

МЕТАБОЛИЗМ L-АРГИНИНА У ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС  
ПРИ УГНЕТЕНИИ АРГИНАЗЫ L-НОРВАЛИНОМ

© 2021 г. М. А. Гилинский<sup>1, \*</sup>, Ю. К. Политыко<sup>1, 2,</sup> А. Л. Маркель<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

\*E-mail: m.a.gilinsky@physiol.ru

Поступила в редакцию 28.02.2021 г.

После доработки 27.04.2021 г.

Принята к публикации 11.05.2021 г.

Гипотензивный эффект угнетения активности аргиназы [1] может реализоваться двумя путями: релаксацией сосудов при увеличении концентрации оксида азота (NO) и/или снижением количества циркулирующей жидкости. Первый эффект имеет место при повышении доступности субстрата NO-синтазы (NOS) – аргинина (АРГ), второй – при увеличении диуреза. Для уточнения путей влияния аргиназы на регуляцию артериального давления (АД) у крыс гипертензивной линии ISIAN и нормотензивной линии WAG проведен анализ особенностей метаболизма аминокислоты L-аргинина при торможении активности аргиназы путем введения ее ингибитора L-норвалина. Измерение концентрации АРГ и его метаболита орнитина в крови, моче и в гомогенате ткани почки производили при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с разделением на обращеннофазовом сорбенте и с флуоресцентной детекцией. Норвалин вводили внутривентриально (в/б) 1 раз в день в дозе 30 мг/кг в течение 7-ми дней, контрольным крысам обеих линий вводили физиологический раствор. В экспериментах с введением норвалина не обнаружено достоверного увеличения концентраций аминокислот в плазме крови как гипертензивных крыс, так и нормотензивных животных. Концентрация АРГ в моче крыс ISIAN, получавших норвалин, удваивалась, а у крыс WAG не менялась. Суточная экскреция АРГ у нормотензивных крыс WAG, получавших норвалин, лишь немного увеличилась, а у крыс ISIAN под влиянием норвалина возросла почти в три раза. При этом диурез увеличился только у гипертензивных крыс. Под влиянием норвалина содержание АРГ на 1 г массы почки у крыс ISIAN возросло почти в два раза, а у нормотензивных крыс WAG не изменилось. Проведенные исследования позволяют заключить, что ингибирование аргиназы норвалином оказало более сильный гипотензивный эффект у гипертензивных крыс по сравнению с нормотензивными. При этом гипотензивный эффект норвалина у нормотензивных крыс WAG может обеспечиваться системой оксида азота, тогда как у крыс гипертензивной линии ISIAN гипотензивный эффект реализуется за счет усиления диуреза.

*Ключевые слова:* аргиназа, L-норвалин, L-аргинин, L-орнитин, регуляция артериального давления

DOI: 10.31857/S0869813921080057

В большинстве обзоров в качестве одного из важных факторов формирования гипертензии называют аргиназу [1]. Эффекты аргиназы в отношении артериального давления (АД) связывают с угнетением продукции вазодилататора оксида азота

(NO), синтезируемого в процессе гидролиза АРГ NO-синтазой (NOS) с получением NO и цитруллина. Аргиназа — это марганецсодержащий металлофермент, катализирующий расщепление АРГ на орнитин и мочевину. Идентифицированы две формы фермента: аргиназа I и аргиназа II. Первый тип локализуется в цитоплазме клеток и экспрессируется в основном в печени как компонент цикла мочевины. Помимо гепатоцитов, аргиназа I экспрессируется в тканях мозга, в тонкой кишке и в эритроцитах (последнее — только у приматов). Следует отметить, что образовавшийся в гепатоцитах АРГ не попадает в системный кровоток, а немедленно гидролизуется аргиназой, формируя мочевину и орнитин. Последний частично вновь включается в цикл мочевины. Таким образом, благодаря аргиназе АРГ из цикла мочевины в печени становится недоступным для синтеза NO [2].

Второй тип аргиназы существует в митохондриях и экспрессируется в небольших количествах во многих тканях организма за исключением печени. Больше всего аргиназы типа II содержится в почке, простате, яичке, тонком кишечнике, молочной железе. Экспрессия аргиназ может быть индуцирована оксидативным стрессом, а также воспалительными стимулами [3, 4]. Снижение же экспрессии и/или активности аргиназ сопровождается увеличением производства NO. Экспрессия аргиназы II в эндотелии сосудов связана с регуляцией функции эндотелия и артериального давления [5, 6].

