

Бурдин

Дмитрий Валерьевич

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ  
ЭФФЕКТЫ СВЕРХЭКСПРЕССИИ  
АЛАНИН-ГЛИОКСИЛАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ 2

03.03.01 - физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена на кафедре общей физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт - Петербургский государственный университет», а также в лаборатории ангиологии центра теоретической медицины Технического университета Дрездена

**Научный руководитель:**

**Марков Александр Георгиевич**

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физиологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Консультант:**

**Rodionov Roman**

PhD, глава лаборатории ангиологии центра теоретической медицины Технического университета Дрездена

**Официальные оппоненты:**

**Гамбарян Степан Петрович**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук»

**Галкин Алексей Петрович**

доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией генетического моделирования болезней человека, заместитель директора, Санкт-Петербургский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова»

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Защита состоится «   » \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д002.020.01 при ФГБУН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, Санкт - Петербург, наб. Макарова, д.б.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт - Петербург, наб. Макарова, д.б.) и на сайте института <http://www.infran.ru>

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета: **Ордян Наталья Эдуардовна**, доктор биологических наук

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологически активных веществ, который вовлечен в 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, а также участие в реализации других важных физиологических функций, таких как нейротрансмиссия, реакции иммунной системы и др. (Davis et al., 2001; Li and Förstermann, 2000). Показано, что изменение уровня биосинтеза NO связано с развитием таких сердечно-сосудистых заболеваний, как инфаркт миокарда, атеросклероз, инсульт, гипертония и других (Li et al., 2000).

Одним из факторов регуляции уровня NO, защищающих организм от его гиперпродукции в нормальных физиологических условиях, является асимметричный 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), вызывая таким образом ингибирование 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.

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 (Ogawa et al., 1987, Leiper et al., 1999).

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). Таким образом, исследование физиологической роли AGXT2 представляет особый научный интерес, поскольку, с одной стороны, данный фермент 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, 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 усилению сосудистых ответов на ацетилхолин. 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 количественной 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-тандем 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.

**Личный вклад автора.** Автор внес значительный вклад в разработку научной гипотезы, планирование научного исследования, стандартизацию методов выполнения исследования, обсуждение и обработку полученных результатов. Данные, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии в проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

**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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования**

**Генерация трансгенной линии мышей по hAGXT2.** Для создания hAGXT2 трансгенной линии мышей использовали последовательность кДНК гена AGXT2 человека, полученную из почки. Методом ПЦР к 3'-концу была присоединена последовательность FLAG эпитопа с терминаторным кодоном, а также сигнал полиаденилирования вируса SV40 человека. Для обеспечения высокого и стабильного уровня экспрессии трансгенного hAGXT2 5'-конец данной конструкции был совмещен с фрагментом Козака (GCCACC) и CAG промотором. Полученную генетическую конструкцию использовали для генерации трансгенных мышей путем пронуклеарной микроинъекции (объем 2 пл) в зиготу линии C57BL/6 (Jackson Laboratories, США). Яйцеклетки трансплантировали в яйцеводы псевдобеременных самок-реципиентов линии C57BL/6 в тот же день. Впоследствии одного из полученных таким образом трансгенных самцов скрещивали с самкой дикого типа линии C57BL/6 и получали поколение F1. 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. 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.

**Манипуляции с ранними эмбрионами и хирургические процедуры на мышах.** Для увеличения числа ранних эмбрионов и синхронизации их созревания проводили гормональную стимуляцию самок-доноров с использованием гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (СЖК) и последующим скрещиванием с фертильными половозрелыми самцами линии C57BL/6. Извлечение зигот проводили под бинокуляром с сортировкой полученных клеток, и отбором зигот, находящихся на стадии 2 пронуклеусов и имеющих ярко выраженную *zona Pellucida*. Дальнейшие манипуляции с зиготами включали микроинъекции в пронуклеус раствора ДНК трансгенной конструкции. Реимплантацию ранних эмбрионов проводили ложнобеременным самкам-реципиентам в день обнаружения вагинального плага после спаривания с вазэктомированными самцами. Все хирургические манипуляции проводили под общей анестезией: раствор авертина в дозе 0,3 мг/г, внутривентриально. 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.

