

Роль ингибиторов синтеза окиси азота в предотвращении токсического действия аммиака и глутамата в головном мозгу

Г.С.Мисакян, Ж.А.Паронян, Г.А.Туршян, Г.В.Априкян

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА

375014, Ереван, ул.П. Севака, 5/4

Ключевые слова: окись азота, нейродегенеративные заболевания, образование и обезвреживание аммиака

В последние десятилетия было выяснено, что лечебный эффект нитроглицерина и других нитросоединений сводится к образованию в организме окиси азота (NO радикала). NO является релаксирующим фактором гладких мышц, сосудов через образование цГМФ [9–13, 16]. NO образуется в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, в ЦНС и других органах из аргинина под действием NO-синтазы (NOS) [2, 8].

Существуют 3 изоформы NOS: нейрональная (nNOS), индуцибельная (iNOS) и эндотелиальная (eNOS). nNOS Ca^{2+} -зависимая, экспрессируется в нейронах при активировании глутаматных NMDA рецепторов и наличии избыточного количества аммиака. iNOS индуцируется под действием бактериального эндотоксина липополисахарида и цитокинов [17], является одним из эффекторов клеточного иммунитета, активируется при хронических инфекциях, аутоиммунных болезнях и способна продуцировать NO в течение длительного времени (до нескольких дней) [5]. Однако разные клеточные типы мозга могут одновременно проявлять активность разных видов NOS [6, 7].

Хотя немногие нейроны (1–2%) могут содержать nNOS, однако, они сильно разветвлены системой отростков, вследствие чего соседствующие нейроны, не содержащие NOS, находятся в сфере влияния нейронов, продуцирующих NO цитозольной nNOS [12]. Открытие NO в качестве сигнальной молекулы явилось демонстрацией нового типа нейротрансмиссии. NO путем простой диффузии легко переходит в соседние и более далеко расположенные клетки (в виде Hb-NO), осуществляя межклеточную коммуникацию и регуляцию в различных тканях, в первую очередь в ЦНС, через систему цГМФ, инозитолтрифосфата, диацилглицерола, Ca^{2+} , ГК- и ГАМК-рецепторы, а также ацетилхолин, дофамин, АТФ-азу [18]. Избыточное образование NO в условиях накопления в организме токсического количества аммиака (цирроз печени, гепатиты, врожденный дефицит аргиназы, недостаточность почечной функции и др.) и глутамата (гипоксические, ишемические и другие патологиче-

ские состояния), вследствие чрезмерного активирования глутаматных NMDA рецепторов, становится причиной развития многих патологических процессов и нейродегенеративных заболеваний с фатальным исходом (болезни Альцгеймера, Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и др.) через образование агрессивных радикалов [18]. NO не резервируется в синаптических везикулах нервных окончаний и высвобождается в синаптическую щель путем свободной диффузии без механизма экзоцитоза. nNOS присутствует в первую очередь в ГК- и ГАМК-ергических нейронах [11]. Особенно чувствительны к действию NO клетки мозга, миокарда и эндотелия [21]. Сегодня трудно назвать функцию организма, в регуляции которого NO не принимала бы участия.

При концентрации 10–100 нМ NO обеспечивает процессы клеточной и межклеточной сигнализации. При повышении концентрации NO до 2–4 мкМ (ишемия мозга и другие гипоксические и патологические состояния) или даже до 10 мкМ, как это бывает в макрофагах при активации iNOS, превращение NO в токсические ($\text{ONOO}^{\cdot}$) и другие продукты усиливается, так как способность супероксиддисмутазы конкурировать с NO за супероксид-анион резко падает [14, 15]. Нитрирование белков увеличивает их антигенность и способствует развитию аутоиммунных процессов в нервной системе [14].

