Maastricht University

"Pathophysiological basis of hepatic Encephalopathy": a multi-organ perspective in patients with liver failure

Citation for published version (APA):

Olde Damink, S. W. (2005). *"Pathophysiological basis of hepatic Encephalopathy": a multi-organ perspective in patients with liver failure*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. https://doi.org/10.26481/dis.20050531so

Document status and date:
Published: 01/01/2005

DOI:
10.26481/dis.20050531so

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 20 Apr. 2024

HOOFDSTUK 11

SAMENVATTING

Dit proefschrift is opgebouwd uit drie delen. In het eerste deel (hoofdstukken 1-4) wordt het interorgaan metabolisme van ammoniak en metabool gerelateerde aminozuren in patiënten met lever cirrhose besproken en tevens de metabole en neurospychologische gevolgen van een hoge tractus digestivus (HTD) bloeding. In het tweede gedeelte (hoofdstukken 5-7) worden de metabole gevolgen van een HTD bloeding op het vertakte keten aminozuur en het eiwitsynthese metabolisme beschreven. Het derde deel (hoofdstukken 8-13) beschrijft de pathofysiologische basis van hepatische encephalopathie (HE) in patiënten die een transjugulaire intrahepatische portasystemische stent shunt (TIPSS) insertie ondergaan. Tevens wordt in patiënten met acuut leverfalen (ALF) de relatie tussen hersenmetabolisme en haemodynamiek beschreven en wordt de klinische en pathofysiologische basis van de therapeutische toepassing van gematigd koelen van het gehele lichaam bij deze patiënten bestudeerd.

In **Hoofdstuk 1** beschrijven we het interorgaan metabolisme van ammoniak en gerelateerde aminozuren in metabool stabiele patiënten met levercirrhose en een TIPSS. De studie was ontworpen om het interorgaan ammoniak metabolisme te kwantificeren in patiënten met levercirrhose. Hierbij was er de belangrijke grondaanname dat tijdens levercirrhose de ureumsynthesecapaciteit verminderd is en dat dan de belangrijkste alternatieve ammoniak ontgiftigingsroute bestaat uit de synthese van het aminozuur glutamine uit ammoniak en glutamaat. In de 24 patiënten die we bestudeerden bleek dat ammoniak voornamelijk geproduceerd werd in de portaal drainerende organen. Daarnaast produceerden de nieren ammoniak, in hoeveelheden die gelijk was aan hetgeen in het hepato-splanchnische gebied geproduceerd werd. De skeletspieren verwijderden meer ammoniak dan de cirrhotische lever, echter de hoeveelheid stikstof die werd opgenomen door de spier in de vorm van ammoniak was minder dan afgegeven in de vorm van glutamine. De portaal drainerende organen consumeerden glutamine en produceerden ammoniak, alanine en citrulline. Een opvallende observatie was dat ureum werd afgegeven aan de vena lienalis en de vena mesenterica superior, waardoor organen die hierop draineren bijdragen aan de gehele-lichaam ureagenese in deze cirrhotische patiënten. In deze studie werd geconcludeerd dat de

hyperammonemie in metabool stabiele patiënten met levercirrhose en een TIPSS het resultaat is van de portasystemische shunting van ammoniak geproduceerd in de portaal drainerende organen en uit de nier. De spieren verwijderden meer ammoniak uit de circulatie dan de cirrhotische lever, maar produceren excessieve hoeveelheden van de niet-toxische stikstof carrier glutamine, die elders (in nier en darm) weer tot ammoniak kan worden gemetaboliseerd.

In **Hoofdstuk 2** worden de metabole gevolgen van een HTD bloeding in patiënten met lever cirrhose bestudeerd. Een HTD bloeding is klinisch een van de meest voorkomende HE inducerende momenten in deze patiëntenpopulatie. In dit hoofdstuk worden twee studies besproken. In de eerste studie werd een HTD bloeding gesimuleerd in acht patiënten met levercirrhose en een TIPSS. De bloeding werd gesimuleerd door een intragastrische toediening van een aminozuur oplossing met de samenstelling van het hemoglobine molecuul. Bloed werd gedurende vier uren intermitterend afgenomen uit de arteria femoralis en de vena femoralis, renalis, porta en de vena hepatica. Tevens werd de plasma flow over deze organen gemeten. Door de gesimuleerde HTD bloeding steeg de arteriële ammoniak concentratie zoals verwacht significant. Er kon geen significante toename in de ammoniak productie uit de portaal drainerende organen gevonden worden, maar de ammoniak productie uit de nier nam wel 6-voudig toe. In tegenstelling tot de onveranderde ammoniak opname door de cirrhotische lever, was er wel een significante toename in ammoniak consumptie door de spier.

In de tweede studie werden 9 patiënten met levercirrhose bestudeerd die een acute HTD bloeding hadden en een acute TIPSS plaatsing ondergingen. Bloed werd afgenomen uit een arterie, de vena hepatica, renalis en de vena porta. Tevens werd de plasma flow bepaald over de lever en de nier. Het bleek dat ammoniak alleen werd geproduceerd door de nieren en dat er geen netto ammoniak productie was over het splanchnische gebied. Uit beide studies werd geconcludeerd dat een toegenomen ammoniak productie door de nieren een belangrijke rol speelt in de hyperammonemie die volgt op een HTD bloeding bij patiënten met levercirrhose. Tijdens deze situatie van hyperammonemie was de spier het belangrijkste ammoniak consumerende orgaan.

