

АРГІНАЗНА АКТИВНІСТЬ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ РІЗНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ХАРЧОВОГО РАЦІОНУ ПРОТЕЇНОМ ТА САХАРОЗОЮ

Г. П. КОПИЛЬЧУК*, І. М. НИКОЛАЙЧУК, Ю. Ю. КИРИЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
*e-mail: g.kopilchuk@chnu.edu.ua

У роботі представлені дослідження активності аргінази, а також вмісту L-аргініну та сечовини в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов різного забезпечення харчового раціону протеїном та сахарозою. Впродовж експерименту дослідні тварини споживали напівсинтетичний раціон AIN-93 відповідно до рекомендації Американського інституту нутрієнтології з урахуванням кількості харчового протеїну та сахарози в перерахунку на кілограм дієти. З метою моделювання аліментарної депривації протеїну тварини протягом 28 днів щоденно отримували низькопротеїновий раціон, що містив 1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну. Дієту з високим вмістом сахарози моделювали шляхом збільшення кількості вуглеводу в 4 рази. Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування. Активність аргінази в цитозольній фракції клітин печінки визначали за кількістю сечовини. Вміст L-аргініну оцінювали шляхом утворення забарвленого продукту в реакційній суміші з α -нафтолом та гіпобромідним реактивом після осадження протеїнів. Вміст сечовини діагностували уреазним методом відповідно до інструкції виробника. Встановлено, що зниження вмісту аргініну в цитозольній фракції клітин печінки щурів приблизно в 3 рази порівняно з контролем спостерігається лише в групах тварин, які отримували недостатню кількість харчового протеїну. При цьому у цитозолі клітин печінки щурів усіх дослідних груп спостерігається зниження активності аргінази порівняно зі значеннями контролю. Водночас за умов споживання високосахарозного раціону при нормальному надходженні протеїну зниження аргіназної активності на тлі стабільного клітинного рівня аргініну в цитозольній фракції печінки щурів можна розглядати як адаптаційний механізм підтримання тканинного пулу L-аргініну. Отже, дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні призводить до порушення завершальної ланки орнітинового циклу, що супроводжується зниженням аргіназної активності та зменшенням кількості сечовини. Встановлені нами зміни вказують на порушення сечовиноутворювальної функції печінки.

Ключові слова: аргінін, аргіназа, цикл сечовини, печінка, аліментарна нестача протеїну, високосахарозний раціон

Вступ. Упродовж останніх років особливих змін зазнає якісний та кількісний склад харчового раціону, що характеризується тенденцією до посиленого споживання легкодоступних вуглеводів (рафінований цукор, цукрозамінники, солодощі, здобні вироби, енерготоніки тощо) за умов значного дефіциту протеїнів (Moore et al., 2016; Schwimmer et al., 2019).

Нестача харчового протеїну, як правило, супроводжується розвитком ендегенної протеїно-енергетичної недостатності та призводить до виснаження внутрішньоклітинного пулу амінокислот (Korylchuk et al., 2020).

В останні роки наводяться численні факти про причетність порушень метаболізму аргініну до розвитку низки захворювань (Rodríguez-Gómez et al., 2016; Szeffel et al., 2019). В організмі людини ендегенний синтез L-аргініну відбувається під час проходження орнітинового циклу в печінці, а також у нирках із цитруліну, який синтезується в слизовій оболонці тонкого кишечника як кінцевий продукт глутамінового/глутаматного метаболізму (Brosnan et al., 2004; Zhang et al., 2020).

На відміну від більшості амінокислот, аргінін необхідний не лише для біосинтезу протеїнів, а й для утворення низки регуляторних і сигнальних молекул (Gawrys et al., 2020).

Рівень аргініну знаходиться під контролем ензиму аргінази (КФ 3.5.3.1), максимальна активність якого спостерігається в печінці. Дослідження останніх років показали, що існують дві ізоформи цього ензиму, які відрізняються за внутрішньоклітинною локалізацією та метаболізмом (Caldwell et al., 2015). Хоча обидва ензими відповідають за утворення сечовини, аргіназа I – цитозольний ензим – функціонує в циклі сечовини та залучена до утворення орнітину, а згодом і поліамінів, тоді як мітохондріальна аргіназа II регулює клітинну концентрацію L-аргініну/орнітину і, окрім того, інгібує активність NO-синтази (NOS), безпосередньо регулюючи синтез оксиду азоту (NO) (Kepka-Lenhart et al., 2008; Grobбен et al., 2020).

