



Биолог. журн. Армении, 2 (66), 2014

## АЗОТИСТЫЙ МЕТАБОЛИЗМ СЕЛЕЗЁНКИ ПРИ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ И ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

П.Н. САВИЛОВ

*Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия  
Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж, Россия  
p\_savilov@mail.ru*

В опытах на 75 животных (крысы) исследовали содержание аммиака, глутамина и мочевины в селезёнке после резекции печени (РП, 15-20 % от массы органа) и трёхдневного курса гипербарической оксигенации (ГБО, 3 ата, 50 мин, 1 сеанс в сут). Установлено, что ГБО предотвращает формирование послеоперационной артериальной гипераммониемии, снижает концентрацию аммиака в спленоцитах оперированного организма. Она усиливает стимулирующее влияние РП на формирование послеоперационной артериальной гиперглутаминемии и препятствует формированию глутаминового дефицита в спленоцитах, свойственного неоксигенированным животным с РП. Увеличение концентрации мочевины в артериальной крови после ГБО оперированных крыс не приводит к увеличению её содержания в спленоцитах, что указывает на её переход в них из свободного в связанное состояние.

*Гипероксия – резекция печени – селезёнка – азотистый метаболизм*

75 կենդանիների (անոնետներ) վրա կատարված փորձերում հետազոտել են ամոնիակի, գլուտամինի և միզանյութի քանակը փայծաղում լյարդի բացահատումից (ԼԲ, օրգանի զանգվածի 15-20%) և հիպերբարիկ օքսիգենացման (ՀԲՕ, 3 ատմ, 50 րոպե, 1 սեսնս օրական) առօրյա կուրսից հետո: Հետազոտության արդյունքում պարզվել է, որ ՀԲՕ-ը կանխում է հետվիրահատական արտերիալ հիպերամոնիեմիայի ձևավորումը, իջեցնում է ամոնիակի կոնցենտրացիա վիրահատված օրգանիզմի սպլենոցիտներում: ՀԲՕ-ն ուժեղացնում է ԼԲ-ն խթանող ազդեցությունը հետվիրահատական արտերիալ հիպերամոնիեմիայի ձևավորման վրա, ինչպես նաև սպլենոցիտներում գլուտամինի պակասորդի (դեֆիցիտ) ձևավորման արգելակման վրա, ինչը բնորոշ էր ԼԲ-ով կենդանիներին: Միզանյութի կոնցենտրացիայի ավելացումը արտերիալ արյան մեջ ՀԲՕ վիրահատված անոնետների մոտ չի առաջացնում դրա քանակի ավելացում սպլենոցիտներում, ինչը ցուցադրում է դրա փոխադրումը ազատ վիճակից՝ կապված վիճակ:

*Հիպերօքսիա – լյարդի բացահատում – փայծաղ – ազոտի նյութափոխանակություն*

The content of the ammonia, urea and glutamine in the spleen after hepatectomy (RP, 15-20% of body weight) and three-day course of hyperbaric oxygenation (HBO, 3 atm, 50 min, 1 once daily) were examined through experiments on 75 animals (rats). Investigations have shown that HBO prevents the formation of postoperative arterial hyperammonemia, reduces the ammonia concentration in the operated organism splenocytes. HBO increases the stimulating effect of RP on the formation of arterial postoperative hyperglutaminemia and prevents the formation of glutamine deficiency in splenocytes inherent disoxygenated animals with RP. Increasing urea concentration in the arterial blood after GBO operated rats does not increase its content in splenocytes, indicating its transition to free from the bound state.

