

# Το NH<sub>4</sub>Cl ως δυνητική θεραπευτική επιλογή στην οξεία ηπατική ανεπάρκεια

## Πειραματική μελέτη

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

**Α' Προπ. 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 ηπατο-βιοχημικό 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 Wistar 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 NH<sub>4</sub>Cl, 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<sup>1-4</sup>. Η άμεση μεταμόσχευση ήπατος έχει αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στις περιπτώσεις αυτές<sup>3,5</sup>.

Η χορήγηση της ηπατοξίνης θειακεταμίδης (hepatotoxin thioacetamide

**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

administration-TAA) προκαλεί σε πειραματοζώα (επίμυες) ένα τύπο οξείας ηπατικής ανεπάρκειας που χαρακτηρίζεται από μαζική νέκρωση του ήπατος, ραγδαίες νευρολογικές βλάβες και θάνατο λόγω βαριάς εγκεφαλοπάθειας και εγκεφαλικού οιδήματος<sup>6,7</sup>. Η κατάσταση αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί πρότυπο πειραματικής επαγωγής οξείας ηπατικής ανεπάρκειας. Η TAA ανήκει στις θειονοσουλφουρίες και μπορεί να προκαλέσει επιπρόσθετα κίρρωση έπειτα από χρόνια χορήγηση της<sup>8</sup>.

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 οξυγόνου<sup>9-11</sup> και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα) και οι ιντερλευκίνες 1 και 6<sup>12-15</sup>. Η χορήγηση αναστολέων του TNFα έχει ευεργετική δράση στο πάσχον ήπαρ<sup>16</sup>.

Το χλωριούχο αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl) είναι ένα διαλυτό άλας που χρησιμοποιείται σήμερα στην κλινική ιατρική για τη θεραπεία της υποχλωραιμικής μεταβολικής αλκάλωσης. Επίσης χρησιμοποιείται στο διαγνωστικό έλεγχο της λειτουργικής ικανότητας του ήπατος<sup>17-19</sup>. Η χορήγηση από το στόμα του χλωριούχου αμμωνίου (σεσημασμένου με 15N) και η επακόλουθη ιστοτοπική ανάλυση της ουρίας (15N-ουρίας) και της αμμωνίας (15N-αμμωνίας) στα ούρα παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργική κατάσταση του ήπατος. Κλινικές έρευνες που μελέτησαν τη σχέση μεταξύ της αμμωνίας (15N) και της ουρίας

(15N) που απεκκρίθηκε στα ούρα 3 ώρες μετά τη χορήγηση του σεσημασμένου χλωριούχου αμμωνίου από το στόμα έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ηπατικές βλάβες και σε υγιή άτομα<sup>18</sup>.

Η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση του χλωριούχου αμμωνίου σε ζώα με έντονο ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό κατόπιν είτε μερικής ηπατεκτομής ή ηπατοπάθειας λόγω τοξινών, μείωσε τη δραστηριότητα των αναγεννητικών ενζύμων<sup>20-21</sup>. Η δοσολογία του χλωριούχου αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε σε αυτές τις μελέτες ήταν εξαιρετικά υψηλή και χαρακτηρίστηκε ως δοσολογία υπό-κώματος. Από την άλλη πλευρά το χλωριούχο αμμώνιο δεν επηρέασε τη γένεση ουρίας στο ήπαρ μετά την ηπατεκτομή<sup>20</sup>. Η επίδραση του χλωριούχου αμμωνίου εις τους νεφρούς θα μπορούσε να προκαλέσει αλλοιώσεις εις τα νεφρικά σωληνάκια και εις την ανακύκλωση των πρωτεϊνών (turnover protein) ειδικά όταν χορηγείται σε πολύ υψηλές δόσεις<sup>22</sup>.

Σε παλαιότερες κλινικές παρατηρήσεις μας είχαμε διαπιστώσει ότι η χορήγηση του χλωριούχου 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 NH<sub>4</sub>Cl στην οξεία νέκρωση του ήπατος και η εξαγωγή έμμεσων συμπερασμάτων για την χρόνια νέκρωση του ήπατος, και την τοξική ηπατίτιδα όπου το NH<sub>4</sub>Cl 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 χλωριούχο αμμώνιο, μελετώντας ταυτόχρονα τη σταδιακή εξέλιξη των ιστολογικών, βιοχημικών και ανοσολογικών παραμέτρων στα πειραματοζώα καθώς και το ποσοστό επιβίωσής τους.

