

УДК 616.36:547.466.6622

©П.Н.Савилов

## **ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАМИНА В ПОВРЕЖДЕННОЙ И НЕПОВРЕЖДЕННОЙ ДОЛЯХ ОПЕРИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ**

П.Н. САВИЛОВ

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

Экспериментальные исследования показали, что удаление даже небольших (15-20%) объемов здоровой печени вызывает стойкое нарушение метаболизма глутамина в гепатоцитах, которое не ликвидируется на протяжении 21-х суток послеоперационного периода и проявляется преобладанием распада глутамина над его синтезом. В основе этих нарушений лежат изменения активности ключевых ферментов метаболизма глутамина: глутаминсинтетазы и глутаминазы (фосфат-зависимой). Изменения активности этих ферментов под действием операционной агрессии (частичная гепатэктомия) и их динамика в послеоперационном периоде находится в прямой зависимости от близости гепатоцитов к очагу механического повреждения.

**Ключевые слова:** печень, резекция, глутамин, глутаминсинтетаза, глутаминаза, метаболизм

**ВВЕДЕНИЕ.** Многочисленными исследованиями установлено, что глутамин не только является обратимой формой связывания аммиака в организме [1], но и выступает в качестве донора амидной группы НАД [2], участвует в образовании глутатиона [3], регуляции пластических процессов [4] и кислотно-основного состояния организма [5].

В метаболизме глутамина у млекопитающих особое место занимает печень, где одновременно протекают процессы его образования и распада (дезамидирования). При этом отмечается строгая внутридольковая компартментализация, обусловленная особенностями локализации ферментов, катализирующих эти процессы. Так, глутаминсинтетаза, катализирующая образование глутамина, обнаружена исключительно в клетках перивенулярной (центральной) зоны долики печени [6], а глутаминазы, отвечающие за его

дезамидирование находятся вблизи портальной триады (перипортально) вместе с ферментами орнитинового цикла Кребса-Хензелейта [7]. Именно в гепатоцитах перипортальной зоны долики печени осуществляется переход обратимой формы связывания аммиака (глутамин) в необратимую (мочевина) в результате включения его амидной группы в первое звено мочевино-синтетического орнитинового цикла [8].

В условиях механического повреждения печени следует ожидать нарушения метаболизма глутамин в гепатоцитах и сопряженных с ним метаболических реакций. Однако данное предположение требует экспериментальной проверки. Поэтому целью данной работы явилось изучение состояния основных биохимических реакций метаболизма глутамин в печени (образование и дезамидирование глутамин) после ее краевой резекции.

**МЕТОДИКА.** Исследования проведены на 123 белых крысах самках, массой 170-223 г. Краевую резекцию печени (КРП) осуществляли под эфирным наркозом в утренние часы по разработанной нами методике [9], которая заключалась в резекции электроножом части левой доли печени. При этом сокращалось время оперативного вмешательства, предотвращалось кровотечение из поврежденного органа и сохранялось кровоснабжение оставшейся после резекции части левой доли печени. Последнее делало возможным сравнительное изучение метаболизма как в поврежденной, так и неповрежденной долях оперированной печени. Объем удаляемой части печени составлял 15-20% от массы органа. Объектом исследования служили оставшаяся после резекции часть левой (ЛДП) и одна из неоперированных (средняя, СДП) доли печени. Животных забивали декапитацией на фоне этиминального наркоза в ранние (3-и и 7-е сутки) и поздние (14-е и 21-е сутки) сроки послеоперационного периода. Учитывая, что лапаротомия не влияет на состояния метаболизма глутамин в печени [4], контролем служили здоровые животные.

В ткани печени, замороженной в жидком азоте, определяли концентрацию аммиака, глутамин [10] и глутамат [11]. Для определения активности ферментов печень предварительно перфузировали охлажденным раствором 0,125 М КСl и гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы. Субклеточные фракции гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [12]. В митохондриальной фракции определяли активность фосфат-зависимой глутаминазы (ФЗГ) [13], в микросомальной фракции - активность глутаминсинтетазы (ГС) [14]. Результаты опытов обработаны статистически с учетом параметрического критерия  $t$  Стьюдента [15].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В ранние сроки послеоперационного периода отмечалось достоверное снижение содержания глутамин в обеих изучаемых долях печени как на 3-и, так и на 7-е сутки после КРП (рис.1). Это сопровождалось накоплением в печени аммиака (рис.1), являющегося как субстратом для образования глутамин, так и продуктом его распада [1]. Однако степень его накопления в изучаемых долях печени была различной и составила на 3-и сутки после операционного периода в ЛДП 78%, тогда как в СДП 55% (рис.1). На 7-е сутки послеоперационного периода концентрация аммиака превышала норму в ЛДП и СДП соответственно на 71% и 61% (рис.1). Со стороны глутамата, являющегося, как и аммиак, субстратом для синтеза

