NEUROPAT. POL., 1979, XVII, 2

WOJCIECH HILGIER, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

# AKTYWNOŚĆ l-GLUTAMINO-AMIDOHYDROLAZY W MÓZGU SZCZURÓW W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

W piśmiennictwie neurologicznym i neuropatologicznym od dawna zwracano uwagę na rolę patogenetyczną amoniaku w zespole encefalopatii wątrobowej, stanowiącej następstwo nieswoistych uszkodzeń wątroby (Adams, Foley 1953, McDermott, Adams 1954, Bessman, Bessman 1955). Poglądy oparte na analizie klinicznych przypadków śpiączki wątrobowej znalazły swoje późniejsze potwierdzenie w badaniach doświadczalnych z wytwarzaniem przetoki między żyłą wrotną i żyłą główną dolną (Kyu, Cavanagh 1970, Cavanagh, Kyu 1971). Hyperamonemia stanowiąca następstwo zespolenia żylnego współprzebiegała z charakterystycznym zespołem nieprawidłowości tkankowych spotykanych w klinicznych przypadkach encefalopatii wątrobowej. Podobieństwo morfologiczne uszkodzeń mózgu w encefalopatii wątrobowej i w chorobie Wilsona zwróciło uwagę na możliwą patogenetyczną rolę miedzi w kształtowaniu zespołu encefalopatii wątrobowej. Wzrost poziomu miedzi w mózgu stwierdzono w przypadkach ostrej encefalopatii wątrobowej u ludzi (Śmiałek, Mossakowski 1974) oraz w encefalopatii wrotno-układowej (Wender, Kozik 1973), a ponadto w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej u szczurów, stanowiącej następstwo marskości wątroby wywołanej czterochlorkiem węgla (Hilgier, Lipska 1979). W oparciu o całokształt spostrzeżeń uzyskanych w badaniach na pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej (Mossakowski i wsp. 1970a, 1975, 1977a, Renkawek i wsp. 1973) wysunięto przypuszczenie, że w patogenezie encefalopatii wątrobowej podstawową rolę odgrywa upośledzenie detoksykacji amoniaku w mózgu, związane z względnym lub bezwzględnym niedoborem α-ketoglutaranu w ośrodkowym układzie nerwowym. Patogenetyczna rola miedzi polegałaby na upośledzeniu pro-

http://rcin.org.pl

dukcji endogennego α-ketoglutaranu w następstwie zaburzenia metabolizmu komórkowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

W związku z powyższym wydawało się celowe określenie aktywności l-glutamino-amidohydrolazy (stanowiącej pośredni wykładnik poziomu amoniaku) w mózgu oraz stężenia amoniaku w surowicy krwi u szczurów z doświadczalną encefalopatią wątrobową.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 34 szczurach rasy Wistar, samcach. U 19 szczurów marskość wątroby wywoływano przez podskórne wstrzykiwanie, co drugi dzień, roztworu czterochlorku węgla w płynnej parafinie w dawce 0,1 ml na 100 g ciężaru ciała, wg metody opisanej przez Georgijewa i wsp. (1968). Zwierzęta kontrolne w liczbie 14 otrzymywały podskórne iniekcje płynnej parafiny w objętości identycznej w przeliczeniu na ciężar ciała, jak zwierzęta doświadczalne.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację bez stosowania narkozy, w grupach po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od rozpoczęcia doświadczenia. W chwili zakończenia doświadczenia, niezależnie od okresu jego trwania, wiek zwierząt wynosił 8 miesięcy. Do badań pobierano mózgi oraz surowicę krwi. Poziom amoniaku w homogenatach mózgu oznaczano pośrednio poprzez pomiar aktywności glutaminazy (EC 3.5.1.2-α-glutamino-amidohydrolaza) i wyrażano w μM $NH_3$/mg białka/godz. (Mardaszew i wsp. 1967, Tweit i wsp. 1970). Mieszanina inkubacyjna w objętości 1 ml zawierała 20 mM glutaminy, 50 mM $Na_2HPO_4$, 0,2 mM EDTA (pH 8,0) i około 1 mg białka. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 37°C przez okres 30 minut. Reakcję przerywano przez dodanie 0,5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego oziębionego do temp. około +4°C. Próby wirowano przez 10 min przy 4.000 obr./min. Następnie zbierano po 0,25 ml nadsączu, dodawano 4,75 ml wody i 0,5 ml odczynnika Nesslera. Wolny amoniak oznaczano przy użyciu fotokolorymetru Spekol, przy długości fali 420 nm.