In **Hoofdstuk 3A** worden de metabole gevolgen beschreven van een andere HE inducerende klinische situatie. In deze studie wordt de belangrijke rol van de nier in ammoniak homeostase beschreven tijdens de plaatsing van een TIPSS in patiënten met levercirrhose. Dertien patiënten met levercirrhose werden bestudeerd 1 uur voor en 1 uur na plaatsing van een TIPSS. In deze patiënten werd bloed afgenomen uit de vena porta, hepatica, de rechter vena renalis en de vena femoralis. Vóór plaatsing van de TIPSS bleek de efflux van ammoniak uit de nier vene significant groter te zijn dan de hoeveelheid ammoniak die door de lever werd afgegeven. De hoeveelheid ammoniak die door de lever werd afgeven was niet significant verschillend van nul. TIPSS plaatsing veranderde de arteriële ammoniak concentratie en de hoeveelheid ammoniak die

door de lever werd afgegeven niet, maar de hoeveelheid ammoniak die door de nier werd afgegeven reduceerde significant, tot hoeveelheden die niet significant verschilden van nul. De opname van de ammoniagene aminozuren glutamine en glycine door de nier werd niet beïnvloed door de TIPSS plaatsing. Dit suggereert een toename in ammoniak excretie via de urine (hetgeen echter niet gemeten werd in deze studie). Het veneuze minus arteriële concentratie verschil van ammoniak over de spier nam toe na plaatsing van de TIPSS. Na TIPSS plaatsing was de geschatte hoeveelheid ammoniak die via porta-systemische shunts in de systemische circulatie wordt afgegeven 7 keer hoger dan de hoeveelheid die door de nier werd afgegeven. De nieren bleken in staat om snel na plaatsing van de TIPSS te veranderen van een orgaan dat netto ammoniak afgeeft aan de systemische circulatie in een orgaan dat geen ammoniak meer afgeeft. Deze aanpassing van de nier zou het mechanisme kunnen zijn waarmee de patiënt met levercirrhose de ammoniak homeostase handhaaft na portasystemische shunting.

In **Hoofdstuk 3B** beschrijven we de effecten van plasma volume expansie op de ernst van HE, plasma ammoniak en urine ammoniak excretie in patiënten met diuretica-geïnduceerde HE. Vijftien patiënten met alcoholische lever cirrhose en diuretica-geïnduceerde HE werden geïncludeerd. In 8 patiënten werd humaan albumine oplossing gebruikt voor volume expansie en in 7 patiënten werden colloïden gebruikt. Een significante verbetering van HE gradatie trad alleen op in de groep die was behandeld met humaan albumine. In beide groepen waren er vergelijkbare verminderingen in plasma ammoniak concentraties, plasma renine activiteit en angiotensine II en was er een vergelijkbare toename in de gemiddelde arteriële bloeddruk, nier plasma flow en ammonia uitscheiding via de urine. Plasma malondialdehyde, een merkstof voor oxidatieve stress, was initieel verhoogd in beide groepen, maar daalde in de groep patiënten die werden behandeld met humaan albumine oplossing. De resultaten van deze studie toonden aan dat plasma volume expansie leidt tot een significante verlaging van de arteriële ammoniak concentratie. Dit geschiedt waarschijnlijk via een toegenomen ammoniak excretie via de urine. Deze verlaging van de ammoniak concentratie resulteerde alleen in een verbetering van de HE gradering in die patiënten die met humaan albumine werden behandeld en waarin een reductie in oxidatieve stress werd gezien. Deze resultaten ondersteunen de hypothese dat andere factoren, zoals oxidatieve stress, interacteren met ammoniak in de pathogenese van diuretica-geïnduceerde HE, en suggereren een potentiële rol voor albumine infusie bij de behandeling van deze patiënten.

In **Hoofdstuk 4** beschrijven we twee studies waarin het model om een HTD bloeding te simuleren, middels een intragastrisch toegediende aminozuur oplossing die lijkt op het hemoglobine molecuul, wordt gebruikt om de pathofysiologie van HE te bestuderen.

In **Hoofdstuk 4A** testten we de hypothese dat een gesimuleerde HTD bloeding leidt tot een verminderd neuropsychologisch functioneren en een reductie in regionale cerebrale doorbloeding. Acht metabool stabiele patiënten met cirrhose van de lever

werden bestudeerd vlak voor en 4 uur na de toediening van de oplossing. De neuropsychologische test bestond uit de Trails B Test, Digit Symbol Substitution Test, de geheugen subtest van de Randt test en een reactie tijd test. Bloed werd afgenomen voor de bepaling van ammoniak en aminozuren. Regionale cerebrale perfusie werd gemeten met behulp van een head-SPECT-scanner. De resultaten lieten zien dat een gesimuleerde HTD bloeding leidt tot hyperammonemie, hypoisoleucinemie en tot een significante vermindering in neuropsychologisch functioneren. Analyse van de SPECT gegevens liet zien dat de gesimuleerde HTD bloeding leidde tot een significant verminderde cerebrale perfusie in beide temporaal kwabben, de linker gyrus frontalis superior en de rechter gyrus parietale en cingulatus. We concludeerden uit deze studie dat een simulatie van de metabole gevolgen van een HTD bloeding in patiënten met cirrhose van de lever een interessant nieuw model is om de pathofysiologie van HE te bestuderen.

In **Hoofdstuk 4B** wordt hetzelfde model gebruikt om de gevolgen met betrekking tot neurospychologische tests, intracerebrale glutamine concentratie en magnetisatie transfer ratio (MTR) te bestuderen. Achtenveertig metabool stabiele patiënten met levercirrhose die geen kenmerken vertoonden van HE werden gerandomiseerd tussen de gesimuleerde bloeding en placebo toediening. Metingen werden verricht vlak vóór en 4 uur na toediening van de oplossing. De neurospychologische test bestond uit de Trails B Test, Digit Symbol Substitution Test, de geheugen subtest van de Randt test en een reactie tijd test. Bloed werd afgenomen voor bepaling van ammoniak en aminozuren. In de eerste 16 patiënten werd het hersenmetabolisme bestudeerd middels proton magnetische resonantie (MR). In 7 andere patiënten werden de effecten op MTR bestudeerd. De arteriële ammoniak concentratie steeg significant na de gesimuleerde HTD bloeding en bleef gelijk in de placebo groep. Het neuropsychologisch functioneren verbeterde significant in de placebo groep, in tegenstelling tot de gesimuleerde HTD bloeding groep. Na de gesimuleerde HTD bloeding was er een significante toename van de intracerebrale glutamine/glutamate/creatine ratio en een significante afname in MTR. Dit suggereert dat een toename in intracerebraal water een van de pathofysiologische mechanismen is waardoor HE ontstaat in patiënten met levercirrhose. We concludeerden uit deze studie dat een gesimuleerde HTD bloeding bij patiënten met lever cirrhose leidt tot een vermindering in neuropsychologisch functioneren, waarschijnlijk tengevolge van een intracerebrale glutamine accumulatie en gerelateerde intracerebrale zwelling.

