



Биолог. журн. Армении, 2 (69), 2017

ОБРАЗОВАНИЕ СУПЕРОКСИДНЫХ И ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ГИДРОКСИДОМ АММОНИЯ

Р.М. СИМОНЯН¹, М.А. БАБАЯН¹, Г.Р. ОКСУЗЯН³, Г.М. СИМОНЯН¹,
С.М. ФЕСЧЯН², А.А. ЕНГИБАРЯН², М.А. СИМОНЯН¹, Р.Յ. МАТЕВОСЯՆ²

¹Институт биохимии им. Г.Буятыяна НАН РА.

²ԵրԳՄՍ ւմ.Մ.Գերազի.

³ԳՊՍ ւմ. Մ.Նալբանդյան, Գյումրի
maxim.simonyan@gmail.com

Разработан кинетический метод определения стационарной концентрации O_2^- , генерированных при расщеплении перекиси водорода аммиаком. Выявлен новый механизм токсического действия аммиака как стимулятора образования супероксидных и гидроксильных радикалов в ходе неферментативного расщепления перекиси водорода. Такой процесс может наблюдаться при гипераммонемии (при пересадке органов, циррозе печени, сахарном диабете).

Гидроксид аммония – перекись водорода – расщепление – супероксидный радикал – гидроксидный радикал – гипераммонемия

Մշակվել է ամոնիակով ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման հետևանքով գոյացած O_2^- ստացիոնար քանակի որոշման կինետիկական մեթոդ: Բացահայտվել է ամոնիակի թունավոր ազդեցության նոր մեխանիզմ, որպես ջրածնի պերօքսիդի ոչ ֆերմենտային ճեղքման ընթացքում սուպերօքսիդ և հիդրօքսիլ ռադիկալների գոյացման խթանիչ: Այս գործընթացը կարող է դիտվել հիպերամոնեմիայի ժամանակ (օրգանների փոխպատվաստման, լյարդի ցիրոզի և շաքարախտի դեպքում):

Ամոնիումի հիդրօքսիդ – ջրածնի պերօքսիդ – ճեղքում – սուպերօքսիդ ռադիկալ – հիդրօքսիլ ռադիկալ – հիպերամոնեմիա

The kinetic method for the determination of the stationary concentration of O_2^- , during decay of H_2O_2 by ammonia is elaborated. A new mechanism for toxic effect of the ammonia was revealed as a stimulator of the generation of O_2^- during non enzymatic decay of H_2O_2 . This process can be observed at hyperammonemia (at transplantation of the organs, liver cirrhosis, diabetes).

Ammonium hydroxide – hydrogen peroxide – decay – superoxide radical – hydroxyl radical – hyperammonemia

Аммиак играет важную роль как в нормальной, так и в патологической физиологии животных и человека. Печень животных преобразует аммиак в мочевины с помощью серии последовательных реакций, известных как цикл мочевины с участием орнитин-карбамилтрансферазы. При циррозе печени, когда нарушена ее

способность преобразовывать аммиак в мочевины, происходит увеличение содержания аммиака в крови, приводящее к гипераммонемии. Гипераммонемия приводит к нарушению сознания и развитию сопорозных коматозных состояний при печёночной энцефалопатии и к уремии, а совместное действие антиоксиданта и цинка играет положительную роль при энцефалопатии и циррозе печени [1]. Наряду с этим, при острой и хронической гипераммонемии наблюдается нарушение функционирования мозговой ткани [3]. При печеночной недостаточности наблюдаются нейropsychические нарушения и изменение уровня глутатиона в мозговой ткани, а полифенольный компонент ресвератрол играет регулируемую роль, снижая фон оксидативного стресса [4]. При гипераммонемии ЦНС наблюдается нарушение функционирования астроглиальных клеток, а липоевая кислота и N-ацетилцистеин, обладающие противовоспалительной и антиоксидантной активностью, играют положительную роль, снижая активность глутаминсинтетазы и высвобождение проинфламаторных цитокинов. Кроме этого, гемоксигеназа-1, липоевая кислота и ресвератрол снижают фон аммиуминдуцированного оксидативного стресса [5-7].

