

УДК 616.36-002-036.11-089-008:9:547.466.6
©П.Н.Савилов.

МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

П.Н.Савилов.

Воронежская медицинская академия.
394622 Воронеж, ул.Студенческая, 10; факс. (8073)-53-00-05

Длительное действие CCl_4 на организм вызывает снижение концентрации глутамина в печени, обусловленное преобладанием распада метаболита над его образованием, которое не восстанавливается на протяжении 21-х суток после отмены токсина. В основе этого лежит стойкое угнетение активности глутаминсинтетазы на фоне неизменной или повышенной активности фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ). Применение на этом фоне резекции печени (15-20% от массы органа) не ликвидирует нарушения метаболизма глутамина в гепатоцитах пораженного органа, даже в условиях кратковременного (3-и сутки после операции) увеличения активности глутаминсинтетазы, поскольку в этот же период отмечены увеличение активности ФЗГ и снижение концентрации в печени глутамата. В поздние сроки (14-е и 21-е сутки) после резекции печени происходит угнетение активности обоих ферментов, однако при этом сохраняется преобладание распада глутамина над его образованием и усиливается накопление в печени аммиака. Близость клеток к очагу механического повреждения печени определяет степень изменения активности ферментов метаболизма глутамина в раннем и позднем послеоперационном периоде.

Ключевые слова: глутамин, метаболизм, печень, резекция, гепатит.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из хирургических методов лечения хронических гепатитов и циррозов печени является частичная гепатэктомия (ЧГЭ), которая не только стимулирует репаративные процессы в пораженном органе, но и содействует обратному развитию в них склеротических изменений [1]. Вместе с тем выполнение оперативного вмешательства на фоне диффузного поражения печени таит в себе опасность прогрессирования печёночной недостаточности в послеоперационном периоде [2], механизмы развития которой остаются не изученными. В предыдущих исследованиях установлено, что резекция небольших (15-20%) объёмов печени у здоровых животных вызывает стойкое нарушение метаболизма глутамина в гепатоцитах [3]. Однако состояние метаболизма глутамина (обратимая форма связывания эндотоксина аммиака) в печени, оперированной на фоне хронического гепатита, в настоящее время не изучено.

МЕТОДИКА. Исследования проведены на 196 белых крысах самках массой 180-220 г. Хронический гепатит вызывали подкожным введением 50% раствора тетрахлорметана (CCl_4) 0,1 мл / 100 г массы через день с двумя двухнедельными перерывами между 6 и 7, 13 и 14 инъекциями. На 65-е сутки развития гепатита сразу после 21-й (последней) инъекции токсина одним животным делали лапаротомию (они составили серии "ложнооперированных" животных); других подвергали ЧГЭ по разработанной нами методике [4]. При этом удалялось электроножом часть левой доли органа, что составляло 15-20% от массы органа.

МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА ПРИ ГЕПАТИТЕ

Операцию проводили под эфирным наркозом. Животные были разделены на 10 серий опытов. 1 серия - здоровые животные, 2 серия - животные, исследованные на 65-е сутки введения токсина (исходное состояние); 3, 4, 5 и 6 серии - "ложнооперированные" животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после отмены токсина и лапаротомии. Эти серии служили контролем для выявления "чистого" эффекта ЧГЭ; 7, 8, 9 и 10 серии - животные с хроническим гепатитом, исследованные соответственно на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после резекции печени.

Животных декапитировали на фоне этиминалового наркоза. Объектом исследования служили левая (оперируемая, ЛДП) и средняя (неоперируемая, СДП) доли печени. В ткани печени, замороженной в жидком азоте, определяли содержание аммиака, глутамин [5] и глутамата [6]. Для определения активности ферментов печень предварительно перфузировали охлажденным 0,125 М раствором KCl и гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы. Субклеточные фракции гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [7]. В митохондриальной фракции гепатоцитов определяли активность фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) [8], в микросомальной фракции - активность глутаминсинтетазы (ГС) [9]. Содержание белка в субклеточных фракциях определяли по методу Лоури. Результаты обработаны статистически с учетом параметрического t-критерия Стьюдента [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ. Длительное действие на организм CCl_4 вызывало снижение активности ГС и концентрации глутамин в обеих изучаемых долях печени (табл.1), что свидетельствует об угнетении глутаминообразовательной функции гепатоцитов при данной патологии. Активность ФЗГ к концу затравки не изменялась (табл.1), указывая на устойчивость реакции дезамидирования глутамин в гепатоцитах к длительному действию CCl_4 . Преобладание распада глутамин над его образованием не сопровождалось накоплением в печени аммиака и глутамата (наоборот, их содержание снижалось). Аналогичные изменения были обнаружены и в других исследованиях [11].

