

УДК: 616.36-089-008:9:615.835.3-092.6

©Савилов

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ НА МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА В ПОВРЕЖДЕННОЙ И НЕПОВРЕЖДЕННОЙ ДОЛЯХ ОПЕРИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

П.Н. Савилов

Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко
394066, Воронеж, Студенческая, 10;
факс (8-0732) 53-06-39; эл.почта: p_savilov @ gambler.ru

Экспериментальные исследования показали, что применение гипербарической оксигенации (ГБО, 3 ата, 50 мин, 1 сеанс в сутки) в первые трое суток после резекции печени (15-20% от массы органа) у здоровых животных ликвидирует нарушения метаболизма глутамина, вызванные операционной агрессией. В результате происходит преобладание образования глутамина над его распадом. Это сопровождается накоплением в оперированной печени глутамина и глутамата на фоне нормализации повышенного содержания аммиака. Близость гепатоцитов к очагу механической деструкции ткани определяет не только степень прироста концентрации глутамата в условиях гипероксии, но и динамику активности глутаминсинтетазы и фосфатзависимой глутаминазы в раннем и позднем постгипероксическом периоде.

Ключевые слова: гипероксия, печень, операция, глутамин, метаболизм

ВВЕДЕНИЕ. Основными метаболическими путями связывания эндогенного аммиака в печени являются образование глутамина и синтез мочевины. Которые осуществляются в различных зонах долики печени. Образование глутамина катализируется глутаминсинтетазой и протекает в гепатоцитах, расположенных вблизи центральной вены [1]. Таким путем устраняется аммиак, поступающий в печень в свободной форме [1]. В обычных условиях через синтез мочевины происходит элиминация метаболита, доставляемого к гепатоцитам в составе "уреагенных" аминокислот, одной из которых является глутамин [1]. В клетках перипортальной зоны долики печени "внепечёночный" глутамин подвергается дезамидированию при участии глутаминаз. При этом амидная группа включается в первое звено орнитинового цикла синтеза мочевины - образование карбамоилфосфата [1]. Все ферменты орнитинового цикла, а также глутаминазы [1], локализованы в клетках перипортальной зоны долики печени [2].

Предыдущими исследованиями установлено, что резекция 15-20% от массы печени у здоровых животных вызывает угнетение образования глутамина и активацию его дезамидирования в гепатоцитах. В результате происходило снижение концентрации метаболита в печени на фоне накопления в ней аммиака [3].

Одним из эффективных способов коррекции нарушений метаболизма глутамина в головном мозге и печени при острой кровопотере является гипербарическая оксигенация (ГБО) [4,5]. Однако влияние гипербарического кислорода на метаболизм глутамина в оперированной печени в настоящее время не изучено.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния ГБО на метаболизм глутамина в оперированной печени.

ГИПЕРБАРИЧЕСКАЯ ОКСИГЕНАЦИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА

МЕТОДИКА. Исследования проведены на 250 белых крысах-самках массой 170-220 г. Краевую резекцию печени (КРП) осуществляли под эфирным наркозом в утренние часы, удаляя электроножом часть левой доли печени, что составляло 15-20% от массы органа. Сохранение кровообращения в оставшейся после резекции части левой доли печени делало возможным сравнительное изучение метаболизма как в поврежденной, так и неповрежденной долях органа. ГБО проводили медицинским кислородом в режиме 3 ата - 50 мин, 1 сеанс в сутки в первые трое суток послеоперационного периода. Первый сеанс начинали через 4-8, второй и третий соответственно через 24 и 48 часов после КРП. Объектом исследования служили оперированная (левая, ЛДП) и одна из неоперированных (средняя, СДП) доли печени. Животные были разделены на 9 групп: 1 группа - здоровые животные, 2,4,6,8 группы - животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после КРП. Эти группы служили контролем для выявления "чистого" эффекта ГБО. 3,5,7 и 9 группы - оксигенированные животные с КРП, исследованные соответственно на 1-е, 4-е, 11-е и 18-е сутки постгипероксического (3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки послеоперационного) периода.

