

УДК 611.8546/7 11

Новый подход к лечению гипераммонемического синдрома

Н.В. Кочарян, И.М. Бархударянц, Г.В. Априкян

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

Ключевые слова: гипераммонемический синдром, аминогуанидин, орнитин

При воспалительных процессах активируются цитокины, которые через макрофаги и нейтрофилы активируют iNOS, приводят к накоплению NO, NO₂, N₂O₃, превращая их в агрессивные радикалы OH[•], OCl[•], ONOO[•] и др., и становятся причиной окисления гуанина в оксигуанидин. Последний в 1000 раз более активно взаимодействует с пероксинитритом и в результате расщепления кольцо гуанидина превращается в дегидрогуанидиногидантоин, который отщепляет гуанидин с образованием парабенной кислоты [11, 27]. Агрессивные радикалы также образуются при гипераммонемическом синдроме, вызванном различными заболеваниями печени, некоторых других патологических состояниях и под действием экзогенного аммиака в результате активирования глутаматных NMDA рецепторов, которые становятся причиной активирования NOS [13, 19]. Примечательно, что нитрозилирование NMDA рецепторов под действием NO инактивирует его [24].

В крови у людей и животных содержатся производные гуанидина: аргинин, гуанидинуксусная кислота, гуанидинсукцинат, креатин, креатинфосфат, метилгуанидин, креатинин [18, 22]. С мочой выделяется креатин, креатинин, аргинин, гуанидинуксусная кислота, гуанидин, метилгуанидин [18]. В кишечнике глутамин последовательно превращается в глутаматсемиальдегид, орнитин, цитрулин, последний в почках превращается в креатин, который в мышцах превращается в креатинфосфат. Гуанидин содержится в моче как нормальный продукт метаболизма нуклеиновых кислот [18]. Природное гуанидиновое соединение – аргинин дает начало креатину, который в мышцах превращается в креатинфосфат, являясь источником энергии при работе мышц. Другой продукт метаболизма аргинина – гуанидинуксусная кислота стимулирует секрецию инсулина. Аргинин, креатин и гуанидин менее эффективны [4].

Аминогуанидин, который имеет широкий спектр действия на организм, впервые синтезирован в 1892 г. восстановлением нитрогуанидина

водородом [23]. В обзорной статье [32] обобщены достижения в расшифровке разнообразного действия аминугуанидина на организм человека и животных. В организме аминугуанидин не обнаружен. При его внутривенном введении быстро покидает кровь и аккумулируется в печени, почках, тканях желудочно-кишечного тракта, за исключением мозга, через 2 часа ещё обнаруживается в тканях [5]. Аминугуанидин является селективным ингибитором iNOS [9, 15]. По данным Laszlo, аминугуанидин кроме iNOS ингибирует и nNOS и eNOS [21]. Необходимо иметь в виду, что nNOS и eNOS Ca^{2+} -зависимые и продуцируют сравнительно малое количество NO, необходимое для регулирования зависимой от эндотелий релаксации (т.е. ацетилхолином) и нервной передачи. Тогда как активирование iNOS изоформы цитокинами и бактериальным эндотоксином при воспалительных процессах вызывает продукцию большого количества нитритов, превращению их в агрессивные радикалы [11, 27]. Следует иметь в виду, что аминугуанидин является мощным ингибитором образования NO, вызванным цитокинами. Другие гуанидиновые соединения менее активны [16]. Гуанидиновая структура содержится в аргинине, из которого образуется NO под действием NOS. В этой связи следует иметь в виду, что аргиназная активность самая высокая в печени, тонких кишках, поджелудочной железе, почках, мозге, сердце и скелетных мышцах [17].

Аминугуанидин подавляет образование продуктов неферментативного гликозилирования белков, ферментов и липидов при диабете, атеросклерозе и старении, улучшает работу васкулатуры, снижая накопление продуктов гликозилирования в сосудах [7, 8, 14]. Примечательно, что регулярные умеренные физические упражнения снижают неферментативное гликозилирование, оказывая лечебный эффект [6].

Аминугуанидин ингибирует диаминооксидазу (гистаминазу), которая катализирует окислительное дезаминирование диаминов – гистидина и путресцина [34]. По мнению Nilsson, ингибирование диаминооксидазы аминугуанидином *in vivo* может вызывать побочные эффекты, связанные с накоплением гистамина в кровяном русле и ингибированием NOS, влияя на иммунологический ответ, нервную передачу и сосудистый контроль. В обезвреживании гистамина определенную роль может играть также его метилирование [28]. Потенциальную токсичность аминугуанидина возможно устранить при добавлении пиридоксамина или других аналогов витамина B₆.

