

ԱԵՒ ԾԵՒ ԵՅ

УДК 611.36.546.171.1

Բ. Ա. Ի աճիւյի, Ա. Ն. Ի ԵնաԵյի, Ա. Ա. Օոժոյի, Ա. Ա. ԱիժԵյի

ԸիԵյ իԵԵնԵ աճիժա ա իաժաճիաաիԵԵ Ե օնժժաի աիԵԵ ա ի ԵաԵա ա իա:աիի:իԵ ԵժաիԵ

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 21/II 2006)

ԵԵր-աաժա նԵիաա: *окись азота, образование и устранение аммиака*

В регуляции работы сердечно-сосудистой системы большую роль играет окись азота, механизм действия которого как релаксирующего фактора гладких мышц сосудов осуществляется через образование цГМФ [1-3].

Окись азота - свободный радикал, являющийся производным газа азота с неспаренным, непарным электроном ($\cdot\text{N}=\text{O}$). Это соединение, оказавшееся эндогенным веществом, образуется в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, нейронах, глиальных и других клетках и тканях [4,5] из аминокислоты аргинина под действием NO синтазы (NOS) с участием кислорода и АТФ [6, 7]. Кофактором этой реакции служат НАДФН, тетрагидробиоптерин, ФМН и ФАД. NOS относится к классу гемсодержащих цитохромов подобно цитохрому P-450, цитохромоксидазе и миоглобину.

NO сам по себе менее активный, чем другие свободные радикалы, но становится высокоактивным, легко взаимодействуя с другими внутриклеточными соединениями, такими как супероксид анион, железо, молекулярный кислород и др., чем объясняется короткая продолжительность его жизни - несколько секунд [8]. В организме NO в зависимости от его количества превращается в различные физиологические и токсические соединения, чем и объясняется широкий спектр его действия. Из NO образуются пероксинитрит (ONOO^-), нитроксил анион (NO^-), ион нитрозония (NO^+), пероксинитритная кислота (HOONO), HO· радикал, NO_3^- , NO_2^- , H^+ , липидные перекиси, нитрированные белки. Агрессивные интермедиаты NO способны оказывать действие на различные внутриклеточные мишени и повреждать биологические структуры путем окисления или нитрозирования, вызывая

апоптоз и некроз [9]. NO играет важную роль в функциональной деятельности головного мозга, являясь своеобразным нейромедиатором ЦНС [10]. NO играет значительную роль в развитии многих патологических процессов, в том числе нейродегенеративных заболеваний.

В литературе имеются данные относительно роли NO в механизме действия аммиака, количество которого значительно увеличивается при различных патологических состояниях печени. Установлено, что при гипераммонемии причиной интоксикации и смерти является активирование глутаматных НМДА рецепторов и, в конечном счете, усиление синтеза NO в головном мозге [11]. В связи с этим представляло интерес изучение роли NO в образовании и устранении аммиака непосредственно в печеночной ткани.

Работа выполнена на зрелых белых крысах популяции Вистар, массой 120-130 г. Животных быстро декапитировали, извлекали печень и после удаления кровеносных сосудов и остатков крови готовили 10%-ный гомогенат в специально подобранном К-фосфатном буфере, молярность которого сахарозой доводили до 0.32 М. Активность глутаматдегидрогеназы определяли ранее описанным методом [12, 13]. Реакционную смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин в атмосфере воздуха, затем белки осаждали 40%-ным ТХУ (конечная концентрация 4%), спустя 20 мин пробы центрифугировали при 3.5 тысячи об/мин в центрифуге К-24 в течение 15 мин и в надосадочной жидкости определяли содержание аммиака и глутамина микродиффузионным методом [14]. Белок определяли по Лоури и соавт. [15]. Содержание реагентов в инкубационной среде составляло в конечных концентрациях: глутамата (ГК) 10 mM, малоната 20 mM, витамина К₃ (менадиона) 0.02 mM, аминокуанидина 0.9 mM, L-НАМЭ (N-нитро-L-аргинин метил эстер) 0.9 mM. Указанные реагенты были приобретены из Sigma Chemical Company, остальные являлись коммерческими.