In **hoofdstuk 5** wordt de hypothese geïntroduceerd dat de ammoniagene en katabole gevolgen van een HTD bloeding worden veroorzaakt door de afwezigheid van het essentiële aminozuur isoleucine in het hemoglobine molecuul. Het hemoglobine molecuul is uniek omdat het essentiële vertakte keten aminozuur isoleucine mist en een grote hoeveelheid van de twee andere vertakte keten aminozuren, leucine en valine bevat. Een HTD bloeding heeft daardoor tot gevolg dat de darmen een eiwit van zeer

lage biologische waarde aangeboden krijgen, hetgeen een stimulus is om een cascade van biologische processen te induceren die uiteindelijk resulteren in netto eiwit afbraak. Netto eiwit afbraak is nadelig voor het functioneren van sneldelende cellen, zoals cellen betrokken bij het immuunproces, en van eiwitten met een korte halfwaardetijd. In dit hoofdstuk onderbouwen wij deze hypothese en poneren we een oplossing om deze ammoniagene en katabole cascade te voorkomen door intraveneuze infusie van het essentiële aminozuur isoleucine.

In **Hoofdstuk 6** wordt de hypothese getest dat een HTD bloeding resulteert in hypoisoleucinemie door de inductie van vertakte keten aminozuur antagonisme en daardoor resulteert in verminderde eiwitsynthese. Wij bestudeerden 5 gevaste, metabool stabiele patiënten met cirrhose van de lever. De patiënten kregen een geprimed, continue intraveneuze infusie van het stabiele isotoop [1-^{13}C]isoleucine en een priming dosis van [^{13}C]bicarbonaat zodat het mogelijk was om isoleucine oxidatie en eiwitsynthese te bepalen. Het protocol bestond uit een 4 uur durende periode waarin intragastrisch fysiologisch zout werd gegeven gevolgd door een 4 uur durende periode waarin een HTD bloeding werd gesimuleerd door intragastrische toediening van een aminozuur mengsel met een samenstelling identiek aan het hemoglobine molecuul. Deze gesimuleerde HTD bloeding resulteerde in een significante daling van de arteriële isoleucine concentratie (tot 26% van de uitgangsconcentratie) en een significante stijging van de arteriële concentraties van de vertakte keten aminozuren leucine (400%) en (350%). Zowel de flux als de oxidatie van isoleucine verminderden tot eenderde van de uitgangswaarde als gevolg van de gesimuleerde HTD bloeding. Hierdoor veranderde de fractie van de isoleucine flux, die gebruikt wordt voor oxidatie, niet tengevolge van de gesimuleerde HTD bloeding. Als gevolg hiervan daalde de niet-oxidatieve fractie van de isoleucine flux, een maat voor de eiwitsynthese, tot eenderde van de uitgangswaarde. Het feit dat dit niet leidde tot een relatieve daling van de oxidatie van isoleucine kan alleen maar verklaard worden door het optreden van vertakte keten aminozuur antagonisme.

In **Hoofdstuk 7** beschrijven we de gevolgen van een gesimuleerde HTD bloeding op de eiwit kinetiek in patiënten met cirrhose van de lever en de mogelijke therapeutische effecten van intraveneuze infusie van isoleucine tijdens deze interventie. We kwantificeerden de eiwit kinetiek over de portaal drainerende organen, de lever, de beenspieren en de nier gedurende de gesimuleerde bloeding. Zestien overnacht gevaste, metabool stabiele patiënten kregen gedurende een 4 uur durende periode een intragastrische infusie van een aminozuur mengsel met een samenstelling identiek aan het hemoglobine molecuul en werden gerandomiseerd om intraveneus fysiologisch zout of intraveneus isoleucine te krijgen. Gedurende de studie werd een mix van stabiele isotopen gegeven om op orgaan niveau eiwitsynthese en afbraak te bepalen. De gesimuleerde HTD bloeding resulteerde in hyperammonemie in beide groepen en in hypoisoleucinemie in de fysiologisch zout groep, dat werd voorkomen in de isoleucine

interventie groep. Isoleucine infusie stimuleerde eiwit synthese in de lever en de spier. In de controle groep was deze normale respons op een aminozuur maaltijd onderdrukt. Eiwit kinetiek in de portaal drainerende organen en de nier werd niet beïnvloed door het studie protocol. Isoleucine infusie had geen invloed op de post-haemorrhagische hyperammonemie, die voornamelijk werd veroorzaakt door de toegenomen ammoniak productie in de nier. Wij concludeerden uit deze studie dat infusie van isoleucine gedurende een gesimuleerde HTD bloeding in patiënten met cirrhose van de lever de verstoorde eiwitsynthese in de lever en de spier herstelt en resulteert in een netto eiwit aanmaak in deze organen. Vervolg onderzoek is nodig om de therapeutische waarde van isoleucine infusie in patiënten met een acute HTD bloeding te onderzoeken. Dit onderzoek zou zich moeten richten op de effecten van isoleucine infusie op stollingsfunctie en infectie incidentie of op substituut eindpunten als aanmaak snelheid en functie van stollingsfactoren en sneldelende cellen die betrokken zijn bij de immuuunrespons.

