

УДК 577.151.042:577 25

©Коллектив авторов

## **АНТИОКСИДТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В ПЕЧЕНИ, МОЗГЕ, СЕРДЦЕ И ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС ПРИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

*Н.И. Венедиктова, О.В. Лопата, А.С. Погосян, Е.А. Косенко, Ю.Г. Каминский*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино,  
факс: (0967) 790553; эл. почта: kaminsky@iteb.ru

Введение больших количеств солей аммония приводит к скорой гибели животных. Однако молекулярные механизмы токсичности аммиака остаются невыясненными. Мы исследовали влияние токсичных доз ацетата аммония на активность антиоксидельных ферментов в мозге, печени, сердце и эритроцитах крыс. Острая интоксикация аммиаком вызывает быстрое (в течение 11 мин) снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы в митохондриях и цитоплазме печени, мозга и в эритроцитах, но повышение активности этих ферментов в сердце. Сниженная активность ферментов в печени, мозге и эритроцитах является свидетельством системного окислительного стресса, а повышенная их активность в сердце может быть следствием адаптации этого органа к окислительному стрессу при гипераммониемии.

**Ключевые слова:** аммиачная интоксикация, ферменты-антиоксиданты, печень, мозг, сердце, эритроциты

**ВВЕДЕНИЕ.** Аммиак - это естественный продукт распада белков, аминокислот, пуринов и других азотистых соединений. Однако в высоких концентрациях аммиак становится нейротоксином, вызывая функциональные нарушения в центральной нервной системе, которые могут привести к коме и смерти. При печеночной недостаточности или портокавальном шунтировании концентрация аммиака в крови повышается и функционирование мозга нарушается. Такое заболевание известно как печеночная энцефалопатия. Механизм, по которому недостаточность печени или гипераммониемия ведут к нарушению функций мозга, остается не выясненным.

Введение больших доз ацетата аммония приводит к гипераммониемии и скорой гибели животных. Несмотря на большой объем выполненных биохимических исследований, молекулярный механизм токсичности аммиака не известен. Острая интоксикация аммиаком сопровождается тяжелыми нарушениями аэробного обмена глюкозы и истощением основных энергетических субстратов в печени, мозге и плазме крови - таких, как гликоген, кетоновые тела и АТФ [1,2], - а также изменениями цитоплазматического и митохондриального отношений  $NAD^+/NADH$  в противоположных направлениях [3] и снижением активности малат-аспартатного шунтового механизма переноса восстановительных эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии [4]. Все эти изменения могут быть причинами вызываемых аммиаком комы и смерти, однако одного истощения АТФ недостаточно для гибели нейронов [5], и, следовательно, в токсическое действие аммиака вовлекаются другие биохимические процессы.

## АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПРИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Нарушение функционирования митохондрий при аммиачной интоксикации может не только ослаблять их способность к синтезу АТФ, но также интенсифицировать генерацию свободных кислородных радикалов. Пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) и супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot -}$ ) принадлежат к широкому классу активных кислородных метаболитов-окислителей. Гомеостаз этих кислородных метаболитов в клетке поддерживается многочисленными антиокислительными ферментами, среди которых супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и каталаза играют главную роль. СОД имеется в клетках всех типов и катализирует дисмутацию двух анионов  $O_2^{\cdot -}$  с образованием одной молекулы  $H_2O_2$ , которая превращается в воду в реакциях катализируемых каталазой и глутатионпероксидазой. Непрерывность протекания глутатионпероксидазной реакции зависит от постоянного восстановления окисленного глутатиона, обеспечиваемого глутатионредуктазой. Последняя, в свою очередь, требует постоянного притока NADPH. Нарушения активности ферментов антиокислительной защиты могут приводить к повышению внутриклеточных уровней окислителей. В патофизиологических концентрациях  $H_2O_2$  оказывает цитотоксическое действие [6], а также индуцирует одностранные [7] и двустранные [8] разрывы ДНК. Цитотоксическое действие  $H_2O_2$  усиливается в 10-1000 раз в присутствии железа [9] - универсального неферментного катализатора перекисных процессов.

Гибель животных при аммиачной интоксикации наступает в результате остановки сердца [10], и, следовательно, токсическое действие аммиака распространяется на кардиомиоциты. Окислительный стресс при гипераммониемии может быть причиной как дегенерации клеток мозга [11], так и ухудшения функционирования мышечных клеток сердца и фибрилляции миокарда [10]. В настоящее время не известно, оказывает ли аммиак влияние на биохимические процессы в сердце, в том числе на ферменты антиокислительной защиты, и связана ли токсичность аммиака с изменениями в гомеостазе железа. Такие данные отсутствуют в литературе.