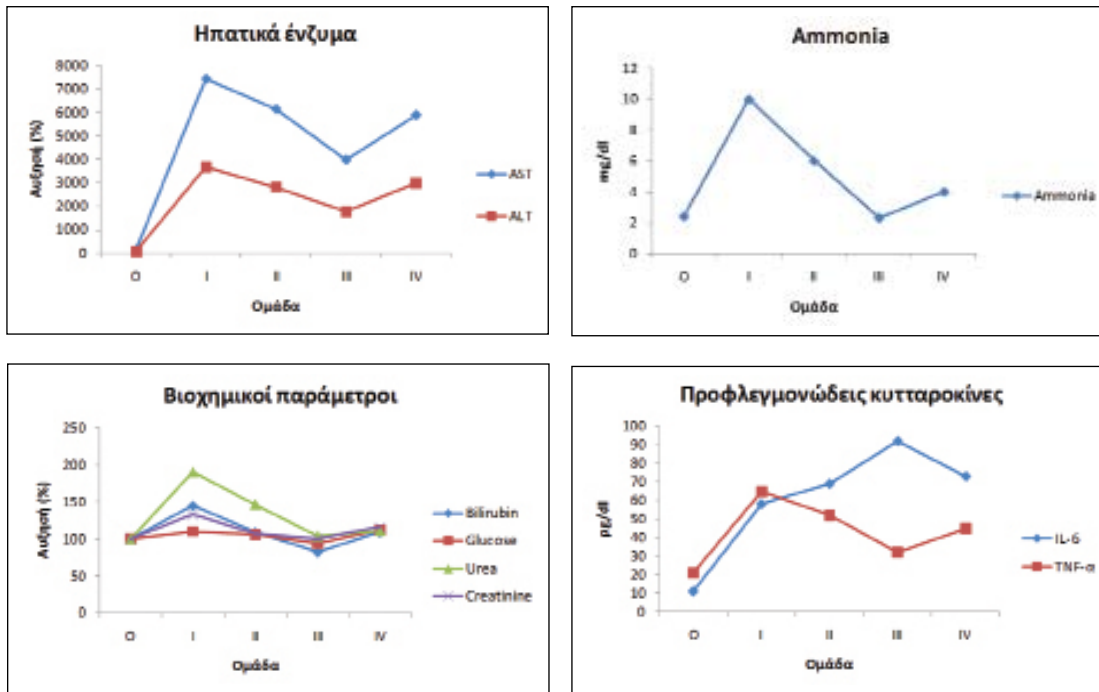
## Υλικά και Μέθοδοι

### Ζώα

Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 32 ενήλικες (ηλικίας 4 μηνών) αλφικοί επίμυες Wistar, βάρους 220-270 γραμμαρίων (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 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)<sup>23</sup>.

### Έναρξη Οξείας Ηπατικής Ανεπάρκειας και χορήγηση NH<sub>4</sub>Cl

Για την έναρξη της οξείας ηπατικής ανεπάρκειας χορηγήθηκαν στα ζώα ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις TAA με δοσολογία 400mg/κιλό σωματικού βάρους σε τρία συνεχή χρονικά διαστήματα 24 ωρών (ομάδα I)<sup>6,7</sup>. Τα ζώα ελέγχου έλαβαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις 0.9% NaCl. Παρασχέθηκε υποστηρικτική θεραπεία με υποδερμική χορήγηση 5% δεξτρόζης (25ml/κιλό σωματικού βάρους) και 0.9% NaCl με κάλιο (20meq/L) ανά 12 ώρες για την αποφυγή της υπογλυκαιμίας και της νεφρικής ανεπάρκειας. Η χορήγηση χλωριούχου αμμωνίου σε δόσεις 300 ή 600 ή 900mg/κιλό 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.



**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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  αναστρέφει τις επηρεασμένες βιοχημικές παραμέτρους και τα επίπεδα του  $\text{TNF-}\alpha$ . Το  $\text{NH}_4\text{Cl}$  χορηγήθηκε σε δόσεις: ομάδα II: 300mg/kg, ομάδα III: 600mg/kg, ομάδα IV: 900mg/kg.

**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 κρεατινής και της συνολικής πρωτεΐνης. Τα επίπεδα αμμωνίας υπολογίστηκαν σε ολικό αίμα σύμφωνα με την μέθοδο μικροδιάχυσης<sup>24</sup>.

**Ιστοπαθολογία**

Για την ανάλυση της ιστοπαθολογίας του ήπατος λήφθηκαν τομές πάχους 5μm 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 πειραμα-

τικές 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 μιτωτικός δείκτης αποτιμήθηκε ως ο αριθμός των παρατηρηθέντων μιτώσεων / 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 πόνο<sup>45</sup>.

**Καθορισμός κυτταροκινών**

Οι κυκλοφορούντες οροί  $\text{TNF-}\alpha$  (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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  αναστρέφει μερικώς τις επηρεασμένες παραμέτρους**

Οι επίμυες που έλαβαν 0.9% NaCl αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου του πειράματος. 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 παρουσιάσθηκαν 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)<sup>25</sup> (Εικόνα 1).