In **Hoofdstuk 8** onderzoeken we de acute effecten van een TIPSS plaatsing op het ammoniak en aminozuur metabolisme van de hersenen van patiënten met cirrhose van de lever. Tevens bestudeerden we de effecten op de cerebrale doorbloeding en de NO productie van het gehele lichaam. Twaalf patiënten die een TIPSS insertie ondergingen vanwege bloedende oesophagus varices werden bestudeerd. Cardiovasculaire haemodynamiek werd gemonitoord middels een Swan-Ganz katheter en cerebrale bloedflow (CBF) werd gemeten met de Kety-Schmidt techniek. NO metabolisme werd gemeten met behulp van stabiele isotopen (L-[*guanidino*-$^{15}N_2$] Arginine en L-[*ureido*-^{13}C;5,5-$^{2}H_2$] Citrulline). TIPSS insertie resulteerde in een significante vermindering van de gemiddelde arteriële bloeddruk, een significante stijging in cardiac output en CBF. Er werden geen significante veranderingen waargenomen in de arteriële ammoniak concentratie, maar de opname van ammoniak door de hersenen nam significant toe. Tevens was er een significante toename van de productie van NO, welke correleerde met de veranderingen in gemiddelde arteriële bloeddruk, cardiac output en CBF. We concludeerden dat een TIPSS plaatsing resulteert in een significante stijging van de CBF, welke waarschijnlijk resulteert in een toegenomen ammoniak opname door de hersenen. De data van de studie ondersteunen tevens de hypothese dat een TIPSS geïnduceerde toename van de CBF wordt gemedieerd door een toename van de NO productie. Het exacte mechanisme van de gestimuleerde NO productie is niet geheel duidelijk, maar de data van onze studie ondersteunen een rol voor een toegenomen ammoniak opname door de hersenen en een TIPSS-geïnduceerde toename van de cardiac output welke leidt tot een toename in shear stress.

Hoofdstuk 9 beschrijft de rol van ontstekingsmediatoren in de pathofysiologie van gestegen intracraniële druk (ICP) in patiënten met ALF en de correlatie met CBF en ammoniak metabolisme. 21 patiënten met ALF werden bestudeerd vanaf het moment dat ze beademd werden vanwege hepatisch coma, tot het moment dat ze specifieke

behandeling ondergingen voor gestegen intracraniële druk. Afhankelijk van de initieel gemeten intracraniële druk werden de patiënten ingedeeld in twee groepen: patiënten die specifieke behandeling behoefden voor verhoogde intracraniële druk (ICP>20mmHg, Groep 1: n=8) en patiënten waarbij dit niet nodig was (ICP£20 mmHg, Groep 2: n=13). Patiënten in Groep 1 hadden significant verhoogde waarden van ontstekingsmediatoren en een verhoogde plasma ammoniak concentratie. In die groep was er een significante correlatie tussen TNFa concentraties en CBF (r=0.80). Vier patiënten uit groep 2 ontwikkelden uitbraken van verhoogde intracraniële druk welke waren geassocieerd met toenamen in de CBF, ontstekingsmediatoren en TNFa. Er werd geen verandering waargenomen in deze markers, CBF en/of ICP in de andere 9 patiënten van deze groep. De resultaten van deze studie ondersteunen een 'multiple-hit' hypothese voor de etiologie van intracraniële hypertensie in patiënten met cirrhose van de lever. Hierbij is een toename in ammoniak opname door de hersenen de initiële stimulus, welke resulteert in cerebraal oedeem, maar worden de plotselinge stijgingen in de intracraniële druk veroorzaakt door een toename in cerebrale hyperemie. Cerebrale hyperemie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de geactiveerde werking van vasodilatoren welke gestimuleerd worden door de systemische inflammatoire respons en/of door een ammoniak geïnduceerde glutamine accumulatie in de hersenen.

Hoofdstuk 10 beschrijft de rol van gematigd koelen van het gehele lichaam als behandeling voor oncontroleerbaar gestegen verhoogde intracraniële druk bij patiënten met acuut leverfalen (ALF). We bestudeerden zeven achtereenvolgende patiënten met ALF welke voldeden aan de criteria van slechte prognose volgens het Kings College. De patiënten hadden verhoogde intracraniële druk welke niet reageerde op 2 behandelingen met mannitol en dialyse. Vier van deze patiënten waren tevens kandidaat voor acute orthotope levertransplantatie (OLT). De centrale lichaamstemperatuur werd verlaagd met behulp van koeldekens tot 32-33°C. De vier patiënten welke kandidaat waren voor OLT werden succesvol behandeld tot transplantatie, waarbij ze gemiddeld 13 uur (spreiding 10-14 uur) werden gekoeld. De drie patiënten die ongeschikt werden geacht voor OLT overleden na opwarming. Koelen leidde tot een opmerkelijke daling van de ICP en CBF en een stijging van de cerebrale perfusie druk. Tijdens koelen was er geen terugval naar verhoogde intracraniële hersendrukken. Koelen leidde tevens tot een daling van de arteriële ammoniak concentratie en de opname van ammoniak door de hersenen. Er werden geen nadelige gevolgen van koelen waargenomen. We concludeerden uit deze studie dat gematigd koelen van het gehele lichaam een nuttige en veilige behandeling is voor ongecontroleerd verhoogde intracraniële druk bij patiënten met ALF en dat het kan helpen om de tijd tot OLT te overbruggen.

In **Hoofdstuk 11** bestuderen we de hypothese dat gematigd koelen van het gehele lichaam bij patiënten met ALF een vermindering van de intracraniële druk geeft doordat het de autoregulatie van CBF herstelt. Negen patiënten met een oncontroleerbaar verhoogde intracraniële druk en ALF werden bestudeerd. Direct voor aanvang van het

koelen en 4 uur nadien werd de CBF autoregulatie en de reactiviteit op CO_2 bepaald. We observeerden significante verlagingen van de ICP en CBF. Voordat gekoeld werd was er geen CBF autoregulatie in de bestudeerde patiënten. Toepassing van koelen als therapie herstelde dit bij alle bestudeerde patiënten. De resultaten van deze studie suggereren dat de verbetering van ICP door koelen van het gehele lichaam bij patiënten met ALF mogelijk het gevolg is van het herstellen van de autoregulatie van de CBF.

