

Το NH₄Cl ως δυνητική θεραπευτική επιλογή στην οξεία ηπατική ανεπάρκεια

Πειραματική μελέτη

ΚΙΑΣΣΟΣ Δ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Σ, ΧΑΤΖΗΓΙΑΝΝΑΚΗΣ Ε,
ΑΓΑΠΗΤΟΣ Ε, ΘΕΟΧΑΡΗΣ Σ.

B' Χειρουργική Κλινική και Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής,
Ιατρική Σχολή Παν/μίου Αθηνών

Περίληψη

Η οξεία ηπατική ανεπάρκεια (ΑΗΦ) αποτελεί μια σπάνια και σοβαρή επιπλοκή της ιογενούς και αυτοάνοσης ηπατίτιδας και της χρήσης ορισμένων φαρμακευτικών ή χημικών ουσιών. Χαρακτηρίζεται από μαζική νέκρωση του ήπατος και εγκεφαλοπάθεια που συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Οι θεραπευτικές επιλογές στην κατάσταση αυτή είναι περιορισμένες.

Σε παλαιότερες κλινικές παρατηρήσεις μας είχαμε διαπιστώσει ότι η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου ως αποχρεμπτικού σε χρόνιους ηπατοπαθείς με συνυπάρχουσα ΧΑΠ είχε ευεργετικά αποτελέσματα στο ηπατοβιοχημικό προφίλ των ασθενών. Έτσι στην παρούσα πειραματική μελέτη αξιολογήσαμε την προστατευτική δράση του κλωριούχου αμμωνίου στην οξεία νέκρωση του ήπατος που προκλήθηκε σε πειραματόζωα έπειτα από τη χορήγηση θειακεταμίδης. Χρησιμοποιήθηκαν 32 ενήλικες επίμυες Winstar στους οποίους χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις ΤΑΑ σε 3 συνεχή εικοσιτετράωρα.

Προκλήθηκε οξεία ηπατική νέκρωση η οποία συνοδεύτηκε από πολύ μεγάλη αύξηση (κατά περίπου 6000%) των ηπατικών ενζύμων ALT και AST και από αυξημένα επίπεδα αμμωνίας, χολερυθρίνης, γλυκόζης, ουρίας, κρεατίνης, και προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, TNF-α). Η αμμωνία αυξήθηκε σε επίπεδα τέτοια που είναι συμβατά με την εμφάνιση υπεραμμωνιακού

κώματος. Το 75% των ζώων, παρόλη την υποστηρικτική θεραπεία, δεν κατάφερε να επιβιώσει, ενώ στο υπόλοιπο 25% παρατηρήθηκε εγκεφαλοπάθεια βαθμού 3-4 (απώλεια αντανακλαστικών και κώμα). Τα αποτελέσματα της χορήγησης του NH₄Cl, στη βέλτιστη συγκέντρωση του, ήταν θεαματικά. Η επιβίωση των ζώων αυξήθηκε από το 25% στο 75% και στα επιζώντα ζώα η εγκεφαλοπάθεια μειώθηκε στο βαθμό 1 (απλό λήθαργο).

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων και ο TNF-α έπεσαν στο μισό, η αμμωνία υποτετραπλασιάστηκε, (πέφτοντας σε υποκωματώδη επίπεδα) και οι λοιπές βιοχημικές παράμετροι βελτιώθηκαν. Παθολογοανατομικά, η κεντρολοβιακή νέκρωση και η φλεγμονώδης διήθηση στο ήπαρ μειώθηκαν στο 1/3 ενώ η μιτωτική δραστηριότητα (αναγέννηση του ήπατος) αυξήθηκε κατά 50%. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι το κλωριούχο αμμώνιο θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για καταστάσεις που προκαλούν μαζική νέκρωση του ήπατος

και οξεία ηπατική ανεπάρκεια.

Εισαγωγή

Η οξεία ηπατική ανεπάρκεια (ΑΗΦ) χαρακτηρίζεται από μαζική νέκρωση του ήπατος και εγκεφαλοπάθεια με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Αποτελεί μία σπάνια αλλά πολύ σοβαρή επιπλοκή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας, και της τοξικής δράσης φαρμάκων ή χημικών ουσιών^{1,4}. Η άμεση μεταμόσχευση ήπατος έχει αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στις περιπτώσεις αυτές^{3,5}.

Η χορήγηση της ηπατοξίνης θειακεταμίδης (hepatotoxin thioacetamide administration –TAA) προκαλεί σε πειραματόζωα (επίμυες) ένα τύπο οξείας ηπατικής ανεπάρκειας που χαρακτηρίζεται από μαζική νέκρωση του ήπατος, ραγδαίες νευρολογικές βλάβες και θάνατο λόγω βαριάς εγκεφαλοπάθειας και εγκεφαλικού οιδήματος^{6,7}. Η κατάσταση αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί πρότυπο πειραματικής επαγωγής οξείας ηπατικής ανεπάρκειας. Η ΤΑΑ ανήκει στις θειονοσουλφούριες και μπορεί να προκαλέσει επιπρόσθε-