*Hyperoxia – resection of the liver – spleen – nitrogen metabolism*

Исследованиями установлено, что удаление небольших участков здоровой печени приводит к формированию в послеоперационном периоде эндогенной аммиачной интоксикации [7] в результате нарушения аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов [6]. Одновременно с этим нарушается кинетика аммиака в самом организме, которая сопровождается избирательным накоплением данного метаболита в различных органах [9]. В свою очередь, накопление аммиака клеткой может вызывать нарушения функционирования последней, вплоть до развития некроза [3]. Отсюда вытекает необходимость изучения азотистого метаболизма отдельных висцеральных органов после резекции печени, в частности селезёнки. Селезёнка принимает активное участие не только в формировании клеточного иммунитета [4], но и в посттравматической репаративной регенерации печени [1]. Поскольку резекция печени, помимо аммиакдетоксикационной функции гепатоцитов, нарушает антимикробную активность крови [5,8], то интерес к азотистому метаболизму спленоцитов в условиях эндогенной аммиачной интоксикации является вполне оправданным. Одним из эффективных методов борьбы с эндогенной аммиачной интоксикацией является гипербарическая оксигенация [7]. Однако её влияние на азотистый метаболизм спленоцитов в условиях нарушения аммиакобезвреживающей функции печени остаётся не исследованным.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния резекции печени и её сочетания с ГБО на азотистый метаболизм в селезёнке.

**Материал и методика.** Опыты проведены на 75 беспородных белых крысах (самках) массой 180-220 г. Резекцию печени (РП) осуществляли под эфирным наркозом, удаляя 15-20 % массы органа. Гипербарическую оксигенацию (ГБО) проводили медицинским кислородом в режиме 3 ата-50 мин, трёхкратно. Первый сеанс начинали через 4-8, второй и третий соответственно через 24 и 48 ч после РП. Животные были разделены на 7 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма), 2, 3, 4 серии – животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после РП, 5,6 и 7 серии – животные с РП и ГБО, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сутки послеоперационного (1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического периода). Объектом исследования служили ткань селезёнки и артериальная кровь (АК, аорта). Забой животных проводился на фоне этилового наркоза (40 мг/кг массы). Для определения азотистых метаболитов ткань селезёнки замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10% гомогената в 60 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат экстрагировали на холоде в течение 30 мин, после чего центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали для определения аммиака, глутамина и мочевины. Кровь для исследования брали предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами. Объектом исследования служила депротеинизированная плазма. Содержание аммиака в ткани селезёнки определяли микродиффузионным методом [11], в крови – фенолгипохлоридным методом [14]. Содержание глутамина в почках и крови определяли методом кислотного гидролиза [13]. Содержание мочевины в селезёнке и крови – диацетилмоноксимовым методом [17]. 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.** Как показали наши исследования (табл.1), РП вызывала увеличение концентрации аммиака в АК, которая на 3-и, 7-е и 14-е сутки послеоперационного периода превышала норму, соответственно на 46%, 34% и 23%. Это указывает на развитие артериальной гипераммониемии. Несмотря на это, концентрация аммиака в ткани селезёнки достоверно не изменялась, оставаясь в пределах нормы. Полученные результаты позволяют говорить об активации в спленоцитах метаболических реакций нейтрализации аммиака, поступающего в них с АК. Одной из таких реакций является вовлечение аммиака в образование глутами-

на. Однако содержание глутамин в селезёнке после РП не увеличивалось, наоборот, на 3-и и 14-е сут исследования обнаружено его снижение, соответственно на 52% и 27% на фоне развития послеоперационной артериальной гиперглутаминемии.

**Таблица 1.** Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) после резекции печени ( $M \pm m$ )

Метаболиты	Норма N=15	Сутки после резекции печени		
		3 (N=10)	7 (N=10)	14 (N=10)
Селезёнка				
Аммиак	1,67 ± 0,12	1,4 ± 0,09	1,66 ± 0,14	1,38 ± 0,16
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,05 ± 0,09*	2,41 ± 0,3 <sup>▶</sup>	1,59 ± 0,11* <sup>◀</sup>
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,77 ± 0,27	3,62 ± 0,2	3,36 ± 0,25
Артериальная кровь				
Аммиак	0,104 ± 0,004	0,152 ± 0,007*	0,139 ± 0,007*	0,128 ± 0,005*
Глутамин	0,690 ± 0,01	0,823 ± 0,026*	0,671 ± 0,017 <sup>▶</sup>	0,812 ± 0,022* <sup>◀</sup>
Мочевина	3,4 ± 0,12	3,55 ± 0,37	4,06 ± 0,19*	3,04 ± 0,21 <sup>◀</sup>

\* (p < 0,05) - достоверность различий по сравнению с нормой; <sup>▶</sup> и <sup>◀</sup> (p < 0,05) - достоверность различий по сравнению с 3-ми и 7-ми сутками послеоперационного периода соответственно.