In **Hoofdstuk 12** beschrijven we het effect van gematigd koelen van het gehele lichaam op de intracraniële druk van patiënten met ALF welke een orthotope lever transplantatie (OLT) ondergaan. Het is bekend dat gedurende een OLT sommige patiënten met ALF een acuut verhoogde intracraniële druk krijgen. Wij onderzochten de hypothese dat dit zou kunnen worden vóórkomen door de patiënten tijdens de OLT te koelen. Zestien patiënten met ALF werden bestudeerd. Afhankelijk van de gemeten intracraniële druk vóór OLT werden de patiënten in drie groepen ingedeeld. Groep I (n=6): patiënten welke geen therapie behoefden voor verhoogde intracraniële druk (ICP<15mmHg). Groep II (n=5): patiënten welke episoden van verhoogde intracraniële druk hadden doorgemaakt, maar konden worden behandeld met conventionele therapie. De patiënten uit deze beide groepen werden normothermisch gehouden tijdens de OLT. Groep III (n=5) bestond uit patiënten welke een ongecontroleerd verhoogde intracraniële druk hadden voorafgaand aan de OLT, waarvoor ze gematigd koelen als therapie ondergingen, zowel voorafgaande aan als gedurende de OLT. Er was een significante stijging van de intracraniële druk tijdens de dissectie en reperfusie fase van de OLT in de patiënten uit groep I en II. Patiënten uit groep III lieten geen verandering in intracraniële druk zien tijdens de OLT. De stijging in intracraniële druk in groep I en II was geassocieerd met een toename van de CBF, welke niet werd geobserveerd in groep III. Tijdens de anhepatische fase van de OLT normaliseerde de intracraniële druk in groep I en II. Er was geen verschil in transfusie behoefte of infecties tussen de groepen. We concludeerden dat gematigd koelen een veilige en succesvolle methode is om stijgingen in intracraniële hersendruk tijdens een OLT bij patiënten met ALF te voorkomen, en dan metname tijdens de dissectie en reperfusie fase tijdens de operatie. De beschermende effecten van koelen worden waarschijnlijk veroorzaakt door een verminderde behoefte aan substraat en zuurstof, waardoor het substraat aanbod en/of verbruik in de hersenen beter aansluit aan de behoefte, welke verstoord is bij patiënten met ALF.

Hoofdstuk 13 besluit met een evaluatie van de klinische effecten en de pathofysiologische mechanismen van gematigd koelen van het gehele lichaam bij patiënten met ALF, welke een oncontroleerbaar verhoogde intracraniële druk ontwikkelen die resistent is tegen conventionele therapie. We bestudeerden veertien patiënten met ALF die op de wachtlijst stonden voor een acute OLT en die een oncontroleerbaar verhoogde intracraniële druk hadden die niet reageerde op 2 behandelingen met mannitol en/of dialyse. De lichaamstemperatuur werd verlaagd met behulp van koeldekens

tot 32-33°C. Dertien patiënten overbrugden de wachtperiode tot OLT succesvol met een mediane koelingduur van 32 uur (spreiding 10-118 uur). De patiënten ondergingen de OLT zonder significante koelinggerelateerde complicaties en herstelden zonder neurologische gevolgen. De ICP voor aanvang van het koelen was 36.5 (2.7) mmHg en daalde na 4 uur koelen naar 16.3 (0.7) mmHg, welke waarde gehandhaafd bleef na 24 uur (16.8 (1.5) mmHg) ($p<0.0001$). Ondanks koelen stierf 1 patiënt aan de gevolgen van cerebrale herniatie. De gemiddelde arteriële bloeddruk en cerebrale perfusie druk steeg significant, terwijl er een significante afname was in inotropie behoefte. Gematigd koelen leidde tot een aanhoudende verlaging van de arteriële ammoniak concentratie en ammoniak opname door de hersenen. Tevens verminderde de CBF, de cerebrale cytokine productie en indicatoren van oxidatieve stress. We concludeerden uit deze studie dat gematigd koelen van het gehele lichaam een effectieve en veilige methode is om de tijd tot OLT te overbruggen bij patiënten met ALF en een ongecontroleerde verhoogde intracraniële druk welke resistent is tegen conventionele therapie.

SUMMARY

This thesis comprises three major sections. The first section (Chapters 1-4) deals with the interorgan metabolism of ammonia and related amino acids in patients with cirrhosis of the liver and with the metabolic and neuropsychological consequences of an upper GI bleed. The second section (Chapters 5-7) deals with the consequences of an upper GI bleed on isoleucine and protein metabolism and the possible therapeutic role of isoleucine. In the third section (Chapters 8-13) the pathophysiological basis of HE in patients undergoing TIPSS insertion, is described with special emphasis on alterations in cerebral blood flow and nitric oxide metabolism. In subsequent chapters in this section the interrelationship is explored between cerebral metabolism and haemodynamics in patients with ALF. Furthermore, the clinical and pathophysiological basis of intervention with moderate hypothermia in these patients is investigated.

In **Chapter 1** the quantitative dynamics of interorgan ammonia and amino acid metabolism are described in 24 metabolically stable patients with cirrhosis who underwent TIPSS portography. Blood was sampled and blood flows measured across portal drained viscera, leg, kidney and liver, and arterio-venous differences across the spleen and the inferior and superior mesenteric veins. We found that ammonia was predominantly produced by the portal drained viscera. The kidneys also produced ammonia, in amounts that equalled total hepato-splanchnic area production. Skeletal muscle removed more ammonia than the cirrhotic liver. However, the amount of nitrogen that was taken up by muscle in the form of ammonia was less than the amount of glutamine released. This excess in glutamine released in the circulation, can, after its degradation, lead to ammonia production in the PDV and kidneys. The portal drained viscera consumed glutamine and produced ammonia, alanine and citrulline. Urea was released in the splenic and superior mesenteric vein, contributing to whole body ureagenesis in these cirrhotic patients. We concluded from this study that hyperammonemia in metabolically stable, overnight fasted patients with cirrhosis of the liver and a TIPSS results from portosystemic shunting and renal ammonia production.