Πίνακας 1. Παθολογοανατομικά ευρήματα στο ήπαρ

Ομάδα	Φλεγμονή	Νέκρωση	Μιτωτικός δείκτης
0	0	0	Δ/Ε
I	2,7 ± 0,8	2,6 ± 0,8	11 ± 6
II	2,1 ± 0,9	1,6 ± 0,7	28 ± 6
III	1 ± 0,4	0,9 ± 0,4	15 ± 5
IV	2,2 ± 0,7	1,8 ± 0,8	10 ± 7

Πίνακας 2. Βαθμός εγκεφαλοπάθειας και ποσοστά επιβίωσης πειραματοζώων

Ομάδα	Βαθμός εγκεφαλοπάθειας	Ποσοστά επιβίωσης (%)
0	0	100
I	3-4	25
II	1-2	40
III	1	75
IV	1-2	50

τα κίρρωση έπειτα από χρόνια χορήγηση της⁸.

Γενικώς, για την πρόκληση οξείας ή χρόνιας ηπατοκυτταρικής βλάβης έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι παράγοντες όπως η δημιουργία στο ηπατικό παρέγχυμα ουσιών όπως οι τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου⁹⁻¹¹ και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα) και οι ιντερλευκίνες 1 και 6¹²⁻¹⁵. Η χορήγηση αναστολέων του TNFα έχει ευεργετική δράση στο πάσχον ήπαρ¹⁶.

Το κλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) είναι ένα διαλυτό άλας που χρησιμοποιείται σήμερα στην κλινική ιατρική για τη θεραπεία της υποκλωραιμικής μεταβολικής αλκάλωσης. Επίσης χρησιμοποιείται στο διαγνωστικό έλεγχο της λειτουργικής ικανότητας του ήπατος¹⁷⁻¹⁹. Η χορήγηση από το στόμα του κλωριούχου αμμωνίου (σεσημασμένου με 15N) και η επακόλουθη ισοτοπική ανάλυση της ουρίας (15N-ουρίας) και της αμμωνίας (15N-αμμωνίας) στα ούρα παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργική κατάσταση του ήπατος. Κλινικές έρευνες που μελέτησαν την σχέση μεταξύ της αμμωνίας (15N) και της ουρίας (15N) που απεκκρίθηκε στα ούρα 3 ώρες μετά τη χορήγηση του σεσημασμένου κλωριούχου αμμωνίου από το στόμα έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ηπατικές βλάβες και σε υγιή άτομα¹⁸.

Η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου σε ζώα με έντονο ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό κατόπιν είτε μερικής ηπατεκτομής ή ηπατοπάθειας λόγω τοξινών, μείωσε τη δραστηριότητα των αναγεννητικών ενζύμων²⁰⁻²¹. Η δοσολογία του κλωριούχου αμμωνίου που χρησιμοποιήθη-

κε σε αυτές τις μελέτες ήταν εξαιρετικά υψηλή και χαρακτηρίστηκε ως δόσολογία υπό-κώματος. Από την άλλη πλευρά το κλωριούχο αμμώνιο δεν επηρέασε την γένεση ουρίας στο ήπαρ μετά την ηπατεκτομή²⁰. Η επίδραση του κλωριούχου αμμωνίου εις τους νεφρούς θα μπορούσε να προκαλέσει αλλοιώσεις εις τα νεφρικά σωληνάρια και εις την ανακύκλωση των πρωτεϊνών (turnover protein) ειδικά όταν χορηγείται σε πολύ υψηλές δόσεις²².

Σε παλαιότερες κλινικές παρατηρήσεις μας είχαμε διαπιστώσει ότι η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου ως αποχρεπτικού σε χρόνιους ηπατοπαθείς που υπέφεραν από ΧΑΠ είχε ευεργετικά αποτελέσματα βελτιώνοντας το ηπατο-βιοχημικό προφίλ των ασθενών. Ο σκοπός της παρούσης πειραματικής μελέτης είναι η αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης του NH₄Cl στην οξεία νέκρωση του ήπατος και η εξαγωγή έμμεσων συμπερασμάτων για την χρόνια νέκρωση του ήπατος, και την τοξική ηπατίτιδα όπου το NH₄Cl θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική θεραπεία στα νοσήματα αυτά. Η υλοποίηση του στόχου αυτού έγινε με την πρόκληση οξείας ηπατικής ανεπάρκειας σε 32 επίμυες χορηγώντας TAA σε συνδυασμό ή όχι με κλωριούχο αμμώνιο, μελετώντας ταυτόχρονα τη σταδιακή εξέλιξη των ιστολογικών, βιοχημικών και ανοσολογικών παραμέτρων στα πειραματόζωα καθώς και το ποσοστό επιβίωσής τους.

Υλικά και Μέθοδοι

Ζώα

Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 32 ενήλικες (ηλικίας 4 μηνών) αλφικοί επίμυες Winstar, βάρους 220-270 γραμμαρίων (Ελληνικό Ινστιτούτο Πα-

στέρ, Αθήνα, Ελλάδα). Οι επίμυες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και παρέμεναν σε ένα δωμάτιο με θερμοκρασία 22°C, με 12ωρο κύκλο φωτός/σκοταδιού. Οι συνθήκες διαβίωσης των ζώων συμμορφώνονταν με τις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών σχετικά με τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματοζώων (Guide to the Care and Use of Experimental Animals)²³.

