

Состав свободных аминокислот сыворотки крови у больных циррозом печени

Е.И.
Н.Н.
О.П.
Г.Д.
З.И.

Адаменко,
Силивончик,
Попова,
Полешко,
Куваева

Белорусский государственный
медицинский университет
Институт физико-
органической химии НАН
Беларуси

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) у 74 больных циррозом печени и 30 доноров исследовано содержание 20 свободных аминокислот в сыворотке крови. Проведенное исследование выявило нарушение баланса разветвленных и ароматических аминокислот, а также изменение концентрации метионина, аланина, гистидина и глутаминовой кислоты у больных циррозом печени по сравнению с донорами; различия в составе аминокислот у больных циррозом печени с манифестной печеночной энцефалопатией (ПЭ) и без нее, что может иметь отношение к патогенезу ПЭ. Не установлено корреляции концентрации аминокислот с уровнем ПЭ, что доказывает возможную роль других факторов в развитии этого осложнения.

Ключевые слова: цирроз печени, печеночная энцефалопатия, аминокислоты.

E.I.Adamenko, N.N.Silivonschik, O.P.Popova,
G.D.Poleshko, Z.I. Cuvaeva

Free amino acids balance in cirrhotic patients
Concentration of 20 amino acids of serum was studied in 74 cirrhotic patients and 30 donors by high performance liquid chromatography (HPLC). This study has revealed abnormality balance of branched-chain and aromatic amino acids and also change of the level of methionine, alanine, histidine and glutamic acid concentrations in cirrhotic patients. There are difference in a structure of amino acids for cirrhotic patients with hepatic encephalopathy (HE) and without it, that can relate to a pathogenesis of HE. Is not established correlations of concentration of amino acids with a level of HE, that demonstrates a possible role of other factors in development of this complication.
Key words: cirrhosis of liver, hepatic encephalopathy, amino acids

Печень играет главенствующую роль в трансформации аминокислот. Наибольшее внимание при циррозе печени традиционно уделяется разветвленным и ароматическим аминокислотам. Впервые на их дисбаланс при заболеваниях печени обратили внимание J.E. Fischer и R.J. Baldessarini, исследования которых легли в основу одной из теорий развития печеночной энцефалопатии (ПЭ) – теории «ложных нейротрансмиттеров», согласно которой ПЭ возникает вследствие свойственной патологии печени нарушения

баланса ароматических и разветвленных аминокислот [6]. Соотношение суммы разветвленных аминокислот к сумме фенилаланина и тирозина получило в литературе название коэффициента Фишера. При ПЭ он обычно снижается [1]. Относительно других аминокислот в литературе имеется значительно меньшее число публикаций, и касаются они таких аминокислот как глютамин, глютаминовая кислота, аргинин, аспарагин, орнитин, метионин [1, 3, 8, 14].

Целью нашего исследования явилось определение особенностей состава свободных аминокислот сыворотки крови у больных циррозом печени.

Материалы и методы: обследовано 74 больных циррозом печени, проходивших обследование и лечение в 2-й и 10-й городских клинических больницах в 2001-2003гг. Диагноз цирроза устанавливался на основании клинических данных, объективного осмотра, данных лабораторно-инструментальных методов обследования. Класс тяжести определялся по системе Child-Pugh [13]. Среди больных было мужчин - 41, женщин - 33, средний возраст составил $53,28 \pm 10,37$ года. Длительность цирроза печени до 1 года у 49 человек (у 32 пациентов диагноз цирроза печени был выставлен впервые), от 1 года до 5 лет - у 22, больше 5-ти лет - у 3-х больных. Класс тяжести у 7 пациентов – А, 46 - В, 21 – С. Контрольную группу составили 30 доноров, сопоставимых по возрасту и полу. Диагностика и градация ПЭ осуществлялась на основании критериев West-Haven [1].

