

ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИЯ: РОЛЬ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АММИАК-ОБРАЗУЮЩИХ РЕАКЦИЙ

Алилова Г.А.¹, Тихонова Л.А.¹, Монтолиу К.^{2,3}, Косенко Е.А.^{1*}

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино, Россия

2 – Фонд исследований больничной клиники. Институт медицинских исследований INCLIVA, Валенсия, Испания

3 – Отделение патологии, Медицинский факультет, Университет Валенсии, Валенсия, Испания

* – Автор для переписки: eakos@rambler.ru

Аннотация:

Гепатоэнцефалопатия представляет собой нарушение функции головного мозга, возникающее у больных с прогрессирующей печеночной недостаточностью. Концептуально, главной причиной развития гепатоэнцефалопатии является накопление аммиака в мозге из-за нарушения детоксикационной функции печени, вызванной повреждением гепатоцитов, или образование портокавальных анастомозов.

Однако увеличение концентрации аммиака в мозге, наблюдаемое при различных патологиях на фоне нормального его содержания в крови и при сохранении детоксикационной функции печени, свидетельствует о том, что аммиак не только транспортируется в мозг из крови, но образуется в мозге в результате активации внутриклеточных аммиак-образующих реакций.

С целью выявления возможных источников аммиака в мозге в данной работе проведено сравнительное исследование состояния ферментативных систем, ответственных за поддержание гомеостаза аммиака в разных отделах мозга крысы, и влияния на них известных конвульсантов ацетата аммония и пентилентетразолия. Активность аденозиндезаминазы, АМФ-дезаминазы, глутаминсинтетазы, глутаматдегидрогеназы, глутаминазы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы была изучена в различных субклеточных фракциях, выделенных из различных областей мозга крыс после развития судорог, вызванных введением обоих конвульсантов.

Выяснилось, что и ацетат аммония, и пентилентетразолий способны усиливать эндогенные аммиак-образующие реакции в митохондриях и цитозоле разных отделов мозга независимо от концентрации аммиака в крови и детоксицирующей функции печени и могут вносить самостоятельный вклад в значительное его накопление в мозге и развитие

энцефалопатии и судорожных симптомов.

Ключевые слова: аммиак-метаболизирующие ферменты, гипераммониемия, неокортекс, мозжечок, гиппокамп, стриатум, печень.

HEPATOENCEPHALOPATHY: THE ROLE OF CEREBRAL AMMONIA-FORMING REACTIONS

Alilova G.A.¹, Tikhonova L.A.¹, Montoliu C.^{2,3}, Kosenko E.A.^{1*}

1 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

2 – Hospital Clinico Research Foundation. INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

3 – Pathology Department, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

* – Corresponding author: eakos@rambler.ru

Abstract

Hepatoencephalopathy (HE) is a dysfunction of the brain that occurs in patients with progressive liver failure. Conceptually, the main reason for the development of HE is the accumulation of ammonia in the brain due to impaired liver detoxification pathways associated with hepatocyte damage, or the formation of portocaval anastomoses.

However, an increase in the concentration of ammonia in the brain, observed in various pathologies when its level in the blood lies in the normal range and the detoxification function of the liver is preserved, indicates that ammonia is not only transported to the brain from the blood, but is generated in the brain as a result of activation of intracellular ammonia-forming reactions.

This research has been conducted with the goal to identify possible sources of ammonia in the brain. So, we performed a comparative analysis of the state of the enzymatic systems responsible for the maintenance of ammonia homeostasis in different parts of the rat brain and the effect of the known convulsants of ammonium acetate and pentylenetetrazolium on these systems. The activities of adenosine deaminase, AMP deaminase, glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase, glutaminase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were studied in various subcellular fractions isolated from different regions of the rat brain after the development of seizures caused by the administration of both convulsants.

It was shown that both ammonium acetate and pentylenetetrazolium are able to enhance endogenous ammonia-forming reactions in mitochondria and cytosol of different parts of the brain, regardless of the concentration of ammonia in the blood and the detoxification function of

the liver, and can independently contribute to its significant accumulation in the brain and the development of encephalopathy and convulsive symptoms.

Keywords: ammonia-metabolizing enzymes, hyperammonemia, neocortex, cerebellum, hippocampus, striatum, liver.

Введение

Аммиак — это нормальный клеточный метаболит, который осуществляет множество жизненно важных функций в организме. Помимо участия в синтезе аминокислот и белков, аммиак регулирует активность ферментов гликолиза [1], кетогенеза, нейтрализует кислоты, образуемые в результате обменных процессов в почках, поддерживая тем самым кислотно-щелочное равновесие в организме [2], тормозит миграцию лейкоцитов к очагу воспаления [3], защищает нейроны от эксайтотоксичности глутамата [4].

Несмотря на важную роль и постоянное образование аммиака в тканях, его концентрация в крови в физиологических условиях поддерживается на очень низком уровне и не превышает 50 мкмоль/л. В более высокой концентрации аммиак ядовит, поскольку является мощным нейротоксином. Всего лишь двукратное повышение концентрации аммиака в крови (гипераммонемия, ГА), особенно у детей, приводит к гепатоэнцефалопатии (ГЕ), которая сопровождается потерей сознания, судорогами, комой, часто заканчивающейся смертью [5].

В нормальных условиях низкая концентрация аммиака в крови поддерживается постоянной его детоксикацией в цикле мочевины, полный набор ферментов которого локализован исключительно в печени, и при помощи другого печеночного фермента — глутаминсинтетазы (ГС), переводящей не вошедший в цикл мочевины аммиак в относительно безвредный глутамин. В других тканях, где отсутствует цикл мочевины, например, в мозге, ГС является единственным аммиак-детоксицирующим ферментом.

Таким образом, тотальное обезвреживание аммиака происходит только в печени и только в цикле мочевины. Поэтому неудивительно, что согласно гипотезе, принятой в научном мире, существует две основные причины повышения концентрации аммиака в крови. Одна — это нарушение детоксикационной функции печени, вызванной повреждением гепатоцитов. Другая — образование портокавальных анастомозов, позволяющих крови, оттекающей из желудочно-кишечного тракта, минуя печень (то есть без очищения в печени), попадать в общую циркуляцию [6, 7].

Действительно, при заболеваниях печени, например, при гепатите и циррозе, скорость превращения аммиака в мочевины резко снижается, и аммиак в свободном виде поступает в общую циркуляцию и накапливается в крови и, соответственно, в мозге, вызывая дисфункцию нейронов. Поэтому принято считать, что концентрация аммиака в мозге зависит от его содержания в крови. Чем выше концентрация аммиака в крови, тем больше его накапливается в мозге и тем выше вероятность летального исхода при гепатоэнцефалопатиях, вызванных заболеваниями печени.

Несмотря на многочисленные исследования, механизм энцефалопатии, возникающей при ГА, до конца не выяснены.

В основном считается, что аммиак, поступивший в мозг при ГА, вызывает каскад патологических реакций, который начинается с резкого торможения аэробного обмена глюкозы, ведущего к гиперактивации глутаматных NMDA-рецепторов [8], нарушению гомеостаза Ca^{2+} [9], окислительного фосфорилирования в митохондриях [10], снижению концентрации АТФ [11], усиленному образованию свободных радикалов [12], инициации окислительного стресса [13], фрагментации ДНК [14] и гибели нейронов.

Известно также, что ГА, помимо заболеваний печени, может возникать при многих других патологиях, таких как диабет, развитие в желудочно-кишечном тракте чужеродной микрофлоры, например, бактерий *Helicobacter pylori* [15, 16], раковое перерождение тканей, химиотерапия [17], трансплантация органов [18, 19, 20], нейродегенеративные заболевания [21].

