

УДК 543.9

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.45126

НОВИЙ ЕНЗИМАТИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ L-АРГІНІНУ ЗА ВИКОРИСТАННЯ АРГІНАЗИ І ЛЮДИНИ ТА УРЕАЗИ

© Н. Є. Стасюк, С. Р. Басс, Г. З. Гайда, Х. С. Єпрмян, М. В. Гончар

Розроблено чутливий та селективний метод кількісного аналізу L-Аргініну із спектрофотометричним способом детектування продукту реакції (амонію) за допомогою о-фталевого альдегіду. Метод базується на використанні високоочищеної аргінази I та комерційної уреазі. Новому методу властива висока порогова чутливість визначення L-Аргініну, широкий діапазон лінійності, а також нечутливість до інтерферуючого впливу широкого спектру амінокислот

Ключові слова: ензиматичний аналіз, аргіназа I, уреазі, о-фталевий альдегід, L-аргінін, сечовина, амоній, спектрофотометрія

It is developed a sensitive and selective method for quantitative analysis of L-arginine with spectrophotometric method of detection of the reaction product (ammonium) using o-Phthalaldehyde. The method is based on the use of highly purified arginase I and commercial urease. The new method is highly sensitive for L-arginine determination, a wide range of linearity and insensitivity to interfering influence of wide range of amino acids

Keywords: enzymatic assay, arginase I, urease, o-Phthalaldehyde, L-arginine, urea, ammonium, spectrophotometry

1. Вступ

L-Аргінін (L-Arg) – напівзамінна амінокислота, яка служить попередником для біосинтезу багатьох біоактивних сполук, включаючи NO, поліаміни, пептиди і білки [1]. Визначення рівня L-Arg в плазмі крові здійснюють при доведенні L-Arg в процесі діагностики та експериментального дослідження захворювань ендокринної системи [2]. Відомо також, що визначення концентрації L-Arg у сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких складних захворювань, як гепатокарцинома, меланоми шкіри та колоректальний рак [3, 4].

2. Постановка проблеми

На сьогодні визначення вмісту L-Arg в розчинах проводиться методами іонообмінної хроматографії, флуориметрії, спектрофотометрії, капілярного електрофорезу, полярографії, проточно-інжекційного аналізу, ензиматичним методом, високоефективною рідинною хроматографією. Однак, більшість відомих методів визначення L-Arg має низку недоліків, основні із яких: низька селективність, громіздкість та коштовність апаратури і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. З огляду на це, розробка нових високоселективних та чутливих методів визначення вмісту L-Arg, зокрема ензиматичних, є надзвичайно актуальною.

3. Літературний огляд

L-Arg є важливим біомаркером низки захворювань, пов'язаних із порушенням обміну, зокрема, гіпераргінінемії, викликаній генетичним дефектом в гені *ARG1* (дефіцит аргінази I) [5]. Моніторинг вмісту L-Arg в плазмі крові здійснюють при доведенні L-Arg в процесі діагностики та експериментального дослідження захворювань ендокринної системи [2]. Рівень L-Arg в сечі є маркером гомозиготної цистинурії [6] та обструктивної нефропатії

новонароджених [7]. Існують дані, що визначення концентрації L-Arg у сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких захворювань, як артеріальна гіпертензія, гестоз вагітних та інші акушерські ускладнення [8], астма [9], обструктивні захворювання дихальних шляхів та запалення кішківника [10], а також гепатокарцинома, меланома шкіри та колоректальний рак [3, 4].

Визначення вмісту L-Arg проводиться методами іонообмінної хроматографії, флуориметрії, спектрофотометрії, капілярного електрофорезу, полярографії, проточно-інжекційного аналізу, високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) [11] та біосенсорними методами [12–14].

Для кількісного аналізу L-Arg розроблено також і ензиматичні методи, зокрема за використання трьох ферментів – аргінази, уреазі та глутаматдегідрогенази [15] або октопіндегідрогенази [16]. Недоліком цих методів є висока вартість аналізу, обумовлена використанням кількох комерційних ферментів. Тому пошук удосконалених ензиматичних методів визначення L-Arg особливо в напрямку створення комерційно вигідних ензиматичних тест-систем за використання ферментів, селективних до цієї амінокислоти є надзвичайно актуальним.