В литературе имеются данные о том, что кроме ингибирования образования продуктов гликозилирования, возможно расщепление его продуктов [30] фармакологическими средствами, которые можно использовать при лечении диабета, болезни Альцгеймера, ревматоидного артрита и атеросклероза [12]. Итак, гуанидиновые соединения играют значительную роль в метаболизме и функции организма.

Особый интерес представляет аминоксидин, который хотя не обнаружен в организме человека и животных, обладает широким фармакологическим действием. При различных заболеваниях, в том числе гепатитах разного происхождения, накапливается большое количество аммиака, который становится причиной активирования NOS, образования избыточного количества NO и агрессивных радикалов, которые нитрируют и нитрозируют различные соединения, в том числе глутаминсинтетазу, инактивируя её, приводят к накоплению аммиака, оказывающего токсическое действие на организм [2, 13, 19].

Нами было показано, что под действием аминоксидина содержание аммиака в печени снижается, что расходуется на синтез глутамина [2, 3]. В литературе имеются данные о том, что при комбинировании двух аммиакснижающих средств – орнитина с фенилацетатом [10, 31] возможно получить больший аммиакснижающий эффект, т. е. усилить детоксикацию аммиака. Следует иметь в виду, что орнитинаминотрансфераза (ОАТ) мозга не отличается от печёночной. Пиридоксальфосфат необходим для максимальной активности ОАТ [12].

Мы задались целью изучить аммиакснижающий эффект при сочетанном применении аминоксидина с орнитином. Как известно, орнитин является одним из главных членов цикла мочевинообразования. Кроме этого, под действием ОАТ, наибольшая активность которой сосредоточена в печени, орнитин превращается в глутамат, затем в глутамин и удаляется с мочой [20]. Имеются данные о том, что при ингибировании ОАТ количество орнитина увеличивается, в результате чего синтез мочевины усиливается, что даёт аммиакснижающий эффект [33]. Однако нам представляется, что при значительном накоплении аммиака одним только увеличением орнитина цикл мочевинообразования не может полностью утилизировать такое количество аммиака. И тогда орнитин под действием ОАТ превратится в глутаминовую кислоту с обезвреживанием аммиака через синтез глутамина. Интересно, что ОАТ преимущественно локализована в синапсах, что коррелирует с высокоаффинным поглощением глутамата. Авторы заключают, что ОАТ, скорее всего, ответственна за синтез глутамата в глутиматергических нейронах [36].

Материал и методы

Опыты были поставлены на половозрелых белых крысах популяции Вистар массой 130-150 г. Животных быстро декапитировали, извлекали печень и головной мозг без мозжечка и после удаления кровеносных сосудов готовили 10% гомогенат в калий-фосфатном буфере (pH 7,4), (mM): KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -16, MgSO_4 -5, KCl -20 и NaCl -76. Молярность буфера довели сахарозой до 0,32 М. В качестве добавок использовали в конечных концентрациях (mM): 1 mM аминоксидин и 3,5 mM орнитин. В наших

прежних экспериментах [2], для получения *in vitro* модели гипераммонемии, с успехом использовали 30 мин инкубирование гомогенатов при 37°C, при котором количество эндогенного аммиака резко увеличивалось. Аммиак определяли салицилатгипохлоридным методом [35], белок – по Лоури [25]. Указанные реактивы были приобретены из Sigma Chemical Company, остальные являлись коммерческими. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли параметрическим однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA) программы Sigma Stat 3,5 for Windows. В качестве критерия достоверности принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что при инкубировании гомогенатов печени под действием 1 mM аминоксидина, содержание аммиака (табл.1) снижается на 24,79%. Под действием 3,5 mM орнитина содержание аммиака снижается ещё сильнее – на 67,55%. Интересно, что при совместном применении аминоксидина с орнитином, аммиакснижающий эффект как аминоксидина, так и орнитина, усиливается. Так, если под действием аминоксидина содержание аммиака снижается на 24,79%, то в присутствии орнитина этот эффект усиливается в весьма высокой степени: от 24,79% до 90,19%. С другой стороны, если под действием орнитина содержание аммиака снижается на 67,55%, то в присутствии орнитина и аминоксидина содержание аммиака уменьшается на 90,19%. Полученные результаты показывают, что при совместном применении аминоксидина и орнитина эффект каждого из них не подавляется, а суммируется. Эти результаты указывают на то, что в гомогенатах печени при совместном применении аминоксидина и орнитина их аммиакобезвреживающие эффекты складываются.

Таким образом, нами получены новые данные, указывающие, что при гипераммонемическом синдроме (интоксикации аммиаком) в качестве лечебного средства, наряду с комбинированием орнитина с фенилацетатом [10, 31], можно с успехом использовать комбинирование аминоксидина с орнитином. Нами намечается проведение исследований по выяснению влияния аминоксидина и орнитина как отдельно, так и при их совместном применении при гипераммонемическом синдроме в условиях *in vivo*.