Исследование состава свободных аминокислот сыворотки крови у всех больных и доноров проводилось в Институте физико-органической химии Белорусской Национальной Академии наук методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Метод основан на получении флуоресцирующих производных первичных и вторичных аминокислот с реагентами ОРА и FMOC с последующим их разделением на хроматографической колонке с сорбентом Zorbax Eclipse XDB-CP в режиме градиентного элюирования и регистрацией с использованием флуоресцентного детектора жидкостного хроматографа Agilent 1100 фирмы Agilent Technologies (США). В качестве буфера А использован фосфорнокислый буфер (pH=7,80) (40 ммоль Na_2HPO_4), в качестве раствора В- смесь ацетонитрил: метанол : вода (45:45:10 об.%)

Изучены следующие свободные аминокислоты: аспарагиновая (ASP) и глютаминовая кислоты (GLU), аспарагин (ASN), глютамин (GLN), серин (SER), треанин (THR), триптофан (TRP), аргинин (ARG), глицин (GLY), аланин (ALA), пролин (PRO), валин (VAL), метионин (MET), изолейцин (ILE), лейцин (LEU), фенилаланин (PHE), орнитин (ORN), лизин (LYS), тирозин (TYR), гистидин (HIS).

Статистическая обработка проведена с помощью программы статистического анализа Statistica – 6 с использованием параметрических (среднее значение - \bar{X} , стандартное отклонение - σ , 95% доверительный интервал для значений – $\bar{X} \pm 2\sigma$, 95% доверительный интервал для среднего значения признака - 95% ДИ, медиана - M_e , 5-й и 95-й процентиля) и непараметрических (критерий Манна-Уитни - T , корреляционный анализ Спирмена – r_s) методов. Нулевая гипотеза об отсутствии различий групп отклонялась при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ свободных аминокислот сыворотки крови доноров показал, что колебания их концентрации соответствуют закону нормального распределения признака, поэтому вычислялись параметрические показатели: среднее значение, стандартное отклонение, 95% ДИ для значений и для среднего значения. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Состав свободных аминокислот сыворотки крови доноров

Аминокислота,	n	Me, мг/л	$X \pm \sigma$, мг/л	95% ДИ для среднего, мг/л	95% ДИ для значений, ($X \pm 2\sigma$), мг/л
ASP	30	8,60	$8,94 \pm 4,95$	7,10 - 10,79	-0,96 - 18,84
CLU	30	25,64	$29,69 \pm 1,88$	21,51 - 37,86	21,88 - 29,40
ASN	30	7,93	$7,97 \pm 0,74$	6,95 - 8,98	6,49 - 9,45
SER	30	24,67	$26,63 \pm 1,22$	22,45 - 30,82	24,19 - 29,05
GLN	30	89,43	$83,20 \pm 3,06$	70,86 - 95,55	77,08 - 89,32
HIS	30	20,86	$21,94 \pm 0,09$	18,17 - 25,71	21,76 - 22,12
GLY	30	24,25	$25,08 \pm 1,27$	20,87 - 29,28	22,54 - 27,62
THR	30	18,19	$18,73 \pm 0,58$	16,27 - 21,19	17,57 - 19,89
CITR	30	9,26	$9,67 \pm 0,25$	8,45 - 10,88	9,17 - 10,17
ALA	30	47,56	$45,31 \pm 2,64$	40,59 - 50,03	40,03 - 50,59
ARG	30	24,12	$30,03 \pm 9,19$	22,86 - 37,19	11,65 - 48,41
TYR	30	14,45	$14,41 \pm 0,98$	12,55 - 16,27	12,45 - 16,37
VAL	30	33,15	$32,48 \pm 0,32$	30,12 - 34,84	31,84 - 33,12
MET	30	7,04	$10,20 \pm 0,80$	2,44 - 17,97	8,6 - 11,8
TRP	30	12,73	$13,89 \pm 6,39$	11,13 - 16,65	1,11 - 26,67
PHE	30	8,14	$8,13 \pm 1,14$	7,70 - 8,55	5,85 - 10,41
ILE	30	12,23	$12,64 \pm 0,91$	11,56 - 13,73	10,82 - 14,46
ORN	30	17,75	$18,29 \pm 6,01$	16,05 - 20,54	6,27 - 30,31
LEU	30	23,09	$23,70 \pm 7,97$	20,73 - 26,68	7,76 - 39,64
LYS	30	29,68	$19,35 \pm 10,68$	25,36 - 33,33	-2,01 - 40,71
PRO	30	34,73	$35,14 \pm 8,47$	31,98 - 38,30	18,2 - 52,08

Коэффициент Фишера у доноров находился в пределах от 2,24 (минимальное значение) до 5,27 (максимальное), среднее значение составило (?±?) $3,07 \pm 0,59$; (?±2?) 1,89 – 4,25. 95% ДИ для среднего был 2,85 – 3,29. Медиана практически не отличалась от среднего значения и составила 3,09.

