

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

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

MARTA SKOWROŃSKA

**STRES OKSYDACYJNY I NITRACYJNY WYWOŁANY PRZEZ
JONY AMONOWE W ASTROCYTACH I KOMÓRKACH
ŚRÓDBŁONKA NACZYŃ MÓZGOWYCH: PRÓBY PROTEKCJI**

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

WARSZAWA 2012

<http://rcin.org.pl>

Składam szczególne podziękowania mojemu Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi za wszechstronną pomoc, życzliwą opiekę naukową oraz inspirujące wskazówki i dyskusje, które wzbogaciły moją wiedzę i niezmiennie mobilizowały do dalszej wzmoczonej pracy.

Marta Skowrońska

Pragnę serdecznie podziękować dr hab. Magdalenie Zielińskiej, za poświęcony czas oraz cenne uwagi i sugestie, które bardzo pomogły mi w realizacji niniejszej pracy.

Równie gorąco dziękuję Panu Prof. Michaelowi Aschnerowi z Uniwersytetu w Vanderbilt, za owocną współpracę, której wyniki stanowią część tej rozprawy oraz mgr Luizie Wójcik –Stanaszek za zaangażowanie w badania nad aktywnością metaloproteinaz.

Wyrazy wdzięczności składam także mgr Annie Dybel, Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś oraz Inez Fręsko, za fachową pomoc techniczną w realizacji badań.

Bardzo dziękuję też wszystkim pracownikom Zakładu Neurotoksykologii za życzliwość, okazaną pomoc oraz sympatyczną atmosferę, dzięki której praca nad niniejszą rozprawą była pozytywnym doświadczeniem.

Ponadto, dziękuję moim Najbliższym za wiarę we mnie, cierpliwość i wsparcie.

Marta

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

Skowrońska M, Zielińska M, Albrecht J (2010) Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia-treated astrocytes. *J Neurochem* 115: 1068-1076. (IF=4,33)

Skowrońska M, Albrecht J (2012) Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res* 21: 236-44. (IF=3,01)

Skowrońska M, Zielińska M, Wójcik-Stanaszek L, Ruszkiewicz J, Milatovic D, Aschner M, Albrecht J (2012) Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/ nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *121: 125-134.* (IF=4,33)

Badania, których wyniki przedstawiono w rozprawie, były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów badawczych: nr N 401 0550 33 i nr S 005/P-N/2007/01 (MNiSW) oraz nr N401 572 440 (NCN)

I. WYKAZ SKRÓTÓW	8
II. WSTĘP	12
II.1. Amoniak – charakterystyka substancji, rola fizjologiczna i metabolizm w organizmach ssaków	12
II.2. Rola amoniaku w patogenezie encefalopatii wątrobowej	14
II.2.1. <i>Rola nadmiaru amoniaku w OUN w patogenezie encefalopatii wątrobowej</i>	18
II.2.2. <i>Wpływ hiperamonemii na poszczególne typy komórek OUN</i>	19
II.2.3. <i>Rola amoniaku w patogenezie obrzęku mózgu związanego z ostrą niewydolnością wątroby</i>	22
II.3. Wykładniki biochemiczne i patofizjologiczne toksycznego działania amoniaku na OUN	23
II.3.1. <i>Stres oksydacyjny i nitracyjny w neurotoksyczności amoniaku</i>	24
II.4. Wybrane strategie oraz związki do potencjalnego zastosowania w zapobieganiu toksycznemu działaniu jonów amonowych.	28
II.4.1. <i>Hamowanie stresu oksydacyjnego</i>	28
II.4.1.1. <i>Peptydy natriuretyczne</i>	28
II.4.1.2. <i>Glutation</i>	31
II.4.2. <i>Usuwanie nadmiaru amoniaku z organizmu</i>	34
II.4.2.1. <i>Fenylomaślan ornityny</i>	34
III. CELE PRACY	37
IV. MATERIAŁY I METODY	40
IV.1. Hodowle komórkowe	40
IV.1.1. <i>Pierwotna hodowla szczurzych astrocytów</i>	40
IV.1.2. <i>Hodowla komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura linii RBE-4</i>	40
IV.2. Warunki inkubacji hodowli komórkowych z amoniakiem	41
IV.3. Pomiar wolnych rodników tlenowych metodą fluorymetryczną	41

IV.4. Pomiar produkcji anionorodnika ponadtlennego [$\cdot\text{O}_2$] przy użyciu skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego	42
IV.5. Oznaczanie poziomu mRNA – analiza ekspresji genów	42
IV.5.1. <i>Izolacja RNA</i>	43
IV.5.2. <i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i>	44
IV.5.3. <i>Real-Time PCR</i>	45
IV.6. Oznaczenie poziomu azotanów i azotynów	46
IV.7. Pomiar objętości komórkowej	46
IV.8. Analiza poziomu białka – Western Blot	47
IV.8.1. <i>Izolacja białka do analizy Western Blot</i>	47
IV.8.2. <i>Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących</i>	47
IV.8.3. <i>Western blotting</i>	48
IV.9. Oznaczanie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP i cGMP	49
IV.10. Pomiar aktywności syntazy tlenku azotu	49
IV.11. Oznaczanie glutationu wewnątrzkomórkowego w hodowlach in vitro metodą HPLC	51
IV.12. Badanie przepuszczalności pojedynczych warstw komórek RBE-4	52
IV.13. Oznaczanie zmian liczebności komórek	53
IV.14. Badanie żywotności komórek	53
IV.15. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz w pożywkach hodowlanych metodą zymografii żelowej	54
IV.16. Oznaczanie izoprostanów (F₂-IsoPs)	55
IV.17. Oznaczanie białka	55
IV.17.1. <i>Metoda Bradforda</i>	55
IV.17.2. <i>Metoda Lowry’ego</i>	56
IV.17.3. <i>Metoda wykorzystująca kwas biscynchoninowy (BCA)</i>	56
IV.18. Analiza statystyczna wyników	57
V. WYNIKI	58
V.1. Wpływ jonów amonowych na astrocyty	58
V.1.1. <i>Wpływ ANP i CNP na produkcję wolnych rodników tlenowych w komórkach kontrolnych i traktowanych amoniakiem</i>	58

V.1.2.	<i>Wpływ aktywacji receptora NPR-C na produkcję wolnych rodników tlenowych w komórkach kontrolnych i traktowanych amoniakiem</i>	60
V.1.3.	<i>Wpływ ANP i cANP₍₄₋₂₃₎ na produkcję [O_2^-] wywołaną amoniakiem</i>	61
V.1.4.	<i>Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ na ekspresję białka $G_{i\alpha-2}$ oraz na produkcję cAMP i cGMP: dowody na funkcjonalność NPR-C w astrocytach</i>	63
V.1.5.	<i>Wpływ preinkubacji z przeciwciałem anty- $G_{i\alpha-2}$ na hamowanie produkcji [O_2^-] przez cANP₍₄₋₂₃₎ w astrocytach traktowanych amoniakiem</i>	65
V.1.6.	<i>Wpływ ANP i cANP₍₄₋₂₃₎ na syntezę tlenku azotu w astrocytach kontrolnych i traktowanych amoniakiem – rola endotelialnej formy syntazy tlenku azotu</i>	66
V.1.7.	<i>Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ na zmiany objętości astrocytów wywołane amoniakiem</i>	69
V.2.	Wpływ jonów amonowych na komórki śródbłonna naczyń (RBE-4)	71
V.2.1.	<i>Wpływ amoniaku na produkcję wolnych rodników tlenowych, tlenku azotu i F_2-izoprostanów w linii komórek śródbłonna mikronaczyń mózgu RBE-4</i>	71
V.2.2.	<i>Wpływ amoniaku na wewnątrzkomórkowy poziom glutationu w komórkach RBE-4</i>	73
V.2.3.	<i>Wpływ amoniaku na ekspresję transportera γ^+ LAT2</i>	74
V.2.4.	<i>Wpływ amoniaku na fizjologiczne parametry komórek RBE-4, kluczowe dla ich funkcji barierowych</i>	76
V.2.5.	<i>Wpływ amoniaku na zewnątrzkomórkową aktywność MMP-2 i MMP-9</i>	78
V.2.6.	<i>Modulacja stresu oksydacyjno – nitracyjnego wywołanego amoniakiem przez czynniki egzogenne</i>	80
VI.	DYSKUSJA	85
VII.	WNIOSKI	97
VIII.	STRESZCZENIE	99
IX.	LITERATURA	106

I. WYKAZ SKRÓTÓW

ADP	adenozynodifosforan
AMP	adenozynomonofosforan
ANP	przedsiorkowy peptyd natriuretyczny (ang. <i>atrial natriuretic peptide</i>)
AP-1	kompleks białek działający jako czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activator protein-1</i>)
ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. <i>antioxidant response element</i>)
ATP	adenozynotrifosforan
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood brain barrier</i>)
BCA	kwaskwam biskynchoninowy
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
białko G _i	białko G inhibitorowe
BNP	mózgowy peptyd natriuretyczny (ang. <i>brain natriuretic peptide</i>)
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan
cANP ₍₄₋₂₃₎	fragment peptydu ANP, specyficzny agonista NPR-C
CAT	transporter aminokwasów kationowych (ang. <i>cationic amino acid transporter</i>)
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan
CNP	peptyd natriuretyczny typu C (ang. <i>C type natriuretic peptide</i>)
Cys	cysteina
Cyss	dwusiarczkowa postać cystyny
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol, barwnik fluorescencyjny
DHEt	dihydroetydyna (ang. <i>dihydroethidium</i>)
DiI	nadchloran 1,1'-dioktadecylo-3,3',3'-tetrametyloindokarbocyanianu, lipofilny barwnik fluorescencyjny
DMEM	podłoże Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
dNTP	trifosforan deoksynukleozydu
EDTA	kwaskwam wersenowy; kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
eNOS	endotelialna forma syntazy tlenku azotu
EW	encefalopatia wątrobowa
F ₂ -IsoPs	F ₂ – izoprostany

FBS	bydłęca surowica płodowa (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	izotiocyjanian fluoresceiny
GABA	Kwas γ -aminomasłowy
GAPDH	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa.
GCL	ligaza glutaminianowo-cysteinowa
GCLC	katalitycznie aktywna podjednostka ligazy glutaminianowo-cysteinowej
GEE	ester dietylowy glutationu (ang. <i>diethyl ester of glutatione</i>)
GLAST	transporter glutaminianowo- asparaginianowy
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
GPx	Peroksydaza glutationowa
GR	reduktaza glutationowa
GS	syntaza glutaminy
GSH	zredukowana forma glutationu
GSSG	utleniona, dwusiarczkowa forma glutationu
Gstm3	S- transferaza glutationowa
GSx	glutation całkowity
GTP	5'-guazynotrojfosforan
H ₂ DCFDA	diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
Ham's F10	podłoże F-10 (Ham), wykorzystywane do hodowli komórek RBE-4
HAV	Wirus zapalenia wątroby typu A (ang. <i>Hepatitis A Virus</i>)
HBV	Wirus zapalenia wątroby typu B (ang. <i>Hepatitis B Virus</i>)
HEV	Wirus zapalenia wątroby typu E (ang. <i>Hepatitis E Virus</i>)
HPLC	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IBMX	3-izobutylo-1-metyloksantyna (ang. <i>3-isobutyl-1-methylxantine</i>)
IMP	inozynomonofosforan
iNOS	indukowalna forma syntazy tlenku azotu
j.u.	jednostka umowna (ang. <i>arbitrary unit</i> ; a.u.)
LD ₅₀	średnia dawka śmiertelna (ang. <i>median lethal dose</i>)
L-NNA	L-N ^G -nitroarginina
LOLA	L-asparaginian L- ornityny (ang. <i>L-ornithine L-aspartate</i>)
MAPK	kinazy aktywowane mitogenem (ang. <i>mitogen activated protein kinases</i>)
MMP	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinase</i>)

MMPs	metaloproteinazy: MMP-9 i MMP-2
MnSOD	manganowa dysmutaza ponadtlenkowa
MPT	zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (ang. <i>mitochondrial permeability transition</i>)
MRP	białka oporności wielolekowej (ang. <i>multidrug resistant protein</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo tetrazolu
NADPH	zredukowana forma kationu fosforanowego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NKCC	kotransporter sodowo-potasowo-chlorkowy
NMDA	kwask <i>N</i> -metylo-D-asparaginowy
nNOS	neuronalna forma syntazy tlenu azotu
NO	tlenek azotu
NOS	syntaza tlenu azotu
NOx	azotany i azotyny
NPR-A	receptor peptydów natriuretycznych typu A
NPR-B	receptor peptydów natriuretycznych typu B
NPR-C	receptor peptydów natriuretycznych typu C
NPRs	receptory peptydów natriuretycznych (ang. <i>natriuretic peptide receptors</i>)
NPs	peptydy natriuretyczne (ang. <i>natriuretic peptides</i>)
OD	gęstość optyczna
ONS	stres oksydacyjno-nitracynjny
OP	fenylomaślan ornityny (ang. <i>ornithine phenylbutyrate</i>)
OPA	dialdehyd orto-ftalowy
Orn	L-ornityna
OS	stres oksydacyjny
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy
PB	fenylomaślan (ang. <i>phenylbutyrate</i>)
PBR	receptor benzodiazepinowy
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PET	pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>positron emission tomography</i>)
PFA	paraformaldehyd
PKA	kinaza białkowa regulowana przez cAMP (ang. <i>protein kinase A</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PKG	kinaza białkowa regulowana przez cGMP (ang. <i>protein kinase G</i>)

PLC	fosfolipaza C
PMSF	fluorek fenylometylosulfonowy (ang. <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
RBE-4	linia komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura (ang. <i>rat brain endothelial cell line</i>)
RhCG	glikoproteina Rh (ang. <i>rhesus glycoprotein</i>)
RNS	wolne rodniki azotowe (ang. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	wolne rodniki tlenowe (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (ang. <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sGC	rozpuszczalna forma cyklazy guanylowej
TBS-T	roztwór soli buforowany Trisem, z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>tris-buffered saline with Tween-20</i>)
TCA	kwask trichlorooctowy
TJ	połączenie ścisłe (ang. <i>tight junction</i>)
VSMC	komórki mięśni gładkich naczyń (ang. <i>vascular smooth muscle cells</i>)
α MEM	podłoże do hodowli komórek RBE-4
γ -GT	γ – glutamylotransferaza

II. WSTĘP

II.1. Amoniak – charakterystyka substancji, rola fizjologiczna i metabolizm w organizmach ssaków

W warunkach fizjologicznych amoniak występuje w dwóch formach: jonowej (NH_4^+) oraz gazowej (NH_3). Ze względu na niestabilną stereochemicznie strukturę cząsteczki, może ona ulegać wewnętrznej inwersji wytwarzając dynamiczną, zależną od pH i temperatury równowagę pomiędzy obiema formami. NH_3 w fizjologicznym pH ulega uprotonowaniu, dlatego też aż 98% amoniaku obecnego we krwi występuje w postaci jonów amonowych.

W organizmach zwierząt i ludzi amoniak jest zarówno źródłem jonów azotu do produkcji puryn, pirymidyn oraz niektórych aminokwasów, jak i naturalnym produktem metabolizmu białek i kwasów nukleinowych (Visek, 1984). Do krwioobiegu trafia głównie z układu pokarmowego, jako produkt rozkładu białek i deaminacji aminokwasów, w wyniku hydrolizy mocznika poprzez endogenne jak i zewnątrzkomórkowe ureazy wytwarzane przez florę bakteryjną zasiedlającą jelita oraz jako efekt metabolizmu w bakterii. Ponadto, może być też produkowany przez inne narządy w wyniku szeregu procesów metabolicznych tj. deaminacja AMP do IMP i amoniaku (w mięśniach szkieletowych w trakcie intensywnego wysiłku fizycznego), deamidacja glutaminy (Gln) (nerki, mózg), deaminacja glutaminianu (Glu) (mózg). Mimo, iż odgrywa kluczową rolę w organizmach ludzi i zwierząt, jego nadmiar jest toksyczny ($\text{LD}_{50} = 350 \text{ mg/kg}$ (szczur, doustnie)), dlatego jego stężenie musi być utrzymywane na odpowiednio niskim poziomie (fizjologiczne stężenie amoniaku u człowieka we krwi: $70\text{-}113 \mu\text{M}$, w mózgu ok. 1,5 do 3 razy wyższe: $150\text{-}200 \mu\text{M}$ (Cooper i Plum, 1987)). Organem odpowiedzialnym za detoksykację amoniaku jest w głównej mierze wątroba. To w

niej, w wyniku serii reakcji chemicznych w tzw. cyklu moczNIKowym (ornitynowym) następuje przekształcenie amoniaku do dużo mniej toksycznego moczNIka.

W pozostałych narządach tj.: mózg, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy czy płuca, detoksykacja amoniaku zachodzi z dużo mniejszą wydajnością i jedynie na drodze syntezy glutaminy, która powstaje w wyniku przyłączenia amoniaku do Glu w reakcji katalizowanej przez syntazę glutaminy (GS) (Cooper i wsp., 1979).



W mózgu główną rolę w detoksykacji amoniaku odgrywają astrocyty. To przede wszystkim one, jako jedyne komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN) posiadające znaczącą aktywność GS (Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979) produkują glutaminę, która następnie może być transportowana poza barierę krew-mózg (BBB) lub do innych komórek OUN (w głównej mierze do neuronów, ale również do mikrogleju (Svoboda i Kerschbaum, 2009), gdzie rozkładana jest z powrotem do glutaminianu.

BBB dla gazowej postaci amoniaku jest wysoce przepuszczalna, przedostaje się ona z krwi do mózgu na zasadzie swobodnej dyfuzji przez błony komórkowe (Phelbs i wsp., 1977). Nie tłumaczy to jednak zwiększonego stężenia amoniaku w mózgu, gdyż forma gazowa stanowi jedynie 1% całkowitej puli amoniaku we krwi (Reichle i Larson, 1981). Ponieważ w fizjologicznym pH w organizmie przeważa amoniak w postaci kationu (NH_4^+) (Warren, 1962), przypuszcza się, iż przedostaje się on do mózgu głównie na drodze aktywnego transportu przez komórki śródbłonna tworzące BBB, wykorzystując do tego celu kanały i transportery potasowe, bądź też układy transportujące inne kationy o zbliżonej do NH_4^+

wielkości (Ott i Larsen, 2004). Wykazano, iż w mikronaczyniach mózgu istnieją transportery specyficzne dla jonów amonowych (RhCG) (Huang i Liu, 2001), jednakże ich funkcjonalność nie została jak dotąd potwierdzona.

II.2. Rola amoniaku w patogenezie encefalopatii wątrobowej

Pierwsze doniesienia o toksycznym działaniu amoniaku pochodzą z XIX wieku. Zaobserwowano wówczas zmiany behawioralne oraz śpiączkę u zwierząt z operacyjnie wywołaną hiperammonemią (zespolenie żyły wrotnej i żyły głównej dolnej) (Hahn i wsp. 1893). Natomiast w latach 30 XX wieku pokazano, iż sole amonowe powodują śpiączkę u pacjentów z marskością wątroby (Van Caulert i wsp., 1932; Stahl, 1936). Od tego czasu zainteresowanie i uwaga wielu badaczy, zarówno zajmujących się zaburzeniami funkcji wątroby jak i schorzeniami układu nerwowego, skupiła się na głębszym poznaniu interakcji pomiędzy metabolizmem amoniaku w wątrobie a funkcjonowaniem mózgu. To doprowadziło do powstania terminu i definicji encefalopatii wątrobowej (EW), którą określa się jako zespół objawów neuropsychiatrycznych i nerwowo-mięśniowych związanych z upośledzeniem ostrym bądź przewlekłym funkcji wątroby (Albrecht i Jones, 1999).

Ustalono, że upośledzenie funkcji detoksykacyjnych tego organu pociąga za sobą konsekwencje w postaci m.in. podwyższenia poziomu amoniaku we krwi, tzw. hiperamonemii, która jest uznawana za najistotniejszy czynnik w patofizjologii tego schorzenia. Warto też nadmienić, że choć amoniak jest głównym czynnikiem sprawczym w EW, nie jest jedynym. Liczba substancji toksycznych trafiających do mózgu w warunkach upośledzonego funkcjonowania wątroby przekracza 20, a należą do nich m.in. kwasy tłuszczowe, merkaptany, fenol i oktanian metylu (Zaki, 1983; Zieve, 1987).

Różnorodność przyczyn i czasu trwania hiperamonemii implikuje podział encefalopatii hiperamonemicznych na:

ostrą encefalopatię wątrobową (wirusowe lub toksyczne uszkodzenie wątroby)

przewlekłą encefalopatię wątrobową (marskość wątroby, zespolenie wrotno-czeczne)

encefalopatię związaną z zespołem Reye'a (tłuszczowe zwyrodnienie wątroby związane najprawdopodobniej z niewłaściwą odpowiedzią gospodarza na infekcję wirusową, przyczyna powstawania jest nie do końca poznana)

encefalopatie wywołane wrodzonymi niedoborami enzymów cyklu mocznikowego (cytrulinemia, argininemia, mutacje w obrębie genu kodującego transkarbamoylazę ornitynową)

Wśród encefalopatii hiperamonemicznych najczęściej występującą i najlepiej zbadaną jest encefalopatia wątrobowa. Zgodnie z ustaleniami 11-stego Światowego Kongresu Gastroenterologii (Ferenci i wsp., 2002), które obowiązują do chwili obecnej (Bajaj i wsp., 2011), wyróżniamy trzy typy EW:

Typ A – typ ostry – związany z ostrą niewydolnością wątroby

Typ B – typ przewlekły encefalopatie będące skutkiem operacyjnego lub spontanicznego zespolenia żył wrotnej i głównej dolnej

Typ C – typ przewlekły – encefalopatie chroniczne, najczęściej będące konsekwencją marskości bądź przewlekłej niewydolności wątroby

Typ A jest skutkiem ostrego i nagłego uszkodzenia wątroby, mogącego wynikać z różnych przyczyn. Najczęściej jest to efekt infekcji wirusami hepatotropowymi (HAV, HBV, HEV) lub przedawkowania leków. W krajach rozwijających się przeważa przyczyna wirusowa, natomiast w USA i zachodniej Europie większość przypadków ostrej niedoczynności wątroby wynika z przedawkowania leków. Wśród zakażeń wirusowych

najwyższą śmiertelność z powodu ostrej niewydolności wątroby notuje się w przypadku zakażeń wirusem HBV, jest też on przyczyną ok. 30% zachorowań na ostrą niewydolność wątroby na niektórych obszarach Europy południowej oraz ich główną przyczyną w Azji, środkowej Afryce i dorzeczu Amazonii (Bernal i wsp., 2010). Natomiast ostre uszkodzenia wątroby spowodowane lekami są najczęściej wynikiem przedawkowania paracetamolu (acetaminofenu) (dotyczy to przede wszystkim USA i północnej Europy (Rahman i Hodgson, 2001; Larson i wsp., 2005), ale też przedawkowania leków przeciwgruźliczych (izoniazyd), przeciwpadaczkowych (fenytoina, walproinian) i antybiotyków (nitrofurantoina, ketokonazol) (Mindikoglu i wsp., 2009). Do innych przyczyn takiego uszkodzenia wątroby zaliczamy: zatrucia grzybami (np. muchomorek sromotnikowym zawierającym amanitynę, uszkodzenia spowodowane sepsą i zakrzepicą żyły wrotnej (Ichai i Samuel, 2008). Encefalopatia typu A ma gwałtowny przebieg, z szybkim przejściem do drgawek, sztywności i śpiączki. W najbardziej zaawansowanym stadium dochodzi do obrzęku mózgu i nadciśnienia wewnątrzczaszkowego, które są bezpośrednią przyczyną wysokiej, ok. 70-80% śmiertelności chorych (O'Grady i wsp., 1989; Cordoba i Blei, 1996).

Typ B encefalopatii jest to typ niezwiązany z dysfunkcją wątroby, będący efektem zespolenia żył wrotnej i głównej dolnej. Połączenie to jest wrodzone lub nabyte, jako efekt operacji (tzw. by-pass) lub naturalnie powstałej przetoki okołowrotnej. Przetoka powstaje, gdy rozszerzone naczynia żyłne omijają wątrobę, jest to konsekwencja powikłań nadciśnienia w żyłach wrotnej.

Typ C jest najczęściej występującym typem EW, wynikającym z marskości wątroby, tj. przewlekłej niewydolności wątroby. Typ C jest zwykle efektem poalkoholowej marskości wątroby.

