

Участие окиси азота в регуляции азотистого обмена в печени

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

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул.П. Севака, 5/1

Ключевые слова: окись азота, гипераммонемия, синтез мочевины, NOS, L-NAME, печень

Аскания Собrero в 1846 г. впервые синтезировал нитроглицерин. В 1879 г. Вильям Мюррель опубликовал статью о том, что нитроглицерин можно использовать в качестве лечебного средства при стенокардии с целью борьбы с болевым синдромом. По автору, нитроглицерин оказывает расширяющее действие на артерии сердца, вследствие чего растёт снабжение сердечной ткани кислородом. По иронии судьбы, Мюррель скончался в 1912 г. от нелеченого сердечного недуга, так ни разу не приняв нитроглицерин [12].

Спустя 100 лет после публикации Мюрреля выяснилось, что эндотелиальным релаксирующим фактором артерии и вен является окись азота, которая выделяется из нитроглицерина при его *per os* применении, и механизм его действия связан со стимулированием синтеза циклического гуанозин монофосфата (сGMP) [15, 16, 23, 30]. Окись азота – свободный радикал, являющийся производным азота с неспаренным, непарным электроном ($N=O^{\bullet}$). Это соединение образуется в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, центральной и периферической нервной системе (нейронах, астроцитах и микроглии), печени (гепатоцитах, периферической зоне печеночных ацинусов, ядрах гепатоцитов), почках и других органах и тканях [9, 32].

NO является мессенджером между нервными клетками и связан с процессами обучения, памяти, сна, боли и др. [9, 13, 29]. NO – универсальный регуляторный фактор в организме, выполняет роль внутри- и внеклеточного передатчика. Сегодня трудно назвать функцию организма, в регуляции которой NO не принимало бы участия. NO синтезируется в ответ на физиологические потребности NO синтазой (NOS) из аргинина. NADPH, FMN, FAD и тетрагидробиоптерин служат кофакторами [4, 16-18, 40, 42]. Существуют 3 изоформы NOS: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS) [6, 29].

Способность NO давать физиологический эффект в большей степени зависит от малой величины его молекулы, его высокой реактивности и способности к свободной диффузии в различные ткани [4,34]. При низкой концентрации (10-100 нМ) NO обеспечивает физиологические процессы, а при увеличении до 2-4 мкМ и более – проявляется токсическое действие вследствие образования из него высокотоксичных соединений и агрессивных свободных радикалов ($\text{ONOO}^\cdot$, $\text{HO}^\cdot$, $\text{H}^\cdot$, NO_2^+ и др.) [4,24].

При патологических состояниях мозга и печени и экспериментальной гипераммонемии происходит активирование NMDA рецепторов, что приводит к активированию NOS, образованию NO, нитрированию или нитрозилированию различных белков и ферментов, в том числе глутаминсинтетазы, и их ингибированию. Ингибирование NOS повышает активность глутаминсинтетазы и способствует устранению аммиака и снижению его токсического действия [14, 25].

Токсичность аммиака впервые была выявлена в лаборатории И.П.Павлова [19]. При гепатитах, циррозе и других заболеваниях печени активность глутаминсинтетазы и ферментов цикла мочевины значительно снижается [20], в результате чего содержание аммиака повышается более чем на 1 мМ и выбрасывается в кровяное русло, через которое проникает в мозг, оказывает свое токсическое действие стимулированием NMDA рецепторов, повышает синтез NO. Через образование токсических интермедиатов NO становится причиной отека мозга [39], энцефалопатии [10] и различных неврологических заболеваний вплоть до болезни Альцгеймера [9, 22].

В этом отношении представляло интерес изучение синтеза мочевины в печени при аммонийной интоксикации, а также в присутствии глутамин, и предотвращение вызванных ими патологических процессов под действием ингибитора NOS L-NAME.