Аргиназы участвуют в катаболизме АРГ, препятствуя тем самым синтезу NO, который происходит в результате гидролиза АРГ с помощью NOS. При этом отмечается, что активность аргиназы многократно превосходит активность NOS [3]. Однако сопоставление  $K_m$  и  $V_{max}$  аргиназ и NO-синтаз позволяет утверждать, что скорости потребления субстрата обоими ферментами при низкой концентрации АРГ сопоставимы [3]. Исследованиями на макрофагах продемонстрировано увеличение конверсии АРГ в цитруллин с образованием NO при ингибировании аргиназы в этих клетках [7]. Также известно, что экспрессирующие NOS макрофаги и эндотелиальные клетки способны производить достаточное количество L-ω-N-гидроксиаргинина (промежуточный продукт в синтезе NO), чтобы ингибировать активность аргиназы [8, 9]. Наконец, было обнаружено, что высокий уровень экспрессии аргиназы I в астроцитах может уменьшать уровень АРГ в этих клетках до такой степени, что подавляется экспрессия индуцибельной NOS [4]. Приведенные данные свидетельствуют о конкуренции аргиназы и NOS за субстрат.

В принципе, гипотензивный эффект аргиназы может осуществляться двумя путями: за счет релаксации сосудов вследствие увеличения продукции NO и/или путем снижения количества циркулирующей жидкости. В первом варианте эффект реализуется вследствие увеличения АРГ — субстрата для NOS, во втором — за счет увеличения диуреза. При планировании этой работы ожидалось, что оценки особенностей метаболизма АРГ у нормо- и гипертензивных крыс позволят уточнить участие каждого из путей влияния аргиназы на АД. Таким образом, задача настоящей работы состояла в изучении возможных изменений метаболизма АРГ у нормо- и гипертензивных крыс путем сравнительного анализа эффектов ингибитора аргиназы — L-норвалина у крыс гипертензивной линии ISIAN и нормотензивной линии WAG.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования одобрены Комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института физиологии и фундаментальной медицины (НИИ ФФМ, протокол No. 7 от 10.09.2015 г.) и соответствуют Директиве Совета Европейского сообщества 86/609 / ЕЕС.

Эксперименты проведены на трехмесячных крысах-самцах массой до 350 г, из вивария Институт цитологии и генетики СО РАН. Животные были поделены случайным образом на 4 группы по 6 крыс в каждой. Группа 1 – контрольные крысы нормотензивной линии WAG (WAG – Wistar Albino Glaxo); группа 3 – контрольные крысы гипертензивной линии ISIAH (ISIAH – Inherited Stress Induced Arterial Hypertension). Группы 2 и 4 включали по 6 крыс линий WAG и ISIAH, которым в течение 7 дней внутрибрюшинно (в/б) вводили L-норвалин (30 мг/кг, Sigma, США), растворенный в 1 мл физиологического раствора. Контрольным крысам ежедневно вводили 1 мл физиологического раствора.

Животных содержали в индивидуальных пластиковых метаболических клетках (Italplast, Италия), при комнатной температуре (22–24°C), световом режиме 12/12 и свободном доступе к воде и сбалансированному стандартному корму. У всех крыс измеряли АД непрямым методом на приборе BIOPAC (США). Эксперимент начинался со дня высадки в метаболические клетки и заканчивался через 8 дней, включая день забоя (8-е сутки) путем быстрой декапитации на гильотине. Моча для исследований собиралась ежедневно, кровь забиралась утром 8-го дня. За исключением сопоставления данных начала и конца эксперимента в тексте представлены показатели мочи, полученные за 7-ой день. После декапитации кровь собирали в стеклянные вакутейнеры с 50-ю мкл цитрата натрия, встряхивали и центрифугировали 10 мин при 10000 g и 4°C. Плазма и моча хранились при –70°C до начала измерений. После декапитации у животных забирали и замораживали в жидком азоте почки. Для проведения измерений образцы ткани почек, плазмы и мочи оттаивали на ледяной бане.

