

Теоретическая и профилактическая медицина

УДК 615.2+616-092.9

**Изменение уровня и активности
антиоксидантных и прооксидантных
металлопротеинов тканей крыс под влиянием
L-аргинина****¹М.С.Товмасян, ¹Г.С.Хачатрян, ²Р.М.Симонян,
¹Р.Г.Бороян, ²М.А.Симонян**¹ЕГМУ им. М.Гераци, кафедра клинической фармакологии²Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА

0025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: металлопротеины, ткань, L-аргинин

В биологических системах нитроксильный радикал ($\text{NO}^\bullet$) образуется нитритоксидсинтазой (НОС) из гуанидиновой группы L-аргинина. NO реагирует с активными формами кислорода (АФК) различного характера и с переходными металлами. Взаимодействуя с супероксидными радикалами (O_2^-), NO образует пероксинитрильный радикал ($^-\text{ONOO}^\bullet$), который далее превращается в NO_2 и гидроксильный радикал ($\text{HO}^\bullet$). Этим $\text{NO}^\bullet$ оказывает двойственный эффект: стимулирует липидную пероксидацию биомембран, оказывая прооксидантный эффект и нейтрализует O_2^- , оказывая антиоксидантный эффект. L-аргинин в отличие от D-аргинина увеличивает уровень более токсичного для биосистем $^-\text{ONOO}$ путем повышения уровня NO . Взаимодействия NO *in vitro* и *in vivo* существенно отличаются [5]. L-Аргинин и D-аргинин нейтрализуют O_2^- , продуцируемые в системе ксантин-ксантиноксидазы, ингибируют процесс прилипания фагоцитов и их АФК-продуцирующий потенциал *in vitro*. Этим L-аргинин оказывает антиоксидантный эффект [7]. Хронически вводимый диетический L-аргинин (2,5%) существенно подавляет продуцирование АФК и перекисного окисления липидов (ПОЛ), повышает уровень сывороточных нитритов у обезьян с гиперхолестеринемией [6]. Гидрохлорид L-аргинина (120мг/100г массы крыс), вводимый внутривентриально, повышает мембранную текучесть и снижает ПОЛ в эритроцитарных мембранах (ЭМ) при гипоксии крыс на фоне увеличения активности супероксиддисмутазы (СОД) (64%) и каталазы (46%) [9]. L-аргинин вызывает антиоксидантный и кардиопротективный эффект на изолированное перфузируемое сердце крыс [12].

Физиологическая доза нитроксила в крови составляет $10^{-7}M$, однако при воспалительных процессах уровень этого радикала повышается до $10^{-6}M$ и выше. При инкубации крови с $10^{-7}M$ NO наблюдается процесс усиления деформации эритроцитов. $10^{-5}M$ NO снижает текучесть липидов, $10^{-3}M$ NO вызывает повышение концентрации метгемоглобина и усиление деформации эритроцитов [8]. С другой стороны, ЭМ высокопроницаемы для NO и участвуют в процессе утилизации этих радикалов.

Однако до сих пор комплексно не определены молекулярно-биохимические механизмы воздействия L-аргинина на уровень и активность ключевых металлопротеинов (МП) – регуляторов метаболизма АФК.

Цель работы – определить характерные количественные и качественные изменения металлопротеинов антиоксидантной активности – МАА (Cu,Zn-СОД, Mn-СОД, каталаза, церулоплазмин и трансферрин) и металлопротеинов прооксидантной активности – МПА (новые изоформы цитохрома (цит) b558 крови и других тканей, а также супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки крови) после инкубирования в аэробных условиях L-аргинина с этими МП *in vitro* и с гомогенатами тканей *ex vivo*.

Материал и методы

В опытах *in vitro* определенные количества лиофилизированных препаратов МАА и МПА были инкубированы с 20мг/мл L-аргинином фирмы «Ликвор» в аэробных условиях при 4° в течение 48 ч. Были использованы следующие препараты МАА: Cu,Zn-СОД – по 5 мг, церулоплазмин – по 20 мг, трансферрин – по 20 мг и каталаза – по 10 мг (эти белки имели электрофоретически гомогенное состояние). Из МПА были использованы электрофоретически гомогенные препараты изоформ сывороточных цит b558I и цит b558II, цит b558III, из эритроцитарных мембран (ЭМ) и цит b5 из цитозоля эритроцитов. Супрол и изоформы цит b558 из мембран клеток селезенки (МКС) и мембран клеток печени (МКП) имели 92-95% чистоты. Эти белки были получены биотехнологическим (препаративным) способом [3], без использования детергента, который снижает стабильность цит b558 [4]. Белки были растворены в 3 мл 0,04М калий-фосфатном буфере (КФБ), pH=7,4. В контрольных опытах МАА и МПА инкубировали в аналогичных условиях в отсутствие L-аргинина.