Материал и методы

Опыты были поставлены на половозрелых белых крысах породы Вистар массой 120-130 г. В *in vivo* опытах контрольной группе в/б вводили физ. раствор, второй группе – L-NAME 75 мг/кг, третьей – 7 мМ/кг NH_4Cl , четвертой группе – L-NAME и через 10 мин – NH_4Cl , а через 15 мин животных быстро декапитировали и определяли соответствующие ингредиенты в указанных органах. В *in vitro* опытах животных быстро декапитировали, извлекали печень и после удаления кровеносных сосудов и остатков крови готовили 10% гомогенат в К-фосфатном буфере (мМ): KH_2PO_4 – K_2HPO_4 – 16, MgSO – 5, KCl – 20 и NaCl – 76. Молярность буфера доводили сахарозой до 0,32 М. Для каждой пробы брали 2 мл гомогената. В *in vitro* опытах использовали 0.21 мМ NH_4Cl , 3 мМ глутамин, 1 мМ L-NAME. Реакционную смесь

инкубировали в течение 30 мин при 37°C в атмосфере воздуха. По окончании инкубации белки осаждали 40% трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация составляла 4%). Спустя 30 мин пробы центрифугировали при 3,5 тыс. об/мин в центрифуге К-24 в течение 15 мин. В надосадочной жидкости определяли содержание аммиака и глутамина микродиффузионным методом [5]. Белок определяли по Лоури и соавт. [28], мочевины – уреазным методом [35]. Указанные реактивы были приобретены из Sigma Chemical Company, остальные являлись коммерческими.

Результаты и обсуждение

Известно, что основным механизмом устранения аммиака в организме является синтез мочевины, который происходит, в основном, в печени. Другим механизмом обезвреживания аммиака является синтез глутамина, который, главным образом, происходит в мозгу и мышцах. Наши прежние исследования показали, что под действием ингибитора NOS амингуанидина содержание эндогенного аммиака в мозгу значительно снижается, что расходуется на синтез глутамина [2]. В печеночной ткани под действием L-NAME окисление NADPH подавляясь, снижает дезаминирующую активность глутаматдегидрогеназы, и создаются условия для синтеза глутамата с использованием аммиака [3]. Проведенные нами исследования показали (табл. 1), что в *in vivo*

Таблица 1

Влияние NH_4Cl и L-NAME на количество аммиака и мочевины
($\gamma\text{N}/100$ мг белка) в печени крыс в *in vivo* опытах

Условия экспериментов		Азот аммиака	Общий азот *	Азот мочевины
1	Физ. раствор	$64,72 \pm 2,26$ (13)	$128,36 \pm 3,76$ (12)	63,64
2	L-NAME	$63,20 \pm 2,07$ (11) $**P^{2/1} > 0,5$	$123,35 \pm 2,63$ (12) $P^{2/1} > 0,2$	60,15
3	NH_4Cl	$98,32 \pm 2,53$ (12) $P^{3/1} < 0,001$	$158,77 \pm 8,78$ (12) $P^{3/1} < 0,005$	60,45
4	$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{L-NAME}$	$90,63 \pm 6,6$ (12) $P^{4/3} > 0,05$	$156,26 \pm 5,48$ (12) $P^{4/3} > 0,5$	65,63

* Азот аммиака + азот мочевины

** Здесь и в последующих таблицах у Р указаны номера сравниваемых вариантов эксперимента

опытах содержание аммиака ($\gamma\text{N}/100$ мг белка) в печени крыс контрольной группы составляет $64,72 \pm 2,26$. Под действием ингибитора

NOS L-NAME его количество не подвергается особым изменениям. Внутривенное введение аммиака (7 мМ/кг) в виде NH_4Cl приводит к резкому увеличению его количества (на 51,92%). В этих условиях животные впадали в коматозное состояние. При введении ингибитора NOS L-NAME за 10 мин до введения NH_4Cl животные внешне выглядели нормально, коматозное состояние предотвращалось. Содержание аммиака заметно снижалось. Действие L-NAME можно объяснить ингибированием NOS, снижением уровня NO и предотвращением образования токсических продуктов метаболизма NO, денитрированием или денитрозилированием глутаминсинтетазы и активированием синтеза глутамина [2, 14, 25]. Устранение аммиака в *in vivo* условиях могло происходить через синтез мочевины. В наших экспериментах под действием L-NAME в присутствии NH_4Cl количество мочевины лишь несколько увеличивается, что в *in vivo* экспериментах можно объяснить удалением части образовавшейся мочевины почками.