глутамин и продуктом его распада [1], концентрация в печени на 3-и сутки послеоперационного периода не изменялась, тогда как на 7-е сутки после КРП снижалась на 18% только в ЛДП (рис.1).

Изменения концентрации глутамин и аммиака в печени в ранние сроки после ее краевой резекции сопровождались изменениями активности ключевых ферментов метаболизма глутамин ГС и ФЗГ. Как видно из рис.1а, на 3-и сутки после КРП отмечалось увеличение активности ГС в ЛДП и СДП соответственно на 19% и 32%, тогда как активность ФЗГ возрастала соответственно на 32% и 15%. На 7-е сутки после операции активность ГС снижалась по сравнению с предыдущим сроком исследования, становилась ниже нормы в ЛДП на 35%, а в СДП на 17% (рис.1б). Вместе с тем активность ФЗГ гепатоцитов в этот период наблюдений оставалась повышенной (рис.1б).

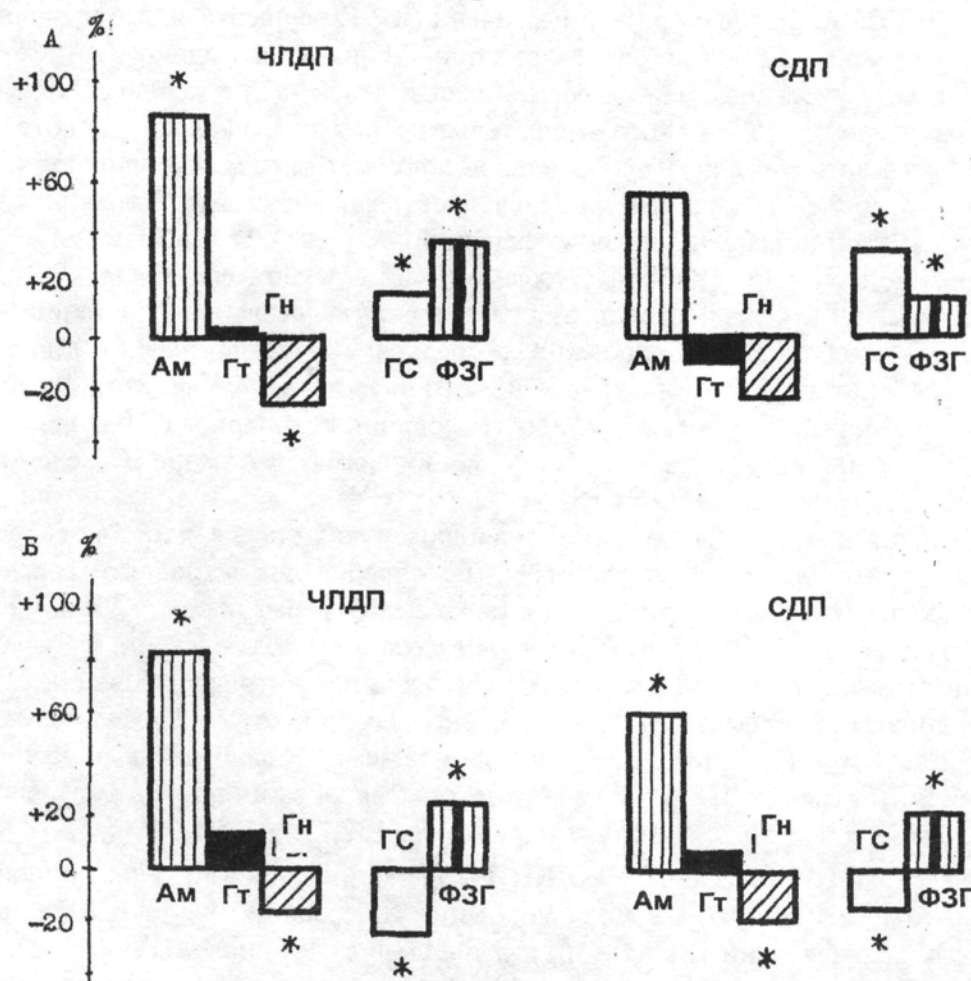


Рисунок 1.

