INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO
POLSKA AKADEMIA NAUK

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

MICHAŁ WĘGRZYNOWICZ

GLUTATION W NEUROTOKSYCZNOŚCI AMONIAKU: INTERAKCJE ASTROCYT – NEURON

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Jana Albrechta

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN
BIBLIOTEKA
ZS 292
H42 16

WARSZAWA 2008

http://rcin.org.pl

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
promotorowi, Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi
za inspirację, wszechstronną opiekę, cenne rady oraz uwagi
na każdym etapie powstawania tej pracy

Michał Węgrzynowicz

http://rcin.org.pl

Serdecznie dziękuję dr Wojciechowi Hilgierowi
za wprowadzenie mnie w metodykę badań in vivo,
oraz za wielką życzliwość i pomoc przy licznych doświadczeniach

Dr Agacie Klejman składam wyrazy podziękowania
za owocną współpracę, której wyniki stanowią część niniejszej pracy

Pragnę również serdecznie podziękować
Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś, mgr Annie Dybel oraz Mirosławie Poławskiej
za nieocenioną pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczeń

Dziękuję koleżankom i kolegom z Zakładu Neurotoksykologii
za wspaniałą atmosferę, dzięki której czas spędzony z Wami
będę zawsze wspominał z uśmiechem

Szczególne podziękowania składam mojej żonie, Marcie
za pomoc i wspieranie mnie w realizacji tej pracy

Michał

http://rcin.org.pl

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

Klejman A, **Węgrzynowicz M**, Szatmari EM, Mioduszewska B, Hetman M, Albrecht J. (**2005**) Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem Int.* 47:51-57.

Węgrzynowicz M, Hilgier W, Dybel A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. (**2007**) Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: the role of cystine uptake. *Neurochem Int.* 50:883-889.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektów badawczych nr 2P05 A 066 28 oraz N401 080 32/1928

http://rcin.org.pl

I. WYKAZ SKRÓTÓW 4

II. WSTĘP 7

II.1 Metabolizm amoniaku w organizmie ssaków 7
II.1.1. Amoniak w OUN 9
II.2. Hiperamonemia i encefalopatia wątrobowa 10
II.2.1. Amoniak w OUN w encefalopatii wątrobowej 13
II.2.2. Astrocyty i neurony w patogenezie encefalopatii wątrobowej: uwagi wstępne 13
II.2.3. Rola glutaminy w patogenezie encefalopatii wątrobowej 14
II.2.4. Zaburzenia metabolizmu energetycznego i dysfunkcja mitochondriów w encefalopatii wątrobowej 16
II.2.5. Obrzmienie astrocytów i obrzęk mózgu w encefalopatii wątrobowej 18
II.2.6. Zaburzenia neurotransmisji w encefalopatii wątrobowej 19
II.2.7. Stres oksydacyjny w encefalopatii wątrobowej 24
II.2.8. Terapia w encefalopatii wątrobowej 26
II.3. Glutation 27
II.3.1. Metabolizm glutationu 28
II.3.2. Interakcje między astrocytami a neuronami w metabolizmie glutationu w OUN 29
II.3.3.Transport cystyny do astrocytów 31
II.3.4. Rola glutationu 32

III. CEL PRACY 34

IV. MATERIAŁY I METODY 35

IV.I. Odczynniki 35
IV.2. Mikrodializa prążkowia i kory przedczołowej mózgu szczura *in vivo* 35
IV.3. Hodowle komórkowe 37
IV.3.1 Hodowle pierwotne astrocytów korowych 37
IV.3.2 Hodowle komórek glejaka szczurzego C6 38
IV.3.3. Hodowle pierwotne neuronów korowych 38
IV.3.4. Warunki inkubacji komórek z odczynnikami 38
IV.4. Oznaczanie glutationu 39

http://rcin.org.pl

IV.4.1. Oznaczanie glutationu w mikrodializatach 39
IV.4.2. Oznaczanie glutationu wewnątrzkomórkowego w hodowlach in vitro 41
IV.4.3. Oznaczanie glutationu zewnątrzkomórkowego w hodowlach in vitro 43
IV.5. Wychwyt cystyny 43
IV.6. Badanie żywotności neuronów pierwotnych 44
IV.7. Oznaczanie poziomu mRNA genów białek biorących udział w metabolizmie glutationu 45
IV.7.1. Izolacja RNA 45
IV.7.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji 46
IV.7.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy 47
IV.7.4. Elektroforeza w żelu agarozowym 48
IV.8. Pomiar aktywności enzymów 49
IV.8.1. Pomiar aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej 49
IV.8.2. Pomiar aktywności γ-glutamylotransferazy 49
IV.9. Oznaczanie białka 50
IV.9.1. Oznaczanie białka metodą Bradforda 50
IV.9.2. Oznaczanie białka metodą biuretową 50

V. WYNIKI 52

V.1. Wpływ NH_4Cl na zewnątrzkomórkowy poziom glutationu *in vivo* 52
V.2. Wpływ NH_4Cl na wewnątrzkomórkowy poziom glutationu w hodowlach pierwotnych neuronów 54
V.3. Wpływ NH_4Cl na metabolizm glutationu w hodowlach pierwotnych astrocytów oraz w komórkach glejaka C6 58
V.3.1. Wpływ NH_4Cl na zawartość glutationu wewnątrzkomórkowego 58
V.3.2. Wpływ NH_4Cl na wychwyt cystyny 62
V.3.3. Wpływ NH_4Cl na ekspresję genów związanych z metabolizmem glutationu 66
V.3.4. Wpływ NH_4Cl na poziom glutationu zewnątrzkomórkowego 69

VI. DYSKUSJA 73

VI.1. Glutation w warunkach hiperamonemii w mózgu *in vivo* 73
VI.2. Metabolizm glutationu w warunkach hiperamonemii w hodowlach komórkowych *in vitro* 76
VI.2.1. Neurony 76

http://rcin.org.pl

VI.2.2. Astrocyty i komórki glejaka C6 77

VI.3. Glutation w warunkach hiperamonemii w kontekście interakcji między astrocytami a neuronami w jego metabolizmie 84

VII. WNIOSKI 87

VIII. STRESZCZENIE 89

IX. LITERATURA 92

http://rcin.org.pl

I. WYKAZ SKRÓTÓW

2-VP	2-winylopirydyna (ang. *2-**v**inyl**p**yridyne*)
4F2hc	łańcuch ciężki transportera x_c^-
5-HT	serotonina
αKG	**α** - **k**eto**g**lutaran
γGT	**γ**-**g**lutamylo**t**ransferaza
$\Delta\psi_m$	transbłonowy potencjał mitochondrialny
Abs	**abs**orbancja
Arg	**arg**inina
aCSF	sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. ***a**rtificial **c**erebro**s**pinal **f**luid*)
AMP	adenozynomonofosforan (ang. ***a**denosine **m**ono**p**hosphate*)
AP	oś przednio-tylna (ang. ***a**nterior-**p**osterior axis*)
Asn	**as**paragi**n**a
Asp	**asp**araginian
ATP	adenozynotrójfosforan (ang. ***a**denosine **t**ri**p**hosphate*)
BBB	bariera krew-mózg (ang. ***b**lood-**b**rain **b**arrier*)
BCA	kwas bis-cynchoninowy (ang. ***bic**inchoninic **a**cid*)
BME	podłoże podstawowe Eagle'a (ang. ***b**asal **m**edium **E**agle*)
BSO	sulfoksyimina butioniny (ang. ***b**uthionine **s**ulf**o**ximine*)
C6	linia glejaka szczurzego
CBR	centralny receptor benzodiazepinowy (ang. ***c**entral **b**enzodiazepine **r**eceptor*)
cDNA	komplementarny DNA (ang. ***c**omplementary **DNA***)
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan (ang. **c**yclic ***g**uanosine **m**ono**p**hosphate)*
CsA	**c**yklo**s**poryna **A**
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. ***c**erebro-**s**pinal **f**luid*)
Cys	**cys**teina
CySS	cystyna
dATP	deoksyadenozynotrójfosforan (ang. ***d**eoxy**a**denosine **t**ri**p**hosphate*)
dCTP	deoksycytydynotrójfosforan (ang. ***d**eoxy**c**ytidine **t**ri**p**hosphate*)
DEPC	dietylopirowęglan (ang. ***die**thyl**p**yro**c**arbonate*)
dGTP	deoksyguanozynotrójfosforan (ang. ***d**eoxy**g**uanosine **t**ri**p**hosphate*)
DMEM	podłoże Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco (ang. ***D**ulbecco's **m**odified **E**agle **m**edium*)
dNTP	trójfosforan deoksynukleozydu (ang. ***d**eoxy**n**ucleoside **t**ri**p**hosphate*)
DON	6-**d**iazo-5-**o**xy-L-**n**orleucyna
DTNB	kwas 5,5'-**dit**iobis-2-**n**itro**b**enzoesowy
DTT	**dit**io**t**reitol
dTTP	deoksytymidynotrójfosforan (ang. ***d**eoxy**t**hymidine **t**ri**p**hosphate*)
DV	oś grzbietowo-brzuszna (ang. ***d**orsal-**v**entral axis*)
EAAT	transportery aminokwasów pobudzających (ang. ***e**xcitatory **a**mino **a**cid **t**ransporters)*
EDTA	kwas wersenowy; kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ***e**thylene**d**iamine**t**etraacetic **a**cid*)
EtBr	bromek etydyny (ang. ***et**hidium **br**omide*)
FA	fluorooctan (ang. ***f**luoro**a**cetate*)
FBS	płodowa surowica bydlęca (ang. ***f**etal **b**ovine **s**erum*)
G6P	glukozo-6-fosforan (ang. ***g**lucose-**6**-**p**hosphate*)
G6PDH	dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (ang. ***g**lucose-**6**-**p**hosphate **deh**ydrogenase*)

http://rcin.org.pl

GABA	kwas γ-aminomasłowy (ang. *gamma-aminobutyric acid*)
$GABA_A$	receptor **GABA** typu **A**
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
GC	cyklaza guanylanowa (ang. *guanylate cyclase*)
GCL	ligaza glutaminianowo-cysteinowa (ang. *glutamate cysteine ligase*)
GCL-HS	ciężka podjednostka GCL (ang. *GCL – heavy subunit*)
GCL-LS	lekka podjednostka GCL (ang. *GCL – light subunit*)
GFAP	kwaśne białko włókienkowe gleju (ang. *glial fibrillary acidic protein*)
GLAST	transporter Glu, Asp i CySS; zwany również EAAT1
GLT1	transporter Glu, Asp i CySS; zwany również EAAT2
Glc	glukoza (ang. *glucose*)
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
GluCaNA	l-γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilid (ang. *l-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide*)
Gly	glicyna (ang. *glycine)*
GS	syntetaza glutaminowa (ang. *glutamine synthetase*)
GSH	glutation (forma zredukowana)
GSSC	dwusiarczek glutation-cysteina
GSSG	glutation (forma utleniona)
GSx	glutation całkowity
HA	hiperamonemia
HCysA	kwas homocysteinowy (ang. *homocysteic acid*)
HE	encefalopatia wątrobowa (ang. *hepatic encephalopathy*)
HEPES	kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynylo]etanosulfonowy
His	histydyna
HPLC	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. *high-pressure liquid chromatography*)
HVA	kwas homowanilinowy (ang. *homovanillic acid*)
ICP	ciśnienie śródczaszkowe (ang. *intracranial pressure*)
kDa	kilodalton
Lac	mleczan (ang. *lactate*)
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*)
l-trans-PDC	kwas l-trans-pirolidyno-2,4-dikarboksylowy (ang. *l-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid*)
MAO	oksydaza monoaminowa (ang. *monoamine oxidase*)
MAO_A	**MAO** typu **A**
MI	mieszanina inkubacyjna
MK-801	dizocilpina
ML	oś środkowo-boczna (ang. *medial-lateral axis*)
MPT	zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (ang. *mitochondrial permeability transition*)
MR	mieszanina reakcyjna
mRNA	matrycowy **RNA**
MRP	białko oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance protein*)
MSO	sulfoksyimina metioniny (ang. *methionine sulfoximine*)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana
nArg	nitroarginina
NMDA	n-metylo-d-asparaginian
NMDAr	receptor NMDA (ang. *NMDA receptor*)

http://rcin.org.pl

NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. ***n**uclear **m**agnetic **r**esonance*)
NOS	syntaza tlenku azotu (ang. ***n**itric **o**xide **s**ynthase*)
NOx	azotany i azotyny
NTB	kwas 2-**n**itro-5-**t**io**b**enzoesowy
oligo(dT_{12-18})	oligonukleotyd złożony z 12 - 18 reszt tymidynowych
OPA	aldehyd orto-ftalowy (ang. ***o**rto-**p**hthal**a**ldehyde*)
Orn	**orn**ityna
OUN	**o**środkowy **u**kład **n**erwowy
PAG	fosforanozależna glutaminaza (ang. ***p**hosphate-**a**ctivated **g**lutaminase*)
PDE	fosfodiesteraza (ang. ***p**hospho**die**sterase*)
PET	emisyjna tomografia pozytronowa (ang. ***p**ositron **e**mission **t**omography*)
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. ***p**hosphate **b**uffered **s**aline*)
PCA	kwas nadchlorowy (ang. ***perc**hloric **a**cid*)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. ***p**olymerase **c**hain **r**eaction*)
PCS	zespolenie wrotno-czcze (ang. ***p**orta**c**aval **s**hunt*)
PK11195	ligand TSPO
PTP	kanał zmiany przepuszczalności mitochondriów (ang. ***p**ermeability **t**rasnition **p**ore*)
Pyr	piriogronian (ang. ***pyr**uvate*)
Poli-A	fragment **polia**denylowy
pz	**p**ary **z**asad
ROS	reaktywne cząsteczki tlenowe (ang. ***r**eactive **o**xygen **s**pecies)*
RT	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. ***r**everse **t**ranscription*)
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. ***s**odium **d**odecyl **s**ulfate*)
SNAP	**S**-**n**itrozo-N-**a**cetylo**p**enicylamina
SSA	kwas sulfosalicylowy (ang. ***s**ulfo**s**alycilic **a**cid*)
TAA	**t**io**a**ce**t**amid
TBE	bufor **T**ris-**b**oran-**E**DTA
TCAc	cykl Krebsa; cykl kwasów trójkarboksylowych (ang. ***tric**arboxylic **a**cid **c**ycle*)
TRI	odczynnik do izolacji całkowitego RNA (ang. ***t**otal **R**NA **i**solation reagent*)
Trp	**tryp**tofan
TSPO	białko translokatora 18 kDa (ang. ***trans**locator **pro**tein*)
UV	światło ultrafioletowe (ang. ***ultrav**iolet*)
VER	wywołane potencjały wzrokowe (ang. ***v**isual **e**voked **r**esponse*)
X_{AG}^-	rodzina transporterów Glu, Asp i CySS
x_c^-	antyporter cystynowo-glutaminianowy
xCT	łańcuch lekki transportera x_c^-

http://rcin.org.pl

II. WSTĘP

II.1 Metabolizm amoniaku w organizmie ssaków

Utrzymanie homeostazy amoniaku ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Amoniak jest bowiem prekursorem licznych związków biorących udział w najważniejszych szlakach metabolicznych, tworzących strukturę komórek i tkanek, przechowujących i przetwarzających informację genetyczną, czy uczestniczących w neuroprzekaźnictwie. Z drugiej jednak strony, zbyt wysoki poziom amoniaku jest szkodliwy dla organizmu, a dotyczy to w pierwszym rzędzie ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Fizjologiczne stężenia amoniaku w organizmie utrzymują się na poziomie mikromolarnym. We krwi tętniczej wynoszą: u ludzi – od 45 µmol/l [Clemmensen i wsp., 2000] do 80 µmol/l [Lockwood i wsp., 1979]; u szczurów – od 35 µmol/l [Ehrlich i wsp., 1980; Kawaguchi i wsp., 2005] do 250 µmol/l [Hindfelt i wsp., 1977]. We krwi żylnej odpowiednio: 20 µmol/l – 25 µmol/l [Svenson i asfalt, 1982] oraz 50 µmol/l – 80 µmol/l [Cruz i Duffy, 1983].

Amoniak w roztworach wodnych występuje w dwóch formach: jako niezdysocjowana cząsteczka NH_3, oraz w postaci jonu amonowego NH_4^+. Obie te formy pozostają w dynamicznej równowadze między sobą:

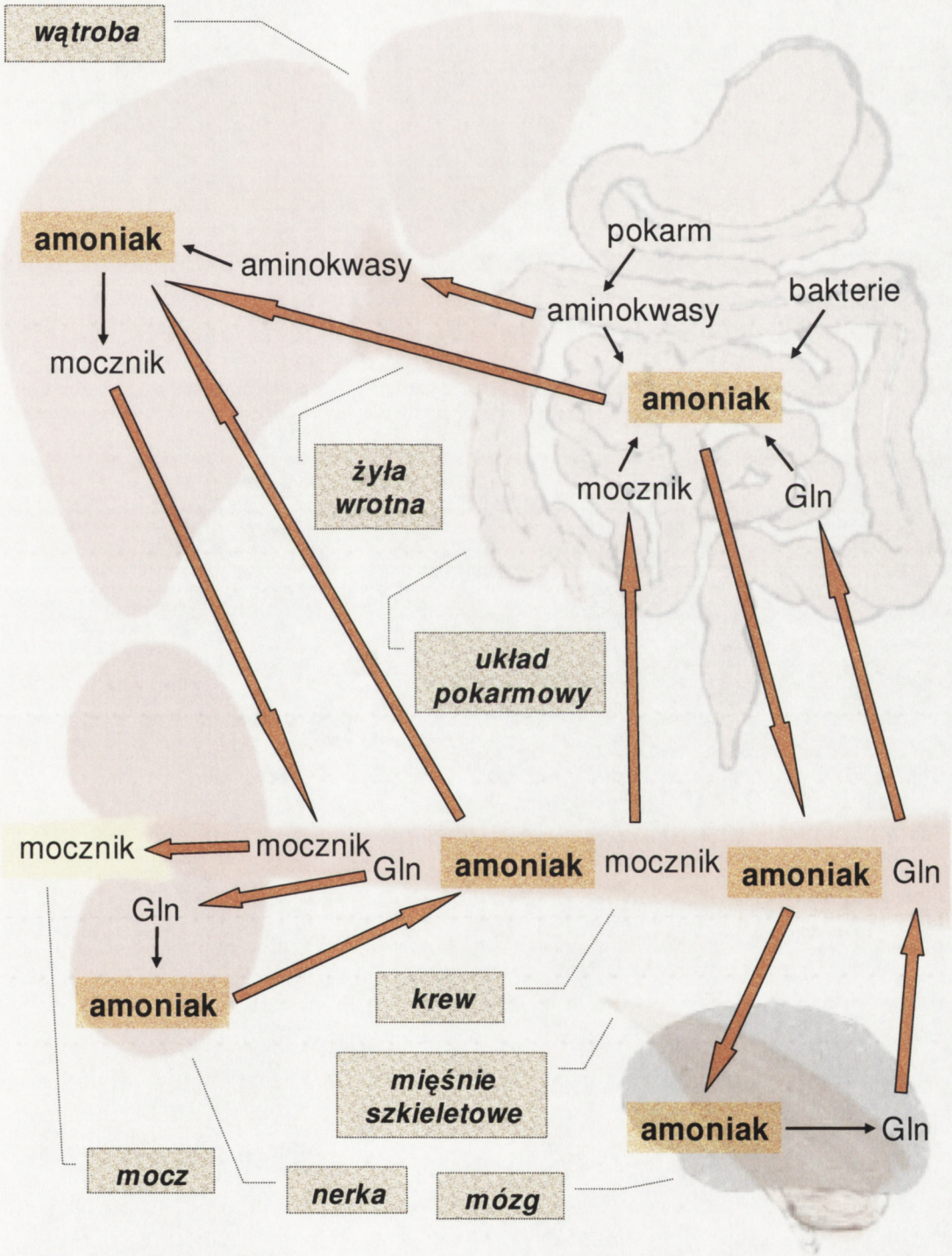
$$NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$$

We krwi, w warunkach fizjologicznych, pK_a dla amoniaku wynosi 9,1-9,2, a stosunek NH_3 do NH_4^+ - około 1:99 [Bromberg i wsp., 1960]. W niniejszej pracy pod pojęciem „amoniak" rozumieć będziemy całkowitą pulę tego związku, czyli sumę NH_3 i NH_4^+.

Amoniak trafia do układu krwionośnego głównie z przewodu pokarmowego. Stanowi przede wszystkim produkt trawienia dostarczonych z pokarmem białek i rozkładu pochodzących z nich aminokwasów [Weber i wsp., 1988], a także metabolizmu glutaminy (Gln), która jest wychwytywana z układu krążenia przez enterocyty jelita cienkiego i tam deamidowana, z uwolnieniem amoniaku z powrotem do układu krwionośnego [Windmueller i Spaeth, 1974; Hawkins i wsp., 1994]. Za kolejne źródła amoniaku uznaje się metabolizm bakterii żyjących w okrężnicy [Wolpert i wsp., 1970], a także hydrolizę mocznika, która zachodzi w jelicie [Wrong i wsp., 1985]. Ponadto amoniak może być wydzielany do krwi z

http://rcin.org.pl

innych narządów, w których stanowi produkt licznych procesów metabolicznych, takich jak: oksydacyjna deaminacja glutaminianu (Glu), deamidacja glutaminy oraz deaminacja adenozynomonofosforanu (AMP).



Rys. II.1. Schemat interakcji pomiędzy poszczególnymi narządami w metabolizmie amoniaku

http://rcin.org.pl

Detoksyfikacja amoniaku u ssaków zachodzi przede wszystkim w wątrobie – NH_4^+ włączany jest tam do cyklu ornitynowego (mocznikowego), którego końcowy produkt - mocznik jest usuwany z organizmu wraz z moczem [Meijer i wsp., 1990]. Przez żyłę wrotną, bezpośrednio do wątroby, trafia bogata w amoniak i aminokwasy krew z układu pokarmowego, natomiast przez tętnicę wątrobową dostaje się tu amoniak pochodzący z innych narządów. Drugim, po syntezie mocznika, mechanizmem detoksyfikacji amoniaku jest włączanie go do glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową (GS):

$$Glu + NH_4^+ + ATP \rightarrow Gln + ADP + P_i$$

Reakcja ta zachodzi w wielu narządach, przede wszystkim w wątrobie [Gebhardt i Mecke, 1983], mięśniach szkieletowych [Ganda i Ruderman, 1976] i mózgu [Girard i wsp., 1993].

Schemat interakcji między poszczególnymi narządami w metabolizmie amoniaku w organizmie ssaków przedstawiono na **rys. II.1**.

II.1.1. Amoniak w OUN

Fizjologiczne stężenia amoniaku, mierzone w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) wynoszą u ludzi od 20 µmol/l do 100 µmol/l [Huizenga i wsp., 1998], u szczurów zaś od 40 µmol/l do 100 µmol/l [Hindfelt i wsp., 1977; Rose i wsp., 2000]. Stosunek stężeń pomiędzy mózgiem a krwią zawiera się w przedziale od 1,5 do 3 [Cooper i wsp., 1979; Ehrlich i wsp., 1980].

Bariera krew-mózg (BBB) jest wysoce przepuszczalna dla amoniaku, zatem może on swobodnie przenikać do OUN. Uważa się, że przedostaje się tam z krwi przede wszystkim na zasadzie dyfuzji przez błony komórkowe [Phelps i wsp., 1977; Cooper i wsp., 1979]. BBB cechuje się znacznie wyższą przepuszczalnością dla niezdysocjowanej zasady amonowej niż dla jonu NH_4^+, wobec czego w warunkach fizjologicznych aż 75% amoniaku przechodzi do mózgu w postaci NH_3, pomimo, że forma ta stanowi tylko 1% całkowitej puli amoniaku we krwi [Raichle i Larson, 1981]. Amoniak w formie zjonizowanej prawdopodobnie jest przenoszony przy udziale systemu transportującego. Istnieje hipoteza, ze w procesie tym mogą brać udział znane z innych narządów (układ pokarmowy, wątroba, nerki) transportery specyficzne dla NH_4^+ (RhBG, RhCG) [Huang i Liu, 2001], choć równie prawdopodobny wydaje się transport jonów amonowych za pośrednictwem układu swoistego dla innych kationów [Sugimoto i wsp., 1997].

http://rcin.org.pl

Do najważniejszych endogennych źródeł amoniaku w mózgu zalicza się aktywność deaminazy AMP [Schultz i Lowenstein, 1976]; dehydrogenazy glutaminianowej [Weil-Malherbe i Gordon, 1971]; fosforanozależnej glutaminazy (PAG) [Benjamin, 1981] oraz oksydazy monoaminowej (MAO) [Hazama i wsp., 1976].

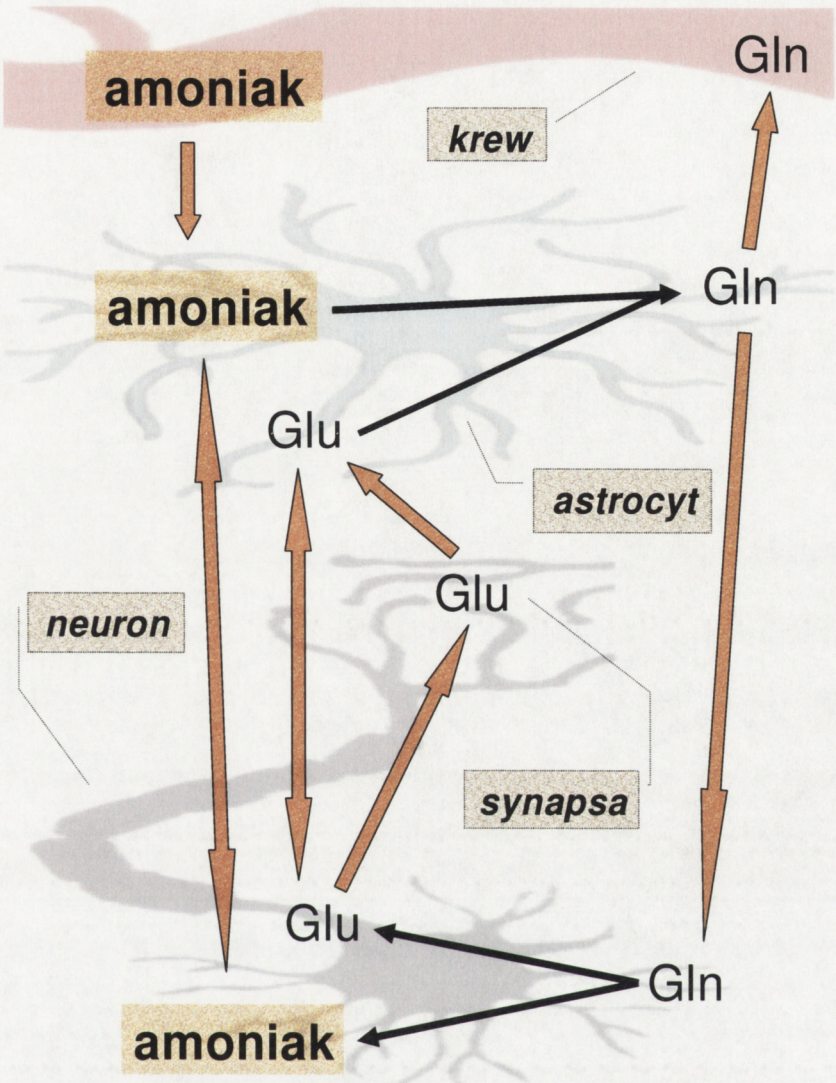
W OUN detoksyfikacja amoniaku zachodzi prawie wyłącznie (98%) poprzez syntezę glutaminy [Cooper i wsp., 1979]. Aktywność syntetazy glutaminowej obserwuje się przede wszystkim w astrocytach [Martinez-Hernandez i wsp., 1977]. Część powstającej w astrocytach Gln jest włączana do astrocytarno-neuronalnego cyklu glutamina-glutaminian: zostaje pobrana do neuronów glutaminianergicznych, gdzie jest deamidowana, a powstający z niej Glu, jako neurotransmiter wydzielany jest do szczeliny synaptycznej [Yudkoff i wsp., 1988; Shen i wsp., 1999], inna część Gln usuwana jest z OUN do krwi [Duffy i wsp., 1983]. Mózg odznacza się wysoką aktywnością syntetazy glutaminowej, co zapewnia szybkie włączanie amoniaku do glutaminy, i, obok różnicy pH między krwią a mózgiem, powoduje, że jego dyfuzja zachodzi w kierunku: krew → OUN [Hindfelt, 1975; Cooper i wsp., 1979].

Główne drogi metabolizmu amoniaku w OUN przedstawiono na **rys. II.2**.

II.2. Hiperamonemia i encefalopatia wątrobowa

Początek badań nad toksycznym wpływem amoniaku na ośrodkowy układ nerwowy datuje się na drugą połowę XIX wieku. Od tego również czasu uważa się podwyższone stężenie amoniaku we krwi (hiperamonemię; HA) za najważniejszy czynnik patogenny w encefalopatii wątrobowej (HE), schorzeniu w którym jako efekt dysfunkcji wątroby obserwuje się szereg zaburzeń w funkcjonowaniu OUN [Eck, 1877; Nencki i wsp., 1896]. Hiperamonemię mogą wywoływać również inne czynniki, takie jak np. dysfunkcje enzymów cyklu ornitynowego [Atig i wsp., 2008]; niedobór argininy (Arg) [Batshaw i wsp., 1984]; kwasice organiczne [Filipowicz i wsp., 2006]; czy kuracja lekiem przeciwpadaczkowym, kwasem walproinowym [Wadzinski i wsp., 2007], jednak to encefalopatia wątrobowa jest najczęściej występującą i najlepiej zbadaną encefalopatią hiperamonemiczną.

http://rcin.org.pl



Rys. II.2. Metabolizm amoniaku w OUN

W zależności od przyczyn, wyróżnia się trzy podstawowe typy encefalopatii wątrobowej: ostrą typu a, chroniczną typu b, oraz chroniczną typu c [Ferenci i wsp., 2002]. HE **typu a** jest efektem szybko postępującej niewydolności wątroby, będącej skutkiem ostrego zakażenia wirusowego (np. HAV, HBV, HCV) lub zatrucia hepatotoksynami (np. acetaminofenem, α-amanityną). Choroba ta przebiega z ciężkimi objawami (drgawki, delirium, śpiączka), a rokowania są bardzo niekorzystne – śmiertelność wynosi 80 – 90% [Schiodt i wsp., 1999]. W najwyższym stadium obserwuje się przyspieszenie mózgowego przepływu krwi [Strauss i wsp., 1997], a także znaczny wzrost ciśnienia śródczaszkowego (ICP) i obrzęk mózgu [Blei, 1991], skutkujący jego wgłobieniem (wklinowaniem), które stanowi najczęstszą przyczynę śmierci w przebiegu ostrej HE [Ede i Williams, 1986]. Encefalopatia wątrobowa **typu b** nie jest spowodowana bezpośrednio dysfunkcją wątroby, ale jest skutkiem chirurgicznego lub spontanicznego

http://rcin.org.pl

(wywołanego nadciśnieniem wrotnym) zespolenia wrotno-systemowego. HE **typu c** jest natomiast efektem marskości wątroby, czyli jej przewlekłej niewydolności [Ferenci i wsp., 2002]. We wszystkich trzech typach HE za podstawowy czynnik odpowiedzialny za zaburzenia funkcjonowania OUN uważa się niedostateczną detoksyfikację w wątrobie związków (przede wszystkim amoniaku), które po przekroczeniu fizjologicznego stężenia we krwi stają się neurotoksyczne [Rudman i wsp., 1973; Zieve, 1987]. W przebiegu choroby wyróżnia się 4 stadia, które rozpoznaje się na podstawie obserwacji zmian świadomości, funkcji intelektualnych i zachowania pacjentów (**tab. II.1**) [Conn, 1994].

Tab. II.1. Stadia encefalopatii wątrobowej i ich charakterystyka

stadium HE	objawy
stadium 1	zmiany rytmu snu i czuwania; obniżenie koncentracji; euforia lub depresja; nieznaczne przymglenie świadomości; niewyraźna mowa; drażliwość
stadium 2	pogorszenie sprawności intelektualnej; okresowa dezorientacja w czasie; nieprawidłowe zachowanie
stadium 3	senność; niemożność wykonania jakichkolwiek zadań umysłowych; dezorientacja w czasie i przestrzeni; znaczne ubytki pamięci; napady pobudzenia; brak kontaktu słownego
stadium 4	śpiączka

Do badania różnych aspektów hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej opracowano szereg modeli eksperymentalnych. Eksperymenty *in vivo* prowadzi się przede wszystkim na myszach oraz szczurach. Samą hiperamonemię, niezwiązaną z dysfunkcją wątroby wywołuje się poprzez dootrzewnowe podanie octanu amonowego [Hilgier i wsp., 1996]. Chroniczną HE można zaindukować, wykonując operacyjnie zespolenie wrotno-czcze (PCS) [Lozeva i wsp., 2001; Oria i wsp., 2006] lub podając czterochlorek węgla [Díaz-Muñoz i Tapia, 1989; Oria i wsp., 2006]. Objawy ostrej HE wywołuje dootrzewnowe podanie zwierzętom hepatotoksyn: galaktozaminy [Hu i Chen, 1992], lub tioacetamidu (TAA) [Zielińska i wsp., 2001; Sathyasaikumar i wsp., 2007a]. W niektórych eksperymentach łączy się dwa czynniki ze sobą, np. szczurom z PCS podaje się octan amonu [Bergqvist i wsp., 1995; Therrien iwsp., 1997]. Lokalne zmiany metabolizmu w mózgu można śledzić przy użyciu metody mikrodializy, oddziałując chlorkiem amonu przez sondę

http://rcin.org.pl

mikrodializacyjną bezpośrednio na badaną strukturę [Hilgier i wsp., 2003]. Eksperymenty *in vitro* prowadzi się na skrawkach mózgowych pochodzących od zwierząt z uprzednio wywołaną encefalopatią wątrobową [Wysmyk i wsp., 1992; Zielińska i wsp., 2002b], można także traktować solami amonu skrawki pobrane od zwierząt zdrowych [Zielińska i wsp., 2002b; Chepkova i wsp., 2006]. Do badań wykorzystuje się również hodowle komórkowe, dodając chlorek amonu do pożywki w której komórki rosną [Bender i Norenberg, 2000; Chan i wsp., 2000].

II.2.1. Amoniak w OUN w encefalopatii wątrobowej

U pacjentów cierpiących na encefalopatię wątrobową obserwuje się zwiększenie stężenia amoniaku w organizmie. W przypadku chronicznej HE zawartość tego związku we krwi tętniczej wzrasta około 1,5 - 2 - krotnie [Lockwood i wsp., 1991a; Lockwood i wsp., 2000; Rees i wsp., 2000], natomiast u pacjentów chorych na ostrą formę tego schorzenia wzrost ten może być 4 - 10 – krotny, a stężenie amoniaku może dochodzić do 450 μmol/l [Jalan i wsp., 1999; Clemmensen i wsp, 2000]. Podobne wartości obserwuje się w zwierzęcych modelach HE [Butterworth i wsp., 1987; Kawaguchi i wsp., 2005]. Również stosunek stężenia amoniaku w mózgu do stężenia we krwi jest podniesiony w tych warunkach: w chronicznej HE wynosi 3 - 4 [Cooper i Plum, 1987], w ostrej może dochodzić do 8 [Felipo i Butterworth, 2002], a sam amoniak w mózgu może osiągać stężenia 2 – 5 mM [Giguere i Butterworth, 1984]. Wartości te nasuwają przypuszczenie, że wysokie stężenie amoniaku w mózgu jest nie tylko bezpośrednią pochodną podniesionego stężenia we krwi, ale dodatkowo jest też efektem rozszczelnienia bariery krew-mózg. Badania z użyciem metody emisyjnej tomografii pozytronowej (PET) potwierdzają te spostrzeżenia – u pacjentów chorujących na chroniczną HE obserwuje się wzrost przepuszczalności BBB dla amoniaku [Lockwood i wsp., 1991a].

II.2.2. Astrocyty i neurony w patogenezie encefalopatii wątrobowej: uwagi wstępne

Przyjmuje się, że to przede wszystkim dysfunkcja astrocytów leży u podstaw patologii OUN w encefalopatii wątrobowej [Albrecht, 2005]. Wysoką podatność tych komórek na hiperamonemię można wytłumaczyć przede wszystkim tym, że w nich zachodzi proces detoksyfikacji amoniaku prowadzący do akumulacji Gln, która wydaje się być jednym z kluczowych czynników w patogenezie HE (por. **rozdz. II.2.3**). Astrocyty w HE wykazują szereg zmian morfologicznych. W encefalopatii

http://rcin.org.pl

chronicznej przybierają postać komórek Alzheimera II typu: są obrzmiałe, mają powiększone jądra z jasną chromatyną i wyraźnymi jąderkami [Gregorios i wsp., 1985], zaś w encefalopatii ostrej wykazują silne obrzmienie prowadzące do obrzęku mózgu. Zmiany histopatologiczne neuronów w HE występują rzadziej niż te dotyczące komórek glejowych [Butterworth, 2007]. Znacznie częściej wyraźne efekty wywoływane przez amoniak w neuronach objawiają się *in vitro* – w hodowlach pierwotnych tych komórek obserwuje się znaczące zmiany ekspresji genów [Irie i wsp., 1998] oraz indukcję apoptozy [Li i wsp., 2004]. Fakt, że takie zjawiska ujawniają się w czystych hodowlach neuronalnych, sugeruje, że mogą być one wywołane nieobecnością astrocytów, co wskazuje, że *in vivo* w HE, podobnie jak w innych schorzeniach OUN [Rosenberg i Aizenman, 1989] astrocyty zapewniają neuronom ochronę.

Do najważniejszych zmian obserwowanych w astrocytach w warunkach hiperamonemii zalicza się: wzrost zawartości glutaminy, obrzmienie komórek, stres oksydacyjny, zmianę przepuszczalności błon mitochondriów (MPT), spadek metabolizmu energetycznego, oraz zmiany aktywności szlaku tlenek azotu (NO) → cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP). Zmiany dotyczące neuronów to przede wszystkim zaburzenia neurotransmisji, choć związane są one nieraz z pierwotną wobec nich dysfunkcją procesów astrocytarnych (np. obniżeniem wychwytu Glu ze szczelin synaptycznych przez astrocyty, lub aktywacją białka translokatora 18 kDa (TSPO; do niedawna znanego jako peryferyjny receptor benzodiazepinowy) na zewnętrznej błonie astrocytarnych mitochondriów). Te zagadnienia zostaną szczegółowo omówione w następnych rozdziałach.

II.2.3. Rola glutaminy w patogenezie encefalopatii wątrobowej

W warunkach hiperamonemii obserwuje się zwiększenie syntezy Gln, reakcji, która zachodzi przede wszystkim w astrocytach i stanowi praktycznie jedyną drogę detoksyfikacji amoniaku w OUN (por. **rozdz. II.1.1.**). W efekcie rośnie zawartość tego aminokwasu w mózgu, co można zaobserwować u pacjentów cierpiących na encefalopatię wątrobową: tak ostrą [Record i wsp., 1976; McConell i wsp., 1995], jak i przewlekłą [Lavoie i wsp., 1987; Laubenberger i wsp., 1997], a także w różnych zwierzęcych modelach tej choroby [Hawkins i wsp., 1993; Cordoba i wsp., 1996; Zielińska i wsp., 2004; Hilgier i wsp., 2008]. Wzrost stężenia Gln odnotowuje się również w CSF [Hourani i wsp., 1971; Holt i wsp., 2002]. Dawniej uważano, że akumulacja Gln jest procesem obojętnym dla OUN, jednak już od dłuższego czasu uznaje się, że zjawisko to ma kluczowe znaczenie w patogenezie

http://rcin.org.pl

HE. Wykazano, że wśród szczurów, u których zaindukowano ostrą hiperamonemię, znaczny spadek śmiertelności można uzyskać poprzez obniżenie zawartości Gln w mózgu przy użyciu sulfoksyiminy metioniny (MSO), inhibitora syntetazy glutaminowej [Warren i Schenker, 1964]. Zaobserwowano również, że zwiększony poziom Gln w warunkach hiperamonemii przekłada się na zaburzenia funkcji neuropsychologicznych – w przypadku pacjentów z marskością wątroby stopień upośledzenia pamięci bezpośredniej koreluje z poziom Gln [Shawcross i wsp., 2004]. Obecnie uważa się, że zwiększona synteza Gln może leżeć u podstaw wielu obserwowanych w HE zaburzeń, takich jak: obrzmienie astrocytów i obrzęk mózgu (por. **rozdz. II.2.5**), spadek metabolizmu energetycznego i MPT (por. **rozdz. II.2.4**), czy stres oksydacyjny (por. **rozdz. II.2.7**).