Образец ткани почки выделяли с помощью поперечного среза в срединной части левой почки, он включал в себя корковое и мозговое вещества. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 1 мл 0.1 М хлорной кислоты. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 10000 g, после чего супернатант пропускали через конический фильтр, заполненный стеклянным фильтровальным материалом GFC (Whatmann, Англия) для избавления от осадка. Образец плазмы или мочи встряхивали, а затем центрифугировали 6–8 мин при 10000 g. К 200 мкл плазмы, мочи или гомогената почки добавляли 100 мкл внутреннего стандарта гомоаргинина (40 мкмоль/мл) и разбавляли до 1 мл натрий-фосфатным буфером (pH 7.4).

Процедура определения L-аргинина и орнитина в плазме, моче и ткани почки выполнялась в 3 этапа: 1) выделение аминокислот путем твердофазной экстракции; 2) дериватизация проб для измерений флуоресценции образца; 3) анализ при помощи высокоэффективной хроматографии с флуоресцентной детекцией. На первом этапе подготовленные растворы фильтрата гомогената почки, а также плазмы и мочи пропускали через концентрирующий патрон с адсорбентом (Oasis MCX, 30 мг, 1 мл, Waters, США), предварительно промытый 1 мл метанола, 1 мл сверхчистой H<sub>2</sub>O (milliQ) и 1 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7.4). После нанесения образца картридж промывали 1 мл метанола и 1 мл соляной кислоты. Аминокислоты элюировали раствором воды, метанола и аммиака в соотношении 5 : 4 : 1 с добавлением 50 мкл 1 М гидроксида натрия. Элюат высушивали на водяной бане при температуре 60–65°C в токе азота.

На втором этапе после ресуспендирования элюата в 200 мкл воды аликвоты растворов (50 мкл) дериватизировали при помощи препарата AccQ Fluor (Waters, США). Этот дериватизатор, благодаря длительности действия, создает возможность серийного определения уровней орнитина в одной с АРГ трассе хроматографа (дериватизация производилась в соответствии с инструкцией поставщика). Наконец, на третьем этапе 10 мкл дериватизированных образцов инжектировали в хроматограф.

**Таблица 1.** Характеристики исследованных крыс в начале и в конце эксперимента

№	Группы	Масса тела, г		АД, мм рт. ст.		Диурез, мл/100 г массы	
		1-й день	7-й день	1-й день	7-й день	1-й день	7-й день
1	WAG физраствор	324 ± 12	325 ± 12	125 ± 2	130 ± 3	3.48 ± 0.22	2.14 ± 0.17*
2	WAG норвалин	316 ± 7	302 ± 6	123 ± 3	113 ± 1*	3.47 ± 0.05	2.94 ± 0.15*
3	ISIAN физраствор	374 ± 21	376 ± 19	193 ± 2	196 ± 3	2.94 ± 0.48	3.64 ± 0.46
4	ISIAN норвалин	397 ± 7	374 ± 5	184 ± 3	156 ± 2*	2.82 ± 0.19	4.78 ± 0.42*

Данные приведены в виде  $M \pm m$ , для каждого показателя  $n = 6$ , \* – различия с 1-м днем достоверны при  $p < 0.05$ .

Для количественного анализа образцов использовался градиентный хроматограф Shimadzu 20 (Япония), укомплектованный двумя насосами LC20AD, автоинжектором SIL20A и флуоресцентным детектором RF20AXL. Для разделения компонентов применялись колонки Luna2 (Phenomenex, США) диаметром 2 мм, длиной 100 мм, упакованные 3 мкм сорбентом C18. Отношение аргинин/орнитин во всех случаях определялось как отношение площадей пиков концентрации аминокислот в хроматограммах плазмы, мочи или гомогенатов.

Результаты обработки данных представлены в таблицах как  $M \pm m$ . Достоверность различий показателей определяли при помощи непараметрической статистики с использованием программы Статистика 7, при уровне достоверности  $p < 0.05$  по критериям Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики животных, использованных в эксперименте, приведены в табл. 1.

Как видно, значения массы тела контрольных, получавших физиологический раствор, нормотензивных и гипертензивных животных не различались в первый и седьмой дни эксперимента. В то же время гипер- и нормотензивные животные, получавшие ежедневно в/б инъекцию 30 мг/кг норвалина, за 7 дней опыта потеряли в массе соответственно 23 и 14 г ( $p < 0.05$ ). При этом артериальное давление (АД) крыс ISIAN снизилось существенно (на 15%) после недели в/б введения L-норвалина по сравнению с первым днем измерений (156 против 184 мм рт. ст.,  $p = 0.027$ ). АД нормотензивных крыс WAG, получавших норвалин, также несколько снизилось (в среднем на 10 мм рт. ст. при  $p < 0.05$ ). Отмечено также, что норвалин значительно увеличивал диурез у гипертензивных, но не у нормотензивных крыс.