Таблица 2

Влияние NH_4Cl и L-NAME на количество аммиака и мочевины ($\gamma\text{N}/100\text{мг}$ белка) в головном мозгу крыс в *in vivo* опытах

Условия экспериментов		Азот аммиака	Общий азот	Азот мочевины
1	Физ. раствор	$108,38 \pm 4,23$ (6)	$187,65 \pm 4,83$ (6)	79,27
2	L-NAME	$114,88 \pm 1,62$ (6) $P^{2/1} > 0,05$	$179,96 \pm 2,38$ (6) $P^{2/1} > 0,1$	65,08
3	NH_4Cl	$142,0 \pm 2,03$ (6) $P^{3/1} < 0,001$	$211,9 \pm 2,28$ (6) $P^{3/1} < 0,005$	69,9
4	$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{L-NAME}$	$133,61 \pm 3,28$ (6) $P^{4/3} < 0,001$	$216,75 \pm 1,79$ (6) $P^{4/3} > 0,1$	83,14

В головном мозгу в условиях *in vivo* в контроле содержание эндогенного аммиака составляет 108.38 (табл. 2). На этом фоне L-NAME не оказывает особого влияния на содержание аммиака. NH_4Cl значительно увеличивает (на 31,02%) количество аммиака в мозгу ($P < 0,001$). При введении L-NAME за 10 мин до введения NH_4Cl количество аммиака снижается ($P < 0,001$), который, вероятно, используется для синтеза глутамина [2]. Количество мочевины в присутствии NH_4Cl несколько снижается. В этих условиях L-NAME четко увеличивает (на 18,94%) содержание мочевины (табл. 2), что, вероятно, связано с её защитной функцией.

В следующей серии *in vitro* мы изучили накопление аммиака и синтез мочевины в печеночной ткани при экспериментальном ги-

Таблица 3

Накопление аммиака и синтез мочевины ($\gamma\text{N}/100\text{мг}$ белка) в гомогенатах печени крыс при экспериментальном гипераммонемическом синдроме

Содержание эндогенного аммиака		Содержание аммиака и мочевины при добавлении NH_4Cl и L-NAME		
До инкубации	После инкубации			
контроль	контроль	L-NAME	NH_4Cl	NH_4Cl + L-NAME
1	2	3	4	5
Содержание аммиака				
$81,15 \pm 1,89$ (18)	$125,94 \pm 1,46$ (18) $P^{2/1} < 0,001$	$110,69 \pm 1,14$ (9) $P^{3/2} < 0,001$	$165,48 \pm 7,7$ (18) $P^{4/2} < 0,01$	$155,69 \pm 5,68$ (15) $P^{5/4} > 0,05$
Содержание мочевины				
$71,27 \pm 2,01$ (12)	$53,76 \pm 2,73$ (15) $P^{2/1} < 0,001$	$50,4 \pm 3,05$ (12) $P^{3/2} > 0,05$	$47,22 \pm 3,13$ (15) $P^{4/2} > 0,05$	$44,11 \pm 1,43$ (12) $P^{5/4} > 0,05$

пераммонемическом синдроме, вызванном аммоний хлоридом (табл. 3). Исследования показали, что содержание эндогенного аммиака в гомогенатах печени составляет 81,15. При 30 мин инкубации его количество увеличивается, составляя 125,94 ($P < 0,001$). Под действием L-NAME (1 mM) образование аммиака снижается до 110,69 ($P < 0,001$), что можно объяснить синтезом глутамина [2,14,25]. При добавлении к инкубационной среде 0,21 mM NH_4Cl количество свободного аммиака увеличивается, составляя 165,48 ($P < 0,001$). В присутствии NH_4Cl L-NAME приводит к некоторому снижению содержания аммиака.