Задачей данной работы было изучение влияния токсичных доз аммиака, вводимых крысам, на активность СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в мозге, печени, сердце и эритроцитах.

**МЕТОДИКА.** Ферменты, субстраты и другие химические реагенты получали из следующих источников: Ficoll 400, ADP, ЭГТА, L-глутамат, нитротетразолиевый синий - фирмы "Sigma" (США); глутатион и АТФ - фирмы "ICN Biomedicals" (США); сахарозу, бычий сывороточный альбумин, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфонат) (Hepes), трис(гидроксиметил)аминометан (трис), NADPH, антимицин А, 3-D,L-гидроксибутират, пируват и 2-оксоглутарат фирмы "Serva" (Германия).

Все эксперименты выполнены на крысах линии Вистар (половозрелых самцах) массой 200-250 г. Экспериментальным животным вводили внутривенно ацетат аммония в летальной дозе 12 ммоль/кг, контрольным - физиологический раствор.

Через 11 мин после введения ацетата аммония или физраствора животных забивали декапитацией. Сердце быстро извлекали и помещали в охлажденный физраствор, тщательно отмывали от крови, измельчали продавливанием через отверстия специального пресса. Для более полного разрушения мышечной ткани полученный материал гомогенизировали с использованием стеклянного гомогенизатора Поттера-Эльвегейма в буферном растворе, содержащем 0,225 М маннит, 0,075 М сахарозу, 0,01 М Hepes-буфер, pH 7,4, и 1 мМ ЭГТА. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали как цитоплазматическую фракцию. Печень гомогенизировали в 9 объемах среды, содержащей 0,21 М маннит, 0,07 М сахарозу, 5 мМ Hepes-буфер, pH 7,4, 1 мМ Na-ЭДТА и альбумин (0,5 мг/мл). Митохондрии и цитозоль (постмитохондриальный супернатант) выделяли обычным методом

дифференциального центрифугирования [1]. Передний мозг гомогенизировали в 9 объемах среды, содержащей 0,25 М сахарозу, 10 мМ трис-буфер, pH 7,4 и 0,5 мМ Na-ЭДТА, и выделяли несинаптические митохондрии и цитоплазматическую фракцию [4] с применением центрифугирования в градиенте Ficoll 400. Эритроциты и плазму крови отделяли и анализировали, как ранее [12].

Белок в гомогенате, митохондриях и цитоплазматических фракциях, активность каталазы (КФ 1.11.1.6), СОД (КФ 1.15.1.1), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли методами, описанными ранее [12]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) измеряли методом Дойча [13]. Концентрацию железа в плазме крови измеряли колориметрически [14]. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью метода вариационной статистики по Стьюденту.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Введение крысам ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг сопровождалось комой на 7-10-й минуте, судорогами на 10-15-й минуте и гибелью животных через  $20 \pm 4$  мин после трех-пяти судорожных эпизодов. После введения ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг животные испытывали один-два судорожных эпизода на 13-16-й минутах, но гибель наступала лишь у 54% крыс. Поэтому в описываемых экспериментах по биохимическому действию аммиака забой крыс производили через 11 мин после введения ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг (после начала судорожных эпизодов) или физиологического раствора. Предварительные эксперименты показали, что через 11 мин после введения крысам ацетата аммония концентрация аммиака в плазме крови составила  $2,36 \pm 0,27$  мМ ( $n=6$ ) по сравнению с  $0,16 \pm 0,04$  мМ ( $n=8$ ) у контрольных животных ( $p < 0,001$ ). Эти данные находятся в полном соответствии с результатами определения концентрации аммиака (2,7 мМ) в крови крыс через 15 мин после введения той же дозы ацетата аммония [3].

При экспериментальной гипераммониемии снижается: 1) активность глутатионпероксидазы в митохондриях (на 35%) и цитозоле (на 24%) печени, в митохондриях (на 47%) и цитозоле (на 38%) мозга, в эритроцитах (на 25%); 2) активность СОД в митохондриях (на 41%) и цитозоле (на 32%) печени, в митохондриях (на 37%) и цитозоле (на 40%) мозга, в эритроцитах (на 69%) (табл. 1); 3) активность каталазы в цитозоле и митохондриях печени и мозга (на 42 и 27%, на 52 и 58% соответственно), в эритроцитах (на 29%) (табл. 1).

В цитоплазматической фракции сердца активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы повышается при гипераммониемии на 41, 59 и 27% соответственно (табл. 2).