Wzrost zawartości Gln w OUN w warunkach hiperamonemii nie wynika jednak z aktywacji syntetazy glutaminowej, a prawdopodobnie tylko ze zwiększenia stężenia amoniaku, substratu reakcji syntezy tego aminokwasu. Pomimo, że w astrocytach pierwotnych, po inkubacji z 5mM NH_4Cl obserwuje się nadekspresję GS [Bodega i wsp., 2006], już w mózgu szczurów z PCS zawartość tego enzymu pozostaje niezmieniona [Desjardins i wsp., 1999a], lub nawet spada [Suárez i wsp., 2005], a jego aktywność zmniejsza się o 1/3 [Desjardins i wsp., 1999a]. Spadek aktywności GS w tych warunkach może być wywołany hamującym działaniem tlenku azotu, którego stężenie wzrasta w efekcie pobudzenia syntetazy NO przez amoniak (por. **rozdz. II.2.6**).

Głównym miejscem rozkładu Gln do Glu w OUN są neurony, chociaż jest bardzo prawdopodobne, że część tego aminokwasu ulega deamidacji również w astrocytach. Obecność PAG w astrocytach hodowanych *in vitro* nie ulega wątpliwości [Schousboe i wsp., 1979; Hogstad i wsp., 1988; Collins i wsp., 1994], natomiast wyniki badań dotyczących jej występowania *in vivo* nie są jednoznaczne – jedne świadczą o jej obecności zarówno w neuronach, jaki i komórkach glejowych [Aoki i wsp., 1991; Wurdig i Kugler, 1991], inne wykazują, że jej lokalizacja ogranicza się tylko do neuronów [Akiyama i wsp., 1990; Laake i wsp., 1999]. Na poziomie subkomórkowym, PAG związana jest z wewnętrzną błoną mitochondrialną [Roberg i wsp., 1995; Laake i wsp., 1999], przy czym jej katalityczne działanie wydaje się przejawiać w matriks [Bak i wsp., 2008], w związku z czym deamidacja Gln musi być poprzedzona transportem tego aminokwasu do mitochondriów. W hodowlach astrocytów pierwotnych zaobserwowano szybką deamidację Gln [Sonnewald i wsp., 1996], przy czym wykazano, że proces ten jest równoważony przez syntezę tego aminokwasu, która zachodzi z podobną szybkością [Yudkoff i wsp., 1988]. W HE, obok wzrostu

http://rcin.org.pl

syntezy Gln, wzrasta również ekspresja i aktywność PAG [Romero-Gomez i wsp., 2006]. Obserwuje się również wzrost szybkości pobierania Gln do mitochondriów pod wpływem jonów amonowych [Dolińska i wsp., 1996]. Nowo postawiona tzw. hipoteza „konia trojańskiego" zakłada, że w efekcie tych procesów stężenie amoniaku w mitochondriach osiąga wysokie, patologiczne wartości, co stanowi główną przyczynę występującego w hiperamonemii zaburzenia funkcjonowania tych organelli (por. **rozdz. II.2.4**), które z kolei wydaje się skutkować kolejnymi dysfunkcjami obserwowanymi w astrocytach [Albrecht i Norenberg, 2006]. Potwierdzeniem tej hipotezy są obserwacje wskazujące, że zawartość jonów amonowych w mitochondriach wyizolowanych z mózgów szczurów, którym dootrzewnowo podano octan amonu jest aż 5-krotnie podwyższona w porównaniu ze szczurami kontrolnymi [Kosenko i wsp., 1996].

II.2.4. Zaburzenia metabolizmu energetycznego i dysfunkcja mitochondriów w encefalopatii wątrobowej

W OUN u pacjentów cierpiących na encefalopatię wątrobową, oraz w zwierzęcych modelach tej choroby, a także w komórkach traktowanych amoniakiem *in vitro*, bardzo często obserwuje się dysfunkcję metabolizmu energetycznego. Badania nad zużywaniem glukozy (Glc), podstawowego substratu energetycznego w OUN, wskazują na zaburzenia tego procesu w takich warunkach. U pacjentów z HE obserwuje się spadek mózgowego wskaźnika metabolizmu Glc [Lockwood i wsp., 1991b]. U szczurów z encefalopatią wywołaną PCS stwierdzono obniżenie wykorzystywania Glc w korze czołowej [Audet i wsp., 1998], a u szczurów traktowanych TAA – w korze, prążkowiu, móżdżku i hipokampie [Hilgier i wsp., 1991]. Jednak w innych doświadczeniach, u szczurów z ostrą niewydolnością wątroby, zaobserwowano w korze czołowej wzrost ekspresji mRNA i białka GLUT1, odpowiedzialnego za transport Glc przez BBB. Wykazano również zwiększenie pobierania [^{14}C]-2-deoksy-D-glukozy do astrocytów pierwotnych w efekcie inkubacji z NH_4Cl [Belanger i wsp., 2006]. Zaburzeniom metabolizmu Glc w warunkach hiperamonemii mogą towarzyszyć zmiany zawartości adenozynotrójfosforanu (ATP). Inkubacja hodowli pierwotnych tak astrocytów jak i neuronów z chlorkiem amonu powoduje spadek stężenia wewnątrzkomórkowego ATP [Haghighat i wsp., 2000; Pichili i wsp., 2007]. Podobne zjawisko obserwuje się w mózgach szczurów po dootrzewnowym podaniu octanu amonu [Kosenko i wsp., 1994]. Dodatkowo wykazano, podając CH_3COONH_4 szczurom z zespoleniem wrotno-systemowym, że spadek ATP poprzedzony jest obniżeniem zawartości cytrynianu, które ma miejsce

http://rcin.org.pl

pomimo wzrostu poziomu pirogronianu (Pyr) w tych warunkach, co może świadczyć o upośledzeniu cyklu Krebsa (TCAc) [Hindfeld i wsp., 1977]. Te obserwacje znajdują potwierdzenie w doświadczeniach *in vitro*: zużywanie tlenu, po podaniu Pyr jako substratu energetycznego, jest niższe w mitochondriach wyizolowanych z mózgów szczurów z marskością wątroby w porównaniu do wartości obserwowanych u szczurów kontrolnych [Díaz-Muñoz i Tapia, 1989]. Spadek utleniania Pyr obserwuje się również w astrocytach pierwotnych po inkubacji z NH_4Cl [Albrecht i wsp., 1987]. Obniżenie zużywania Pyr w TCAc skutkuje wzrostem jego redukcji do mleczanu (Lac). Podwyższenie zawartości Lac obserwuje się w CSF pacjentów cierpiących na encefalopatię wątrobową [Yao i wsp., 1987], a także w mózgach [Zwingmann i wsp., 2003] oraz w CSF [Therrien i wsp., 1991] szczurów z wywołaną niewydolnością wątroby. Przyczyną obniżenia wydajności cyklu Krebsa w HE może być zmniejszenie aktywności enzymów z nim związanych. W mitochondriach izolowanych z mózgów szczurów traktowanych TAA lub octanem amonu wykazano spadek aktywności karboksylazy pirogronianowej [Faff-Michalak i Albrecht, 1991]. Enzym ten odpowiada za syntezę szczawiooctanu i pełni kluczową rolę w utrzymywaniu prawidłowych stężeń pośredników TCAc. Dodatkowo, zaobserwowano hamowanie przez amoniak kompleksu dehydrogenazy α-ketoglutaranowej (który jest kluczowym kompleksem enzymatycznym w TCAc) *in vitro* w izolowanych mitochondriach [Faff-Michalak i Albrecht, 1993], oraz obniżenie aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (który jest odpowiedzialny za reakcję oksydacyjnej dekarboksyalcji Pyr, której produkt, acetylokoenzym A jest substratem TCAc) *in vivo* u szczurów z ostrą encefalopatią wątrobową [Zwingmann i wsp., 2003].

Kolejnym czynnikiem w zaburzeniach metabolizmu energetycznego w warunkach hiperamonemii jest występująca w astrocytach MPT. Mianem tym określa się nagłe zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej w efekcie otwarcia kanałów PTP, co skutkuje obniżeniem transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\psi_m$). W astrocytach oraz neuronach pierwotnych w obecności jonów amonowych obserwuje się spadek $\Delta\psi_m$, który można całkowicie zablokować stosując inhibitor PTP, cyklosporynę A (CsA). Indukcja MPT wydaje się być efektem wzrostu zawartości astrocytarnej Gln w hiperamonemii. W astrocytach pierwotnych, MSO blokuje spadek $\Delta\psi_m$ spowodowany przez NH_4Cl [Bai i wsp., 2001], a inkubacja komórek z samą Gln, podobnie jak z NH_4Cl, wywołuje objawy typowe dla MPT [Rama Rao i wsp., 2003a]. Zjawisko to jest ograniczone tylko do astrocytów – inkubacja neuronów z Gln nie powoduje zmian $\Delta\psi_m$ [Rama Rao i wsp., 2005b]. Kluczowe znaczenie w procesie

http://rcin.org.pl

powstawania astrocytarnego MPT okazuje się mieć mitochondrialne pobieranie Gln i jej deamidacja przez PAG (por. **rozdz. II.2.3** – hipoteza „konia trojańskiego"). Użycie histydyny (His), inhibitora transportu Gln do mitochondriów, znacząco ogranicza wywołane przez inkubację astrocytów pierwotnych z amoniakiem zaburzenia, takie jak MPT i spadek ATP [Pichili i wsp., 2007]. Również zahamowanie aktywności PAG przez potraktowanie komórek 6-diazo-5-oxy-L-norleucyną (DON) zapobiega obniżeniu $\Delta\psi_m$ przez NH_4Cl [Rama Rao i wsp., 2005b]. Hipoteza „konia trojańskiego" znajduje potwierdzenie również w doświadczeniach z użyciem mitochondriów izolowanych z mózgu szczura, w których jako objaw toksyczności Gln obserwowano zmiany ich objętości. Inkubacja z NH_4Cl nie powodowała w tych mitochondriach obrzmienia, zjawiska, które obserwowano po podaniu Gln, i które było hamowane przez CsA lub His [Ziemińska i wsp., 2000]. Spostrzeżenia te świadczą o tym, że toksyczne działanie amoniaku na mitochondria opiera się na zwiększeniu syntezy Gln (GS, będąc enzymem cytosolowym jest nieobecna w tym układzie doświadczalnym), pobraniu jej do mitochondriów, a następnie deamidacji przez PAG, skutkującej lokalnym wzrostem stężenia NH_4^+ w matriks.

II.2.5. Obrzmienie astrocytów i obrzęk mózgu w encefalopatii wątrobowej

Obrzmienie komórek glejowych, które obserwuje się w obecności wysokich stężeń amoniaku [Norenberg i wsp., 1991] uznawane jest za główny czynnik wywołujący obrzęk mózgu [Traber i wsp., 1987], który z kolei stanowi najczęstszą przyczynę śmierci w przebiegu ostrej encefalopatii wątrobowej. Dokładny mechanizm powstawania tych zjawisk nie jest jak dotąd znany, choć najważniejszym czynnikiem wydaje się być w tym przypadku Gln. Zahamowanie aktywności GS zapobiega obrzękowi mózgu u szczurów traktowanych octanem amonu [Takahashi i wsp., 1991] oraz u zwierząt z PCS [Blei i wsp., 1994]. Badania *in vitro* potwierdzają związek Gln z obrzmieniem komórek glejowych: w obecności MSO nie obserwuje się wywołanego inkubacją z NH_4Cl zwiększenia objętości astrocytów pierwotnych [Norenberg i Bender, 1994]. Do niedawna uważano, że wzrost zawartości wody w astrocytach spowodowany jest prostym działaniem osmotycznym akumulującej się w nich Gln [Olafsson i wsp., 1995]. Jednak w ostatnich latach pojawiło się wiele prac, które każą zrewidować tę hipotezę. Hipotermia, pomimo, że prowadzi do zmniejszenia obrzęku (por. **rozdz. II.2.8**) nie powoduje jakichkolwiek zmian w zawartości Gln w mózgu szczurów z PCS [Córdoba i wsp., 1999] oraz z ostrą niewydolnością wątroby [Zwingmann i wsp.,

http://rcin.org.pl

2004]. Również badania *in vitro* wskazują na brak korelacji między wewnątrzkomórkowym stężeniem Gln a stopniem obrzmienia astrocytów pierwotnych [Jayakumar i wsp., 2006a]. Zaobserwowano natomiast, że obrzmieniu tych komórek wywołanemu inkubacją z amoniakiem można zapobiec stosując następujące inhibitory: His (hamuje pobieranie Gln przez mitochondria) [Pichili i wsp., 2007]; DON (hamuje PAG) [Jayakumar i wsp., 2006a] lub CsA (hamuje MPT) [Rama Rao i wsp., 2003b]. Te spostrzeżenia nasuwają przypuszczenie, że problemy z utrzymaniem objętości astrocytów mogą być związane z wywołaną przez metabolizm Gln dysfunkcją mitochondriów (por. **rozdz. II.2.4**).

Inna teoria dotycząca przyczyn obrzęku wskazuje na zwiększoną syntezę Lac w OUN (por **rozdz. II.2.4**), którego akumulacja w astrocytach *in vitro* może wywoływać gradient osmotyczny skutkujący obrzmieniem tych komórek [Plesnila i wsp., 1999]. Tę hipotezę potwierdzają obserwacje *in vivo* - u szczurów z ostrą niewydolnością wątroby wykazano korelację stopnia obrzęku z zawartością Lac w mózgu [Zwingmann i wsp., 2003].

II.2.6. Zaburzenia neurotransmisji w encefalopatii wątrobowej

W licznych zwierzęcych modelach hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej obserwuje się wzrost stężeń Glu zewnątrzkomórkowego [Moroni i wsp., 1983; De Knegt i wsp., 1994; McArdle i wsp., 1996; Michalak i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1999]. Dodatkowo, w HA i HE obserwuje się obniżenie ekspresji astrocytarnych transporterów Glu, co skutkuje spadkiem pobierania przez astrocyty Glu wydzielonego do szczeliny synaptycznej z neuronów glutaminianergicznych [Knecht i wsp., 1997; Norenberg i wsp., 1997; Chan i wsp., 2000]. Akumulacja zewnątrzkomórkowego Glu prowadzi do zaburzeń pobudzającej neurotransmisji glutaminianergicznej, choć nie jest jedyną przyczyną tego zjawiska. Największe zmiany w funkcjonowaniu receptorów dla Glu dotykają receptorów NMDA (NMDAr) – ich aktywność jest zwiększona w ostrej i obniżona w chronicznej HA.

Pobudzenie NMDAr powoduje otwarcie kanałów jonowych i napływ jonów sodowych i wapniowych do komórki, oraz aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego NO → cGMP. Jony Na^+ usuwane są następnie poza komórkę przez Na^+/K^+-ATPazę, natomiast jony Ca^{2+} wychwytywane są przez mitochondria. Wykazano, że dootrzewnowe podanie szczurom wysokich dawek octanu amonu skutkuje wzrostem aktywności Na^+/K^+-ATPazy oraz zwiększeniem poziomu mitochondrialnego Ca^{2+} w mózgu, i że te zjawiska są hamowane przez MK-801 (dizocilpinę; inhibitor NMDAr) [Kosenko i wsp., 1994; Kosenko i wsp., 2000]. W

http://rcin.org.pl

doświadczeniach z użyciem mikrodializy stwierdzono natomiast, że podanie amoniaku, w stężeniu zbliżonym do stężeń obserwowanych w ostrej HE, do różnych ośrodków w mózgu szczura, powoduje wyraźne zwiększenie zawartości cGMP w mikrodializatach, a procesowi temu można zapobiec stosując MK-801 [Hermenegildo i wsp., 2000], lub CGP 78608 (antagonistę glicyny, która jest koaktywatorem NMDAr) [Hilgier i wsp., 2004]. Dodatkowo zaobserwowano wzrost stężenia produktów utleniania NO, azotanów i azotynów (NOx) w mikrodializatach z prążkowia szczura po podaniu NH_4Cl [Hilgier i wsp., 2008], co świadczy o pobudzeniu syntezy tlenku azotu. Potwierdzają to badania, w których wykazano aktywację syntazy NO (NOS) w tych warunkach [Raghavendra Rao i wsp., 1995]. Funkcjonowanie szlaku NO → cGMP w hiperamonemii jest zaburzone również w astrocytach: stwierdzono, że dodanie NH_4Cl do hodowli pierwotnych tych komórek skutkuje aktywacją NOS, którą można zahamować przy użyciu MK-801 [Schliess i wsp., 2002], a także powoduje, zależne od czasu inkubacji, zmiany zawartości cGMP, oraz zmiany ekspresji podjednostek poszczególnych astrocytarnych izoform cyklazy guanylanowej (GC), enzymu odpowiedzialnego za syntezę cGMP [Konopacka i wsp., 2006].

Badania nad aktywacją receptorów NMDA w ostrej encefalopatii wątrobowej wskazują na powiązanie tego zjawiska z powstawaniem niektórych zaburzeń obserwowanych w tych warunkach i prowadzą do stawiania hipotez często konkurencyjnych wobec tezy zakładającej, że metabolizm Gln jest podstawowym czynnikiem w patogenezie HE. Na związki NMDAr z redukcją metabolizmu energetycznego wskazano, obserwując hamowanie przez MK-801 spadku poziomu ATP w mózgach szczurów po dootrzewnowym podaniu octanu amonu. Udział pobudzenia tych receptorów w obniżaniu zawartości ATP może się opierać na zwiększaniu zużycia tego związku w wyniku aktywacji Na^+/K^+-ATPazy a także zmniejszaniu jego syntezy w efekcie obniżenia potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, o który syntaza ATP konkuruje z transporterem Ca^{2+} [Kosenko i wsp., 1994]. Przy użyciu innego inhibitora receptora NMDA, memantyny, wykazano również udział nadpobudzenia NMDAr w wywoływaniu obrzęku w szczurzym modelu ostrej HE [Vogels i wsp., 1997]. Natomiast MK-801 oraz nitroarginina (nArg; inhibitor NOS) okazały się skuteczne w redukcji obrzmienia skrawków kory mózgu szczurów wywołanego inkubacją z NH_4Cl [Zielińska i wsp., 2003]. W tym przypadku spadkowi zawartości wody w komórkach nie towarzyszyły zmiany w zawartości Gln, co może stanowić kolejny argument przeciwko hipotezie zakładającej, że obrzmienie astrocytów i obrzęk mózgu są efektem bezpośredniego osmotycznego działania Gln (por. **rozdz. II.2.3**). Wyniki niektórych badań nad związkiem szlaku

http://rcin.org.pl

NMDAr → NO → cGMP z Gln w HA wskazują nawet na hamujący wpływ aktywacji tego szlaku na GS. W mózgach szczurów traktowanych CH_3COONH_4 zaobserwowano wzrost aktywności GS i zawartości Gln po podaniu nArg [Kosenko i wsp., 1995]. Również w warunkach *in vitro* wykazano wpływ NO na aktywność GS: podanie donora NO, S-nitrozo-N-acetylopenicylaminy (SNAP) wywołuje spadek zawartości Gln w astrocytach pierwotnych [Miñana i wsp., 1997]. Wzajemne powiązania między zwiększonym pobudzeniem szlaku NMDAr → NO → cGMP a akumulacją Gln nie są jak dotąd jasne i wymagają dokładniejszego zbadania, zwłaszcza, że właśnie te dwa zjawiska wydają się odgrywać główną rolę w patogenezie ostrej encefalopatii wątrobowej.

W przeciwieństwie do ostrej HE, w chronicznym przebiegu tego schorzenia obserwuje się raczej zahamowanie szlaku NMDAr → NO → cGMP, co uważa się za odpowiedź kompensacyjną po wstępnym pobudzeniu. U szczurów z PCS w wielu ośrodkach mózgu zaobserwowano spadek ilości miejsc wiążących ligandy receptorów NMDA w porównaniu ze szczurami kontrolnymi [Peterson i wsp., 1990]. Dodatkowo GC wykazuje obniżoną wrażliwość na aktywację przez NO: w mikrodializatach z móżdżków szczurów z chroniczną HA, a także *in vitro*, w hodowlach pierwotnych neuronów traktowanych NH_4Cl, produkcja cGMP po podaniu SNAP jest niższa niż w warunkach kontrolnych [Hermenegildo i wsp., 1998].

Szlak NMDAr → NO → cGMP, poprzez wytwarzanie zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), odgrywa istotną rolę w procesie uczenia się i pamięci [Bon i Garthwaite, 2003]. Zaobserwowano, że u szczurów w polu CA1 hipokampa, poziom LTP po stymulacji NMDAr jest czterokrotnie niższy w warunkach hiperamonemicznych niż w kontroli [Muñoz i wsp., 2000]. Ponadto wykazano, że sildenafil, inhibitor fosfodiesterazy (PDE), enzymu odpowiedzialnego za degradację cGMP, podawany szczurom z PCS, przywraca zawartość cGMP do poziomu kontrolnego, a także polepsza zdolność do uczenia się, która u takich szczurów jest upośledzona [Erceg i wsp., 2005]. Dysfunkcja szlaku NMDAr → NO → cGMP może zatem być odpowiedzialna za obserwowane w przebiegu HE zaburzenia neuropsychologiczne.

Liczne doniesienia wskazują na zmiany hamującej neurotransmisji z udziałem receptorów kwasu γ-aminomasłowego, zwłaszcza typu A ($GABA_A$), w przebiegu HE. U pacjentów z chroniczną encefalopatią wykazano znaczny wzrost stężenia GABA we krwi, co może być efektem zmniejszonej degradacji tego neuroprzekaźnika w wątrobie [Minuk i wsp., 1985], a w mózgu zaobserwowano zagęszczenie miejsc wiążących flunitrazepam, ligand centralnych receptorów

BIBLIOTEKA

http://rcin.org.pl

benzodiazepinowych (CBR) [Mullen i wsp., 1990]. CBR wchodzą w skład kompleksów receptorowych $GABA_A$, a ich aktywacja pozytywnie moduluje neurotransmisję GABAergiczną. U szczurów traktowanych TAA stwierdzono wzrost ekspresji mRNA dla trzech podjednostek (α, β i γ) $GABA_A$ w większości badanych ośrodków mózgu [Li i wsp., 2005] oraz stymulację syntezy GABA z argininy w wyizolowanych synaptosomach [Albrecht i wsp., 1990]. Jednak wyniki niektórych badań nie potwierdzają tych spostrzeżeń: w mózgach pobranych *post mortem* od pacjentów chorujących na marskość wątroby nie stwierdzono zmian ani w poziomie GABA [Lavoie i wsp., 1987], ani w ilości miejsc wiążących muscimol (ligand dla $GABA_A$) i flunitrazepam, ani też w powinowactwie receptorów do tych ligandów [Butterworth i wsp., 1988].

Receptory $GABA_A$ posiadają liczne endogenne neuromodulatory, które wiążąc się z nimi mogą regulować ich aktywność. Do modulatorów pozytywnych zaliczają się m.in. niektóre neurosteroidy, których synteza zachodzi w mitochondriach, po aktywacji znajdującego się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka translokatora (TSPO), dawniej nazywanego peryferyjnym receptorem benzodiazepinowym. W OUN TSPO występuje przede wszystkim w astrocytach, choć w ostatnich latach pojawiają się doniesienia o możliwej neuronalnej lokalizacji tego białka [Jordà i wsp., 2005]. W korze mózgu pacjentów zmarłych w przebiegu marskości wątroby zaobserwowano wzrost wiązania PK11195, ligandu TSPO [Lavoie i wsp., 1990]. W mózgach myszy traktowanych TAA lub CH_3COONH_4 wykazano zwiększenie zawartości pregnenolonu, prekursora neurosteroidów modulujących aktywność $GABA_A$, którego synteza jest kontrolowana przez TSPO [Itzhak i wsp., 1995]. Szczury z PCS charakteryzowały się natomiast nadekspresją mRNA dla TSPO w OUN [Desjardins i wsp., 1999b]. Wzrost pregnenolonu, a także jego metabolitu – allopregnanolonu zaobserwowano również w mózgach pacjentów zmarłych w wyniku chronicznej HE [Ahboucha i wsp., 2006]. Wynikom wskazującym na zwiększone wiązanie ligandów do TSPO przeczą natomiast badania przeprowadzone z użyciem PET na żyjących pacjentach chorujących na marskość wątroby, które wykazały brak jakichkolwiek zmian w gęstości miejsc wiążących PK11195 [Iversen i wsp., 2006].

Dysfunkcja hamującego przekaźnictwa GABAergicznego może przyczyniać się do zaburzeń pobudliwości oraz funkcji motorycznych, obserwowanych w encefalopatii wątrobowej. Wykazano, że antagonista CBR, flumazenil znacząco ogranicza zjawiska występujące u szczurów po indukcji ostrej HE, takie jak: spadek aktywności ruchowej oraz wzrost częstości nieprawidłowych wywołanych potencjałów wzrokowych (VER) [Gammal i wsp., 1990; Yano i wsp., 2005].

http://rcin.org.pl

TSPO, oprócz kontroli produkcji neurosteroidów, reguluje również przepuszczalność błon mitochondrialnych, stanowiąc część kompleksu białkowego PTP i uczestnicząc w MPT (por. **rozdz. II.2.4**). Wykazano, że w astrocytach pierwotnych, obniżenie ekspresji TSPO przy użyciu antysensowych nukleotydów zapobiega wywołanym przez NH_4Cl procesom: obrzmieniu komórek oraz wrażliwemu na CsA spadkowi $\Delta\psi_m$ [Panickar i wsp., 2007]. Obrzmienie astrocytów po amoniaku, które zazwyczaj wiąże się z dysfunkcją mitochondriów (por. **rozdz. II.2.4**), spada również w efekcie traktowania antagonistą TSPO, PK11195, natomiast rośnie po podaniu agonistów tego receptora oraz neurosteroidów [Bender i Norenberg, 1998]. Dane te sugerują, że aktywacja TSPO w warunkach hiperamonemii może przyczyniać się do dysfunkcji mitochondriów i do powiązanych z nią zjawisk, takich jak obrzmienie astrocytów.

W OUN, w HE, obserwuje się wzrost zawartości tryptofanu (Trp), który jest prekursorem neuroprzekaźnika, serotoniny (5-HT) [Young i wsp., 1975]. Zjawisko to jest efektem stymulacji antyportu Trp/Gln wskutek wzrostu zawartości Gln w mózgu w tych warunkach (por. **rozdz. II.2.3**), co zaobserwowano na modelu BBB *in vitro* – mikronaczyniach izolowanych z mózgów szczurów z chroniczną HE wywołaną PCS [Cangiano i wsp., 1983], lub z ostrą HE indukowaną podaniem TAA [Hilgier i wsp., 1992]. W encefalopatii wątrobowej zmienia się również zagęszczenie receptorów serotonergicznych na błonach komórkowych neuronów. W mózgach pobranych od pacjentów zmarłych w wyniku marskości wątroby stwierdzono spadek wiązania ligandów dla receptora 5HT1A oraz wzrost dla receptora 5HT2 [Raghavendra Rao i wsp., 1994]. Zaobserwowano również zwiększenie zawartości metabolitu 5HT, kwasu 5-hydroksyindolooctowego w CSF u pacjentów z marskością [Young i wsp., 1975] oraz w mózgach szczurów z PCS [Bengtsson i wsp., 1991]. Zjawisko to jest efektem pobudzenia reakcji utleniania 5HT przez oksydazę monoaminową typu A (MAO_A). Wzrost aktywności tego enzymu stwierdzono w mózgach chorych zmarłych w przebiegu chronicznej HE (tu również zaobserwowano nadekspresję MAO_A) [Mousseau i wsp., 1997], oraz w mózgach szczurów po podaniu CH_3COONH_4 [Kosenko i wsp., 2003]. Nadaktywacja MAO_A może wiązać się z degradacją innych monoamin, które są substratami tego enzymu. W mózgach pobranych *post mortem* od chorych na marskość wątroby, oraz w mózgach szczurów z PCS stwierdzono podwyższony poziom kwasu homowanilinowego (HVA), metabolitu dopaminy (DA) [Bergeron i wsp., 1995]. Natomiast w mikrodializatach z prążkowia szczurów z ostrą HE, stężenie HVA było obniżone w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [Borkowska i wsp., 1999], za to wykazano

http://rcin.org.pl

wzrost stężenia pośredniego produktu degradacji DA do HVA, kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego [Deshpande i wsp., 2007].

Dysfunkcja neuroprzekaźnictwa monoaminergicznego może wiązać się z niektórymi obserwowanymi w przebiegu HE objawami neuropsychologicznymi i behawioralnymi, takimi jak zaburzenia świadomości i uwagi, upośledzenie funkcji intelektualnych, zmiany rytmu snu i czuwania, czy zaburzenia lokomotoryczne [Bengtsson i wsp., 1985; Cauli i wsp., 2007]. Zaobserwowano, że zastosowanie inhibitora receptorów serotonergicznych znacząco poprawia aktywność motoryczną szczurów wykazujących objawy typowe dla II i III stadium HE po potraktowaniu TAA [Yurdaydin i wsp., 1996].

W HE obserwuje się również zmiany w aktywności innych systemów neuroprzekaźnikowych w OUN, m.in. układu noradrenergicznego [Michalak i wsp., 2001], opioidowego [Bergasa i wsp., 2002], czy glutaminianergicznego z udziałem receptorów metabotropowych [Cauli i wsp., 2006]. Mimo, że zaburzenia w ich funkcjonowaniu są znacznie słabiej poznane niż te dotyczące opisanych powyżej układów, nie ulega wątpliwości, że przyczyniają się one do ogólnego obrazu HE.

II.2.7. Stres oksydacyjny w encefalopatii wątrobowej

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących stresu oksydacyjnego obserwowanego w warunkach hiperamonemii. Inkubacja astrocytów pierwotnych z chlorkiem amonu powoduje produkcję reaktywnych cząsteczek tlenowych (ROS) w sposób zależny od użytego stężenia NH_4Cl [Murthy i wsp., 2001]. Również w badaniach na szczurach obserwuje się oznaki stresu oksydacyjnego: podanie NH_4Cl przez sondę mikrodializacyjną bezpośrednio do prążkowia skutkuje wzrostem zawartości rodnika wodorotlenowego w mikrodializatach [Hilgier i wsp., 2003], a podanie dootrzewnowo octanu amonu dwukrotnie zwiększa produkcję nadtlenków w mózgu [Kosenko i wsp., 1997].

Stres oksydacyjny w hiperamonemii wydaje się być ściśle powiązany ze zwiększonym astrocytarnym metabolizmem Gln (por. **rozdz. II.2.3**). Podanie tego aminokwasu nie powoduje żadnych zmian w poziomie wolnych rodników w hodowlach pierwotnych neuronów, wywołuje natomiast silny stres oksydacyjny w astrocytach pierwotnych. Zjawisku temu zapobiegają DON (inhibitor PAG) oraz CsA (inhibitor MPT), co świadczyć może o tym, że stres oksydacyjny spowodowany przez Gln jest efektem indukcji MPT przez wzmożoną aktywność PAG (por. **rozdz. II.2.3**) [Jayakumar i wsp., 2004]. Znaczenie tego mechanizmu w neurotoksyczności amoniaku ukazują badania, w których zaobserwowano, że wywołana jonami

http://rcin.org.pl

amonowymi produkcja ROS może być zahamowana przez zablokowanie pobierania Gln do mitochondriów w astrocytach pierwotnych [Pichili i wsp., 2007].

Nadprodukcja ROS może przyczyniać się do wzrostu objętości astrocytów: w obecności różnych antyoksydantów obrzmienie astrocytów pierwotnych wywołane jonami amonowymi jest znacznie obniżone [Jayakumar i wsp., 2006b]. Zjawisko to zaobserwowano również w mózgach szczurów – podawanie przeciwutleniacza, C-fikocyjaniny wraz z TAA, powodowało, obok spadku peroksydacji lipidów, również znaczne zmniejszenie objawów obrzmienia astrocytów w obrazie ultrastrukturalnym różnych ośrodków w mózgu w porównaniu ze zwierzętami, które otrzymywały sam TAA [Sathyasaikumar i wsp., 2007a].

Nieco inne wyniki pochodzą z badań dotyczących powiązań stresu oksydacyjnego z pobudzeniem szlaku NMDAr → NO → cGMP (por. **rozdz. II.2.6**). Wykazano, że MK-801, antagonista NMDAr, zapobiega obserwowanym po podaniu CH_3COONH_4 w mózgach szczurów zmianom, takim jak: spadek aktywności enzymów związanych usuwaniem wolnych rodników, wzrost zawartości nadtlenków, czy zwiększona peroksydacja lipidów [Kosenko i wsp., 1999]. Zahamowanie aktywności NOS przynosi podobne efekty u szczurów [Kosenko i wsp., 1998], a także blokuje nadprodukcję wolnych rodników wywoływaną podaniem Gln do hodowli pierwotnych astrocytów [Jayakumar i wsp., 2004]. Pobudzenie produkcji NO w hiperamonemii w połączeniu z nadprodukcją ROS skutkuje zwiększonym wytwarzaniem reaktywnych form azotu. Efektem takiego stresu nitrozacyjnego może być wzrost nitrozylacji reszt tyrozylowych białek, który obserwuje się w hodowlach pierwotnych astrocytów po inkubacji z amoniakiem. Proces ten można zahamować blokując szlak NMDAr → NO → cGMP, przy użyciu MK-801 lub nArg. Do białek, w których stwierdza się zwiększoną nitrozylację reszt tyrozylowych należą m.in. GS oraz TSPO, co może stanowić przyczynę zmian ich aktywności w warunkach hiperamonemii [Schliess i wsp., 2002].

Przedstawione powyżej dane świadczą o istotnej roli, jaką odgrywa nadprodukcja ROS w patogenezie HE, zwłaszcza w jej ostrym przebiegu. Amoniak, przyspieszając metabolizm Gln, a także pobudzając szlak NMDAr → NO → cGMP, wywołuje dysfunkcję mitochondriów, co skutkuje stresem oksydacyjnym i obrzmieniem astrocytów, a to z kolei stanowi przyczynę obrzęku mózgu i może prowadzić do śmierci. Jednak ten mechanizm nie musi działać jednokierunkowo. Wykazano np. że zastosowanie przeciwutleniaczy zapobiega spadkowi $\Delta\psi_m$ wywoływanemu w astrocytach pierwotnych poprzez inkubację z NH_4Cl [Rama Rao i wsp., 2005c], co wskazuje, że MPT może być nie tylko przyczyną ale też skutkiem stresu oksydacyjnego i potwierdza przypuszczenie, że poszczególne zjawiska

http://rcin.org.pl

obserwowane w tak złożonym schorzeniu jakim jest HE, mogą się wzajemnie stymulować.

II.2.8. Terapia w encefalopatii wątrobowej

W ostrej niewydolności wątroby jedyną skuteczną metodą terapeutyczną jest przeszczep tego narządu. Po tym zabiegu przeżywalność wynosi około 80% [Ascher i wsp., 1993; Bismuth i wsp., 1996]. Jednak, spośród pacjentów zakwalifikowanych do transplantacji, około 30% umiera przed jej wykonaniem, najczęściej na skutek wgłobienia mózgu spowodowanego szybko postępującym obrzękiem [Ascher i wsp., 1993]. W świetle tych danych czynniki zmniejszające obrzęk mózgu są najważniejszym składnikiem terapii u osób oczekujących na przeszczep wątroby. Do tego typu czynników należą takie substancje jak mannitol [Stravitz i wsp., 2007], czy tiopenton [Forbes i wsp., 1989]. Najbardziej obiecującą metodą ograniczania obrzęku wydaje się jednak hipotermia. Pierwsze doniesienia o skuteczności tego środka pochodzą z badań na hepatektomizowanych szczurach, gdzie wykazano zwiększoną przeżywalność zwierząt po obniżeniu temperatury ich ciała z 37,5^{O}C do 35,5^{O}C [Peignoux i wsp., 1982]. Zaobserwowano również, że hipotermia zmniejsza obrzęk mózgu i powoduje spadek ICP u szczurów z ostrą HE [Bélanger i wsp., 2005]. Próby zastosowania tej metody u pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby dały pozytywne rezultaty. Obniżenie temperatury ciała do 32°C – 33°C przez 10 – 118 godzin, spowodowało, że do operacji przeżyło 17 spośród 18 pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby. Hipotermia powodowała u nich wyraźny spadek takich parametrów jak: zawartość amoniaku we krwi, pobieranie go do mózgu, oznaki stresu oksydacyjnego w OUN, ICP, czy mózgowy przepływ krwi. Mechanizm działania hipotermii nie jest poznany, choć przypuszcza się, że opiera się on na spowolnieniu krążenia systemowego i obniżeniu ogólnego metabolizmu, co może skutkować zmniejszonym pobieraniem amoniaku i spadkiem jego metabolizmu w OUN [Jalan i wsp., 1999]. Obniżanie temperatury ciała wydaje się być bezpiecznym i nie powodującym ubocznych skutków sposobem zapobiegania nadmiernemu obrzękowi mózgu i może stać się rutynową metodą kliniczną, znajdującą zastosowanie u pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby.

W przypadku przewlekłej encefalopatii wątrobowej terapia sprowadza się przede wszystkim do zmniejszania stężenia amoniaku we krwi, a co za tym idzie w mózgu, co próbuje się osiągnąć poprzez wywołanie spadku produkcji lub wzrostu usuwania tego związku z organizmu. Nieznaczny spadek produkcji można

http://rcin.org.pl

zaobserwować po zmniejszeniu w diecie do minimalnego poziomu (1-2 g/kg), zawartości białek, które są istotnym źródłem amoniaku w organizmie (por. **rozdz. II.1**) [Swart i wsp., 1988]. Nie mniej znaczącym źródłem NH_4^+ jest metabolizm bakterii jelitowych (por. **rozdz. II.1**), wobec czego podejmuje się próby zmniejszenia ich ilości poprzez m.in. mechaniczne oczyszczanie okrężnicy [Wolpert i wsp., 1970], czy podawanie antybiotyków, np. neomycyny [Wolpert i wsp., 1970] lub ryfaksyminy [Williams i wsp., 2000]. Używa się również środków, takich jak laktuloza, które powodują, że bakterie zmieniają metabolizm i uwalniają mniej amoniaku [Watanabe i wsp., 1997]. Wydajność usuwania NH_4^+ z organizmu można zwiększyć, stosując ornitynę (Orn), zazwyczaj w połączeniu z innym czynnikiem, co pobudza syntezę Gln w mięśniach szkieletowych i ewentualnie szczątkowy cykl ornitynowy w wątrobie. Asparaginian ornityny podany pacjentom cierpiącym na marskość wątroby powoduje spadek amoniaku we krwi, poprawia wyniki testów psychometrycznych i zapis EEG [Poo i wsp., 2006]. Najnowszym preparatem z tej grupy jest fenylooctan ornityny, którego działanie opiera się na stymulowaniu syntezy Gln w mięśniach przez Orn, a następnie acetylacji powstającej Gln do fenyloacetyloglutaminy, która jest usuwana przez nerki wraz z moczem [Jalan i wsp., 2007]. Jednak, jak dotąd nie opracowano terapii, która pozwalałaby, bez wywoływania poważnych skutków ubocznych, na trwałe obniżenie amoniaku we krwi do wartości nie powodujących zaburzeń w funkcjonowaniu OUN u pacjentów chorujących na encefalopatię wątrobową.

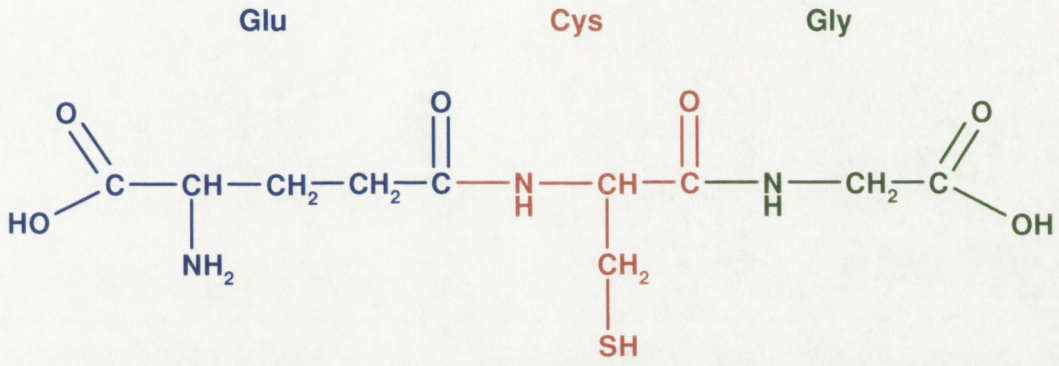
II.3. Glutation

Glutation, czyli γ-glutamylocysteinyloglicyna (γGluCysGly) (**rys. II.3**) jest niebiałkowym związkiem tiolowym, powszechnie występującym w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Jego stężenie u ssaków wynosi w mózgu 2-3 mmol/l [Slivka i wsp., 1987], a w CSF – 0,2-5 μmol/l [Anderson i wsp., 1989]. Zawartość tego związku w hodowlach pierwotnych astrocytów (8 - 20 mmol/l) jest wyższa niż w hodowlach pierwotnych neuronów (0,25 - 10 mmol/l) [Raps i wsp., 1989; Pileblad i wsp., 1991], co jednak może nie mieć przełożenia na warunki *in vivo*, ze względu na znacząco ograniczoną dostępność prekursorów dla neuronalnej syntezy glutationu w hodowlach komórkowych (por. **rozdz. II.3.2**).

