

Молчанов Д.В., Савилов П.Н.

ПОЧЕЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭЛИМИНАЦИИ АММИАКА ПРИ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России;
ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», Тамбовская область;
ГОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко» Минздрава России

Molchanov D.V., Savilov P.N.

RENAL MECHANISMS ELIMINATION OF AMMONIA LIVER RESECTIONS (EXPERIMENTAL STUDY)

Moscow Research Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery; Tambov Central District Hospital, Tambov region; Voronezh State Medical Academy

Резюме

В опытах на 98 крысах (самках) исследовали влияние резекции печени (РП, 15–20% от массы органа) на выведение аммиака почками из организма. Исследования проводили на 3-и, 7-е и 14-е сутки после РП. Установлено, что торможение секреции аммиака в почечные каналы и накопление его почечной тканью на 3-и сутки после РП сменяется увеличенным выделением аммония с мочой на фоне снижения степени артериальной гипергаммониемии. Формирование артериальной гиперглутаминемии после РП сопровождается увеличением дезамидирования в почках «артериального» глутамина при одновременном увеличении образования в них «почечного» глутамина и его инкрецией в кровь. Стимуляция реабсорбции мочевины в почках в ранние (3-и сутки) сроки после РП снижает ее выведение мочой из организма, не вызывая накопления в почечной ткани, которое наблюдается в поздние (14-е сутки) сроки послеоперационного периода на фоне восстановления экскреции мочевины с мочой и нормализации ее содержания в оттекающей от почек крови.

Ключевые слова: почки, резекция печени, аммиак, глутамин, мочевина

Abstract

During experiments on 98 rats (female) investigated the influence of liver resection (LR, 15–20% of a body mass) to ammonia excretion by kidneys from a body. Studies were carried out on the third, seventh and the fourteenth day after the LR. It was found that inhibition of secretion of ammonia in renal tubules and its accumulation by renal tissue on the third day after LR were replaced afterwards with an increase in the allocation of ammonium with urine against the background of decline in the degree of arterial hyperammoninemia. Formation of arterial hyperglutaminemia after LR is accompanied by increase of desamidation of arterial glutamine in kidneys while increasing in formation of renal glutamine and its incretion in blood. Stimulation of reabsorption of urea in kidneys in early (day 3) terms after LR reduces the excretion of urine from the body without causing its accumulation in renal tissue that occurs in the later (14 days) time of post-operative period against the background of recovery of excretion of urea with urine and normalization of its content in the blood that drains from kidneys.

Key words: kidneys, liver resection, ammonia, glutamine, urea

В настоящее время единственным эффективным методом лечения гепатоцеллюлярной карциномы у детей является анатомическая резекция печени в сочетании с полихимиотерапией [1]. Между тем исследованиями установлено, что удаление даже небольших объемов печени вызывает

нарушение аммиакдетоксикационной функции гепатоцитов [2], что приводит к развитию в послеоперационном периоде эндогенной аммиачной интоксикации [3]. Наряду с печенью важную роль в элиминации избытка аммиака из организма играют почки [4]. При этом аммиак выделяется почка-

ми из организма как в виде аммонийных солей, так и в виде мочевины [5]. В свою очередь в образовании аммонийных солей принимает участие аммиак, профильтровавшийся в почечных клубочках и образовавшийся в результате дезамидирования нефроцитами глутамина [6]. Между тем способность почек принимать участие в устранении эндогенной аммиачной интоксикации при резекции печени пока не исследована.

Цель работы – изучение влияния резекции печени на способность почек выводить из организма избыток аммиака.

Материал и методы исследования

Опыты проведены на 98 половозрелых крысах (самках) массой 180–220 г. Резекцию печени (РП) осуществляли под эфирным наркозом, удаляя электроножом часть левой доли печени (15–20% массы органа). Происходящая при этом коагуляция раневой поверхности оставляемой доли органа сводила на нет кровопотерю, характерную для данного оперативного вмешательства. Исследования проводили на 3-и, 7-е и 14-е сутки послеоперационного периода. Было выделено 7 серий опытов. 1 серия – интактные животные (норма), 2-я, 3-я и 4-я серии – животные, исследованные соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сутки после РП. Объектом исследования служили почечная ткань, артериальная кровь (АК), кровь почечной вены (КПВ) и моча. Животных выводили из опыта под тиопенталовым наркозом (40 мг тиопентала натрия/кг массы). В почечной ткани определяли аммиак методом микродиффузии [7], глутамин – методом кислотного гидролиза [8] в модификации [7], мочевины – диацетилмоноксидным методом [9]. Забор крови (по 0,4 мл) для исследования осуществляли предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами из 2-х сосудов одного животного в последовательности почечная вена–аорта. В депротенизированной плазме определяли содержание аммиака фенолгипохлоридным методом по Келлеру [10], глутамин – методом кислотного гидролиза [8] с последующим определением аммиака по Келлеру [10], мочевины – диацетилмоноксидным методом [9]. Одновременно рассчитывали почечные артериовенозные разницы (пАВР) по аммиаку, глутамину и мочеине. Для определения содержания аммиака и мочевины в моче животное помещали на 2–4 ч в клетку-пенал, предназначенную для этой цели,