При инкубации гомогенатов печени количество эндогенной мочевины четко снижается (на 24,57%, $P < 0,001$), вероятно, связываясь с частицами гомогената, выпадает в осадок. Под действием L-NAME наблюдается тенденция к снижению количества эндогенной мочевины. При гипераммонемии (добавление NH_4Cl) не происходит синтеза мочевины, а в присутствии L-NAME отмечается лишь тенденция к ее снижению. Следует иметь в виду, что при гипераммонемии в условиях *in vivo* и *in vitro* нарушается мочевинообразование вследствие подавления цикла трикарбоновых кислот [26, 38] и снижения синтеза АТФ [14, 25]. Учитывая это обстоятельство, при изучении синтеза мочевины используют различные активаторы для стимулирования мочевинообразования [1].

В следующей серии мы использовали в качестве источника аммиака глутамин (табл. 4). Исследования показали, что и в этой серии количество эндогенного аммиака при инкубировании значительно увеличивается (на 82,92%), и под действием L-NAME тенденция к

Таблица 4

Накопление аммиака и синтез мочевины ($\gamma\text{N}/100\text{мг белка}$)
из глутамината в гомогенатах печени крыс

Содержание эндогенного аммиака		Содержание аммиака и мочевины при добавлении глутамина и L-NAME		
До инкубации	После инкубации			
контроль	контроль	L-NAME	глутамин	глутамин+ L-NAME
1	2	3	4	5
Содержание аммиака				
57,01± 1,42 (15)	104,28±2,91 (24) P ^{2/1} <0,001	96.53± 3,87 (15) P ^{3/2} >0,05	135,57±3,33 (18) P ^{4/2} <0,001	124,82±1,8 (15) P ^{5/4} <0,025
Содержание мочевины				
79,58 ±1,29 (18)	63,83 ±1,91 (27) P ^{2/1} <0,01	41,19 ±1,05 (9) P ^{3/2} <0,001	73,93 ±2,35 (21) P ^{4/2} <0,005	47,71 (15) P ^{5/4} <0,001

снижению его количества сохраняется. При добавлении к инкубационной среде глутамината количество аммиака увеличивается ($P<0,001$). L-NAME несколько снижает образование аммиака из глутамината ($P<0,025$). Снижение количества эндогенной мочевины при инкубировании и в этой серии повторяется ($P<0,001$). Под действием L-NAME количество мочевины четко снижается, что можно объяснить усилением синтеза глутамината [2]. Примечательно, что в присутствии глутамината выражено увеличивается синтез мочевины (на 15,8%, $P^{4/2}<0,005$). На этом фоне L-NAME четко подавляет синтез мочевины (на 35,47%, $P^{5/4}<0,001$). Можно допустить, что в этих условиях образовавшийся из глутамината аммиак вновь расходуется на синтез глутамината вследствие активирования глутаминсинтетазы денитрированием или денитрозилированием [2, 14, 25]. Таким образом, в отличие от гипераммонемии, вызванной NH_4Cl (табл.3), в присутствии глутамината четко стимулируется синтез мочевины (табл.4), вероятно, из-за постепенного высвобождения аммиака из глутамината. Токсический эффект аммиака связан с активированием NMDA рецепторов, синтезом NO и токсических продуктов его метаболизма, а не ингибированием глутаминсинтетазы [14, 25].

Впервые в 1964 г. было показано, что метионинсульфоксимин (MS) является ингибитором глутаминсинтетазы [41]. Однако данные о том, что MS, ингибируя синтез глутамината, предотвращает гибель животных, не подтвердились. После появления работ о том, что MS ингибирует высвобождение глутамата, стало ясно, что MS оказывает свое действие через ингибирование NMDA рецепторов вследствие снижения коли-

чества глутамата [37]. Тем не менее продолжают исследования относительно ингибирующего действия MS на глутаминсинтетазу [21].

Попытка применения антагониста NMDA рецептора МК-801 с лечебной целью выявила и его токсическое действие, механизм которого предстоит выяснить [8]. При циррозе печени содержание NO увеличивается под действием eNOS в эндотелиальных клетках и iNOS в сосудах стенок и клетках под действием цитокинов и эндотоксинов [7]. iNOS, который является Ca^{2+} -независимым, оказывает положительную роль в борьбе с инфекциями в сосудах стенок, гепатоцитах и купферовских клетках [27]. У печеночных больных увеличивается и количество цитрулина, вероятно, из-за ослабления синтеза мочевины [36]. NO играет ведущую роль в развитии артериальной вазодилатации [7].