W komórkach, w warunkach fizjologicznych, glutation występuje przede wszystkim (~99%) w zredukowanej formie tiolowej (GSH). Pozostałe 1% przypada na utlenioną, symetryczną formę dwusiarczkową (GSSG), oraz na śladowe ilości mieszanych dwusiarczków z różnymi tiolami lub białkami, a także tioetery i inne

http://rcin.org.pl

koniugaty [Orrenius i Moldeus 1984; Slivka i wsp., 1987; Wang i Ballatori 1998]. Przedziałami charakteryzującymi się najwyższą zawartością glutationu w komórce są cytosol (~90%) oraz mitochondria (~10%) [Huang i Philbert, 1995].



Rys. II.3. Wzór strukturalny glutationu

II.3.1. Metabolizm glutationu

Synteza glutationu przebiega w cytosolu wszystkich komórek i jest procesem obejmującym dwie reakcje katalizowane przez dwa enzymy zależne od ATP [Meister i Anderson, 1984]. Pierwszy z nich, ligaza glutaminianowo-cysteinowa (GCL; do niedawna znana jako syntetaza γ-glutamylocysteinowa) katalizuje wytworzenie wiązania między grupa γ-karboksylową Glu a grupą aminową Cys:

$$Glu + Cys + ATP \rightarrow \gamma GluCys + ADP + P_i$$

Enzym ten w formie natywnej składa się dwóch podjednostek: ciężkiej (GCL-HS) oraz lekkiej (GCL-LS). Aktywność katalityczną i wrażliwość na czynniki ją regulujące przejawia GCL-HS. Natomiast GCL-LS, mimo, że jest enzymatycznie nieaktywna, zapewnia holoenzymowi większą wydajność, ponieważ jej asocjacja z podjednostką ciężką obniża K_m wobec Glu. [Seelig i wsp., 1984]. Kolejny etap, kondensacja γGluCys z Gly zachodzi przy udziale syntetazy glutationowej:

$$\gamma GluCys + Gly + ATP \rightarrow GSH + ADP + P_i$$

Proces syntezy glutationu regulowany jest na etapie reakcji katalizowanej przez GCL. Enzym ten jest hamowany na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez GSH [Huang i wsp., 1988], a jego aktywność może być regulowana na poziomie ekspresji GCL-HS przez wiele czynników, m.in. stres oksydacyjny (por. **rozdz. II.3.4**), stres nitrozacyjny [Burdo i wsp., 2007], czy hormony i neuroprzekaźniki [Dasgupta i wsp., 2007; Madrigal i wsp., 2007]. Największe znaczenie ma jednak

http://rcin.org.pl

dostępność cysteiny, której zawartość w komórce jest najniższa spośród trzech prekursorowych aminokwasów glutationu (por. **rozdz. II.3.1**). Drugi etap syntezy GSH, reakcja katalizowana przez syntetazę glutationową, nie podlega regulacji.

Wiązanie γ-peptydowe między Glu a Cys zapobiega degradacji cząsteczki glutationu przez wewnątrzkomórkowe peptydazy. Jedynym enzymem, który posiada zdolność hydrolizy tego wiązania jest γ-glutamylotransferaza (γGT), która przenosi resztę γ-glutamylową na inny aminokwas (AA), lub cząsteczkę wody:

$$GSH + AA / H_2O \rightarrow \gamma GluAA / Glu + CysGly$$

Drugim etapem degradacji glutationu jest hydroliza CysGly przez dipeptydazę cysteinylo-glicynową:

$$CysGly \rightarrow Cys + Gly$$

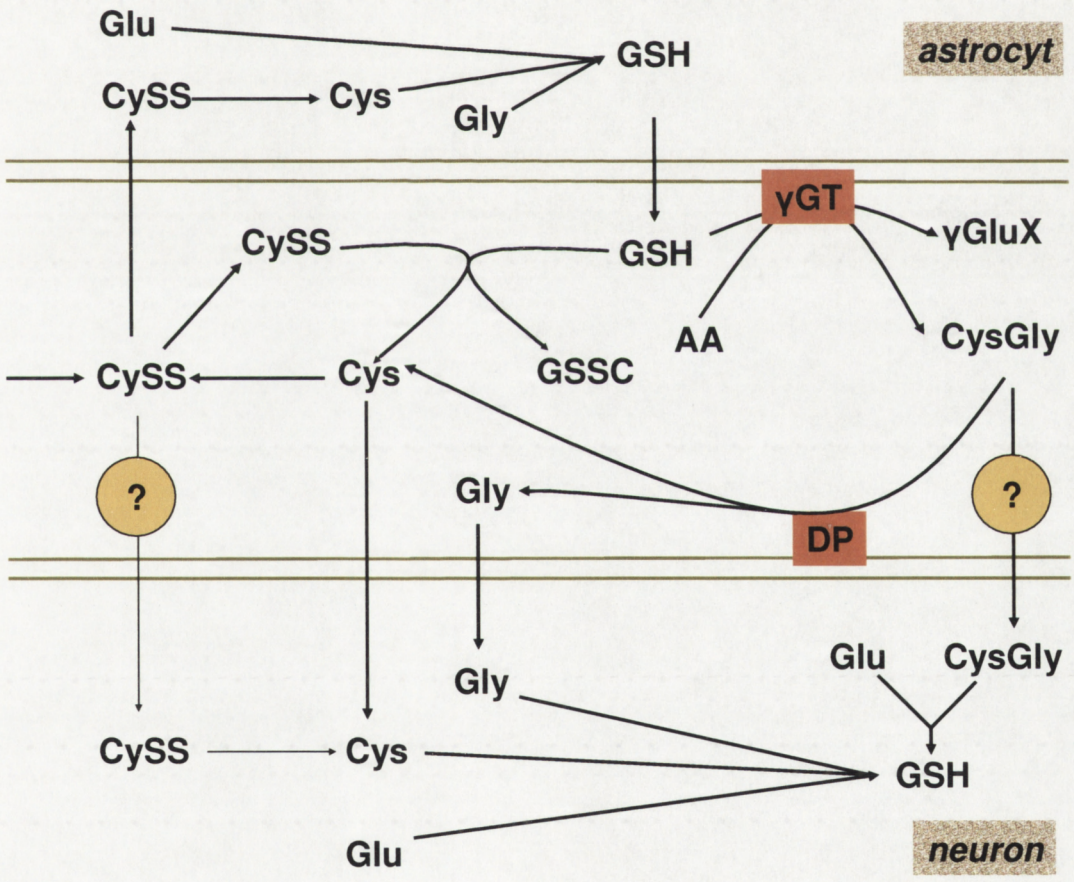
Enzymy te zlokalizowane są po zewnętrznej stronie błony komórkowej. W OUN γGT występuje przede wszystkim na powierzchni komórek endotelialnych i pericytów naczyń włosowatych oraz na stopkach astrocytarnych przylegających do tych naczyń [Zhang i wsp., 1997]. Wobec zewnątrzkomórkowej aktywności enzymów degradujących, GSH, aby mógł ulec hydrolizie, musi zostać uwolniony z komórki. Za proces ten odpowiedzialne są niektóre spośród tzw. białek oporności wielolekowej (MRP). Te zależne od ATP białka, obok wielu innych substratów, mogą transportować GSH, GSSG oraz koniugaty glutationowe. W OUN najważniejszą rolę w tym procesie wydaje się pełnić transporter MRP-1, którego obecność wykazano w mózgach myszy i człowieka, oraz w hodowlach pierwotnych astrocytów [Nies i wsp., 2004; Hirrlinger i wsp., 2005; Minich i wsp., 2006]. Eksport GSH z astrocytów odgrywa niezwykle istotną rolę w dostarczaniu prekursorów do neuronalnej syntezy GSH (por. **rozdz. II.3.3**). Usuwanie GSSG z komórek może natomiast przyczyniać się do zapobiegania spadkowi glutationowego stanu redoks (por. **rozdz. II.3.4**).

II.3.2. Interakcje między astrocytami a neuronami w metabolizmie glutationu w OUN

Cys jest kluczowym aminokwasem w syntezie GSH [Meister, 1991], jednak jej zawartość w komórkach jest bardzo niska, wobec czego do utrzymania homeostazy glutationu niezbędny jest jej wydajny transport. Znaczną większość zewnątrzkomórkowej puli Cys stanowi jej utleniona, dwusiarczkowa forma, cystyna (CySS) [Sagara i wsp., 1993]. Zależnie od typu komórki, aminokwas ten może być

http://rcin.org.pl

pobierany w formie zredukowanej lub też utlenionej [Bannai, 1984], i tak, badając transport prekursorów syntezy GSH w hodowlach komórek OUN stwierdzono, że astrocyty pobierają przede wszystkim CySS [Kranich i wsp., 1996; Koyama i wsp., 2000], zaś neurony przede wszystkim Cys, lub dipeptyd CysGly [Kranich i wsp., 1996; Himi i wsp., 2003]. Ze względu na brak cysteiny, a obecność cystyny w standardowych pożywkach do hodowli komórkowych, a w przypadku uzupełnienia pożywki cysteiną, z powodu szybkiego jej utleniania do CySS, synteza GSH w neuronach *in vitro* zachodzi ze znacznie mniejszą wydajnością niż w astrocytach [Raps i wsp., 1989; Pileblad i wsp., 1991]. Jednak już w mieszanych hodowlach astrocytarno-neuronalnych, poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w neuronach jest znacznie wyższy niż w czystych hodowlach neuronów [Rathinam i wsp., 2006].



Rys. II.4. Interakcje między astrocytem a neuronem w syntezie glutationu

Jak wykazano, astrocyty, uwalniając GSH, dostarczają prekursory do neuronalnej syntezy tego związku. Zaproponowano dwie hipotezy wyjaśniające mechanizm tego zjawiska. Pierwsza zakłada, że astrocyty transportują GSH do przestrzeni pozakomórkowej, po czym, poprzez aktywność γGT i dipeptydazy (por. **rozdz.**

http://rcin.org.pl

II.3.1), rozkładają go, a uwolniona z niego Cys jest pobierana do neuronów i tam wykorzystywana do syntezy glutationu. Wskazuje na to spostrzeżenie, że potraktowanie mieszanych hodowli astrocytarno-neuronalnych acywicyną, inhibitorem γGT, powoduje spadek wewnątrzkomórkowej zawartości GSH w neuronach, chociaż nie wpływa na poziom tego związku w astrocytach. Jest bardzo prawdopodobne, że również pośredni metabolit w degradacji GSH, dipeptyd CysGly może być transportowany do neuronów i w nich hydrolizowany. [Dringen i wsp., 1999]. Druga hipoteza wskazuje na ograniczone występowanie γGT w OUN, gdzie stwierdza się obecność tego enzymu głównie na stopkach naczyniowych, co może znacznie zmniejszać dostępność uwolnionych tam prekursorów dla neuronalnej syntezy glutationu. W zamian zaproponowano mechanizm oparty na spontanicznym utlenianiu zewnątrzkomórkowej CySS przez uwolniony z astrocytów GSH, w efekcie czego powstaje mieszany dwusiarczek glutationowo-cysteinowy (GSSC) oraz Cys, która jest pobierana do neuronów [Wang i Cynader, 2000].

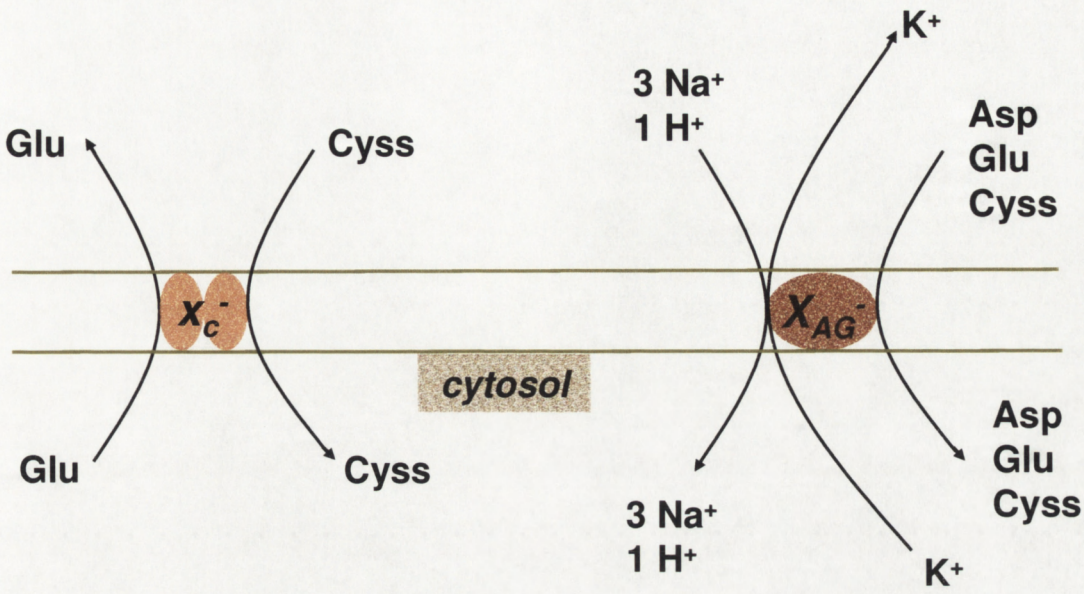
Interakcje pomiędzy astrocytem a neuronem w syntezie GSH, z uwzględnieniem obydwu opisanych mechanizmów przedstawiono na **rys. II. 4**.

II.3.3. Transport cystyny do astrocytów

Wobec opisanego w poprzednim rozdziale mechanizmu interakcji między komórkami OUN, podstawowym procesem regulującym metabolizm GSH w obu typach komórek jest transport cystyny do astrocytów. CySS może być pobierana przez komórki glejowe za pośrednictwem dwóch typów transporterów. Pierwszym z nich jest antyporter cystynowo-glutaminianowy x_c^-. Jest to heterodimer złożony z łańcucha lekkiego (xCT) oraz łańcucha ciężkiego (4F2hc) [Sato i wsp., 1999], przy czym wykazano, że koekspresja obydwu podjednostek jest niezbędna do jego aktywności [Bassi i wsp., 2001; Gochenauer i Robinson, 2001]. Transporter ten, działając zgodnie z gradientem stężeń, przenosi CySS do komórki (gdzie jej stężenie jest niskie, a stężenie Glu – wysokie), zaś Glu do przestrzeni pozakomórkowej (gdzie proporcja stężeń tych dwóch aminokwasów jest odwrotna) (**rys. II.5**) [Bannai i Kitamura, 1980]. Badania zależności antyportera x_c^- od jonów, wykazały, że jego aktywność jest częściowo zależna od Cl^- i całkowicie niezależna od Na^+ [Gochenauer i Robinson, 2001]. Zaobserwowano, że x_c^- odgrywa główną rolę w procesie transportu CySS do komórek Müllera w siatkówce [Kato i wsp., 1993], komórek glejaka szczurzego C6 [Mawatari i wsp., 1996], czy komórek gwiaździaka ludzkiego UC11 [Johnson i Johnson, 1993]. Dane dotyczące roli tego transportera w pobieraniu CySS przez astrocyty pierwotne są niejednoznaczne:

http://rcin.org.pl

wskazują na jego udział w tym procesie w zakresie od minimalnych wartości [Bender i wsp., 2000] do ~50% [Shanker i Aschner, 2001].



Rys. II.5. Transportery cystyny w komórkach OUN

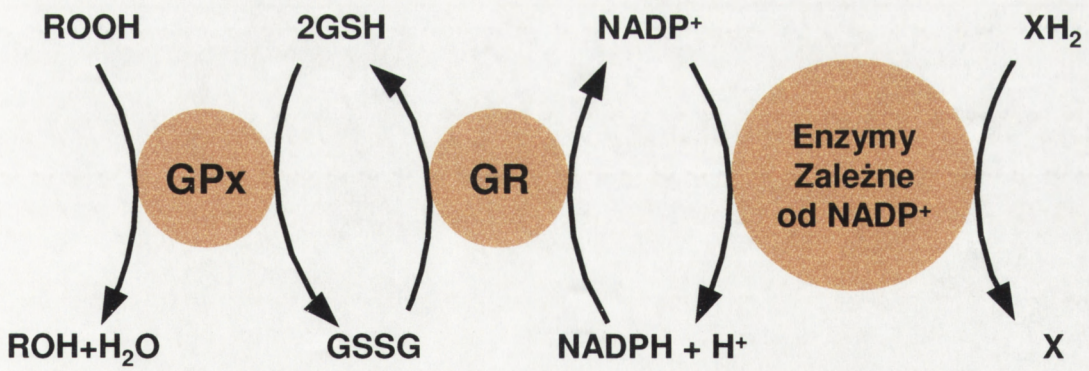
Drugim systemem transportującym cystynę w komórkach OUN są niektóre spośród wchodzących w skład rodziny X_{AG}^- transporterów EAAT. Białka te, obok swoich głównych substratów, Glu i Asp, mogą transportować do komórek również CySS. Ich aktywność jest ściśle uzależniona od jonów sodu: pobranie aminokwasu przez X_{AG}^- wiąże się z równoczesnym pobraniem do komórki trzech jonów Na^+ i jednego jonu H^+ oraz z uwolnieniem jednego jonu K^+ (**rys. II.5**). W OUN zlokalizowano 5 białek należących do rodziny EAAT (EAAT 1-5). W komórkach glejowych obserwuje się ekspresję dwóch z nich: EAAT1 (GLAST) oraz EAAT2 (GLT1) i uważa się że obydwa odpowiadają za pobieranie cystyny [Ye i wsp., 1999]. Dwa kolejne, EAAT3 (EAAC1) oraz EAAT4 zlokalizowane są w neuronach i prawdopodobnie nie wykazują zdolności do transportu CySS [Kanai i Hediger, 1992]. Lokalizacja ostatniego (EAAT5) ogranicza się do siatkówki [Wersinger i wsp., 2006]. W niektórych typach komórek transportery X_{AG}^- mogą mieć większe znaczenie w procesie pobierania cystyny niż antyporter x_c^-. W astrocytach pierwotnych GLT1 i GLAST odpowiadają za 50% [Shanker i Aschner, 2001] do 90% całkowitego transportu CySS [Bender i wsp., 2000].

II.3.4. Rola glutationu

Glutation poprzez wysoce reaktywna grupą tiolową, może brać udział w reakcjach utleniania i redukcji [Meister i Anderson, 1984]. Ten element struktury

http://rcin.org.pl

pozwala glutationowi pełnić rolę głównego komórkowego przeciwutleniacza. Redukcja H_2O_2, wolnych rodników, oraz nadtlenków organicznych zachodzi dzięki aktywności peroksydazy glutationowej (GPx), która równocześnie utlenia GSH do GSSG. Enzym ten zlokalizowany jest w cytosolu oraz mitochondriach [Huang i Philbert, 1995]. Utleniona forma glutationu jest następnie redukowana z powrotem do GSH przez zależny od NADPH enzym, reduktazę glutationową (GR) (**rys. II.6**) Cohen i Hochstein, 1963]. Aktywność GR pozwala na utrzymanie stanu redoks glutationu (czyli stosunku GSH/GSSG) na wysokim poziomie. Spadek stosunku GSH/GSSG może być efektem stresu oksydacyjnego, zjawiska, w którym nadmiar ROS skutkuje na tyle dużym zwiększeniem utleniania GSH, że GR nie jest w stanie tego zrekompensować poprzez równie szybką redukcję GSSG [Liddell i wsp., 2006a]. Aby system glutationowy mógł skuteczniej funkcjonować w takich warunkach, komórka może uruchamiać różne mechanizmy przeciwdziałające spadkowi glutationowego potencjału redoks. Wykazano m.in., że w komórkach glejowych, stres oksydacyjny pobudza ekspresję xCT [Shih i wsp., 2006], oraz GCL-HS [Shih i wsp., 2003; Aguirre i wsp., 2007], a także zwiększa wypływ GSSG [Hirrlinger i Dringen, 2005].



Rys. II.6. Glutationowy cykl redoks

Kolejną istotną funkcją glutationu jest wytwarzanie koniugatów ze związkami elektrofilowymi. Reakcje te są katalizowane przez specyficzne enzymy, S-transferazy glutationowe. Proces ten usprawnia transport różnych związków przez błony - ma m.in. istotne znaczenie w usuwaniu ksenobiotyków z komórki [Orrenius i Moldeus, 1984]. Glutation bierze również udział w apoptozie [Hall, 1999], a także w neuroprzekaźnictwie i neuromodulacji [Guo i wsp., 1992], jednak te funkcje są jak dotąd słabo poznane.

http://rcin.org.pl

III. CEL PRACY

W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się na stres oksydacyjny jako istotny czynnik w patogenezie wielu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, m.in. choroby Alzheimera, czy choroby Parkinsona. Również w przypadku encefalopatii wątrobowej, nadprodukcja reaktywnych cząsteczek tlenowych w wyniku oddziaływania wysokich stężeń amoniaku na komórki mózgu, wymieniana jest coraz częściej jako jedno ze zjawisk leżących u podstaw licznych zaburzeń obserwowanych w tej chorobie. W warunkach stresu oksydacyjnego wielokrotnie wykazywano zdolność komórek do aktywowania metabolizmu różnych przeciwutleniaczy. Murthy i wsp. zaobserwowali wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości jednego z najważniejszych komórkowych antyoksydantów, glutationu, w hodowlach pierwotnych astrocytów traktowanych NH_4Cl, co wskazuje na aktywację systemu glutationowego w takich warunkach [Murthy i wsp., 2000].

Celem niniejszej pracy było określenie zmian zachodzących w metabolizmie glutationu pod wpływem bezpośredniego działania amoniaku na komórki. Badania prowadzono w warunkach *in vivo* przy użyciu metody mikrodializy, a także *in vitro*, na hodowlach pierwotnych neuronów i na dwóch modelach komórek glejowych – hodowlach pierwotnych astrocytów oraz hodowlach linii glejaka C6. Postawiono następujące pytania:

- czy podanie NH_4Cl bezpośrednio do prążkowia lub kory przedczołowej szczura przez sondę mikrodializacyjną skutkuje zmianą zawartości glutationu w pobieranych mikrodializatach?
- czy inkubacja neuronów pierwotnych, astrocytów pierwotnych oraz komórek linii glejaka C6 z NH_4Cl powoduje zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości i stopnia utlenienia glutationu?
- czy zmianom zawartości glutationu w komórkach glejowych pod wpływem amoniaku towarzyszą zmiany szybkości transportu jego kluczowego prekursora, cystyny?
- czy zmiany zawartości glutationu w komórkach glejowych w takich warunkach mogą wynikać ze zmienionej ekspresji genów związanych z metabolizmem tego związku?
- czy zmieniony metabolizm glutationu w komórkach glejowych może skutkować zmianą dostępności prekursorów do neuronalnej syntezy GSH?

http://rcin.org.pl

IV. MATERIAŁY I METODY

IV.I. Odczynniki

Do doświadczeń użyto następujących odczynników:

db-cAMP, BME, Gln, arabinozyd cytozyny, BSO, GEE, DTT, czteroboran sodu, GSH, DTNB, GR, NADPH, 2-VP, GSSG, HEPES, chlorek choliny, CySS zimna, HCysA, l-trans-PDC, MTT, SDS, TRI Reagent, chloroform, izopropanol, DEPC, dNTP, agaroza, błękit Coomassie (firma Sigma-Aldrich; St. Louis, USA); NaCl, CaCl2, $MgCl_2$, KH_2PO_4, $NaHCO_3$, Na_2SO_4, Glc, NH_4Cl, K_2HPO_4, NaOH, PCA, H_3BO_3 (firma POCh; Gliwice, Polska); DMEM, FBS, streptomycyna + penicylina (firma Gibco; Carlsbad, USA); zestaw do PCR: bufor + Taq + MgCl2; drabinka DNA, barwnik do elektroforezy (firma Fermentas; Burlington, Kanada); OPA, SSA (firma Merck; Whitehouse Station, USA); PBS, Superscript II (firma Invitrogen; Carlsbad, USA); oligo(dT_{12-18}), EtBr (firma Promega Corporation; Madison, USA); Narcotan (firma Zentiva; Praga, Czechy); KCl (firma Standard; Lublin, Polska); fluorooctan sodu (firma Riedel – de Haën; Seelze, Niemcy); β-merkaptoetanol (firma Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Niemcy); metanol (firma LabScan Analytical Sciences; Dublin, Irlandia); EDTA (firma BDH Chemicals Ltd.; Poole, Wielka Brytania); [^{14}C]CySS (firma ARC Inc.; Saint Louis, USA); Insta-Gel Plus (firma Perkin Elmer Inc.; Boston, USA); etanol (firma Eurochem BGD; Tarnów, Polska); startery do PCR (oligo IBB; Warszawa, Polska); Tris (firma Fluka; St. Gallen, Szwajcaria); Triton X-100 (Serva; Heidelberg, Niemcy); zestaw do G6PDH, zestaw do γGT (Pointe Scientific; Canton, USA); H_3PO_4 (firma Lach-Ner; Neratovice, Czechy); albumina (firma BDH Chemicals Ltd.; Poole, Wielka Brytania); BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rockford, USA).

IV.2. Mikrodializa prążkowia i kory przedczołowej mózgu szczura *in vivo*

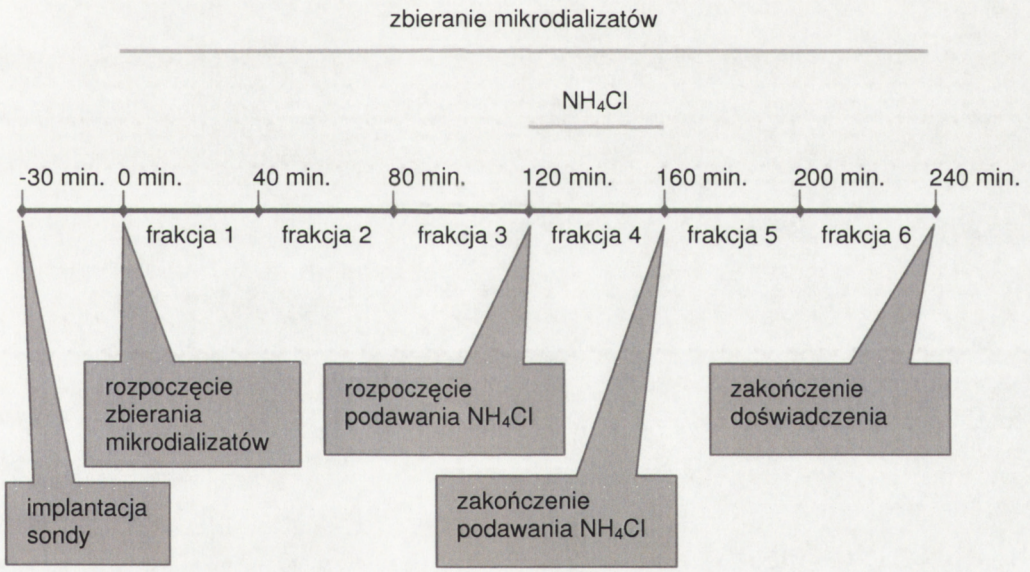
Eksperymenty *in vivo* z wykorzystaniem metody mikrodializy były przeprowadzane zgodnie z ustawą z dnia 21 stycznia 2005 o doświadczeniach na zwierzętach. Osoby biorące w nich udział posiadały zezwolenia na wykonywanie eksperymentów na zwierzętach, a przebieg tych doświadczeń oraz liczba użytych w nich szczurów były zaakceptowane przez I lokalną komisję etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie. Do badań używano dorosłych (230 -

http://rcin.org.pl

250 g) samców szczurów rasy Sprague-Dawley. Zwierzęta były losowo przyporządkowywane do grupy kontrolnej oraz grup eksperymentalnych. Szczury poddawano wstępnemu znieczuleniu w zamkniętym pojemniku, do którego przez 2 min., przy użyciu parownika Vapor (firma Dräger; Lubeka, Niemcy), dostarczano 4% narcotan w powietrzu. Następnie zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym (firma TSE Systems; Bad Homburg, Niemcy) i utrzymywano w znieczuleniu ogólnym przez cały czas trwania doświadczenia, podając 1% narcotan w powietrzu z prędkością 1,2 l/min. Temperaturę ciała szczura na poziomie 37,5^{O}C podtrzymywano za pomocą termostatu TempControl II (firma TSE Systems; Bad Homburg, Niemcy) wyposażonego w termometr rektalny i koc grzewczy, który znajdował się na aparacie stereotaktycznym, bezpośrednio pod zwierzęciem. Głębokość znieczulenia kontrolowano, obserwując reakcję szczura na bodziec mechaniczny. Po umieszczeniu zwierzęcia w aparacie przecinano skórę na środku głowy i odsłaniano powierzchnię czaszki. W czaszce, przy pomocy wiertła trepanacyjnego wiercono otwór, przez który wprowadzano sondę mikrodializacyjną CMA/12 (firma CMA Microdialysis AB; Sztokholm, Szwecja) o średnicy 0,5 mm, długości błony mikrodializacyjnej 3 mm i przepuszczalności 20 kDa, do struktur w lewej półkuli: prążkowia (koordynaty względem bregmy: AP +0,5 mm; ML -3,0 mm; DV -6,0 mm) lub kory przedczołowej (koordynaty względem bregmy: AP +3,2 mm; ML -0,6 mm; DV -3,0 mm) [Paxinos i Watson, 1982]. Przez sondę podawano, z prędkością 2,5 µl/min., uprzednio nasycony karbogenem (5% CO_2; 95% O_2) i przefiltrowany przez nitrocelulozowy filtr membranowy (0,45 µm; firma Millipore; Billerica, USA) sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (aCSF) o pH 7,4, w składzie: 10 mM glukoza; 126 mM NaCl; 27 mM $NaHCO_3$; 2,4 mM KCl; 0,5 mM Na_2SO_4; 0,5 mM KH_2PO_4; 1,1 mM $CaCl_2$; 0,8 mM $MgCl_2$. Do doświadczeń używano pompy mikrodializacyjnej CMA/102 (firma CMA Microdialysis AB; Sztokholm, Szwecja), strzykawek Exmire Microsyringe o pojemności 1 ml (firma ITO Corporation; Tokio, Japonia), oraz wężyków o pojemności 1,2 µl / 100 mm (firma CMA Microdialysis AB; Sztokholm, Szwecja). Po 30 min. od momentu zaimplantowania sondy rozpoczynano zbieranie mikrodializatów, w których następnie oznaczano poziom glutationu (por. **rozdz. IV.4.1**). Podczas pojedynczego doświadczenia zbierano 6 frakcji po 100 µl (każda frakcja była zbierana przez 40 min.; w sumie – 240 min.). Szczury z grupy kontrolnej otrzymywały czysty aCSF przez cały czas trwania mikrodializy. W doświadczeniach, w których hamowano syntezę i eksport glutationu z astrocytów, używano aCSF uzupełnionego 50 mM fluorooctanem (FA), który jest swoistym inhibitorem metabolizmu energetycznego komórek glejowych (Paulsen i wsp., 1987; Szerb, 1991; Hassel i wsp. 1997). Procedura superfuzji jonami

http://rcin.org.pl

amonowymi była następująca: w 120 min., czyli na początku 4-tej frakcji, przy użyciu ręcznego przełącznika CMA/110 (firma CMA Microdialysis AB; Sztokholm, Szwecja), zmieniano bufor na aCSF (lub aCSF z FA) zawierający 60 mM chlorek amonowy (NH_4Cl). Po 40 min., na końcu 4-tej frakcji przestawiano przełącznik z powrotem na czysty aCSF (lub aCSF z FA). Tak wysokie (60 mM) stężenie chlorku amonu stosowano ze względu na właściwości używanych w doświadczeniach sond mikrodializacyjnych, których współczynnik przepuszczalności dla amoniaku wynosił około 12, zatem stężenie tego związku, którym oddziaływano na badane struktury wynosiło około 5 mmol/l [Zielińska i wsp., 2002a]. Eksperymenty kończono po zebraniu 6-tej frakcji, próbki umieszczano w -20°C, natomiast szczury, po zdjęciu z aparatu stereotaktycznego, będąc nadal w znieczuleniu ogólnym, były dekapitowane i oddawane do utylizacji (firma Eco ABC; Bełchatów, Polska). Przebieg doświadczenia zilustrowany jest na **rys. IV.1**.



Rys. IV.1. Przebieg mikrodializy

IV.3. Hodowle komórkowe

IV.3.1 Hodowle pierwotne astrocytów korowych

Do doświadczeń *in vitro* używano pierwotnych hodowli astrocytów korowych wyprowadzonych z kory mózgowej 1-dniowych noworodków szczurów rasy Wistar. Hodowle prowadzono wg zmodyfikowanej metody Hertza i wsp. [1989]. Fragmenty kory przecierano kolejno przez nylonowe filtry o średnicach 80 μm i 41 μm (firma

http://rcin.org.pl

Millipore; Billerica, USA) do szalki Petriego, zawierającej pożywkę DMEM uzupełnioną 20% płodową surowicą bydlęcą (FBS), a także streptomycyną (50 µg/ml) oraz penicyliną (50 u/ml). Komórki były hodowane w inkubatorze (firma Kebo BioMed; Spånga, Szwecja) w atmosferze 10% CO_2, w temperaturze 37°C, na 35-mm szalkach (firma Nunc; Roskilde, Dania) lub 24-dołkowych płytkach hodowlanych (firma Costar; Corning, USA), w zagęszczeniu 2 x 10^5 komórek / cm^2. Pożywka była wymieniana dwa razy w tygodniu, przy czym obniżano w niej stopniowo zawartość FBS, dochodząc po dwóch tygodniach do 10%. Ponadto, na początku trzeciego od założenia hodowli, do pożywki dodawano 0,25 mM dibutyrylo-cAMP (db-cAMP), aby pobudzić morfologiczne różnicowanie się astrocytów. Doświadczenia prowadzono po 3-4-tygodniach od rozpoczęcia hodowli.

IV.3.2 Hodowle komórek glejaka szczurzego C6

Komórki glejaka C6 (firma American Type Culture Collection; Rockville, USA) były hodowane wg wskazań producenta na 35-mm szalkach lub 24-dołkowych płytkach hodowlanych. Doświadczenia prowadzono na nich po 3-6 dniach od wysiania.

IV.3.3. Hodowle pierwotne neuronów korowych

Hodowle pierwotne neuronów korowych prowadzono w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie. Komórki izolowano z kory mózgowej 1-dniowych noworodków szczurów rasy Sprague-Dawley i hodowano je w podłożu podstawowym Eagle'a (BME) uzupełnionym 10% FBS, 35 mM Glc, 1 mM Gln, a także streptomycyną (100 µg/ml) oraz penicyliną (100 u/ml). Hodowle były prowadzone w atmosferze 6,5% CO_2, w temperaturze 37°C, na 35-mm szalkach lub 96-dołkowych płytkach hodowlanych, w zagęszczeniu 1,5-2 x 10^5 komórek / cm^2. Aby zahamować proliferację komórek innych niż neurony, drugiego dnia po wysianiu, do pożywki dodawano 2,5 µM arabinozyd cytozyny. Doświadczenia prowadzono po 5 dniach od rozpoczęcia hodowli.

IV.3.4. Warunki inkubacji komórek z odczynnikami

Na 1-72 h przed planowanym zakończeniem hodowli, do pożywki, w której hodowano komórki, dodawano wodny roztwór chlorku amonu, w końcowym

http://rcin.org.pl

stężeniu 1-10 mmol/l. Dokładne stężenia NH_4Cl a także czas inkubacji komórek w tych warunkach podane są w legendach do poszczególnych rysunków (por. **rozdz. V**). Manipulacje wewnątrzkomórkową zawartością glutationu w neuronach prowadzono przy użyciu BSO (sulfoksyimina butioniny; inhibitor GCL) oraz GEE (ester etylowy glutationu; prekursor GSH). Roztwory wodne tych odczynników dodawano do pożywki na 24 h przed zakończeniem hodowli, w końcowym stężeniu 10 µmol/l (BSO) lub 3 mmol/l (GEE).

IV.4. Oznaczanie glutationu

Do oznaczeń glutationu stosowano dwie metody: metodę wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz metodę enzymatyczną. Wybór metody zależał od poziomu glutationu w danym rodzaju próbki. Jeżeli zawartość glutationu była wystarczająco wysoka, tak jak w komórkach pochodzących z hodowli *in vitro*, stosowano metodę enzymatyczną, która jest szybka i wygodna w użyciu. W przypadku próbek o niskiej zawartości glutationu (mikrodializaty, glutation zewnątrzkomórkowy w hodowlach *in vitro*) używano bardziej pracochłonnej i czasochłonnej, ale zarazem znacznie bardziej czułej metody HPLC. Szczegółowe procedury opisane są w następnych podrozdziałach.

IV.4.1. Oznaczanie glutationu w mikrodializatach

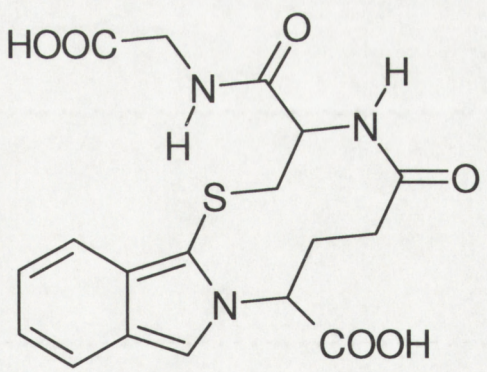
Stężenie glutationu w mikrodializatach mierzono za pomocą metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconym układem faz, z detekcją fluorymetryczną. Zastosowano procedurę opisaną przez Neuschwander'a-Tetri i Roll'a [1989], do której wprowadzono pewne modyfikacje.

Bezpośrednio przed oznaczaniem glutationu, próbki inkubowano przez 30 min. z 20 mM ditiotreitolem (DTT), w $4^{\circ}C$. DTT jest silnym odczynnikiem redukującym mostki dwusiarczkowe – inkubacja z nim powoduje przekształcenie wszystkich utlenionych form glutationu (GSSG, GSSC i innych mieszanych dwusiarczków glutation-tiol) w formę zredukowaną – GSH, co pozwala na oznaczenie całkowitej puli glutationu w próbce.

Do rozdziałów używano systemu złożonego z pompy P580 (firma Dionex; Sunnyvale, USA), autosamplera Gina 50 (firma Dionex; Sunnyvale, USA), kolumny ze złożem Hypersil Gold (firma Thermo Electron Co.; Waltham, USA), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (firma Dionex; Sunnyvale, USA). Glutation w próbkach był upochadniany w reakcji z dialdehydem orto-ftalowym (OPA). OPA

http://rcin.org.pl

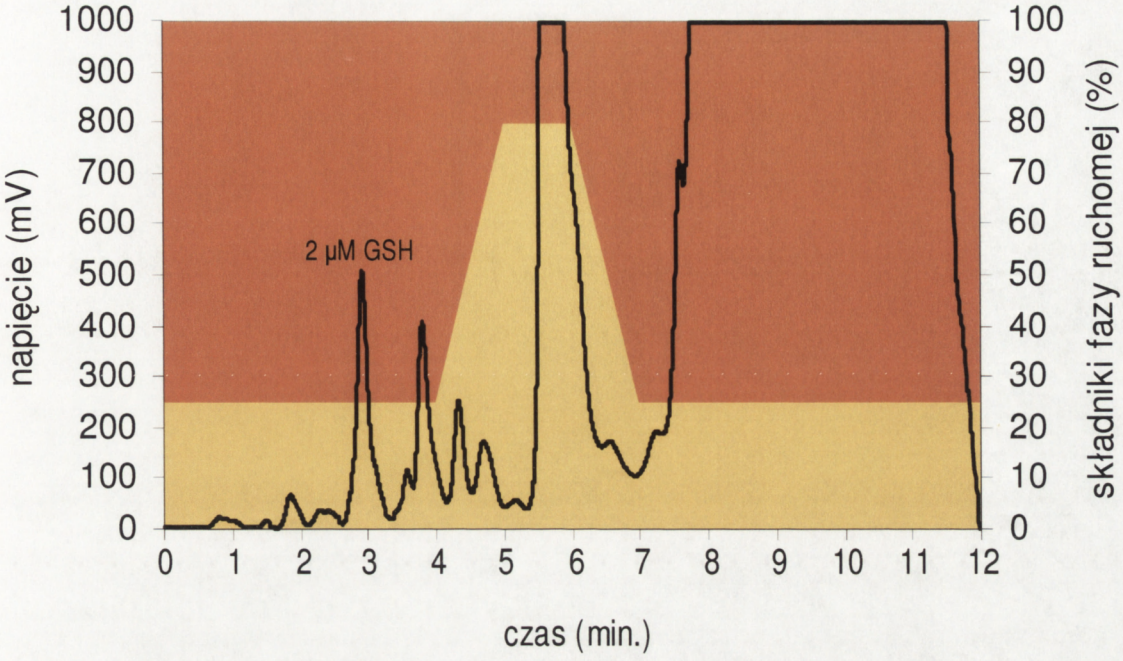
łączy się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dając fluorescencyjną pochodną (**rys. IV.2**). Reakcja ta przebiega z wysoką wydajnością w pH alkalicznym, w obecności β-merkaptoetanolu [Simons i Johnson, 1976]. Aby upochodnić GSH, przed każdym rozdziałem, do 100 µl próbki, dodawano przy pomocy autosamplera 100 µl 0,1 M buforu boranowego, pH 10,0, zawierającego 1,5 mM OPA oraz 0,25 % β-merkaptoetanol. Po 1 min. inkubacji, 150 µl upochodnionej próbki było nakładane na pętlę. Podczas rozdziału fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i 50 mM buforu fosforanowego (KH_2PO_4 / K_2HPO_4), pH 6,2. Elucję, przy prędkości 1,2 ml/min. prowadzono izokratycznie (25% MetOH / 75% bufor fosforanowy) do 4 min. Fluorymetrycznych pomiarów orto-ftalaldehydowej pochodnej glutationu dokonywano przy długościach fal detektora: wzbudzenia, λ_{ex}= 370 nm, oraz emisji λ_{em}= 450 nm. Pik dla glutationu przypadał na około 3-cią min. rozdziału. Następnie, aby przepłukać kolumnę przed kolejnym rozdziałem, od 4 do 5 min., zwiększano gradientowo udział metanolu w fazie ruchomej z 25% do 80%, po czym przez kolejną minutę prowadzono elucję w tych warunkach, a przez następną powracano do wyjściowego składu fazy ruchomej. Rozdział kończono po 12 min. od nałożenia próbki na pętlę.