Токсический эффект аммиака также обусловлен снижением оксидативного фосфорилирования и повышением скорости продуцирования перекиси водорода в митохондриях клеток сердца, головного и спинного мозга. При этом подавляется активность антиоксидантных ферментов печени и мозга млекопитающих, в то время как мелатонин играет защитную роль, снижая уровень активного кислорода [8-12]. Гипераммонемия играет также отрицательную роль при пересадке органов [13]. Показано, что наряду с перекисью водорода, аммиак способен проходить через клеточные мембраны млекопитающих по специальным каналам, вызывая, в частности, оксидативное повреждение кардиомиоцитов. При этом под воздействием перекиси водорода и интрацеллюлярного железа наблюдается повреждение ДНК активными формами кислорода [14-17].

При неферментативном расщеплении перекиси водорода, органических и липидных перекисей в присутствии КОН при значениях pH 7,4 и выше генерируются супероксидные радикалы (O_2^-), а скавенджеры гидроксильных радикалов резко повышают стационарную концентрацию продуцированных O_2^- [18-20]. Однако вопрос продуцирования O_2^- при расщеплении перекиси водорода в присутствии гидроксида аммония при физиологических значениях pH среды и выше *in vitro* остается нерешенным. Целью настоящей работы является определение механизмов токсического эффекта аммиака в присутствии перекиси водорода.

Материал и методика. Были использованы химически чистые перекись водорода, гидроксид аммония, кумасси бриллиант синий (КБС), электрофоретически гомогенные препараты Cu, Zn-СОД и каталаза, выделенные и очищенные из печеночной ткани быка [19]. Концентрацию перекиси водорода определяли перманганометрическим титрованием раствора. Концентрацию КБС (М) определяли, используя величину молярного поглощения при 580 нм, которая составляет $43.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Количественные показатели образовавшихся супероксидных радикалов определяли кинетическим методом путем регистрации изменения плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм за определенные промежутки времени. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре „Specord UV/VIS“ (Германия) с длиной оптического пробега в 1 см. Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) регистрировались на спектрометре “Varian E-4” (США). Условия регистрации ЭПР спектров: константа времени – 0,3 сек., чувствительность записи спектров – $1,25 \times 10^2$, амплитуда модуляции – 10 Гс, микроволновая частота – 9,8 ГГц. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности „p“.

Результаты и обсуждение. В результате нагревания при 50-60°C 5 мл 0,1 М перекиси водорода (H_2O_2) с 5 мл 0,01 М водного раствора аммиака (гидроксид аммония – NH_4OH) при pH 7,4 в течение 1,5-2 мин происходит экзотермическая реакция с расщеплением перекиси водорода. После охлаждения этого раствора и инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре получается раствор O_2^- со стабильной стационарной концентрацией. После добавления этого раствора (по 0,5 мл) к водному раствору КБС (по 5 мл) наблюдается снижение плотности максимального оптического поглощения этого красителя при 580 нм и 37°C, pH 7,4 в течение 2,5-3 ч (рис.1).

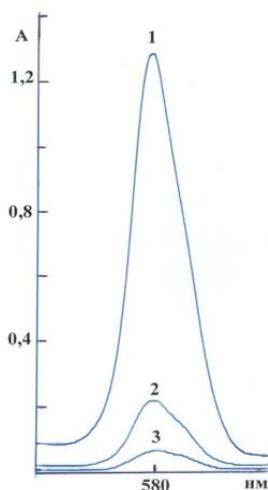


Рис.1. Снижение плотности максимального оптического поглощения водного раствора КБС (при 580 нм) под влиянием O_2^- , образованными при расщеплении H_2O_2 под влиянием аммиака при pH 7,4 и 9,5 в присутствии: O_2^- , Cu,Zn-СОД или каталазы при pH 7,4 или 9,5 (1); под влиянием O_2^- , при pH 7,4 (2) и pH 9,5 (3), $p < 0,05$, $n = 6$.