Дослідження активності аргінази та вмісту аргініну в клітинах за умов нутритивного дисбалансу на сьогодні є досить обмеженими.

З огляду на вищесказане мета роботи – дослідити аргіназну активність та вміст *L*-аргініну в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов різного забезпечення харчового раціону протеїном та сахарозою.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 120-150 г та віком 2,5-3 місяці. Усі маніпуляції проводили відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, регламентованих положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р., зі змінами, 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Дослідні щури впродовж експерименту споживали напівсинтетичний раціон AIN-93 відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології з урахуванням кількості харчового протеїну та сахарози в перерахунку на кілограм дієти (Reeves et al., 1993).

З метою моделювання аліментарної депривації протеїну тварини протягом 28 днів щоденно отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон, що містив 1/3 загальноприйнятої норми добової потреби білка (Korylchuk et al., 2020).

Дієту з високим вмістом сахарози моделювали відповідно до рекомендацій (Fernandes-Lima, 2015).

Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу *pair-feeding* (Lind T. et al., 2018).

Дослідні тварини були поділені на групи:

- 1 – щури, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К);
- 2 – щури, які протягом 4 тижнів отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР);
- 3 – щури, які впродовж експерименту споживали високосахарозний раціон (ВС);
- 4 – щури, які наприкінці харчового протеїну споживали надлишок сахарози (НПР/ВС).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 29 добу експерименту відповідно до діючих рекомендацій та етичних стандартів у стані наркозу (Закон України № 3447-1 від 21.02.2006р. «Про захист тварин від жорстокого поводження»).

Для отримання цитозольної фракції гомогенізацію тканин печінки проводили в 0,25 М розчині сахарози. Ядра та фракцію мітохондрій одночасно осаджували центрифугуванням при 12 000 g протягом 15 хв. До отриманого супернатанту додавали іони Ca^{2+} і Mg^{2+} (до 9 об'ємів надосадової рідини – 1 об'єм 80 мМ розчину $CaCl_2$ та 1 об'єм 160 мМ розчину $MgCl_2$ у 10 мМ трис-НCl буфері, рН 7,4). Отримані дослідні зразки перемішували на магнітній мішалці впродовж 10 хв при 4 °С з подальшим центрифугуванням при 10 000 g протягом 10 хв. Отриманий осад – мікосомна фракція (Korylchuk et al., 2020), що утворюється як агрегатна суспензія при додаванні до реакційного середовища іонів двовалентних металів (Ca^{2+} , Mg^{2+}), враховуючи те, що вони нейтралізують негативний заряд мікосом. Надосадову рідину, що залишалася після отримання мікосомної фракції, відбирали та використовували у подальших дослідженнях як цитозольну (постмікосомну) фракцію.

Активність аргінази в цитозольній фракції визначали за кількістю сечовини (Перетятко та ін., 2009). Реакційна суміш містила: 2 М трис-НCl, рН 7,5, 0,2 М $MnCl_2$, 10 М NaOH, 1 М розчин аргініну та 100 мкг протеїну. Проби інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Реакцію зупиняли внесенням до розчину 100 мкл 50 % ТХО, після чого визначали загальний вміст сечовини за допомогою діагностичного набору фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна) відповідно до інструкції виробника. Активність аргінази виражали в мікромолях утвореної сечовини за 1 хв на 1 мг загального протеїну в пробі.

Вміст *L*-аргініну в цитозольній фракції досліджували методом (Перетятко та ін., 2009) після осадження протеїнів 20 % розчином ТХО. Одержаний супернатант інкубували протягом 20 хв при 37 °С в реакційній суміші наступного складу: 20 % NaOH, 0,02 % α -нафтол, 10 % сечовина, гіпобромідний реактив (Br_2 та 5 % NaOH, співвідношення 1:100). Екстинкцію дослідних зразків вимірювали при довжині хвилі 500 нм на спектрофотометрі CARY 60 (США). Концентрацію *L*-аргініну виражали у мкмоль/мг протеїну.