Rys. IV.2. Wzór strukturalny fluorescencyjnej pochodnej powstającej w reakcji glutationu z dialdehydem orto-ftalowym

Każdą serię pomiarów zawartości glutationu w mikrodializatach poprzedzano wyznaczeniem krzywej standardowej. Przygotowywano wzorce GSH w aCSF, w zakresie stężeń 0,2 – 5 µmol/l, po czym poddawano je dokładnie tym samym procedurom jak opisane powyżej. Na podstawie otrzymanej krzywej wyznaczano stężenie glutationu w poszczególnych próbkach. Przykładowy chromatogram dla wzorca GSH o stężeniu 2 µmol/l przedstawiono na **rys. IV.3**.

http://rcin.org.pl



Rys. IV.3. Chromatogram dla 2 µM wzorca GSH z uwzględnieniem zmian składu fazy ruchomej podczas rozdziału. ■ - bufor fosforanowy; ■ - metanol

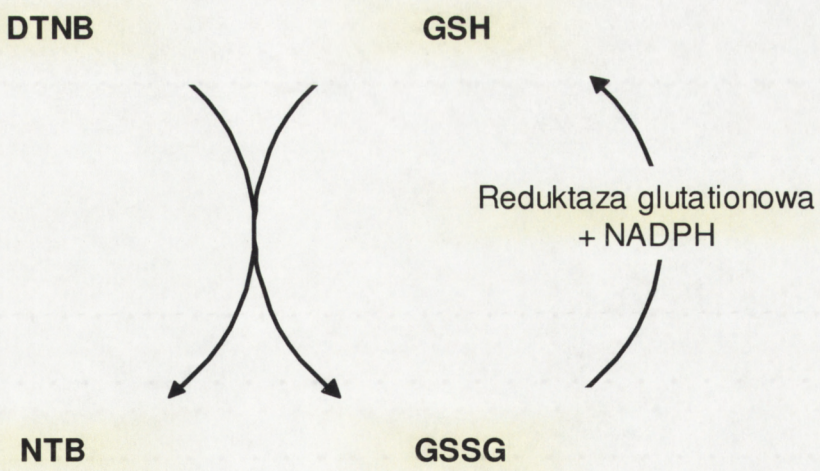
IV.4.2. Oznaczanie glutationu wewnątrzkomórkowego w hodowlach in vitro

Hodowle pierwotne neuronów i astrocytów, oraz hodowle glejaka C6 z przeznaczeniem do pomiarów zawartości glutationu wewnątrzkomórkowego prowadzono na 35-mm szalkach hodowlanych. Przed oznaczaniem szalki umieszczano w 4°C, znad komórek usuwano pożywkę i trzykrotnie przepłukiwano je buforem PBS, pH 7,4. Następnie komórki lizowano, traktując je 1 ml 1% kwasu sulfosalicylowego (SSA). Kwaśne pH, w jakim zachodziła liza, w znacznym stopniu zapobiega nieenzymatycznemu utlenieniu się GSH po rozpadzie komórek [Rossi i wsp., 2002], co pozwala na zachowanie stopnia utlenienia glutationu bliskiego natywnemu. Powstałe w ten sposób lizaty wraz z zeskrobanym z szalek osadem przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano w 4°C, przez 10 min., przy 13 000 x g w wirówce MPW 350R (firma MPW Med. Instruments; Warszawa, Polska). Supernatanty wykorzystywane były do pomiarów glutationu całkowitego oraz GSSG, osady natomiast rozpuszczano w 1 ml 1 M NaOH i oznaczano w nich białko (por. **rozdz. IV.9.1**).

Glutation wewnątrzkomórkowy w hodowlach oznaczano metodą cyklicznej reakcji enzymatycznej opisaną przez [Bakera i wsp. 1990]. W metodzie tej

http://rcin.org.pl

wykorzystuje się kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DTNB), który spontanicznie utlenia tiole (m.in. GSH do GSSG), samemu ulegając redukcji do kwasu 2-nitro-5-tiobenzoesowego (NTB), którego poziom można oznaczyć kolorymetrycznie. Aby ograniczyć swoistość metody tylko do glutationu, do mieszaniny reakcyjnej dodaje się GR oraz NADPH, co umożliwia redukcję GSSG z powrotem do GSH, który z kolei znowu jest utleniany przez DTNB z wytworzeniem następnej porcji NTB itd. Ta cykliczność reakcji powoduje stały (w pewnym zakresie) wzrost absorbancji spowodowany ciągłym przyrostem NTB (**rys. IV.4**). Wyjściową zawartość glutationu w próbce można zatem wyliczyć z szybkości wzrostu absorbancji, porównując ją z szybkością reakcji dla wzorców o znanym stężeniu. Oznaczenia glutationu prowadzono na płytkach 96-dołkowych, przy użyciu spektrofotometru płytkowego MR 680 (firma Bio-Rad; Hercules, USA). Do mieszaniny reakcyjnej (10 µl lizatu + 190 µl 50 mM buforu fosforanowego (KH_2PO_4 / K_2HPO_4), pH 7,5; zawierającego 0,5 mM EDTA; 0,15 mM DTNB oraz 0,2 mM NADPH) dodawano GR (1 u / dołek) i przez 7 minut, w 15-sekundowych odstępach, mierzono przyrost absorbancji przy długości fali 405 nm. Wzorce glutationu przygotowywano w 1% SSA, w zakresie 31,25 – 750 pmol / 10 µl, po czym mierzono je w taki sam sposób, jak glutation w lizatach.



Rys. IV.4. Cykliczna reakcja redukcji DTNB przez GSH w obecności GR i NADPH

Przed oznaczaniem poziomu glutationu utlenionego, przez godzinę inkubowano w temperaturze pokojowej 125 µl próbki z 5 µl 2-winylopirydyny (2-VP), która blokuje grupy tiolowe w GSH [Griffith, 1980]. Dalsza część procedury

http://rcin.org.pl

była taka sama jak dla glutationu całkowitego, z tym, że pomiar przyrostu absorbancji prowadzono przez 15 min., w 30-sekundowych odstępach. Krzywa wzorcowa była wyznaczana przy użyciu standardów GSSG w 1% SSA w zakresie 10 – 50 pmol / 10 µl, które przed oznaczaniem również były inkubowane z 2-VP.

Poziom GSH dla każdej próbki wyliczano odejmując zawartość GSSG od zawartości glutationu całkowitego. Wyniki przedstawiano w przeliczeniu na zawartość białka w danej próbce.

IV.4.3. Oznaczanie glutationu zewnątrzkomórkowego w hodowlach in vitro

Hodowle pierwotne astrocytów, oraz hodowle glejaka C6 z przeznaczeniem do pomiarów poziomu glutationu zewnątrzkomórkowego prowadzono na 35-mm szalkach hodowlanych. Do oznaczeń pobierano pożywkę znad komórek, natomiast same komórki płukano 3-krotnie buforem PBS, inkubowano w 37°C przez 30 min. z 1 ml 1 M NaOH, po czym lizat zbierano i mierzono w nim białko (por. **rozdz. IV.9.1**).

Glutation zewnątrzkomórkowy mierzono metodą HPLC, przy czym przed oznaczaniem próbki były zakwaszane, w celu usunięcia z nich białek. Próbkę mieszano z 30% kwasem nadchlorowym (PCA) w stosunku 10:1 i wirowano przez 12 min. przy 20 000 x g. Supernatant pobrany znad osadu był następnie doprowadzany przy użyciu Na_2CO_3 do pH 7,0. Zobojętnianie próbek miało na celu zwiększenie wydajności reakcji upochodnienia GSH z OPA, jako, że reakcja ta przebiega wolniej w niskim pH [Paroni i wsp., 1995]. Po zobojętnieniu próbki były ponownie wirowane przez 12 min. w 20 000 x g, po czym pobierano supernatant, inkubowano z DTT i oznaczano w nim glutation (por. **rozdz. IV.4.1**).

Wzorce glutationu w zakresie 0,5 – 6 µmol/l przygotowywano w takiej samej pożywce, jakiej używano do hodowli komórek i poddawano takim samym procedurom jak opisane powyżej.

IV.5. Wychwyt cystyny

Hodowle przeznaczone do pomiaru wychwytu CySS przez komórki prowadzono na 24-dołkowych płytkach hodowlanych. Do badań używano CySS znakowanej izotopem węgla ^{14}C.

Komórki, po usunięciu pożywki były preinkubowane w 37°C z mieszaniną inkubacyjną (MI), pH 7,4 o składzie: 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM $CaCl_2$; 0,8 mM $MgCl_2$; 5 mM Glc; 10 mM HEPES (250 µl MI / dołek). Do doświadczeń, w których badano wpływ nieobecności jonów sodu na dokomórkowy transport CySS używano

http://rcin.org.pl

MI, w której 150 mM chlorek sodu zastąpiony był przez 150 mM chlorek choliny. Po 30 min. preinkubacji wymieniano mieszaninę inkubacyjną na mieszaninę reakcyjną (MR), czyli MI uzupełnioną [^{14}C]-CySS (0,25 µCi / dołek) oraz 100 µM niewyznakowaną cystyną (przy wyznaczaniu parametrów kinetycznych używano CySS w stężeniach 10 µmol/l – 1 mmol/l) i inkubowano komórki w MR przez 5 min. W doświadczeniach, w których badano wpływ hamowania wychwytu CySS przez kompetytory poszczególnych układów transportujących, MR zawierała dodatkowo kwas homocysteinowy (HCysA; inhibitor wymiennika x_c^-), lub kwas l-trans-pirolidyno-2,4-dikarboksylowy (l-trans-PDC; inhibitor transporterów z rodziny X_{AG}^-). Stężenia kompetytorów użyte w poszczególnych doświadczeniach podane są w legendach do rysunków (por. **rozdz. V.3.2**). Wychwyt cystyny zatrzymywano, usuwając MR znad komórek i trzykrotnie przepłukując je MI schłodzoną do 4°C. Następnie komórki poddawano lizie, inkubując je w 37°C przez 30 min. z 450 µl 1 M NaOH. 400 µl lizatu przenoszono do fiolki scyntylacyjnej, dodawano 4 ml płynu scyntylacyjnego Insta-Gel Plus i mierzono radioaktywność węgla ^{14}C przy użyciu licznika scyntylacyjnego Wallac 1409 (firma Wallac; Turku, Finlandia). Podczas każdej serii oznaczeń dokonywano również kontrolnego pomiaru aktywności takiej ilości [^{14}C]CySS, jaka przypadała na jeden dołek w momencie rozpoczęcia doświadczenia. Porównanie tej wartości z aktywnością ^{14}C w poszczególnych lizatach umożliwiało określenie jaka część cystyny znajdującej się wyjściowo w mieszaninie reakcyjnej została pobrana przez komórki. Przy pomocy tego współczynnika, znając wyjściowe stężenia cystyny wyznakowanej i niewyznakowanej, wyliczano szybkość transportu CySS. Wyniki przeliczano na zawartość białka, którą mierzono w pozostałej części lizatu (por. **rozdz. IV.9.1**). Parametry kinetyczne wyznaczano przy użyciu równania Lineweavera-Burka.

IV.6. Badanie żywotności neuronów pierwotnych

Żywotność neuronów badano za pomocą testu MTT. W metodzie tej inkubuje się komórki z żółtym bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu (MTT), który jest przekształcany przez mitochondrialne dehydrogenazy w fioletowy formazan. Reakcja ta zachodzi tylko w mitochondriach żywych komórek, zatem stężenie jej produktu jest proporcjonalne do przeżywalności komórek w hodowli. Zawartość formazanu mierzona jest spektrofotometrycznie, po uprzednim dodaniu odpowiedniego rozpuszczalnika (formazan jest nierozpuszczalny w wodzie) [Mosman, 1983].

http://rcin.org.pl

Hodowle, w których badano żywotność komórek prowadzono na płytkach 96-dołkowych. Aby wykonać test MTT, usuwano pożywkę, płukano komórki buforem PBS ogrzanym do 37°C i dodawano (100 µl / dołek) roztwór MTT w PBS (1 mg/ml). Po 3 h inkubacji w 37°C, aby rozpuścić formazan powstały w wyniku redukcji MTT, dodawano 100 µl 5% roztworu dodecylosiarczanu sodu (SDS) w PBS i pozostawiano komórki w temperaturze pokojowej. Następnego dnia, za pomocą spektrofotometru płytkowego, mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm. Wyniki zostały przedstawione jako procent żywych komórek w hodowlach traktowanych NH_4Cl, BSO lub GEE w stosunku do hodowli kontrolnych.

IV.7. Oznaczanie poziomu mRNA genów białek biorących udział w metabolizmie glutationu

Ekspresję genów białek odpowiedzialnych za metabolizm glutationu badano określając w komórkach poziom mRNA dla poszczególnych białek. Badania prowadzono używając metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), poprzedzonej reakcją odwrotnej transkrypcji (RT). Hodowle komórek przeznaczone do oznaczania poziomu mRNA prowadzono na 35-mm szalkach.

IV.7.1. Izolacja RNA

Pierwszym etapem analizy RT-PCR była izolacja całkowitego RNA z komórek. Do tego celu wykorzystywano metodę ekstrakcji przy użyciu tiocyjanianu guanidyny, fenolu i chloroformu, opartą na procedurze opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi [1987]. Po usunięciu pożywki z szalek, komórki płukano buforem PBS i dodawano do nich 1 ml odczynnika do izolacji całkowitego RNA (TRI Reagent), zawierającego tiocyjanian guanidyny i fenol. Komórki inkubowano z TRI w temperaturze pokojowej przez 5 min., po czym przenoszono lizat do probówek, dodawano do niego 200 µl chloroformu i wytrząsano ręcznie przez 15 sekund. Po 3 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, próbki wirowano w 4°C przez 15 min., przy 12 000 x g. Górna, wodna frakcja, która zawierała RNA, była przenoszona do nowych probówek, gdzie dodawano do niej 500 µl izopropanolu. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. i wirowano w 4°C przez 10 min., przy 12 000 x g. Po usunięciu supernatantu, do osadu (w którym znajdowało się RNA) dodawano 1 ml 75% etanolu i wirowano w 4°C przez 5 min.,

http://rcin.org.pl

przy 7 500 x g. Metanol usuwano, a osad rozpuszczano w wodzie zawierającej 0,1% inhibitor rybonukleaz - dietylopirowęglan (DEPC).

Ilość wyizolowanego całkowitego RNA oraz jego czystość mierzono metodą spektrofotometryczną, przy użyciu spektrofotometru Ultrospec 2000 (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, Wielka Brytania). Próbę ślepą stanowił 0,1% roztwór DEPC w wodzie. Stężenie RNA wyliczano mierząc absorbancję próbki przy długości fali 260 nm, przy założeniu, że dla Abs = 1 stężenie RNA wynosi 40 µg/ml. Czystość określano na podstawie stosunku absorbancji próbki przy 260 nm do absorbancji przy 280 nm. Do dalszych badań używano próbek o stosunku Abs_{260}/Abs_{280} wyższym od 1,6.

IV.7.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano od 1 do 5 µg wyizolowanego RNA. Stanowił on matrycę dla odwrotnej transkryptazy, która na jego podstawie syntetyzowała komplementarny DNA (cDNA). Aby reakcja odwrotnej transkrypcji mogła zostać zainicjowana niezbędne są trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) oraz starter, czyli krótka sekwencja DNA komplementarna do końca 3' matrycowego RNA. Jako startera używano oligo(dT_{12-18}) - oligonukleotydu złożonego z 12 - 18 reszt tymidylowych, który jest komplementarny do fragmentu poliadenylowego (poli-A), stanowiącego koniec 3' mRNA eukariontów. Dzięki zastosowaniu oligo(dT_{12-18}) odwrotna transkryptaza przepisuje na cDNA całkowity mRNA, ale nie przepisuje pozostałych rodzajów RNA.

Do badań używano zestawu Superscript II, w skład którego wchodziła odwrotna transkryptaza, DTT, oraz 5-krotnie stężony bufor do RT. Mieszaninę reakcyjną złożoną z: badanej próbki w objętości zależnej od stężenia w niej całkowitego RNA; 1 µl (0,5 µg) oligo(dT_{12-18}) oraz 1 µl 10 mM mieszaniny czterech trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP) uzupełniano 0,1% wodnym roztworem DEPC do 12 µl i inkubowano przez 5 min. w 65°C. Następnie dodawano 4 µl stężonego buforu, 2 µl 100 mM DTT oraz 1 µl 0,1% roztworu DEPC i inkubowano całość przez 2 min. w 35°C. Po zakończeniu inkubacji dodawano 1 µl odwrotnej transkryptazy i inkubowano przez 50 min. w 37°C, a następnie przez 15 min. w 70°C.

http://rcin.org.pl

IV.7.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Wybrany fragment uzyskanego w procesie odwrotnej transkrypcji cDNA był amplifikowany za pomocą metody PCR [Mullis i wsp., 1986; Mullis i Faloona, 1987], z użyciem flankującej ten fragment pary oligonukleotydowych starterów (starter f i starter r) o sekwencjach unikatowych dla badanego genu. Reakcja łańcuchowa polimerazy składa się z trzech, cyklicznie powtarzających się etapów: denaturacji DNA, która zachodzi w 90 – 95°C; wiązania starterów do jednoniciowej matrycy (temperatura zależy od sekwencji startera); oraz syntezy komplementarnej nici DNA (68 – 72°C). Do PCR, ze względu na wysoką temperaturę niezbędną do denaturacji DNA, używa się termostabilnej polimerazy Taq, pochodzącej z żyjącej w gorących źródłach bakterii *Thermus aquaticus*. Poza wymienionymi czynnikami do prawidłowego przebiegu PCR niezbędne są jony magnezu, który jest kofaktorem polimerazy, a także dNTP, z których syntetyzowana jest nowa nić DNA. Sekwencje poszczególnych starterów używanych w doświadczeniach, zastosowane temperatury przyłączania tych starterów do matrycy DNA, oraz wielkości produktów powstałych w wyniku reakcji PCR przedstawiono w **tab. IV.1**.

Mieszanina reakcyjna składała się z następujących składników: 2,5 µl buforu do PCR; 2 µl cDNA (por. **rozdz. IV.7.2**); 2 µl 25 mM $MgCl_2$; 1 µl 10 µM startera f; 1 µl 10 µM startera r; 1 µl 10 mM dNTP; 1 µl (1 u) polimerazy Taq oraz 14,5 µl wody. PCR przeprowadzano w termocyklerze T3000 (firma Biometra; Getynga, Niemcy), w następujących warunkach:

- denaturacja wstępna	94°C	2 min.	
- denaturacja	94°C	1 min.	30 cykli
- przyłączanie starterów	(patrz **tab. IV.1**)	1 min.	
- wydłużanie łańcucha	72°C	2 min.	
- ostateczne wydłużanie	72°C	4 min	

Poziom ekspresji każdego badanego genu porównywano do poziomu ekspresji genu kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), która jest w komórkach eksprymowana w sposób konstytutywny.

http://rcin.org.pl

Tab. IV.1. Charakterystyka starterów użytych w reakcjach PCR

starter	sekwencja	temperatura przyłączania	wielkość produktu
GCL_f	**5'** CCACTGAGCTGGGAAGAGAC **3'**	$57^{O}C$	192 pz
GCL_r	**5'** GCCGCCATTCAGTAACAACT **3'**		
GLT1_f	**5'** ACCATGCTCCTCATTCTCACAGCT **3'**	$58^{O}C$	335 pz
GLT1_r	**5'**ACCATGCTCCTCATTCTCACAGCT**3'**		
GLAST_f	**5'**CCTGGGTTTTCATTGGAGGG**3'**	$53^{O}C$	124 pz
GLAST_r	**5'**ATGCGTTTGTCCACACCATTG**3'**		
4F2hc_f	**5'**CTCCCAGGAAGATTTTAAAGACCTTCT**3'**	$58^{O}C$	141 pz
4F2hc_r	**5'**TTCATTTTGGTGGCTACAATGTCAG**3'**		
GAPDH_f	**5'**TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG**3'**	$53^{O}C - 58^{O}C$	998 pz
GAPDH_r	**5'**CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC**3'**		

IV.7.4. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty PCR poddawano elektroforezie w żelu agarozowym - metodzie, która pozwala na rozdzielenie znajdujących się w badanej próbce cząsteczek DNA na podstawie ich długości. Do uwidocznienia DNA używano bromku etydyny (EtBr), związku, który interkaluje pomiędzy pary zasad w dwuniciowym DNA i po wzbudzeniu w UV emituje pomarańczowe światło. Intensywność świecenia jest proporcjonalna do ilości DNA, w który wniknął EtBr (EtBr niezwiązany z DNA świeci bardzo słabo), co pozwala na densytometryczny pomiar poziomu otrzymanego produktu. Położenie badanego produktu na żelu lokalizowano, porównując je z położeniem rozdzielonych równolegle cząsteczek DNA o wyjściowo znanej długości (tzw. drabinka DNA).

Żel przygotowywano rozpuszczając agarozę (w stężeniu 1,5%) w $100^{O}C$ w buforze TBE (45 mM Tris-H_3BO_3; 1 mM EDTA; pH 8,0). Przed zastygnięciem, do roztworu dodawano EtBr (30 µl/l). Gotowy żel umieszczano w buforze TBE, w aparacie do elektroforezy (firma Biometra; Getynga, Niemcy). Badaną próbkę (5 –

http://rcin.org.pl

10 µl) mieszano z barwnikiem do elektroforezy (w celu obciążenia próbki oraz uwidocznienia czoła elektroforezy podczas rozdziału) w stosunku 5:1 i nakładano na żel. Rozdział prowadzono przy napięciu 80 – 100 V przez 25 – 40 min. Rozdzielony DNA oglądano w świetle UV i podawano analizie densytometrycznej przy użyciu aparatu Nucleovision i programu GelExpert 4.0 (firma NucleoTech; San Mateo, USA).

IV.8. Pomiar aktywności enzymów

Hodowle przeznaczone do badania aktywności enzymów w komórkach prowadzono na 35-mm szalkach hodowlanych. Po usunięciu pożywki, komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS i inkubowano je w 4°C przez 10 min. z 200 µl buforu lizującego (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100). Następnie lizat wraz z zeskrobanym z szalek osadem przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano w 4°C, przez 10 min., przy 2000 x g. Supernatanty przenoszono do nowych probówek i wykorzystywano do pomiarów aktywności enzymów oraz zawartości białka (por. **rozdz. IV.9.2**).

IV.8.1. Pomiar aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej

W badaniach wykorzystywano zestaw do pomiaru aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PDH) zawierający glukozo-6-fosforan (G6P) oraz NADP. G6PDH katalizuje reakcję utlenienia G6P przy udziale NADP, który zostaje zredukowany do NADPH. Poziom NADPH można mierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 340 nm [Lohr i Waller, 1965].

Mieszaninę inkubacyjną stanowiło 1,5 ml odczynnika do oznaczania aktywności G6PDH oraz 20 µl lizatu. Szybkość reakcji mierzono przez 5 min., w 37°C, przy użyciu spektrofotometru Ultrospec III (firma Pharmacia Biotech; Uppsala, Szwecja). Aktywność enzymu obliczano na podstawie wzoru Lamberta – Beera, przy założeniu, że milimolowy współczynnik absorbancji dla NADPH przy 340 nm wynosi 6,22. Wartości aktywności G6PDH podano w przeliczeniu na zawartość białka (por. **rozdz. IV.9.2**).

IV.8.2. Pomiar aktywności γ-glutamylotransferazy

W badaniach wykorzystano zestaw do oznaczania aktywności γGT zawierający l-γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilid (GluCaNA) oraz glicyloglicynę

http://rcin.org.pl

(GlyGly). γGT katalizuje przeniesienie grupy glutamylowej z GluCaNA na GlyGly, z wytworzeniem 5-amino-2-benzoesanu, którego poziom można mierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm [Persijn i van der Slik, 1976].

Mieszaninę inkubacyjną stanowił 1 ml odczynnika do oznaczania aktywności γGT oraz 100 µl lizatu. Szybkość reakcji mierzono przez 6 min., w 37°C, przy użyciu spektrofotometru Ultrospec III. Aktywność enzymu obliczano na podstawie wzoru Lamberta – Beera, przy założeniu, że milimolowy współczynnik absorbancji dla 5-amino-2-nitrobenzoesanu przy 405 nm wynosi 9,5. Wartości aktywności γGT podano w przeliczeniu na zawartość białka.

IV.9. Oznaczanie białka

Sposób przygotowania próbek do oznaczania białka opisany jest w poprzednich rozdziałach (por. **rozdz. IV.4.2, rozdz. IV.4.3, rozdz. IV.5, rozdz. IV.8**). W próbkach traktowanych NaOH białko oznaczano metodą Bradforda, natomiast w próbkach traktowanych Tritonem X-100 – metodą biuretową.

IV.9.1. Oznaczanie białka metodą Bradforda

W metodzie Bradforda używa się błękitu Coomassie, który wiążąc się z białkiem zmienia barwę z brązowej na niebieską. Kompleks taki jest stabilny i może być oznaczany kolorymetrycznie [Bradford, 1976].

Odczynnik do oznaczania białka przygotowywano rozpuszczając 10 mg błękitu Coomassie w 5 ml etanolu, po czym dodawano 10 ml H_3PO_4 i uzupełniano wodą do 100 ml. Tak przygotowany roztwór filtrowano przez sączek z bibuły filtracyjnej, co pozwalało na usunięcie z odczynnika zanieczyszczeń białkowych. Oznaczenia prowadzono na płytkach 96-dołkowych, przy użyciu spektrofotometru płytkowego. Do dołka nanoszono 270 µl roztworu błękitu Coomassie i 30 µl badanej próbki w NaOH, po czym mierzono absorbancję przy 595 nm. Do sporządzenia krzywej standardowej używano albuminy rozpuszczonej w NaOH.

IV.9.2. Oznaczanie białka metodą biuretową

Metoda biuretowa opiera się na zdolności białek do redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^{+}, oraz zdolności Cu^{+} do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem bis-cynchoninowym (BCA). Absorbancja tego kompleksu jest wprost proporcjonalna do

http://rcin.org.pl

zawartości jonów Cu^+, a ta natomiast zależy od ilości białka w próbce [Smith i wsp., 1985].

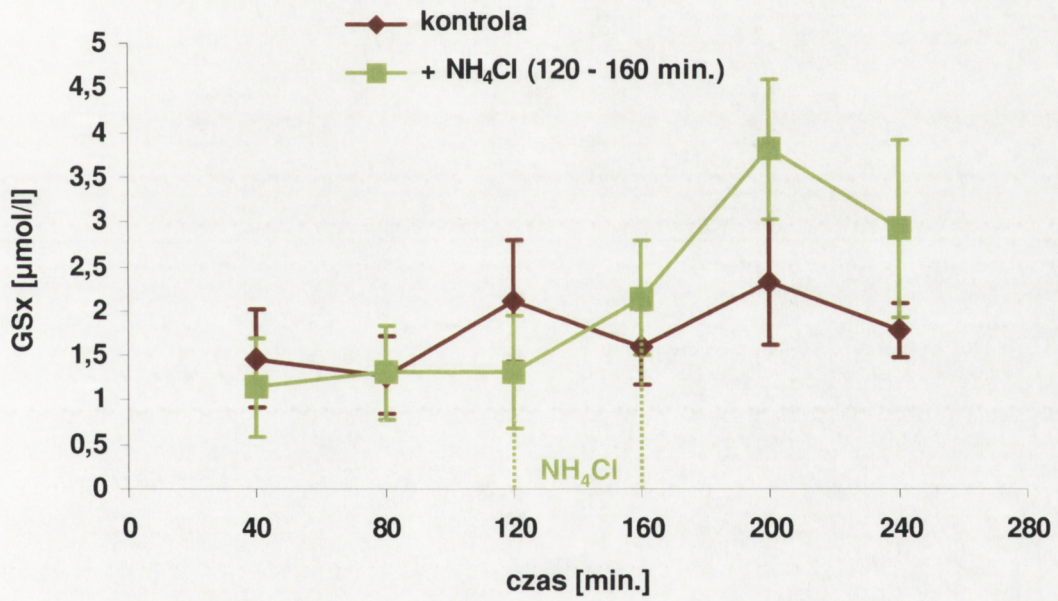
Do badań używano zestawu BCA Protein Assay Kit. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru płytkowego przy długości fali 570 nm. Do sporządzenia krzywej standardowej używano albuminy rozpuszczonej w buforze lizującym z Tritonem X-100.

http://rcin.org.pl

V. WYNIKI

V.1. Wpływ NH_4Cl na zewnątrzkomórkowy poziom glutationu *in vivo*

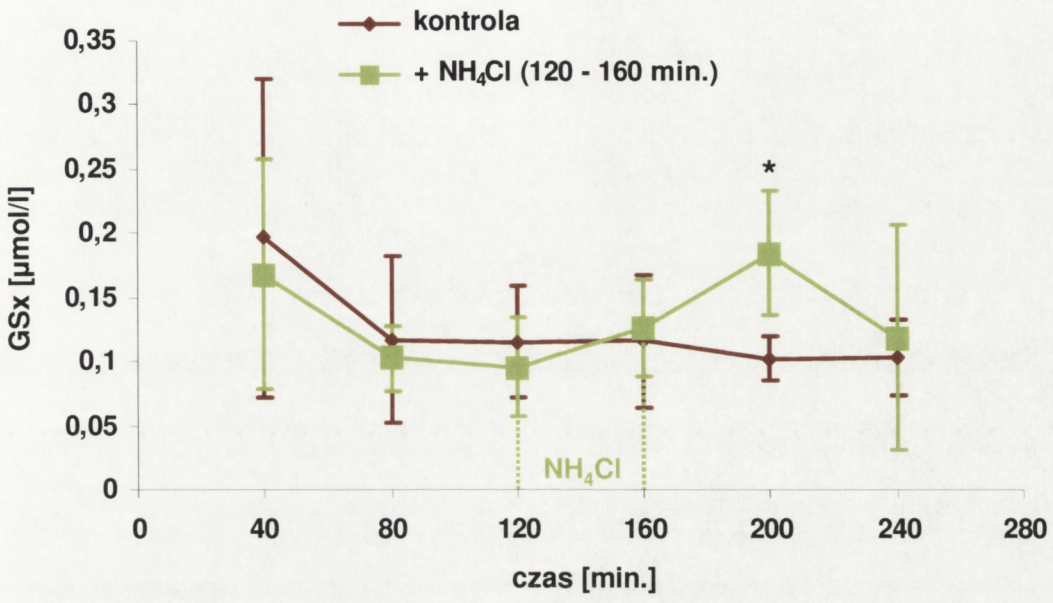
Przy użyciu metody mikrodializy badano wpływ bezpośredniego podania chlorku amonu przez sondę mikrodializacyjną na zewnątrzkomórkowy poziom glutationu całkowitego (GSx) w prążkowiu oraz w korze przedczołowej szczura *in vivo*. W prążkowiu wykazano tendencję do wzrostu poziomu GSx po podaniu NH_4Cl, jednak wartości, które wówczas obserwowano nie różniły się w sposób statystycznie istotny od wartości kontrolnych (**rys. V.1**).



Rys. V.1. Stężenie glutationu całkowitego w mikrodializatach z prążkowia mózgu szczura. NH_4Cl podawano w stężeniu końcowym 5 mM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 10 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe

W mikrodializatach z kory przedczołowej, wyjściowa zawartość glutationu była około 10-krotnie wyższa niż w mikrodializatach z prążkowia. W korze, po podaniu NH_4Cl zawartość GSx wzrastała, najwyższą wartość osiągając w 200 min. (około 180% wartości kontrolnej), czyli we frakcji następującej po tej, w której podawano NH_4Cl. Wzrost ten był przejściowy – już w następnej frakcji stężenie GSx nie odbiegało od stężenia obserwowanego w warunkach kontrolnych (**rys. V.2**).

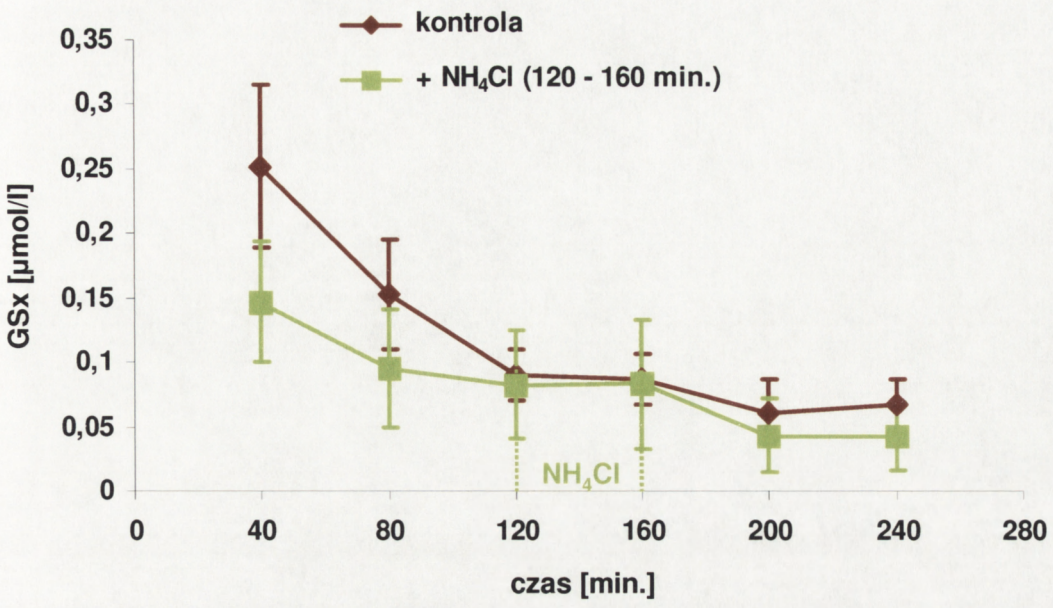
http://rcin.org.pl



Rys. V.2. Stężenie glutationu całkowitego w mikrodializatach z kory przedczołowej mózgu szczura. NH_4Cl podawano w stężeniu końcowym 5 mM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

Aby określić, jaki był udział astrocytów i neuronów w wywołanym przez amoniak podwyższeniu zewnątrzkomórkowego stężenia glutationu w korze przedczołowej, użyto fluorooctanu, który jest inhibitorem metabolizmu energetycznego komórek glejowych. FA jest pobierany przez komórki glejowe (ale nie przez neurony), w nich jest przekształcany we fluorocytrynian, który jest inhibitorem akonitazy, jednego z enzymów cyklu Krebsa. W efekcie następuje spadek aktywności TCAc, co skutkuje spadkiem produkcji ATP, który jest niezbędny na obu etapach syntezy GSH oraz w procesie transportu glutationu z komórki. W obecności FA nie obserwowano zmian zawartości glutationu w mikrodializatach po podaniu NH_4Cl (**rys. V.3**). Spostrzeżenie to wskazuje, że w wywołanym przez amoniak zwiększeniu zewnątrzkomórkowego stężenia GSx w korze przedczołowej szczura najprawdopodobniej brały udział wyłącznie komórki glejowe.

http://rcin.org.pl



Rys. V.3. Stężenie glutationu całkowitego w mikrodializatach z kory przedczołowej mózgu szczura po zahamowaniu metabolizmu energetycznego w astrocytach przy użyciu 50 mM FA. NH_4Cl podawano w stężeniu końcowym 5 mM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

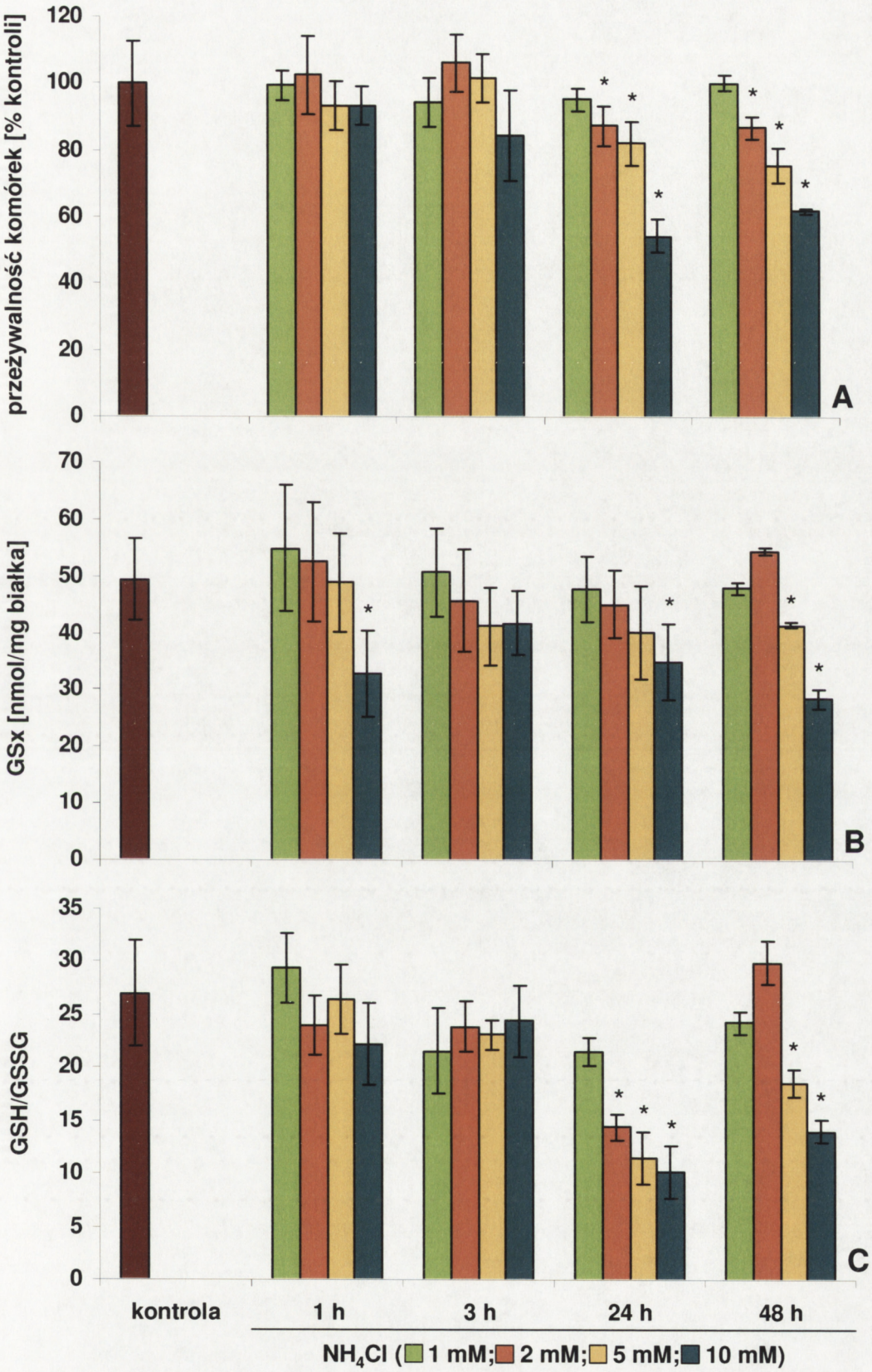
Aby sprawdzić, czy te, zaobserwowane *in vivo* zjawiska zachodzą również w warunkach *in vitro*, a także aby poznać leżące u ich podstaw mechanizmy, oraz móc dokonać obserwacji w warunkach dłuższego oddziaływania amoniaku na komórki, przeprowadzono szereg doświadczeń z użyciem hodowli pierwotnych neuronów i astrocytów korowych oraz komórek glejaka C6.

