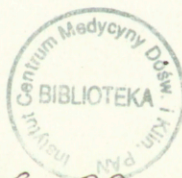


Wojciech Hilgier

METABOLIZM AMONIAKU W MÓZGU  
W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Praca doktorska



LS 89

(dublet)

H3188

Promotor:

Prof. dr hab. med. Mirosław J. Mossakowski

Zespół Neuropatologii  
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN  
Warszawa 1983

Składam gorące podziękowanie Panu Profesorowi Mirosławowi J. Mossakowskiemu, Kierownikowi Zespołu Neuropatologii CMDiK PAN, za umożliwienie wykonania badań w kierowanym przez Niego Zespole oraz za bardzo cenne uwagi w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Szczególne wyrazy uznania składam Pani Teresie Pańkowskiej za niezwykle wszechstronną i staranną pomoc techniczną przy wykonywaniu pracy.

## SPIS TREŚCI

	Str.
WSTĘP .....	1
CEL PRACY .....	20
MATERIAŁ I METODY .....	22
1. Warunki doświadczalne .....	22
1.1. Model chemicznego uszkodzenia wątroby ....	22
1.2. Model zespoleniowy .....	23
2. Metody .....	23
2.1. Oznaczanie poziomu amoniaku we krwi .....	23
2.2. Oznaczanie zawartości amoniaku w mózgu ...	23
2.3. Oznaczanie zawartości L-ketoglutaranu ....	24
2.4. Oznaczanie zawartości glutaminianu .....	25
2.5. Oznaczanie zawartości glutaminy i aktyw- ności aminotransferazy glutaminowej .....	26
2.5.1. Zawartość glutaminy .....	27
2.5.2. Aktywność aminotransferazy glutami- nowej .....	28
2.6. Oznaczanie aktywności syntetazy glutamino- wej .....	29
2.7. Oznaczanie aktywności glutaminazy .....	29
2.8. Oznaczanie zawartości białka .....	30
2.9. Metody statystycznej oceny wyników .....	30
WYNIKI .....	31
1. Zatrucie czterochlorkiem węgla .....	31
1.1. Zawartość amoniaku w surowicy krwi .....	31

1.2. Zawartość amoniaku w mózgu .....	32
1.3. Zawartość $\alpha$ -ketoglutaranu .....	33
1.4. Zawartość glutaminianu .....	34
1.5. Zawartość glutaminy .....	34
1.6. Aktywność syntetazy glutaminowej .....	35
1.7. Aktywność aminotransferazy glutaminowej ..	36
1.8. Aktywność glutaminazy .....	37
2. Zespolecie żyły wrotnej z żyłą główną dolną ...	38
2.1. Zawartość amoniaku w surowicy krwi .....	38
2.2. Zawartość amoniaku w mózgu .....	39
2.3. Zawartość $\alpha$ -ketoglutaranu .....	40
2.4. Zawartość glutaminianu .....	41
2.5. Zawartość glutaminy .....	42
2.6. Aktywność syntetazy glutaminowej .....	43
2.7. Aktywność aminotransferazy glutaminowej ..	44
2.8. Aktywność glutaminazy .....	45
OMOWIENIE I DYSKUSJA .....	46
WNIOSKI .....	63
PIŚMIENNICTWO .....	65

## WSTĘP

Nieswoiste uszkodzenia wątroby o przebiegu przewlekłym i podoстрыm mogą stanowić podłoże charakterystycznego zespołu neurologicznego, któremu towarzyszą typowe, acz nie patognomiczne, zmiany patologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym. Zespołowi temu nadano nazwę encefalopatii wątrobowej. Charakterystyczną cechą obrazu klinicznego encefalopatii wątrobowej jest okresowe występowanie zaburzeń świadomości o różnej głębokości, aż do śpiączki włącznie. Objawy te w miarę rozwoju choroby pojawiają się ze wzrastającą częstotliwością. Końcową fazą choroby jest śpiączka wątrobowa. Zaburzenia te nakładają się na postępujący zespół neurologiczny łączący cechy zaburzeń pozapiramidowych i piramidowych, ze zmiennie zaakcentowanym komponentem mózdzkowym. Zespół encefalopatii wątrobowej najczęściej rozwija się w następstwie marskości wątroby, różnego pochodzenia. Opisywano go również w pierwotnych i wtórnych nowotworach wątroby oraz w jej przewlekłym zapaleniu. Analogiczne obrazy kliniczne opisywano również w przypadkach zespolenia żyły wrotnej z żyłą główną dolną. Zespołowi temu nadano nazwę encefalopatii wrotno-układowej. Ostre uszkodzenia wątroby o podłożu zapalnym i toksycznym rzadko prowadzą do pełnego zespołu klinicznego encefalopatii wątrobowej. W przypadkach tych częstszym, a wielokrotnie

jedynym wykładnikiem uszkodzenia układu nerwowego jest śpiączka wątrobowa występująca w końcowej fazie choroby.

Pomimo klinicznego różnicowania poszczególnych postaci encefalopatii wątrobowej, podstawowy wzorzec obrazu neuropatologicznego jest wspólny. Zmiany o tym samym charakterze, choć o różnej intensywności, występują zarówno w przypadkach encefalopatii z w pełni rozwiniętym zespołem klinicznym, jak i w tych, w których śpiączka wątrobowa w ostatnim okresie choroby jest jedynym objawem wskazującym na zajęcie ośrodkowego układu nerwowego. Takie same zaburzenia spotyka się również u ludzi, u których uszkodzenie wątroby nie doprowadza do śpiączki. Elementy zespołu morfologicznego encefalopatii występują także w przypadkach ostrej martwicy wątroby, o krótkotrwałym przebiegu klinicznym.

Dominującym elementem patologicznym obrazu mikroskopowego są zmiany dotyczące astrogleju. Charakteryzują się one rozplemem astrocytów, obejmującym wszystkie szare formacje, z towarzyszącym mu przerostem komórek gwiaździstych. Równolegle występują w nich zmiany wsteczne, przejawiające się przede wszystkim rozpadem wypustek, ujawnianym przy impregnacji sposobem Cajala, a prowadzącym do powstawania astrocytów bezwypustkowych. Bardzo licznie występują komórki Alzheimera typu II, uznane za charakterystyczny wykładnik patologii wątrobowo-mózgowej. W niektórych przypadkach można również zaobserwować komórki Opalskiego /Mossakowski 1966, Mossakowski 1978/.

Drugim typowym elementem obrazu patomorfologicznego encefalopatii wątrobowej są rozsiane ogniska zwyrodnienia gąbczastego tkanki nerwowej, znamionujące się niezmienną strukturą elementów komórkowych położonych w ogniskach zgęszczenia oraz brakiem włóknistego odczynu wytwórczego ze strony astrocytów.

Dwóm podstawowym rodzajom nieprawidłowości tkankowych towarzyszą ponadto rozlane uszkodzenia komórek nerwowych, o cechach nieswoistego zwyrodnienia oraz ich ubytki /Mossakowski 1981/. Zwraca przy tym uwagę niewspółmierność reakcji astrocytarnej w stosunku do stopnia uszkodzenia lub ubytków komórek nerwowych. Skłoniło to Seitelbergera /1970/ do uznania encefalopatii wątrobowej za proces o charakterze pierwotnej gliopatii.

Patomechanizm uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego w chorobach wątroby, prowadzących do jej niewydolności nie jest dotychczas jednoznacznie wyjaśniony. Wszystkie z dotychczasowych koncepcji patogenetycznych opierają się na podstawowych faktach klinicznych, z których wynika, że encefalopatia wątrobowa stanowi następstwo przeulekłej lub ostrej niewydolności wątroby, zaburzonego przepływu jelitowej krwi żyłnej, omijającego krążenie wrotne, w wyniku chirurgicznego wytworzenia przetoki żyłnej albo wewnątrz- lub zewnątrzwątrobowego zablokowania układu wrotnego oraz nietolerancji na białka pokarmowe /Fischer 1974/. Zarówno niewydolności wątroby jak i nieprawidłowemu przepływowi krwi wrotnej towarzyszą głębokie zaburzenia metaboliczne, znajdujące swoje odzwier-

ciędlenie w składzie chemicznym krwi /Zieve 1979/. Licznym spośród związków chemicznych pojawiających się w surowicy krwi w nieprawidłowym stężeniu w następstwie wypadnięcia "detoksykacyjnej" funkcji wątroby przypisywano i przypisuje się nadal rolę bezpośredniego czynnika patogenetycznego leżącego u podłoża uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego. Ich przedostawaniu się do ośrodkowego układu nerwowego sprzyjać może upośledzenie mechanizmów barierowych krew-mózg w przebiegu uszkodzenia wątroby /Mossakowski i wsp. 1970b, Plum, Hindfelt 1976, Livingstone i wsp. 1977/. Według Zieve /1979/ podstawowe znaczenie w patogenezie encefalopatii wątrobowej ma zachowanie wzajemnych proporcji czynników toksycznych i osłaniających. Obniżenie poziomu czynników osłaniających, do których zalicza się między innymi sód, potas i albuminy surowicy krwi, sprzyjać może ujawnieniu się patogenetycznego działania substancji neurotoksycznych, takich jak amoniak, aromatyczne aminokwasy, wolne kwasy tłuszczowe, merkaptany i in.; nawet wtedy gdy nie występują one w bezwzględnie podwyższonym stężeniu.

Jedną z najstarszych jest koncepcja patogenetyczna Nikolajewa /1937/, który zakładał, że rolę bezpośredniego czynnika uszkadzającego ośrodkowy układ nerwowy odgrywają niezidentyfikowane produkty rozpadu miąższu wątrobowego. Podobna koncepcja, jakkolwiek w zmienionej postaci, pojawiła się w latach pięćdziesiątych w oparciu o badania Geigera /1953/, który stwierdził, że czynność układu nerwowego zależy od nieznanej substancji czynnej produkowanej przez wątrobę,



której brak spowodowany uszkodzeniem wątroby może być istotnym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi patologii wątrobowo-mózgowej. Koncepcja ta znalazła swoje późniejsze poparcie w doświadczalnych obserwacjach Egana i wsp. /1978/. W oparciu o badania doświadczalne, Schutta /1967/ oraz Hai-Chen i wsp. /1969/ patogenetyczną rolę w rozwoju encefalopatii wątrobowej przypisywali bilirubinie lub produktom jej przemiany. W świetle współczesnych poglądów przedstawione powyżej koncepcje mają jedynie znaczenie historyczne hipotez nie posiadających dostatecznego poparcia w faktach zarówno klinicznych jak i doświadczalnych.

Do grupy substancji neurotoksycznych, które najpowszechniej uwzględnia się jako możliwe czynniki odgrywające istotną rolę w rozwoju zespołu klinicznego encefalopatii wątrobowej i współodpowiedzialne za strukturalne uszkodzenia tkanki nerwowej należą aminokwasy aromatyczne, wolne kwasy tłuszczowe, o krótkim łańcuchu węglowym, merkaptany, tzw. fałszywe neuromediatory oraz amoniak.

Aminokwasami, którym przypisuje się rolę czynników uszkadzających ośrodkowy układ nerwowy są fenyloalanina, tyrozyna, a przede wszystkim tryptofan /Hirayama 1971/. Ich poziom w surowicy krwi wzrasta znacznie u ludzi i u zwierząt z uszkodzeniem wątroby /Job i wsp. 1970, Condon 1971, Fischer 1974/. Inni autorzy przypuszczają, że nie tyle bezwzględny wzrost poszczególnych aromatycznych aminokwasów w surowicy krwi, lecz zachwianie ich proporcji w stosunku do aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu, takich jak leucyna,

izoleucyna czy walina może odgrywać zasadniczą rolę w patomechanizmie zespołu wątrobowo-mózgowego /Fernstrom, Wurtman 1972/. Obniżenie poziomu tych ostatnich w surowicy krwi jest stałym zjawiskiem u ludzi i zwierząt doświadczalnych z zespołem encefalopatii wątrobowej /Fischer i wsp. 1975/.

W roku 1966 Ruto zwrócił uwagę na możliwą rolę patogenetyczną wolnych kwasów tłuszczowych, o krótkim łańcuchu węglowym, obserwując wzrost ich poziomu w surowicy u licznych chorych z zespołem wątrobowo-mózgowym. Obserwacje te potwierdzili Rabinowitz i wsp. /1978/, a Teyshenne i wsp. /1976/ wywoływali stan śpiączkowy u królików po dożylnym podaniu kwasu walerianowego i izowalerianowego.

Wzrost poziomu merkaptanów u chorych z uszkodzeniem wątroby, przebiegającym z cechami encefalopatii wątrobowej jak i nie wykazującym zajęcia ośrodkowego układu nerwowego, stwierdzili liczni autorzy, między innymi Brunner i Siehoff /1976/, Doizaki i Zieve /1977/, McClain i wsp. /1978 a, b/. Zieve /1979/ przypuszcza, że ich działanie może zależeć zarówno od ich bezpośredniego efektu neurotoksycznego jak i od wzmagania wpływu innych substancji toksycznych takich jak amoniak, czy wolne kwasy tłuszczowe.

Należy wspomnieć również o koncepcji Fischera /1974/, który odrzucając rolę patogenetyczną amoniaku, w oparciu o stwierdzone przez siebie zmiany w zawartości katecholamin w ośrodkowym układzie nerwowym, rolę podstawowego czynnika uszkadzającego, prowadzącego do rozwoju śpiączki wątrobowej przypisuje tzw. fałszywym neurotransmiterom, przede wszystkim

oktopaminie. Pogląd ten został podważony przez Zieve i Olsena /1977/, którzy przy dokomorowym podaniu oktopaminy, w stężeniu przewyższającym kilkusetkrotnie stwierdzany w mózgach zwierząt ze śpiączką wątrobową, nie obserwowali zaburzeń typowych dla encefalopatii wątrobowej, mimo obniżenia poziomu katecholamin w mózgu do 10% ich prawidłowej zawartości.

Szeroką akceptację uzyskał pogląd o kluczowej roli amoniaku w patogenezie encefalopatii wątrobowej. Znajduje on swoje podstawowe poparcie we wzroście jego poziomu w surowicy krwi u większości chorych z niewydolnością wątroby i z nieprawidłowym przepływem wrotnym, występującym zwłaszcza w okresie zaburzeń świadomości /Sherlock i wsp. 1954, 1956, Mc Dermott, Adams 1954, Baltazan i wsp. 1957, Gabuzda, Davidson 1969, Fischor 1974, Zieve 1979/ oraz w doświadczeniach klinicznych związanych z leczeniem encefalopatii wątrobowej poprzez obniżenie produkcji amoniaku w przewodzie pokarmowym i zmniejszenie jego wchłaniania z jelit do krwi. Za podstawową rolę amoniaku w rozwoju uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, związanych z niewydolnością wątroby przemawiają również liczne wyniki badań doświadczalnych prowadzonych zarówno in vivo /Mossakowski 1966, Cavanagh, Kyu 1971, Dimer 1978 i in./ oraz in vitro /Mossakowski i wsp. 1970 a/. W roku 1955 Bessman i Bessman wysunęli przypuszczenie, że toksyczny wpływ amoniaku na tkankę nerwową związany jest z zaburzeniem przemian w cyklu Krebsa jako następstwo wychwytywania  $\alpha$ -ketoglutaranu w procesie detoksykacji amoniaku do glutaminianu i glutaminy. Prowadzić to ma do upośledzenia procesów ener-

getycznych tkanki nerwowej. Koncepcję Bessmana i Bessman /1955/ podważył szereg danych biochemicznych /Berl 1971/, a przede wszystkim brak zaburzeń metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej u zwierząt z doświadczalną śpiączką wątrobową /Gabuzda 1962, Zieve, Nikoloff 1975/. Nie znalazły również doświadczalnego potwierdzenia inne koncepcje patogenetyczne toksycznego działania amoniaku na tkankę nerwową, związane między innymi z gromadzeniem się w nadmiarze w mózgu kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego, stanowiącego hamujący neuromediator /Breen, Schenker 1972/, czy zahamowaniem syntezy acetylocholiny /Walker i wsp. 1971/. Rolę amoniaku jako jedyne go czynnika leżącego u podłoża encefalopatii wątrobowej podważają również kliniczne przypadki zespołu przebiegające bez hiperamonemii /Phillips i wsp. 1952, Fischer 1974, Zieve 1979/ oraz obserwacje doświadczalne, dotyczące niektórych uszkodzeń wątroby /Hilgier, Mośsakowski 1979/.