Таким образом, характеристики животных в данном исследовании принципиально не отличались от опубликованных нами ранее [10]. При этом в настоящей работе в качестве группы сравнения мы использовали крыс инбредной линии WAG вместо аутбредных крыс Вистар, что предпочтительнее при сравнении с также инбредной линией ISIAN.

Эксперименты показали, что угнетение аргиназы при в/б введении 30 мг/кг ингибитора аргиназы L-норвалина не привело к достоверным изменениям концентраций АРГ и его метаболита орнитина в плазме крови крыс обеих линий (табл. 2). В отличие от ожидаемого повышения концентрации АРГ у гипертензивных крыс ISIAN наблюдалась противоположная тенденция, хотя некоторое снижение уровня метаболита АРГ – орнитина могло свидетельствовать в пользу эффективности блокады аргиназы норвалином. Отношение концентраций аргинин/орнитин, которое является суррогатным показателем влияния аргиназы на этот путь катаболизма АРГ, несколько уменьшилось у нормотензивных крыс и возросло у гипертензивных (табл. 2), но эти изменения не были статистически значимыми.

**Таблица 2.** Концентрации аргинина и орнитина в плазме крови и моче крыс

	WAG физраствор	WAG норвалин	ISIAH физраствор	ISIAH норвалин
Плазма				
Аргинин, $\mu\text{mol/mL}$	$68.21 \pm 4.46$	$60.38 \pm 7.64$	$59.65 \pm 18.25$	$36.20 \pm 6.68$
Орнитин, $\mu\text{mol/mL}$	$5.22 \pm 2.1$	$4.19 \pm 0.93$	$5.45 \pm 1.66$	$2.06 \pm 0.69$
(Аргин/Орнит)/mL	$29.95 \pm 9.43$	$16.72 \pm 3.23$	$14.7 \pm 3.8$	$22.25 \pm 3.54$
Моча				
Аргинин, $\mu\text{mol/mL}$	$12.91 \pm 1.89$	$12.96 \pm 0.77$	$8.23 \pm 2.04$	$17.40 \pm 2.25^*$
Орнитин, $\mu\text{mol/mL}$	$0.93 \pm 0.18$	$3.04 \pm 0.77^*$	$1.20 \pm 0.63$	$1.72 \pm 0.32$
Аргинин/сут	$90.34 \pm 8.43$	$114.46 \pm 10.59^*$	$112.51 \pm 24.21$	$310.38 \pm 63.11^{*\#}$
Орнитин/сут	$6.26 \pm 0.74$	$27.39 \pm 6.04^*$	$19.07 \pm 11.99$	$31.37 \pm 7.02$
(Аргин/Орнит)/mL	$14.37 \pm 0.59$	$5.12 \pm 0.90^*$	$11.86 \pm 3.73$	$13.50 \pm 5.58$

\* – различия с группой “физраствор” и # – различия с показателями крыс линии WAG достоверны при  $p < 0.05$ ; данные представлены в виде  $M \pm m$ ; во всех группах  $n = 6$ .

Представляло интерес оценить динамику соотношения аминокислот в моче в день высадки животных в экспериментальные клетки и после 7-ми дней пребывания в них. Величины отношений при оценке влияния дней высадки не приводятся в таблицах этой работы. Они рассчитаны по площади пиков хроматограмм и не учитывают значений суточного диуреза (табл. 2). Оказалось, что у всех исследованных нормотензивных крыс WAG и гипертензивных крыс ISIAH, получавших норвалин, отношение аргинин/орнитин в моче на 7-ой день увеличено по сравнению с днем первым. То есть, эффективность действия аргиназы на этом этапе снизилась.

