

VERÄNDERUNGEN VON AMINOSÄUREN-INDEX UND AMMONIAKKONZENTRATIONEN IN BLUT UND LIQUOR CEREBROSPINALIS DES RINDES MIT LEBERSCHADEN

H. Scholz, J. Rehage, C. Meier, Maria Mertens und M. Höltershinken

Klinik für Rinderkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule,
Bischofsholer Damm 15, D - Hannover 1, Germany

EINLEITUNG

Leberfunktionsstörungen beim Rind sind Ursache für Leistungseinbußen, Fruchtbarkeits- und Gesundheitsprobleme (26). Selbst wenn Veränderungen bestimmter Metabolite und Enzymaktivitäten im Blut Hinweise auf Leberschäden geben, so ist deren ursächliche Beteiligung am Krankheitsgeschehen bislang nur unsicher nachzuweisen.

Aus Untersuchungen an Mensch, Hund, Pferd und Ratte (2,3,6,8, 21,27,30) ist bekannt, daß infolge gestörten Leberstoffwechsels Produktion und Metabolisierung von Aminosäuren betroffen sind, was sich in einem veränderten Quotienten von verzweigtkettigen (Valin, Isoleucin, Leucin) zu aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin) äußert. Darüber hinaus führt die eingeschränkte hepatische Entgiftungskapazität zu steigenden Ammoniak-Gehalten im Blut (7, 28). Beides zieht ausgeprägte klinische Erscheinungen (hepatische Enzephalopathie) nach sich.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit diese Kriterien auch für die Diagnostik von leberbedingten klinischen Störungen am Rind zu nutzen sind.

MATERIAL und METHODEN

Versuchstiere

- a) Gesunde Tiere zur Erstellung der Referenzwerte
n = 10, ohne laborklinisch erkennbare Leberbelastung
(Normalwerte für AST, GLDH, Bilirubin)
Kennzeichnung: Kontrollgruppe
- b) Klinikpatienten p.p. mit Dislocatio abomasi sinistra
(n= 31). Laborklinisch nachgewiesene Leberbelastung (AST > 80 U/l; GLDH > 15 U/l; Bilirubin > 12 µmol/l; Leberverfettung histologisch nachweisbar), aber klinisch gesund
Kennzeichnung: GML
- c) s. b) (n=19); aber klinisch erkrankt (Futteraufnahme deutlich reduziert, teilweise zentralnervöse Depression)
Kennzeichnung : KML
Je nach Ausprägung der klinischen Erscheinungen wurde diese Gruppe KML in drei Stadien unterteilt (1 = leicht ; 2 = mittelgradig; 3 = schwer erkrankt)

Probennahme

Die zu untersuchenden Proben wurden unmittelbar vor der operativen Beseitigung der Labmagenverlagerung und 1 bzw. 3-4 Tage nach der Operation gewonnen. CSF-Proben wurden 3-4 Tage nach der Operation bei einem Teil der KML-Tiere genommen und ausgewertet.

Analytik

Leberbiopsie (s. 23) ; Probenaufbereitung und -meßvorgänge sind im Detail bei (14, 15) beschrieben. Die Bestimmung der Aminosäurenkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der HPLC, die von NH₃ mit einem enzymatischen Test. Der Variationskoeffizient

der Meßpräzision in der Serie lag bei allen Analysenverfahren deutlich < 5% .

Statistik

Die Mittelwert-Differenzen der einzelnen Gruppen wurden mit gepaartem t-Test nach Student und der einfaktoriellen Varianzanalyse auf statistische Sicherheit geprüft.