**Генотипирование мышей.** Для детекции трансгенной конструкции hAGXT2 использовали метод ПЦР. Реакцию ПЦР проводили в объеме 20 мкл с использованием Taq полимеразы и праймеров, специфически распознающих трансгенную конструкцию hAGXT2. Для разделения и визуализации продуктов амплификации ДНК использовали метод горизонтального гель-электрофореза. Наличие в геноме мыши человеческого гена hAGXT2 определяли по наличию специфической полосы на геле при освещении в ультрафиолетовом спектре.

**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). 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 L-аргинина и его метилированных производных. Хранение мочи, плазмы крови и тканей осуществляли при -80°C.

**Клинический анализ крови** Для определения возможного влияния трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на процессы кроветворения проводили клинический анализ крови с использованием автоматического гематологического анализатора PCE-90Vet (Erma, Япония)

**Изучение содержания мРНК транскриптов AGXT2, DDAN1 и DDAN2 методом ПЦР в реальном времени.** Для определения содержания мРНК транскриптов трансгенного hAGXT2, эндогенного mAGXT2, общего (эндогенного+трансгенного) AGXT2, а также DDAN I и DDAN 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. 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 и человека, а также DDAN I и DDAN II генов мыши. Дизайн праймеров был проведен таким образом, чтобы температура отжига каждой из пар праймеров была 60 °C. Реакцию проводили в конечном объеме 15 мкл с использованием SYBR Green Buffer (Thermo Scientific, США) согласно протоколу компании-производителя. Количественную ПЦР в реальном времени 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 (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. 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.

**Анализ белковой экспрессии трансгенного hAGXT2 методом Вестерн-блот.** Методом Вестерн-блот проводили определение и сравнение экспрессии трансгенного hAGXT2 в различных тканях трансгенных мышей. При этом отрицательным контролем служили аналогичные ткани мышей дикого типа и клетки HUVEC, инфицированные аденовирусным вектором без вставки, а положительным контролем - клетки HUVEC, инфицированные вектором, содержащим hAGXT2. Лизис тканей проводили в буфере RIPA с последующим гомогенизированием ультразвуком на приборе UP-100H (Dr. Hielscher, Германия). Для разделения белков по молекулярной массе проводили электрофорез в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) (110 В, 90 мин, 22°C). Перенос белков с ПААГ на PVDF мембраны проводили при постоянном напряжении 100 В (60 мин, 22°C). Для иммунодетекции трансгенного hAGXT2 в тканях трансгенных мышей мембраны последовательно инкубировали в блокирующем растворе (5% сухое молоко, TBS) (60 мин, 22°C); растворе первичных моноклональных AntiFLAG антител (Sigma, Германия) (1:800, 60 мин, 22°C); растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (BD Biosciences, США) (1:2000, 60 мин, 22°C). Визуализация белков осуществлялась после инкубации мембран в растворе Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics, Германия) (5 мин, 22°C) на анализаторе Fusion FX7 (Peqlab, Германия). В качестве внутреннего контроля иммуномечения был использован белок GAPDH. 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).

**Культивирование и инфицирование аденовирусом клеток HUVEC.** Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (Lonza, США) были использованы в качестве положительного и отрицательного контроля Вестерн-блота. По достижении клетками 80%

конфлюэнтности их промывали в фосфатном буфере (Sigma, Германия) и инфицировали пустым аденовирусным вектором *pacAd5CMV-IRES-GFP* (Cell Biolabs, USA) (отрицательный контроль), или аналогичным аденовирусным вектором, содержащим *hAGXT2FLAG* (положительный контроль). По прошествии 72 часов после заражения проводили лизис клеток в буфере RIPA. Создание аденовирусных векторов было проведено по методике описанной ранее (Rodionov et al., 2010c).

**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 иммуноомечением на белки *hAGXT2* и специфический маркер эндотелиальных клеток CD31 (Newman et al., 1990).

**Иммуноцитохимическое исследование первичных эндотелиальных клеток трансгенных мышей для изучения локализации трансгенного *hAGXT2*.** Полученную первичную культуру клеток аорты фиксировали с помощью 1:1 раствора ацетона-метанола (10 мин, 4°C), промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером и блокировали раствором Dako (Dako, США) (20 мин, 22°C). Затем клетки инкубировали с первичными кроличьими поликлональными AntiFLAG антителами (Sigma Catalog #7425, США) (1:100, 120 мин, 37°C), промывали 3 раза по 2 мин охлажденным фосфатным буфером и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой (Jackson, США) (1:250, 60 мин, 22°C). Далее, аналогичные процедуры повторяли для иммуномечения на CD31 (Biolegend, Catalog # 102401, США). В конце процедуры клетки помещали в препятствующую фотовыцветанию среду Moviol (Германия). Для оценки специфичности действия вторичных антител использовали негативный контроль. Полученные образцы клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000.