В ткани печени, замороженной в жидком азоте, определяли концентрацию аммиака, глутамина [6] и глутамата [7]. Для определения активности ферментов печень предварительно перфузировали охлажденным раствором КСI (0,125 М) и гомогенизировали в растворе сахарозы (0,25М) в соотношении 1:9 с добавлением ЭДТА (1 мМ). Субклеточные фракции гепатоцитов выделяли дифференциальным центрифугированием при $t = +2- (+5)^\circ\text{C}$ по методике [8]. Для этого первоначально гомогенат печени центрифугировали 10 мин при 1000 g. После этого полученную надосадочную жидкость (5 мл) подвергали повторному центрифугированию в течение 10 мин при 16000g для получения осадка содержащего митохондриальную фракцию гепатоцитов. Надосадочную жидкость (5 мл), полученную после второго центрифугирования, использовали для выделения микросомальной фракции, подвергая её центрифугированию в течение 120 мин при 45000 g. Осадок, содержащий митохондриальную фракцию гепатоцитов, очищали от примесей двукратным ресуспензированием (в 5 мл 0,25 М раствора сахарозы, pH =7,4) и центрифугированием при 22000 g в течение 10 мин.

В митохондриальной фракции гепатоцитов определяли активность фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) фотометрически по отщепившемуся аммиаку [9]. Инкубационная смесь (объемом 2,0 мл) содержала 50 мМ трис-НСI буфер, pH 8,05, 100 мМ K_2HPO_4 , pH 8,05, 100 мкг белка; старт реакции осуществляли 2,05 мМ глутамином. После инкубации в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 60% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В депротенинизованном осадке определяли содержание аммиака изотермическим микродиффузионным методом [6].

В микросомальной фракции определяли активность глутаминсинтетазы (ГС) по отщепившемуся ортофосфату [10]. Инкубационная смесь (объемом 1,6 мл) содержала 133 мМ трис-НСI буфер, pH 7,2, 44 мМ NH_4Cl , 44 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ цистеин, 6,25 мМ АТФ, 100 мкг белка; старт реакции осуществляли 110 мМ глутаматом. Через 20 мин инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением в 0,1 мл 60% раствора ТХУ, затем добавляли 1% раствор сернокислого железа в 0,3 н растворе серной кислоты. В контрольном опыте добавляли глутамат. Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляли 6,6% раствор молибденовокислого аммония в 7,5 н серной кислоте. После чего измеряли оптическую плотность раствора при 700 нм. Определение белка в субклеточных фракция гепатоцитов проводили по методу Лоури [11]. Содержание метаболитов выражали в ммоль/кг влажной ткани, активность ферментов в нмоль/мин на 1 мг белка для ГС и нмоль/сек на 1 мг белка для ФЗГ. Результаты обработаны статистически с учетом параметрического критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В первые сутки постгипероксического периода обнаружено увеличение концентрации глутамина в оставшейся после

резекции части ЛДП и СДП соответственно на 92% и 76% (рис. 1а), что превышало нормальные величины (табл.). При этом активность ГС не отличалась от контроля, свидетельствуя о рефрактерности фермента к действию гипероксии. Однако, если по сравнению с нормой в части ЛДП она не изменялась, то в СДП была увеличена на 31% (табл.).

Таблица. Содержание аммиака, глутамата, глутамина, активность ГС и ФЗГ в оперированной печени после применения гипербарической оксигенации

Показатели		Норма	Сутки постгипероксического/послеоперационного периода			
			1/3	4/7	11/14	18/21
Аммиак	ЛДП	$0,94 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,05$	$1,99 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,05^*$	$0,95 \pm 0,09$
	СДП	$0,94 \pm 0,04$ (15)	$0,85 \pm 0,08$ (15)	$1,04 \pm 0,07$ (15)	$0,74 \pm 0,06^*$ (15)	$1,16 \pm 0,11^*$ (15)
Глутамат	ЛДП	$1,83 \pm 0,08$	$2,24 \pm 0,19^*$	$2,13 \pm 0,15$	$3,12 \pm 0,2^*$	$2,35 \pm 0,13$
	СДП	$2,0 \pm 0,09$ (15)	$2,8 \pm 0,28^*$ (15)	$2,24 \pm 0,14$ (15)	$2,95 \pm 0,18^*$ (15)	$2,28 \pm 0,16$ (15)
Глутамин	ЛДП	$3,36 \pm 0,16$	$4,75 \pm 0,21^*$	$4,1 \pm 0,2^*$	$4,18 \pm 0,21^*$	$4,17 \pm 0,2^*$
	СДП	$3,56 \pm 0,16$ (15)	$4,68 \pm 0,23^*$ (15)	$3,8 \pm 0,2$ (15)	$4,56 \pm 0,17^*$ (15)	$4,0 \pm 0,12^*$ (15)
ГС	ЛДП	$60,4 \pm 4,3$	$67,4 \pm 4,3$	$79,6 \pm 6,8^*$	$101,1 \pm 9,4^*$	$101,9 \pm 9,6^*$
	СДП	$67,5 \pm 5,3$ (10)	$88,0 \pm 9,2^*$ (10)	$76,1 \pm 5,9$ (10)	$95,3 \pm 12,5^*$ (10)	$119,1 \pm 10,1^*$ (10)
ФЗГ	ЛДП	$1,83 \pm 0,1$	$3,35 \pm 0,26^*$	$2,97 \pm 0,17^*$	$1,74 \pm 0,22$	$2,04 \pm 0,3$
	СДП	$1,58 \pm 0,08$ (10)	$2,57 \pm 0,2^*$ (10)	$2,15 \pm 0,24^*$ (10)	$1,97 \pm 0,22$ (10)	$2,12 \pm 0,2^*$ (10)

