

4. Доброчаева, Д. Н. Определитель высших растений Украины [Текст] / Д. Н. Доброчаева, М. И. Котов и др. – К.: Наукова думка, 1987. – 548 с.
5. Визначник рослин Українських Карпат [Текст] / за ред. В. І. Чопика. – К.: Наук. думка, 1977. – 435с.
6. Григора, І. М. Геоботаніка [Текст]: навч. пос. / І. М. Григора, Б. Є. Якубенко, М. Д. Мельничук. – К.: Арістей, 2006. – 448 с.
7. Червона книга України. Рослинний світ [Текст] / за ред. Я. П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 912 с.

References

1. Takhtadjan, A. L. (1981). *Zhyzn rastenij*. Moscow: Prosvjeshchenije.

2. Zyman, S. M. (2004). *Iljustruvanyj dovidnyk z morfologiji kvitkovykh roslin*. Uzhgorod: Medium, 165.
3. Grodzynskyi, A. M. (1987). *Enstyklopedia likarskykh roslin*. Kyiv: Naukova dumka, 560.
4. Dobrochaeva, D. N., Kотов, M. I. et. al. (1987). *Opredelitel vysshikh rasteniy Ukrainy*. Kyiv: Naykova dumka, 548.
5. Chopyk, V. I. (1977). *Vyznachnyk Roslyn Ukrayinskykh Karpat*. Kyiv: Naukova dumka, 435.
6. Hryhora, I. M., Yakubenko, B. Ye., Melnychuk, M. D. (2006). *Heobotanika*. Kyiv: Aristey, 448.
7. Didukh, Ja. P. (2009). *Chervona knyga Ukrainy. Roslynyj svit*. Kyiv: Globalkonsalting, 912.

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук, професор Парпан В. І.
Дата надходження рукопису 22.10.2015*

Буняк Віра Іванівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біології та екології, Інститут природничих наук ДВЗН «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», вул. Галицька, 201, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018

Гнезділова Вікторія Ігорівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біології та екології Інституту природничих наук, Інститут природничих наук ДВЗН «Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника», вул. Галицька, 201, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018
E-mail: victoria1975@bigmir.net

УДК 543.9

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.54486

ВИЗНАЧЕННЯ L-АРГІНІНУ У КРОВІ ЩУРІВ ЕНЗИМАТИЧНИМ МЕТОДОМ

© Г. З. Гайда, Н. Є. Стасюк, Н. О. Сибірна, М. В. Гончар

Здійснено опрацювання ензиматично-хімічного методу кількісного аналізу L-Аргініну (Арг) на реальних зразках крові щурів. Розроблений метод ґрунтується на використанні рекомбінантної аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму (ДМО). Продукт реакції (сечовина) реєструється флуорометрично. Показано придатність нового методу для визначення Арг в біологічних рідинах ссавців

Ключові слова: Аргінін, сечовина, кров щурів, ензиматично-хімічний аналіз, аргіназа, 2,3-бутандіонмонооксим

The study of enzymatic-chemical method of L-Arginine (Arg) assay on the real samples of rat blood was done. The developed method is based on the usage of recombinant arginase I and 2,3-butandion monooxim. Urea, the final product of the reaction, is detected by fluorometry. The new method was shown to be suitable for Arg assay in biological liquids of mammals

Keywords: Arginine, urea, rat blood, enzymatic-chemical assay, arginase, 2,3-butandion monooxim

1. Вступ

Рівень L-аргініну (Арг) є важливим біомаркером багатьох захворювань [1, 2], тому надійне визначення концентрації цієї амінокислоти у біологічних рідинах людини є запорукою правильної діагностики та адекватного лікування.

Більшість відомих методів визначення Арг має низку недоліків, головні із яких: низька селективність, громіздкість та коштовність апаратури і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. Тому розробка нових високоселективних, чутливих і економічно вигідних методів кількісного аналізу Арг є надзвичайно актуальною.

