют о том, что нарушения синтеза гемоглобина в связи с трансгенной сверхэкспрессией hAGXT2 не происходит.

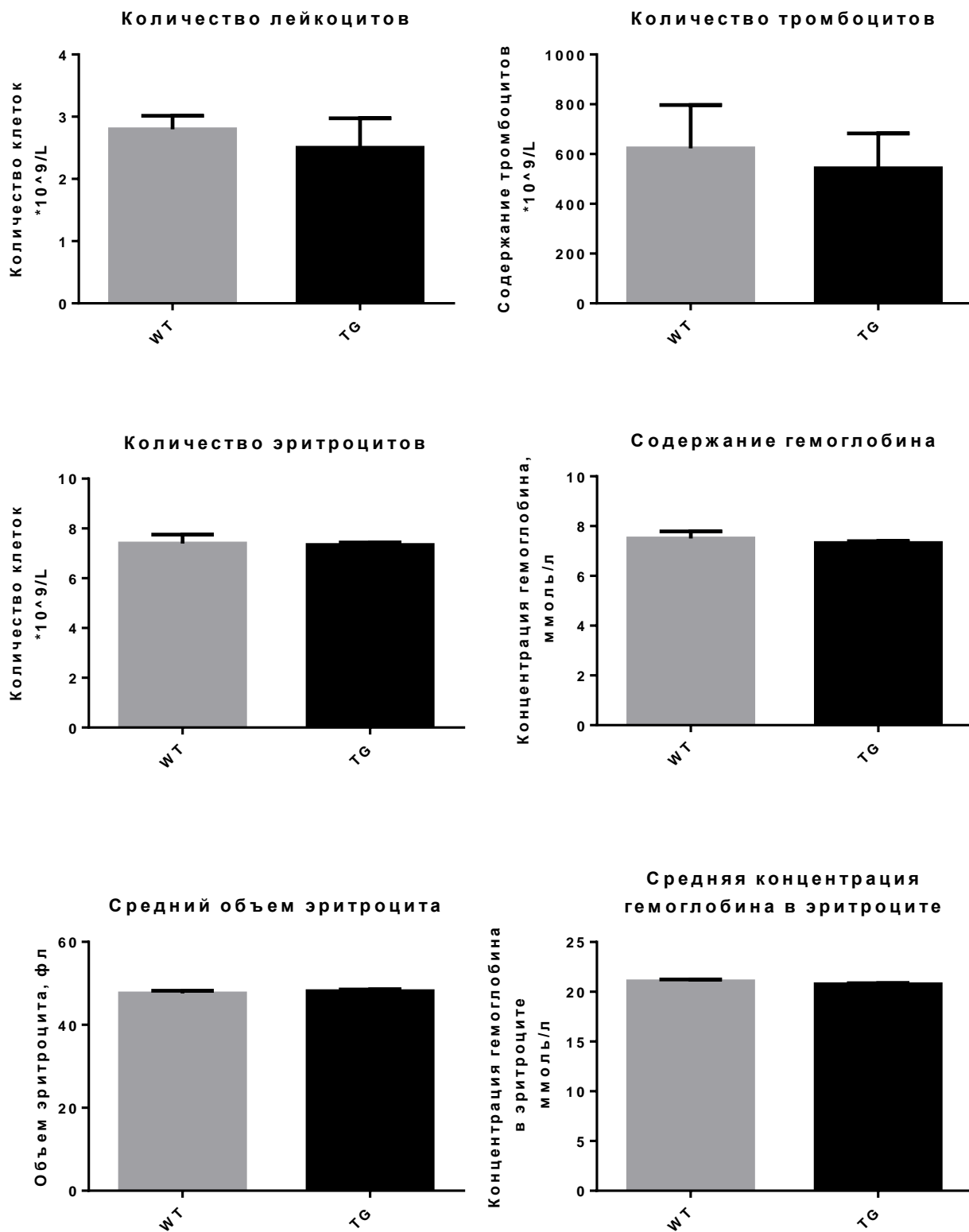


Рисунок 17. Клинический анализ крови трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT)

$p > 0.05$; $n = 4$; U-критерий Манна-Уитни

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ТРАНСГЕНА В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ МЫШЕЙ ЛИНИИ hAGXT2

Одной из первостепенных задач после создания трансгенной мыши был анализ тканеспецифичности экспрессии трансгенного hAGXT2, как на уровне транскрипции, так и на белковом уровне. Для исследования были выбраны 8 тканей: аорта, мозг, сердце, почка, печень, легкое, скелетная мышца и селезенка. Также для оценки возможного компенсаторного влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на пути метаболизма ADMA был проведен анализ мРНК транскриптов эндогенного mAGXT2, а также гидролаз DDAN1 и DDAN2 в вышеперечисленных тканях.

4.1 Анализ экспрессии генов AGXT2, DDAN1, DDAN2 на уровне транскрипции в тканях трансгенных мышей и мышей дикого типа

Анализ трансгенной экспрессии hAGXT2 с методом ПЦР в реальном времени показал наличие его транскриптов во всех тканях трансгенных мышей (рис. 18). Транскриптов hAGXT2 не было выявлено ни в одной из тканей мышей дикого типа.

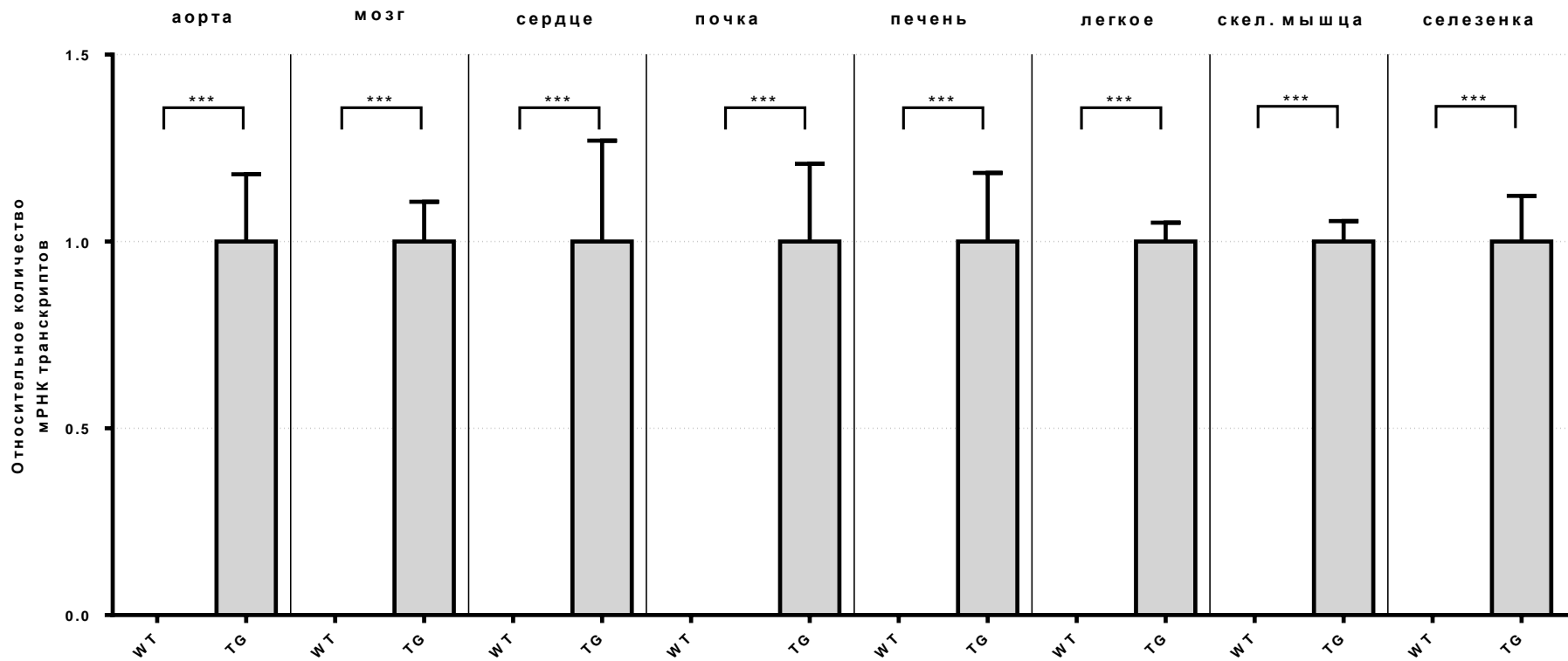


Рисунок 18. Экспрессия трансгенного hAGXT2 в различных тканях трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа. Трансгенная экспрессия hAGXT2 в каждой из тканей трансгенных мышей принята за единицу. Внутренний контроль HPRT.

*** $p < 0.001$; $n = 5-7$; U-критерий Манна-Уитни

Трансген hAGXT2 экспрессировался во всех тканях трансгенных мышей с разной интенсивностью. Так, наибольшее содержание мРНК транскриптов hAGXT2 наблюдалось в сердце, печени и скелетной мышце (рис. 19), что превосходило по уровню остальные ткани в 2 и более раз.

Поскольку дифференциальная экспрессия генов во многом зависит от регуляторных участков гена и промоторной области, можно предположить, что данные различия связаны с выбранным нами для трансгенной экспрессии hAGXT2 CAG промотором. В других моделях трансгенных мышей была также показана преимущественная экспрессия трансгенов под контролем данного промотора в тканях сердца и печени (Kim et al., 2013).

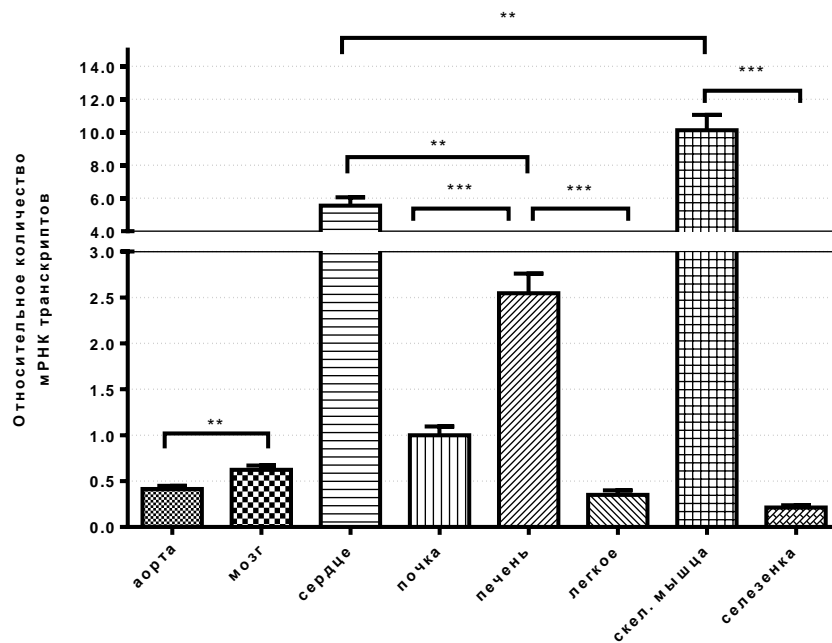


Рисунок 19. Сравнение экспрессии трансгенного hAGXT2 в различных тканях трансгенных мышей. Экспрессия hAGXT2 в ткани почек трансгенных мышей принята за единицу. Внутренний контроль m18s.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n=5-7$; Критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения

Экспрессия эндогенного mAGXT2 в исследованных животных была выявлена только в почке и печени, что подтверждается данными мировой литературы (Kittel et

al., 2013). При этом различий между трансгенными мышами и мышами дикого типа не было обнаружено (рис. 20).

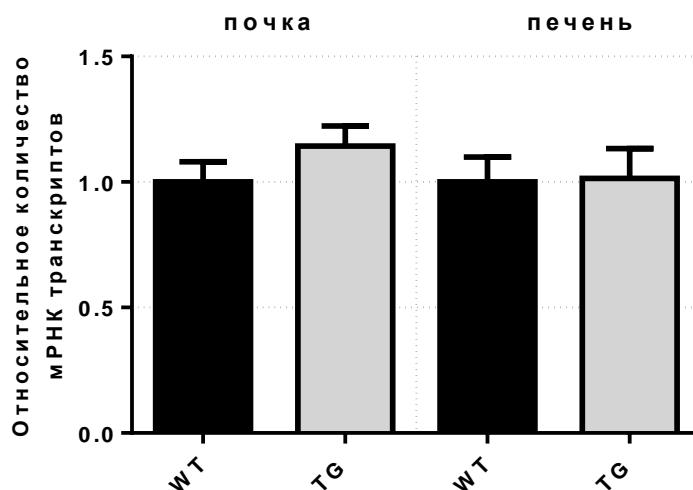


Рисунок 20. Сравнение экспрессии эндогенного mAGXT2 в тканях почек и печени трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Экспрессия mAGXT2 в тканях мышей дикого типа принята за единицу. Внутренний контроль HPRT.

$p > 0.05$; $n = 6$; U-критерий Манна-Уитни

Далее была проанализирована общая экспрессия AGXT2 (как трансгенная так и эндогенная одновременно) для сравнения суммарного содержания AGXT2 в тканях трансгенных мышей и мышей дикого типа. Данный подход позволил оценить, насколько трансгенная экспрессия фермента AGXT2 в исследованных тканях мышей линии hAGXT2 превосходит физиологическую норму. В тканях почки и печени мышей суммарная экспрессия AGXT2 была соответственно в 8 и 12 раз выше по сравнению с мышами дикого типа (рис. 21).

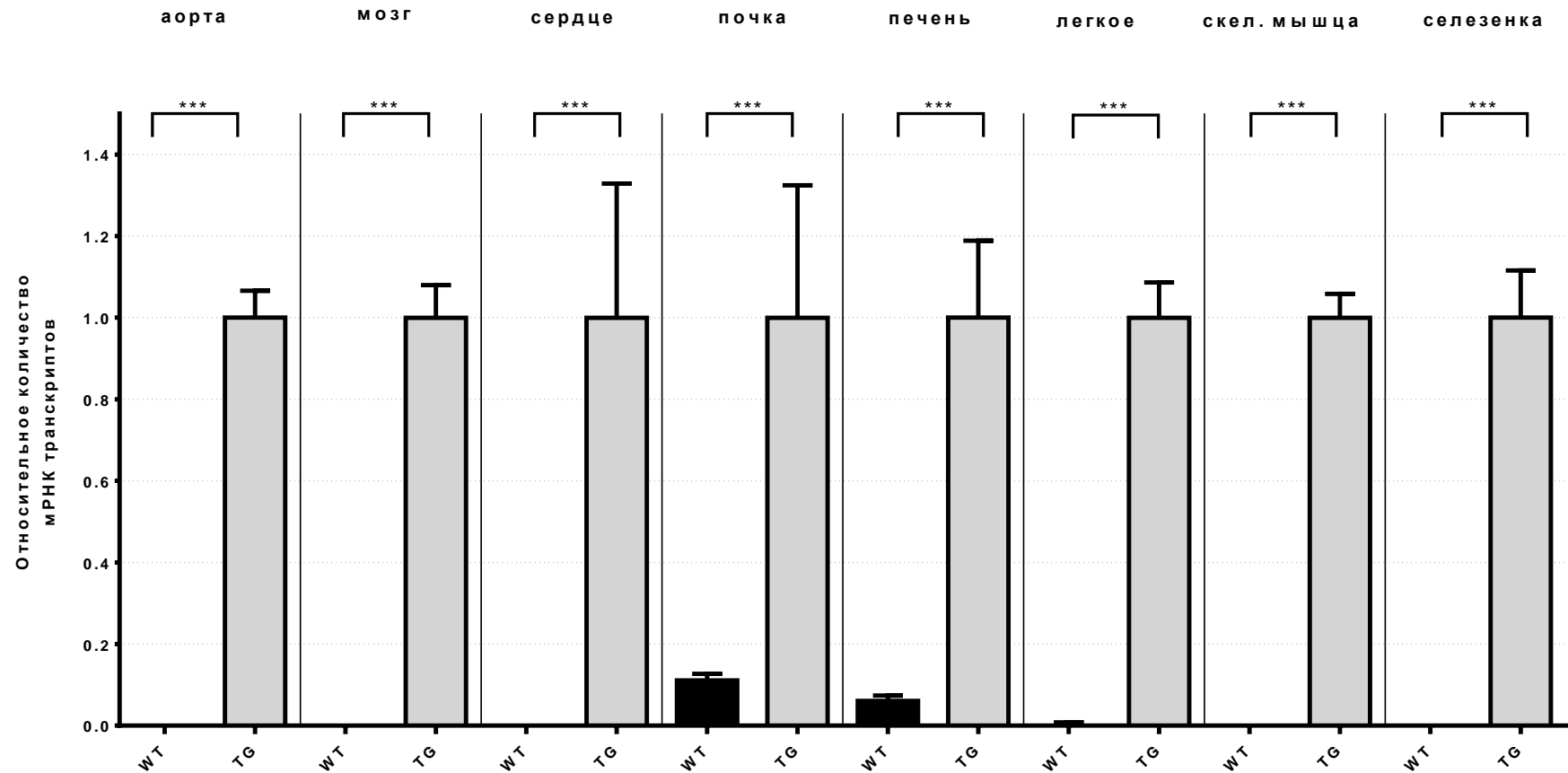


Рисунок 21. Сравнение общей экспрессии AGXT2 (трансгенной+эндогенной) в различных тканях трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Общая экспрессия AGXT2 в каждой из тканей трансгенных мышей принята за единицу. Внутренний контроль HPRT.

*** $p < 0.001$; $n = 5-7$; U-критерий Манна-Уитни

Таким образом, транскрипты AGXT2 выявлены на высоком уровне во всех проанализированных тканях трансгенных мышей. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что увеличение экспрессии AGXT2 в тканях трансгенных мышей происходит именно за счет интеграции трансгена и появлению hAGXT2 транскриптов, а не за счет каких-либо изменений в уровне экспрессии эндогенного AGXT2.

Помимо экспрессии AGXT2 была также проанализирована эндогенная экспрессия DDAN1 и DDAN2, ферментов, участвующих в гидролитическом пути метаболизма ADMA в организме. Было показано, что DDAN1 экспрессируется преимущественно в мозге, почках и печени у мышей дикого типа, а DDAN2 - на одинаковом уровне в большинстве тканей (рис. 22, 23). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными (Tran et al., 2000). Так, анализ, проведенный Tran и соавторами с помощью дот-блоттинга также показал преимущественную экспрессию DDAN1 в тканях мозга, почек и печени и повсеместную экспрессию DDAN2.