Przebieg wszystkich typów tej choroby można klasyfikować w zależności od stopnia nasilenia objawów neuropsychiatrycznych, poczynając od stopnia 0 (brak jakichkolwiek objawów) do stopnia 4 (śpiączka, bez możliwości oceny stanu mentalnego pacjenta) (Conn i wsp., 1977; Santiago i Munoz, 2008; Eroglu i Byrne, 2009; Bajaj i wsp., 2011):

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

Stopień Encefalopatii	Objawy
0	Brak zauważalnych zmian (stan podkliniczny, wykrywany tylko przy pomocy subtelnych testów behawioralnych lub biochemicznych)
1 (łagodny)	Zaburzenia snu, lekkie zaburzenia świadomości, osłabione skupienie uwagi, euforia lub depresja, drażliwość, brak koordynacji ruchowej, pogorszenie sprawności odręcznego pisania
2 (umiarkowany)	Letarg, łagodna dezorientacja czasowa, zaburzenia pamięci krótkotrwałej, problemy z obliczeniami, wyraźna zmiana osobowości, zachowania irracjonalne i nieadekwatne do sytuacji, niewyraźna mowa, ataksja
3 (zaawansowany)	Senność, zagubienie, częściowe otępienie, poważna dezorientacja w czasie i przestrzeni, niemożność wykonywania zadań umysłowych, paranoja, dziwne zachowania, napady pobudzenia, sztywność, oczopląs, brak kontaktu słownego
4 (śpiączka)	Otępienie, brak jakiegokolwiek kontaktu z otoczeniem

II.2.1. Rola nadmiaru amoniaku w OUN w patogenezie encefalopatii wątrobowej

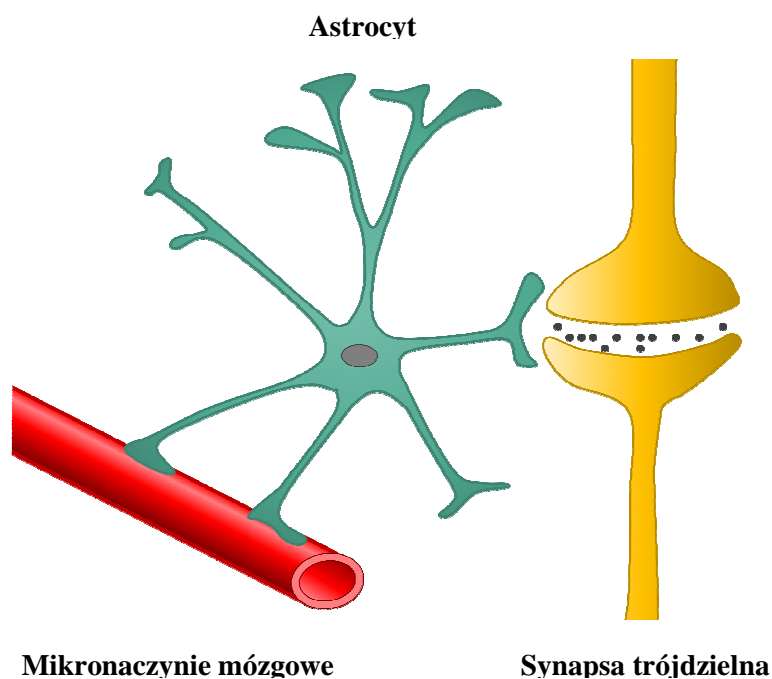
Amoniak uznawany jest za najważniejszą przyczynę powstawania EW a hiperamonemia pozostaje podstawowym biomarkerem tego schorzenia. Większość badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wskazuje na dobrą korelację pomiędzy stężeniem amoniaku we krwi a nasileniem objawów EW. Kontrowersyjne przypadki, w których korelacja ta była kwestionowana, rozpatruje się obecnie, jako wynikające z niedokładności bądź różnic metodologicznych pomiędzy poszczególnymi ośrodkami badawczymi (Lockwood, 2004). Poziom amoniaku we krwi u osób zdrowych wynosi mniej niż 50 $\mu\text{mol/L}$, podczas gdy u chorych na przewlekłą postać EW jest on 1,5-2-krotnie wyższy, a u osób chorych na ostrą postać tej choroby stężenie amoniaku może wzrastać nawet 4-10-krotnie (Lockwood i wsp. 1991; Jalan i wsp., 2004). Natomiast w mózgu jego stężenie jest jeszcze wyższe, w przypadku ostrej EW może osiągać wartość 2-5 mmol/L (Giguere i Butterworth, 1984). Zaobserwowano, iż glutaminaza, enzym katalizujący reakcję deaminacji glutaminy z wytworzeniem Glu i jonu amonowego, również odgrywa istotną rolę w patogenezie EW (Romero-Gómez, 2005). Podwyższona aktywność glutaminazy może mieć podłoże genetyczne, wiążąc się z mutacją promotora genu kodującego ten enzym (Albrecht, 2010; Romero-Gomez i wsp., 2010). Badania wskazują, iż ryzyko pogłębienia się EW u osób z marskością wątroby jest związane ze zwiększoną produkcją amoniaku z glutaminy w jelitach i w nerce (Olde Damink i wsp., 2003; Romero-Gómez i wsp., 2004). Wysokie stężenie amoniaku w mózgu, jakie obserwuje się w ostrej EW, jest efektem nie tylko jego zwiększonej zawartości we krwi, ale najprawdopodobniej także zwiększonego przechodzenia amoniaku przez BBB. Z badań śledzących ten proces techniką PET (z wykorzystaniem znakowanego amoniaku [N^{13}]) wynika, iż amoniak dużo łatwiej

przechodzi przez barierę u osób z zaawansowaną EW niż u osób zdrowych (Lockwood i wsp., 1991), jednakże nie wszystkie badania potwierdziły te wyniki (Goldbecker i wsp., 2010).

W licznych zwierzęcych modelach EW obserwowano zmiany przepuszczalności BBB dla związków o różnej masie cząsteczkowej (Laursen i wsp., 1975; Horowitz i wsp., 1983; Zaki i wsp., 1983), jednak obserwacje te nie zostały potwierdzone we wszystkich modelach i nie dla wszystkich znaczników (Sarna i wsp., 1977; Lo i wsp., 1987; Aleksander i wsp., 2000). Kontrowersje trwają do dnia dzisiejszego (Goldbecker i wsp., 2010; Wang i wsp., 2011), niemniej wykazano, iż EW towarzyszy zwiększony transport endocytarny poprzez komórki śródbłonka tworzące BBB oraz zmiany w budowie tzw. połączeń ścisłych (TJ) (Pilbeam i wsp., 1983; Chen i wsp., 2009), które są niemożliwe do zarejestrowania metodą mikroskopii świetlnej czy elektronowej (Kato i wsp., 1992). To sugeruje, że funkcjonalność i ścisłość BBB jest rzeczywiście zmieniona, jednakże zmiany te są zbyt subtelne, aby mogły być wychwycone klasycznymi metodami, wykorzystującymi markery służące do oznaczania całkowitego przerwania BBB (Skowrońska i Albrecht, 2011).

II.2.2. Wpływ hiperamonemii na poszczególne typy komórek OUN

Nadmiar amoniaku w mózgu uszkadza przede wszystkim astrocyty, a w znacznie mniejszym stopniu lub wcale neurony. Wynika to z położenia topograficznego tych komórek w obrębie tzw. jednostki nerwowo- naczyniowej; ich wypustki bezpośrednio otaczają mikronaczynia mózgu wychwytyjąc i metabolizując substraty pochodzące z krwi, a ich ciała odgradzają neurony od mikronaczyń (Tsacopoulos i Magistretti, 1996) (**Ryc.II.1.**).



Ryc. II.1. Przestrzenne położenie astrocytów w obrębie jednostki nerwowo- naczyniowej.

Kluczowym efektem toksycznego działania amoniaku na astrocyty jest ich obrzmienie, które skutkuje obrzękiem mózgu, stanowiącym krytyczne powikłanie ostrej EW (Takahashi i wsp., 1991). Obrzmienie astrocytów jest powszechnie obserwowane zarówno w tkankach mózgu chorych z ostrą EW (Kato i wsp., 1992), jak i w modelach zwierzęcych EW (Blei i wsp., 1994). Za tym, że to amoniak odpowiada za obrzmienie astrocytów występujące w EW przemawiają fakty, że podanie amoniaku zwiększa obrzęk mózgu w modelach EW *in vivo* (Blei i wsp., 1994) oraz powoduje obrzmienie astrocytów w hodowli *in vitro* (Rama Rao i wsp., 2003). Ponadto, obniżenie zawartości amoniaku we krwi (Rose i wsp., 1999) czy też ograniczenie jego napływu do mózgu (Rose i wsp., 2000) skutkuje zmniejszeniem obrzęku i złagodzeniem objawów ostrej EW (Rose i wsp., 1999, 2000). Natomiast w przypadku encefalopatii chronicznej astrocyty przyjmują cechy morfologiczne charakterystyczne dla

komórek Alzheimerera typu II: są obrzmiałe, z dużymi jądrami, w których widać wyraźnie wyodrębnione jąderka i jasną chromatynę (Gregorios i wsp., 1985).

Neurony w warunkach hiperamonemii *in situ* są stosunkowo dobrze chronione przez astrocyty przed toksycznym wpływem amoniaku, dlatego też zmiany histopatologiczne neuronów w EW występują dużo rzadziej. Martwicę i apoptozę neuronów można zaobserwować jedynie wówczas, gdy hodowle tych komórek podda się działaniu amoniaku, bez obecności astrocytów (Li i wsp., 2004), co potwierdza ochronną rolę tych komórek. Jednym z przejawów „opiekuńczej” funkcji astrocytów jest zwiększona pod wpływem amoniaku synteza glutationu w astrocytach. „Nadmiar” wyprodukowanego glutationu służy jako źródło prekursorów dla jego syntezy w neuronach, co może być jedną z przyczyn względnej odporności neuronów na amoniak (Hilgier i wsp., 2010). Uważa się, że hiperamonemii czy EW nie towarzyszy rozległe i trwałe uszkodzenie neuronów (Butterworth, 2007), a neurologiczne objawy są przeważnie odwracalne; często ustępują zupełnie w wyniku przeszczepienia wątroby (Hallik i wsp., 2011).

Jakkolwiek efekty działania amoniaku na astrocyty i neurony są dobrze poznane i udokumentowane, wciąż niewiele wiadomo jak wpływa on na komórki śródbłonna tworzące BBB i jak zmienia ich właściwości kluczowe dla utrzymania homeostazy mózgu, a co za tym idzie funkcjonalności samej bariery. Badania morfologiczne wykazały wakuolizację i znaczne powiększenie się komórek śródbłonna naczyń mózgowych oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co sugeruje zwiększenie przepuszczalności i transportu pinocytarnego w obrębie BBB (Kato i wsp., 1992; Matkowskyj i wsp., 1999). Natomiast w odniesieniu do funkcji wiadomo, że amoniak moduluje transport różnych cząsteczek poprzez BBB, wpływając na transportery znajdujące się na komórkach śródbłonna. Wykazano, iż w różnych modelach EW zwiększony jest transport aminokwasów: dużych neutralnych, m.in. tryptofanu (James i wsp., 1978) oraz aromatycznych (tyrozyna, fenyloalanina) (Smith i wsp., 1978),

których napływ do mózgu jest stymulowany poprzez wymianę z glutaminą produkowaną w wyniku detoksykacji amoniaku. Ponadto pokazano, że amoniak oddziałuje także na transport aminokwasów kationowych: argininy, która jest prekursorem do syntezy tlenku azotu (NO) oraz ornityny (Orn) (Albrecht i wsp., 1994, 1996), a także wpływa na transport substratów energetycznych glukozy i kreatyny (Belanger i wsp., 2006, 2007). Kontrowersje dotyczące wpływu amoniaku na BBB omówiono obszernie we własnej pracy przeglądowej (Skowrońska i Albrecht, 2011).

II.2.3. Rola amoniaku w patogenezie obrzęku mózgu związanego z ostrą niewydolnością wątroby

Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, obrzęk mózgu oraz związany z nim wzrost ciśnienia śródczaszkowego są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów u chorych z ostrą EW (Takahashi i wsp., 1991); wg niektórych badaczy częstość zgonów sięga aż 80% (Blei, 2005). Powstawanie obrzęku mózgu zależy od intensywności i czasu trwania wzrostu poziomu amoniaku we krwi. Śmiertelność pacjentów z EW z powodu obrzęku mózgu jest ściśle skorelowana ze stężeniem amoniaku we krwi tętniczej (Clemmesen i wsp., 1999); a w badaniach przeprowadzonych na 87 chorych z ostrą niewydolnością wątroby, klinicznie istotny obrzęk mózgu występował dopiero przy poziomie amoniaku wyższym niż 150 $\mu\text{mol/L}$ (Kitzberger i wsp., 2009). W zwierzęcych modelach hiperamonemii wywołanej podawaniem octanu amonu (bez uszkodzenia wątroby) także obserwowano obrzęk mózgu (Takahashi i wsp., 1991), co potwierdza udział amoniaku w generowaniu tego zjawiska.

Uważa się, że obrzęk mózgu towarzyszący EW ma cechy obrzęku cytotoksycznego, a woda gromadzi się przede wszystkim w astrocytach powodując ich obrzmienie. Związane jest to z toksycznym uszkodzeniem tych komórek, do którego przyczyn zalicza się wywołany przez amoniak stres oksydacyjno-nitracynowy, zaburzenie funkcjonowania komórkowych pomp

jonowych i układów transportujących różne metabolity oraz powstanie nierównowagi osmotycznej pomiędzy wnętrzem komórki a jej środowiskiem (Takahashi i wsp., 1991; Vaquero i Butterwoth, 2007; Jayakumar i wsp., 2008). Zaobserwowano także, iż wymieniony łańcuch przyczynowo-skutkowy działa na zasadzie zamkniętego „błędnego koła” (Häussinger i wsp., 2008). Niedawno sformułowana i wiarygodnie udokumentowana hipoteza (tzw. hipoteza „konia trojańskiego”) zakłada, iż jedną z głównych przyczyn uszkodzenia astrocytów w EW jest gromadzenie się w tych komórkach zbyt dużych ilości glutaminy, będące efektem metabolizowania nadmiaru amoniaku. Według tej hipotezy nadwyżka glutaminy jest transportowana do mitochondriów i tam metabolizowana do amoniaku i Glu, co skutkuje wzrostem stężenia amoniaku w mitochondriach i indukcją stresu oksydacyjnego (Albrecht i Norenberg, 2006). Ostatnie doniesienia sugerują także udział komponenty naczyniopochodnej w obrzęku mózgu wywołanym amoniakiem, wskazując na zmiany przepuszczalności BBB. Badania przeprowadzone techniką rezonansu magnetycznego pokazują zależny od regionu i stopnia zaawansowania choroby obrzęk naczyniopochodny, zarówno u szczurów z ostrą hiperamonemią (Cauli i wsp., 2007), jak i z ostrą niewydolnością wątroby (Cauli i wsp., 2011). Wykazano też, że w zwierzęcych modelach EW wzrost ciśnienia śródczaszkowego jest ściśle skorelowany ze wzrostem przepuszczalności BBB oraz ze wzrostem aktywności metaloproteinazy- 9 (MMP-9) (Cauli i wsp., 2011), a zmiany te są skutkiem degradowania białek tworzących TJ przez aktywowane MMPs (Chen i wsp., 2009).

II.3. Wykłádniki biochemiczne i patofizjologiczne toksycznego działania amoniaku na OUN

Jakkolwiek patofizjologiczne podstawy EW nie są do końca poznane, wiadome jest, iż akumulacja amoniaku w mózgu następuje zarówno w przypadku ostrego jak i chronicznego uszkodzenia wątroby i jest odpowiedzialna za zaburzenia procesów bioenergetycznych

(Kosenko i wsp., 1994; Rao i Norenberg, 2001) oraz funkcjonowania różnych układów neuroprzekaźnikowych (Mousseau i Butterworth, 1994; Albrecht i Jones, 1999). W szczególności, amoniak aktywuje obwodowe receptory benzodiazepinowe (Norenberg, 1997; Desjardins i Butterworth, 2002), co prowadzi do syntezy neurosteroidów pobudzających GABA-ergiczny układ hamujący (Ahboucha i wsp., 2006). Z drugiej strony, amoniak wykazuje działanie ekscytotoksyczne, związane z uwrażliwieniem receptorów NMDA (Hermenegildo i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 2003). Ponadto, jak wspomniano w poprzednim rozdziale, cały szereg zaburzeń związany jest także z nadmierną produkcją glutaminy (Takahashi i wsp., 1991; Hawkins i wsp., 1993). Mimo wielu znaczących doniesień i obserwacji mechanizmy neurotoksyczności amoniaku nadal nie zostały do końca poznane.

II.3.1. Stres oksydacyjny i nitracyjny w neurotoksyczności amoniaku

W ostatnich latach stres oksydacyjny i nitracyjny (*ang. oxidative/nitrosative stress*, ONS) jest rozważany jako istotny czynnik w patogenezie toksycznego oddziaływania amoniaku. Uważa się, że ONS indukuje kaskadę patofizjologiczną obejmującą patologiczne zmiany w astrocytach, prowadzące do zakłóceń komunikacji astrocyt- neuron i zaburzeń plastyczności synaptycznej, a w konsekwencji do powstawania symptomów EW. Generację wolnych rodników tlenowych i azotowych, w tym wysoce toksycznego nadtlenoazotynu [ONOO⁻] powstającego w wyniku spontanicznej reakcji tlenku azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym [⁻O₂], zaobserwowano w traktowanych amoniakiem hodowlach pierwotnych astrocytów (Murthy i wsp., 2001; Schliess i wsp., 2002; Haussinger i Schliess, 2005; Görg i wsp., 2008; Skowrońska i wsp., 2010). Podwyższoną aktywność oraz ekspresję syntaz tlenku azotu (NOS) (Rao i wsp., 1995), a także zwiększony poziom azotanów/azotynów (marker produkcji NO) w mózgu zauważono również w eksperymentalnych modelach EW (Master i wsp., 1999; Sathyaikumar i wsp., 2007).

Natomiast inne badania wskazują, iż amoniak powoduje obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych tj.: peroksydaza glutationu, dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza (Kosenko i wsp., 1997; Kosenko i wsp., 1999), a więc czynników, których resustytucja daje pozytywne efekty, zarówno w eksperymentalnych modelach hiperamonemii (Guerrini i wsp., 1994) i EW (Bruck i wsp., 1999), jak i u chorych z ostrą EW (Sushma i wsp., 1992).

Jednym z czynników wpływających na gromadzenie się wolnych rodników tlenowo-azotowych w astrocytach bądź skrawkach traktowanych amoniakiem jest nadaktywacja receptora NMDA i związane z nią mechanizmy Ca^{2+} -zależne (Schliess i wsp., 2002).

Amoniak może powodować uwalnianie Glu z astrocytów, co z kolei wyzwała samonapędzający się mechanizm autokrynej aktywacji receptora NMDA (Ohara i wsp., 2009). Innym czynnikiem mającym znaczący udział w powstawaniu stresu oksydacyjnego w warunkach hiperamonemii jest nadprodukcja anionorodnika ponadtlenkowego, która jest efektem aktywacji NADPH oksydazy (Reinehr i wsp., 2007). Badania wykazały, że stres oksydacyjno-nitracyny wzbudzony zarówno poprzez aktywację receptora NMDA, jak i NADPH oksydazy, jest bezpośrednio związany z obrzmieniem astrocytów wywołanym amoniakiem, będąc zarówno jego przyczyną, jak i skutkiem (Schliess i wsp., 2006; Reinehr i wsp., 2007). Natomiast kinazy aktywowane mitogenem (ang. *mitogen activated protein kinases*, MAPK) oraz czynnik transkrypcyjny Nf-kappaB zostały zidentyfikowane jako kluczowe mediatory pośredniczące w przekazywaniu sygnału na drodze: wolne rodniki – obrzmienie astrocytu (Sinke i wsp., 2008).

Dobrze poznanym, najbardziej krytycznym efektem stresu oksydacyjno-nitracynowego wywołanego amoniakiem jest zjawisko MPT (ang. *mitochondrial permeability transition*) – zależne od Ca^{2+} otwarcie kanałów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, które prowadzi do uszkodzenia mitochondriów: zaburzenia mitochondrialnego potencjału błonowego, osmotycznego obrzęku macierzy mitochondrialnej, zahamowania produkcji ATP oraz do

nadprodukcji wolnych rodników (pogłębienie stresu oksydacyjnego) (Bai i wsp., 2001; Albrecht i Norenberg, 2006). Konsekwencją ww. dysfunkcji mitochondriów jest m.in. obrzmienie astrocytów, wynikające najprawdopodobniej z zaburzenia procesów regulacji objętości komórkowej (Rama Rao i wsp., 2003). Zależną od amoniaku indukcję MPT blokują antyoksydanty oraz inhibitory syntaz tlenu azotu, co jednoznacznie wskazuje na udział stresu oksydacyjno-nitracyjnego w tym procesie (Jayakumar i wsp., 2002). Sama glutamina jest zdolna do wywoływania MPT oraz obrzęku w izolowanych mitochondriach (Ziemińska i wsp., 2000). Oba procesy są hamowane poprzez blokowanie transportu glutaminy do mitochondriów, co jednocześnie zapobiega obrzękowi mózgu w szczurzym modelu EW (Rama Rao i wsp., 2010). Te obserwacje potwierdzają hipotezę „konio trojańskiego” oraz wskazują na znaczący udział glutaminy w generowaniu stresu oksydacyjnego i jej rolę pośrednika w procesie obrzęku mózgu wywołanego amoniakiem.

Funkcjonalnymi konsekwencjami ONS obserwowanymi na poziomie molekularnym są: oksydacja białek i kwasów nukleinowych (Görg i wsp., 2008), nitracja reszt tyrozynowych w białkach, s-nitrozylacja reszt cysteinowych w białkach i innych czynnych związkach siarkowych (glutation) (Schliess i wsp., 2004) oraz peroksydacja lipidów: zarówno w tkankach mózgu w mysim modelu hiperamonemii (Kosenko i wsp., 1999), jak i w hodowlach pierwotnych astrocytów traktowanych amoniakiem (Gregorios i wsp., 1985). Wszystkie te procesy mają potwierdzony licznymi badaniami udział w patofizjologii hiperamonemii i EW. Amoniak w znacznym stopniu zwiększa oksydację RNA w hodowlach astrocytów oraz w mózgu szczurzym *in vivo* (Görg i wsp., 2008), co może selektywnie obniżać wydajność i dokładność translacji genów, a w konsekwencji zaburzać syntezę poszczególnych białek, bądź indukować syntezę białek o nieprawidłowej budowie. Pomiedzy różnymi rodzajami RNA, które ulegają oksydacji pod wpływem amoniaku zidentyfikowano rybosomalne 28S i 18S RNA oraz mRNA kodujący transporter glutaminianowo-asparaginianowy (GLAST)

(Görg i wsp., 2008), co najprawdopodobniej odpowiada za obniżoną ekspresję tego transportera, jaką obserwuje się w warunkach ostrej hiperamonemii (Butterworth, 2002). Natomiast wywoływana m.in. przez amoniak nitracja reszt tyrozynowych bądź też s-nitrozylacja białek znacząco wpływa na ich funkcjonowanie. Nitracja reszt tyrozynowych jest procesem selektywnym i charakterystycznym dla nadtlenoazotynu, który dość łatwo reaguje z grupami tiolowymi białek. W neurotoksyczności amoniaku stwierdzono nitrację m.in. takich białek jak: syntaza glutaminy, receptor benzodiazepinowy (PBR) (Schliess i wsp., 2002) oraz kotransporter sodowo-potasowo-chlorkowy (NKCC) (Jayakumar i wsp., 2008). W przypadku syntazy glutaminy nitracja inaktywuje enzym, co w warunkach hiperamonemii rozpatrywane jest jako proces regulacji, mający na celu zahamowanie obrzmienia astrocytu wskutek nadmiernej produkcji glutaminy (Görg i wsp., 2005). Natomiast nitracja NKCC jest związana z jego zwiększoną aktywnością w późnej fazie wywołanego amoniakiem obrzmienia astrocytu (Jayakumar i wsp., 2008).

O ile opisane powyżej efekty i mechanizmy neurotoksyczności amoniaku są dobrze poznane i udokumentowane w odniesieniu do astrocytów i neuronów, to praktycznie brak jest danych pokazujących czy i w jaki sposób ONS wywołany hiperamonemią wpływa na komórki śródbłonna mikronaczyń mózgu. O istnieniu takiego wpływu można jedynie spekulować, opierając się na doniesieniach dotyczących innych schorzeń. Stwierdzono np., że ONS obniża właściwości barierowe tych komórek oraz zwiększa przepuszczalność BBB w warunkach niedotlenienia – reoksygenacji (Lochhead i wsp., 2010) oraz neurotoksyczności spowodowanej metamfetaminą (Ramirez i wsp., 2009).

Jednym z procesów leżących u podstaw subtelnych zmian w BBB w warunkach hiperamonemii, a prowadzących do powstawania naczyniopochodnego obrzęku mózgu jest aktywacja metaloproteinaz, w tym MMP-9 (Skowrońska i Albrecht, 2011; inne odnośniki podano w podrozdziale **II.2.3**). Zależność przyczynowo-skutkową pomiędzy stresem

oksydacyjnym a aktywacją metaloproteinaz wykazywano wielokrotnie zarówno w OUN, jak i w tkankach obwodowych (Lehner i wsp., 2011). Niektóre z wewnątrzkomórkowych wykładników zaburzeń metabolicznych, będących konsekwencją ONS w komórkach OUN lub w komórkach pochodzących z tkanek obwodowych, stwierdza się również w traktowanych amoniakiem komórkach śródbłonna tworzących BBB, np.: aktywacja szlaku sygnalizacyjnego p38 MAPK/ NF-kappaB związana z degradacją TJ przez MMP-9 w mysim modelu EW (Chen i wsp., 2011) jest także zaangażowana w wywołane amoniakiem oksydacyjne uszkodzenia astrocytów (Jayakumar i wsp., 2006; Sinke i wsp., 2008).