Многие животные белки и ферменты инактивируются нитрованием и нитрозилированием. Среди них тирозингидроксилаза [20] и глутаминсинтетаза [10, 20]. Ингибирование NOS нитроаргином приводит к выраженному активированию глутаминсинтетазы. В нашей лаборатории было показано, что под действием ингибиторов NOS аминоксидина и L-NAME (N-нитро-L-аргинин метил эстер) в гомогенатах печени количество свободного аммиака снижается, соответственно усиливается синтез глутамина, что указывает на активирование глутаминсинтетазы. В связи с этим представляло интерес изучение образования аммиака из эндогенных источников и через ГК-дегидрогеназный путь, влияния ингибиторов NOS на

этот процесс, а также на синтез глутамина с использованием образовавшегося из указанных источников аммиака.

Материал и методы

Опыты были поставлены на половозрелых белых крысах популяции Вистар массой 120–130 г. Животных быстро декапитировали, извлекали головной мозг без мозжечка и после удаления кровеносных сосудов и остатков крови готовили 10% гомогенат в К-фосфатом буфере (мМ): KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -16, MgSO_4 -5, KCl -20 и NaCl -76. Молярность буфера доводили сахарозой 0,32М. Для каждой пробы брали 2 мл гомогената. В качестве ингибиторов NOS использовали амингуанидин и L-NAME. Реакционную смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин в атмосфере воздуха. По окончании инкубации белки осаждали 40% трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация составляла 4%), спустя 30 мин пробы центрифугировали при 3,5 тысяч об/мин в центрифуге К-24 в течение 15 мин. В надосадочной жидкости определяли активность ГК-дегидрогеназы ранее описанным методом [1, 3], содержание аммиака и глутамина определяли микродиффузионным методом [4], белок определяли по Лоури и соавт. [19]. Содержание реагентов в инкубационной среде составляло в конечных концентрациях (мМ): ГК – 10, малоната – 20, витамина K_3 (менадиона) – 0,02, амингуанидина – 0,9 и L-NAME – 0,9. Указанные реагенты были приобретены из Sigma Chemical Company, остальные являлись коммерческими.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что при 30-минутной инкубации гомогенатов головного мозга количество эндогенного свободного аммиака составляет 128,28 $\mu\text{N}/100$ мг белка, а глутамин – 26,03 $\mu\text{N}/100$ мг белка (табл.1). Под действием амингуанидина – ингибитора NOS резко снижается количество эндогенного аммиака (-34,78) и часть его используется для синтеза глутамин (+11,19).

Данные табл.2 показывают, что под действием амингуанидина количество суммарного аммиака (аммиак + амидоазот глутамин) значительно уменьшается (-23,58). Известно, что в условиях *in vitro* в мозгу и других органах содержание свободного аммиака увеличивается в 10–15 раз. В условиях повышенного содержания свободного аммиака происходит увеличение количества NO в головном мозгу, под действием которого нитрируется и нитрозилируется глутаминсинтетаза со снижением ее активности [18]. В этих условиях под действием инги-

Таблица 1

Влияние амингуанидина на содержание аммиака из эндогенных источников ($\mu\text{N}/100$ мг белка) в гомогенатах головного мозга

Состав инкубационной смеси	Свободный аммиак		Глутамин	
	количество	разница	количество	разница
Гомогенат	128,28±0,87 (11)		26,03±0,91 (9)	
Гомогенат+амингуанидин	93,5±1,31 (9) $p^* < 0,001$	-34,78	37,22±0,43 (12) $p < 0,001$	+11,19

*Здесь и в последующем значение p – по сравнению с предыдущим опытом

битора NOS нитроаргинина ингибируется образование NO и модификация глутаминсинтетазы, в результате чего происходит активирование фермента. По мнению авторов, причиной активирования этого фермента является денитрирование и денитрозилирование его молекулы с участием неидентифицированного фермента [18]. Наши исследования показали, что под действием ингибитора NOS амингуанидина значительно снижается количество эндогенного свободного аммиака, часть которого расходуется на синтез глутамин в результате активирования глутаминсинтетазы, а остальная часть может уменьшаться либо в результате активирования других путей обезвреживания аммиака, либо ингибирования его образования (табл.1,2). Так как NADPH является коферментом NOS [22], а окисленная его форма коферментом ГК-дегидрогеназы для прямой реакции, то ингибирование NOS является причиной подавления ГК-дегидрогеназы и, следовательно, снижения образования свободного аммиака через ГК-дегидрогеназный путь. В наших исследованиях снижение образования свободного аммиака под действием ингибитора NOS амингуаниди-