4. Мета дослідження

Метою нашого дослідження було розроблення ензиматичного методу аналізу L-Arg на основі аргінази I печінки людини, виділеної з клітин рекомбінантного штаму дріжджів *H. polymorpha* та комерційної уреазі, а також оцінювання нового методу в порівнянні з відомим хімічним методом аналізу та іншими методами [17].

5. Матеріали та методи дослідження

Як продуцент аргінази I печінки людини використовували рекомбінантний штам дріжджів NCYC 495 *H. polymorpha* pGAP1#HsARG1 leu2car1:

LEU2(S. c). Штам містить цільовий ген *HsARG1* під контролем конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази. Фермент виділяли із безклітинного екстракту штаму продуцента шляхом афінної колонкової хроматографії за розробленою нами схемою [17]. Активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини [17]. Концентрацію сечовини визначали в хімічній реакції за інструкцією до набору для визначення сечовини виробництва НВФ «СІМКО», Львів [18]. Розчин ферменту з питомою активністю $600 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \times \times (600 \text{ Од./мг})$ було використано для розробки ензиматичного методу аналізу L-Арг.

Для приготування робочого реактиву: 5 г ОФА попередньо розведеного у 5 мл 96 % етанолу змішували із 100 мл боратного буфера, рН 10.5. Далі до отриманої суміші вносили 5 мг натрій сульфіту та інтенсивно перемішували. Реагент зберігали до використання на темноті при температурі +4 °С упродовж 1 доби.

Аналіз проводили за такою схемою: в скляні пробірки відбирали по 0,1 мл розведених в 30 мМ Тріс НСІ, рН 8,8 (ТБ) досліджуваних проб, а для побудови градууювального графіка – по 0,1 мл стандартних розчинів L-Арг в 30 мМ ТБ, рН 8,8. Реакцію запускали додаванням 0,01 мл розчину аргінази I в 30 мМ ТБ, рН 8,8 з вихідними концентраціями 16,5; 33,0; 49,5 та 66,0 Од./мл. Інкубаційну суміш перемішували та витримували при 37 °С протягом 15 хв. Далі до суміші вносили розчин уреазу в 30 мМ ФБ, рН 7,5 з вихідними концентраціями 420; 210; 105; 50 та 25 Од./мл одержану суміш перемішували та витримували знову при 37 °С упродовж 15 хв. Далі в суміш вносили 2.0 мл *o*-фталевого альдегіду (ОФА), прогрівали на водяній лазні при 60 °С протягом 15 хв та спектрофотометричним (при 360 нм) методом реєстрували оптичну густину кінцевого кольорового продукту реакції відносно “сліпої” проби (0,1 мл ТБ замість дослідної проби).

Визначення величини довжини хвилі для забезпечення максимуму поглинання реакційної суміші проводилось на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 РС у широкому діапазоні (250–700 нм) із використанням стандартного програмного забезпечення “UVProbe 2.20”. Результати досліджень обробляли статистично.

6. Результати та їх обговорення

Запропонований нами метод ґрунтується на ферментативному гідролізі L-Арг до L-орнітину та сечовини (I стадія реакції, ензиматична) із наступним гідролізом утвореної сечовини до іонів амонію під впливом уреазу (II стадія реакції, ензиматична). Утворений амоній реагує із ОФА з утворенням продукту – 2*H*-ізоіндол-1-тіолу, який кількісно оцінюється спектрофотометрично (ОФА-СФ) при 360 нм [19]. Принципова схема реакцій, що лягли в основу методу визначення L-Арг, представлена на рис. 1.