Poziom amoniaku w surowicy krwi określano przy użyciu standardowych testów „Blood Ammonia Test" f-my Hyland. Zawartość białka w homogenatach mózgu oznaczano wg metody Lowry'ego i wsp. (1951).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu t-Studenta i Q-Dixona.

## WYNIKI

Aktywność l-glutamino-amidohydrolazy w mózgach zwierząt kontrolnych i doświadczalnych, ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w tabeli 1.

http://rcin.org.pl

*Tabela 1.* Aktywność glutaminazy w μmolach $NH_3$/mg białka/godz.
*Table 1.* Activity of glutamine-amidohydrolase μmol/ $NH_3$/mg protein/h

| Czas zatrucia Intoxication time | Kontrola Control animals $\bar{x} \pm SEM$ | (n) | Zwierzęta doświadczalne Experimental animals $\bar{x} \pm SEM$ | (n) | p |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 miesiące months | 2,26±0,04 | (4) | 2,38±0,09 | (4) | $\geqslant$ 0,01 |
| 4 miesiące months | 2,81±0,23 | (5) | 4,02±0,26 | (6) | $\leqslant$ 0,01 |
| 6 miesięcy months | 2,96±0,18 | (5) | 5,94±0,13 | (7) | $\leqslant$ 0,01 |

$\bar{x} \pm SEM$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej
arithmetic mean ± standard error of the mean
n — liczba zwierząt
number of animals
p — prawdopodobieństwo
probability

Z uzyskanych danych wynika, że w grupie zwierząt z 2-miesięcznym podawaniem czterochlorku węgla nie zachodzą zmiany w aktywności glutaminazy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Po 4 miesiącach obserwuje się wzrost aktywności enzymu, wynoszący około 43% wartości kontrolnych. U zwierząt z 6-miesięcznym okresem doświadczenia wzrost aktywności wynosił około 100% w stosunku do zwierząt kontrolnych.

Poziom amoniaku w surowicy zwierząt kontrolnych i doświadczalnych przedstawiono w tabeli 2. Stężenie amoniaku w surowicy zwierząt doświadczalnych w żadnym okresie doświadczenia nie różniło się w sposób istotny od stwierdzanego u zwierząt kontrolnych.

*Tabela 2.* Zawartość $NH_3$ w surowicy krwi w μg/dl
*Table 2.* $NH_3$ content in blood serum μg/dl

| Czas zatrucia Intoxication time | Kontrola Control animals $\bar{x} \pm SEM$ | (n) | Zwierzęta doświadczalne Experimental animals $\bar{x} \pm SEM$ | (n) | p |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 miesiące months | 159,7±0,33 | (3) | 167,2±7,78 | (5) | $\geqslant$0,01 |
| 4 miesiące months | 94,6±5,76 | (4) | 83,3±6,59 | (6) | $\geqslant$0,01 |
| 6 miesięcy months | 123,8±1,25 | (4) | 116,3±3,54 | (8) | $\geqslant$0,01 |

$\bar{x} \pm SEM$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej
arithmetic mean ± standard error of the mean
n — liczba zwierząt
number of animals
p — prawdopodobieństwo
probability

http://rcin.org.pl

## OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że w przebiegu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, stanowiącej następstwo marskości wątroby wywołanej czterochlorkiem węgla, dochodzi do wzrostu aktywności glutaminazy w mózgu. Wzrost aktywności glutaminazy jest wykładnikiem zwiększonego poziomu glutaminy w mózgu, która jest jednym z podstawowych metabolitów na szlaku detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Hindfelt (1975) wykazał, że ostre zatrucie amoniakiem prowadzi do znacznego przyspieszenia syntezy glutaminy i wzrostu jej zawartości w mózgu. Stężenie glutaminy w mózgu jest funkcją zawartości amoniaku i wzrasta proporcjonalnie do wzrostu jego poziomu (Duffy i wsp. 1974). W związku z powyższym na podstawie aktywności glutaminazy można pośrednio sądzić o zachowaniu się amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym.