Существует медикаментозная гипераммониемия, которая может возникать после внутривенного введения глюкозы, приема парацетамола [22], аспирина [23], диуретиков [24], миорелаксантов, седативных, противоэпилептических препаратов [25] и др. Так, было обнаружено, что прием вальпроата натрия вызывает ГА и развитие судорог у детей с эпилепсией, причем было отмечено, что у всех обследованных пациентов функция печени не отличалась от нормы [26]. Другой разновидностью медикаментозной терапии является развитие энцефалопатии и судорожных эпизодов на фоне нормального содержания аммония в крови (негипераммониевая энцефалопатия) [27, 28, 29]. Механизм возникновения энцефалопатии при вышеуказанных заболеваниях и после медикаментозной терапии в настоящее время неизвестен.

Ранее нами было показано, что у крыс с портокавальным шунтированием, имитирующим хроническую патологию печени [30], несмотря на двукратное повышение концентрации аммиака в крови, его концентрация в разных отделах мозга была в 5-6 раз выше, чем в плазме [31, 32]. Обнаруженный градиент концентрации аммиака (низкая концентрация в плазме крови и намного выше в мозге) свидетельствует о том, что аммиак

вряд ли будет потребляться тканью мозга из крови, но образуется в мозге в результате активации внутриклеточных аммиак-образующих реакций, что, независимо от концентрации аммиака в крови, может приводить к его накоплению в мозге и возникновению энцефалопатии, судорожных припадков, переходящих в кому.

Правомочность такого предположения подтверждается данными, полученными при исследовании пациентов с другими нейродегенеративными заболеваниями. В частности, было показано, что резкое нарушение аэробного окисления глюкозы в мозге некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера приводило к усиленному образованию аммиака в мозге, возникновению судорог, иногда переходящих в кому [21].

Эти данные дополнительно свидетельствуют о том, что при некоторых патологиях эндогенные реакции, связанные с образованием аммиака в мозге, могут вносить самостоятельный вклад в развитие судорожных приступов, независимо от концентрации аммиака в крови и детоксицирующей функции печени.

Известно, что концентрация аммиака внутри клетки определяется балансом между аммиак-образующими и аммиак-потребляющими ферментными системами. Важную роль играют цитоплазматические ферменты аденозиндезаминаза (АДА) и АМФ-дезаминаза (АМФД) и митохондриальные глутаматдегидрогеназа (ГДГ) и глутаминаза. И в цитозоле, и в митохондриях распределены аспартатаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ), непрямо участвующие в обмене аммиака через образование глутамата в катализируемых ими реакциях переаминирования.

Изменение активности любого из этих ферментов при недостаточно высокой активности ГС в мозге может приводить к накоплению аммиака и развитию энцефалопатии.

Кроме того, неодинаковая степень чувствительности нейронов разных отделов мозга к токсическому действию аммиака [31] указывает на наличие причинно-следственной связи между активностью региональных ферментов, регулирующих steady-state концентрацию аммиака, и степенью уязвимости различных отделов мозга при его накоплении [31].

Насколько нам известно, в литературе отсутствуют данные о влиянии конвульсантов, судорожный эффект которых проявляется на фоне нормально функционирующей печени, но различной (нормальной или патологической) концентрации аммиака в крови, на активность ферментов, локализованных в различных отделах мозга и контролирующих выработку и клиренс аммиака.

С целью выявления возможных источников аммиака в мозге в данной работе проведено сравнительное исследование состояния ферментативных систем,

ответственных за поддержания гомеостаза аммиака в разных отделах мозга крысы и влияния на них известных конвульсантов ацетата аммония и пентилентетразолия (ПТЗ). Активность АДА, АМФД, ГС, ГДГ, глутаминазы, АСТ и АЛТ была изучена в различных субклеточных фракциях, выделенных из различных областей мозга крыс после развития судорог, вызванных введением обоих конвульсантов.

Методы исследования

Животные

Экспериментальные процедуры выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с Европейскими Правилами по использованию лабораторных животных 1986 г. (пересмотренными в Директиве 2010/63/EU Совета Европы и изложенными в Приказе Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 № 267 “Правила лабораторной практики в РФ”).

В экспериментах использовали крыс Вистар массой 210–230 г, содержащихся в виварии по четыре особи на клетку размерами 40 × 30 × 20 см с двухэтажным интерьером при комнатной температуре, естественном режиме освещения, свободном доступе к корму и воде.

Для решения поставленной задачи использовался известный конвульсант аммиак, механизмы токсического действия которого в развитии энцефалопатии при различных заболеваниях изучается длительное время в нашей лаборатории [33] и который при остром введении не вызывает изменений биохимических показателей крови, служащих маркерами целостности клеток печени. Конвульсант вводился животным внутривентриально в летальной дозе (12 ммоль/кг) в виде раствора ацетата аммония. Судороги у животных развивались в течение 13±2 минут. Декапитация животных проводилась после прохождения третьей судороги, обычно на 11 минуте [14], (первая группа животных).

Другим конвульсантом служил ПТЗ, обычно используемый для создания острой и хронической моделей эпилепсии [34]. Доза ПТЗ была подобрана так, чтобы клонико-тонические судороги возникали, как и при введении ацетата аммония, через несколько минут после введения препарата. Поскольку было обнаружено, что при внутривентриальном введении ПТЗ в дозе 70 мг/кг судороги у животных возникали на 15±4 минуте, эта доза была признана оптимальной и декапитацию животных проводили, как и в случае с ацетатом аммония, после прохождения третьего судорожного эпизода на 30-й минуте после введения ПТЗ (вторая группа животных).

В качестве контроля использовались животные (третья группа), которым внутрибрюшинно вводился физиологический раствор. Поскольку ни объем вводимого физиологического раствора, ни время после его введения не влияли на измеряемые показатели, характерные для интактных животных, контролем для обеих опытных групп служили животные, декапитацию которых проводили на 30-й минуте после введения физиологического раствора в том же объеме, что и ПТЗ.

Получение плазмы

Для получения плазмы крови использовали кровь, взятую из ретроорбитального сплетения. В качестве антикоагулянта применяли 130 мМ 3Na-цитрат (pH 7,4). Для удаления форменных элементов кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1000 g (+4°C). Осадок удаляли, супернатант (плазму) депротеинизировали охлажденной смесью (-20° С) 6% HClO₄ и 40% этанола (конечная концентрация HClO₄ 3,5% мас./Об.) и нейтрализовали 30% КОН (-20° С) до pH 6. Кристаллы KClO₄ осаждали центрифугированием и полученный супернатант немедленно использовали для измерения показателей, характеризующих целостность клеток печени и ее детоксицирующую функцию (концентрация мочевины, активность АЛТ, АСТ и др.). Все показатели крови были измерены по стандартным методам, разработанным международным комитетом по стандартизации в гематологии [35].

Определение концентрации метаболитов в плазме крови

Концентрация аммиака. Содержание аммония в плазме измерялось с помощью микрофлуориметрического метода, как описано Косенко и др., 2008 [36]. Реакцию запускали добавлением плазмы объемом 200 мкл. Концентрацию аммиака выражали в ммоль/л.

Концентрация мочевины определялась после предварительного расщепления мочевины уреазой до аммиака, концентрацию которого определяли в глутаматдегидрогеназной реакции.

Реакционная смесь объемом 1 мл содержала 50 мМ KН₂РO₄ (pH 7,6), 7 мМ α-кетоглутарат, 0,16 мМ НАДН, 4 ед/мл ГДГ, 2,5 ед/мл уреазы. Реакцию запускали добавлением плазмы объемом 25 мкл. Концентрацию мочевины выражали в ммоль/л.

Определение активности АСТ и АЛТ в плазме крови.