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфат-зависимой глутаминазы (ФЗГ), содержания глутамин (ГН), глутамата (ГТ), аммиака (Ам) в печени на 3-и (а) и 7-е (б) сутки после частичной гепатэктомии. ЧЛДП - оставшаяся после резекции часть левой доли печени. СДП - средняя (неоперированная) доля печени. \* - Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.



Таким образом, в ранние (первые 7 суток) сроки после краевой резекции печени распад глутамина в печени преобладает над его образованием. Кратковременная стимуляция активности ГС не в состоянии предотвратить снижение концентрации глутамина в регенерирующей печени.

В поздние (14-е и 21-е сутки) сроки послеоперационного периода восстановления сниженной концентрации глутамина в изучаемых долях печени не происходило и она оставалась на 28-32% ниже нормы (рис.2). При этом в печени сохранялось повышенное содержание аммиака, прирост которого, (относительно контроля) на 14-е и 21-е сутки послеоперационного периода составил в ЛДП 28% и 23%, тогда как в СДП - 45% и 53% соответственно (рис.2). На 14-е сутки после КРП отмечалось накопление клетками оперированной печени глутамата, на 21-е сутки после КРП его концентрация превышала нормальные величины в ЛДП и СДП соответственно на 87% и 42% (рис.2). Рассматривая состояние активности ГС и ФЗГ в этот период, следует отметить сохранение сниженной (по сравнению с нормой) активности ГС в обеих изучаемых долях печени как на 14-е, так и на 21-е сутки послеоперационного периода (рис.2). В тоже время обращает внимание различное поведение ФЗГ в изучаемых долях печени в этот период наблюдений. В поврежденной (левой) доле печени отмечалось снижение активности ФЗГ на 14-е сутки послеоперационного периода до нормы, а на 21-е сутки исследования ее активность становилась на 22% ниже нормы (рис.2б). В неповрежденной (СДП) доле печени активность ФЗГ превышала норму на 14-е и 21-е сутки послеоперационного периода соответственно на 16% и 32%.

Таким образом, в поздние (14-е и 21-е сутки) сроки после КРП в поврежденной и неповрежденной долях печени сохраняется угнетение глутаминообразовательной функции гепатоцитов, тогда как повышенный распад метаболита имел место только неповрежденной доле органа.

Анализ полученных результатов показывает, что удаление 15-20% от массы печени здоровых животных вызывает выраженные нарушения метаболизма глутамина в гепатоцитах, которые сохраняются на протяжении 21-х суток послеоперационного периода и проявляются стойким снижением в печени содержания глутамина. Близость гепатоцитов к очагу механического повреждения не влияет на степень снижения содержания в печени глутамина, но определяет интенсивность накопления в ней глутамата и аммиака. Кажется вполне очевидным, что одной из причин этого является обнаруженное нами различие в соотношении метаболических реакций образования и распада глутамина в оперированной и неоперированной долях регенерирующей печени. Кратковременная стимуляция активности ГС на 3-и сутки после КРП (рис.1а) по срокам совпадает с периодом максимальной митотической активности гепатоцитов регенерирующей печени [16]. Это дает основание полагать увеличение синтеза фермента *de novo* во время митотического деления клеток оперированной печени. Неслучайно нормализация митотической активности гепатоцитов на 7-е сутки после резекции печени [16] соответствует в нашем опыте нормализации повышенной активности ГС (рис.1б). Концентрация фермента в клетке зависит не только от скорости его синтеза, но и скорости распада его молекул [17]. Можно полагать, что снижение митотической

активности гепатоцитов после резекции печени сопровождается активацией лизосомных гидролаз, ведущей к повышенному разрушению внутриклеточных ферментативных белков, в том числе и ГС.