Наши исследования показали (табл.2), что аминоксидин в гомогенатах головного мозга не оказывает существенного влияния на снижение аммиака. В отличие от аминоксидина под действием орнитина в гомогенатах мозга при инкубации происходит резкое снижение аммиака – на 72,41%. При совместном применении аминоксидина с орнитином проявляется эффект только орнитина. Следует иметь в виду, что хотя наши исследования проведены с гомогенатами органов, аминоксидин

при внутривенном введении проникает во все органы и ткани, за исключением головного мозга [5].

Таблица 1

*Действие орнитина и аминоксидина на содержание аммиака
(в γ на 100 мг белка) в гомогенатах печени белых крыс*

Контроль	Аминоксидин		Орнитин		Аминоксидин+орнитин		
	количество	разница, %	количество	разница, %	количество	разница, %	разница с орнитиним, %
75,63±2,19 (5)	56,88± 5,14 (6)	-24,79 P<0,025	24,54± 8,89 (5)	-67,55 P<0,001	7,42± 2,1 (5)	-90,19 P<0,001	-69,76 P<0,05

Таблица 2

*Действие орнитина и аминоксидина на содержание аммиака
(в γ на 100 мг белка) в гомогенатах головного мозга белых крыс*

Контроль	Аминоксидин		Орнитин		Аминоксидин+орнитин		
	количество	разница, %	количество	разница, %	количество	разница, %	разница с орнитиним, %
127,8±6,8 (5)	127,4± 6,6 (5)	-0,31	35,26±10,44 (5)	-72,41 P<0,001	31,74±8,72 (5)	-75,16 P<0,001	-9,98 P>0,05

Нужно отметить, что предложенное нами сочетанное применение аминоксидина с орнитиним, по сравнению с применением орнитина с фенилацетатом [10, 29], имеет ряд преимуществ: аминоксидин, кроме аммиакснижающего эффекта, через усиление синтеза глутамина, в результате ингибирования iNOS [9, 15], предотвращает неферментативное гликозилирование белков и липидов при диабете, гипергликемии и старении [7, 8, 14], снижает количество агрессивных радикалов, вызванных цитокинами и бактериальным эндотоксином при воспалительных процессах [16], подавляет развитие атеросклероза [26, 29]. Нами ранее было показано, что при старении увеличивается содержание аммиака и уменьшается содержание глутамина [1]. Наши результаты указывают, что положительное действие аминоксидина при старении [7] частично можно объяснить уменьшением накопления аммиака вследствие стимулирования синтеза глутамина.

Полученные нами результаты и литературные данные дают основание заключить, что сфера применения аминоксидина и орнитина в качестве лечебных средств расширяется.

Поступила 12.03.14

Նոր մոտեցում գերամոնիակային համախտանիշի բուժման մեջ

Ն.Վ. Քոչարյան, Ի.Մ. Բարխուդարյանց, Գ.Վ. Ապրիկյան

Գերամոնիակային համախտանիշը, որն առաջանում է լյարդի զանազան հիվանդությունների ժամանակ, պատճառ է դառնում ամոնիակային թունավորման և էնցեֆալոպաթիաների զարգացման: Ամոնիակի թունավոր քանակների վնասագերծման համար օգտագործվում են զանազան դեղամիջոցներ: Այդ նպատակով մեր կողմից առաջին անգամ օգտագործվել է ամինոգուանիդինը՝ զուգորդված օրնիտինի հետ: Պարզվել է, որ այդ խառնուրդը արդյունավետ միջոց է գերամոնիակային համախտանիշի բուժման համար՝ համեմատած այդ երկու նյութերի առանձին օգտագործման հետ:

New approach to the treatment of hyperammonemia syndrome

N.V. Kocharian, I. M. Barkhudaryants, G.V. Aprikian

Hyperammonemia, which is developed during different pathological conditions of liver, leads to ammonia intoxication and hepatic encephalopathy. There are described various ammonia lowering therapeutic strategies. We have offered a combination of aminoguanidine with ornitine, which demonstrates more effective results compared to the effect of these two substances used separately.