В опытах *ex vivo* 20мг/мл L-аргинина инкубировали с гомогенатами селезенки и печени, а также с кровью крыс в аэробных условиях при 4°С в течение 5 дней. В контрольных опытах инкубирование гомогенатов осуществляли в аналогичном режиме в отсутствие L-аргинина. Гомогенизацию селезенки и печени проводили на лабораторном

гомогенизаторе со скоростью вращения ножей 2000 оборотов в мин в течение 2 мин в 30 и 50мл 0,04М КФБ при 4°C соответственно. При этом были использованы ткани печени (по 20г) и селезенки (по 10г), которые подверглись перфузии физиологическим раствором. После инкубирования гомогенатов тканей и крови с L-аргинином осуществляли одновременное и комплексное получение МАА и МПА из этих объектов. Растворимые белковые фракции сыворотки, цитозоля эритроцитов, клеток селезенки и печени, а также белковые фракции МКС и МКП после их солюбилизации при pH 9 и выше [10] и после диализа против воды (используется только дистиллированная вода) и центрифугирования подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ-52, КМ-52 («Whatman», Англия) и сефадексе ДЕАЕ А-50 («Pharmacia», Швеция) и гель-фильтрации на сефадексе G-150 («Pharmacia»). Часть ЭМ, МКС, МКП (5мл) отделяли для определения активности цит b558 в гетерогенной фазе. Изоформы цит b558 МКС и МКП в отличие от цит b558 ЭМ имеют нейтральный характер, но по оптико-спектральным и другим показателям и активностям являются новыми изоформами, обладающими НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активностью [10]. Таким образом, были получены следующие МАА – Cu,Zn-СОД и каталаза из цитозоля эритроцитов, церулоплазмин и трансферрин – из сыворотки крови и следующие МПА – 2 новые изоформы цит b558 из сыворотки крови и цитb558III из ЭМ, цит b558 из МКС и МКП, супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол, а также цит b5 из цитозоля эритроцитов.

Количество МП определяли оптическим спектральным методом, путем измерения плотности характерного максимального оптического поглощения для цит b5 при 525нм, изоформ цит b558 – 530нм, супрола – 430нм, церулоплазмينا – 610нм и трансферрина – 470нм. СОД-активность и O_2^- -продуцирующую активность супрола и изоформ цит b558 ЭМ, сыворотки, МКС и МКП в гомогенной и гетерогенной фазах определяли нитротетразолиевым синим (НТС) путем вычисления процента ингибирования (в случае СОД) или стимулирования образования формазана (при 560 нм), в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности или O_2^- -продуцирующей активности принимали количество белка, которое соответственно подавляет или стимулирует образование формазана на 50%. Супероксидпродуцирующую активность супрола и изоформ цит b558 определяли и методом восстановления цит С (последний получали из митохондрий сердца крыс до электрофоретически гомогенного состояния биотехнологическим способом путем ионообменной хроматографии фракции цит С на целлюлозе КМ-52, гель-фильтрации на сефадексе G-25).

МетHb-восстанавливающую активность новых изоформ цит b558 из ЭМ, МКС и МКП [11] в гомогенной фазе определяли, используя свежеполученный метHb (ферриHb) крови крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения альфа-полосы (при 565нм) 0,8. При этом величина плотности максимального оптического поглощения бета-полосы цит b558III в реакционной смеси составляла 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3мл раствора метHb добавляли 0,2мл цит b558III (при $A_{530} = 0,45$). После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16ч при 30°C. После повторного перемешивания смеси определяли кинетику восстановления ферриHb до ферроHb путем измерения снижения плотности альфа-поглощения ферриHb (это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb, который имеет поглощение при 555нм). Для определения метHb-восстанавливающей активности цит b558 в гетерогенной фазе (в ЭМ, МКС, МКП) к ферриHb добавляли 0,2мл ЭМ, МКС и МКП смешивали с 0,04М КФБ. За единицу метHb-активности принимали количество цит b558, снижающее плотность оптического поглощения альфа-полосы метHb до 0,1 за 1ч при 30°C.

Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода в присутствии и отсутствие каталазы. За единицу каталазной активности принимали то количество фракции (белка), которое расщепляет 0,1М перекиси водорода в течение 1 мин при 20 °C.

Для определения цит С-восстанавливающей активности супрола и изоформ цит b558 к 4мл раствора цит С (при $A_{520} = 0,2$) добавляли по 0,4мл этих белков с плотностью оптического поглощения 0,3 при 430нм для супрола и при 530нм для изоформ цит b558. Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Spesogd M-40» (Германия) с длиной оптического пути 1см при 20°C.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности Р.

Результаты и обсуждение

Направленность изменений уровня и активности МАА под влиянием L-аргинина сохраняется *in vitro* и *ex vivo* (таблица, а). При этом наблюдается некоторое снижение уровня церулоплазмينا *ex vivo*, но *in vitro* L-аргинин не вызывает изменения уровня этого металлопротеина-белка острой фазы [1]. Количество трансферрина в опытах *in vitro* снижено больше, чем в опытах *ex vivo*. Не исключается, что L-аргинин может улавливать ионы железа у голотрансферрина и сни-

жать его поглощение при 470нм. L-аргинин не изменяет активность изоформ супероксиддисмутазы (Cu, Zn-СОД и Mn-СОД) из цитозоля эритроцитов, клеток селезенки и печени. Однако L-аргинин вызывает резкое повышение активности каталазы из цитозоля эритроцитов, цитозоля селезенки и печени. Механизм такого действия L-аргинина пока трудно интерпретировать. Этим может быть обусловлен антиоксидантный эффект L-аргинина [6,9,12]. Активирование каталазы L-аргином является важным фактором защиты биосистем от повреждающих эффектов перекиси водорода, в первую очередь от продукта его расщепления гидроксильного радикала – самого сильного окислителя для биосистем. Такой эффект L-аргинина существеннее при воздействии с каталазой селезенки и особенно печени (таблица, а). Используемая доза L-аргинина подобрана на том основании, что в этих условиях низкие дозы L-аргинина мало эффективны. Повышение этих доз (20-25 мг/мл) в большинстве приводит к понижению рН среды (к тому же эти дозы не физиологические).

Уровень же МПА под влиянием L-аргинина изменяется по-разному (таблица, б). Если *in vitro* L-аргинин не вызывает изменения уровня изоформ цит b558 крови, то уровень изоформ цит b558 МКС и МКП существенно снижен. Возможно, что это связано с повышением степени агрегации этих гемопротеинов в МКС и МКП, под влиянием L-аргинина. Под влиянием L-аргинина процесс агрегации этих цитохромов МКС и МКП (они имеют изоэлектрическую точку 7), видимо, больше, чем таковой у цит b558III ЭМ (последний является белком кислого характера с изоэлектрической точкой 5,3). Можно предположить, что *in vitro* L-аргинин не вызывает нарушения микроструктуры ЭМ, гемопротеиновым компонентом которого является и цит b558III, но существенно изменяет микроструктуру МКС и МКП, что нельзя считать положительным эффектом L-аргинина (агрегация изоформ цит b558 препятствует процессу их солюбилизации). В опытах *in vitro* L-аргинин не влияет на уровень (оптико-спектральные характеристики) цит С из митохондрий клеток селезенки и печени.

В опытах *ex vivo* направленность этих изменений несколько отличается. На фоне повышения уровня цит b5 цитозоля эритроцитов, цит b558III ЭМ, супрола и цит С наблюдается снижение уровня изоформ сывороточных цит b558 и цит b558 МКС и МКП. Механизмы снижения уровня цит b558 МКС и МКП *ex vivo*, видимо, не отличаются от такового *in vitro*. Однако снижение уровня изоформ цит b558 и повышение уровня супрола сыворотки, возможно, обусловлено тем, что L-аргинин вызывает увеличение активности каталазы и отпадает необходимость формирования сывороточных цит b558, которые, по предварительным данным, обладают некоторой каталазомиметической активностью [2]. Стабилизация супрола L-аргином считается важным

фактором сохранения микровязкости крови и, в целом, обеспечения микроциркуляции крови.