**Измерение содержания L-аргинина, ADMA, SDMA, ADGV и креатинина в плазме, моче и тканях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (HPLC-MS/MS).** Для определения содержания L-аргинина и его метилированных производных SDMA и ADMA в плазме крови, моче и лизатах тканей трансгенных мышей и мышей дикого типа использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (HPLC-MS/MS) согласно протоколу Schwedhelm et al., 2005. В качестве внутренних стандартов для определения содержания L-аргинина использовали меченые дейтерием молекулы [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-L-аргинина (Sigma, Германия), а для определения содержания ADMA и SDMA – меченые дейтерием молекулы [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA (Sigma, Германия). Для детектирования 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). Концентрацию креатинина в моче определяли с помощью метода жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC). 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.

**Измерение артериального давления.** Для определения возможных эффектов трансгенной сверхэкспрессии AGXT2 у мышей на артериальное давление, проводили его измерение 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).

**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. 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). Внутренний цилиндр сосуда заполняли буферным раствором Кребса (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C). Исследуемые кольца аорты выдерживали при изометрическом натяжении в 0.5 грамма в течение одного часа для развития в них стабильного напряжения. Изучение вазодилаторной активности эндотелия производилось на сосудистых кольцах, предварительно спазмированных  $\alpha_1$ -адреностимулятором фенилэфрином ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$ М) до уровня 60% от максимальной вазоконстрикции. С целью исследования обусловленной эндотелием NO-зависимой дилатации

на кольца аорты воздействовали ацетилхолином. Для построения дозозависимой кривой ацетилхолин последовательно вносили в водяную баню со ступенчатым возрастанием концентрации от  $10^{-9}$  до  $3 \times 10^{-5}$  М. Сосудорасширяющие ответы, независимые от эндотелия, оценивали путем использования эндотелий-независимого вазодилататора нитропрусида натрия в концентрациях от  $10^{-11}$  до  $3 \times 10^{-5}$  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.

**Статистический анализ полученных данных.** Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, США) с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. 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 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 и стандартной ошибки среднего.

## Результаты и обсуждение

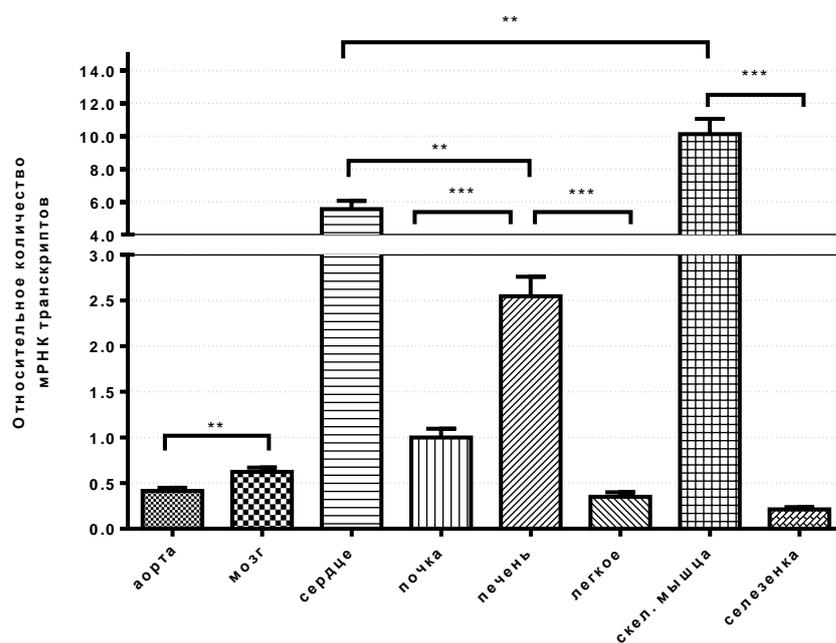
**Анализ результатов трансгенеза в линии мышей hAGXT2.** В результате проведенного исследования было получено 2 фаундера, несущих трансгенную hAGXT2 конструкцию, и способных передавать ее потомству, на основе которых были получены две независимые трансгенные мышинные линии. В данной работе была использована линия, полученная от первого фаундера. В экспериментах использовались гибриды поколений F1, F2 и F3, полученные в результате скрещивания оригинальной трансгенной линии с C57BL/6 линией лабораторных мышей. 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 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 F1 составило 1:1. Аналогичная картина скрещивания наблюдалась и в последующих поколениях. Дальнейшие исследования не выявили различий между самками и самцами, что свидетельствует об аутосомном типе наследования.