Вміст сечовини оцінювали уреазним методом при використанні набору реактивів «Філісіт-діагностика» (Україна) відповідно до інструкції виробника. Принцип методу ґрунтується на тому, що сечовина піддається уреазному гідролізу з утворенням вуглекислого газу та аміаку. Останній у реакційній суміші з гіпохлоритною та саліциловою кислотами утворює продукти зеленого забарвлення.

Статистичний аналіз отриманих результатів досліджень здійснювали з використанням прикладних програм статистичного аналізу *Microsoft Excel 2010* та *STATISTICA 6.0*. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний t-критерій критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що зниження вмісту аргініну в цитозольній фракції клітин печінки щурів приблизно в 3 рази порівняно з контролем спостерігається лише в групах тварин, які отримували недостатню кількість харчового протеїну (рис. 1).

Так, зменшення концентрації *L*-аргініну в цитозольній фракції печінки щурів за даних експериментальних умов можна пояснити порізному. По-перше, зменшення надходження харчового протеїну призводить до змін в складі пулу вільних амінокислот (Roth et al., 2011); по-друге, за умов аліментарної депривації протеїну порушується синтез даної амінокислоти, що пов'язано зі змінами активностей ферментів циклу сечовини. У попередніх роботах (Korylchuk et al., 2020) наукової групи зазначається, що в протеїнодефіцитних щурів порушення циклу сечовини відбувається ще за умов конденсації клітинного аміаку в карбамойлфосфатсинтезній реакції, згодом відмічено зниження активностей ферментів синтезу ключових метаболітів

орнітинового циклу – орнітину, цитруліну та аргініну (Korylchuk et al., 2020).

По-третє, дана протеїногенна амінокислота може посилено використовуватися в реакції синтезу інших метаболітів. Наприклад, *L*-аргінін, гліцин та метіонін конденсуються у нирках з утворенням креатину (Morris, 2016; Joncquel-Chevalier Curt M. et al., 2015), який є субстратом креатинкіназної ферментативної системи для утворення креатинфосфату. Тому можна припустити, що при недостатній кількості протеїну інтенсифікуються системи відновлення клітинного рівня креатину з посиленням використанням *L*-аргініну.

Окрім того, вказана амінокислота є безпосереднім субстратом синтази оксиду азоту, яка каталізує реакцію утворення цитруліну та NO. Причому вільний цитрулін може знову захоплюватися нирками та використовуватися для синтезу аргініну (Gawrys et al., 2020).

Водночас за умов споживання надмірного вмісту сахарози достовірних відмінностей між показниками *L*-аргініну в дослідній та контрольній групах щурів не виявлено (рис.1). У літературі (Мхітарян та ін., 2016) зазначено, що цитрулін вважається регулятором синтезу аргініну. Існує цикл аргінін – цитрулін – аргінін, що дозволяє захищати зазначену амінокислоту, яка надходить в раціон, від надмірної деградації в печінці.

