



Биолог. журн. Армении, 2 (67), 2015

АЗОТИСТЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В СЕЛЕЗЁНКЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ГЕПАТИТЕ

П.Н. САВИЛОВ

ТОГБУЗ “Тамбовская ЦРБ”, с. П.Пригородное, Россия
Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж, Россия
p_savilov@rambler.ru

Исследовали влияние хронического тетрахлометанового гепатита на азотистый метаболизм в селезёнке. Установили, что в процессе развития хронического CCl₄-гепатита в селезёнке происходит патологическое накопление аммиака на фоне развития артериальной гипераммониемии. При этом спленоциты не способны через образование глутамина предотвратить накопление в них аммиака, поступающего из артериальной крови и образующегося в результате активации в них внутриклеточного аммиогенеза. В процессе хронического отравления организма CCl₄ селезёнка приобретает способность к “активному” поглощению свободной мочевины из артериальной крови, с дальнейшим переводом её в связанную форму, а после прекращения токсического влияния на организм повышать образование мочевины селезёночными макрофагами, которое не предотвращает накопления селезёночной аммиака.

Селезёнка – аммиак – глутамин – мочевина – гепатит

Յետազոտվել է քրոնիկ տետրաքլորմեթան հեպատիտի ազդեցությունը առնետների փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության վրա: Յետազոտություններով պարզվել է, որ փայծաղում քրոնիկ CCl₄-հեպատիտի զարգացման ընթացքում տեղի է ունենում ամոնիակի պաթոլոգիկ կուտակում՝ զարկերակային հիպերամոնեմիայի զարգացման ֆոնի վրա: Ընդ որում, սպլենոցիտները ընդունակ չեն կանխել իրենց մեջ՝ գլուտամինի ձևավորման միջոցով ամոնիակի կուտակումը, որը թափանցում է զարկերակային արյունից և ձևավորվում իրենց մեջ ներթափանցող ակտիվացման արդյունքում: CCl₄-ով օրգանիզմի քրոնիկ թունավորման ժամանակ, փայծաղը ձեռք է բերում զարկերակային արյունից ազատ միզանյութի «ակտիվ» կլանման ունակություն՝ հետագայում այն վերափոխելու կապված ձևի, իսկ օրգանիզմի վրա թունավոր ազդեցության ավարտից հետո՝ ունակություն ձևավորելու միզանյութ փայծաղի մակրոֆագերի միջոցով, ինչը չի խոչընդոտում ամոնիակի կուտակումը փայծաղի միջոցով:

Փայծաղ – ամոնիակ – գլուտամին – միզանյութ – հեպատիտ

The effect of chronic tetrahlometanic hepatitis on nitrogen metabolism in the rat spleen has been investigated. Studies have found that in the process of developing chronic CCl₄-hepatitis in the spleen the abnormal accumulation of ammonia in the background of arterial hyperammonemia occurs. Thus, splenocytes are not capable to prevent the accumulation of ammonia via formation of glutamine which penetrates through the erterial blood and leads to activation of intracellular ammoniogeneza therein. In the course of chronic poisoning organism by CCl₄ the spleen acquires the ability to "active" free urea uptake of arterial blood, with the further transfer it into a coherent form, and after the termination of the toxic effects on the body and increase the formation of urea splenic macrophages, which does not prevent the accumulation of ammonia spleen.

Spleen – ammonia – glutamine – urea – hepatitis

В настоящее время установлено, что одним из органов, принимающих активное участие в хронизации воспалительного процесса в печени, является селезёнка [26]. В частности установлена её способность продуцировать аутоантитела к печёночным антигенам в ответ на воздействие тетрахлорметана (CCl₄) [27]. При этом главной мишенью селезёночных антител при хроническом CCl₄-гепатите становятся митохондрии гепатоцитов [24]. Неслучайно спленэктомия при CCl₄-поражении abortирует образование аутоантител к клеткам печени [26]. Вместе с тем при хроническом CCl₄-гепатите спленоциты начинают выделять факторы, стимулирующие синтез ДНК в гепатоцитах, а также в клетках ретикулоэндотелиальной системы, находящихся в печени [15], принимая участие в регенерации поражённого органа [13]. Следует отметить, что 90 % клеток печени на высоте репаративной активности включают в свой хромосомный набор хромосому T₆ спленоцитов донора [19]. Помимо участия в аутоиммунных процессах, селезёночные макрофаги в условиях хронического диффузного поражения печени берут на себя поглотительную функцию купферовских клеток, которая нарушается при данной патологии [23]. Но при этом увеличивается поступление из селезёнки в кровь свободного железа [5], которое является катализатором свободно-радикальных процессов [4]. Между тем изменение специализированных функций клетки невозможно без определённых перестроек её внутриклеточного метаболизма, изучение которого даст ключ к пониманию причин, лежащих в основе нарушения или быстрого истощения её специфической функции в условиях патологии. Не является исключением азотистый метаболизм спленоцитов как активный участник внепечёночных реакций компенсации нарушения аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов, что обнаружено после резекции здоровой печени [11].