Активность глутатионредуктазы во всех трех тканях при гипераммониемии не меняется.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы - фермента пентозофосфатного пути, обеспечивающего метаболические процессы в клетке восстановительными эквивалентами в форме NADPH, тоже существенно (на 68%) и достоверно ( $p < 0,001$ ) повышается при гипераммониемии как в гомогенате (не показано), так и в цитоплазматической фракции сердца, но не меняется в цитозоле мозга (табл. 3).

Концентрация  $Fe^{2+}$  в плазме крови крыс повышается при гипераммониемии почти в 2 раза (табл.3).

Проведённые исследования показали, что острая интоксикация аммиаком вызывает быстрые, в течение 11 минут, изменения активности антиоксидательных ферментов в тканях, сходные в печени, мозге и эритроцитах и противоположно направленные в сердце. Результаты частично подтверждают недавно полученные данные о снижении активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы и неизменной активности глутатионредуктазы в митохондриях печени и мозга крыс при острой аммиачной интоксикации [15]. Другие имеющиеся в литературе отдельные сообщения о ферментах-антиоксидантах у животных на моделях экспериментальной гипераммониемии, отличных от острой интоксикации аммиаком, и у пациентов с недостаточностью функции печени не однозначны и

## АНТИОКСИДТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПРИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

противоречивы. Так, в печени крыс с гипераммониемией, вызванной введением гепатотоксина тиацетамида, снижена активность глутатион-зависимых ферментов и каталазы, тогда как активность СОД повышена при сравнении с нормой [6].

Таблица 1. Активность антиоксидельных ферментов в цитоплазматических фракциях и митохондриях печени и мозга, а также в эритроцитах через 11 минут после введения крысам лсальной дозы ацетата аммония

Фермент и препарат	Контроль	Ацетат аммония
<b>Глутатионпероксидаза:</b>		
цитозоль печени (нмоль/мин на 1 мг белка)	1310±140	1010±110*
митохондрии печени (нмоль/мин на 1 мг белка)	333±19	222±22*
цитозоль мозга (нмоль/мин на 1 мг белка)	123±24	82±11*
митохондрии мозга (нмоль/мин на 1 мг белка)	31±5	20±3
эритроциты (мкмоль/мин на 1 мл клеток)	120±20	92±14*
<b>Глутатионредуктаза:</b>		
цитозоль печени (нмоль/мин на 1 мг белка)	106±14	105±8
митохондрии печени (нмоль/мин на 1 мг белка)	55±7	52±8
цитозоль мозга (нмоль/мин на 1 мг белка)	42±6	41±4
митохондрии мозга (нмоль/мин на 1 мг белка)	21±1	18±2
эритроциты (мкмоль/мин на 1 мл клеток)	70±11	65±10
<b>Супероксиддисмутаза:</b>		
цитозоль печени (Ед/сек на 1 мг белка)	50±3,9	35±2,2*
митохондрии печени (Ед/сек на 1 мг белка)	8±0,7	4,4±0,6*
цитозоль мозга (Ед/сек на 1 мг белка)	12±1,1	7±0,9*
митохондрии мозга (Ед/сек на 1 мг белка)	4,1±0,4	2,2±0,4
эритроциты (Ед/сек на 1 мл клеток)	88±54	314±67*
<b>Каталаза:</b>		
цитозоль печени (Ед/сек на 1 мг белка)	0,32±0,03	0,19±0,02*
митохондрии печени (Ед/сек на 1 мг белка)	1,1±0,06	0,82±0,08*
цитозоль мозга (Ед/сек на 1 мг белка × 10 <sup>4</sup> )	10,9±1,3	5,5±0,4*
митохондрии мозга (Ед/сек на 1 мг белка × 10 <sup>4</sup> )	3,6±1,4	1,7±0,2
эритроциты (Ед/сек на 1 мл клеток)	25±2,0	17±1,2*

Примечание: Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для числа измерений n=6-14 (кроме n=3 для митохондрий мозга). \*p<0,05 при сравнении с контрольным значением.

Следует отметить, что острая интоксикация большими дозами аммиака, применяемыми в данной работе, вызывала повышение концентрации аммиака в крови крыс во много раз больше, чем это сообщается в литературе (обычно 0,2-0,8 мМ). Неудивительно, что такая интоксикация привела к более глубоким метаболическим изменениям, чем при умеренной гипераммониемии.