У попередніх дослідженнях нами розроблено та охарактеризовано ензиматично-хімічний метод визначення Арг за використання рекомбінантної аргінази I печінки людини та 2,3-бутандіонмонооксиму (ДМО) [1, 3, 4]. Метод ґрунтується на ензиматичному гідролізі Арг до L-орнітину та сечовини (карбаміду). Останній під час нагрівання в кислому середовищі взаємодіє з 2,3-бутандіонмонооксимом (ДМО) з утворенням продукту, який кількісно оцінюється спектрофотометрично або флуоресцентно.

Можливість практичного застосування розробленого методу визначення вмісту Арг за використання аргінази і ДМО вивчали на зразках промисло-

вих фармацевтичних препаратів [3] та комерційних вин [1, 5]. Як свідчить порівняльний аналіз результатів у цих зразках різними методами [3], новий ензиматично-хімічний метод «аргіназа-ДМО» дає результати, які добре корелюють з показниками виробника й даними, одержаними за допомогою референтних методів. Аргіназа-ДМО-метод не потребує попереднього відокремлення Арг з досліджуваних зразків, є простим у виконанні, високо-селективним, надійним і комерційно доступним. Розроблений метод може бути перспективним для створення економічно вигідних тест-систем на Арг та застосування їх у лабораторіях харчової та фармацевтичної промисловості. Наступним необхідним кроком на шляху випробування запропонованого методу є дослідження його придатності для аналізу Арг в реальних зразках біологічних рідин, зокрема крові та сечі.

2. Постановка проблеми

Застосування відомих методів визначення концентрації Арг у клінічній діагностиці обмежується їх низькою селективністю, спричиненою позитивною реакцією на гуанідинові сполуки, тобто на точність вимірювань можуть впливати відносно високі концентрації L-лізину, L-проліну, L-цитруліну тощо [5–8]. Арг у біологічних рідинах зазвичай відокремлюють від інтерферуючих сполук, застосовуючи іонообмінні смоли [9], проте це ускладнює процедуру аналізу. В Україні відсутні вітчизняні ензиматичні тест-системи для визначення Арг. Щодо країн зарубіжжя, то такі аналітичні набори існують, проте вони досить дорогі. З огляду на це, актуальним завданням було дослідити придатність розробленого аргіназа-ДМО-методу, який не потребує попереднього відокремлення Арг з досліджуваних зразків, для визначення вмісту Арг в біологічних рідинах, зокрема, в крові ссавців.

3. Літературний огляд

Арг – глюкогенна напівзамінна амінокислота, важливий метаболіт циклу сечовини [10, 11]. Арг бере участь у численних біохімічних процесах, що мають місце в організмі ссавців, включаючи детоксикацію аміаку, секрецію гормонів і т. ін. Арг є попередником оксиду азоту (NO), який продукується клітинами ендотелію і є головною судинорозширювальною речовиною. Біологічна активність NO суттєво знижується при серцево-судинних захворюваннях, що супроводжуються порушенням ендотеліозалежної релаксації судин і підвищеною адгезивністю ендотеліальної вистілки. Зниження активності NO (і, відповідно, зниження концентрації Арг) асоціюється з факторами ризику ішемічної хвороби серця, прогресуванням атеросклеротичного ураження артерій. Завчасна діагностика таких порушень відкриває додаткові можливості своєчасного виявлення станів, що передують виникненню гострого коронарного синдрому. Таку діагностику можна здійснювати шляхом визначення концентрації Арг у крові та інших біологічних рідинах.

З іншого боку, Арг, як джерело NO, може бути використаним в якості лікувального засобу в терапії

стенокардії, коронарної серцевої недостатності, при гіпертонічній хворобі, ішемічній хворобі серця, преєклампсії, еректильній дисфункції, цукровому діабеті та інших захворюваннях [12]. Зрозуміло, що при такому лікуванні потрібно ретельно контролювати рівень Арг у крові та сечі. Аналогічний моніторинг є необхідним при ензимотерапії деяких видів раку (меланоми, гепатокарциноми і пухлин підшлункової залози) аргіназою І печінки людини [9–11].