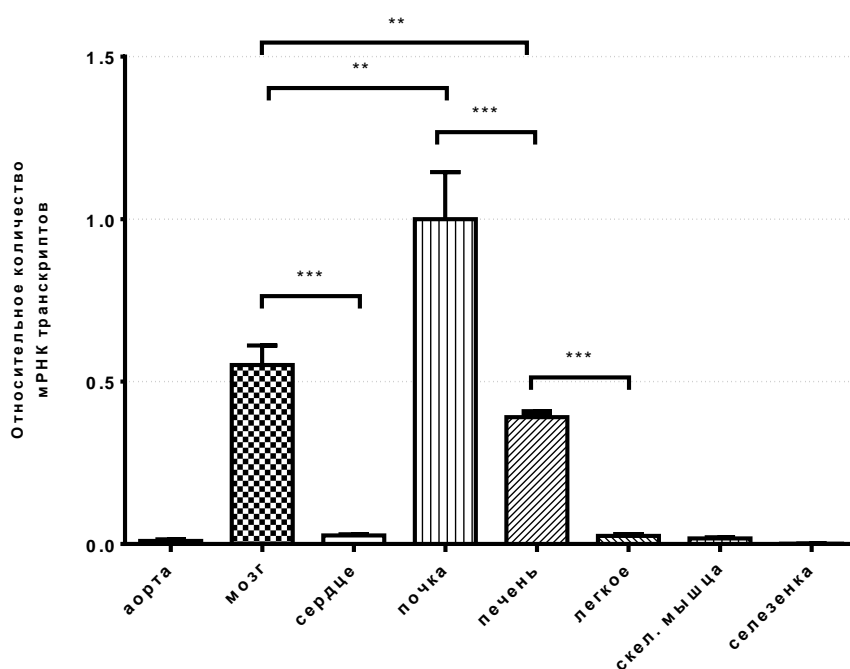


Рисунок 22. Экспрессия эндогенного DDAN1 в тканях мышей дикого типа.

Экспрессия DDAN1 в почке принята за единицу. Внутренний контроль m18s.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 5-7$; Критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения

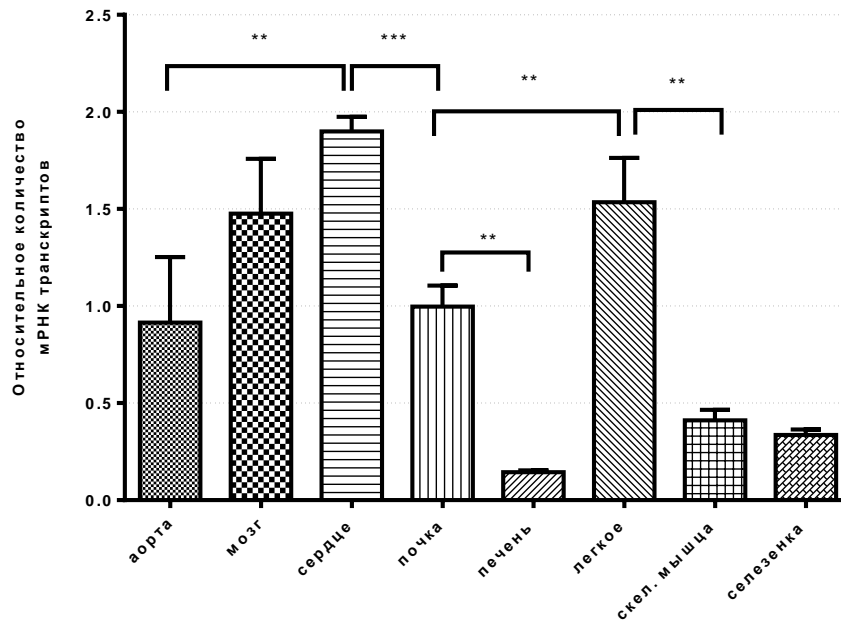


Рисунок 23. Экспрессия эндогенного DDAN2 в тканях мышей дикого типа. Экспрессия DDAN1 в почке принята за единицу. Внутренний контроль m18s.

** $p < 0.01$; $n = 5-7$; Критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения

В мозге трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа была достоверно понижена экспрессия DDAN1 (рис. 25, $p < 0.01$), а в аорте - понижена экспрессия DDAN2 (рис. 25, $p < 0.01$). В селезенке трансгенных мышей было показано - значительное (примерно в 2 раза) увеличение экспрессии как DDAN1, так и DDAN2 (рис. 24, 25 $p < 0.01$).

Данные результаты, по-видимому, свидетельствуют о различных компенсаторных механизмах, происходящих в данных тканях. Так, повышенная экспрессия AGXT2 в тканях может приводить к увеличению интенсивности метаболизма ADMA, и как следствие - к гиперпродукции оксида азота. Гиперпродукция оксида азота может иметь отрицательные последствия для иммунной, нервной и других систем организма, в связи с крайне высокой реактивностью данного радикала. В частности, избыток NO в нервной системе, связанный с повышенной активностью nNOS, может приводить к инсульту и нейродегенерации (Vallance, Leiper, 2002). С этой точки зрения невозможно

объяснить увеличенную экспрессию DDAN1 и DDAN2 в тканях селезенки трансгенных мышей, однако данное увеличение экспрессии, по-видимому, не играет существенной физиологической роли, поскольку содержание как DDAN1, так и DDAN2 находится здесь на очень низком уровне по сравнению с другими тканями (см. рис. 22, 23).

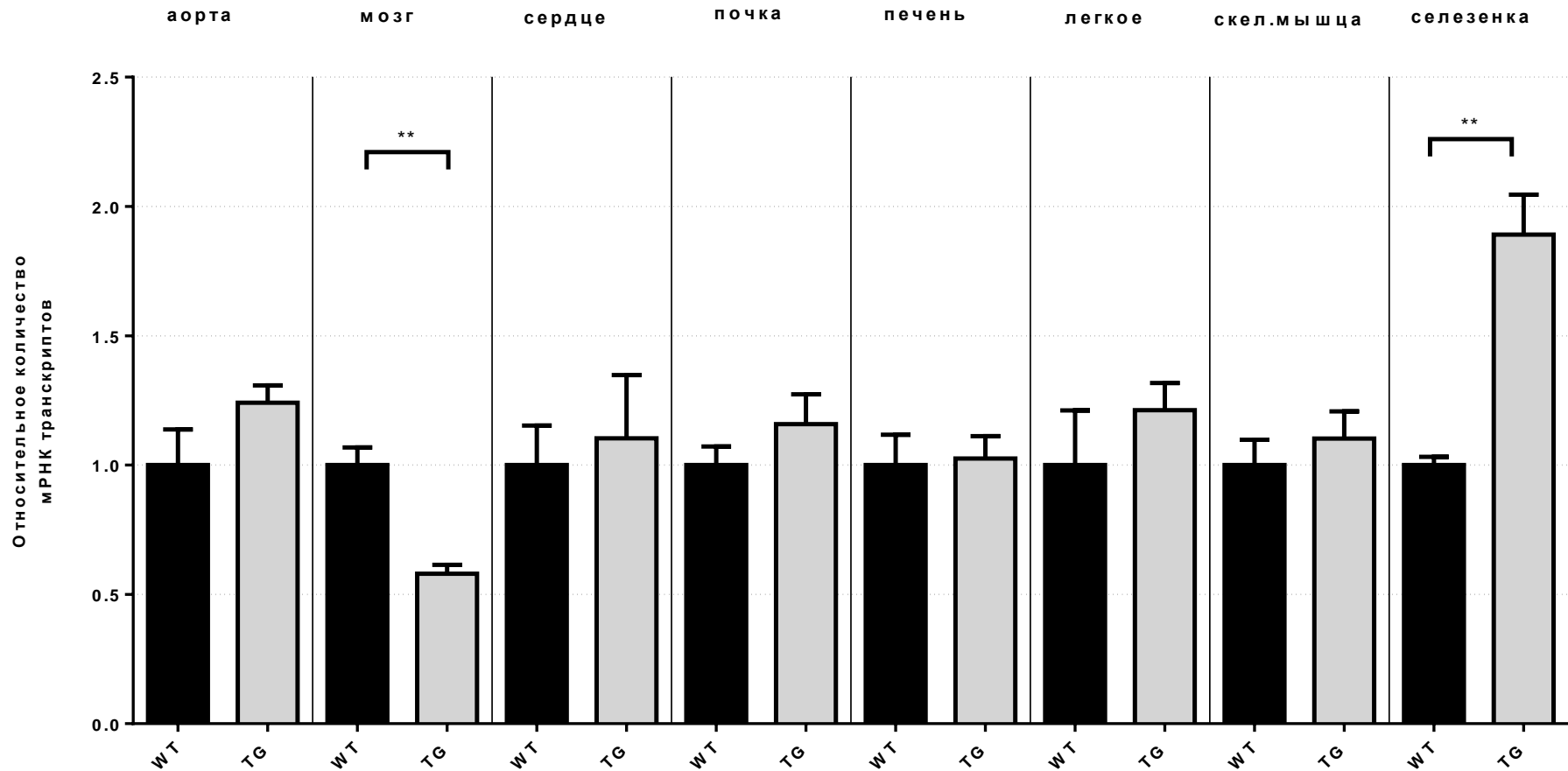


Рисунок 24. Сравнение экспрессии DDAN1 в различных тканях трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Экспрессия DDAN1 в каждой из тканей мышей дикого типа принята за единицу. Внутренний контроль HPRT.

** $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; $n = 5-7$; U-критерий Манна-Уитни

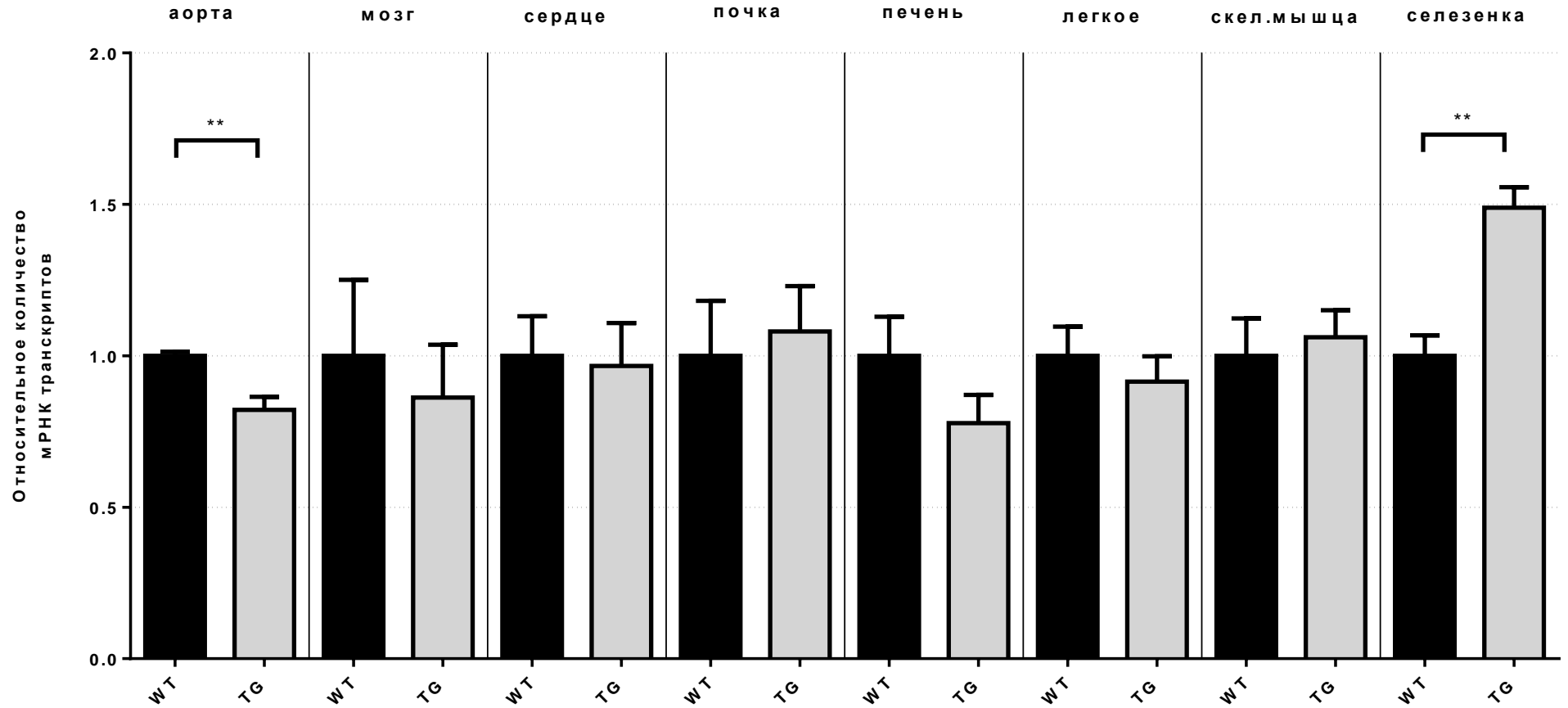


Рисунок 25. Сравнение экспрессии DDAN2 в различных тканях трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Экспрессия DDAN2 в каждой из тканей мышей дикого типа принята за единицу. Внутренний контроль HPRT.

** $p < 0.01$; $n = 5-7$; U-критерий Манна-Уитни

4.2 Анализ белковой экспрессии трансгенного AGXT2 в тканях трансгенных мышей

После оценки уровня мРНК транскриптов hAGXT2 важной задачей была оценка белковой экспрессии трансгена. С помощью метода Вестерн-блот была показано наличие трансгенного белка во всех тканях трансгенных мышей. При этом белковая экспрессия трансгенного AGXT2 отсутствовала в тканях мышей дикого типа (рис. 26, 27). Экспрессия GAPDH, который использовался в качестве внутреннего контроля для Вестерн-блота стабильно детектировалась во всех исследованных тканях.

Уровень белковой экспрессии AGXT2 в тканях трансгенных мышей оказался различным. Максимальная белковая экспрессия трансгена наблюдалась в тканях сердца, печени и скелетной мышцы, что соответствует результатам, полученным с помощью метода ПЦР в реальном времени (рис. 19, 28). Денситометрический анализ изображений мембран, полученных методом Вестерн-блот, показал значимые различия в экспрессии трансгена в селезенке от тканей сердца, печени и скелетной мышцы (рис. 28, Б), что также соответствует результатам исследования сравнительного содержания мРНК транскриптов (рис. 19).

Подводя итоги вышесказанному, трансгенная сверхэкспрессия hAGXT2 наблюдалась во всех тканях трансгенных мышей как на уровне мРНК, так и на белковом уровне. При этом наибольшая экспрессия трансгена выявлена в скелетной мышце, сердце и печени.

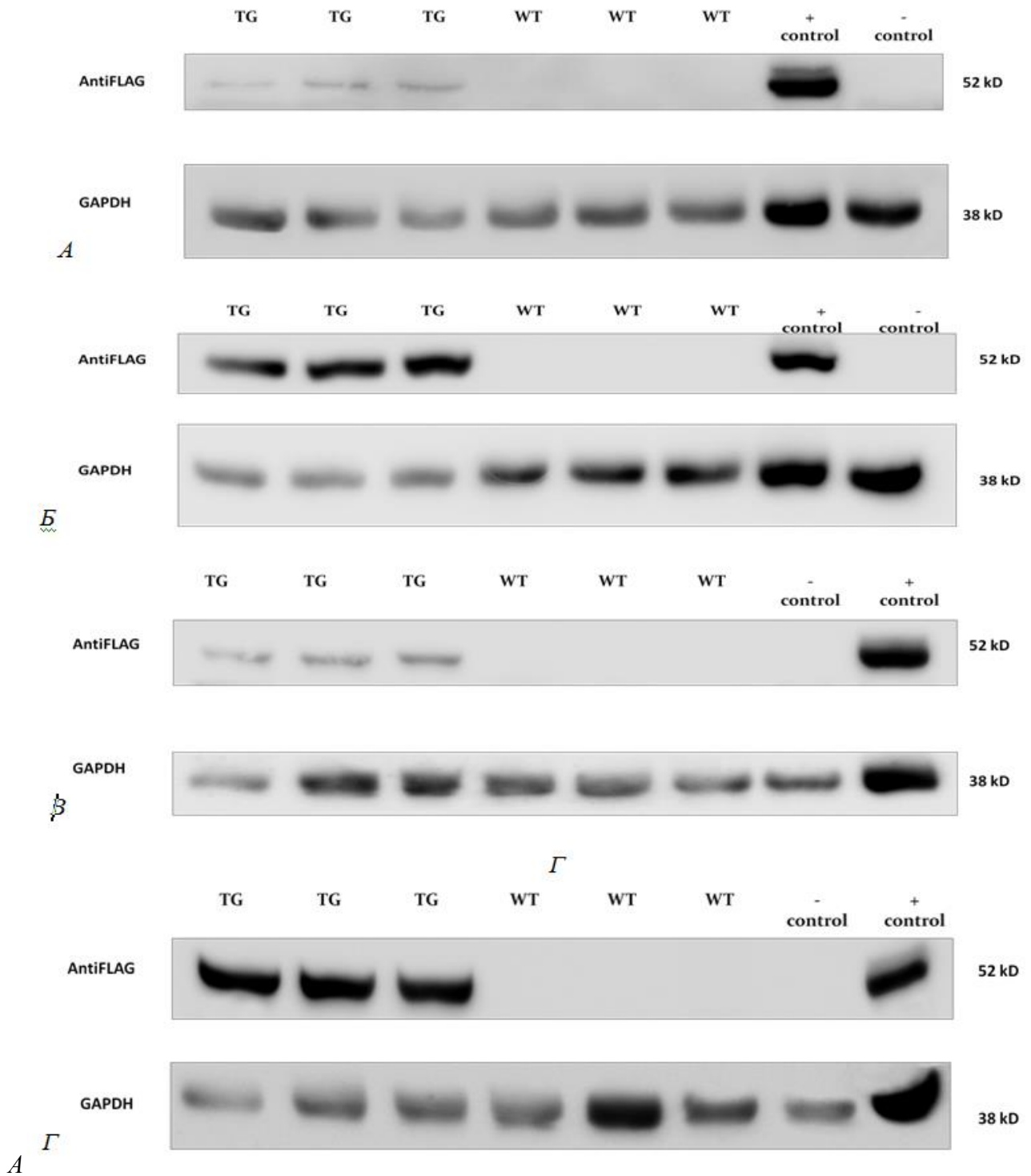


Рисунок 26. Трансгенная экспрессия hAGXT2 на белковом уровне в мозге (А), сердце (Б), почке (В) и печени (Г) трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). "+" - положительный контроль, "-" - отрицательный контроль