Έναρξη Οξείας Ηπατικής Ανεπάρκειας και χορήγηση NH₄Cl

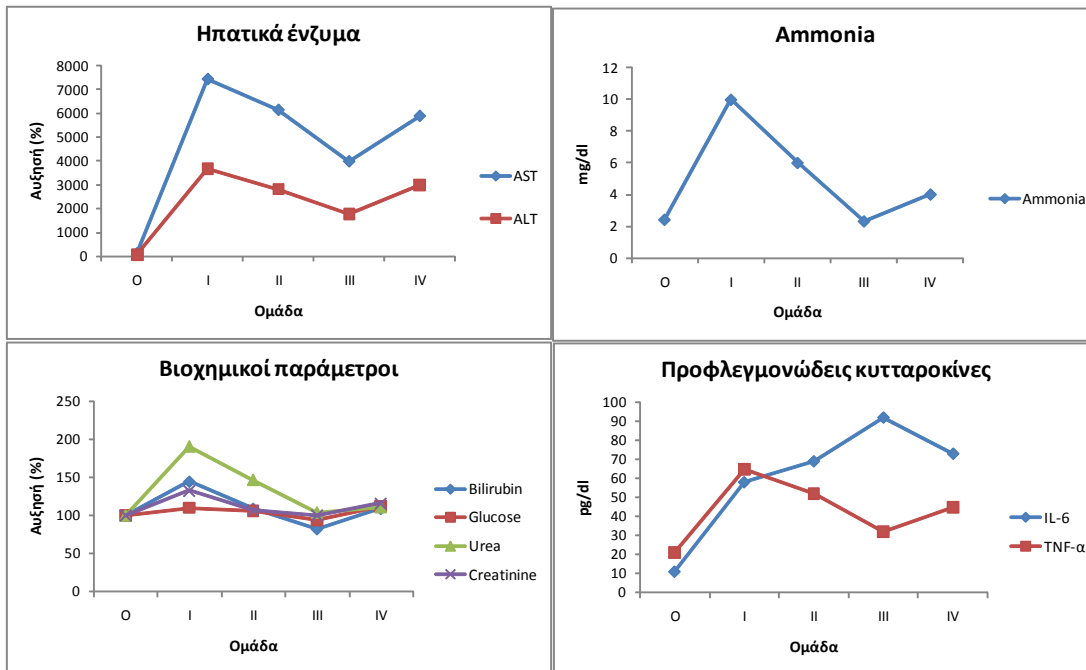
Για την έναρξη της οξείας ηπατικής ανεπάρκειας χορηγήθηκαν στα ζώα ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις TAA με δοσολογία 400mg/κίλο σωματικού βάρους σε τρία συνεχή χρονικά διαστήματα 24 ωρών (ομάδα I)^{6,7}. Τα ζώα ελέγχου έλαβαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις 0.9% NaCl. Παρασχέθηκε υποστηρικτική θεραπεία με υποδερμική χορήγηση 5% δεξτρόζης (25ml/κίλο σωματικού βάρους) και 0.9% NaCl με κάλιο (20meq/L) ανά 12 ώρες για την αποφυγή της υπογλυκαιμίας και της νεφρικής ανεπάρκειας. Η χορήγηση κλωριούχου αμμωνίου σε δόσεις 300 ή 600 ή 900mg/κίλο σωματικού βάρους έγινε 2 ώρες μετά την 2η και την 3η ένεση TAA (ομάδες II, III και IV, αντίστοιχα). Τα ζώα εξετάστηκαν για νευρολογικές ενδείξεις και θανατώθηκαν 12 ώρες μετά τη χορήγηση TAA.

Εκτίμηση της ηπατικής βλάβης μέσω καθορισμού των βιοχημικών παραμέτρων ορού

Από όλα τα ζώα λήφθηκαν δείγματα αίματος μέσω καρδιακής παρακέντησης. Ο ορός λήφθηκε έπειτα φυγοκέντρηση σε 1000g για 10 λεπτά. Όλα τα δείγματα ήταν ελεύθερα από αιμόλυση και διατηρήθηκαν στους 4°C πριν τον καθορισμό των ενζυματικών δραστηριοτήτων των AST, ALT και των επιπέδων της γλυκόζης, της ουρίας, της κρεατίνης και της συνολικής πρωτεΐνης. Τα επίπεδα αμμωνίας υπολογίστηκαν σε ολικό αίμα σύμφωνα με την μέθοδο μικροδιάχυσης²⁴.

Ιστοπαθολογία

Για την ανάλυση της ιστοπαθολογί-



Εικόνα 1. Τα ηπατικά ένζυμα, η χολερυθρίνη, η ουρία, η κρεατινίνη, η αμμωνία και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν σημαντικά έπειτα από την πειραματική επαγωγή της AHF (ομάδα I). Η χορήγηση NH_4Cl αναστρέφει τις επηρεασμένες βιοχημικές παραμέτρους και τα επίπεδα του TNF- α . Το NH_4Cl χορηγήθηκε σε δόσεις: ομάδα II: 300mg/kg, ομάδα III: 600mg/kg, ομάδα IV: 900mg/kg.