При добавлении ГК к препаратам различных органов, в том числе печени, в которой представлена самая высокая активность глутаматдегидрогеназы, его окислительное дезаминирование не выявляется, причиной чего является чрезмерная восстановленность пиридиннуклеотидных коферментов. При добавлении малоната и витамина К₃ коферменты окисляются, в результате чего происходит окислительное дезаминирование ГК в митохондриях мозга белых крыс [12, 13].

Наши исследования показали, что при добавлении малоната и витамина К₃ к гомогенатам печени из ГК образуется заметное количество свободного аммиака (+9.58, табл.1). На этом фоне аминокуанидин (АГ) - ингибитор NOS резко снижает количество свободного аммиака (-23.71). Такая же картина наблюдается при применении L-НАМЭ - другого ингибитора NOS (табл.2):

в присутствии малоната и витамина К₃ образование свободного аммиака из ГК четко возрастает (+6.52), а на этом фоне под действием L-НАМЭ резко снижается (-18.4). Сравнение данных табл.1 и 2 показывает, что из двух использованных ингибиторов NOS аминоксидин более эффективно снижает количество свободного аммиака.

Таблица 1

Влияние L-НАМЭ и L-АМК на образование свободного аммиака из ГК в присутствии малоната и витамина К₃ (γN/100 и % различия)

Состав инкубационной смеси	Количество свободного аммиака	Разница
Гомогенат	40.33±0.73 (19)	
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃	49.91±0.7 (20) P* <0.001	+9.58
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃ + аминоксидин	26.2±1.1 (19) P* <0.001	-23.71

*Здесь и в последующем значение P по сравнению с предыдущим опытом.

Следует обратить внимание на то, что оба ингибитора NOS не только полностью снижают образование свободного аммиака из ГК через ГК-дегидрогеназный путь, но и в значительной степени снижают количество свободного аммиака, образовавшегося при инкубации гомогенатов (табл.1, 2).

Таблица 2

Влияние L-НАМЭ и L-АМК на образование свободного аммиака из ГК в присутствии малоната и витамина К₃ в присутствии L-НАМЭ (γN/100 и % различия)

Состав инкубационной смеси	Свободный аммиак		Глутамин	
	Количество	Разница	Количество	Разница
Гомогенат	41.48±0.51 (12)		80.59±3.85 (12)	
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃	48.0±0.78 (12) P<0.001	+6.52 +15.7%	94.5±4.6 (12) P<0.05	+13.91
Гомогенат + ГК + Малонат + вит. К ₃ + L-НАМЭ	29.6±1,3 (12) P<0.001	-18.4 -38.3%	118.525±5.23 (12) P<0.05	+24.025

Так, в конце инкубации гомогенатов печени количество свободного аммиака составляет соответственно 40.33 (табл.1) и 41.48 (табл.2), а в присутствии амингуанидина и L-НАМЭ снижается до 26.2 и 29.6 единицы соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под действием указанных ингибиторов NOS со снижением количества образовавшегося свободного аммиака через ГК-дегидрогеназный путь параллельно снижается и образование свободного аммиака из эндогенных источников.

Как видно из данных, приведенных в табл.2, наряду с увеличением количества свободного аммиака (+6.52) в условиях, способствующих окислительному дезаминированию ГК (в присутствии малоната и витамина К₃), происходит интенсивный синтез глутамина (+13.91) с использованием свободного аммиака, образовавшегося ГК-дегидрогеназным путем и из эндогенных источников. Под действием ингибитора NOS L-НАМЭ в гомогенатах печени в условиях, способствующих окислительному дезаминированию ГК, значительно увеличивается синтез глутамина, амидоазот которого формируется за счет уменьшения образовавшегося свободного аммиака (табл.2). В этих условиях свободный аммиак уменьшается на 18.4 единицы, а амидоазот глутамина увеличивается на 24.025 единицы. Разница составляет 5.625 единицы и покрывается за счет эндогенно образовавшегося свободного аммиака.