In **Chapter 2** the effects of an upper GI bleed on interorgan ammonia metabolism are described. An upper GI bleed is one of the clinically most important ammonia liberating events leading to HE in patients with cirrhosis of the liver. In this chapter two studies are described. In the first study an upper GI bleed was simulated in 8 patients with cirrhosis and a TIPSS, by intragastric infusion of an amino acid solution that mimics the amino acid composition of the haemoglobin molecule. We sampled blood at regular intervals from a femoral artery and from a femoral, renal, portal and hepatic vein for 4 hours during the simulated bleed and measured plasma flows across these

organs. During the simulated bleed arterial concentrations of ammonia increased significantly. There was no change in ammonia production from the portal drained viscera but renal ammonia production increased 6-fold. In contrast to an unchanged ammonia removal by the liver, a significant increase in muscle ammonia removal was observed. In the second study we studied 9 cirrhotic patients with an acute upper GI bleed that underwent acute TIPSS insertion. Blood was sampled from an artery, a hepatic, renal and portal vein, and plasma flows were measured. We showed that ammonia was only produced by the kidneys and not by the splanchnic area. We concluded from these studies that enhanced renal ammonia release plays an important role in the hyperammonemia that follows an upper GI bleed in patients with cirrhosis. During this hyperammonemic state, muscle was the major site of ammonia removal.

In Chapter 3A the consequences of another major clinical event that induces HE was described. This study highlights the important role of the kidney in ammonia homeostasis after portasystemic shunting in patients with cirrhosis. Thirteen patients with cirrhosis of the liver were studied prior to and one hour after TIPSS insertion. In these patients blood was sampled from the portal vein, a hepatic vein, the right renal vein and the right femoral vein. We observed that prior to TIPSS, renal ammonia release was significantly higher than ammonia release from the hepatosplanchnic area, which was not significantly different from zero. TIPSS insertion did not change the arterial ammonia concentration or ammonia release by the hepatosplanchnic area, but reduced ammonia release in the renal vein significantly, to values that were not different from zero. The uptake of the ammoniagenic amino acids glutamine and glycine was not changed by TIPSS, suggesting that the obligatory ammonia production resulting from the uptake of glutamine and glycine is excreted in the urine. TIPSS resulted in an increased venous minus arterial ammonia concentration difference across the leg muscle. The post-TIPSS estimate of ammonia efflux via portasystemic shunts was 7 times higher than renal efflux. We concluded from this study that the kidneys have the ability to switch from an organ that produces net systemic ammonia release to an organ with no significant systemic ammonia release immediately after TIPSS insertion. This may be the mechanism by which the cirrhotic patient maintains ammonia homeostasis after portasystemic shunting.

In **Chapter 3B** we describe the effects of plasma volume expansion on the severity of HE, plasma and urinary ammonia in patients with diuretic-induced HE. Fifteen patients with alcoholic cirrhosis and diuretic-induced HE were enrolled. In 8 patients, human albumin solution was used for volume expansion and in 7 patients colloid was used. Significant improvement of HE grade was observed only in the group treated with human albumin solution. There were similar reductions in plasma ammonia concentration, plasma renin activity and angiotensin II, and an increase in mean arterial pressure, renal plasma flow and urinary ammonia excretion, in both groups. Plasma malondialdehyde, a marker of oxidative stress, was elevated in both groups but was sig-

nificantly reduced only in the group treated with human albumin solution. The results of this study showed that plasma volume expansion results in significant reduction in plasma ammonia concentration possibly through an increase in urinary ammonia excretion. This reduction in ammonia concentration translates into an improvement in mental state only in those patients treated with human albumin solution in whom concomitant reduction in oxidative stress was observed. These data support the notion that other factors such as oxidative stress act as adjuncts to ammonia in the pathogenesis of diuretic-induced HE and suggest a possible role for albumin infusion in its treatment, possibly by virtue of its potential scavenging properties.

In **Chapter 4** two studies are described in which we use the model of simulating an upper GI bleed to study neuropsychological changes and intracerebral metabolic and bloodflow changes.

In **Chapter 4A** we tested the hypothesis that administration of an oral amino acid load mimicking haemoglobin in patients with cirrhosis of the liver produces deterioration in neuropsychological function and a reduction in regional cerebral perfusion. Eight overnight fasted, metabolically stable cirrhotic patients with no evidence of overt hepatic encephalopathy were studied prior to and 4 hours after simulating the upper GI bleed. Neuropsychological function was measured using a neuropsychological test battery and venous blood was collected for ammonia and amino acid determinations. Regional cerebral perfusion was measured using a head SPECT scanner. The results showed that the oral amino acid load mimicking haemoglobin induced hyperammonemia, hypoisoleucinemia and caused a significant deterioration in memory tests, probably due to a reduction in regional cerebral perfusion. SPECT analysis showed a significant reduction in cerebral perfusion after the simulated bleed in both temporal lobes, left superior frontal gyrus and, right parietal and cingulate gyrus. We therefore concluded that simulating the metabolic effects of an upper GI bleed in patients with cirrhosis of the liver is a useful new model to study the metabolism of HE and also point to the importance of ammonia-induced reduction in cerebral perfusion in the pathogenesis of HE in cirrhosis.