Обесцвечивание КБС обусловлено одноэлектронным восстановлением этого красителя электроном O_2^- . Аналогичным образом в результате нагревания при 50-60°C 5 мл 0,1 М перекиси водорода (H_2O_2) с 5 мл 0,1 М NH_4OH при pH 9,5 в течение 15-20 сек наблюдается бурная экзотермическая реакция с расщеплением перекиси водорода. После охлаждения этого раствора и инкубации в течение 10-15 мин получается O_2^- со стабильной стационарной концентрацией (в течение 5-6 ч при комнатной температуре). При добавлении раствора O_2^- (по 0,1 мл) к водному раствору КБС (по 5 мл) при 37°C в течение 1-1,5 ч при pH 9,5 наблюдается более интенсивное снижение плотности максимального оптического поглощения этого красителя при 580 нм (рис.2).

В отдельности H_2O_2 или NH_4OH практически не снижают плотности оптического поглощения КБС при 580 нм. С другой стороны, в присутствии $5 \cdot 10^{-8}$ М Cu,Zn-SOD или каталазы процесса обесцвечивания КБС под влиянием O_2^- при pH 7,4 или pH 9,5 не наблюдается (рис.2). Однако в присутствии 0,1 М этанола (или других типов одно- и полиатомных спиртов) или глюкозы наблюдается резкое снижение интенсивности плотности максимального оптического поглощения КБС, как это показано на рис.2. Этим путем процесс усиливается вправо с резким увеличением стационарной концентрации O_2^- .

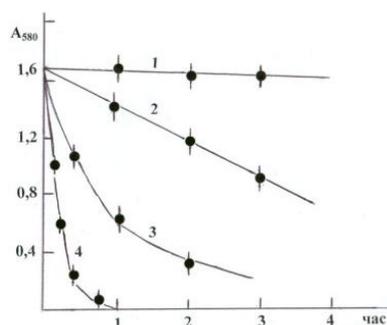


Рис.2. Кинетические кривые обесцвечивания КБС супероксидными радикалами, продуцируемыми при расщеплении перекиси водорода под влиянием аммиака при pH 7,4 и 9,5. Кинетические кривые обесцвечивания КБС под влиянием O_2^- , Cu, Zn-СОД или каталазы (1); под влиянием O_2^- при pH 7,4 (2); pH 9,5 (3) и в присутствии O_2^- и 0,1 М этанола или глюкозы (4), $p < 0,01$. $n=6$.

Нетрудно заметить, что процесс восстановления КБС происходит под влиянием O_2^- , а не гидроксильных радикалов, которые являются сильными окислителями для биосистем. Полученные результаты подтверждаются и ЭПР данными. ЭПР спектры O_2^- , генерированные при расщеплении H_2O_2 с NH_4OH при pH 7,4 и pH 9,5, приведены на рис.3.

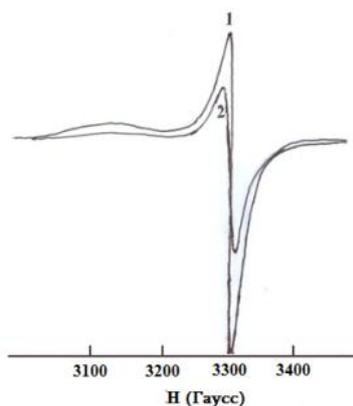
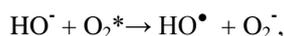


Рис.3. ЭПР спектры O_2^- , зарегистрированные при расщеплении перекиси водорода под влиянием аммиака в приведенных условиях: при pH 9,5 (1) и pH 7,4 (2). ЭПР спектры O_2^- зарегистрированы при температуре жидкого азота ($-196^\circ C$), с характерным для O_2^- g фактором, равным 2,02. $p < 0,01$, $n=6$.

