

НОВЫЕ МЕТОДЫ

УДК 616.33-002-07

А.С. БЫКОВ¹, С.Э. БЫКОВ², Н.В. БАРЫШНИКОВА³, А.И. ГИНАК¹

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), 190013, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26

²ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» 199034, г. Санкт-Петербург, 18-я линия В.О., д. 3

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Модель транспорта амиака из желудка в ротовую полость при гидролизе карбамида в присутствии гастральной уреазы

Быков Андрей Сергеевич — аспирант кафедры молекулярной биотехнологии, тел. +7-911-976-27-80, e-mail: bas1976@mail.ru¹

Быков Сергей Эдуардович — ведущий специалист ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», тел. +7-921-400-22-78, e-mail: Bse_mail@mail.ru²

Барышникова Наталия Владимировна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренних болезней стоматологического факультета, тел. +7-921-301-33-77, e-mail: Baryshnikova_nv@mail.ru³

Гинак Анатолий Иосифович — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии, академик РАН, тел. (812) 494-92-67, e-mail: mbt@lti-gti.ru¹

В статье рассматривается дискуссионный вопрос о транспорте амиака, индуцированного в желудке при гидролизе карбамида в присутствии гастральной уреазы, в ротовую полость. Предлагается модель такого перемещения, основанная на физико-химических свойствах NH_3 , существующих представлениях о моторике верхних отделов пищеварительного тракта, а также особенностях пневматики системы: ротовая полость — пищевод — желудок. На основе экспериментальных данных, полученных при прямом ополоскании стенок желудка раствором карбамида во время гастроскопии, показано, что, несмотря на возникающие потери, индуцированный в желудке амиак легко детектируется в воздухе ротовой полости. Осциллирующий характер динамики концентрации NH_3 в ротовой полости, связывается с периодическими моторными сокращениями в верхних отделах пищеварительного тракта. Полученные представления лежат в основе диагностики хеликобактериоза по составу воздуха ротовой полости.

Ключевые слова: диагностика хеликобактериоза, транспорт амиака, ротовая полость, диагностика по амиаку.

A.S. BYKOV¹, S.E. BYKOV², N.V. BARYSHNIKOVA³, A.I. GINAK¹

¹St. Petersburg State Technological Institute (technical university), 26 Moskovsky Prospect, Saint-Petersburg, Russian Federation, 190013

²Association of Medicine and Analytics, Co Ltd, 3 18-ya liniya V.O. St., St. Petersburg, Russian Federation, 199034

³I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 6-8 Lev Tostoy St., Saint-Petersburg, Russian Federation, 197022

Model of transport of ammonia released during urea hydrolysis in the presence of gastric urease from the stomach to the mouth cavity

Bykov A.S. — Postgraduate Student of the Molecular Biotechnology Department, tel. +7-911-976-27-80, e-mail: bas1976@mail.ru¹

Bykov S.E. — Leading Specialist of Association of Medicine and Analytics, Co Ltd, tel. +7-921-400-22-78, e-mail: Bse_mail@mail.ru²

Baryshnikova N.V. — Cand. Med. Sc., Associate Professor of the Internal Diseases Department of Dental Faculty, tel. +7-921-301-33-77, e-mail: Baryshnikova_nv@mail.ru³

Ginak A.I. — D. Chem. Sc., Professor, Head of the Molecular Biotechnology Department, Academician of the RANS, tel. (812) 494-92-67, e-mail: mbt@lti-gti.ru¹

The article presents an arguable point concerning the transport of ammonia released in the stomach during urea hydrolysis in the presence of gastric urease to the mouth cavity. A model of such transport is suggested, based on physicochemical properties of NH₃, current understanding of motility of the upper gastrointestinal tract as well as characteristics of «mouth cavity — esophagus — stomach» system air movement. Experimental findings obtained during direct rinsing of stomach walls with urea solution during gastroscopy showed that in spite of occurring losses ammonia released in the stomach can be easily detected in the mouth cavity air. The «oscillating» pattern of NH₃ concentration in the mouth cavity over time is associated with rhythmic motor activity of the upper gastrointestinal tract. This understanding forms the basis of helicobacteriosis diagnosis by means of analysis of mouth cavity air composition.

Key words: helicobacteriosis diagnosis, ammonia transport, mouth cavity, diagnosis according to ammonia concentration.