В отличие от плазмы, содержание L-аргинина и L-орнитина в моче животных изменялось после введения L-норвалина. Так, если концентрация АРГ в моче нормотензивных крыс WAG под влиянием норвалина не изменялась по сравнению с контрольными крысами, получавшими физиологический раствор, то у гипертензивных крыс норвалин приводил к достоверному увеличению концентрации АРГ по сравнению с соответствующим контролем (табл. 2). Весьма ярко влияние торможения аргиназы норвалином проявилось в показателях количества экскретированных за сутки аминокислот с мочой. Эти значения рассчитывались для каждого животного как произведение концентрации вещества в моче на ее суточный объем. Оказалось, что под влиянием норвалина количество экскретированного за 7-е сутки АРГ у крыс ISIAH достоверно и весьма значительно превысило как уровень АРГ в моче крыс ISIAH, получавших физиологический раствор, так и уровни АРГ в моче обеих групп нормотензивных животных. Концентрация орнитина в суточной моче и количество орнитина, экскретированного за сутки, достоверно возросли у крыс линии WAG, а изменения орнитина у гипертензивных крыс также были направлены в сторону увеличения, но не достигли уровня достоверности. Соответственно, отношения количества удаленных из организма аминокислот в сериях с норвалином были достоверно снижены у нормотензивных крыс и не различались у гипертензивных. Следует подчеркнуть, что показатели экскреции аминокислот существенно зависели от уровня диуреза, который при угнетении аргиназы мог значительно изменяться (табл. 1).

Усиление диуреза у гипертензивных крыс, получавших норвалин, может быть результатом повышения под влиянием норвалина уровня АРГ в почке, создающего благоприятные условия для синтеза оксида азота, который, улучшая внутриспечечную гемодинамику, увеличивает диурез. Следствием этого в конечном итоге является снижение АД, регистрируемое у гипертензивных крыс, получавших норвалин.

Торможение катаболизма АРГ норвалином привело у крыс линии ISIAH к почти двукратному достоверному повышению содержания АРГ в ткани почки (табл. 3).

**Таблица 3.** Концентрации аргинина и орнитина в ткани почек исследованных крыс

	1	2	3	4
	WAG физраствор	WAG норвалин	ISIAN физраствор	ISIAN норвалин
Масса пробы (мг)	63.9 ± 9.2	74.3 ± 4.1	74.6 ± 2.4	74.7 ± 3.2
Аргинин, $\mu\text{mol/mL}$	36.17 ± 9.07	28.37 ± 3.94	14.97 ± 2.71 <sup>#</sup>	27.62 ± 3.72*
Орнитин, $\mu\text{mol/mL}$	17.71 ± 1.90	26.86 ± 11.15	12.24 ± 1.95	15.78 ± 3.96
Аргинин, $\mu\text{mol/g}$	661.62 ± 223.79	393.86 ± 62.22	202.60 ± 39.63 <sup>#</sup>	372.12 ± 54*
Орнитин, $\mu\text{mol/g}$	275.89 ± 46.31	358.63 ± 143.82	163.09 ± 25.10 <sup>#</sup>	206.98 ± 49.55
Аргинин/Орнитин	2.18 ± 0.48	1.52 ± 0.34	1.24 ± 0.13	1.67 ± 1.01

Во всех группах  $n = 6$ ; данные представлены в виде  $M \pm m$ ; \* – различия с группой “физраствор” достоверны при  $p < 0.05$ ; # – различия с группой WAG физраствор достоверны при  $p < 0.05$ ;  $\mu\text{mol/mL}$  – концентрация в 1 мл гомогената образца почки;  $\mu\text{mol/g}$  – концентрация аминокислот, приведенная на 1 г массы почки.

Теоретически это должно было бы сопровождаться повышением концентрации АРГ в плазме, но этого не обнаружено. Возможно, отсутствие повышения содержания АРГ в плазме гипертензивных крыс, получивших норвалин, отчасти связано с параллельным увеличением экскреции АРГ и орнитина с мочой.

Что касается показателей исследованных аминокислот в ткани почки, то оказалось, что в отсутствие норвалина средний уровень АРГ в 1 мл гомогената ткани почек у крыс WAG существенно – в 2.3 раза ( $p < 0.05$ ) превышал таковой у крыс ISIAN (табл. 3). Подобное соотношение сохранялось и при пересчете концентрации АРГ на 1 г массы почки (3.3 при  $p < 0.05$ ). При этом средний уровень концентрации орнитина на грамм массы почек в группе WAG превышал уровень в группе контрольных крыс ISIAN в 1.7 раза ( $p < 0.05$ ).