Арг є попередником симетричних та несиметричних диметильованих похідних гуанідину, а також гомоаргініну. Як субстрати NO-синтази, Арг та його сполуки можуть бути важливими біомаркерами у клінічній діагностиці не тільки серцево-судинних [12], але і нейродегенеративних, легеневих [11], аутоімунних захворювань [2], сепсису, гіпераргінінемії (аргінінемія) і гіперамоніемія (амоніемія) [2, 10–12].

Аргінінемія і амоніемія викликані дефіцитом аргінази І (L-Арг амідогідролаза, ЕС 3.5.3.1), останнього ферменту циклу сечовини, що каталізує гідроліз Арг до сечовини [1]. На відміну від інших дефектів циклу сечовини, дефіцит аргінази І, зумовлений мутацією в відповідному гені, зазвичай не викликає катастрофічної амоніемії новонароджених. Але цей дефіцит проявляється у прогресуючих неврологічних симптомах, включаючи судоми, в перші роки життя та важкі печінкові патології новонароджених, зокрема, холестаза, гостру печінкову недостатність або фіброз печінки [1]. Для виявлення аргінінемії у немовлят, у деяких економічно розвинутих країнах уряди фінансують програми для здійснення моніторингу крові новонароджених на вміст Арг. Встановлено, що своєчасна діагностика дозволяє розпочати адекватне лікування і зупинити розвиток цього рідкісного, але вкрай небезпечного генетичного захворювання [1].

Таким чином, розробка та опрацювання високочутливого, надійного, швидкого та зручного експрес-методу для моніторингу Арг у біологічних рідинах, є актуальним завданням аналітичної біотехнології.

4. Мета дослідження

Метою нашого дослідження було апробувати на крові щурів розроблений нами ензиматично-хімічний метод кількісного аналізу Арг за використанням рекомбінантної аргінази І печінки людини та ДМО.

5. Матеріали та методи дослідження

Концентрацію Арг визначали за допомогою Аргіназа-ДМО-методу [3]. Як продуцент аргінази І печінки людини (далі – аргіназа) використовували рекомбінантний штам дріжджів NCYC 495 *H. Polytomorphia* [1]. Фермент виділяли із безклітинного екстракту штаму-продуцента шляхом афінної колонкової хроматографії за розробленою нами схемою, активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини за інструкцією до набору для визначення сечовини (НВФ «СІМКО», Львів, Україна) [13].

Для приготування зразків до аналізу, цитратну плазму крові декапітованих щурів центрифугували (ЦФ) 10 хв при 10000 об./хв. До одержаного суперна-

танту (освітлена плазма, об'ємом V_1) додавали 50 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК) до кінцевої концентрації 5 %, перемішували, витримували 30 хв при 0 °С та центрифугували 10 хв при 10000 об./хв. Безбілкову надосадову рідину (БНР, об'ємом V_2) відбирали і зберігали до початку аналізу при -20 °С. З формених елементів крові [13] (еритроцитів та лейкоцитів) одержували лізати, додавали рівний об'єм охолодженого ацетону з наступним ЦФ. В надосадових рідинах визначали Арг і сечовину.

Досліджували оптимальні умови ензиматичної реакції для звільнення БНР від нативної сечовини: нейтралізували БНР додаванням розчину 2МТрисОН до рН 7,0, вносили уреазу та інкубували упродовж 50 хв при 37°С. Концентрацію залишкової сечовини у БНР^{nc} (розчин БНР без нативної сечовини, об'ємом V_3) контролювали за допомогою набору «СІМКО».