Примечание. ЛДП - левая доля печени, СДП - средняя доля печени, ГС- глутаминсинтетазы, ФЗГ - фосфатзависимая глутаминаза, * - достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с нормой. В скобках число животных. Содержание метаболитов выражали в ммоль/кг влажной ткани, активность ферментов в нмоль/мин на 1 мг белка (ГС) и нмоль/сек на 1 мг белка (ФЗГ).

Как видно из рисунка 1а, в первые сутки постгипероксического периода активность ФЗГ превышала контроль в ЛДП на 39%, в СДП на 46%, в результате чего становилась выше нормы (табл.). Полученные данные указывают на стимуляцию в условиях гипероксии дезамидирования глутамина в оперированной печени, которая сопровождалась достоверным снижением концентрации аммиака в обеих изучаемых долях органа (рис. 1а). Увеличение концентрации глутамата при гипероксии составило в ЛДП - 22%, в СДП - 57% (рис. 1а). В результате она превышала нормальные величины, а содержание аммиака оставалась в пределах нормы (табл.).

На 4-е сутки после окончания ГБО концентрация глутамина в исследуемых долях оперированной печени превышала соответствующий контроль. При этом отмечалось увеличение активности ГС в части ЛДП на 78%, в СДП только на 36% (рис. 1б). По сравнению с нормой достоверное увеличение активности фермента выявлено только в части ЛДП (табл. 16). Активность ФЗГ в СДП не отличалась от контроля, тогда как в оставшейся после резекции части ЛДП она была увеличена на 29% (рис. 1б). Относительно нормы она была увеличена в обеих изучаемых долях органа (табл.). Как показали наши исследования, на 4-е сутки после окончания ГБО ингибирующее влияние гипероксии на содержание аммиака в клетках оперированной печени сохранялось (рис. 1б), благодаря чему оно оставалось в пределах нормы (табл.). Вместе с тем в этот период отмечена нормализация повышенного содержания глутамата в гепатоцитах (табл.) Это указывает на возможность повышенного потребления метаболита клетками печени в условиях стимуляции активности ГС.