N - число животных по сериям опытов

Если учесть, что функциональная активность макрофагов находится в прямой зависимости от поступления в них глутамин [15], то есть все основания говорить об увеличении потребления “артериального” глутамин спленоцитами оперированных крыс. Известно, что поступивший в клетки глутамин подвергается дезамидированию с образованием аммиака. Однако отсутствие его накопления в спленоцитах свидетельствует об их способности в создавшихся условиях нейтрализовать как аммиак, диффундировавший из АК, так и аммиак, образовавшийся в процессе метаболизма “артериального” глутамин. Поскольку в спленоцитах обнаружена глутаминсинтетаза [16], которая активируется повышенной концентрацией аммиака [3], то есть все основания предполагать стимуляцию образования в спленоцитах “селезёночного” глутамин с его дальнейшим активным выделением в портальный кровоток. Неслучайно, после РП выявлено формирование портальной гиперглутаминемии в послеоперационном периоде [10]. Вероятно, повышенная инкреция “селезёночного” глутамин из спленоцитов в кровоток на фоне активного дезамидирования в них “артериального” глутамин и лежит в основе развития дефицита данной аминокислоты в спленоцитах оперированных крыс. Поскольку РП стимулирует аргиназную активность спленоцитов мышей [12], то после РП мы были вправе ожидать увеличения концентрации мочевины в спленоцитах оперированных крыс. Однако она оставалась в пределах нормы, даже в условиях транзитного (на 7-е сут после операции) увеличения её концентрации в АК. Известно, что мочевина не только легко диффундирует через клеточные мембраны, но и легко переходит из свободного в связанное с белками и липопротеидами состояние [2]. Этим можно объяснить сохранение в пределах нормы концентрации мочевины в селезёнке на 7-е сут после РП на фоне увеличения её поступления к органу с артериальной кровью. Вместе с тем, на 14-е сут после РП, вероятно, активируется обратный процесс, стабилизируя концентрацию мочевины в спленоцитах на фоне снижения её повышенного содержания в артериальной крови (табл. 1).

Применение ГБО у животных с РП вызывало достоверное снижение концентрации аммиака в АК, которая становилась ниже операционного контроля на 1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического периода (ПГП), соответственно на 32%, 22% и 18% (рис. 1).

При этом она находилась в пределах нормы (табл.2). Предотвращая формирование артериальной гипераммониемии, гипербарический кислород непосредственно способствовал снижению (на 30%) концентрации аммиака в селезёнке на 14-е сут послеоперационного периода (рис.), в результате чего она становилась на 42% ниже нормы (табл.2). Это указывает на отсроченное торможение в спленоцитах аммионогенеза, детерминированное применением ГБО.