После окончания введения CCl_4 и контрольной лапаротомии концентрация глутамин в печени увеличивалась по сравнению с концом затравки, однако полной нормализации содержания метаболита не происходило (табл.1). Активность ГС возрастала на 7-е сутки исследования по сравнению с концом затравки в ЛДП на 57%, в СДП на 73%, однако полной нормализации показателя не происходило (табл.1). Активность ФЗГ в ЛДП после отмены CCl_4 не изменялась, тогда как в СДП увеличивалась по сравнению с нормой на 14-е и 21-е сутки восстановительного периода. Преобладание распада глутамин над его образованием в печени после отмены токсина сопровождалось накоплением гепатоцитами аммиака (табл.1). Концентрация глутамата в ЛДП на 3-и сутки после отмены CCl_4 увеличивалась на 33%, а на 7-е и 14-е сутки снижалась соответственно на 30% и 20% по сравнению с нормой. В СДП содержание глутамата становилось ниже нормы на 7-е и 14-е сутки исследования (табл.1).

Таким образом, длительное действие CCl_4 на организм вызывает нарушение метаболизма глутамин в гепатоцитах, которое проявляется угнетением его образования на фоне сохранения или активации его распада (дезамидирования). Это сопровождается снижением содержания в печени глутамата и глутамин на фоне накопления эндогенного токсина аммиака.

В ранние (3-и и 7-е сутки) сроки после ЧГЭ на фоне хронического гепатита содержание глутамин в печени не изменялось (рис.1), оставаясь достоверно ниже нормы (табл.2). На 3-и сутки после резекции печени обнаружено увеличение активности ГС в части ЛДП и СДП соответственно на 27% и 54%, тогда как активность ФЗГ увеличивалась в них по сравнению с контролем соответственно на 108% и 55% на фоне накопления аммиака и снижения концентрации глутамата (рис.1а). По сравнению с нормой восстановление активности ГС отмечалось только в СДП, а содержание аммиака и активность ФЗГ превышали норму в обеих изучаемых долях печени (табл.2).

Таблица 1. Содержание аммиака, глутамата, глутамина (ммоль/кг влажной ткани), активность ГС и ФЗГ (нкат / мг белка) в печени крыс при хроническом тетрахлорметановом (CCl₄) гепатите.

Показатели		Норма	Конец затравки	Сутки после отмены CCl ₄			
				3	7	14	21
Номер серии опытов		1	2	7	8	9	10
Аммиак	ЛДП	0,94±0,0317	0,59±0,05*	1,23±0,12*	1,27±0,14*	1,12±0,09*	1,29±0,1*
	СДП	0,94±0,04	0,6±0,05*	1,23±0,13*	1,12±0,09*	0,2±0,05*	1,16±0,17*
Глутамат	ЛДП	1,83±0,08	1,47±0,1*	2,43±0,2*	1,27±0,12*	1,47±0,13*	1,82±0,23
	СДП	2,0±0,09	1,68±0,14*	1,9±0,2	1,1±0,1*	1,56±0,1*	1,79±0,16
Глутамин	ЛДП	3,36±0,16	1,59±0,09*	2,84±0,13*	2,44±0,1*	2,44±0,17*	2,34±0,15*
	СДП	3,56±0,16	1,83±0,1*	2,72±0,16*	2,69±0,17*	2,28±0,15*	2,41±0,14*
ГС	ЛДП	1,12±0,0	0,44±0,05*	0,48±0,07*	0,81±0,13*	0,5±0,08*	0,62±0,09*
	СДП	1,13±0,09	0,4±0,05*	0,42±0,07*	0,65±0,08*	0,57±0,08*	0,61±0,07*
ФЗГ	ЛДП	1,83±0,1	1,69±0,27	1,58±0,13	1,84±0,29	1,97±0,22	1,95±0,17
	СДП	1,58±0,08	1,29±0,17	1,7±0,14	1,98±0,25*	2,41±0,26*	1,93±0,11*