Целью настоящей работы явилось изучение азотистого метаболизма в селезёнке при хроническом CCl₄-гепатите.

Материал и методика. Опыты проведены на 57 беспородных половозрелых белых крысах (самках) массой 180-220 г. Хронический гепатит воспроизводили путём подкожного введения 50 %-ного раствора CCl₄ на оливковом масле (0,1 мл/100 г массы) через сутки с двумя двухнедельными перерывами (между 6-7 и 13-14 инъекциями) [13]. На 65-е сут моделирования CCl₄-гепатита сразу после последней инъекции токсина под эфирным наркозом делали лапаротомию для оценки состояния печени. Животные были разделены на 5 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма), 2 серия – животные, исследованные на 65-е сут введения CCl₄ (конец затравки), 3, 4, 5 серии – животные с хроническим CCl₄-гепатитом, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии и отмены CCl₄. Забой животных проводился на фоне этиминального наркоза (40 мг/кг массы). Для определения азотистых метаболитов ткань селезёнки замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10 %-ного гомогената в 60 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Гомогенат экстрагировали на холоде в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Полученный супернатант использовали для определения аммиака, глутамина и мочевины. Артериальную кровь (АК) для исследования брали предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами из аорты. Объектом исследования служила депротеинизированная плазма крови. Содержание аммиака в ткани селезёнки определяли микродиффузионным методом [14], в крови – фенилгипохлоридным методом [22]. Содержание глутамина в почках и крови определяли методом кислотного гидролиза [20], содержание мочевины в селезёнке и крови – диацетилмоноксимовым методом [25]. Содержание метаболитов в селезёнке выражали в ммоль/кг влажной ткани, в крови – в ммоль/л. Результаты обработаны статистически с учётом параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Длительное прерывистое действие на организм малых доз CCl₄ вызывало увеличение концентрации аммиака в АК. При этом арте-

риальная гипераммониемия сохранялась к 14-м сут после отмены токсина (табл.1). Одной из причин её развития является формирование при данной патологии портальной гипертензии [2, 19], что приводит к открытию портокавальных анастомозов и сбросу богатой аммиаком крови воротной вены в центральный кровоток, минуя печень [8]. Другой причиной является нарушение при хроническом CCl_4 -гепатите основных путей обезвреживания аммиака (образование глутамина и синтез мочевины) в самой печени [9, 10].

Таблица 1. Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) при хроническом CCl_4 -гепатите, $M \pm m$

Метаболиты	Норма, n=15	65-сут введения CCl_4 , конец затравки, n=10	Сутки после отмены CCl_4 и лапаротомии		
			3 n=12	7 n=10	14 n=10
Селезёнка					
Аммиак	1,67 ± 0,12	2,91±0,15*	2,01±0,2 [▲]	2,98±0,25*	2,78±0,29*
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,99±0,23	1,67 ± 0,14*	1,83±0,15	2,33±0,23
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,96±0,25	5,19±0,37* [▲]	2,95 ± 0,08 [▲]	5,93±0,51* [▲]
Артериальная кровь					
Аммиак	0,098±0,006	0,186±0,008*	0,166±0,01*	0,145±0,011*	0,128±0,007* [▲]
Глутамин	0,710±0,021	0,585±0,023*	0,660±0,021	0,810±0,02* [▲]	0,785±0,044 [▲]
Мочевина	3,4 ± 0,12	7,11±0,36*	6,17±0,31*	4,17±0,18* [▲]	3,97±0,18* [▲]

* ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с нормой; [▲] ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с концом затравки. n- число животных по сериям опытов