W poszukiwaniu wyjaśnienia przyczyn zasadniczego podobieństwa, jeśli nie identyczności, obrazu uszkodzeń tkankowych, występujących w encefalopatii wątrobowej i w zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym /choroba Wilsona/ - dwu zespołach o różnym podłożu etiopatogenetycznym, odmiennym przebiegu i obrazie klinicznym, Mośsakowski /1973/ wysunął przypuszczenie, oparte o obszerny cykl prac doświadczalnych przeprowadzonych zarówno in vivo jak i in vitro, że u podstaw gliopatii, stanowiącej wiodący element zespołu neuropatologicznego obu procesów chorobowych leży upośledzenie detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Ma być ono następstwem wzgląd-

nego lub bezwzględnie niedoboru  $\alpha$ -ketoglutaranu w gleju gwiaździstym, stanowiącym zasadniczy przedział komórkowy mózgu, w którym zachodzi metabolizm amoniaku w mózgu /Baxter 1976, Hallermayer i wsp. 1981/. Gliopatia wątrobowa może się przeto rozwijać zarówno w warunkach hiperamonemii jak i przy jego prawidłowym stężeniu we krwi. W tym ostatnim przypadku warunkiem jej rozwoju jest niedobór  $\alpha$ -ketoglutaranu w gleju gwiaździstym, spowodowany przez dodatkowy czynnik lub czynniki. W chorobie Wilsona, przebiegającej z zasady z normoamonemią, może nim być miedź gromadzaca się w nadmiarze w mózgu. Podwyższoną zawartość miedzi w ośrodkowym układzie nerwowym stwierdzono również w ostrej /Śmiałek, Mossakowski 1974/ i przewlekłej /Wender, Kozik 1973/ encefalopatii wątrobowej u ludzi oraz w niektórych grupach zwierząt doświadczalnych z marskością wątroby /Hilgier, Lipska 1979 /. Na rolę niedoboru  $\alpha$ -ketoglutaranu w rozwoju gliopatii wątrobowej wskazywać mogą doświadczenia, w których wykazano zahamowanie jej rozwoju pod wpływem miedzi i amoniaku w warunkach *in vitro* przy zastosowaniu egzogenego  $\alpha$ -ketoglutaranu /Mossakowski 1978/. Podobne jego działanie wykazano *in vivo* u zwierząt z doświadczalną przetoką między żyłą wrotną i główną dolną /Mossakowski i wsp. 1977/.

Według Mossakowskiego /1978/ o pierwotnym zajęciu astrocytów w warunkach upośledzenia detoksykacji amoniaku w mózgu decyduje ich "wstawkowe położenie" w tkance nerwowej, niski metabolizm tlenowy oraz ich podstawowa rola w metabolizmie amoniaku.

W warunkach fizjologicznych amoniak jest stale wytwarzany w tkankach organizmu w przebiegu metabolizmu aminokwasów, jednakże zaledwie jego ślady znajdują się we krwi. Jest on bowiem szybko usuwany w procesie:

1. aminacji ketokwasów /szczawiuoocetowy, ketoglutarowy/ z utworzeniem asparagianu i glutaminianu;
2. amidacji kwasu glutaminowego z utworzeniem glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminy;
3. syntezy mocznika w wątrobie.

Oprócz amoniaku stanowiącego produkt metabolizmu tkankowego, znaczna jego ilość powstaje w przewodzie pokarmowym w wyniku działania bakterii jelitowych na substraty azotowe, takie między innymi jak pochodne białek pokarmowych oraz mocznik, obecny w sokach wydzielanych do przewodu pokarmowego. Wytworzony w jelitach amoniak wchłania się do krwi wrotnej, która w związku z tym znamionuje się znacznie większą zawartością amoniaku niż krew krążenia ogólnego. W warunkach prawidłowych wątroba szybko metabolizuje przeniesiony drogą krwi wrotnej amoniak, dzięki czemu krew żylna opuszczająca wątrobę jest praktycznie wolna od amoniaku /Harper 1972/. Mechanizm ten chroni między innymi ośrodkowy układ nerwowy przed toksycznym działaniem amoniaku.

Sprawna czynność wątroby ma istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu. Upośledzenie którejkolwiek z licznych czynności wątroby może prowadzić do wielokierunkowych i głębokich ogólnoustrojowych zaburzeń metabolicznych, znajdujących swoje odbicie w upośledzeniu funkcji

innych narządów i tkanek, w tym również ośrodkowego układu nerwowego. Wątroba wyróżnia się jednak niezwykle wysoką rezerwą funkcjonalną, do wyraźnego upośledzenia jej funkcji dochodzi dopiero przy uszkodzeniu około 80% masy narządu. Najwyraźniejsze zaburzenia czynności wątroby występują w procesach chorobowych obejmujących cały narząd.

Morfologicznym wykładnikiem uszkodzenia wątroby jest zwyrodnienie lub martwica jej mięszu. Najpospolitszą formą zmian zwyrodnieniowych jest stłuszczenie wątroby, w którym dochodzi do gromadzenia się tłuszczów obojętnych w cytoplazmie jej komórek. Stłuszczenie wątroby cechuje się zwiększoną lipogenezą z wewnątrzkomórkową kumulacją trójglicerydów. W prawidłowych warunkach, syntetyzowane w siateczce śródplazmatycznej trójglicerydy wbudowywane są łącznie z fosfolipidami i cholesterolem w cząsteczki lipoprotein, które następnie podlegają sekrecji do płynu pozakomórkowego. Wewnątrzkomórkowa kumulacja trójglicerydów może być wynikiem niedostatecznej syntezy apolipoprotein, stanowiących element niezbędny do prawidłowego formowania lipoprotein, w stosunku do zwiększonego zapotrzebowania na nie, bądź też następstwem zaburzenia procesu sekrecji. Upośledzenie biosyntezy białek, zwłaszcza ich grupy o niskim okresie półtrwania jest jednym z bardziej czułych wskaźników uszkodzenia czynności wątroby. Wszystkie czynniki zaburzające metabolizm kwasów nukleinowych, uszkadzające strukturę siateczki śródplazmatycznej, interferujące w syntezę samego łańcucha peptydowego, a nawet upośledzające procesy energetyczne mogą prowadzić do zmniejszenia

syntezy białek produkowanych przez komórkę wątrobową, w tym również apolipoprotein. Przy zachowanym wydajnym procesie lipogenezy prowadzi to do kumulacji trójglicerydów, a w efekcie do stłuszczenia wątroby i ograniczenia jej czynnościowej wydolności.

Do głębokiego upośledzenia czynności wątroby prowadzi martwica jej komórek. Liczne czynniki wywołują ciężkie uszkodzenie mięszu wątrobowego, włącznie z martwicą. Należą do nich między innymi czterochlorek węgla, benzen, fosfor, chloroform, alkaloidy występujące w grzybach trujących, a przede wszystkim hepatotoksyczny wirus wywołujący wirusowe zapalenie wątroby. Drobne zmiany martwicze, ulegające resorpcji i wtórnemu zbliznowaczeniu lub regeneracji, mogą nie wywoływać w ogóle lub tylko przejściowe upośledzenie czynności narządu. Rozległe zmiany martwicze leżą u podłoża ciężkiej niewydolności wątroby, a włókniste zbliznowaczenie, stanowiące ich zejście, prowadzi do jej marskości. Cechą charakterystyczną tego stanu jest przebudowa i fragmentacja narządu, prowadząca do zaburzeń wewnątrzwątrobowego przepływu krwi. Skutkiem tego jest wytwarzanie pozawątrobowego obocznego krążenia żylnego łączącego układ wrotny z układem żył głównych /Sherlock i wsp. 1954, 1956, Summerskill i wsp. 1956, Parson-Smith i wsp. 1957/. Diemer /1973/ wykazał dodatkowo powstawanie wewnątrzwątrobowego obocznego układu krążenia żylnego. U przebiegu marskości wątroby wiele fragmentów zachowanego mięszu wątrobowego nie jest perfundowane przez krew żyły wrotnej, co wyłącza je z normalnej czynności narządu /Rogulski 1982/. Efektem marskości wątroby jest więc anatomiczne i czynnościowe zmniejszenie



miąższu wątrobowego oraz pozawątrobowy przepływ krwi wrotnej do ogólnego krążenia żylnego. Amoniak absorbowany z jelit przedostaje się wówczas do ogólnego krążenia, gdzie jego stężenie może wzrosnąć do toksycznego poziomu. Analogiczna sytuacja patofizjologiczna występuje przy operacyjnym wytworzeniu zespolenia między układem wrotnym i żyłą próżną dolną. W warunkach tych może dojść do zatrucia amoniakiem, szczególnie przy wzroście jego zawartości w żylniej krwi pochodzącej z jelit, w następstwie wysokobiałkowej diety lub krwawienia do przewodu pokarmowego /Harper 1972, Fischer 1974/. Toksyczność amoniaku wynika z tego, iż powoduje on redukcyjną aminację  $\alpha$ -ketoglutaranu w mitochondriach. Jest to reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową:



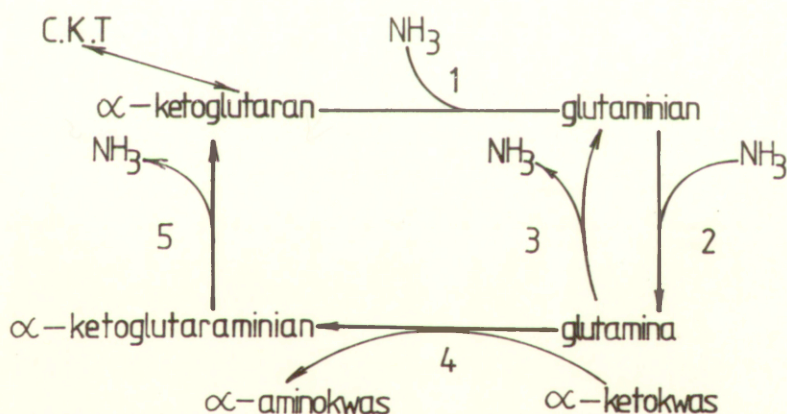
Ponieważ równowaga reakcji w warunkach wzrostu stężenia amoniaku jest przesunięta w prawo, przeto dochodzi do usuwania  $\alpha$ -ketoglutaranu z cyklu kwasów trójkarboksylowych, a w efekcie do upośledzenia oddychania wewnątrzkomórkowego, a także nadmiernego tworzenia w wątrobie ciał ketonowych z acetylo-CoA /Lehninger 1979/.

Zawarty we krwi amoniak przedostaje się do wszystkich narządów ustroju w tym również do ośrodkowego układu nerwowego. W badaniach nad losami amoniaku w organizmie człowieka, przeprowadzonych przy użyciu pierwiastków promieniotwórczych przez Lockwooda i wsp. /1979/ wykazano, że około 7% podanego izotopu w warunkach fizjologicznych metabolizowane jest w mózgu. Stwierdzono również, że szybkość zużywania egzogenego amoniaku

jest proporcjonalny do jego stężenia we krwi tętniczej. W przypadku prawidłowego mózgowego przepływu krwi około 50% amoniaku zawartego w krwi tętniczej jest wychwytywane przez mózg podczas jednorazowego przepływu. Metabolizm amoniaku w mózgu odbywa się prawdopodobnie w astrocytach, ponieważ w tym przedziale komórkowym gromadzi się ponad 20% izotopu. U ludzi zdrowych szybkość zużywania amoniaku wynosi około 32  $\mu\text{mole}/\text{min.}/\text{całą masę mózgu}$ . U ludzi z encefalopatią wątrobową wzrasta o około 50%.

Istotne informacje o drogach przemiany amoniaku w organizmie przyniosły wcześniejsze badania Berla i wsp. /1962/ przeprowadzone również przy użyciu znakowanego  $^{15}\text{N}$  octanu amonu podawanego kotom do tętnicy szyjnej wewnętrznej. Wykazano w nich, że w mózgu większość wprowadzonego amoniaku znajdowała się w postaci amoniaku wolnego. Drugą mniejszą pulę stanowiły grupy amidowa i  $\alpha$ -aminowa glutaminy. W wątrobie zaś znaczne ilości amoniaku znajdowane były w glutaminianie, glutaminie, asparaginianie i moczniku. We krwi przepływającej zarówno przez mózg jak i wątrobę około połowy  $^{15}\text{N}$  występowało w formie wolnego amoniaku, a pozostały w moczniku. Wyniki te wskazują na wyraźną odrębność metabolizmu amoniaku w mózgu w porównaniu z wątrobą. W wątrobie główną drogą eliminacji amoniaku jest synteza mocznika, podczas gdy w mózgu jest nią tworzenie glutaminy. Według danych Sporne i wsp. /1959/ w mózgu również zachodzi synteza mocznika. Jednakże późniejsze prace Mc Ilwaina i Bachelarda /1971/ wskazują, że proces ten nie odgrywa istotnej roli w usuwaniu amoniaku z ośrodko-

wego układu nerwowego, a głównym torem jego eliminacji, jak wspomniano powyżej, jest wytwarzanie glutaminy /Berl i wsp. 1962/. Proces ten jednak musi być poprzedzony miejscową syntezą glutaminianu, gdyż ilość tego substratu dostarczanego przez krew nie jest wystarczająca do syntezy zwiększonych ilości glutaminy, powstających w ośrodkowym układzie nerwowym przy zwiększonej podaży amoniaku /Harper 1972/. Według Mc Ilwaina i Bachelarda /1971/ metabolizm amoniaku w mózgu zachodzi na drodze dwóch podstawowych reakcji, przedstawionych na ryc. 1.



1. Dehydrogenaza glutaminianowa

2. Syntetaza glutaminowa

3. Glutaminaza

4. Aminotransferaza glutaminowa

5.  $\omega$ -amidaza

C.K.T.—Cykl kwasów trójkarboksylowych

Ryc.1. Metabolizm amoniaku w mózgu

Są to:

1. Reduktywna aminacja  $\alpha$ -ketoglutaranu /pochodzącego z cyklu kwasów trójkarboksylowych/ do kwasu glutaminowego w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową. Równowaga tej reakcji jest przesunięta w kierunku tworzenia glutaminianu przy nadmiarze jonów amonowych.
2. ATP-zależna amidacja glutaminianu do glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową.