Таблица 2

Влияние амингуанидина на содержание эндогенного суммарного аммиака ($\mu\text{N}/100$ мг белка) в гомогенатах головного мозга белых крыс

Состав инкубационной смеси	Суммарный аммиак	Разница
Гомогенат	154,3±1,06 (9)	
Гомогенат+амингуанидин	130,72 ± 1,72 (9) $p < 0,001$	-23,58

на можно объяснить как активированием глутаминсинтетазы, так и ингибированием образования аммиака через ГК-дегидрогеназный путь (табл.1, 2).

Следует иметь в виду, что ингибиторы NOS активируют глутаминсинтетазу не только в условиях *in vitro* при повышении содержания свободного аммиака, но и в условиях *in vivo* у интактных животных с нормальным содержанием свободного аммиака [18]. Эти данные указывают, что в нормальных физиологических условиях глутаминсинтаза весьма чувствительна к действию NO и в определенной степени находится в модифицированном состоянии, в результате чего полностью не используется ее активность для синтеза глутамин. С другой стороны, в условиях избыточного активирования глутаматных NMDA рецепторов (аммонийная интоксикация, врожденный дефицит аргиназы, заболевания печени и почек, гипоксия, ишемические и нейродегенеративные заболевания) резко возрастает количество NO и токсические продукты его превращений, которые сильно модифицируют глутаминсинтетазу, снижают ее активность и способность мозговой ткани и других органов к обезвреживанию аммиака – токсического для организма вещества.

Наши исследования показали (табл.3), что в условиях, способствующих образованию аммиака через ГК-дегидрогеназный путь (в присутствии малоната + вит. K₃) в гомогенатах головного мозга не происходит образования аммиака из ГК, а, наоборот, образование аммиака из эндогенных источников заметно снижается. Это находится в противоречии с нашими прежними результатами о том, что в митохондриях мозга в условиях, способствующих образованию аммиака через ГК-дегидрогеназный путь, происходит дезаминирование некоторого количества ГК [1], хотя в гомогенатах печени происходит ее активное дезаминирование.

Однако нужно иметь в виду, что в мозговой ткани существует целый ряд природных ингибиторов и активаторов ГК-дегидрогеназы и дезаминирование ГК во многом зависит от их наличия и соотношения [1]. Противоречия результатов в гомогенатах и митохондриях мозга можно объяснить тем, что при выделении митохондриальной фракции из гомогенатов удаляются указанные соединения и меняется их соотношение. Об этом свидетельствует и то, что при дальнейшем очищении митохондриальной фракции в аналогичных условиях усиливается дезаминирование ГК [3].

Таблица 3

Влияние аминоксидина на глутаматдегидрогеназную активность (γ N/100мг белка) гомогенатов головного мозга белых крыс

Состав инкубационной смеси	Свободный аммиак	Разница
Гомогенат	91,28±1,03 (14)	
Гомогенат+ГК+малонат+ вит.К ₃	74,18±0,87 (14) p<0,001	-17,1
Гомогенат+ГК+малонат+вит. К ₃ +аминоксидин	41,32±2,65 (15) p<0,001	-32,86

Под действием аминоксидина в условиях, благоприятствующих дезаминированию ГК (в присутствии малоната + вит. K₃), содержание свободного аммиака продолжает снижаться (с 91,28 до 41,32). Это снижение составляет 32,86 г N/100 мг белка (табл.3).