Показано, что при циррозе печени избыточное количество NO выбрасывается в альвеолы, затем в респираторный тракт, где оказывает защитное действие в борьбе с различными инфекциями [11, 31]. При этаноловом циррозе снижается образование NO в непаренхимальных клетках и компенсаторно повышается в гепатоцитах, что можно объяснить проявлением защитной функции при этой патологии [33].

В заключение следует отметить, что при различных патологиях печени и экспериментальном гипераммонемическом синдроме имеет место токсическое действие аммиака с тяжелыми последствиями (гибель нейронов, нейродегенеративные заболевания, глубокие поражения печеночной ткани). Возникает необходимость поиска безвредных средств повышения эффективности циклов трикарбоновых кислот и мочевинообразования, а также ингибиторов NOS, активаторов глутаминсинтетазы и внедрения их в клиническую практику с целью борьбы с гипераммонемическим синдромом и его последствиями.

Поступила 28.04.09

Ազոտի օրգանիկ մասնակցությունը լյարդում ազոտային փոխանակության կարգավորմանը

Ժ.Ա. Պարոնյան, Գ.Հ. Թուրքյան, Ն.Վ. Բոչարյան, Գ.Ս. Մխալյան,
Գ.Վ. Ապրիկյան

Գերամոնիակային համախտանիշի ժամանակ, որը տեղի է ունենում լյարդի զանազան հիվանդությունների դեպքում, խանգարվում է եռկարբոնաթթվային ցիկլի աշխատանքը, որը բերում է միզանյութի սինթեզի համակարգի թուլացման: Ամոնիակը՝ խթանելով NO-ի սինթեզը, պատճառ է դառնում նրանից թունավոր նյութերի առաջացման և գլոտամինսինթետազի արգելակման: Հարց է առաջանում ամոնիակի

թումալորման դեմ պայքարելու նպատակով որոնել NOS-ի անվնաս արգելակիչներ, գլոտամինսինթետազի ակտիվատորներ, ինչպես նաև եռկարբոնաթթվային ու միզանյութի ցիկլերի խթանիչներ ու ներդնել կլինիկական պրակտիկայում՝ գերամոնիակային համախտանիշի ու նրա հետևանքների դեմ պայքարելու նպատակով:

Participation of nitric oxide in regulation of liver nitrogen metabolism

Zh.A.Paronian, G.H.Turshian, N.V.Kocharian, G.S.Misakyan,
G.V.Aprikian

In the present study we have found out that urea cycle in liver is not able to remove excess amount of ammonia in hyperammonemic situation because of the disturbance of tricarboxilic acid and hence urea cycle. In contrast to ammonia glutamine serves a better substance for urea synthesis, perhaps because of gradual formation of ammonia. We have concluded that the best way for resolving this problem is searching substances able to potentiate tricarboxilic acid and urea cycles.