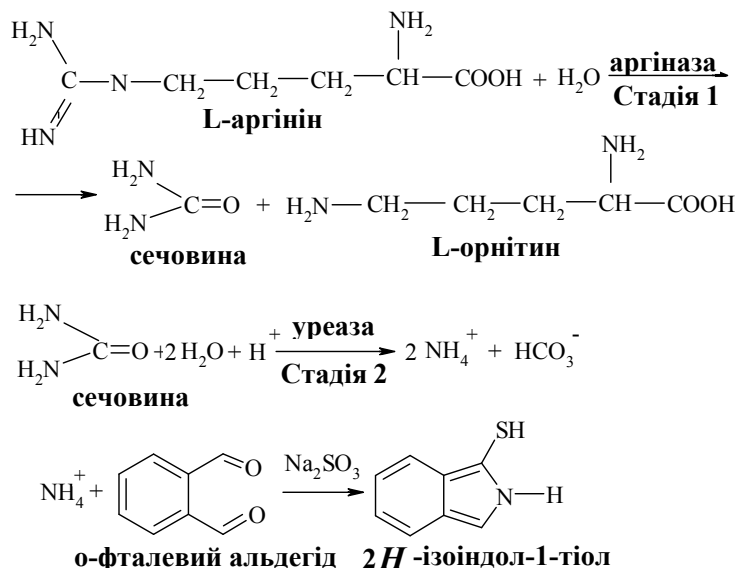


Рис. 1. Схема реакцій при бі-ензимному визначенні L-Арг методом ОФА-СФ

Було встановлено, що максимум поглинання утвореного продукту хімічної реакції знаходиться в ультрафіолетовій області при 360 нм (рис. 2) [20].

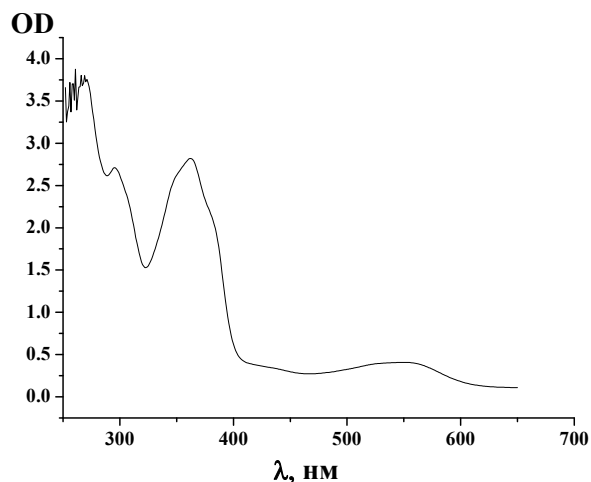


Рис. 2. Електронний спектр світлопоглинання продукту взаємодії ОФА з 7 мМ NH₄Cl

Для розробки ензиматичного методу аналізу L-Арг та забезпечення його надійності, досліджували умови проведення реакції. З метою оптимізації умов першої стадії експериментально змінювали склад інкубаційної суміші та час проведення ензиматичної реакції. Для оптимізації хімічної стадії варіювали концентрацію ОФА та умови для ефективного утворення продукту – тривалість нагрівання. На основі отриманих даних визначено оптимальні умови проведення ензиматичної реакції: 15 хв інкубації із обома ферментами при 37 °С; концентрація аргінази I – 1,5 Од./мл; концентрація уреазу – 35 Од./мл в інкубаційній суміші.

На хімічній стадії реакції здійснювали спектрофотометричне визначення іонів амонію за відомим методом [19]. Нами досліджено, що аналітичний сигнал на амоній залежить від умов проведення

хімічної реакції. Зменшення концентрації ОФА від 58 до 14,3 мМ значно збільшувало величину флуоресценції, що вагомо впливало на результат. Як видно із рис. 3, лінійність визначення іонів амонію досліджуваним СФ методом знаходиться в діапазоні від 0,7 мМ до 250 мМ. Мілімолярний коефіцієнт екстинкції (ξ_{MM}) ОФА-СФ методу для іонів амонію становить $6 \cdot 10^{-6} \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