Активность АСТ и АЛТ определяли методами, описанными в разделе: «Определение активности ферментов в митохондриях». Объем реакционной смеси в

кювете составлял 1 мл, объем добавляемой плазмы – 200 мкл. Активность ферментов выражали в мкмоль/мин х л.

Изоляция митохондрий с помощью самообразующегося градиента Перколла

Мозг быстро извлекали из черепной коробки (не более 20 сек от момента декапитации), отделяли неокортекс, гиппокамп и мозжечок согласно анатомическому атласу и помещали ткани в охлажденный буферный раствор, содержащий 10 мМ Tris, pH 7,4, 0,25М сахарозу и 0,5 мМ ЭГТА. Массы неокортекса, мозжечка, гиппокампа составляли 700–1000, 200–340 и 100–120 мг соответственно. Поэтому для получения одного препарата митохондрий из каждого отдела мозга были объединены ткани от 2–3 животных.

Митохондрии были изолированы с помощью комбинации дифференциального и самогенерирующего в градиенте Перколла центрифугирования в соответствии с протоколом, разработанным Грэхэмом [37], позволяющим получить высокоочищенный и интактный препарат митохондрий, что оценивалось по относительно низкому загрязнению митохондрий другими клеточными органеллами (низкая активность ферментов-маркеров субклеточных фракций) и близким к теоретическим значениям показателям дыхательного контроля при окислении субстратов липидной и нелипидной природы [38]. Митохондриальный белок определяли методом Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [39].

Постмитохондриальный супернатант, полученный до использования перколла, подвергали центрифугированию при 100000 g и 4°C в течение 30 мин, и надосадочную жидкость использовали как цитоплазматическую фракцию.

Разрушение митохондрий для определения активности ферментов

Митохондрии были разрушены осмотическим шоком (течение 15 мин. при + 4° С) в 2 объемах лизисной смеси, содержащей 5 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,4, 0,5 мМ ФМСФ, 0,25 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 10 мкМ лейпептин, 1,5 мкМ пепстатин и 0,15 мкМ апротинин и трех циклах замораживания и оттаивания. Затем образцы центрифугировали при 14 000 g в течение 10 мин. Активность ферментов измеряли в супернатанте сразу после его получения.

Определение активности ферментов в цитозоле и митохондриях, изолированных из разных отделов мозга.

Определение активности ферментов в митохондриях

Активность ГДГ (КФ 1.4.1.3) определялась при 340 нм и 37°C в реакции, сопряженной с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) [40]. Реакционная смесь содержала 50 мМ трис (рН 7,4), 100 мМ NH_4Cl , 1 мМ АДФ, 7 мМ α -кетоглутарат, 0,16 мМ НАДН, 5 мкг/мл ЛДГ, лизат митохондрий (50 мкг). Объем реакционной смеси составлял 1 мл. Активность фермента выражали в нмоль/мин·мг белка.

Активность глутаминазы (КФ 3.5.1.2) определяли спектрофотометрически по образованию глутамата [41] и по увеличению поглощения НАДН в сопряженной глутаматдегидрогеназной реакции при 340 нм и 25°C [40].

Предварительно концентрацию белка в лизированных митохондриях доводили до 5 мг/мл. Из лизата отбирались пробы, которые инкубировались в течение 10 минут при 37°C в буферной смеси, содержащей 75 мМ KH_2PO_4 , 75 мМ K_2HPO_4 , 50 мМ трис, 0,2 мМ K^+ -ЭДТА (рН 8,6), 2 мкМ ротенон в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 100 мМ глутамин. Реакцию останавливали 96% этанолом, предварительно охлажденным при -20°C. Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 2 минуты при 14000g. Супернатант отбирали и использовали для измерения активности фермента. Конечная концентрация белка в полученной пробе составляла 0,1 мг/мл. Среда измерения содержала 0,1 М трис, 5% гидразин-ОН (рН 9,0), 1,5 мМ АДФ, 0,64 мМ NAD^+ , 2,2 ед./мл ГДГ. Реакцию запускали добавлением пробы (20 мкг белка). Объем реакционной смеси составлял 1 мл. Активность фермента выражали в нмоль/мин·мг белка.

Активность аденилаткиназы (АК, КФ 2.7.4.3) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения НАДН при 340 нм при 37°C в реакции, сопряженной с пируваткиназой (ПК) и ЛДГ.

Реакционная среда объемом 1 мл содержала 70 мМ Трис- HCl буфер, рН 8,0; 4,5 мМ KCl , 5 мМ MgCl_2 , 0,71 мМ ФЕП, 1,1 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, ПК (8 мкг/мл), ЛДГ (8 мкг/мл). Реакцию запускали добавлением АМФ в конечной концентрации 1 мМ. Концентрация белка в пробе составляла 10 мкг/мл. Активность фермента выражали в нмоль/мин·мг белка.

Активность АСТ (КФ 2.6.1.1) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения НАДН в сопряженной малатдегидрогеназной реакции при 340 нм и 37°C [10].

Реакционная смесь содержала 50 мМ трис (рН 7,8), 7 мМ α -кетоглутарат, 100 мМ аспарат, 0,16 мМ НАДН, 5 мкг/мл ЛДГ, 2,5 мкг/мл малатдегидрогеназы. Реакцию запускали добавлением пробы. Концентрация белка в пробе составляла 20 мкг/мл. Активность фермента выражали в нмоль/мин·мг белка.

Активность АЛТ (КФ 2.6.1.2) определялась по окислению НАДН при 340 нм в реакции, сопряженной с ЛДГ, с использованием в качестве субстратов аланина и α -кетоглутарата.

Реакционная смесь содержала 50 мМ трис (рН 7,3), 7 мМ α -кетоглутарат, 200 мМ аланин, 0,16 мМ НАДН, 5 мкг/мл ЛДГ. Реакцию запускали добавлением пробы (300 мкг/мл). Активность фермента выражали в нмоль/мин•мг белка.

Определение активности ферментов в цитозольной фракции.

Активность ГС (КФ 6.3.1.2) определялась по окислению НАДН при 340 нм и 37°C в реакции, сопряженной с ПК и ЛДГ [42]. Буфер для измерения содержал 100 мМ имидазол (рН 7,2), 50 мМ глутамат натрия, 40 мМ NH_4Cl , 25 мМ β -меркаптоэтанол, 20 мМ MgCl_2 , 1 мМ оуабаин, 2 мМ фосфоенолпируват, 5 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, 15 мкг/мл ПК, 6 мкг/мл ЛДГ. Реакцию запускали добавлением пробы с количеством белка 100 мкг. Объем реакционной смеси – 1 мл. Активность фермента выражали в нмоль/мин•мг белка.

Активность АМФД (КФ 3.5.4.6) определяли спектрофотометрически по образованию аммиака и регистрировали по снижению поглощения НАДН при 340 нм при 37°C в реакции, сопряженной с ГДГ.

Реакционная среда объемом 1 мл содержала 50 мМ имидазол - буфер, рН 7, 100 мМ KCl_2 , 4 мМ MgCl_2 , 6,5 мМ α -кетоглутарат, ГДГ (3,2ед/мл), 0,16 мМ НАДН, 50 мМ АМФ. Реакцию запускали добавлением цитозоля с количеством белка 400 мкг. Активность фермента выражали в нмоль/мин•мг белка.

Активность АДА (КФ 3.5.4.4) определяли спектрофотометрически по увеличению поглощения образуемого инозина при 265 нм при 37°C [43].

Пробу, содержащую 100 мкг белка, инкубировали 30 минут при 37°C с 1,5 мл буферной смеси, содержащей 50 мМ KH_2PO_4 , рН 7, 10 мМ KCl_2 , 10 мМ MCl_2 , 1 мМ аденозин. Реакцию останавливали 150 мкл 57% HClO_4 . Доводили рН до 6-6,5 30% KOH . Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 5 минут при 10000g. Супернатант отбирали и использовали для измерения поглощения инозина при 265 нм. Конечная концентрация белка при измерении составляла 7 мкг/мл. Активность фермента определяли по разности поглощения инозина после инкубации и до инкубации и выражали в нмоль/мин•мг белка.