Autorzy ci wykazali ponadto, że ilość powstającej glutaminy jest wprost proporcjonalna do stężenia amoniaku.

Wytworzona w ośrodkowym układzie nerwowym glutamina podlega dalszym przemianom. W reakcji katalizowanej przez glutaminazę dochodzi do jej rozpadu do glutaminianu. Może ona również ulegać transaminacji z wytworzeniem  $\alpha$ -ketoglutaraminianu przy udziale aminotransferazy glutaminowej /Sigiura 1957, Yoshida 1967/.  $\alpha$ -ketoglutaraminian z kolei pod wpływem  $\omega$ -amidazy zostaje zdazaminowany do  $\alpha$ -ketoglutaranu. Reakcja ta zamyka cykl metabolizmu amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym, uwalniając w każdym obrocie cyklu 1 mol  $\text{NH}_3$ .

Dotychczasowe badania nad doświadczalną encefalopatią wątrobową prowadzone były na licznych modelach zwierzęcych, które pod względem patogenetycznym uszeregować można w 3 grupy /Mossakowski 1981/:

1. Operacyjne wytworzenie pozawątrobowego przepływu krwi wrotnej /przetoka Ecka i jej modyfikacje/
2. Doświadczalna hiperamonemia przy nieuszkodzonym mięszu wątrobowym i zachowanym prawidłowym krążeniu wrot-

nym /infuzje octanu amonu, ureazy i in./

3. Uszkodzenie mięszu wątroby z jej wtórną marskością przy zastosowaniu deficytu białkowego lub różnych substancji hepatotoksycznych takich między innymi jak czterochlorek węgla.

W badaniach metabolizmu amoniaku w mózgu najczęściej stosowane były dwa pierwsze modele doświadczalne, w których nie dochodzi jednak do metabolicznego upośledzenia funkcji wątroby. Model trzeci wykorzystywany był głównie dla oceny wpływu uszkodzenia wątroby na obraz uszkodzeń strukturalnych ośrodkowego układu /Mossakowski i wsp. 1970b, Mossakowski 1981 /. Doniesienia na temat wpływu doświadczalnego upośledzenia czynności wątroby na metabolizm amoniaku w mózgu są fragmentaryczne i niepełne. Wydawało się przeto celowe podjęcie tego właśnie kierunku badań, ze zwróceniem szczególnej uwagi na dynamikę zaburzeń metabolizmu amoniaku w mózgu w funkcji postępu patomorfologicznego zespołu encefalopatii wątrobowej.

Przy znanych ograniczeniach i niedogodnościach zatrucie czterochlorkiem węgla jest jednym z najpowszechniej stosowanych modeli doświadczalnych trwałego uszkodzenia wątroby prowadzącego do jej marskości, a powstający w jej następstwie zespół zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym ma cechy typowe dla encefalopatii wątrobowej /Mossakowski i wsp. 1970 b/.

Czterochlorek węgla jest substancją silnie hepatotoksyczną. Uszkadza on wątrobę silniej i łatwiej niż chloroform i

inne związki hepatotoksyczne. Trwałe uszkodzenie wątroby z wtórnym rozwojem jej marskości uzyskuje się przy jego przewlekłym stosowaniu /Mossakowski i wsp. 1970 b/. Wchłania się on w postaci par w drogach oddechowych oraz przez skórę, a w formie ciekłej z przewodu pokarmowego i przez skórę. Równoczesne podanie z tłuszczem zwiększa szybkość wchłaniania. Rozdział czterochlorku węgla w tkankach ustroju jest proporcjonalny do zawartości w nich substancji tłuszczowych - najwyższe stężenie występuje w tkance tłuszczowej, a następnie w wątrobie. Hepatotoksyczne działanie czterochlorku węgla ujawnia się pierwotnymi zmianami w mitochondriach oraz w siateczce śródplazmatycznej i najprawdopodobniej polega na rozpuszczaniu przez  $CCl_4$  błony komórkowej i zaburzeniu procesów czynnego transportu. Umożliwia to wnikanie do cytoplazmy jonów wapnia, które reagując z grupami hydrofilnymi tworzą związki kompleksowe z fosfolipidami, kwasami tłuszczowymi i białkami mitochondriów, naruszając trwale ich funkcję, głównie w zakresie oddychania i fosforylacji. Ponadto stwierdza się trwałą depolaryzację rybosomów. Może dochodzić również do uszkodzenia błon lizosomalnych /Dyk i wsp. 1972, Rechnagel, Glende 1973/.

Wnosząc z badań z użyciem czterochlorku węgla piętnowanego pierwiastkami promieniotwórczymi, nie przechodzi on do ośrodkowego układu nerwowego /Hemminki 1979/. a obraz zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym po jego stosowaniu sugeruje ich wyłącznie hepatogeny charakter /Mossakowski i wsp. 1970b/. Skłoniło to do wyboru tego właśnie modelu do

oceny zaburzeń metabolicznych stanowiących następstwo uszkodzenia wątroby.

## CEL PRACY

Celam badań była ocena metabolizmu amoniaku w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej i prześledzenie dynamiki jego ewentualnych zaburzeń w procesie kształtowania się morfologicznego zespołu wątrobowo-mózgowego.

Ze względu na odrębności dynamiki procesu patologicznego i zmian strukturalnych w różnych modelach doświadczalnych o odmiennym mechanizmie patogenetycznym, badania wykonano w dwóch grupach doświadczalnych, a mianowicie:

- grupę pierwszą stanowiły zwierzęta z chemicznym uszkodzeniem wątroby, prowadzącym do rozwoju marskości, której następstwem był w pełni ukształtowany morfologiczny zespół encefalopatii wątrobowej. W modelu tym u podłoża zespołu wątrobowo-mózgowego leżało pierwotne uszkodzenie wątroby, a czas trwania pozwala na jego traktowanie jako model przewlekły;
  - grupę drugą stanowiły zwierzęta z chirurgicznie wytworzonym zespoleniem żyły wrotnej z żyłą główną dolną, którego następstwem był rozwój typowej gliopatii wątrobowej w mózgu. W grupie tej u podłoża mózgowego procesu patologicznego leży nieprawidłowy przeciek krwi wrotnej do krążenia ogólnego, przy nieuszkodzonej wątrobie.
- Model ten w założeniu stanowił doświadczalny odpowiednik



tw. encefalopatii wrotno-układowej, a czas trwania doświadczenia pozwala na jego traktowanie jako model podostry.

Przedmiotem szczegółowej analizy była zawartość amoniaku i produktów jego metabolizmu w mózgu / $\alpha$ -ketoglutaran, glutaminian i glutamina/ oraz aktywność enzymów uczestniczących w poszczególnych etapach ich przemian /syntetaza glutaminowa, glutaminaza, transaminaza glutaminowa/ w kolejnych fazach rozwoju encefalopatii wątrobowej. W obu grupach doświadczalnych przeprowadzono również ocenę zawartości amoniaku w surowicy krwi.

## MATERIAŁ I METODY

### 1. Warunki doświadczalne.

Badania przeprowadzono na 8-tygodniowych szczurach rasy Wistar, samicach o ciężarze ciała około 180-220 g. Stosowano dwa układy doświadczalne:

- model chemicznego uszkodzenia wątroby wywołanego podawaniem  $\text{CCl}_4$ ;
- model zespolenia żyły wrotnej z żyłą główną dolną.

#### 1.1. Model chemicznego uszkodzenia wątroby.

W celu wywołania marskości wątroby zwierzętom wstrzykiwano podskórnio, co drugi dzień, roztwór  $\text{CCl}_4$  w płynnej parafinie, w dawce 0,1 ml na 100 g ciężaru ciała /Georgijew i wsp. 1968/. Zwierzęta kontrolne otrzymywały w tych samych warunkach i analogicznych objętościach podskórne iniekcje płynnej parafiny. Zwierzęta dekapitowano bez znieczulenia po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od pierwszej iniekcji. W chwili zakończenia doświadczenia, niezależnie od okresu jego trwania, wiek zwierząt wynosił 8 miesięcy. Miało to na celu wyeliminowanie ewentualnego wpływu wieku zwierząt na uzyskane wyniki. Bezpośrednio po dekapitacji do oznaczeń biochemicznych pobierano obie półkule mózgu.

## 1.2. Model zespoleniowy.

Zespolenie żyły wrotnej z żyłą główną dolną "koniec do boku" wykonywano w płytkiej narkozie eterowej według techniki podanej przez Lee i Fishera /1961/. Zwierzętom kontrolnym w płytkiej narkozie eterowej wykonywano tzw. "zabieg poronny". Zwierzęta dekapitowano bez znieczulenia po 3, 5, 10, 14 i 21 dniach od założenia zespolenia. Bezpośrednio po dekapitacji do oznaczeń biochemicznych pobierano obie półkule mózgu.

## 2. Metody.

### 2.1. Oznaczanie poziomu amoniaku we krwi.

Poziom amoniaku w surowicy krwi określano przy użyciu standardowych testów "Blood Ammonia Test" firmy Hyland. Zwierzętom w płytkiej narkozie eterowej pobierano strzykawką z prawej komory serca około 3 ml krwi. Krew odwirowywano przy 3.000 x g. Do oznaczeń używano uzyskaną surowicę, a badania przeprowadzano według zasad standardowej metody.

### 2.2. Oznaczanie zawartości amoniaku w mózgu.

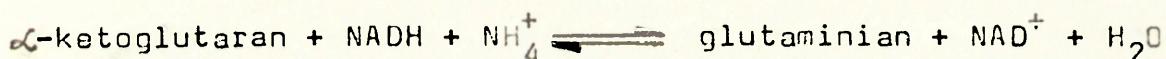
Przygotowanie materiału z mózgu do oznaczeń wykonywano według metody opisanej przez Sadasivudu i wsp. /1977/. Poziom amoniaku oznaczano przy zastosowaniu odczynnika Nesslera.

Ze świeżo pobranych półkul sporządzano 1% homogenaty, w oziębionym do temperatury ok. 4°C TCA, w homogenizatorze

typu szkło-szkło. Homogenaty wirowano 10 min. przy 2.000 x g. Do 1 ml uzyskanego nadsącza dodawano 0,5 ml odczynnika Nesslera i 2 ml wody redestylowanej. Gęstość optyczną roztworu odczytywano przy użyciu fotokolorymetru "Spekol" przy długości fali 420 nm.

### 2.3. Oznaczanie zawartości $\alpha$ -ketoglutaranu.

Poziom  $\alpha$ -ketoglutaranu oznaczano metodą spektrofotometryczną według Bergmeyera i Bernta /1963/ przy użyciu dehydrogenazy glutaminianowej. Dehydrogenaza glutaminianowa katalizuje reakcję:



W obecności nadmiaru jonów amonowych oraz NADH,  $\alpha$ -ketoglutaran jest równoważnikowo przekształcany w glutaminian. Na jeden mol przekształconego  $\alpha$ -ketoglutaranu przypada utlenienie jednego mola NADH. Miarą reakcji jest spadek absorpcji przy 340 lub 366 nm. Stopień utlenienia NADH mierzono w spektrofotometrze "Spectromom 202" przy długości fali 366 nm.

Półkule mózgu homogenizowano w 4 objętościach 0,6 M kwasu nadchlorowego / $\text{HClO}_4$ /, a następnie wirowano 10 min. przy 3.000 x g. Pobierano 4 ml nadsącza, doprowadzano do pH około 7,6 przy użyciu 1 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , odstawiano na 10 min. do lodu, a następnie odsączano wytrącczy  $\text{KClO}_4$  na sączku karbowanym. Przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej.

Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,75 ml przesącza i 0,05 ml NADH /ok.  $8 \times 10^{-3}$  M/. Odczytywano ekstynkcją początkową

wobec wody redestylowanej, poczym dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej /2 mg białka/ml/ zawieszonej w 2,8 M  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  i po 4 min. inkubacji w temperaturze 25°C ponownie odczytywano ekstynkcję. Z różnic ekstynkcji obliczano zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu porównując z krzywą wzorcową.

#### 2.4. Oznaczanie zawartości glutaminianu.

Poziom glutaminianu oznaczano metodą spektrofotometryczną według Bernta i Bergmeyera /1963/ przy użyciu dehydrogenazy glutaminianowej. Dehydrogenaza glutaminianowa katalizuje reakcję:



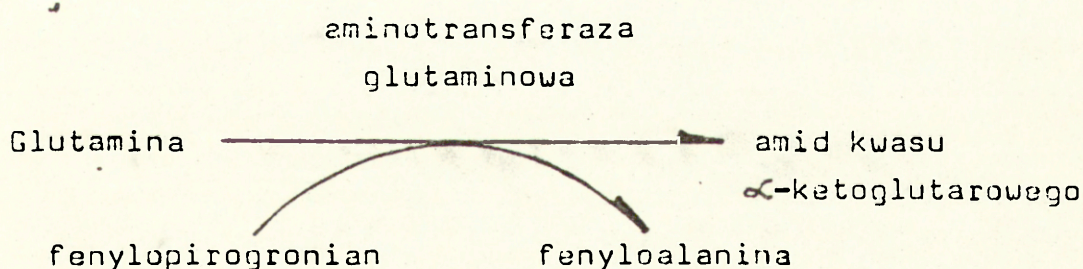
Równowaga reakcji przesunięta jest w lewo. Jednakże poprzez wychwytywanie  $\alpha$ -ketoglutaranu w reakcji z hydrazyną w obecności nadmiaru  $\text{NAD}^+$  i w alkalicznym środowisku /pH 9/ glutaminian jest równoważnikowo przekształcany w  $\alpha$ -ketoglutaran. Miarą reakcji jest wzrost absorpcji przy 340 lub 366 nm. Ekstynkcję zredukowanego  $\text{NAD}^+$  mierzono w spektrofotometrze "Spectromom 202" przy długości fali 366 nm.

Półkule mózgu homogenizowano w 4 częściach 0,6 M  $\text{HClO}_4$ , a następnie wirowano 10 min. przy 3.000 x g. Pobierano 3 ml nadsącza i doprowadzano do pH ok. 9 przy użyciu 2 M roztworu fosforanów / $\text{K}_3\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ / o pH ok. 12, odstawiano na 10 min. do lodu, a następnie odsączano wytrącony  $\text{KClO}_4$  na sączku karbowanym. Przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej.

Mieszanka reakcyjna zawierała: 3 ml buforu glicyno-hydrazynowego /0,5 M glicyny i 0,4 M hydrazyny o pH 9/; 0,2 ml przesączu /próba ślepa zawierała 0,2 ml wody redestylowanej/; 0,2 ml  $\text{NAD}^+$  /około  $3 \times 10^{-2}$  M/. Bezpośrednio odczytywano ekstynkcję, po czym dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej /ok. 10 mg białka/ml/ wolnej od jonów amonowych i ponownie odczytywano ekstynkcję po 30 min. Z różnicy ekstynkcji obliczano zawartość glutaminianu według wzoru podanego przez autorów metody.