ERGEBNISSE

Die an 10 gesunden Rindern erarbeiteten Referenzbereiche sind in Tab. 1 aufgeführt:

Tab. 1 : Referenzbereiche für AS-Index und NH_3 ($\mu\text{mol/l}$) in venösem Blutplasma und CSF des gesunden Rindes (n = 10)

	venöses Blutplasma				C S F			
	\bar{x}	\pm	S ₁	S ₂	\bar{x}	\pm	S ₁	S ₂
AS-Index	5,9	0,8	5,1-6,7	4,3-7,5	1,5	0,25	1,25-1,75	1,0-2,0
NH_3	12	6	6-18	0-24	10	5	5-15	0-20

Klinisch gesund erscheinende, aber als leberbelastet ausgewiesene Kühe (G M L) erreichten im AS-Index durchschnittlich exakt den als untere Grenze des Referenzbereiches errechneten Wert ($4,5 \pm 1,3$) und hoben sich statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$) von den Kontrollen ab. In der gleichen Gruppe stiegen die NH_3 -Konzentrationen im venösen Plasma auf durchschnittlich $34 \pm 12,6 \mu\text{mol/l}$ an und lagen damit um 36 % über der physiologischen Obergrenze.

Patienten mit Leberfunktionsstörungen einschließlich klinischen Veränderungen (K M L, Abb. 1 und 2) setzten die bei GML beobachtete Tendenz fort: Der AS-Index fiel in Abhängigkeit vom Schweregrad des klinischen Bildes über 3,2 bzw. 2,6 auf 2,1 ab ($p < 0,05$). Im CSF sank er ebenfalls auf unphysiologisch tiefe Werte ab ($0,8 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$).

Gleiches - aber in umgekehrter Richtung - galt für die NH_3 -Gehalte im venösen Plasma: Bereits bei geringfügigen Krankheitserscheinungen stiegen sie gegenüber den GML-Patienten über $38 \mu\text{mol/l}$ im Stadium 1 mit zunehmendem Schweregrad bis letztlich auf Konzentrationen von $77 \mu\text{mol/l}$ im Stadium 3 an. Diese Veränderung wirkte sich auch auf den CSF-Gehalt aus, der sich mit $23 \pm 12 \mu\text{mol/l}$ um gut 10 % über die physiologische Obergrenze hinaus erhöhte.

Verlaufsuntersuchungen an genesenden Tieren zeigten, daß mit Normalisierung des klinischen Verhaltens (ZNS-Erscheinungen, Futteraufnahme) diese laborklinischen Parameter ebenfalls zur Norm zurückkehrten.

DISKUSSION

Die bei den KML-Tieren beobachteten Veränderungen des klinischen Bildes werden für schwere Leberschädigungen beschrieben, ohne daß jedoch ein eindeutiger Nachweis über die causalen Zusammenhänge

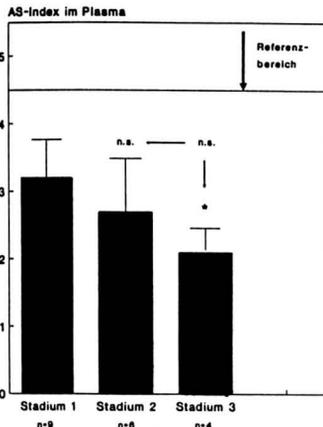


Abb. 1: AS-Index im Plasma klinisch kranker Kühe mit Leberschaden (KML) in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

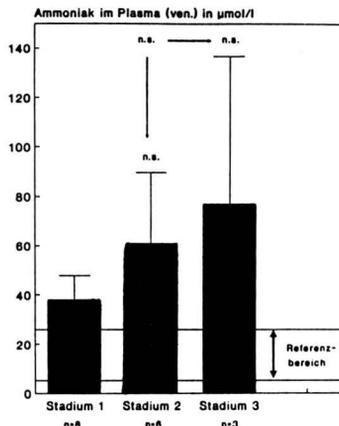


Abb. 2: Ammoniak-Konzentrationen im venösen Plasma klinisch kranker Kühe mit Leberschaden (KML) in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

gelingen wäre (9,16,22,25,29). Vergleicht man die Veränderungen mit den bei der hepatischen Enzephalopathie (HE) von Mensch, Hund und Pferd (4,8,18) beobachteten Erscheinungen, so läßt sich eine überraschende Ähnlichkeit feststellen.