Несмотря на то что хронический CCl_4 -гепатит вызывает стойкое нарушение глутаминообразовательной функции гепатоцитов [10], концентрация глутамина в АК снижалась (на 18 %) только в конце затравки (табл.1). Между тем на 3-и и 14-е сут после отмены CCl_4 она находилась в пределах нормы, а на 7-е сут даже превышала её на 13% (табл.1). Это позволяет говорить об активации внепечёночных механизмов образования глутамина, например, в результате образования глутамина нефроцитами с его дальнейшей инкрецией в кровоток [6]. В свою очередь, увеличение реабсорбции мочевины в почках, выявленное при хроническом CCl_4 -гепатите [6], следует рассматривать как одну из причин увеличения её содержания в АК (табл.1), несмотря на выявленное при данной патологии [9, 10] нарушение мочевиносинтетической функции гепатоцитов.

Сопоставление прироста концентраций аммиака в селезёнке и АК при хроническом CCl_4 -гепатите показало, что в конце затравки концентрация аммиака в АК превышала норму на 90%, тогда как в селезёнке на 74% (табл.1). Если учесть, что диффузия аммиака через биологические мембраны происходит по градиенту концентрации [3], а проницаемость гистогематического барьера во всех органах при CCl_4 -гепатите увеличивается [7], то можно говорить о нейтрализации части “артериального” аммиака спленоцитами. На 3-и сут после отмены CCl_4 эта реакция усиливалась, что приводило к нормализации концентрации аммиака в селезёнке на фоне артериальной гипераммониемии (табл.1). Однако на 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 концентрация аммиака в селезёнке вновь увеличивалась, становясь соответственно на 78 % и 66 % выше нормы, тогда как в АК прирост содержания аммиака составлял 48 % и 31 % соответственно (табл.1). Такое несоответствие указывает на активацию в спленоцитах к 7-м сут после отмены CCl_4 внутриклеточного аммионогенеза, которая сохраняется к 14-м сут восстановительного периода. Причиной этого, возможно, обнаруженное при хроническом CCl_4 -гепатите [23] усиление поглощения и переработки селезёночными макрофагами патологических иммунных комплексов в ответ на торможение этого процесса в купферовских клетках печени [23].

Поскольку конечным этапом расщепления белков в клетке, как известно [3], является дезаминирование входящих в их состав аминокислот, то и повышенное дезаминирование будет детерминировать накопление аммиака спленоцитами на 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 .

Одной из универсальных реакций нейтрализации аммиака в клетке является образование глутамина. Как видно из табл.1, формирование артериальной гипоглутаминемии на 65-е сут введения CCl_4 не сопровождалось изменением концентрации глутамин в селезёнке, которая оставалась в пределах нормы. Это позволяет говорить об увеличении образования глутамин в спленоцитах, что можно рассматривать как одну из причин нормализации содержания аммиака в селезёнке на 3-и сут после отмены токсина. При этом снижение (на 23%) в этот период концентрации глутамин в спленоцитах, происходящее на фоне нормализации его содержания в АК, позволяет говорить о повышенном поступлении “селезёночного” глутамин в портальный кровоток (табл.1). В свою очередь отрицательная корреляция ($r = -0,83$, $p < 0,05$) между содержанием аммиака и глутамин в селезёнке, выявленная на 7-е сут после отмены CCl_4 , происходящая на фоне восстановления содержания в ней глутамин и накопления аммиака, свидетельствует о торможении образования глутамин спленоцитами к указанному сроку.

В отличие от глутамин, мочевины не расщепляется клетками соматических органов, но, как и аммиак [1], легко диффундирует через биологические мембраны по градиенту концентрации. Как показали исследования, на 65-е сут введения CCl_4 концентрация мочевины в АК превышала норму в 2 раза, тогда как в селезёнке её содержание оставалось в пределах нормы (табл.1). Причиной такого несоответствия является обнаруженная ранее [1] способность мочевины переходить из свободного в связанное (с белками, липидами и липопротеидами) состояние. Это отражается не только на проницаемости внутриклеточных мембран [18], но и на функциональном состоянии белков [4]. Нельзя исключить и транзит части “артериальной” мочевины через спленоциты в портальный кровоток, куда она поступает вместе с образованным ими глутамином. На правомочность такого предположения указывает формирование на 65-е сут введения CCl_4 положительной корреляционной связи ($r = 0,81$, $p < 0,05$) между концентрацией мочевины в АК и содержанием глутамин в селезёнке, происходящее на фоне изменений концентрации указанных метаболитов в спленоцитах и АК (табл.1).