а в контейнер для сбора мочи для подавления урезной активности добавляли 0,1 мл 60%-ного раствора ТХУ. В полученной моче содержание аммиака определяли микродиффузионным методом [7], мочевины – диацетилмоноксидным методом [9]. При этом пробу мочи для определения аммиака разводили в 200 раз, мочевины – в 100 раз, что учитывали при расчете полученных показателей. Результаты исследования обрабатывали статистически с учетом параметрического *t*-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно современным представлениям, удаление почками аммиака из организма млекопитающих осуществляется двумя путями [5]. Во-первых, через почечные клубочки, когда в процессе фильтрации в почечные канальцы попадают находящиеся в плазме крови свободный (несвязанный) аммиак и мочеина (необратимая форма связывания аммиака). Во-вторых, путем секреции нефроцитами в почечные канальцы аммиака, образовавшегося в них при дезаминировании аминокислот, главным образом глутамина (обратимая форма связывания аммиака), поступающего с кровью от других органов.

Как видно из данных, представленных в таблице, концентрация аммиака в моче здоровых животных значительно превышала аналогичный показатель в АК. Поскольку подавление ТХУ урезной активности в собранной моче исключает высвобождение аммиака при расщеплении мочевины уреазой, можно говорить о секреции аммиака нефроцитами аммиака в мочу как ведущей причины формирования ее аммонийного пула. Вместе с тем обнаруженную нами отрицательную пАВР по аммиаку можно рассматривать как следствие его частичной реабсорбции из собирательных трубочек в кровь, что было обнаружено ранее [4].

Из таблицы следует, что РП вызывала увеличение концентрации аммиака в АК на 3-и, 7-е и 14-е сутки послеоперационного периода, соответственно на 31, 25 и 16%. Однако в моче она увеличилась только на 7-е и 14-е сутки исследования, соответственно на 65 и 47% (табл.). Задержка повышенного выведения аммония с мочой из организма в условиях артериальной гипераммониемии предполагает нарушение процессов фильтрации в поч-

ках, например, в результате послеоперационной гиповолемии [11]. Однако применяемая нами методика РП исключает обильную кровопотерю [12]. Маловероятна и гипоперфузия коркового слоя почек из-за вазоконстрикции почечных сосудов и раскрытия почечных артериовенозных шунтов. Это привело бы к увеличению концентрации аммиака в КПВ, которая достоверно не отличалась от нормы в указанные сроки наблюдений (табл.), поэтому единственной причиной сохранения в пределах нормы содержания аммония в моче на 3-и сутки после РП на фоне артериальной гипераммониемии следует рассматривать снижение секреции аммиака нефроцитами в почечные канальцы при сохранении дезаминирования в них аминокислот. Последнее может служить одной из причин накопления аммиака в почечной ткани на 3-и сутки после РП (табл.). Однако выявленные на 7-е и 14-е сутки исследования изменения концентрации аммиака в АК и моче (табл.) позволяют говорить об увеличении секреции аммиака в почечные канальцы на фоне снижения степени артериальной гипераммониемии. Это одна из причин снижения повышенной на 3-и сутки после РП (табл.) концентрации аммиака в почечной ткани: в начале до нормы (7-е сутки), а затем и ниже нее (на 14-е сутки после РП). Формирование на 14-е сутки после РП положительной ПАВР по аммиаку (табл.) следует рассматривать как результат снижения его реабсорбции из собирательных трубочек в кровь.

Концентрация аммиака в клетке зависит от соотношения реакций его образования и связывания, при этом особая роль отводится глутамину, который одновременно может служить как источником аммиака, так и одним из продуктов его нейтрализации в организме [13]. Это зависит от активности ферментов, катализирующих образование и дезаминирование данной аминокислоты, соответственно глутаминсинтетазы и глутаминаз. Изучение сопряженной работы этих ферментов в печени позволило доказать существование глутаминового цикла в гепатоцитах [14]. В свою очередь наличие указанных ферментов в нефроцитах, а также кинетика в них аммиака и глутамина позволяют говорить о наличии глутаминового цикла в почечной ткани.