In **Chapter 4B** the model of simulating an upper GI bleed was used to study neuropsychological changes, brain glutamine levels and brain magnetization transfer ratio (MTR). Forty-eight, metabolically stable patients with cirrhosis and no evidence of 'overt' HE were randomised to receive the amino acid solution or saline as placebo and measurements were performed prior to and 4 hours afterwards. Neuropsychological function was tested using the same test-battery as used in chapter 4a. Plasma was collected for ammonia and amino acid measurements and brain metabolism was studied using proton magnetic resonance spectroscopy in the first 16 of the randomised patients. In 7 other patients MTR were measured. Administration of the amino acid solution induced hyperammonemia, which was absent in the placebo group. The study showed an improvement in neuropsychological tests following placebo, which was not

observed in patients that received the amino acid solution. The hyperammonemia induced, resulted in an increased brain peak of glutamate and glutamine (which could not separated), an increased the glutamate.glutamine/creatine ratio and a decrease in MTR, which indicates the presence of an increase in brain water. We concluded from this study that a simulated upper GI bleed impaired neuropsychological function by intracerebral glutamine accumulation and consequent brain swelling. This study has provided the first direct evidence in patients with cirrhosis for the ammonia-glutamine-brain swelling hypothesis of HE.

In **Chapter 5** we introduce the hypothesis that an upper GI bleed is an ammoniagenic and catabolic event due to the absence of isoleucine in the haemoglobin molecule. The haemoglobin molecule is unique because it lacks the essential amino acid isoleucine and has high amounts of leucine and valine. Upper GI bleeds therefore present the gut with protein of very low biologic value, which may be the stimulus to induce a cascade of events culminating in net catabolism which may influence the function of rapidly dividing cells and short half-life proteins. We hypothesise that following an upper GI bleed in a cirrhotic patient, the lack of isoleucine in blood protein is the cause of hyperammonemia and catabolism. We propose that intravenous administration of isoleucine may serve as a simple therapeutic intervention to reverse this cascade.

In **Chapter 6** studies are described in which the above mentioned hypothesis is tested, that an upper GI bleed produces hypoisoleucinemia by inducing BCAA antagonism, which would lead to diminished protein synthesis. We studied five overnight fasted, metabolically stable patients with cirrhosis that received a primed, continuous intravenous infusion of [1-^{13}C]isoleucine to study isoleucine turnover and oxidation. The protocol consisted of a 4 hour period of intragastric saline infusion followed by a 4 hour period in which an upper GI bleed was simulated. We showed that the simulated upper GI bleed produced a significant reduction in arterial isoleucine concentration (26% of initial values) and an increase in leucine (400%) and valine (350%) concentrations. Isoleucine flux and isoleucine oxidation decreased to a third of initial values following a simulated bleed, but the fraction of isoleucine flux used for oxidation did not change after the simulated bleed. Consequently, the non-oxidative portion of isoleucine flux, representing protein synthesis, decreased similarly. We concluded from these results that a simulated upper GI bleed induces hypoisoleucinemia and decreases protein synthesis markedly. The fact that the percentage of isoleucine flux that was oxidized was not influenced by the hypoisoleucinemic state pointed to the occurrence of BCAA antagonism. The results of this study therefore supported the isoleucine hypothesis outlined in Chapter 5.

In **Chapter 7** we investigated the consequences of a simulated upper GI bleed on protein kinetics in patients with cirrhosis of the liver and the possible therapeutic effects of intravenous infusion of isoleucine. Portal drained viscera, liver, muscle and kidney protein kinetics were quantified. Sixteen overnight fasted, metabolically stable

patients received a 4 hourly, intragastric infusion of the amino acid solution that mimicked haemoglobin and were randomised to receive either intravenous saline or isoleucine. A mixture of stable isotopes was administered to determine organ protein breakdown and synthesis rates. The simulated bleed resulted in hyperammonemia in both groups and in hypoisoleucinemia that was attenuated by isoleucine infusion. Isoleucine infusion stimulated liver and muscle protein synthesis. In the control group not supplemented with isoleucine, this normal response to the administration of an amino acid mixture was impaired. Protein kinetics in the portal drained viscera and the kidney were not influenced by the study protocol. Isoleucine infusion did not diminish post-bleeding hyperammonemia, which was predominantly kidney related. We concluded that infusion of isoleucine during a simulated bleed in patients with cirrhosis of the liver restores impaired protein synthesis of liver and muscle leading to a net anabolic state in these organs. Improving liver protein synthesis during an acute upper GI bleed in patients with cirrhosis of the liver may have major clinical benefits, since liver protein synthesis is of pivotal importance in generating adequate cellular immunity, an acute phase response and normal clotting function.

In **Chapter 8** we investigated the acute effect of TIPSS insertion on brain ammonia and amino acid metabolism and we wanted to determine whether TIPSS insertion would result in an increase in cerebral blood flow (CBF). We also measured the rate of whole body nitric oxide (NO) production. Twelve patients with cirrhosis who were undergoing TIPSS insertion for variceal bleeding were included. Cardiovascular haemodynamics were measured using a Swan-Ganz catheter and CBF was measured using the Kety-Schmidt technique. Blood was sampled from an artery and a reverse jugular catheter for measurement of ammonia, amino acids and pro-inflammatory cytokines. NO production was measured using the stable isotope technique using a primed, continuous infusion of L-[*guanidino*-$^{15}N_2$] Arginine and L-[*ureido*-^{13}C;5,5-$^{2}H_2$] Citrulline. TIPSS insertion resulted in a significant reduction in mean arterial pressure and an increase in cardiac output and CBF. No significant changes were observed in the arterial ammonia but the brain flux of ammonia increased significantly without any significant changes in brain glutamine flux. Whole body NO production increased significantly. The change in NO production correlated with the changes in mean arterial pressure, cardiac output and CBF. In conclusion, the results of our study show that insertion of TIPSS results in an increase in CBF, which drives increased brain ammonia flux. Our results support the hypothesis that TIPSS induced increase in CBF is mediated by increased NO synthesis. The exact mechanism of the increase in NO synthesis is not entirely clear, but it could be related to the increased delivery of ammonia to the brain and the TIPSS-induced increase in cardiac output.