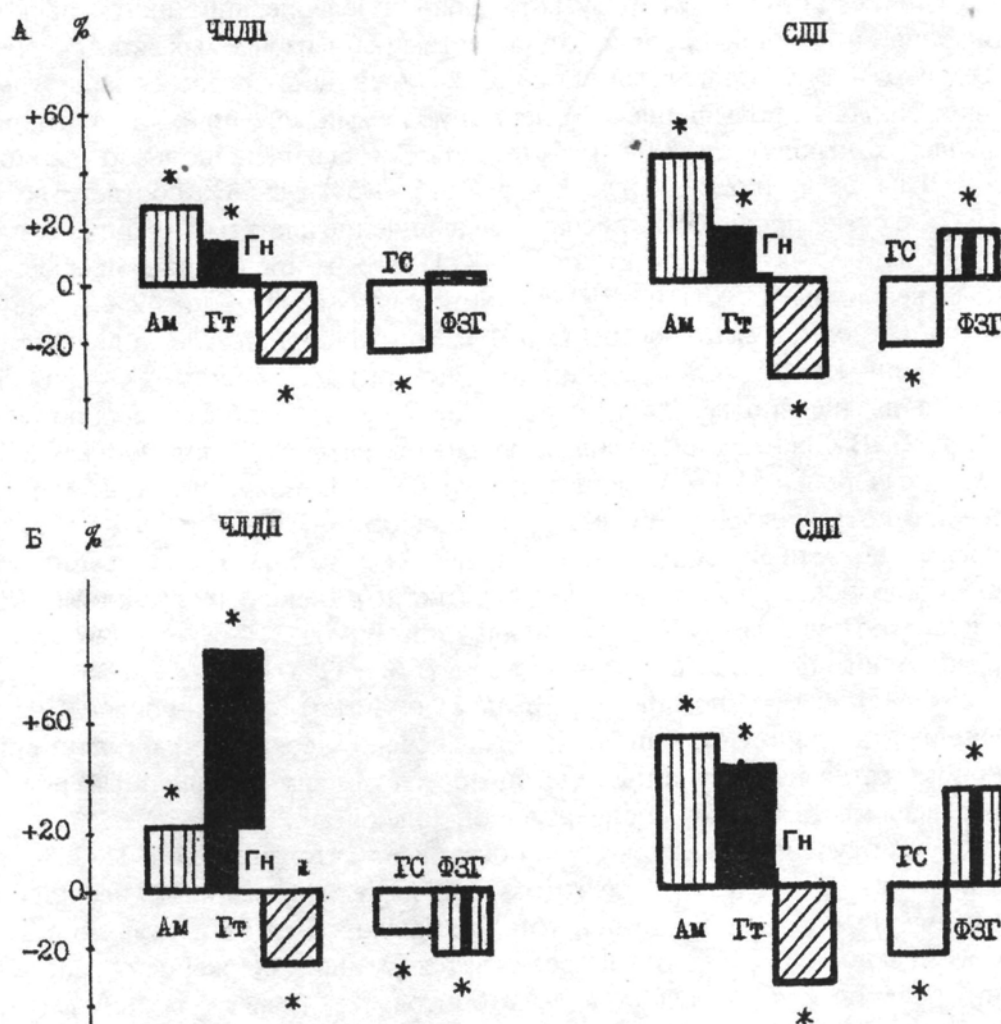


Рисунок 2.

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфат-зависимой глутаминазы (ФЗГ), содержания глутамина (Гн), глутамата (Гт), аммиака (Ам) в печени на 14-е (а) и 21-е (б) сутки после частичной гепатэктомии. ЧДП - оставшаяся после резекции часть левой доли печени. СДП - средняя (неоперированная) доля печени. \* - Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

В регенерирующей печени скорость гидролиза АТФ превышает скорость ее ресинтеза, в результате чего гепатоциты накапливают неорганический фосфат [16], являющийся стимулятором активности ФЗГ [18]. Это в определенной мере объясняет обнаруженную нами увеличение активности фермента в печени в ранние сроки после ее резекции (рис.1). Вместе с тем изменения активности ФЗГ

в ЛДП и СДП, обнаруженные в поздние сроки после операции, указывают на наличие дополнительных причин, способствующих нормализации активности фермента в поврежденной и сохранению его повышенной активности в неповрежденной доле оперированной печени. К ним следует отнести изменения в митохондриальных мембранах, возникающие при резекции печени [19] и способные влиять на активность локализованных на них ферментов, в том числе и ФЗГ, обнаруженной на внутренней поверхности митохондриальных мембран гепатоцитов [20]. Вероятно, эти изменения повышают чувствительность ФЗГ гепатоцитов поврежденной доли печени к действию аллостерических ингибиторов ее активности, например, глутамата [18], прирост концентрации которого в ЛДП на 21-е сутки исследования превышал соответствующий показатель СДП в 2 раза (рис.26).