Как показали наши исследования (табл.), концентрация глутамина в почечной ткани после РП сохранялась в пределах нормы, даже в условиях формирования артериальной гиперглутаминемии

на 3-и и 14-е сутки после РП. Концентрация глутамина в притекающей к почкам крови стимулирует активность почечных глутаминаз [15], поэтому можно говорить о стимуляции дезамидирования артериального глутамина нефроцитами оперированных крыс в условиях формирования послеоперационной артериальной гиперглутаминемии (табл.). Если в АК увеличение концентрации глутамина на 3-и и 14-е сутки после РП составило 16 и 12%, то в КПВ – 38 и 28% соответственно. На 7-е сутки исследования, когда имела место нормализация концентрации глутамина в АК, в КПВ она была увеличена на 29% (табл.). С учетом выявленной кинетики аммиака в почках в указанные сроки наблюдений следует, что после РП стимуляция дезамидирования в нефроцитах артериального глутамина сопровождается увеличением образования в них собственного глутамина с его дальнейшим выведением в кровоток. Можно полагать, что указанные изменения в функционировании почечного глутаминового цикла направлены на предупреждение формирования после РП артериальной гипоглутаминемии. Последнему будет содействовать снижение поступления в кровь из оперированной печени глутамина в результате нарушения глутаминообразовательной функции гепатоцитов [13]. Что касается субстратов для образования глутамина в нефроцитах в условиях артериальной гипераммониемии, то, с одной стороны, это непрофильровавшийся в клубочках аммиак, а с другой – глутамат, образованный при дезамидировании в них артериального глутамина.

Общеизвестно, что в отличие от глутамина поступающая с кровью в почки мочевины не метаболизируется, а только фильтруется в почечных клубочках и частично реабсорбируется в почечных канальцах. Обнаруженное в наших исследованиях снижение на 30% концентрации мочевины в моче на 3-и сутки после РП при одновременном увеличении на 29% ее содержания только в крови почечных вен (табл.) указывает на усиление ее реабсорбции из почечных канальцев. Данный биологический феномен следует рассматривать как приспособительную реакцию организма, направленную на поддержание в пределах нормы концентрации мочевины в артериальной крови в условиях нарушения ее образования гепатоцитами [12]. Это приводит к снижению ее поступления из оперированного органа в кровоток. Повышенная реабсорбция мочевины

Содержание аммиака, глутамина и мочевины в почках (ммоль/кг влажной ткани), крови и моче (ммоль/л) здоровых крыс после частичной гепатэктомии ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Интактные животные (норма)	Сутки после частичной гепатэктомии		
		3-и	7-е	14-е
Аммиак почек	1,95±0,11	2,77±0,15*	1,81±0,18 [▲]	1,24±0,13* ^{▼▲}
Глутамин почек	2,41±0,18	2,93±0,38	2,42±0,32	3,18±0,36
Мочевина почек	11,2±1,01	12,5±0,77	11,9±0,65	15,9±1,1*
Аммиак АК	0,107±0,006	0,140±0,008*	0,134±0,007*	0,124±0,006*
Аммиак КПВ	0,127±0,007	0,131±0,009	0,138±0,008	0,107±0,008 [▼]
АВР по аммиаку	-0,022±0,007	нд	нд	0,014±0,009
Глутамин АК	0,715±0,01	0,830±0,036*	0,709±0,02 [▲]	0,798±0,022* ^{▼*}
Глутамин КПВ	0,441±0,01	0,610±0,037*	0,571±0,028*	0,570±0,037*
АВР по глутамину	0,277±0,028	0,215±0,024	0,137±0,01 ^{▲*}	0,227±0,028 [▼]
Мочевина АК	3,4±0,12	3,55±0,37	4,05±0,19*	3,04±0,21 [▼]
Мочевины КПВ	2,63±0,19	3,39±0,23*	3,84±0,31*	3,01±0,22
АВР по мочеvine	0,77±0,08	нд	нд	нд
Аммиак мочи	1,12±0,12	1,42±0,13	1,88±0,15 ^{▲*}	1,65±0,15*
Мочевина мочи	34,6±3,3	24,3±3,1*	40,6±5,7 [▲]	31,5±6,6

Примечания: АК – артериальная кровь, КПВ – кровь почечной вены, АВР – почечная артериовенозная разница, нд – не достоверное различие, * ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с нормой. [▲] ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с 5-й серией опыта; [▼] ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с 6-й серией опыта.

ны в почках сохранялась и на 7-е сутки после РП. На это указывает то, что увеличение в этот период (табл.) концентрации мочевины на 20% в АК, действуя восстановлению ее сниженной концентрации в моче, сопровождалось увеличением содержания мочевины в КПВ на 46% (табл.). При этом не исключается стимуляция образования мочевины в почках из аргинина, происходящая в клетках проксимальных канальцев нефрона, где локализована аргиназа [16]. Нельзя исключить, что этот процесс активен и на 14-е сутки после РП, будучи одной из причин отсроченного накопления мочевины из почечных канальцев наряду с частичной задержкой метаболита в почечной ткани. Неслучайно увеличение на 42% концентрации мочевины в ткани почек на 14-е сутки после РП происходило на фоне нормализации ее содержания в крови и моче (табл.).