Η χορήγηση του χλωριούχου 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<sub>4</sub>Cl (Εικόνα 1). Η ποσότητα αυτή του NH<sub>4</sub>Cl οδήγησε και σε εντυπωσιακή 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 NH<sub>4</sub>Cl 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 χλωριούχο 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 NH<sub>4</sub>Cl) της φλεγμονώδους διαδικασίας που συνοδεύει τις ηπατικές βλάβες που προκαλούνται από το TAA.

*Το NH<sub>4</sub>Cl 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 χλωριούχου 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 χλωριούχου 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 NH<sub>4</sub>Cl 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 κώματος<sup>25</sup>. Η χορήγηση του χλωριούχου αμμωνίου

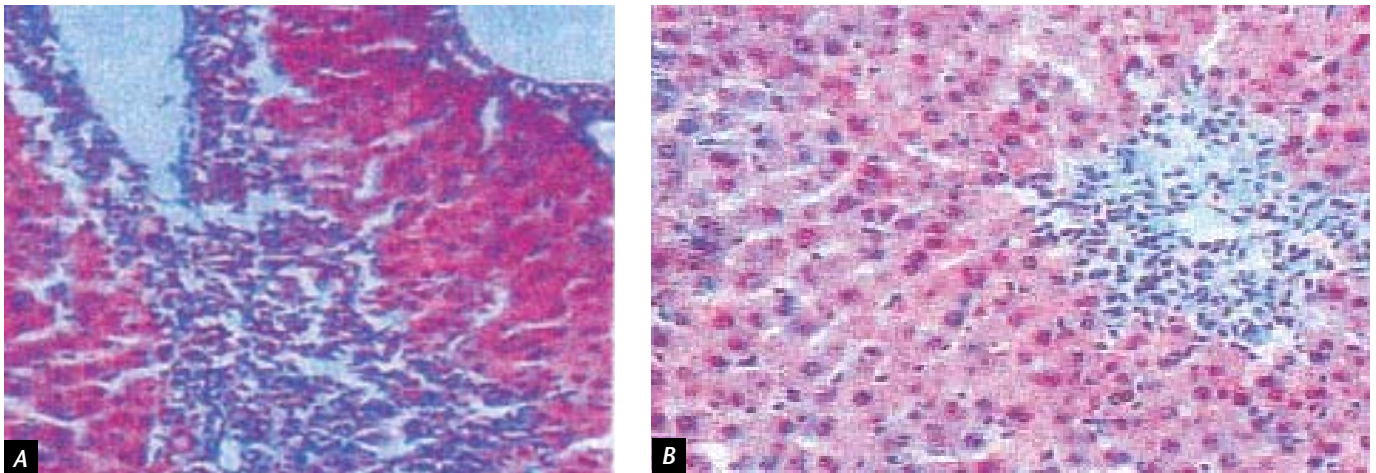
βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας στα ζώα που έλαβαν TAA (12 ώρες μετά την τρίτη δόση TAA), και έτσι τα ζώα των ομάδων II, III και IV που επιβίωσαν παρουσίασαν αυτόματα ανάνηψη και εγκεφαλοπάθεια βαθμού 1-2 (p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα I). Το βέλτιστο αποτέλεσμα το είχαμε 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 τέλος του πειραματικού χρόνου. Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση του χλωριούχου 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 επίμους 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 εγκεφαλοπάθειας<sup>6-8</sup>. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της χορήγησης του χλωριούχου αμμωνίου στην επαγόμενη από TAA οξεία ηπατική ανεπάρκεια των επιμύων.

Η TAA (CH<sub>3</sub>CSNH<sub>2</sub>) είναι μια θειο-νοσουλφούρια που μπορεί να προκαλέσει οξεία ηπατική βλάβη αμέσως μετά τη χορήγηση, κίρρωση κατόπιν χρόνιας χορήγησης και καρκίνο<sup>8</sup>. Λίγο μετά την είσοδο της στον



**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)

οργανισμό υποβάλλεται σε εκτεταμένο μεταβολισμό από το σύστημα μεικτής οξειδωσης (hepatic mixed-function oxidase enzymes) και μετατρέπεται σε οξείδιο του ακεταμιδίου ( $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ ) και οξείδιο του θειοακεταμιδίου ( $\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$ )<sup>8</sup>. Το οξείδιο του ακεταμιδίου ασκεί τοξική δράση στο ήπαρ, ενώ το οξείδιο του θειοακεταμιδίου μεταβολίζεται περαιτέρω, τουλάχιστον μερικά, μέσω του κυτοχρώματος P-450 (CYP) σε άλλα παράγωγα, συμπεριλαμβανομένου και ενός πολικού παραγώγου, του διοξειδίου του θειοακεταμιδίου ( $\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$ ), το οποίο θεωρείται πολύ δραστικό<sup>26</sup>. Συγκεκριμένα ο μεταβολίτης αυτός συνδέεται με διάφορα μεγαλομόρια των ιστών και προκαλεί ηπατική βλάβη<sup>26</sup>. 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 δράση<sup>27</sup>. 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-6<sup>27</sup>. 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 τη σειρά της σε ηπατική εγκεφαλοπάθεια<sup>6</sup>.