Примечание: * - достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с нормой; • - достоверность различий ($p < 0,05$) после прекращения введения CCl₄

Таблица 2. Содержание аммиака, глутамата, глутамина (ммоль/кг влажной ткани), активность ГС и ФЗГ (нкат / мг белка) в печени животных с хроническим гепатитом после частичной гепатэктомии.

Показатели		Норма	Конец затравки	Сутки после операции			
				3	7	14	21
Номер серии опытов		1	2	7	8	9	10
Аммиак	ЛДП	0,94±0,037	0,59±0,05*	1,5±0,13*	1,6±0,12*	1,66±0,09*	1,75±0,1*
	СГП	0,94±0,04	0,6±0,05*	1,55±0,13*	1,73±0,13*	1,82±0,18*	1,86±0,11*
Глутамат	ЛДП	1,83±0,08	1,47±0,1*	1,68±0,08	2,14±0,14	1,92±0,14	1,57±0,16
	СГП	2,0±0,09	1,68±0,14*	1,9±0,2*	2,12±0,18	1,55±0,13*	1,46±0,1*
Глутамин	ЛДП	3,36±0,16	1,59±0,09*	2,46±0,12*	2,14±0,14*	2,29±0,18*	2,57±0,19*
	СГП	3,56±0,16	1,83±0,1*	2,44±0,11*	2,14±0,13*	2,0±0,2*	2,5±0,24*
ГС	ЛДП	1,12±0,1	0,44±0,05*	0,61±0,08*	0,34±0,05*	0,36±0,05*	0,5±0,07*
	СГП	1,13±0,09	0,4±0,05*	0,65±0,07*	0,46±0,08*	0,36±0,06*	0,28±0,04*
ФЗГ	ЛДП	1,83±0,1	1,69±0,27	3,28±0,45*	1,32±0,19*	1,37±0,13*	2,06±0,24
	СГП	1,58±0,08	1,27±0,17	2,65±0,2*	1,61±0,14	1,79±0,18	1,75±0,16

Примечание: * - достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с нормой.

На 7-е сутки после ЧГЭ у животных с хроническим гепатитом обнаружено снижение активности ГС в ЛДП и СДП соответственно на 58% и 29% относительно контроля (рис. 16), в результате чего она становилась достоверно ниже нормы (табл.2). Активность ФЗГ снижалась на 28% только в ЛДП (рис.16), становясь на 25% ниже нормы (табл.2). Однако прирост содержания аммиака в печени на 7-е сутки после ЧГЭ составил в части ЛДП 22%, в СДП-52%. (рис.16), в результате чего его содержание превышало норму в ЛДП на 70%, в СДП - на 84% (табл.2)

Таким образом, у животных с хроническим гепатитом в ранние (первые 7 суток) сроки после ЧГЭ не только сохраняются нарушения метаболизма глутамина в гепатоцитах, но и активируется его дезамидирование в поврежденной доле на 3-и сутки, в неповрежденной доле - на 7-е сутки послеоперационного периода.