Литература

1. *Ապրիկյան Գ. Վ., Շագինյան Վ. Ա.* Роль глутаматдегидрогеназы в окислительном дезаминировании глутаминовой кислоты в мозгу и печени на разных этапах постнатального развития. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1973, т. VIII, с. 91-105.
2. *Միսակյան Գ. Ս., Փարոնյան Զ. Ա., Թուրսյան Գ. Ա., Ապրիկյան Գ. Վ.* Роль ингибиторов синтеза окси азота в предотвращении токсического действия аммиака и глутамата в головном мозгу. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 2, с. 18-22.
3. *Փարոնյան Զ. Ա., Միսակյան Գ. Ս., Թուրսյան Գ. Ա., Ապրիկյան Գ. Վ.* Роль окиси азота в образовании и устранении аммиака в печеночной ткани. ДАН Армении, 2007, т. 107, 1, с. 79-86.
4. *Alsever R.N., Georg R. H., Sussman K.E.* Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. Endocrinology, 1970, 86, p. 332-336.
5. *Beaven M.A. et al.* A specific and sensitive assay for aminoguanidine: Its application to a study of the disposition of aminoguanidine in animal tissues. J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics, 1969, 165 (1), p. 14-22.

6. *Boor P. et al.* Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. *Metabolism*, 2009, 58 (11), p. 1669-1677.
7. *Brownley M. et al.* Advanced glycosylation and products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication. *New Engl. J. Med.*, 1988, 318, p. 1315-1321.
8. *Brownley M. et al.* Aminoguanidine prevents diabetes-mediated arterial wall protein crosslinking. *Science*, 1986, 232, p. 1629-1632.
9. *Corbett J.A. et al.* Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*, 1992, 41, p. 552-556.
10. *Davis N.A., Wright G.* L-ornithine and phenylacetate synergistically produce sustained reduction in ammonia and brain water in cirrhotic rats. *Hepatology*, 2009, 50 (1), p. 155-161.
11. *Dedon P.C., Tannenbaum S.R.* Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem. Biophys.*, 2004, 423, p. 12-22.
12. *Deshmukh D.R., Srivastava S. K.* Purification and properties of ornithine aminotransferase from rat brain. *Experientia*, 1984, 40, p. 357-359.
13. *Felipo V., Butterworth R.F.* Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiol.*, 2002, 67, p. 259-279.
14. *Goldin A. et al.* Advanced glycation and products. *Circulation*, 2006, 114, p. 597-605.
15. *Griffiths M. J.D. et al.* Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *British J. Pharmacol.*, 1993, 110 (3), p. 963-968.
16. *Hasan K. et al.* Inhibition of nitric oxide formation by guanidine. *Europ. J. Pharmacol.*, 1993, 249 (1-2), p. 101-106.
17. *Herzfeld and Raper S. M.* The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.*, 1976, 153, p. 469-478.
18. *John F. et al.* Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine and methyl-guanidine in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 1956, 222, p. 225-236.
19. *Kosenko et al.* Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Internat.*, 2003, 43, p. 493-499.
20. *Kumar H. R. et al.* Sensitive assay for ornithine aminotransferase in rat brain mitochondria by ninhydrin method. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2009, 24 (3), p. 275-279.
21. *Laszlo F. et al.* Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 272 (2-3), p. 169-175.
22. *Lazdins I., Dawborn J. K.* Concentration of guanidines in normal human plasma. *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.*, 1978, 5 (1), p. 75-80.
23. *Lieber E., Smith G.B.L.* The chemistry of aminoguanidine and related substances. *Chem. Rev.*, 1939, 25, p. 213-271.
24. *Lipton S.A., Choi Y. B. et al.* A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 1993, 364, p. 626-632.
25. *Lowry O. H. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, p. 265-275.
26. *Lyons T. J.* Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, 1993, 71, p. 26B-31B.
27. *Niles J. C. et al.* Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*, 2006, 19, p. 109-121.
28. *Nilsson B. O.* Biological effects of aminoguanidine: An update. *Inflam. Res.*, 1999, 48, p. 509-515.
29. *Panagiotopoulos S. et al.* Aminoguanidine has an antiatherogenic effect in the cholesterol fed rabbit. *Atherosclerosis*, 1998, 136, p. 125-131.
30. *Rahbar S., Figarola J. L.* Novel inhibitors of advanced glycation end products. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 419, p. 63-79.

31. *Rose C. F.* Ammonia-lowering strategies for the treatment of hepatic encephalopathy. *Clin. Pharmacol. and Therap.*, 2012, 92 (3), p. 321-331.
32. *Saczewski F., Balewski L.* Biological activities of guanidine compounds. *Expert. Opin. Ther. Path.*, 2013, 23(8), p. 965-995.
33. *Seiler N.* Ornithine aminotransferase a potential target for the treatment of hyperammonemias. *Curr. Drug Targets*, 2000, 1 (2), p. 119-153.
34. *Seuler W.* Zur hemmung der diaminoxiasse. *Experientia*, 1952, 8, p. 230-232.
35. *Tabacco A., Meattini F. et al.* Simplified enzymatic colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clin Chem.*, 1979, 25 (2), p. 336-337.
36. *Wong P. T. et al.* Sensitive assay for ornithine aminotransferase: regional and subcellular distribution in rat brain. *J. Neurochem.*, 1981, 36(2), p. 501-505.