Особенностью бактерии *Helicobacter pylori* (HP) по сравнению с другой уреалической микрофлорой является ее способность выделять в большом количестве фермент уреазу, который, в свою очередь, обеспечивает положительный катализ гидролиза мочевины до двуокиси углерода и аммиака:



Эта способность бактерии HP лежит в основе неинвазивных методов диагностики хеликобактериоза по составу выдыхаемого воздуха и воздуха ротовой полости после перорального приема специально приготовленного водного раствора мочевины [1]. Суть методов состоит в получении убедительных свидетельств того, что провоцирующее введение мочевины при наличии в гастродуоденальной зоне бактерии HP, приводит к специальному изменению состава пробы воздуха в сторону увеличения показателей присутствия одного из газов-метаболитов реакции [1]. Общепринятым является представление о том, что индуцированный в желудке CO₂, проникает в ротовую полость через респираторный тракт. Вместе с тем, вопрос о способе транспортировки индуцированного NH₃ к месту отбора пробы остается дискуссионным.

В научных публикациях можно встретить утверждение, что аммиак, индуцированный в желудке в результате гидролиза мочевины в присутствии гастральной уреазы, проникает в ротовую полость с выдыхаемым воздухом [2]. Такое представление основано на том, что аммиак обнаруживается в малых количествах (на уровне сотен ppb [3]) в составе выдыхаемого альвеолярного воздуха, и, кроме этого, сама собой напрашивается параллель с CO₂. Не все специалисты поддерживают «дыхательные» представления о транспорте аммиака, справедливо указывая на то, что, его концентрация в общем кровотоке чрезвычайно мала. Утилизация

гастрального аммиака происходит через кровоток воротной вены, где он, в связанном состоянии транспортируется в печень и уже там почти весь превращается в мочевину. Концентрация NH₃ в общем кровотоке колеблется в физиологических пределах [4], а аномальные значения обусловлены не наличием HP инфекции, а нарушениями процесса дезаминирования крови, вызванными дисфункцией печени. Эта часть специалистов поддерживает пищеводный путь перемещения аммиака в ротовую полость. Есть и третья группа специалистов, которая ссылаясь на высокую химическую активность NH₃ и его значительные абсорбционные свойства, вообще исключает диагностическую значимость этого газового метаболита.

Следует представить процесс перемещения аммиака в свободном состоянии в ротовую полость исходя из физико-химических свойств этого газа, известных физиологических данных «натощакового» желудка, представлений о моторике верхних отделов пищеварительного тракта, а также особенностей пневматики системы: ротовая полость — пищевод — желудок.

Материалы и методы

В исследование были включены 9 пациентов гастроэнтерологического отделения стационара с гистологически подтвержденным положительным HP статусом. В процессе гастроскопии пациентам ополаскивали стенки желудка 1%-ным раствором мочевины в объеме 50 мл. До и после гастроскопии измерялся уровень концентрации NH₃ в воздухе ротовой полости. Полученные эмпирические данные сравнивались на достоверность различия средних значений с помощью вычисления доверительных границ для среднего с уровнем доверия p<0,001. Кроме этого, у добровольцев определялась динамика изменения концентрации NH₃ в воздухе ротовой полости после полоскания рта 0,5%-ным раствором мочевины в объеме 50 мл. В первом случае наблюдалась динамика концентрации

амиака, индуцированного за счет гидролиза мочевины в присутствии оральной уреалитической микрофлоры. Отбор пробы воздуха осуществлялся по месту протекания самой реакции, что исключало какое-либо искажение измеряемого сигнала. Во втором случае наблюдалась продукция амиака, образованного в результате гидролиза мочевины за счет гастральной уреазы. Поскольку проба воздуха бралась также из ротовой полости, то наблюдаемый сигнал хранил в себе искажения, наложенные транспортным каналом. Все измерения концентрации амиака проводились компьютеризированным газоанализатором (ООО «АМА, Россия»), позволяющим производить посекундную регистрацию уровня текущей концентрации.

Результаты

Восемь пациентов из девяти с гистологически подтвержденным хеликобактериозом ответили достоверным ($p<0,001$) приростом уровня амиака в воздухе ротовой полости после прямого ополаскивания стенок желудка 1%-ным раствором мочевины. Этот результат прямо указывает на то, что амиак, индуцированный гастральной уреазой, не теряется полностью на пути к ротовой полости, как полагают некоторые специалисты, а достигает ее и детектируется достаточного «грубыми» средствами. Прирост концентрации NH_3 в ротовой полости начался уже через 5 минут после ополаскивания стенок желудка раствором карбамида. Это существенно отличается от времени начала определения CO_2 в выдыхаемом воздухе, которое, составляет не менее 30 минут. Такое расхождение косвенно указывает на то, что NH_3 и CO_2 транспортируются в ротовую полость разными путями.