Die für diese Patientengruppen registrierten Veränderungen spezieller laborklinischer Parameter (AS-Index, NH_3 -Gehalt) konnten auch für das Rind bestätigt werden (Abb. 1,2). Offensichtlich muß man auch für diese Spezies die typische Pathogenese der HE unterstellen. So ist davon auszugehen, daß die funktionsbeeinträchtigte Leber durch eingeschränkte Metabolisierung der aromatischen bei gleichzeitig erhöhten Verbrauch der verzweigt-kettigen Aminosäuren im katabolen Stoffwechsel die Voraussetzungen für eine vermehrte Produktion falscher Neurotransmitter schafft, die das typische Bild der hochgradig lebergestörten Kuh mit auslösen (5,12,17,19,24).

Der infolge mangelhafter Harnstoff- und Glutaminsynthese erhöhte NH_3 -Gehalt unterstützt das Geschehen durch neurotoxische Wirkungen im zellulären Energiestoffwechsel, Permeabilitätsbeeinträchtigung der Nervenzellmembranen und durch Beeinflussung postsynaptischer Rezeptoren (1,10, 11,13,20).

Somit steht über die Prüfung des AS-Index und der NH_3 -Konzentrationen im Blutplasma - wobei der arterielle NH_3 -Gehalt offenbar die eindeutigeren Ergebnisse liefert (14) - zumindest den Kliniken eine zuverlässigere Möglichkeit zur Erkennung Leber-Schaden-bedingter Störungen des bovines Allgemeinbefindens zur Verfügung. Sie kann - besonders bei wiederholter Anwendung - auch als prognostisches Hilfsmittel verwendet werden.

SCHRIFTTUM

- 1) Cardelli-Cangiano, P., P. Cangiano, J.H. James, F. Ceci, J.E. Fischer u. R. Strom (1984): J. Biol. Chem. 259,5295-5300.-
- 2) Cascino,

- A., C. Cangiano, V. Calcaterra, F. Rossi-Fanelli u. L. Capocaccia (1978): Am. J. Dig. Dis. 23, 591-598.- 3) Cascino, A., C. Cangiano, F. Fiaccadori, F. Ghinelli, M. Merli, G. Pelosi, O. Riggio, F. R. Fanelli, D. Sacchini, M. Stortoni u. L. Capocaccia (1982): Dig. Dis. Sci. 27, 828-832.- 4) Fiebiger, I., L. Bucsis, H. J. Flashhof, W. Kraft u. R. Parrisius (1985): Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 98, 155-160.- 5) Fischer, J. E., u. R. J. Baldessarini (1971): Lancet 2, 75-79.- 6) Fischer, J. E., J. M. Funovics, A. Aguirre, J. H. James, J. M. Keane, R. I. C. Wesdorp, N. Yoshimura u. T. Westman (1975): Surgery 78, 276-290.- 7) Gerok, W. (1987): Infusionstherapie 14, Suppl. 5, 43-49.- 8) Gulick, B. A., Q. R. Rogers u. H. D. Knight (1978): Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 24, 517-522.- 9) Herdt, T. H. (1988): Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 4, 269-287.- 10) Hindfelt, B., F. Plum u. T. E. Duffy (1977): J. Clin. Invest. 59, 386-396.- 11) Holm, E. (1975): Biochem., Elektrophysiol., Toxikol., Fischer Verlag, Stuttgart.- 12) James, J. H., u. J. E. Fischer (1981): Pharmacology 22, 1-7.- 13) James, J. H., V. Ziparo, B. Jeppson u. J. E. Fischer (1979): Lancet 2, 772-775.- 14) Meier, C. (1992): Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.- 15) Mertens, M. (1992): Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.- 16) Morrow, D. A. (1976): J. Dairy Sci. 59, 1525-1629.- 17) Munro, H. N., J. D. Fernstrom u. R. J. Wurtman (1975): Lancet 1, 722-724.- 18) Müting, D., u. J. Reikowski (1983): Fortschr. Med. 101, 1610-1614.- 19) Odessey, R., u. A. L. Goldberg (1972): Am. J. Physiol. 223, 1376-1383.- 20) Riederer, P., E. Kienzl, K. Jellinger, G. Kleinberger, S. Wuketich u. W. Wesemann (1984): Verlag Karger, Basel, 373-384.- 21) Rosen, H. M., N. Yoshimura, J. M. Hodgman u. J. E. Fischer (1977): Gastroenterology 72, 483-487.- 22) Rosenberger, G., u. H. D. Gründer (1978): Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 363-378.- 23) Scholz, H., G. Zipori u. M. Höltershinken (1988): Prakt. Tierarzt Coll. Vet. 19, 21-22.- 24) Smith, A. R., F. Rossi-Fanelli, V. Ziparo, J. H. James, B. A. Perelle u. J. E. Fischer (1978): Ann. Surg. 187, 343-350.- 25) Stöber, M. (1978): Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 1051-1070.- 26) Stöber, M. u. G. Dirksen (1982): Prakt. Tierarzt. Colleg. vet. 12, 79-88.- 27) Strombeck, D. R., u. Q. Rogers (1978): J. Am. Vet. Med. Assoc. 173, 93-96.- 28) Strombeck, D. R., M. G. Weiser u. J. J. Kaneko (1975): J. Am. Vet. Med. Assoc. 166, 1105-1108.- 29) West, H. J. (1990): Res. Vet. Sci. 48, 221-227.- 30) Zieve, L. (1981): 1, 360-366.-