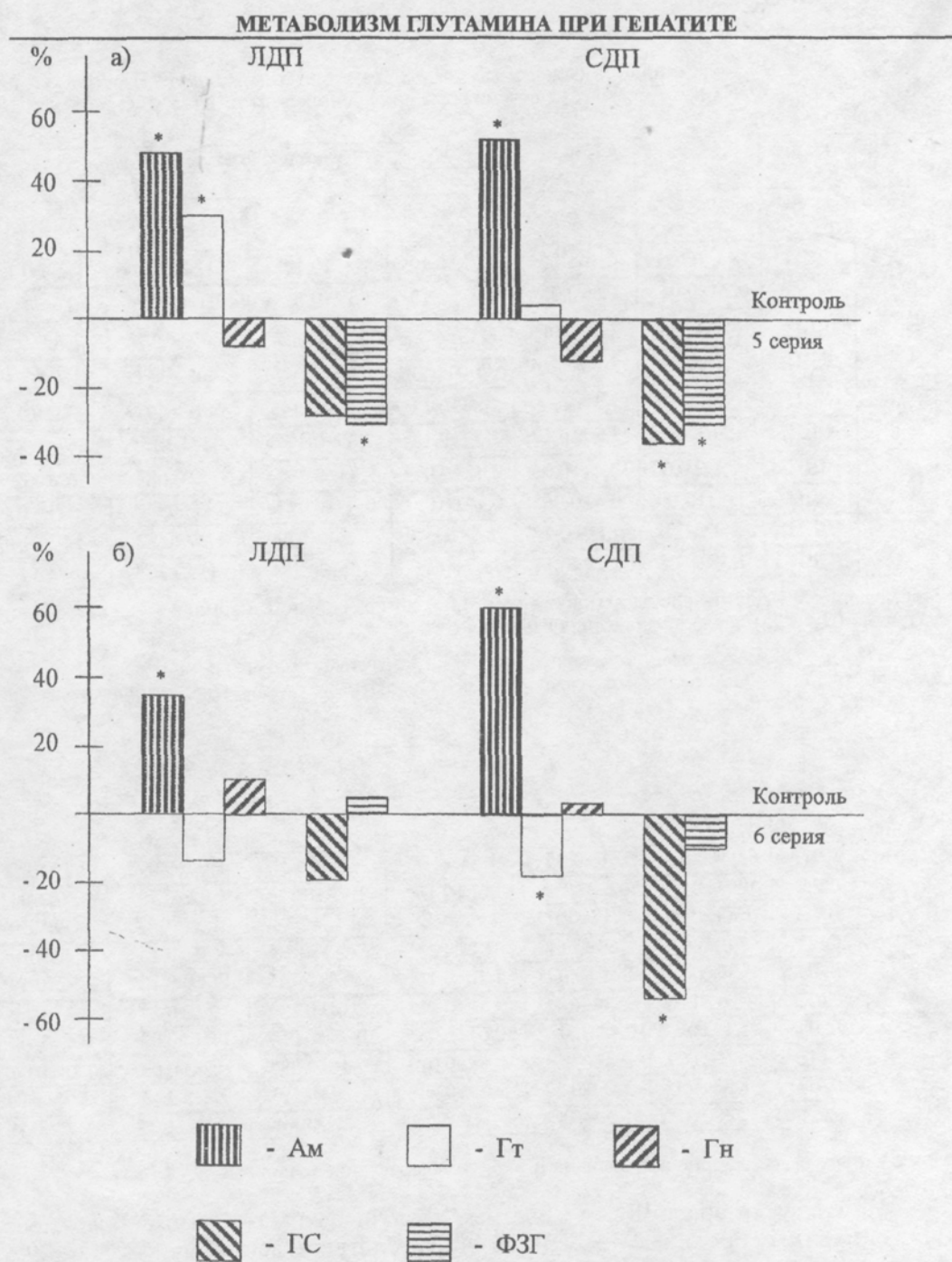


Рисунок 1.

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), содержания глутамина (Гн), глутамата (Гт) и аммиака (Ам) в печени животных с хроническим гепатитом на 3-и (а) и 7-е (б) сутки после частичной гепатэктомии. Примечание: ЛДП - левая (оперированная) доля печени, СДП - средняя (неоперированная) доля печени. * - Достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим контролем. Объяснение в тексте.