ГИПЕРБАРИЧЕСКАЯ ОКСИГЕНАЦИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА

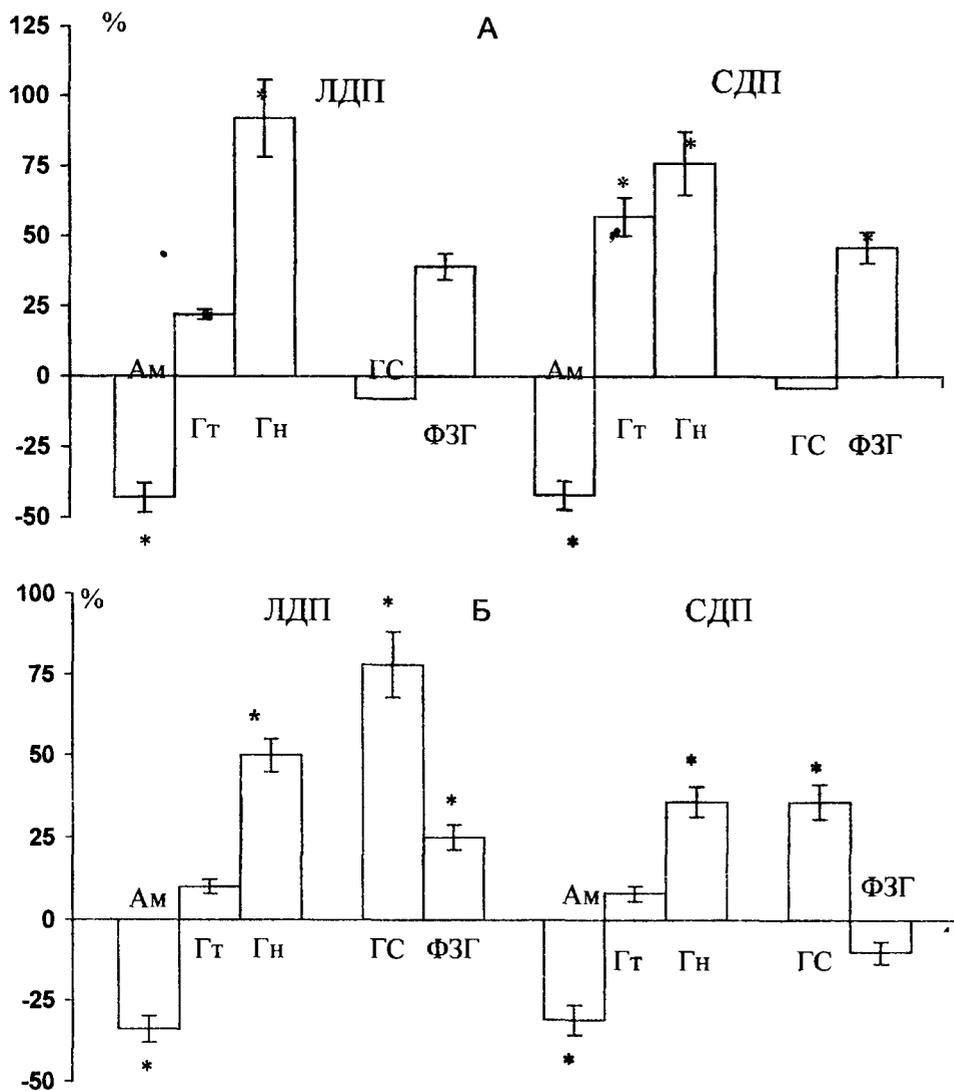


Рисунок 1

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфатзависимой глутамины (ФЗГ), содержания глутамина (Гл), глутамата (Гт) и аммиака (Ам) в оперированной печени оксигенированных животных на 1-е (А) и 4-е (Б) сутки постгипероксического периода. Примечание. ЛДП - левая доля печени, СДП - правая доля печени. По оси абсцисс - изменения в % по отношению к соответствующему контролю: неоксигенированным животным, исследованным на 3-и сутки после резекции печени (А), неоксигенированным животным, исследованным на 7-е сутки после резекции печени (Б). * - достоверность различий ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему контролю. Объяснение в тексте.

Таким образом, накопление глутамина в оперированной печени при гипероксии происходит на фоне рефрактерности ГС к действию гипербарического кислорода и сопровождается усилением его дезамидирования в результате активации ФЗГ. Прекращение ГБО не влияет на содержание глутамина в оперированной печени, но вызывает увеличение содержания ГС, наиболее выраженное в поврежденной доле органа. Одновременно происходит уменьшение активности ФЗГ, особенно в интактной (средней) доле оперированной печени. При этом содержание аммиака в оперированной печени оставалась в пределах нормы.

По мере развития постгипероксического состояния (11-е и 18-е сутки постгипероксического периода) стимулирующее влияние гипероксии на содержание глутамина в оперированной печени сохранялось (рис.2), благодаря чему оно достоверно превышало норму на протяжении всего периода наблюдений (табл.). Одной из причин этого явилось повышенное образование метаболита в повреждённой и, особенно, в неповреждённой доле оперированного органа. На это указывает прирост на 11-е сутки после окончания ГБО активности ГС, который составил в ЛДП и СДП соответственно 95% и 85% (рис. 2а). На 18-е сутки постгипероксического периода увеличение активности ГС составило 81% в ЛДП, 124% в СДП (рис. 2б). При этом активность фермента в указанные сроки наблюдения превышала и нормальные величины (табл.).