**Фенотипический анализ трансгенной линии мышей hAGXT2.** Трансгенные мыши не отличались по внешнему виду от мышей дикого типа. 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. 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).

**Клинический анализ крови трансгенной линии мышей hAGXT2.** 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). В настоящее время существуют данные о том, что AGXT2 может участвовать в реакции трансаминирования  $\delta$ -Аминолевулиновой кислоты, которая является первичным компонентом синтеза тетрапирролов - порфиринов, входящих в состав гемсодержащих белков (Noguchi and Mori, 1981; Varticovski et al., 1980), в том числе гемоглобина. Настоящие результаты свидетельствуют о том, что нарушения синтеза гемоглобина в связи с трансгенной сверхэкспрессией hAGXT2 не происходит.

**Анализ экспрессии генов AGXT2, DDAH1, DDAH2 на уровне транскрипции в тканях трансгенных мышей и мышей дикого типа.** Анализ трансгенной экспрессии hAGXT2 с методом количественной ПЦР в реальном времени показал наличие его транскриптов во всех тканях трансгенных мышей. Наибольшее содержание мРНК транскриптов hAGXT2 наблюдалось в сердце, печени и скелетной мышце, что превосходило по уровню остальные ткани в 2 и более раз (рис.1). Транскриптов hAGXT2 не было выявлено ни в одной из тканей мышей дикого типа. 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).

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



*Рисунок 1. 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*

Проведенный анализ общей экспрессии AGXT2 (трансгенной и эндогенной одновременно) позволил оценить, насколько трансгенная экспрессия фермента AGXT2 в исследованных тканях мышей линии hAGXT2 превосходит физиологическую норму. В тканях почки и печени мышей общая экспрессия AGXT2 была соответственно в 8 и 12 раз выше по сравнению с мышами дикого типа (рис. 2).

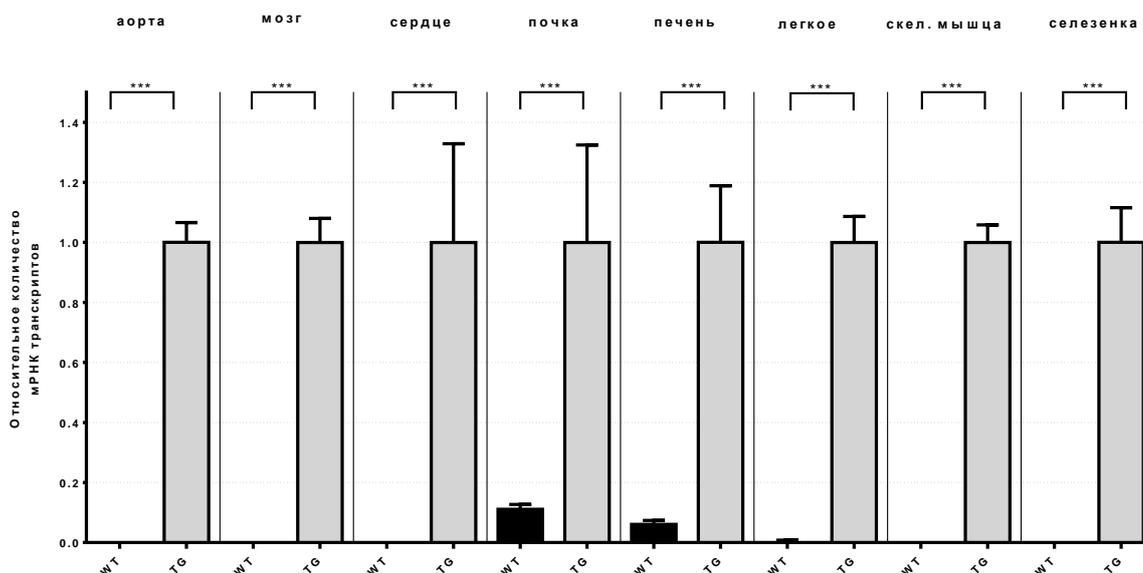


Рисунок 2. Сравнение общей экспрессии AGXT2 в различных тканях трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Общая экспрессия AGXT2 в каждой из тканей трансгенных мышей принята за 1. Внутренний контроль HPRT.