Przytoczone w podrozdziale dane literaturowe i wyniki bezspornie wskazują na silny związek pomiędzy stresem oksydacyjno-nitracynym a patogenezą EW. Dlatego też, wszelkie próby obniżania produkcji wolnych rodników mogą być skutecznym punktem uchwytu terapii EW. Jednakże należy pamiętać, że wolne rodniki są także cząsteczkami sygnalizacyjnymi niezbędnymi w prawidłowej fizjologii, w związku z czym ich zbyt efektywna neutralizacja mogłaby powodować niepożądane skutki.

II.4. Wybrane strategie oraz związki do potencjalnego zastosowania w zapobieganiu toksycznemu działaniu jonów amonowych.

II.4.1. Hamowanie stresu oksydacyjnego

II.4.1.1. Peptydy natriuretyczne

Peptydy natriuretyczne (NPs) to rodzina polipeptydów, które mogą działać zarówno jako hormony, jak i neuroprzekaźniki. W układach sercowo- naczyniowym i nerkowym oraz w mózgu NPs odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy w zakresie gospodarki wodno-elektrolitycznej, ciśnienia krwi i objętości krwi krążącej (Imura i wsp., 1992; Maack, 2006). Peptydy te hamują aktywność układu renina angiotensyna aldosteron, zwiększają

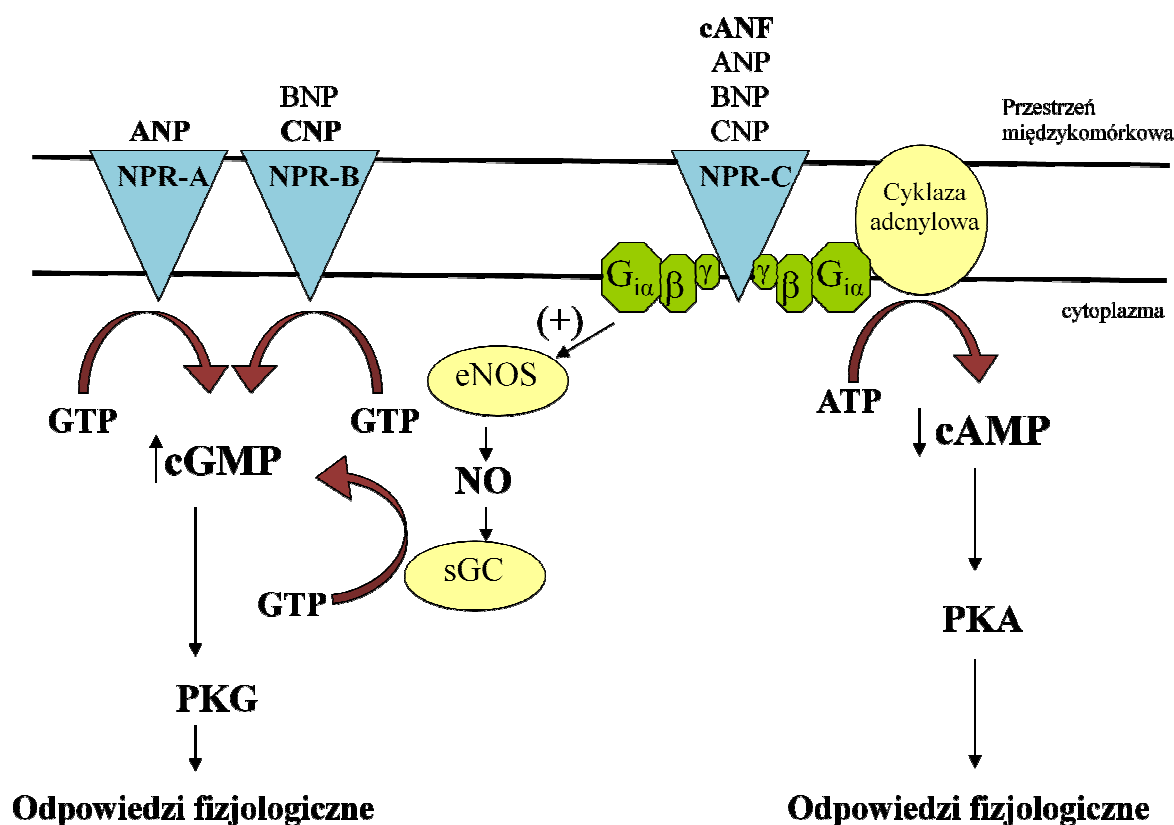
wydalanie wody i sodu z moczem oraz powodują rozkurcz błony mięśniowej naczyń, przez co rozszerzają naczynia i zmniejszają ich napięcie (Yamakahara i wsp., 2003; Ahluwalia i wsp., 2004). Jednakże najnowsze doniesienia wskazują, że funkcje NPs nie są ograniczone jedynie do regulacji i utrzymywania homeostazy objętości i ciśnienia w powyższych układach. Ich ekspresję i ochronne działanie w odpowiedzi na warunki stresowe wykazano także w różnych narządach i tkankach poza układem sercowo-naczyniowym i nerkami, co odślania nowe aspekty biologicznych właściwości NPs.

Wiadomo, iż NPs zapobiegają przerostowi i zwłóknieniom serca oraz apoptozie kardiomiocytów (Misono, 2011), mają właściwości przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe (Quian i wsp., 2002), indukują regenerację śródbłonna przy uszkodzeniach naczyń (Ohno i wsp., 2002; Yamahara i wsp., 2003), a także przeciwdziałają uszkodzeniom nerek wywołanym przez hipoksję (Shaw i wsp., 1987; Zhou i wsp., 1990). Ponadto, pokazano, że NPs mają właściwości antyoksydacyjne, hamują nadmierną produkcję wolnych rodników w układzie sercowo- naczyniowym i w komórkach wątroby (Woodard i Rosado, 2008; De Vito i wsp., 2010). A zważywszy na fakt, iż wszystkie trzy peptydy natriuretyczne: przedsionkowy (ANP), mózgowy (BNP) oraz typu C (CNP) są obecne również w mózgu (Herman i wsp., 1996; Potter i wsp., 2006), posiadają one także potencjał do przeciwdziałania ONS wywołanemu amoniakiem w OUN.

Aktywność biologiczna NPs jest wynikiem aktywacji obecnych w błonie komórkowej receptorów peptydów natriuretycznych (NPRs): ANP preferencyjnie wiąże się do NPR-A, a BNP oraz CNP do NPR-B. Wszystkie trzy peptydy wiążą się z jednakowym powinowactwem do NPR-C (Lucas i wsp., 2000). NPR-A i NPR-B to receptory posiadające aktywność cyklaz guanylowych. Przekazują sygnały do wnętrza komórki, zwiększając stężenie cGMP. Natomiast NPR-C, znany dotychczas jako receptor usuwający i deaktywujący czynniki natriuretyczne („clearance receptor”), posiada odrębny, niezwiązany z cyklazą guanylową,

mechanizm sygnalizacyjny. Najlepiej poznanym, bezpośrednim efektem aktywacji NPR-C jest hamowanie cyklazy adenylowej (obniżanie poziomu cAMP) poprzez aktywację białek Gi (Potter i wsp., 2006). Z drugiej strony wiadomo, że NPR-C jest także związany z endotelialną formą syntazy tlenku azotu (eNOS) i również poprzez NO bierze udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych (Murthy i wsp., 1998).

Ścieżki sygnałowe związane z poszczególnymi receptorami peptydów natriuretycznych przedstawiono na **Ryc.II.2**.



Ryc.II.2. Receptory peptydów natriuretycznych oraz ścieżki sygnałowe związane z ich aktywacją.

W tkankach obwodowych NPs hamują produkcję wolnych rodników działając poprzez aktywację wszystkich typów receptorów. W hepatocytach i komórkach Kupffera ANP obniżał stres oksydacyjny aktywując NPR-A/B (Pella i wsp., 1991; Kiemer i wsp., 1998; Carini i wsp., 2003). Z kolei podwyższony stres oksydacyjny w komórkach mięśni gładkich naczyń pochodzących od szczurów z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym był redukowany poprzez specyficzną aktywację NPR-C (Saha i wsp., 2008).

Udowodniono, iż NPs oddziałują na metabolizm astrocytów głównie na drodze aktywacji NPR-A (Borán i wsp., 2007; Prado i wsp., 2010) lub NPR-B (Zielińska i wsp., 2007), jednakże żadne z tych efektów nie dotyczyły ich wpływu na stres oksydacyjno-nitracynowy. W literaturze praktycznie brak jest danych pokazujących biologiczne skutki aktywacji receptora NPR-C w astrocytach, poza pojedynczą pracą wskazującą, iż peptydy natriuretyczne mogą regulować proliferację astrocytów poprzez aktywację NPR-C i związane z tą aktywacją hamowanie aktywności MAP kinaz (Prins i wsp., 1996). Niedawno pokazano obecność funkcjonalnych NPR-C w komórkach śródbłonna naczyń, ich rola ograniczała się jednak do usuwania liganda z mózgu do łożyska naczyniowego (Ito i wsp., 2011).

II.4.1.2. Glutation

Glutation to trójpeptyd (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycyna), który jest ważnym elementem komórkowego systemu obrony przeciwko wolnym rodnikom tlenowym. Występuje w zredukowanej postaci tiolowej (GSH) lub w utlenionej formie dwusiarczkowej (GSSG) (Kaplowitz i wsp., 1985), przy czym forma zredukowana jest formą dominującą, obecną powszechnie w komórkach wszystkich narządów ssaków, osiągając stężenia do 12 mM (Cooper i wsp., 1997), natomiast zawartość glutationu w postaci GSSG to zaledwie ok. 1% całej jego puli wewnątrzkomórkowej (Akerboom i wsp., 1982). W mózgu stężenie glutationu wynosi 1-3 mM. Jak pokazują dane uzyskane przy użyciu metod

immunohistochemicznych, w OUN na poziomie komórkowym glutation jest obecny głównie w neuronach i astrogleju (Hjelle i wsp., 1994; Maybodi i wsp., 1999), przy czym w astrocytach jego zawartość jest wyższa.

Synteza glutationu przebiega etapowo, w dwóch następujących po sobie reakcjach. W wyniku pierwszej reakcji, katalizowanej przez przez ligazę glutaminianowo-cysteinową (GCL), z Glu i cysteiny (Cys) powstaje dwupeptyd γ GluCys, który następnie w drugiej reakcji przy udziale syntetazy glutationowej jest przyłączany do glicyny (Meister i Anderson, 1984). Trójfosforan adenozyiny (ATP) jest kosubstratem obu reakcji enzymatycznych.

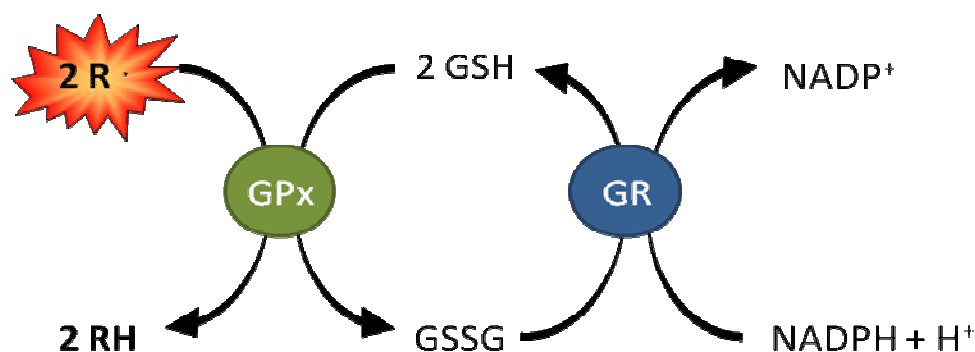
Wewnątrzkomórkowy poziom glutationu jest regulowany poprzez hamowanie aktywności GCL produktem syntezy – glutationem, na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego (Richman i Meister, 1975; Huang i wsp., 1988) oraz dostępnością jednego z prekursorów do jego syntezy – Cys (Meister i Anderson, 1983). W ten sposób utrzymywana jest równowaga pomiędzy zużyciem i syntezą tego związku. Ponadto jego produkcja może być też regulowana na poziomie transkrypcyjnym, np. przez zwiększenie ekspresji mRNA katalitycznie aktywnej podjednostki GCL (GCLC), co ma miejsce np. w warunkach stresu oksydacyjnego (OS) (Shih i wsp., 2003) lub nitracyjnego (Burdo i wsp., 2007). Wykazano, iż obecne w promotorze genu kodującego GCLC sekwencje AP-1 (activator protein-1) i ARE (antioxidant response element) są kluczowe dla indukcji transkrypcji tego genu w warunkach OS (Morales i wsp., 1998; Rahman i wsp., 1996), przy czym pokazano, iż aktywacja ekspresji związana z sekwencją ARE wymaga przyłączenia do niej czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w kompleksie z innymi białkami Jun lub Maf (Wild i wsp., 1999; Erickson i wsp., 2002).

Szczególny charakter wiązania peptydowego pomiędzy Glu a Cys (poprzez grupę γ -karboksylową, w zamian za powszechnie występujące wiązanie α -karboksylowe) powoduje, iż glutation może być hydrolizowany tylko przez jeden enzym γ -glutamylotransferazę (γ -

GT), który jest obecny jedynie na zewnętrznych powierzchniach błon poszczególnych komórek (Meister i Anderson, 1983). W konsekwencji glutation jest odporny na wewnątrzkomórkową degradację i może być metabolizowany tylko zewnątrzkomórkowo przy udziale γ -GT. Natomiast uwalnianie glutationu zachodzi na drodze aktywnego transportu, a główną rolę w OUN w tym procesie zdaje się odgrywać transporter MRP-1 należący do grupy transporterów MRP (tzw. białek oporności wielolekowej, ang. *multidrug resistant protein*) (Hirrlinger i wsp., 2005; Minich i wsp., 2006). Eksport GSH z astrocytów oraz zewnątrzkomórkowa aktywność γ -GT odgrywają istotną rolę w dostarczaniu prekursorów do neuronalnej syntezy glutationu. Jest to bardzo ważne, gdyż większość zewnątrzkomórkowej puli Cys (kluczowego aminokwasu w syntezie GSH) występuje w jej utlenionej dwusiarczkowej postaci, cystyny (Cyss) (Sagara i wsp., 1993), która z kolei pobierana jest przede wszystkim przez astrocyty, zaś z dużo mniejszą wydajnością przez neurony (Kranich i wsp., 1996). To powoduje, iż synteza GSH w neuronach jest w dużej mierze uzależniona od prekursorów (Cys lub CysGly) uwalnianych przez astrocyty.

Podstawową funkcją glutationu jest jego działanie antyoksydacyjne. Wykazano, iż wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie GSH chroni daną komórkę przed całą gamą toksycznych wolnych rodników tlenowych. Jest to możliwe dzięki wysoce reaktywnej grupie tiolowej glutationu, która ulegając odwracalnej reakcji przyłączenia lub oddawania elektronów sprawia, iż glutation może funkcjonować jako układ oksydo-redukcyjny (Meister i Anderson, 1984). W formie zredukowanej jego wolna grupa tiolowa (-SH) służy do redukcji wszelkich nadtlenków, wolnych rodników tlenowych oraz czynników elektrofilowych, a także chroni białkowe grupy -SH przed utlenieniem. Peroksydaza glutationowa (GPx) pośredniczy w tych procesach antyoksydacyjnych, utleniając jednocześnie G-SH do jego formy z wiązaniami disiarczkowymi G-SS-G. Utleniona forma może być z powrotem zredukowana do GSH dzięki aktywności reduktazy glutationowej (GR) (Dringen, 1999) (**Ryc.**

II.3). W warunkach stresu oksydacyjnego komórki (głównie glejowe) bronią się przed zbytnim obniżeniem glutationowego potencjału redoks poprzez zwiększenie syntezy GSH oraz wypływ GSSG (Hirrlinger i Dringen, 2005).



Ryc. II.3. Cykl redoks leżący u podstaw antyoksydacyjnych właściwości glutationu.

II.4.2. Usuwanie nadmiaru amoniaku z organizmu

II.4.2.1. Fenylomaślan ornityny

Fenylomaślan ornityny (ang. *ornithine phenylbutyrate*, OP) to nowo zaprojektowany lek, który poprzez zmniejszanie ilości amoniaku we krwi i w tkankach obwodowych (mięśnie) częściowo zapobiega patofizjologicznym zmianom towarzyszącym EW. Fakt, iż w jego skład wchodzi dwie substancje, powoduje, że OP działa w dwójnasób. Orn funkcjonuje, jako substrat do syntezy Gln z amoniaku. Natomiast fenyllooctan (powstający *in vivo* z fenylomaślanu) łączy się z nowo zsyntetyzowaną glutaminą, dając produkt fenylacetyloglutaminę, która następnie jest z łatwością wydalana przez nerki (Jalan i wsp., 2007).

Zarówno Orn, jak i fenylomaślan (ang. *phenylbutyrate*, PB) to substancje, które podawane oddzielnie wykazywały ochronne właściwości w stosunku do szkodliwych skutków wywoływanych hiperamonemią. Koncepcja dostarczania ornityny do mięśni w celu

zwiększenia ich możliwości detoksykacyjnych (Orn, jako źródło Glu potrzebnego do syntezy glutaminy z amoniaku) dała podstawę do stworzenia kombinacji ornityny z asparaginianem (ang. *L-ornithine L-aspartate*, LOLA), jako środka z założenia mającego obniżyć poziom amoniaku we krwi (Salvatore i wsp., 1964). LOLA podawana chorym z marskością wątroby lub hiperamonemią faktycznie obniżała poziom amoniaku we krwi tych chorych i jednocześnie poprawiała wyniki ich testów psychometrycznych (Kircheis i wsp., 1997). Jednakże w przypadku podawania LOLA nadmiar wyprodukowanej glutaminy pozostaje w organizmie, co może skutkować wtórną produkcją amoniaku np. w nerkach bądź w jelicie, jako efekt aktywności glutaminazy.

Z kolei PB poprzez efektywne usuwanie nadmiaru Gln z organizmu (formowanie fenyloacetyloglutaminy, która może być wydalana z moczem) bez wywoływania niepożądanych skutków ubocznych redukuje stężenie amoniaku i zwiększa przeżywalność pacjentów z niedoborami enzymów cyklu mocznikowego (Darmaun i wsp., 1998; Enns i wsp., 2007). Zastosowanie tych dwóch substancji razem wykazało ich synergiczny efekt w redukowaniu hiperamonemii. Kilkogodzinne podawanie OP szczurom lub świniom z operacyjnie wywołaną EW redukowało podwyższony poziom amoniaku we krwi do wartości notowanych u zwierząt bez uszkodzeń wątroby, a powyższy efekt OP był skorelowany z równie efektywnym obniżeniem obrzęku mózgu u tych zwierząt (Davies i wsp., 2009; Ytrebø i wsp., 2009). Natomiast ostatnie doniesienia wskazują, że OP zapobiega także zaburzeniom funkcji neuronalnych, w modelu odtwarzającym niektóre z zaburzeń towarzyszących EW (Oria i wsp., 2011).

Z licznych badań wynika, że oprócz właściwości ochronnych OP jako koniugatu związanych z metabolizmem amoniaku, każdy z jego składników posiada również własności cytoprotekcyjne oparte o inne mechanizmy. PB wykazuje działanie cytoprotekcyjne w OUN poprzez zwiększanie acetylacji histonów i ekspresji genów antyoksydacyjnych kodujących

m.in.: S- transferazę glutationową (Gstm3), manganową dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD) (Petri i wsp., 2006), białko DJ-1(Zhou i wsp., 2011) i/lub obniżając ekspresję genu kodującego regulator apoptozy związany z kaspazą-8 (Cflar) (Zhou i wsp., 2011). Orn blokuje produkcję tlenku azotu przez komórki śródbłonna naczyń, hamując transport argininy, prekursora dla syntezy NO (Kakoki i wsp., 2006).

III. CEL PRACY

Badania ostatnich lat jednoznacznie wykazały, że stres oksydacyjno-nitracyjny jest jedną z głównych przyczyn upośledzenia funkcji, a często uszkodzenia struktury komórek OUN narażonych na działanie jonów amonowych. Zgłębianie szczegółów mechanizmów warunkujących powstawanie i skutki ONS oraz projektowanie dróg łagodzenia tych skutków stanowi jedno z podstawowych wyzwań w badaniach nad neurotoksycznością amoniaku ujawniającą się w warunkach hiperamonemii, w tym zwłaszcza ostrej EW.

Omówione we wstępie uwarunkowania przestrzenne i metaboliczne sprawiają, że astrocyty są najbardziej narażone na ONS związane z oddziaływaniem amoniaku, a konsekwencje tego stresu stanowią podłoże głównych patofizjologicznych przejawów EW, zwłaszcza obrzęku mózgu, głównej przyczyny zgonów w jej zaostrożonych postaciach. Fakt, że w dotychczasowych badaniach nad obrzękiem hiperamonemicznym główny nacisk kładziono na astrocyty wynikał z przekonania o absolutnej nadrzędności mechanizmu cytotoksycznego (upośledzenia metabolizmu astrocytów) nad naczyniopochodnym, którego udziału nie brano pod uwagę zakładając brak wpływu amoniaku na funkcjonowanie BBB. Najświeższe wyniki badań świadczą jednak o tym, że obrzęk mózgu towarzyszący ostrej EW może mieć związek z subtelnymi zmianami w funkcjonowaniu BBB, co implikuje zmiany w funkcjonowaniu komórek śródbłonna naczyń mózgowych jako elementu komórkowego tej bariery. Bardzo fragmentaryczny charakter dotychczasowej wiedzy o wpływie amoniaku na komórki śródbłonna w zestawieniu ze stosunkowo bogatą wiedzą o ONS indukowanym w astrocytach, skłonił do zbadania, czy amoniak wywołuje ONS w komórkach śródbłonna i czy skutkuje to zmianami w przepuszczalności.

Cele tej rozprawy koncentrują się wokół wpływu ONS wywołanego przez amoniak na astrocyty i komórki śródbłonka naczyń. Równolegle, postanowiono przebadać wpływ potencjalnych czynników protekcyjnych o różnych punktach uchwytu na ONS i jego skutki w obu typach komórek. Ze względu na różnice w wyjściowym stanie wiedzy, pytania odnośnie astrocytów i komórek śródbłonka naczyń sformułowano oddzielnie. W odniesieniu do astrocytów sprawdzano hipotezę zakładającą protekcyjne działanie peptydów natriuretycznych. W tym celu postanowiono:

- Określić wpływ peptydów natriuretycznych na produkcję wolnych rodników tlenowych i azotowych w hodowli pierwotnej astrocytów traktowanych amoniakiem.
- Ustalić obecność funkcjonalnych receptorów NPR-C w astrocytach oraz udział sygnalizacji związanej z aktywacją tych receptorów w potencjalnych protekcyjnych właściwościach peptydów natriuretycznych.
- Sprawdzić, czy aktywacja NPR-C przeciwdziała obrzmieniu astrocytów wywołanemu amoniakiem.

W badaniach nad własnościami komórek śródbłonna naczyń mózgowych posłużono się unieśmiertelnioną linią komórek wyprowadzoną z mózgu szczura (RBE-4). Przy jej użyciu postawiono sprawdzić:

- czy amoniak wywołuje stres oksydacyjno–nitracyjny w komórkach śródbłonna mikronaczyń mózgu.
- czy potencjalny ONS wywoływany amoniakiem wpływa bezpośrednio na funkcje barierowe komórek tworzących BBB oraz czy wpływa na ich właściwości, kluczowe dla utrzymania ścisłości bariery.
- czy działanie antyoksydantami zapobiega zwiększonej przepuszczalności BBB w modelu *in vitro*.

IV. MATERIAŁY I METODY

IV.1. Hodowle komórkowe

IV.1.1. Pierwotna hodowla szczurzych astrocytów

Pierwotna hodowla szczurzych astrocytów była zakładana zgodnie z metodą opisaną przez Hertz'a i współpracowników (1989). Korę mózgową pobieraną od 1-2 dniowych osesków szczurzych przenoszono na sterylną siatkę nylonową (80µm), a następnie przecierano na szalkę Petriego zawierającą 10 ml pożywki DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco/BRL) z 20% zawartością bydlęcej surowicy płodowej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) (Gibco/BRL) oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (Gibco/BRL). Komórki hodowano w inkubatorze (Kebo BioMed) w temperaturze 37°C, w atmosferze: 90% powietrza i 10% CO₂, na różnej wielkości szalkach i płytkach hodowlanych (Costar, Corning), w zależności od rodzaju planowanego doświadczenia, w zagęszczeniu 2x10⁵/cm². Pożywkę zmieniano dwa dni po wysianiu a następnie dwa razy w tygodniu, stopniowo obniżając zawartość FBS, dochodząc do 10% po dwóch tygodniach hodowli. Począwszy od trzeciego tygodnia, dodawano do hodowli 0,25 mM dibutyrylo-cAMP w celu pobudzenia astrocytów do morfologicznego różnicowania się. Eksperymenty przeprowadzano na hodowlach 3-4 tygodniowych.