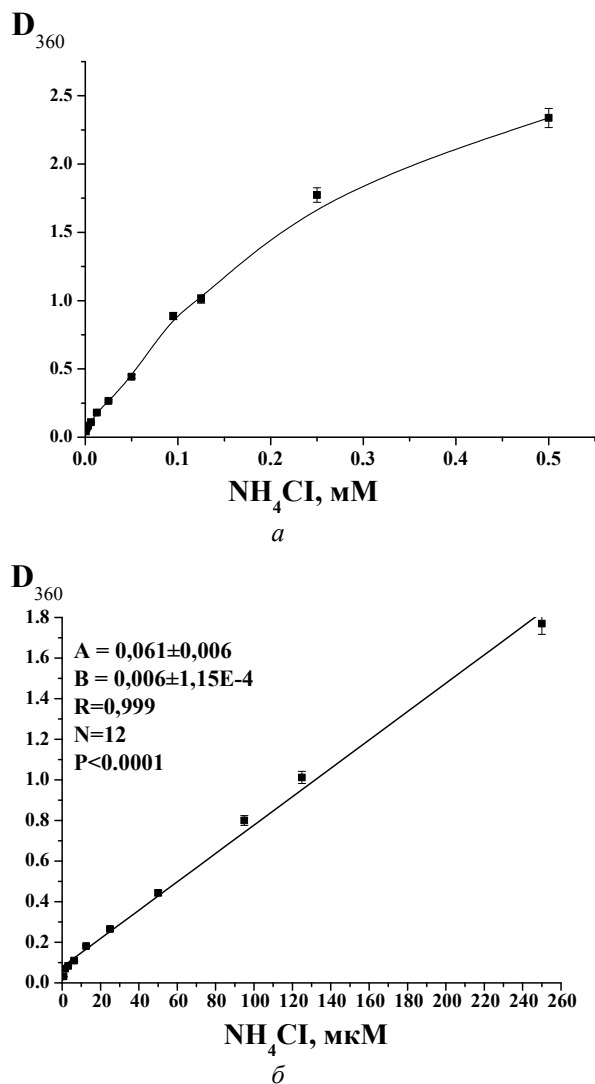


Рис. 3. Основні аналітичні параметри ОФА-СФ методу визначення амонію: *а* – залежність аналітичного сигналу від концентрації амонію у фотометрованій суміші; *б* – діапазон лінійності спектрофотометричного методу визначення амонію. Коефіцієнт В лінії регресії відповідає ξ_{MM} продукту реакції

На наступній стадії реакції – ензиматичній, за використання комерційної уреази – здійснювали спектрофотометричне калібрування за концентрацією сечовини (рис. 4).

Як видно із рис. 4, ξ_{MM} для ОФА-СФ – $9 \cdot 10^{-6} \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Лінійність визначення сечовини досліджуваним СФ методом знаходиться в діапазоні від 2 мМ до 250 мМ. Порівняння ξ_{MM} іонів амонію ($6 \cdot 10^{-6} \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та карбаміду ($9 \cdot 10^{-6} \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) свід-

чить про 80 %-ну конверсію карбаміду до продукту ензиматичного гідролізу.