Таблица 3

Таблица 3. Содержание суммарного аммиака в гомогенатах печени крысы при инкубации с L-НАМЭ в присутствии малоната и витамина К₃ (γN/100 и стандартная ошибка)

Состав инкубационной смеси	Количество суммарного аммиака	Разница
Гомогенат	122.07±3.87 (12)	
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃	142.5±3.86 (12) P<0.05	+ 20.43
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃ + L-НАМЭ	148.125±5.76 (12) P>0.05	+ 5.625

Из табл.3 видно, что в присутствии малоната и витамина К₃ из ГК образуется 20.43 единицы суммарного аммиака, который является суммой образовавшегося свободного аммиака (+6.52) и амидоазота синтезированного глутамина (13.91, табл.2). Под действием L-НАМЭ суммарный аммиак

увеличивается лишь на 5.625 единицы, так как при синтезе глутамина используется свободный аммиак, образовавшийся при инкубации ГК-дегидрогеназным путем (18.4) и из эндогенных источников (5.625, табл.3). При совместном применении обоих ингибиторов NOS действие L-НАМЭ на снижение свободного аммиака выражено усиливается (табл.4).

Таблица 4

Влияние ингибиторов NOS на синтез глутамина в гомогенатах печени с использованием свободного аммиака ($\gamma N/100$ и Δ) в присутствии L-НАМЭ и ингибитора NOS

Состав реакционной смеси	Свободный аммиак	Разница
Гомогенат	37.63±0.45 (15)	
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃	63.54±2.72 (14) P<0.001	+ 25.91
Гомогенат + ГК + малонат + вит. К ₃ + L-НАМЭ + аминогуанидин	37.13±1.52 (15) P>0.001	-26.41

Ингибиторы NOS в мозге активируют глутаминсинтетазу как у нормальных животных, так и у животных с аммонийной интоксикацией [11]. Авторы показали, что при аммонийной интоксикации причиной нейродегенерации и гибели животных является чрезмерное активирование глутаматных НМДА рецепторов, при котором активируется NOS и образуется избыточное количество NO, что оказывает свое разрушительное действие на ЦНС. NO, синтезируясь, подвергается нитрозилированию или нитрированию глутаминсинтетазу, вследствие чего активность фермента ингибируется. Нитроаргинин, ингибитор NOS и МК-801 - ингибитор НМДА рецепторов значительно активируют глутаминсинтетазу, предотвращая нейродегенерацию и гибель животных при аммонийной интоксикации. Ковалентная модификация глутаминсинтетазы под действием NO является обратимой с участием неидентифицированного фермента [11].

Хотя в условиях *in vitro* в печени и других органах количество свободного аммиака увеличивается в 10-15 раз, в печени, в отличие от головного мозга, отсутствует вышеуказанный механизм синтеза NO с участием глутаматных НМДА рецепторов. Несмотря на это, данные исследования показали, что под действием ингибиторов NOS активируется глутаминсинтетаза, в результате чего увеличивается синтез глутамина в гомогенатах печени с использованием

образовавшегося свободного аммиака. Нам представляется, что в печени образуется или накапливается NO, который через нитрозилирование или нитрирование, модифицируя глутаминсинтетазу, снижает ее активность, а под действием ингибиторов NOS синтез NO подавляется, в результате происходит денитрозилирование либо денитрирование фермента и повышается его активность.

Возникает вопрос: каков механизм накопления NO в печеночной ткани, если глутаматные NMDA рецепторы отсутствуют в ней? Во-первых, в печени существует эндотелиальный NOS. Во-вторых, при острых и хронических нарушениях функции печени (цирроз, аргининемия при врожденном недостатке аргиназы, интоксикации), нарушении почечной функции, ишемических заболеваниях и гипоксических состояниях, вследствие чрезмерного накопления аммиака и глутамата в головном мозге глутаматные NMDA рецепторы головного мозга могут избыточно активироваться и стать причиной накопления большого количества NO. NO оказывает разрушительное действие и станет причиной развития нейродегенерации и многих других патологических процессов (болезни Альцгеймера, Паркинсона, боковой амиотрофической склероз и др.) и, в конечном счете, гибели организма.

Образовавшееся избыточное количество NO, проникая в кровяное русло и образуя гемоглобин - NO комплекс, может транспортироваться на большие расстояния, попасть в печень и другие органы, где при низкой концентрации кислорода, освобождаясь от гемоглобина, оказывает свое разрушительное действие, через нитрозилирование или нитрирование, ингибируя глутаминсинтетазу и снижая способность нейтрализации избыточного количества свободного аммиака. В связи с этим возникает необходимость поиска безвредных для организма средств, в том числе и эндогенных, обладающих способностью ингибировать NOS, снижая количество NO, с целью использования для профилактики и лечения многих болезней и патологических состояний, вызванных накоплением избыточного количества аммиака и глутамата.