W naszych badaniach stwierdzono, że po upływie 2 miesięcy nie występują statystycznie znamienne zmiany w aktywności glutaminazy. Natomiast w grupach 4- i 6-miesięcznych obserwowano znaczny, statystycznie znamienny wzrost aktywności enzymu. Można przypuszczać, że stężenie amoniaku podlegało tym samym zmianom. Zwraca przy tym uwagę fakt zbieżności czasowej zmian w aktywności glutaminazy z pojawianiem się i narastaniem nieprawidłowości morfologicznych astrogleju, stwierdzonych w tym samym modelu doświadczalnym przez Mossakowskiego i wsp. (1970b). Dynamika procesu jest analogiczna jak w przypadku gromadzenia się miedzi w mózgu (Hilgier, Lipska 1979). W grupie zwierząt, którym roztwór czterochlorku węgla podawano przez 2 miesiące, zarówno stężenie miedzi jak i aktywność enzymu nie odbiegały od wartości kontrolnych. U zwierząt z 4-miesięcznym przebiegiem doświadczenia 11% przyrostowi stężenia miedzi towarzyszył 43% przyrost aktywności glutaminazy, a przy 6-miesięcznym trwaniu doświadczenia 43% wzrost zawartości miedzi przebiegał z dwukrotnym wzrostem aktywności enzymu. Można przeto przyjąć, że w zastosowanym modelu doświadczalnym encefalopatii wątrobowej występuje równoczesny wzrost poziomu miedzi i amoniaku w mózgu, a uszkodzenie strukturalne tkanki jest wypadkową działania obu czynników. Nie przesądza to oczywiście wzajemnych związków przyczynowych w patogenezie uszkodzeń tkankowych. Fakt niezmienionego stężenia amoniaku w surowicy krwi może jedynie implikować pierwotność uszkadzającego działania miedzi. Według koncepcji Mossakowskiego (1973) patogenetyczna rola miedzi w śpiączce wątrobowej polega na upośledzeniu produkcji endogennego $\alpha$-ketoglutaranu, stanowiącego pierwotne ogniwo detoksykacji amoniaku do glutaminy. Znajduje ona swoje po-

http://rcin.org.pl

twierdzenie w spostrzeżeniach Bessmana i Bessman (1955), którzy stwierdzili, że w śpiączce wątrobowej toksyczne działanie amoniaku ujawnia się przy obniżeniu stężenia α-ketoglutaranu w mózgu. W nowszych badaniach wykazano, że wzrostowi poziomu amoniaku w mózgu towarzyszy wzrost stężenia α-ketoglutaranu (Shorey i wsp. 1967, Hindfelt, Siesjö 1971, Duffy i wsp. 1974). Wydaje się jednak, że wzrost ten może być zjawiskiem kompensacyjnym zależnym od fazy rozwojowej encefalopatii wątrobowej oraz od jej typu. Można więc przypuszczać, że występuje on przede wszystkim w encefalopatii wątrobowej przebiegającej z hyperamonemią.

Hindfelt (1975) w badaniach doświadczalnych, prowadzonych na modelu zespolenia żyły wrotnej z żyłą główną dolną u szczurów, już w drugim tygodniu od założenia przetoki żylnej stwierdzał dwukrotny wzrost stężenia amoniaku w mózgu. Podobny wzrost stężenia amoniaku w naszych doświadczeniach występował dopiero po 6 miesiącach trwania doświadczenia. Różnicę w dynamice procesu odnieść należy zapewne do powolności hepatotoksycznego działania czterochlorku węgla w zastosowanej dawce. Mimo postępującego uszkodzenia wątroby (Mossakowski i wsp. 1970b) jej funkcje były utrzymane do końca doświadczenia, o czym świadczył zarówno stan kliniczny zwierząt (żadne zwierzę nie zginęło w śpiączce wątrobowej) jak i brak zmian w stężeniu amoniaku w surowicy krwi. W przypadku encefalopatii wrotno-układowej, przy wytworzeniu przetoki między żyłą wrotną i główną dolną dochodzi do znacznej hyperamonemii już we wczesnym okresie doświadczenia (Cavanagh, Kyu 1971, Mossakowski i wsp. 1977b).