V.2. Wpływ NH_4Cl na wewnątrzkomórkowy poziom glutationu w hodowlach pierwotnych neuronów

Wykazano, że traktowanie neuronów 5 mM i 10 mM chlorkiem amonu nie dłużej niż 3 h nie wpływa na ich przeżywalność. Jednak już po 24 h inkubacji zaobserwowano wprost proporcjonalny do użytego stężenia NH_4Cl (oprócz 1 mM) wzrost śmiertelności komórek. Amoniak, w najwyższym, 10 mM stężeniu, obniżał ich przeżywalność o prawie 50%. Dłuższe, 48-godzinne traktowanie neuronów chlorkiem amonu nie powodowało dalszych zmian – śmiertelność pozostawała na takim poziomie, jaki obserwowano po 24 h. (**rys. V.4A**).

Podobnie jak dla przeżywalności, również w przypadku zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu dało się zaobserwować wywołaną amoniakiem, proporcjonalną do użytych stężeń, tendencję do spadku.

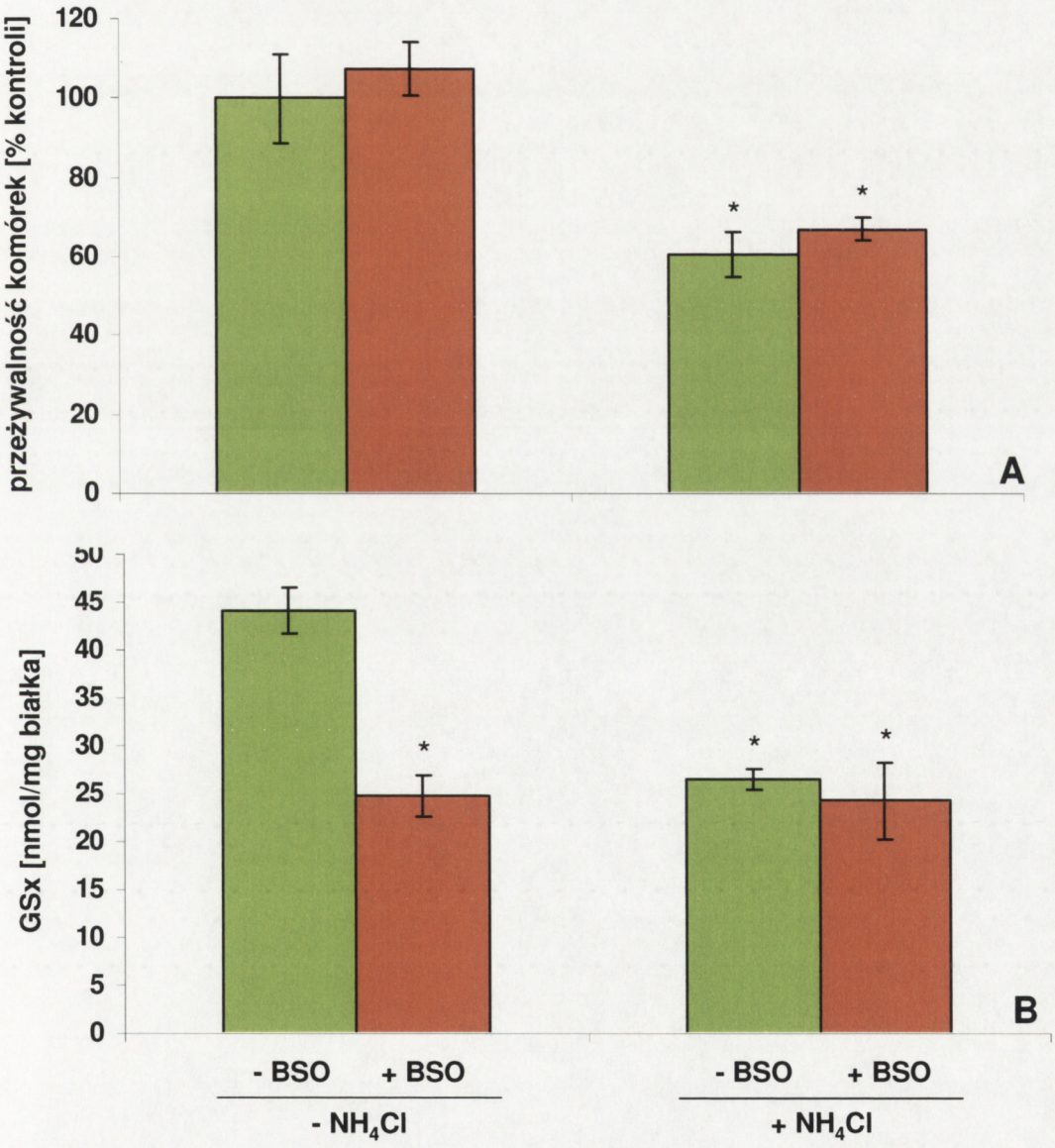
http://rcin.org.pl



Rys. V.4. Przeżywalność komórek (A), zawartość wewnątrzkomórkowego glutationu (B) oraz wewnątrzkomórkowy stosunek GSH/GSSG (C) w hodowlach pierwotnych neuronów traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

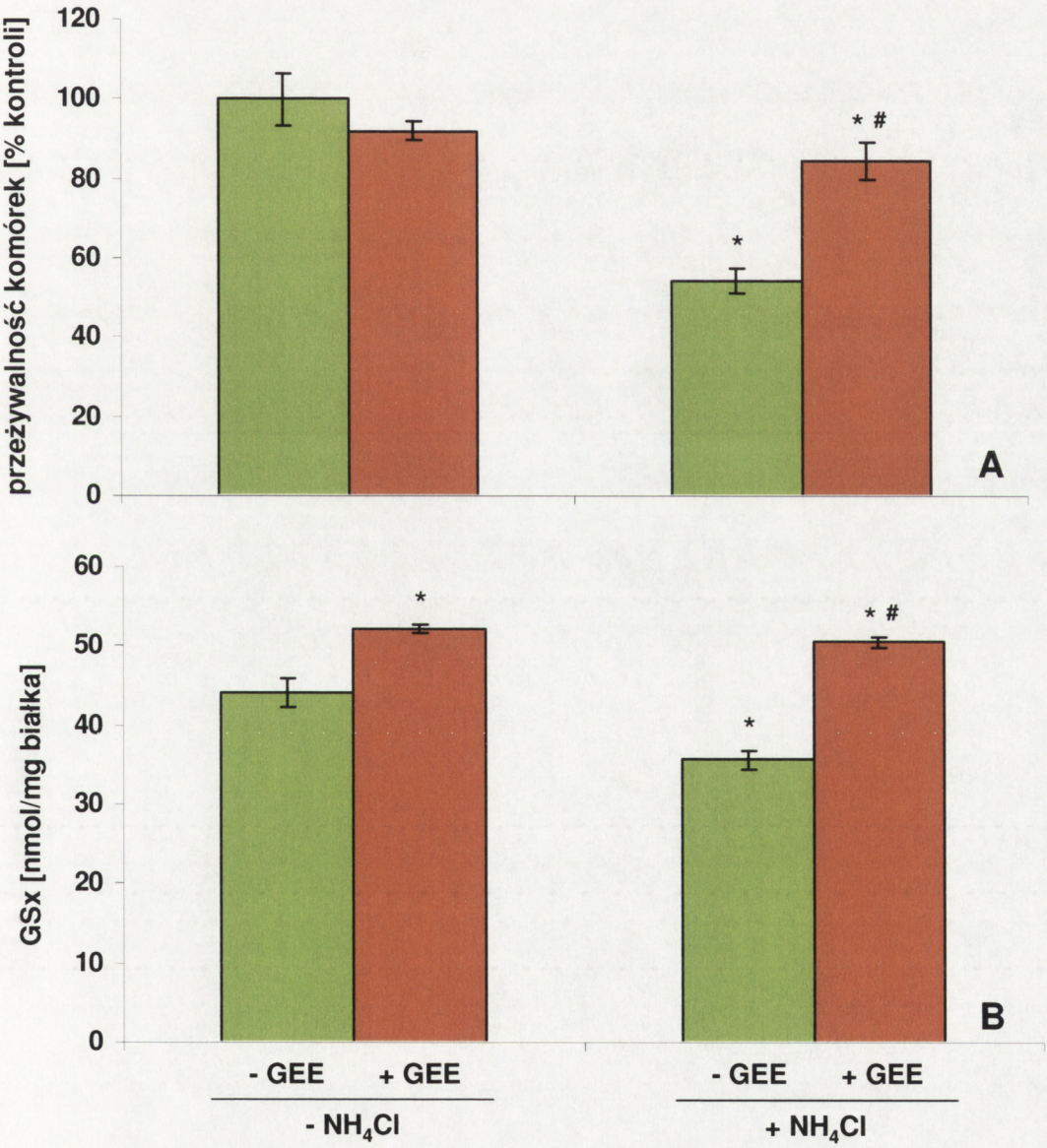
Największy spadek (o około 40 %) obserwowano po 48 h inkubacji z 10 mM NH_4Cl (**rys. V.4B**). Aby zbadać wpływ NH_4Cl na wewnątrzkomórkowy stan redoks glutationu określono również stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego (por. **rozdz. II.3.4**). Wykazano, że wyższe stężenia amoniaku obniżają stosunek GSH/GSSG w przypadku inkubacji 24 i 48 – godzinnych (10 mM NH_4Cl powodował około 2-krotny spadek tego wskaźnika). Nie zaobserwowano natomiast jakiegokolwiek wpływu NH_4Cl na stan redoks glutationu po inkubacjach 1 i 3 – godzinnych (**rys. V.4C**).



Rys. V.5. Przeżywalność komórek (A) oraz zawartość wewnątrzkomórkowego glutationu (B) w hodowlach pierwotnych neuronów traktowanych 10 mM NH_4Cl oraz 10 μM BSO przez 24 h. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli („-BSO; -NH_4Cl") (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

Aby sprawdzić, czy spadek przeżywalności neuronów może być efektem spadku GSx, dokonano manipulacji wewnątrzkomórkową zawartością glutationu przy zastosowaniu BSO oraz GEE (por. **rozdz. IV.3.4**). BSO dwukrotnie obniżała zawartość GSx w próbkach kontrolnych, jednak nie wywoływała żadnych zmian w neuronach traktowanych NH_4Cl przez 24 h. Nie zaobserwowano również wpływu BSO na przeżywalność komórek (**rys. V.5**) w żadnym z układów doświadczalnych. GEE zwiększał zawartość GSx w neuronach kontrolnych i inkubowanych z NH_4Cl, a także, w przypadku tych drugich, zapobiegał spadkowi przeżywalności (**rys. V.6**).



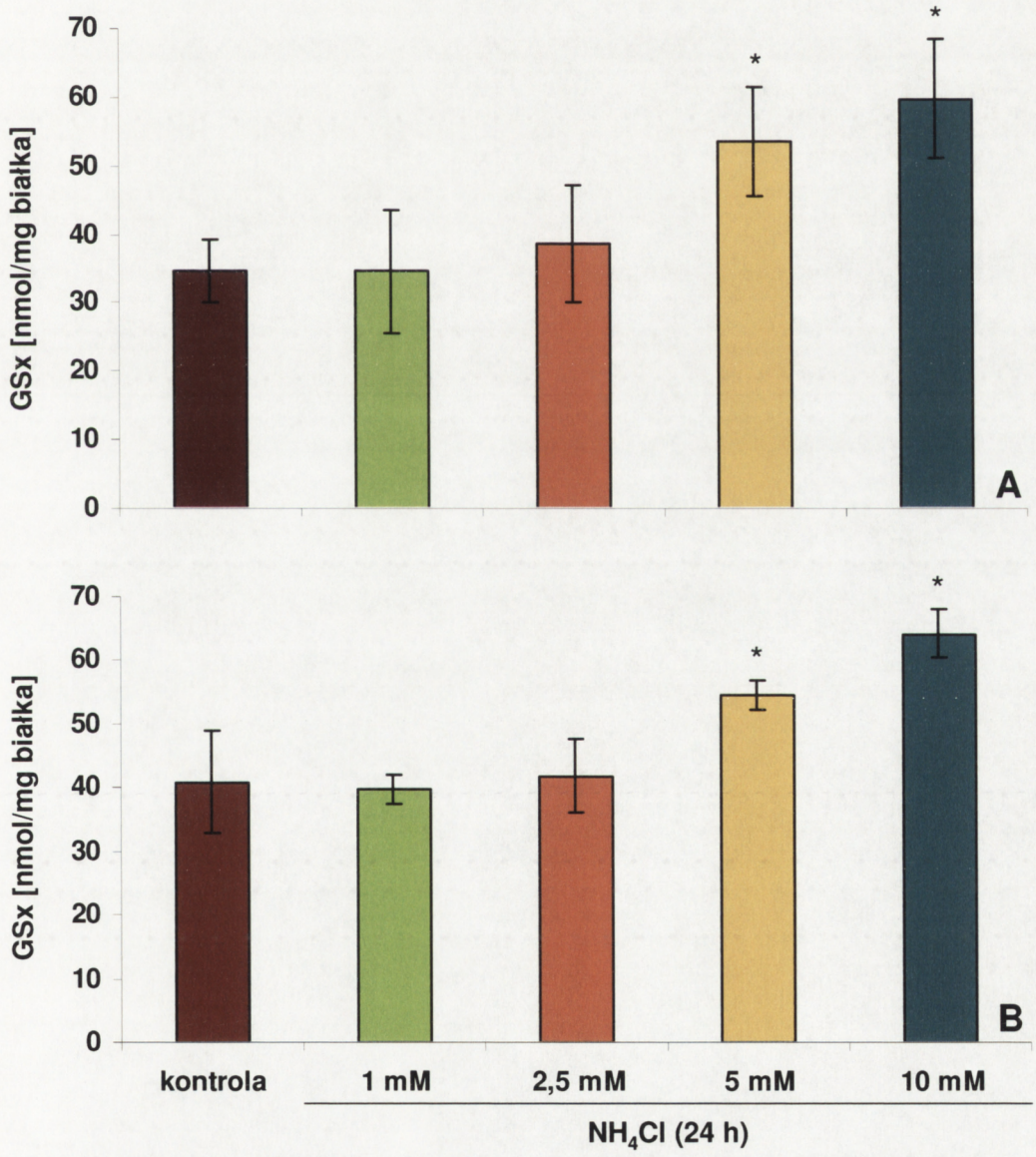
Rys. V.6. Przeżywalność komórek (A) oraz zawartość wewnątrzkomórkowego glutationu (B) w hodowlach pierwotnych neuronów traktowanych 10 mM NH_4Cl oraz 3 mM GEE przez 24 h. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli („-GEE; -NH_4Cl"); #p<0,05 w stosunku do „-GEE; +NH_4Cl" (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

Dane te mogą świadczyć o tym, że wywołany amoniakiem spadek glutationu naraża neurony na działanie jakiegoś czynnika obecnego w warunkach hiperamonemicznych (najprawdopodobniej stresu oksydacyjnego), który zwiększa ich śmiertelność.

V.3. Wpływ NH_4Cl na metabolizm glutationu w hodowlach pierwotnych astrocytów oraz w komórkach glejaka C6

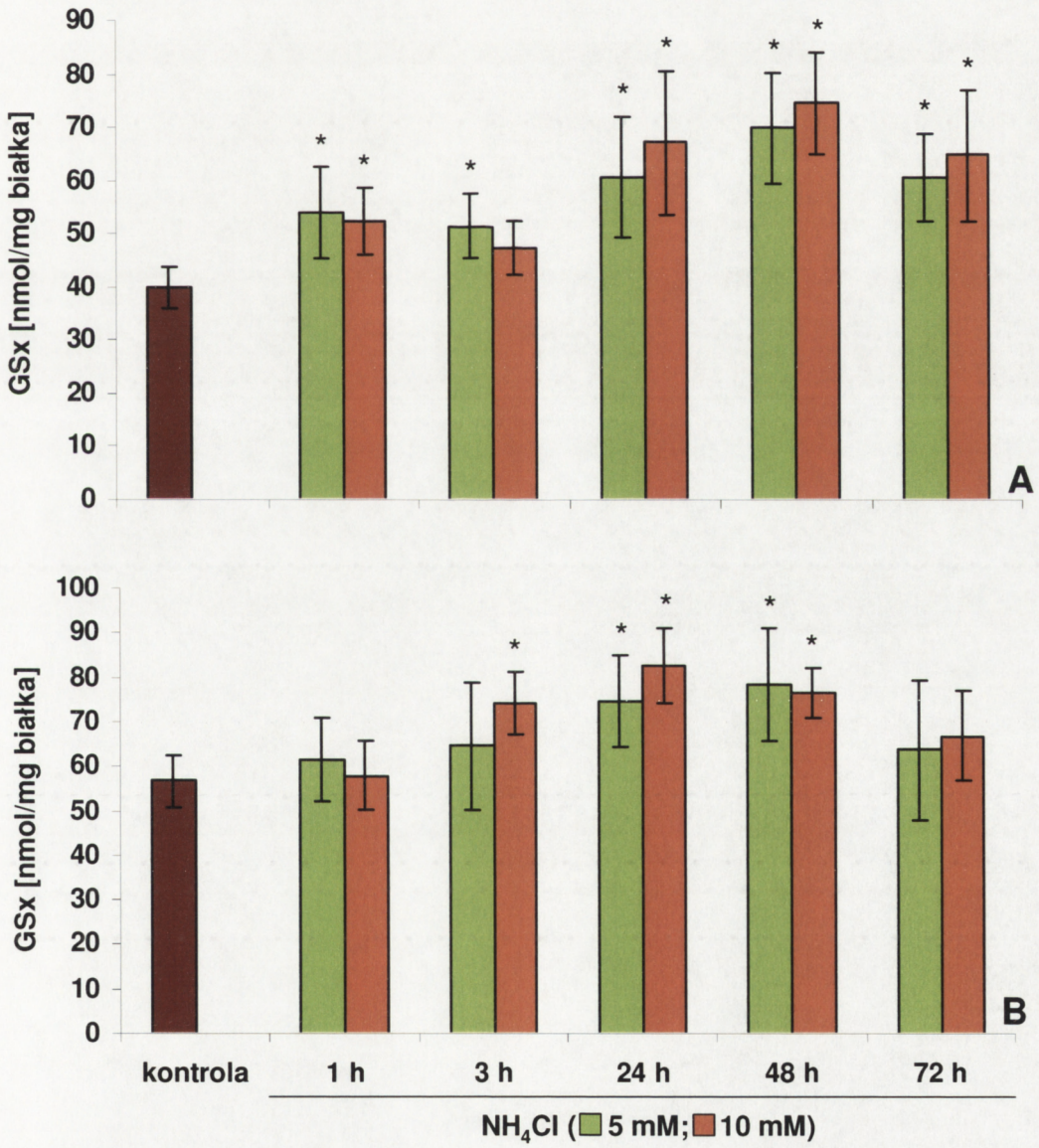
V.3.1. Wpływ NH_4Cl na zawartość glutationu wewnątrzkomórkowego



Rys. V.7. Zawartość glutationu w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

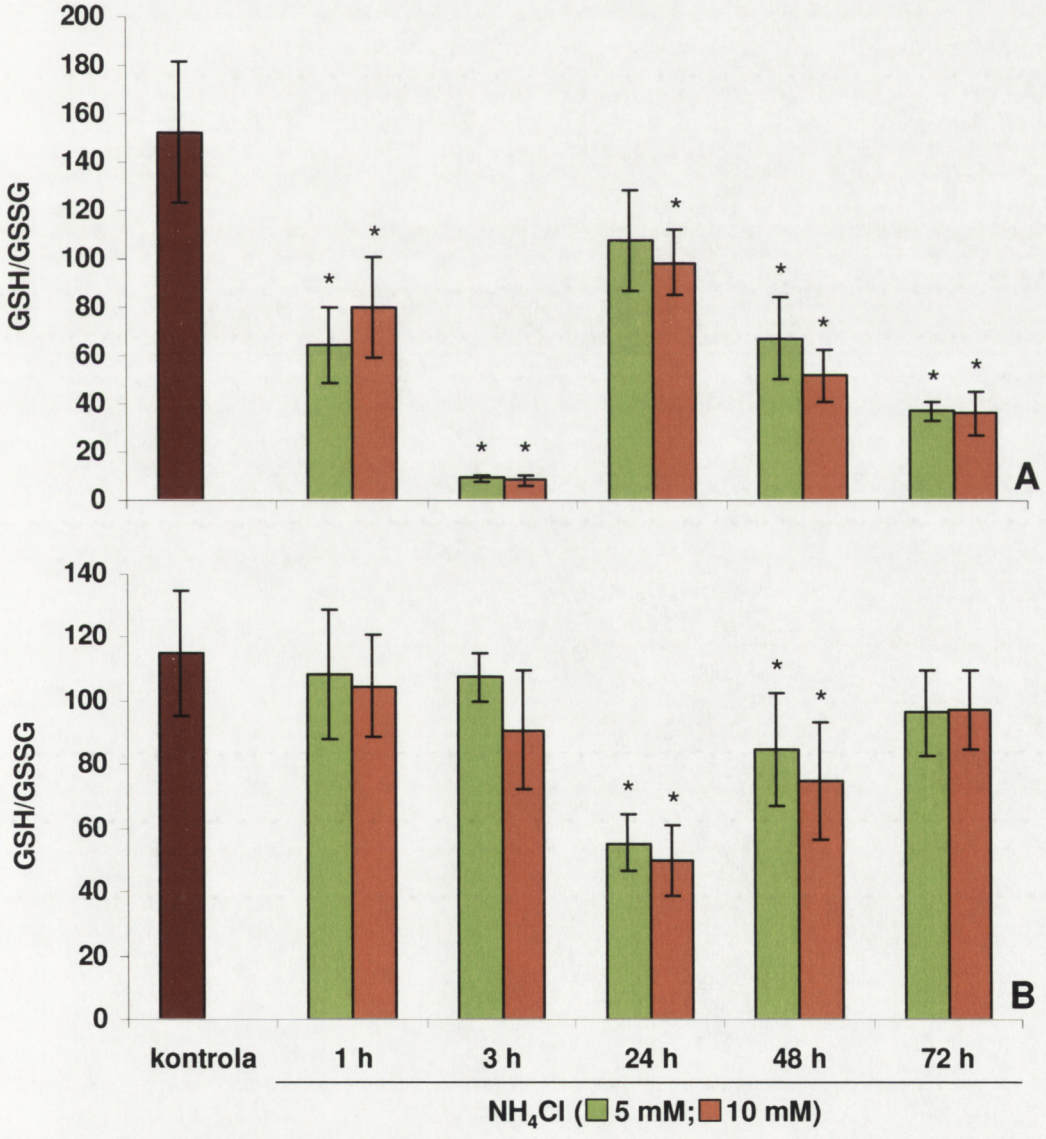
24-godzinne traktowanie astrocytów pierwotnych i komórek glejaka C6 5 mM i 10 mM chlorkiem amonu skutkowało wzrostem poziomu glutationu w obu typach komórek. Niższe stężenia nie wywoływały żadnego efektu (**rys. V.7**). Podniesioną zawartość GSx obserwowano w astrocytach w całym zakresie stosowanych czasów inkubacji z 5 mM i 10 mM NH_4Cl (1 h – 72 h), natomiast w komórkach C6 od 3 h do 48 h. Najwyższy wzrost GSx obserwowano w astrocytach inkubowanych z 10 mM NH_4Cl przez 48 h (o około 80%), a w komórkach C6 - przez 24 h (o około 40%) (**rys. V.8**).



Rys. V.8. Zawartość glutationu w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

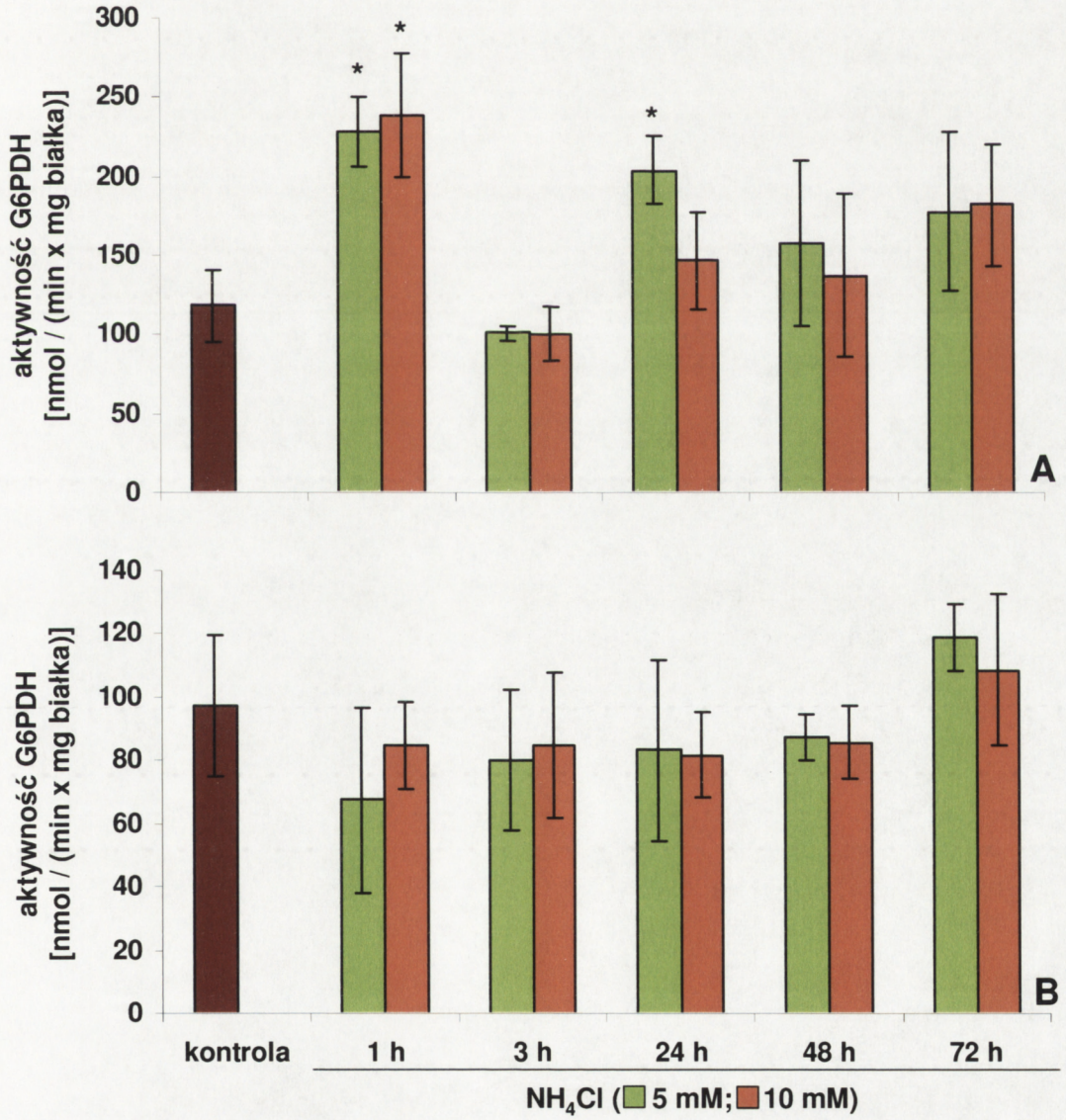
Wzrost glutationu całkowitego nie zapobiegał obniżeniu glutationowego stanu redoks. W astrocytach, już po 1 h traktowania NH_4Cl wykazano około 2-krotny spadek stosunku GSH/GSSG, a po 3 h zaobserwowano zmniejszenie tego wskaźnika aż do około 6% wartości kontrolnej. Po 24 h następowało chwilowe przywrócenie wyższych wartości (do około 65% stanu wyjściowego), jednak już dłuższe czasy inkubacji z NH_4Cl powodowały dalsze obniżenie, chociaż nie było ono tak dramatyczne jak w przypadku inkubacji 3-godzinnej (**rys. V.9A**). W komórkach C6 spadek stosunku GSH/GSSG nie był tak silny ani długotrwały: ujawniał się dopiero po 24 h inkubacji (50% wartości kontrolnej), ale już po 72 h następowało przywrócenie stanu wyjściowego (**rys. V.9B**).



Rys. V.9. Stosunek GSH/GSSG w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna- Whitneya)

http://rcin.org.pl

Aby stwierdzić, czy spadek stosunku GSH/GSSG może być efektem zmniejszenia dostępności NADPH niezbędnego do redukcji GSSG przez GR, dokonano pomiarów aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, enzymu uważanego za główne źródło NADPH w komórkach OUN [Bolaños i wsp., 2004]. W astrocytach pierwotnych zaobserwowano wzrost aktywności G6PDH po 1 h i 24 h traktowania komórek NH_4Cl, natomiast w pozostałych punktach czasowych nie wykazano zmian tego parametru (**rys. V.10A**). W komórkach glejaka C6 aktywność G6PDH pozostawała na niezmienionym poziomie przez cały czas inkubacji z NH_4Cl (**rys. V.10B**). Dane te świadczą o tym, że spadek glutationowego potencjału redoks wywołany przez NH_4Cl (**rys. V.9**) najprawdopodobniej nie jest spowodowany zmniejszeniem dostępności NADPH.

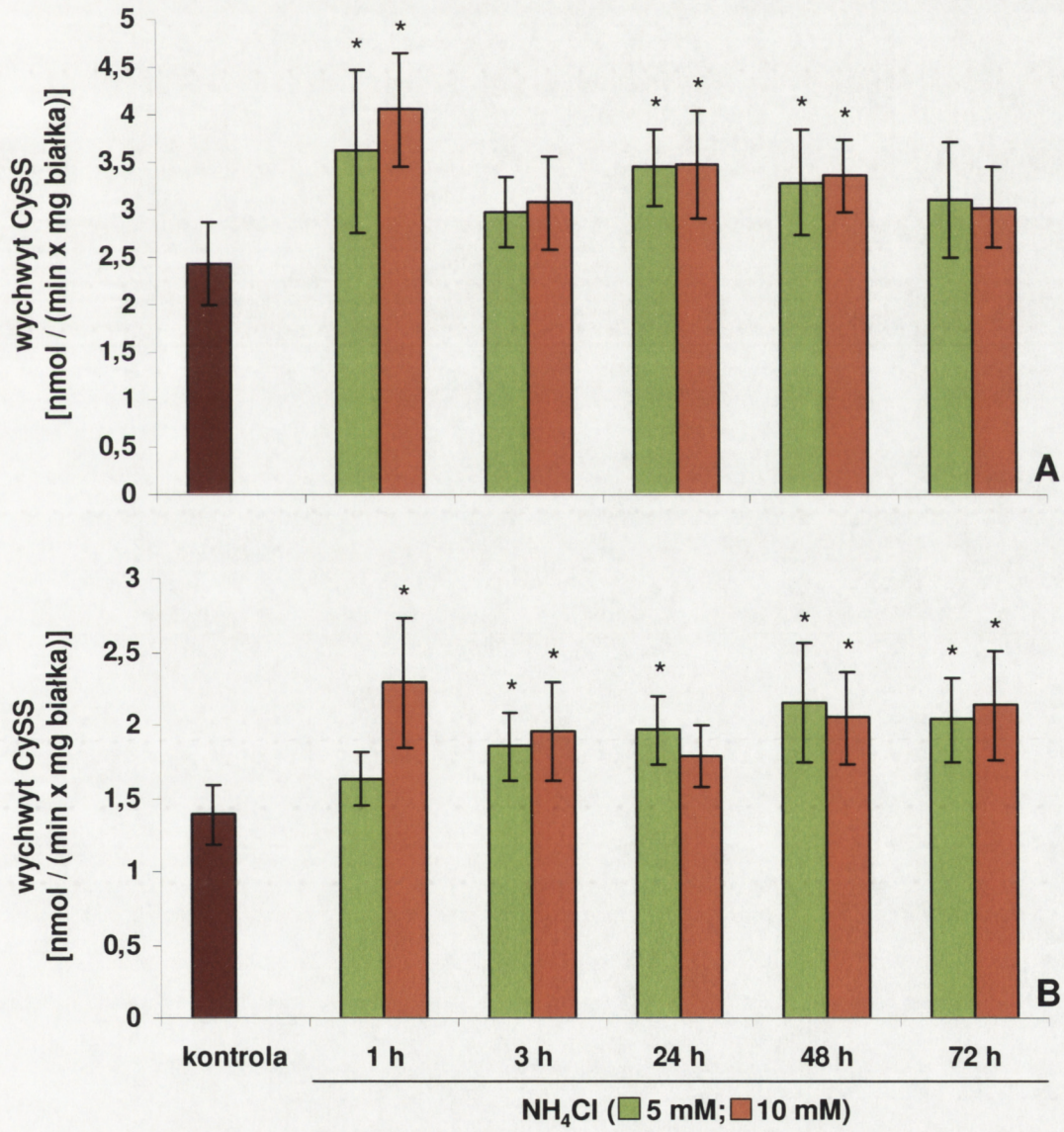


Rys. V.10. Aktywność G6PDH w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

V.3.2. Wpływ NH_4Cl na wychwyt cystyny

Wykazano, że wywołanemu przez NH_4Cl wzrostowi wewnątrzkomórkowego GSx towarzyszy zwiększenie pobierania CySS. Astrocyty wzmagały transport tego prekursora już po 1 h traktowania 5 mM i 10 mM chlorkiem amonu i w tym punkcie czasowym efekt ten był najsilniejszy. Wzrost transportu CySS obserwowano również po inkubacji astrocytów z NH_4Cl przez 24 h i 48 h (**rys. V.11A**). W przypadku komórek C6 najwyższą wartość szybkości pobierania CySS obserwowano także po 1 h inkubacji, ale tylko z 10 mM NH_4Cl. Stymulujący efekt amoniaku utrzymywał się do 72 h (**rys. V.11B**).



Rys. V.11. Wychwyt cystyny przez astrocyty pierwotne (A) oraz komórki glejaka C6 (B) traktowane NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 12 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

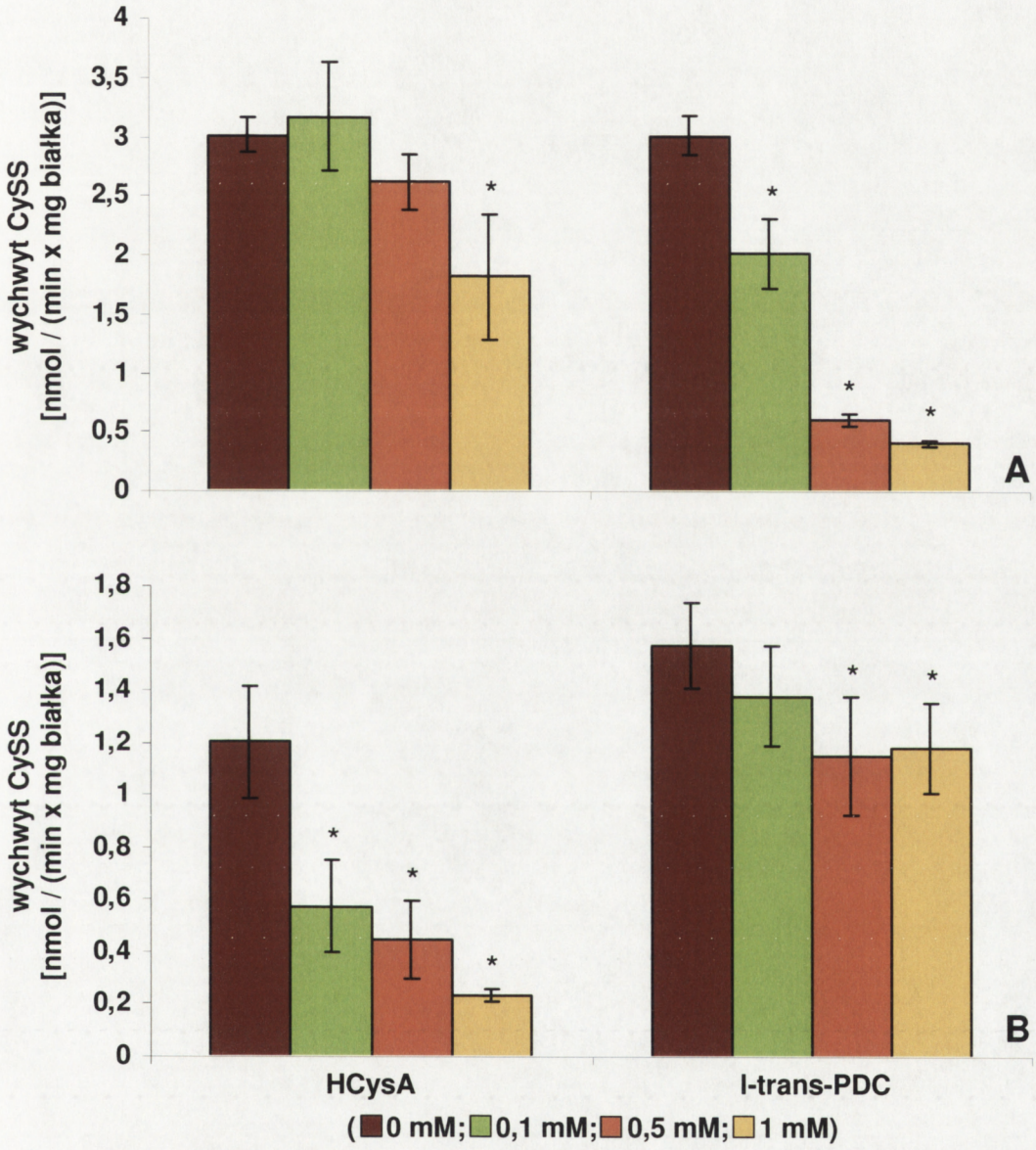
Badając kinetyczne parametry wychwytu CySS wykazano, że wartości V_{max} i K_m, dla astrocytów były odpowiednio 4-krotnie i 1,5-krotnie wyższe niż dla komórek C6. Zaobserwowano, że inkubacja z 10 mM NH_4Cl przez 1 h i 24 h nie wpływała na K_m, ale zwiększała V_{max} w obu typach komórek (**tab. V.1**).

Tab. V.1. Parametry kinetyczne wychwytu CySS przez astrocyty pierwotne i komórki glejaka C6. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

		kontrola	10 mM NH_4Cl (1 h)	10 mM NH_4Cl (24 h)
astrocyty	K_m [µM]	348,2 ± 86,2	268,7 ± 55,3	337,9 ± 43,9
	V_{max} [nmol / (min x mg)]	20,9 ± 3,3	29,8 ± 3,1*	28,8 ± 2,8*
C6	K_m [µM]	213,5 ± 43,7	198,8 ± 73,5	223,7 ± 37,2
	V_{max} [nmol / (min x mg)]	5,6 ± 0,9	9,8 ± 1,2*	8,8 ± 2,3*

Badania z użyciem inhibitorów poszczególnych układów transportujących, a także badania zależności od jonów Na^+ pozwoliły na ustalenie udziału antyportera x_c^- oraz transporterów z układu X_{AG}^- w procesie pobierania CySS przez oba typy komórek (por. **rozdz. II.3.3**). Wykazano, że transport CySS do astrocytów charakteryzował się dużą wrażliwością na l-trans-PDC, inhibitor X_{AG}^-, i dużą odpornością na HCysA, inhibitor x_c^-, (**rys. V.12A; rys. V.13A**), a także bardzo małym (około 6%) udziałem składnika niezależnego od jonów sodu (**rys. V.14A**). Dane te świadczą o tym, że astrocyty pobierają CySS prawie wyłącznie poprzez układ X_{AG}^-. W komórkach C6 nie zaobserwowano aż tak wyraźnej dominacji któregoś z układów transportujących, choć większą rolę wydaje się w nich odgrywać antyporter x_c^-, na co wskazuje bardzo duża wrażliwość na HCySA i niewielka na l-trans-PDC (**rys. V.12B; rys. V.13B**), a także duży udział (prawie 70%) składnika niezależnego od Na^+ w całkowitym transporcie CySS (**rys. V.14B**).