#### 2.5. Oznaczanie zawartości glutaminy i aktywności aminotransferazy glutaminowej.

Poziom glutaminy oraz aktywność aminotransferazy glutaminowej /aminotransferaza L-glutamina: 2-okso-kwas EC 2.6.1.15/ oznaczano według swoistej spektrofotometrycznej metody Kupchika i Knoxa /1970/, wykorzystującej niżej przedstawioną reakcję:



Metoda oparta jest na procesie tworzenia kompleksu fenylopirogronianu /akceptor jonów amonowych/ z boranem, charakteryzującego się maksimum absorpcji światła przy 300 nm. Wykładnikiem zawartości glutaminy i aktywności enzymu jest spadek absorpcji kompleksu fenylopirogronian-enoloboran przy

długości fali 300 nm, który jest proporcjonalny do zawartości glutaminy i stężenia enzymu.

### 2.5.1. Zawartość glutaminy.

Poziom glutaminy oznaczano wykorzystując zasadę powyższej reakcji przy użyciu aminotransferazy glutaminowej zawartej w homogenacie nerki.

Świeżo pobrane półkule mózgu homogenizowano w 0,15 M KCl oziębionym do temperatury ok. 4°C /1 cz. tkanki + 4 cz. KCl/ w homogenizatorze typu szkło-szkło. Do oznaczeń używano homogenaty.

Mieszaniny inkubacyjne o końcowej objętości 1 ml i końcowym stężeniu buforu boranowego 0,3 M, pH 8,5 zawierały: 0,05 ml 20% homogenatu z nerki w 0,15 M KCl /źródło aminotransferazy glutaminowej/; 0,2 μmole kwasu fenylopirogronowego; 0,05 μmola L-glutaminy oraz 0,1 ml homogenatu mózgowego. Próby ślepe stanowiły mieszaniny nie zawierające homogenatu mózgowego bądź L-glutaminy.

Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C do prób dodawano po 0,1 ml 60% kwasu metafosforowego. Próby mieszano i odstawiano na 10 min., po czym ponownie mieszano w celu całkowitego odbiałczenia i wirowano przez 10 min. przy około 600 x g. Do 0,8 ml uzyskanego nadsącza dodawano po 0,4 ml buforu arsenowo-boranowego o pH 6,5 /3 M boran i 2 M arsenian/ i odstawiano na 30 min. celem doprowadzenia do całkowitej tautomeryzacji kompleksu. Po tym czasie odczytywano ekstynkcję w spektrofotometrze "Spectromom 202" przy długości

fali 300 nm w stosunku do wody. Zawartość glutaminy obliczano na podstawie wzoru podanego przez autorów metody.

### 2.5.2. Aktywność aminotransferazy glutaminowej.

Aktywność aminotransferazy glutaminowej oznaczano na podstawie pomiaru spadku absorpcji światła kompleksu fenylopirogronian-enoloboran. W wyniku reakcji transaminacji, fenylopirogronian jako akceptor jonów amonowych zostaje przekształcony w fenyloalaninę. Spadek absorpcji światła kompleksu wynikający ze zużycia w reakcji transaminacji fenylopirogronianu, jest liniowy w czasie i proporcjonalny do stężenia enzymu.

Świeżo pobrane półkule mózgu homogenizowano w oziębionym do temperatury około 4°C 0,15 M KCl /1 cz. tkanki + 4 cz. KCl/ w homogenizatorze typu szkło-szkło. Homogenaty wirowano przez 40 min. przy 165.000 x g. Do oznaczeń używano uzyskane nadsącze. Mieszanka inkubacyjna w końcowej objętości 1 ml zawierała: 0,1 ml 0,004 M fenylopirogronianu /sól jednosodowa/ w 0,02 M octanie sodowym o pH 5,0; 0,4 ml 0,75 M buforu boranowego o pH 8,5; 0,3 ml 0,2 M L-glutaminy; 0,1 ml wody redestylowanej i 0,1 ml nadsącza. Próba ślepa nie zawierała L-glutaminy. Całość mieszano i inkubowano przez ok. 20 min. w temperaturze 37°C. Ekstynkcją mierzono w odstępach 2-minutowych na spektrofotometrze "Spectromom 202" przy długości fali 300 nm.



## 2.6. Oznaczanie aktywności syntetazy glutaminowej.

Aktywność syntetazy glutaminowej /ligaza L-glutaminian: amoniak /ADP/ EC 6.3.1.2./ oznaczano według metody Rowe'a i wsp. /1970/ polegającej na pomiarze ilości  $\gamma$ -glutamylhydroksaminianu, powstałego w wyniku reakcji hydroksylaminy z glutaminą.

Ze świeżo pobranych półkul mózgu sporządzano 5% homogenat w 0,25 M sacharozie. 0,2 ml homogenatu dodawano do mieszaniny inkubacyjnej, która w końcowej objętości 0,9 ml zawierała: 50  $\mu$ moli buforu imidazol-HCl /pH 7,2/; 20  $\mu$ moli 2-merkaptoetanolu; 50  $\mu$ moli glutaminianu sodu; 100  $\mu$ moli hydroksylaminy; 20  $\mu$ moli  $MgCl_2$  i 10  $\mu$ moli ATP. Próba ślepa w miejsce glutaminianu sodu zawierała wodę redestylowaną. Inkubację prowadzono przez 15 min. w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 1,5 ml roztworu chlorku żelazowego /0,37 M  $FeCl_3$ ; 0,67 M HCl; 0,2 M TCA/, a następnie próby wirowano 10 min. przy 2.000 x g. Gęstość optyczną nadsącza oznaczano przy użyciu fotokolorymetru "Spekol" przy długości fali 520 nm.

Ilość powstałego  $\gamma$ -glutamylhydroksaminianu obliczano na podstawie jego absorbcji molowej /1  $\mu$ mol  $\gamma$ -glutamylhydroksaminianu daje absorbcję 0,340/.

## 2.7. Oznaczanie aktywności glutaminazy.

Aktywność glutaminazy /L-glutamino-amidohydrolaza EC 3.5.1.2./ w mózgu oznaczano zgodnie z metodą stosowaną

przez Mardaszewa i wsp. /1967/ polegającą na pomiarze ilości uwolnionego amoniaku w reakcji hydrolizy glutaminy katalizowanej przez ten enzym.

Ze świeżo pobranych półkul mózgu sporządzano 5% homogenaty w 0,32 M sacharozie. Mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 1 ml zawierała: 20 mM glutaminy; 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 mM EDTA /pH 8,0/ i około 1 mg białka homogenatu. Próby ślepe w miejsce homogenatu zawierały zagotowane białko lub wodę redestylowaną. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez okres 30 min. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 ml 10% TCA oziębionego do temperatury ok. 4°C. Próby wirowano przez 10 min. przy 2.000 x g. Następnie zbierano 0,25 ml supernatantu, dodawano 4,75 ml wody redestylowanej i 0,5 ml odczynnika Nesslera. Gęstość optyczną roztworu odczytywano na fotokolorymetrze "Spekol" przy długości fali 420 nm.

#### 2.8. Oznaczanie zawartości białka.

Białko oznaczano kolorymetryczną metodą Lowry i wsp. /1951/. Pomiar ekstynkcji wykonywano w fotokolorymetrze "Spekol" przy długości fali 750 nm.

#### 2.9. Metody statystycznej oceny wyników.

Znamiennosc statystyczną otrzymanych wyników oceniano przy użyciu testu t-Studenta.

## WYNIKI

W żadnym z dwóch zastosowanych modeli doświadczalnych zwierzęta nie dochodziły do stadium śpiączki wątrobowej. Nie stwierdzano również ogniskowych zespołów neurologicznych. W przypadku zatrucia czterochlorkiem węgla, poczynając od 4 miesiąca zatrucia, u większości zwierząt występowały objawy wodobrzusza. Zwierzęta stawały się apatyczne, mało ruchliwe, traciły apetyt, a ich sierść była matowa i przerzedzona. Podobne zmiany behawioru i wyglądu zwierząt stwierdzano po doświadczalnym zespoleniu żyły wrotnej z żyłą główną dolną, poczynając od 5 dnia po zabiegu. Odrębności uzyskanych wyników badań biochemicznych skłaniają do ich oddzielnego przedstawienia w obu modelach.

### 1. Zatrucie czterochlorkiem węgla.

#### 1.1. Zawartość amoniaku w surowicy krwi.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że w grupach zwierząt badanych po okresie 2, 4 i 6 miesięcy zatruwania nie występują statystycznie znamienne różnice w zawartości amoniaku w surowicy krwi w stosunku do wartości u zwierząt kontrolnych /tab. 1/.

Tabela 1.

Zawartość amoniaku w surowicy krwi szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatrucia /miesiące/	Amoniak / $\mu\text{g}\%$ /		p
	Kontrola	$\text{CCl}_4$	
2	* $159,7 \pm 0,6$ /3/	$167,2 \pm 17,4$ /5/	nz
4	$94,6 \pm 12,9$ /5/	$83,3 \pm 21,0$ /6/	nz
6	$120,6 \pm 7,4$ /5/	$116,4 \pm 10,0$ /7/	nz

\* - średnia arytmetyczna  $\pm$  SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

### 1.2. Zawartość amoniaku w mózgu.

Wyniki przedstawione w tabeli 2 wskazują, że po 2-miesięcznym okresie podawania czterochlorku węgla nie dochodzi

Tabela 2.

Zawartość amoniaku w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatrucia /miesiące/	Amoniak / $\mu\text{mole/kg}$ tkanki/		p
	Kontrola	$\text{CCl}_4$	
2	* $0,22 \pm 0,03$ /12/	$0,22 \pm 0,02$ /12/	nz
4	$0,22 \pm 0,02$ /12/	$0,36 \pm 0,03$ /13/	< 0,01
6	$0,22 - 0,03$ /12/	$0,46 - 0,03$ /12/	< 0,01

Oznaczenia jak w tabeli 1.

do zmian w zawartości amoniaku w mózgu w stosunku do wartości kontrolnych. W następnych przedziałach czasowych, tj. po 4 i 6 miesiącach następuje jego wyraźny wzrost, który wynosi odpowiednio 64 i 110%.

### 1.3. Zawartość $\alpha$ -ketoglutaranu.

U zwierząt z 2-miesięcznym zatrutowaniem zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu nie ulega istotnym zmianom w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Po 4 miesiącach obserwuje się natomiast jego wyraźny spadek o około 37% w stosunku do kontroli. Po 6 miesiącach spadek ten utrzymuje się nadal i wynosi około 40% wartości kontrolnej /tab. 3/.

Tabela 3.

Zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatrównania /miesiące/	$\alpha$ -ketoglutaran / $\mu$ mole/kg tkanki/		
	Kontrola	CCl <sub>4</sub>	p
2	*38,4 <sup>±</sup> 2,7 /5/	38,2 <sup>±</sup> 5,8 /5/	nz
4	38,8 <sup>±</sup> 1,5 /4/	24,6 <sup>±</sup> 3,1 /5/	< 0,01
6	38,5-2,3 /4/	23,0-3,1 /5/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

#### 1.4. Zawartość glutaminianu.

Po 2 miesiącach zatrucia dochodzi do niewielkiego, wynoszącego około 3% obniżenia zawartości glutaminianu w mózgu. U zwierząt z 4-miesięcznym zatruciem zawartość glutaminianu w mózgu nie różni się w sposób istotny od stwierdzonego w grupie zwierząt kontrolnych. Po 6 miesiącach obserwuje się jego ponowny nieznaczny spadek wynoszący około 3% /tab. 4/.

Tabela 4.

Zawartość glutaminianu w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatrucia /miesiące/	Glutaminian /mmole/kg tkanki/		
	Kontrola	CCl <sub>4</sub>	p
2	*12,7 <sup>±</sup> 0,2 /6/	12,3 <sup>±</sup> 0,2 /6/	< 0,01
4	12,5 <sup>±</sup> 0,2 /6/	12,6 <sup>±</sup> 0,3 /6/	nz
6	12,8 <sup>±</sup> 0,2 /6/	12,4 <sup>±</sup> 0,1 /6/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

#### 1.5. Zawartość glutaminy.

Po 2-miesięcznym doświadczalnym zatruciu dochodzi do niewielkiego, około 13%, a po 4 miesiącach do znacznego, wynoszącego około 133% wzrostu zawartości glutaminy w mózgu.

W grupie zwierząt z 6-miesięcznym okresem trwania doświadczenia następuje spadek zawartości substratu do poziomu kontrolnego /tab. 5/.

Tabela 5.

Zawartość glutaminy w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatruwania /miesiące/	Glutamina /mmole/kg tkanki/		
	Kontrola	CCl <sub>4</sub>	p
2	*5,18 <sup>±</sup> 0,26 /6/	5,83 <sup>±</sup> 0,59 /8/	< 0,05
4	5,31 <sup>±</sup> 0,51 /5/	12,35 <sup>±</sup> 1,80 /7/	< 0,01
6	5,47 <sup>±</sup> 0,33 /4/	6,37 <sup>±</sup> 1,18 /6/	nz

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

#### 1.6. Aktywność syntetazy glutaminowej.

Wyniki przedstawione w tabeli 6 wskazują, że po 2- i 4-miesięcznym okresie podawania czterochlorku węgla dochodzi do wzrostu aktywności enzymu w mózgu, odpowiednio o około 10 i 20% w stosunku do wartości kontrolnych, a po 6 miesiącach do jej nieznacznego, statystycznie nieznamiennego obniżenia /tab. 6/.

Tabela 6.

Aktywność syntetazy glutaminowej w mózgu szczura  
w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatrutowania /miesiące/	Syntetaza glutaminowa /μmole γ-glutamylhydroksaminianu/g tkanki/godz/		
	Kontrola	CCl <sub>4</sub>	p
2	*54,66 <sup>±</sup> 7,98 /12/	60,05 <sup>±</sup> 5,39 /12/	< 0,05
4	59,80 <sup>±</sup> 7,13 /12/	71,57 <sup>±</sup> 6,56 /12/	< 0,01
6	56,62 <sup>±</sup> 8,61 /12/	50,49 <sup>±</sup> 6,25 /12/	nz

Oznaczenia jak w tabeli 5.

#### 1.7. Aktywność aminotransferazy glutaminowej.

Zwraca uwagę bardzo niska aktywność enzymu w mózgu zwierząt kontrolnych, co jest zgodne zresztą z obserwacjami autorów metody jej oznaczania /Kupchik, Konx 1970/. Ponieważ wartości pomiarów mieściły się w dolnych granicach czułości metody, uzyskanych wyników nie poddawano analizie statystycznej. W żadnym przypadku różnica między skrajnymi wynikami nie przekraczały 15%.

W pierwszym okresie zatrutowania, to jest po upływie 2 miesięcy, nie obserwuje się zmian w aktywności enzymu. Po 4 miesiącach dochodzi jednak do jej znacznego, wynoszącego około 150% wzrostu. Po 6 miesiącach natomiast obserwuje się jej powrót do poziomu kontrolnego /tab. 7/.



Tabela 7.

Aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatruwania /miesiące/	Aminotransferaza glutaminy	
	Kontrola	Badane /zmiana w %/
2	** 0,02 jednostki/ g tkanki	0 /8/
4		+133 /6/
6		0 /6/

\*\* - Wartość kontrolną stanowi średnia z 12 oznaczeń. Aktywność enzymu w grupach badanych ustalono na podstawie liczby pomiarów zaznaczonych w nawiasach. Wyników nie opracowywano statystycznie, ponieważ odchylenia standardowe mieściły się w granicach błędów metody.