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

Полученные результаты 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.

Анализ эндогенной экспрессии DDAN1 и DDAN2 показал, что DDAN1 экспрессируется преимущественно в мозге, почках и печени у мышей дикого типа, а DDAN2 - на одинаковом уровне в большинстве тканей. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными (Tran et al., 2000). При этом в мозге трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа была достоверно понижена экспрессия DDAN1 ( $p < 0.01$ ), а в аорте - понижена экспрессия DDAN2 ( $p < 0.01$ ,  $n = 5-7$ ). В селезенке трансгенных мышей было показано - значительное (примерно в 2 раза) увеличение экспрессии как DDAN1, так и DDAN2 ( $p < 0.01$ ,  $n = 5-7$ ). 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, что имеет отрицательные последствия для иммунной, нервной и других систем организма. В частности, избыток NO в нервной системе, связанный с повышенной активностью nNOS, может приводить к инсульту и нейродегенерации (Vallance and 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.

#### Анализ белковой экспрессии трансгенного AGXT2 в тканях трансгенных мышей.

Результаты анализа белковой экспрессии трансгенного hAGXT2 методом денситометрии полностью соответствовали данным, полученным методом ПЦР в реальном времени. Так, было показано наличие трансгенного белка во всех тканях трансгенных мышей, при этом белковая экспрессия hAGXT2 отсутствовала в тканях мышей дикого типа. Максимальное содержание белка hAGXT2 наблюдалось в тканях сердца, печени и скелетной мышцы. Денситометрический анализ изображений мембран, показал значимые различия в экспрессии трансгена в селезенке от тканей сердца, печени и скелетной мышцы (рис. 3), что также соответствует результатам исследования сравнительного содержания мРНК транскриптов. Таким образом, трансгенная сверхэкспрессия hAGXT2 наблюдалась во всех тканях трансгенных мышей как на уровне мРНК, так и на белковом уровне.

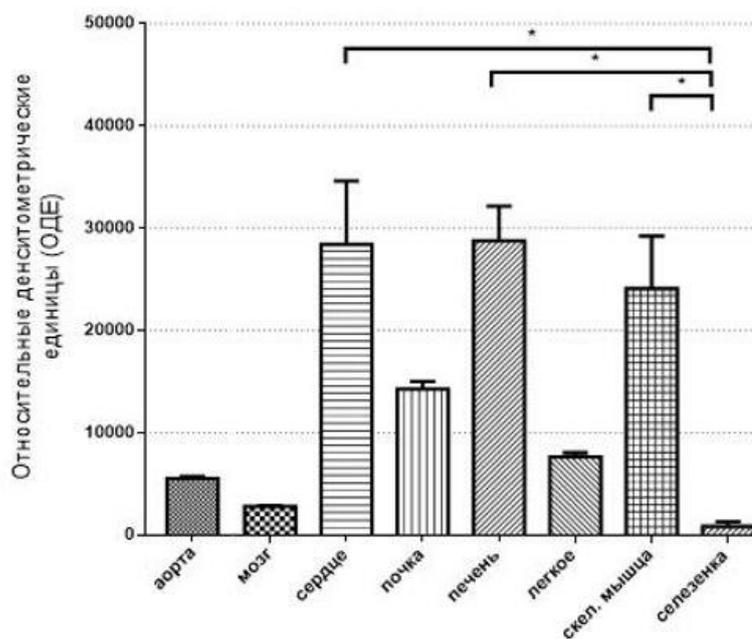


Рисунок 3. Сравнение белковой экспрессии hAGXT2 в различных тканях трансгенных мышей методом денситометрии

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

**Изучение клеточной локализации трансгенного hAGXT2 в тканях аорты.** 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 физиологически активен непосредственно в эндотелиальных клетках, как основном источнике выработки оксида азота с помощью NO-синтаз. Проведенный иммуноцитохимический анализ показал, что hAGXT2 локализован в цитоплазме как CD31-положительных (эндотелиальных), так и CD31-отрицательных (гладкомышечных) клеток.