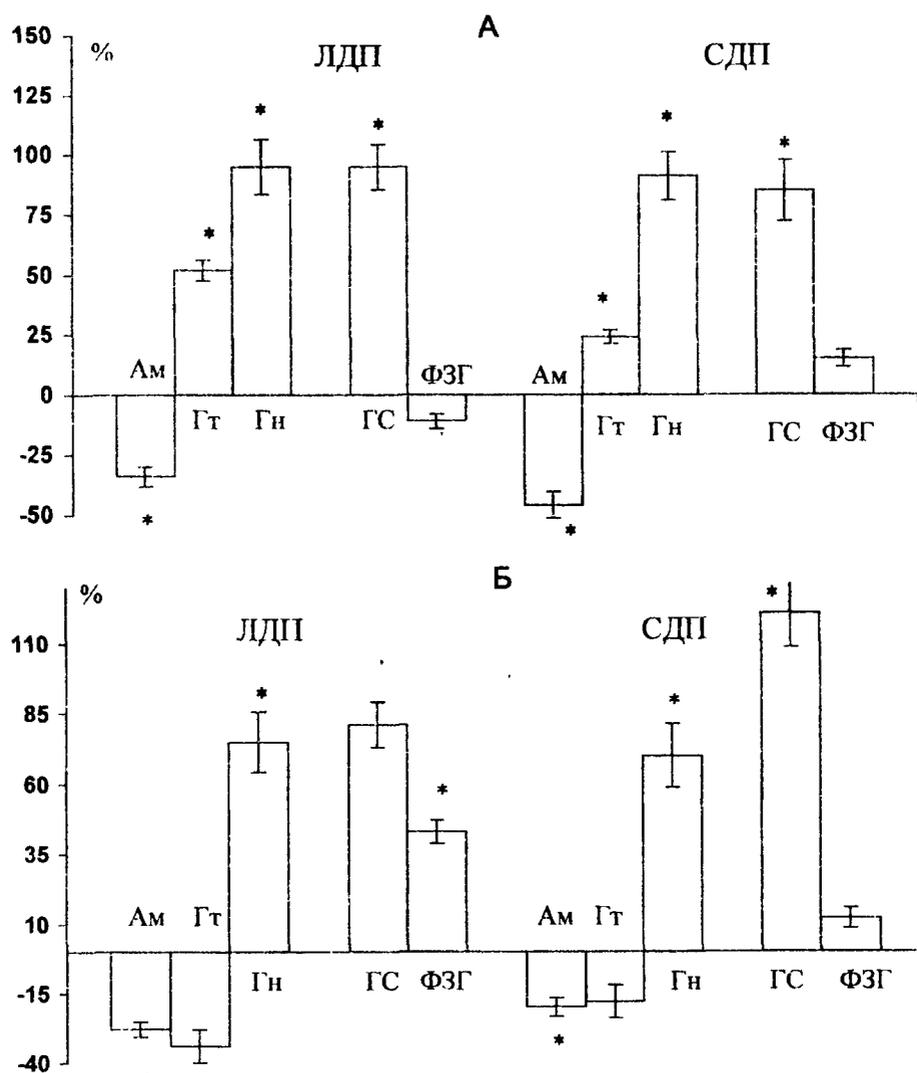


Рисунок 2

Изменение активности глутаминсинтетазы (ГС), фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), содержания глутамина (Гн), глутамата (Гт) и аммиака (Ам) в оперированной печени оксигенированных животных на 11-е (А) и 18-е (Б) сутки постгипероксического периода. Примечание. ЛДП - левая доля печени, СДП - правая доля печени. По оси абсцисс - изменения в % по отношению к соответствующему контролю: неоксигенированным животным, исследованным на 14-е сутки после резекции печени (А), неоксигенированным животным, исследованным на 21-е сутки после резекции печени (Б). * - достоверность различий ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему контролю. Объяснение в тексте.

ГИПЕРБАРИЧЕСКАЯ ОКСИГЕНАЦИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА

Как видно из рисунка 2а, на 11-е сутки постгипероксического периода активность ФЗГ гепатоцитов изучаемых долей печени достоверно не отличалась от контроля. На 18-е сутки после окончания ГБО происходило повышение (на 43%) активности ФЗГ в части ЛДП по сравнению с контролем (рис.2б). благодаря чему она оставалась достоверно выше нормы, как и в неповрежденной доле печени (табл.). Следовательно, на 18-е сутки постгипероксического периода включаются механизмы, направленные на поддержание повышенного дезамидирования глутамина в гепатоцитах, расположенных вблизи раневой поверхности печени.