Активность АСТ и АЛТ определяли методами, описанными выше в разделе: «Определение активности ферментов в митохондриях». Концентрация белка в кювете для определения активности АСТ и АЛТ составляла 20 мкг/мл и 300 мкг/мл соответственно.

Определение концентрации аммиака в экстрактах, полученных из митохондрий и цитозольной фракции мозга.

Для получения экстрактов из митохондрий и цитозоля пробы экстрагировались в смеси 6%-ной хлорной кислоты и 40%-ного этанола в течение 5 мин при +4°C при постоянном перемешивании. Затем пробы центрифугировали при 5500 g в течение 10 мин при +4°C. pH полученного супернатанта доводили 30%-ным КОН, охлажденным до -20 °C, до 6-6,5, и центрифугировали при 5500 g в течение 5 мин при +4°C. Полученный супернатант использовали для определения концентрации аммиака.

Концентрацию аммиака определяли микрофлуориметрическим методом, описанным ранее [36], по изменению поглощения НАДН в глутаматдегидрогеназной реакции при 340 нм и 25°C.

Инкубационная среда содержала 50 мМ KH_2PO_4 (pH 7,6), 7 мМ α -кетоглутарат, 0,16 мМ НАДН, 4 ед/мл ГДГ. Реакцию запускали добавлением пробы. Концентрацию аммиака выражали в нмоль/мг белка.

Статистическая обработка данных.

Статистический анализ выполняли с помощью компьютерной программы Prism 5 для Windows (GraphPad Software, США). Результаты выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки. Нормальность распределения переменных подтвердили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Различия между группами анализировали с помощью t-теста Стьюдента, а при множественных сравнениях – метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

Результаты

Для того чтобы определить, происходят ли изменения в детоксикационной функции печени и в целостности ее клеток при введении конвульсантов, мы измерили активность АЛТ, АСТ (классические «печеночные пробы»), а также концентрацию аммиака и мочевины в плазме крови животных. В таблице 1 показано, как изменяются эти параметры в плазме крови животных после введения ацетата аммония и ПТЗ.

	Контроль <i>N</i> = 7	NH_4^+-ацетат, 12 ммоль/кг <i>N</i> = 7	ПТЗ, 70 мг/кг <i>N</i> = 7	ВПА, 100 мг/кг <i>N</i> = 7
--	---------------------------------	---	--------------------------------------	---------------------------------------

АЛТ, мкмоль/мин × л	24,1 ± 9,8	21,3±6,9	27,9 ± 7,4	27,95±7,1
АСТ, мкмоль/мин × л	26,3 ± 3,8	27±4,4	24 ± 7,9	23,3±4,04
Аммиак, мМ	0,204± 0,05	2,15±0,11 ***	0,189±0,012	0,175±0,091
Мочевина, мМ	6,91 ± 0,73	13,8±1,7 ***	6,0 ± 0,9	5,9±0,55

Таблица 1. Активность Аспаратаминотрансферазы (АСТ), Аланинаминотрансферазы (АЛТ), концентрация аммиака и мочевины в крови животных после внутрибрюшинного введения ацетата аммония и пентилентетразолия (ПТЗ). Данные выражены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

*** — $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы.

Видно (табл.1), что активность обоих ферментов (АЛТ и АСТ) почти одинакова в плазме крови животных всех групп. Это свидетельствует о том, что при острых воздействиях обоих конвульсантов целостность клеток печени сохраняется.

Концентрация аммиака и мочевины в плазме крови достоверно увеличивается при сравнении с контролем только у животных, которым вводился ацетат аммония, что подтверждает известный факт о том, что при накоплении аммиака в печени ее детоксикационная функция, связанная с обезвреживанием аммиака в цикле мочевины, усиливается. Поскольку ПТЗ в используемой дозе не влиял на эти показатели, можно предположить, что ПТЗ не вызывал дополнительного появления аммиака в печени и, соответственно, ускорения цикла мочевины.

Измерение концентрации аммиака в митохондриях показало (рис. 1А), что совместно с гипераммониемией (концентрация аммиака в плазме крови животных, которым вводился ацетат аммония, достоверно увеличивается в десять раз по сравнению с контролем), в митохондриях трех исследуемых отделов мозга - неокортекса, мозжечка, гиппокампа происходит резкое накопление аммиака. И это логично, потому что, как известно, чем выше концентрация аммиака в крови, тем больше его накапливается в мозге.

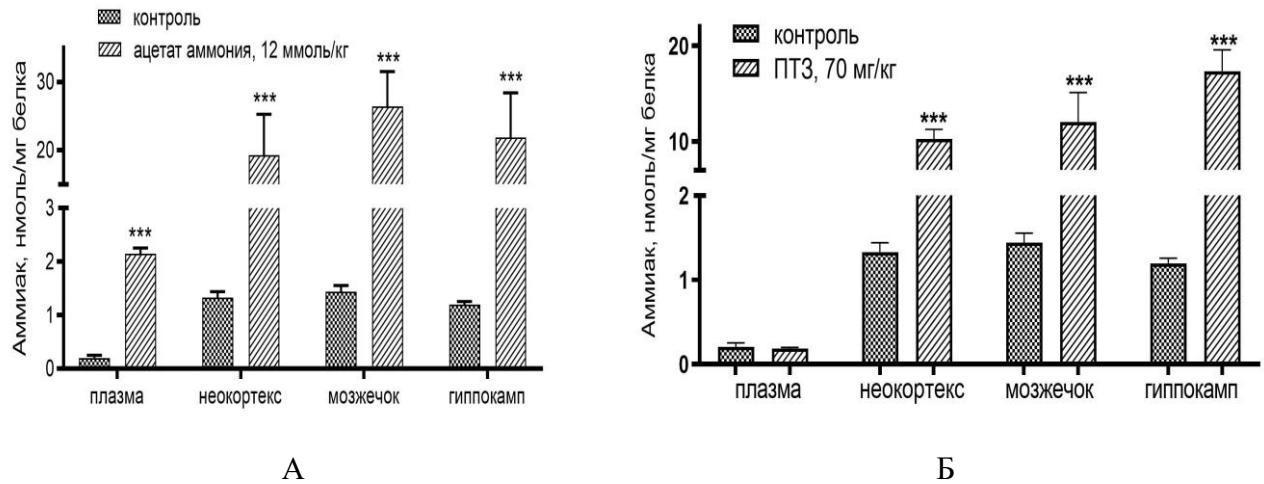


Рисунок 1. Концентрация аммиака в плазме крови и митохондриях разных отделов мозга крыс после внутрибрюшинного введения ацетата аммония (А) и пентилентетразолия (Б). Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

*** — $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы.

Однако у животных, которым вводился ПТЗ, подобная взаимосвязь между содержанием аммиака в крови и его накоплением в митохондриях мозга не наблюдалась (рис. 1Б). Как уже было сказано, этот конвульсант, как и ацетат аммония, вызывал судороги у животных, но при этом не влиял на концентрацию аммиака в крови. Из рис. 1Б также видно, что при почти равной концентрации аммиака в крови контрольных и опытных животных концентрация аммиака в митохондриях трех отделов мозга после введения ПТЗ достоверно увеличивалась при сравнении с контролем, как это наблюдалось и у гипераммониемированных животных.

И именно эти данные, как и литературные данные, полученные на пациентах с болезнью Альцгеймера, о которых было сказано выше, дают возможность предположить, что в мозге может происходить ускорение эндогенных аммиак-образующих реакций, которые могут вносить самостоятельный вклад в значительное его накопление в мозге и развитие энцефалопатии и судорожных симптомов. Для проверки этого предположения мы измерили активность ферментов, катализирующих реакции, протекающие с образованием аммиака.