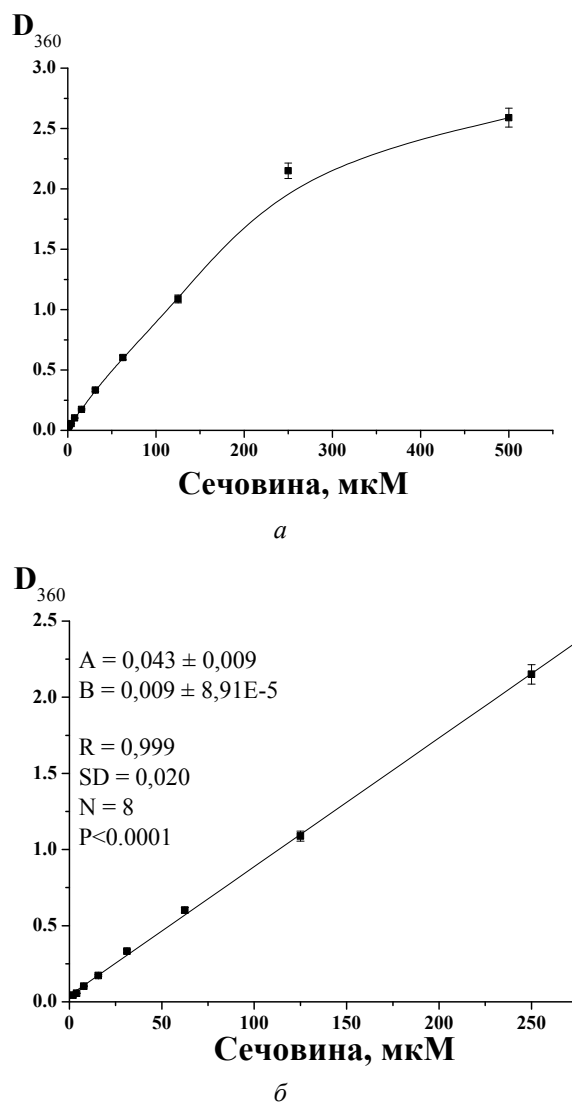


Рис. 4. Основні аналітичні параметри ОФА-СФ методу визначення сечовини: *а* – залежність аналітичного сигналу від концентрації сечовини у фотометрованій суміші; *б* – діапазон лінійності ензиматично-спектрофотометричного ОФА-СФ методу визначення сечовини. Коефіцієнт В лінії регресії відповідає ξ_{MM} продукту реакції

На рис. 5. (*а*, *б*) представлено результати по вивченню залежності оптичної густини реакційної суміші від концентрації L-Арг та встановлення діапазону лінійності для ОФА-СФ методу за оптимізованих умов аналізу. Лінійність калібрувальної кривої для аналізу L-Арг зберігається в межах 0,9 мкМ – 60 мкМ L-Арг у фотометрованій пробі. Порогова чутливість методу – 850 нМ. Порівняння ξ_{MM} сечовини ($0,009 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та L-Арг ($0,017 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) свідчить про 94 %-ну конверсію L-Арг до продукту ензиматичного гідролізу.

Для нового бі-ензимного ОФА-СФ методу досліджували селективність сигналу до різних амінокислот (за концентрації 100 мкМ).

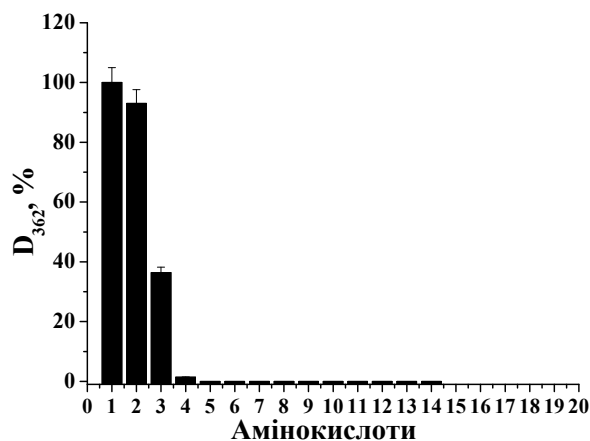
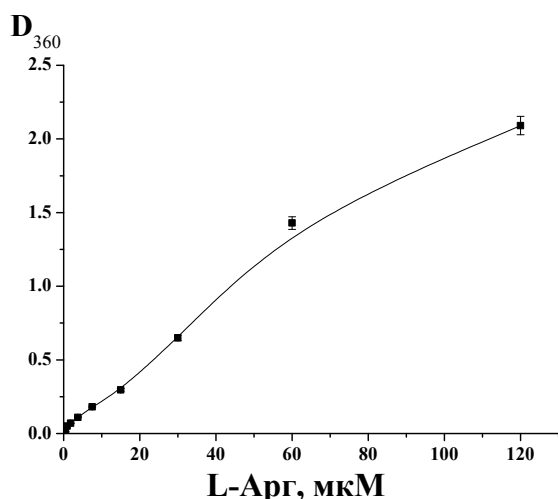


Рис. 6. Залежність світлопоглинання продукту взаємодії 0,1 мМ амінокислот з ОФА. Амінокислоти: 1 – L-Arg; 2 – Can; 3 – L-Glu; 4 – L-Gln; 5 – L-Lys; 6 – L-Pro; 7 – L-His; 8 – L-Ala; 9 – L-Cys; 10 – L-Leu; 11 – L-Tyr; 12 – L-Ser; 13 – L-Orn; 14 – L-Trp