IV.1.2. Hodowla komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura linii RBE-4

Komórki RBE-4 hodowano na płytkach hodowlanych pokrywanych kolagenem I, w pożywce αMEM/Ham-F10 z dodatkiem Glutamax-u (Gibco/ Invitrogen) oraz z 10% zawartością inaktywowanej surowicy bydlęcej (FBS), zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) i genetycyną. Komórki wysiewane z

gęstością 25000/cm² (pasaże: 13-25) po 4 dniach hodowli wykorzystywano do dalszych badań.

IV.2. Warunki inkubacji hodowli komórkowych z amoniakiem

Doświadczenia przeprowadzano na komórkach nietraktowanych (kontrolnych) oraz traktowanych NH₄Cl. Wodny roztwór chlorku amonu (dalej określamy, jako „amoniak”) dodawano bezpośrednio do pożywki hodowlanej, w końcowym stężeniu 5 mmol/L. Czasy inkubacji wynoszące 1 lub 24h, w zależności od wariantu doświadczenia, podano w legendach. Warunki inkubacji z pozostałymi czynnikami, tj. dokładne stężenia i czasy inkubacji zostały opisane na rycinach i w legendach pod poszczególnymi rycinami.

IV.3. Pomiar wolnych rodników tlenowych metodą fluorymetryczną

Pomiary całkowitej puli wolnych rodników tlenowych (ROS), generowanych w różnych warunkach doświadczalnych wykonywano metodą opisaną przez Murthy i współpracowników (2001), do której wprowadzono nieznaczne modyfikacje. Doświadczenia wykonywano w standardowym buforze Krebsa (118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM glukoza, bufor wysycano 95% O₂ i 5% CO₂, pH 7.4). Komórki płukano, a następnie inkubowano (w wyżej wymienionym buforze) z 100 μM sondą fluorescencyjną: dioctanem 5-(-6)-karboksy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (carboxy-H₂DCFDA) (Molecular Probes, Invitrogen) przez 30 minut w 37°C (roztwór podstawowy carboxy-H₂DCFDA: 10 mmol/L w dimetylosulfotlenku (DMSO)). Po upływie czasu inkubacji komórki płukano dwukrotnie w buforze PBS o temperaturze 4°C, a następnie zawieszano w 0,2% roztworze Triton-X100 w PBS, zeskrobywano z szalek i rozbijano metodą sonifikacji. Ekstrakty komórkowe wirowano przez 5 minut w 6500 x g. Uzyskane supernatanty były używane do pomiaru fluorescencji ,

prowadzonego na płytkach 96-dołkowych w fluorymetrze płytkowym (Fluoroscanner Ascent-FL). Intensywność fluorescencji, która jest wprost proporcjonalna do ilości nagromadzonych w komórkach wolnych rodników, mierzono przy długościach fali: ekscytacji 485 nm i emisji 515 nm. Wyniki obliczano w przeliczeniu na zawartość białka w danej próbce, mierzonej metodą Lowry-ego, a następnie przedstawiano jako % kontroli.

IV.4. Pomiar produkcji anionorodnika ponadtlenkowego [$\cdot\text{O}_2^-$] przy użyciu skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego

Gromadzenie się anionorodnika ponadtlenkowego mierzono przy użyciu sondy fluorescencyjnej dihydroetydyny (DHEt) (Molecular Probes, Invitrogen). Tuż przed doświadczeniem komórki były dwukrotnie płukane w buforze Krebsa, po czym inkubowano je przez 1h w 37°C w tym samym buforze zawierającym 50 $\mu\text{mol/L}$ DHEt (roztwór podstawowy: 1mmol/L w DMSO). Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem Krebsa i ponownie dodawano świeży bufor. Do detekcji fluorescencji używano mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 510, a za źródło światła służył laser helowo-neonowy (543nm). Skanowano trzy przypadkowo wybrane pola obserwacji w każdym dołku. Fluorescencję DHEt wzbudzano przy długości fali 518 nm, natomiast emisja obserwowana była przy dł. fali 605nm. Intensywność fluorescencji (wprost proporcjonalna do ilości wytworzonego [$\cdot\text{O}_2^-$]) analizowano za pomocą programu ImageJ (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

IV.5. Oznaczanie poziomu mRNA – analiza ekspresji genów

Ilość określonego informacyjnego RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) w danej komórce zależy od poziomu ekspresji danego genu. Przepisując mRNA na komplementarne DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie namnażając dany gen za pomocą reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*) możemy

analizować ekspresję genów. Technika ta pozwala śledzić zmiany w obrębie danej komórki dokonujące się na poziomie transkryptomu po potraktowaniu określonym czynnikiem lub też powstałe w określonych stanach fizjologicznych czy patologicznych. Pomiar wykonuje się w odniesieniu do genu o stałej ekspresji, tzw. genu referencyjnego (ang. *housekeeping gene*). Poniżej kolejne etapy tej analizy zostały szczegółowo opisane.

IV.5.1. Izolacja RNA

Całkowity kwas rybonukleinowy (RNA) izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma) metodą opartą o procedurę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Do izolacji używano hodowli komórkowych rosnących na szalkach o średnicy 10 cm. Komórki przeznaczone do izolacji płukano dwukrotnie w buforze PBS, po czym zawieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej w 1 ml odczynnika TRI Reagent. Lizat komórkowy przenoszono do probówki (Eppendorf), dodawano do niego 0,2 ml chloroformu i energicznie wytrząsano przez 15 sekund, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po upływie czasu inkubacji próbki wirowano (12 000 x g, 15 min., 4°C) w celu rozdzielenia poszczególnych frakcji. Górną wodną frakcję zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 0,5 ml izopropanolu aby wytrącić osad RNA. Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbki ponownie wirowano (12 000 x g, 10 min., 4°C). Powstały nadsącz usuwano, a osad płukano za pomocą 1ml 75% etanolu. Za pomocą kolejnego wirowania (7 800 x g, 5 min., 4°C) etanol usuwano, a osad rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz. Gęstość oraz czystość wyizolowanego RNA mierzono spektrofotometrycznie, wykorzystując spektrofotometr Nano Drop-1000 (Thermo Scientific), który umożliwia odczyt z próbek o niewielkiej objętości (1µl) i dużym stężeniu. Czystość RNA szacowano na podstawie stosunku wartości odczytów OD 260/280 nm. Do dalszych badań używano próbek RNA, dla których stosunek OD 260/280 nm był wyższy od 1,6.

IV.5.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano używając 1 µg wyizolowanego RNA. Stanowił on matrycę dla odwrotnej transkryptazy do syntezy cDNA. Do badań używano zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystem), który zawiera wszelkie odczynniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji. Zestaw ten do inicjacji syntezy cDNA wykorzystuje pulę przypadkowych starterów (ang. *random primers*), co zapewnia syntezę cDNA z całkowitego RNA (w tym mRNA). Do mieszaniny reakcyjnej składającej się z:

2 µl 10x stężonego buforu do RT

0,8 µl 100mM mieszaniny trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP)

2 µl Random Primers (10x stężonych)

1 µl odwrotnej transkryptazy (MultiScribe)

4,2 µl H₂O (wolnej od aktywności rybonukleaz)

dodawano równą objętość badanej próbki (10 µl), zawierającą 1 µg RNA. Następnie próbki mieszano, krótko wirowano i inkubowano w następujących warunkach :

Tab.IV.1. Optymalne warunki reakcji odwrotnej transkrypcji dla zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit.

	Krok 1	Krok 2	Krok 3
Temperatura	25°C	37°C	85°C
Czas	10 min.	120 min.	5 min.

IV.5.3. Real-Time PCR

Zmiany ilości mRNA poszczególnych genów analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Real-time PCR przeprowadzano na płytkach 96-dółkowych w aparacie ABI 7500 (Applied Biosystems) przy użyciu sond MGB Taqman, specyficznych dla wybranych genów (Tab.III.2) zakupionych w tej samej firmie.

Mieszaninę reakcyjną zawierającą: 1 μl uzyskanej matrycy (cDNA) i 5 μl Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) uzupełniano H₂O do objętości 10 μl i poddawano reakcji Real-time PCR w warunkach: 95°C przez 10 min., a następnie : (30 s. w 95°C, 1 min. w 60°C) x 40 cykli amplifikacji. Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Wyniki analizy obliczano w odniesieniu do genu referencyjnego (β- aktyna - Tab.III.2.) amplifikowanego z tego samego cDNA i wyrażano jako równanie ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dla uzyskanych wartości, gdzie wartość C_T jest cyklem progowym dla amplifikacji badanego genu (Livak i Schmittgen, 2001).

Tab.IV.2. Sekwencje sond używanych do namnażania wybranych genów.

Nazwa białka kodowanego przez badany gen	Nazwa genu	sonda MGB Taqman	sekwencja badanego genu
eNOS	Nos3	Rn 02132634-s1	NM_021838.2
transporter y ⁺ LAT2	Slc7a6	Rn 01431908-m1	NM_001107424.1
β- aktyna	Actb	Rn 00667869-m1	NM_031144.2

IV.6. Oznaczenie poziomu azotanów i azotynów

Cząsteczka tlenku azotu (NO) jest formą niestabilną, a NO produkowany przez komórki w trakcie hodowli łatwo wchodzi w serię reakcji z różnymi molekułami obecnymi w pożywce, co prowadzi do powstawania bardziej trwałych produktów tj. azotany $[\text{NO}_3^-]$ i azotyny $[\text{NO}_2^-]$. Dlatego też, całkowite stężenie wyprodukowanych przez komórki $[\text{NO}_3^-]$ i $[\text{NO}_2^-]$ zostało wykorzystane jako marker produkcji tlenku azotu. Oznaczenia wykonywano w pożywkach hodowlanych, przy użyciu zestawu Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman). W pierwszym etapie przekształcano azotany w azotyny w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotanową. W drugim, zastosowano reakcję Griess'a, przekształcając azotyny w barwny produkt, ciemnofioletowy związek azowy, którego absorbancję mierzono metodą spektrofotometryczną. Wyniki obliczano w przeliczeniu na ilość białka mierzonego metodą Bradford (Bradford, 1976), a następnie przedstawiano, jako % kontroli.

IV.7. Pomiar objętości komórkowej

Badania wykonywano metodą opisaną w Zakładzie Neurotoksykologii przez Konopacką i wsp. (2009). Do eksperymentów używano astrocytów z 3,5-tygodniowej hodowli pierwotnej przesianych (gęst. wysiewu: $1 \times 10^4/\text{cm}^2$) na szkiełka nakrywkowe pokryte polilizyną (Sigma) i umieszczone w płytkach 24-dołkowych. W celu wyznakowania błon komórkowych użyto lipofilnego barwnika fluorescencyjnego DiI (Molecular Probes) w stężeniu końcowym 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (roztwór podstawowy: 2,5 mg/ml w etanolu). Następnie preparaty utrwalano w 2 % roztworze paraformaldehydu (PFA) w PBS i utwierdzano na szkiełkach podstawowych przy użyciu preparatu VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories), zawierającego barwnik fluorescencyjny DAPI, barwiący jądra komórkowe.

Preparaty skanowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510. Fluorescencję DiI wzbudzano przy długości fali 543 nm, natomiast emisję obserwowano przy dł. fali 590 nm. Skanowanie wykonywano metodą Z-Stack, na wielu płaszczyznach ogniskowania, oddalonych od siebie o ok. 0,2 μm , obejmujących całą grubość preparatu. Uzyskane obrazy poddano analizie komputerowej przy użyciu programu ImageJ „3D objects counter function” (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

IV.8. Analiza poziomu białka – Western Blot

IV.8.1. Izolacja białka do analizy Western Blot

Hodowle komórkowe przeznaczone do izolacji płukano trzykrotnie buforem PBS o temperaturze 37°C, zawieszano w 1ml PBS, a następnie zeskrobywano z szalek i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Następnie odwirowywano (5 000 x g, 5 min., 4°C), a uzyskany osad komórkowy zawieszano w buforze Triton Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH=7.4 ;137mM NaCl; 2mM EDTA; 1% Triton X-100) z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz i fosfataz (0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, inhibitor fosfataz (1:100), inhibitor proteaz (1:200) (wszystkie składowe mieszaniny zakupiono w firmie Sigma). Po 10-minutowej inkubacji w 4°C lizaty komórkowe traktowano ultradźwiękami, a następnie wirowano (12000 x g, 10 min., 4°C). Supernatanty przenoszono do nowych probówek i używano do dalszych badań. Stężenie białka oznaczano metodą Lowry’ego (Lowry i wsp., 1951) przy użyciu Modified Lowry Protein Assay Reagent Kit (Pierce) , metodą opisaną w podrozdziale **IV.17.2** .

IV.8.2. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Do 40 μg białka dodawano odpowiednią objętość buforu do prób (0,062 M Tris, pH= 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 5% β - merkaptoetanol, 0,001% błękit bromofenolowy), objętości pomiędzy próbkami wyrównywano przy pomocy buforu do izolacji białka a następnie

denaturowano (10 min., 100°C). Próbki rozdzielano na 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) w buforze do elektroforezy (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH = 8,3), przy napięciu 150 V. W celu identyfikacji wielkości prążków uzyskanych w wyniku elektroforetycznego rozdziału używano markera Precision Plus Protein Kaleidoscope 10 – 250 kDa (Bio-Rad). Rozdzielone na żelu białko przenoszono na błonę nitrocelulozową w buforze o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol, 0,01% SDS, przy natężeniu 350 mA. Zarówno elektroforezę jak i transfer przeprowadzono w aparacie Bio-Rad.

IV.8.3. Western blotting

Immunodetekcję białek przeprowadzano używając systemu SNAP i.d. (Milipore), w którym dzięki zastosowaniu próżni, odczynniki używane do analizy przepływają przez membranę, co pozwala na skrócenie czasów inkubacji, a tym samym usprawnienie całej procedury. Systemu SNAP i.d. używano zgodnie z protokołem i zaleceniami producenta. Nitrocelulozę z białkiem inkubowano w 0,25% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze TBS-T (50 mM Tris pH=7,5; 0,9% NaCl, 0,5% Tween-20), w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie membranę inkubowano przez 30 minut, w temperaturze pokojowej z przeciwciałem I° przeciwko szczurzemu $G_{i\alpha-2}$ (1: 250, Santa Cruz) lub γ^+ LAT2 (1:200, Santa Cruz) w 0,25% odtłuszczonego mleku rozpuszczonym w TBS-T. Membranę płukano trzykrotnie w TBS-T i umieszczano na 10 minut w roztworze przeciwciała II° „anty-króliczego”, skoniugowanego z peroksydazą chrzanową (Sigma, 1:2500 w 0,25% mleku w TBS-T), a następnie w roztworze SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) na 5 minut. Detekcji sygnału (chemiluminescencji) dokonywano aparaturą G BOX (Syngene), a uzyskane obrazy zapisywano przy użyciu programu GeneSnap ver.7.12.01 (Syngene). Analizę densytometryczną prążków

przeprowadzano za pomocą programu GeneTools ver. 4.02.01 (Syngene). W kolejnych etapach, przeciwciała związane z białkiem na błonie usuwano przy pomocy 0,1 M glicyny (pH 2,9), a błonę poddawano 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej z przeciwciałem przeciwko β -aktynie lub GAPDH (1:3300, Sigma). Wyniki przedstawiano jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego i porównywano do kontroli, którą za każdym razem przyjmowano za 100%.

IV.9. Oznaczanie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP i cGMP

Oznaczenia cyklicznego GMP i cyklicznego AMP wykonywano metodą immunoenzymatyczną wykorzystując zestawy: cAMP i cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (Amersham Biosciences), stosując instrukcje producenta, w niewielkim stopniu zmodyfikowane. Komórki przeznaczone do oznaczeń przepłukiwano PBS, następnie inkubowano przez 3 minuty w buforze Krebsa z dodatkiem niespecyficznego inhibitora fosfodiesteraz, IBMX (ang. *3-isobutyl-1-methylxantine*) w stężeniu 0,5 mM. Po upływie czasu inkubacji z IBMX, komórki zawieszano w 250 μ l buforu do prób (Assay kit buffer) zawierającego 4 mM EDTA i rozbijano metodą sonifikacji. Próbki poddawano denaturacji (5 min., 100°C), wirowano (14 000 x g, 5 min., 4°C), po czym zbierano supernatant, w którym w zależności od wykonywanego testu oznaczano cAMP lub cGMP. W osadzie oznaczano zawartość białka metodą Bradforda (Bradford, 1976). Zawartość cAMP i cGMP przeliczano na mg białka.

IV.10. Pomiar aktywności syntazy tlenu azotu

Aktywność syntazy tlenu azotu (nitric oxide synthase, NOS) mierzono przy użyciu zestawu NOS detect Assay firmy Stratagene, w którym wykorzystano katalizowaną przez NOS reakcję biochemicznej przemiany argininy w cytrulinę. Użycie wyznakowanego

radioaktywnie substratu [³H]argininy pozwoliło na monitorowanie powstającego produktu cytruliny, a wykorzystanie odmiennego punktu izoelektrycznego obu substancji umożliwiło oddzielenie produktu od mieszaniny reakcyjnej. Komórki przeznaczone do doświadczenia płukano w buforze PBS, po czym dodawano do nich bufor PBS zawierający 1mM EDTA, ściągano z szalki przy użyciu skrobaczki i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Próbkę wirowano (12 000 x g, 2 min., 4°C), a uzyskany osad komórkowy zawieszano w 100 µl buforu do homogenizacji (Stratagene) i homogenizowano wielokrotnie pipetując. Próbkę ponownie wirowano (12 000 x g, 5 min., 4°C), a supernatanty odciągano i mierzono w nich stężenie białka metodą Lowry'ego (Lowry i wsp., 1951) przy użyciu Modified Lowry Protein Assay Reagent Kit (Pierce), opisaną w podrozdziale **IV.17**. Następnie próbki rozcieńczano tak, aby stężenie białka we wszystkich próbkach było identyczne (ok. 2 µg/µl). Reakcję przemiany argininy w cytrulinę prowadzono przez 1 godzinę w temp. 37°C, w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło:

10 µl badanej próbki

25 µl 2x stężonego buforu do reakcji (Stratagene)

5 µl 10 mM NADPH (rozcieńczony w 10 mM Tris- HCl pH =7.4)

1 µl [³H]argininy (1 µCi/µl)

5 µl 6 mM CaCl₂

4 µl H₂O

Reakcję przerywano dodaniem 400µl buforu stop (Stratagene) do każdej reakcji. Do próbek dodawano żywicę (equilibrated resin) wiążącą argininę, następnie przenoszono je na kolumnienki do wirowania. Podczas wirowania (12 000 x g, 1 minuta, 4°C) cytrulina będąca jonowo neutralna w pH=5,5 przepływała w całości przez kolumnienkę. Aktywność NOS oznaczano mierząc radioaktywność eluatu.

IV.11. Oznaczanie glutationu wewnątrzkomórkowego w hodowlach *in vitro* metodą

HPLC

Komórki przeznaczone do pomiarów zawartości wewnątrzkomórkowego GSH przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS, odklejano i usuwano z szalek za pomocą skrobaczki, a następnie wirowano (4000x g, 5 min., 4°C) aby uzyskać osad komórkowy. Osad odbiałczano poprzez intensywne mieszanie i sonifikowanie w 250µl 10% kwasu trichlorooctowego (TCA). Próbkę wirowano 20 min. w 20 000 x g. Supernatant pobrany z osadu był następnie doprowadzany do pH= 7,0 przy użyciu Na₂CO₃. Zobojętnianie próbek miało na celu zwiększenie wydajności reakcji upochodnienia GSH, niezbędnej do oznaczeń metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Po zobojętnieniu próbki były ponownie wirowane 20 min. w 20 000 x g, po czym pobierano supernatant i inkubowano przez 30 minut z 20 mM ditiotreitolem (DTT) w 4°C. DTT będąc silnym odczynnikiem redukującym mostki dwusiarczkowe, przekształca utlenione formy glutationu w formę zredukowaną (GSH), co pozwala na oznaczenie całkowitej puli glutationu w próbce. Osady komórkowe powstałe w trakcie procesu przygotowywania próbek rozpuszczano w 1M NaOH i oznaczano w nich białko metodą Bradforda (1976).

Stężenie glutationu mierzono metodą HPLC, z odwróconym układem faz, z detekcją fluorymetryczną wg zmodyfikowanej procedury Neuschwander'a -Tetri i Roll'a (1989). Do rozdzielania używano systemu złożonego z pompy P580, autosamplera Gina 50 (Dionex), kolumny ze złożem Hypersil Gold (Thermo Electron Co.), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (Dionex). Glutation w próbkach upochodniono w reakcji z dialdehydem orto-ftalowym (OPA) poprzez 1 minutową inkubację z równą objętością 0,1 M buforu boranowego (pH=10), 1,5 mM OPA i 0,25% β-merkaptotanołem (Simons i Johnson, 1976). OPA łączy się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dając fluorescencyjną pochodną. Podczas

rozdziła fazę ruchomą stanowiła mieszanina 50mM buforu fosforanowego (75%) i metanolu (25%). Elucję przy prędkości 1,2 ml/min. przeprowadzano izokratycznie do 4 min.

Flourescencję orto-ftalaldehydowej pochodnej glutationu mierzono przy długościach fali: wzbudzenia 370 nm i emisji 450 nm. Pik glutationu przypadał na ok. 3 minutę rozdziła.

Pomiary glutationu każdorazowo przeprowadzano razem z wzorcami GSH, które poddawano dokładnie taki samym procedurom jak próbki badane. Na ich podstawie wyznaczano krzywą standardową, według której wyznaczano stężenie w poszczególnych próbkach. Wyniki przedstawiano w przeliczeniu na zawartość białka w danej próbce.

IV.12. Badanie przepuszczalności pojedynczych warstw komórek RBE-4

W celu zbadania przepuszczalności, komórki RBE-4 wysiewano z równą gęstością na pokryte kolagenem I inserty Transwell (CORNING) o średnicy 3µm. Gęstość wysiewu wynosiła 60 000 komórek/ insert płytki 24-dołkowej. Eksperymenty przeprowadzano po trzech dniach hodowli, gdy komórki pokrywały inserty ścisłą jednolitą monowarstwą. Na godzinę przed rozpoczęciem doświadczenia standardową pożywkę do hodowli komórek RBE-4 (skład opisany w podrozdziale hodowle komórkowe) zamieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy, bez dodatku czerwieni fenolowej (αMEM/Ham's F10 z 1% FCS). Przepuszczalność monowarstw mierzono dodając do górnej komory insertu Dekstran o masie 40 kDa znakowany izotio-cyjanianem fluoresceiny (FITC-Dextran, Sigma) w stężeniu 1mg/ml. Po 30 minutach inkubacji w 37°C, 5% CO₂ pobierano 50µl próbki z dolnego przedziału, rozcieńczano w 150µl buforu PBS, a następnie za pomocą fluorymetru płytkowego fluostar Omega (BMG LABTECH) mierzono flourescencję przy długości fali 520nm (fala ekscytacji: 485nm). Przepuszczalność, określoną jako ilość Dekstranu jaka przeniknęła przez monowarstwę do dolnego przedziału insertu, wyrażano w % wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nieotraktowanych amoniakiem).

IV.13. Oznaczanie zmian liczebności komórek

Aby zbadać wpływ amoniaku na namnażanie się komórek RBE-4 wysiewano je z równą gęstością (10^5 komórek na płytkę o średnicy 35mm). Po 24 godzinach od wysiewu, do części komórek dodawano amoniak, po czym hodowano komórki kolejne 48 godzin. Po upływie 3 dni od założenia hodowli komórki płukano buforem PBS i trypsynizowano, aby uzyskać jednorodną zawiesinę pojedynczych komórek. Następnie zawiesinę rozcieńczano 10x w buforze PBS i mierzono licznikiem Multisizer3 (Beckman Coulter). Wyniki wyrażano jako % kontroli.

IV.14. Badanie żywotności komórek

Żywotność komórek badano za pomocą testu MTT, w którym wykorzystuje się reakcję przemiany żółtego bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo tetrazolu (MTT) w fioletowy formazan (Mosmann, 1983). Reakcja ta katalizowana jest przez mitochondrialne dehydrogenazy i zachodzi jedynie w mitochondriach żywych komórek, dlatego też stężenie produktu reakcji jest wprost proporcjonalne do żywotności komórek w danych warunkach hodowli. Aby wykonać test MTT komórki płukano buforem PBS o temperaturze 37°C, a następnie dodawano do nich roztwór MTT w PBS (0,5 mg/ml) na 15 minut w 37°C. Po upływie czasu inkubacji roztwór MTT odciągano, a komórki zawieszano w 300µl DMSO i inkubowano na wytrząsarce, przez 30 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Gdy powstały formazan uległ rozpuszczeniu w DMSO, mierzono jego zawartość spektrofotometrycznie przenosząc po 90 µl lizatu do dołka płytki 96- dołkowej i mierząc absorbancję za pomocą czytnika płytkowego przy długości fali 570 nm.