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, παράλληλα 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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  στη βέλτιστη συγκέντρωση του (600mg/kg βάρους, ομάδα III) ήταν θεαματικά. Η επιβίωση των

ζώων αυξήθηκε στο 75% και στα επίζωτα 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 το μηχανισμό με τον οποίο το  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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 επίμους από τη χορήγηση τετραχλωριδίου του άνθρακα<sup>16</sup>.

Επιπλέον, η χρήση πενταξυφυλίνης, ενός ανταγωνιστή του TNF-α, εφαρμόστηκε για την ελαχιστοποίηση των ηπατικών βλαβών από τη χορήγηση

► της τοξίνης concanavalin A<sup>28</sup>. Στη μελέτη μας, η χορήγηση του κλωριούχου αμμωνίου μείωσε στο ήμισυ τα επίπεδα TNF-α του ορού στους επίμους 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 τη χορήγηση TAA. Από την άλλη πλευρά, η IL-6 είναι μια κυτταροκίνη ιδιαίτερα σημαντική για τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων<sup>29,30</sup>. Είναι γνωστό, ότι τα επίπεδά της αυξάνονται σημαντικά κατά τις πρώτες ώρες μετά από μια μερική ηπατεκτομή και φυσικά διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων<sup>29,30</sup>. Τα αυξημένα επίπεδα της κυκλοφορούσης IL-6 (κατά περίπου 50%) στους επίμους 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 αποδοθεί και στην επίδρασή του στη διαλυτότητα της χολερυθρίνης και στην πολικότητα των μεμβρανών. Το κλωριούχο 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<sup>22,31</sup>. Αυτή η ευεργετική επίδραση στα ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αντοχή τους στις βλάβες μέσω της αύξησης της ενεργειακής τους κατάστασης και της μεί-

ωσης της κυτταρικής υποξίας. Με το μηχανισμό αυτό η λειτουργική ικανότητα των ηπατοκυττάρων βελτιώνεται και επιταχύνεται ο πολλαπλασιασμός τους.

Συμπερασματικά, η χορήγηση NH<sub>4</sub>Cl μειώνει την ηπατική βλάβη και την εγκεφαλοπάθεια που προκαλείται από το TAA, αυξάνει θεαματικά την επιβίωση των πειραματοζώων και σχετίζεται με αυξημένη αναγέννηση του ήπατος. Έτσι, με βάση τα παραπάνω δεδομένα το κλωριούχο αμμώνιο θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για καταστάσεις που προκαλούν μαζική νέκρωση του ήπατος και οξεία ηπατική ανεπάρκεια.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of hepatology* 1991; 13(3):372-4.
- Viral hepatitis. *British medical bulletin* 1990; 46(2):301-558.
- O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342(8866):273-5.
- Lee WM. Acute liver failure. *The New England journal of medicine* 1993; 329(25):1862-72.
- 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.
- Zimmermann C, Ferenci P, Pfl C, Yurdaydin C, Ebner J, Lassmann H, Roth E, Hortsnaagl 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.
- 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.
- 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.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical journal* 1984; 222(1):1-15.
- Machlin LJ, Bendich. A Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987; 1(6):441-5.
- 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.
- 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.
- Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone 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.

- McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md 1989; 9(3):349-51.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jung K, Hirschberg K, Faust H, Matkowitz R. A liver-function test using 15N-labelled ammonium chloride. *European journal of nuclear medicine* 1985; 11(2-3):62-4.
- Jung K, Faust H, Matkowitz R. [15N] ammonium test for liver function diagnosis. *Zeitschrift fur medizinische Laboratoriumsdiagnostik* 1989; 30(3):169-74.
- Zieve L. Regenerative enzyme activity of the liver after partial hepatectomy or toxic injury depressed by continuous NH<sub>4</sub><sup>+</sup> infusion. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1989; 114(5):527-30.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai Y, Chusiri, FJ Gonzalez, S Fukushima. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 2008; 228(3):295-300.
- 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.
- Michalopoulos GK, MC DeFrances. Liver regeneration. *Science* (New York, NY 1997; 276(5309):60-6.
- Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000; 47(2):309-12.
- 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.