Досліджували оптимальні умови ензиматичного перетворення нативного Арг у сечовину: спочатку інгібували уреазу шляхом підлужнювання розчину БНР^{nc} до рН 9, додаючи 2 М розчин ТрисОН, потім вносили аргіназу та інкубували упродовж 40 хв при 37 °С. Зразок БНР^{ncАрг} ((БНР^{nc} без нативного Арг, об'ємом V_4) містив сечовину – продукт перетворення нативного Арг за дії аргінази.

На етапі хімічної стадії реакції 0.5 мл розчину БНР^{ncАрг} змішували з 3 мл реагенту на сечовину – розчину ДМО та кип'ятили 50 хв на водяній бані. Кінцевий продукт реакції сечовина-ДМО реестрували проти «сліпої» проби флуориметрично. «Сліпу» пробу готували додаванням відповідних кількостей уреазу і аргінази до 5 % розчину ТХУ у воді з наступними кип'ятінням із ДМО. Концентрацію Арг у фінальному аналізованому зразку визначали методом порівняння із двома калібрувальними пробами – 0,4 та 0,8 мМ розчинами Арг у 30 мМ Трис-НСІ буфері, рН 8,8.

Результати досліджень обробляли статистично. При розрахунку брали до уваги середнє арифметичне показів цих проб.

6. Результати досліджень та їх обговорення

Приготування зразків крові для аналізу Арг у плазмі здійснювали за схемою, зображеною на рис. 1

Для оптимізації умов ензиматичної стадії аналізу Арг у реальних зразках плазми крові та забезпечення його надійності, експериментально визначали концентрацію ферментів та час проведення ензиматичних реакції (рис. 2). Як видно з рис. 2, а, залишкова концентрація карбаміду у зразку БНР^{nc} пропорційно зменшується при збільшенні концентрації уреазу в інкубаційній суміші і часу інкубації. На рис. 2, б наведено дані по залежності ефективності гідролізу Арг за дії аргінази у зразку БНР^{ncАрг} від активності аргінази І у інкубаційній суміші.

На основі отриманих даних (рис. 2) вибрано оптимальні умови проведення ензиматичних стадій реакції. Для повного усунення нативної сечовини (перетворення її у іони амонію за дії уреазу при 37 °С) оптимальним часом інкубації із ферментом є 50 хв, а концентрація уреазу в інкубаційній суміші становить 40 Од./мл. Для повного перетворення на-

тивного Арг у сечовину при 37 °С, концентрація аргінази І в інкубаційній суміші повинні бути не менше як 3 Од./мл, час інкубації 40 хв.

Запропонована методика була апробована на зразках крові 10 здорових щурів.

Проби аналізували при довжині хвилі емісії 520 нм, довжині хвилі збудження – 360 нм на спектрофлуориметрі НІТАСНІ МРV-4 проти відповідних «сліпих» проб. Розрахунок концентрації Арг у кінцевій дослідній пробі проводили за методом порівняння із калібрувальними пробами (стандартними розчинами Арг із концентраціями 0,4 та 8 мМ):

$$C_{\text{Арг}} = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кл}}} \cdot C_{\text{кл}}$$

де $C_{\text{Арг}}$ – концентрація Арг ($C_{\text{Арг}}$) у кінцевій пробі, $E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{кл}}$ – показники інтенсивностей випромінювання в дослідній та калібрувальній пробах; $C_{\text{кл}}$ – концентрація Арг в калібрувальній пробі, мМ.