IV.15. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz w pożywkach hodowlanych metodą zymografii żelowej

Pożywki hodowlane zbierano z nadkomórek, a obecne w nich metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2 i 9, (MMP-2 i MMP-9) izolowano metodą chromatografii powinowactwa (ang. *affinity chromatography*). W celu usunięcia pozostałych białek o masie zbliżonej do MMP, pożywki inkubowano z 50 µl sepharozy B związanej z żelatyną (gelatin-Sepharose 4B, Pharmacia Biotech) przez 1 godzinę w temp. 4°C, ciągle mieszając. Następnie próbki odwirowywano, płukano buforem o składzie : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH=7,6), 5mM CaCl₂, 0,05% Brij-35, 0,02% NaN₃, po czym enzymy eluowano wyżej wymienionym buforem, z dodatkiem 10% DMSO. Komórki płukano w buforze PBS, zbierano, po czym lizowano i mierzono stężenie białka przy użyciu zestawu BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific) metodą opisaną w podrozdziale **IV.17.3**.

Aktywność metaloproteinaz MMP-9 i MMP-2 oznaczano metodą zymografii żelowej, opisaną przez Zhang'a i Gottschalla (1997). Do próbek dodawano 2x stężony bufor do prób, nie zawierający czynnika redukującego (0,125 M Tris-HCl (pH=6,8); 4% SDS; 20% glicerol; 0,05% błękit bromofenolowy) a następnie rozdzielano elektroforetycznie w temperaturze 4°C na 7,5% żelu poliakrylamidowym zawierającym 0,1% żelatyny. Jako pozytywnej kontroli używano próbek aktywnych enzymów MMP-2 i MMP-9 zakupionych w firmie Oncogene Research Products. Po zakończonej elektroforezie żele płukano dwukrotnie w 2,5% roztworze Triton X-100 przez 20 minut, aby usunąć SDS i zrenatuować białka, po czym żele inkubowano w buforze rozwijającym (200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH=7,5); 5 mM CaCl₂ i 0,02% NaN₃) przez 48h w temperaturze 37 °C. Wizualizację powstałych prążków przeprowadzano barwiąc żele Coomassie Blue R250, rozcieńczonym w 40% metanolu i 10% kwasie octowym. Enzymy rozkładając żelatynę znajdującą się w żelu poliakrylamidowym, pozostawiają odbarwiony prążek na tle granatowo wybarwionego żelu, zatem wielkość

uzyskanego prążka jest wprost proporcjonalna do aktywności danego enzymu. Aby zmierzyć zmiany aktywności metaloproteinaz wykonywano zdjęcia żeli, a prążki analizowano densytometrycznie przy użyciu programu GeneTools (Syngene). Dane uzyskane z analizy densytometrycznej przeliczano na zawartość białka (odpowiadającego danej próbce) a wyniki przedstawiano jako procenty kontroli.

IV.16. Oznaczanie izoprostanów (F₂-IsoPs)

Całkowitą pulę F₂-IsoPs mierzono w komórkach RBE-4 przy użyciu chromatografii gazowej, w połączeniu ze spektrometrią masową (Morrow i Roberts, 1999) metodą opisaną przez Milatovic'a i współpracowników (2007). Komórki zawieszano w 0,5 ml metanolu zawierającego 0,005% stężenie butylowanego hydroksytoluenu, sonifikowano i poddawano zmydłaniu przy użyciu 15% KOH aby zhydrolizować związane F₂-IsoPs. Następnie lizaty komórkowe doprowadzano do pH=3, po czym dodawano jako standard 0,1 ng znakowanego [⁴H₂] 15-F_{2α} IsoPs i oczyszczano ekstrakcją na kolumnkach C18 Sep-Pak oraz chromatografią cienkowarstwową. Następnie analizowano pochodną trimetylsilylu, ester pentafluorobenzylu, metodą chromatografii gazowej i metodą spektrometrii masowej, wykorzystującą technikę chemicznej jonizacji.

IV.17. Oznaczanie białka

IV.17.1. Metoda Bradforda

W metodzie tej używa się błękitu Coomasie, który po związaniu z białkiem zmienia barwę z brązowej na niebieską, tworząc stabilny kompleks który oznacza się kolorymetrycznie (Bradford, 1976). Pomiarów dokonywano na płytkach 96- dołkowych za

pomocą spektrofotometru płytkowego. Nanoszono 30µl badanej próbki w 1M NaOH na dołek i dodawano 270µl odczynnika do oznaczeń białka (0,01% Coomassie Brilliant Blue G- 250, 4,75% etanol, 8,5% kwas fosforowy). Pomiary wykonywano w trzykrotnym powtórzeniu. Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm a zawartość białka wyznaczano na podstawie krzywej standardowej, sporządzonej z roztworów albuminy o stężeniach 1-10 µg/próbę.

IV.17.2. Metoda Lowry'ego

W metodzie Lowry'ego wykorzystuje się dwie odrębne reakcje: reakcję jonów miedzi z wiązaniem peptydowym oraz reakcję aminokwasów aromatycznych z odczynnikiem Folin-Ciocalteu'a. Pomiary stężenia białka tą metodą wykonywano przy użyciu zestawu Modified Lowry Protein Assay Reagent (Pierce), zgodnie z instrukcją producenta. 40 µl badanej próbki lub „standardu” przenoszono do dołka na płytce 96-dołkowej, w 3 powtórzeniach. Następnie do każdego dołka dodawano 200 µl odczynnika Lowry'ego (Modified Lowry Reagent, Pierce), energicznie mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, bez dostępu światła. Następnie do każdego z dołków dodawano 20 µl odczynnika Folin-Ciocalteu (1x) i ponownie mieszano. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono absorbancję przy długości fali 750 nm, w spektrofotometrze płytkowym (Model 680, Bio-Rad). Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej z roztworów albuminy o stężeniach 0,05 – 2 mg/ml.

IV.17.3. Metoda wykorzystująca kwas biscynchoninowy (BCA)

Metoda ta opiera się na zdolności białek do redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ oraz zdolności jonów Cu^+ do tworzenia barwnych kompleksów z BCA. Absorbancja kompleksów jest wprost proporcjonalna do zawartości jonów Cu^+ , których ilość z kolei zależna jest od

ilości białka w badanej próbce. Do oznaczeń używano zestawu BCA Protein Assay (Pierce). 10 μ l badanej próbki lub „standardu” przenoszono do dołka na płytce 96-dołkowej, w 3 powtórzeniach. Następnie do każdego dołka dodawano 200 μ l odczynnika do oznaczeń (BCA Working Reagent), energicznie mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, pod przykryciem. Następnie płytkę schładzano do temperatury pokojowej i mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm, w spektrofotometrze płytkowym (Model 680, Bio-Rad). Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej z roztworów albuminy o stężeniach 0,125 – 2 mg/ml.

IV.18. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (\pm SD). Liczbę doświadczeń podano w legendach do rycin. Znamienność statystyczną różnic określano przy pomocy programu GraphPad Prism 3.0, stosując test Studenta lub analizę wariancji (ANOVA) z testem Dunnett'a.

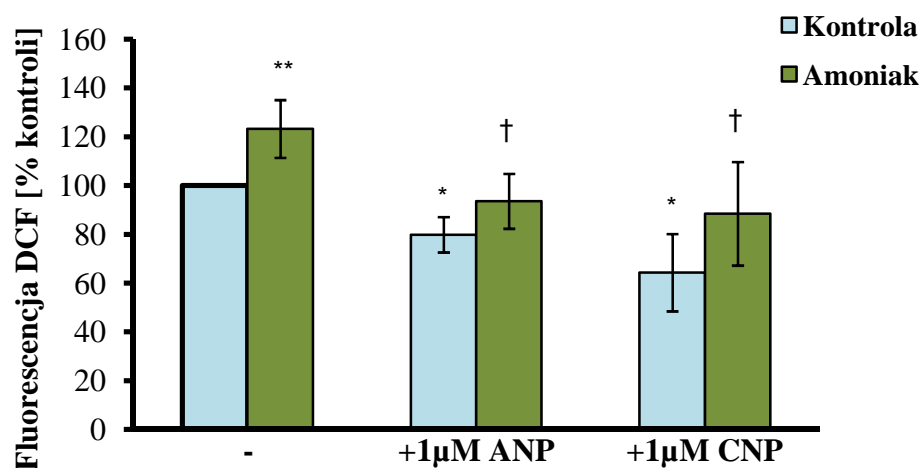
V. WYNIKI

V.1. Wpływ jonów amoniowych na astrocyty

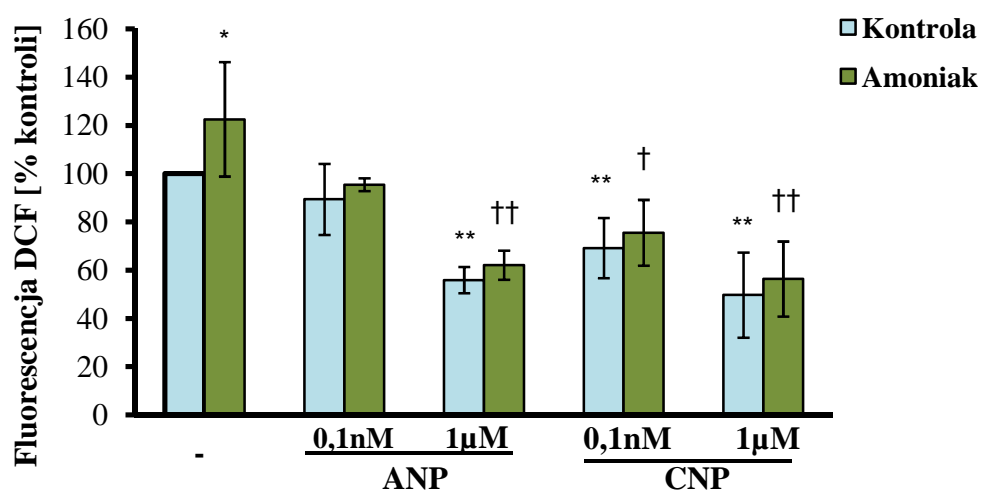
V.1.1. Wpływ ANP i CNP na produkcję wolnych rodników tlenowych w komórkach kontrolnych i traktowanych amoniakiem

Traktowanie amoniakiem (5mM NH₄Cl) przez 1 godzinę (Ryc.V.1A) lub 24 godziny (Ryc.V.1B) zwiększało akumulację ROS w astrocytach o ok. 24% w stosunku do kontroli. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami z innych laboratoriów (Murthy i wsp., 2001). Dodanie ANP lub CNP w stężeniu 10⁻⁶ M hamowało gromadzenie się ROS w komórkach kontrolnych o odpowiednio: ok. 20% lub 35%, a w komórkach traktowanych amoniakiem przez 1godzinę o ok. 30 % lub 35 % (Ryc.V.1A). ANP i CNP dodawane na 24godz. obniżały produkcję ROS w sposób zależny od dawki. W komórkach kontrolnych ANP w stężeniu 10⁻¹⁰ M oraz 10⁻⁶ M obniżało ROS do odpowiednio: ok. 89% i 56 % wartości podstawowej, podczas gdy CNP w tych samych stężeniach obniżało ROS o ok. 69% i 50 %. W komórkach traktowanych amoniakiem przez 24 godz., ANP w stęż. 10⁻¹⁰ M oraz 10⁻⁶ M obniżało ROS o odpowiednio: ok. 28 % i 61%, natomiast CNP w tych samych stężeniach obniżało ROS o ok. 48% i 57% (Ryc.V.1B).

A



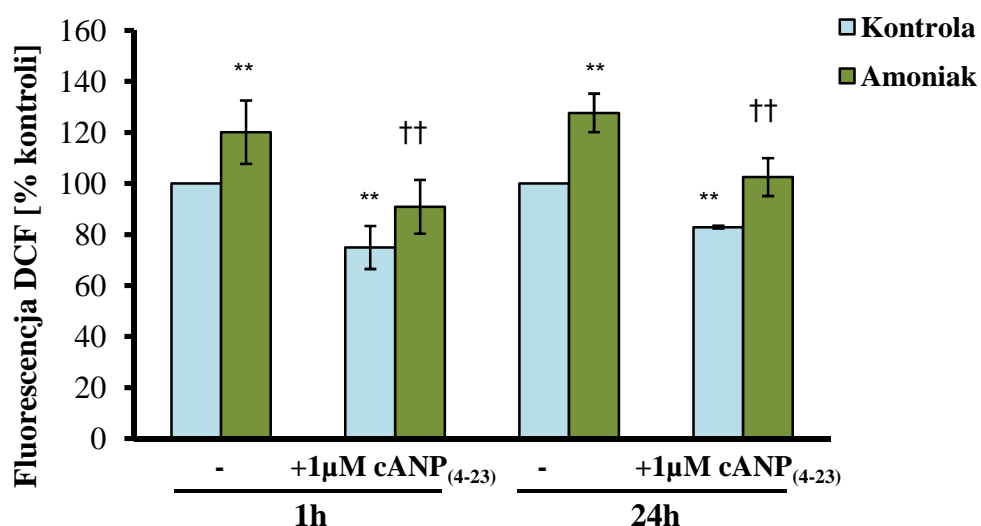
B



Ryc.V.1. Wpływ ANP i CNP na produkcję ROS w hodowli pierwotnej szczurzych astrocytów w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po inkubacji z 5mM chlorkiem amoniaku („Amoniak”) 1 godz. (A) i 24 godz. (B). Peptydy natriuretyczne dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Kontrola; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ vs Amoniak.

V.1.2. Wpływ aktywacji receptora NPR-C na produkcję wolnych rodników tlenowych w komórkach kontrolnych i traktowanych amoniakiem

cANP₍₄₋₂₃₎, selektywny agonista receptora NPR-C, dodawany w stężeniu 10⁻⁶M obniżał produkcję ROS o 25% w komórkach kontrolnych i o 33% w komórkach traktowanych amoniakiem przez 1 godzinę. W komórkach kontrolnych analizowanych po 24 godz. inkubacji cANP₍₄₋₂₃₎ redukował poziom ROS o 18%, a w komórkach poddanych działaniu amoniaku przez 24 godz. o 21%. Różnice pomiędzy efektami ANP i cANP₍₄₋₂₃₎ były statystycznie nieznamienne zarówno w komórkach traktowanych, jak i nietraktowanych amoniakiem ($p > 0,05$) (Ryc. V.2).

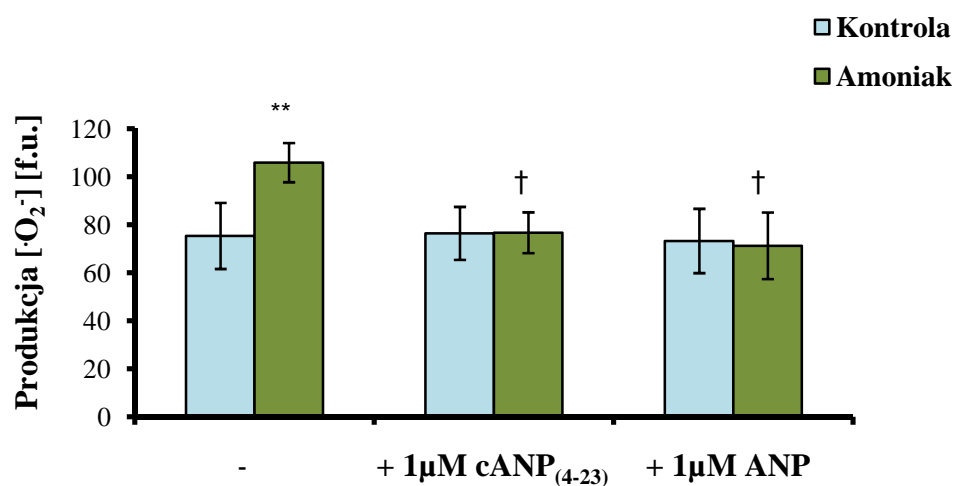


Ryc.V.2. Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ na produkcję ROS w hodowli pierwotnej szczurzych astrocytów w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”) przez 1 i 24 godz. cANP₍₄₋₂₃₎ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola; †† $p < 0,01$ vs Amoniak.

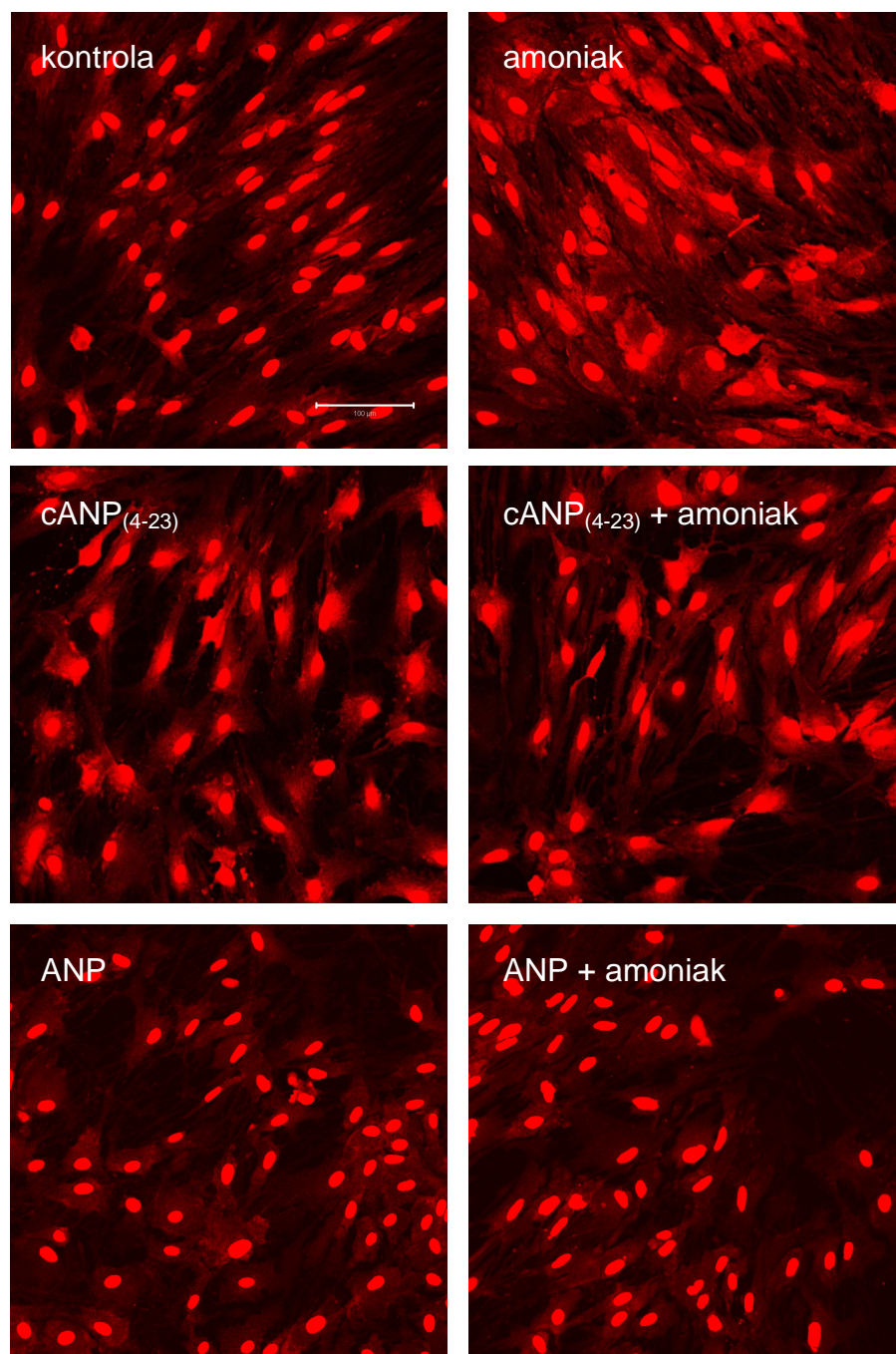
V.1.3. Wpływ ANP i cANP₍₄₋₂₃₎ na produkcję [$\cdot\text{O}_2^-$] wywołaną amoniakiem

Traktowanie astrocytów amoniakiem przez 24 godz. zwiększało intensywność fluorescencji DHEt (marker produkcji [$\cdot\text{O}_2^-$]) z $75,3 \pm 13,8$ do $105,9 \pm 8,2$ [f.u.], co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami z innych laboratoriów (Reinher i wsp., 2007). Zarówno ANP, jak i cANP₍₄₋₂₃₎ specyficznie przeciwdziałały wywołanej amoniakiem produkcji [$\cdot\text{O}_2^-$] (Ryc.V.3A, zdjęcia: Ryc.V.3B).

A



B

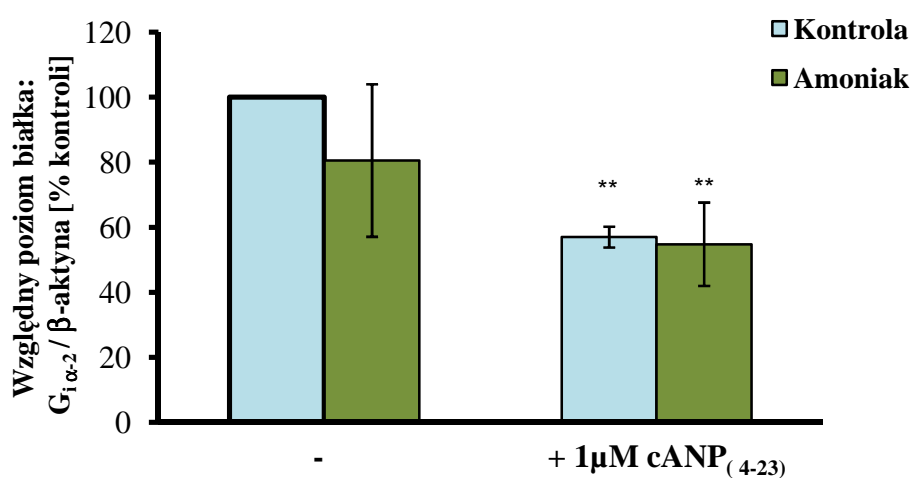


Ryc.V.3. Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ i ANP na generację anionorodnika nadtlenowego [O_2^-], w hodowli pierwotnej astrocytów, wywołaną 24 godz. inkubacją z amoniakiem. cANP₍₄₋₂₃₎ lub ANP dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. (A) Dane uzyskane z analizy intensywności fluorescencji. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-5 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola, † $p < 0,05$ vs Amoniak. (B) Przykładowe zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Oznaczenie skali dla wszystkich zdjęć- 100 μ m.

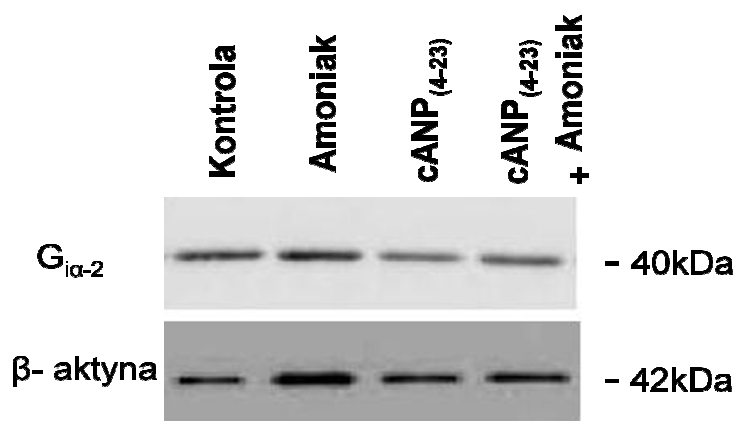
V.1.4. Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ na ekspresję białka G_{ia-2} oraz na produkcję cAMP i cGMP: dowody na funkcjonalność NPR-C w astrocytach

Inkubacja z cANP₍₄₋₂₃₎ (10⁻⁶ M) przez 24 godziny obniżała ekspresję białka G_{ia-2} w komórkach traktowanych amoniakiem oraz w komórkach kontrolnych, odpowiednio o: ok. 54 % i ok.56 % (Ryc.V.4A, zdjęcie: Ryc.V.4B).

A



B

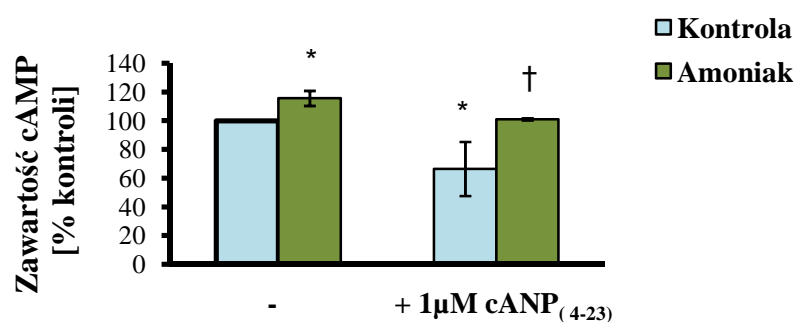


Ryc.V.4. Wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ na ekspresję białka G_{ia} w hodowli pierwotnej astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). cANP₍₄₋₂₃₎ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. (A) Dane uzyskane w wyniku analizy Western Blot. Wyniki są średnią (± SD) z 4 niezależnych doświadczeń. ** p< 0,01 vs Kontrola. (B) Przykładowe zdjęcie immunodetekcji białek G_{ia}.