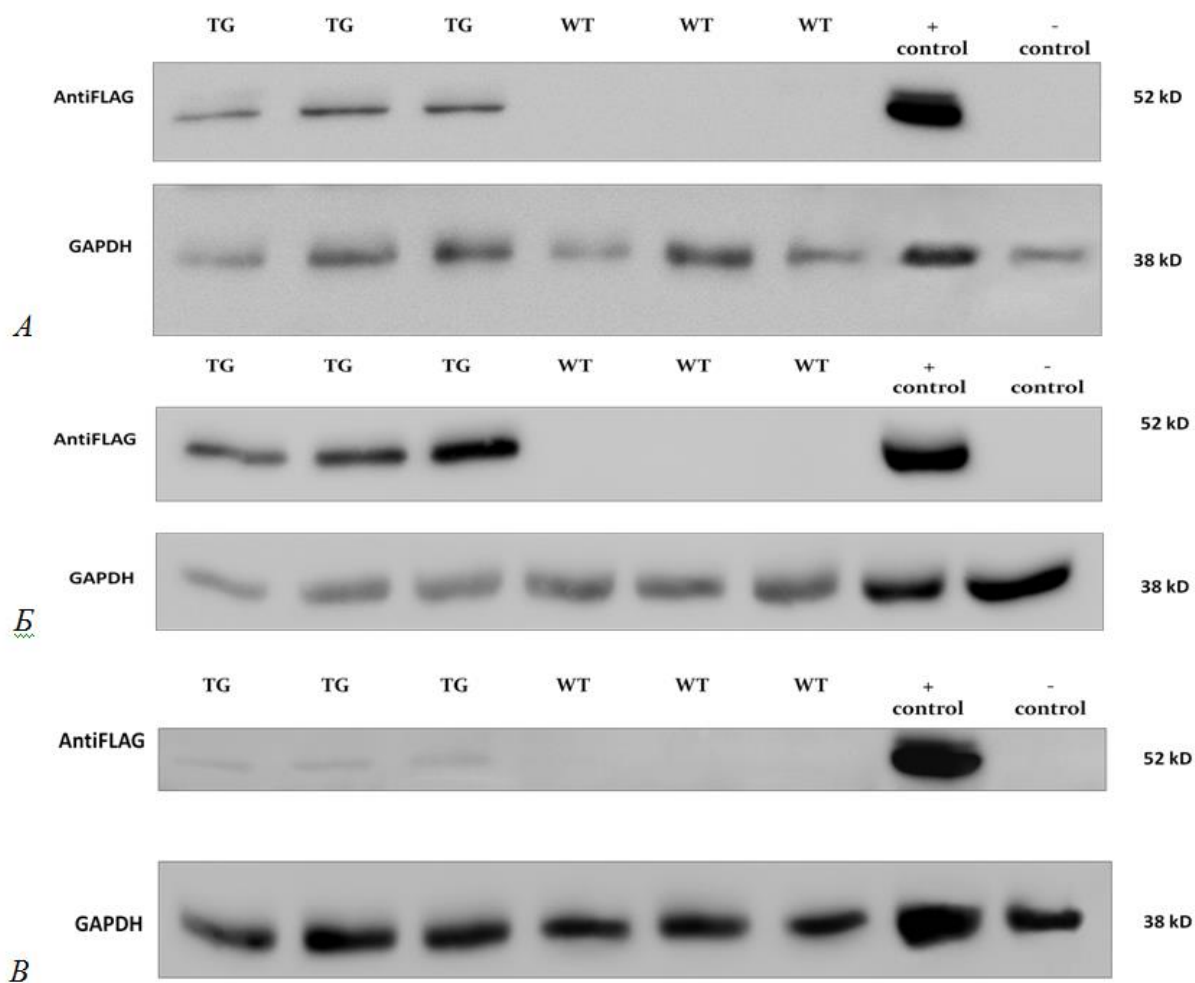


Рисунок 27. Трансгенная экспрессия hAGXT2 на белковом уровне в легком (А), скелетной мышце (Б) и селезенке (В) трансгенных мышей (ТГ) и мышей дикого типа (WT). "+" - положительный контроль, "-" - отрицательный контроль

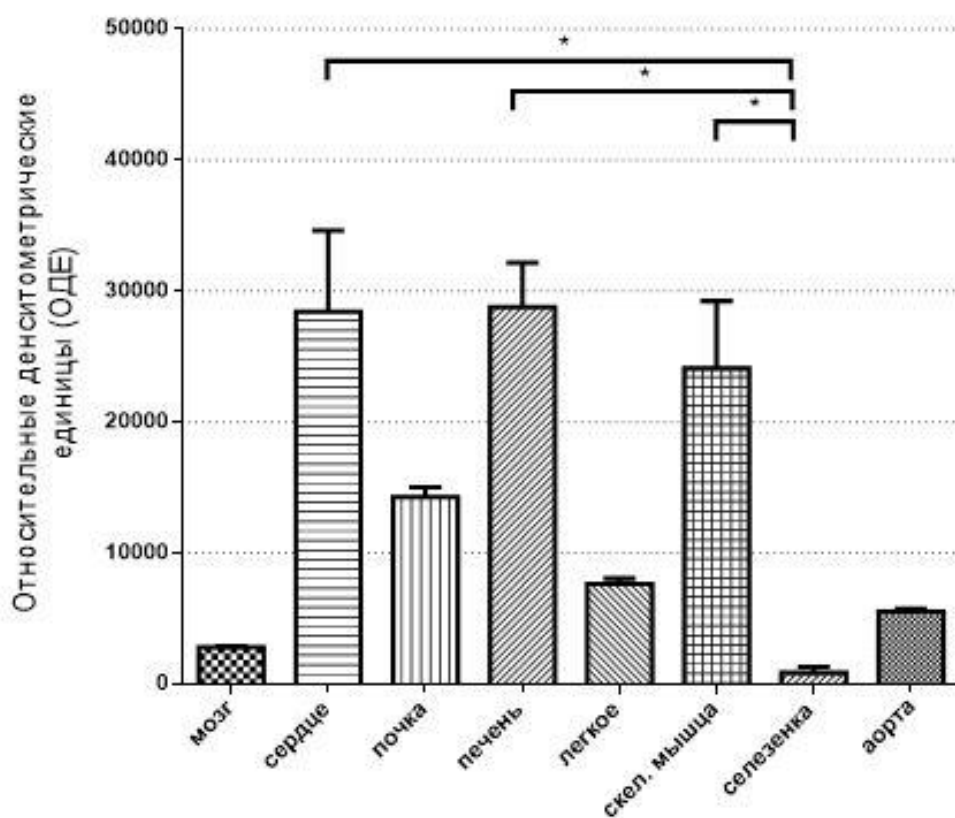
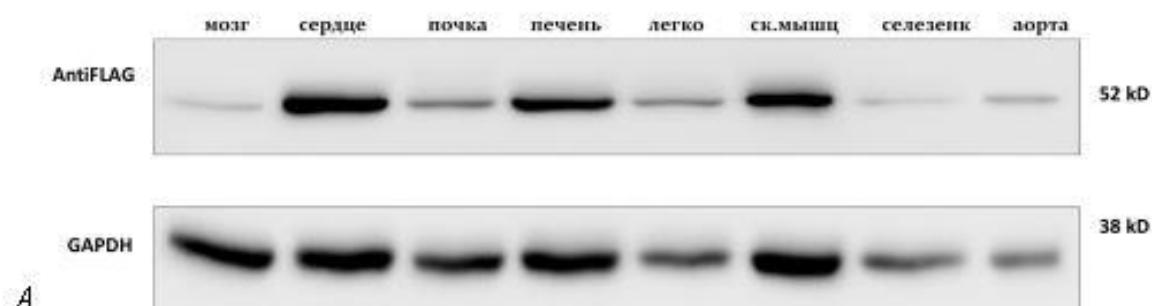


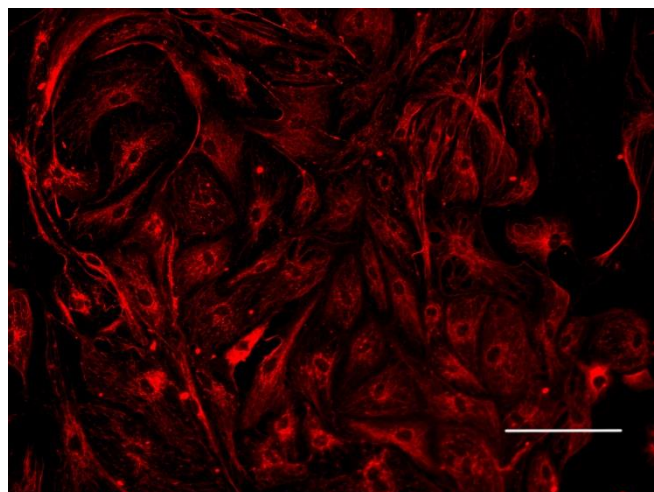
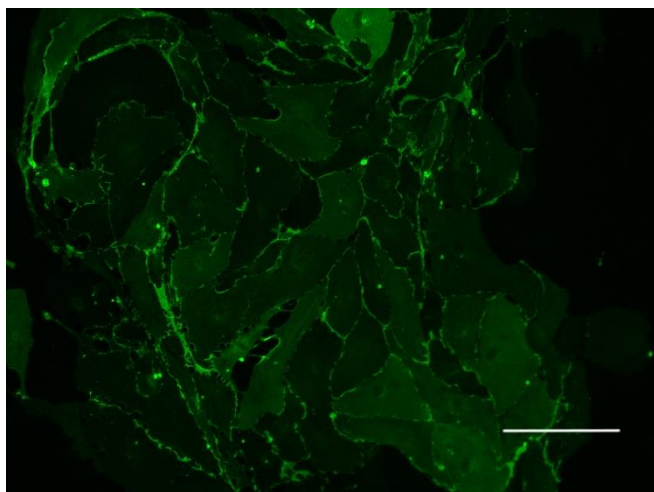
Рисунок 28. Сравнение белковой экспрессии hAGXT2 в различных тканях трансгенных мышей методом Вестерн-блот (А) и анализ полученных данных с помощью денситометрии (Б)

* $p < 0.05$; $n = 3$; Критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения

4.3 Изучение клеточной локализации трансгенного hAGXT2 в тканях аорты

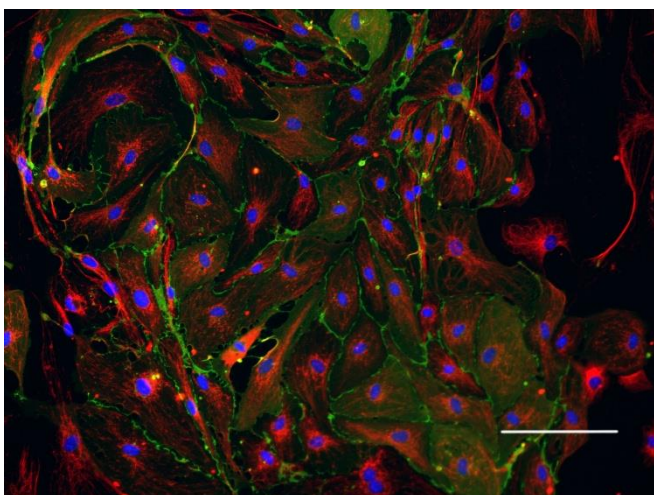
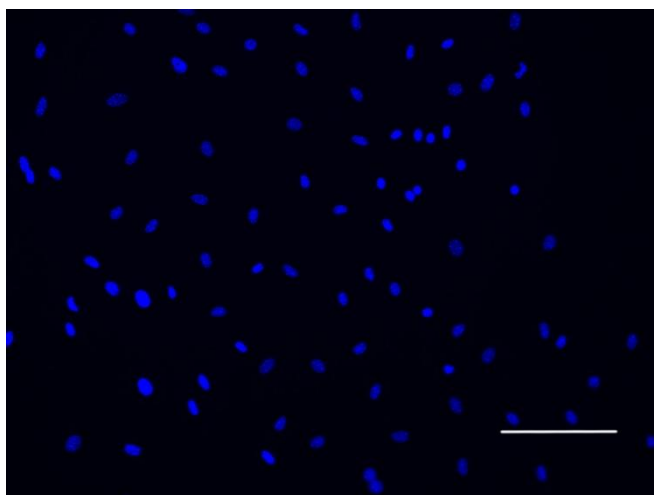
Основной задачей иммуноцитохимического исследования первичных клеток аорты было изучение локализации трансгенного hAGXT2 в клетках эндотелия. Несмотря на то, что анализ белковой экспрессии hAGXT2 методом Вестерн-блот показал его наличие в тканях аорты трансгенных мышей, данный факт еще не свидетельствовал о том, что трансген экспрессируется и способен снижать уровень ADMA непосредственно в эндотелиальных клетках, как основном источнике выработки оксида азота с помощью NO-синтаз. Это являлось важным шагом перед комплексным изучением физиологических ответов эндотелия изолированных сосудов на эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые релаксанты.

Поскольку первичная культура клеток аорты представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из гладкомышечных и эндотелиальных клеток (Kobayashi et al., 2005), для маркирования последних использовали окраску на CD31, который является одним из основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток (Newman et al., 1990). Иммуноцитохимический анализ показал, что hAGXT2 локализован в цитоплазме (митохондриях) как CD31-положительных (эндотелиальных), так и CD31-отрицательных (гладкомышечных) клеток (рис. 29). При этом в первичной культуре клеток аорты у мышей дикого типа, а также в отрицательном контроле не наблюдалось фоновой флуоресценции, что свидетельствует о высокой специфике использованных в работе антител.

CD31**FLAG**

А

Б

DAPI**Совмещенное изображение**

В

Г

Рисунок 29. Иммуноцитохимическое исследование первичной культуры клеток эндотелия у трансгенных hAGXT2 мышей

Зеленое свечение — окраска антителами к CD31; красное свечение – окраска антителами к FLAG; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI

Масштабная линейка на всех изображениях - 30 мкм.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МЫШЕЙ ЛИНИИ hAGXT2

5.1 Влияние трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на метаболизм L-аргинина, ADMA и SDMA у мышей

Одной из важнейших задач после обнаружения стабильной белковой экспрессии трансгенного hAGXT2 во всех исследованных тканях трансгенных мышей была демонстрация биохимической активности фермента *in vivo*. С помощью метода жидкостной хроматографии-тандем масс-спектрометрии было выявлено снижение уровня ADMA в плазме крови трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа на 20% (рис. 30, $p < 0.05$). В то же время было показано значительное увеличение уровня ADGV в плазме крови и моче трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа (рис. 30, $p < 0.01$). При анализе содержания L-аргинина, SDMA в плазме крови и моче, а также ADMA в моче достоверных различий не обнаружено. Поскольку уровень ADMA в плазме крови динамично регулируется ферментами, ответственными за процессы его синтеза из аминокислоты L-аргинина, входящей в состав белков (с помощью PRMTs), и распада (с помощью DDAN1/2 и AGXT2), а также почечной экскрецией (Cooke, 2004; MacAllister et al., 1996b), полученные результаты свидетельствуют о том, что именно трансгенная сверхэкспрессия AGXT2 (а не увеличение катаболизма ADMA с помощью DDAN1, или экскреции его почками) может *in vivo* снижать уровень ADMA.

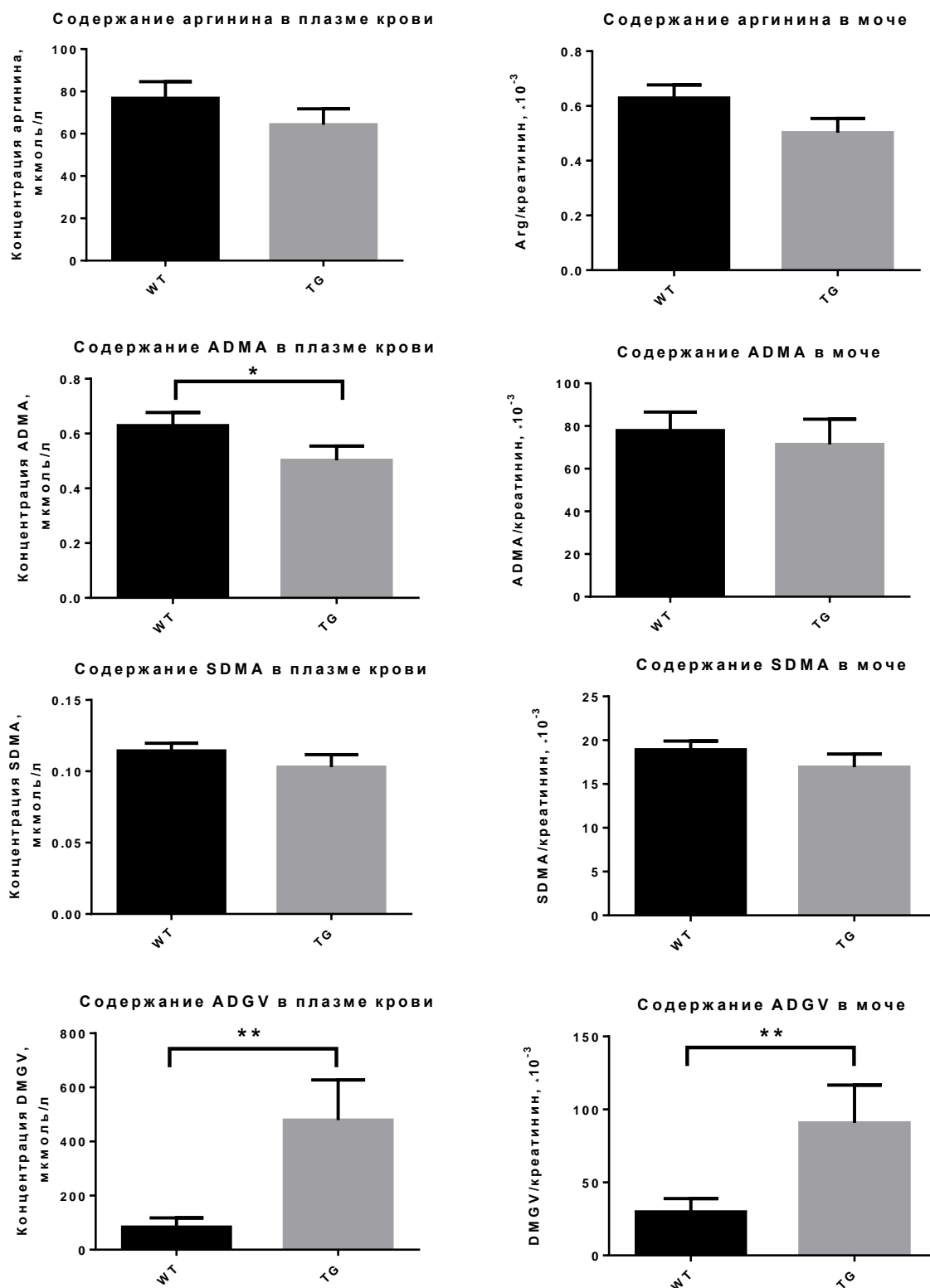


Рисунок 30. Эффекты трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на метаболизм L-аргинина, ADMA и SDMA у мышей

TG – трансгенные мыши; WT – мыши дикого типа

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 9-12$; U-критерий Манна-Уитни

Помимо исследования влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на содержание L-аргинина и его метилированных производных в крови и моче трансгенных мышей мы провели анализ тканевого метаболизма ADMA, SDMA и ADGV. Для выполнения этой задачи было выбрано 4 типа тканей: почка, печень, сердце и легкое. Почка и печень были выбраны как основные органы метаболизма метилированных производных L-аргинина и эндогенные источники ADGV, а сердце и легкое - как основные продуценты ADMA согласно данным литературы (Bulau et al., 2007) и важнейшие органы сердечно-сосудистой системы. Было показано достоверное снижение содержания ADMA ($p < 0.05$; U-критерий Манна-Уитни) в сердце и легком трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа, при этом в почке и печени различий по данному показателю не наблюдалось (рис. 31). Кроме того, ткани легкого трансгенных мышей демонстрировали достоверное снижение уровня SDMA на 40% в сравнении с контрольной группой ($p < 0.05$; U-критерий Манна-Уитни) (рис. 32). ADGV, который является продуктом метаболизма ADMA с помощью AGXT2, детектировался во всех тканях трансгенных мышей и был достоверно повышен в ткани почек по сравнению с контрольной группой (рис. 31). Следует отметить, однако, что в тканях сердца и легкого мышей дикого типа обнаружить ADGV не удалось, что, очевидно, связано с отсутствием эндогенной экспрессии AGXT2 в этих тканях (рис. 31).

Таким образом, проведенное комплексное биохимическое исследование крови, мочи и тканей мышей показало, что трансген hAGXT2 активен в отношении его эндогенных субстратов - ADMA и SDMA и приводит к изменению их метаболизма *in vivo*.