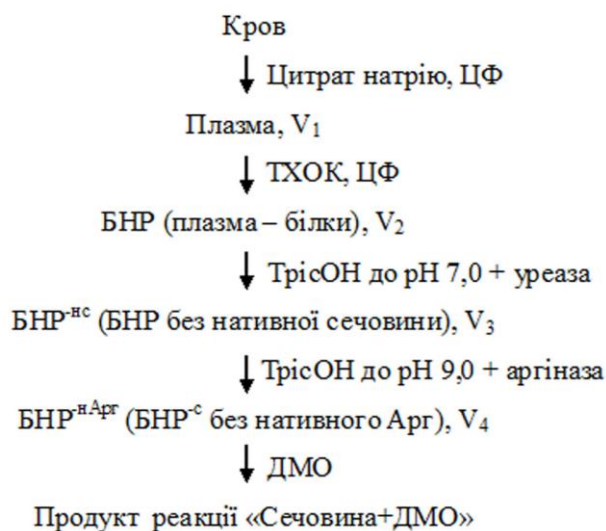
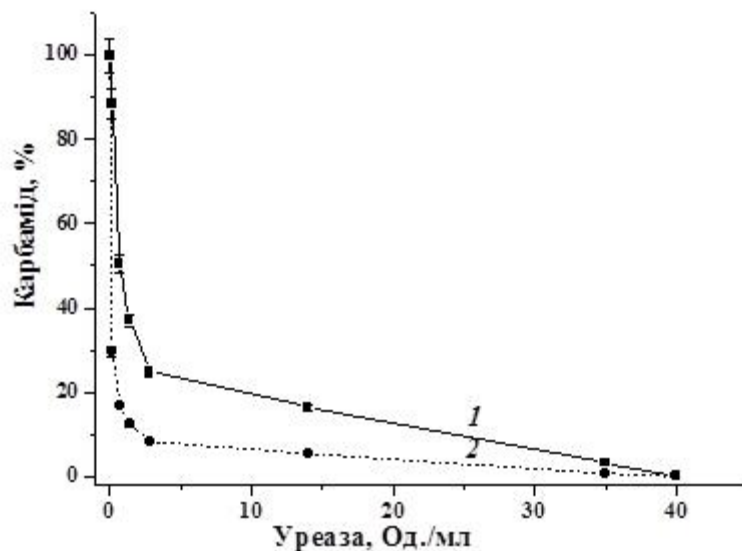


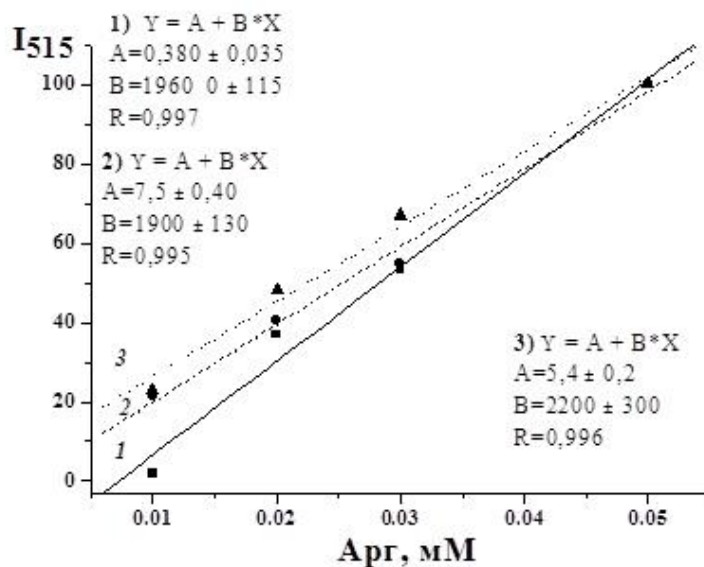
Рис. 1. Етапи приготування зразків плазми крові для аналізу Арг

Для перерахунку концентрацій Арг у дослідних пробах на концентрацію Арг у вихідній плазмі, необхідно врахувати сумарний фактор розведення (ΦP_c), якій є добутком ΦP кожного етапу приготування зразка для аналізу (рис. 1). ΦP на кожному етапі визначається як величина співвідношення об'ємів зразків – наступного до попереднього. Так, $\Phi P_1 = V_2/V_1$, $\Phi P_2 = V_3/V_2$, $\Phi P_3 = V_4/V_3$. Таким чином, для визначення концентрації Арг в плазмі, необхідно $C_{\text{Арг}}$ розраховану за формулою, перемножити на добуток величин ΦP_1 , ΦP_2 , ΦP_3 .