Выявленные изменения кинетики мочевины в почках после РП позволяют говорить о ее важной

роли в адаптации организма к операционной агрессии. В частности, образуя комплекс с гепарином, мочевина пролонгирует антитромбиновую активность последнего [17], что улучшает микроциркуляцию в тканях оперированного организма. В то же время, являясь одним из эндогенных антиоксидантов, мочевина тормозит протеолитическую активность крови и повышает антирадикальную защиту организма [18].

Выводы

1. Формирование артериальной гипераммониемии при РП сопровождается накоплением аммиака почечной тканью в ранние (3-и сутки) сроки и отсроченным увеличением его секреции в почечные канальцы в поздние (7-е и 14-е сутки) сроки послеоперационного периода, что проявляется увеличением содержания аммония в моче и развитием в почечной ткани отсроченного дефицита аммиака.

2. Формирование транзиторной гиперглутаминемии при РП сопровождается активацией почечного глутаминового цикла, которое проявляется стимуляцией дезамидирования в почках артериального глутамина при одновременном увеличении образования глутамина самими нефроцитами с его дальнейшим выделением в оттекающую от почек кровь.

3. Стимуляция реабсорбции мочевины в почках в ранние (3-и сутки) сроки после РП снижает ее выведение мочой из организма, не вызывая накопления в почечной ткани, которое наблюдается в поздние (14-е сутки) сроки послеоперационного периода на фоне восстановления экскреции мочевины с мочой и нормализации ее содержания в оттекающей от почек крови.

Список литературы

1. Шиманский А.Т. Новообразования и очаговые патологические процессы печени у детей: Дисс. ... канд. мед. наук. – Минск, 2008.
2. Савилов П.Н. Состояние аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов после резекции печени в эксперименте // Патол. физиол. и эксперим. терапия. 2002. №4. С. 11–13.
3. Савилов П.Н., Молчанов Д.В., Алабовский А.А. Влияние гипербарической оксигенации на кинетику аммиака в организме при печеночной недостаточности // Общая реаниматология. 2010. №6 (6). С. 12–17.
4. Вандер А. Физиология почек / Пер. с англ. – СПб.: Питер, 2000.
5. Гарт О. Физиология почек // Физиология человека в 4 тт. / Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. – М.: Мир, 1986. Т. 4. С. 145–197.
6. Welbourn T.C. Ammonia production and glutamine in corporation in the functioning rat kidney // Can. J. Biochem. 1980. Vol. 79, N 3. P. 233–237.
7. Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах // Вопросы медицинской химии. 1962. №8 (5). С. 538–544.
8. Harris M. Studies regenerating a glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including a method for its quantitative determination // J. Clin. Invest. 1943. Vol. 22, №4. P. 569–576.
9. Richterrich D. Clinical. Chemistry. – N. Y.: Academia Press, 1962.
10. Keller H., Muller-Beisenritz M., Neumann E. Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut Klin // Wsch. 1967. Bd. 15. S. 314–319.
11. Хирургическая гепатология / Пол ред. Б.В. Петровского. – М.: Медицина, 1972.
12. Савилов П.Н. Механизмы лечебного действия гипербарической оксигенации при резекции печени (экспериментальное исследование): Дисс. ... д-ра мед. наук. – Воронеж: ВГМА, 2007.
13. Савилов П.Н., Молчанов Д.В., Яковлев В.Н. Влияние гипербарической оксигенации на кинетику глутамина в организме при печеночной недостаточности // Общая реаниматология. 2012. Т. 8, №2. С. 20–27.
14. Häussinger D. Die hepatische Ammoniumionentgiftung Forsch // Med. 1985. Bd. 103, №45. S. 1051/41–1051/43.
15. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака. – М.: ЛКИ, 2008.
16. Levillau O., Parry Ph., Hus Cithare A. Arginine metabolism in cat kidney // J. Pisiol. 1986. Vol. 491, №2. P. 471–477.
17. Кудряшев Б.А., Ляпина Л.А. Комплекс гепарин–мочевина и его физико-химические свойства // Вопросы медицинской химии. 1975. Т. 21, №2. С. 165–168.
18. 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. 1986. №9. С. 30–36.

Авторы

КОНТАКТНОЕ лицо:
МОЛЧАНОВ
Дмитрий Владимирович

Заведующий отделением анестезиологии-реанимации ФГБУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздрава России, врач высшей категории, кандидат медицинских наук. Тел.: 8 (495) 483-34-85 (раб.), 8 (916) 484-95-65 (сот.). E-mail: dr.molchanov@gmail.com.