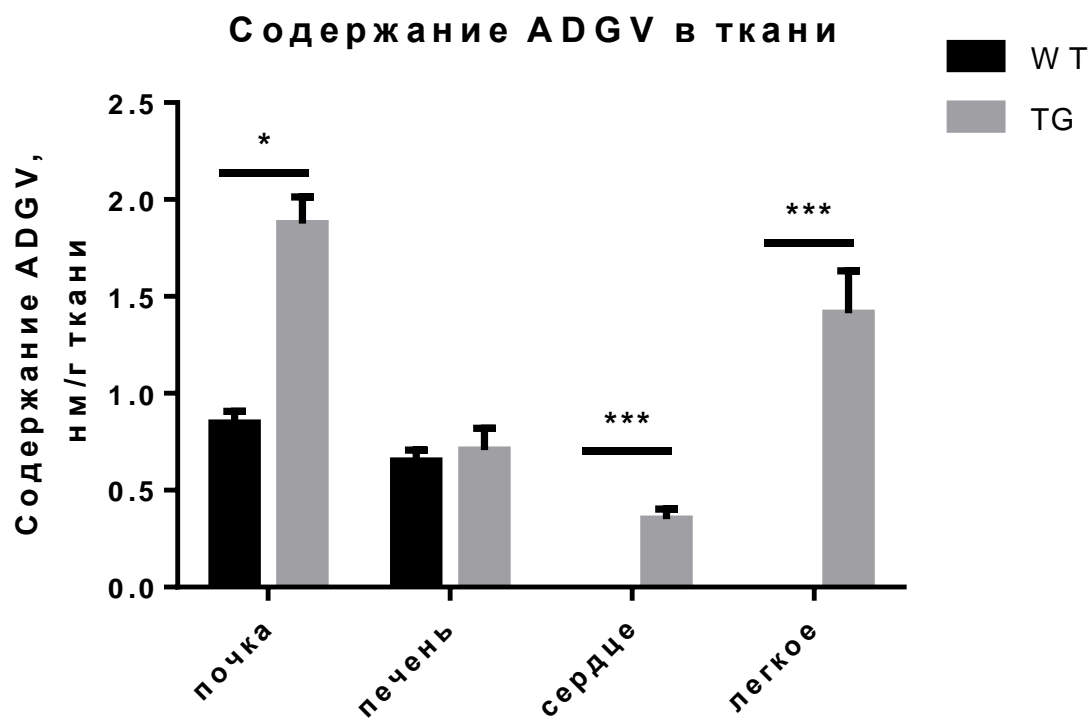
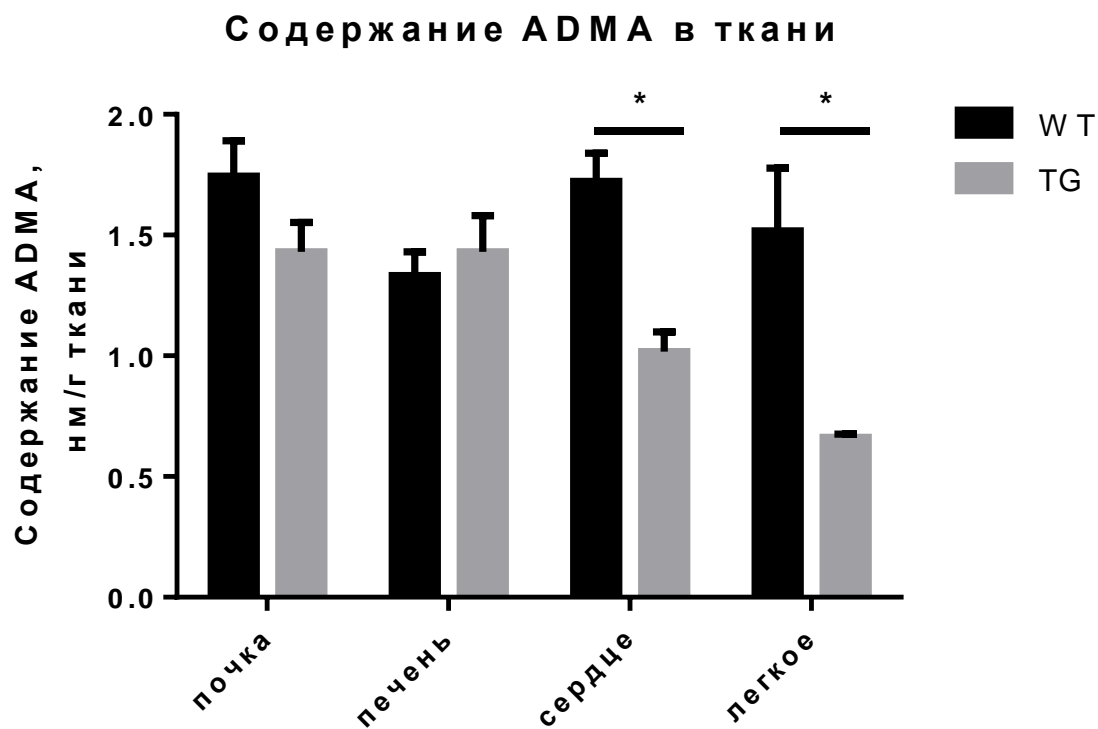


Рисунок 31. Эффекты трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на тканевой метаболизм ADMA у мышей

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; $n=4$; U-критерий Манна-Уитни

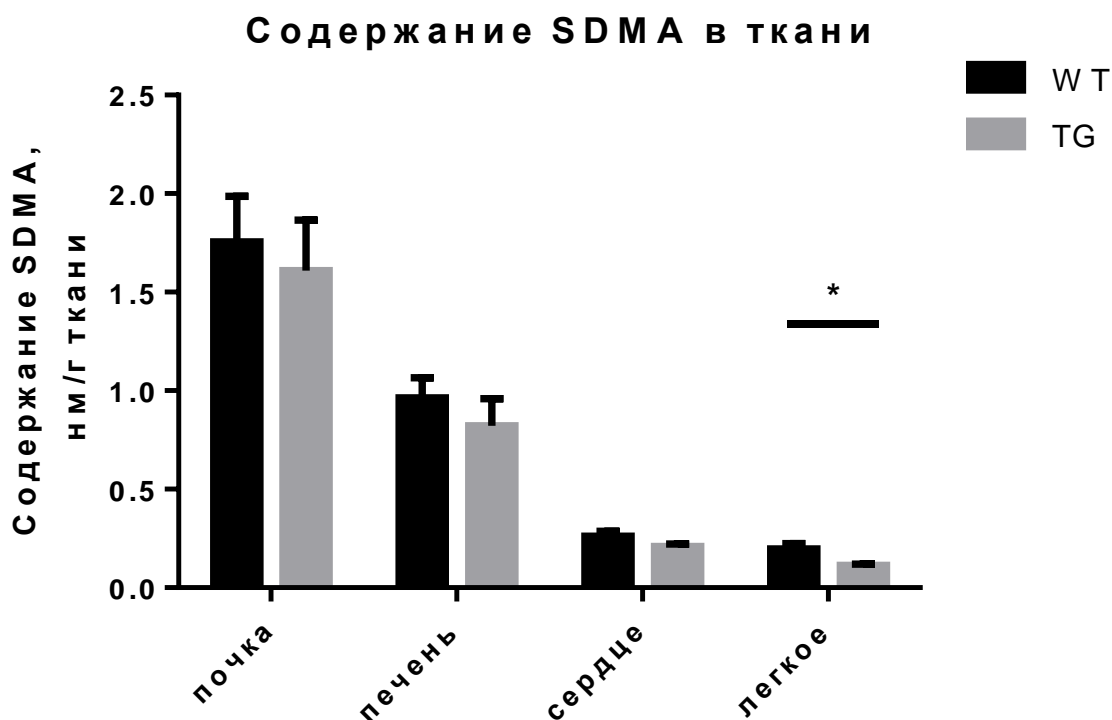


Рисунок 32. Эффекты трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на тканевой метаболизм SDMA у мышей

* $p < 0.05$; $n = 4$; U-критерий Манна-Уитни

5.2 Изучение физиологических особенностей сердечно-сосудистой системы трансгенных мышей линии hAGXT2

Для оценки влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на эндотелиальную функцию, проводили исследование вазоактивных реакций аорты методом изометрии. Данный подход широко используется в литературе и позволяет не только оценить состояние эндотелия, но и уточнить причины его повреждения, разработать методы коррекции, сравнить их эффективность (Feng et al., 2010; Hu et al., 2009; Schwedhelm et al., 2009). В ходе экспериментов оценку эндотелий-зависимого расслабления (как физиологический показатель функционального состояния эндотелия) и эндотелий-независимого расслабления (как физиологический показатель чувствительности гладких мышц сосуда к NO) производили на сосудистых кольцах, предварительно

сокращенных $\alpha 1$ -адреностимулятором фенилэфрином до уровня 60% от максимальной вазоконстрикции. Зависимость силы изометрического сокращения от концентрации фенилэфрина представлена на рис. 33.

В результате проведенных исследований было показано достоверное увеличение эндотелий-зависимого расслабления колец аорты трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа, что свидетельствовало об улучшении сосудистой функции вследствие сверхэкспрессии hAGXT2 (рис. 34 А). При этом максимальный ответ (EC_{max}) на ацетилхолин достигал 20% от предварительно вызванного сокращения у трансгенных мышей и лишь 40% у мышей дикого типа. Подтверждением того, что увеличение вызванного ацетилхолином расслабления сосудов у трансгенных мышей в сравнении с мышами дикого типа не опосредуется прямым действием трансгенного hAGXT2 на состояние гладкой мускулатуры, стали опыты с нитропруссидом натрия. Это вещество в физиологических условиях распадается с образованием оксида азота и, таким образом, относится к классу эндотелий-независимых сосудорасширяющих факторов. Следовательно, изменения вызываемого нитропруссидом натрия расслабления отражает изменение чувствительности гладких мышц к действию оксида азота эндогенной или экзогенной природы. В наших опытах разницы между сосудистыми ответами на нитропруссид не наблюдалось (рис. 34 Б).

Таким образом, трансгенные мыши демонстрировали стойкое улучшение сосудистой функции, вызванное сверхэкспрессией трансгенного hAGXT2.

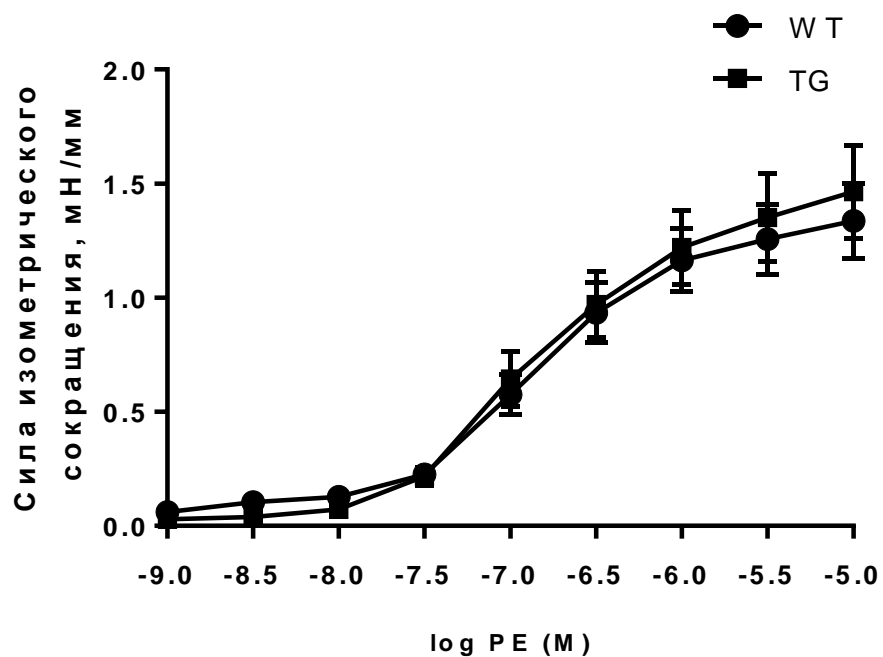


Рисунок 33. Зависимость силы изометрического сокращения изолированных колец аорты у трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT) от концентрации фенилэфрина (PE)

$p > 0.05$; $n = 14$; двухфакторный дисперсионный анализ

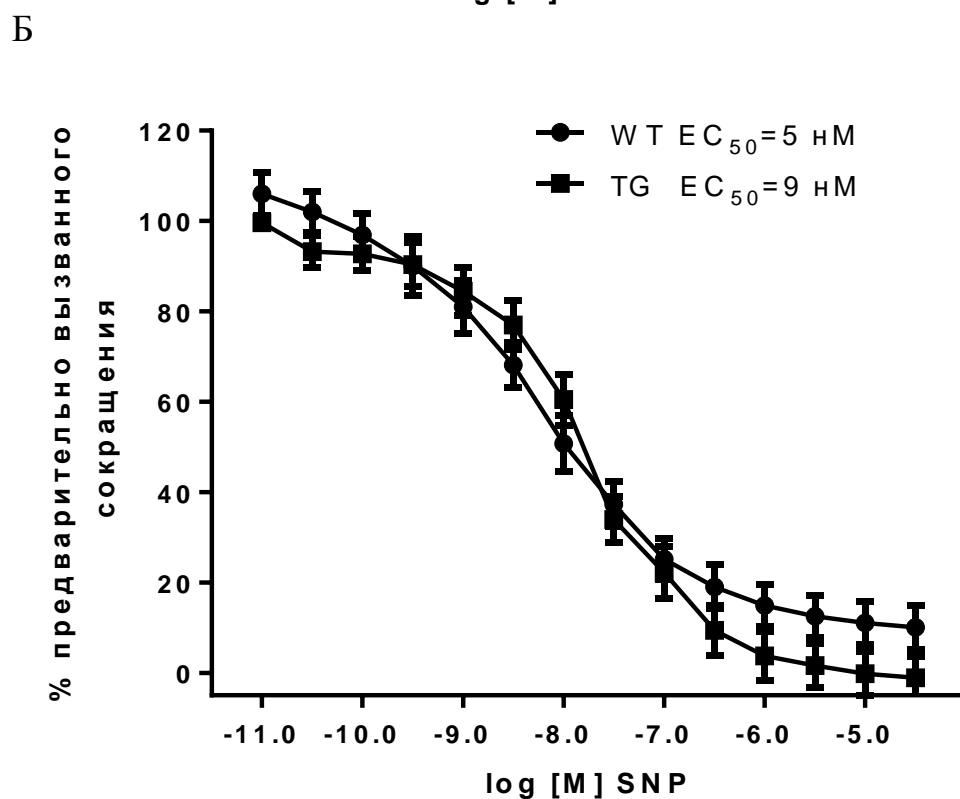
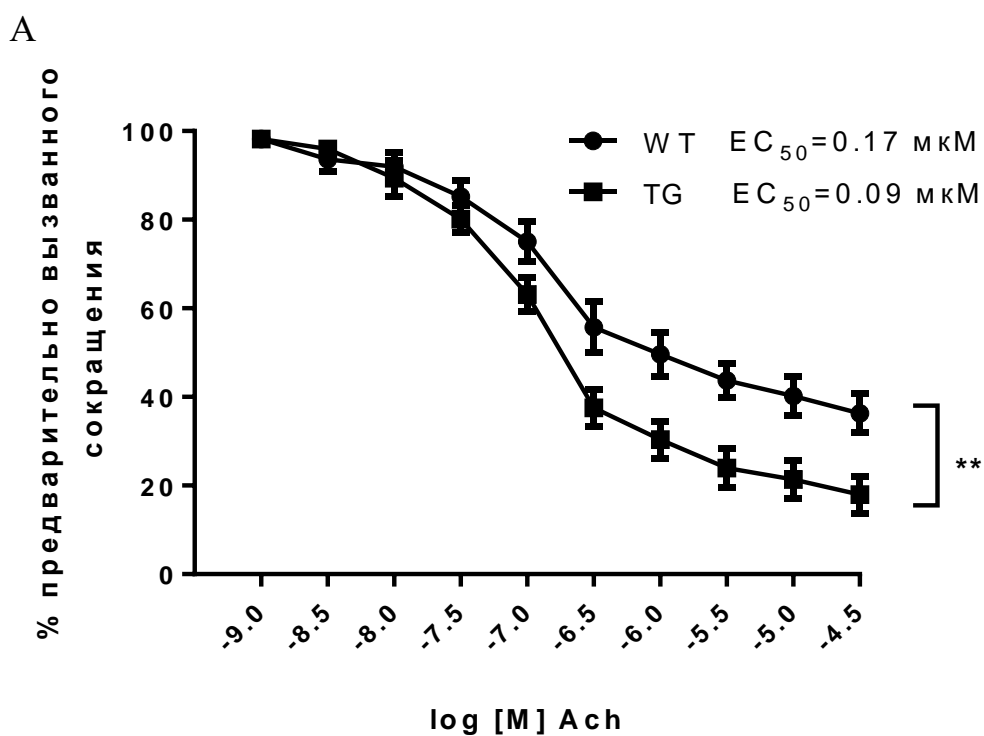


Рисунок 34. Эндотелий-зависимая (А) и эндотелий-независимая (Б) вазодилатация изолированных колец аорты у трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT)

Ach – ацетилхолин, SNP – нитропруссид натрия

* $p < 0.05$; $n = 14$; двухфакторный дисперсионный анализ

Анализ среднего артериального давления не выявил различий между группами трансгенных животных и контрольных животных (рис. 35). Среднее значение артериального давления у трансгенных животных составляло 108 ± 1.1 мм рт. ст., а у животных дикого типа - 109 ± 0.75 мм рт. ст. По-видимому, это связано с тем, что сверхэкспрессии hAGXT2 недостаточно для изменения системных показателей гемодинамики *in vivo*, однако, данный вопрос требует дальнейшего более детального исследования.

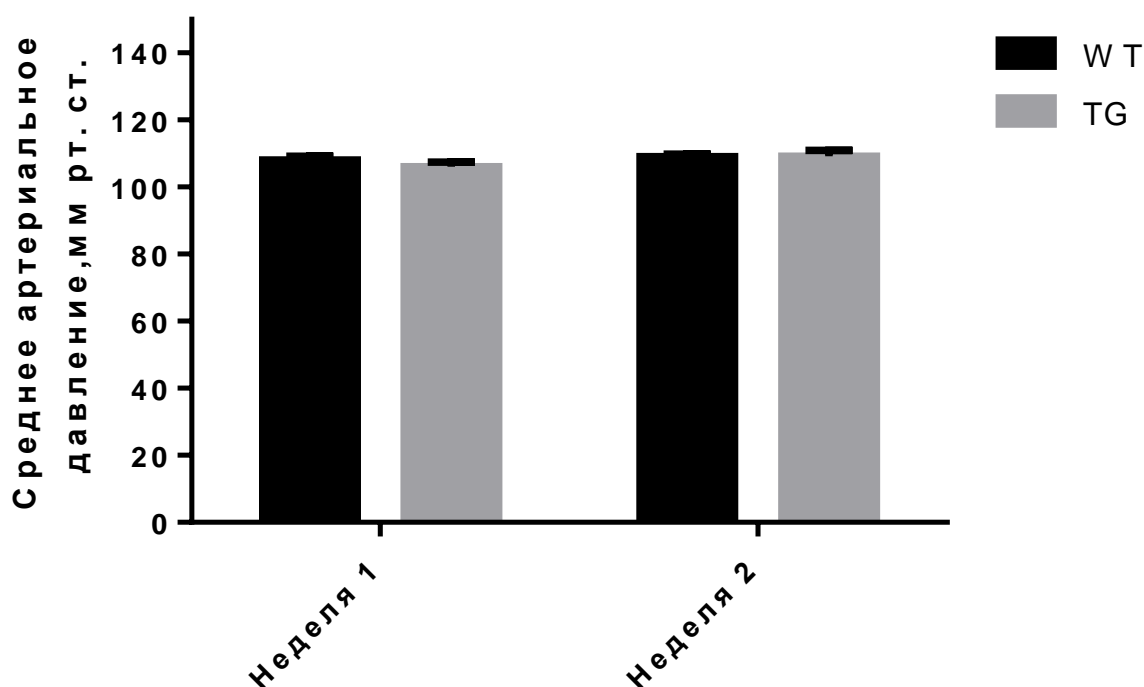


Рисунок 35. Влияние трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на показатели среднего артериального давления у трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT)

$p > 0.05$; $n = 11$; U-критерий Манна-Уитни

ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное изучение функциональной роли белков, вовлеченных в гомеостаз оксида азота в организме, является актуальной проблемой современной физиологии сердечно-сосудистой системы. При этом создание и характеристика модельных трансгенных организмов со сверхэкспрессией изучаемого белка является одной из приоритетных задач в данной области, открывая новые перспективы для полномасштабных исследований и внедрения полученных результатов в клиническую практику.