**Таблица 2.** Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) после резекции печени ( $M \pm m$ )

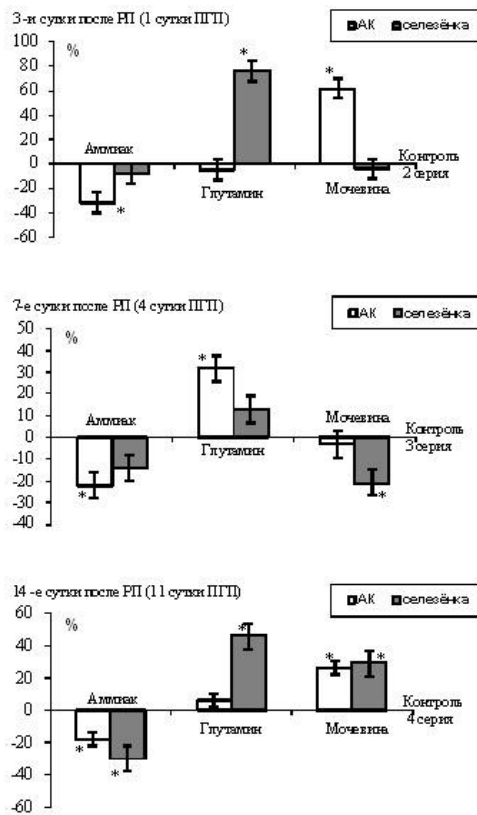
Метаболиты	Норма N=15	Сутки после резекции печени		
		3 (1) N=10	7(4) N=10	14(11) N=10
Селезёнка				
Аммиак	1,67 ± 0,12	1,29 ± 0,17	1,42 ± 0,11	0,97 ± 0,08*◀
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,85 ± 0,13	2,73 ± 0,3▶	2,32 ± 0,26
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,42 ± 0,22	3,21 ± 0,17	4,33 ± 0,25*◀
Артериальная кровь				
Аммиак	0,104 ± 0,004	0,104 ± 0,004	0,109 ± 0,007	0,106 ± 0,004
Глутамин	0,690 ± 0,01	0,784 ± 0,023*	0,885 ± 0,02*▶	0,860 ± 0,023*
Мочевина	3,4 ± 0,12	5,78 ± 0,22*	4,01 ± 0,3▶	3,84 ± 0,15*

\* (p<0,05) - достоверность различий по сравнению с нормой; \* и ◀ (p<0,05) - достоверность различий по сравнению с 3-ми и 7-ми сутками послеоперационного периода соответственно.

N- число животных по сериям опытов

Как видно из рис, ГБО оказывала незначительное стимулирующее влияние на формирование послеоперационной артериальной гиперглутаминемии у крыс с РП. Благодаря этому, предотвращалась характерная для неоксигенированных животных (табл.1) нормализация повышенного содержания глутамина в артериальной крови на 7-е сут после РП (табл.2). На этом фоне обнаружено увеличение концентрации глутаминина в селезёнке, по сравнению с операционным контролем: в 1-е и на 11-е сут ППП, соответственно на 76% и 46% (рис.1). В результате этого происходила её нормализация в спленоцитах (табл.2). Анализ результатов позволяет предположить торможение ГБО дезамидирования спленоцитами глутаминина, поступающего с артериальной кровью. К 11-м сут ППП ингибирующее влияние гипербарического кислорода на дезамидирование спленоцитами глутаминина усиливается, но при этом сохраняется образование спленоцитами собственного глутаминина и его повышенное поступление из них в порталный кровоток. Неслучайно, в последнем выявлено длительное формирование порталной гиперглутаминемии после сочетанного применения РП и ГБО [10].

Применение ГБО вызывало увеличение концентрации мочевины в артериальной крови оперированных крыс на 3-и и 14-е сутки послеоперационного периода, соответственно на 52% и 22% (рис.1). При этом относительно нормы в указанные сроки она была увеличена на 70% и 12% соответственно (табл.2). Между тем, в ткани селезёнки концентрация мочевины увеличивалась (на 29%) только на 11-е сутки ППП (рис.1), становясь выше нормы на 34% (табл.2). С учётом того, что мочевина диффундирует из крови в ткань по градиенту концентрации [2], несоответствие её концентрации в селезёнке и поступающей к ним АК позволяет утверждать, что в условиях ГБО мочевина, поступившая из АК, переходит в спленоцитах из свободного в связанное состояние. Этим и объясняется сохранение в пределах нормы концентрации мочевины в спленоцитах в 1-е сутки ППП при увеличении её содержания в АК (табл.2). В свою очередь на 11-е сутки ППП к этому процессу, возможно, присоединяется и повышенное образование мочевины самими спленоцитами в результате отсроченной стимуляции селезёночной аргиназы.