αυτού ήπατος λήφθηκαν τομές πάχους 5mm από τους αριστερούς λοβούς του ήπατος, οι οποίες εξετάστηκαν μικροσκοπικά έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη.

Οι τομές του ιστού εξετάστηκαν τυφλά από δύο ειδικούς παθολογοανατόμους, οι οποίοι δεν γνώριζαν για την ανάθεση δειγμάτων σε πειραματικές ομάδες. Ο βαθμός της φλεγμονής και της νέκρωσης υπολογίστηκε με βάση 10 διαφορετικά πεδία σε κάθε τομή και βαθμολογήθηκε σύμφωνα με μια κλίμακα από το 0 έως το 3 (κανονικό: 0, ελαφρύ: 1, μέτριο: 2, βαρύ: 3). Ο μπιωτικός δείκτης αποτιμήθηκε ως ο αριθμός των παρατηρηθέντων μιώσεων / 10 πεδία που επιλέχθηκαν τυχαία.

Ηπατική εγκεφαλοπάθεια και επιβίωση

Ο βαθμός της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας και της επιβίωσης των επιμύων των διαφορετικών ομάδων υπολογίστηκε 12 ώρες μετά την τρίτη χορήγηση TAA. Ο βαθμός της εγκεφαλοπάθειας καθορίστηκε σύμφωνα με μια κλίμακα νευρικής συμπεριφοράς:

- στάδιο 1: λήθαργος

- στάδιο 2: ελαφρά αταξία
- στάδιο 3: έλλειψη αυτόματης κίνησης και απώλεια αντανακλαστικών, αλλά ανταπόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα
- στάδιο 4: κώμα και καμία αντίδραση στον πόνο⁴⁵.

Καθορισμός κυτταροκινών

Οι κυκλοφορούντες οροί TNF- α (Tumor Factor Necrosis) και IL-6 (Ιντερλευκίνη-6) προσδιορίστηκαν με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων κιτ (Chemicon Inc.) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με Student's t-test και τιμές του p μικρότερες του 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

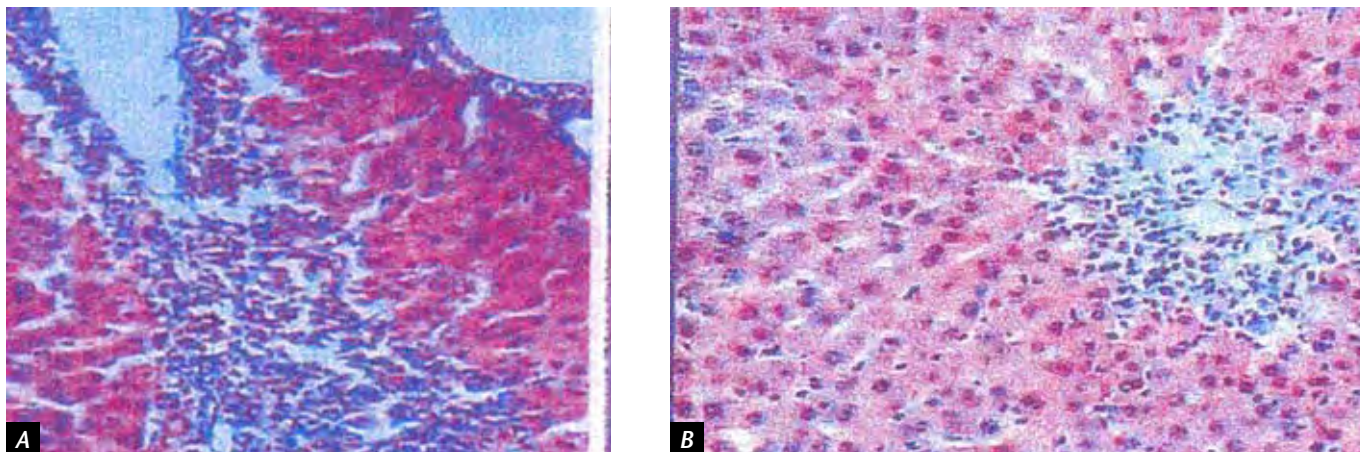
Αποτελέσματα

Βιοχημικό προφίλ έπειτα από επαγόμενη από TAA οξεία ηπατική ανεπάρκεια: η χορήγηση NH_4Cl αναστρέφει μερικώς τις επηρεασμένες παραμέτρους

Οι επίμυες που έλαβαν 0.9% NaCl αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου του πει-

ράματος. Τα ζώα που έλαβαν 3 δόσεις TAA ανά 24ωρα διαστήματα (ομάδα I) παρουσίασαν πολύ αυξημένα τα ηπατικά ένζυμα ALT και AST (ALT:6500%, AST: 5700%) μετά την τρίτη χορήγηση TAA (Εικόνα 1). Τα επίπεδα της χολερυθρίνης, της γλυκόζης, της ουρίας, της κρεατίνης παρουσιάστηκαν επίσης επηρεασμένα σε όλα τα ζώα που έλαβαν TAA σε σχέση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στα ζώα ελέγχου. Τα επίπεδα αμμωνίας στο αίμα των ζώων της ομάδας I ήταν πολύ αυξημένα σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου και μάλιστα σε επίπεδα τέτοια που ξεπερνούσαν τις συγκεντρώσεις που απαιτούνται στο ΚΝΣ για την εμφάνιση υπεραμμωνιακού κώματος (5.5 – 8.5 mg/dl)²⁵ (Εικόνα 1).