Одержані значення Арг у зразках плазми добре корелюють із даними літератури (табл. 1). Вміст Арг у лізатах еритроцитів складає 38 мкМ, враховуючі об'єм лізатів еритроцитів (в наших дослідах складає 0,1 мл), сумарна кількість Арг становить менше, ніж 9 % від кількості Арг у плазмі. Слід також зазначити, що при аналізі лізатів лейкоцитів не виявлено навіть слідових кількостей Арг.



a



б

Рис. 2. Вибір оптимальних умов проведення ензиматичних реакцій: a – Залежність ефективності гідролізу нативної сечовини у зразку БНР^{тс} (прийнято за 100 %) за дії уреазы від активності ферменту в інкубаційній суміші та часу інкубації (хв): 15 (1) і 50 (2); б – Залежність інтенсивності флуоресценції фінального продукту хімічної реакції від концентрацій Арг та аргінази в інкубаційній суміші (Од./мл): 1,5 (1); 3, 0 (2) і 4,5 (3)

Таблиця 1

Лабораторні показники значень Арг та сечовини, визначені у плазмі та формених елементах крові щурів (n=10)

Об'єкт	Плазма		Еритроцити		Лейкоцити	
	Арг	Сечовина	Арг	Сечовина	Арг	Сечовина
Концентрація, мМ	0,050–0,140	1,8–8,1	0,034–0,044	1,5–2,7	0	0,08–0,12
Норма, мМ	0,100	2,5–8,3	–	–	–	–
Посилання	14	15	–	–	–	–

У табл. 1 наведено також результати по визначенню концентрації сечовини у елементах крові. Встановлено, що рівень сечовини у плазмі крові щурів знаходиться в межах норми [15, 16], тоді як літе-

ратурних даних відносно рівня сечовини у лізатах еритроцитів та лейкоцитів щурів нами не знайдено.

Таким чином, в результаті проведених досліджень нами запропоновано оптимальний кіль-

кісний склад реакційної суміші для визначення Arg у крові щурів ензиматичним та умови виконання аналізу.

7. Висновки

1. Апробовано на зразках крові щурів ензиматично-хімічний метод кількісного аналізу L-Arg із флуорометричним способом детектування продукту реакції (сечовини). Метод базується на використанні високоочищеної аргінази I, одержаної нами за власною технологією із клітин дріжджового рекомбінантного штама-надпродукта і ДМО.

2. Запропонована методика є простою у виконанні, не потребує складної підготовки зразків до аналізу і може використовуватись для кількісного визначення вмісту L-Arg в біологічних рідинах, зокрема, крові.

Подяка

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках науково-технічного проекту № 29/2015 «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору "Аргітест" для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації».

Література

1. Гайда, Г. З. Методи аналізу L-аргініну [Текст] / Г. З. Гайда, Н. Є. Стасюк, М. В. Гончар // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 31–39. doi: 10.15407/biotech7.01.031

2. Стасюк, Н. Є. Новий ензиматичний метод визначення L-аргініну за використання аргінази і людини та уреазі [Текст] / Н. Є. Стасюк, С. Р. Басс, Г. З. Гайда, Х. С. Спрем'ян, М. В. Гончар // *ScienceRise*. – 2015. – Т. 6, № 1 (11). – С. 43–48. doi: 10.15587/2313-8416.2015.45126

3. Stasyuk, N. L-arginine assay with the use of arginase I [Text] / N. Stasyuk, G. Gaida, M. Gonchar // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2013. – Vol. 49, Issue 5. – P. 529–534. doi: 10.1134/s000368381305013x

4. Стасюк, Н. Є. Ензиматичний метод визначення вмісту L-аргініну за використання рекомбінантної аргінази I людини [Текст] / Н. Є. Стасюк, Г. З. Гайда, А. В. Гайда та ін. // *Ukrainica Biorganica Acta*. – 2012. – Т. 1. – С. 31–37.