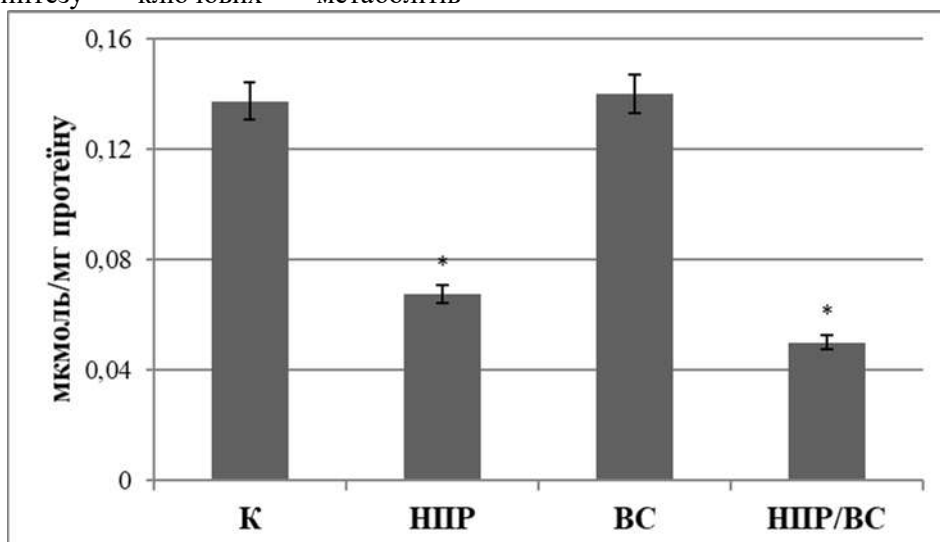


Рис. 1. Вміст *L*-аргініну в цитозольній фракції печінки щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Примітка: К – щури, які споживали повноцінний раціон; НПР – щури, які перебували на низькопротеїновій дієті; ВС – щури, які отримували високосахарозний раціон; НПР/ВС – тварини, які на тлі аліментарної нестачі протеїну споживали надлишок сахарози; * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Note (hereinafter): C – animals that received a full semi-synthetic diet; LPD – animals that consumed a low-protein diet; HSD – animals that consumed a high-sucrose diet; LPD/HSD – animals that consumed excess sucrose on the background of protein alimentary deficiency; * – statistically significant difference compared with the control, $P \leq 0.05$.

Як відомо, в печінці синтезується достатня кількість *L*-аргініну, який використовується в циклі сечовини, і таким чином, практично не впливає на позаклітинну концентрацію амінокислоти. Внутрішньоклітинний вміст *L*-аргініну значно вищий за концентрацію його у плазмі крові та позаклітинній рідині. Це пов'язане з тим, що гепатоцити проявляють низьку активність захоплення амінокислот, зокрема аргініну (Premakumar et al., 2019). Однак, невдовзі дослідниками встановлено, що частина позаклітинного *L*-аргініну може швидко захоплюватися клітинами печінки для активного синтезу NO.

В експериментальних дослідженнях різних науковців (Pudlo et al., 2017; Gawrys et al., 2020) зазначено, що недостатня активність аргінази призводить до підвищення активності NO-синтази. Остання, в свою чергу, виснажує запас вільного *L*-аргініну, оскільки дана амінокислота є спільним субстратом для обох ензимів. Відомо, що в результаті активності NO-синтази відбувається перетворення *L*-аргініну до *L*-цитруліну та NO. Однак при цьому утворюється проміжний продукт *N*-гідрокси-*L*-аргінін, який вважається мікромолярним інгібітором аргінази.

Враховуючи те, що вміст аргініну знижується лише за умов недостатності протеїну в харчовому раціоні, логічним етапом нашої подальшої роботи було дослідження активності аргінази – одного із ключових ензимів циклу сечовини, який забезпечує неокислювальні перетворення даної амінокислоти.

Нами встановлено, що в цитозолі клітин печінки щурів усіх дослідних груп спостерігається зниження активності аргінази порівняно зі значеннями контролю (рис. 2).

Проте, цікавим для обговорення залишається той факт, чому за умов стабільного клітинного рівня аргініну в цитозольній фракції печінки щурів, які споживали надмірну кількість сахарози (рис. 1), активність аргінази порівняно з контролем знижується? Необхідно врахувати, що концентрація аргініну в печінці тварин підтримується не лише за рахунок циклу Кребса-Гензеляйта, надходження екзогенного протеїну (оскільки даний раціон повноцінно збагачений за кількістю протеїну), а й внаслідок захопленням гепатоцитами аргініну із кровоплину, куди він потрапляє із нирок.

Після досягнення системної циркуляції близько 83 % цитруліну посилено захоплюється та метаболізується нирками до аргініну через частковий цикл сечовини за дії аргініносукцинатсинтетази та аргініносукцинатліази (але не інших ензимів орнітинового циклу). Таким чином кількості цитруліну, перетвореного нирками, достатньо для підтримання фізіологічного пулу аргініну в організмі (Мхітарян та ін., 2016).