Η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου (2 ώρες μετά την 2η και 3η ένεση TAA) σε οποιαδήποτε δοσολογία μείωσε τους δείκτες των ηπατικών βλαβών και ανέστρεψε μερικώς το βιοχημικό προφίλ (Εικόνα 1). Το βέλτιστο αποτέλεσμα λήφθηκε έπειτα από τη χορήγηση 600mg/kg σωματικού βάρους NH_4Cl (Εικόνα 1). Η ποσότητα αυτή του NH_4Cl οδήγησε και σε εντυπωσια-



Εικόνα 2. Α) Ιστολογική παρουσίαση του ήπατος των ζώων της ομάδας I με έντονη νέκρωση και βαριά φλεγμονώδη διήθηση **Β)** Ιστολογική παρουσίαση του ήπατος των ζώων της ομάδας III μειωμένη ηπατική βλάβη (H.E.X.125)

κή πτώση των επιπέδων αμμωνίας στο αίμα η οποία επέστρεψε σε υποκωματώδη επίπεδα απόλυτα συγκρίσιμα με αυτά της ομάδας ελέγχου (στην οποία δεν χορηγήθηκε TAA).

Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και επαγόμενη από TAA οξεία ηπατική ανεπάρκεια: η χορήγηση NH₄Cl μειώνει τα επίπεδα του TNF-α.

Τα επίπεδα του ορού IL-6 και του TNF-α αυξήθηκαν σημαντικά στα ζώα που έλαβαν TAA σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα τα ζώα που ανήκαν στην ομάδα I παρουσίασαν πενταπλάσια αύξηση των επιπέδων IL-6 και τριπλάσια αύξηση των επιπέδων TNF-α 12 ώρες μετά την τρίτη δόση TAA (Εικόνα 1).

Στα ζώα που χορηγήθηκε κλωριούχο αμμώνιο παρατηρήθηκε επιπλέον αύξηση των επιπέδων ορού IL-6. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ορού του IL-6 στα ζώα των ομάδων I και III (p<0.001). Αντίθετα, τα επίπεδα του TNF-α μειώθηκαν στις ομάδες II, III και IV σε σύγκριση με αυτά της ομάδας I. Η σημαντικότερη μείωση των επιπέδων του TNF-α παρατηρήθηκε στην ομάδα III σε σχέση με τις τιμές που βρέθηκαν στην ομάδα I (p<0.001).

Η μείωση αυτή πιθανότατα αντικατοπτρίζει την ύφεση (έπειτα από την χορήγηση NH₄Cl) της φλεγμονώδους

διαδικασίας που συνοδεύει τις ηπατικές βλάβες που προκαλούνται από το TAA.

Το NH₄Cl βελτιώνει την ιστοπαθολογική εικόνα που προκαλείται έπειτα από την χορήγηση TAA

Η ιστολογία του ήπατος παρουσίασε εκτεταμένη κεντρολοβιακή νέκρωση με βαριά φλεγμονώδη διήθηση που αποτελείτο κυρίως από λεμφοκύτταρα. Στις νεκρωτικές περιοχές παρατηρήθηκε επίσης και ένας μικρός αριθμός πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Επιπλέον παρατηρήθηκε μιτωτική δραστηριότητα στα ηπατοκύτταρα του λοβίου (Εικόνα 2). Η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου σε οποιαδήποτε δοσολογία στα ζώα που έλαβαν TAA μείωσε ηπατοκυτταρικές βλάβες (Πίνακας 1) και βελτίωσε την ιστολογική εικόνα του ήπατος (Εικόνα 2). Παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική μείωση των δεικτών των ηπατικών βλαβών (φλεγμονή και τη νέκρωση) κατά τη χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου σε δοσολογία 600mg/κιλό σωματικού βάρους (ομάδα I έναντι ομάδας III, p<0.001). Αντίθετα, η μιτωτική δραστηριότητα των ηπατοκυττάρων αυξήθηκε, γεγονός που πιθανά υποδεικνύει την ενεργό αναγέννηση του ήπατος (Πίνακας 1).

Το NH₄Cl αναστρέφει την εγκεφαλοπάθεια που προκαλείται έπειτα από

την χορήγηση TAA και βελτιώνει σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης.