В поздние (14-е и 21-е сутки) сроки после ЧГЭ концентрация глутамина в печени не изменялась (рис.2), оставаясь достоверно ниже нормы на фоне повышенного содержания аммиака (табл.2). Активность ФЗГ в печени на 14-е сутки после ЧГЭ была снижена в ЛДП и СДП соответственно на 40% и 26% по

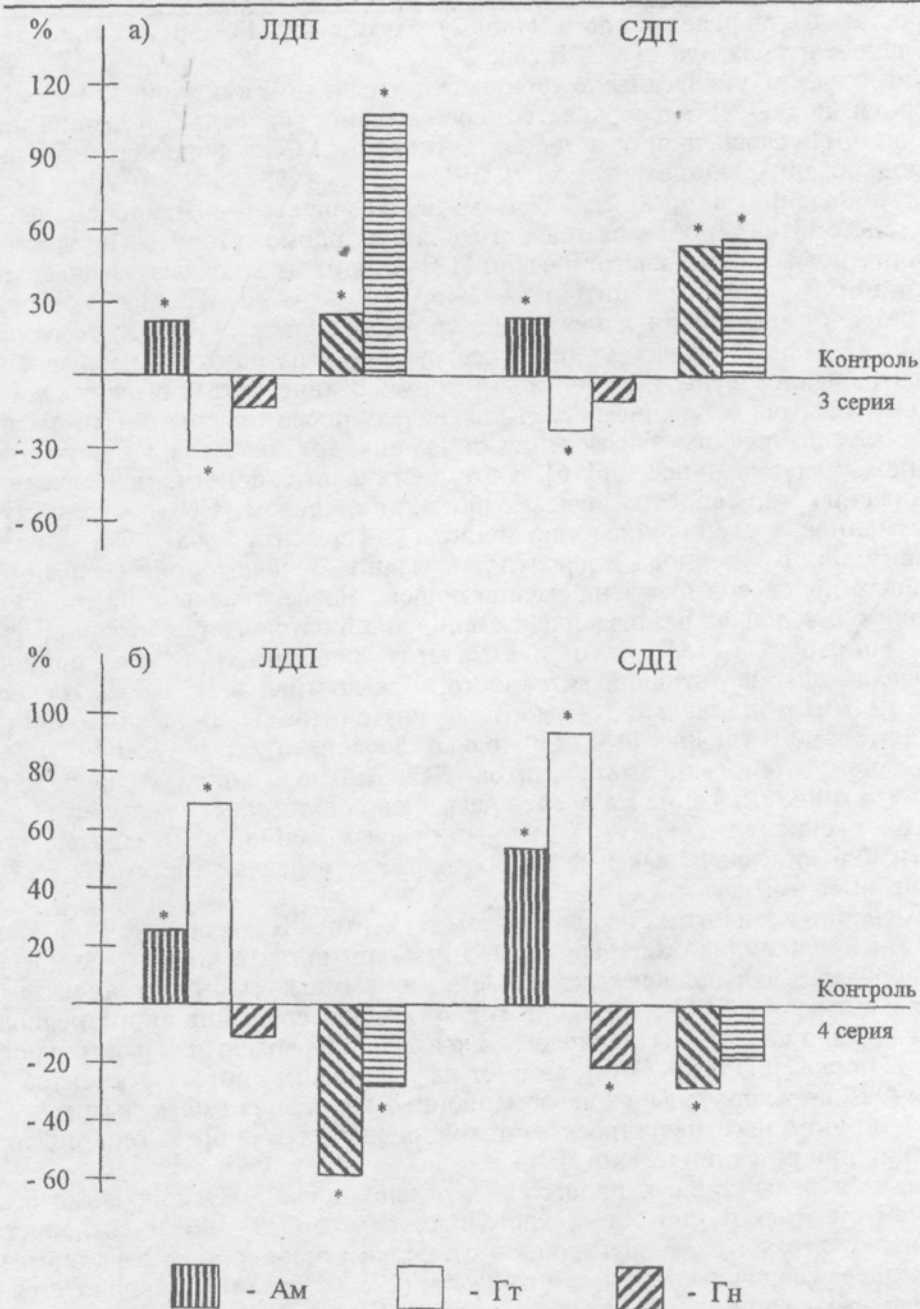


Рисунок 2

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), содержания глутамина (Гн), глутамата (Гт) и аммиака (Ам) в печени животных с хроническим гепатитом на 14-е (а) и 21-е (б) сутки после частичной гепатэктомии.

Примечание: ЛДП - левая (оперированная) доля печени, СДП - средняя (неоперированная) доля печени. * - Достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим контролем.

Объяснение в тексте.