В исследовании использовали контаминированную уреазной микрофлорой ротовую полость добровольцев в качестве модели для изучения развития процесса продуцирования амиака при гидролизе мочевины. Типичная динамика развития этого процесса приведена на рисунке 1. На рисунке 2 приведена динамика изменения концентрации индуцированного в желудке NH_3 , но измеренная также в ротовой полости.

Сопоставляя полученные данные, следует отметить существенное различие в поведении кривых. Если в первом случае нарастание уровня амиака выглядит как достаточно «гладкий» процесс, то во втором случае наблюдаются периодически повторяющиеся осцилляции кривой. Если предположить, что процессы продукции амиака за счет бактериальной уреазы в обоих случаях протекают одинаково, то отмеченные осцилляции следует рассматривать как искажения, налагаемые на сигнал транспортным каналом. Такие искажения может вносить периодическая моторная деятельность пищевода, сопровождаемая частичным или полным перекрытием на короткое время доступа амиака в ротовую полость. Заметим также, что частота осцилляций и частота повышения мышечного тонуса пищевода, измеряемого при проведении внутрипищеводной манометрии [5], являются величинами одного порядка.

Обсуждение

Результаты исследований однозначно и достоверно показывают, что амиак, продуцируемый в гастродуodenальной зоне при гидролизе мочевины,

Рисунок 1.
Динамика концентрации NH_3 в воздухе ротовой полости при гидролизе мочевины в присутствии оральной уреалитической микрофлоры

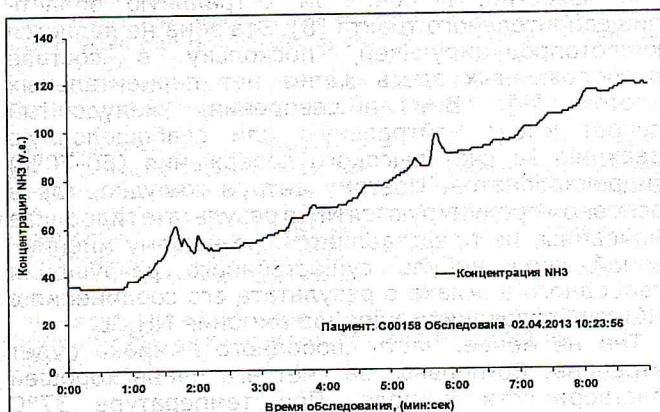
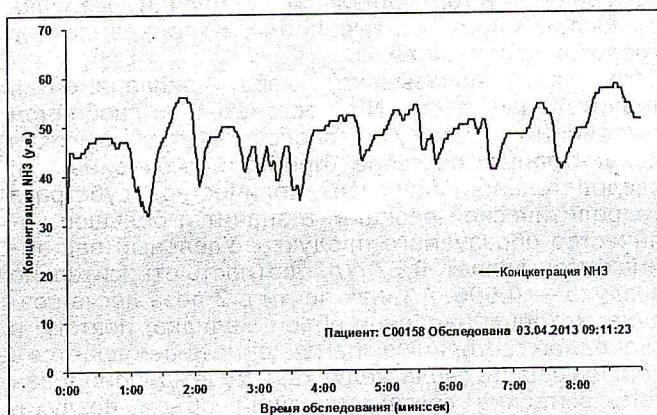


Рисунок 2.
Динамика концентрации NH_3 в воздухе ротовой полости при гидролизе мочевины в желудке в присутствии гастральной уреалитической микрофлоры



сохраняется в достаточно большом количестве и определяется в воздухе ротовой полости уже через 5-10 минут после непосредственного ополаскивания стенок желудка раствором субстрата. Короткое время транспорта амиака в оральную зону, характерные для пищеводного канала искажения измеряемого сигнала, а также неоднократно отмеченное постоянство содержания амиака в общем кровотоке до и после принятия мочевины в присутствии гастральной уреазы, указывает на то, что амиак транспортируется в ротовую полость через пищеводный канал.

Для развития методов диагностики хеликобактериоза на основе изменения состава воздуха ротовой полости по содержанию NH_3 , необходимо иметь, по возможности, целостную картину механизма протекающих процессов, иначе говоря, иметь некоторую модель как систему взглядов, непротиворечивым образом соответствующих уже накопленным знаниям.