Мы сопоставили собственные данные с литературными. Анализ публикаций относительно содержания свободных аминокислот в сыворотке крови здоровых лиц выявил 4 работы, выполненных методом HPLC на оборудовании аналогичного класса. Следует отметить, что авторами выполнены исследования у небольшого количества здоровых лиц (от 7 – до 16) и представлены концентрации не всех аминокислот (от 14 до 18, кроме того, авторы получили несовпадающие данные относительно содержания аминокислот в сыворотке крови у здоровых лиц (табл. 2).

Таблица 2.

Состав свободных аминокислот сыворотки крови доноров (литературные данные)

АМИНОКИСЛОТЫ, МГ/Л	Краснова И.Н., Россия, 2000 [2] Здоровые доноры n = 10	Y, V, Tcherkas Russia, 2001 [12] Здоровые доноры n = 16	Herbert Godel, Stuttgart, 1984 [5] Здоровые мужчины n = 7	B, Mearadji, The Netherlands, 2001 [9] Здоровые доноры n = 16
ASP	-	-	-	1,46
CLU	11,7 ± 0,51	11,75 ± 0,51	3,15 ± 1,25	10,44
ASN	5,09 ± 0,13	5,32 ± 0,59	6,22 ± 0,32	-
SER	11,8 ± 0,47	12,27 ± 0,95	14,54 ± 0,99	11,66
GLN	75,47 ± 3,74	75,47 ± 3,74	84,33 ± 3,56	-
HIS	12,87 ± 0,62	13,30 ± 0,84	14,89 ± 0,51	10,09
GLY	-	-	19,84 ± 1,79	13,95
THR	-	-	16,63 ± 0,98	20,18
CITR	-	-	5,40 ± 0,24	-
ALA	35,5 ± 2,25	35,42 ± 4,45	33,02 ± 1,64	29,13
ARG	13,5 ± 0,80	13,94 ± 0,78	14,72 ± 1,26	13,06
TYR	-	-	12,32 ± 0,66	-
VAL	-	-	33,60 ± 1,92	26,91
MET	31,8 ± 0,85	2,76 ± 0,31	3,70 ± 0,25	3,13
TRP	13,65 ± 0,78	14,46 ± 1,39	-	6,93
PHE	13,0 ± 0,41	9,83 ± 0,93	16,24 ± 0,82	8,26
ILE	8,8 ± 0,43	7,90 ± 1,12	10,31 ± 0,48	7,48
ORN	42,05 ± 2,67	35,95 ± 4,39	14,59 ± 0,57	-
LEU	14,9 ± 0,64	13,19 ± 1,54	18,58 ± 0,64	12,99
LYS	18,0 ± 1,24	22,81 ± 1,67	35,82 ± 1,03	19,88
PRO	-	-	-	19,21

Учитывая вышеизложенное, мы принимали полученные нами данные о содержании свободных аминокислот в сыворотке крови доноров в пределах 95% ДИ для значений за норму.

Анализ состава свободных аминокислот сыворотки крови больных циррозом печени показал значительные колебания у части больных концентрации аминокислот. От 58,1 % до 98,7% больных имели отклонения по всем аминокислотам, за исключением триптофана и аспарагиновой кислоты, где отклонения наблюдались у 8,11% больных, лейцина – у 12,16%, пролина – у 17,6%, лизина – у 23,0% и орнитина – у 39,2%. Распределение содержания аминокислот больных циррозом печени было отличным от нормального, в частности это наглядно демонстрирует сравнение средней и медианы (табл. 3).

Таблица 3.