Содержание глутамата в печени снижалось на 18-е сутки после окончания ГБО (рис. 2б), однако при этом оно находилось в пределах нормы, как и содержание аммиака (табл.).

Таким образом, в поздние (11-е и 18-е сутки) сроки постгипероксического периода накопление глутамина в оперированной печени происходит на фоне повышения активности ГС, особенно в неповрежденной доле органа и регуляции активности ФЗГ. Последнее достигается повышением глутаминазной активности в поврежденной и ее ингибированием в неповрежденной доле печени. В целом отмечается преобладание образования глутамина над его дезамидированием, благодаря чему сохраняется в пределах нормы уровень эндотоксина аммиака в печени.

Концентрация глутамина в клетке определяется соотношением скоростей его образования и дезамидирования [1,3], а также поступлением метаболита в клетку и его удалением из неё [12]. Анализ фермент-субстратных отношений показал, что накопление глутамина в оперированной печени при ГБО достигается двумя путями ГС-независимым и ГС-зависимым. Первый преимущественно активировался в условиях гипероксии, второй - в постгипероксическом периоде. Поскольку гипербарический кислород способен повышать содержание глутамина в артериальной крови анемизированного организма [4], то нельзя исключить его влияния на накопление метаболита в крови животных с КРП. Глутамин, в свою очередь, является стимулятором активности ФЗГ [13]. Поэтому увеличение его концентрации в печени при гипероксии следует рассматривать как одну из причин обнаруженного нами стимулирующего влияния гипербарического кислорода на активность данного энзима.

В отличие от неоксигенированных животных с КРП [3], увеличение дезамидирования глутамина в оперированной печени при ГБО сопровождалось снижением концентрации в ней аммиака. Скорость дезамидирования глутамина лимитирует образование карбамоилфосфата, продукта первого звена орнитинового цикла [1]. Поэтому нельзя исключить стимуляцию гипербарическим кислородом активности митохондриальной карбамоилфосфатсинтетазы, катализирующей первую реакцию синтеза мочевины [12]. В результате при гипероксии ускоряется процесс включения амидной группы глутамина в орнитиновый цикл и тем самым предотвращается накопление аммиака в печени, характерное для неоксигенированных животных с КРП. Неслучайно, ГБО вызывало увеличение содержания мочевины в оставшейся после резекции части печени [14].

Одним из проявлений адаптации клетки к гипероксии является рефрактерность (нечувствительность) её функционально-метаболических систем к действию гипербарического кислорода [15]. В наших исследованиях рефрактерной к действию ГБО оказалась ГС гепатоцитов оперированной печени. Вероятно, в процессе интенсивной репаративной регенерации, которая наблюдается в первые трое суток после частичной гепатэктомии [16], создаются условия, препятствующие влиянию гипероксии как на сам фермент, так и метаболические реакции, детерминирующие изменение его концентрации в клетке. В свою очередь увеличение активности ГС в постгипероксическом периоде следует рассматривать как результат отсроченного стимулирующего влияния гипербарического кислорода на концентрацию данного энзима в клетке. В настоящее время установлена зависимость активности ГС от концентрации фермента в клетке [17]. При этом

неодинаковая интенсивность репаративных процессов в повреждённой и неповреждённой долях печени [18] будет оказывать влияние на степень увеличения активности ГС их клеток в постгипероксическом периоде.

Предыдущими исследованиями установлено, что в процессе адаптации организма как к гипероксии [19], так и резекции печени [20], происходят структурные изменения митохондриальных мембран гепатоцитов. Это должно отразиться и на активности ФЗГ, локализованной на ее внутренней поверхности [13]. В свою очередь, структурные изменения субклеточных органелл, как и конформационные изменения белков, в значительной мере определяют сохранение эффекта ГБО в постгипероксическом периоде [21]. С этих позиций можно объяснить и обнаруженное нами сохранение повышенной активности ФЗГ в гепатоцитах оперированной печени к 18-м суткам постгипероксического периода. При этом сохранение стимулирующего влияния ГБО на активность ФЗГ проявлялось в гепатоцитах той доли печени, где отмечалось снижение стимулирующего влияния КРП на активность энзима по мере развития послеоперационного периода.