Описанные эксперименты были направлены на исследование влияния вводимого животным аммиака на активность антиоксидельных ферментов в разных тканях и не преследовали целью выяснение молекулярных механизмов этого влияния. Хотя такие механизмы не известны, они, очевидно (из-за быстрого действия вводимого аммиака), не связаны с экспрессией или супрессией генов соответствующих ферментов.

Таблица 2. Активность ферментов в цитоплазматической фракции сердца контрольных крыс и животных, которым вводили ацетат аммония.

Показатель	Контроль	Ацетат аммония	p
СОД, Ед/мин на 1 мг белка	7,5±0,2 n=17	10,6±0,2 n=16	<0,001
Каталаза, Ед/сек на 1 мг белка	17,3±0,37 n=29	27,5±0,8 n=25	<0,001
Глутатионпероксидаза, нмоль/мин на 1 мг белка	270±7,4 n=18	342±8 n=16	<0,001
Глутатионредуктаза, нмоль/мин на 1 мг белка	24±0,93 n=20	24,3±0,4 n=16	>0,1

Примечание: Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для указанного числа измерений.

Таблица 3. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в цитоплазматических фракциях сердца (А) и мозга (Б) и концентрация железа в плазме крови крыс после введения ацетата аммония.

Показатель		Контроль	Ацетат аммония	p
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, нмоль/мин на 1 мг белка	А	1,16±0,07 n=14	1,95±0,09 n=20	<0,001
	Б	49±3 n=9	49±1 n=9	>0,1
Железо в плазме крови, МкМ (n=5)		9,9±1,0	17,9±2,5	<0,005

Примечание: Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для указанного числа измерений.

Проведенные нами ранее работы [3,15-17] позволяют предположить, что острая аммиачная интоксикация вызывает гиперактивацию NMDA-рецепторов и усиленное проникновение внеклеточного кальция в постсинаптические нейроны. В свою очередь, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  стимулируют нейрональную конститутивную нитроксидсинтазу и образование NO-радикала, который оказывает прямое ингибирующее действие на антиокислительные ферменты и вызывает окислительный стресс. Действительно, вызываемой аммиаком гибели животных препятствуют десять различных антагонистов NMDA-рецепторов [17] и нитроаргинин - ингибитор NO-синтазы [15]. Известно также, что оксид азота является ингибитором каталазы, СОД и глутатионпероксидазы [15], а нитроаргинин, вводимый животным или добавляемый в среду инкубации, вызывает резкое повышение активности всех этих ферментов в митохондриях мозга [15].

Опосредуемым NMDA-рецепторами образованием оксида азота можно объяснить действие гипераммониемии в мозге, но этот механизм не применим к тканям, не имеющим NMDA-рецепторов (печень и эритроциты). Аммиак, однако, может ускорять образование оксида азота другими, пока не идентифицированными, механизмами, не зависящими от активации NMDA-рецепторов [16]. Аммиак стимулирует образование NO в печени [18], тромбоцитах [19] и желудке [20] крысы. Такие дополнительные механизмы образования NO могут обуславливать угнетение антиокислительных ферментов в печени и эритроцитах. Их функционирование подтверждается тем фактом, что вводимый крысам нитроаргинин препятствует вызываемым аммиаком изменениям в

## АНТИОКСИДТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПРИ АММИАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

антиоксидельных ферментах и скорости образования супероксидного радикала в печени [15].

Концентрация свободного железа в плазме крови повышается вдвое при острой гипераммониемии (табл. 3), что является еще одним подтверждением интенсификации перекисного окисления липидов и развития окислительного стресса в организме.

Активность глутатионпероксидазы определяется в присутствии избытка глутатиона и глутатионредуктазы, необходимой для постоянного удаления окисленного глутатиона, который, как продукт глутатионпероксидазной реакции, может угнетать эту реакцию по механизму обратной связи. В свою очередь, для достижения максимальной активности глутатионредуктазы требуется избыток NADPH, который *in vivo* образуется главным образом в пентозофосфатном пути. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ключевого фермента пентозофосфатного пути, в мозге при острой аммиачной интоксикации не изменяется (табл. 3); следовательно, активность глутатионредуктазы тоже не лимитируется концентрацией NADPH *in vivo*, а активность глутатионпероксидазы не лимитируется избыточной концентрацией окисленного глутатиона.

В цитоплазме сердца, однако, активность глутатионпероксидазы, СОД и каталазы повышается после введения аммиака животным (табл. 2). Механизм такого парадоксального действия аммиака на антиоксидельные ферменты в сердце не известен и может быть связан со специфическим его влиянием на вегетативную нервную систему.