5. Gayda, G. Arginase-based electrochemical sensors to L-arginine assay for prediction of ethyl carbamate formation in fermented beverages [Text] / G. Gayda, N. Stasyuk, H. Klepach et. al. – In the Book "Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds", 2015. – P. 73–88.

6. Costin, J. Selective determination of amino acids using flow injection analyses coupled with chemiluminescence detection [Text] / J. Costin, F. Paul, S. Lewis // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – Vol. 408, Issue 1. – P. 67–77. doi: 10.1016/s0003-2670(02)01645-8

7. Mira de Orduña, R. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic End-Point analysis [Text] / R. Mira de Orduña // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49, Issue 2. – P. 549–552. doi: 10.1021/jf000522y

8. Gaede, G. A rapid and specific enzymatic method for the estimation of L-arginine [Text] / G. Gaede, M. Grieshaber // *Analytical Biochemistry*. – 1975. – Vol. 66, Issue 2. – P. 393–399. doi: 10.1016/0003-2697(75)90606-5

9. Cohen, S. I. The determination of arginine released in human blood plasma after plasminogen activation. Use of a

cation-exchange resin [Text] / S. I. Cohen // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1960. – Vol. 86, Issue 2. – P. 166–168. doi: 10.1016/0003-9861(60)90397-0

10. Yokoro, M. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NOS inhibitor, metabolized in rat erythrocytes [Text] / M. Yokoro, M. Suzuki, K. Murota, C. Otsuka, H. Yamashita, Y. Takahashi, H. Tsuji et. al // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 76, Issue 7. – P. 1334–1342. doi: 10.1271/bbb.120086

11. Lacroix, C. Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy [Text] / C. Lacroix, C. Caubet, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Breuil, D. Bouyssie, A. Stella et. al // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2014. – Vol. 13, Issue 12. – P. 3421–3434. doi: 10.1074/mcp.m114.040121

12. Сибірня, Н. О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах [Текст] / Н. О. Сибірня, М. Я. Люта, Н. І. Климишин // *Біологічні Студії / Studia Biologica*. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 143–160.

13. Меньшиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике [Текст] / В. В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 215–219 с.

14. Miczke, A. Effect of L-arginine supplementation on insulin resistance and serum adiponectin concentration in rats with fat diet [Text] / A. Miczke, J. Suliburska, D. Pupek-Musialik et. al // *Int. J. Clin. Exp. Med*. – 2015. – Vol. 8, Issue 7. – P. 10358–10366.

15. Liu, J. Acute Cd MT injection is not a good model to study chronic Cd nephropathy: comparison of chronic CdCl₂ and CdMT exposure with acute CdMT injection in rats [Text] / J. Liu, S. S. Habeebu, Y. Liu, C. D. Klaassen // *Toxicology and Applied Pharmacology. Pharmacol*. – 1998. – Vol. 153, Issue 1. – P. 48–58. doi: 10.1006/taap.1998.8506

16. Enzytech [Electronic resource]. – Available at: <https://www.enzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/>

References

1. Gayda, G. Z., Stasyuk, N. E., Gonchar, M. V. (2014). The methods OF L-Arginine analysis. *Biotechnologia Acta*, 7 (1), 31–39. doi: 10.15407/biotech7.01.031

2. Stasyuk, N. Je., Bass, S. R., Gajda, G. Z., Jeprjemjan, H. S., Gonchar, M. V. (2015). New enzymatic method for l-arginine determination based on use of human arginase i and urease. *ScienceRise*, 6/1 (11), 43–48. doi: 10.15587/2313-8416.2015.45126

3. Stasyuk, N. E., Gaida, G. Z., Gonchar, M. V. (2013). L-arginine assay with the use of arginase I. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49 (5), 529–534. doi: 10.1134/s000368381305013x

4. Stasyuk, N. Ye., Gayda, G. Z., Gayda, A. V. et. al (2012). Enzymatic assay of L-arginine by the use of recombinant human arginase I. *Ukrainica Biorganica Acta*, 1, 31–37.