Влияния норвалина на уровни АРГ и/или орнитина в почках нормотензивных крыс WAG не зарегистрировано. Однако торможение аргиназы норвалином привело к существенному увеличению как концентрации АРГ в ткани почек, так и количества АРГ в пересчете на грамм массы почек у гипертензивных крыс ISIAN ( $p < 0.03$ ). При этом отношения аргинин/орнитин для табл. 3 рассчитывались только для хроматограмм гомогенатов почки. Наконец, интерес представляет динамика отношений аргинин/орнитин, отражающая эффективность преобразования субстрата ферментом в орнитин в цикле орнитина. Следует иметь в виду, что при этом не учитывались как интенсивность экскреции обоих компонентов реакции, так и утилизация части орнитина в производстве полиаминов и цитруллина.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируя полученные результаты измерений АРГ, желательнее представить, какой АРГ мы измеряем? “Свободный”, измеряемый в плазме и моче АРГ – это суммарный, синтезированный системой “тонкий кишечник–почка” АРГ, за вычетом АРГ, вступившего в реакции [3, 4]. Наиболее существенное количество АРГ исчезает из процедуры измерения за счет реакций с двумя ферментами: аргиназой (в циклах мочевины и орнитина) и NO-синтазой (при образовании NO и цитруллина), плюс некоторое количество АРГ включается в синтез белков *de novo* и креатина [3, 4].

Следует отметить дисбаланс концентраций АРГ и уровней метаболитов NO, выявленный при сопоставлении результатов двух наших работ. Существенное увеличение концентрации нитритов-нитратов в крови и моче нормотензивных крыс при торможении аргиназы норвалином, обнаруженное в работе [10], мы рассматриваем как отражение возросшего под влиянием норвалина количества АРГ, доступного для конвертации NO-синтазой, но тогда нами не измерявшегося. У крыс линии ISIAN в тех опытах норвалин не изменил продукции нитритов-нитратов, что свидетельствует о

снижении активности системы образования оксида азота у крыс ISIAN, а не о нехватке субстрата – АРГ. Эта снижение проявилась ранее в отсутствии влияния норвалина на уровень метаболитов NO в крови и моче этих крыс [10], хотя уровень АРГ – субстрата NOS, измеренный в моче и почке гипертензивных крыс, получавших норвалин, в настоящей работе оказался существенно повышенным. Поэтому представляется весьма вероятным, что обнаруженный в данной работе отчетливый рост концентрации АРГ при действии норвалина в моче крыс с гипертонией демонстрирует неостребованность АРГ мало активной системой производства оксида азота.

Основания для предположений о сниженной активности системы оксида азота у крыс гипертоников имеются. Так, прямые измерения [11] выявили значительно более низкую концентрацию NO-синтазы в почках крыс ISIAN по сравнению с нормотензивными крысами. Измерения оксида азота методом электронного парамагнитного резонанса показали двойное превышение NO в сыворотке крови нормотензивных крыс по сравнению с его уровнем у крыс ISIAN [12].

Тот факт, что норвалин практически не влиял на концентрации АРГ у нормотензивных крыс WAG, не позволяет сегодня проводить прямых сопоставлений с исследованными ранее крысами Вистар без специальных измерений нитритов-нитратов. Отметим только, что крысы нормотензивной линии WAG в отдельные моменты жизни демонстрировали краткосрочный рост АД, что роднит их с крысами ISIAN, в частности, в отношении недостаточной активности NOS [12].

В работе Prins и соавт. [13] было исследовано влияние экзогенной аргиназы. Авторы выявили снижение уровня АРГ в плазме крови системного русла на фоне повышения в этих условиях продукции АРГ почками. Был сделан вывод о том, что снижение уровня АРГ в системе является причиной для роста синтеза аминокислоты почкой. Таким образом, была установлена связь производства АРГ почкой с уровнем аминокислоты в крови. В наших экспериментах при частичном угнетении аргиназы норвалином не зарегистрировано изменений уровней АРГ в плазме крови исследованных крыс, хотя выявлен достоверный рост концентрации АРГ в моче и в почках гипертензивных крыс. Надо отметить, что такой эффект норвалина регистрируется не в первый, а лишь на седьмой день введения, когда его эффекты накапливаются. Что касается снижения массы тела, то в качестве одной из причин можно привести данные о липолитической активности L-норвалина, полученные в условиях выделенных препаратов печени [14].