**Рис.1.** Влияние ГБО на содержание аммиака, глутамина и мочевины в артериальной крови (АК) и селезенке крыс с резекцией печени  
 \*( $p < 0,05$ ) – достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем (животные с РП без ГБО), РП – резекция печени.  
 ПТП – постгипероксический период. Объяснения в тексте.

Таким образом, гипербарический кислород, применённый после РП, регулирует изменения азотистого метаболизма, происходящие в спленоцитах в ответ на механическую травму печени. Предотвращая формирование послеоперационной артериальной гипераммониемии, ГБО одновременно ингибирует аммиониогенез в спленоцитах оперированного организма. Сохраняя стимулирующее влияние РП на формирование артериальной гиперглутаминемии, гипербарический кислород активирует механизмы, препятствующие формированию глутаминового дефицита в спленоцитах, свойственного неоксигенированным животным с РП. Вызывая транзиторное увеличение концентрации мочевины в артериальной крови, гипербарический кислород, с одной стороны, не препятствует её переходу в спленоцитах из свободного в связанное состояние, с другой – создаёт условия для её образования самими спленоцитами на 14-е сут послеоперационного периода.

**Благодарность.** Считаю своим долгом выразить благодарность 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. *Бабаева А.Г.* Регенерация печени и система иммуногенеза М., Медицина, 1985.
2. *Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И.* Мочевина в живых организмах. Ростов н/Д, изд-во РГУ, 1970.
3. *Косенко Е.А., Каминский Ю.Г.* Клеточные механизмы токсичности аммиака. М., Изд-во ЛКИ, 2008.
4. *Рахмилевич А.Л., Сидоренко О.Н.* Стимуляция и супрессия активности клеточного иммунитета у мышей в условиях репаративной регенерации печени. Бюлл. Эксперим. биол. и мед. 5, 591-594, 1986.
5. *Савилов П.Н., Кузьмина Н.Н., Дьячкова С.Я.* Бактерицидная активность крови после частичной гепатэктомии интактной и патологически изменённой печени. Вестник ВГУ. Серия Проблемы химии, биологии, Воронеж, 1, 41-43, 2001.
6. *Савилов П.Н.* Состояние аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов после резекции печени в эксперименте. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 4, 11-13, 2002.
7. *Савилов П.Н.* Роль и место гипербарической оксигенации при печёночной недостаточности. Общая реаниматология, 5, 5, 72-79, 2009.
8. *Савилов П.Н.* Влияние резекции печени и гипербарической оксигенации на фагоцитоз нейтрофилами *E.coli*. Биолог. журн. Армении, 61, 1, 11-17, 2009.
9. *Савилов П.Н., Д.В. Молчанов, Алабовский А.А.* Влияние гипербарической оксигенации на кинетику аммиака в организме при печёночной недостаточности. Общая реаниматология, 6, 6, 12-17, 2010.
10. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В., Яковлев В.Н.* Влияние гипербарической оксигенации на кинетику глутамина в организме при печёночной недостаточности. Общая реаниматология, 8, 2, 20-27, 2012.
11. *Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И.* Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы мед. химии. 8, 5, 538-544, 1962.
12. *Чернышева М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я.* Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА при частичной гепатэктомии. Цитология, 27, 2, 209-212, 1985.
13. *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.
14. *Keller H., Muller-Beisenritz M., Neumann E.* Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut Klin. Wsch. 15, 314-319, 1967.
15. *Macedo R.M., Primavera B., Ramirez V.M.A et al.* Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. Clin. Nutr. 27, 3, 386-397, 2008.
16. *Mello R.A., Tahin Q.S.* Atividade da glutamine synthetase animale na farmaco do v-glutamihidroamato. I. Efeito do ADP, do pH e de cations divalentes. Arg. Biol. e Technol., 24, 2, 249-253, 1981.
17. *Richterrich D.* Clinical. Chemistry -N.Y.:Academia Press, 1962.

Поступила 02.07.2014