В. Гильгер, М. Я. Моссаковски

## АКТИВНОСТЬ l-ГЛУТАМИН-АМИДОГИДРОЛАЗЫ В МОЗГЕ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Было проведено исследование активности глутаминазы в мозгах и содержание аммиака в плазме крови у крыс, у которых вызывалось повреждение печени посредством подкожных инъекций четыреххлористого угля. Инъекции проводили через день в течение 2, 4 и 6 месяцев.

Наблюдали усиливающийся во времени рост активности энзима. После 2 месяцей активность глутаминазы не отличалась существенным образом от активности этого энзима у контрольных животных. После 4 месяцев обнаруживали около 43%, а после 6 месяцев около двухкратное приращение активности энзима. Не наблюдали изменений в содержании аммиака в плазме крови.

Выдвигается заключение, что в применяемой экспериментальной модели имеет место увеличение уровня аммиака в мозге.

http://rcin.org.pl

W. Hilgier, M. J. Mossakowski

## THE 1-GLUTAMINE-AMIDOHYDROLASE ACTIVITY IN RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The brain glutaminase activity and serum ammonia content were determined in rats in which liver damage was produced by subcutaneous injections of carbon tetrachloride. The injections were performed every other day for 2, 4 and 6 months. The enzyme activity was observed to increase gradually; it was not different from the control level after 2 months, but was elevated by 43% after 4 months and about twice after 6 months. The serum ammonia content remained unchanged throughout.

The results are indicative of an increase of ammonia level in the brain in this experimental model.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams R. D., Foley J. M.: The neurological changes associated with liver disease. Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis. 1953, 32, 198—237.
2. Bessman S. P., Bessman A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanism of hepatic coma. J. Clin. Inv. 1955, 36, 622—628.
3. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. J. neurol. Sci. 1971, 12, 241—261.
4. Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. Brain dysfunction metabolic disorders. Ed. F. Plum, Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis. Vol. 53. Raven Press, New York 1974.
5. Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu $CCl_4$ na wątrobę prawidłową i regenerującą. Pat. Pol. 1968, 19, 179—187.
6. Hilgier W., Lipska M.: Topografia ilościowa miedzi w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1979, 17, 145—153.
7. Hindfelt B., Siesjö B. K.: Cerebral effects of acute ammonia intoxication: the effect upon energy metabolism. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1971, 28, 365—374.
8. Hindfelt B.: On mechanism in hyperamonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975, 252, 116—123.
9. Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rats. Brit. J. exp. Path. 1970, 51, 217—227.
10. Lowry C. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265—270.
11. Mardaszew S. R., Nikołajew A., Ewsieju A. P.: Indukcija asparginaznoj i glutaminaznoj aktiwnostiej u Pseudomonas sp. asparginowoj i glutaminowej kisłotami. Biochimija 1967, 32, 1093—1098.
12. McDermott W. V., Adams R. B.: Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. J. Clin. Invest. 1954, 33, 1—9.
13. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. Acta Neuropath. (Berl.) 1970a, 16, 1—16.

http://rcin.org.pl

14. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1970b, 8, 365—374.
15. Mossakowski M. J.: The role of copper in the pathogenesis of Wilsonian gliopathy. II. Inter. Symp. on Wilson's Disease. Paris, 1973.
16. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ glutaminianu sodu na obraz gliopatii wywołanej przez amoniak i malonian sodu w warunkach hodowli in vitro. Neuropat. Pol. 1975, 13, 1—9.
17. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ d-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej w hodowli tkankowej. Neuropat. Pol. 1977a, 15, 58—74.
18. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Rózga J., Paluszkiewicz R.: Wpływ α-oksoglutaranu na rozwój encefalopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. Neuropat. Pol. 1977b, 15, 317—325.
19. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes in vitro induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. Acta Neuropath. (Berl.) 1973, 26, 107—114.
20. Shorey J., Mc Candless D. W., Schenker S.: Cerebral α-ketoglutarate in ammonia intoxication. Gastroenterology 1967, 53, 706—711.
21. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Morphological changes on quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma due to acute liver impairment. Neuropat. Pol. 1974, 12, 259—268.
22. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. Obraz biochemiczny. Neurol. Neurochir. Pol. 1973, 7, 177—181.
23. Tweit B., Svennebly G. S., Krame E.: Kinetic properties of glutaminase from pig renal cortex. Eur. J. Bioch. 1970, 14, 337—344.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.



http://rcin.org.pl