Если на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 содержание мочевины в АК превышало норму соответственно на 83 %, 23 % и 17 %, то в селезёнке её повышенная концентрация сохранялась только на 3-и и 14-е сут исследования, превышая норму соответственно на 53 % и 73 % (табл.1). Сопоставление данных показывает, что характер нарушения кинетики мочевины в спленоцитах крыс после отмены CCl_4 не только зависит от сроков восстановительного периода, но и определяет кинетику в них других азотистых метаболитов. Так, отрицательная корреляция ($r = -0,87$, $p < 0,05$) между содержанием мочевины и аммиака в селезёнке, выявленная на 3-и сут после отмены CCl_4 , указывает на определённую связь между нормализацией в этот период содержания аммиака в спленоцитах и увеличением в мочевины. Однако связывание аммиака через синтез мочевины у млекопитающих возможно только в печени и тонком кишечнике, где имеется полный набор ферментов орнитинового цикла Кребса-Хенселяйта [3]. В селезёнке, помимо аргиназы, локализованной в селезёночных макрофагах [17], сведения о наличии других ферментов орнитинового цикла в доступной литературе отсутствуют. Поэтому в данном случае речь может идти о влиянии “артериальной” мочевины на нейтрализацию аммиака спленоцитами через образование в них глутамин.

Известно, что мочевины, связываясь с глутаматдегидрогеназой, катализирующей дезаминирование глутамата [3], снижает сродство фермента к данному метаболиту [28]. В результате создаются условия для накопления клеткой глутамата, являющегося, наряду с аммиаком, субстратом для образования глутамина [3]. Кажется вполне очевидным, что этот механизм принимает участие в нормализации содержания аммиака в селезёнке на 3-и сут после отмены токсина. В свою очередь нормализация на 7-е сут после отмены CCl_4 содержания мочевины в селезёнке при сохранении её повышенной концентрации в АК (табл.1) не исключает сохранения перехода в спленоцитах “артериальной” мочевины из свободного в связанное состояние. На 14-е сут восстановительного периода данный процесс, вероятно, прекращается, а в спленоцитах активируется образование собственной мочевины. В результате прирост её концентрации в селезёнке на 14-е сут после отмены CCl_4 в 4 раза превышает аналогичные изменения содержания метаболита в АК (табл.1).

Скорость образования мочевины находится в прямой зависимости от активности аргиназы [16], между тем в макрофагах повышение аргиназной активности сопряжено с увеличением их цитотоксичности [21]. Поэтому увеличение концентрации мочевины в селезёнке на 14-е сут после отмены CCl_4 может служить косвенным признаком увеличения функциональной активности селезёночных макрофагов в указанный период наблюдений.

Таким образом, в процессе развития хронического тетрахлорметанового гепатита селезёнка вовлекается во внепечёночные механизмы компенсации нарушения обезвреживания аммиака в печени. Это приводит к патологическому накоплению спленоцитами аммиака, что связано как с неспособностью спленоцитов нейтрализовать через образование глутамина аммиак, поступающий из АК, а также аммиак, образующийся в них при внутриклеточном аммонийногенезе. В процессе хронического отравления организма CCl_4 селезёнка приобретает способность к “активному” поглощению свободной мочевины из артериальной крови, с дальнейшим переводом её в связанную форму. После прекращения токсического влияния CCl_4 на организм наблюдается отсроченная (на 14-е сут) стимуляция образования мочевины в селезёнке, не предотвращающая накопление в ней аммиака.

Благодарность. Считаю своим долгом выразить глубокую признательность заведующему кафедрой нормальной физиологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко профессору Виктору Николаевичу Яковлеву за возможность проведения исследований в лаборатории его кафедры и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершеневич З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. Мочевина в живых организмах. Ростов н/Д., Изд-во РГУ, 1970.
2. Ковальская К.С. Функциональная связь между нарушением гемодинамики и оттоком лимфы при отравлении четырёххлористым углеродом. Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 11, 25-26, 1971.
3. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака М., Изд-во ЛКИ, 2008.
4. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Внуков В.В., Дудкин С.И. Железосодержащие белки плазмы крови и протеолитическая активность в сыворотке крови при гипербарической оксигенации и защитном действии мочевины. Биологические науки, 9, 30-36, 1986.
5. Мигина Т.В. Роль селезёнки в эндогенном обмене железа в условиях анемии и экспериментального гепатита. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 4, 53-56, 1963.