Состав свободных аминокислот сыворотки крови больных циррозом печени

АМИНО- КИСЛОТА	n	X, мг/л	Me, мг/л	5 -й процентиль, мг/л	95 -й процентиль, мг/л
ASP	74	11,09	7,48	4,45	43,54
CLU	74	55,56	32,91	14,42	174,09
ASN	74	11,46	7,11	3,25	52,26
SER	74	35,40	24,71	2,67	177,43
GLN	74	92,65	76,13	1,97	344,62
HIS	74	21,36	16,26	0	133,89
GLY	74	37,51	22,17	1,99	227,86
THR	74	25,48	16,97	3,94	119,97
CITR	74	366,99	9,9	3,38	42,38
ALA	74	47,92	29,83	10,22	232,16
ARG	74	37,20	35,92	3,70	95,02
TYR	74	28,73	20,68	6,82	110,13
VAI	74	34,68	24,92	13,23	140,73
MET	74	16,21	10,68	2,62	62,20
TRP	74	88,13	10,93	3,82	41,13
PHE	74	23,33	17,20	8,43	92,28
ILE	74	14,69	10,37	5,16	52,40
ORN	74	24,20	18,82	3,34	71,91
LEU кислоты	74	27,88	20,20	10,16	98,19
LYS	74	40,18	28,67	11,38	155,45
PRO	74	50,92	35,85	20,91	164,74

Отсутствие нормального распределения концентрации аминокислот у больных циррозом печени не позволило использовать параметрические методы (хотя количество больных и доноров было достаточным), в связи с чем у больных оценивались 2 параметра: доля больных, концентрация аминокислот которых выходила за рамки 95% ДИ для среднего уровня аминокислот доноров, и непараметрический критерий Манна-Уитни.

Прежде всего изучены содержания разветвленных и ароматических аминокислот. Анализ % отклонения от «нормы» разветвленных аминокислот больных циррозом печени выявил у них снижение концентрации валина, и изолейцина и незначительное повышение лейцина. При сравнении содержания аминокислот больных и доноров статистически значимыми оказались различия для изолейцина ($T = 1886,0$; $P = 0,026$), валина ($T = 2071,0$; $P < 0,001$); уровень лейцина достоверно не отличался. Анализ ароматических аминокислот показал повышение уровня фенилаланина ($T = 564,5$; $P < 0,001$) и тирозина ($T = 1048,5$; $P < 0,001$), при этом уровень триптофана также повышался, однако различия были не достоверны.

Было проанализировано 179 публикаций базы данных MEDLINE относительно обоснования применения разветвленных аминокислот при патологии печени. Во всех работах авторами получены согласованные данные о повышенном содержании ароматических аминокислот у больных заболеваниями печени. Относительно содержания разветвленных имеются неоднозначные данные: ряд авторов находят

снижение разветвленных аминокислот, ряд - неизменное по сравнению с здоровыми. Акцент делается преимущественно на соотношение этих групп аминокислот (Коэффициент Фишера) – всеми авторами подчеркивается его снижение.

По нашим данным коэффициент Фишера у больных циррозом печени находился в пределах от 0,60 (минимальное значение) до 5,60 (максимальное). Медиана составила 1,57, 5-й перцентиль – 0,74, 95-й – 2,62.

Сравнение коэффициента Фишера у больных циррозом печени и доноров показало статистически значимое снижения коэффициента у больных с высоким уровнем достоверности ($T = 2589,0$, $P < 0,001$).

Нами проанализировано содержание других аминокислот у больных циррозом печени, которые через свои метаболические пути могут изменяться при диффузных заболеваниях печени: глутамин, глутаминовая кислота, цитруллин, аргинин, орнитин, метионин. Так, глутамин и глутаминовая кислота участвуют в процессах утилизации аммиака, кроме того глутамину в настоящее время придается роль осмолита, препятствующего гидратации астроцитов головного мозга – отек и дисфункция астроглии в настоящее время рассматривается в качестве главной модели развития порто-системной энцефалопатии у больных циррозом печени [4, 10, 11, 15], а глутаминовая кислота может выступать как передатчик нервных импульсов [8]. Орнитин является “аммиакснижающей” аминокислотой: включается в цикл мочевины в качестве субстрата на этапе синтеза цитруллина и стимулирует карбоамилофосфатсинтетазу I - первого фермента цикла мочевины [7]. Метионин является источником аммиака [1]. Аргинин и цитруллин являются участниками цикла мочевины. Анализ содержания этих аминокислот у исследуемых больных показал изменение концентрации по сравнению с донорами в сторону увеличения глутаминовой кислоты, , метионина, цитруллина, и уменьшения –глутамин, орнитина и аргинина. Статистически значимыми оказались повышение уровня глутаминовой кислоты ($T = 1235,5$, $P = 0.015$) и метионина ($T = 1133,5$, $P = 0.002$).