На рис. 2 показано, как изменяется активность митохондриальных ферментов под воздействием ацетата аммония и ПТЗ, продуктом реакции которых является аммиак: ГДГ, Глутаминаза, АЛТ и АСТ.

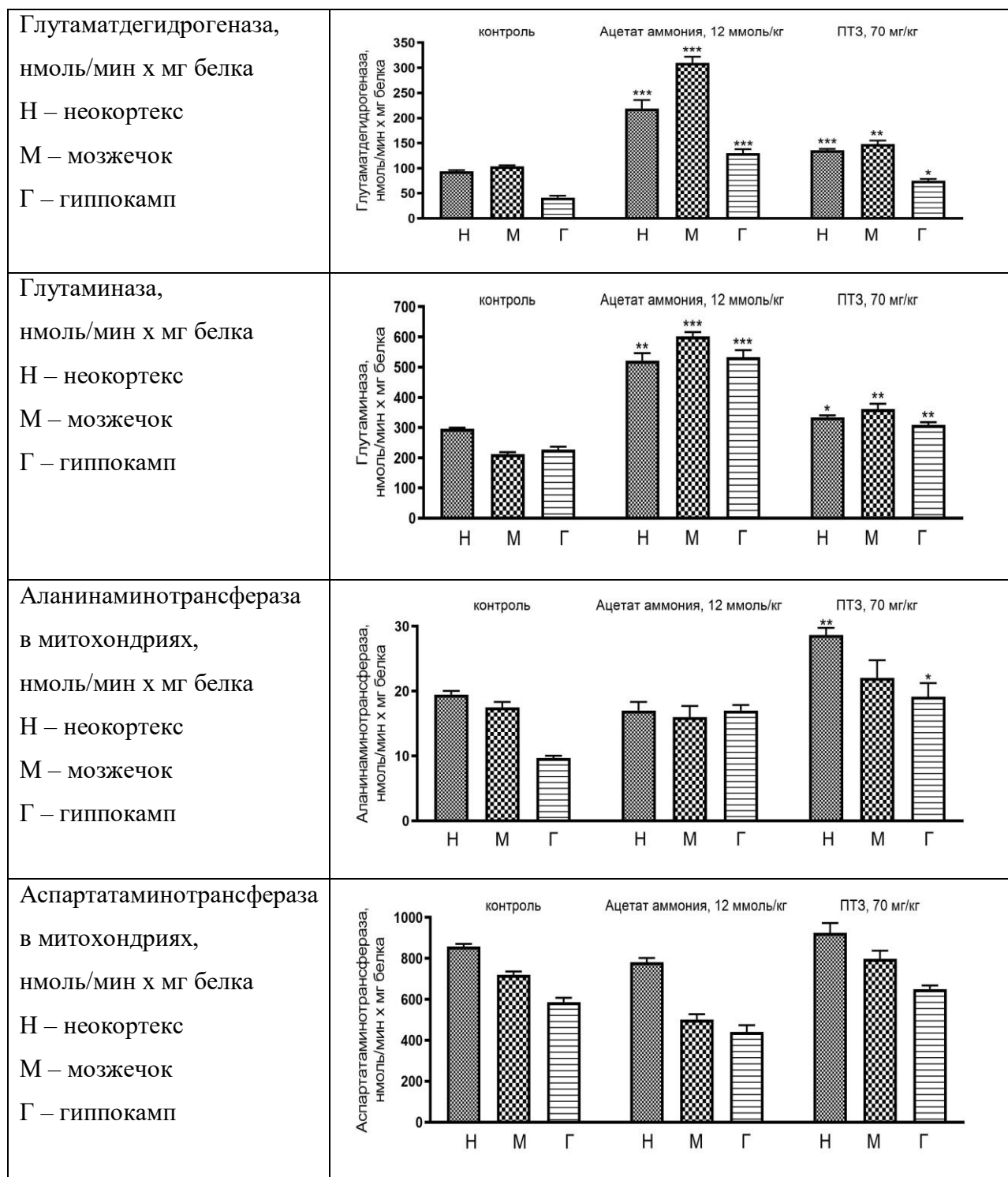


Рисунок 2. Активность глутаматдегидрогеназы, глутаминазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы в митохондриях разных отделов мозга крыс после внутрибрюшинного введения ацетата аммония и пентилентетразолия. Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы.

Видно, что активность ГДГ и глутаминазы в митохондриях разных отделов мозга животных, которым вводился аммиак, почти удваивается по сравнению с контролем. Активность этих же ферментов в митохондриях разных отделов мозга животных, которым вводился ПТЗ, тоже достоверно увеличивается по сравнению с контролем, хотя и в меньшей степени, чем после введения ацетата аммония (рис. 2). Активность АЛТ достоверно при сравнении с контролем увеличивается только в митохондриях неокортекса и гиппокампа животных, которым вводился ПТЗ, а активность АСТ в митохондриях всех отделов мозга вообще не меняется ни после введения ацетата аммония, ни после введения ПТЗ.

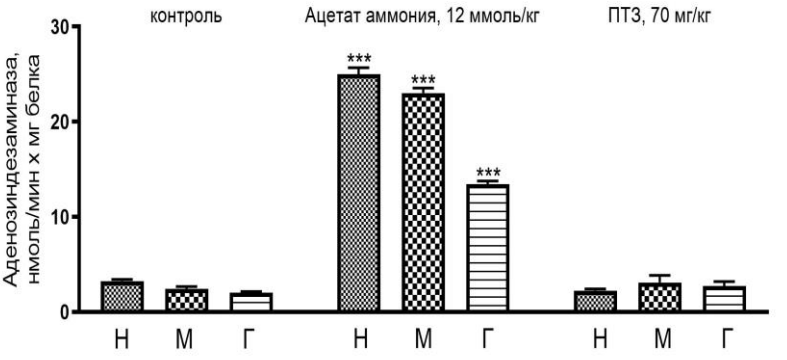
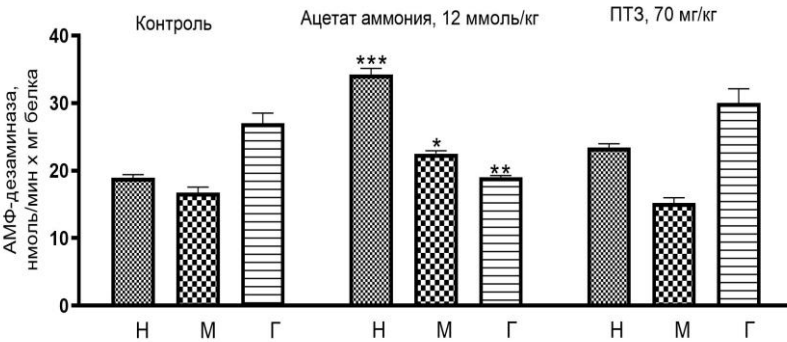
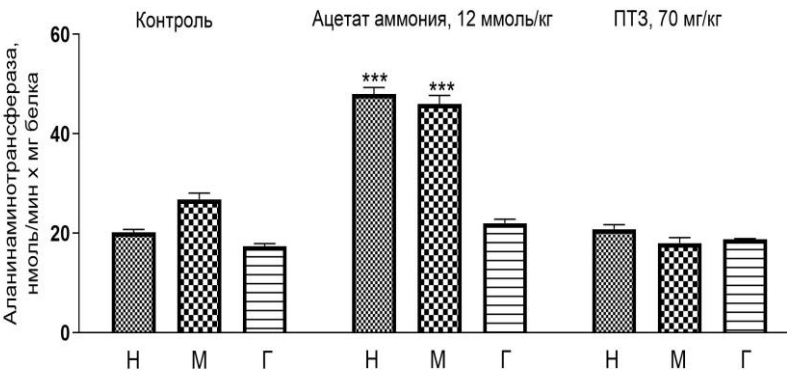
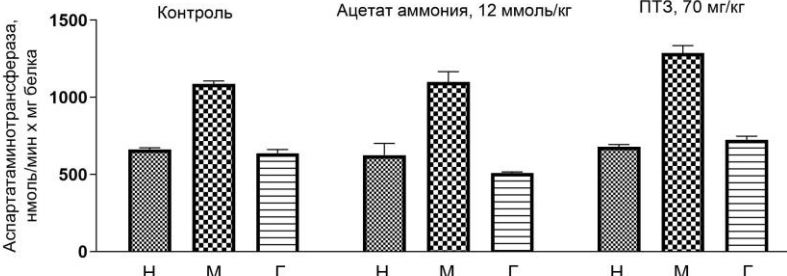
Таким образом, мы обнаружили, что при аммоний-индуцированной гипераммониемии и при нормальном содержании аммиака в крови, сохраняющимся после введения ПТЗ, наибольший вклад в усиленное образование аммиака в митохондриях неокортекса, мозжечка и гиппокампа вносят ГДГ и глутаминаза.