В последние годы накапливается все больше экспериментальных и клинических данных, подтверждающих участие AGXT2 в системной и тканевой регуляции баланса оксида азота в организме человека и животных. Однако, интерпретацию полученных результатов осложняет недостаточное количество адекватных моделей для исследования биологии данного фермента. В результате проведенных исследований была выведена трансгенная линия мышей с преимущественной сверхэкспрессией AGXT2 человека в печени, сердце и скелетной мышце как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Эндогенная экспрессия mAGXT2 была выявлена только в почках и печени на сопоставимом уровне, что согласуется с результатами исследования тканей мышей, полученными другими группами (Kittel et al., 2013). В то же время анализ тканей крыс, проведенный, Lee и соавторами показал преимущественную экспрессию AGXT2 в почечных канальцах Петли Генле при обнаружении следовых количеств мРНК этого фермента в печени (Lee et al., 1999). Анализ тканей человека, проведенный нашей группой, также показал преимущественную экспрессию данной аминотрансферазы в почке (неопубликованные наблюдения), что, по-видимому, указывает на видоспецифические особенности тканевой локализации AGXT2 у различных животных и человека.

Исследование влияния сверхэкспрессии AGXT2 на альтернативный путь элиминации ADMA с помощью DDAH1 и 2 выявил компенсаторное снижение уровня их экспрессии в тканях аорты (в случае с DDAH2) и мозга (в случае с DDAH1) и их

сопутствующее увеличение в ткани селезенки. Известно, что гиперпродукция оксида азота, в частности, в тканях мозга, приводит к гибели нервных клеток и прогрессированию нейродегенеративных заболеваний (Chabrier et al., 1999). Так, Abe и соавторы показали снижение концентрации ADMA в цереброспинальной жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера, что позволило выдвинуть гипотезу о защитной роли ADMA при наблюдаемой нейропатологии (Abe et al., 2001). Показано также, что адаптация к гипоксии у крыс сопровождается ингибированием NOS и ограничивает падение артериального давления и чрезмерное усиление эндотелийзависимого расслабления сосудов в модели инфаркта миокарда (Манухина и др., 1991). В то же время при ишемическом и реперфузионном повреждении изолированного сердца крысы и собаки адаптация к периодической нормобарической гипоксии эффективно предупреждала ишемические аритмии и уменьшает площадь инфаркта, что очевидно указывало на токсические эффекты чрезмерной выработки NO (Белкина и др., 2012; Zong et al., 2004). Таким образом, наблюдаемые компенсаторные эффекты снижения экспрессии DDAN1 и DDAN2 в тканях мозга и аорты могут обладать кардиопротекторным и нейропротекторным действием, предохраняя ткани от гиперпродукции NO. Для более комплексного понимания подобных защитных механизмов требуются дальнейшие исследования. Наблюдаемое увеличение экспрессии DDAN1 и 2 в тканях селезенки трансгенных мышей, напротив, вероятнее всего не обладает физиологической ролью, поскольку оба фермента экспрессируются в данной ткани в следовых количествах.

В настоящее время существует неопределенность относительно участия AGXT2 в образовании ALA и синтезе порфириновых предшественников и гемоглобина. Данные клинического анализа крови трансгенных мышей не подтвердили прямого участия AGXT2 в данных процессах. Возможно, сверхэкспрессия AGXT2 приводила к снижению активности образования ALA по основному пути с помощью ALA-синтазы, или в альтернативном пути биосинтеза ALA участвует совершенно другой фермент, подтверждая гипотезу Туаги и соавторов (Tuagi, Datta, 1993). Так или иначе, для ответов на эти вопросы необходимы новые исследования.

Описание линии мышей с направленной сверхэкспрессией гена AGXT2 человека, выполненная в рамках данной работы, позволила выявить новые аспекты физиологической роли AGXT2-зависимого трансаминирования ADMA в организме. До настоящего времени единственным исследованием, подтвердившим роль AGXT2 в метаболизме ADMA *in vivo*, являлась работа Rodionov и соавторов (Rodionov et al., 2010a), методической основой которой послужила кратковременная сверхэкспрессия AGXT2 с помощью аденовирусной инфекции. В результате проведенных исследований впервые удалось проанализировать результат длительной и стабильной сверхэкспрессии AGXT2. Было показано достоверное снижение уровня ADMA в плазме крови трансгенных животных на 20%. При этом данное снижение не сопровождалось сопутствующими изменениями артериального давления и не приводило к развитию гипотензии у мышей. Аналогичный анализ сверхэкспрессии DDAN1 у трансгенных мышей, опубликованный Dayoub и соавторами, выявил снижение уровня ADMA на 60% при сопутствующем понижении артериального давления на 10% (Dayoub et al., 2003). Анализируя полученные данные, логично предположить, что гидролизу DDAN1 принадлежит основная роль в метаболизме ADMA в физиологических условиях, при этом механизмы трансаминирования ADMA с помощью AGXT2 в большей степени адаптивны и участвуют в более тонкой регулировке уровня ADMA и системных показателей гемодинамики. В пользу этого факта также свидетельствуют результаты анализа тканевого метаболизма ADMA у трансгенных животных. Так, содержание ADMA в тканях почки и печени (где экспрессируется DDAN1) AGXT2-трансгенных мышей не изменялось. В то же время в тканях сердца и легкого (где отсутствует экспрессия DDAN1) было зафиксировано статистически значимое снижение уровня ADMA практически на 50%, сопровождающееся образованием ADGV, что свидетельствовало о его интенсивном трансаминировании с помощью трансгенного AGXT2. Относительный вклад ферментативных путей метаболизма ADMA в патофизиологических условиях (на фоне увеличения ADMA) еще предстоит изучить, исследуя модели сердечно-сосудистых заболеваний или проводя инфузию ADMA у AGXT2- или DDAN1/2-трансгенных животных.

Особенно интересными оказались результаты анализа сосудорасширяющих ответов изолированных колец аорты на ацетилхолин у AGXT2-трансгенных мышей. Данные, полученные в ходе этого анализа, впервые позволили оценить физиологические эффекты трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на функциональную активность эндотелия сосудов и в частности, на его NO-продуцирующую способность. Было показано достоверное увеличение эндотелий-зависимого расслабления колец аорты на 20% у трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа. Поскольку проведенный иммуноцитохимический анализ первичных клеток аорты показал экспрессию AGXT2 в эндотелии, наблюдаемое улучшение сосудистой функции, очевидно, было связано с трансгенной сверхэкспрессией hAGXT2. При этом, стоит отметить, что при сверхэкспрессии DDAN1 у трансгенных мышей аналогичных изменений на модели изолированных колец аорты не наблюдалось (Schwedhelm et al., 2009). В то же время у DDAN1-трансгенных мышей было показано значительное усиление образования оксида азота и ослабление вызванной ADMA эндотелиальной дисфункции в каротидных артериолах мозга (Dayoub et al., 2008). Вероятнее всего, подобные различия связаны с методическими особенностями проведенных экспериментов, однако, то, что увеличение активности AGXT2 приводит к улучшению сосудистой функции *in vivo* уже не вызывает сомнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что увеличение уровня ADMA на 24% приводит к увеличению смертности у человека на 21% (Böger et al., 2009). В последние годы показана аналогичная связь с увеличением SDMA (Meinitzer et al., 2011). Однако, несмотря на клинические и экспериментальные доказательства взаимосвязи повышенных уровней ADMA и SDMA в плазме крови с эндотелиальной дисфункцией и риском развития сердечно-сосудистых осложнений, их этиологическую роль в патогенезе сердечно-сосудистых осложнений еще предстоит доказать. Для того чтобы убедительно ответить на вопрос, является ли ADMA или SDMA этиологическим фактором сердечно-сосудистых заболеваний или только лишь их маркером, требуется всесторонний биохимический, генетический и фармакологический подход. Разработка специфической терапии, направленной на снижение уровня ADMA, поможет в дальнейшем пролить свет на физиологическую роль ADMA и метаболизирующих его ферментов в организме. По этой причине разработка препаратов, снижающих уровень ADMA, является в настоящее время одной из наиболее приоритетных задач. Проведенное исследование биохимических и физиологических эффектов трансгенной сверхэкспрессии AGXT2 продемонстрировало, что увеличение активности данного фермента может быть особенно перспективно в этом плане. Полученная трансгенная линия мышей может быть использована для проведения фундаментальных исследований в целях изучения биохимической и физиологической роли AGXT2 (очистка препаративных количеств белка, его кристаллизация, изучение ферментативной активности в отношении различных субстратов и т.д.). Кроме того данная модель может применяться при выяснении патогенетических основ заболеваний (так или иначе связанных с изменениями метаболизма ADMA) и разработке новых диагностических и терапевтических подходов для борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые сохраняют лидирующую позицию среди причин смертности в большинстве стран мира.

ВЫВОДЫ

1. Получена линия мышей, трансгенная по hAGXT2. Общий фенотипический анализ и анализ динамики изменений массы тела трансгенных мышей не показал достоверных различий по сравнению с мышами дикого типа. Клинический анализ крови трансгенных животных также не выявил различий, что свидетельствует об отсутствии нарушений синтеза гемоглобина в связи с трансгенной сверхэкспрессией AGXT2.

2. Трансгенный hAGXT2 детектировался на уровне мРНК и на белковом уровне во всех проанализированных тканях трансгенных мышей, при этом максимальная его экспрессия обнаружена в сердце, печени и скелетной мышце. Иммуноцитохимический анализ показал присутствие трансгенного hAGXT2 в эндотелиальных клетках аорты трансгенных мышей. Эндогенная экспрессия mAGXT2 обнаружена только в почке и печени и не различается по сравнению с мышами дикого типа. Уровень транскрипции DDAN 1 достоверно повышается в селезенке и понижается в мозге трансгенных мышей, а DDAN 2 - повышается в селезенке и понижается в аорте трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа.

3. Трансгенная сверхэкспрессия hAGXT2 приводит к достоверному снижению уровня асимметричного диметиларгинина в плазме крови, тканях сердца и легкого, а также к достоверному повышению уровня диметилгуанидиновалериановой кислоты в плазме крови, моче и тканях почки, сердца и легкого трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа. Зафиксировано также снижение уровня симметричного диметиларгинина в тканях легкого трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа.

4. Трансгенные мыши демонстрировали стойкое улучшение эндотелий-зависимой вазодилатации, вызванное сверхэкспрессией трансгенного hAGXT2. Параметры кровяного давления при этом не изменялись.

5. Полученная линия hAGXT2 трансгенных мышей является удобной моделью для изучения физиологической роли AGXT2 и асимметричного диметиларгинина в норме и при патологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AdAGXT2 – аденовирусный вектор, содержащий AGXT2

ADGB - альфа-кето-дельта-диметилгуанидинобутировая кислота

ADGV – альфа-кето-дельта-диметилгуанидиновалериановая кислота

ADMA - асимметричный диметиларгинин

ALA – дельта-аминолевулиновая кислота

BAIB – бета-аминоизобутират

BH₄- тетрагидробиоптерин

CAG - куриный промотор бета актина

CAT - катионный транспортер аминокислот

CMV – цитомегаловирус

DOVA – гамма, дельта-диоксовалериановая кислота

EDRF - расслабляющий фактор сосудов, впоследствии идентифицированный как оксид азота

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMN – флавинмононуклеотид

GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

hAGXT2 - аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 человека

HPLC-MS/MS - жидкостная хроматография - тандем - масс-спектрометрия

HUVEC - эндотелиальные клетки пупочной вены человека

ICAM - молекула межклеточной адгезии

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

L-NAME – NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир

L-NMMA – монометил-L-аргинин

mAGXT2 - аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2 мыши

MAPK - митогенактивируемая протеинкиназа

mDDAH I (II) - диметиаргининдиметиламиногидролаза мыши I (II)

NADPH - Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NMDA - N-метил-D-аспартат

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

NO - оксид азота

NOS - синтаза оксида азота

PAMT - протеин аргинин метилтрансфераза

PDZ - Psd-95 (Post Synaptic Density Protein), DlgA (Drosophila Disc Large Tumor

Suppressor) и ZO1 (Zonula Occludens-1 Protein) - гомологичный домен

PIN - белковый ингибитор NO - синтаз

PKB - протеинкиназа B

PrF - прямой праймер

PrR - обратный праймер

PVDF - поливинилиденфторид

SAM - S-аденозилметионин

SERCA - сарко-эндоплазматическая кальциевая АТФаза

SDMA - симметричный диметиларгинин

siRNA - малые интерферирующие РНК

SOD - супероксиддисмутаза

TBS (tris buffered saline) - трис буферный раствор

А.о. – аминокислотный остаток

АТФаза - аденозинтрифосфатаза

БОЕ - бляшкообразующая единица

ГТФ - гуанозинтрифосфат

кДа - килодальтон

НФ1 - нейрофибромин 1

СЖК – сыворотка жеребой кобылы

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Шимкович М.В., Терехина О.Л., Горячева А.В., Ченурнова Д.А., Дауни Г.Ф., Маллет Р.Т., Манухина Е.Б. Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс // Патол. физиол. экспер. терапия. 2012. Т. 4, 44-48.
2. Максимович Н.Е., Козловский В. И., Максимович Н. А. Некоторые современные методы изучения состояния эндотелия сосудов в эксперименте // Журнал Гродненского медицинского университета. 2004. Т. 3, 26-30.
3. Манухина Е. Б., Лапшин А. В., Меерсон Ф. З. Адаптация к коротким стрессорным воздействиям предупреждает усиление эндотелийзависимых реакций аорты при инфаркте миокарда // Физиол. журнал СССР им. И. М. Сеченова. 1991. Т. 77, 72-80.
4. Павлова Н. А. Биосинтез глицина из глиоксилата и аминокислот // Доклады Академии Наук СССР. 1955. Т. 100, 947-949.
5. Петенкова А. А., Коваленко Р. И., Ноздрачев А. Д. Роль оксида азота в регуляции миграции лейкоцитов в тканях сердца *in vitro* // Доклады Академии наук. 2015. Т. 465, 119-122
6. Родионов Р. Н., Блохин И. О., Галагудза М. М., Шляхто Е. В., Лентц С. Р. Асимметричный диметиларгинин и его роль в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний // Артериальная гипертензия. 2008. Т. 14, 306-314.
7. Рыжова И. В., Ноздрачев А. Д., Тобиас Т. В., Орлов И. В., Чихман В. Н., Солнушкин С. Д. Метаботропные глутаматные рецепторы как мишень нейромодулирующего влияния оксида азота // Доклады Академии Наук. 2016. Т. 469, 116-118.
8. Abbasi, F., Asagmi, T., Cooke, J.P., Lamendola, C., McLaughlin, T., Reaven, G.M., Stuehlinger, M., and Tsao, P.S. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus // *Am. J. Cardiol.* 2001. V. 88, 1201–1203.
9. Abe, K., Pan, L.H., Watanabe, M., Kato, T., and Itoyama, Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurosci. Lett.* 1995. V. 199, 152–154.
10. Abe, T., Tohgi, H., Murata, T., Isobe, C., and Sato, C. Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease // *Neurosci. Lett.* 2001. V. 312, 177–179.

11. Achan, V., Tran, C.T.L., Arrigoni, F., Whitley, G.S.J., Leiper, J.M., and Vallance, P. all-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *Circ. Res.* 2002. V. 90, 764–769.
12. Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R., and Vallance, P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. V. 23, 1455–1459.
13. Akdemir, N., Cinemre, H., Bilir, C., Akin, O., and Akdemir, R. Increased serum asymmetric dimethylarginine levels in primary dysmenorrhea // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010. V. 69, 153–156.
14. Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // *Biochem. J.* 2001. V. 357, 593–615.
15. Altmann, K.S., Havemeyer, A., Beitz, E., and Clement, B. Dimethylarginine-dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) does not metabolize methylarginines // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 2012. V. 13, 2599–2604.
16. Anderssohn, M., McLachlan, S., Lüneburg, N., Robertson, C., Schwedhelm, E., Williamson, R.M., Strachan, M.W.J., Ajjan, R., Grant, P.J., Böger, R.H., et al. Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* 2014. V. 37, 846–854.
17. Anthony, S., Leiper, J., and Vallance, P. Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors // *Vasc. Med. Lond. Engl.* 2005. 10 Suppl 1, S3-9.
18. Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. V. 95, 7659–7663.
19. Arrigoni, F., Ahmetaj, B., and Leiper, J. The biology and therapeutic potential of the DDAH/ADMA pathway // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16, 4089–4102.
20. Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Sitia, S., Tomasoni, L., Gianturco, L., Battellino, M., Boccassini, L., De Gennaro Colonna, V., Marchesoni, A., and Turiel, M. Coronary flow reserve and asymmetric dimethylarginine levels: new measurements for identifying subclinical atherosclerosis in patients with psoriatic arthritis // *J. Rheumatol.* 2011. V. 38, 1661–1664.
21. Aydemir, O., Ozcan, B., Yucel, H., Bas, A.Y., and Demirel, N. Asymmetric dimethylarginine and L-arginine levels in neonatal sepsis and septic shock // *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 2015. V. 28, 977–982.

22. Aydin, M., Altintas, N., Cem Mutlu, L., Bilir, B., Oran, M., Tülübaş, F., Topçu, B., Tayfur, İ., Küçükyağın, V., Kaplan, G., et al. Asymmetric dimethylarginine contributes to airway nitric oxide deficiency in patients with COPD // *Clin. Respir. J.* 2015. V. 11, 318–327
23. Bender, A.T., Silverstein, A.M., Demady, D.R., Kanelakis, K.C., Noguchi, S., Pratt, W.B., and Osawa, Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274, 1472–1478.
24. Birdsey, G.M., Leiper, J.M., and Vallance, P. Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line // *Acta Physiol. Scand.* 2000. V. 168, 73–79.
25. Birdsey, G.M., Lewin, J., Cunningham, A.A., Bruford, M.W., and Danpure, C.J. Differential enzyme targeting as an evolutionary adaptation to herbivory in carnivora // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21, 632–646.
26. Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Kielstein, J.T., Martens-Lobenhoffer, J., Breithardt, G., Fobker, M., and Reinecke, H. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2006. V. 17, 1128–1134.
27. Böger, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor // *Cardiovasc. Res.* 2003. V. 59, 824–833.
28. Böger, R.H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor // *J. Nutr.* 2004. V. 134, 2842S–2847S; discussion 2853S.
29. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Mügge, A., Kienke, S., Brandes, R., Dwenger, A., and Frölich, J.C. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production // *Atherosclerosis.* 1995. V. 117, 273–284.
30. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K., and Frölich, J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease // *Circulation.* 1997. V. 95, 2068–2074.
31. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Szuba, A., Tsao, P.S., Chan, J.R., Tangphao, O., Blaschke, T.F., and Cooke, J.P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia // *Circulation.* 1998. V. 98, 1842–1847.
32. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Tsao, P.S., Lin, P.S., Chan, J.R., and Cooke, J.P. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. V. 36, 2287–2295.