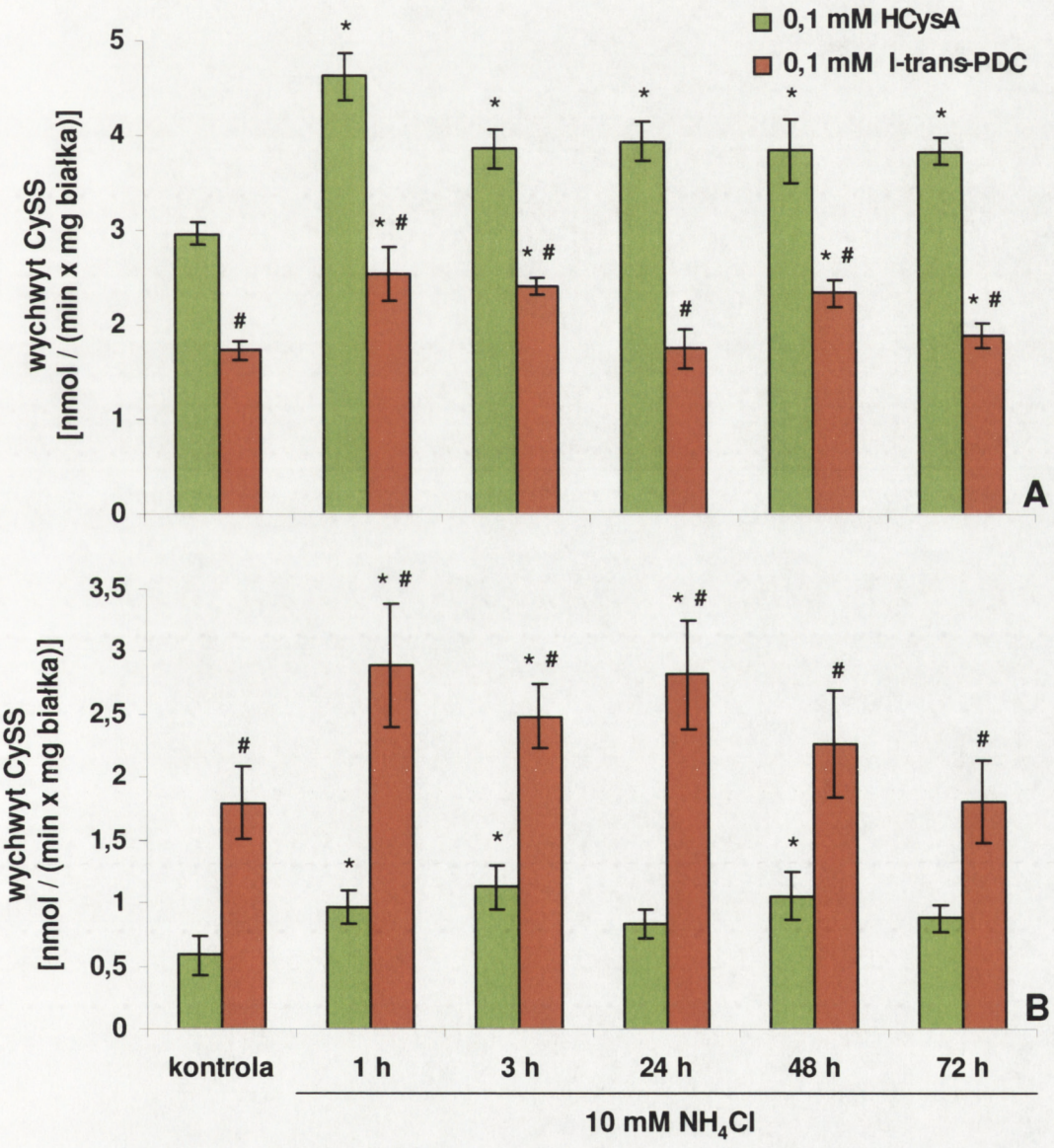
http://rcin.org.pl



Rys. V.12. Wychwyt cystyny przez astrocyty pierwotne (A) oraz komórki glejaka C6 (B) w obecności inhibitorów poszczególnych układów transportujących. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

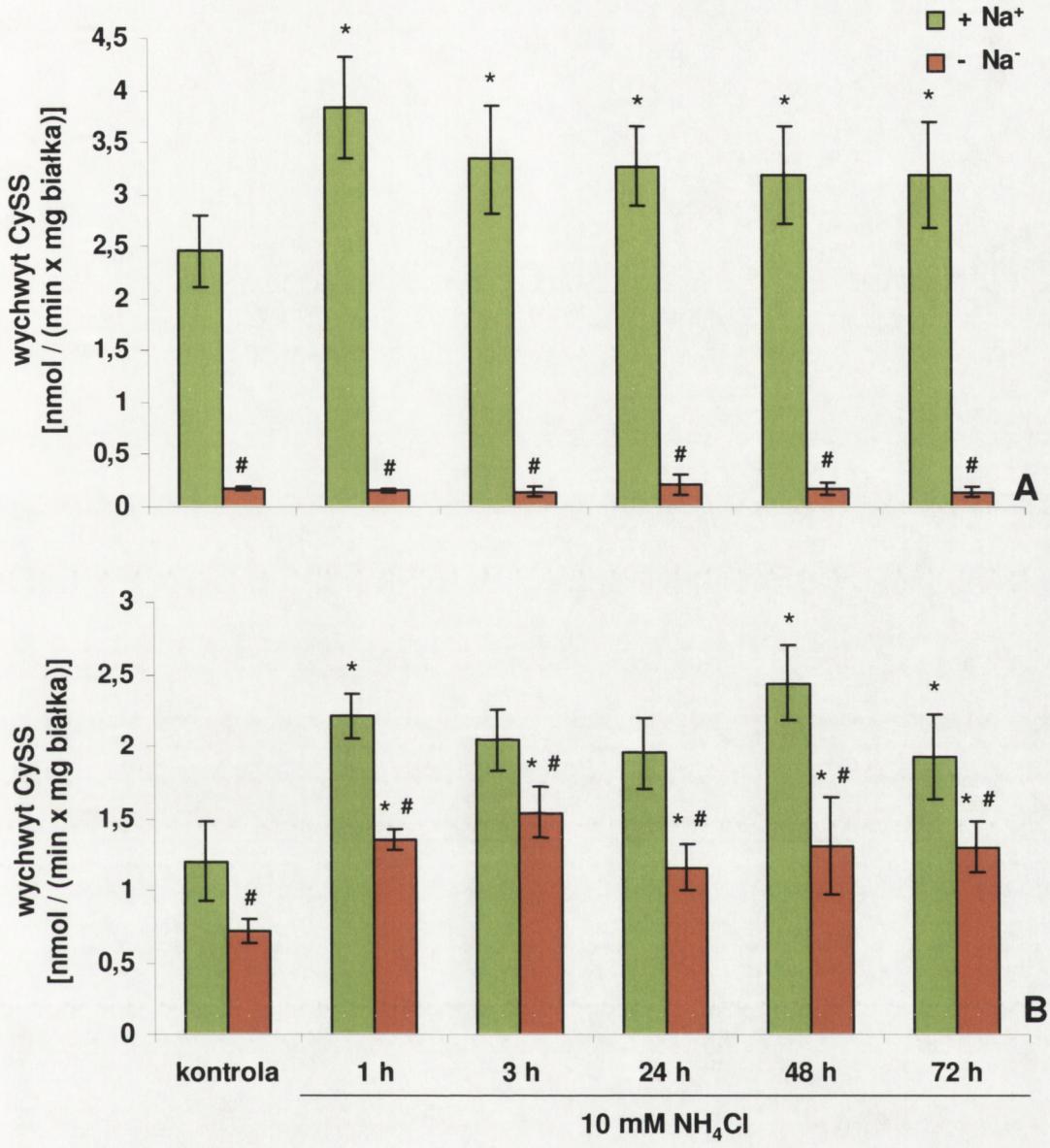
http://rcin.org.pl

Zaobserwowano, że po inkubacji z 10 mM NH_4Cl (1 h – 72 h) nie zmieniały się proporcje składników wrażliwych na HCySA i l-trans-PDC (**rys. V.13**), ani też składników zależnych i niezależnych od jonów Na^+ (**rys. V.14**) w całkowitym transporcie CySS w obu typach komórek. Świadczy to o tym, że amoniak wywołując wzrost pobierania tego aminokwasu aktywuje w równym stopniu poszczególne układy transportujące odpowiedzialne za wychwyt tego aminokwasu przez astrocyty pierwotne oraz komórki glejaka C6.



Rys. V.13. Wychwyt cystyny przez astrocyty pierwotne (A) oraz komórki glejaka C6 (B) traktowane NH_4Cl, w obecności inhibitorów poszczególnych układów transportujących. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli; #p<0,05 w stosunku do „HCySA" (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl



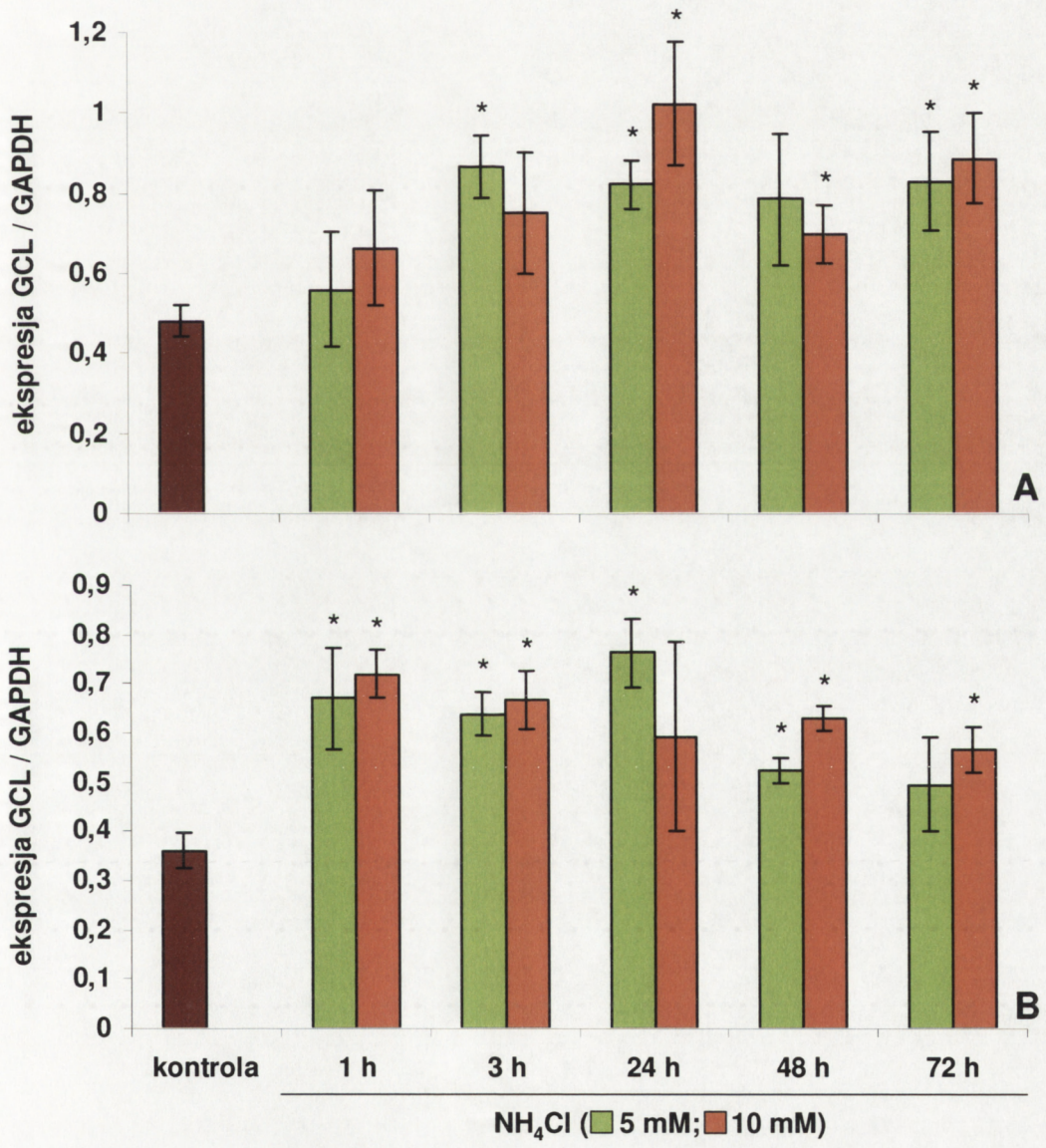
Rys. V.14. Wychwyt cystyny przez astrocyty pierwotne (A) oraz komórki glejaka C6 (B) traktowane NH_4Cl. Zależność od jonów Na^+. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli; #p<0,05 w stosunku do „+Na^+" (test Manna-Whitneya)

V.3.3. Wpływ NH_4Cl na ekspresję genów związanych z metabolizmem glutationu

Aby dokładniej określić mechanizmy zaobserwowanych zmian w metabolizmie glutationu, zbadano ekspresję mRNA dla genów z nim związanych. Wykazano, że traktowanie astrocytów pierwotnych chlorkiem amonu przez dłużej niż 1 h powodowało wzrost ekspresji genu podjednostki ciężkiej GCL (por. **rozdz. II.3.1**). Po 24 h inkubacji z 10 mM NH_4Cl zawartość mRNA dla GCL-HS w komórce była dwukrotnie wyższa niż w warunkach kontrolnych. Dłuższe traktowanie

http://rcin.org.pl

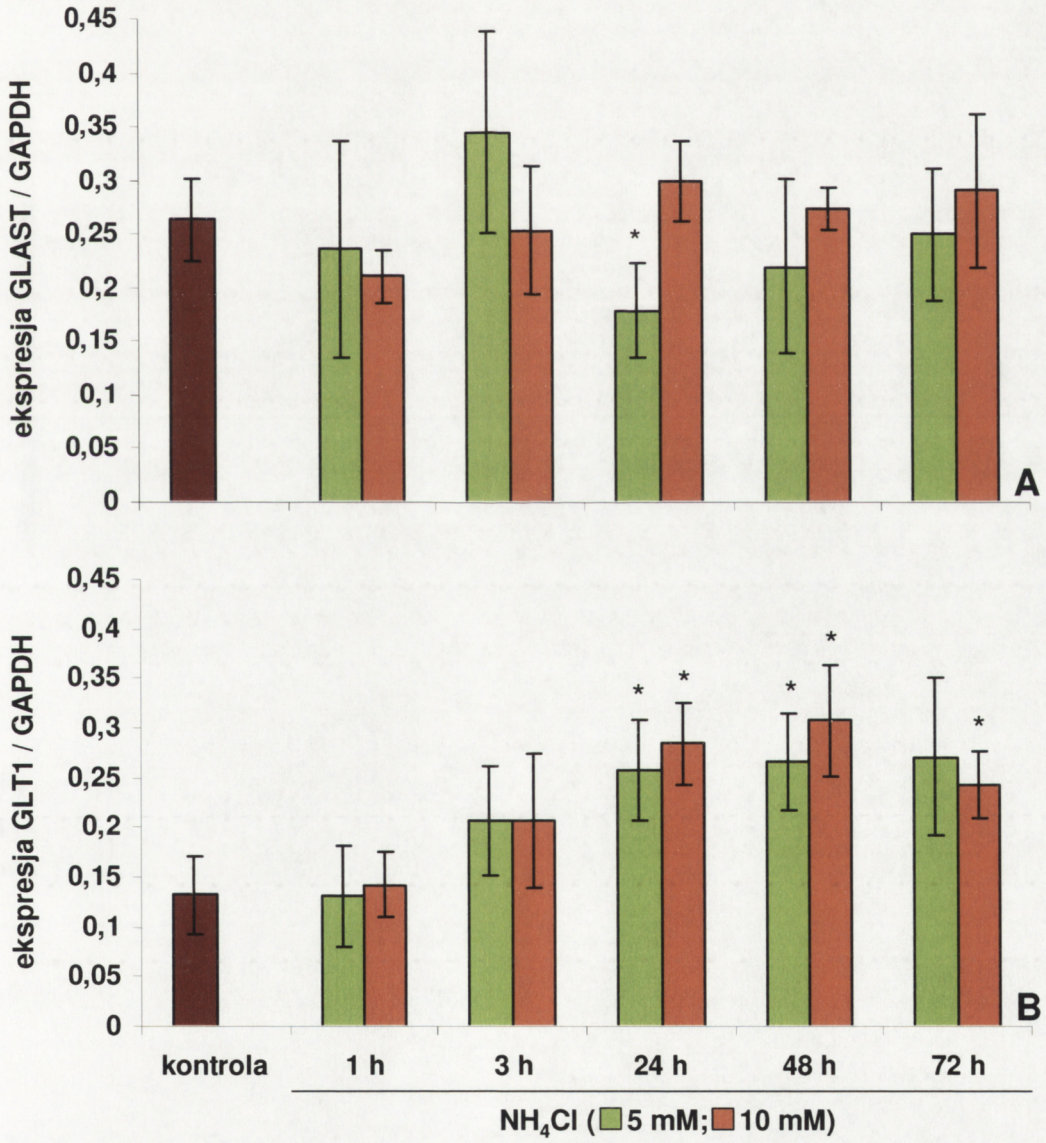
komórek amoniakiem utrzymywało nadekspresję tego genu, choć na nieco niższym poziomie (**rys. V.15A**). W komórkach glejaka C6 odpowiedź na NH_4Cl była szybsza – już po 1 h obserwowano dwukrotny wzrost zawartości mRNA dla GCL-HS. Ekspresja na takim poziomie utrzymywała się przez 24 h traktowania amoniakiem, po czym, podobnie jak w astrocytach spadała, choć nadal była wyższa od ekspresji wyjściowej (**rys. V.15B**).



Rys. V.15. Ekspresja mRNA dla GCL-HS w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna- Whitneya)

http://rcin.org.pl

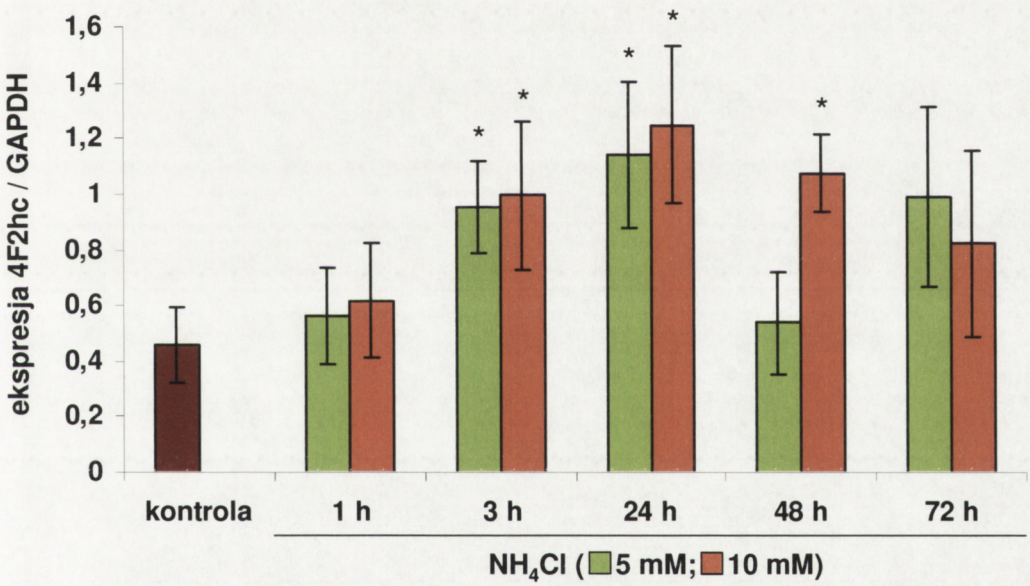
Badaniom ekspresji poddano również geny białek odpowiedzialnych za pobieranie CySS przez komórki glejowe. Zaobserwowano, że ekspresja genu transportera GLAST w astrocytach nie wykazywała wrażliwości na amoniak (**rys. V.16A**). Wykazano natomiast, że zawartość mRNA dla transportera GLT1, która wyjściowo była dwukrotnie niższa niż dla GLAST, wzrastała wraz z czasem inkubacji komórek z NH_4Cl aż do 48 h, gdzie osiągała poziom dwukrotnie wyższy niż w warunkach kontrolnych i zbliżony do wyjściowego poziomu mRNA dla GLAST (**rys. V.16B**).



Rys. V.16. Ekspresja mRNA dla GLAST (A) oraz GLT1 (B) w astrocytach pierwotnych traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

W komórkach glejaka C6 zbadano ekspresję genu dla łańcucha ciężkiego antyportera x_c^- (4F2hc) (por. **rozdz. II.3.3**). Tu, podobnie jak w przypadku GLT1 w astrocytach, zaobserwowano stopniowy wzrost zawartości mRNA dla 4F2hc pod wpływem amoniaku, przy czym maksymalny poziom ekspresji tego genu stwierdzono po 24 h inkubacji z chlorkiem amonu (wzrost o około 170% w porównaniu z kontrolą w przypadku 10 mM NH_4Cl). Traktowanie komórek amoniakiem dłużej niż 24 h nie powodowało już tak wysokiego wzrostu, a po 72 h poziom ekspresji mRNA dla 4F2hc nie odbiegał w sposób statystycznie znamienny od poziomu wyjściowego (**rys. V.17**).



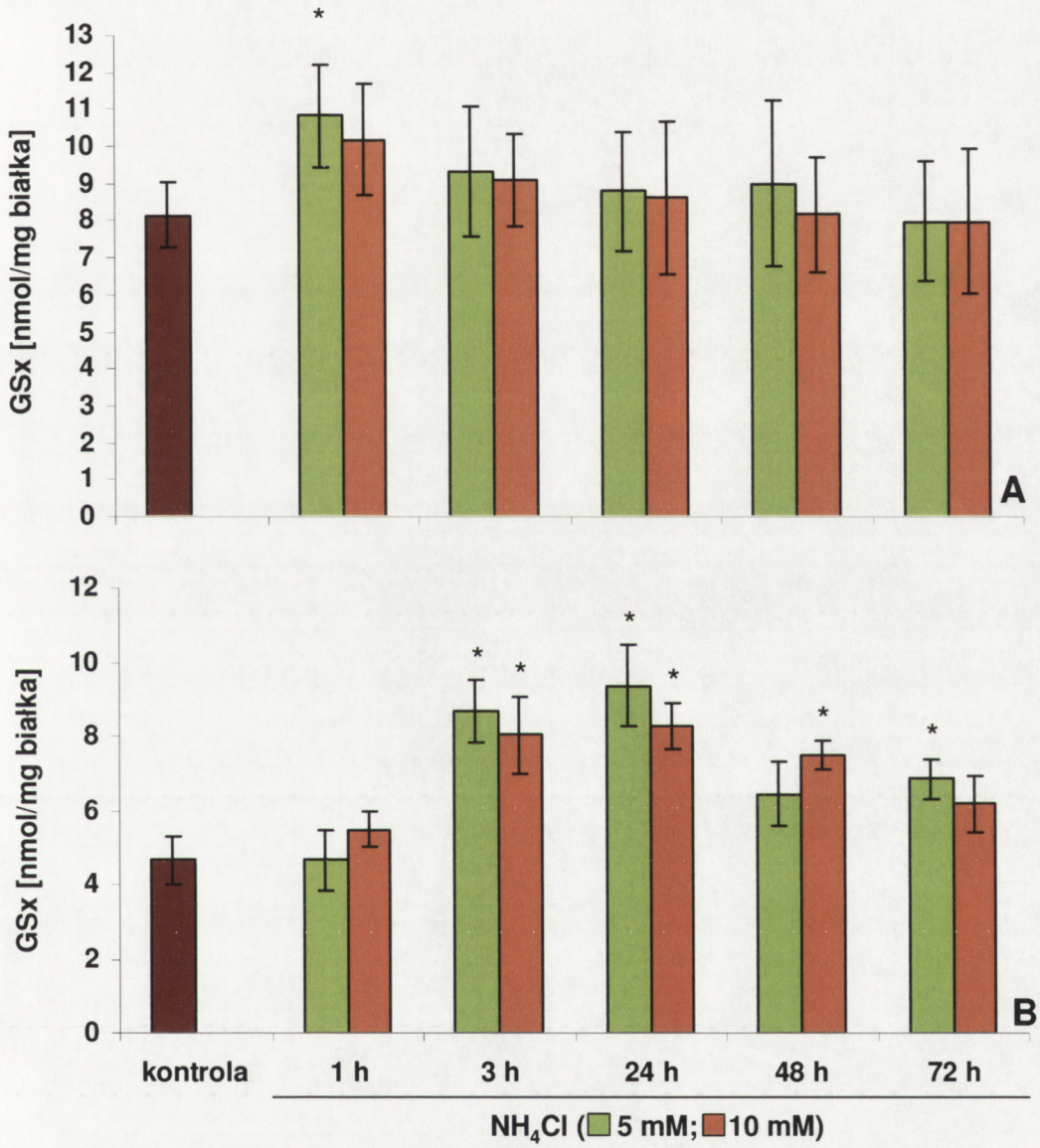
Rys. V.17. Ekspresja mRNA dla 4F2hc w komórkach glejaka C6 traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

V.3.4. Wpływ NH_4Cl na poziom glutationu zewnątrzkomórkowego

Z dotychczas opisanych wyników badań jasno wynika, że astrocyty oraz komórki C6 *in vitro* reagują na podwyższone stężenia amoniaku, zwiększając aktywność procesów związanych z syntezą glutationu, natomiast neurony w takich warunkach charakteryzują się obniżoną wewnątrzkomórkową zawartością tego związku, co prawdopodobnie wynika z braku prekursorów do jego syntezy w pożywce hodowlanej. Aby sprawdzić, czy w komórkach glejowych, obok aktywacji

http://rcin.org.pl

mechanizmów zapewniających wzrost poziomu glutationu wewnątrzkomórkowego, następuje również aktywacja procesów, które mogłyby prowadzić do zwiększenia prekursorów dla neuronalnej syntezy GSH (por. **rozdz. II.3.2**), zbadano wpływ amoniaku na zewnątrzkomórkowe stężenia GSx oraz aktywność γGT.

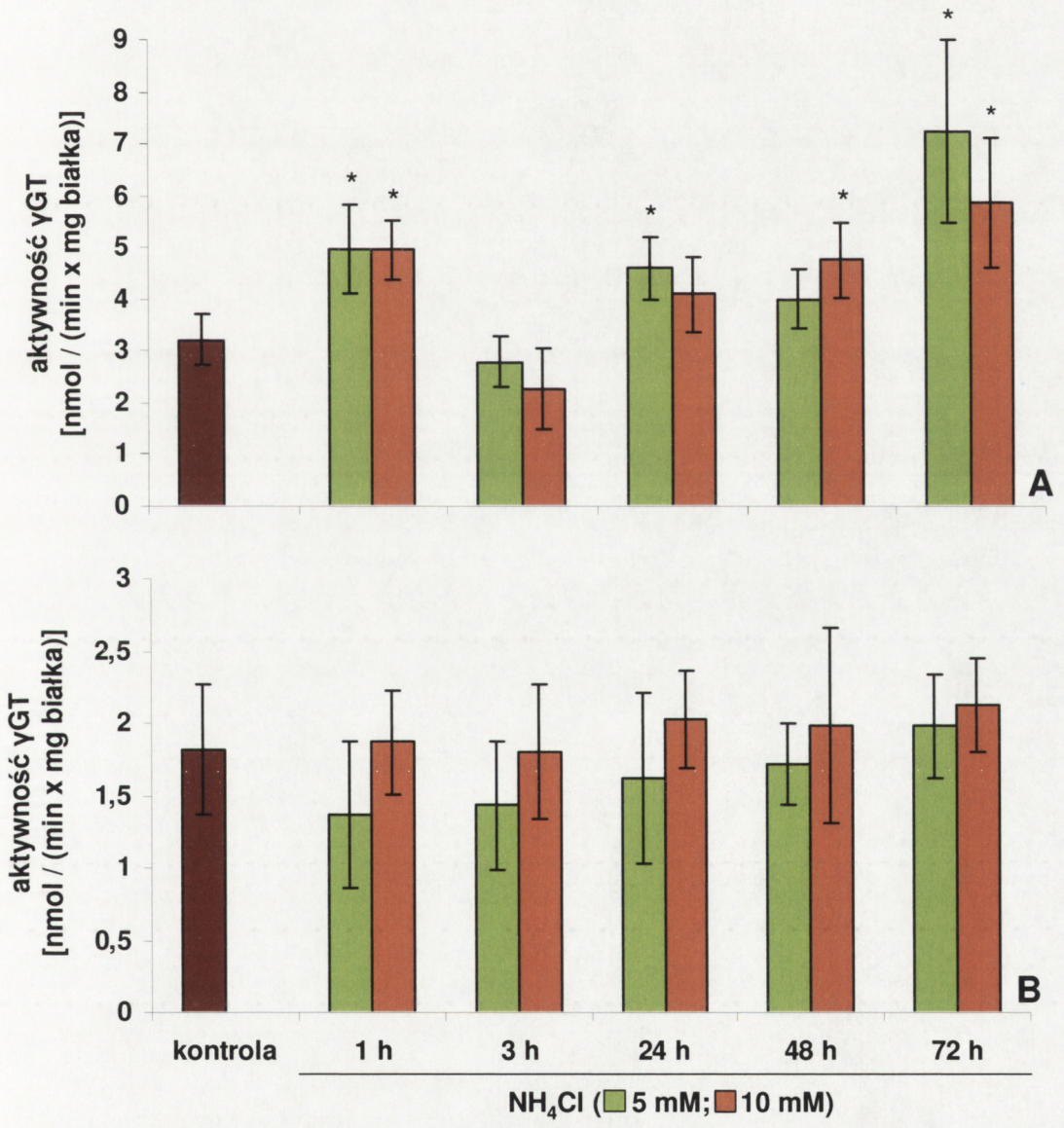


Rys. V.18. Zawartość zewnątrzkomórkowego glutationu w hodowlach pierwotnych astrocytów (A) oraz w hodowlach komórek glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

Wykazano, że traktowanie astrocytów pierwotnych chlorkiem amonu powodowało nieznaczny wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu GSx po 1 h (o nieco ponad 30% po użyciu 5 mM NH_4Cl), ale w przypadku dłuższych czasów

http://rcin.org.pl

inkubacji nie wywoływało żadnych zmian (**rys. V.18A**). Natomiast komórki glejaka C6, które charakteryzowały się wyjściowo prawie 2-krotnie niższym poziomem GSx zewnątrzkomórkowego okazały się bardziej wrażliwe na NH_4Cl. Zawartość glutationu w pożywce w hodowlach inkubowanych z chlorkiem amonu wzrastała 2-krotnie po 3 h, utrzymywała się na tym poziomie również po 24 h, po czym nieco spadała, ale nadal przewyższała zawartość wyjściową po 48 h i 72 h (**rys. V.18B**).



Rys. V.19. Aktywność γGT w astrocytach pierwotnych (A) oraz w komórkach glejaka C6 (B) traktowanych NH_4Cl. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń ± odchylenie standardowe. *p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya)

http://rcin.org.pl

Inną prawidłowość zaobserwowano badając aktywność γGT: w astrocytach wykazano wzrost tego parametru po inkubacji komórek z NH_4Cl (po 1 h, 24 h i 48 h o około 50%, zaś po 72 h o ponad 120%) (**rys. V.19A**), natomiast komórki C6 okazały się pod tym względem niewrażliwe na amoniak (**rys. V.19B**).

http://rcin.org.pl

VI. DYSKUSJA

Stres oksydacyjny jest uznawany za istotny element w mechanizmie neurotoksyczności amoniaku (por. **rozdz. II.2.7**), jednak procesy zaangażowane w przeciwdziałanie nadmiernej produkcji ROS w komórkach OUN w tych warunkach nie są jak dotąd dokładnie poznane. Jednym z najważniejszych komórkowych przeciwutleniaczy jest glutation, którego metabolizm, w warunkach stresu oksydacyjnego, może na wielu etapach podlegać regulacji, tak aby zapewnić komórce zwiększony potencjał antyoksydacyjny. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy w warunkach hiperamonemii takie zjawisko również występuje, przeprowadzono szereg doświadczeń, w których zbadano wpływ chlorku amonu w stężeniach zbliżonych do stężeń amoniaku obserwowanych w OUN zwierząt z eksperymentalnie wywołaną encefalopatią wątrobową [Giguere i Butterworth, 1984] na różne aspekty metabolizmu glutationu w mózgu szczura *in vivo*, oraz w hodowlach komórkowych *in vitro*.

VI.1. Glutation w warunkach hiperamonemii w mózgu *in vivo*

Badania z użyciem metody mikrodializy pozwoliły określić zmiany stężenia zewnątrzkomórkowego glutationu całkowitego w warunkach krótkotrwałego (40 min.), bezpośredniego oddziaływania amoniaku na prążkowie oraz korę przedczołową w mózgu szczura. Zaobserwowano, że w takich warunkach zawartość GSx w mikrodializatach z prążkowia wykazywała tendencję do wzrostu (**rys. V.1**), a z kory - wzrastała w sposób statystycznie znamienny (**rys. V.2**), zaś wzrost ten był całkowicie uzależniony od astrocytów (**rys. V.3**). Zwiększenie zewnątrzkomórkowego poziomu GSx może stanowić efekt dezaktywacji enzymu degradującego glutation, γGT, lub może być spowodowane wzrostem wypływu GSH lub GSSG z komórek. Z dostępnych danych dotyczących γGT w hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej w OUN szczurów *in vivo* wynika, że aktywność tego enzymu nie ulega obniżeniu w takich warunkach, a często jest nawet zwiększana. Podniesioną aktywność γGT obserwowano w synaptosomach i mikronaczyniach izolowanych z mózgów zwierząt traktowanych TAA, natomiast astrocytarny enzym nie wykazywał w tym modelu żadnych zmian [Stastný i wsp., 1988]. Również wywołanie ostrej lub przewlekłej hiperamonemii u szczurów poprzez podawanie octanu amonu skutkowało w wielu badanych ośrodkach mózgu

http://rcin.org.pl

wzrostem lub brakiem zmian (m.in. w korze), ale nigdy zmniejszeniem aktywności γGT [Hilgier i wsp., 1990]. W niniejszej rozprawie przedstawiono natomiast wyniki badań nad γGT w komórkach glejowych *in vitro*, które, podobnie jak powyżej przytoczone nie wskazują na hamowanie aktywności tego enzymu przez amoniak (**rys. V.19**). W świetle tych danych można założyć, że obserwowany wzrost zewnątrzkomórkowego glutationu jest raczej efektem zwiększenia wypływu tego związku z komórek.

Prace opisujące metabolizm glutationu w OUN w hiperamonemii *in vivo* są nieliczne (a tych dotyczących glutationu zewnątrzkomórkowego, za wyjątkiem danych przedstawionych w niniejszej rozprawie, jak dotąd nie ma) i nie dają jednoznacznego obrazu zmian zachodzących w tych warunkach. Kosenko i wsp. zaobserwowali, że podanie szczurom wysokich dawek octanu amonu skutkowało spadkiem aktywności GPx i obniżeniem stosunku GSH/GSSG w ich mózgach [Kosenko i wsp., 1997; Kosenko i wsp., 1998]. Inne badania na szczurach z hiperamonemią ostrą i przewlekłą wywołaną podawaniem CH_3COONH_4 wykazały w korze mózgowej i w móżdżku brak zmian poziomu glutationu i niewielkie wahania aktywności i ekspresji GPx i GR (w zależności od zastosowanej procedury i badanego ośrodka mózgu), zazwyczaj nie osiągające znamienności statystycznej w porównaniu z kontrolą [Singh i wsp., 2008]. W kolejnych doświadczeniach wykazywano wzrost zawartości glutationu w OUN. U młodych (14-dniowych) szczurów, po podaniu octanu amonu zaobserwowano zwiększenie poziomu GSx w mózgu o 28% i brak zmian stosunku GSH/GSSG. Nie stwierdzono tu też wzrostu generacji ROS ani zwiększenia peroksydacji lipidów [García i wsp., 2004]. Te dane mogą świadczyć o skutecznej aktywacji systemu obrony przeciwoksydacyjnej, w którym istotną rolę mógłby odgrywać glutation. Znaczący wzrost glutationu obserwowano również w korze mózgowej i móżdżku u dorosłych szczurów z encefalopatią wątrobową wywołaną TAA. U takich zwierząt wykazano ponadto obniżenie (około 2-krotne) stosunku GSH/GSSG i nieznaczne spadki aktywności GPx (o około 10%) i GR (o około 10% - 20%) [Sathyasaikumar i wsp., 2007b]. Pomimo pewnych rozbieżności, z powyżej przytoczonych danych można wywnioskować, że hiperamonemia skutkuje w OUN *in vivo* zwiększeniem zawartości glutationu (prawdopodobnie poprzez wzrost jego syntezy), oraz spadkiem stosunku GSH/GSSG (pomimo opisywanego w niektórych pracach spadku aktywności GPx). Oba te zjawiska mogą świadczyć o zaangażowaniu glutationu w przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez amoniak. Oba również mogą skutkować zwiększonym wypływem glutationu z komórek, który zaobserwowano w badaniach z użyciem metody mikrodializy

http://rcin.org.pl

opisanych w niniejszej rozprawie. Jednak, aby wyjaśnić istotę tego procesu niezbędne byłoby ustalenie, której formy glutationu (zredukowanej czy utlenionej) wypływ jest wzmagany w warunkach hiperamonemii. Wzrost wypływu GSSG mógłby przeciwdziałać dalszemu spadkowi wewnątrzkomórkowego glutationowego stanu redoks i wzmacniałby w ten sposób potencjał antyoksydacyjny [Hirrlinger i Dringen, 2005], natomiast wzrost wypływu GSH z astrocytów skutkowałby zwiększeniem dostępności prekursorów dla neuronalnej syntezy glutationu w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na ten przeciwutleniacz (por. **rozdz. II.3.2** i **rozdz. II.3.4**). Jednak w warunkach *in vivo*, zewnątrzkomórkowy stosunek GSH/GSSG nie jest proporcjonalny do udziału obu tych form w procesie wypływu glutationu z komórek, ze względu na szybkie utlenianie GSH. Przyjmuje się, że poza komórką stan redoks glutationu nie jest tak ściśle kontrolowany jak w komórce, mimo, że w CSF obserwuje się aktywność GR i GPx [Calabrese i wsp., 1994]. Wprawdzie na podstawie badań *in vitro* wysunięto hipotezę, że astrocyty wraz z GSH mogą uwalniać dysmutazę ponadtlenkową (SOD), która poprzez usuwanie zewnątrzkomórkowego O_2^- miałaby zapobiegać utlenieniu GSH [Stewart i wsp., 2002], jednak hipoteza ta nie znajduje potwierdzenia w innych badaniach. Jeżeli jednak któryś z tych mechanizmów byłby rzeczywiście w stanie utrzymywać glutation w przestrzeni pozakomórkowej w formie, w jakiej został on usunięty z komórki, to i tak ostatecznie w mikrodializatach następowałoby spontaniczne utlenienie GSH, ponieważ błona mikrodializacyjna nie jest przepuszczalna dla tak dużych białek jak GR, GPx i SOD. Dlatego też w dalszej procedurze użyto DTT (por. **rozdz. IV.4.1**), czynnika redukującego dwusiarczki, który powodował przekształcenie wszystkich form glutationu w GSH, co pozwoliło na oznaczenie całkowitej puli tego związku, bez rozróżniania na jego formę zredukowaną i utlenioną.

Podsumowując ten rozdział, można założyć, że zaobserwowana po podaniu NH_4Cl zwiększona zawartość GSx w mikrodializatach stanowi najprawdopodobniej efekt wzrostu wypływu tego związku z astrocytów w następstwie aktywacji jego wewnątrzkomórkowego metabolizmu (wzmożonej syntezy lub/i zwiększonego zużywania w procesie redukcji nadtlenków).

http://rcin.org.pl

VI.2. Metabolizm glutationu w warunkach hiperamonemii w hodowlach komórkowych *in vitro*

VI.2.1. Neurony

Pomiary poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu w hodowlach pierwotnych neuronów wykazały jego spadek po 24 h i 48 h inkubacji z wysokimi stężeniami NH_4Cl (**rys. V.4B**). W takich warunkach zaobserwowano również wzrost śmiertelności neuronów (**rys. V.4A**). Jednak podanie do hodowli neuronów BSO, inhibitora GCL, w stężeniu takim, jakie skutkowało spadkiem zawartości GSx porównywalnym ze spadkiem wywoływanym przez 24-godzinną inkubację z 10 mM NH_4Cl, nie powodowało zmian w przeżywalności komórek (**rys. V.5**), co mogłoby świadczyć o tym, że wywołana przez NH_4Cl śmiertelność neuronów nie jest efektem obniżenia zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu. Tymczasem zastosowanie prekursora glutationu, GEE, który zapobiegał spadkowi poziomu GSx w neuronach traktowanych 10 mM NH_4Cl, zapobiegało również wzrostowi śmiertelności tych komórek w takich warunkach (**rys. V.6**). Wyniki te można zinterpretować w ten sposób, że w warunkach kontrolnych, w których nie ma tak wysokiego natężenia czynników patogennych (m. in. ROS) jak w hiperamonemii, obniżenie zawartości glutationu nawet do poziomu, jaki obserwuje się po inkubacji z NH_4Cl, nie wywołuje zmian w przeżywalności neuronów, ponieważ ta pula GSx, która pozostaje w komórce, całkowicie wystarcza do utrzymania prawidłowego funkcjonowania systemu glutationowego. Natomiast po inkubacji z NH_4Cl, gdy w warunkach stresu oksydacyjnego wzrasta zapotrzebowanie na glutation, spadek poziomu tego przeciwutleniacza może przekładać się na zwiększenie śmiertelności komórek. Zatem GEE, zapobiegając obniżeniu zawartości GSx w neuronach, zaspokajałby zapotrzebowanie na zwiększoną obronę antyoksydacyjną w tych warunkach, co prowadziłoby do poprawienia przeżywalności komórek.