Трансаминаза АЛТ, непрямо участвующая в обмене аммиака, в меньшей степени способствует его образованию в мозге, тогда как активность АСТ при действии обоих конвульсантов участия в этом процессе не принимает.

Далее мы изучили, как изменяется активность аммиак-образующих ферментов в цитозольной фракции разных отделов мозга у этих же животных (рис. 3). Видно, что активность АДА во всех отделах мозга достоверно (при сравнении с контролем) увеличивается только при введении животным ацетата аммония.

Активность АМФД и АЛТ у этих же животных увеличивается только в неокортексе и мозжечке, тогда как в гиппокампе она снижается (группа – ацетат аммония, 12 ммоль/кг), либо не меняется при сравнении с контролем (группа – ПТЗ 70 мг/кг).

Активность АСТ в цитозоле, полученном из всех исследуемых отделов мозга, не отличается от контрольных значений ни после введения ацетата аммония, ни после введения ПТЗ.

Аденозиндезаминаза, нмоль/мин х мг белка Н – неокортекс М – мозжечок Г – гиппокамп	 контроль Ацетат аммония, 12 ммоль/кг ПТЗ, 70 мг/кг Аденозиндезаминаза, нмоль/мин х мг белка Н М Г Н М Г Н М Г
АМФ-дезаминаза, нмоль/мин х мг белка Н – неокортекс М – мозжечок Г – гиппокамп	 Контроль Ацетат аммония, 12 ммоль/кг ПТЗ, 70 мг/кг АМФ-дезаминаза, нмоль/мин х мг белка Н М Г Н М Г Н М Г
Аланинаминотрансфераза в цитозоле, нмоль/мин х мг белка Н – неокортекс М – мозжечок Г – гиппокамп	 Контроль Ацетат аммония, 12 ммоль/кг ПТЗ, 70 мг/кг Аланинаминотрансфераза, нмоль/мин х мг белка Н М Г Н М Г Н М Г
Аспаргатаминотрансфераза в цитозоле, нмоль/мин х мг белка Н – неокортекс М – мозжечок Г – гиппокамп	 Контроль Ацетат аммония, 12 ммоль/кг ПТЗ, 70 мг/кг Аспаргатаминотрансфераза, нмоль/мин х мг белка Н М Г Н М Г Н М Г

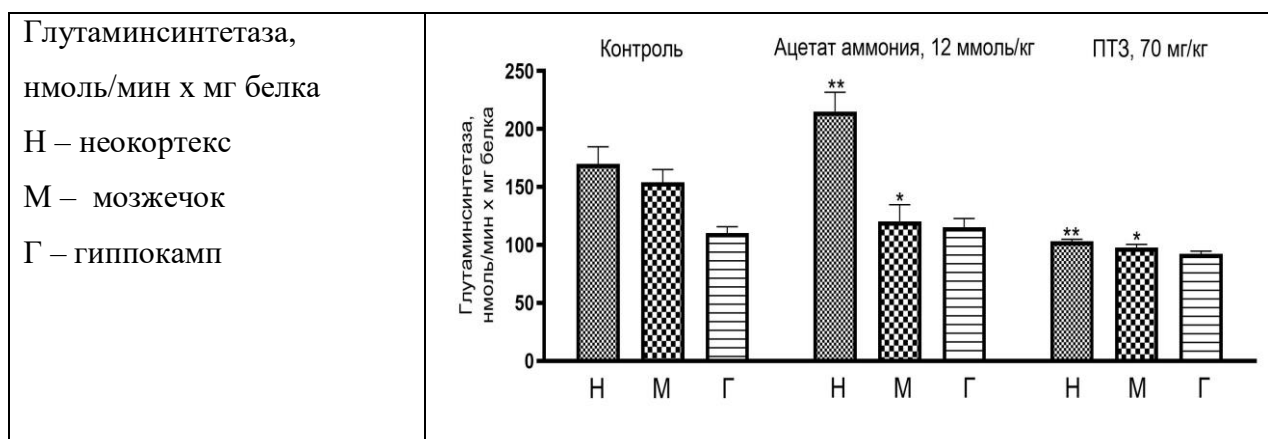


Рисунок 3. Активность Аденозиндезаминазы, АМФ-дезаминазы, АЛТ, АСТ и Глутаминсинтетазы в цитозоле разных отделов мозга крыс после внутрибрюшинного введения ацетата аммония и пентилентетразолия. Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы.

Следовательно, активность аммиак-образующих ферментов в цитозоле разных отделов мозга увеличивается только лишь при введении животным ацетата аммония, тогда как ПТЗ в используемой дозе не изменяет их активность. Эти данные, несмотря на некоторое уменьшение активности ГС, согласуются с отсутствием увеличения концентрации аммиака в цитозольной фракции всех отделов мозга животных, которым вводился ПТЗ (таблица 2).

	Плазма крови, мМ	Неокортекс, цитозоль, мМ	Мозжечок, цитозоль, мМ	Гиппокамп, цитозоль, мМ
Контроль	0,204 $\pm$ 0,05	0,311 $\pm$ 0,032	0,244 $\pm$ 0,114	0,213 $\pm$ 0,026
NH₄-ацетат, 12 ммоль/кг	2,15 $\pm$ 0,15 ***	0,758 $\pm$ 0,79 **	0,686 $\pm$ 0,193 **	0,439 $\pm$ 0,129 **
ПТЗ, 70 мг/кг	0,189 $\pm$ 0,012	0,298 $\pm$ 0,112	0,258 $\pm$ 0,040	0,212 $\pm$ 0,069

Таблица 2. Концентрация аммиака в плазме крови и цитозольной фракции разных отделов мозга крыс после внутрибрюшинного введения ацетата аммония и пентилентетразолия. Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка

среднего». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы.

Таким образом, мы показали, что и ацетат аммония, и ПТЗ способны усиливать эндогенные аммиак-образующие реакции в митохондриях и цитозоле разных отделов мозга и могут вносить самостоятельный вклад в значительное его накопление в мозге и развитие энцефалопатии и судорожных симптомов.

Обсуждение

Главный вывод настоящего исследования заключается в том, что и ацетат аммония, и ПТЗ способны усиливать эндогенные аммиак-образующие реакции в митохондриях и цитозоле разных отделов мозга крыс независимо от концентрации аммиака в крови и детоксицирующей функции печени. Механизм действия обоих конвульсантов, приводящий к активации ферментов, катализирующих реакции, связанные с образованием аммиака в мозге, неизвестен. Однако некоторые выводы могут быть предположены на основании полученных нами и литературных данных.