Анализ прочих аминокислот выявил у наших больных по сравнению с донорами уменьшение концентрации, аспарагина, серина, гистидина, глицина, треонина, аланина, незначительное повышение уровня аспарагиновой кислоты, лизина и пролина. Среди этих кислот достоверные различия получены только для гистидина ($T = 1939,5$, $P = 0.008$) и аланина ($T = 2135,0$, $P < 0.001$) (табл.4).

Таблица 4.

Сравнение состава свободных аминокислот сыворотки крови больных циррозом и доноров

Аминокислоты, n=74		% больных, имевших отклонения от «нормы»			Критерий Манна- Уитни	
		всего	Больше «нормы»	Меньше «нормы»	T	P
С разветвлен ной боковой цепью	VAI	98,65	20,27	78,38	2071,0	< 0,001
	ILE	77,03	20,27	56,76	1886,0	0,026
	LEU	12,16	12,16	0	1761,5	0,182
Ароматиче ские	TYR	82,43	67,57	14,86	1048,5	< 0,001
	PHE	90,54	90,54	0	564,5	< 0,001
	TRP	8,11	8,11	0	1737,5	0,245
Прочие аминокисл оты	ASP	8,11	8,11	0	1610,0	0,804
	CLU	82,43	54,05	28,38	1235,5	0,015
	ASN	70,27	31,08	39,19	1652,0	0,583
	SER	85,14	35,14	50,00	1683,0	0,441
	THR	94,59	43,24	51,35	1633,0	0,680
	GLN	93,24	40,54	52,70	1765,5	0,173
	HIS	98,65	29,73	68,92	1939,5	0,008
	GLY	89,19	36,49	52,70	1656,5	0,561
	THR	94,59	43,24	51,35	1633,0	0,680
	CITR	95,94	51,35	44,59	1461,0	0,415
	ALA	85,13	13,51	71,62	2135,0	< 0,001
	ARG	58,11	28,38	29,73	1494,5	0,566
	MET	75,67	41,89	33,78	1133,5	0,002
	ORN	39,19	18,92	20,27	1531,5	0,758
	LYS	22,97	22,97	0	1533,5	0,769
PRO	17,57	17,57	0	1474,5	0,473	

Проведенные исследования позволили сделать заключение, что выявленные изменения указывают на нарушение основных метаболических путей в белковом обмене при циррозе печени.

Было проведено сравнение концентрации аминокислот больных с манифестной ПЭ (n = 56) и без ПЭ (n = 18). Достоверные различия были получены по 3 аминокислотам. У больных циррозом печени с манифестной ПЭ достоверно снижена концентрация аспарагиновой кислоты (T = 835,5; P = 0,04), орнитина (T = 847,5; P = 0,03) и аргинина (T = 880,0; P = 0,01). Отклонения содержания этих аминокислот вероятно не случайны. Известно, что они являются участниками цикла мочевины и способствуют утилизации аммиака. L- орнитин- L- аспарат на протяжении многих лет используется в клинической практике в качестве фармакологического препарата для коррекции ПЭ

В связи с полученными данными был проведен корреляционный анализ содержания этих трех аминокислот у больных циррозом печени с манифестной ПЭ с

уровнем ПЭ. Достоверной взаимосвязи не обнаружено. Кроме того, анализ взаимосвязи коэффициента Фишера у больных циррозом печени со степенью ПЭ не выявил достоверной корреляции с уровнем ПЭ, что может указывать на глубокие метаболические нарушения при циррозе печени при любой степени энцефалопатии. Это доказывает и обнаруженная слабая обратная корреляция коэффициента Фишера с классом тяжести цирроза печени $r_s = -0,275$, $P = 0,02$.

Выявленные изменения в спектре аминокислот при циррозе печени могут указывать на наличие сложного механизма развития ПЭ при участии многих факторов, в том числе и аминокислот, а также на необходимость коррекции аминокислотного состава еще на начальных этапах развития ПЭ.