### 1.8. Aktywność glutaminazy.

Wyniki przedstawione w tabeli 8 wskazują, że po 2 miesiącach zatrucia nie występują zmiany w aktywności enzymu. Obecny jest natomiast jej 43% wzrost po 4 miesiącach i 100% po 6 miesiącach podawania czterochlorku węgla /tab. 8/.

Tabela 8.

Aktywność glutaminazy w mózgu szczura w przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla.

Okres zatruwania /miesiące/	Aktywność glutaminazy /μmole NH <sub>3</sub> /mg białka/godz/		
	Kontrola	CCl <sub>4</sub>	p
2	*2,26 <sup>±</sup> 0,03 /4/	2,38 <sup>±</sup> 0,18 /4/	nz
4	2,81 <sup>±</sup> 0,23 /5/	4,02 <sup>±</sup> 0,70 /6/	< 0,01
6	2,96 <sup>±</sup> 0,41 /5/	5,94 <sup>±</sup> 0,34 /7/	< 0,01

Oznaczenia jak w tabeli 5.

2. Zespole nie żyły wrotnej z żyłą główną dolną.

2.1. Zawartość amoniaku w surowicy krwi.

W pierwszym etapie doświadczenia, tj. po 3 dniach od wykonania zabiegu chirurgicznego zawartość amoniaku w surowicy krwi nie ulega zmianie w stosunku do stwierdzonej u zwierząt kontrolnych. W pozostałych przedziałach czasowych, tj. po 5, 10, 14 i 21 dniach od założenia przetoki żyłnej obserwuje się postępujący, statystycznie znamienne wzrost zawartości amoniaku, wynoszący odpowiednio około 10, 25, 48 i 74% /tab. 9/.

Tabela 9.

Zawartość amoniaku w surowicy krwi szczura w zespole niu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Amoniak / $\mu$ g%/		
	Kontrola	Zespolenie	p
3	*111,4 $\pm$ 8,0 /5/	110,8 $\pm$ 8,5 /6/	nz
5	109,4 $\pm$ 7,8 /6/	120,6 $\pm$ 6,6 /7/	< 0,05
10	114,9 $\pm$ 8,6 /6/	143,7 $\pm$ 8,9 /7/	< 0,01
14	111,6 $\pm$ 8,2 /6/	165,0 $\pm$ 12,0 /7/	< 0,01
21	110,8-8,6 /6/	199,4-11,0 /7/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna  $\pm$  SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienne

## 2.2. Zawartość amoniaku w mózgu.

W 3 dni po założeniu przetoki żyłnej, analogicznie jak w przypadku surowicy krwi, nie obserwuje się zmian w zawartości amoniaku w mózgu. W pozostałych fazach doświadczenia, tj. po 5, 10, 14 i 21 dniach od zabiegu chirurgicznego występuje postępujący, statystycznie znamieny przyrost jego zawartości, który wynosi odpowiednio około 14, 28, 43 i 111% /tab. 10/.

Tabela 10.

Zawartość amoniaku w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Amoniak / $\mu$ mole/kg tkanki/				
	Kontrola		Zespolenie		p
3	*0,24 $\pm$ 0,03	/6/	0,23 $\pm$ 0,03	/7/	
5	0,21 $\pm$ 0,02	/6/	0,24 $\pm$ 0,02	/7/	< 0,01
10	0,25 $\pm$ 0,01	/6/	0,32 $\pm$ 0,02	/6/	< 0,01
14	0,30 $\pm$ 0,02	/6/	0,43 $\pm$ 0,01	/8/	< 0,01
21	0,27 $\pm$ 0,04	/6/	0,57 $\pm$ 0,03	/8/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna  $\pm$  SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

### 2.3. Zawartość $\alpha$ -ketoglutaranu.

W dwu kolejnych wczesnych okresach po zespoleniu żylnym, tj. w 3 i 5 dniu zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu nie ulega zmianie w stosunku do stwierdzonej u zwierząt kontrolnych. Natomiast kolejne przedziały czasowe, tj. 10, 14 i 21 dzień po zabiegu przynoszą wzrost jego zawartości, wynoszący odpowiednio 10, 15 i 19% /tab. 11/.

Tabela 11.

Zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	$\alpha$ -ketoglutaran / $\mu$ mole/kg tkanki/		
	Kontrola	Zespolenie	p
3	*41,0 <sup>±</sup> 2,9 /6/	43,3 <sup>±</sup> 3,6 /7/	nz
5	43,6 <sup>±</sup> 4,6 /6/	42,8 <sup>±</sup> 4,2 /7/	nz
10	43,1 <sup>±</sup> 2,3 /6/	47,4 <sup>±</sup> 3,3 /7/	< 0,05
14	43,3 <sup>±</sup> 3,0 /6/	50,0 <sup>±</sup> 1,9 /7/	< 0,01
21	44,1 <sup>±</sup> 4,7 /6/	52,6 <sup>±</sup> 3,1 /7/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienne

## 2.4. Zawartość glutaminianu.

Podobnie jak w przypadku  $\alpha$ -ketoglutaranu, po 3 i 5 dniach od wykonania przetoki żyłnej nie stwierdza się zmian w zawartości glutaminianu w mózgu w stosunku do zwierząt kontrolnych. W dalszych przedziałach czasowych natomiast, tj. po 10, 14 i 21 dniach występuje jego postępujący spadek odpowiednio o 6, 8 i 11% /tab. 12/.

Tabela 12.

Zawartość glutaminianu w mózgu szczura w zespoleniu urotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Glutaminian /mmole/kg tkanki/		
	Kontrola	Zespolenie	p
3	*10,50 $\pm$ 0,30 /6/	10,12 $\pm$ 0,60 /7/	nz
5	10,89 $\pm$ 0,39 /6/	10,46 $\pm$ 0,37 /6/	nz
10	11,03 $\pm$ 0,39 /6/	10,37 $\pm$ 0,46 /6/	< 0,05
14	10,98 $\pm$ 0,62 /6/	10,12 $\pm$ 0,05 /7/	< 0,01
21	10,72 $\pm$ 0,47 /6/	9,55 $\pm$ 0,21 /7/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna  $\pm$  SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienne

## 2.5. Zawartość glutaminy.

Wyniki przedstawione w tabeli 13 wskazują, że od najwcześniejszego badanego okresu, tj. od 3 dni po utworzeniu przetoki żyłnej do końca obserwacji występuje systematyczny, statystycznie znamieny wzrost zawartości glutaminy w mózgu w stosunku do grup kontrolnych. Wynosi on odpowiednio około 15% dla 3 dni, 20% - 5 dni, 44% - 10 dni, 66% - 14 dni i 163% - 21 dni /tab. 13/.

Tabela 13.

Zawartość glutaminy w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Glutamina /mmole/kg tkanki/		
	Kontrola	Zespolenie	p
3	*6,06 <sup>±</sup> 0,23 /5/	6,97 <sup>±</sup> 0,85 /7/	< 0,05
5	6,01 <sup>±</sup> 0,29 /5/	7,19 <sup>±</sup> 0,68 /7/	< 0,01
10	6,15 <sup>±</sup> 0,65 /5/	8,84 <sup>±</sup> 0,72 /7/	< 0,01
14	5,87 <sup>±</sup> 0,16 /5/	9,97 <sup>±</sup> 0,55 /5/	< 0,01
21	5,76 <sup>±</sup> 0,43 /5/	15,13 <sup>±</sup> 0,94 /6/	< 0,01

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

## 2.6. Aktywność syntetazy glutaminowej.

W 3 dni od wykonania zabiegu chirurgicznego nie stwierdza się różnic w aktywności enzymu w stosunku do wartości kontrolnych. Po 5, 10 i 14 dniach trwania zespolenia żylnego dochodzi do wzrostu aktywności enzymu. Przyrost ten wynosi odpowiednio około 18, 31 i 30%. W 21 dniu doświadczenia aktywność enzymu jest nadal wyższa od wartości kontrolnych, ale różnica ta nie jest statystycznie znamienne /tab. 14/.

Tabela 14.

Aktywność syntetazy glutaminowej w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Syntetaza glutaminowa		
	/μmole γ-glutamylhydroksaminianu/g tkanki/godz/		p
	Kontrola	Zespolenie	
3	*53,92 <sup>±</sup> 7,59 /6/	53,78 <sup>±</sup> 6,51 /7/	nz
5	51,47 <sup>±</sup> 6,10 /6/	60,50 <sup>±</sup> 3,74 /7/	< 0,01
10	50,49 <sup>±</sup> 5,71 /6/	65,97 <sup>±</sup> 12,35 /7/	< 0,05
14	50,98 <sup>±</sup> 6,35 /6/	66,39 <sup>±</sup> 6,55 /7/	< 0,01
21	54,90 <sup>±</sup> 4,80 /6/	61,39 <sup>±</sup> 9,23 /8/	nz

\* - średnia arytmetyczna <sup>±</sup> SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienne

## 2.7. Aktywność aminotransferazy glutaminowej.

We wszystkich okresach po wytworzeniu zespolenia żyl- nego obecny jest wzrost aktywności enzymu w porównaniu do wartości kontrolnych. Wynosi on odpowiednio 100% po 3, 200% po 5, 250% po 10 i 300% po 14 dniach. Po 21 dniach następuje spadek aktywności enzymu w stosunku do grupy 14-dniowej, do poziomu wyższego o około 30% od wartości kontrolnej /tab. 15/.

Tabela 15.

Aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Aminotransferaza glutaminy	
	Kontrola	Badane /zmiana w %/
3		+ 100 /6/
5	**	+ 200 /7/
10	0,02 jednostki/	+ 250 /6/
14	g tkanki	+ 300 /6/
21		+ 50 /6/

\*\* - Wartość kontrolną stanowi średnia z 25 oznaczeń. Aktywność enzymu w grupach badanych ustalono na podstawie liczby pomiarów zaznaczonych w nawiasach. Wyników nie opracowywano statystycznie, bowiem z wyjątkiem grupy 14-dniowej, odchylenia standardowe w poszczególnych grupach mieściły się w granicach błędów metody.



## 2.8. Aktywność glutaminazy.

Wartości przedstawione w tabeli 16 wskazują, że we wszystkich przedziałach czasowych po wykonaniu zabiegu chirurgicznego aktywność enzymu utrzymuje się niezmiennie na poziomie wartości kontrolnych /tab. 16/.

Tabela 16.

Aktywność glutaminazy w mózgu szczura w zespoleniu wrotno-układowym.

Okres trwania zespolenia /dni/	Aktywność glutaminazy / $\mu$ mole $\text{NH}_3$ /mg białka/godz/		
	Kontrola	Zespolenie	p
3	*3,32 $\pm$ 0,91 /5/	3,48 $\pm$ 0,63 /7/	nz
5	3,65 $\pm$ 0,71 /5/	3,75 $\pm$ 1,06 /6/	nz
10	3,35 $\pm$ 0,75 /5/	3,46 $\pm$ 0,92 /5/	nz
14	3,23 $\pm$ 0,49 /5/	2,93 $\pm$ 1,06 /8/	nz
21	3,95 $\pm$ 0,39 /5/	3,44 $\pm$ 0,36 /7/	nz

\* - średnia arytmetyczna  $\pm$  SD

/ / - liczba zwierząt

p - prawdopodobieństwo

nz - różnica statystycznie nieznamienna

## OMÓWIENIE I Dyskusja

Zastosowane modele doświadczalne, których cechą wspólną są strukturalne nieprawidłowości ośrodkowego układu nerwowego, charakterystyczne dla encefalopatii wątrobowej /Kossakowski i wsp. 1970b, Mossakowski i wsp. 1977/, różnią się między sobą mechanizmem patogenetycznym. W przypadku zatrucia czterochlorkiem węgla występuje powoli, lecz stale postępujący proces uszkodzenia wątroby, prowadzący w końcowej fazie doświadczenia do jej marskości. W modelu żylnego zespolenia wrotno-układowego dochodzi natomiast do omijającego, niezmienną przez cały czas, wątrobę przepływu krwi żylną, pochodzącej z łożyska jelitowego. Udmienności te znajdują swój wyraz między innymi w różnicach w zawartości amoniaku we krwi zwierząt. W modelu zatrucia czterochlorkiem węgla przez cały czas doświadczenia utrzymuje się normoamonemia, podczas gdy w zespoleniu żylnym obserwuje się narastającą w czasie hiperamonemię. Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że w obu grupach doświadczalnych zwierzęta nie dochodziły do stanu, który mógłby odpowiadać klinicznemu zespołowi śpiączki wątrobowej, mimo wykształcania się charakterystycznego obrazu nieprawidłowości strukturalnych w mózgu. Nawet w przewlekłej grupie intoksykacyjnej z rozwinętą marskością wątroby, nie występuje załamanie jej wydolności, wyrażające się hiperamonemią.

Wzrost zawartości amoniaku we krwi stwierdza się w znacznej większości przypadków śpiączki wątrobowej u ludzi, stanowiącej następstw przewlekłego i ostrego uszkodzenia wątroby /Adams, Folley 1953, Bessman, Bessman 1955, Gabuzda, Davidson 1969, Fischer 1974, Mossakowski i wsp. 1974, Neumann i wsp. 1978/. Obok nich występują jednakże przypadki niewydolności wątroby ze śpiączką bez wzrostu amoniaku w surowicy krwi /Phillips i wsp. 1952, Fischer 1974, Kassur i wsp. 1974, Zieve 1979/. Wzrost amoniaku w surowicy krwi jest natomiast stałym zjawiskiem w przypadkach wrotno-układowej przetoki żyłnej, zarówno w warunkach klinicznych jak i doświadczalnych /Mc Dermot, Adams 1954, Sherlock i wsp. 1956, Mossakowski, Paluszkiewicz-Szymchel 1964, Kyu, Cavanagh 1970, Cavanagh, Kyu 1971, Hindfeld 1975, Hindfeld i wsp. 1977/.

Amoniak znajdujący się we krwi swobodnie przedostaje się z łożyska naczyniowego do mózgu, podlegając tu dalszym przemianom. Vergara i wsp. /1974/ stwierdzili, że wzrostowi poziomu amoniaku we krwi towarzyszy proporcjonalny wzrost jego zawartości w ośrodkowym układzie nerwowym, a Hawkins i wsp. /1973/, Duffy i wsp. /1974/ oraz Hindfeld/1975/ w badaniach prowadzonych zarówno na modelu ostrej hiperamonemii, uzyskanej przez dożylnie iniekcje octanu amonu, jak i w doświadczalnym zespoleniu wrotno-układowym, wykazali wpływ wzrostu poziomu amoniaku na proporcjonalny przyrost zawartości  $\alpha$ -ketoglutaranu i glutaminy przy jednoczesnym obniżeniu stężenia glutaminianu w mózgu.

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy w obu modelach encefalopatii wątrobowej stwierdzono zaburzenie przemiany amoniaku w mózgu. Wyrażały się one nieprawidłową zawartością substratów stanowiących produkty jego metabolizmu oraz zmienioną aktywnością uczestniczących w tym procesie enzymów. Obok cech wspólnych dla obu typów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, występowały również istotne odrębności metaboliczne, świadczące niewątpliwie o różnicach przebiegu procesu patologicznego i jego dynamice, a zapewne również i odmienności mechanizmu patogenetycznego.