**Влияние трансгенной сверхэкспрессии hAGXT2 на метаболизм L-аргинина, ADMA и SDMA у мышей.** С помощью метода жидкостной хроматографии-танDEM масс-спектрометрии было выявлено снижение уровня ADMA в плазме крови трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа на 20% (рис. 4,  $p < 0.05$ ). В то же время было показано значительное увеличение уровня ADGV в плазме крови и моче трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа (рис. 4,  $p < 0.01$ ). 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 DDAH1/2 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 DDAH1, или экскреции его почками) может *in vivo* снижать уровень ADMA.

Анализ тканевого метаболизма метилированных производных L-аргинина показал достоверное снижение содержания ADMA ( $p < 0.05$ ;  $n=4$ , 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. Кроме того, ткани легкого трансгенных мышей демонстрировали достоверное снижение уровня SDMA на 40% в сравнении с контрольной группой ( $p < 0.05$ ;  $n=4$ , U-критерий Манна-Уитни). 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 ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ , U-критерий Манна Уитни). 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. 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*.

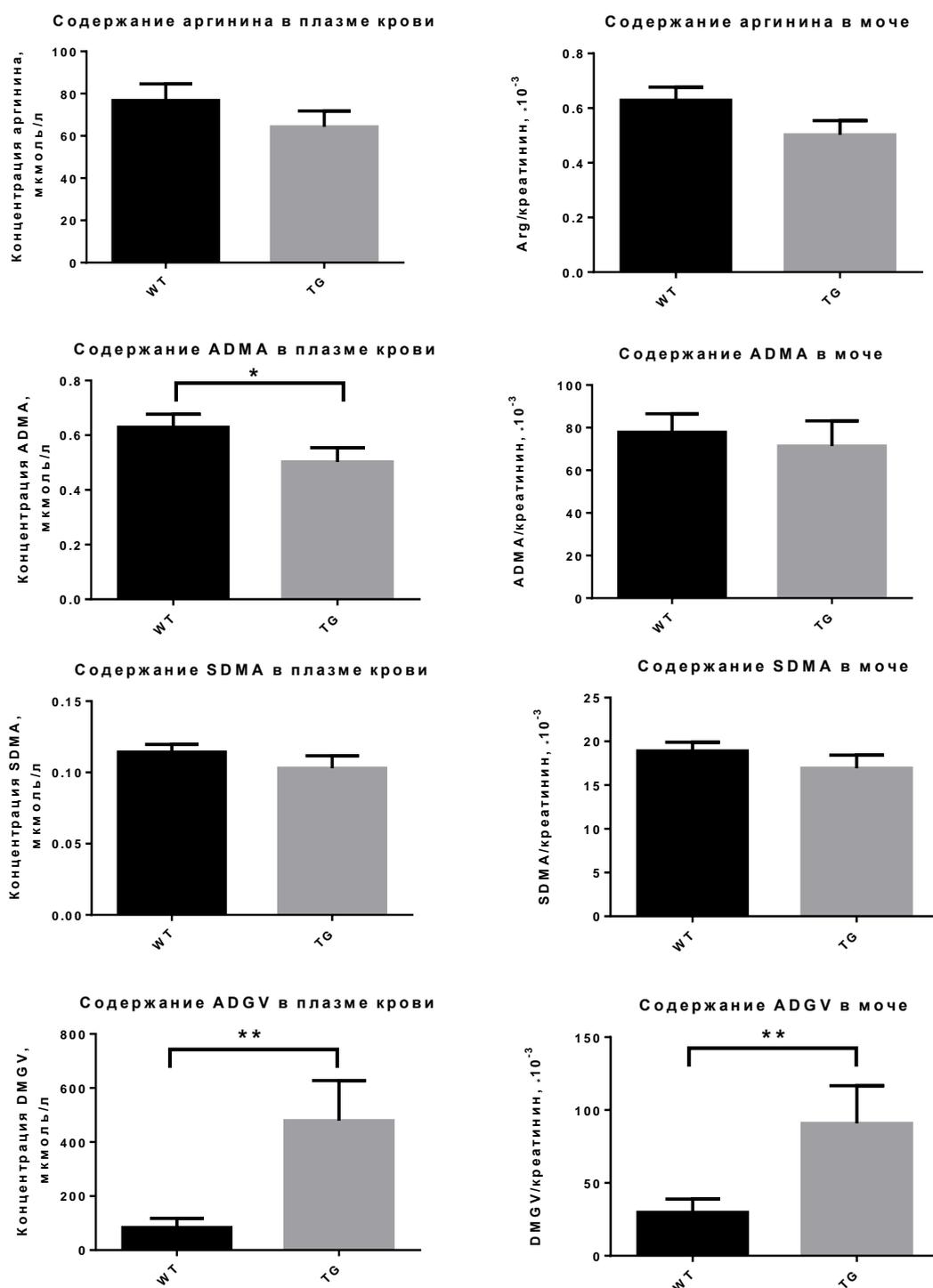


Рисунок 4. Эффекты трансгенной сверхэкспрессии *hAGXT2* на метаболизм L-аргинина, ADMA и SDMA у мышей TG – трансгенные мыши; WT – мыши дикого типа

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