Водночас за умов нестачі протеїну в харчовому раціоні незалежно від кількості сахарози в цитозольній фракції печінки щурів зменшення вмісту аргініну (рис. 1) однозначно супроводжується зниженням активності аргінази, що, в свою чергу, відображається на кількості утворених продуктів реакції – орнітину та сечовини.

Нами встановлено зниження вмісту сечовини в печінці щурів усіх дослідних груп порівняно зі значеннями контролю (рис. 3). Проте, необхідно відзначити, що ключовим чинником зниження даного показника слід вважати саме дефіцит протеїну.

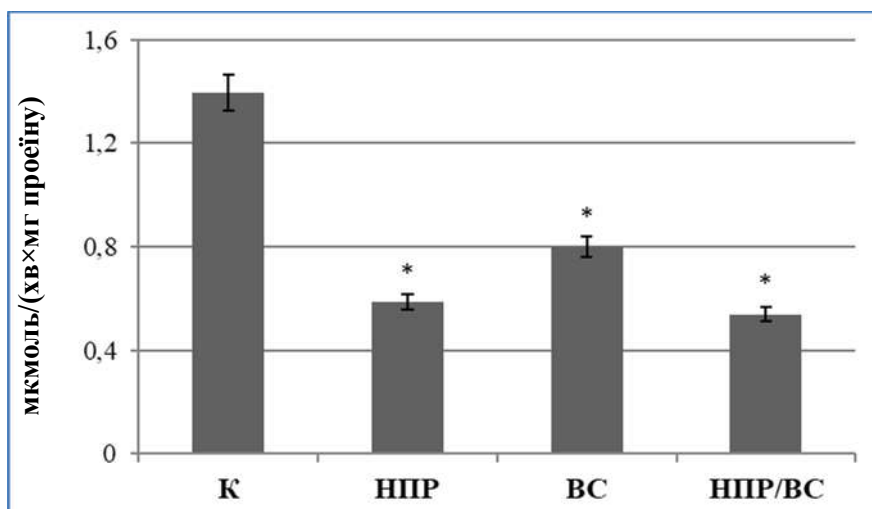


Рис. 2. Аргіназна активність в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 2. Arginase activity in hepatic cytosolic fraction of rats under the conditions of different nutrients provisions

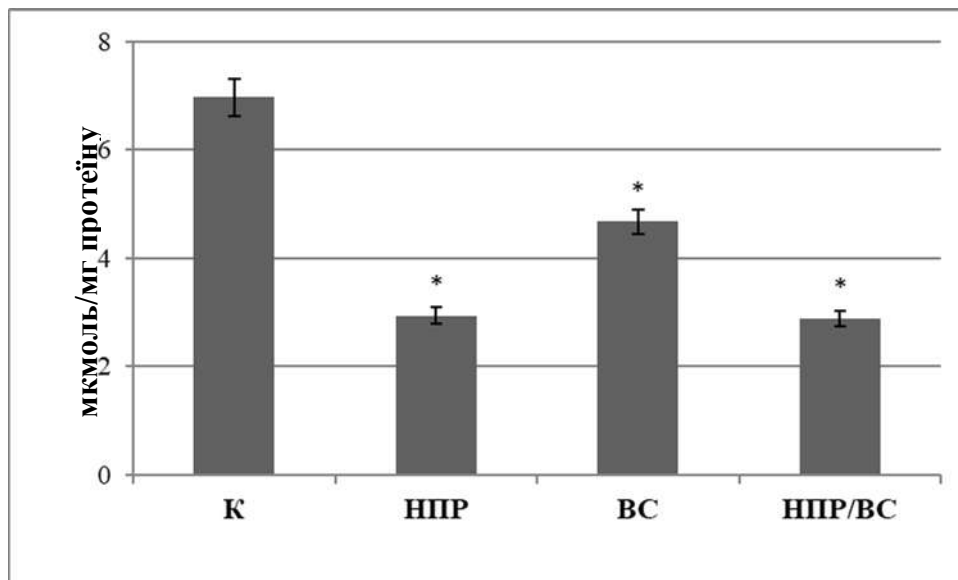


Рис. 3. Концентрація сечовини в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 3. The concentration of urea in the hepatic cytosolic fraction of rats under the conditions of different nutrients supply

Також з'ясовано, що при споживанні раціону з високим рівнем вуглеводів спостерігається зменшення вмісту сечовини майже у 1,5 рази порівняно з контролем, оскільки відбувається зниження активності аргінази, не зважаючи на доступність L-аргініну.