Недавно мы показали, что аммоний-индуцированное нарушение транспорта основных энергетических субстратов глюкозы и кетоновых тел из кровотока в мозг, драматически подавляющее энергетический обмен в мозге, предшествует развитию судорог и комы у гипераммониемированных животных [38]. Интересно, что между нарушением аэробного обмена глюкозы в мозге и накоплением аммиака тоже имеется прямая взаимосвязь: чем больше снижается концентрация глюкозы в мозге, тем больше аммиака накапливается, причем эта взаимосвязь не зависит ни от концентрации аммиака в крови, ни от причин, вызывающих нарушение метаболизма глюкозы [44, 45, 46]. Доподлинно механизм этой взаимосвязи неизвестен. Однако можно предположить, что он связан с анаплеротическими реакциями, которые активируются в условиях энергетического кризиса, вызванного аммоний-индуцированным нарушением аэробного обмена глюкозы в мозге с целью повышения концентрации субстратов цикла Кребса (α -кетоглутарата и оксалоацетата), образующихся в других метаболических путях [47]. Одним из известных анаплеротических ферментов в мозге является ГДГ, локализованная в матриксе митохондрий нервных клеток [48, 49], где в зависимости от доступности кофакторов, АТФ [40] и концентрации аммиака фермент катализирует либо окислительное дезаминирование глутамата до α -кетоглутарата и аммиака, либо участвует в обратной реакции, связывающей аммиак [50]. Показано, что окислительное

дезаминирование, катализируемое ферментом, в значительной степени активируется при нарушении энергетического обмена в мозге [51], что способствует «перенаправлению» α -кетоглутарата в цикл Кребса, активность которого резко снижается в отсутствии глюкозы [52]. Однако одновременное образование аммиака в этой реакции делает ГДГ одним из главных аммоний-образующих ферментов в мозге.

Аммиак является нейротоксином, вызывающим многочисленный каскад патологических реакций [8–14], запускающим патологическим звеном в котором является именно нарушение аэробного обмена глюкозы [38].

Следовательно, можно предположить, что обнаруженное увеличение активности ГДГ в митохондриях животных, которым вводился ацетат аммония, может быть связано с нарушением аэробного обмена глюкозы в мозге, и активацию фермента (по крайней мере, до возникновения судорог у животных) следует рассматривать как анаплеротическую реакцию, поставляющую α -кетоглутарат в цикл Кребса, который тормозится в отсутствии глюкозы [53]. Однако сопутствующее образование аммиака в ГДГ-реакции и его значительное накопление в митохондриях мозга [10], необратимо нарушающее аэробный обмен глюкозы [38], характеризует ГДГ-реакцию и как одну из главных источников аммиака в мозге, который активируется в условиях гипераммониемии при нормальной детоксицирующей функции печени.

Прямое доказательство наличия источников образования аммиака в мозге было получено и при использовании ПТЗ в качестве конвульсанта.

Введение ПТЗ, так же как и ацетата аммония, приводило к активации ГДГ и значительному накоплению аммиака в митохондриях разных отделов мозга животных (рис 2). Интересно, что это действие ПТЗ проявлялось при нормальной концентрации аммиака в крови (рис 1Б). Механизм действия ПТЗ на ГДГ-реакцию неизвестен, но если учесть наличие функциональной взаимосвязи между нарушением обмена глюкозы и эпилептогенным действием ПТЗ [54, 55, 56], то можно предположить, что активация фермента под действием ПТЗ происходит по тем же причинам, что и под воздействием ацетата аммония и что энергетический обмен и гомеостаз аммиака — два важных метаболических пути, которые регулирует этот фермент.

Другим ферментом, активность которого значительно увеличивалась в митохондриях всех исследуемых отделах мозга животных после введения им обоих конвульсантов, является глутаминаза. Поскольку одним из главных активаторов фермента является фосфат, иначе этот фермент называется фосфат-активированная глутаминаза [57]. Другим активатором фермента является глутамин, который, с одной стороны, является продуктом обезвреживания аммиака в мозге в реакции, катализируемой ГС, с

другой – активатором глутаминазы, которая расщепляет глутамин до глутамата и свободного аммиака [58]. В зависимости от локализации фермента образуемый в результате глутаминазной реакции глутамат может использоваться либо как нейромедиатор, либо как энергетический субстрат [59]. Мы измеряли активность фермента в очищенных митохондриях, что дает возможность предположить, что активация глутаминазы под действием обоих конвульсантов может быть связана и с накоплением глутамина, и с накоплением неорганического фосфата, которое усиливается при аммоний-индуцированном нарушении энергетического обмена и чрезмерном гидролизе АТФ [8].

Отсюда следует, что при аммоний-индуцированной гипераммониемии и при нормальном содержании аммиака в крови, сохраняющимся после введения ПТЗ, наибольший вклад в усиленное образование аммиака в митохондриях неокортекса, мозжечка и гиппокампа, вносят ГДГ и глутаминаза.

Трансаминаза АЛТ, непрямо участвующая в обмене аммиака, в меньшей степени способствует его образованию в мозге, тогда как активность АСТ при действии обоих конвульсантов участия в этом процессе не принимает.

В целом, проведенные исследования позволили выявить, что и ацетат аммония, и ПТЗ способны усиливать эндогенные аммиак-образующие реакции в митохондриях и цитозоле разных отделов мозга, независимо от концентрации аммиака в крови и детоксицирующей функции печени, и могут вносить самостоятельный вклад в значительное его накопление в мозге и развитие энцефалопатии и судорожных симптомов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00106.

Литература

1. Shimizu T. et al. Erythrocyte glycolysis and its marked alterations by muscular exercise in type VII glycogenosis // *Blood*. 1988. Vol. 71, № 4. P. 1130–1134.
2. Weiner I.D., Verlander J.W. Renal ammonia metabolism and transport // *Compr Physiol*. 2013. Vol. 3, № 1. P. 201–220.
3. Kalmar J.R., Van Dyke T.E. Effect of bacterial products on neutrophil chemotaxis // *Methods Enzymol*. 1994. Vol. 236. P. 58–87.
4. Bak L.K., Schousboe A., Waagepetersen H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // *J Neurochem*. 2006. Vol. 98, № 3. P. 641–653.
5. Munoz S.J. Hepatic encephalopathy // *Med Clin North Am*. 2008. Vol. 92, № 4. P. 795–812, viii.
6. Butterworth R.F. et al. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy // *Neurochem Pathol*. 1987. Vol. 6, № 1–2. P. 1–12.
7. Oja S.S., Saransaari P., Korpi E.R. Neurotoxicity of Ammonia // *Neurochem Res*. 2017. Vol. 42, № 3. P. 713–720.
8. Kosenko E. et al. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase // *J Neurochem*. 1994. Vol. 63, № 6. P. 2172–2178.
9. Kosenko E. et al. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo // *Brain Res*. 2000. Vol. 880, № 1–2. P. 139–146.
10. Kosenko E. et al. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria // *Metab Brain Dis*. 1997. Vol. 12, № 1. P. 69–82.
11. Kosenko E. et al. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism // *Neurochem Res*. 1995. Vol. 20, № 4. P. 451–456.
12. Kosenko E. et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats // *Free Radic Res*. 1997. Vol. 27, № 6. P. 637–644.
13. Kosenko E. et al. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication // *Free Radic Biol Med*. 1999. Vol. 26, № 11–12. P. 1369–1374.
14. Kosenko E. et al. Acute ammonia intoxication induces an NMDA receptor-mediated increase in poly(ADP-ribose) polymerase level and NAD metabolism in nuclei of rat brain cells // *J Neurochem*. 2004. Vol. 89, № 5. P. 1101–1110.
15. Miyaji H. et al. Effects of *Helicobacter pylori* eradication therapy on hyperammonaemia in patients with liver cirrhosis // *Gut*. 1997. Vol. 40, № 6. P. 726–730.
16. Cover T.L. et al. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin // *Infect Immun*. 1991. Vol. 59, № 4. P. 1264–1270.
17. Mitchell R.B. et al. Syndrome of idiopathic hyperammonemia after high-dose chemotherapy: review of nine cases // *Am J Med*. 1988. Vol. 85, № 5. P. 662–667.
18. Anwar S. et al. Symptomatic hyperammonemia after lung transplantation: lessons learnt // *Hemodial Int*. 2014. Vol. 18, № 1. P. 185–191.
19. Lichtenstein G.R. et al. Fatal hyperammonemia after orthotopic lung transplantation // *Ann Intern Med*. 2000. Vol. 132, № 4. P. 283–287.
20. Tse N., Cederbaum S., Glaspy J.A. Hyperammonemia following allogeneic bone marrow transplantation // *Am J Hematol*. 1991. Vol. 38, № 2. P. 140–141.
21. Hoyer S., Nitsch R., Oesterreich K. Ammonia is endogenously generated in the brain in the presence of presumed and verified dementia of Alzheimer type // *Neurosci Lett*. 1990. Vol. 117, № 3. P. 358–362.
22. Gupta S. et al. Inhibition of carbamyl phosphate synthetase-I and glutamine synthetase by hepatotoxic doses of acetaminophen in mice // *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997. Vol. 146, № 2. P. 317–327.