Όλα τα ζώα που έλαβαν TAA (ομάδα I) – και παρέμειναν στη ζωή – παρουσίασαν, 12 ώρες μετά τη χορήγηση της 3ης δόσης TAA, απώλεια αντανακλαστικών και κώμα (εγκεφαλοπάθεια βαθμού 3-4) (Πίνακας 2). Η εικόνα αυτή είναι συμβατή με τα επίπεδα αμμωνίας στο αίμα που στην ίδια χρονική στιγμή ήταν σε επίπεδα που ξεπερνούσαν τα όρια (συγκεντρώσεων στο ΚΝΣ) για την εμφάνιση υπεραμμωνιακού κώματος²⁵. Η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας στα ζώα που έλαβαν TAA (12 ώρες μετά την τρίτη δόση TAA), και έτσι τα ζώα των ομάδων II, III και IV που επιβίωσαν παρουσίασαν αυτόματη ανάληψη και εγκεφαλοπάθεια βαθμού 1-2 (p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα I). Το βέλτιστο αποτέλεσμα το είχαμε στα ζώα της ομάδας III όπου η εγκεφαλοπάθεια δεν ξεπέρασε τον βαθμό 1 (πίνακας 2). Η εικόνα αυτή συμβαδίζει πλήρως με την εντυπωσιακή πτώση των επιπέδων αμμωνίας στο αίμα (σε υποκωματώδη/φυσιολογικά) επίπεδα στην εν' λόγω ομάδα.

Ο βαθμός επιβίωσης εκτιμήθηκε σε όλες τις ομάδες ζώων της μελέτης μας 12 ώρες μετά τη χορήγηση της τρίτης δόσης TAA. Τα ζώα της ομάδας I επιβίωσαν σε ποσοστό 25% κατά το τέ-

λος του πειραματικού χρόνου. Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου αύξησε θεαματικά το βαθμό επιβίωσης των ζώων των ομάδων II, III και IV σε ποσοστά 40%, 75% και 50% αντίστοιχα (Πίνακας 2) ($p < 0.001$). Και στην περίπτωση αυτή, το βέλτιστο αποτέλεσμα το είχε η ομάδα III εμφανίζοντας 3-πλάσια ποσοστά επιβίωσης από την ομάδα I (75% έναντι 25%, αντίστοιχα).

Συζήτηση

Ο τύπος της οξείας ηπατικής ανεπάρκειας που προκλήθηκε στους επίμυες με χορήγηση TAA είχε χαρακτηριστεί παλαιότερα από κλινικές παρατηρήσεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις παρουσιάζοντας ένα αξιόπιστο μοντέλο της ανθρώπινης οξείας ηπατικής ανεπάρκειας και της προκαλούμενης από αυτή εγκεφαλοπάθειας⁶⁻⁸. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της χορήγησης του κλωριούχου αμμωνίου στην επαγόμενη από TAA οξεία ηπατική ανεπάρκεια των επιμύων.

Η TAA (CH₃CSNH₂) είναι μια θειονοσουλφούρια που μπορεί να προκαλέσει οξεία ηπατική βλάβη αμέσως μετά τη χορήγηση, κίρρωση κατόπιν χρόνιας χορήγησης και καρκίνο⁸. Λίγο μετά την είσοδο της στον οργανισμό υποβάλλεται σε εκτεταμένο μεταβολισμό από το σύστημα μεικτής οξειδωσης (hepatic mixed-function oxidase enzymes) και μετατρέπεται σε οξειδίο του ακεταμιδίου (CH₃CONH₂) και οξειδίο του θειοακεταμιδίου (CH₃CSONH₂)⁸. Το οξειδίο του ακεταμιδίου ασκεί τοξική δράση στο ήπαρ, ενώ το οξειδίο του θειοακεταμιδίου μεταβολίζεται περαιτέρω, τουλάχιστον μερικά, μέσω του κυττάρου P-450 (CYP) σε άλλα παράγωγα, συμπεριλαμβανομένου και ενός πολικού παραγώγου, του διοξειδίου του θειοακεταμιδίου (CH₃CSO₂NH₂), το οποίο θεωρείται πολύ δραστικό²⁶. Συγκεκριμένα ο μεταβολίτης αυτός συνδέεται με διάφορα μεγαλομόρια των ιστών και προκαλεί ηπατική βλάβη²⁶. Για την ηπατοτοξική δράση του TAA απολύτως απαραίτητη είναι η βιομετατροπή του στους τοξικούς του μεταβολίτες. Χαρακτηριστικά, χορήγηση TAA σε ποντίκια που τους λείπει

το ένζυμο CYP2E1 από το κυτόχρωμα P-450 δεν προκαλεί καμία ηπατοτοξική δράση²⁷. Στη συνέχεια, οι μεταβολίτες του TAA προκαλούν νέκρωση κυττάρων και βλάβη ήπαρ η οποία επιτείνεται από μια φλεγμονώδη διαδικασία που συνοδεύεται από την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IL-6²⁷. Τελικά, τα ζώα οδηγούνται σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια και αδυναμία εξουδετέρωσης νευροτοξικών ουσιών που εισέρχονται από το γαστρεντερικό, όπως η αμμωνία. Η αύξηση της αμμωνίας στο αίμα οδηγεί με την σειρά της σε ηπατική εγκεφαλοπάθεια⁶.