Представленные ЭПР показатели полностью совпадают с показателями ЭПР спектров O_2^- , образованных при расщеплении H_2O_2 едким калием (KOH) [17]. Таким образом, при расщеплении H_2O_2 аммиаком образуются O_2^- и HO^\bullet -радикалы по схеме:



где O_2^* является молекулой “горячего кислорода”, образованной при экзотермическом расщеплении H_2O_2 . “Горячий кислород” легко восстанавливается электроном HO^- группы, с образованием HO^\bullet и O_2^- , а классические сквенджеры HO^\bullet (маннитол, спирты, сахара) резко повышают стационарную концентрацию O_2^- .

Учитывая то обстоятельство, что супероксиды одноэлектронно восстанавливают КБС стехиометрично, легко определить количество образующихся O_2^- при расщеплении H_2O_2 аммиаком при рН 7,4 и рН 9,5(рис.4).

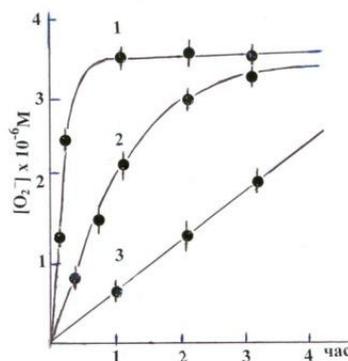


Рис.4. Стационарная концентрация генерированных O_2^- при расщеплении перекиси водорода под влиянием аммиака при рН 7,4 или 9,5, в присутствии 0,1 М этанола или глюкозы (1); при рН 9,5, в отсутствие этанола или глюкозы (2) и при рН 7,4, в отсутствие этанола или глюкозы (3). Аналогичный эффект оказывают и другие спирты или сахара. $p < 0,05$, $n = 6$.

Процесс образования супероксидных радикалов при расщеплении H_2O_2 под влиянием аммиака при нарушении метаболизма последнего (при гипераммонемии) трудно переоценить. В свою очередь, при гипераммонемии, сахарном диабете и циррозе печени это является новым механизмом оксидативного повреждения под влиянием продуцированных O_2^- [2,3]. Генерирование O_2^- и HO^\bullet при расщеплении H_2O_2 в присутствии аммиака является новым механизмом токсического эффекта перекиси водорода.

Таким образом, в ходе расщепления H_2O_2 аммиаком в условиях, близких к физиологическим (рН 7,4, $37^\circ C$), образуются O_2^- и HO^\bullet *in vitro*. Соответственно, процесс образования O_2^- и HO^\bullet резко усиливается при повышении рН среды. В присутствии сквенджеров HO^\bullet (этанол, глюкоза или другие спирты или сахара) стационарная концентрация O_2^- резко повышается. На этом основании был разработан кинетический метод определения стационарной концентрации O_2^- радикалов, генерированных при расщеплении перекиси водорода аммиаком. Выявлен новый механизм токсического действия аммиака, как стимулятора образования супероксидных и гидроксильных радикалов в ходе неферментативного расщепления перекиси водорода, что может наблюдаться при гипераммонемии, пересадке органов, циррозе печени, сахарном диабете и др. патологических состояниях, протекающих с нарушением метаболизма аммиака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симонян М.А. Взаимодействие супероксиддисмутазы с органическими перекисями и с генерированными из них супероксидами. Биохимия, 49, 11, 1792-1798, 1984.
2. Симонян М.А. Способ получения супероксиддисмутазы из животного сырья. Открытия Изобретения (СССР), N28,107, АС 1413139, 1988.
3. Mousa N., Abdel-Razik A., Zaher A., Hamed M., Shiha G., Effat N., Elbaz S., Elhelaly R., Hafez M., El-Wakeel N., Eldars W. The role of antioxidants and zinc in minimal hepatic encephalopathy: a randomized trial. Therap Adv Gastroenterol., 9, 5, 684-691, 2016.