Возникает вопрос: почему увеличение уровня АРГ в почках при введении норвалина не отразилось на АРГ плазмы у крыс с артериальной гипертонией? Иначе говоря, какова возможная причина локальности действия норвалина? Локальность эффектов угнетения аргиназы норвалином, вероятнее всего, связана с тем, что сосудистая система почки обладает гораздо более высокой чувствительностью и реактивностью, чем системные сосуды, по отношению к нарушению синтеза NO [15]. В связи с этим, при некоторых воздействиях эффекты проявляются только на уровне почки и мочи, но не способны обнаруживаться в общем русле крови. Представляется, что именно такая ситуация имеет место в случае гипертензивных крыс, у которых снижение АД происходит за счет диуреза.

Итак, в наших исследованиях отмечено недостоверное снижение концентрации аргинина в ткани почек нормотензивных крыс и значимый рост в почках крыс с гипертонией. А между тем, в предыдущей работе, где аргинин не измерялся, при таком же протоколе исследований, в крови и моче нормотензивных крыс при введении норвалина зарегистрировано существенное увеличение концентрации метаболитов оксида азота, нитритов-нитратов и отсутствие изменений этих метаболитов у гипертензивных крыс [10]. Полученный материал свидетельствует, что эффекты угнетения аргиназы в значительной мере определяются исходным уровнем АД и состоянием систем регуляции почечной циркуляции, которая изменена у крыс ISIAN [16].

Таким образом, есть основания считать, что в то время как у нормотензивных животных оксид азота играет существенную роль в поддержании нормального уровня АД, у гипертензивных крыс линии ISIAN оксид азота не играет ведущей роли в контроле уровня АД. Эта роль у крыс ISIAN, вероятно принадлежит в основном механизмам регуляции диуреза.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № АААА-А21-121011990039-2) при частичной поддержке РФФИ (проект № 017-04-00916).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

М.А.Г. и А.Л.М. обосновали и спланировали исследование. М.А.Г. и Ю.К.П. провели эксперименты. М.А.Г., Ю.К.П. и А.Л.М. обсудили результаты работы и написали раздел результатов, а М.А.Г. и А.Л.М. написали раздел обсуждения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Michell DL, Andrews KL, Chin-Dusting JP* (2011) Endothelial dysfunction in hypertension: the role of arginase. *Front Biosci (Schol Ed)* 1(3): 946–960. <https://doi.org/10.2741/199>
2. *Pastor CM, Morris SM Jr, Billiar TR* (1995) Sources of arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver. *Am J Physiol* 269: G861–G866. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.6.G861>
3. *Wu G, Morris SM Jr* (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336: 1–17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>
4. *Wu G, Morris SM Jr* (2004). Arginine metabolism in mammals. In: *Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition* Second Edition *Cynober LC* (ed) Ch 10 CRC Press 153–167.
5. *Якушев ВИ, Покровский МВ, Корокин МВ, Покровская ТГ, Куликовская ВА, Еришов ИН, Бесхмельницкая ЕА, Арустамова АА, Котельникова ЛВ* (2012) Аргиназа — новая мишень для фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции. *Научные ведомости БелГУ Сер Медицина Фармация* 22 (141) Вып 22/3 36–41. [*Yakushev VI, Pokrovskiy MV, Korokin MV, Pokrovskaya TG, Kulikovskaya VA, Ershov I.N, Bezkhmel'nitsyna EA, Arustamova AA, Kotelnikova LV* (2012) Arginase — a new target for pharmacological correction of endothelial dysfunction. *Scient Rep BelSU Ser Med Pharmacy* 22 (141) Issue 22/3 36–41. (In Russ)].
6. *Mahdi A, Kövamees O, Pernow J* (2020) Improvement in endothelial function in cardiovascular disease — Is arginase the target? *Int J Cardiol* 15: 301: 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.11.004>
7. *Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racké K* (1997) Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N-omega-hydroxy-D,L-inospicine effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 121: 395–400. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701143>
8. *Griffith OW, Stuehr DJ* (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57: 707–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003423>
9. *Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racké K* (1995) Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 359: 251–254. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00039-c](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00039-c)
10. *Gilinsky MA, Polityko YK, Markel AL, Latysheva TV, Samson AO, Polis B, Naumenko SE* (2020) Norvaline Reduces Blood Pressure and Induces Diuresis in Rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension. *Biomed Res Int* 2020 ID 4935386. <https://doi.org/10.1155/2020/4935386>
11. *Amstislavsky S, Welker P, Fruhauf JH, Maslova L, Ivanova L, Jensen B, Markel AL, Bachmann S* (2005) Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Histo-*