Στην παρούσα μελέτη η ηπατοκυτταρική βλάβη μετά τη χορήγηση TAA (στην ομάδα I) προσδιορίστηκε:

α) έμμεσα μέσω της πολύ μεγάλης αύξησης (κατά περίπου 6000%) των ηπατικών ενζύμων ALT και AST και των αυξημένων επιπέδων αμμωνίας, χολερυθρίνης, γλυκόζης, ουρίας και κρεατίνης και

β) άμεσα μέσω παθολογοανατομικής εξέτασης του ήπατος και ανεύρεσης εκτεταμένης νέκρωσης και φλεγμονής. Η αμμωνία μάλιστα αυξήθηκε σε επίπεδα μεγαλύτερα από αυτά που απαιτούνται για την εμφάνιση υπεραμμωνιακού κώματος. Το 75% των ζώων, παρόλη την υποστηρικτική θεραπεία, δεν κατάφερε να επιβιώσει, ενώ στο υπόλοιπο 25% παρατηρήθηκε εγκεφαλοπάθεια βαθμού 3-4 (απώλεια αντανακλαστικών και κώμα).

Τα αποτελέσματα της χορήγησης του NH₄Cl στη βέλτιστη συγκεντρωσή του (600mg/kg βάρους, ομάδα III) ήταν θεαματικά. Η επιβίωση των ζώων αυξήθηκε στο 75% και στα επιζώντα ζώα η εγκεφαλοπάθεια μειώθηκε στο βαθμό 1. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων έπεσαν στο μισό από αυτά της ομάδας I, η αμμωνία υποτετραπλασιάστηκε, πέφτοντας σε υποκωματώδη επίπεδα και οι λοιπές βιοχημικές παράμετροι βελτιώθηκαν. Παθολογοανατομικά, η κεντρολοβιακή νέκρωση και η φλεγμονώδης διήθηση στο ήπαρ μειώθηκαν στο 1/3 ενώ η μιτωτική δραστηριότητα (συμβατή με την αναγέννηση του ήπατος)

αυξήθηκε κατά 50%.

Για να διερευνήσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο το NH₄Cl προλαμβάνει την οξεία ηπατική νέκρωση που προκαλείται από το TAA, εξετάσαμε τη μεταβολή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IL-6. Είναι γνωστό ότι ο TNF-α συμμετέχει στη φλεγμονώδη διαδικασία που συνοδεύει τις ηπατικές βλάβες που προκαλούνται από χημικά. Μάλιστα, η χορήγηση διαλυτού υποδοχέα TNF-α (που εξουδετερώνει τον TNF-α), εμποδίζει την πρόκληση ηπατικών βλαβών σε επίμυες από τη χορήγηση τετρακλωριδίου του άνθρακα¹⁶. Επιπλέον, η χρήση πενταξυφυλίνης, ενός ανταγωνιστή του TNF-α, εφαρμόστηκε για την ελαχιστοποίηση των ηπατικών βλαβών από τη χορήγηση της τοξίνης concanavalin A²⁸. Στη μελέτη μας, η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου μείωσε στο ήμισυ τα επίπεδα TNF-α του ορού στους επίμυες που έλαβαν TAA, και επιπλέον μείωσε και τις ιστολογικά αποδεδειγμένες ηπατοκυτταρικές βλάβες. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει ότι η δράση του κλωριούχου αμμωνίου σχετίζεται με μειωμένη νέκρωση και φλεγμονή στο ήπαρ έπειτα από την χορήγηση TAA. Από την άλλη πλευρά, η IL-6 είναι μια κυτταροκίνη ιδιαίτερα σημαντική για τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων^{29,30}. Είναι γνωστό, ότι τα επίπεδά της αυξάνονται σημαντικά κατά τις πρώτες ώρες μετά από μια μερική ηπατεκτομή και φυσικά διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων^{29,30}. Τα αυξημένα επίπεδα της κυκλοφορούσας IL-6 (κατά περίπου 50%) στους επίμυες που έλαβαν κλωριούχο αμμώνιο, πιθανότατα σχετίζεται με τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μια άμεση ή έμμεση επίδραση αυτού του φαρμάκου στην ικανότητα του φυσιολογικού πολλαπλασιασμού του ήπατος.

Η παρουσία τοξικών μεταβολιτών στα ηπατοκύτταρα μειώνει τις δυνατότητες των συστημάτων αποτοξίνωσής τους και αυξάνει τις απαιτήσεις τους σε ενέργεια, επηρεάζοντας την ενεργειακή τους κατάσταση. Η δράση της χορήγησης του κλωριούχου αμμωνίου στα ηπατοκύτταρα θα μπορούσε να απο-

► δοθεί και στην επίδρασή του στη διαλυτότητα της χολερυθρίνης και στην πολικότητα των μεμβρανών. Το χλωριούχο αμμώνιο μεταβάλλει την πολικότητα των μορίων της χολερυθρίνης με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να παράγεται από τον οργανισμό πιο υδατοδιαλυτή χολερυθρίνη και συνεπώς να βελτιώνεται η έκκριση χολερυθρίνης από τα ηπατοκύτταρα, τόσο στην κυκλοφορία του αίματος, όσο και στην παραγόμενη χολή^{22,31}. Αυτή η ευεργετική επίδραση στα ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αντοχή τους στις βλάβες μέσω της αύξησης της ενεργειακής τους κατάστασης και της μείωσης της κυτταρικής υποξίας. Με το μηχανισμό αυτό η λειτουργική ικανότητα των ηπατοκυττάρων βελτιώνεται και επιταχύνεται ο πολλαπλασιασμός τους.