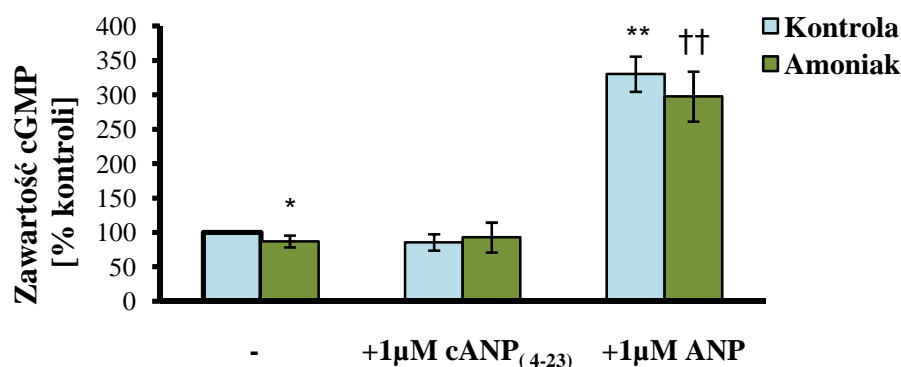
Dodawanie cANP₍₄₋₂₃₎ (10^{-6} M) na 24 godz. obniżało poziom cAMP o ok. 40%. Traktowanie amoniakiem przez 24 godz. podnosiło poziom cAMP o ok.15%, natomiast preinkubacja z cANP₍₄₋₂₃₎ znosiła efekt wywołany amoniakiem (Ryc.V.5A).

Zgodnie z oczekiwaniem, ANP działając poprzez aktywację NPR-A, podnosiło poziom cGMP trzykrotnie zarówno w astrocytach kontrolnych, jak i traktowanych amoniakiem. Z kolei cANP₍₄₋₂₃₎ nie zmieniało poziomu cGMP, co świadczy o jego specyficznej interakcji wyłącznie z receptorem NPR-C (Ryc.V.5B).

A



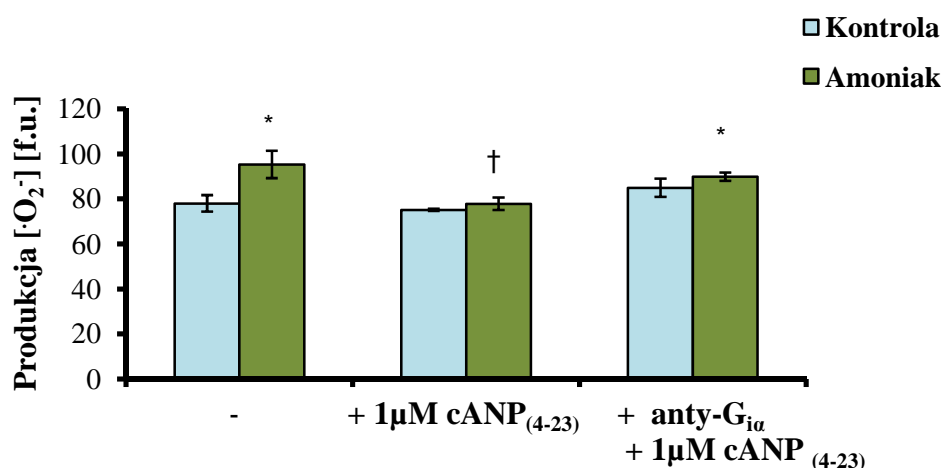
B



Ryc.V.5. Wpływ preinkubacji z ANP i/lub cANP₍₄₋₂₃₎ na zawartość cAMP (A) i cGMP (B) w hodowli pierwotnej astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). ANP i/lub cANP₍₄₋₂₃₎ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Podstawowe wartości stężeń cAMP i cGMP w astrocytach kontrolnych wynosiły odpowiednio: $100,7 \pm 18,3$ i $9,9 \pm 1,7$ [fmol/mg białka]. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Kontrola; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ vs Amoniak.

V.1.5. Wpływ preinkubacji z przeciwciałem anti- $G_{i\alpha-2}$ na hamowanie produkcji $[\cdot O_2^-]$ przez $cANP_{(4-23)}$ w astrocytach traktowanych amoniakiem

Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach (Ryc.V.3), $cANP_{(4-23)}$ hamował wywołane amoniakiem wytwarzanie $[\cdot O_2^-]$. Inkubacja z przeciwciałem przeciwko białku $G_{i\alpha-2}$ powodowała zniesienie hamującego efektu $cANP_{(4-23)}$, a poziom generacji $[\cdot O_2^-]$ był taki, jak w przypadku traktowania astrocytów amoniakiem, co potwierdza udział NADPH oksydazy w tym procesie (Ryc.V.6).

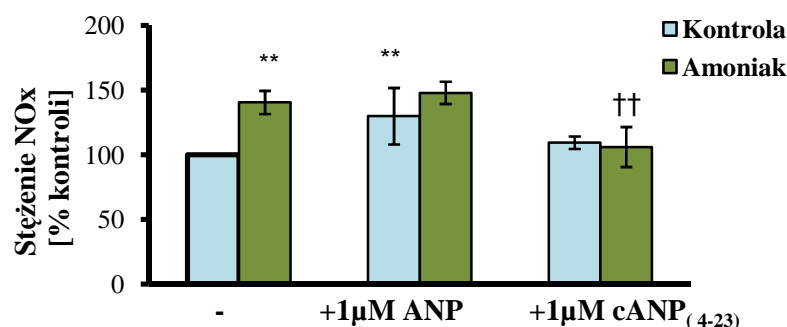


Ryc.V.6. Wpływ $cANP_{(4-23)}$ na generację anionorodnika nadtlenkowego $[\cdot O_2^-]$, w hodowli pierwotnej astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). Inkubację prowadzono w obecności lub bez przeciwciała przeciwko białku $G_{i\alpha-2}$. Przeciwciało anti- $G_{i\alpha-2}$ (1µg/ dołek płytki 24-dółkowej) dodawano na 30 minut przed dodaniem $cANP_{(4-23)}$, natomiast $cANP_{(4-23)}$ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Przedstawione dane uzyskano z analiz intensywności fluorescencji. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, † $p < 0,05$ vs Amoniak.

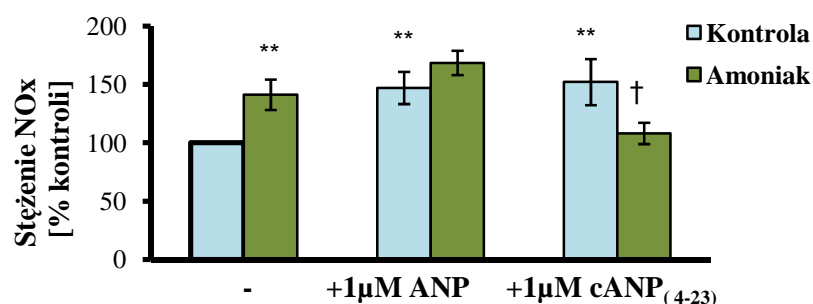
V.1.6. Wpływ ANP i cANP₍₄₋₂₃₎ na syntezę tlenku azotu w astrocytach kontrolnych i traktowanych amoniakiem – rola endotelialnej formy syntazy tlenku azotu

Dodanie amoniaku na 1 godz. lub 24 godz. podnosiło poziom azotanów/azotynów (NOx) (marker produkcji NO) o ok.40% (Ryc. V.7A i B). Inkubacja komórek kontrolnych z ANP (10^{-6} M) przez 1 godz. zwiększała poziom NOx o ok. 29% w stosunku do wartości podstawowych, natomiast cANP₍₄₋₂₃₎ w tych samych warunkach nie wywoływał żadnego efektu. W komórkach traktowanych amoniakiem przez 1 godz. preinkubacja z ANP również podwyższała produkcję NOx, o ok. 50 %, a cANP₍₄₋₂₃₎ dodawany w tym samym stężeniu nie wpływał na poziom NOx. Po 24 godz. inkubacji zarówno ANP, jak i cANP₍₄₋₂₃₎, podnosiły produkcję NOx o odpowiednio: ok. 47 % i ok. 52 %. Jednakże w przypadku astrocytów traktowanych amoniakiem przez 24 godz. ANP nie zwiększało produkcji NOx ponad poziom wygenerowany przez dodanie amoniaku, natomiast cANP₍₄₋₂₃₎ redukowało stymulujący efekt amoniaku, obniżając poziom NOx do wartości rejestrowanych w komórkach nie poddawanych działaniu amoniaku (Ryc. V.7B)

A



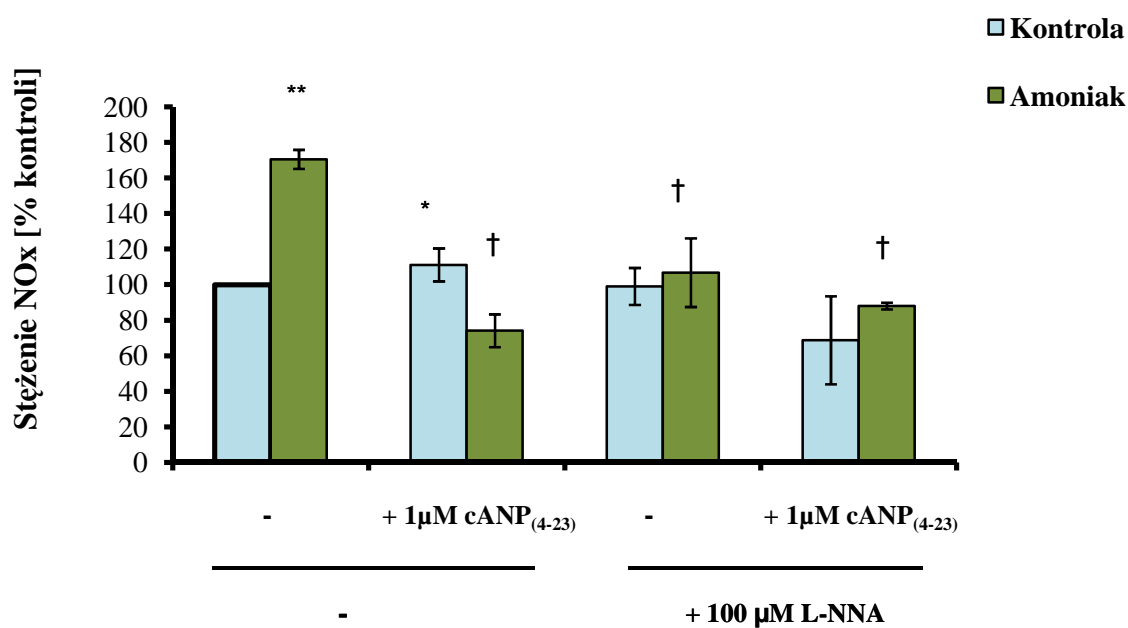
B



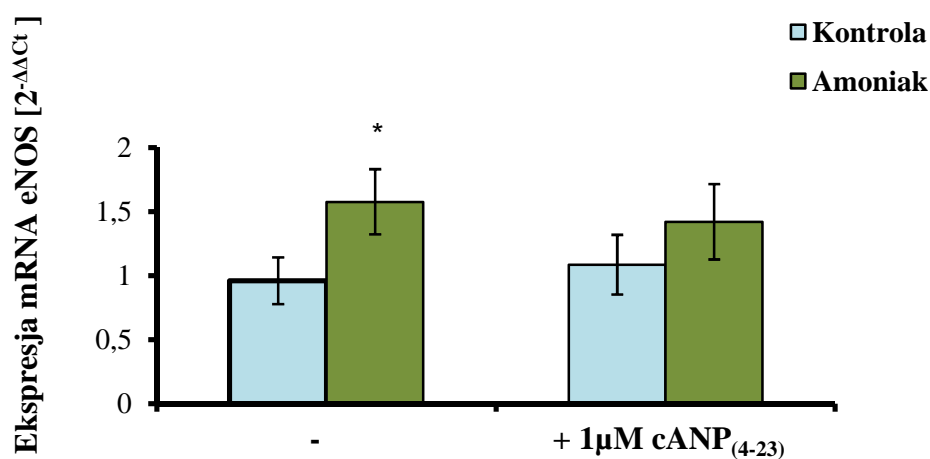
Ryc.V.7. Wpływ preinkubacji z ANP lub cANP₍₄₋₂₃₎ na zawartość azotanów/azotynów (NOx) w pożywkach pierwotnej hodowli astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 1 godz. (A) lub 24 godz. (B) inkubacji z 5mM chlorkiem amoniaku („Amoniak”). ANP lub cANP₍₄₋₂₃₎ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola; † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ vs Amoniak.

Wzrost produkcji NOx po 24-godzinnej inkubacji z amoniakiem był hamowany przez 100 μ M L-N^G-nitroargininę, która w podanym stężeniu jest preferencyjnym inhibitorem konstytutywnych form syntaz tlenu azotu (tj. eNOS i nNOS) (Adamczyk i wsp., 2010) (Ryc.V.8A). Ponadto, amoniak wywoływał wzrost ekspresji mRNA eNOS (Ryc. 8B). Wyniki te wskazują, iż wywołany amoniakiem wzrost NOx był najprawdopodobniej spowodowany zwiększoną ekspresją eNOS w astrocytach. Z kolei cANP₍₄₋₂₃₎ podnosił poziom NOx w komórkach kontrolnych, nie powodując zmian ekspresji genu kodującego ten enzym.

A

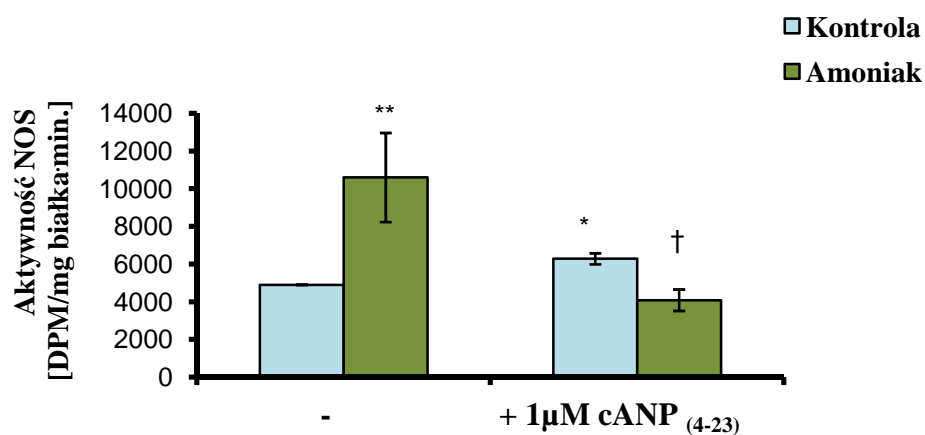


B



Ryc. V.8. Wpływ preinkubacji z cANP₍₄₋₂₃₎ (A,B) i 100 µM L-N^G-nitroargininą (L-NNA) (A) na stężenie azotanów/azotynów (NO_x) w pożywkach (A) i na ekspresję mRNA genu kodującego eNOS (B) w pierwotnej hodowli astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). L-NNA dodawano na 15 minut przed dodaniem cANP₍₄₋₂₃₎, natomiast cANP₍₄₋₂₃₎ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (± SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * p < 0,05 , ** p < 0,01 vs Kontrola; †p < 0,05 vs Amoniak.

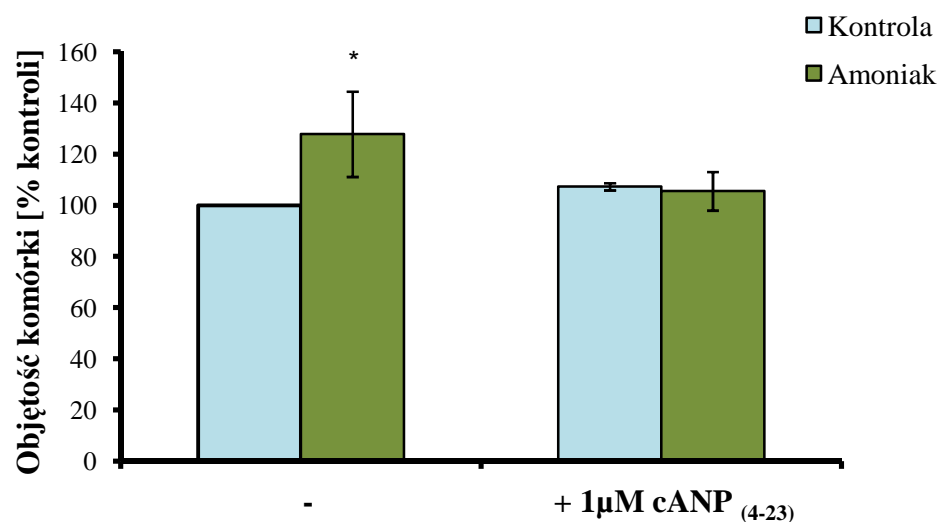
Zarówno amoniak, jak i $cANP_{(4-23)}$, dodawane oddzielnie na 24 godziny zwiększały aktywność NOS, podczas gdy preinkubacja z $cANP_{(4-23)}$ hamowała efekt amoniaku (Ryc.V.9).



Ryc. V.9. Wpływ preinkubacji z $cANP_{(4-23)}$ na całkowitą aktywność syntazy tlenku azotu w hodowli pierwotnej astrocytów, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). $cANP_{(4-23)}$ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Kontrola; † $p < 0,05$ vs Amoniak.

V.1.7. Wpływ $cANP_{(4-23)}$ na zmiany objętości astrocytów wywołane amoniakiem

Traktowanie pierwotnej hodowli astrocytów amoniakiem przez 24 godz. powodowało wzrost ich objętości o 28%. Preinkubacja z $cANP_{(4-23)}$ zapobiegała wywoływanemu amoniakiem wzrostowi objętości, w wyniku czego objętość tak traktowanych astrocytów nie różniła się od tej obserwowanej w astrocytach kontrolnych (Ryc. V.10).



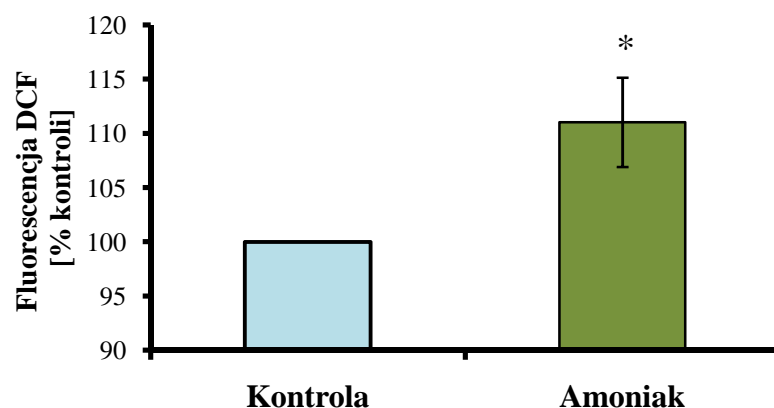
Ryc.V.10. Wpływ preinkubacji z $cANP_{(4-23)}$ na objętość astrocytów w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). $cANP_{(4-23)}$ dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Podstawowa wartość pomiaru objętości astrocytów kontrolnych wynosiła: $131862,7 \pm 14060,66$ [j.u.]. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

V.2. Wpływ jonów amonowych na komórki śródbłonka naczyń (RBE-4)

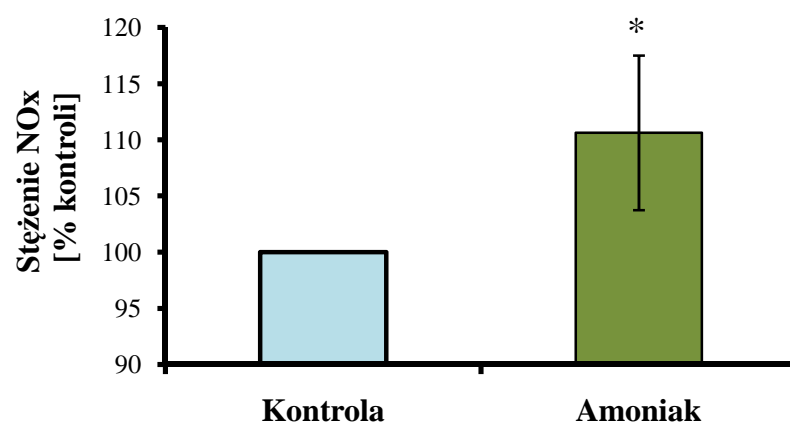
V.2.1. Wpływ amoniaku na produkcję wolnych rodników tlenowych, tlenku azotu i F_2 -izoprostanów w linii komórek śródbłonka mikronaczyń mózgu RBE-4

Aby ocenić, czy amoniak generuje stres oksydacyjno-nitracyjny w komórkach RBE-4, zastosowano metodykę analogiczną do użytej w stosunku do astrocytów: mierzono produkcję ROS i zawartość NOx, które traktowane były jako marker produkcji tlenku azotu. Do pomiaru ROS używano sondy fluorescencyjnej DCF, która świeci gdy oksydacja zachodzi wewnątrzkomórkowo, przy czym aktywacja fluorescencji zachodzi niezależnie od rodzaju wolnego rodnika tlenowego, zatem służy do wykrywania całkowitej puli ROS. Traktowanie amoniakiem (5mM NH_4Cl) przez 24godz. zwiększało zarówno produkcję ROS (Ryc. V.11A), jak i tlenku azotu (Ryc.V.11B) w komórkach RBE-4 o ok. 11% w stosunku do kontroli.

A



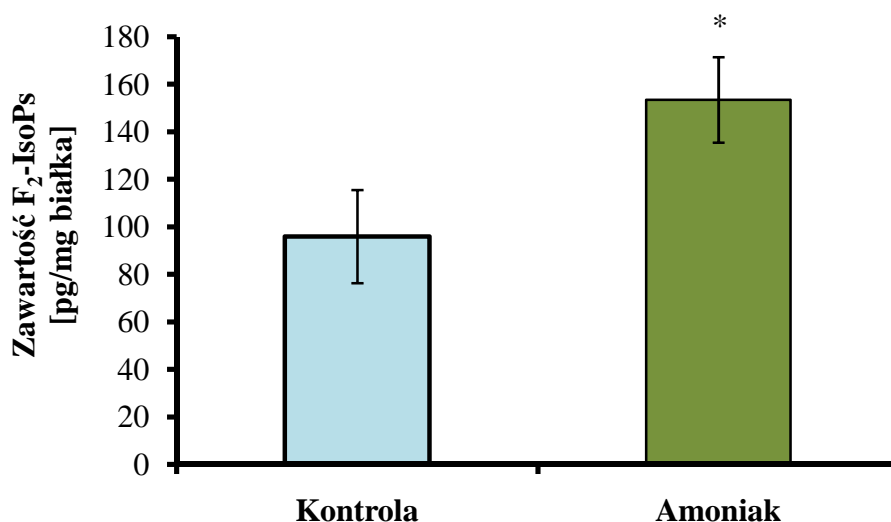
B



Ryc.V.11. Produkcja ROS w komórkach RBE-4 (A) i zawartość azotanów/azotynów (NOx) w pożywkach hodowlanych (B) w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). Wyniki są średnią (\pm SD) z 5-7 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

Zbadano także wpływ amoniaku na poziom F_2 -izoprostanów (F_2 -IsoPs), które są stabilnymi i specyficznymi produktami nieenzymatycznej wolnorodnikowej peroksydacji lipidów, przez co stanowią dobre markery stresu oksydacyjnego, odzwierciedlając jego patofizjologiczne konsekwencje. Inkubacja z amoniakiem przez 24 godz. wywoływała wzrost poziomu F_2 -IsoPs o ok. 53% w stosunku do wartości kontrolnych (Ryc. V.12), co wskazuje,

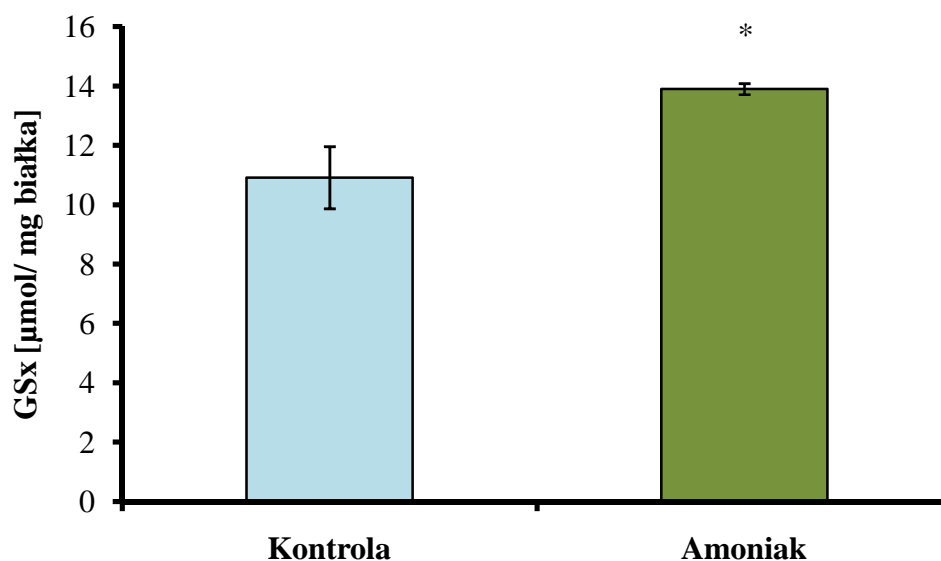
iż nagromadzenie się ROS i NO pod wpływem inkubacji z amoniakiem było faktycznie przejawem indukcji stresu oksydacyjno–nitracyjnego w tych komórkach.