Полученные другими исследователями результаты в отношении головного мозга [11] и наши данные в отношении печени указывают на то, что активность глутаминсинтетазы, не работающей с максимальной мощностью, можно значительно повышать фармакологическими средствами, изменяя активность NMDA рецепторов или содержание NO.

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА

Ժ. Ա. Պարոնյան, Գ. Ս. Միսակյան, Գ. Ն. Թուրշյան, Գ. Վ. Ապրիկյան

Ազոտի օքսիդի դերը լյարդի հյուսվածքում ամոնիակի առաջացման և չեզոքացման գործում

Սրացված փվյալները վկայում են, որ ազոտի օքսիդի սինթեզի արգելակիչներ ամինագուանիդինը և L-ՆԱՄԷ-ն լյարդի հոմոգենատներում ճնշում են ամոնիակի առաջացումը էնդոգեն աղբյուրներից, ինչպես նաև գլուտամինաթթվից գլուտամապրոլինիդրոգենազի մասնակցությամբ, սակայն խթանում են ամոնիակի չեզոքացումը գլուտամինսինթեզազի ակտիվացման միջոցով:

Ներագոյության արդյունքները հիմք են տալիս եզրակացնելու, որ լյարդի հյուսվածքում գլուտամինսինթեզազը չի գործում մաքսիմալ ուժով, և նրա ակտիվությունը հնարավոր է բարձրացնել դեղորայքներով:

Zh. A. Paronyan, G. S. Misakyan, G. H. Thurshyan, G. V. Aprikyan

Role of Nitric Oxide in Ammonia Formation and Neutralization in Liver Tissue

Data obtained indicated that nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-NAME inhibited formation of ammonia from endogen sources and from glutamate with participation of glutamate dehydrogenase in liver homogenates, and on the other hand stimulated neutralization of ammonia by glutamin synthetase activation.

The conclusion is that in liver tissue glutamin synthetase does not work at maximum rate and its activity may be increased pharmacologically by manipulating the content of nitric oxide to increase ammonia detoxication in different pathological conditions.

Էնթոսոսթոն

1. *Forchgott R.F., Zavadzki I.V.* - Nature. 1980. V. 288. P. 313-376.
2. *Kimura H., Murad F.* - Life Science. 1975. V. 17 (N 6). P. 837-843.
3. *Ignarro L.J.* - Pharmacol. and Toxicol. 1990. V. 67. P. 1-7.
4. *Bruhwyler G., Chleide E., Liegeois J.F.* - Neurosci. Behav. Rev. 1993. V. 17. P. 373-385.
5. *Барсегян К.А., Геворкян Г.А., Мовсесян Н.О. и др.* - Вестн. МАНБ. 2003. Т. 8 (N 7). С. 215-218.
6. *Schmidt H.H., Hoffmann H., Ogilvie P.* In: The Role of Nitric Oxide in Physiology and Pathophysiology. Eds by Korowski H., Maeda H. Berlin, Heidelberg. 1995. P. 75-86.
7. *Yamada K., Nabeshima T.* - Neurosci. Res. 1997. V. 28. P. 93-102.
8. *Beckman J.S., Smith C.D., Koppenol W.H.* - Nature. 1993. V. 364. P. 584.
9. *Beckman J., Beckman T., Chen J et al.* - Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 1990.

V. 87. P. 1620-1622.

10. *Hermenogildo C., Monfort P., Felipo V.* - Hepatology. 2000. V. 31. P. 709-715.

11. *Kosenko E., Liansola M., Montoliu C. et al.* - Neurochem. Internat. 2003.

V. 43. P. 493-499.

12. *Априкян Г.В., Шагинян В.А.* - Вопросы биохимии мозга. 1973. Т. 8. С. 91-105.

13. *Априкян Г.В., Шагинян В.А., Бунятян Г.Г.* - ДАН АрмССР. 1975. Т. 61. N 1. С. 54-59.

14. *Силакова А.И., Труш Г.П., Явилякова А.* - Вопросы мед. химии. 1962. Т. 5. С. 538-543.

15. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* - J. Biol.Chem. 1951. V. 193. P. 265-267.