ВЫВОДЫ:

1. В условиях гипероксии накопление глутамина в клетках оперированной печени не связано с изменением активности ГС, но является одной из причин увеличения активности ФЗГ, которое свидетельствует о стимуляции дезамидирования глутамина в гепатоцитах.

2. Повышенное дезамидирование глутамина в условиях гипероксии сопровождается снижением концентрации в печени аммиака. Это указывает на вовлечение последнего в орнитиновый цикл синтеза мочевины, важного компонента антиоксидантной системы [22].

3. В постгипероксическом периоде повышенное образование глутамина в реакции, катализируемой ГС, сопровождается относительным снижением его дезамидирования. Благодаря этому поддерживается высокая концентрация глутамина в гепатоцитах и предотвращается накопление в них аммиака.

4. Близость гепатоцитов к очагу механической деструкции ткани определяет не только степень прироста концентрации глутамина при гипероксии, но и степень изменения активности ГС и ФЗГ в раннем и позднем постгипероксическом периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haussinger D., Gerok W. (1984) Infusionstherapie, **11**(6), 246-253
2. Moran A.F.M., Vermeulen J.L.M., Charles R., Lamers W. (1988) Hepatology, **29**, 367-372.
3. Савилов П.Н. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 370-377.
4. Яковлев В.Н. (1983) *Метаболические реакции адаптации головного мозга при гипербарической кислородной терапии острой кровопотери*. Дисс. докт. мед. наук, Воронеж
5. Малиютин В.Э. (1994) *Бюлл. гипербарич. биол. и мед.*, **1**(1-4), 26-30
6. Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И. (1962) *Вопр. мед. химии*, **8** (5), 538-544.
7. Bernt E., Bergmeyer H.U. (1979) *Methoden der enzym. Analus*. Weimcheim, **2**, 1749-1752
8. Jonson D., Lardy H. (1967) *Meth. Enzymol.* **10**, 94-102
9. Beaton J.R., Ozawa C. (1955) *J. Biol. Chem.*, **214**, 685-691

ГИПЕРБАРИЧЕСКАЯ ОКСИГЕНАЦИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГЛУТАМИНА

10. *Пушкин А.В., Евстигнеева З.Г., Кретович В.А.* (1972) Прикл. биохим. и микробиол. **28**, 81-90.
11. *Hartree E.F.* (1972) Anal. Biochem., **48**, 422-427
12. *Ленинджер А.* (1985) Основы биохимии (Пер. с англ.) "Мир", М., с.571-595.
13. *Mc Givan J.A., Bradford P.M., Verholen A.I.* (1984) Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues, Berlin, pp. 122-132.
14. *Савилов П.Н.* (1987) В кн. Формы и механизмы процессов адаптации в норме и патологии, Воронеж. с. 72-76.
15. *Савилов П.Н.* (1999) Бюлл. гипербарич. биол. и мед. 7(1-4), 117
16. *Солопаев Б.П.* (1980) Регенерация нормальной и патологически изменённой печени. Горький, с.90-99.
17. *Феллиг Ф.* (ред) (1985) Эндокринология и метаболизм (Пер. с англ) "Медицина", М.
18. *Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М.* (1969) Регенерация печени у млекопитающих "Медицина", М.
19. *Ефуни С.Н.* (ред.) (1985) Руководство по гипербарической оксигенации, "Медицина", М.
20. *Хейсин Е.М.* (ред.) (1969) Регенерация нормальной и патологически изменённой печени "Наука", Л., с. 90-115.
21. *Савилов П.Н.* (1999) Бюлл. гипербарич. биол. и мед. 7(1-4), 121-122.
22. *Кричевская А.А., Лукаш А.И., Брновицкая З.Г.* (1980) Биохимические механизмы кислородной интоксикации, Ростов.

Поступила 28.09.2002.

INFLUENCE OF HYPERBARIC OXYGENATION ON METABOLISM OF GLUTAMINE IN DAMAGED AND INTACT LOBES OF THE OPERATED LIVER

P.N.Savilov

Burdenko Voronezh State Medical Academy,
Voronezh, 395066 Russia
fax (8-0732) 53-00-05; e-mail: p_savilov @ rambler.ru

Employment of hyperbaric oxigenation (HBO, 3 bar, 50 min, 1 session per day) during the first three days after resection of liver (15-20% of mass) normalized glutamine metabolism impairments caused by operational trauma.

Key words: hyperoxia, liver, glutamine, metabolism