Сердце - наиболее адаптивный орган. Повышение активности ферментов антиоксидельной защиты в сердце может отражать включение компенсаторных реакций в ответ на усиленное образование свободных кислородных метаболитов в первые минуты после введения летальной дозы ацетата аммония.

В сердце крыс с гипераммониемией повышается также активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которая не меняется в мозге (табл. 3). Это может означать, что под действием аммиака окислительный стресс в сердце не развивается и что образуемый в глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции избыток NADPH не отвлекается на восстановление глутатиона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ № 01-04-48211, 01-04-97031, 02-04-06808).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kosenko E., Felipo V., Minana M.D., Grau E., Grisolia S. (1991) Arch Biochem. Biophys., **290**, 484-488
2. Kosenko E.A., Kaminsky Yu.G., Felipo V., Minana M.D., Grisolia S. (1993) Biochim. Biophys. Acta, **1180**, 321-326
3. Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Minana M.D., Marcaida G., Grisolia S., Felipo V. (1994) J. Neurochem., **63**, 2172-2178
4. Kosenko E., Felipo V., Montoliu C., Grisolia S., Kaminsky Yu.G. (1996) Metab. Brain Dis., **12**, 69-82
5. Marcaida G., Minana M.D., Grisolia S., Felipo V. (1995) Brain Res., **695**, 146-150
6. Sanz N., Diez-Fernandez C., Fernandez-Simon L., Alvarez A., Cascales M. (1995) Carcinogenesis, **16**, 1585-1593
7. McDonald R.J., Pan L.C., St George J.A., Hyde D.M., Ducore J.M. (1993) Inflammation, **17**, 715-722
8. Asin J., Perez-Martos A., Fernandez-Silva P., Montoya J., Andreu A.L. (2000) FEBS Lett., **480**, 161-164
9. Link E.M. (1990) Free Radical Res Commun., **11**, 89-99

- 10 Wilson R P, Davis L E, Muhrer M E, Bloomfield R A (1964) *J Anim Sci*, **23**, 1221-1229
- 11 Phillips S C (1981) *Neuropathol Appl Neurobiol*, **7**, 205-216
- 12 Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (1997) *Free Rad Res*, **27**, 637-644
- 13 Deutsch J (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3 (H U Bergmeyer, ed), New York, Wiley, pp 190-197
- 14 Van Wyck D B, Schiffman R B, Stivelman J C, Ruiz J, Martin D (1988) *Clin Chem*, **34**, 1128-1130
- 15 Kosenko E, Kaminsky Y, Lopata O, Muravyov N, Kaminsky A, Hermenegildo C, Felipo V (1998) *Metab Brain Dis*, **13**, 29-41
- 16 Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana M D, Grisolia S, Felipo V (1995) *Neurochem Res*, **20**, 451-456
- 17 Minana M D, Llansola M, Hermenegildo C, Cucarella C, Montoliu C, Kosenko E, Grisolia S, Felipo V (1997) *Adv Exp Med Biol*, **420**, 45-56
- 18 Wettstein M, Gerok W, Haussinger D (1994) *Hepatology*, **19**, 641-647
- 19 Shinya H, Matsuo N, Takeyama N, Tanaka T (1996) *Thromb Res*, **81**, 195-201
- 20 Konturek S J, Konturek P C, Brzozowski T, Stachura J, Zembala M (1996) *Digestion*, **57**, 433-445

Поступила 10 04 2002

#### ANTIOXIDANT ENZYMES OF RAT LIVER, BRAIN, HEART AND ERYTHROCYTE IN AMMONIA INTOXICATION

*N.I.Venediktova, O.V.Lopata, A.S.Pogosyan, E.A.Kosenko, Y.G.Kaminsky*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, 142290 Russia  
Fax (0967) 790553, E-mail kaminsky@iteb.ru

Injection of large amounts of ammonium salts leads to rapid death of animals. However the molecular mechanisms involved in ammonia toxicity remain to be clarified. We have tested the effect of toxic dose of ammonium acetate on the activities of antioxidant enzymes in rat liver, brain, heart and erythrocytes. Acute ammonia intoxication resulted in rapid (within 11 min) decrease in superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in liver and brain mitochondria and cytosol and in erythrocytes, but in increase of these enzyme activities in heart. Diminished activities of the antioxidant enzymes in liver, brain and erythrocytes suggest that the systemic oxidative stress takes place, whereas their elevated activities in heart can be the adaptive reaction to oxidative stress in hyperammonemia.

**Key words** ammonia intoxication, antioxidant enzymes, liver, brain, heart, erythrocytes