23. Hadchouel M., Prieur A.M., Griscelli C. Acute hemorrhagic, hepatic, and neurologic manifestations in juvenile rheumatoid arthritis: possible relationship to drugs or infection // *J Pediatr*. 1985. Vol. 106, № 4. P. 561–566.
24. Häussinger D. et al. Liver carbonic anhydrase and urea synthesis. The effect of diuretics // *Biochem Pharmacol*. 1986. Vol. 35, № 19. P. 3317–3322.
25. Mehndiratta M.M. et al. Valproate induced non hepatic hyperammonaemic encephalopathy (VNHE)--a study from tertiary care referral university hospital, north India // *J Pak Med Assoc*. 2008. Vol. 58, № 11. P. 627–631.
26. Yamamoto Y. et al. Risk factors for hyperammonemia in pediatric patients with epilepsy // *Epilepsia*. 2013. Vol. 54, № 6. P. 983–989.
27. Farooq O. et al. Non-Hyperammonemic valproate encephalopathy // *Ann Neurosci*. 2014. Vol. 21, № 2. P. 76–79.
28. Sin O., Batterink J. Encephalopathy induced by combination therapy with valproic Acid and topiramate: challenging the utility of serum ammonia measurement // *Can J Hosp Pharm*. 2015. Vol. 68, № 1. P. 54–56.
29. Caruana Galizia E., Isaacs J.D., Cock H.R. Non-hyperammonaemic valproate encephalopathy after 20 years of treatment // *Epilepsy Behav Case Rep*. 2017. Vol. 8. P. 9–11.
30. Chamuleau R.A. Animal models of hepatic encephalopathy // *Semin Liver Dis*. 1996. Vol. 16, № 3. P. 265–270.
31. Kosenko E.A. et al. Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions // *Free Radic Biol Med*. 2017. Vol. 113. P. 109–118.
32. Каминский Ю.Г., Белоушко Е.Е., Косенко Е.А. Антиокислительная Защита В Коре Мозга, Мозжечке, Гиппокампе И Стриатуме Крысы И Ее Изменения При Портокавальном Шунтировании // *Нейрохимия*. 2014. Vol. 31, № 4.
33. Kaminsky Y., Kosenko E. Brain purine metabolism and xanthine dehydrogenase/oxidase conversion in hyperammonemia are under control of NMDA receptors and nitric oxide // *Brain Res*. 2009. Vol. 1294. P. 193–201.
34. Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy // *Curr Protoc Neurosci*. 2012. Vol. Chapter 9. P. Unit9.37.
35. Beutler E. et al. International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis // *Br J Haematol*. 1977. Vol. 35, № 2. P. 331–340.
36. Kosenko E.A. et al. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification // *Biochem Cell Biol*. 2008. Vol. 86, № 6. P. 469–476.
37. Graham J.M. Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation // *Curr Protoc Cell Biol*. 2001. Vol. Chapter 3. P. Unit 3.4.
38. Kosenko E. et al. A Look into Liver Mitochondrial Dysfunction as a Hallmark in Progression of Brain Energy Crisis and Development of Neurologic Symptoms in Hepatic Encephalopathy // *J Clin Med*. 2020. Vol. 9, № 7.
39. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem*. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
40. Fisher H.F. L-Glutamate dehydrogenase from bovine liver // *Methods Enzymol*. 1985. Vol. 113. P. 16–27.
41. Kvamme E., Torgner I.A., Svenneby G. Glutaminase from mammalian tissues // *Methods Enzymol*. 1985. Vol. 113. P. 241–256.
42. Meister A. Glutamine synthetase from mammalian tissues // *Methods Enzymol*. 1985. Vol. 113. P. 185–199.
43. Nathans G.R., Chang D., Deuel T.F. AMP deaminase from human erythrocytes // *Methods Enzymol*. 1978. Vol. 51. P. 497–502.
44. Hoyer S., Oesterreich K., Wagner O. Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type? // *J Neurol*. 1988. Vol. 235, № 3. P. 143–148.

45. Folbergrová J. et al. Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex // *Brain Res.* 1974. Vol. 80, № 2. P. 265–279.
46. Otsuka M. et al. Lactic acidosis with hypoglycemia and hyperammonemia observed in two uremic patients during calcium hopantenate treatment // *Jpn J Med.* 1990. Vol. 29, № 3. P. 324–328.
47. Owen O.E., Kalhan S.C., Hanson R.W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function // *J Biol Chem.* 2002. Vol. 277, № 34. P. 30409–30412.
48. Mastorodemos V. et al. Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum // *Biochem Cell Biol.* 2009. Vol. 87, № 3. P. 505–516.
49. Nicklas W.J. Amino acid metabolism in the central nervous system: role of glutamate dehydrogenase // *Adv Neurol.* 1984. Vol. 41. P. 245–253.
50. Cooper A.J., Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia // *Physiol Rev.* 1987. Vol. 67, № 2. P. 440–519.
51. Erecińska M., Nelson D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes // *J Neurochem.* 1990. Vol. 54, № 4. P. 1335–1343.
52. Yudkoff M. et al. Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle // *J Biol Chem.* 1994. Vol. 269, № 44. P. 27414–27420.
53. Косенко Е. Энергетический обмен в норме и при патологии. Роль возбуждающих нейромедиаторов: учебное пособие для студентов, обучающихся по направлению “Биология”. Москва: URSS, 2013. 301 с.
54. Guzmán D.C. et al. Effect of pentylenetetrazole and carbodiimide on oxidation stress markers in rat brain // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005. Vol. 96, № 6. P. 512–513.
55. Pumain R. et al. Lability of GABAA receptor function in human partial epilepsy: possible relationship to hypometabolism // *Epilepsia.* 2008. Vol. 49 Suppl 8. P. 87–90.
56. Naseer M.I. et al. Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons // *Synapse.* 2011. Vol. 65, № 7. P. 562–571.
57. Romero-Gómez M. Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy // *Metab Brain Dis.* 2005. Vol. 20, № 4. P. 319–325.
58. Olde Damink S.W.M. et al. Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS // *Hepatology.* 2002. Vol. 36, № 5. P. 1163–1171.
59. Bellocchio E.E. et al. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission // *J Neurosci.* 1998. Vol. 18, № 21. P. 8648–8659.