W neuronach, na których prowadzono badania, poziom glutationu był zależny od relacji między jego syntezą a uwalnianiem: spadek zawartości wewnątrzkomórkowego GSx pod wpływem BSO świadczy o zachodzeniu obydwu tych procesów (**rys. V.5A**). Zaskakująca wydawać się może wielkość tego spadku (o 40% po 24 h inkubacji z BSO), która wskazuje na wydajną syntezę GSH *de novo* w warunkach kontrolnych w badanych komórkach. Przyjmuje się bowiem, że synteza glutationu w hodowlach pierwotnych neuronów wyjściowo jest bardzo nieznaczna, ze względu na brak w pożywce hodowlanej Cys, która jest uważana za prekursor determinujący syntezę neuronalnego GSH (por. **rozdz. II.3.2**). Nie można

http://rcin.org.pl

wykluczyć jednak, że w hodowlach, których używano do badań, mogły znajdować się również niewielkie ilości astrocytów, które zaopatrywały neurony w prekursory do syntezy glutationu. Wprawdzie w hodowlach przygotowywanych w ten sposób neurony stanowią ponad 90% komórek [Hetman i wsp., 1999], ale istnieją dane wskazujące, że bardzo mały (2%) udział astrocytów może znacząco poprawiać metabolizm glutationu w neuronach [Shih i wsp., 2003]. Ponadto, pomimo, że przyjmuje się, że neurony *in vitro* raczej nie pobierają CySS lub pobierają ją z bardzo małą wydajnością, istnieją pojedyncze doniesienia, które zaprzeczają temu założeniu. Transport CySS do komórek przy udziale układu o właściwościach antyportera x_c^- obserwowano m.in. w hodowlach neuronów hipokampalnych [Allen i wsp., 2001], oraz w hodowlach niedojrzałych neuronów korowych [Murphy i wsp., 1990]. Być może zatem, któryś z powyższych mechanizmów odpowiadał za dostarczanie Cys lub CySS do opisanej w niniejszej pracy syntezy neuronalnego GSH. Dostępność prekursorów, w każdym bądź razie, była wystarczająca, aby podtrzymać syntezę glutationu, na poziomie który równoważył jego wypływ, co w sumie zapewniało utrzymanie wewnątrzkomórkowej zawartości tego związku na stałym poziomie w warunkach kontrolnych a także po inkubacji z niższymi stężeniami NH_4Cl. Dopiero wyższe (5 mM i 10 mM) stężenia NH_4Cl zaburzały tę równowagę i prowadziły do spadku GSx (**rys. V.4B**). Amoniak wydaje się w tym przypadku przede wszystkim hamować syntezę GSH, na co wskazuje spostrzeżenie, że potraktowanie komórek BSO łącznie z NH_4Cl nie skutkowało większym spadkiem zawartości GSx niż obserwowany po inkubacji z samym NH_4Cl (**rys. V.5B**). Zmniejszenie syntezy GSH mogło z kolei przyczyniać się do spadku stosunku GSH/GSSG obserwowanego w tych warunkach (**rys. V.4C**), choć przyczyną tego zjawiska niewątpliwie było również zwiększenie utleniania GSH do GSSG w procesie redukcji nadtlenków powstających w tych warunkach.

VI.2.2. Astrocyty i komórki glejaka C6

Okres półtrwania glutationu w astrocytach w hodowlach wynosi około 5 h [Devesa i wsp., 1993], zatem wewnątrzkomórkowa zawartość tego związku zależy od jego syntezy i uwalniania. Standardowe pożywki zawierają m.in. CySS, Gly, Gln i Glc - składniki, które zapewniają wydajną syntezę GSH [Dringen i Hamprecht, 1996]. W astrocytach *in vitro* obserwuje się również stały wypływ glutationu z komórek [Yudkoff i wsp., 1990], który w warunkach kontrolnych równoważy jego syntezę, co zapewnia utrzymanie wewnątrzkomórkowego GSx na stałym poziomie. Rozmaite czynniki mogą wpływać na któryś z tych procesów (lub na oba naraz),

http://rcin.org.pl

prowadząc do zmian zawartości glutationu w komórkach. W niniejszej pracy wykazano, że potraktowanie hodowli komórek glejowych (astrocytów pierwotnych oraz komórek glejaka C6) wysokimi stężeniami NH_4Cl skutkowało, w przeciwieństwie do hodowli pierwotnych neuronów, wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu całkowitego (**rys. V.8**). Ten wzrost zawartości był najprawdopodobniej spowodowany zwiększeniem syntezy GSH, na co wskazują kolejne obserwacje: wzrost pobierania prekursora syntezy glutationu, CySS (**rys. V.11**), wzrost ekspresji mRNA dla transporterów zaangażowanych w ten proces (**rys. V.16, rys V.17**), wzrost ekspresji mRNA dla podjednostki ciężkiej GCL (**rys. V.15**) oraz brak zmian (w hodowlach pierwotnych astrocytów; **rys. V.18A**) i wzrost (w hodowlach komórek glejaka C6; **rys. V.18B**) poziomu zewnątrzkomórkowego GSx.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że komórki glejowe reagowały na toksyczne działanie amoniaku, aktywując metabolizm glutationu na kilku jego etapach (pobieranie CySS, synteza GSH, aktywność γGT, wypływ glutationu z komórki). Taką skoordynowaną odpowiedź obserwuje się często w różnych modelach stresu oksydacyjnego. Wykazano m.in., że podanie do hodowli pierwotnych astrocytów oksydazy glukozowej i Glc, skutkujące znaczącym zwiększeniem produkcji H_2O_2 i peroksydacji lipidów, wywoływało również 3-krotny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego GSx (który osiągał wartość aż 150 nmol/mg białka) i 4-krotny wzrost szybkości pobierania CySS i uwalniania glutationu [Sagara i wsp., 1996]. Te wartości pokazują, że system glutationowy w astrocytach pierwotnych ma możliwość znacznie silniejszej reakcji na stres oksydacyjny niż ta obserwowana w badaniach, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie. Może to oznaczać, że stres oksydacyjny wywołany przez inkubację komórek z 5 mM lub 10 mM NH_4Cl nie jest na tyle silny, aby spowodować maksymalną aktywację metabolizmu glutationu. Z drugiej strony nie można jednak wykluczyć, że astrocyty, w których amoniak, poza zwiększoną produkcją wolnych rodników wywołuje szereg innych zaburzeń, nie są w stanie już bardziej zwiększyć antyoksydacyjnego potencjału glutationowego, choćby ze względu na obserwowany w tych warunkach spadek metabolizmu energetycznego i niedobór ATP (por. **rozdz. II.2.4**), który jest niezbędny na obydwu etapach syntezy GSH *de novo* (por. **rozdz. II.3.1**).

Zwiększonej syntezie glutationu pod wpływem inkubacji z NH_4Cl towarzyszyła zwiększona ekspresja mRNA dla podjednostki ciężkiej ligazy glutaminianowo-cysteinowej w obu badanych modelach komórek glejowych (**rys. V.15**). Taki mechanizm był obserwowany również w warunkach stresu

http://rcin.org.pl

oksydacyjnego wywołanego traktowaniem komórek H_2O_2. Iwata-Ichikawa i wsp. wykazali wzrost ekspresji (o około 50%) mRNA i białka GCL-HS, a także (o około 70%) wewnątrzkomórkowego poziomu GSH po inkubacji astrocytów pierwotnych z H_2O_2. Co ważne, nie zaobserwowali w tych warunkach zmian aktywności dwóch innych badanych enzymów związanych z obroną antyoksydacyjną: SOD oraz katalazy [Iwata-Ichikawa i wsp., 1999]. Spostrzeżenia te mogą wydawać się zaskakująca szczególnie w przypadku katalazy, która odpowiada za redukcję właśnie H_2O_2, ale wskazują zarazem na centralną rolę jaką pełni glutation i powiązane z nim enzymy w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu w komórkach glejowych *in vitro*. Taka sytuacja może przekładać się na warunki w mózgu *in vivo*, gdzie również wykazano dużo większe znaczenie systemu glutationowego niż katalazy w obronie antyoksydacyjnej [Flohe, 1999; Tureen, 2003]. Zatem zwiększenie syntezy glutationu w komórkach glejowych mogłoby być podstawą reakcji obrony przed stresem oksydacyjnym w OUN w warunkach hiperamonemii.

Drugim, obok wzrostu ekspresji mRNA dla GCL-HS, zjawiskiem mogącym przyczyniać się do zwiększenia poziomu wewnątrzkomórkowego GSx było przyspieszenie pobierania CySS, które obserwowano w obu typach badanych komórek po inkubacji z 5 mM i 10 mM NH_4Cl. W przypadku astrocytów pierwotnych aktywacja tego procesu następowała już po 1 h i w tym punkcie czasowym szybkość wychwytu CySS była najwyższa (**rys. V.11A**). Nie korelowało to jednak z poziomem GSx wewnątrzkomórkowego, który wprawdzie był zwiększony w porównaniu z kontrolą, ale nie osiągał tak wysokich wartości, jak po dłuższych inkubacjach z NH_4Cl (**rys. V.8A**), kiedy szybkość transportu CySS nie była już tak duża, choć nadal była wyższa niż w warunkach kontrolnych. Należy jednak zauważyć, że po 1 h traktowania NH_4Cl zwiększony był poziom glutationu zewnątrzkomórkowego (**rys. V.18A**) i to pomimo wzrostu aktywności γGT (**rys. V.19A**), co mogłoby wskazywać na to, że synteza GSH była wyższa niż wynikałoby to z zawartości wewnątrzkomórkowego GSx. W pozostałych punktach czasowych, kiedy już nie obserwowano zmian zawartości GSx w pożywce, w której hodowano astrocyty, poziom wewnątrzkomórkowego glutationu był skorelowany z szybkością wychwytu CySS. W hodowlach komórek glejaka C6 aż tak ścisłej współzależności między tymi dwoma parametrami jak w astrocytach nie dało się zaobserwować, choć zazwyczaj wzrostowi zawartości GSx (**rys. V.8B**) towarzyszył wzrost transportu CySS (**rys. V.11B**). Natomiast w obu typach komórek zaobserwowano, że amoniak aktywuje transport CySS zwiększając V_{max} dla tego procesu i nie zmieniając K_m (**tab. V.1**).

http://rcin.org.pl

Omawiane wyniki wskazują na istotne różnice w udziale układów X_{AG}^- i x_c^- w pobieraniu CySS przez oba badane modele komórek glejowych *in vitro*. Wykazano, że astrocyty pierwotne angażują do tego procesu prawie wyłącznie transportery z układu X_{AG}^- (**rys. V.12A, rys. V.13A, rys. V.15A**), natomiast komórki glejaka C6 – oba systemy transportujące, przy czym większą aktywność wykazuje w nich antyporter x_c^- (**rys. V.12B, rys. V.13B, rys. V.14B**). Większość z dostępnych danych literaturowych pokrywa się z tymi spostrzeżeniami [Kato i wsp., 1992; Mawatari i wsp., 1996; Bender i wsp., 2000; Gochenauer i Robinson, 2001], choć są i takie, które wskazują na znacznie wyższy udział antyportera x_c^- w pobieraniu CySS przez astrocyty *in vitro* [Shanker i Aschner, 2001; Shih i wsp., 2003]. Jednak w przypadku hodowli astrocytów pierwotnych używanych do badań opisanych w niniejszej rozprawie, Na^+-niezależny transport tego aminokwasu stanowił tylko około 6% transportu całkowitego, a inkubacja z NH_4Cl nie powodowała istotnych zmian tego udziału (**rys. V.14A**). Interesujące wydają się wyniki doświadczeń z użyciem komórek C6, w przypadku których obserwowano proporcjonalny wzrost pobierania CySS przez oba systemy transportujące (**rys. V.14B**). Mogłoby to wskazywać na wspólny szlak sygnałowy, który w odpowiedzi na podwyższone stężenie amoniaku aktywowałby oba typy transporterów w tych komórkach.

Badania ekspresji genów transporterów odgrywających główną rolę w pobieraniu CySS przez oba typy komórek wykazały, że inkubacja z NH_4Cl skutkowała wzrostem zawartości mRNA dla GLT1 w astrocytach pierwotnych (**rys. V.16B**) oraz dla 4F2hc (łańcucha ciężkiego antyportera x_c^-) w komórkach glejaka C6 (**rys. V.17**), jednak wzrost ten nie był ściśle skorelowany ze zwiększoną szybkością transportu CySS (**rys. V.11**). Po 1 h inkubacji z NH_4Cl, pomimo braku zmian ekspresji GLT1 (w astrocytach pierwotnych) i 4F2hc (w komórkach C6), w obu tych typach komórek obserwowano zwiększone pobieranie CySS. Może to świadczyć o tym, że w pierwszej fazie reakcji komórek glejowych *in vitro* na amoniak, wzrost szybkości transportu CySS opiera się na mechanizmie nie angażującym dodatkowej ekspresji transporterów, która jednak staje się niezbędna przy dłużej utrzymującym się zwiększonym zapotrzebowanie na ten aminokwas. Obserwowane w astrocytach pierwotnych: nadekspresja mRNA dla GLT1 i brak zmian ekspresji mRNA dla GLAST (**rys. V.16**) są jednak zaskakujące w świetle dotychczasowej wiedzy o tych transporterach, bowiem na ogół notuje się spadek ich ekspresji pod wpływem amoniaku *in vitro* i *in vivo* [Knecht i wsp., 1997; Norenberg i wsp., 1997; Zhou i Norenberg, 1999; Chan i wsp., 2000], chociaż nie zawsze taka reakcja jest obserwowana – np. w móżdżku szczurów z zespoleniem wrotno-czczym wykazano wzrost zawartości zarówno GLAST jak i GLT1 [Suárez i

http://rcin.org.pl

wsp., 2000], natomiast w korze mózgowej szczurów traktowanych octanem amonu - brak zmian ekspresji tego drugiego transportera [Tanigami i wsp., 2005]. Niemniej jednak wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są sprzeczne z większością dotychczas opublikowanych prac na ten temat. Ta rozbieżność może po części wynikać z trudnych do zidentyfikowania różnic w procesie hodowania komórek. Również fakt użycia w PCR starterów o innych sekwencjach mógł mieć jakiś wpływ na odmienne wyniki doświadczeń przedstawionych w niniejszej rozprawie i opisanych w cytowanych powyżej pracach. Natomiast obserwowany w komórkach C6 wzrost zawartości mRNA dla 4F2hc pod wpływem inkubacji z NH_4Cl jest już zjawiskiem znajdującym odzwierciedlenie w licznych pracach dotyczących roli antyportera x_c^- w obronie przeciwoksydacyjnej. Wzrost ekspresji jego podjednostek jest uznawany za istotny element aktywacji systemu glutationowego w takich warunkach i obserwowany jest w różnych modelach komórek glejowych [Sagara i wsp., 1993; Shih i wsp., 2003; Tomi i wsp., 2003]. Obecność antyportera x_c^- stwierdza się w wielu ośrodkach mózgu, m. in. w korze, hipokampie, móżdżku, oraz prążkowiu [Shih i wsp., 2006], ponadto obserwuje się bardzo dużą jego aktywność w świeżo izolowanych komórkach z OUN zarodków szczurzych [Sagara i wsp., 1993]. Te spostrzeżenia wraz z obserwacją, że lokalizacja GLAST i GLT w mózgu ogranicza się prawie wyłącznie do synaps glutaminianergicznych [Rothstein i wsp., 1994], gdzie CySS musiałaby konkurować o dokomórkowy transport z Glu, nasuwają przypuszczenie, że x_c^- odgrywa *in vivo* znacznie ważniejszą rolę w pobieraniu CySS niż transportery z rodziny X_{AG}^-. Potwierdza to więc zasadność użycia w badaniach opisanych w niniejszej pracy, drugiego, obok astrocytów pierwotnych modelu komórek glejowych *in vitro* - komórek glejaka C6, w których mechanizm transportu CySS wydaje się być bardziej zbliżony do tego, jaki występuje w OUN *in vivo*.

Kolejnym parametrem, który zbadano, był stan redoks glutationu. W warunkach kontrolnych udział GSSG w całkowitej wewnątrzkomórkowej puli tego związku był niewielki w obu typach badanych komórek (poniżej 1%), co jest zgodne z dotychczas opublikowanymi danymi [Dringen i Hamprecht, 1996; García-Nogales i wsp., 1999]. Zmiany stosunku GSH/GSSG wywołane przez amoniak przybierały inny charakter w astrocytach i w komórkach C6. W tych pierwszych, już po 1 h traktowania NH_4Cl obserwowano 2-krotny spadek tego wskaźnika. (**rys. V.9A**). Zjawisko to, wraz z obserwacją, że amoniak nie zmniejsza aktywności G6PDH (**rys. V.10A**), może świadczyć o wywoływanym w tych warunkach stresie oksydacyjnym, a także o zaangażowaniu systemu glutationowego w obronę przed tym stresem poprzez aktywność GPx [Liddell i wsp., 2006b]. Zwiększenie syntezy

http://rcin.org.pl

GSH na tym etapie (**rys. V.8A**) nie było wystarczające, aby utrzymać stosunek GSH/GSSG na wyjściowym poziomie - po 3 h inkubacji komórek z NH_4Cl jego spadek znacząco się pogłębiał i osiągał on w tym punkcie czasowym wartość około 16-krotnie niższą niż obserwowana w warunkach kontrolnych. Być może tak istotne obniżenie glutationowego potencjału redoks stanowiło sygnał do dodatkowego zwiększenia syntezy GSH *de novo*, które obserwowano po 24 h traktowania astrocytów NH_4Cl. Wiadomo bowiem, że zmiany wewnątrzkomórkowego stosunku GSH/GSSG mogą wpływać na ekspresję i aktywność różnych czynników transkrypcyjnych, m.in. AP-1 [Bergelson i wsp., 1994], i NFκB [Li i wsp., 2000], które regulują ekspresję GCL [Malone i Hernandez, 2007; Nagashima i wsp., 2007]. Zatem, podsumowując, obserwowany w astrocytach pierwotnych, po 24 h traktowania NH_4Cl, wzrost glutationowego potencjału redoks (w porównaniu do inkubacji 3-godzinnej) mógł być skutkiem wzmożonej syntezy GSH (**rys. V.8A**) wywołanej zwiększeniem zawartości GCL-HS, które poprzedzone było obserwowaną po 3 h inkubacji z NH_4Cl nadekspresją mRNA dla tego białka, (**rys. V.15A**) do której z kolei sygnał stanowił znaczący spadek stosunku GSH/GSSG (**rys. V.9A**). Jednak ta aktywacja nie dawała trwałego rezultatu w postaci utrzymania stanu redoks glutationu na niezmienionym poziomie – w następnych punktach czasowych (48 h i 72 h) obserwowano stopniowe obniżanie tego parametru pomimo zwiększonej syntezy GSH *de novo*. Należy dodatkowo odnotować, że astrocyty pierwotne traktowane NH_4Cl prawdopodobnie nie zwiększają uwalniania GSSG z komórki. Reakcję taką obserwuje się nieraz w stresie oksydacyjnym i uznaje się ją za mechanizm zapobiegający spadkowi stosunku GSH/GSSG w takich warunkach [Hirrlinger i wsp., 2001]. Jednak w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zaobserwowano, że poziom zewnątrzkomórkowego glutationu w hodowlach pierwotnych astrocytów traktowanych NH_4Cl nie zmieniał się w badanych punktach czasowych (oprócz 1 h) (**rys. V.18A**), pomimo, że wewnątrzkomórkowy potencjał redoks glutationu podlegał bardzo znaczącym wahaniom. Komórki glejaka C6 wydają się być wyposażone w znacznie skuteczniejsze mechanizmy obrony przed spadkiem stosunku GSH/GSSG w wyniku traktowania NH_4Cl. Wyjściowa zawartość GSx wewnątrzkomórkowego była w nich o 40% wyższa niż w astrocytach pierwotnych (**rys. V.8**), a spadek glutationowego potencjału redoks następował dopiero po 24 h inkubacji z NH_4Cl (**rys. V.9B**). Wtedy też obserwowano wzrost syntezy GSx *de novo*, który wydawał się skutecznie przeciwdziałać temu zjawisku, ponieważ po 48 h stosunek GSH/GSSG był wyższy niż po 24 h, a po 72 h powracał do poziomu wyjściowego. W komórkach C6, w wyniku spadku glutationowego potencjału

http://rcin.org.pl

redoks, zwiększany mógł być również eksport GSSG z komórki, o czym może świadczyć spostrzeżenie, że zawartość glutationu (**rys. V.18B**) w pożywce była odwrotnie proporcjonalna do wartości stosunku GSH/GSSG.

Z drugiej jednak strony, wzrost wypływu glutationu z komórek C6 mógł być tylko efektem jego zwiększonej syntezy, na co wskazuje korelacja poziomu GSx wewnątrzkomórkowego (**rys. V.8B**) i zewnątrzkomórkowego (**rys. V.18B**), przy braku jakichkolwiek zmian aktywności γGT (**rys. V.19B**). Taka interpretacja prowadziłaby do wniosku, że w komórkach C6 traktowanych NH_4Cl, proces uwalniania glutationu nie podlega żadnej regulacji i jest zależny tylko od wewnątrzkomórkowej zawartości tego związku. Odmiennych obserwacji dokonano w hodowlach astrocytów pierwotnych, gdzie nie wykazano zależności poziomu GSx zewnątrzkomórkowego (**rys. V.18A**) ani od poziomu GSx wewnątrzkomórkowego (**rys. V.8A**), ani od aktywności γGT (**rys. V.19A**). Pomimo wywołanych traktowaniem NH_4Cl zmian tych dwóch parametrów, zawartość glutationu w pożywce utrzymywała się na stałym poziomie, za wyjątkiem inkubacji 1-godzinnej, kiedy obserwowano wzrost GSx zewnątrzkomórkowego w porównaniu z kontrolą. Wzrost ten następował, mimo, że w tym punkcie czasowym zwiększała się aktywność γGT, a wzrost GSx wewnątrzkomórkowego nie był tak wysoki jak po dłuższych inkubacjach z NH_4Cl (24 h – 72 h). Świadczyć to może o tym, że pierwsza faza aktywacji metabolizmu glutationu pod wpływem amoniaku w astrocytach może służyć zasileniu zewnątrzkomórkowej puli GSx, a zarazem zwiększeniu jego degradacji przez γGT. Aktywność tego enzymu była podniesiona we wszystkich badanych punktach czasowych (poza 3 h), choć nie powodowało to zmniejszenia zawartości GSx w pożywce, co nasuwa przypuszczenie, że uwalnianie glutationu z komórek było w tych warunkach wzmożone, choć nie do takiego stopnia jak po 1 h inkubacji z NH_4Cl. Wiadomo bowiem, że poza szybkością eksportu glutationu, również aktywność γGT odpowiada za poziom GSx zewnątrzkomórkowego – wykazano, że poziom ten wzrasta w hodowlach astrocytów pierwotnych po zastosowaniu acywicyny, inhibitora γGT [Dringen i wsp., 1997]. Dane dotyczące aktywności tego enzymu w hiperamonemii *in vivo* wskazują na jej wzrost w móżdżku i brak zmian w korze mózgowej szczurów traktowanych octanem amonu [Hilgier i wsp., 1990], a także wzrost w mikronaczyniach i synaptosomach izolowanych z mózgów szczurów traktowanych TAA [Stastný i wsp., 1988]. W tym drugim modelu nie obserwowano jednak zmian aktywności γGT w wyizolowanych komórkach glejowych.

http://rcin.org.pl

Podsumowując ten rozdział, można stwierdzić, że neurony pierwotne traktowane *in vitro* wysokimi stężeniami NH_4Cl nie są w stanie syntetyzować glutationu na tyle wydajnie, aby zapewnić utrzymanie jego wewnątrzkomórkowej zawartości na poziomie, który zaspokajałby zapotrzebowanie komórek na ten związek w takich warunkach, co może przyczyniać się do spadku glutationowego potencjału redoks, a także do zwiększenia śmiertelności komórek. Komórki glejowe natomiast, co wykazano w obu badanych modelach, pod wpływem amoniaku zwiększają wewnątrzkomórkową zawartość glutationu poprzez przyspieszenie pobierania jego prekursorów, a także wzrost ekspresji mRNA dla kluczowego enzymu biorącego udział w syntezie GSH. Ta aktywacja przynosi poprawę glutationowego stanu redoks (przejściową w astrocytach pierwotnych i trwałą w komórkach C6). Znaczące różnice między użytymi modelami komórek glejowych obserwuje się dopiero w zewnątrzkomórkowym metabolizmie glutationu – komórki glejaka C6, traktowane NH_4Cl, prawdopodobnie w żaden sposób go nie modyfikują, podczas gdy astrocyty pierwotne zwiększają w tych warunkach aktywność γGT, a także wzmagają uwalnianie glutationu do pożywki (przede wszystkim we wczesnej, 1-godzinnej fazie).

VI.3. Glutation w warunkach hiperamonemii w kontekście interakcji między astrocytami a neuronami w jego metabolizmie

Przyjmuje się, że neuronalna synteza glutationu jest w dużej mierze uzależniona od prekursorów dostarczanych przez astrocyty (por. **rozdz. II.3.2**). Zatem obserwowany wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości GSx w astrocytach pierwotnych oraz w komórkach C6 pod wpływem inkubacji z NH_4Cl (**rys. V.8**) mógłby nie tylko wzmacniać potencjał antyoksydacyjny w tych komórkach, ale również mógłby przyczyniać się do zwiększenia produkcji prekursorów do neuronalnej syntezy GSH. Założenie to potwierdzają obserwacje, że w tych warunkach wzrasta uwalnianie GSx (w przypadku komórek C6), a także aktywność γGT (w przypadku astrocytów pierwotnych). Oba te procesy uważa się za czynniki dostarczające do przestrzeni pozakomórkowej Cys (ewentualnie CysGly), która następnie może być pobierana przez neurony i tam wykorzystywana do syntezy GSH (por. **rozdz. II.3.2**). W tej interakcji pomiędzy tymi dwoma typami komórek kluczowym procesem jest stałe uwalnianie glutationu w zredukowanej formie przez astrocyty, ponieważ okres półtrwania Cys przed utlenieniem do CySS w pożywce hodowlanej wynosi 30 min. [Ishii i Bannai, 1985], zatem do efektywnego transportu tego aminokwasu do neuronów niezbędne jest ciągłe zasilanie jego

http://rcin.org.pl

zewnątrzkomórkowej puli poprzez hydrolizę GSH lub/i redukcję CySS przez tę formę glutationu.

Wielokrotnie wykazywano, że neurony w hodowlach mieszanych z astrocytami charakteryzują się znacznie wyższą zawartością glutationu niż komórki w czystych hodowlach neuronalnych [Sagara i wsp., 1993; Bolaños i wsp., 1996; Iwata-Ichikawa i wsp., 1999; Shih i wsp., 2003]. Zaobserwowano również, że w warunkach *in vitro* obecność Cys w pożywce jest ściśle uzależniona od pobierania CySS przez astrocyty [Sagara i wsp., 1993], zatem przyspieszenie tego procesu obserwowane w hodowlach komórek glejowych w wyniku inkubacji z NH_4Cl (**rys. V.11**) również może być elementem mechanizmu mającego zapewnić zwiększoną dostępność prekursorów do syntezy glutationu w neuronach. Ponadto wykazano, że czynniki uwalniane przez astrocyty mogą zwiększać ekspresję genów związanych z metabolizmem glutationu w neuronach w warunkach stresu oksydacyjnego: traktowanie neuronów H_2O_2 powodowało wzrost ekspresji GCL o 40%, ale tylko jeżeli wcześniej wymieniono im pożywkę na pobraną z hodowli astrocytów pierwotnych [Iwata-Ichikawa i wsp., 1999]. Brak takiego mechanizmu w neuronach hodowanych przy nieobecności astrocytów może dodatkowo przyczyniać się do obserwowanego w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie spadku zawartości glutationu w tych komórkach pod wpływem amoniaku (**rys. V.4B**). Rolę astrocytów w ochronie neuronów przed toksycznością amoniaku wykazano przy użyciu mieszanych hodowli pierwotnych tych komórek. Rama Rao i wsp. zaobserwowali, że liczne zaburzenia, które pojawiają się w czystych hodowlach neuronalnych po traktowaniu 5 mM NH_4Cl (m.in. wzrost zawartości wolnych rodników i zwiększona śmiertelność) nie występują w neuronach pochodzących z mieszanych hodowli astrocytarno-neuronalnych [Rama Rao i wsp., 2005a]. Te spostrzeżenia, wraz z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy, wskazującymi na zwiększenie produkcji prekursorów do neuronalnej syntezy GSH przez komórki glejowe po inkubacji z NH_4Cl, a także na zapobieganie spadkowi przeżywalności przez podniesienie poziomu GSx w neuronach przy użyciu GEE, nasuwają przypuszczenie, że aktywacja metabolizmu glutationu w astrocytach może być kluczowym procesem w neuroprotekcji w warunkach hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej. O tym, że mechanizm taki mógłby występować w warunkach *in vivo* świadczą wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu mikrodializy, w których wykazano wzrost zewnątrzkomórkowej zawartości GSx w korze przedczołowej wywołany najprawdopodobniej zwiększonym eksportem tego związku z astrocytów (**rys. V.2; rys. V.3**), a także tendencję do wzrostu tego

http://rcin.org.pl

parametru w prążkowiu szczura (**rys. V.1**), co może zwiększać dostępność prekursorów do neuronalnej syntezy GSH.

Podsumowując ten rozdział można stwierdzić, że aktywacja metabolizmu glutationu w komórkach glejowych po inkubacji z NH_4Cl jest procesem, który oprócz zwiększenia potencjału antyoksydacyjnego w nich samych, może również przyczyniać się do wzrostu dostępności prekursorów do neuronalnej syntezy glutationu.

http://rcin.org.pl

VII. WNIOSKI

1. Amoniak podany bezpośrednio do mózgu szczura wywołuje wzrost (w korze przedczołowej) lub tendencję do wzrostu (w prążkowiu) zewnątrzkomórkowego poziomu glutationu całkowitego. Zjawisko to jest najprawdopodobniej efektem aktywacji metabolizmu tego związku w astrocytach.

2. Neurony pierwotne w wyniku ekspozycji na NH_4Cl nie są w stanie utrzymać syntezy glutationu na poziomie, który zaspokoiłby zapotrzebowanie na ten przeciwutleniacz, co skutkuje spadkiem jego wewnątrzkomórkowej zawartości i przyczynia się do obniżenia jego stanu redoks a także do zmniejszenia przeżywalności komórek.

3. Amoniak zwiększa syntezę glutationu całkowitego w komórkach glejowych (zarówno w astrocytach pierwotnych, jak i komórkach glejaka C6) poprzez stymulowanie ekspresji podjednostki katalitycznej ligazy glutaminianowo-cysteinowej. Do zwiększonej syntezy GSH w tych warunkach przyczynia się dodatkowo wzrost pobierania kluczowego prekursora tego związku, cystyny. Wzmożony transport tego aminokwasu jest prawdopodobnie wywołany aktywacją i nadekspresją jego transporterów.

4. Astrocyty pierwotne pobierają cystynę prawie wyłącznie za pomocą systemu X_{AG}^-, natomiast komórki glejaka C6 angażują do tego procesu dwa układy: X_{AG}^- oraz x_c^-, przy czym w tym przypadku przeważa transport przy udziale tego drugiego. W warunkach zwiększonego pobierania cystyny w wyniku inkubacji komórek z amoniakiem względny udział obu układów w tym transporcie nie ulega zmianie.

5. Zwiększenie syntezy glutationu przez astrocyty skutkuje zmniejszeniem stopnia upośledzenia wewnątrzkomórkowego glutationowego potencjału redoks, co należy uznać za element mechanizmu autokompensacyjnego w warunkach toksyczności amoniaku.

http://rcin.org.pl

6. Aktywacja metabolizmu glutationu w komórkach glejowych może przyczyniać się do zapewnienia zwiększonej dostępności prekursorów do neuronalnej syntezy GSH.

http://rcin.org.pl

VIII. STRESZCZENIE

Podwyższone stężenie amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym wywołuje szereg zaburzeń w funkcjonowaniu tego układu określanych mianem encefalopatii hiperamonemicznej. Najczęstszą przyczyną takiej encefalopatii jest dysfunkcja wątroby skutkująca m.in. nieprawidłowym metabolizmem amoniaku i prowadząca do podwyższenia jego zawartości we krwi, skąd w nadmiarze przedostaje się do mózgu. Ten rodzaj encefalopatii nosi miano encefalopatii wątrobowej. W komórkach ośrodkowego układu nerwowego nie zachodzi pełny cykl mocznikowy i jedyną efektywną drogą detoksyfikacji amoniaku jest synteza glutaminy w astrocytach. Nadprodukcja tego aminokwasu wydaje się być przyczyną obrzmienia astrocytów, co skutkuje obrzękiem mózgu, który jest główną przyczyną śmierci pacjentów w najwyższym stadium encefalopatii wątrobowej. W chorobie tej ponadto obserwuje się szereg innych zaburzeń, które stanowią o jej ogólnym obrazie. Do najważniejszych spośród nich zalicza się pobudzenie neurotransmisji (szczególnie glutaminianergicznej i GABAergicznej), dysfunkcję mitochondriów, zaburzenia metabolizmu energetycznego, a także stres oksydacyjny.

Jednym z najważniejszych komórkowych przeciwutleniaczy jest glutation (γ-glutamylocysteinyloglicyna). Związek ten występuje powszechnie i w wysokich stężeniach w komórkach roślinnych i zwierzęcych, w mózgu jego poziom szacowany jest na 2 – 3 mmol/l. W warunkach fizjologicznych 98% glutationu w komórce występuje w zredukowanej formie tiolowej (GSH), zaś pozostałe 2% - głównie jako utleniona forma dwusiarczkowa (GSSG). Najważniejszą funkcją glutationu jest przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu poprzez redukcję nadtlenków. Proces ten zachodzi przy udziale peroksydazy glutationowej (GPx), a w jego efekcie GSH utleniany jest do GSSG. GSSG jest przywracany do formy zredukowanej dzięki aktywności zależnej od NADPH reduktazy glutationowej (GR). W warunkach fizjologicznych cykl taki pozwala na usuwanie nadtlenków bez uszczuplania puli GSH. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do zaburzenia tej równowagi skutkującego zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego potencjału redoks glutationu, co wyraża się przez spadek stosunku GSH/GSSG. Synteza glutationu przebiega w dwóch etapach katalizowanych przez dwa enzymy zależne od ATP: ligazę glutaminianowo – cysteinową (GCL) oraz syntetazę glutationową. Przyjmuje się, że synteza GSH w neuronach jest w dużej mierze uzależniona od metabolizmu tego związku w astrocytach. Interakcja ta opiera się

http://rcin.org.pl

na zróżnicowaniu prekursorów wykorzystywanych do tego procesu w tych dwóch typach komórek. Astrocyty pobierają cystynę (CySS) i wykorzystują ją do syntezy glutationu, który następnie transportowany jest do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie przy udziale γ-glutamylotransferazy (γGT), lub poprzez redukcję CySS, zasila pulę cysteiny (Cys), która z kolei jest pobierana do neuronów i w nich wykorzystywana do syntezy GSH. Metabolizm glutationu może ulegać modyfikacjom pod wpływem oddziaływania czynników wywołujących stres oksydacyjny.

W świetle tych danych oraz wobec licznych obserwacji wskazujących na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach OUN w hiperamonemii, jako cel niniejszej pracy postawiono zbadanie metabolizmu glutationu na różnych jego etapach w warunkach bezpośredniego oddziaływania amoniaku na komórki. Używając metody mikrodializaty *in vivo*, zaobserwowano, po podaniu NH_4Cl przez sondę mikrodializacyjną, zwiększony wypływ glutationu do przestrzeni pozakomórkowej w korze przedczołowej i tendencję do wzrostu wypływu tego związku w prążkowiu, co prawdopodobnie było efektem aktywacji metabolizmu glutationu w komórkach glejowych przez amoniak. Badania *in vitro* przeprowadzone na hodowlach pierwotnych neuronów wykazały spadek zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu całkowitego (GSx) w efekcie inkubacji tych komórek z wysokimi (5 mM – 10 mM) stężeniami NH_4Cl. Spadek ten był efektem niedostatecznej syntezy GSH *de novo*, która w tych warunkach nie była w stanie zaspokoić zapotrzebowania komórek na ten antyoksydant. Zjawisko to skutkowało obniżeniem potencjału redoks glutationu w neuronach i przyczyniało się do zwiększonej śmiertelności komórek. W przeciwieństwie do neuronów, w badanych komórkach glejowych (astrocytach pierwotnych oraz komórkach glejaka C6) inkubacja z NH_4Cl wywoływała wzrost zawartości wewnątrzkomórkowego GSx. Zjawisko to było efektem zwiększonej syntezy tego związku, której towarzyszyło wzmożone pobieranie CySS przy udziale transporterów swoistych dla danego typu komórek (x_c^- w przypadku astrocytów pierwotnych oraz X_{AG}^- i x_c^- w przypadku komórek C6). U podstawy tych zjawisk leżała zwiększona ekspresja genów białek biorących w nich udział. Wykazano nadekspresję mRNA dla GCL w obu typach komórek, dla 4F2hc (łańcucha ciężkiego transportera x_c^-) w komórkach C6, oraz dla transportera GLAST (jednego z dwóch astrocytarnych transporterów z rodziny X_{AG}^-) w astrocytach pierwotnych. Zwiększenie syntezy GSH skutkowało poprawą glutationowego potencjału redoks (w astrocytach pierwotnych - przejściową, w komórkach C6 – trwałą), który na pierwszym etapie odpowiedzi komórek na amoniak był obniżony. Obserwowana aktywacja wewnątrzkomórkowego

http://rcin.org.pl

metabolizmu glutationu przekładała się na jego metabolizm zewnątrzkomórkowy. W przypadku komórek C6 zwiększona synteza GSH skutkowała proporcjonalnym wzrostem zawartości glutationu w pożywce, zaś w przypadku astrocytów pierwotnych obserwowano zwiększenie aktywności γGT oraz wzrost wypływu glutationu z komórek (przede wszystkim we wczesnej fazie). Obserwowana aktywacja metabolizmu glutationu w komórkach glejowych w warunkach hiperamonemii może zatem, oprócz wzmacniania potencjału antyoksydacyjnego tych komórek, stanowić również mechanizm zwiększający dostępność prekursorów do neuronalnej syntezy glutationu w warunkach wzmożonego zapotrzebowania na ten przeciwutleniacz.

Instytut Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN
BIBLIOTEKA

http://rcin.org.pl

IX. LITERATURA

Aguirre P, Valdés P, Aracena-Parks P, Tapia V, Núñez MT (**2007**) Upregulation of gamma-glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C2197-C2203.

Ahboucha S, Pomier-Layrargues G, Mamer O, Butterworth RF (**2006**) Increased levels of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *Neurochem Int.* 49:372-378.

Akiyama H, Kaneko T, Mizuno N, McGeer PL (**1990**) Distribution of phosphate-activated glutaminase in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 297:239-252.

Albrecht J, Wysmyk-Cybula U, Rafałowska U (**1987**) Cerebral oxygen consumption in experimental hepatic encephalopathy: different responses in astrocytes, neurons, and synaptosomes. *Exp Neurol.* 97:418-422.

Albrecht J, Hilgier W, Rafałowska U (**1990**) Activation of arginine metabolism to glutamate in rat brain synaptosomes in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: an adaptative response? *J Neurosci Res.* 25:125-130.

Albrecht J (**2005**) Astrocytes in ammonia neurotoxicity: a target, a mediator and a shield. w: "The role of glia in neurotoxicity" (Aschner M, Costa LG (eds.)) CRC Press, Boca Raton. 329-342.

Albrecht J, Norenberg MD (**2006**) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology.* 44:788-794.

Allen JW, Shanker G, Aschner M (**2001**) Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res.* 894:131-140.

http://rcin.org.pl

Anderson ME, Underwood M, Bridges RJ, Meister A (**1989**) Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J.* 3:2527-2531.

Aoki C, Kaneko T, Starr A, Pickel VM (**1991**) Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurosci Res.* 28:531-548.

Ascher NL, Lake JR, Emond JC, Roberts JP (**1993**) Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Arch Surg.* 128:677-682.

Atiq M, Holt AF, Safdar K, Weber F, Ravinuthala R, Jonas ME, Neff GW (**2008**) Adult onset urea cycle disorder in a patient with presumed hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.* 42:213-214.