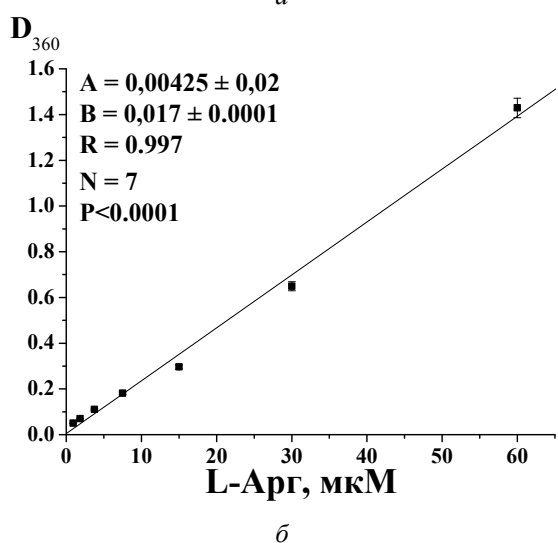


Рис. 5. Основні аналітичні параметри ОФА-СФ методу визначення L-Arg: *a* – залежність аналітичного сигналу від концентрації L-Arg у фотометрованій суміші; *б* – діапазон лінійності ензиматично-спектрофотометричного ОФА-СФ методу визначення L-Arg. Коефіцієнт *B* лінії регресії відповідає ξ_{MM} продукту реакції

Рівень селективності ензиматичного методу оцінювався у відносних одиницях (%) світлопоглинання відповідно до величини максимального сигналу, прийняту за 100 %. Як видно з рис. 6 спостерігається значний інтерферуючий вплив 0,1 мМ канаваніну (90 %) та глютамінової кислоти (38 %). Інші амінокислоти не реєструвались запропонованими методами, що можна пояснити високою селективністю аргінази I до природного субстрату – L-Arg. Позитивний сигнал на канаванін пов'язаний із здатністю гідролізувати цю амінокислоту з утворенням сечовини. Цей факт є мало суттєвим для аналізу реальних зразків, оскільки ця рідкісна амінокислота зустрічається, як правило, тільки в насінні деяких рослин [21].

Таким чином, запропонований ензиматичний метод кількісного визначення L-Arg характеризується більшою чутливістю (НМВ становить 850 нМ) у порівнянні із комерційним набором “Ензим-тест” (НМВ становить 2,100 мкМ) та функціональністю, що дозволяє визначати не лише один (L-Arg), а одразу три аналіти – L-Arg, сечовину та амоній (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняльний аналіз ензиматичних методів визначення L-Arg

Аналіт	Параметри	Метод			
		ОФА-СФ $\lambda=360$ нм [дана стаття]	“Ензим-тест” [22] $\lambda=340$ нм	ДМО-ФЛ [14] $\lambda_{ex}=380$ нм $\lambda_{em}=510$ нм	ДМО-СФ [23] $\lambda_{ex}=480$ нм
L-Arg	ЛД ¹ , μ М НМВ ² , μ М	0,95–60 0,85	2,9–100 2,10	0,06–200 0,045	7–100 5
Сечовина	ЛД, μ М НМВ, μ М	2,0–250 1,80	2,5–117 2,5	4,0–250 3,3	5,0–100 4,0
NH ₄ ⁺	ЛД, μ М НМВ, μ М	0,7–250 0,50	5,6–194,4 3,9	³ НВ	³ НВ

Примітка: ¹ЛД – лінійний діапазон, μ М, ²НМВ – нижня межа визначення, μ М, ³НВ – не визначали

Отже, у результаті проведених досліджень при розробці ензиматичного методу нами запропоновано новий підхід для аналізу L-Arg за використання ферментів (поєднання аргінази і уреазі)

та спектрофотометричної/флуоресцентної детекції кінцевого продукту (амонію), а також визначено оптимальний склад реакційної суміші та умови аналізу.

7. Висновки

1. Розроблено чутливий та селективний метод кількісного аналізу L-Арг із спектрофотометричним способом детектування продукту реакції (амонію) за допомогою ОФА. Метод базується на використанні високоочищеної аргінази I, одержаної нами за власною технологією із клітин дріжджового рекомбінантного штама-надпродуцента.

2. Встановлено, що новому методу властива висока порогова чутливість визначення L-Арг (850 нМ), широкий діапазон лінійності – 0,95 мкМ – 60 мкМ, а також нечутливість до інтерферуючого впливу широкого спектру амінокислот.