ZUSAMMENFASSUNG

An insgesamt 60 hochleistenden Milchkühen wurden Untersuchungen zur Diagnostik von Leberfunktionsstörungen durchgeführt. 10 gesunde Tiere, denen laborklinisch kein Leberschaden nachzuweisen war (Nutzung von AST, GLDH, Bilirubin, Leberbiopsie und histologische Fettgehaltsbestimmung) dienten zur Erstellung von Referenzwerten.

Die Untersuchungen fanden an Tieren im Puerperium mit erfolgreich behobener linkseitiger Labmagenverlagerung statt, bei denen labordiagnostisch eine Leberbelastung diagnostiziert wurde (AST > 80 U/l, GLDH > 15 U/l, Bilirubin > 12 µmol/l). Diese Tiere wurden in "leberbelastet, klinisch gesund" (GML, n=31) und "leberbelastet, klinisch erkrankt" (KML, n=19) unterteilt. KML konnte je nach Grad der klinischen Krankheitserscheinungen nach den Stadien 1): leicht (n= 9), 2): mittelgradig (n= 6) und 3): schwer erkrankt (n= 4) differenziert werden.

In Blut und Liquor cerebrospinalis (CSF) wurden die Aminosäurenkonzentrationen zur Errechnung des Quotienten aus Valin+Isoleucin+Leucin einerseits und Phenylalanin+Tyrosin andererseits (AS-Index) bestimmt. Desgleichen wurden die NH₃-Konzentrationen gemessen.

Folgende Ergebnisse können mitgeteilt werden:

1) Die Referenzwerte für den AS-Index des Rindes betragen:

- a) im Blutplasma: \bar{x} : 5,9 ± 0,8, S_1 : 5,1-6,7, S_2 : 4,3-7,5
 b) im CSF: \bar{x} : 1,5 ± 0,25, S_1 : 1,25-1,75, S_2 : 1,0-2,0

2) Die Obergrenzen der Referenzwerte für die NH_3 -Gehalte des Rindes betragen

- a) im Blutplasma, venös: < 25 $\mu\text{mol/l}$, arteriell: < 30 $\mu\text{mol/l}$
 b) im CSF : < 20 $\mu\text{mol/l}$

3) Bei Leberbelastungen verändern sich diese Parameter signifikant in Abhängigkeit vom Grad der klinischen Erkrankung:

Der AS-Index fällt ab (bis auf Werte < 3)
 Die NH_3 - Gehalte steigen an bis auf Werte > 80 $\mu\text{mol/l}$

Bei Normalisierung des klinischen Zustands gehen diese Veränderungen korrespondierend zum klinischen Verhalten auf die Normwerte zurück.

Durch Nutzung dieser Parameter besteht die Möglichkeit, Leberschaden-bedingte Störungen des klinischen Allgemeinbefindens beim Rind besser als bisher nachzuweisen.

SUMMARY

Investigations were carried out in 60 high yielding cattle to improve diagnostic tools in liver disturbances. 10 healthy cows were used to establish reference values, while another group consisted of cows (GML, n= 31) suffering from dislocatio abomasi sinistra with liver affections (elevated AST, GLDH, and bilirubine values) but clinical inapparent after reposition, and the third one (KML, n=19) as GML but clinical disturbed cows. The latter were divided into three units depending on the degree of clinical problems: 1) slight (n=9), 2) medium (n=6), and 3) severe (n=4).