Ryc.V.12. Zawartość F₂-IsoPs w komórkach RBE-4, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po traktowaniu 5mM chlorkiem amonu przez 24 godz. („Amoniak”). Wyniki są średnią (\pm SD) z 9-10 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

V.2.2. Wpływ amoniaku na wewnątrzkomórkowy poziom glutationu w komórkach RBE-4

Wykazano, iż traktowanie komórek RBE-4 amoniakiem przez 24 godziny podnosiło poziom glutationu całkowitego (GSx) o ok. 27% (Ryc. V.13), analogicznie do wcześniejszych obserwacji dotyczących komórek glejowych. Traktowanie 24–godzinne astrocytów pierwotnych i komórek glejaka C6 5mM chlorkiem amonu skutkowało wzrostem poziomu glutationu w obu typach komórek (Hilgier i wsp., 2010), co interpretowano jako przejaw autoprotekcji w reakcji na stres związany z działaniem amoniaku. W świetle powyższej interpretacji wzrost produkcji GSx w komórkach RBE-4 poddanych działaniu amoniaku również może świadczyć o swoistej odpowiedzi antyoksydacyjnej.

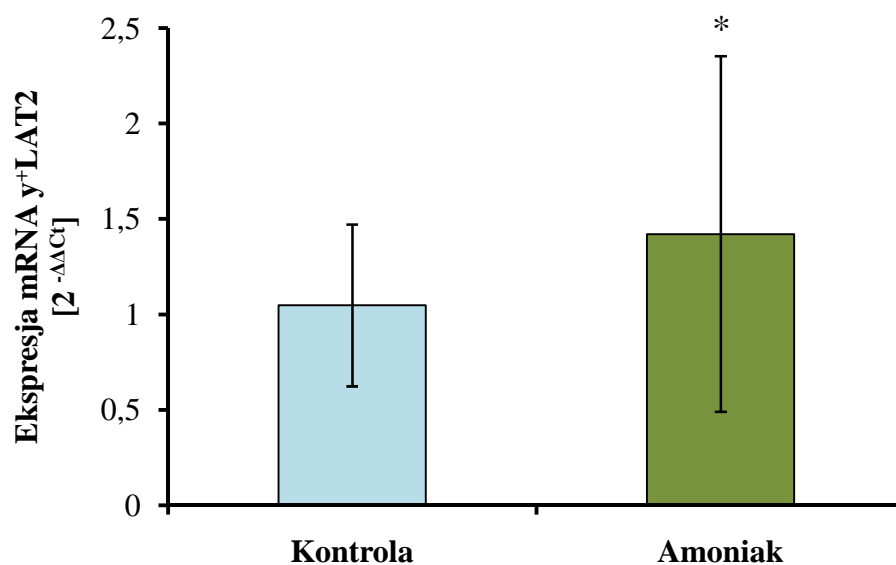


Ryc.V.13. Zawartość glutationu (GSx) w komórkach RBE-4, w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po traktowaniu 5mM chlorkiem amonu przez 24 godz. („Amoniak”). Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

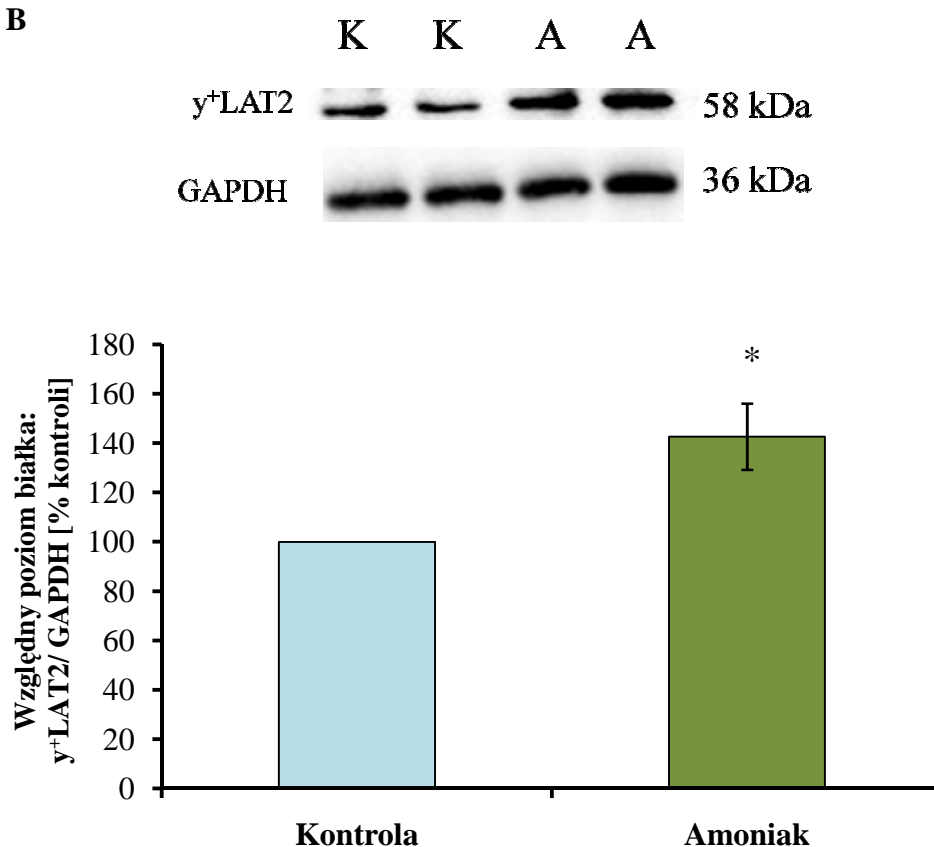
V.2.3. Wpływ amoniaku na ekspresję transportera γ^+ LAT2

Wykazano, że inkubacja komórek RBE-4 z amoniakiem powoduje wzrost ekspresji mRNA oraz białka hybrydowego transportera argininowo- glutaminowego γ^+ LAT2, odpowiednio o ok. 30% (Ryc.V.14A) i 40% (Ryc.V.14B) w stosunku do ekspresji mierzonych w komórkach kontrolnych. W komórkach RBE-4 nie wykryto ekspresji pozostałych transporterów argininy (CAT1 i CAT2, dane nie zawarte w rozprawie). W świetle faktu, iż arginina jest substratem do produkcji tlenku azotu, wzrost ekspresji γ^+ LAT2 po amoniaku, a co za tym idzie zwiększony transport argininy do komórek RBE-4, może być jednym z możliwych mechanizmów tłumaczących wzrost produkcji NO_x po amoniaku.

A



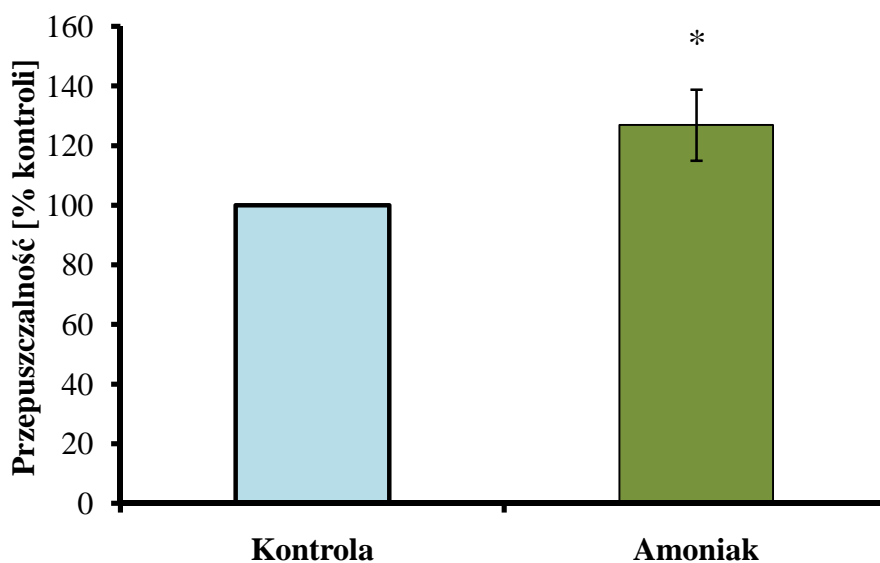
B



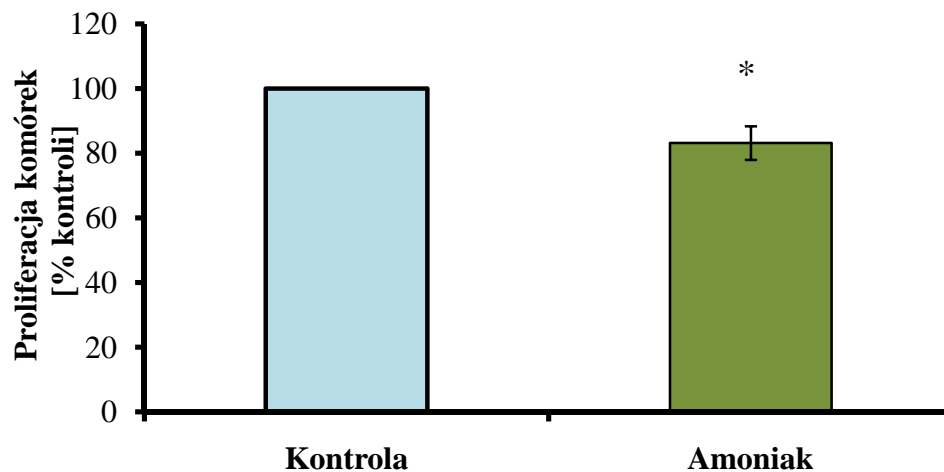
Ryc.V.14. Ekspresja mRNA (A) i białka (B) transportera y⁺LAT2 w komórkach RBE-4 w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po traktowaniu 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”) przez 24 godz. Wyniki są średnią z 3-6 niezależnych doświadczeń. * p< 0,05 vs Kontrola

V.2.4. Wpływ amoniaku na fizjologiczne parametry komórek RBE-4 , kluczowe dla ich funkcji barierowych

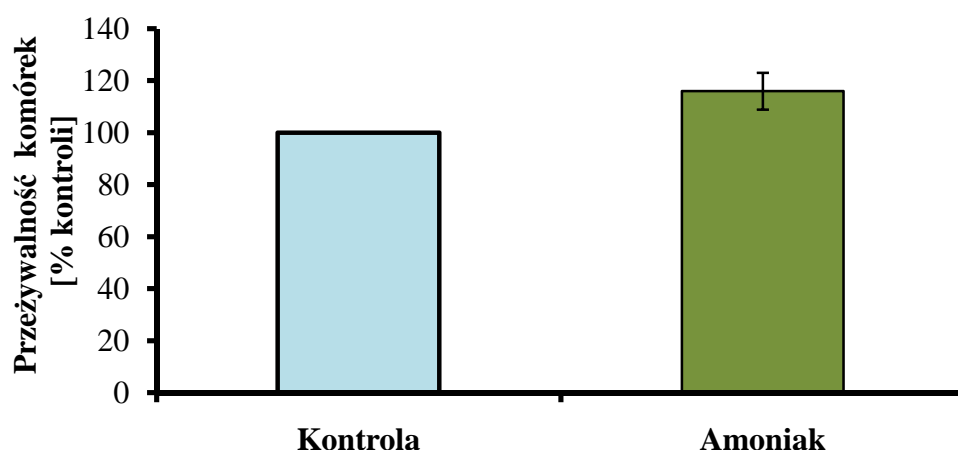
Zaobserwowano, że traktowanie komórek RBE-4 amoniakiem przez 24 godz. zwiększało przepuszczalność pojedynczych warstw tych komórek dla Dekstranu znakowanego FITC (40kDa) o ok. 27% w stosunku do wartości uzyskanych dla komórek nie poddawanych działaniu amoniaku (Ryc.V.15). Hodowanie komórek RBE-4 przez 48 godz. w obecności jonów amonowych (począwszy od 1 dnia po wysianiu, aż do dnia wykonywania eksperymentu) powodowało spadek ich proliferacji o ok. 17% (Ryc.V.16). Ani jedno ani drugie zjawisko nie było związane ze spadkiem żywotności tych komórek; wynik testu MTT pozostawał niezmienny w stosunku do poziomu kontrolnego (Ryc.V.17).



Ryc.V.15. Przepuszczalność monowarstw komórek RBE-4 dla FITC-Dekstranu (40 kDa) w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). Wyniki są średnią (\pm SD) z 6 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.



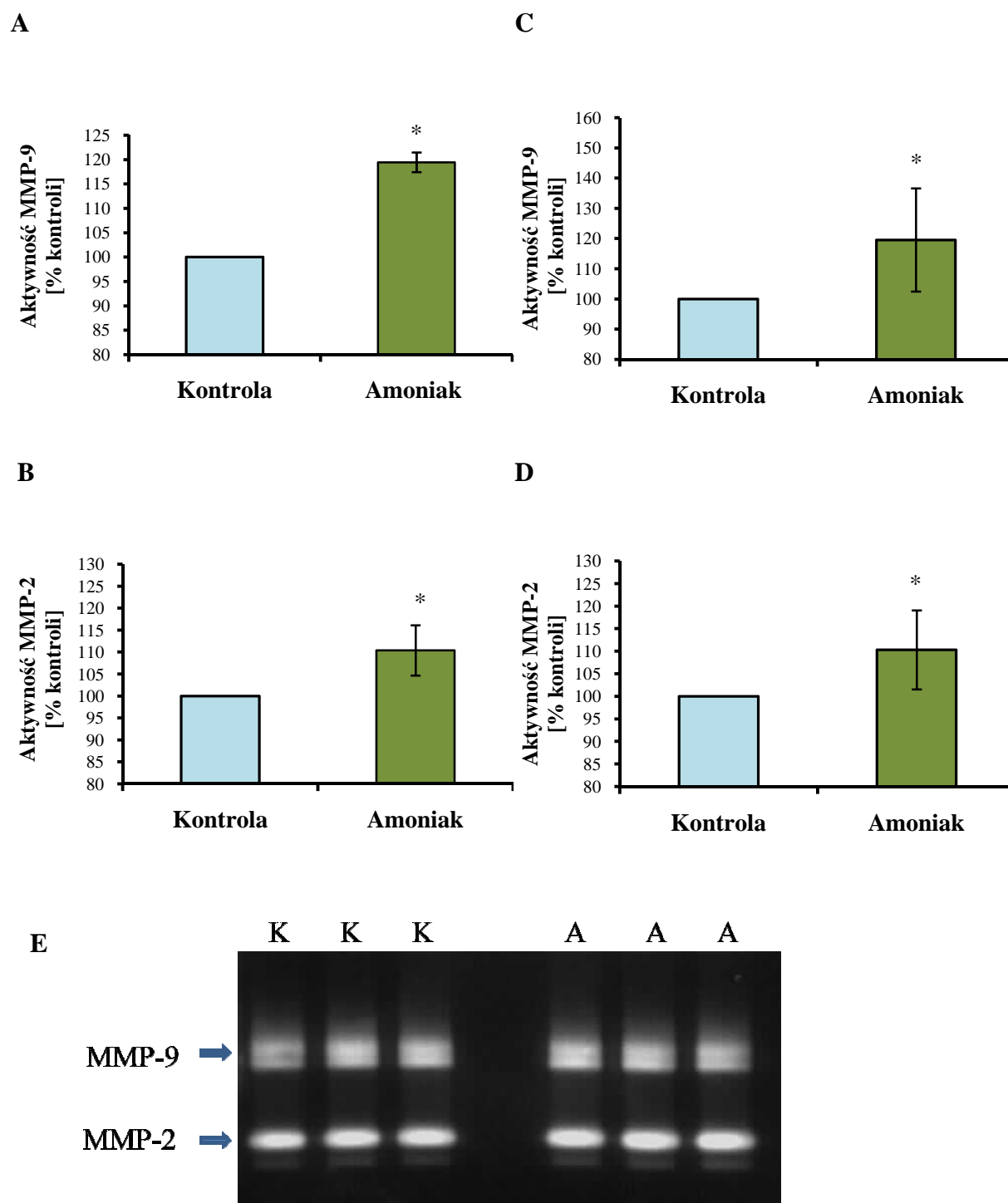
Ryc.V.16. Wpływ 5mM chlorku amonu („Amoniak”) na proliferację komórek RBE-4. Amoniak dodawano 24 godz. po wysianiu komórek. Do eksperymentów używano 3-dniowych hodowli. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.



Ryc.V.17. Żywotność komórek RBE-4 w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.

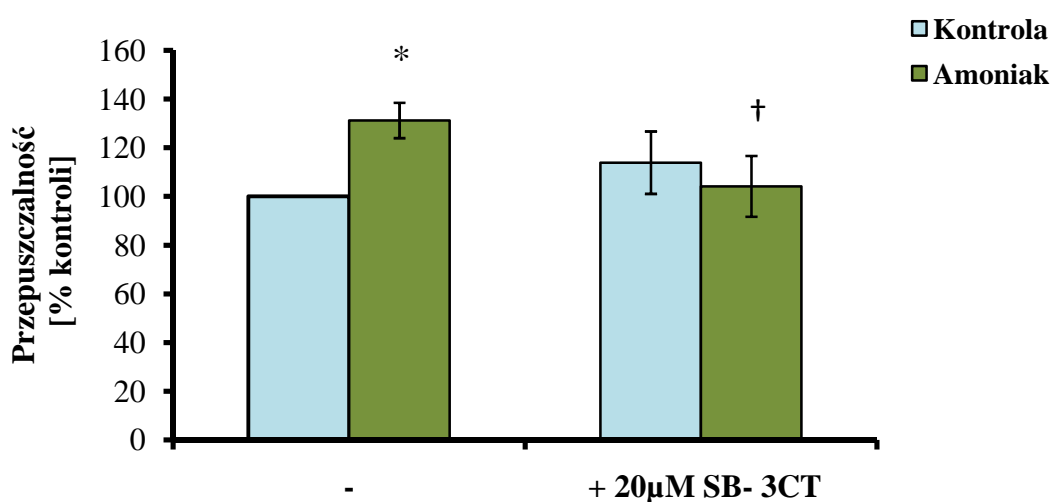
V.2.5. Wpływ amoniaku na zewnątrzkomórkową aktywność MMP-2 i MMP-9

Ze względu na fakt, iż surowica obecna w pożywkach hodowlanych posiada własną odrębną aktywność MMPs, wpływ amoniaku na zewnątrzkomórkową aktywność MMPs produkowanych przez komórki RBE-4 analizowano w różnych wariantach, tj. w pożywkach zawierających surowicę, bądź jej nie zawierających. Wykazano, że niezależnie od zastosowanego wariantu, traktowanie komórek amoniakiem przez 24 godz. jednakowo zwiększało zewnątrzkomórkową aktywność metaloproteinaz: MMP-9 i MMP-2 o odpowiednio: ok. 20% i 10% (Ryc. V.18), natomiast wewnątrzkomórkowa aktywność MMPs nie ulegała zmianie w powyższych warunkach doświadczalnych (dane niezilustrowane). Wyniki te wskazują, iż wywołany amoniakiem wzrost przepuszczalności pojedynczych warstw komórek RBE-4 jest najprawdopodobniej wynikiem degradacji białek tworzących TJ, a degradacja ta jest indukowana przez metaloproteinazy wydzielane z komórek RBE-4.



Ryc.V.18. Zewnątrzkomórkowa aktywność metaloproteinaz: MMP-9 (A, C) i MMP-2 (B, D) mierzona w pożywkach hodowlanych zawierających - (A, B) bądź nie zawierających surowicy (C, D), pobranych z komórek RBE-4 inkubowanych w warunkach kontrolnych („Kontrola”) i w obecności 5mM chlorku amonu przez 24 godz. („Amoniak”). E - przykładowy zymogram ilustrujący aktywność MMPs. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

Dodanie do hodowli RBE-4 związku SB-3CT, który jest selektywnym inhibitorem MMP-9 i MMP-2, zapobiegało wywołanemu amoniakiem wzrostowi przepuszczalności pojedynczych warstw komórek RBE-4 (Ryc. V.19). Wynik ten potwierdza udział MMP-9 i MMP-2 w tym procesie.



Ryc.V.19. Wpływ inkubacji z SB-3CT (selektywnym inhibitorem MMP-2 i MMP-9) na przepuszczalność monowarstw komórek RBE-4 dla FITC-Dekstranu (40 kDa) w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po 24 godz. inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”). SB-3CT był dodawany do hodowli w tym samym czasie co amoniak. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 - 4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola , † $p < 0,05$ vs Amoniak.

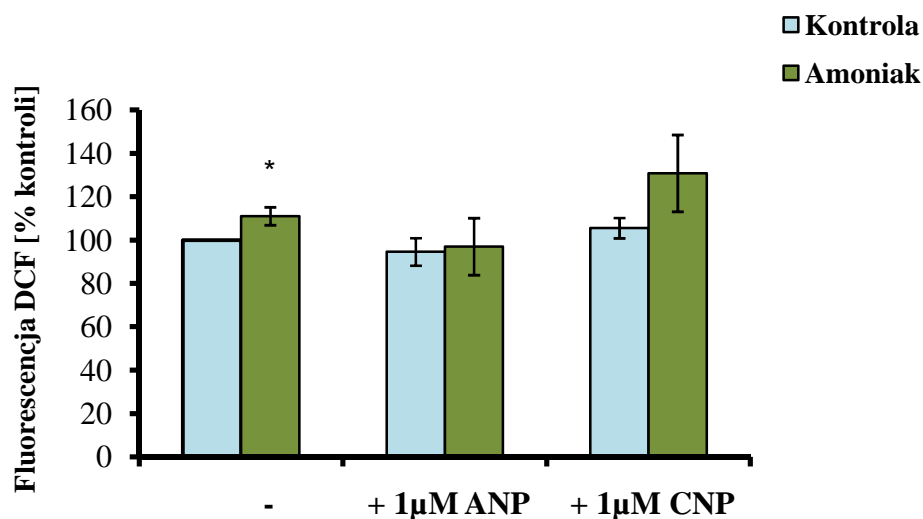
V.2.6. Modulacja stresu oksydacyjno-nitracyjnego wywołanego amoniakiem przez czynniki egzogenne

Peptydy natriuretyczne

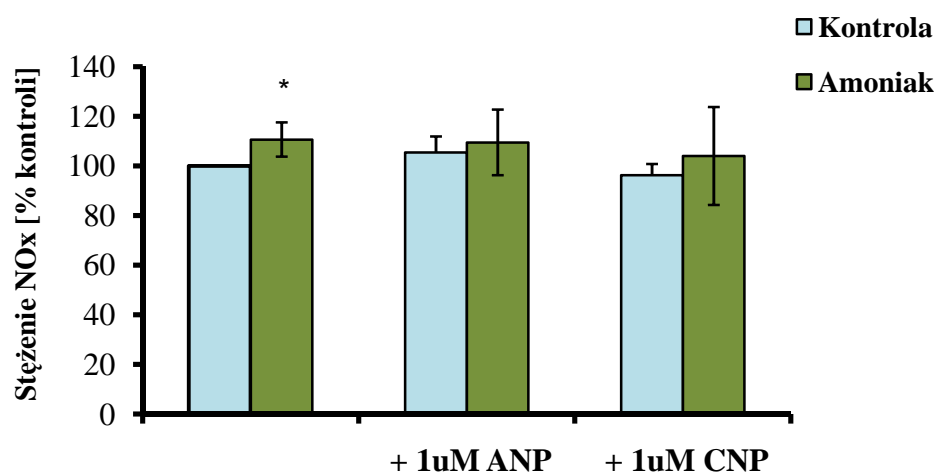
Dodanie ANP lub CNP w stęż. 10^{-6} M nie wpływało na gromadzenie się zarówno ROS (Ryc. V.20A), jak i NOx (Ryc. V.20B), ani w komórkach kontrolnych ani też w komórkach traktowanych amoniakiem. Peptydy natriuretyczne nie wykazywały właściwości

antyoksydacyjnych w komórkach RBE-4, w odróżnieniu od efektów jakie wywoływały w przypadku astrocytów traktowanych amoniakiem.

A



B

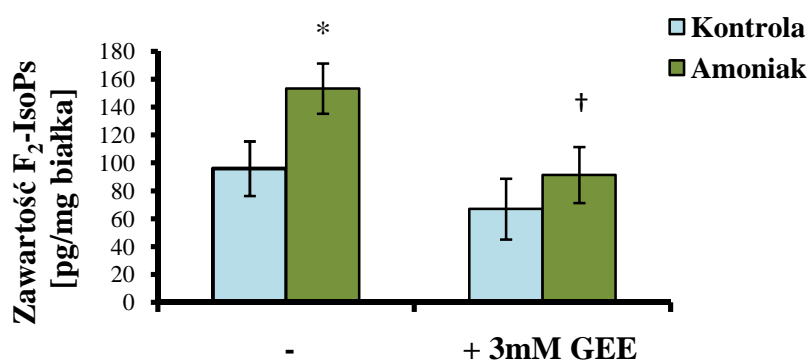


Ryc.V.20. Wpływ ANP i CNP na produkcję ROS w komórkach RBE-4 (A) i na zawartość azotanów/azotynów (NOx) w pożywkach hodowlanych komórek RBE-4 (B) w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po inkubacji z 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”) przez 24 godz. Peptydy natriuretyczne dodawano na 15 minut przed dodaniem amoniaku. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola.