3. Запропонована методика є простою у виконанні, не потребує складної підготовки зразків до аналізу і може використовуватись для кількісного визначення вмісту L-Арг в біологічних рідинах та харчових продуктах.

Література

1. 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 et al. // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 76, Issue 7. – P. 1334–1342. doi: 10.1271/bbb.120086

2. Rotondo, R. Arginase II is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression [Text] / R. Rotondo, L. Mastracci, T. Piazza, G. Barisione, M. Fabbi, M. Cassanello et al. // *International Journal of Cancer*. – 2008. – Vol. 123, Issue 5. – P. 1108–1116. doi: 10.1002/ijc.23437

3. Lam, T. L. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis [Text] / T. L. Lam, G. K. Wong, H. Y. Chow, H.-C. Chong, T.-L. Chow, S.-Y. Kwok et al. // *Pigment Cell & Melanoma Research*. – 2011. – Vol. 24, Issue 2. – P. 366–376. doi: 10.1111/j.1755-148x.2010.00798.x

4. Glazer, E. S. Bioengineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma [Text] / E. S. Glazer, E. M. Stone, C. Zhu, K. L. Massey, A. N. Hamir, S. A. Curley // *Translational Oncology*. – 2011. – Vol. 4, Issue 3. – P. 138–146. doi: 10.1593/tlo.10265

5. Vynnytska-Myronovska, B. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation [Text] / B. Vynnytska-Myronovska, Y. Bobak, Y. Garbe, C. Dittfeld, O. Stasyk, L. A. Kunz-Schughart // *International Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 130, Issue 9. – P. 2164–2175. doi: 10.1002/ijc.26221

6. Morales, S. M. Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach [Text] / S. M. Morales // *An. Sist. Sanit. Navar.* – 2011. – Vol. 34, Issue 3. – P. 453–461.

7. 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. Bouyssié, A. Stella et al. // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2014. – Vol. 13, Issue 12. – P. 3421–3434. doi: 10.1074/mcp.m114.040121

8. 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

9. Costin, J. Selective determination of amino acids using flow injection analyses coupled with chemiluminescence detection [Text] / J. Costin, F. Paul, S. Lewis // *Anal. Chim. Acta*. – 2003. – Vol. 408, № 1. – P. 67–77.

10. Fritz, J. H. Arginine cools the inflamed gut [Text] / J. H. Fritz // *Infection and Immunity*. – 2013. – Vol. 81, Issue 10. – P. 3500–3502. doi: 10.1128/iai.00789-13

11. Гайда, Г. З. Методи аналізу L-аргініну [Текст] / Г. З. Гайда, Н. Є. Стасюк, М. В. Гончар // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Vol. 7, Issue 1. – P. 31–39. doi: 10.15407/biotech7.01.031

12. Stasyuk, N. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease [Text] / N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda et al. // *J. Mater. Sci. Eng. A*. – 2011. – Vol. 1, Issue 6. – P. 819–827.

13. Stasyuk, N. Bi-enzyme L -arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode [Text] / N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, B. Vus, Y. Koval'chuk, M. Gonchar // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – Vol. 37, Issue 1. – P. 46–52. doi: 10.1016/j.bios.2012.04.031

14. 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

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

16. 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

17. Стасюк, Н. Синтез афінних сорбентів для очищення аргінази I людини із рекомбінантних дріжджів *Hansenula polymorpha* [Текст] / Н. Стасюк, Г. Гайда, А. Гайда та ін. // *Праці НТШ. Сер. “Хемія і Біохемія”* – 2011. – Т. 28. – С. 139–149.

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

19. Kuo, M. T. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes [Text] / M. T. Kuo, N. Savaraj, L. G. Feun // *Oncotarget*. – 2010. – Vol. 1, Issue 4. – P. 246–251.

20. Goyal, S. Determination of ammonium ion by fluorometry or spectrophotometry after on-line derivatization with o-phthalaldehyde [Text] / S. Goyal, D. Rains, R. Huffaker // *Analytical Chemistry*. – 1988. – Vol. 60, Issue 2. – P. 175–179. doi: 10.1021/ac00153a016

21. Ekanayake, S. Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): analysis and effect of processing [Text] / S. Ekanayake, K. Skog, N. G. Asp // *Food and Chemical Toxicology*. – 2007. – Vol. 45, Issue 5. – P. 797–803. doi: 10.1016/j.fct.2006.10.030

22. L-Arginine/Urea/Ammonia, UV method [Electronic resource]. – Available at: <https://www.nzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/>

23. 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. – Vol. 1. – P. 31–37.