4. Shiraki M, Shimizu M, Moriwaki H, Okita K, Koike K. Carnitine dynamics and their effects on hyperammonemia in cirrhotic Japanese patients. *Hepatology Res.* Jun 2. doi: 10.1111/hepr.12750. [Epub ahead of print], 2016.
5. Natesan V, Mani R, Arumugam R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomed Pharmacother.* 81, 192-202, 2016.
6. Bobermin L.D., Hansel G., Scherer E.B., Wyse A.T., Souza D.O. Quincozes-Santos A., Gonçalves C.A. Ammonia impairs glutamatergic communication in astroglial cells: protective role of resveratrol. *Toxicol In Vitro.* 29, 8, 2022-2029, 2015.
7. Santos C.L., Bobermin L.D., Souza D.G., Bellaver B., Bellaver G., Arús B.A., Souza D.O., Gonçalves C.A., Quincozes-Santos A. Lipoic acid and N-acetylcysteine prevent ammonia-induced inflammatory response in C6 astroglial cells: The putative role of ERK and HO1 signaling pathways. *Toxicol In Vitro.* 29, 7, 1350-1357, 2015.
8. Bobermin L.D., Wartchow K.M., Flores M.P., Leite M.C., Quincozes-Santos A., Gonçalves C.A. Ammonia-induced oxidative damage in neurons is prevented by resveratrol and lipoic acid with participation of hemeoxygenase 1. *Neurotoxicology.* 49, 28-35, 2015.
9. Skowrońska M., Albrecht J. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochem Int.* 62, 5, 731-737, 2013.
10. Venediktova N.I., Kosenko E.A., Kaminskiĭ Iu.G. Antioxidant enzymes, hydrogen peroxide metabolism, and respiration in rat heart during experimental hyperammonemia. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 3, 351-357, 2006.
11. Hindfelt B. The distribution of ammonia between extracellular and intracellular compartments of the rat brain. *ClinSciMol Med.*, 48, 1, 33-37, 1975.
12. García M.V., López-Mediavilla C, Juanes de la Peña M.C., Medina J.M. Antioxidant defence of the neonatal rat brain against acute hyperammonemia. *Brain Res.*, 1001, 1-2, 159-163, 2004.
13. P. Jasmín Lena, P. Subramanian. Nephroprotective effects of melatonin in hyperammonemia induced oxidative stress in Wistar rats. *Intern. Journ. of PharmTech. Research CODEN (USA)*, 8, 8, 74-78, 2015.
14. Chen C., Bain K.B., Iuppa J.A., Yusen R.D., Byers D.E., Patterson G.A., Trulock E.P., Hachem R.R., Witt C.A. Hyperammonemia syndrome after lung transplantation: a single center experience. *Transplantation.* 100, 3, 678-684, 2016.
15. Gerd P. Bienert, Jan K. Schjoerring, Thomas P. Jahn. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758, 8, 994-1003, 2006.
16. Yuri N. Antonenko, Peter Pohl, Gennady A. Denisov, A. N. Belozersky V. Permeation of ammonia across bilayer lipid membranes studied by ammonium ion selective microelectrodes. *Biophysical Journal*, 72, 2187-2195, 1997.
17. Janero D.R., Hreniuk D., Sharif H.M. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal oxidative membrane injury. *J Cell Physiol.* 149, 3, 347-364, 1991.
18. Jun Nakamura, Elizabeth R. Purvis, James A. Swenberg. Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 6, 1790-1795, 2003.
19. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Generation of superoxide radicals in alkaline solution of hydrogen peroxide and the effect of superoxide dismutase on this system. *Biochim. Biophys. Acta.* 583, 3, 279-286, 1979.
20. Simonyan M.A. Reduction of some organic and inorganic oxidants in alkaline media by superoxide dismutase and scavengers of hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 4, 1751-1756, 1982.

Поступила 06.02.2017