Zjawiskiem wspólnym dla obu badanych modeli był postępujący w czasie doświadczenia wzrost zawartości amoniaku w mózgu. Na podkreślenie zasługuje przy tym fakt, że dynamika zmian jego zawartości była zgodna z narastaniem nieprawidłowości strukturalnych astrocytów /Kossakowski i wsp. 1970b, Kossakowski i wsp. 1977/. Neumann i wsp. /1978/ w przypadku marskości wątroby, a Colombo i Bachmann /1978/ w zespoleniu żylnym stwierdzili, że wysoki poziom amoniaku w mózgu prowadzi do wzrostu aktywności dehydrogenazy glutaminianowej, co powoduje przesunięcie stanu równowagi reakcji w kierunku tworzenia glutaminianu z  $\alpha$ -ketoglutaranu. Glutaminian z kolei zostaje natychmiast przekształcony do glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową. W badaniach własnych, prowadzonych na modelu intoksykacyjnym stwierdzono, że w miarę wzrastania poziomu amoniaku w mózgu dochodzi do proporcjonalnego obniżenia zawartości  $\alpha$ -ketoglutaranu z praktycznie niezmienioną pulą glutaminianu. Obserwacje te są zgodne z donie-

sieniami Bessmana i Bessman /1955/ i Neumann i wsp. /1978/ oraz z ogólną patogenetyczną hipotezą Mossakowskiego /1978/, według której w mechanizmie rozwoju gliopatii wątrobowej podstawową rolę odgrywa upośledzenie detoksykacji amoniaku, związane z niedoborem  $\alpha$ -ketoglutaranu. W zespole niernym natomiast wzrostowi zawartości amoniaku w mózgu towarzyszy stopniowe zwiększanie poziomu  $\alpha$ -ketoglutaranu z równoczesnym proporcjonalnym obniżeniem puli glutaminianu.

Rozbieżności metaboliczne w obydwu modelach doświadczalnych obserwuje się również w dalszych etapach cyklu detoksykacji amoniaku. Kolejną jego fazą jest tworzenie się glutaminy z glutaminianu. W zespole niernym poziom glutaminy systematycznie rośnie w kolejnych przedziałach czasowych doświadczenia, podczas gdy w modelu intoksykacyjnym jej poziom początkowo wzrasta również, by w końcowej fazie doświadczenia, przy w pełni rozwiniętym zespole morfologicznym encefalopatii, obniżyć się do poziomu kontrolnego. Na uwagę zasługuje również fakt, że przedstawione powyżej zmiany w zawartości glutaminy w zespole niernym zachodzą z niezmienną przez cały czas aktywnością glutaminazy /enzym katalizujący rozkład glutaminy/, a w modelu zatrucia czterochlorkiem węgla aktywność tego enzymu rośnie w czasie trwania doświadczenia.

Wydaje się, że zaobserwowane różnice w obu modelach encefalopatii wątrobowej mogą być następstwem różnej dostępności  $\alpha$ -ketoglutaranu jako czynnika warunkującego detoksykację amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Według Neumann

i wsp. /1978/ w modelu zespolenia wrotno-układowego amoniak włączany jest do  $\alpha$ -ketoglutaranu z jednoczesnym wytwarzaniem glutaminianu. Można przypuszczać, że część wytworzonego glutaminianu ulega przemianie do glutaminy, co powoduje jej wzrost "netto"; wzrost ten bowiem nie jest kompensowany przez działanie glutaminazy, której aktywność utrzymuje się na niezmiennym poziomie. Druga część glutaminianu może ulegać procesowi transaminacji, w którym biorcą amoniaku jest pirogronian lub szczawiooctan. W konsekwencji prowadzi to do zwrotnego wytwarzania  $\alpha$ -ketoglutaranu, którego poziom znacznie wzrasta w tym modelu doświadczalnym. W przypadku intoksykacyjnej marskości wątroby większość glutaminianu jest przekształcana w glutaminę, a w wyniku wzmożonej aktywności glutaminazy uwalniane są znaczne ilości amoniaku, który dodatkowo obciąża cykl detoksykacyjny z jednoczesnym spadkiem poziomu  $\alpha$ -ketoglutaranu.

W obserwacjach przeprowadzonych w obydwu modelach doświadczalnych zwracają uwagę stosunkowo niewielkie zmiany w poziomie glutaminianu w mózgu. Wydaje się, że fakt ten można wiązać ze znanym zjawiskiem jego kompartmentacji w ośrodkowym układzie nerwowym. Na podstawie szeregu badań, przedstawionych szczegółowo w pracach Fischera /1974/ i Baxtera /1976/ wiadomo, że w mózgu istnieją dwie pule glutaminianu: tzw. "mała pula", związana z komórkami glejowymi i prawdopodobnie również z perykarionami komórek nerwowych, oraz "pula duża" związana z zakończeniami nerwowymi i terminalnymi dendrytami. Obie pule komunikują się ze sobą bardzo wolno. W procesie

detoksykacji amoniaku glutamina syntetyzowana jest z szybko metabolizującej się puli glutaminianu, stanowiącej tzw. mały przedział metaboliczny, charakteryzujący się stałym poziomem w komórce. Powstająca w nim glutamina transportowana jest do dużego przedziału, gdzie może ulegać ponownemu przekształceniu do glutaminianu, który z kolei przenoszony jest do małego przedziału metabolicznego. Można więc przypuszczać, że praktycznie stały poziom glutaminianu w komórce jest wynikiem jego bardzo szybkiego dalszego metabolizmu do glutaminy. Potwierdzeniem tej hipotezy są obserwacje Meistera /1980/, poczynione w badaniach nad metabolizmem glutaminy. W serii badań z podawaniem  $^{15}\text{NH}_3$  kotom w perfuzji do tętnicy szyjnej wspólnej wykazano, że znakowany azot w większym stopniu wbudowany był do grupy  $\alpha$ -aminowej glutaminy niż glutaminianu. W innych doświadczeniach przy użyciu  $^{13}\text{NH}_3$  stwierdzono, że rozkład znakowanego azotu między grupą  $\alpha$ -aminową glutaminianu i glutaminy oraz grupą amidową glutaminy wynosił 1:5:400.

Na odrębną uwagę zasługuje zbieżność zachowania się syntezy glutaminy oraz jej dalszego metabolizmu we wczesnej fazie obu modeli doświadczalnych. W obu przypadkach w tym okresie dochodzi do znacznego przyrostu zawartości glutaminy oraz aktywności transaminazy glutaminowej, enzymu katalizującego jej przekształcanie się do  $\alpha$ -ketoglutaraminianu. W świetle tych spostrzeżeń można przypuszczać, że w warunkach encefalopatii wątrobowej, stanowiącej przedmiot własnych badań, dochodzi do znacznego przyrostu zawartości  $\alpha$ -ketoglutaraminianu w mózgu. Jego wysokie neurotoksyczne właściwości wykazali

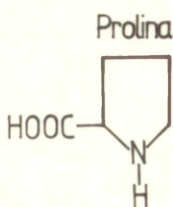
Duffy i wsp. /1974/ oraz Vergara i wsp. /1974/. Podawali oni szczurom sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy, zawierający  $\alpha$ -ketoglutaraminian w różnym stężeniu w perfuzji do komory bocznej mózgu. Przy wykonywaniu perfuzji w późnych godzinach popołudniowych, niskie dawki substancji /10 mM/ prowadziły do ponad 50% spadku nocnej aktywności ruchowej zwierząt. Dawka 10-krotnie wyższa już w 5 min. po perfuzji wywoływała nieprawidłowe zachowanie zwierząt i objawy neurologiczne, charakteryzujące się między innymi ruchami rotacyjnymi i przerywanymi klonicznymi drgawkami. Badania nad zawartością  $\alpha$ -ketoglutaraminianu w płynie mózgowo-rdzeniowym u ludzi ze śpiączką wątrobową wykazały około 10-krotny wzrost jego poziomu /Vergara i wsp. 1974/. Autorzy ci uważają, że ocena poziomu  $\alpha$ -ketoglutaraminianu w płynie mózgowo-rdzeniowym może być ważnym diagnostycznym wykładnikiem śpiączki wątrobowej, a jego nagromadzenie w ośrodkowym układzie nerwowym może odgrywać istotną rolę w jej patogenezie.

Do wzrostu zawartości  $\alpha$ -ketoglutaraminianu w mózgu może dojść przy znacznym nagromadzeniu glutaminy i odpowiednio wysokiej aktywności transferazy glutaminowej. Oba te warunki istnieją we wczesnej fazie zastosowanych w badaniach własnych modeli doświadczalnych encefalopatii wątrobowej. Reakcja transaminacji wymaga jednakże sprzężenia z odpowiednim  $\alpha$ -ketokwasem, stanowiącym akceptor grupy aminowej. Cooper i Meister /1973/ stwierdzili, że największą aktywność transaminazy glutaminowej uzyskuje się, gdy jako  $\alpha$ -ketokwasów używa się fenylopirogronianu lub  $\alpha$ -ketometyonyloksaloalanu.



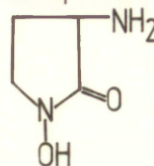
Zawartość tych związków w mózgu u encefalopatii wątrobowej nie była jednakże oceniana ani u ludzi, ani u zwierząt doświadczalnych. Z szeregu innych prac wiadomo skądinąd, że zarówno u ludzi jak i zwierząt w warunkach encefalopatii wątrobowej dochodzi do znacznego wzrostu poziomu fenyloalaniny i metioniny we krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym /Richmond, Girdwood 1962, Job i wsp. 1970, Rosen i wsp. 1977/. Wzrost poziomu tych związków, stanowiących bezpośrednio produkty transaminacji wymienionych powyżej  $\alpha$ -ketokwasów, w mózgu zwierząt z upośledzoną funkcją wątroby wykazali ponadto Mattson i wsp. /1970/ oraz Record i wsp. /1976/. Spostrzeżenia te stanowią poparcie dla koncepcji Duffy'ego i wsp. /1974/, którzy przypuszczają, że w przypadku śpiączki wątrobowej istnieją sprzyjające warunki do wzmożonej syntezy  $\alpha$ -ketoglutaraminianu.

$\alpha$ -ketoglutaraminian może występować w dwóch różnych izomerycznych formach - jako  $\alpha$ -ketokwas o otwartym łańcuchu lub jako  $\beta$ -laktam 2-hydroksy-5-ketoprolina /ryc. 2/. Współistnienie tych izomerów jest zależne od pH środowiska /Meister 1953/. W pH powyżej 9 dominuje forma cykliczna. W wielu pracach stwierdzono, że strukturalne analogi tego cyklicznego izomeru wywierają farmakologiczny wpływ na tkankę nerwową. Van Harreveld i Fifkova /1971, 1973/ wykazali, że prolina i 5-ketoprolina są antagonistami wychwyty glutaminianu w skrawkach siatkówki, zmieniającymi jej właściwości fizjologiczne, uzyskiwane przez podawanie glutaminianu *in vitro*.



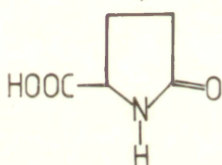
Blok wychwytu glutaminianu w siatkówce /Van Harreveld i Firkowa, 1973/

1-hydrokso-3-aminopirolidon-2-on



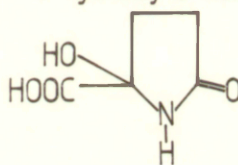
Blok receptora glutaminianowego /Davis, Watkins 1972; Curtis i wsp. 1973/

5-ketoprolina



Znoszenie wpływu glutaminianu w siatkówce /Van Harreveld, Firkowa 1971/

2-hydrokso-5-ketoprolina



Inhibitor konkurencyjny receptora glutaminianowego?

Ryc. 2. Biologiczne efekty strukturalnych analogów cyklicznej formy  $\alpha$ -keto-glutaraminianu (2-hydrokso-5-ketoproliny). /Wg. Vergara i wsp. 1974/

Davis i Watkins /1972/ oraz Curtis i wsp. /1973/ stwierdzili, że syntetyczny związek 1-hydrokso-3-aminopirolidon-2-on selektywnie blokuje wpływ kwasu glutaminowego i asparaginowego na neurony korowe i rdzeniowe. Jeżeli więc naturalna 2-hydrokso-5-ketoprolina ma działanie podobne, to jej nagromadzenie w mózgu może zaburzać czynność tkanki nerwowej na drodze konkurencji z receptorami kwasu glutaminowego. Taki mechanizm mógłby stanowić teoretyczną podstawę korzystnego leczniczego wpływu glutaminianu w niektórych postaciach śpiączki wątro-

bowej /Walshe 1953/. Duffy i wsp. /1974/ przypuszczają, że zahamowanie syntezy  $\alpha$ -ketoglutaraminianu może wpływać na zniesienie niektórych przynajmniej objawów neurologicznych w ostrych chorobach wątroby.

Na podstawie przedstawionych powyżej danych można założyć, że we wczesnym okresie encefalopatii wątrobowej w obu modelach doświadczalnych podstawowym czynnikiem uszkadzającym jest przede wszystkim amid kwasu  $\alpha$ -ketoglutarowego. Można wnioskować o tym również ze wspomnianych powyżej badań Duffy'ego i wsp. /1974/, którzy wykazali proporcjonalną zależność między stężeniem amoniaku i glutaminy a zawartością  $\alpha$ -ketoglutaraminianu. Nie wykonywali oni jednakże oznaczeń aktywności aminotransferazy glutaminowej, której wzrost stwierdzony w badaniach własnych stanowi argument wspierający ich koncepcję. Jak wynika z prac Bradforda i Mc Ilvaina /1966/ sama glutamina nie wykazuje działania neurotoksycznego, a jej wysoki poziom jest jedynie wykładnikiem dokonania się kolejnego etapu reakcji w cyklu detoksykacji amoniaku w mózgu.

Należy ponadto zwrócić uwagę na zachowanie się aktywności glutaminazy w omawianym wczesnym okresie encefalopatii wątrobowej w obu badanych jej modelach doświadczalnych. W zespoleniu wrotno-układowym wzrostowi poziomu amoniaku i glutaminy nie towarzyszy wzrost aktywności glutaminazy, co może świadczyć o powolnym metabolizmie glutaminy na drodze jej rozkładu do glutaminianu w reakcji katalizowanej przez ten enzym. Podobnie w modelu toksycznego uszkodzenia wątroby należy liczyć się ze stosunkowo powolnym metabolizmem gluta-

miny na tej drodze, choć dochodzi tutaj do niewielkiego wzrostu aktywności glutaminazy. Uskazuje to dodatkowo, wobec wzmożonej aktywności aminotransferazy glutaminowej, na przewagę procesu transeminacji glutaminy z wytwarzaniem  $\alpha$ -keto-glutaraminianu.