In **Chapter 9** we studied the role of inflammation in the pathogenesis of increased ICP in patients with ALF and its interplay with CBF and ammonia. Twenty-one patients with ALF were studied from the time they were ventilated for grade 4

encephalopathy until receiving specific treatment for increased ICP. Depending upon the ICP, the patients were divided into two groups; those that required specific treatment (ICP>20mmHg, Group 1: n=8) and those that did not (ICP£20 mmHg, Group 2: n=13). Patients in Group 1 had significantly greater evidence of inflammation and higher arterial ammonia concentrations. TNFa levels correlated with CBF (r= 0.80). Four patients from Group 2 developed surges of increased ICP that were associated with increases in CBF, markers of inflammation and TNFa. There was no change in these inflammatory markers, CBF or ICP in the other 9 patients in Group 2. In conclusion, our data support a multiple-hit hypothesis for the development of intracranial hypertension in patients with ALF. Accordingly, brain ammonia uptake is possibly the initial stimulus that leads to cerebral oedema but the bursts of increased ICP is the result of cerebral hyperaemia. This hyperaemia may be the consequence of putative vasodilators operative during the systemic inflammatory response and/or resulting from ammonia-induced glutamine accumulation.

In **Chapter 10** we investigated the role of hypothermia as a treatment of uncontrolled intracranial hypertension in patients with ALF. We studied seven consecutive patients with ALF who fulfilled the Kings College criteria for poor prognosis and had increased ICP that was unresponsive to 2 treatments with mannitol and ultrafiltration. Four of the patients studied were candidates for orthotopic liver transplantation (OLT). Core temperature was reduced to 32-33°C using cooling blankets. The 4 patients who were candidates for OLT were successfully bridged to transplantation with a median of 13 (range 10-14) hours of hypothermia. The three patients who were unsuitable candidates for OLT died following rewarming. ICP and CBF reduced markedly following cooling, whereas cerebral perfusion pressure increased significantly following cooling. During hypothermia there was no significant relapse of increased ICP. Arterial ammonia and cerebral uptake of ammonia were significantly reduced with cooling. No adverse effects of hypothermia were observed. We concluded from this study that moderate hypothermia is useful in the treatment of uncontrolled increase in ICP in patients with ALF and may prevent brain death in the period necessary to prepare for OLT.

In **Chapter 11** we describe investigations to test the hypothesis that moderate hypothermia reduced ICP by restoring CBF autoregulation. Nine patients with uncontrolled intracranial hypertension and ALF who fulfilled criteria for poor prognosis were studied. CBF autoregulation and reactivity to carbon dioxide were evaluated before and 4 hours after cooling (32°C). Significant reductions were observed in the ICP and CBF. The defective CBF autoregulation and the absence of reactivity to carbondioxide that was observed in all patients was restored with cooling. The results of this study suggest that the improvement in ICP observed with hypothermia may be due to its effects upon CBF autoregulation and provides a tool to explore the mechanisms associated with the deranged CBF autoregulation in ALF. The results further point to the subgroup of patients with intracranial hypertension that may benefit from hypothermia.

In **Chapter 12** we describe the effect of hypothermia on ICP in patients with ALF undergoing liver transplantation (OLT). During OLT for ALF, some patients develop acute increases in ICP. We tested the hypothesis that increases in ICP during OLT for ALF can be prevented by moderate hypothermia. Sixteen patients with ALF undergoing OLT were studied. Depending upon the measured ICP prior to OLT, the patients were divided into three groups. Group I (n=6) did not require treatment for increased ICP (ICP<15mmHg). Group II (n=5) had episodes of increased ICP that were controlled by conventional treatment. Both these groups of patients were maintained normothermic during OLT. Group III (n=5) had uncontrolled increased ICP prior to OLT for which they had been cooled and remained cooled during OLT. There was a significant increase in ICP during the dissection and reperfusion phases of the OLT in the patients in Groups I and II. Patients in Group III had no significant increase in ICP during the OLT. The rise in ICP in Groups I and II was associated with an increase in CBF which was not observed in Group III. In patients from Group I and II, the increase in ICP was corrected during the anhepatic phase of the operation. There was no difference in the requirement of transfusions or incidence of post-operative infections between the groups. In conclusion, the results of this study suggest that hypothermia prevents the increase in ICP that is encountered in patients with ALF undergoing OLT, particularly during the dissection and the reperfusion phases of the operation. These protective effects of hypothermia may be mediated by decreased requirement for substrates and oxygen, which can therefore be better satisfied during the derangements of cerebral metabolism which results from the products of the 'necrotic' liver.

In **Chapter 13** we conclude with an evaluation of the clinical effects and the pathophysiologic basis of moderate hypothermia in patients with ALF who develop intracranial hypertension that is unresponsive to standard medical therapy. We studied fourteen patients with ALF who were awaiting OLT and had increased ICP that was unresponsive to 2 treatments with mannitol and ultrafiltration. Core temperature was reduced to 32-33°C using cooling blankets. Thirteen patients were successfully bridged to OLT with a median of 32 (range 10-118) hours of cooling. They underwent OLT with no significant complications related to cooling either prior to or after OLT and made complete neurological recovery. ICP prior to cooling was 36.5 (2.7) mmHg and this was reduced to 16.3 (0.7) mmHg at 4 hours, which was sustained at 24 hours (16.8 (1.5) mmHg). Despite cooling, 1 patient died from cerebral herniation. Mean arterial pressure and cerebral perfusion pressure increased significantly and the requirement for inotropic agents was reduced significantly. The effect of hypothermia on ICP are likely to be mediated through multiple mechanisms such as reduction in arterial ammonia, its brain uptake and metabolism, and its effects on CBF and brain cytokine production. In conclusion, the results of this study show that mild-moderate hypothermia can be used safely to bridge patients with ALF and uncontrolled intracranial hypertension to liver transplantation.