Обследование на присутствие НР в желудке с помощью амиачных тестов осуществляется натощак [6]. В качестве нагрузки используется 1%-ный водный раствор мочевины в объеме 50 мл. Пациент принимает раствор перорально. «Натощаковый» желудок имеет минимальный внутренний просвет,

стенки желудка соприкасаются друг с другом, особенно в его нижней пилорической части [7], поэтому раствор мочевины омывает практически всю внутреннюю поверхность стенок желудка.

Бактерия *Helicobacter Pylori* колонизирует, как известно, в основном антравальную область пищеварительного тракта [8]. Эта зона не является кислотопродуцирующей, поскольку в составе расположенных здесь желез нет париентальных клеток [9]. Вне пищеварения, желудочный секрет имеет нейтральную или слабощелочную реакцию за счет высокого содержания (60-70%) гидрокарбонатов. Поэтому антрум желудка, где в основном продуцируются NH_3 в результате гидролиза мочевины, не представляется, по-нашему мнению, зоной сколь-нибудь существенного разрушения свободного амиака в результате его соединения с HCl с образованием хлорида аммония NH_4Cl .

Тем не менее, часть свободного амиака будет утрачена. Во-первых, за счет его очень хорошей растворимости в воде. При температуре 37°C (температура в просвете желудка) в одном объеме воды может раствориться примерно 650 объемов амиака. Нагрузочный раствор мочевины и желудочный секрет вместе составляют объем свыше 50 мл воды.

Во-вторых, за счет диффузии молекул NH_3 через мембранны клеток слизистой оболочки желудка с последующим связыванием и попаданием в кровоток воротной вены.

Но, как показывают наши эксперименты, значительная часть NH_3 останется в свободном состоянии. Этому способствует высокая концентрация раствора принятой мочевины, и, следовательно, большое количество субстрата гидролитической реакции, а значит и большое количество образуемого продукта. Удельный вес амиака составляет 0,77 г/л, плотность относительно воздуха — 0,596. Амиак почти в 2 раза легче воздуха, которым наполнен объем желудка, поэтому в свободном состоянии он немедленно перемещается в верхнюю часть свода желудка, и будет депонирован там, вытеснив соответствующий объем воздуха. Таким образом, амиак в свободном состоянии будет отделен от желудочного секрета и возможных остатков жидкости, что будет препятствовать его дальнейшей абсорбции. Заметим, что с углекислым газом, который является вторым продуктом реакции [1], ничего подобного происходить не будет. Углекислый газ плохо растворим в воде и тяжелее воздуха. При температуре 37°C в одном объеме воды растворяется 0,6 объемов углекислого газа, плотность относительно воздуха составляет 1,5. Как нам представляется, здесь и происходит разделение транспортных путей для продуктов гидролиза мочевины: CO_2 в кишечник, где происходит его всасывание в кровоток с последующим появлением в составе выдыхаемого воздуха, NH_3 через пищевод в ротовую полость, где он и обнаруживается в составе воздуха ротовой полости.

В области свода желудка всегда находится воздушный пузырь [7], определяющий статическое давление газа в просвете этого органа. Замечено, что давление в этой области остается практически постоянным и не зависит от степени наполнения желудка. Это означает, что согласованная моторика органов верхнего отдела пищеварительного тракта реализует и поддерживает работу пневмосистемы, обеспечивающей адаптивную регуляции внутрижелудочного давления вне зависимости от

времени суток, состояния сна или бодрствования, физической активности или покоя человека.

С нашей точки зрения вопрос о механизме образования и поддержания этого пузыря является ключевым в понимании того, как амиак проникает из желудка в ротовую полость.

В процессе дыхания проникновение воздуха в желудок невозможно. Известно [7], что в мышечной оболочке верхнего пищеводного сфинктера существует структура, выполняющая воздухозаградительную функцию для пищевода. Она сокращается на вдохе, перекрывая вход в пищевод, и расслабляется на выдохе. В момент вдоха в легких создается отрицательное давление и, следовательно, поток воздуха направляется туда, а не в пищевод, где ему препятствует высокое пневматическое сопротивление.