Водночас у групі тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон спостерігається зниження вмісту сечовини порівняно з контролем майже у 2 рази, оскільки кількість утвореної сечовини знаходиться в прямій залежності від рівня спожитого протеїну.

Висновки. Отже, дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні призводить до порушення завершальної ланки орнітинового циклу, що супроводжується зниженням аргіназної активності та зменшенням кількості сечовини. Встановлені нами зміни вказують на порушення сечовиноутворювальної функції печінки.

Водночас за умов споживання високосахарозного раціону при нормальному надходженні протеїну зниження аргіназної активності на тлі стабільного клітинного рівня аргініну в цитозольній фракції печінки щурів можна розглядати як адаптаційний механізм підтримання тканинного пулу L-аргініну.

Фінансування. Дана робота виконана у рамках науково-дослідної держбюджетної теми «Біохімічні та лазерно-поляриметричні параметри комплексного прогнозування метаболічних порушень» (№ державної реєстрації 0119U100717).

Список літератури:

1. Мхітарян Л.С., Кучменко О.Б., Євстратова І.Н., Ліпкан Н.Г., Василичук Н.М., Дроботько Т.Ф. Цитрулін як маркер функціонального стану

органів за умов патологічних станів. *Український кардіологічний журнал.* 2016; 3: 109-115.

2. Перетятко Ю.В., Сибірна Н.О. Особливості аргіназного та по-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення. *Укр. біохім. журн.* 2009; 81(2): 40-48.
3. Brosnan M.E., Brosnan J.T. Renal arginine metabolism. *J Nutr.* 2004;134(10 Suppl):2791S-2795S. doi: 10.1093/jn/134.10.2791S.
4. Caldwell R.B., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.W. Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(6):395-405. doi: 10.1016/j.tips.2015.03.006.
5. Fernandes-Lima F., Monte T. L., Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs.* 2015 -2016; 201(6):464-472. doi: 10.1159/000446514.
6. Gawrys J., Gajecki D., Szahidewicz-Krupska E., Doroszko A. Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:1015908. doi: 10.1155/2020/1015908.
7. Grobber Y., Willemsen-Seegers N., Uitdehaag J., de Man J., van Groningen J., Friesen J., van den Hurk H., Buijsman R., Zaman G. High-Throughput Fluorescence-Based Activity Assay for Arginase-1. *SLAS Discov.* 2020; 25(9):1018-1025. doi: 10.1177/2472555220919340.
8. Joncquel-Chevalier Curt M., Voicu P.M., Fontaine M., Dessein A.F., Porchet N., Mention-Mulliez K., Dobbelaere D., Soto-Ares G., Cheillan D., Vamecq J. Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie.* 2015 Dec;119:146-65. doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.022.
9. Kepka-Lenhart D., Ash D.E., Morris S.M. Determination of mammalian arginase activity.