6. Молчанов Д.В. Кинетика азотистых метаболитов в почках при частичной гепатэктомии, хроническом гепатите и гипербарической оксигенации. Дисс. канд мед наук, ВГМА Воронеж, 2010
7. Нейко В.В. Влияние этимизола на проницаемость гематоцеллюлярного барьера при отравлении четырёххлористым углеродом, вызывающим гепатит. Бюллетень эксперим. биологии и медицины, 12, 700-701, 1980.
8. Решетняк В.И. Печёночно-клеточная недостаточность. Общая реаниматология, 3, 1, 68-79, 2005.
9. Савилов П.Н. Кровоток, напряжение кислорода и обезвреживание аммиака в печени при длительном действии на организм малых доз тетрахлорметана. В кн. „Экология и безопасность жизнедеятельности“. Воронеж, 74-79, 1996.
10. Савилов П.Н. Состояние аммиакобезвреживающей функции печени при хроническом активном гепатите. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1, 24-26, 2004.
11. Савилов П.Н. Азотистый метаболизм селезёнки при резекции печени и гипербарической оксигенации. Биол. журн. Армении, 66, 2, 6-17 2014.
12. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека. М., Медицина, 1995.
13. Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С. Пути восстановления цирротически изменённой печени. М., Медицина, 1965.
14. Слакова А.И., Трубин Г.П., Явлюкова А.И. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах Вопросы медицинской химии, 8, 5, 538-544, 1962.
15. Сукерник Р.И., Скворцова Т.А., Леонтьева Л.И., Ладыгин В.И. Воспроизведение клеточных аутоиммунных реакций к печени у мышей путём имплантации селезёночных клеток сингенных доноров с токсическим гепатитом. Цитология, 13, 5, 636-643, 1977.
16. Трапезникова С.С., Навасардянц А.Г., Давтян М.А. Множественные формы аргиназы печени крысы. Биохимия, 47, 2, 2022-2027, 1982.
17. Чернышёва М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я. Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА при частичной гепатэктомии. Цитология, 27, 2, 209-212, 1985.
18. Чихачёв А.С. Действие гипербарической оксигенации (ГБО) на проницаемость мембран лизосом мозга и защитный эффект мочевины. В кн. „Новое в диагностике, лечении и профилактике заболеваний“, Ростов-н/Д., 53-54, 1974.
19. Hard R.C., Kulgren B. Chimeric mice with donortype liver cells *Sciens*, 152, 349-352, 1966.
20. Harris M. Studies regenerating a glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including a method for its quantitative determination. *J. Clin. Invest.*, 22, 4, 569-576, 1943.
21. Jakway J.P., Morris H.G. Blumental E.J., Talmage D.W. Serum factors required for arginase induction in macrophages *Cell. Immunol.*, 54, 253-264, 1980.
22. Keller H., Muller-Beisenritz, M., Neumann E. Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut *Klin. Wsch.*, 15, 314-319, 1967.
23. Noda T, Mimura H., Orito K. Assesement of Kupfer cell function in rats with chronic liver injury caused by CCl₄. *Hepatogastroenterology*, 3, 3, 319-323, 1990.
24. Pincard R.N., Weir D.M. Antibodies against mitochondrial fraction of lever after toxic liver damage rats. *Clin.Exper. Immunol.*, 1, 33-43, 1966.
25. Richterrich D. *Clinical. Chemistry -N.Y.*, Academia Press, 1962.
26. Weir D.M. Liver autoantibodies in the rat *Immunology*, 6, 581-591, 1963.
27. Weir D.M, Sveling D.E. Immunocytoadherence by spleen cells and carbon tetrachloride rats *Clin.Exper. Immunol.*, 3, 837-841, 1968.
28. Yancey P.H., Somero G.H. Methylamine osmoregulatory solubes of elasmofranch fishes conteract urea inhibition of enzymes. *J. Exp. Zool.*, 213, 2, 205-213, 1980.

Поступила 16.02.2015