33. Böger, R.H., Cooke, J.P., and Vallance, P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor // *Vasc. Med. Lond. Engl.* 2005.10 Suppl 1, S1-2.
34. Böger, R.H., Sullivan, L.M., Schwedhelm, E., Wang, T.J., Maas, R., Benjamin, E.J., Schulze, F., Xanthakis, V., Benndorf, R.A., and Vasan, R.S. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community // *Circulation.* 2009. V. 119, 1592–1600.
35. Bogle, R.G., MacAllister, R.J., Whitley, G.S., and Vallance, P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269, C750-756.
36. Böhme, G.A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J.M., Doble, A., and Blanchard, J.C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. V. 90, 9191–9194.
37. Bonkovsky, H.L., Guo, J.-T., Hou, W., Li, T., Narang, T., and Thapar, M. Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias // *Compr. Physiol.* 2013. V. 3, 365–401.
38. Böttger, A., Islam, M.S., Chowdhury, R., Schofield, C.J., and Wolf, A. The oxygenase *Jmjd6*--a case study in conflicting assignments // *Biochem. J.* 2015. V. 468, 191–202.
39. Braekke, K., Ueland, P.M., Harsem, N.K., and Staff, A.C. Asymmetric dimethylarginine in the maternal and fetal circulation in preeclampsia // *Pediatr. Res.* 2009. V. 66, 411–415.
40. Bredt, D.S., and Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990.V. 87, 682–685.
41. Bruijn, L.I., Beal, M.F., Becher, M.W., Schulz, J.B., Wong, P.C., Price, D.L., and Cleveland, D.W. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94, 7606–7611.
42. Bulau, P., Zakrzewicz, D., Kitowska, K., Leiper, J., Gunther, A., Grimminger, F., and Eickelberg, O. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007. V. 292, L18-24.
43. Bultink, I.E.M., Teerlink, T., Heijst, J.A., Dijkmans, B. a. C., and Voskuyl, A.E. Raised plasma levels of asymmetric dimethylarginine are associated with cardiovascular events, disease activity, and organ damage in patients with systemic lupus erythematosus // *Ann. Rheum. Dis.* 2005. V. 64, 1362–1365.

44. Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite // *Mutat. Res.* 1999. V. 424, 37–49.
45. Buttery, L.D., Springall, D.R., Chester, A.H., Evans, T.J., Standfield, E.N., Parums, D.V., Yacoub, M.H., and Polak, J.M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite // *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 1996. V. 75, 77–85.
46. Caplin, B., and Leiper, J. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators, and regulators? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. V. 32, 1343–1353.
47. Caplin, B., Wang, Z., Slaviero, A., Tomlinson, J., Dowsett, L., Delahaye, M., Salama, A., International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Wheeler, D.C., and Leiper, J. Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. V. 32, 2892–2900.
48. Cellini, B., Lorenzetto, A., Montioli, R., Oppici, E., and Voltattorni, C.B. Human liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase: Different stability under chemical stress of the major allele, the minor allele, and its pathogenic G170R variant // *Biochimie.* 2010. V.92, 1801–1811.
49. Chabrier, P.E., Demerlé-Pallardy, C., and Auguet, M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases // *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 1999.V. 55, 1029–1035.
50. Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. JMJD6 is a histone arginine demethylase // *Science.* 2007. V. 318, 444–447.
51. Charitidou, C., Farmakiotis, D., Zournatzi, V., Pidonia, I., Pegiou, T., Karamanis, N., Hatzistilianou, M., Katsikis, I., and Panidis, D. The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome // *Atherosclerosis.* 2008. V. 196, 958–965.
52. Choi, Y.B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.S., and Lipton, S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3, 15–21.
53. Cillero-Pastor, B., Mateos, J., Fernández-López, C., Oreiro, N., Ruiz-Romero, C., and Blanco, F.J. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, a newly identified mitochondrial protein modulating nitric oxide synthesis in normal human chondrocytes // *Arthritis Rheum.* 2012. V. 64, 204–212.

54. Closs, E.I., Basha, F.Z., Habermeier, A., and Förstermann, U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B // *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 1997. V. 1, 65–73.
55. Cooke, J.P. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? // *Circulation* . 2004. V. 109, 1813–1818.
56. Creager, M.A., Gallagher, S.J., Girerd, X.J., Coleman, S.M., Dzau, V.J., and Cooke, J.P. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans // *J. Clin. Invest.* 1992. V. 90, 1248–1253.
57. Crumpler, H.R., Dent, C.E., Harris, H., and Westall, R.G. beta-Aminoisobutyric acid (alpha-methyl-beta-alanine); a new amino-acid obtained from human urine // *Nature*. 1951. V. 167, 307–308.
58. Dailey, H.A., and Meissner, P.N. Erythroid heme biosynthesis and its disorders // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. V. 3, a011676.
59. Danpure, C.J., Cooper, P.J., Wise, P.J., and Jennings, P.R. An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria // *J. Cell Biol.* 1989. V. 108, 1345–1352.
60. Das, I., Khan, N.S., Puri, B.K., and Hirsch, S.R. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 215, 209–211.
61. Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., and Murad, F. Novel Effects of Nitric Oxide // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. V. 41, 203–236.
62. Dayoub, H., Achan, V., Adimoolam, S., Jacobi, J., Stuehlinger, M.C., Wang, B., Tsao, P.S., Kimoto, M., Vallance, P., Patterson, A.J., et al. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Regulates Nitric Oxide Synthesis Genetic and Physiological Evidence // *Circulation*. 2003. V. 108, 3042–3047.
63. Dayoub, H., Rodionov, R.N., Lynch, C., Cooke, J.P., Arning, E., Bottiglieri, T., Lentz, S.R., and Faraci, F.M. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation // *Stroke J. Cereb. Circ.* 2008. V. 39, 180–184.
64. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation // *Nature*. 1999. V. 399, 601–605.
65. Dooley, A., Gao, B., Bradley, N., Abraham, D.J., Black, C.M., Jacobs, M., and Bruckdorfer, K.R. Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine // *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2006. V. 45, 676–684.

66. Dubey, R.K., Jackson, E.K., and Luscher, T.F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 96, 141–149.
67. Dückelmann, C., Mittermayer, F., Haider, D.G., Altenberger, J., Eichinger, J., and Wolzt, M. Asymmetric dimethylarginine enhances cardiovascular risk prediction in patients with chronic heart failure // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27, 2037–2042.
68. Eid, H.M.A., Arnesen, H., Hjerkin, E.M., Lyberg, T., and Seljeflot, I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine // *Metabolism.* 2004. V. 53, 1574–1579.
69. Faraci, F.M., Brian, J.E.J., and Heistad, D.D. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269, H1522–1527.
70. Fard, A., Tuck, C.H., Donis, J.A., Sciacca, R., Di Tullio, M.R., Wu, H.D., Bryant, T.A., Chen, N.T., Torres-Tamayo, M., Ramasamy, R., et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V. 20, 2039–2044.
71. Feng, M., He, Z.-M., Zhu, Y.-X., Liu, L.-H., Lu, C.-W., and Xiong, Y. Improvement of endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbit aortas by ex vivo gene transferring of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 // *Int. J. Cardiol.* 2010. V. 144, 180–186.
72. Fickling, S.A., Leone, A.M., Nussey, S.S., Vallance, P., and Whitley, G.S.J. Synthesis of NG, NG Dimethylarginine by Human Endothelial Cells // *Endothelium.* 1993. V. 1, 137–140.
73. Fink, K., Cline, R.E., Henderson, R.B., and Fink, R.M. Metabolism of thymine (methyl-C14 or -2-C14) by rat liver in vitro // *J. Biol. Chem.* 1956. V. 221, 425–433.
74. Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M., and Stein, G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases // *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2003. V. 336, 1–12.
75. Ford, P.C., Wink, D.A., and Stanbury, D.M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide // *FEBS Lett.* 1999. V. 326, 1–3.
76. Förstermann, U., Boissel, J., and Kleinert, H. Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) // *FASEB J.* 1998. V. 12, 773–790.

77. Frey, D., Braun, O., Briand, C., Vasák, M., and Grütter, M.G. Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors // *Struct.* 2006. V. 14, 901–911.
78. Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K., and Nakazawa, H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. V. 22, 771–774.
79. Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* 1980. V. 288, 373–376.
80. Furchgott, R.F., Cherry, P.D., Zawadzki, J.V., and Jothianandan, D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1984. 6 Suppl 2, S336-343.
81. Gauthier, T.W., Scalia, R., Murohara, T., Guo, J.P., and Lefer, A.M. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995. V. 15, 1652–1659.
82. Ghosh, S.K., Paik, W.K., and Kim, S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263, 19024–19033.
83. Goonasekera, C.D., Rees, D.D., Woolard, P., Friend, A., Shah, V., and Dillon, M.J. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents // *J. Hypertens.* 1997. V. 15, 901–909.
84. Gorenflo, M., Zheng, C., Werle, E., Fiehn, W., and Ulmer, H.E. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001. V. 37, 489–492.
85. Green, S.J., Mellouk, S., Hoffman, S.L., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. // *Immunol. Lett.* 1990. V. 25, 15–19.
86. Halbrügge, T., Lütsch, K., Thyen, A., and Graefe, K.H. Role of nitric oxide formation in the regulation of haemodynamics and the release of noradrenaline and adrenaline // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1991. V. 344, 720–727.
87. Harris, H. Family studies on the urinary excretion of beta-aminoisobutyric acid. // *Ann. Eugen.* 1953. V. 18, 43–49.
88. Hasegawa, K., Wakino, S., Tanaka, T., Kimoto, M., Tatematsu, S., Kanda, T., Yoshioka, K., Homma, K., Sugano, N., Kurabayashi, M., et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression

through Sp1 transcription factor in endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006 V. 26, 1488–1494.

89. Hasegawa, K., Wakino, S., Tatematsu, S., Yoshioka, K., Homma, K., Sugano, N., Kimoto, M., Hayashi, K., and Itoh, H. Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 // *Circ. Res.* 2007. V. 101, e2-10.
90. Hemmens, B., and Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 1998. V. 100, 1–32.
91. Hemmens, B., Goessler, W., Schmidt, K., and Mayer, B. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* 200). V. 275, 35786–35791.
92. Hermenegildo, C., Medina, P., Peiró, M., Segarra, G., Vila, J.M., Ortega, J., and Lluch, S. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87, 5636–5640.
93. Horowitz, J.D., and Heresztyn, T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: methodological considerations // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2007. V. 851, 42–50.
94. Hsu, C.-N., Huang, L.-T., Lau, Y.-T., Lin, C.-Y., and Tain, Y.-L. The combined ratios of L-arginine and asymmetric and symmetric dimethylarginine as biomarkers in spontaneously hypertensive rats // *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 2012. V. 159, 90–98.
95. Hu, X., Xu, X., Zhu, G., Atzler, D., Kimoto, M., Chen, J., Schwedhelm, E., Lüneburg, N., Böger, R.H., Zhang, P., et al. Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine // *Circulation.* 2009. V. 120, 2222–2229.
96. Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase // *Nature.* 1995. V. 377, 239–242.
97. Huie, R.E., and Padmaja, S. The reaction of no with superoxide // *Free Radic. Res. Commun.* 1993. V. 18, 195–199.
98. Ignarro, L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology // *Biosci. Rep.* 1999. V. 19, 51–71.
99. Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., and Kadowitz, P.J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary

- artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986. V. 237, 893–900.
100. Isik, D.U., Bas, A.Y., Demirel, N., Kavurt, S., Aydemir, O., Kavurt, A.V., and Cetin, I. Increased asymmetric dimethylarginine levels in severe transient tachypnea of the newborn. // *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 2016. V. 36, 459–462.
101. Jacobi, J., and Tsao, P.S. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation limits? // A systematic review. *Am. J. Nephrol.* 2008. V. 28, 224–237.
102. Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase // *Science.* 1996. V. 274, 774–777.
103. Javadiyan, S., Burdon, K.P., Whiting, M.J., Abhary, S., Straga, T., Hewitt, A.W., Mills, R.A., and Craig, J.E. Elevation of serum asymmetrical and symmetrical dimethylarginine in patients with advanced glaucoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012. V. 53, 1923–1927.
104. Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, 18522–18525.
105. Kakimoto, Y., Taniguchi, K., and Sano, I. D-beta-aminoisobutyrate:pyruvate aminotransferase in mammalian liver and excretion of beta-aminoisobutyrate by man // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244, 335–340.
106. Kasumov, T., Edmison, J.M., Dasarathy, S., Bennett, C., Lopez, R., and Kalhan, S.C. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease // *Metabolism.* 2011. V. 60, 776–781.
107. Kato, G.J., Wang, Z., Machado, R.F., Blackwelder, W.C., Taylor, J.G., and Hazen, S.L. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in sickle cell disease: abnormal levels and correlations with pulmonary hypertension, desaturation, haemolysis, organ dysfunction and death // *Br. J. Haematol.* 2009. V. 145, 506–513.
108. Kaur, H., and Halliwell, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients // *FEBS Lett.* 1994. V. 350, 9–12.
109. Kielstein, J.T., Impraim, B., Simmel, S., Bode-Böger, S.M., Tsikas, D., Frölich, J.C., Hoepfer, M.M., Haller, H., and Fliser, D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. // *Circulation.* 2004. V. 109, 172–177.

110. Kielstein, J.T., Bode-Böger, S.M., Hesse, G., Martens-Lobenhoffer, J., Takacs, A., Fliser, D., and Hoepfer, M.M. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. V. 25, 1414–1418.
111. Kielstein, J.T., Donnerstag, F., Gasper, S., Menne, J., Kielstein, A., Martens-Lobenhoffer, J., Scalera, F., Cooke, J.P., Fliser, D., and Bode-Böger, S.M. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. // *Stroke J. Cereb. Circ.* 2006a. V. 37, 2024–2029.
112. Kielstein, J.T., Salpeter, S.R., Bode-Boeger, S.M., Cooke, J.P., and Fliser, D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2006b. V. 21, 2446–2451.
113. Kielstein, J.T., Fliser, D., and Veldink, H. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: axis of evil or useful alliance? // *Semin. Dial.* 2009. V. 22, 346–350.
114. Kielstein, J.T., Veldink, H., Martens-Lobenhoffer, J., Haller, H., Burg, M., Lorenzen, J.M., Lichtinghagen, R., Bode-Böger, S.M., and Kliem, V. SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2011. V. 26, 324–328.
115. Kim, D., Kim, J.D., Baek, K., Yoon, Y., and Yoon, J. Improved mammalian expression systems by manipulating transcriptional termination regions // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19, 1620–1622.
116. Kim, H.S., Joo, H.J., Woo, J.S., Choi, Y.S., Choi, S.H., Kim, H., and Moon, W.K. In vivo magnetic resonance imaging of transgenic mice expressing human ferritin // *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 2013. V. 15, 48–57.
117. Kimoto, M., Tsuji, H., Ogawa, T., and Sasaoka, K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. V. 300, 657–662.
118. Kirbas, S., Kirbas, A., Tufekci, A., Cumhuri Cure, M., Cakmak, S., Yazici, T., and Cure, E. Serum levels of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in patients with Parkinson's disease // *Acta Clin. Belg.* 2016. V. 71, 71–75.
119. Kittel, A., Maas, R., König, J., Mieth, M., Weiss, N., Jarzebska, N., Hohenstein, B., Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., and Rodionov, R.N. In vivo evidence that Agxt2 can regulate plasma levels of dimethylarginines in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 430, 84–89.
120. Kittel, A., Müller, F., König, J., Mieth, M., Sticht, H., Zolk, O., Kralj, A., Heinrich, M.R., Fromm, M.F., and Maas, R. Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2)

polymorphisms have considerable impact on methylarginine and β -aminoisobutyrate metabolism in healthy volunteers // *PloS One*. 2014. V. 9, e88544.

121. Knipp, M. How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 2006. V. 7, 879–889.
122. Knipp, M., Charnock, J.M., Garner, C.D., and Vasák, M. Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1 // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276, 40449–40456.
123. Knipp, M., Braun, O., Gehrig, P.M., Sack, R., and Vasák, M. Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, 3410–3416.
124. Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T., and Kodama, T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells // *J. Atheroscler. Thromb.* 2005. V. 12, 138–142.
125. Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujiwara, S., and Noguchi, T. Identity of alanine:glyoxylate aminotransferase with alanine:2-oxoglutarate aminotransferase in rat liver cytosol // *Biochimie*. 1989. V. 71, 471–475.
126. Kontani, Y., Kaneko, M., Kikugawa, M., Fujimoto, S., and Tamaki, N. Identity of D-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase with alanine-glyoxylate aminotransferase 2 // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1156, 161–166.
127. Korandji, C., Zeller, M., Guillard, J.-C., Vergely, C., Sicard, P., Duvillard, L., Gambert, P., Moreau, D., Cottin, Y., and Rochette, L. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute myocardial infarction // *Clin. Biochem.* 2007. V. 40, 66–72.
128. Koshland, D.E.J. The molecule of the year // *Science*. 1992. V. 258, 1861.
129. Kostourou, V., Robinson, S.P., Cartwright, J.E., and Whitley, G.S.J. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis // *Br. J. Cancer*. 2002. V. 87, 673–680.
130. Kostourou, V., Robinson, S.P., Whitley, G.S.J., and Griffiths, J.R. Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging // *Cancer Res.* 2003. V. 63, 4960–4966.
131. Kostourou, V., Troy, H., Murray, J.F., Cullis, E.R., Whitley, G.S.J., Griffiths, J.R., and Robinson, S.P. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase enhances tumor hypoxia: an insight into the relationship of hypoxia and angiogenesis in vivo // *Neoplasia*. 2004. V. 6, 401–411.