Литература

1. Бунятян Г. Х., Давтян М.А. Вопросы биохимии мозга, 1964, т.1, с.97-104.
2. Мисакян Г.С., Паронян Ж.А., Туршян Г.А., Априкян Г.В. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 2, с.18-22.
3. Паронян Ж.А., Мисакян Г.С., Туршян Г.А., Априкян Г.В. ДНАН Армении, 2007, т.107, 1, с.79-86.
4. Раевский К.С., Башкатова В.Г., Ванин А.Ф. Вестник Российской АМН, 2000, т.4, с.11-15.
5. Силакова А.И., Труш Г.Р., Являкова А. Проблемы медицинской химии, 1962, т.5, с.538-543.
6. Alderton W.K., Cooper C.A., Knowles R.G. Biochem. J., 2001, 357, p.593-615.
7. Atucha N.M., Nadal F.J.A., Lyu D., Alcaraz A. et al. Current Vascular Pharmacology, 2005, 3, p. 81-85.
8. Brenner E., Kondziella D., Haberg A., Sonnewald U. J.Neurochem., 2005, 94, p.1594-1603.
9. Bruhwyler J., Chleide E., Liegeois J.F., Carreer F. Neurosci. Behav. Rev., 1993, 17, p.373-385.
10. Clemmensen J.O., Larsen F.S., Kondrup J. et al. Hepatology, 1999, 29, p. 648-653.
11. Delclaux C., Mahut B., Zerah-Lancner F. et al. Am. J.Respir. Crit. Care Med., 2002, 165, (3), p. 332-337.
12. Devlin Th.M., ed.In: Textbook of Biochemistry, USA, 2006, p.438.
13. Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H. Ann.Neurol., 1992, 32, p.297-311.
14. Felipo V., Butterworth R.F. Progress in Neurobiology, 2002, 67, p.259-279.
15. Furchgott R.F., Zawadzki I.V. Nature, 1980, 288, p.373-376.
16. Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. Nature, 1988, 336, p.385-388.
17. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.C., Moncada S.Eur. J.Pharmacol., 1989, 172, p.413-416.
18. Griffith O.W., Stuehr D.J. Annu.Rev. Physiol., 1995, 57, p.707.
19. Hahn M., Massen O., Nenchi M., Pavlov I. Arch.Exp.Path.Pharmac., 1893, 32, p.161-173.

20. Haussinger D. Eur. J. Biochem., 1983, 133, p.269-275.
21. Hawkins A., Jessy J., Mans A.M., De Josef M.R. J. Neurochem., 1993, 60, p.1000-1006.
22. Heales S.J.R., Bolanos J.P., Stewart V.C. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1410, p. 215-228.
23. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, p. 9265.
24. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J.S. Arch. Biochem. Biophys., 1992, 298, p.446-451.
25. Kosenko E., Liansola M., Montoliu C. et al. Neurochem. Internat., 2003, 43, p.493-499.
26. Kosenko E., Felipe V., Grisolia S., Kaminsky Y. Metab. Brain Dis., 1996, 12, (1), p.69-82.
27. Li J., Billiar T.R. Am. J. Physiol. Gastrointest. and Liver Physiol., 1999, 276, (5), PG1069-G1073.
28. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., 1951, 193, p.265-267.
29. Lincoln J., Hoyle C.H.V., Burnstock G. In: Nitric Oxide in Health and Disease. Biochemical Research Topics. Cambridge University Press, 1997.
30. Murad F., Kimura H. Life Science, 1975, 17(6), p.837-843.
31. Matsumoto A., Ogura K., Hirata Y. et al. Annals Internal Medicine, 1995, 123, (2), p.110-113.
32. McNaughton L., Puttagunda L., Martinez-Cuesta M.A. et al. PNAS, 2002, 99, (26), p.17161-17166.
33. Naji A.A., Greenberg G.S., Tahan S.R. et al. Gastroenterology, 1995, 109, (3), p.899-907.
34. Nelson R.J., Kriegsfeld L.J., Dawson V.L., Dawson T.M. Front Neuroendocrinol., 1997, 18, (4), p.463-491.
35. Okuda H., Fujii S., Kawashima Y. Tokushima J. Experim. Medicine, 1965, 12, (1), p.11-23.
36. Parva A.E., Negrean V., Pleca-Manea L. et al. Romanian J. Gastroenterology, 2005, 14, (3), p.225-230.
37. Paulson R.E., Fonnum F. J. Neurochem., 1989, 52, p.1823-1829.
38. Ratnakumari L., Qureshi I.A., Butterworth R.F. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 184, p.740-751.
39. Swain M., Butterworth R.E., Blei A.T. Hepatology, 1992, 15, p.449-453.
40. Schmidt H.H.H., Hofmann H., Ogilvie P. In: The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology. Eds. by Korowski H. and Nacada H., Berlin, Heidelberg, 1995, p.75-86.
41. Warren K.S., Schenker S. J. Lab. Clin. Med., 1964, 64, p.442-449.
42. Yamada K., Nabeshima T. Neurosci. Res., 1997, 28, p.93-102.