- Methods Enzymol.* 2008; 440:221-30. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00813-0.
10. Kopylchuk G.P., Ivanovich I.Y., Voloshchuk O.M. Peculiarities of ammonia metabolism in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(4): P. 71-77. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.070>
 11. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Lylyk I.S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.01.113>.
 12. Lind T., Lind P.M., Hu L., Melhus H. Studies of indirect and direct effects of hypervitaminosis A on rat bone by comparing free access to food and pair-feeding. *Ups J Med Sci.* 2018; 123(2):82-85. doi: 10.1080/03009734.2018.1448020.
 13. Moore J.B., Fielding B.A. Sugar and metabolic health: is there still a debate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19(4):303-9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000289.
 14. Morris S. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr.* 2016; 146(12):2579S-2586S. doi: 10.3945/jn.115.226621.
 15. Premakumar C.M., Turner M.A., Morgan C. Relationship between arginine intake in parenteral nutrition and preterm neonatal population plasma arginine concentrations: a systematic review. *Nutr Rev.* 2019; 77(12):878-889. doi: 10.1093/nutrit/nuz049.
 16. Pudlo M., Demougeot C., Girard-Thernier C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century. *Med Res Rev.* 2017; 37(3):475-513. doi: 10.1002/med.21419.
 17. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939–1951.
 18. Rodríguez-Gómez I., Moliz J.N., Quesada A., Montoro-Molina S., Vargas-Tendero P., Osuna A., Wangenstein R., Vargas F. L-Arginine metabolism in cardiovascular and renal tissue from hyper- and hypothyroid rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016; 241(5):550-6. doi: 10.1177/1535370215619042.
 19. Roth E., Druml W. Plasma amino acid imbalance: dangerous in chronic diseases? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):67-74. doi: 10.1097/MCO.0b013e328341368c.
 20. Schwimmer J.B., Ugalde-Nicalo P., Welsh J.A., Angeles J.E., Cordero M., Harlow K.E., Alazraki A., Durelle J., Knight-Scott J., Newton K.P., Cleeton R., Knott C., Konomi J., Middleton M.S., Travers C., Sirlin C.B., Hernandez A., Sekkarie A., McCracken C., Vos M.B. Effect of a Low Free Sugar Diet vs Usual Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adolescent Boys: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019; 321(3):256-265. doi: 10.1001/jama.2018.20579.
 21. Szeffel J., Danielak A., Kruszewski W.J. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci.* 2019; 64(1):104-110. doi: 10.1016/j.advms.2018.08.018.
 22. Zhang H., Zhang Z.H., Zhang C.S., Wang Z.C. Effects of L-Arginine and alpha(1)-Adrenergic Receptor on the Regulation of Renal Functions. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2020; 42(6):815-819. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.11482.

References:

1. Mkhitarian L.S., Kuchmenko O.B., Ievstratova I.N., Lipkan N.G., Vasylynychuk N.M., Drobotko T.F. Citrulline as a marker of the functional state of organs under pathological conditions. *Ukrainskyi kardiologichnyi zhurnal.* 2016; 3: 109-115. (In Ukrainian).
2. Peretiatio Y.V., Sybirna N.O. Particularities of arginase and NO-synthase pathways of L-arginine conversion in the leucocytes of peripheral blood under the X-ray radiation. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2009; 81(2): 40-48. (In Ukrainian).
3. Brosnan M.E., Brosnan J.T. Renal arginine metabolism. *J Nutr.* 2004;134(10 Suppl):2791S-2795S. doi: 10.1093/jn/134.10.2791S.
4. Caldwell R.B., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.W. Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(6):395-405. doi: 10.1016/j.tips.2015.03.006.
5. Fernandes-Lima F., Monte T. L., Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs.* Cells Tissues Organs. 2015 -2016; 201(6):464-472. doi: 10.1159/000446514.
6. Gawrys J., Gajecki D., Szahidewicz-Krupska E., Doroszko A. Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:1015908. doi: 10.1155/2020/1015908.
7. Grobden Y., Willemsen-Seegers N., Uitdehaag J., de Man J., van Groningen J., Friesen J., van den Hurk H., Buijsman R., Zaman G. High-Throughput Fluorescence-Based Activity Assay for Arginase-1. *SLAS Discov.* 2020; 25(9):1018-1025. doi: 10.1177/2472555220919340.
8. Joncquel-Chevalier Curt M., Voicu P.M., Fontaine M., Dessein A.F., Porchet N., Mention-Mulliez K., Dobbelaere D., Soto-Ares G., Cheillan D., Vamecq J. Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie.* 2015 Dec;119:146-65. doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.022.
9. Kepka-Lenhart D., Ash D.E., Morris S.M. Determination of mammalian arginase activity. *Methods Enzymol.* 2008; 440:221-30. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00813-0.
10. Kopylchuk G.P., Ivanovich I.Y., Voloshchuk O.M. Peculiarities of ammonia metabolism in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(4): P. 71-77. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.070>
11. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Lylyk I.S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.01.113>.