Συμπερασματικά, η χορήγηση NH_4Cl μειώνει την ηπατική βλάβη και την εγκεφαλοπάθεια που προκαλείται από το ΤΑΑ, αυξάνει θεαματικά την επιβίωση των πειραματοζώων και σχετίζεται με αυξημένη αναγέννηση του ήπατος. Έτσι, με βάση τα παραπάνω δεδομένα το χλωριούχο αμμώνιο θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για καταστάσεις που προκαλούν μαζική νέκρωση του ήπατος και οξεία ηπατική ανεπάρκεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of hepatology* 1991; 13(3):372-4.
2. Viral hepatitis. *British medical bulletin* 1990; 46(2):301-558.
3. O'Grady JC, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure:

- redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342(8866):273-5.
4. Lee WM. Acute liver failure. *The New England journal of medicine* 1993; 329(25):1862-72.
 5. Bismuth H, Samuel D, Gugenheim J, Castaing D, Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Emergency liver transplantation for fulminant hepatitis. *Annals of internal medicine* 1987; 107(3):337-41.
 6. Zimmermann C, Ferenci P, Pfl C, Yurdadayin C, Ebner J, Lassmann H, Roth E, Hortsagl H. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* (Baltimore, Md) 1989; 9(4):594-601.
 7. Larsen FS, Knudsen GM, Paulson OB, Vilstrup H. Cerebral blood flow autoregulation is absent in rats with thioacetamide-induced hepatic failure. *Journal of hepatology* 1994; 21(4):491-5.
 8. Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1977; 200(2):439-48.
 9. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical journal* 1984; 222(1):1-15.
 10. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987; 1(6):441-5.
 11. Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL. Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen. *Biochemical and biophysical research communications* 1987; 149(3):889-96.
 12. Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, Weiner FR. Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. *Growth factors* (Chur, Switzerland) 1989; 1(3):219-26.
 13. Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambrone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *The Journal of cell biology* 1989; 108(6):2477-82.
 14. McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md) 1989; 9(3):349-51.
 15. Yoshioka K, Kakumu S, Arai M, Tsutsumi Y, Inoue M. Tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md) 1989; 10(5):769-73.
 16. Czaja MJ, Xu J, Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* 1995; 108(6):1849-54.
 17. Ansley JD, Isaacs JW, Rikkers LF, Kutner MH, Nordlinger BM, Rudman D. Quantitative tests of nitrogen metabolism in cirrhosis: relation to other manifestations of liver disease. *Gastroenterology* 1978; 75(4):570-9.

18. Jung K, Hirschberg K, Faust H, Matkowitz R. A liver-function test using ^{15}N -labelled ammonium chloride. *European journal of nuclear medicine* 1985; 11(2-3):62-4.
19. Jung K, Faust H, Matkowitz R. [^{15}N] ammonium test for liver function diagnosis. *Zeitschrift für medizinische Laboratoriumsdiagnostik* 1989; 30(3):169-74.
20. Zieve L. Regenerative enzyme activity of the liver after partial hepatectomy or toxic injury depressed by continuous NH_4^+ infusion. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1989; 114(5):527-30.
21. Zieve L, Dozeman R. Effect of hepatic failure toxins on regenerative enzymes in the liver after injury with galactosamine in the rat. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1989; 113(4):463-8.
22. Rabkin R, Palathumpat M, Tsao T. Ammonium chloride alters renal tubular cell growth and protein turnover. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1993; 68(4):427-38.
23. Committee on Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources: National Research Council, Washington, 1985.
24. Murawaki Y, Tanimoto K, Hirayama C, Ikuta Y, Watabe N. A simple and rapid microdiffusion method for blood ammonia using a reflectance meter and a reagent plate, and its clinical evaluation for liver diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1984; 144(2-3):195-202.
25. Szerb JC, Butterworth RF. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology* 1992; 39(2):135-53.
26. Porter WR, Neal RA. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 1978; 6(4):379-88.
27. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai Y, Chusiri F, Gonzalez S, Fukushima. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 2008; 228(3):295-300.
28. Shirin H, Bruck R, Aeed H et al. Pentoxifylline prevents concanavalin A-induced hepatitis by reducing tumor necrosis factor alpha levels and inhibiting adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. *Journal of hepatology* 1998; 29(1):60-7.
29. Michalopoulos GK, MC DeFrances. Liver regeneration. *Science* (New York, NY) 1997; 276(5309):60-6.
30. Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000; 47(2):309-12.
31. Sawitsky A, Cheung WH, Seifter E. The effect of pH on the distribution of bilirubin in peripheral blood, cerebrospinal fluid, and fat tissues. *The Journal of pediatrics* 1968; 72(5):700-7.