Выводы: у больных циррозом печени отмечаются изменения содержания свободных аминокислот в сыворотке крови: достоверное уменьшение уровня изолейцина ($T = 1886,0$; $P = 0,026$), валина ($T = 2071,0$; $P < 0,001$) и увеличение фенилаланина ($T = 564,5$; $P < 0,001$), тирозина ($T = 1048,5$; $P < 0,001$) с достоверным снижением коэффициента Фишера ($T = 2589,0$; $P < 0,001$), а также увеличение содержания глутаминовой кислоты ($T = 1235,5$; $P = 0,015$), метионина ($T = 1133,5$; $P = 0,002$), и уменьшение гистидина ($T = 1939,5$; $P = 0,008$) и аланина ($T = 2135,0$; $P < 0,001$).

Имеются различия в составе аминокислот: у больных циррозом печени с манифестной ПЭ и без ПЭ: у больных с манифестной ПЭ наблюдается достоверное снижение уровня аспарагиновой кислоты ($T = 835,5$; $P = 0,04$), орнитина ($T = 847,5$; $P = 0,03$) и аргинина ($T = 880,0$; $P = 0,01$), что может иметь отношение к патогенезу ПЭ.

Не установлено корреляции концентрации аминокислот с уровнем ПЭ, что доказывает возможную роль других факторов в развитии этого осложнения.

Литература

1. Конн Г.О., Либертал М.М. Синдромы печеночной комы и лактулозы: Пер. с англ.- М.: Медицина, 1983.- 516с.
2. Краснова И.Н., Карцова Л.А., Черкас Ю.В. определение аминокислот в сыворотке крови человека методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме изократического элюирования // ЖАХ. – 2000. - № 1. – С. 66-74.
3. Brown R.H., Duda J.D. et al. A colorimetric micromethod for determination of ammonia: the ammonia content of rat tissue and human plasma // Arch. Biochem. – 1957. – Vol. 66. – P. 301 - 309.
4. Butterworth R.F. Portal-systemic encephalopathy: a disorder of neuron-astrocytic metabolic trafficking // Dev. Neurosci. – 1993. – Vol. 15, № 3-5. – P. 313 – 319.
5. Godel H., and Graser T.A. et al. Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography // J. Chromatography. – 1984.- Vol. 297. – P. 49-61.
6. Fischer J.E., Baldessarini R.J. False neurotransmitters and hepatic failure // Lancet.- 1971.- Vol.2, №. – P.75-80.
7. Kircheis G., Nilius R., Held C. et al. Therapeutic efficacy of L-ornitine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study // Hepatology.- 1997.- Vol.25, №6.- P.1351-1360.
8. Logan W.J., Snyder S.H. Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat // Nature. – 1971. – Vol. 3. – P. 297 – 299.

9. Mearadji B., Masclee A.A.M., Onkenhout W. et al. Effect of Intraduodenal and Intravenous Amino Acids on Proximal Gastric Motor Function in Man // *Dig. Dis. Sci.* – 2001 – Vol. 46, № 1 – P. 38-45.
10. Mullen K.D., Kaminsky-Russ K. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential future approaches // *Dig. Dis.* – 1996. – Vol. 14 (Suppl. 1). – P. 20 – 29.
11. Norenberg M.D. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy // *Metab. Brain Dis.* – 1998. – Vol. 13, № 4. – P. 319 – 335.
12. Tcherkas Y.V., Kartsova L.A., Krasnova I.N. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Chromatography.* – 2001. – Vol. 913. – P. 303-308.
13. Transsection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices / R.N.H. Pugh, I.M. Murray-Lyon, S.L. Dawson et al. // *Br. J. Surg.* – 1973. – Vol. 60. – P. 646 - 649.
14. Webster L.T., Gabuzda G.J. Effect on portal blood ammonium concentration of administering methionine to patients with hepatic cirrhosis // *J. Lab. Clin. Med.* – 1957. – Vol. 50. – P. 426 – 431.
15. Zwingmann C., Brand A., Richter-Landsberg C., Leibfritz D. Multinuclear NMP spectroscopy studies on NH₄Cl-induced metabolic alterations and detoxification processes in primary astrocytes and glioma cells // *Dev. Neurosci.* - 1998.- Vol.20.- P. 417-426