Направленность изменений НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей активности изоформ цит b558 ЭМ, МКС и МКП под влиянием L-аргинина сохраняется. Наблюдается снижение НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей активности изоформ цит b558 ЭМ, МКС и МКП как в гомогенной фазе (в растворе), так и мембранах клеток (гетерогенная фаза) (таблица, в). Эта активность резко снижена у цит b558 МКС. Снижение этой активности может также считаться антиоксидантным эффектом L-аргинина. Однако изоформы цит b558 различного характера являются ключевыми компонентами для НАДРН оксидазы, локализованной в клетках иммунной системы, для продуцирования АФК, в первую очередь O_2^- при фагоцитозе, для нейтрализации антигенов [13]. Снижение уровня и O_2^- -продуцирующей активности изоформ цит b558 L-аргинином может ослабить иммунную защиту организма.

Интересно и то обстоятельство, что в отличие от цит b558III ЭМ, цит b558 МКС и МКП продуцируют O_2^- без добавления НАДРН Na_2 более медленно, чем при добавлении последнего. Продуцирование O_2^- восстанавливает цит С (СОД подавляет это восстановление). Процесс такого восстановления цит С существенно подавлен под влиянием цит МКС и МКП (таблица, г). Эти данные свидетельствуют о том, что L-аргинин проникает не только через ЭМ [9], но и через МКС и МКП. Подавление супероксидпродуцирующей активности супрола (соответственно снижение скорости восстановления цит С супролом) также наблюдается под влиянием L-аргинина, что является его антиоксидантным эффектом.

Направленность изменений метHb-восстанавливающей активности изоформ цит b558 ЭМ, МКС и МКП под влиянием L-аргинина *in vitro* и *ex vivo* одинаковая. L-аргинин вызывает повышение метHb-восстанавливающей активности изоформ цит b558, особенно у цит b558 МКС и МКП в гомогенной фазе. Это считается положительным фактором регулирования кислородного гомеостаза, так как только оксиHb (но не метHb) способен переносить молекулярный кислород к клеткам. При анемиях различного характера уровень метHb вместо 3% повышается до 20-25%.

Таблица

Относительное изменение (%) уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов тканей крыс после 48ч инкубирования металлопротеинов с 20мг/мл L-аргинином при 4°C и после пятидневного инкубирования гомогенатов тканей с L-аргинином в аналогичных условиях *in vitro* (полученные данные сравнены со 100% контрольными показателями, полученными в отсутствие L-аргинина), $P < 0,05$, $n = 6$

а. Изменение уровня и активности антиоксидантных металлопротеинов

Металлопротеины	<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>
1	2	3
Уровень церулоплазмина	нет изменений	- 15,5±2,6
Уровень трансферрина	-18,5±3,1 ($P < 0,03$)	- 12,2±0,9
Активность Cu,Zn-СОД из цитозоля эритроцитов	нет изменений	нет изменений
Активность суммарной фракции Cu,Zn-СОД и Mn-СОД из цитозоля клеток селезенки	нет изменений	нет изменений
Активность суммарной фракции Cu,Zn-СОД и Mn-СОД из цитозоля печени	нет изменений	нет изменений
Активность каталазы из цитозоля эритроцитов	+18,6±3,7	+ 41,3±4,5 ($P < 0,03$)
Активность каталазы из цитозоля клеток селезенки	+ 44,3±4,5	+ 61,2±5,2
Активность каталазы из цитозоля клеток печени	+ 87,1±8,3 ($P < 0,03$)	+ 72,4 ±6,1

б. Изменение уровня прооксидантных металлопротеинов

1	2	3
Цит b5 из цитозоля эритроцитов	нет изменений	+ 15,4±2,6
Изоформы сывороточных цит b558I и II	нет изменений	- 25,1±2,7
Цит b558III ЭМ	нет изменений	+ 33,4±4,5
Фракция цит b558 из МК селезенки	- 50,2±5,8 (P<0,03)	- 54,5±4,6
Фракция цит b558 из МК печени	-10,6±1,6	-51,5±7,3
Супрол из сыворотки крови	нет изменений	+ 22,7±2,0
Цит С из цитозоля клеток селезенки	нет изменений	+ 48,7±5,2 (P<0,03)
Цит С из цитозоля клеток печени	нет изменений	+ 18,6±4,1