12. Lind T., Lind P.M., Hu L., Melhus H. Studies of indirect and direct effects of hypervitaminosis A on rat bone by comparing free access to food and pair-feeding. *Ups J Med Sci.* 2018; 123(2):82-85. doi: 10.1080/03009734.2018.1448020.
13. Moore J.B., Fielding B.A. Sugar and metabolic health: is there still a debate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19(4):303-9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000289.
14. Morris S. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr.* 2016; 146(12):2579S-2586S. doi: 10.3945/jn.115.226621.
15. Premakumar C.M., Turner M.A., Morgan C. Relationship between arginine intake in parenteral nutrition and preterm neonatal population plasma arginine concentrations: a systematic review. *Nutr Rev.* 2019; 77(12):878-889. doi: 10.1093/nutrit/nuz049.
16. Pudlo M., Demougeot C., Girard-Thernier C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century. *Med Res Rev.* 2017; 37(3):475-513. doi: 10.1002/med.21419.
17. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939–1951.
18. Rodríguez-Gómez I., Moliz J.N., Quesada A., Montoro-Molina S., Vargas-Tendero P., Osuna A., Wangenstein R., Vargas F. L-Arginine metabolism in cardiovascular and renal tissue from hyper- and hypothyroid rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016; 241(5):550-6. doi: 10.1177/1535370215619042.
19. Roth E., Druml W. Plasma amino acid imbalance: dangerous in chronic diseases? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):67-74. doi: 10.1097/MCO.0b013e328341368c.
20. Schwimmer J.B., Ugalde-Nicalo P., Welsh J.A., Angeles J.E., Cordero M., Harlow K.E., Alazraki A., Durelle J., Knight-Scott J., Newton K.P., Cleeton R., Knott C., Konomi J., Middleton M.S., Travers C., Sirlin C.B., Hernandez A., Sekkarie A., McCracken C., Vos M.B. Effect of a Low Free Sugar Diet vs Usual Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adolescent Boys: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019; 321(3):256-265. doi: 10.1001/jama.2018.20579.
21. Szeffel J., Danielak A., Kruszewski W.J. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci.* 2019; 64(1):104-110. doi: 10.1016/j.advms.2018.08.018.
22. Zhang H., Zhang Z.H., Zhang C.S., Wang Z.C. Effects of L-Arginine and alpha(1)-Adrenergic Receptor on the Regulation of Renal Functions. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2020; 42(6):815-819. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.11482.

ARGINASE ACTIVITY IN RATS' LIVER UNDER THE CONDITIONS OF DIFFERENT PROTEIN AND SUCROSE PROVISION

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, Yu. Yu. Kirichuk

In the present study, the investigations of arginase activity, the content of L-arginine and urea in the cytosolic fraction of rats' liver cells under the conditions of different protein and sucrose provision are presented. During the experiment, the experimental animals consumed a semi-synthetic diet AIN-93 in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition taking into account the amount of dietary protein and sucrose per kilogram of diet. In order to modelate the alimentary protein deprivation, the animals received a low-protein diet daily for 28 days, which contained 1/3 of the generally accepted daily requirement of protein. A high-sucrose diet was modeled by increasing the amount of carbohydrate by 4 times. The rationing of the daily diet was carried out taking into account the principle of steam nutrition. Arginase activity in the cytosolic fraction of liver cells was determined by the amount of urea. The L-arginine content was evaluated by the formation of a colored product in the reaction mixture with α -naphthol and hypobromide reagent after protein precipitation. Urea content was diagnosed by urease method according to the manufacturer's instructions. It was found that the decrease in arginine content in the cytosolic fraction of rats' liver cells by approximately 3 times compared to the control is observed only in groups of animals that received insufficient amounts of dietary protein. In the cytosol of rats' liver cells of all experimental groups the decrease in arginase activity compared with control values was shown. At the same time, under the conditions of high-sucrose diet consumption with normal protein intake, a decrease in arginase activity against a stable cellular level of arginine in the cytosolic fraction of rat liver can be considered as an adaptive mechanism to maintain tissue pool of L-arginine. Thus, the imbalance of nutrients in the diet leads to the disruption of final link of the ornithine cycle, which is accompanied by a decrease in arginase activity and a decrease in urea. The changes we found indicate a disruption of the urea-forming function of the liver.

Keywords: arginine, arginase, urea cycle, liver, dietary protein deficiency, high-sucrose diet

Отримано редколегією 22.09.2021