5. Gayda, G., Stasyuk, N., Klepach, H. et. al (2015). Arginase-based electrochemical sensors to L-arginine assay for prediction of ethyl carbamate formation in fermented beverages. In the Book "Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds", 73–88.

6. Costin, J. W., Francis, P. S., Lewis, S. W. (2003). Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 480 (1), 67–77. doi: 10.1016/s0003-2670(02)01645-8

7. Mira de Orduña, R. (2001). Quantitative Determination of L-Arginine by Enzymatic End-Point Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 549–552. doi: 10.1021/jf000522y

8. Gaede, G., Grieshaber, M. (1975). A rapid and specific enzymatic method for the estimation of l-arginine. *Analyt-*

ical Biochemistry, 66 (2), 393–399. doi: 10.1016/0003-2697(75)90606-5

9. Cohen, S. I. (1960). The determination of arginine released in human blood plasma after plasminogen activation. Use of a cation-exchange resin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 86 (2), 166–168. doi: 10.1016/0003-9861(60)90397-0

10. Yokoro, M., Suzuki, M., Murota, K., Otsuka, C., Yamashita, H., Takahashi, Y. et. al (2012). Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous NOS Inhibitor, Is Actively Metabolized in Rat Erythrocytes. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 76 (7), 1334–1342. doi: 10.1271/bbb.120086

11. Lacroix, C., Caubet, C., Gonzalez-de-Peredo, A., Breuil, B., Bouyssié, D., Stella, A. et. al (2014). Label-free Quantitative Urinary Proteomics Identifies the Arginase Pathway as a New Player in Congenital Obstructive Nephropathy. Molecular & Cellular Proteomics, 13 (12), 3421–3434. doi: 10.1074/mcp.m114.040121

12. Sybirna, N. O., Ljuta, M. Ja., Klymyshyn, N. I. (2010). Molekuljarni mehanizmy deponuvannya oksydu azotu v erythrocytah. Biologichni Studii / Studia Biologica, 4 (1), 143–160.

13. Menshykov, V. V. (1987). The methods of laboratory investigations in clinical diagnostics. Moscow: Medicine, 215–219.

14. Miczke, A., Suliburska, J., Pupek-Musialik, D. et. al (2015). Effect of L-arginine supplementation on insulin resistance and serum adiponectin concentration in rats with fat diet. Int. J. Clin. Exp. Med., 8 (7), 10358–10366.

15. Liu, J., Habeebu, S. S., Liu, Y., Klaassen, C. D. (1998). Acute CdMT Injection Is Not a Good Model to Study Chronic Cd Nephropathy: Comparison of Chronic CdCl₂ and CdMT Exposure with Acute CdMT Injection in Rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 153 (1), 48–58. doi: 10.1006/taap.1998.8506

16. Enzytech. Available at: <https://www.enzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/>

Дата надходження рукопису 15.10.2015

Гайда Галина Зуфарівна, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник, старший науковий співробітник Відділу Аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005

E-mail: galina.gayda@gmail.com

Стасюк Наталія Євгенівна, кандидат хімічних наук, молодший науковий співробітник Відділу Аналітичної біотехнології. Інститут біології клітини НАН України. вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005

E-mail: stasuk_natalia@ukr.net

Сибірна Наталія Олександрівна, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри Біохімії Біологічного факультету, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Університетська, 1, Львів, Україна, 79000

E-mail: sybirna_natalia@yahoo.com

Гончар Михайло Васильович, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу Аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005

E-mail: mykhailo1952@gmail.com