в. Изменение НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности прооксидантных металлопротеинов (изоформы цит b558 и супрол)

1	2	3
Цит b558 из ЭМ (гомогенная фаза)	-12,1±2,2	-14,7±3,1
Цит b558 в ЭМ (гетерогенная фаза)	-6,8±0,8	-12,0±1,3
Цит b558 из МК селезенки (гомогенная фаза)	- 101,2±8,6	+ 10,4±1,1
Цит b558 в МК селезенки (гетерогенная фаза)	-34,7±4,3 (P<0,03)	+ 23,1±4,4(P<0,03)
Цит b558 из МК печени (гомогенная фаза)	- 17,1±2,5	- 50,5±4,9
Цит b558 в МК печени (гетерогенная фаза)	- 12,7±1,8	+ 4,8±0,6
O_2^- -продуцирующая активность супрола	- 19,2±3,9	- 21,8±3,3

г. Изменение цит С-восстанавливающей активности изоформ цит b558 и супрола

1	2	3
Цит b558 из ЭМ	нет изменений	нет изменений
Цит b558 из МК селезенки (гомогенная фаза)	- 55,6±5,7 (P<0,03)	- 36,1±4,6
Цит b558 в МК селезенки (гетерогенная фаза)	-	- 56,1±4,7(P<0,03)
Цит b558 из МК печени (гомогенная фаза)	-30,0±2,7	-41,7±4,8
Цит b558 в МК печени (гетерогенная фаза)	-	- 21,5±3,0
Супрол	- 41,5±4,7	-

д. Изменение метНб-восстанавливающей активности изоформ цит b558

1	2	3
Цит b558П из ЭМ (гомогенная фаза)	+ 24,3±2,5	+ 10,8±1,7
Цит b558 в ЭМ (гетерогенная фаза)	+ 31,7±3,8	+ 14,9±2,4
Цит b558 из МК селезенки (гомогенная фаза)	+ 81,8±5,3 (P<0,03)	+ 36,7±4,4(P<0,03)
Цит b558 в МК селезенки (гетерогенная фаза)	+ 24,5±3,2	+ 19,6±4,0
Цит b558 из МК печени (гомогенная фаза)	+ 66,7±8,1(P<0,03)	+ 29,3±3,8 (P<0,03)
Цит b558 в МК печени (гетерогенная фаза)	+ 14,3±1,8	+17,1±3,8

Таким образом, молекулярно-биохимические механизмы воздействия L-аргинина на уровень и активность ключевых МАА и новых типов МПА ассоциированы с характерным изменением уровня НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности МПА. Механизмы антиоксидантного воздействия L-аргинина *in vitro* и *ex vivo* обусловлены резким повышением каталазной активности, снижением НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ цит b558 МКС и МКП, а также O_2^- -продуцирующей активности супрола. Эти изменения ассоциированы, возможно, с регулированием кислородного гомеостаза путем повышения метНб-восстанавливающей активности изоформ цит b558 под влиянием L-аргинина.

Поступила 08.02.08

Ամենտի հյուսվածքների հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների մակարդակների և ակտիվությունների փոփոխությունները L-արգինինի ազդեցության ներքո

Մ. Ս. Թովմասյան, Գ.Ս. Խաչատրյան, Ռ.Մ. Միմոնյան,
Ռ.Ղ. Բորոյան, Մ.Ա. Միմոնյան

Հետազոտության առաջին փուլում որոշվել է L-արգինինի (20մգ/մլ) հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների՝ ՀԱՄ (Cu, Zn-ՍՕՂ, Mn-ՍՕՂ, ցերուլոպլազմին և տրանսֆերին) և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների՝ ՊԱՄ (ցիտ b558 նոր իզոմերերի քիթրոցիտների քաղանքներից, լյարդի և փայծաղի բջջաթաղանթներից, արյան շիճուկից և սուպրոլ՝ արյան շիճուկից) կրած որակական և քանակական փոփոխությունները L-արգինինի հետ 48 ժամ աերոք պայմաններում 4⁰-ում *in vitro* ինկուբացումից հետո: Հետազոտության երկրորդ փուլում մույն քանակի արգինինն արդեն ինկուբացվում է արյան, լյարդի և փայծաղի հոմոգենատների հետ 5 օր, մույն պայմաններում՝ *ex vivo*, ապա անջատելով այդ օբյեկտներից ՀԱՄ և ՊԱՄ որոշվել է դրանց բնութագրական փոփոխությունները: L-արգինինի՝ ՀԱՄ և ՊԱՄ վրա *in vitro* և *ex vivo* թողած ազդեցության մոլեկուլային-կենսաքիմիական մեխանիզմները կապված են կատալազայի ակտիվության կտրուկ աճի, ՊԱՄ-երի սուպերօքսիդ-նադիկալ գոյացման ակտիվության և քանակների ընկճման, ինչպես նաև դրանց մետНб վերականգնման աճման հետ:

The changes in the level and activity of the antioxidative and prooxidative metalloproteins of the rat tissues under the influence of L-arginine

M.S.Tovmasyan, G.S. Khachatryan, R.M. Simonyan, R.G.Boroyan,
M.A.Simonyan

In the first stage of the study the characteristic quantitative and qualitative changes of the antioxidative activity metalloproteins - AAM (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, catalase, ceruloplasmin, transferrin) and prooxidative activity metalloproteins - PAM (Cyt b5 and new isoforms of cyt b558 from erythrocyte membranes, blood serum, spleen and liver cell membranes, as well as suprol from blood serum) after the incubation of these metalloproteins with L-arginine (20 mg/ml) during 48 hrs in aerobic condition *in vitro* are determined. In the second series of experiments the characteristic quantitative and qualitative changes of the AAM and PAM are determined after incubation in the similar conditions of L-arginine with the blood and homogenates of the spleen and liver tissues during 5 days *ex vivo*, and subsequent isolation and determination of the properties of these metalloproteins. The molecular-biochemical mechanisms of L-arginine influence on the AAM and PAM *in vitro* and *ex vivo* are associated with the sharp elevation of the catalase activity, with the decrease of the PAM's O_2^- -producing activity level and increase in the metHb-reducing activity.

Литература

1. Мжелская М.И. Биологическая функция церулоплазмينا и его дефицит при мутации генов, регулирующих обмен меди и железа. Бюл. эксп. биол. мед., 2000, 130(8), с.124-132.
2. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. Высокая резистентность сывороточных цитохромов b558I и b558II против перекиси водорода, по сравнению с другими гемопротеинами. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. ЕрГМУ им. М.Гераца, 1999, с.48-51.
3. Симонян М.А., Симонян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобрет. N 341 Армпатента, Ереван, 1997.
4. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. N908 Армпатента, Ереван, 2001.
5. Cristol J.P., Moggi M.F., Guerin M.C. et al. Nitric oxide and lipid peroxidation, C.R. Seances Soc.Biol.Fil., 1995, 189(5), p. 797-809.
6. Dhawan V., Handu S.S., Nain C.K., Ganguly N.K. Chronic L-arginine supplementation improves endothelial cell vasoactive functions in hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys, Mol.Cell Biochem., 2005, 269(1-2), p. 1-11.
7. Haklar G., Ulukaya D.C., Yuksel M. et al. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester, Clin.Exp.Pharmacol., 1998, 25(11), p. 908-912.
8. Mesquita R., Picarra B., Saldanha C., Martines S.J. NO effects on human erythrocytes structural and functional properties: an *in vitro* study, Clin.Hemorheol.Microcirc., 2002, 27(2), p. 137-147.

9. *Mogilintskaya L.V., Fan A. et al.* Effects of arginine on properties of the erythrocyte membranes in hypoxia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1992, 113 (5), p. 457-498.
10. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* The reduction of ferrihemoglobin by erythrocytes membranes cytochrome b558III at various pathological states *in vitro*, *NAS RA Electr. J. Natural Sciences*, 2006, 2(7), p. 3-6.
11. *Skliarov O.Ja., Fedevych Ju.M., Melekh O.Ja., Stadnyk V.V.* Effect of L-arginine on antioxidant system and IAAPH -dependent methemoglobin reductase activity in rats blood, *Fiziol. Zh.*, 2006, 52(2), p. 74-79.
12. *Suessenbacher A., Lass A., Mayer B., Brunner F.* Antioxidative and myocardial protective effects of L-arginine on oxygen radical-induced injury of isolated perfused rat hearts, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2002, 365(4), p. 269-267.
13. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, 59(9), p. 1428-1459.A