Таблица 4

Влияние L-NAME на ГК- дегидрогеназную активность (γ N/100 мг белка) гомогенатов головного мозга белых крыс

Состав инкубационной смеси	Свободный аммиак		Глутамин	
	количество	разница	количество	разница
Гомогенат	88,44±2,03 (12)		29,51±2,21 (12)	
Гомогенат+ГК+малонат+ вит.К ₃	62,56±1,26 (12) p<0,001	-25,88	41,48±2,32 (12) p<0,005	+11,97
Гомогенат+ГК+малонат+вит.К ₃ +L-NAME	41,56±0,68 (13) p<0,001	-21,0	46,11±1,32 (12) p<0,05	+4,63

Данные табл. 4 показывают, что в условиях, способствующих окислительному дезаминированию ГК (в присутствии малоната + вит. К₃), количество свободного аммиака значительно снижается (-25,88) и часть его (+11,97) используется для синтеза глутамина. В указанных условиях под действием ингибитора NOS L-NAME количество свободного аммиака продолжает уменьшаться (-21,0), однако лишь часть его (+4,63) используется для синтеза глутамина. В этих экспериментах количество суммарного аммиака (свободный аммиак + амидоазот глутамина), с учетом синтеза глутамина, значительно снижается (-13,91) в условиях, благоприятствующих окислительному дезаминированию ГК, и продолжается под действием L-

NAME (-16,37; табл.5). Нам представляется, что снижение количества свободного аммиака, с учетом синтеза глутамина, можно объяснить положительным соотношением количества ингибиторов и активаторов в гомогенатах мозга [3]. Подавление образования свободного аммиака, с учетом синтеза глутамина, под действием ингибиторов NOS амингуанидина и L-NAME, является результатом снижения окисленного кофермента ГК-дегидрогеназы для прямой реакции. В заключение следует отметить, что при совместном применении ингибиторов амингуанидина и L-NAME подавление образования свободного аммиака через ГК-дегидрогеназный путь не усиливается (сравни табл.3 и 4 с табл.6).

Таблица 5

Влияние L-NAME на ГК- дегидрогеназную активность гомогенатов головного мозга белых крыс по суммарному аммиаку (γN/100 мг белка)

Состав инкубационной смеси	Суммарный аммиак	Разница
Гомогенат	117,95±2,45 (12)	
Гомогенат+ГК+малонат+вит.К ₃	104,04±2,23 (12) p<0,005	-13,91
Гомогенат+ГК+малонат+вит.К ₃ +L-NAME	87,67±1,96 (12) p<0,001	-16,37

Обобщая результаты наших исследований, можно прийти к выводу, что под действием ингибиторов NOS происходит подавление образования аммиака из эндогенных источников и через ГК-дегидрогеназный путь и активирование глутаминсинтетазы, что может предотвратить токсическое действие аммиака и других продуктов превращений NO при различных пато-

Таблица 6

Влияние совместного применения амингуанидина и L-NAME на ГК-дегидрогеназную активность по выходу свободного аммиака (γN/100мг белка) в гомогенатах головного мозга белых крыс

Состав инкубационной смеси	Свободный аммиак	Разница
Гомогенат	79,42 ± 0,47 (15)	
Гомогенат+ГК+малонат+вит.К ₃	62,08 ± 1,32 (15) p<0,001	-17,34
Гомогенат+ГК+малонат+вит.К ₃ +амингуанидин+L-NAME	27,93 ± 0,82 (15) p<0,001	-34,15

логических состояниях, сопровождающихся избыточным накоплением NO.

Возникает необходимость поиска безвредных ингибиторов NO и их применения с целью профилактики и лечения различных нейродегенеративных и связанных с ними заболеваний, получивших распространение во многих странах мира.