Audet RM, Butterworth RF (**1998**) Portacaval anastomosis results in more widespread alterations of cerebral metabolism in old versus young adult rats: implications for post-shunt encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 13:69-78.

Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2001**) Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66:981-991.

Bak LK, Ziemińska E, Waagepetersen HS, Schousboe A, Albrecht J (**2008**) Metabolism of [u-(13)c]glutamine and [u- (13)c]glutamate in isolated rat brain mitochondria suggests functional phosphate-activated glutaminase activity in matrix. *Neurochem Res.* 33:273-278.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A (**1990**) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* 190:360-365.

Bannai S, Kitamura E (**1980**) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 255:2372-2376.

Bannai S (**1984**) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 779:289-306.

http://rcin.org.pl

Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martín R, Zorzano A, Borsani G, Palacín M (**2001**) Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch.* 442:286-296.

Batshaw ML, Wachtel RC, Thomas GH, Starrett A, Brusilow SW (**1984**) Arginine-responsive asymptomatic hyperammonemia in the premature infant. *J Pediatr.* 105:86–91.

Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Rose C, Butterworth RF (**2005**) Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure. *J Hepatol.* 42:694-699.

Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (**2006**) Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein GLUT1 in acute liver failure. *Glia.* 53:557-562.

Bender AS, Norenberg MD (**1998**) Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J Neurosci Res.* 54:673-80.

Bender AS, Norenberg MD (**2000**) Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 36:389-395.

Bender AS, Reichelt W, Norenberg MD (**2000**) Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 37:269-276.

Bengtsson F, Gage FH, Jeppsson B, Nobin A, Rosengren E (**1985**) Brain monoamine metabolism and behavior in portacaval-shunted rats. *Exp Neurol.* 90:21-35.

Bengtsson F, Bugge M, Johansen KH, Butterworth RF (**1991**) Brain tryptophan hydroxylation in the portacaval shunted rat: a hypothesis for the regulation of serotonin turnover in vivo. *J Neurochem.* 56:1069-1074.

Benjamin AM (**1981**) Control of glutaminase activity in rat brain cortex in vitro: influence of glutamate, phosphate, ammonium, calcium and hydrogen ions. *Brain Res.* 208:363-377.

http://rcin.org.pl

Bergasa NV, Rothman RB, Mukerjee E, Vergalla J, Jones EA (**2002**) Up-regulation of central mu-opioid receptors in a model of hepatic encephalopathy: a potential mechanism for increased sensitivity to morphine in liver failure. *Life Sci.* 70:1701-1708.

Bergelson S, Pinkus R, Daniel V (**1994**) Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res.* 54:36-40.

Bergeron M, Swain MS, Reader TA, Butterworth RF (**1995**) Regional alterations of dopamine and its metabolites in rat brain following portacaval anastomosis. *Neurochem Res.* 20:79-86.

Bergqvist PB, Heyes MP, Bugge M, Bengtsson F (**1995**) Brain quinolinic acid in chronic experimental hepatic encephalopathy: effects of an exogenous ammonium acetate challenge. *J Neurochem.* 65:2235-2240.

Bismuth H, Samuel D, Castaing D, Williams R, Pereira SP (**1996**) Liver transplantation in Europe for patients with acute liver failure. *Semin Liver Dis.* 16:415-425.

Blei AT (**1991**) Cerebral edema and intracranial hypertension in acute liver failure: distinct aspects of the same problem. *Hepatology.* 13:376-379.

Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF (**1994**) Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology.* 19:1437-1444.

Bodega G, Suárez I, López-Fernández LA, Almonacid L, Zaballos A, Fernández B (**2006**) Possible implication of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and beta-synuclein in the ammonia effect on cultured rat astroglial cells: a study using DNA and protein microarrays. *Neurochem Int.* 48:729-738.

Bolaños JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB (**1996**) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med.* 21:995-1001.

http://rcin.org.pl

Bolaños JP, Cidad P, García-Nogales P, Delgado-Esteban M, Fernández E, Almeida A (**2004**) Regulation of glucose metabolism by nitrosative stress in neural cells. *Mol Aspects Med.* 25:61-73.

Bon CL, Garthwaite J (**2003**) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.*23:1941-1948.

Borkowska HD, Oja SS, Oja OS, Saransaari P, Hilgier W, Albrecht J (**1999**) N-methyl-D-aspartate-evoked changes in the striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites in vivo in rats with acute hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett.* 268:151-154.

Bradford MM (**1976**) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

Bromberg PA, Robin ED, Forkner CE Jr (**1960**) The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH4 plus minus NH3 system. *J Clin Invest.* 39:332-41.

Burdo J, Schubert D, Maher P (**2008**) Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical neurons. *Brain Res.* 1189:12-22.

Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Pomier-Layrargues G (**1987**) Ammonia: Key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol.* 6:1-12.

Butterworth RF, Lavoie J, Giguère JF, Pomier-Layrargues G (**1988**) Affinities and densities of high-affinity [3H]muscimol (GABA-A) binding sites and of central benzodiazepine receptors are unchanged in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 8:1084-1088.

Butterworth RF (**2007**) Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 22:309-320.

http://rcin.org.pl

Cangiano C, Cardelli-Cangiano P, James JH, Rossi-Fanelli F, Patrizi MA, Brackett KA, Strom R, Fischer JE (**1983**) Brain microvessels take up large neutral amino acids in exchange for glutamine. Cooperative role of Na+-dependent and Na+-independent systems. *J Biol Chem.* 258:8949-8954.

Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V (**2006**) Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol.* 45:654-661.

Cauli O, Mlili N, Llansola M, Felipo V (**2007**) Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. *Eur J Neurosci.* 25:2112-2122.

Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF (**2000**) Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int.* 37:243-248.

Chepkova AN, Sergeeva OA, Haas HL (**2006**) Taurine rescues hippocampal long-term potentiation from ammonia-induced impairment. *Neurobiol Dis.* 23:512-521.

Chomczynski P, Sacchi N (**1987**) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.

Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P (**2000**) Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology.* 118:1131-1139.

Cohen G, Hochstein P (**1963**) Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 2:1420-1428.

Collins RM Jr, Zielke HR, Woody RC (**1994**) Valproate increases glutaminase and decreases glutamine synthetase activities in primary cultures of rat brain astrocytes. *J Neurochem.* 62:1137-1143.

Conn HO (**1994**) The hepatic encephalopathies. w: "Hepatic encephalopathy: syndromes and therapies" (Conn HO, Bircher J (eds.)) Medi-Ed Press, Bloomington. 1-12.

http://rcin.org.pl

Cooper AJ, McDonald JM, Gelbard AS, Gledhill RF, Duffy TE (**1979**) The metabolic fate of ^{13}N-labeled ammonia in rat brain. *J Biol Chem.* 254:4982-4992.

Cooper AJ, Plum F (**1987**) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev.* 67:440-519.

Cordoba J, Gottstein J, Blei AT (**1996**) Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology.* 24:919-923.

Cordoba J, Crespin J, Gottstein J, Blei AT (**1999**) Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology.* 116:686-693.

Cruz NF, Duffy TE (**1983**) Local cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shunts. *J Cereb Blood Flow Metab.* 3:311-320.

Dasgupta A, Das S, Sarkar PK (**2007**) Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. *Free Radic Biol Med.* 42:617-626.

de Knegt RJ, Schalm SW, van der Rijt CC, Fekkes D, Dalm E, Hekking-Weyma I (**1994**) Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *J Hepatol.* 20:19-26.

Deshpande G, Adachi N, Liu K, Motoki A, Mitsuyo T, Nagaro T, Arai T (**2007**) Recovery of brain dopamine metabolism by branched-chain amino acids in rats with acute hepatic failure. *J Neurosurg Anesthesiol.* 19:243-248.

Desjardins P, Rao KV, Michalak A, Rose C, Butterworth RF (**1999a**) Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis.* 14:273-280.

http://rcin.org.pl

Desjardins P, Bandeira P, Rao VL, Butterworth RF (**1999b**) Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochem Int.* 35:293-299.

Devesa A, O'Connor JE, Garciá C, Puertes IR, Viña JR (**1993**) Glutathione metabolism in primary astrocyte cultures: flow cytometric evidence of heterogeneous distribution of GSH content. *Brain Res.* 618:181-189.

Díaz-Muñoz M, Tapia R (**1989**) Functional changes of brain mitochondria during experimental hepatic encephalopathy. *Biochem Pharmacol.* 38:3835-3841.

Dolińska M, Hilgier W, Albrecht J (**1996**) Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neurosci Lett.* 213:45-48.

Dringen R, Hamprecht B (**1996**) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem.* 67:1375-1382.

Dringen R, Kranich O, Hamprecht B (**1997**) The gamma-glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res.* 22:727-733.

Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B (**1999**) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci.* 19:562-569.

Duffy TE, Plum F, Cooper AJL (**1983**) Cerebral ammonia metabolism in vivo. w: "Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system" (Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A (eds.)) Liss, New York. 371-388.

Eck NV (**1877**) Ligature of the portal vein. *Med J. (St. Petersburg)* 130:1-2.

Ede RJ, Williams RW (**1986**) Hepatic encephalopathy and cerebral edema. *Semin Liver Dis.* 6:107-118.

http://rcin.org.pl

Ehrlich M, Plum F, Duffy TE (**1980**) Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia loading. *J Neurochem.* 34:1538-1542.

Erceg S, Monfort P, Hernández-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V (**2005**) Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology.* 41:299-306.

Faff-Michalak L, Albrecht J (**1991**) Aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase activities in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: effects of in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 6:187-197.

Faff-Michalak L, Albrecht J (**1993**) The two catalytic components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: comparison of the response to in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia, and hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 18:119-123.

Felipo V, Butterworth RF (**2002**) Neurobiology of ammonia. *Progr Neurobiol.* 67:259-279.

Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (**2002**) Hepatic encephalopathy-definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology.* 35:716-721.

Filipowicz HR, Ernst SL, Ashurst CL, Pasquali M, Longo N (**2006**) Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. *Mol Genet Metab.* 88:123-130.

Flohe RB (**1999**) Tissue-specific function individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 27:951-965.

Forbes A, Alexander GJ, O'Grady JG, Keays R, Gullan R, Dawling S, Williams R (**1989**) Thiopental infusion in the treatment of intracranial hypertension complicating fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 10:306-310.

http://rcin.org.pl

Gammal SH, Basile AS, Geller D, Skolnick P, Jones EA (**1990**) Reversal of the behavioral and electrophysiological abnormalities of an animal model of hepatic encephalopathy by benzodiazepine receptor ligands. *Hepatology.* 11:371-378.

Ganda OP, Ruderman NB (**1976**) Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. Metabolism. 25:427-435.

García MV, López-Mediavilla C, Juanes de la Peña MC, Medina JM (**2004**) Antioxidant defence of the neonatal rat brain against acute hyperammonemia. *Brain Res.* 1001:159-163.

García-Nogales P, Almeida A, Fernández E, Medina JM, Bolaños JP (**1999**) Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* 72:1750-1758.

Gebhardt R, Mecke D (**1983**) Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J.* 2:567-570.

Giguere JF, Butterworth RF (**1984**) Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Res.* 9:1309-1321.

Girard G, Giguère JF, Butterworth RF (**1993**) Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metab Brain Dis.* 8:207-215.

Gochenauer GE, Robinson MB (**2001**) Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3H]glutamate transport and expression of both system xc(-) subunits. *J Neurochem.* 78:276-286.

Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg LO, Norenberg MD (**1985**) Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. I. Light microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 44:397-403.

http://rcin.org.pl

Griffith OW (**1980**) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106:207-212.

Guo N, McIntosh C, Shaw C (**1992**) Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience.* 51:835-842.

Haghighat N, McCandless DW, Geraminegad P (**2000**) The effect of ammonium chloride on metabolism of primary neurons and neuroblastoma cells in vitro. *Metab Brain Dis.* 15:151-162.

Hall AG (**1999**) The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 29:238-245.

Hassel B, Bachelard H, Jones P, Fonnum F, Sonnewald UJ (**1997**) Trafficking of amino acids between neurons and glia in vivo. Effects of inhibition of glial metabolism by fluoroacetate. *Cereb Blood Flow Metab.* 17:1230-1238.

Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J (**1994**) Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology.* 107:1475-1480.

Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, De Joseph MR (**1993**) Effect of reducing brain glutamine synthesis on metabolic symptoms of hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 60:1000-1006.

Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Chedid A, DeJoseph MR (**1994**) Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. *Adv Exp Med Biol.* 368:125-134.

Hazama H, Ito M, Hirano M, Uchimura H (**1976**) Monoamine oxidase activities in neuronal and glial fractions from regional areas of rat brain. *J Neurochem.* 26:417-419.

Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, Felipo V (**1998**) Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic

http://rcin.org.pl

GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci.* 10:3201-3209.

Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V (**2000**) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology.* 31:709-715.

Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe AS (**1989**) Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. w: "A dissection and tissue culture manual for the nervous system" (Shahar A, DeVellis J, Vernadakis A, Haber, B (eds.)) Liss, New York. 105-108.

Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z (**1999**) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signalregulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 274:22569-22580.

Hilgier W, Albrecht J, Lisy V, Stastny F (**1990**) The effect of acute and repeated hyperammonemia on gamma-glutamyl transpeptidase in homogenates and capillaries of various rat brain regions. *Mol Chem Neuropathol.* 13:47-56.

Hilgier W, Benveniste H, Diemer NH, Albrecht J (**1991**) Decreased glucose utilization in discrete brain regions of rat in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy as measured with [3H]-deoxyglucose. *Acta Neurol Scand.* 83:353-355.

Hilgier W, Puka M, Albrecht J (**1992**) Characteristics of large neutral amino acid-induced release of preloaded L-glutamine from rat cerebral capillaries in vitro: effects of ammonia, hepatic encephalopathy, and gamma-glutamyl transpeptidase inhibitors. *J Neurosci Res.* 32:221-226.

Hilgier W, Olson JE, Albrecht J (**1996**) Relation of taurine transport and brain edema in rats with simple hyperammonemia or liver failure. *J Neurosci Res.* 45:69-74.

Hilgier W, Zielińska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (**1999**) Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino

http://rcin.org.pl

acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res.* 56:76-84.

Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (**2003**) Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 468:21-25.

Hilgier W, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (**2004**) A novel glycine site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/CGMP pathway by ammonia. *Brain Res.* 1015:186-188.

Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I (**2003**) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J Neural Transm.* 110:1337-1348.

Hindfelt B (**1975**) The distribution of ammonia between extracellular and intracellular compartments of the rat brain. *Clin Sci Mol Med.* 48:33-37.

Hindfelt B, Plum F, Duffy TE (**1977**) Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J Clin Invest.* 59:386-396.

Hirrlinger J, König J, Keppler D, Lindenau J, Schulz JB, Dringen R (**2001**) The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem.* 76:627-636.

Hirrlinger J, Dringen R (**2005**) Multidrug resistance protein 1-mediated export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *Methods Enzymol.* 400:395-409.

Hirrlinger J, Moeller H, Kirchhoff F, Dringen R (**2005**) Expression of multidrug resistance proteins (Mrps) in astrocytes of the mouse brain: a single cell RT-PCR study. *Neurochem Res.* 30:1237-1244.

Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A (**1988**) Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic

http://rcin.org.pl

properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. *Neurochem Res.* 13:383-388.

Holt DE, Washabau RJ, Djali S, Dayrell-Hart B, Drobatz KJ, Heyes MP, Robinson MB (**2002**) Cerebrospinal fluid glutamine, tryptophan, and tryptophan metabolite concentrations in dogs with portosystemic shunts. *Am J Vet Res.* 63:1167-1171.

Hourani BT, Hamlin EM, Reynolds TB (**1971**) Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Arch Intern Med.* 127:1033-1036.

Hu HL, Chen RD (**1992**) Changes in free radicals, trace elements, and neurophysiological function in rats with liver damage induced by D-galactosamine. *Biol Trace Elem Res.* 34:19-25.

Huang CS, Moore WR, Meister A (**1988**) On the oxidative site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:2464-2468.

Huang J, Philbert MA (**1995**) Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* 680:16-22.

Huang CH, Liu PZ (**2001**) New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol Dis.* 27:90-101.

Huizenga JR, Teelken AW, Tangerman A, de Jager AE, Gips CH, Jansen PL (**1998**) Determination of ammonia in cerebrospinal fluid using the indophenol direct method. *Mol Chem Neuropathol.* 34:169-177.

Irie T, Hara M, Yasukura T, Minamino M, Omori K, Matsuda H, Inoe K, Inagaki C (**1998**) Chloride concentration in cultured hippocampal neurons increases during long-term exposure to ammonia through enhanced expression of an anion exchanger. *Brain Res.* 806:246-256.

Ishii T, Bannai S (**1985**) The synergistic action of the copper chelator bathocuproine sulphonate and cysteine in enhancing growth of L1210 cells in vitro. *J Cell Physiol.* 125:151-155.

http://rcin.org.pl

Itzhak Y, Roig-Cantisano A, Dombro RS, Norenberg MD (**1995**) Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res.* 705:345-348.

Iversen P, Hansen DA, Bender D, Rodell A, Munk OL, Cumming P, Keiding S. Peripheral benzodiazepine receptors in the brain of cirrhosis patients with manifest hepatic encephalopathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 33:810-816.

Iwata-Ichikawa E, Kondo Y, Miyazaki I, Asanuma M, Ogawa N (**1999**) Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione synthesis. *J Neurochem.* 72:2334-2344.

Jalan R, O Damink SW, Deutz NE, Lee A, Hayes PC (**1999**) Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet.* 354:1164-1168.

Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ (**2007**) L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses.* 69:1064-1069.

Jayakumar AR, Rama Rao KV, Schousboe A, Norenberg MD (**2004**) Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia.* 46:296-301.

Jayakumar AR, Rao KV, Murthy ChR, Norenberg MD (**2006a**) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* 48:623-628.

Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChR, Norenberg MD (**2006b**) Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 26:4774-4784.

Johnson CL, Johnson CG (**1993**) Substance P regulation of glutamate and cystine transport in human astrocytoma cells. *Receptors Channels.* 1:53-59.

http://rcin.org.pl

Jordà EG, Jiménez A, Verdaguer E, Canudas AM, Folch J, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (**2005**) Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. *Apoptosis.* 10:91-104.

Kanai Y, Hediger MA (**1992**) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360:467-471.

Kato S, Negishi K, Mawatari K, Kuo CH (**1992**) A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience.* 48:903-914.

Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K (**1993**) Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Müller glial cells: implications for DL-alpha-aminoadipate toxicity. *Neuroscience.* 57:473-482.

Kawaguchi T, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC (**2005**) Glutamine-dependent inhibition of pial arteriolar dilation to acetylcholine with and without hyperammonemia in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:R1612-R1619.

Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF (**1997**) Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett.* 229:201-203.

Konopacka A, Fręśko I, Piaskowski S, Albrecht J, Zielińska M (**2006**) Ammonia affects the activity and expression of soluble and particulate GC in cultured rat astrocytes. *Neurochem Int.* 48:553-558.

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolía S, Felipo V (**1994**) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na+,K(+)-ATPase. *J Neurochem.* 63:2172-2178.

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Grisolía S, Felipo V (**1995**) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem Res.* 20:451-456.

http://rcin.org.pl

Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolía S, Kaminsky Y (**1996**) Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis.* 12:69-82.

Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (**1997**) Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res.* 27:637-644.

Kosenko E, Kaminsky Y, Lopata O, Muravyov N, Kaminsky A, Hermenegildo C, Felipo V (**1998**) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metab Brain Dis.* 13:29-41.

Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V (**1999**) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med.* 26:1369-1374.

Kosenko E, Kaminsky Y, Stavroskaya IG, Felipo V (**2000**) Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res.* 880:139-146.

Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V (**2003**) Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res.* 981:193-200.

Koyama Y, Kimura Y, Hashimoto H, Matsuda T, Baba A (**2000**) L-lactate inhibits L-cystine/L-glutamate exchange transport and decreases glutathione content in rat cultured astrocytes. *J Neurosci Res.* 59:685-691.

Kranich O, Hamprecht B, Dringen R (**1996**) Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett.* 219:211-214.

Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme E, Ottersen OP (**1999**) Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and

http://rcin.org.pl

pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. N*euroscience.* 88:1137-1151.

Lamarche F, Signorini-Allibe N, Gonthier B, Barret L (**2004**) Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol.* 33:127-138.

Laubenberger J, Häussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M (**1997**) Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology.* 112:1610-1616.

Lavoie J, Giguère JF, Layrargues GP, Butterworth RF (**1987**) Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 49:692-697.

Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF (**1990**) Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 11:874-878.

Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW (**2000**) The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60:3927-3939.

Li Y, Omori K, Suzukawa J, Inagaki C (**2004**) Calcineurin-mediated BAD Ser155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 357:73-75.

Li XQ, Dong L, Liu ZH, Luo JY (**2005**) Expression of gamma-aminobutyric acid A receptor subunits alpha1, beta1, gamma2 mRNA in rats with hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol.* 11:3319-3322.

Liddell JR, Dringen R, Crack PJ, Robinson SR (**2006a**) Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia.* 54:873-879.

http://rcin.org.pl

Liddell JR, Hoepken HH, Crack PJ, Robinson SR, Dringen R (**2006b**) Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci Res.* 84:578-586.

Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE, Gelbard AS, Laughlin JS, Duffy TE, Plum F (**1979**) The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest.* 63:449-460.

Lockwood AH, Yap EW, Wong WH (**1991a**). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11:337-341.

Lockwood AH, Yap EW, Rhoades HM, Wong WH (**1991b**) Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11:331-336.

Lohr GW, Waller HD (**1965**) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. w: "Methods of enzymatic analysis" (Bergmeyer HU (ed.)) Academic Press, New York. 744-751.

Lozeva V, Tuomisto L, Sola D, Plumed C, Hippeläinen M, Butterworth R (**2001**) Increased density of brain histamine H(1) receptors in rats with portacaval anastomosis and in cirrhotic patients with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 33:1370-1376.

Madrigal JL, Kalinin S, Richardson JC, Feinstein DL (**2007**) Neuroprotective actions of noradrenaline: effects on glutathione synthesis and activation of peroxisome proliferator activated receptor delta. *J Neurochem.* 103:2092-2101.

Malone PE, Hernandez MR (**2007**) 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res.* 84:444-454.

Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Miñana MD, Grisolía S (**1992**) Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296:67-68.

http://rcin.org.pl

Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (**1977**) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 195:1356-1358.

Mawatari K, Yasui Y, Sugitani K, Takadera T, Kato S (**1996**) Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via x_c^- antiporter system. *Neuroscience.* 73:201-208.

McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD (**1996**) Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 11:329-342.

McConnell JR, Antonson DL, Ong CS, Chu WK, Fox IJ, Heffron TG, Langnas AN, Shaw BW Jr (**1995**) Proton spectroscopy of brain glutamine in acute liver failure. *Hepatology.* 22:69-74.

Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA (**1990**) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev.* 70:701-748.

Meister A, Anderson ME (**1984**) Glutathione. *Ann Rev Biochem.* 52:711-760.

Meister A (**1991**) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* 51:155-194.

Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF (**1996**) Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology.* 24:908-913.

Michalak A, Rose C, Butterworth RF (**2001**) Loss of noradrenaline transporter sites in frontal cortex of rats with acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int.* 38:25-30.

Miñana MD, Kosenko E, Marcaida G, Hermenegildo C, Montoliu C, Grisolía S, Felipo V (**1997**) Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide. *Cell Mol Neurobiol.* 17:433-445.

http://rcin.org.pl

Minich T, Riemer J, Schulz JB, Wielinga P, Wijnholds J, Dringen R (**2006**) The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J Neurochem.* 97:373-384.

Minuk GY, Winder A, Burgess ED, Sarjeant EJ (**1985**) Serum gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in patients with hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology.* 32:171-174.

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C (**1983**) The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 40:850-854.

Mosmann T (**1983**) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.

Mousseau DD, Baker GB, Butterworth RF (**1997**) Increased density of catalytic sites and expression of brain monoamine oxidase A in humans with hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 68:1200-1208.

Mullen KD, Szauter KM, Kaminsky-Russ K (**1990**) "Endogenous" benzodiazepine activity in body fluids of patients with hepatic encephalopathy. *Lancet.* 336:81-83.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (**1986**). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology 51: 263-73

Mullis K, Faloona F (**1987**) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.

Muñoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, Felipo V (**2000**) Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochem Res.* 25:437-441.

Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (**1990**) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J.* 4:1624-1633.

http://rcin.org.pl

Murthy CR, Bender AS, Dombro RS, Bai G, Norenberg MD (**2000**) Elevation of glutathione levels by ammonium ions in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int.* 37:255-568.

Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (**2001**) Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66:282-288.

Nagashima R, Sugiyama C, Yoneyama M, Kuramoto N, Kawada K, Ogita K (**2007**) Acoustic overstimulation facilitates the expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit probably through enhanced DNA binding of activator protein-1 and/or NF-kappaB in the murine cochlea. *Neurochem Int.* 51:209-215.

Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ (**1989**) Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal Biochem.* 179:236-241.

Nencki M, Pavlov J, Zaleski J (**1896**) Über den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe und die Harnstoffbildung bei den Saugethieren. *Arch Exp Pathol Pharm.* 37:26- 51.

Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D (**2004**) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* 129:349-360.

Norenberg MD, Baker L, Norenberg LO, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT (**1991**) Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res.* 16:833-836.

Norenberg MD, Bender AS (**1994**) Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 60:24-27.

Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A (**1997**) The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia.* 21:124-133.

http://rcin.org.pl

Olafsson S, Gottstein J, Blei AT (**1995**) Brain edema and intracranial hypertension in rats after total hepatectomy. *Gastroenterology.* 108:1097-1103.

Oria M, Raguer N, Chatauret N, Bartolí R, Odena G, Planas R, Córdoba J (**2006**) Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis.* 21:297-308.

Orrenius S, Moldeus P (**1984**) The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmacol Sci. 5*:432-435.

Panickar KS, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD (**2007**) Downregulation of the 18-kDa translocator protein: effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia.* 55:1720-1727.

Paroni R, De Vecchi E, Cighetti G, Arcelloni C, Fermo I, Grossi A, Bonini P (**1995**) HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. *Clin Chem.* 41:448-454.

Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F (**1987**) An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem.* 48:1377-1385

Paxinos G, Watson C (**1982**) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.

Peignoux M, Bernuau J, Benhamou JP (**1982**) Total hepatectomy and hepatic vascular exclusion in the rat: a comparison, with special reference to the influence of body temperature. *Clin Sci (Lond).* 62:273-277.

Persijn JP, van der Slik W (**1976**) A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem.* 14:421-427.

Peterson C, Giguere JF, Cotman CW, Butterworth RF (**1990**) Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem.* 55:386-390.

http://rcin.org.pl

Phelps ME, Hoffman EJ, Raybaud C (**1977**) Factors which affect cerebral uptake and retention of 13NH3. *Stroke.* 8:694-702.

Pichili VB, Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2007**) Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia.* 55:801-809.

Pileblad E, Eriksson PS, Hansson E (**1991**) The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain stem. *J Neural Transm Gen Sect.* 86:43-49.

Plesnila N, Haberstok J, Peters J, Kölbl I, Baethmann A, Staub F (**1999**) Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes. *J Neurotrauma.* 16:831-841.

Poo JL, Góngora J, Sánchez-Avila F, Aguilar-Castillo S, García-Ramos G, Fernández-Zertuche M, Rodríguez-Fragoso L, Uribe M (**2006**) Efficacy of oral L-ornithine-L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. Results of a randomized, lactulose-controlled study. *Ann Hepatol.* 5:281-288.

Raghavendra Rao VL, Butterworth RF (**1994**) Alterations of [3H]8-OH-DPAT and [3H]ketanserin binding sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett.* 182:69-72.

Raghavendra Rao VL, Audet RM, Butterworth RF (**1995**) Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem.* 65:677-678.

Raichle ME, Larson KB (**1981**) The significance of the NH3-NH+(4) equilibrium on the passage of 13N-ammonia from blood to brain. A new regional residue detection model. *Circ Res.* 48:913-937.

Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2003a**) Induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochem Int.* 43:517-523.

http://rcin.org.pl

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD (**2003b**) Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res.* 74:891-897.

Rama Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2005a**) Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res.* 30:1311-1318.

Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2005b**) Differential response of glutamine in cultured neurons and astrocytes. *J Neurosci Res.* 79:193-199.

Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (**2005c**) Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 47:31-38.

Raps SP, Lai JC, Hertz L, Cooper AJ (**1989**) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493:398-401.

Rathinam ML, Watts LT, Stark AA, Mahimainathan L, Stewart J, Schenker S, Henderson GI (**2006**) Astrocyte control of fetal cortical neuron glutathione homeostasis: up-regulation by ethanol. *J Neurochem.* 96:1289-1300.

Record CO, Buxton B, Chase RA, Curzon G, Murray-Lyon IM, Williams R (**1976**) Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest.* 6:387-394.

Rees CJ, Oppong K, Al Mardini H, Hudson M, Record CO (**2000**) Effect of L-ornithine-L-aspartate on patients with and without TIPS undergoing glutamine challenge: a double blind, placebo controlled trial. *Gut.* 47:571-574.

Roberg B, Torgner IA, Kvamme E (**1995**) The orientation of phosphate activated glutaminase in the inner mitochondrial membrane of synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Neurochem Int.* 27:367-376.

Romero-Gomez M, Jover M, Diaz-Gomez D, de Teran LC, Rodrigo R, Camacho I, Echevarria M, Felipo V, Bautista JD (**2006**) Phosphate-activated glutaminase

http://rcin.org.pl

activity is enhanced in brain, intestine and kidneys of rats following portacaval anastomosis. *World J Gastroenterol.* 12:2406-2411.

Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF (**2000**) Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology.* 31:872-877.

Rosenberg PA, Aizenman E (**1989**) Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 103:162-168.

Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, Di Simplicio P (**2002**) Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem.* 48:742-753.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (**1994**) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron.* 13:713-725.

Rudman D, DiFulco TJ, Galambos JT, Smith RB 3rd, Salam AA, Warren WD. (**1973**) Maximal rates of excretion and synthesis of urea in normal and cirrhotic subjects. *J Clin Invest.* 52:2241-2249.

Sagara J, Miura K, Bannai S (**1993**) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem.* 61:1667-1671.

Sagara J, Makino N, Bannai S (**1996**) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem.* 66:1876-1881.

Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Roy KR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P (**2007a**) Co-administration of C-Phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *J Neurol Sci.* 252:67-75.

Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P (**2007b**) Fulminant hepatic failure in rats induces

http://rcin.org.pl

oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res.* 32:517-524.

Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S (**1999**) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem.* 274:11455-11458.

Schiodt FV, Atillasoy E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KV, Stribling R, Crippin JS, Flamm S, Somberg KA, Rosen H, McCashland TM, Hay JE, Lee WM (**1999**) Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl Surg.* 5:29-34.

Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D (**2002**) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* 16:739-741.

Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E (**1979**) Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem.* 32:943-950.

Schultz V, Lowenstein JM (**1976**) Purine nucleotide cycle. Evidence for the occurrence of the cycle in brain. *J Biol Chem.* 251:485-492.

Seelig GF, Simondsen RP, Meister A (**1984**) Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem.* 259:9345-9347.

Shanker G, Aschner M (**2001**) Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res.* 66:998-1002.

Shawcross DL, Balata S, Olde Damink SW, Hayes PC, Wardlaw J, Marshall I, Deutz NE, Williams R, Jalan R (**2004**) Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287:G503-G509.

http://rcin.org.pl

Shen J, Petersen KF, Behar KL, Brown P, Nixon TW, Mason GF, Petroff OA, Shulman GI, Shulman RG, Rothman DL (**1999**) Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo 13C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8235-8240.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (**2003**) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci.* 23:3394-3406.

Shih AY, Erb H, Sun X, Toda S, Kalivas PW, Murphy TH (**2006**) Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J Neurosci.* 26:10514-10523.

Simons SS, Johnson DF (**1976**) The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines. *J Am Chem Soc.* 8:7098-7099.

Singh S, Koiri RK, Trigun SK (**2008**) Acute and chronic hyperammonemia modulate antioxidant enzymes differently in cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem Res.* 33:103-113.

Slivka A, Spina MB, Cohen G (**1987**) Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci Lett.* 74:112-118.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (**1985**) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.

Sonnewald U, Westergaard N, Jones P, Taylor A, Bachelard HS, Schousboe A (**1996**) Metabolism of [U-13C5] glutamine in cultured astrocytes studied by NMR spectroscopy: first evidence of astrocytic pyruvate recycling. *J Neurochem.* 67:2566-2572.

Stastný F, Hilgier W, Albrecht J, Lisý V (**1988**) Changes in the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in brain microvessels, astroglial cells and synaptosomes derived from rats with hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett.* 84:323-328.

http://rcin.org.pl

Stewart VC, Stone R, Gegg ME, Sharpe MA, Hurst RD, Clark JB, Heales SJ (**2002**) Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J Neurochem.* 83:984-991.

Strauss G, Adel Hansen B, Kirkegaard P, Rasmussen A, Hjortrup A, Larsen FS (**1997**) Liver function, cerebral blood flow autoregulation, and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 25:837-839.

Stravitz RT, Kramer AH, Davern T, Shaikh AO, Caldwell SH, Mehta RL, Blei AT, Fontana RJ, McGuire BM, Rossaro L, Smith AD, Lee WM (**2007**) Intensive care of patients with acute liver failure: recommendations of the U.S. Acute Liver Failure Study Group. *Crit Care Med.* 35:2498-2508.

Suárez I, Bodega G, Fernández B (**2000**) Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res.* 859:293-302.

Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández B (**2005**) Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31:163-169.

Sugimoto H, Koehler RC, Wilson DA, Brusilow SW, Traystman RJ (**1997**) Methionine sulfoximine, a glutamine synthetase inhibitor, attenuates increased extracellular potassium activity during acute hyperammonemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17:44-49.

Svensson G, Anfält T (**1982**) Rapid determination of ammonia in whole blood and plasma using flow injection analysis. *Clin Chim Acta.* 119:7-14.

Swart GR, van den Berg JW, Wattimena JL, Rietveld T, van Vuure JK, Frenkel M (**1988**) Elevated protein requirements in cirrhosis of the liver investigated by whole body protein turnover studies. *Clin Sci (Lond).* 75:101-107.

Szerb JC (**1991**) Glutamate release and spreading depression in the fascia dentata in response to microdialysis with high K+: role of glia. *Brain Res.* 542:259-265.

http://rcin.org.pl

Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ (**1991**) Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol.* 261:H825- H829.

Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen TY, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC (**2005**) Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience.* 131:437-449.

Therrien G, Giguère JF, Butterworth RF (**1991**) Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 6:225-231.

Therrien G, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF (**1997**) Protective effect of L-carnitine in ammonia-precipitated encephalopathy in the portacaval shunted rat. *Hepatology.* 25:551-556.

Tomi M, Funaki T, Abukawa H, Katayama K, Kondo T, Ohtsuki S, Ueda M, Obinata M, Terasaki T, Hosoya K (**2003**) Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc-, in the newly developed rat retinal Müller cell line (TR-MUL). *Glia.* 43:208-217.

Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT (**1987**) Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology.* 7:1272-1277.

Tureen JF (**2003**) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335-344.

Vogels BA, Maas MA, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RA (**1997**) Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology.* 25:820-827.

http://rcin.org.pl

Wadzinski J, Franks R, Roane D, Bayard M (**2007**) Valproate-associated hyperammonemic encephalopathy. *J Am Board Fam Med.* 20:499-502.

Wang W, Ballatori N (**1998**) Endogenous glutathione conjugates: occurence and biological functions. *Pharmacol Rev.* 50:335-355.

Wang XF, Cynader MS (**2000**) Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. J Neurochem. 74:1434-1442.

Warren KS, Schenker S (**1964**) Effect of an inhibitor of glutamine synthesis (methionine sulfoximine) on ammonia toxicity and metabolism. *J Lab Clin Med.* 64:442-449.

Watanabe A, Sakai T, Sato S, Imai F, Ohto M, Arakawa Y, Toda G, Kobayashi K, Muto Y, Tsujii T, Kawasaki H, Okita K, Tanikawa K, Fujiyama S, Shimada S (**1997**) Clinical efficacy of lactulose in cirrhotic patients with and without subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 26:1410-1414.

Weber FL Jr, Friedman DW, Fresard KM (**1988**) Ammonia production from intraluminal amino acids in canine jejunum. *Am J Physiol.* 254:G264-G268.

Weil-Malherbe H, Gordon J (**1971**) Amino acid metabolism and ammonia formation in brain slices. J Neurochem. 18:1659-1672.

Wersinger E, Schwab Y, Sahel JA, Rendon A, Pow DV, Picaud S, Roux MJ (**2006**) The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. *J Physiol.* 577:221-234.

Williams R, James OF, Warnes TW, Morgan MY (**2000**) Evaluation of the efficacy and safety of rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy: a double-blind, randomized, dose-finding multi-centre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 12:203-208.

Windmueller HG, Spaeth AE (**1974**) Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem.* 249:5070-5079.

http://rcin.org.pl

Wolpert E, Phillips SF, Summerskill WH (**1970**) Ammonia production in the human colon. Effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. *N Engl J Med.* 283:159-164.

Wrong OM, Vince AJ, Waterlow JC (**1985**) The contribution of endogenous urea to faecal ammonia in man, determined by 15N labelling of plasma urea. *Clin Sci (Lond).* 68:193-199.

Würdig S, Kugler P (**1991**) Histochemistry of glutamate metabolizing enzymes in the rat cerebellar cortex. *Neurosci Lett.* 130:165-168.

Wysmyk U, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (**1992**) Enhanced GABA release in cerebral cortical slices derived from rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 17:1187-1190.

Yano M, Adachi N, Liu K, Arai T (**1987**) Flumazenil-induced improvement of the central dopaminergic system in rats with acute hepatic failure. *J Neurosurg Anesthesiol.* 17:69-74.

Yao H, Sadoshima S, Fujii K, Kusuda K, Ishitsuka T, Tamaki K, Fujishima M (**1987**) Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur Neurol.* 27:182-187.

Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H (**1999**) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci.* 19:10767-10777.

Young, SN, Lal S, Sourkes TL, Feldmuller F, Aronoff A, Martin JB (**1975**) Relationships between tryptophan in serum and CSF, and 5-hydroxyindoleacetic acid in CSF of man: effect of cirrhosis of liver and probenecid administration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 38:322-330.

Yudkoff M, Nissim I, Pleasure D (**1988**) Astrocyte metabolism of [^{15}N]glutamine: implications for the glutamine-glutamate cycle. *J Neurochem.* 51:843-850.

http://rcin.org.pl

Yudkoff M, Pleasure D, Cregar L, Lin ZP, Nissim I, Stern J, Nissim I (**1990**) Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [15N]glutamate. *J Neurochem.* 55:137-145.

Yurdaydin C, Herneth AM, Püspök A, Steindl P, Singer E, Ferenci P (**1996**) Modulation of hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced acute liver failure by serotonin antagonists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 8:667-671.

Zhang HF, Ong WY, Leong SK, Laperche Y (**1997**) Species differences in the localisation of gamma-glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface. *J Hirnforsch.* 38:323-330.

Zhou BG, Norenberg MD (**1999**) Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci Lett.* 276:145-148.

Zielińska M, Hilgier W, Borkowska HD, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (**2001**) Lubeluzole attenuates K(+)-evoked extracellular accumulation of taurine in the striatum of healthy rats and rats with hepatic failure. *Brain Res.* 904:173-176.

Zielińska M, Hilgier W, Borkowska HD, Oja SS, Saransaari P, Goryński P, Albrecht J (**2002a)** Ammonia-induced extracellular accumulation of taurine in the rat striatum in vivo: role of ionotropic glutamate receptors. *Neurochem. Res.* 27:37-42.

Zielińska M, Hilgier W, Law RO, Gorynski P, Albrecht J (**2002b**) Effects of ammonia and hepatic failure on the net efflux of endogenous glutamate, aspartate and taurine from rat cerebrocortical slices: modulation by elevated K+ concentrations. *Neurochem Int.* 41:87-93.

Zielińska M, Law RO, Albrecht J (**2003**) Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int.* 43:299-303.

Zielińska M, Stafiej A, Law RO, Albrecht J. (**2004**) Effects of methionine sulfoximine on the glutamine and glutamate content and cell volume in rat cerebral cortical slices: involvement of mechanisms not related to inhibition of glutamine synthesis. *Neurotoxicology.* 25:443-449.

http://rcin.org.pl

Ziemińska E, Dolińska M, Łazarewicz JW, Albrecht J (**2000**) Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology.* 21:295-300.

Zieve L (**1987**) Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2:147-165.

Zwingmann C, Flögel U, Pfeuffer J, Leibfritz D (**2000**) Effects of ammonia exposition on glioma cells: changes in cell volume and organic osmolytes studied by diffusion-weighted and high-resolution NMR spectroscopy. *Dev Neurosci.* 22:463-471.

Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF (**2003**) Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology.* 37:420-428.

Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF (**2004**) Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res.* 999:118-123.



http://rcin.org.pl