In these animals blood was collected and in some cases CSF as well just before the operation and 3 or 4 days later. Herein aminoacids were measured to form the quotient between Valine+Isoleucine+Leucine and Penylalanine+Tyrosine (AA-Index). Ammonia concentrations were estimated too.

The following results were obtained:

- 1) The reference values for the AA-Index are:
 - a) \bar{x} : 5,9 ± 0,8, S_1 : 5,1-6,7, S_2 : 4,3-7,5 (blood, ven.)
 - b) \bar{x} : 1,5 ± 0,25, S_1 : 1,25-1,75, S_2 : 1,0-2,0 (CSF)
- 2) The upper borders of the reference value for ammonia concentrations are:
 - a) < 25 $\mu\text{mol/l}$ (ven. plasma), < 30 $\mu\text{mol/l}$ (art. plasma)
 - b) < 20 $\mu\text{mol/l}$ (CSF)
- 3) During liver disturbances these values change significantly: While the AA-Index drops down to 3 and less, the NH_3 -concentrations rise up to more than 80 $\mu\text{mol/l}$ depending on the clinical behaviour.
- 4) In clinically normalizing cattle these changes go back to normal, korresponding to the clinical status.

Using these demonstrated parameters in the diagnostic of the bovine, the linkage between hepatic and clinical disturbances can be recognized safer than before.

RESUME

60 vaches laitières de forte production ont été soumises à des expériences pour la diagnostic des troubles de la fonction du foie. Les valeurs de base ont été établies à partir de 10 vaches saines chez lesquelles on n'a pu remarquer aucun trouble du foie (AST, GLDH, Bilirubine, biopsie du foie et détermination histologique de la teneur en matière grasse).

Les expériences ont eu lieu dans la période du puerpérium chez des animaux où on a pu diagnostiquer à partir des valeurs sanguines une surcharge du foie (AST > 80 U/l, GLDH > 15 U/l, Bilirubine > 12 $\mu\text{mol/l}$) et chez lesquelles l'opération chirurgicale du déplacement de la caillette à gauche a été effectuée avec succès. Ces animaux ont été divisés en deux groupes:

- a) foie surchargé; animaux sains d'après l'examen clinique, GML, n= 31
- b) foie surchargé, animaux malades d'après l'examen clinique, KML, n= 19

Le groupe KML a été divisé en trois sousgroupes:

- 1) maladie faible
- 2) maladie moyenne sévère
- 3) maladie sévère

Dans le sang et la liqueur céphalorachidienne (CSF) la teneur en acides aminés a été utilisée pour calculer le quotient entre Valine+Isoleucine+Leucine d'une part et Phénylalanine+Tyrosine d'autre part (Indice-AA). De même la teneur en ammoniac a été mesurée

On a obtenu les résultats suivants:

- 1) Valeurs de base pour l'indice AA des bovins:
 - a) sang (ven): \bar{x} : 5,9 \pm 0,8, S_1 : 5,1-6,7, S_2 : 4,3-7,5
 - b) CSF : \bar{x} : 1,5 \pm 0,25, S_1 : 1,25-1,75, S_2 : 1,0-2-0
- 2) Les frontières hautes des teneurs en ammoniac des bovins:
 - a) sang (ven): < 25 $\mu\text{mol/l}$; sang (art.): <30 $\mu\text{mol/l}$
 - b) CSF : < 20 $\mu\text{mol/l}$
- 3) En cas de surcharge du foie ces paramètres changent d'une manière significative selon le degré de la manifestation clinique:
 - une baisse de l'indice AA jusqu'à des valeurs inférieures à 3
 - une augmentation de la teneur en ammoniac jusqu'à des valeurs supérieures à 80 $\mu\text{mol/l}$
- 4) En cas de normalisation d'image clinique ces valeurs se normalisent aussi

Ces analyses montrent qu'on a maintenant la possibilité de mieux détecter les troubles de l'état de santé dus aux surcharges du foie.