Поступила 20.02.06

Ազոտի օքսիդի սինթեզի արգելակիչների դերը գլխուղեղում ամոնիակի և գլուտամինաթթվի թունավոր ազդեցության կանխարգելման մեջ

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

Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ ազոտի օքսիդի սինթեզի արգելակիչներ ամինա-գլուտամինի և L-ՆԱՄԷ-ն գլխուղեղի հոմոգենատ-

ներում ճնշում են ամոնիակի առաջացումը էնդոգեն աղբյուրներից և գլուտամինաթթվից գլուտամինաթթվի իրոդեմազային ուղիով և ուժեղացնում են

ամոնիակի չեզոքացումը գլուտամինսինթետազի ակտիվացման շնորհիվ, կանխարգելելով ամոնիակի ու գլուտամինաթթվի թունավոր ազդեցությունը՝ զանազան հիվանդագին վիճակների ժամանակ նրանց մեծ քանակների կուտակման դեպքում:

Հեռանկարային է համարվում համապատասխան անվնաս արգելակիչների որոնումը և օգտագործումը նշված հիվանդությունների կանխարգելման ու բուժման ժամանակ:

The role of inhibitors of nitric oxide synthesis in prevention of toxic effect of ammonium and glutamate in brain homogenates

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

It has been suggested that inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine and L-NAME leads to decrease in ammonium formation from endogen sources and glutamate by inhibition of glutamate dehydrogenase, increases ammonium detoxication by activation of glutamylsynthetase and finally prevents toxic effect of ammonium and glutamate at its accumulation in pathological situation.

Pharmacological correction of nitric oxide formation by its inhibitors can have a good perspective in prevention and treatment of pathological conditions.

Pharmacological correction of nitric oxide formation by its inhibitors can have a good perspective in prevention and treatment of pathological conditions.

Литература

1. Априкян Г.В., Шагинян В.А. *Вопр. биох. мозга*. 1973, т.8, с.91-105.
2. Барсегян К.А., Геворкян Г.А., Мовсесян Н.О. и др. *Вестник МАНЕБ*, 2003, т. 8 (7), с. 215-218.
3. Паронян Ж.А., Априкян Г.В., Мкртчян Г.А., Мусаелян С.С. *Вопр. биох. мозга*, 1976, т.11, с.41-48.
4. Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, 1962, т.5, с.538-545.
5. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. *Biochem. J.*, 2001, 358 (3), p.593-615.
6. Beckman J., Beckman T., Chen J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990, 87, p.1620-1622.
7. Beckman J.S., Smith C.D., Koppenol W.H. *Nature*, 1993, 364, p. 584.
8. Bruhwyler J., Chleide E., Liegeois J.F. *Neurosci. Behav. Rev.*, 1993, 17, p.373-385.
9. Forchgot R.F., Zavadzki I.V. *Nature*, 1980, 288, p.313-376.
10. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.C., Moncada S. *Eur. J. Pharmacol.*, 1989, 172, p.413-416.
11. Hermenegildo C., Marcaida G., Montoliu C. *Neurochem. Res.*, 1996, 21, p.1237-1244.
12. Hermenegildo C., Monfort P., Felipo V. *Hepatology*, 2000, 31, p.709-715.
13. Ignarro L.J. *Pharmacol. and Toxicol.*, 1990, 67, p.1-7.
14. Ischiropoulos H., Zhu L., Chenet J. et al. *Acta Biochem. Biophys.*, 1972, 298, p.431-437.
15. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J.S. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298, p. 446-451.
16. Kimura H., Murad F. *Life Science*, 1975, 17 (6), p.837-843.
17. Knowles R.G., Moncada S. *Biochem. J.*, 1994, 298, p.249-258.
18. Kosenko E., Liansola M., Montoliu C. et al. *Neurochem. Internat.*, 2003, 43, p.493-499.
19. Lowry O.H., Rosebrough H.G., Farr A.L., Ranadall R.G. *J.Biol. Chem.*, 1951, 193, p.265-275.
20. Moncada S., Higgs E.A. *Faseb J.*, 1995, 9, p.1312-1330.
21. Tannenboun S.R. *Lancet*, 1983, 8325, p.629-632.
22. Yamada K., Nabeshima T. *Neurosci. Res.*, 1997, 28, p.93-102.