**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. 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. 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. 5). При этом максимальный ответ ( $EC_{max}$ ) на ацетилхолин достигал 20% от предварительно вызванного сокращения у трансгенных мышей и лишь 40% у мышей дикого типа. Анализ сосудистых ответов на нитропруссид натрия не выявил различий между трансгенными мышами и мышами дикого типа. Таким образом, трансгенные мыши демонстрировали стойкое улучшение сосудистой функции, вызванное именно сверхэкспрессией трансгенного hAGXT2, а не изменением чувствительности гладких мышц сосуда к NO.

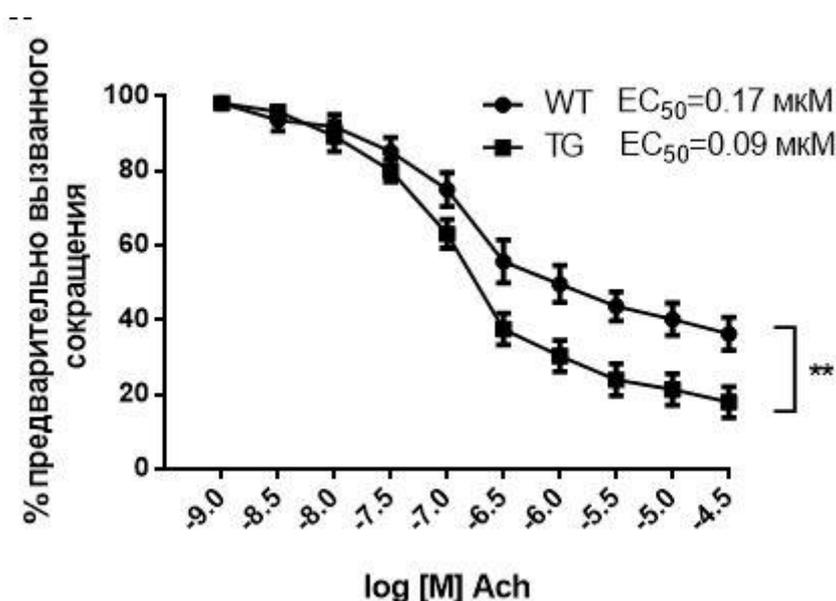


Рисунок 5. Эндотелий-зависимая релаксация изолированных колец аорты у трансгенных мышей (TG) и мышей дикого типа (WT). Ach – ацетилхолин

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

Анализ среднего артериального давления не выявил различий между группами трансгенных животных и контрольных животных. Среднее значение артериального давления у трансгенных животных составляло  $108 \pm 1.1$  мм рт. ст., а у животных дикого типа -  $109 \pm 0.75$  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.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и 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 DDAH1 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 с помощью DDAH1 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 DDAH1) AGXT2-трансгенных мышей не изменялось. В то же время в тканях сердца и легкого (где отсутствует экспрессия DDAH1) 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 DDAH1/2-трансгенных животных.

Данные, полученные в ходе анализа сосудорасширяющих ответов изолированных колец аорты на ацетилхолин у AGXT2-трансгенных мышей, 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.