132. Krzyzanowska, K., Mittermayer, F., Shnawa, N., Hofer, M., Schnabler, J., Etmüller, Y., Kapiotis, S., Wolzt, M., and Schernthaner, G. Asymmetrical dimethylarginine is related to renal function, chronic inflammation and macroangiopathy in patients with Type 2 diabetes and albuminuria // *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 2007. V. 24, 81–86.
133. van Kuilenburg, A.B.P., Stroomer, A.E.M., Bosch, A.M., and Duran, M. Beta-alanine and beta-aminoisobutyric acid levels in two siblings with dihydropyrimidinase deficiency // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008. V. 27, 825–829.
134. Lakhani, K., Kay, A.R., Leiper, J., Barry, J.A., and Hardiman, P.J. Symmetric dimethylarginine (SDMA) is raised in women with polycystic ovary syndrome: a pilot study // *J. Obstet. Gynaecol.* 2011. V. 31, 417–419.
135. Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F., Levi, R., and Novogrodsky, A. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270, 7017–7020.
136. Lander, H.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S., and Quilliam, L.A. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, 4323–4326.
137. Langen, J., Kayacelebi, A.A., Beckmann, B., Weigt-Usinger, K., Carmann, C., Hörster, I., Lilienthal, E., Richter-Unruh, A., Tsikas, D., and Lücke, T. Homoarginine (hArg) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in short stature children without and with growth hormone deficiency: hArg and ADMA are involved differently in growth in the childhood // *Amino Acids.* 2015. V. 47, 1875–1883.
138. Lee, I.S., Muragaki, Y., Ideguchi, T., Hase, T., Tsuji, M., Ooshima, A., Okuno, E., and Kido, R. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding alanine-glyoxylate aminotransferase 2 from rat kidney // *J. Biochem. (Tokyo).* 1995. V. 117, 856–862.
139. Lee, I.S., Nishikimi, M., Inoue, M., Muragaki, Y., and Ooshima, A. Specific expression of alanine-glyoxylate aminotransferase 2 in the epithelial cells of Henle's loop // *Nephron.* 1999. V. 83, 184–185.
140. Leiper, J., Murray-Rust, J., McDonald, N., and Vallance, P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99, 13527–13532.
141. Leiper, J., Nandi, M., Torondel, B., Murray-Rust, J., Malaki, M., O'Hara, B., Rossiter, S., Anthony, S., Madhani, M., Selwood, D., et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis // *Nat. Med.* 2007. V. 13, 198–203.
142. Leiper, J.M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R.J., Charles, I.G., Whitley, G.S., and Vallance, P. Identification of two human dimethylarginine

dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases // *Biochem. J.* 1999. V. 343 Pt 1, 209–214.

143. Li, H., and Förstermann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease // *J. Pathol.* 2000. V. 190, 244–254.
144. Li, F., Munchhof, A.M., White, H.A., Mead, L.E., Krier, T.R., Fenoglio, A., Chen, S., Wu, X., Cai, S., Yang, F.-C., et al. Neurofibromin is a novel regulator of RAS-induced signals in primary vascular smooth muscle cells // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15, 1921–1930.
145. Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V., and Kim, Y.M. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 240, 419–424.
146. Li, L.M., Kilbourn, R.G., Adams, J., and Fidler, I.J. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells // *Cancer Res.* 1991. V. 51, 2531–2535.
147. Li Volti, G., Salomone, S., Sorrenti, V., Mangiameli, A., Urso, V., Siarkos, I., Galvano, F., and Salamone, F. Effect of silibinin on endothelial dysfunction and ADMA levels in obese diabetic mice // *Cardiovasc. Diabetol.* 2011. V. 10, 62.
148. Lluch, P., Torondel, B., Medina, P., Segarra, G., Del Olmo, J.A., Serra, M.A., and Rodrigo, J.M. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis // *J. Hepatol.* 2004. V. 41, 55–59.
149. Lluch, P., Mauricio, M.D., Vila, J.M., Segarra, G., Medina, P., Del Olmo, J.A., Rodrigo, J.M., and Serra, M.A. Accumulation of symmetric dimethylarginine in hepatorenal syndrome // *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 2006. V. 231, 70–75.
150. Lücke, T., Kanzelmeyer, N., Kemper, M.J., Tsikas, D., and Das, A.M. Developmental changes in the L-arginine/nitric oxide pathway from infancy to adulthood: plasma asymmetric dimethylarginine levels decrease with age // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. V. 45, 1525–1530.
151. Lundman, P., Eriksson, M.J., Stühlinger, M., Cooke, J.P., Hamsten, A., and Tornvall, P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001. V. 38, 111–116.
152. Maas, R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA) // *Vasc. Med.* 2005. V. 10, S49–S57.
153. Maas, R., Tan-Andreesen, J., Schwedhelm, E., Schulze, F., and Böger, R.H. A stable-isotope based technique for the determination of dimethylarginine

- dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in mouse tissue // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2007. V. 851, 220–228.
154. MacAllister, R.J., Rambašek, M.H., Vallance, P., Williams, D., Hoffmann, K.H., and Ritz, E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 1996a. V. 11, 2449–2452.
155. MacAllister, R.J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., Russell, R.J., Hodson, H., Whitley, G.S., and Vallance, P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *Br. J. Pharmacol.* 1996b. V. 119, 1533–1540.
156. MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., and Thompson, J.A. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93, 11853–11858.
157. Manzoni, O., and Bockaert, J. Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors // *J. Neurochem.* 1993. V. 61, 368–370.
158. Marletta, M.A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance // *Trends Biochem. Sci.* 1989. V. 14, 488–492.
159. Marsilio, R., Dall'Amico, R., Giordano, G., Murer, L., Montini, G., Ros, M., Bacelle, L., Plebani, M., Dussini, N., and Zacchello, G. Rapid determination of creatinine in serum and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography // *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1999. V. 29, 103–109.
160. Martens-Lobenhoffer, J., Rodionov, R.N., Drust, A., and Bode-Böger, S.M. Detection and quantification of α -keto- δ -(N(G),N(G)-dimethylguanidino)valeric acid: a metabolite of asymmetric dimethylarginine // *Anal. Biochem.* 2011. V. 419, 234–240.
161. Masuda, H., Goto, M., Tamaoki, S., and Azuma, H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 126, 211–218.
162. Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., and Böhme, E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxidoreductase // *FEBS Lett.* 1991. V. 288, 187–191.
163. Meinitzer, A., Kielstein, J.T., Pilz, S., Drechsler, C., Ritz, E., Boehm, B.O., Winkelmann, B.R., and März, W. Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study // *Clin. Chem.* 2011. V. 57, 112–121.
164. Melikian, N., Seddon, M.D., Casadei, B., Chowienczyk, P.J., and Shah, A.M. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation // *Trends Cardiovasc. Med.* 2009. V. 19, 256–262.

165. Mengeloglu, Z., Sünnetcioglu, M., Tosun, M., Küçükbayrak, A., Ceylan, M.R., Baran, A.I., Karahocagil, M., and Akdeniz, H. High asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in patients with brucellosis // *Inflammation*. 2014. V. 37, 127–131.
166. Michel, T., and Vanhoutte, P.M. Cellular signaling and NO production // *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 2010. V. 459, 807–816.
167. Mittermayer, F., Prusa, A.-R., Pollak, A., and Wolzt, M. Umbilical vein plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine are increased in male but not female neonates delivered preterm: a pilot study // *Early Hum. Dev.* 2006. V. 82, 421–424.
168. Mohiuddin, I., Chai, H., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q., and Chen, C. Nitrotyrosine and Chlorotyrosine: Clinical Significance and Biological Functions in the Vascular System // *J. Surg. Res.* 2006. V. 133, 143–149.
169. Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brüne, B., Di Silvio, M., Billiar, T.R., and Lapetina, E.G. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267, 24929–24932.
170. Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* 1991. V. 43, 109–142.
171. Mookerjee, R.P., Malaki, M., Davies, N.A., Hodges, S.J., Dalton, R.N., Turner, C., Sen, S., Williams, R., Leiper, J., Vallance, P., et al. Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis // *Hepatology*. 2007. V. 45, 62–71.
172. Morales, Y., Cáceres, T., May, K., and Hevel, J.M. Biochemistry and regulation of the protein arginine methyltransferases (PRMTs) // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 590, 138–152.
173. Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Lizasoain, I., Su, Y., Knowles, R.G., Radomski, M.W., and Moncada, S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite // *Br. J. Pharmacol.* 1995. V. 116, 1999–2004.
174. Murray-Rust, J., Leiper, J., McAlister, M., Phelan, J., Tilley, S., Santa Maria, J., Vallance, P., and McDonald, N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8, 679–683.
175. Nagasaka, H., Tsukahara, H., Yorifuji, T., Miida, T., Murayama, K., Tsuruoka, T., Takatani, T., Kanazawa, M., Kobayashi, K., Okano, Y., et al. Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects // *Metabolism*. 2009. V. 58, 278–282.

176. Nagasaka, H., Okano, Y., Aizawa, M., Miida, T., Yorifuji, T., Tajima, G., Sakura, N., Takatani, T., Sanayama, Y., Sugamoto, K., et al. Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt // *Metabolism*. 2010. V. 59, 107–113.
177. Neupert, W., and Herrmann, J.M. Translocation of proteins into mitochondria // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76, 723–749.
178. Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily // *Science*. 1990. V. 247, 1219–1222.
179. Nicholson, G., Rantalainen, M., Li, J.V., Maher, A.D., Malmodin, D., Ahmadi, K.R., Faber, J.H., Barrett, A., Min, J.L., Rayner, N.W., et al. A genome-wide metabolic QTL analysis in Europeans implicates two loci shaped by recent positive selection // *PLoS Genet.* 2011. V. 7, e1002270.
180. Nijveldt, R.J., Teerlink, T., Van Der Hoven, B., Siroen, M.P.C., Kuik, D.J., Rauwerda, J.A., and van Leeuwen, P. a. M. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality // *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 2003. V. 22, 23–30.
181. Noguchi, T., and Mori, R. Biosynthesis of porphyrin precursors in mammals. Identity of alanine: gamma, delta-dioxoalate aminotransferase with alanine:glyoxylate aminotransferase // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256, 10335–10339.
182. Noguchi, T., and Takada, Y. Purification and properties of peroxisomal pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver // *Biochem. J.* 1978. V. 175, 765–768.
183. Noguchi, T., Minatogawa, Y., Takada, Y., Okuno, E., and Kido, R. Subcellular distribution of pyruvate (glyoxylate) aminotransferases in rat liver // *Biochem. J.* 1978a. V. 170, 173–175.
184. Noguchi, T., Okuno, E., Takada, Y., Minatogawa, Y., Okai, K., and Kido, R. Characteristics of hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase in different mammalian species // *Biochem. J.* 1978b. V. 169, 113–122.
185. Noguchi, T., Takada, Y., and Oota, Y. Intraperoxisomal and intramitochondrial localization, and assay of pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1979. V. 360, 919–927.
186. Nonaka, S., Tsunoda, M., Imai, K., and Funatsu, T. High-performance liquid chromatographic assay of N(G)-monomethyl-L-arginine, N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine, and N(G),N(G)'-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1066, 41–45.

187. Obayashi, K., Saeki, K., and Kurumatani, N. Relationship between asymmetric dimethylarginine and nocturia in the general elderly population: The HEIJO-KYO cohort // *Neurourol. Urodyn.* 2015. V. 34, 769–773.
188. O'Donnell, V.B., Eiserich, J.P., Bloodsworth, A., Chumley, P.H., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V.M., and Freeman, B.A. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species // *Methods Enzymol.* 1999. V. 301, 454–470.
189. Ogawa, T., Kimoto, M., Watanabe, H., and Sasaoka, K. Metabolism of NG,NG- and NG,N'G-dimethylarginine in rats // *Arch. Biochem. Biophys.* 1987a. V. 252, 526–537.
190. Ogawa, T., Kimoto, M., and Sasaoka, K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987b. V. 148, 671–677.
191. Ogawa, T., Kimoto, M., and Sasaoka, K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264, 10205–10209.
192. Ogawa, T., Kimoto, M., and Sasaoka, K. Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2 // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265, 20938–20945.
193. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells // *FEBS Lett.* 1997. V.407, 313–319.
194. Okuno, E., Minatogawa, Y., and Kido, R. Co-purification of alanine-glyoxylate aminotransferase with 2-aminobutyrate aminotransferase in rat kidney // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 715, 97–104.
195. Okuno, E., Minatogawa, Y., and Kido, R. A new biosynthetic route of porphyrin precursors in common between animals and plants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 112, 986–990.
196. Onozato, M.L., Tojo, A., Leiper, J., Fujita, T., Palm, F., and Wilcox, C.S. Expression of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase and protein arginine N-methyltransferase isoforms in diabetic rat kidney: effects of angiotensin II receptor blockers // *Diabetes.* 2008. V. 57, 172–180.
197. Owczarek, D., Cibor, D., and Mach, T. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), arginine, and 8-iso-prostaglandin F2alpha (8-iso-PGF2alpha) level in patients with inflammatory bowel diseases // *Inflamm. Bowel Dis.* 2010. V. 16, 52–57.
198. Ozkan, Y., Firat, H., Simşek, B., Torun, M., and Yardim-Akaydin, S. Circulating nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, and oxidative

- status in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) // *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 2008. V. 12, 149–154.
199. Paik, W.K., and Kim, S. Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243, 2108–2114.
200. Palm, F., Onozato, M.L., Luo, Z., and Wilcox, C.S. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems // *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 2007. V. 293, H3227–H3245.
201. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* 1987. V. 327, 524–526.
202. Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // *Nature.* 1988. V. 333, 664–666.
203. Pettersson, A., Hedner, T., and Milsom, I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1998. V. 77, 808–813.
204. Podrez, E.A., Schmitt, D., Hoff, H.F., and Hazen, S.L. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 103, 1547–1560.
205. Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., and Murad, F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. V. 88, 10480–10484.
206. Porter, D.J., Harrington, J.A., Almond, M.R., Chestnut, W.G., Tanoury, G., and Spector, T. Enzymatic elimination of fluoride from alpha-fluoro-beta-alanine // *Biochem. Pharmacol.* 1995. V. 50, 1475–1484.
207. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. V. 288, 481–487.
208. Rawal, N., Rajpurohit, R., Paik, W.K., and Kim, S. Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver // *Biochem. J.* 1994. V. 300 (Pt 2), 483–489.
209. Rees, D.D., Palmer, R.M., and Moncada, S.. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989a. V. 86, 3375–3378.

210. Rees, D.D., Palmer, R.M., Hodson, H.F., and Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation // *Br. J. Pharmacol.* 1989b. V. 96, 418–424.
211. Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., and Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo // *Br. J. Pharmacol.* 1990. V. 101, 746–752.
212. Rhee, E.P., Ho, J.E., Chen, M.-H., Shen, D., Cheng, S., Larson, M.G., Ghorbani, A., Shi, X., Helenius, I.T., O'Donnell, C.J., et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort // *Cell Metab.* 2013. V. 18, 130–143.
213. Riddell, D.R., and Owen, J.S. Nitric oxide and platelet aggregation // *Vitam. Horm.* 1999. V. 57, 25–48.
214. Roberts, L.D., Boström, P., O'Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., Lee, Y.-K., Palma, M.J., Calhoun, S., Georgiadi, A., et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors // *Cell Metab.* 2014. V. 19, 96–108.
215. Rodionov, R.N., and Lentz, S.R. The homocysteine paradox // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28, 1031–1033.
216. Rodionov, R.N., Murry, D.J., Vaulman, S.F., Stevens, J.W., and Lentz, S.R. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production // *J. Biol. Chem.* 2010a. V. 285, 5385–5391.
217. Rodionov, R.N., Dayoub, H., Lynch, C.M., Wilson, K.M., Stevens, J.W., Murry, D.J., Kimoto, M., Arning, E., Bottiglieri, T., Cooke, J.P., et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase protects against cerebral vascular effects of hyperhomocysteinemia // *Circ. Res.* 2010b. V. 106, 551–558.
218. Rodionov, R.N., Murry, D.J., Vaulman, S.F., Stevens, J.W., and Lentz, S.R. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production // *J. Biol. Chem.* 2010c. V. 285, 5385–5391.
219. Rodionov, R.N., Jarzebska, N., Weiss, N., and Lentz, S.R. AGXT2: a promiscuous aminotransferase // *Trends Pharmacol. Sci.* 2014a. V. 35, 575–582.
220. Rodionov, R.N., Martens-Lobenhoffer, J., Brilloff, S., Hohenstein, B., Jarzebska, N., Jabs, N., Kittel, A., Maas, R., Weiss, N., and Bode-Böger, S.M. Role of alanine:glyoxylate aminotransferase 2 in metabolism of asymmetric dimethylarginine in the settings of asymmetric dimethylarginine overload and bilateral nephrectomy // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2014b. V. 29, 2035–2042.

221. Rodionov, R.N., Martens-Lobenhoffer, J., Brilloff, S., Burdin, D.V., Jarzebska, N., Demyanov, A.V., Hohenstein, B., Weiss, N., and Bode-Böger, S.M. Acetylation of asymmetric and symmetric dimethylarginine: an undercharacterized pathway of metabolism of endogenous methylarginines // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2016. V. 31, 57–63.
222. Rubanyi, G.M., and Vanhoutte, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor // *Am. J. Physiol.* 1986. V. 250, H822-827.
223. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269, 26066–26075.
224. Ryan, R., Thornton, J., Duggan, E., McGovern, E., O'Dwyer, M.J., Ryan, A.W., Kelleher, D., McManus, R., and Ryan, T. Gene polymorphism and requirement for vasopressor infusion after cardiac surgery // *Ann. Thorac. Surg.* 2006. V. 82, 895–901.
225. Saigusa, D., Takahashi, M., Kanemitsu, Y., and Tomioka, Y. Determination of Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine in Biological Samples of Mice Using LC/MS/MS // *Am. J. Anal. Chem.* 2011. V. 2, 303–313.
226. Sakuma, I., Togashi, H., Yoshioka, M., Saito, H., Yanagida, M., Tamura, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Gross, S.S., and Levi, R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? // *Circ. Res.* 1992. V. 70, 607–611.
227. Salido, E.C., Li, X.M., Lu, Y., Wang, X., Santana, A., Roy-Chowdhury, N., Torres, A., Shapiro, L.J., and Roy-Chowdhury, J. Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103, 18249–18254.
228. Santo-Domingo, J., and Demareux, N. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 139, 415–423.
229. Schepers, E., Glorieux, G., Dhondt, A., Leybaert, L., and Vanholder, R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2009. V. 24, 1429–1435.
230. Schepers, E., Glorieux, G., Dou, L., Cerini, C., Gayrard, N., Louvet, L., Maugard, C., Preus, P., Rodriguez-Ortiz, M., Argiles, A., et al. Guanidino Compounds as Cause of Cardiovascular Damage in Chronic Kidney Disease: An in vitro Evaluation // *Blood Purif.* 2010. V. 30, 277–287.

231. Schlesinger, S., Sonntag, S.R., Lieb, W., and Maas, R. Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies // *PloS One*. 2016. V. 11, e0165811.
232. Schnabel, R., Blankenberg, S., Lubos, E., Lackner, K.J., Rupprecht, H.J., Espinola-Klein, C., Jachmann, N., Post, F., Peetz, D., Bickel, C., et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study // *Circ. Res.* 2005. V. 97, e53-59.
233. Schulze, F., Carter, A.M., Schwedhelm, E., Ajjan, R., Maas, R., von Holten, R.-A., Atzler, D., Grant, P.J., and Böger, R.H. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke // *Atherosclerosis*. 2010. V. 208, 518–523.
234. Schuman, E.M., and Madison, D.V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation // *Science*. 1991. V. 254, 1503–1506.
235. Schwedhelm, E., Tan-Andresen, J., Maas, R., Riederer, U., Schulze, F., and Böger, R.H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma // *Clin. Chem.* 2005. V. 51, 1268–1271.
236. Schwedhelm, E., von Leitner, E.-C., Atzler, D., Schmitz, C., Jacobi, J., Meinertz, T., Münzel, T., Baldus, S., Cooke, J.P., Böger, R.H., et al. Extensive characterization of the human DDAH1 transgenic mice // *Pharmacol. Res.* 2009. V. 60, 494–502.
237. Scott, J.A., North, M.L., Rafii, M., Huang, H., Pencharz, P., Subbarao, P., Belik, J., and Grasemann, H. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 184, 779–785.
238. Senol, S., Tekumit, H., Akar, I., and Ince, I. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginine in acute deep vein thrombosis // *Ann. Vasc. Surg.* 2015. V. 29, 1003–1006.
239. Seppälä, I., Kleber, M.E., Lyytikäinen, L.-P., Hernesniemi, J.A., Mäkelä, K.-M., Oksala, N., Laaksonen, R., Pilz, S., Tomaschitz, A., Silbernagel, G., et al. Genome-wide association study on dimethylarginines reveals novel AGXT2 variants associated with heart rate variability but not with overall mortality // *Eur. Heart J.* 2014. V. 35, 524–531.
240. Seppälä, I., Kleber, M.E., Bevan, S., Lyytikäinen, L.-P., Oksala, N., Hernesniemi, J.A., Mäkelä, K.-M., Rothwell, P.M., Sudlow, C., Dichgans, M., et al. Associations of functional alanine-glyoxylate aminotransferase 2 gene variants with atrial fibrillation and ischemic stroke // *Sci. Rep.* 2016. V. 6, 23207.
241. Sheen, J.-M., Huang, L.-T., Hsieh, C.-S., Chen, C.-C., Wang, J.-Y., and Tain, Y.-L. Bile duct ligation in developing rats: temporal progression of liver, kidney, and brain damage // *J. Pediatr. Surg.* 2010. V. 45, 1650–1658.