W późniejszych okresach rozwoju encefalopatii wątrobowej dochodzi do zahamowania aktywności aminotransferazy glutaminowej w obu modelach doświadczalnych. Powrót aktywności enzymu do wartości prawidłowych wydaje się być cechą charakterystyczną dla późnych faz encefalopatii wątrobowej, bowiem Lockwood i Duffy /1977/ obserwowali jego niezmieloną aktywność w 8 tygodniu po wykonaniu przetoki wrotno-układowej. Nie oznaczali oni jednak aktywności enzymu we wcześniejszych okresach doświadczenia. Hersh /1971/ wysunął koncepcję, zgodnie z którą enzymy syntetyzujące /aminotransferaza glutaminowa/ i degradujące / $\alpha$ -amidaza/ $\alpha$ -ketoglutaraminian są ze sobą ściśle powiązane. Vergara i wsp. /1974/ przypuszczają natomiast, że w przypadkach śpiączki wątrobowej dochodzi do rozprężenia mózgowego metabolizmu glutaminy, przejawiającego się rozerwaniem tych enzymatycznych zależności.

Odmienne zachowanie się glutaminy w późnym okresie rozwoju encefalopatii wątrobowej w obu modelach doświadczalnych zasługuje na specjalną uwagę. W chemicznym uszkodzeniu wątroby obserwuje się jej spadek do poziomu kontrolnego, podczas gdy w zespoleniu żylnym następuje jej dalszy przyrost. W przypadku encefalopatii związanej z toksycznym uszkodzeniem wątroby w tym czasie może dochodzić do szybkiego metabolizmu

glutaminy, związanego ze znacznym wzrostem aktywności glutaminazy, a uwalniany z glutaminy w reakcji glutaminazowej amoniak dodatkowo obciąża cykl detoksykacyjny. Obserwowany w tym okresie wzrost aktywności glutaminazy może być odzwierciedleniem jej wzmożonej, adaptacyjnej syntezy "de novo", na skutek długotrwałego działania czynnika/ów/ uszkodzających. Hipoteza ta wymaga jednakże doświadczalnego potwierdzenia. Z drugiej zaś strony, stwierdzony stały wzrost poziomu glutaminy w mózgu w przypadku zespolenia żylnego sugeruje utrzymywanie się powolnego metabolizmu glutaminy na drodze glutaminazowej, wobec niezminionej przez cały okres obserwacji aktywności glutaminazy. To ostatnie zjawisko może być związane, jak wykazali Cremer i wsp. /1975/ oraz Matheson i Van den Berg /1975/, z hamującym wpływem wysokiego poziomu amoniaku na aktywność enzymu. Można przypuścić również, że w tym modelu doświadczalnym w przypadku niekompletnie zahamowanej aktywności syntetazy i aminotransferazy glutaminowej przy wysokiej podaży amoniaku z łożyska naczyniowego nadal utrzymują się korzystne warunki dla syntezy  $\alpha$ -ketoglutaraminianu. Ze związku tego, w następstwie jego rozkładu przez  $\omega$ -amidazę, uwalnia się amoniak, który jak wykazał Meister /1980/ na drodze tej może być zużytkowany do dalszej syntezy glutaminy.

W świetle przedstawionych danych, wydaje się prawdopodobne, że w encefalopatii wątrobowej, wywołanej przewlekłym zatruciem czterochlorkiem węgla w późniejszej fazie doświadczania, z w pełni ukształtowanym patomorfologicznym obrazem

procesu, rolę podstawowego czynnika uszkadzającego tkankę nerwową spełnia amoniak, przy mniejszej roli toksycznego działania  $\alpha$ -ketoglutaraminianu. Wskazywać na to może postępujący spadek zawartości  $\alpha$ -ketoglutaranu, obniżenie w stosunku do okresów wcześniejszych poziomu glutaminy, aktywizacja glutaminazowego toru jej metabolizmu, obciążająca dodatkowo cykl detoksykacyjny amoniaku w mózgu oraz obniżenie aktywności aminotransferazy glutaminowej w porównaniu do wczesnej fazy ewolucji encefalopatii. Neurotoksyczne działanie amoniaku jest zjawiskiem znanym z prac prowadzonych zarówno in vivo jak i in vitro /Cavanagh, Kyu 1971, Mossakowski i wsp. 1970 a/. W przypadku encefalopatii wywołanej wrotno-układowym zespoleniem żylnym, zarówno w fazach wcześniejszych jak i w okresie późniejszym głównym czynnikiem uszkadzającym pozostawałby  $\alpha$ -ketoglutaraminian. Nie wyłącza to w sposób oczywisty neurotoksycznego działania amoniaku, uwalnianego zwrotnie w wyniku rozkładu  $\alpha$ -ketoglutaraminianu w reakcji katalizowanej przez  $\omega$ -amidazę. Należy zastrzec się równocześnie, co do małej ścisłości określenia "faza wczesna" i "faza późna" w doświadczeniach prowadzonych na dwu modelach o różnym, w założeniu, czasie trwania i przebiegu. W zatruciu czterochlorkiem węgla cechy morfologiczne encefalopatii wątrobowej pojawiają się w 4 miesiącu doświadczenia, a całkowicie ukształtowany jej zespół obecny jest w 6 miesiącu /Mosakowski i wsp. 1970 b/. W zespoleniu żylnym nieprawidłowości glejowe, charakterystyczne dla gliopatii wątrobowej, pojawiają się w 7-14 dniu doświadczenia, a jej uformowany obraz

stwierdza się po upływie 21 dni /Cavanagh, Kyu 1971/. W późniejszych okresach nie objętych badaniami w niniejszej pracy, ulega on dalszemu nasileniu /Mossakowski i wsp. 1977/.

Na odrębną uwagę zasługuje fakt, że obserwowane zmiany w zawartości glutaminy w mózgu w obu modelach doświadczalnej encefalopatii wątrobowej zachodzą przy całkowicie niezmienionej lub zmienionej tylko nieznacznie aktywności syntetazy glutaminy. Spostrzeżenie to jest zbieżne z obserwacjami Kisfaludy'ego /1974/ oraz Sadasivudu i wsp. /1977/, którzy w doświadczeniach nad ostrą i przewlekłą hiperamonemią stwierdzili również niewielkie jedynie zmiany w aktywności enzymu. Należy uwzględnić przy tym fakt, że wynik oznaczenia "in vitro" nie wyklucza istnienia zmian aktywności enzymu "in vivo", nieuchwytnych w warunkach oceny "in vitro".

W rozważaniach różnic metabolicznych obu badanych modeli encefalopatii wątrobowej należy uwzględnić przede wszystkim ich odrębności patogenetyczne. W przypadku intoksykacyjnej marskości wątroby mamy do czynienia z postępującym, długotrwałym procesem zwyrodnieniowym ośrodkowego układu nerwowego, w którego obrazie morfologicznym przeważają zmiany wsteczne astrogleju, podczas gdy w doświadczalnym zespoleniu wrotno-układowym chodzi o proces podostry, w którym wykładniki morfologiczne encefalopatii wątrobowej cechują się przewagą jej komponentu postępowego, wyrażającego się rozpleniem i przerostem astrocytów. Ten ostatni, Mossakowski /1981/ traktuje jako strukturalny wykładnik procesów kompensacyjnych. Można przeto przypuścić, że wzrost poziomu  $\alpha$ -ketoglutaranu

obserwowany w modelu zespolenia żylnego stanowi w warunkach znacznej hiperamonemii wyraz kompensacji metabolicznej. Podobnie można interpretować postępujący wzrost zawartości glutaminy w mózgu. Przypuszczenie to mogą potwierdzać identyczne spostrzeżenia w badaniach nad ostrą encefalopatią wątrobową wywołaną zatruciem tioacetamidem /Hilgier 1983/. Te wyrównawcze procesy metaboliczne mogą nie ujawniać się w postępującym procesie zwyrodnieniowym jakim jest intoksykacyjna encefalopatia wątrobowa, lub ulegać załamaniu w późnych fazach jej rozwoju, przy rozległym i uogólnionym uszkodzeniu astrogleju, który odgrywa zasadniczą rolę w detoksykacji amoniaku w mózgu.

Odrębności patogenetyczne obu modeli doświadczalnych nakazują dodatkowo uwzględnienie jeszcze jednego czynnika. Wzrost poziomu amoniaku w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wrotno-układowej towarzyszy hiperamonemii, podczas gdy w modelu intoksykacyjnej marskości wątroby hiperamonemia nie występuje w żadnej z badanych faz doświadczenia. Przyrostu zawartości amoniaku w mózgu w tych warunkach nie można więc wiązać z jego zwiększoną podażą z łożyska naczyniowego. W zaproponowanej hipotezie patogenetycznej encefalopatii wątrobowej Mossakowski /1978/ przypuszcza, że zaburzenia metabolizmu amoniaku w mózgu mogą być uwarunkowane względnym lub bezwzględnym niedoborem  $\alpha$ -ketoglutaranu. Przykładem jego względnego niedoboru jest zwiększona podaż amoniaku do mózgu w następstwie hiperamonemii. W warunkach bezwzględnego niedoboru  $\alpha$ -ketoglutaranu może dojść do zaburzeń metabolizmu



amoniaku w mózgu przy normoamonemii. Jednym z czynników prowadzących do niedoboru  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu jest gromadzenie się w nim miedzi /Bessman, Bessman 1955/, jak ma to miejsce w chorobie Wilsona, w której obraz nieprawidłowości morfologicznych astrocytów jest identyczny jak w encefalopatii wątrobowej. W warunkach hodowli glejowej *in vitro* Mossakowski i wsp. /1970 a/ uzyskali identyczne zmiany patologiczne gleju zarówno po podaniu egzogenego amoniaku jak i octanu miedzi, a ich rozwojowi zapobiegało podanie egzogenego  $\alpha$ -ketoglutaranu /Mossakowski 1978/. Z badań materiału klinicznego dotyczącego przypadków zarówno ostrej jak i przewlekłej encefalopatii wątrobowej wiadomo, że dochodzi w nich do nadmiernego gromadzenia się miedzi w mózgu /Wender, Kozik 1973, Śmiałek, Mossakowski 1974/. Identyczne zjawisko stwierdzono w doświadczalnej intoksykacyjnej marskości wątroby, zastosowanej w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy /Hilgier, Lipska 1979/. Na podkreślenie zasługuje przy tym fakt pełnej zbieżności czasowej spadku poziomu  $\alpha$ -ketoglutaranu ze wzrostem zawartości miedzi w mózgu.

Nie można wreszcie pominąć faktu, iż w zespoleniu wrotno-układowym proces patologiczny związany jest z omijającym filtr wątrobowy przepływem żyłnej krwi jelitowej, którego skutkiem jest hiperamonemia przy nieuszkodzonej wątrobie, podczas gdy w encefalopatii intoksykacyjnej mamy do czynienia z pierwotnym uszkodzeniem wątroby, prowadzącym do upośledzenia jej funkcji metabolicznych. Egan i wsp. /1978/ stwier-

dzili, że w skrawkach mózgowych, inkubowanych w środowisku zawierającym wysokie stężenie soli amonowych, dochodzi do wzrostu zawartości substratów stanowiących produkty przemiany amoniaku i podwyższenia aktywności enzymów uczestniczących w jego metabolizmie. Przy dodaniu do tego samego medium inkubacyjnego wyciągu z marskiej wątroby mechanizm detoksykacyjny amoniaku ulegał całkowitemu rozprężeniu. Wyszukują oni w związku z tym hipotezę, że u podstaw upośledzonego metabolizmu amoniaku w mózgu w warunkach uszkodzenia wątroby leży działanie bliżej dotąd nieokreślonego czynnika lub czynników wątrobowych. Podobnie należy traktować spostrzeżenia Geigera /1958/, który wykazał, że do prawidłowego funkcjonowania tkanki nerwowej, a więc prawdopodobnie i jej metabolizmu niezbędna jest niezidentyfikowana bliżej substancja czynna produkowana przez wątrobę, której brak w wyniku uszkodzenia wątroby może być istotnym czynnikiem w rozwoju patologii wątrobowo-mózgowej. Mimo nieprecyzyjności pojęcia "wątrobowa substancja czynna" lub "patogenny czynnik wątrobowy" wydaje się, że przytoczonych powyżej spostrzeżeń nie można pominąć, przynajmniej w przypadku analizowania różnic metabolicznych między obu zastosowanymi w badaniach modelami encefalopatii wątrobowej.

## WNIOSKI

1. W obu modelach doświadczalnej encefalopatii wątrobowej u szczurów występują zaburzenia metabolizmu amoniaku w mózgu, wyrażające się nieprawidłową zawartością substratów i zmienioną aktywnością enzymów uczestniczących w jego przemianach.
2. Zaburzenia metabolizmu amoniaku w mózgu w encefalopatii wątrobowej występują niezależnie od poziomu amoniaku w surowicy krwi.
3. W doświadczalnej encefalopatii wątrobowej występuje zbieżność czasowa między zaburzeniami metabolizmu amoniaku w mózgu a pojawianiem się i narastaniem morfologicznych wykładników procesu encefalopatycznego.
4. W obu modelach doświadczalnych stwierdza się różnice w zawartości  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu, wynikające prawdopodobnie z jego różnej dostępności, jako czynnika warunkującego detoksykację amoniaku w oun.
5. Oba modele doświadczalnej encefalopatii wątrobowej różnią się stanem równowagi między glutaminianem i glutaminą, wskutek różnic w aktywnościach enzymów syntetyzujących i degradujących te substraty.

6. Wydaje się, że w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej występują dwie fazy neurotoksyczności, z których pierwsza wiązałaby się z działaniem  $\alpha$ -ketoglutaraminianu, a druga z wpływem samego amoniaku, uwalnianego zwrótnie z glutaminy w następstwie aktywizacji reakcji glutaminazowej. Uwalniany w niej amoniak stanowi dodatkowe obciążenie cyklu detoksykacyjnego. Dwufazowość ta jest wyraźniejsza w przewlekłej marskości wątroby niż w żylnym zespoleniu wrotno-układowym mającym charakter podostrego procesu patologicznego.

PISMIENNICTWO

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. Baltazan M.A., Olszewski J., Zervas N.: Chronic porto-systemic encephalopathy. J. Neuropath. exp. Neurol. 1957, 16, 410-421.
3. Baxter C.F.: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. W: GABA in Nervous System Function. Red. E. Roberts, T.W. Chase, D.B. Tower. Raven Press, New York 1976, 61-87.
4. Berl S., Tokagaki G., Clarke D.D., Waelsch H.: Ammonia and glutamic acid metabolism in brain and liver. J. Biol. Chem. 1962, 237, 2562-2569.
5. Befl S.: Cerebral amino acid metabolism in hepatic coma. Exp. Biol. Med. 1971, 4, 71-84.
6. Bergmeyer H.U., Bernt E.:  $\alpha$ -Oxoglutarate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H.U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963, 324-327.
7. Bernt W.E., Bergmeyer H.U.: L-Glutamate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H.U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963, 334-338.