сравнению с контролем, тогда как активность ГС достоверно снижалась (на 47%) только в СДП (рис. 2а). По сравнению с нормой активность ГС оставалась сниженной в обеих долях, тогда как активность ФЗГ снижалась только в ЛДП (табл.2). На 21-е сутки после ЧГЭ активность ФЗГ не отличалась от контроля

МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА ПРИ ГЕПАТИТЕ

(рис.2б), оставаясь в пределах нормы (табл.2). Активность ГС снижалась на 54% относительно контроля только в СДП (рис.2б).

Таким образом, у животных с хроническим гепатитом в поздние (14-е - 21-е сутки) сроки после ЧГЭ сохраняется преобладание распада глутамина над образованием, обусловленное угнетением активности ГС на фоне нормализации его дезамидирования, катализируемого ФЗГ.

При попадании в организм CCl_4 метаболизируется в микросомальной системе гепатоцитов с образованием токсичных промежуточных продуктов, вызывающих повреждение клеток печени [12]. Одним из ключевых звеньев его трансформации является цитохром P450 [13], концентрация которого увеличивается от периферии к центру печёночной дольки [14]. Поэтому при отравлении CCl_4 наибольшая степень деструкции гепатоцитов наблюдается вблизи центральной вены, где происходит формирование некротических зон [1], которые сохраняются в течение нескольких недель после отмены гепатотоксина [1,15]. ГС, катализирующая образование глутамина, локализована в гепатоцитах центральной зоны дольки печени [16], поэтому становится понятным выявленное нами снижение активности энзима при хроническом CCl_4 - гепатите. Кратковременное увеличение активности фермента на 7-е сутки восстановительного периода, вероятно, связано с некоторой активацией репаративных процессов в печени, возникающей после отмены гепатотоксина [1,15]. Однако в условиях развивающейся при данной патологии гипоксии органа [4,11] и гипозергоза [15] этого оказывается недостаточно для полного восстановления ферментативной активности. Локализация ФЗГ на внутренней поверхности митохондриальной мембраны гепатоцитов [17], расположенных вблизи портальной триады [18], не только делает её более устойчивой к повреждающему действию метаболитов CCl_4 , но и создаёт условия для увеличения активности фермента после прекращения патогенного воздействия на печень. Понижение активности ГС на фоне неизменной или повышенной активности ФЗГ объясняет как дефицит содержания в печени глутамина, так и накопление в ней аммиака.

Применение у животных с хроническим гепатитом ЧГЭ в объеме 15-20% от массы органа не ликвидировало нарушение метаболизма глутамина в гепатоцитах и стимулировало дальнейшее накопление в них аммиака. Обнаруженное нами увеличение активности ГС и ФЗГ на 3-и сутки послеоперационного периода (рис.1а) совпадало по срокам с периодом максимальной репаративной активности гепатоцитов после ЧГЭ [15]. Это указывает на увеличение синтеза ферментов *de novo*. Для ФЗГ не исключены и конформационные изменения молекулы энзима в результате структурных перестроек митохондриальных мембран гепатоцитов, возникающих при резекции печени [19].

Активация репаративных процессов в печени после ЧГЭ сопровождается повышением не только синтеза клеточных белков [20], но и активности лизосомальных ферментов, разрушающих эти белки в процессе аутофагоцитоза [21]. Последнее увеличивается и при гипоксии [22], которая не ликвидируется в печени животных с хроническим гепатитом после ЧГЭ [4]. В этих условиях следует ожидать преобладание распада клеточных белков над их синтезом, и, как следствие, снижение их содержания в клетке. С этих позиций следует рассматривать наблюдающееся в поздние сроки после ЧГЭ снижение активности ГС и ФЗГ в печени. Для ФЗГ причиной снижения активности могут также служить стойкое накопление в печени аммиака и снижение концентрации в ней глутамина, являющихся соответственно ингибитором и стимулятором активности энзима [23].

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. При хроническом CCl_4 -гепатите нарушения метаболизма глутамина в печени проявляются преобладанием его распада над образованием в

результате угнетения активности ГС на фоне неизменной или повышенной активности ФЗГ.