Вместе с этим, при акте глотания создаются условия для проникновения воздуха в пищевод. В момент глотания пищевого комка (в интересующем нас случае слюны) горталь смыкается с надгортанником, закрывая вход в трахею, мягкое небо поднимается и закрывает носовую полость, язык упирается в твердое небо, полностью закрывая доступ в ротовую полость. Таким образом, путем согласованного движения мышц ротовой полости и глотки, внутри последней создается изолированная от атмосферного воздуха камера, в которой за счет мышечных усилий в момент глотка обеспечивается давление до 45 мм рт. ст., в то время как в пищеводе оно не превышает 30 мм рт. ст. [7].

Небольшое количество воздуха, которое всегда оказывается заключенным между пищевым комком (или слюной) и глоточно-пищеводным сфинктером, впрыскивается в пищевод. Далее он подхватывается перистальтической волной и продвигается в желудок. В течение суток человек осуществляет порядка 600 глотательных движений [7] и каждое из них, в силу постоянного присутствия воздуха в ротовой полости и стереотипности мышечных сокращений, сопровождается проникновением «глотка воздуха» в пищевод.

Процессу постоянного движения воздуха из ротовой полости в желудок должен соответствовать процесс его обратного перемещения, что обеспечивало бы наблюдаемое постоянство статического внутрижелудочного давления.

Данные пищеводной манометрии [5] показывают, что при движении диафрагмы внутрь желудка (на вдохе), давление в области свода желудка постепенно увеличивается, в то время как давление в теле пищевода падает. В момент максимального повышения давления в желудке нижний пищеводный сфинктер закрывается, что препятствует выходу газа в пищевод. Однако, с нашей точки зрения, проникновение газа все-таки происходит в процессе перемещения диафрагмы. Здесь определяющим является морфологическое различие между «медленными» гладкими мышцами нижнего пищеводного сфинктера и «быстрыми» поперечнополосатыми мышцами диафрагмы [7]. Диафрагма движется быстрее, чем смыкаются кольцевые мышцы сфинктера, в результате чего за счет резкого повышения внутрижелудочного давления при недостаточно закрытом сфинктере на короткое время создается возможность для «продавливания» воздуха из свода желудка вверх по пищеводу. Мы полагаем, что так реализуется адаптивный механизм поддержания оптимального давления

воздуха в желудке, соответствующего текущему наполнению органа.

Заключение

Показано, что аммиак, образованный в результате гидролиза мочевины в присутствии гастральной бактериальной уреазы, несмотря на потери, вызванные его абсорбционными свойствами, очень хорошо детектируется в составе воздуха ротовой полости, сохраняя при этом высокую диагностическую значимость при хеликобактериозе.

Предложена непротиворечивая модель транспорта аммиака из желудка в ротовую полость, в основе которой лежит постоянно существующий газовый обмен в верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик-тест — метод неинвазивной диагностики геликобактериоза // Рос. журнал гастроэнтер., гепатолог., колопроктол. — 1998. — № 6. — С. 34-38.
2. Паролова Н.И. и др. Сравнительная оценка неинвазивных методов диагностики *Helicobacter Pylori* у детей. Опыт применения дыхательного Хелик-аппаратса. ООО «Ассоциация медицины и аналитики». Режим доступа: <http://www.amamed.ru/articles/article.php?action=43> (дата обращения 03.07.2009).
3. Степанов Е.В. Диодная лазерная спектроскопия и анализ молекул-биомаркеров. — М., Физматлит, 2009. — 416 с.
4. Nijevitch A.A., Yelicheva Z.M. Intragastric urea hydrolysis in children infected with *Helicobacter pylori* // J. Clin. Pathol. — 1995. — 48. — P. 187.
5. Сторонова О.А., Трухманов А.С. Методика изучения двигательной функции пищевода / под ред. В.Т. Ивашкина. — М., 2011. — 36 с.
6. Корниенко Е.А., Дмитриенко М.А., Ключко О.Г., Нажиганов О.Н., Григорьев С.В., Мамаев Н.А. Непрерывная регистрация концентрации аммиака в воздухе ротовой полости в диагностике инфекции *Helicobacter pylori* // Рос. журн. гастроэнт., гепатол., колопроктол. — 2003. — Т. XIII, № 5. — прил. № 21, материалы 9 Гастронедели. — М., октябрь 2003. — с. 159.
7. Л.Л. Колесников Сфинктерология. — М.: ГЭОТАР-медиа, 2008. — 152 с.
8. Успенский Ю.П., Суворов А.Н., Барышникова Н.В. Инфекция *Helicobacter pylori* в клинической практике (монография). — СПб.: ИнформМед, 2011. — 572 с.