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что:

1. Удаление 15-20% от массы здоровой печени вызывает стойкие нарушения метаболизма глутамина в гепатоцитах, в основе которых лежит преобладание распада глутамина над его образованием в клетках как поврежденной, так и неповрежденной долей печени.
2. Кратковременная стимуляция активности ГС в ранние (3 сутки) сроки послеоперационного периода не в состоянии предотвратить снижение концентрации глутамина в гепатоцитах.
3. Близость клеток к очагу механического повреждения ткани печени не влияет на степень снижения концентрации в ней глутамина, но определяет изменение активности ключевых ферментов его метаболизма (ГС и ФЗГ), а так же их динамику в послеоперационном периоде.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ленинджер А.* (1985) Основы биохимии. (Пер. с англ.), Мир, М., 571-595.
2. *Curtnoys N.P.* (1995) Ann. Rev. Nutr., **215**, 133-159.
3. *Welbourne T.C.* (1979) Can. J. Biochem, **257**(3), 233-237.
4. *Гаспарян С.А, Малюгин Э.Ф. и др.* (1973) Экспериментальная и клиническая хирургия печени. 2-й МОЛМИ, **218**(1), 39-44.
5. *Haussinger D., Sies H., Gerok W.* (1984) Verhandlung der Deutsche Gesellschaft fur innere Medizin, **290**, 1165-1167.
6. *Gebhardt R.* (1988) Scand. J. Gastroenterol, **230**(15), 8-18
7. *Mooran A.F.M., Vermeulen J.L.M., Charles R., Lamers W.* (1988) Hepathology, **29**(3), 367-372.
8. *Haussinger D.* (1983) Eur. J. Biochem, **213**, 269-275.
9. *Савилов П.Н.* (1993) Влияние гипербарической оксигенации и частичной гепатэктомии на детоксикацию аммиака в поражённой четырёххлористым углеродом печени. дисс. канд. мед. наук. Воронеж.
10. *Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И.* (1962) Вopr. мед. химии **28**, 538-544.



11. *Bernt E., Bergmeyer H.U.* (1979) *Method. der enzym. Analyse. Weinheim*, **22**, 1749-1752.
12. *Jonson D., Lardy I.* (1967) *Meth. Enzymol.*, **210**, 94-102.
13. *Beaton J.R., Ozawa G.* (1955) *J. Biol. Chem.*, **214**, 685-691.
14. *Пышкин А.В., Евстигнеева З.Г., Кретович В.А.* (1972) *Прикл. Биохим. и микробиол.*, **28**,(1), 81-90.
15. *Лакин Г.Ф.* (1973) *Биометрия. "Высшая школа"*, М.
16. *Солопаев Б.П.* (1980) *Регенерация нормальной и патологически измененной печени, Горький*, 90-99.
17. *Проссер Л.* (1977) *Сравнительная физиология животных (Пер. с англ.)*, "Мир", М.
18. *Козлов Е.А., Коваленко Н.А.* (1972) *Усп. биол. химии*, 49-79.
19. *Хейсина Е.М.* (ред.) (1969) *Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени "Наука"*, Л., 90-115.
20. *Mc Givan J.A., Bradford P.M., Verholen A.I.* (1984) *Glutamine metabolism in Mammalian Tissues*, Berlin, 122-132.

Поступила 6.10.1999

# **GLUTAMINE METABOLISM IN DAMAGED AND INTACT LOBE OF THE OPERATED LIVER.**

P.N. SAVILOV

N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy, 394622, Voronezh,  
Studencheskaya street 10; fax: (0732) 53-00-05.

The experiments have shown that even resection of relatively small (15-20%) portion of the intact liver resulted in significant changes of glutamine metabolism in hepatocytes, which were not eliminated for 21 days of postoperative period. The changes of the activity of key enzymes of glutamine metabolism, glutamine synthetase and glutaminase (phosphate-dependent), are responsible for these alterations. The changes of activity of these enzymes closely depend on the location of hepatocytes to focus of mechanical damage.

**Key words:** liver, resection, glutamine, glutamine synthetase, glutaminase, metabolism.