242. Singh, J.P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis // *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000. 2007. V. 8, 736–741.
243. Smith, C.L., Anthony, S., Hubank, M., Leiper, J.M., and Vallance, P. Effects of ADMA upon gene expression: an insight into the pathophysiological significance of raised plasma ADMA // *PLoS Med.* 2005. V. 2, 264.
244. Snyder, S.H., and Brecht, D.S. Nitric oxide as a neuronal messenger // *Trends Pharmacol. Sci.* 1991. V. 12, 125–128.
245. Soskić, S.S., Dobutović, B.D., Sudar, E.M., Obradović, M.M., Nikolić, D.M., Djordjevic, J.D., Radak, D.J., Mikhailidis, D.P., and Isenović, E.R. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure // *Open Cardiovasc. Med. J.* 2011. V. 5, 153–163.
246. Speer, T., Rohrer, L., Blyszczuk, P., Shroff, R., Kuschnerus, K., Kränkel, N., Kania, G., Zewinger, S., Akhmedov, A., Shi, Y., et al. Abnormal High-Density Lipoprotein Induces Endothelial Dysfunction via Activation of Toll-like Receptor-2 // *Immunity.* 2013. V. 38, 754–768.
247. Spitsyn, V.A., and Afanas'eva, I.S. Differences in allele frequency at the BAIB locus, determining the level of expression of beta-aminoisobutyric acid, in healthy donors and coronary artery atherosclerosis patients from Buryat and Lithuanian populations // *Genetika.* 2001. V. 37, 1713–1716.
248. Stamler, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide // *Cell.* 1994. V. 78, 931–936.
249. Stamler, J.S., Toone, E.J., Lipton, S.A., and Sucher, N.J. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif // *Neuron.* 1997. V. 18, 691–696.
250. Stuehr, D., Pou, S., and Rosen, G.M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276, 14533–14536.
251. Stühlinger, M.C., Abbasi, F., Chu, J.W., Lamendola, C., McLaughlin, T.L., Cooke, J.P., Reaven, G.M., and Tsao, P.S. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor // *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2002. V. 287, 1420–1426.
252. Su, Y., Couch, M., and Block, E.R. Substrate inhibition of nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells in culture // *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 1997. V. 1, 469–475.
253. Suda, O., Tsutsui, M., Morishita, T., Tanimoto, A., Horiuchi, M., Tasaki, H., Huang, P.L., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., and Nakashima, Y. Long-term treatment with

- N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice // *Circulation*. 2002. V. 106, 1729–1735.
254. Suda, O., Tsutsui, M., Morishita, T., Tasaki, H., Ueno, S., Nakata, S., Tsujimoto, T., Toyohira, Y., Hayashida, Y., Sasaguri, Y., et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. V. 24, 1682–1688.
255. Suhre, K., Wallaschofski, H., Raffler, J., Friedrich, N., Haring, R., Michael, K., Wasner, C., Krebs, A., Kronenberg, F., Chang, D., et al. A genome-wide association study of metabolic traits in human urine // *Nat. Genet.* 2011. V. 43, 565–569.
256. Sulicka, J., Surdacki, A., Strach, M., Kwater, A., Gryglewska, B., Ćwiklińska, M., Balwierz, W., and Grodzicki, T.K. Elevated asymmetric dimethylarginine in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report // *Dis. Markers*. 2012. V. 33, 69–76.
257. Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Boeger, R.H., Bode-Boeger, S.M., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., Dubiel, J.S., and Froelich, J.C. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. V. 33, 652–658.
258. Tain, Y.-L., and Hsu, C.-N. Targeting on Asymmetric Dimethylarginine-Related Nitric Oxide-Reactive Oxygen Species Imbalance to Reprogram the Development of Hypertension. *Int // J. Mol. Sci.* 2016 . V. 17.
259. Tain, Y.-L., and Hsu, C.-N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) // *Toxins*. 2017. V. 9.
260. Tain, Y.-L., Hsieh, C.-S., Chen, C.-C., Sheen, J.-M., Lee, C.-T., and Huang, L.-T. Melatonin prevents increased asymmetric dimethylarginine in young rats with bile duct ligation // *J. Pineal Res.* 2010 . V. 48, 212–221.
261. Tain, Y.-L., Lee, W.-C., Hsu, C.-N., Lee, W.-C., Huang, L.-T., Lee, C.-T., and Lin, C.-Y. Asymmetric dimethylarginine is associated with developmental programming of adult kidney disease and hypertension in offspring of streptozotocin-treated mothers // *PloS One* 2013. V. 8, e55420.
262. Takada, Y., and Noguchi, T. Subcellular distribution, and physical and immunological properties of hepatic alanine: glyoxylate aminotransferase isoenzymes in different mammalian species // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1982. V. 72, 597–604.

263. Tamaki, N., Kaneko, M., Mizota, C., Kikugawa, M., and Fujimoto, S. Purification, characterization and inhibition of D-3-aminoisobutyrate aminotransferase from the rat liver // *Eur. J. Biochem.* 1990 . V. 189, 39–45.
264. Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275, 7723–7730.
265. Tang, W.H.W., Tong, W., Shrestha, K., Wang, Z., Levison, B.S., Delfraino, B., Hu, B., Troughton, R.W., Klein, A.L., and Hazen, S.L. Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure // *Eur. Heart J.* 2008. V.29, 2506–2513.
266. Tarnow, L., Hovind, P., Teerlink, T., Stehouwer, C.D.A., and Parving, H.-H. (2004). Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes // *Diabetes Care* 27, 765–769.
267. Teerlink, T., Luo, Z., Palm, F., and Wilcox, C.S. Cellular ADMA: regulation and action // *Pharmacol. Res.* 2009. V. 60, 448–460.
268. Tenderenda-Banasiuk, E., Wasilewska, A., Taranta-Janusz, K., and Korzeniecka-Kozerska, A. Asymmetric and symmetric dimethylarginine in adolescents with hyperuricemia // *Dis. Markers.* 2013. V. 35, 407–412.
269. Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S.S., and Levi, R. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992. V. 262, 343–347.
270. Tojo, A., Welch, W.J., Bremer, V., Kimoto, M., Kimura, K., Omata, M., Ogawa, T., Vallance, P., and Wilcox, C.S. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney // *Kidney Int.* 1997. V. 52, 1593–1601.
271. Tojo, A., Kimoto, M., and Wilcox, C.S. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin // *Kidney Int.* 2000. V. 58, 2075–2083.
272. Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H., and Araki, N. Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase // *FEBS Lett.* 2001. V. 494, 48–53.
273. Topal, G., Donmez, A., Doğan, B.S.U., Kucur, M., Cengiz, D.T., Berkoz, F.B., and Erdogan, N. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels are increased in patients with fibromyalgia: correlation with tumor necrosis factor- α (TNF- α) and 8-iso-prostaglandin F(2 α) (8-iso-PGF(2 α)) // *Clin. Biochem.* 2011. V. 44, 364–367.

274. Tran, C.T., Fox, M.F., Vallance, P., and Leiper, J.M. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins // *Genomics*. 2000. V. 68, 101–105.
275. Tran, C.T.L., Leiper, J.M., and Vallance, P. The DDAH/ADMA/NOS pathway // *Atheroscler. Suppl.* 2003. V. 4, 33–40.
276. Tresham, J.J., Dusting, G.J., Coghlan, J.P., and Whitworth, J.A. Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, in sheep // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1991. V. 18, 327–330.
277. Tsai, C.-M., Kuo, H.-C., Hsu, C.-N., Huang, L.-T., and Tain, Y.-L. Metformin reduces asymmetric dimethylarginine and prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats // *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 2014. V. 164, 452–459.
278. Tsikas, D. A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research // *Anal. Biochem.* 2008. V. 1, 379, 139–163.
279. Turiel, M., Atzeni, F., Tomasoni, L., de Portu, S., Delfino, L., Bodini, B.D., Longhi, M., Sitia, S., Bianchi, M., Ferrario, P., et al. Non-invasive assessment of coronary flow reserve and ADMA levels: a case-control study of early rheumatoid arthritis patients // *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2009. V.48, 834–839.
280. Tyagi, R.K., and Datta, K. In vitro translocation of L-alanine:4,5-dioxovalerate transaminase into rat kidney mitochondria // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1993. V. 113, 557–562.
281. Ueno, S., Morino, H., Sano, A., and Kakimoto, Y. Purification and characterization of D-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase from rat liver // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. V. 1033, 169–175.
282. Ueno, S., Sano, A., Kotani, K., Kondoh, K., and Kakimoto, Y. Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain // *J. Neurochem.* 1992. V. 9, 2012–2016.
283. Usui, M., Matsuoka, H., Miyazaki, H., Ueda, S., Okuda, S., and Imaizumi, T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure // *Life Sci.* 1998. V. 62, 2425–2430.
284. Valkonen, V.-P., Tuomainen, T.-P., and Laaksonen, R. DDAH gene and cardiovascular risk // *Vasc. Med. Lond. Engl.* 2005. V.10 Suppl 1, S45-48.
285. Vallance, P., and Leiper, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. V. 1, 939–950.

286. Vallance, P., Collier, J., and Moncada, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man // *Lancet*. 1989. V. 2, 997–1000.
287. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., and Moncada, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure // *Lancet*. 1992. V. 339, 572–575.
288. Vanhoutte, P.M. How We Learned to Say NO // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009a. V. 29, 1156–1160.
289. Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Tang, E.H.C., and Feletou, M. Endothelial dysfunction and vascular disease // *Acta Physiol. Oxf. Engl*. 2009b. V. 196, 193–222.
290. Varticovski, L., Kushner, J.P., and Burnham, B.F. Biosynthesis of porphyrin precursors. Purification and characterization of mammalian L-alanine:gamma,delta-dioxovaleric acid aminotransferase // *J. Biol. Chem*. 1980. V. 255, 3742–3747.
291. Vasilev, V., Matrozova, J., Elenkova, A., Vandeva, S., Kirilov, G., and Zacharieva, S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and soluble vascular cell adhesion molecule 1(sVCAM-1) as circulating markers for endothelial dysfunction in patients with pheochromocytoma // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc*. 2013. V. 121, 551–555.
292. Vida, G., Sulyok, E., Ertl, T., Martens-Lobenhoffer, J., and Bode-Boger, S.M. Plasma asymmetric dimethylarginine concentration during the perinatal period // *Neonatology*. 2007. V. 92, 8–13.
293. Viner, R.I., Hühmer, A.F., Bigelow, D.J., and Schöneich, C. The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by peroxynitrite // *Free Radic. Res*. 1996. V. 24, 243–259.
294. Wang, D., Gill, P.S., Chabrashvili, T., Onozato, M.L., Raggio, J., Mendonca, M., Dennehy, K., Li, M., Modlinger, P., Leiper, J., et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO // *Circ. Res*. 2007. V. 101, 627–635.
295. Wang, J., Sim, A.S., Wang, X.L., Salonikas, C., Naidoo, D., and Wilcken, D.E.L. Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease // *Atherosclerosis*. 2006. V. 184, 383–388.
296. Weinberg, J.B., Yeo, T.W., Mukemba, J.P., Florence, S.M., Volkheimer, A.D., Wang, H., Chen, Y., Rubach, M., Granger, D.L., Mwaikambo, E.D., et al. Dimethylarginines: endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis in children with falciparum malaria // *J. Infect. Dis*. 2014. V. 210, 913–922.

297. Whittle, B.J., Lopez-Belmonte, J., and Rees, D.D. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation // *Br. J. Pharmacol.* 1989. V. 98, 646–652.
298. Wiederkehr, A.. Matrix alkalisation unleashes β -cell mitochondria // *Islets.* 2009. V. 1, 154–156.
299. Wilcken, D.E.L., Sim, A.S., Wang, J., and Wang, X.L. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism // *Mol. Genet. Metab.* 2007. V. 91, 309–317; discussion 308.
300. Wink, D.A., and Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 25, 434–456.
301. Wolin, M.S., Wood, K.S., and Ignarro L.J. Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257, 13312–13320.
302. Xu, L., Eu, J.P., Meissner, G., and Stamler, J.S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation // *Science.* 1998. V. 279, 234–237.
303. Yanai, J., Kakimoto, Y., Tsujio, T., and Sano, I. Genetic study of beta-aminoisobutyric acid excretion by Japanese // *Am. J. Hum. Genet.* 1969. V. 21, 115–132.
304. Yoo, J.H., and Lee, S.C. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke // *Atherosclerosis.* 2001. V. 158, 425–430.
305. Zhou, L., and Zhu, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications // *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 2009. V. 20, 223–230.
306. Zoccali, C., Bode-Böger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Fermo, I., Frölich, J., et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study // *Lancet.* 2001. V. 358, 2113–2117.
307. Zong, P., Setty, S., Sun, W., Martinez, R., Tune, J.D., Ehrenburg, I.V., Tkatchouk, E.N., Mallet, R.T., and Downey, H.F. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 2004. V. 229, 806–812.
308. Zou, M.H., Leist, M., and Ullrich, V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries // *Am. J. Pathol.* 1999. V. 154, 1359–1365.

309. Zuckerbraun, B.S., Stoyanovsky, D.A., Sengupta, R., Shapiro, R.A., Ozanich, B.A., Rao, J., Barbato, J.E., and Tzeng, E. Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. V. 292, 824-831.

Последовательность конструкции, использованной для создания трансгенных
мышей по hAGXT2

Сайт рестрикции BglII + CAG промотор + фрагмент Козака + hAGXT2 кДНК +
FLAG эпитоп + стоп кодон + SV40 polyA + сайт рестрикции MluI

3761 bp

5'AGATCTACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA
CCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA
CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCC
ACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC
GGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGG
GCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCG
AAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA
AGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCG
CGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCACAGG
TGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA
TGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGA
GGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGG
GCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCG
GGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG
CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGC
TGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTC
GGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG
GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGG
AGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGG
CGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGG
GACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGC
ACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGGCAGGAAGGAAA
TGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGTCCCCTTCTCCCTCTC
CAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCA
GGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
CATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTG
TGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGCCACCATGACTCTAATCTGGAGACATTTGC
TGAGACCCTTGTGCCTGGTCACTTCCGCTCCAGGATCCTTGAGATGCATCCTT
TCCTGAGCCTAGGTACTTCCCGGACATCAGTAACCAAGCTCAGTCTTCATACA

AAGCCCAGAATGCCTCCATGTGACTTCATGCCTGAAAGATACCAGTCCCTTGG
CTACAACCGTGTCTCTGGAAATCCACAAGGAACATCTTTCTCCTGTGGTGACGG
CATATTTCCAGAAACCCCTGCTGCTCCACCAGGGGCACATGGAGTGGCTCTTT
GATGCTGAAGGAAACAGATACCTGGATTTCTTTTCCGGGATTGTTACTGTGTCAG
TGTTGGCCACTGCCACCCAAAGGTGAATGCAGTGGCACAAAAGCAGCTCGGC
CGCCTGTGGCATAACAAGCACCGTCTTCTTCCACCCTCCAATGCATGAATATGC
AGAGAAGCTTGCCGCACTTCTTCCTGAGCCTCTTAAGGTCATTTTCTTGGTGAA
CAGTGGCTCAGAAGCCAATGAGCTGGCCATGCTGATGGCCAGGGGCGCACTCA
AACACATAGACATCATTTCTTTCAGAGGAGCCTACCATGGATGCAGTCCTTA
CACACTTGGCTTGACAAACGTAGGGATCTACAAGATGGAACCTCCCTGGTGGGA
CAGGTTGCCAACCAACAATGTGTCCAGATGTTTTTTCGTGGCCCTTGGGGAGGA
AGCCACTGTCGAGATTCTCCAGTGCAAACAATCAGGAAGTGCAGCTGTGCACC
AGACTGCTGCCAAGCTAAAGATCAGTATATTGAGCAATTCAAAGATACGCTGA
GCACATCTGTGGCCAAGTCAATTGCTGGATTTTTTCGCAGAACCTATTCAAGGT
GTGAATGGAGTTGTCCAGTACCCAAAGGGGTTTTCTAAAGGAAGCCTTTGAGCT
GGTGCGAGCAAGGGGAGGCGTGTGCATTGCAGATGAAGTGCAGACAGGATTT
GGAAGGTTGGGCTCTCACTTCTGGGGCTTCCAAACCCACGATGTCCTGCCTGA
CATTGTCACCATGGCTAAAGGGATTGGGAATGGCTTTCCCATGGCAGCAGTCA
TAACCACTCCAGAGATTGCCAAATCTTTGGCGAAATGCCTGCAGCACTTCAAC
ACCTTTGGAGGGAACCCCATGGCCTGTGCCATTGGATCTGCTGTGCTTGAGGT
GATTAAAGAAGAAAATCTACAGGAAAACAGTCAAGAAGTTGGGACCTACATG
TTACTAAAGTTTGCTAAGCTGCGGGATGAATTTGAAATTGTTGGAGACGTCCG
AGGCAAAGGCCTCATGATAGGCATAGAAATGGTGCAGGATAAGATAAGCTGT
CGGCCTCTTCCCGTGAAGAAGTAAATCAGATCCATGAGGACTGCAAGCACAT
GGGACTCCTCGTTGGCAGAGGCAGCATTTTTTTCTCAGACATTTTCGCATTGCGCC
CTCAATGTGCATCACTAAACCAGAAGTTGATTTTTGCAGTAGAAGTATTTTCGTTT
TGCCTTAACCCAACACATGGAAAGAAGAGCTAAGGATTACAAGGATGACGAC
GATAAGTAAGAATTCGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGAC
AAACCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGAT
GCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAA
CAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTA
AAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCAAGCC
TCGTCGTCTGGCCGGACCACGCTATCTGTGCAAGGTCCCCGGACGCGCGCTCC
ATGAGCAGAGCGCCCGCCGCCGAGGCAAGACTCGGGCGGCGCCCTGCCCCGTC
CCACCAGGTCAACAGGCGGTAACCGGCCTCTTCATCGGGAATGCGCGCGACCT
TCAGCATCGCCGGCATGTCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCAGCTCGACCAAGC
TTACGCGT 3'