8. Bessman S.P., Bessman A.N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanisms of hepatic coma. *J. clin. Inv.* 1955, 36, 622-628.
9. Bradford H.F., Mc Ilwain H.: Ionic basis for the depolarization of cerebral tissues by excitatory acidic amino-acids. *J. Neurochem.* 1966, 13, 1163-1177.
10. Breen K., Schenker S.: Hepatic coma: concept of pathogenesis and therapy. *W: Progress in liver disease.* Red. H. Popper, Shaffner F. Grune and Stratton. New York, 1972, 4, 309-326.
11. Brunner G., Siehoff A.: Untersuchungen über die Bedeutung von endogenen Toxinen bei der Entstehung des Coma hepaticum. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 1976, 82, 445-447.
12. 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.
13. Condon R.E.: Effect of dietary protein and survival in dogs with an Eck fistula. *Amer. J. Surg.* 1971, 121, 107-114.
14. Colombo J.P., Bachmann C.: Enzyme der Ammoniak-entgiftung in der ratte mit portocavalen shunt /PCS/. *W: Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Enzephalopathie.* Red. F. Lewalka, B. Dragoscis, Fischer, Stuttgart, New York 1978, 129-134.

15. Cooper A.J.L., Meister A.: Glutamine transaminases from liver and kidney. *W: The enzymes of glutamine metabolism. Red.: Prusiner S., Stadtman E.R. Acad. Press, New York 1973, 207-226.*
16. Cremer J.E., Heath D.F., Teal H.M., Woods M.S., Cavanagh J.S.: Some dynamic aspects of brain metabolism in rats given a portocaval anastomosis. *Neuropath. appl. Neurobiol. 1975, 3, 293.*
17. Curtis D.R., Johnston G.A.R., Game C.J.A., Culloch R.M.: Antagonism of neural excitation by 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2. *Brain Res. 1973, 49, 467-470.*
18. Davies J., Watkins J.C.: Is 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 /HA-966/ a selective excitatory antagonist? *Nature 1972, 238, 61-63.*
19. Diemer N.H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta Neurol. Scand. 1978, 58, suppl. 71.*
20. Doizaki W.M., Zieve L.: An improved method for measuring blood mercaptans. *J. Lab. Invest. 1977, 90, 849-855, 1-112.*
21. Duffy T.E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. *W: Brain dysfunction in metabolic disorders. Red. F. Plum. Raven Press, New York 1974, vol. 53, 39-52.*

22. Dyk T., Winiarska A., Bomirska T.: Przypadek podostrego zatrucia czterochlorkiem węgla. Pol. Tyg. Lek. 1972, 49, 1940-1941.
23. Egan E., Schoelerman S., Szirmai E.: Action of peripheral organs and deproteinized blood on the brain cortex respiratory process. Agressologie 1978, 19, 109-112.
24. Fernstrom J.D., Wurtman R.J.: Brain serotonin content. Physiological regulation by plasma neutral amino acids. Science 1972, 178, 414-416.
25. Fischer J.E.: Hepatic coma in cirrhosis portal hypertension, and following portocaval shunt. Arch. Surg. 1974, 108, 325-336.
26. Fischer J.E., Funovics J.M., Aguirre A.: The role of plasma amino acids in hepatic encephalopathy. Surgery 1975, 78, 276-288.
27. Gabuzda G.J.: Hepatic coma - clinical consideration, pathogenesis and management. Adv. Intern. Med. 1962, 11, 11-73.
28. Gabuzda G.J., Davidson C.S.: Hepatic coma. W: Diseases of the liver. Ed. L. Schiff. Lippincott. Philadelphia 1969, 387-415.
29. Geiger A.: Correlation of the brain metabolism and function by the use of a brain perfusion method in situ. Physiol. Rev. 1958, 38, 1-20.



30. Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu  $CCl_4$  na wątrobę prawidłową i regenerującą. Pat. Pol. 1968, 19, 179-187.
31. Hai-Chen, Ding-joe Tsai, Chin-hua Wang, Yin-chen Chen: An electron microscopic and autoradiographic study in experimental Kernicterus. I. Bilirubin transport via astroglia. Amer. J. Path. 1969, 59, 31-59.
32. Hallermayer K., Harmening Ch., Hamprecht B.: Cellular localization and regulation of glutamine synthetase in primary cultures of brain cells from newborn mice. J. Neurochem. 1981, 37, 43-52.
33. Harper A.H.: Zarys chemii fizjologicznej. PZWL Warszawa 1972.
34. Hawkins R.A., Miller R.C., Nielsen C., Weech R.L.: The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. Biochem. J. 1973, 4, 1001-1008.
35. Hemminki K. 1979 - konsultacja osobista.
36. Hersh L.B.: Rat liver  $\omega$ -amidase. Purification and properties. Biochemistry. 1971, 10, 2884-2891.
37. Hilgier W., Lipska M.: Topografia ilościowa miedzi w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1979, 17, 145-153.
38. Hilgier W., Mossakowski M.J.: Aktywność l-glutamo-  
-amidohydrolazy w mózgu szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1979, 17, 287-293.

39. Hilgier W: Wstępna ocena metabolizmu amoniaku w tio-acetamidowej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1983. Praca przygotowana do druku.
40. Hindfelt B.: On mechanisms in hyperammonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975, 253, 116-123.
41. Hindfelt B., Plum F., Duffy T.E.: Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portocaval shunts. J. Clin. Invest. 1977, 59, 386-396.
42. Hirayama C.: Tryptophan metabolism in liver disease. Clin. Chem. Acta 1971, 32, 191-197.
43. Job V., Mattson W.J., Sloan M., Coon W.W., Turcotte J.G., Child Ch.: Alterations in plasma - free amino acids in dogs with hepatic insufficiency. Surg. Gynec. Obstet. 1970, 130, 794-801.
44. Kassur B., Olejnik Z., Mossakowski M.J., Kraśnicka Z.: Some pathogenetic aspects of acute liver failure with encephalopathy in the course of viral hepatitis. Proc. VI International Congress of Infectious and Parasitic Diseases. Vol. III. PZWL Warsaw, 1974, 233-238.
45. Kisfaludy S.: Effect of ammonia intoxication and liver injury on the activity of some enzymes of the brain in the rat. W: Recent progress in ammonia metabolism. Red. M. Imler, I. Szam, G. Witcock. Baden-Baden, Brüssel 1974, 123-129.

46. Kupchik H.Z., Knox J.: Assay of glutamine and its aminotransferase with the enol-borate of phenylpyruvate. Arch. Biochem. Biophys. 1970, 136, 178-186.
47. Kyu H.H., Cavanagh J.B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rats. Brit. J. exp. Path. 1970, 51, 217-227.
48. Lee S.H., Fisher B.: Portocaval shunt in the rat. Surgery 1961, 50, 668-672.
49. Lehninger A.L.: Biochemia. PWRiL Warszawa 1979.
50. Livingstone A.S., Potvin M., Goresky C.A.: Changes in the blood-brain barrier in hepatic coma after hepatectomy in the rat. Gastroenterology 1977, 73, 697-704.
51. Lockwood A.H., Duffy T.E.: Glutamine transaminase and  $\omega$ -amidase: species variations in brain activity and effect of portocaval shunting. J. Neurochem. 1977, 28, 673-675.
52. Lockwood A.H., Mc Donald J.M., Reiman R.E., Gelbard A.S.: The dynamics of ammonia metabolism in man. J. Clin. Invest. 1979, 63, 449-460.
53. Lowry O.H., Rosenbrough S.M., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-270.
54. Mardaszew S.R., Nikołajew A., Ewsieju A.P.: Indukcija asparginaznoj i glutaminaznoj aktivnostiej u Pseudomonas sp. asparginowej i glutaminowej kislotami. Biochemija 1967, 32, 1093-1093.

55. Matheson D.F., Van den Berg C.J.: Ammonia and brain glutamine. Inhibition of glutamine degradation. Biochem. Soc. Trans. 1975, 3, 525-530.
56. Mattson W.J., Job V., Solan M., Coon W.W., Trucotte J.G., Child C.G.: Alteration of individual free amino acids in brain during acute coma. Surg. Gynecol. Obstet. 1970, 130, 263-266.
57. McClain C.J., Zieve L., Doizaki W.: Merkaptans in portal systemic encephalopathy /PSE/ due to alcoholic liver disease. Gastroenterology 1978 a, 74, 1064-1067.
58. McClain C.J., Kromhout J., Zieve L.: Blood merkaptan and ammonia concentrations in cirrhotics after a protein load. Gastroenterology 1978 b, 74, 1067-1069.
59. Mc Dermott 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.
60. Mc Ilwain H., Bachelard H.S.: Biochemistry and the nervous system. Williams and Wilkins. Baltimore 1971.
61. Meister A.: Preparation and enzymatic reactions of the keto analogues of asparagine and glutamine. J. Biol. Chem. 1953, 200, 571-589.
62. Meister A.: Catalytic mechanisms of glutamine synthetase; overview of glutamine metabolism. W: Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation. Red.: Mora J., Placios R., Academic Press, New York 1980, 1-40.

63. Mossakowski M.J., Paluszkiewicz-Szymchel J.: Encephalopathy porto-systemica. *Neuropat. Pol.* 1964, 2, 179-192.
64. Mossakowski M.J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 231-304.
65. 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./* 1970 a, 16, 1-16.
66. Mossakowski M.J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970 b, 8, 365-374.
67. Mossakowski M.J., Kraśnicka Z., Kassur B., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrych uszkodzeniach wątroby. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 51-62.
68. Mossakowski M.J., Pronaszko-Kurczyńska A., Różga J., Paluszkiewicz R.: Wpływ  $\alpha$ -oksoglutaranu na rozwój encefalopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 317-325.
69. Mossakowski M.J.: Experimental studies on the pathogenesis of hepatogenic encephalopathy. *Rivista di Patologia nervosa e mentale.* 1978, 37, 25-36.
70. Mossakowski M.J.: Experimental modelling of hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1981, 19, 261-276.

71. Muto Y.: Clinical study on the relationship of short-chain fatty acids and hepatic encephalopathy. Jap. J. Gastroenterol. 1966, 63, 19-32.
72. Neumann U., Heier B., Haschen R.J.: Tierexperimentelle untersuchungen über mechanismen der ammoniakfixation ausserhalb des harnstoffzyklus. W: Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Enzephalopathie. Red.: F. Wewalka, B. Dragoscis, Fischer G. Stuttgart, New York 1978, 78-85.
73. Nikolajew V.: Zur Frage der Beziehungen zwischen Leber und Gehirn. Virchows Archiv. 1937, 299, 309-315.
74. Parson-Smith B., Summerskill W.H.J., Dawson H.M., Sherlock S.: The electroencephalograph in liver disease. Lancet 1957, II, 867-871.
75. Phillips G.B., Schwartz R., Gabuzda G.J., Davidson C.D.: The syndrome of impeding hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. New England J. Med. 1952, 247, 239-246.
76. Plum F., Hindfeld B.; The neurological complications of liver disease. W: Metabolic and deficiency diseases of the nervous system. Handbook of Clinical Neurology. Vol. 27. Red. R.J. Vinken, W.G. Bruyn, H.L. Klawans. American Elsevier, New York 1976, 349-377.
77. Rabinowitz J.L., Staeffen J., Blauquet P.: Sources of serum  $^{14}\text{C}$ -octanoate in cirrhosis of the liver and hepatic encephalopathy. J. Lab. Clin. Med. 1978, 91, 223-227.

78. Rechnagel E., Glende A. Jr.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity and example of lethal cleavage. *Critical Reviews in Toxicology* 1973, 10, 263-295.
79. Record C.O., Duxton B., Chose R.A.: Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Europ. J. Clin. Invest.* 1976, 6, 387-394.
80. Richmond J., Girdwood R.H.: Observation on amino acid absorption. *Clin. Sci.* 1952, 22, 301-314.
81. Rogulski J.W.: Zarys biochemii klinicznej i analityki. Red. Angielski S., Rogulski J. PZWL Warszawa 1982, 309-345.
82. Rosen H.M., Yoshimura N., Hodgman J.M.: Plasma amino acid patterns <sup>in</sup> hepatic encephalopathy of different etiology. *Gastroenterology* 1977, 72, 483-487.
83. Rowe W.B., Ronzio R.A., Weller V.P. Meister A.: Glutamine synthetase /sheep brain/. W: *Methods in enzymology*. Red. H. Tabor, C.W. Tabor. Academic Press, 1970, vol. 17, 900-910.
84. Sadasivudu B., Indira Rao T., Radhakrishna Murthy C.: Acute metabolic effects of ammonia in mouse brain. *Neurochem. Res.* 1977, 2, 639-655.
85. Schutta H.S.: Bilirubin encephalopathy in Guam rats. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 639-694.

86. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia. The concept of glial syndromes. Proc. VI Congr. Neuropath. Masson et C<sup>ie</sup> Paris 1970, 392-406.
87. Sherlock S., Summerskill W.H.J., White L.P., Phear A.E.: Portal systemic encephalopathy: neurological complication of liver disease. Lancet 1954, II, 454.
88. Sherlock S., Summerskill W.H.J., Dawson A.M.: The treatment and prognosis of hepatic coma. Lancet 1956, II, 689-694.
89. Sigiura M.: Pharmacological aspect on glutamic acid metabolism in brain: transamination and associated deamidation of glutamine to  $\alpha$ -keto acid in brain. Jap. J. Pharmacol. 1957, 7, 1-5.
90. Sporn M.B., Dingman W., Defalco A., Davies R.K.: Formation of urea from arginine in the brain of the living rat. Nature 1959, 183, 1520-1521.
91. Summerskill W.H.J., Davidson E.A., Sherlock S., Steiner R.E.: The neuropsychiatric syndrome associated with hepatic cirrhosis and extensive portal collateral circulation. Quart J. Med. 1956, 25, 245.
92. Śmiałek M., Mossakowski M.J.: Morphological changes and quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma due to acute liver impairment. Neuropat. Pol. 1974, 12, 259-268



93. Teyshenne P.F., Walters I., Claveria L.E.: The encephalopathic action of five-carbon-atom fatty acids in the rabbit. Clin. Sci. mol. Med. 1976, 50, 463-472.
94. Van Harreveld A., Fifkova E.: Effects /glutamate and other/ of amino acids on the retina. J. Neurochem. 1971, 18, 2145-2154.
95. Van Harreveld A., Fifkova E.: Effects of amino acids on the isolated chicken retina and on its response to glutamate stimulation. J. Neurochem. 1973, 20, 947-962.
96. Vergara F., Plum F., Duffy T.E.:  $\alpha$ -ketoglutarate: increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. Science 1974, 183, 81-83.
97. Walker C.D., White R.S., Mark L.C.: Cerebral acetylcholine, serotonin in acute ammonia intoxication. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971, 136, 668-671.
98. Walshe J.M.: The effect of glutamic acid on the hepatic failure. Lancet 1953, 1, 1075-1077.
99. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. Obraz biochemiczny. Neurol. Neurochirg. Pol. 1973, 23, 177-181.
100. Zieve L., Olsen R.L.: Can hepatic coma be caused by a reduction of brain noradrenaline or dopamine. Gut. 1977, 18, 688-691.
101. Zieve L.: Hepatic encephalopathy: summary of present knowledge with an elaboration on recent development. W: Progress in liver disease. Vol. VI. Red.: H. Popper, F. Schaffner. Grune and Stratton, New York 1979, 327-341.

102. Zieve L., Nicoloff D.M.: Pathogenesis of hepatic coma.  
Ann. Rev. Med. 1975, 26, 143-157.
103. Yoshida T.: Purification and some properties of soluble  
and mitochondrial glutamine ketoacids transaminase  
isozymes. Vitamins 1967, 35, 227-234.