- chem Cell Biol 8: 1–9.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-005-0118-5>
12. Bobko AA, Sergeeva SV, Bagryanskaya EG, Markel AL, Khramtsov VV, Reznikov VA, Kolosova NG (2005) <sup>19</sup>F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and OXYS rats. *Biochem Biophys Res Commun* 330(2): 367–370.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.166>
  13. Prins HA, Houdijk APJ, Wiezer MJ, Teerlink T, van Lambalgen AAA, Thijs LG, Van Leeuwen PAM (1999) Reduced arginine plasma levels are the drive for arginine production by the kidney in the rat. *SHOCK* 11:199–204.  
<https://doi.org/10.1097/00024382-199903000-00008>
  14. Lang U, Karlaganis G, Seelig S, Sayers G, Schwyzer R (1973) Hormone: receptor interactions. Biological activities of (phenylalanine, norvaline)-adrenocorticotropin-(1-24)-tetracosipeptide and its 4,5-dehydro-4,5-ditritio-norvaline analogue in isolated rat lipocytes and adrenal cortex cells: lipolysis, corticosterone and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate production. *Helv Chim Acta* 56: 1069–1072.  
<https://doi.org/10.1002/hlca.19730560326>
  15. Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García-Estañ J, Ruilope LM (1997) Nitric oxide: the kidney and hypertension. *Am J Hypertens* 10(1): 129–140.  
[https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(96\)00346-9](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(96)00346-9)
  16. Seryapina AA, Shevelev OB, Moshkin MP, Markel AL, Akulov AE (2017) Stress-sensitive arterial hypertension. haemodynamic changes and brain metabolites in hypertensive ISIAH rats: MRI investigation. *Exp Physiol* 102: 523–532.  
<https://doi.org/10.1113/EP086064>

### Arginine Metabolism in the Hypertensive Rats under Arginase Inhibition by Norvaline

M. A. Gilisky<sup>a, \*</sup>, Yu. K. Polityko<sup>a, b</sup>, and A. L. Markel<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>b</sup>Federal Scientific Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

\*e-mail: m.a.gilinsky@physiol.ru

The hypotensive effect of arginase inhibition in the experiment [1] can be realized in two ways: by relaxation of blood vessels by an increase in the concentration of nitric oxide (NO) and/or a decrease in the amount of circulating fluid. The first effect occurs with an increase in the availability of the substrate of NO synthase (NOS) – arginine (ARG). The second – with an increase in diuresis. To clarify the ways in which arginase affects the regulation of blood pressure (BP) we have analyzed the metabolic characteristics of the amino acid L-arginine in hyper- and normotonic rats during inhibition of arginase activity by the administration of its inhibitor L-norvaline. The concentration of arginine and its metabolite ornithine in blood, urine, and in the homogenate of kidney tissue was measured using high-performance liquid chromatography with the separation on a reversed-phase sorbent and with a fluorescence detection. Norvaline was injected intraperitoneally (ip) once a day at a dose of 30 mg/kg for 7 days. In experiments under the influence of norvaline, no significant increase in the concentration of amino acids in the blood plasma was found either in hypertensive rats (ISIAH strain) or in normotensive control (WAG strain). The concentration of arginine in the urine of ISIAH animals treated with norvaline was found doubled, while in WAG rats it did not change. The daily excretion of arginine under norvaline increased in normotonics only slightly, and in hypertensive rats it increased almost threefold. At the same time, norvaline increased diuresis only in hypertensive animals. Under the influence of norvaline, the content of arginine per 1 g of kidney weight increased almost twofold in hypertensive rats, while in normotensive rats it did not change. The studies performed allow us to conclude, that inhibition of arginase by norvaline had a stronger hypotensive effect in hypertensive rats than in normotensive rats. At the same time, the hypotensive effect of norvaline in normotonic rats can be provided by the nitric oxide system, whereas in hypertensive rats this function is taken over by diuresis.

*Keywords:* arginase, L-norvaline, L-arginine, L-ornitine, blood pressure regulation