2. ЧГЭ не ликвидирует нарушение образования глутамина в печени при хроническом ССІ4-гепатите, несмотря на кратковременную стимуляцию активности ГС.

3. ЧГЭ при хроническом ССІ4-гепатите через влияние на ФЗГ стимулирует дезамидирование гепатоцитами глутамина в раннем послеоперационном периоде, наиболее выраженное вблизи раневой поверхности печени.

4. Близость клеток к очагу механического повреждения печени определяет величину изменения в них активности ферментов метаболизма глутамина (ГС и ФЗГ), а так же на степень прироста содержания аммиака в послеоперационном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С. (1965) Пути восстановления цирротически измененной печени. Медицина, М.
2. Нихинсон Р.А. (1984) Хирургия, №7, 105-109.
3. Савилов П.Н. (2000) Вопр. мед. химии, 46, 370-376.
4. Савилов П.Н. (1993) Влияние гипербарической оксигенации и частичной гепатэктомии на детоксикацию аммиака в пораженной четыреххлористым углеродом печени. дисс. канд. мед. наук, Воронеж.
5. Силакова А.И., Трубин Г.П., Явлюкова А.И. (1962) Вопр. мед. химии, 28, 538-544.
6. Bernt E., Bergmeyer H.U. (1979) Method der enzym. analyse. Weinheim, 2, 1749-1752.
7. Jonson D., Lardy I. (1967) Meth. Enzymol. 210, 94-102.
8. Beaton J.R., Ozawa G. (1955) J. Biol. Chem, 214, 685-691.
9. Пышкин А.В., Евстигнеева З.Г., Кретович В.А. (1972) Прикл. биохим. и микробиол. 28 (1), 81-90.
10. Лакин Г.Ф. (1973) Биометрия, Высшая школа, М.
11. Ласкаржевская М.А. (1983) Влияние гипербарической оксигенации на кровоток, напряжение кислорода и реакции обмена низкомолекулярных азотистых веществ печени при её токсическом поражении. Дисс. канд мед наук, Воронеж.
12. Арчаков А.И., Карузина И.И. (1973) Успехи гепатологии (Рига), №4, 38-59.
13. Губский Ю.И. (1989) Коррекция химического поражения печени. Здоров'я, Киев.
14. Sweaney G.D. (1981) Trends. Pharm. Sci. 2 (6), 141-144.
15. Солопаев Б.П. (1980) В кн. Регенерация нормальной и патологически измененной печени. Горький, с.200-213.
16. Gebhardt R. (1988) Scand. J. Gastroenterol., 230 (15), 8-18
17. Mc Givan J.A., Bradford P.M., Verholen A.I. (1984) Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues, Berlin, pp. 122-132.
18. Moran A.F.M., Vermeulen J.L.M., Charles R., Lamers W (1988) Hepatology, 29, 367-372.
19. Хейсин Е.М. (ред.) (1969) Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени Наука, Л., с.90-115.
20. Alesenko A.V., Rusakov S.A., Filippova G. (1993) 22nd Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc. Stockholm, Abstr. 147-148.
21. Малыгин А.Е., Якобсон Т.С. (1986) Патол. физиол. и эксперим. терапия №4, 35-38.

МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА ПРИ ГЕПАТИТЕ

22. Абдуллаев Н.К., Каримов Х.Я. (1989) Печень при интоксикации гепатотропными ядами, Медицина, Ташкент 95.
23. Haussinger D (1983) Eur. J. Biochem., **213**, 269-275.

Поступила 09.01.01.

GLUTAMINE METABOLISM AFTER PARTIAL HEPATECTOMY DURING CHRONICAL HEPATITIS

P. N. Savilov

Burdenko Voronezh State Medical Academy,
394622 Voronezh, Stydencheskaya st., 10, fax:(0732) 53-00-05

A long-term treatment of female rats with CCl₄ caused a decrease of glutamine content in the liver. This decrease may be attributed to stable reduction of glutamine synthetase activity and slightly elevated (or unchanged) phosphate-dependent glutaminase. Partial hepatectomy (15-20% of the liver) did not normalise glutamine metabolism.

Key words: glutamine, metabolism, liver, resection, hepatitis.