References

1. 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

2. Rotondo, R., Mastracci, L., Piazza, T., Barisione, G., Fabbì, M., Cassanello, M. et al. (2008). Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression. *International Journal of Cancer*, 123 (5), 1108–1116. doi:10.1002/ijc.23437

3. Lam, T.-L., Wong, G. K. Y., Chow, H.-Y., Chong, H.-C., Chow, T.-L., Kwok, S.-Y. et al. (2010). Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24 (2), 366–376. doi: 10.1111/j.1755-148x.2010.00798.x

4. Glazer, E. S., Stone, E. M., Zhu, C. et al. (2011). Bi-engineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma. *Transl. Oncol*, 4 (3), 138–146.

5. Glazer, E. S., Stone, E. M., Zhu, C., Massey, K. L., Hamir, A. N., & Curley, S. A. (2011). Bioengineered Human Arginase I with Enhanced Activity and Stability Controls Hepatocellular and Pancreatic Carcinoma Xenografts. *Translational Oncology*, 4(3), 138–146. doi:10.1593/tlo.10265

6. Morales, S. M. Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach. (2011). *An. Sist. Sanit. Navar*, 34 (3), 453–461.

7. 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

8. 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

9. Costin, J., Paul, F., Lewis, S. (2003). Selective determination of amino acids using flow injection analyses coupled with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta.*, 408 (1), 67–77.

10. Fritz, J. H. (2013). Arginine Cools the Inflamed Gut. *Infection and Immunity*, 81 (10), 3500–3502. doi: 10.1128/iai.00789-13

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

12. Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G. et al. (2011). A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. *J. Mater. Sci. Eng. A.*, 1 (6), 819–827.

13. Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G., Vus, B., Koval'chuk, Y., Gonchar, M. (2012). Bi-enzyme l-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 37 (1), 46–52. doi: 10.1016/j.bios.2012.04.031

14. Stasyuk, N. E., Gaida, G. Z., Gonchar, M. V. (2013). L-arginine assay with the use of arginase I. *Appl Biochem Microbiol*, 49 (5), 529–534. doi: 10.1134/s000368381305013x

15. 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

16. Gaede, G., Grieshaber, M. (1975). A rapid and specific enzymatic method for the estimation of l-arginine. *Analytical Biochemistry*, 66 (2), 393–399. doi: 10.1016/0003-2697(75)90606-5

17. Stasyuk, N., Gayda, G., Gayda, A. et al. (2011). The synthesis of affinity sorbents for purification of human arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. *Proc. Shevchenko Sci. Soc. Ser. Biochem*, 28, 139–149.

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

19. Kuo, M. T., Savaraj, N., Feun, L. G. (2010). Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget*, 1 (4), 246–251.

20. Goyal, S. S., Rains, D. W., Huffaker, R. C. (1988). Determination of ammonium ion by fluorometry or spectrophotometry after on-line derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical Chemistry*, 60 (2), 175–179. doi: 10.1021/ac00153a016

21. Ekanayake, S., Skog, K., Asp, N.-G. (2007). Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (5), 797–803. doi: 10.1016/j.fct.2006.10.030

22. L-Arginine/Urea/Ammonia, UV method. Available at: <https://www.nzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/>

23. 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.

Дата надходження рукопису 22.05.2015

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

E-mail: stasuk_natalia@ukr.net

Басс Софія Ростиславівна, Львівський національний університет ім. Івана Франка, вул. Грушевського 4, м. Львів, Україна, 79005

E-mail: bass8@ukr.net

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

E-mail: galina.gayda@gmail.com

Хасмік Суренівна Єпрмян, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник, Науковий Центр «Армбіотехнологія» НАН Вірменія, вул. Гуріян 14, м. Єреван, Вірменія, 0056

E-mail: blackeye03@rumbler.ru

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