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 в сравнении с мышами дикого типа, 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 DDAH 1 достоверно повышается в селезенке и понижается в мозге трансгенных мышей, а DDAH 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК:**

1. Burdin D.V., Kolobov A.A., Brocker C., Soshnev A.A., Samusik N., Demyanov A.V., Brilloff S., Jarzebska N., Martens-Lobenhoffer J., Mieth M., Maas R., Bornstein S.R., Bode-Böger S.M., Gonzalez F., Weiss N., Rodionov R.N. Diabetes-linked transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates metabolism of endogenous methylarginines and  $\beta$ -aminoisobutyric acid by controlling expression of alanine-glyoxylate aminotransferase 2 // *Sci Rep.* - 2016. – V. 6:35503. doi: 10.1038/srep35503.
2. Rodionov R. N., Burdin D. V., Brilloff S., Todorov V., Jarzebska N., Martens-Lobenhoffer J., Demyanov A. V., Hilgers K., Cordasic N., Jacobi J., Maas R., Hofmann A, Morawietz H, Bode-Böger S., Hugo C. P., Hohenstein B., Weiss N. // Transgenic overexpression of alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers tissue levels of asymmetric dimethylarginine and improves vasomotor function // *Circulation.* - 2015. – V. 132:A17603
3. Rodionov R.N., Martens-Lobenhoffer J., Brilloff S., Burdin D V., Jarzebska N., Demyanov A.V., Hohenstein B., Weiss N., Bode-Böger S.M., Acetylation of asymmetric and symmetric dimethylarginine – an undercharacterized pathway of metabolism of endogenous methylarginines // *Nephrol Dial Transplant.* – 2016. – V. 31, N. 1. – P. 57-63.
4. Rodionov R.N., Oppici E., Martens-Lobenhoffer J., Jarzebska N., Brilloff S., Burdin D., Demyanov A., Kolouschek A., Leiper J., Maas R., Cellini B., Weiss N., Bode-Böger S.M. A Novel Pathway for Metabolism of the Cardiovascular Risk Factor Homoarginine by alanine:glyoxylate aminotransferase 2 // *Sci Rep.* – 2016. – V. 6:35277. doi: 10.1038/srep35277.

**Тезисы конференций:**

1. Kolobov A.A., Burdin D.V., Demyanov A.V., Brocker C., Samusik N., Brilloff S, Martens-Lobenhoffer J., Reetz T., Maas R., Bode-Boger S.M., Gonzalez F., Weiss N.; Rodionov R.N. HNF4 $\alpha$  is the major regulator of AGXT2 expression in liver // *Abstracts of 7th International Symposium on Asymmetric Dimethylarginine, St. Petersburg.* - 2014.
2. Kolobov A.A., Burdin D.V., Demyanov A.V., Soshnev A.A., Brocker C., Samusik N., Brilloff S., Martens-Lobenhoffer J., Reetz T., Maas R., Bode-Böger S.M., Gonzalez F., Weiss N., Rodionov R.N. Hepatic Nuclear Factor 4 Alpha is the Major Regulator of Alanine:Glyoxylate Aminotransferase 2 Expression - A Novel Link Between Diabetes and Impaired Metabolism of Nitric Oxide and Lipids // *Abstracts of AHA Scientific Sessions, Chicago.* – 2014.
3. Rodionov R.N., Burdin D., Martens-Lobenhoffer J., Brilloff S., Jarzebska N., Demyanov A.V., Weiss N., Bode-Böger S.M. Detection of N-alpha-acetyltransferase Activity Towards Endogenous

Inhibitor of Nitric Oxide Synthase Asymmetric Dimethylarginine in the Liver and Kidneys // Abstracts of ATVB/PVD Scientific Sessions, San Francisco. – 2015.

4. Rodionov R.N., Burdin D, Todorov V., Brilloff S., Jarzebska N., Martens-Lobenhoffer J., Hofmann A., Morawietz H., Demyanov A.V., Maas R., Bode-Böger S.M., Hugo C.P., Hohenstein B., Weiss N. Transgenic overexpression of alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers tissue levels of asymmetric dimethylarginine and improves endothelial function in mouse aortas // Abstracts of ATVB/PVD Scientific Sessions, San Francisco. – 2015.

5. Burdin D.V., Kolobov A.A., Demyanov A.V., Soshnev A.A., Brocker C., Samusik N., Brilloff S., Martens-Lobenhoffer J., Reetz T., Maas R., Bode-Böger S.M., Gonzalez F., Weiss N., Rodionov R.N. Deficiency of hepatic nuclear factor 4 alpha results in impaired metabolism of endogenous methylarginines and beta-aminoisobutyric acid - a novel mechanism of cardiovascular complications in patients with type 2 diabetes? // Abstracts of ATVB/PVD Scientific Sessions, San Francisco. – 2015.