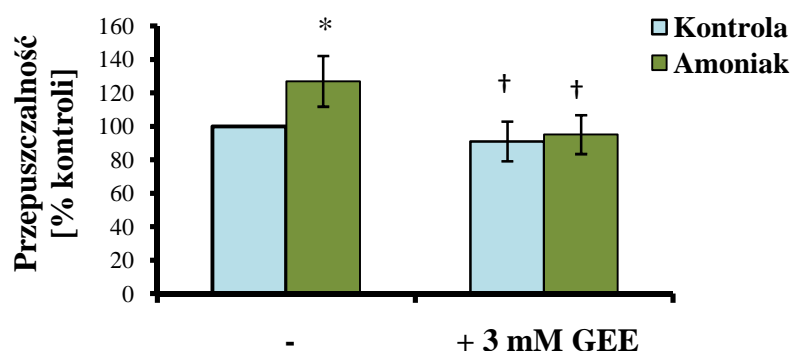
Ester dietylowy glutationu (ang. diethyl ester of glutathione, GEE)

GEE dodawany do hodowli RBE-4 w stężeniu 3mM na 24 godziny hamował produkcję F₂-IsoPs wywołaną amoniakiem, co wskazuje na to, iż zapobiegał indukcji stresu oksydacyjno–nitracyjnego w tych komórkach (Ryc.V.21A). Jednocześnie, GEE w tych samych warunkach doświadczalnych hamował zwiększoną pod wpływem amoniaku przepuszczalność pojedynczych warstw RBE-4 (Ryc.V.21B). Można sądzić, że oba korzystne efekty działania GEE były ze sobą związane przyczynowo (por. Dyskusja).

A



B

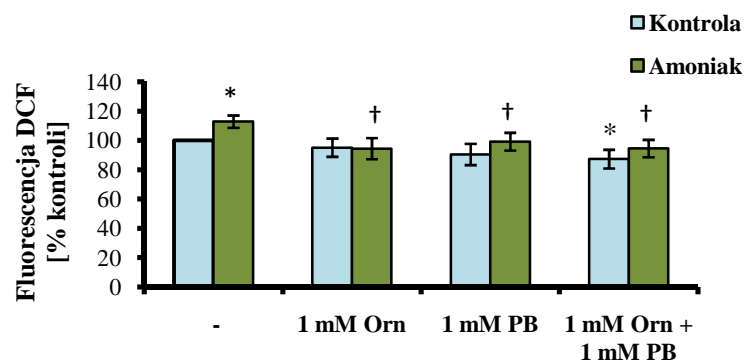


Ryc.V.21. Wpływ inkubacji z estrem dietylowego glutationu (GEE) na produkcję F₂-IsoPs w komórkach RBE-4 (A) i ich przepuszczalność (B) w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po traktowaniu 5mM chlorkiem amonu („Amoniak”) przez 24 godz. GEE dodawano do hodowli w tym samym czasie co amoniak. Wyniki są średnią (\pm SD) z 6-10 (A) lub 5-6 (B) niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, † $p < 0,05$ vs Amoniak.

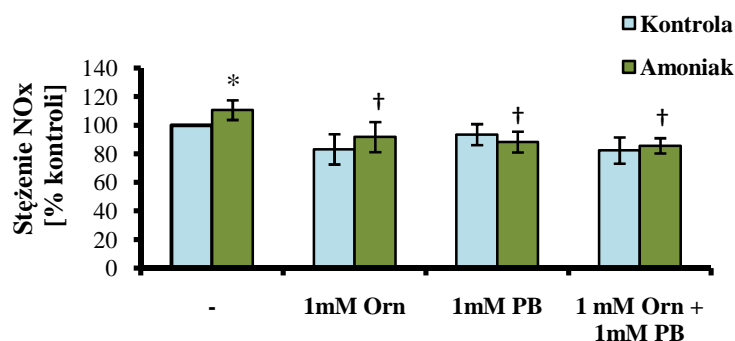
Fenylomaślan ornityny

Dodanie L-ornityny i/lub fenylomaślanu w stężeniu 1mM na 24 godziny do hodowli komórek RBE4 skutkowało zahamowaniem produkcji ROS w komórkach traktowanych amoniakiem. Natomiast w komórkach kontrolnych wytwarzanie ROS było obniżone o ok. 13% jedynie w przypadku gdy obie substancje były dodawane jednocześnie, jako koniugat (Ryc. V.22A). Ponadto, Orn i PB dodawane razem lub osobno obniżały generację NOx i F₂-IsoPs, ale tylko w komórkach poddawanych działaniu amoniaku. W komórkach nie traktowanych amoniakiem oba te parametry nie zmieniały się w żadnym z powyższych układów doświadczalnych (Ryc. V.22 B, C).

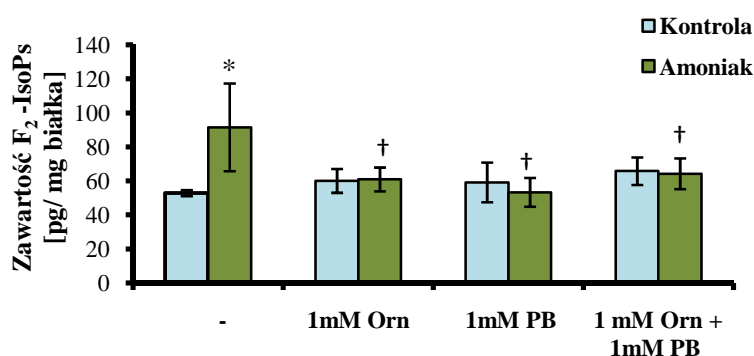
A



B



C



Ryc.V.22. Wpływ inkubacji z L-ornityną (Orn) i/lub fenylomaślanem (ang. *phenylbutyrate*, PB) na produkcję ROS (A), azotanów/azotynów (NOx) (B) i F₂-IsoPs (C) w hodowlach komórek RBE-4 w warunkach kontrolnych („Kontrola”) oraz po traktowaniu 5mM chlorkiem amoniaku („Amoniak”) przez 24 godz. Orn i PB dodawano do hodowli w tym samym czasie co amoniak. Wyniki są średnią (\pm SD) z 5(A), 4(B) i 5-7(C) niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, † $p < 0,05$ vs Amoniak.

VI. DYSKUSJA

Stres oksydacyjno–nitracyjny wynikający z nadmiernego gromadzenia się wolnych rodników tlenowych (ROS) i azotowych (RNS) jest jednym z kluczowych mechanizmów przy udziale których, amoniak gromadzący się w mózgu podczas EW upośledza funkcje i metabolizm astrocytów, prowadząc do ich obrzmienia, a w następstwie do obrzęku mózgu (Blei 2008, Häussinger i Görg , 2010). Wcześniejsze badania wykazały, że indukcji ROS/RNS przez amoniak w astrocytach i jej patofizjologicznym konsekwencjom można zapobiec stosując antyoksydanty (Murthy i wsp., 2001; Jayakumar i wsp., 2006), inhibitory syntezy tlenku azotu (Schliess 2002, Zielińska i wsp., 2003) lub hamując syntezę i transport mitochondrialny glutaminy, która pośredniczy w indukcji stresu na poziomie mitochondriów (Pichili i wsp., 2007; Rama Rao i wsp. 2010 i referencje zawarte tej pracy). Wcześniejsze dane wskazywały, że NPs są związkami o potencjale antyoksydacyjnym w tkankach wątroby oraz układu sercowo- naczyniowego, a potencjał ten ujawniał się w warunkach stresu wywołanego przez różne czynniki patogenne (De Vito i wsp., 2010). W niniejszej pracy dowiedziono, że NPs przeciwdziałają nadmiernej produkcji ROS/RNS w astrocytach traktowanych amoniakiem.

Wyniki badań zawarte w rozprawie wykazują, że oba peptydy natriuretyczne ANP i CNP znacząco redukują akumulację ROS w komórkach astrocytów. Co najbardziej interesujące, nagromadzenie się ROS było także hamowane przez analog ANP, peptyd cANP₍₄₋₂₃₎, który jest specyficznym agonistą receptora NPR-C. Doświadczenia przeprowadzane na tkankach obwodowych i neuroendokrynych ujawniły, że sygnał indukowany przez pobudzenie NPR-C przekazywany jest do komórek za pośrednictwem białek G_i, angażując hamowanie aktywności cykazy adenylowej przez G_{io}, bądź stymulację fosfolipazy C (PLC) przez G_{iβγ} (Rose i Giles, 2008).

Wywołany cANP₍₄₋₂₃₎ spadek poziomu cAMP dowodzi obecności funkcjonalnych receptorów NPR-C na astrocytach, zdolnych do indukcji związanej z NPR-C ścieżki sygnałowej: G_{1α} – cyklaza adenylova. Natomiast amoniak powodował nagromadzenie się wewnątrzkomórkowego cAMP w tych komórkach. Ta obserwacja wydaje się być zgodna z wcześniejszym spostrzeżeniem, iż amoniak zwiększa syntezę cAMP w komórkach glejowych, na drodze związanej z innymi mechanizmami sygnalizacyjnymi (Faff i wsp., 1996). Wzrost poziomu cAMP pod wpływem amoniaku był na tyle znaczący, że aktywacja białek G_{1α} wpływała jedynie w niewielkim stopniu na jego obniżenie. Wywołany przez dodanie cANP₍₄₋₂₃₎ spadek ekspresji białka G_{1α} w astrocytach przypomina efekt opisywany przez Saha i wsp. (2008) w komórkach mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMC) i może być rozpatrywany, jako efekt odwrażliwienia na ligand, a tym samym, jako dowód na obecność funkcjonalnych receptorów w tych komórkach. W VSMC pochodzących od szczurów z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym aktywacja NPR-C obniżała aktywność NADPH oksydazy i produkcję anionorodnika nadtlenowego [O_2^-], równocześnie obniżając ekspresję białka G_{1α} (Saha i wsp., 2008). W niniejszej pracy zarówno cANP₍₄₋₂₃₎, jak i natywny peptyd ANP, obniżały nadprodukcję [O_2^-] wywołaną amoniakiem. Fakt, że zablokowanie białek G_{1α} poprzez dodanie przeciwciała anti-G_{1α} obniżyło zdolność cANP₍₄₋₂₃₎ do hamowania produkcji [O_2^-] wywołanej amoniakiem (Ryc.V.6), sugeruje bezpośredni udział ścieżki: NADPH oksydaza – białka G_{1α} w tym procesie. Modulacja aktywności NADPH oksydazy przez białka G_{1α} nie jest związana ze zmianami w ich ekspresji ponieważ:

- i) redukcja ekspresji G_{1α} wywołana cANP₍₄₋₂₃₎ w komórkach pochodzących od szczurów kontrolnych nie skutkowała obniżeniem gromadzenia [O_2^-] i ii) w odróżnieniu od efektów zaobserwowanych na VSMC pochodzących od szczurów z nadciśnieniem, w astrocytach traktowanych amoniakiem ekspresja białek G_{1α} nie była podwyższona. Najwidoczniej, mimo iż amoniak redukuje ilość tego białka, jest go nadal wystarczająco dużo by efektywnie

przekazywać sygnał w odpowiedzi na stymulację receptora peptydami cANP₍₄₋₂₃₎ i ANP. Z teoretycznego punktu widzenia amoniak może podnosić produkcję [O_2^-] w astrocytach także na drodze innych mechanizmów, niezwiązanych z aktywnością NADPH oksydazy, np.: enzymatycznego utleniania ksantyny lub nieenzymatycznej reakcji przenoszenia elektronów w łańcuchu oddechowym poprzez ubichinon (koenzym Q10) (Dröge, 2002). Jak dotąd, alternatywne szlaki generowania [O_2^-] przez amoniak w astrocytach nie były badane. Ze względu na fakt, iż ROS obecne w komórkach kontrolnych są zaangażowane w fizjologiczną kontrolę metabolizmu i funkcji komórek (referencje w Dröge, 2002), zaobserwowany wpływ cANP₍₄₋₂₃₎ w postaci obniżenia ich poziomu w komórkach astrocytów nietraktowanych amoniakiem może mieć znaczenie regulacyjne. ROS wykrywane przy użyciu sondy H₂DCFDA w astrocytach kontrolnych reprezentowane są najprawdopodobniej przez tlen singletowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy lub nadtlenowy (Dröge, 2002).

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami (Schliess, 2002) amoniak zwiększał syntezę tlenu azotu w astrocytach. Efektem powstałego stresu nitracyjnego może być nitracja reszt tyrozynowych w poszczególnych białkach, która zmieniając ich właściwą funkcję, może mieć znaczenie w patogenezie EW, np. nitracja GS w astrocytach poddanych przedłużonej hiperamonemii powoduje upośledzenie funkcji detoksykacyjnych astrocytów. Udział różnych form syntaz tlenu azotu w generowanej amoniakiem nadprodukcji NO był i nadal pozostaje źródłem kontrowersji w literaturze. Schliess i wsp. (2002) stwierdzili zwiększoną ekspresję iNOS w hodowlach astrocytów traktowanych amoniakiem. Z kolei badania przeprowadzone na zwierzęcych modelach hiperamonemii i EW niezmiennie wskazują na zwiększoną ekspresję eNOS zarówno na poziomie mRNA (Hernandez i wsp., 2004; Sawara i wsp., 2009), jak i białka (Blei, 2005) w różnych obszarach mózgu. Ponadto, warto też nadmienić, iż cofnięciu się symptomów EW towarzyszył spadek ekspresji mRNA genu kodującego eNOS do poziomu notowanego u zwierząt zdrowych (Sawara i wsp., 2009). Badania zawarte w

niniejszej pracy potwierdzają dane uzyskane w modelach *in vivo*. Wzrost produkcji NO_x w astrocytach traktowanych amoniakiem przez 24 godz.: (i) był związany ze wzrostem ekspresji eNOS (Ryc.V.8B), (ii) nie był obserwowany, gdy konstytutywne formy NOS (eNOS+nNOS) wybiórczo zablokowano L- N^G- nitroargininą (Ryc.V.8A). Wzrost całkowitej aktywności NOS pod wpływem amoniaku (Ryc.V.9), świadczyć może o modyfikacji enzymu także na poziomie post translacyjnym. Peptyd cANP₍₄₋₂₃₎ również podnosił aktywność NOS.

Obserwacja, że stymulacja receptora NPR-C podwyższa aktywność NOS bez wpływu na jego ekspresję, jest analogiczna do tego, co zostało pokazane w tkance wchodzącej w skład układu sercowo–naczyniowego poddanej działaniu ANP (Elesgaray i wsp., 2008; William i wsp., 2008; Costa i wsp., 2010). Mechanizm aktywacji eNOS poprzez stymulację NPR-C oraz udział pozostałych typów izoform NOS w tym procesie pozostają niejasne i wymagają dalszych badań. Należy podkreślić, iż doniesienia dotyczące mechanizmu antyoksydacyjnego działania ANP w hepatocytach (Pella, 1991; Kierner and Vollmar, 1998; Carini i wsp., 2003) wyraźnie wskazują na udział receptora NPR-A w tym procesie. Co szczególnie interesujące, wzrost poziomu markerów produkcji NO pod wpływem amoniaku lub cANP₍₄₋₂₃₎ nie wiązał się ze wzrostem produkcji cGMP. W odniesieniu do amoniaku brak tego wzrostu można tłumaczyć faktem, iż powoduje on obniżenie ekspresji rozpuszczalnej formy cyklazy guanylowej (sGC) w astrocytach (Konopacka i wsp., 2006). W przyszłych badaniach warto będzie również przetestować hipotezę, że cGMP syntetyzowany w nadmiarze wskutek zwiększonego gromadzenia się NO, ulega zwiększonej degradacji przez zaktywowane specyficzne dla cGMP fosfodiesterazy. Istnienie takiego dodatniego sprzężenia wykazano w traktowanych amoniakiem neuronach (Monfort i wsp., 2004). W przypadku ANP, nagromadzenie cGMP wynikało z bezpośredniej aktywacji receptora NPR-A, który posiada aktywność cyklazy guanylowej i jest obecny na błonach komórkowych astrocytów (Sumners i Tang, 1992; Konopacka i wsp., 2006).

Obniżenie przez cANP₍₄₋₂₃₎ nadprodukcji NO wywołanej amoniakiem wskazuje, że specyficzna stymulacja receptora NPR-C może być efektywna w zapobieganiu stresowi nitracijnemu w astrocytach w warunkach hiperamonemii. Jednakże, mechanizm leżący u podstaw tego efektu jest nieznan. W makrofagach, NPs destabilizują mRNA genu kodującego iNOS (Kierner i Vollmar 1998, 2001) i/ lub obniżają indukowaną lipopolisacharydem ekspresję białka transportującego argininę, transporter CAT-2B (Kierner i Vollard, 2001). Powyższe mechanizmy raczej nie odnoszą się do efektów wywoływanych przez NPs w astrocytach traktowanych amoniakiem, ponieważ (i) w odróżnieniu od doniesień Schliess'a i wsp. (2002) wyniki niniejszej pracy nie wskazują na udział iNOS w generowaniu wywołanej amoniakiem nadprodukcji NO, (ii) efekty obserwowane w makrofagach były zależne od cGMP, co raczej implikuje udział receptora NPR-A, niż NPR-C. W szczególności drugi punkt jest niespójny, gdyż uzyskane wyniki wskazują na brak hamującego efektu ANP w stosunku do produkcji NO w astrocytach traktowanych amoniakiem, mimo że ANP współdziałając z NPR-A powoduje wzrost poziomu cGMP. Niewątpliwie, ustalenie roli poszczególnych izoform NOS w wywołanej amoniakiem generacji NO i ich udziału w mechanizmie, za pomocą którego aktywacja NPR-C redukuje tę odpowiedź, wymagać będzie dalszych badań.

Wiadomo, iż aktywacja NPR-C uruchamia także ścieżkę sygnałową fosfolipaza C δ (PLC δ)- kinaza białkowa C (PKC), co skutkuje fosforylacją MAPK p38 (Rose i Giles, 2008). W niniejszej pracy ścieżka ta nie była badana, a jej obecność w astrocytach jak dotąd nie została potwierdzona. Jednakże, nawet jeśli jest ona obecna w astrocytach, jej zaangażowanie w antyoksydacyjne efekty NPs w astrocytach jest raczej mało prawdopodobne. Z różnych doniesień wiadomo, iż aktywacja MAPK pośredniczy w wywoływaniu szkodliwych efektów ROS w hodowlach astrocytów *in vitro*, traktowanych amoniakiem (Jayakumar i wsp., 2006) lub menadionem (Zhu i wsp., 2009).

Obrzmienie astrocytów spowodowane nadmierną akumulacją amoniaku w OUN uważane jest za przyczynę obrzęku mózgu w następstwie ostrej EW (Norenberg, 1977; Kato i wsp., 1992; Haussinger, 2006; Blei, 2008). Świadczą o tym wyniki badań na poddanych działaniu jonów amonowych skrawkach mózgowych (Zielińska i wsp., 2003) i hodowlach pierwotnych astrocytów (Rama Rao i wsp., 2003), oraz na próbkach mózgu pochodzących od zwierząt z doświadczalnie wywołaną EW (Norenberg, 1977; Blei i wsp., 1994) lub chorych zmarłych wskutek zaostrzenia EW (Kato i wsp., 1992). Wiele danych wskazuje, że obrzmienie astrocytów indukowane przez amoniak jest skutkiem akumulacji toksycznych rodników azotowych i tlenowych w wyniku aktywacji receptorów NMDA (Kosenko i wsp., 1999, Schliess i wsp., 2002), aktywacji NADPH oksydazy (Reinehr i wsp., 2007), czy też nadmiernego gromadzenia się Gln (Hilgier i Olson, 1994; Jayakumar i wsp., 2006). Obserwacja, iż aktywacja NPR-C obniża wzrost ROS i RNS w astrocytach traktowanych amoniakiem (m.in. poprzez hamowanie aktywności NADPH oksydazy), pozwoliła przypuszczać, iż agonista NPR-C, cANP₍₄₋₂₃₎, może w tych warunkach zapobiegać obrzmieniu astrocytów. W niniejszej rozprawie hipotezę tę sprawdzano badając objętość astrocytów za pomocą komputerowej analizy obrazu z mikroskopu konfokalnego (Konopacka i wsp., 2009). Fakt, że peptyd cANP₍₄₋₂₃₎ zapobiegał wywołanemu amoniakiem obrzmieniu astrocytów (Ryc.V.10) potwierdził te hipotezę. Wynika stąd, że antyoksydacyjny efekt aktywacji NPR-C przekłada się na działanie ochronne na poziomie komórki. Wynik sugeruje możliwość przyszłego wykorzystania analogów receptora NPR-C w zapobieganiu hiperamonemicznemu obrzękowi mózgu i innym patofizjologicznym skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego przez amoniak.

W drugiej części pracy testowano hipotezę, że w warunkach ostrej niewydolności wątroby amoniak zaburza przepuszczalność BBB i że zjawisko to może mieć związek z

generowaniem ONS w komórkach śródbłonna naczyń mózgu. Komórki RBE-4 traktowano 5 mM chlorkiem amonu. Stężenia tego rzędu są rutynowo stosowane w badaniach nad toksycznością amoniaku w skrawkach mózgu *ex vivo* i w hodowlach astrocytów *in vitro*, bowiem odzwierciedlają dość wiernie warunki podwyższonego poziomu amoniaku w tkankach mózgu, występujące w doświadczalnie wywołanej hiperamonemii prostej lub powstałe w następstwie uszkodzenia wątroby (por. rozdz. II.2.1, najnowsze odnośniki zawarte w pracach: Sinke i wsp., 2008; Häussinger i Görg, 2010; Skowrońska i wsp., 2010). Amoniak w tym stężeniu powodował wzrost produkcji ROS, NO (Ryc.V.11), a także markera utleniania lipidów, F₂-IsoPs w komórkach RBE-4 (Ryc.V.12). Efekty te były analogiczne do skutków wywoływanych przez amoniak w astrocytach (Norenberg i wsp., 2009) i neuronach (Klejman i wsp., 2005), oraz przez jony manganu w astrocytach (Milatovic i wsp., 2009). We wcześniejszych badaniach zwiększone nagromadzenie się markerów stresu oksydacyjnego w komórkach RBE-4 obserwowano po ich potraktowaniu menadionem (Lagrange i wsp., 1999).

W przedstawionej pracy markery stresu oksydacyjnego oznaczano przy zastosowaniu sondy fluorescencyjnej H₂DCFDA. Sonda ta znakuje nieswoiście całkowitą pulę ROS; względna proporcja różnych rodzajów ROS i RNS produkowanych pod wpływem amoniaku w tych komórkach będzie musiała zostać określona w przyszłych doświadczeniach. Z badań nad astrocytami i neuronami wiadomo, iż amoniak generuje produkcję szerokiego spektrum reaktywnych czynników, które w zależności od stopnia swej reaktywności posiadają zróżnicowany potencjał do uszkodzania komórki (Norenberg i wsp., 2009).

Wewnątrzkomórkowa kumulacja RNS w odpowiedzi na amoniak jest najprawdopodobniej nasiloną poprzez podwyższoną ekspresję transportera y⁺LAT2 (Ryc.V.14), który dostarcza komórkom substrat do syntezy NO, Argininę (Broër i wsp., 2000). Ostatnie doniesienia pokazują iż ekspresja y⁺LAT2 była podwyższona również w mózgach szczurów z wywołaną hiperamonemią (Zielińska i wsp., 2011).

Zależność pomiędzy ONS a aktywacją MMPs była wielokrotnie pokazywana w OUN i w tkankach obwodowych (Lehner i wsp., 2011). Wyniki zawarte w rozprawie sugerują, iż ROS i RNS produkowane pod wpływem amoniaku także stymulują zewnątrzkomórkową aktywność MMPs wytwarzanych przez komórki śródbłonna mikronaczyń mózgu. Mimo, iż mechanizm procesu tej aktywacji jest nie do końca poznany i wymaga dalszych badań, możemy spekulować, iż prawdopodobnie jest on analogiczny do mechanizmów zachodzących w innych komórkach OUN gdzie (i) nitrozyłacja (Gu i wsp., 2002) lub oksydacja (Meli i wsp., 2003) bezpośrednio aktywują proenzymy MMPs i/lub (ii) wzrost ekspresji MMPs następuje w odpowiedzi na stan zapalny (Huang i wsp., 2001). Nadmiar amoniaku powoduje nitrację i nitrozyłację reszt tyrozynowych i serynowych różnych białek w OUN (Häussinger i wsp., 2005), można zatem sądzić, że identyczna sekwencja zdarzeń ma miejsce w poddanych działaniu amoniaku komórkach śródbłonna naczyń. Natomiast reakcja prozapalna w odpowiedzi na amoniak, w którą zaangażowana jest aktywacja komórek mikrogleju, została niedawno opisana w tkankach mózgu szczurów z hiperamonemią (Rodrigo i wsp., 2010) oraz *post mortem* u pacjentów z EW (Zemstova i wsp., 2011). Ustalenie, czy podobna reakcja leży u podstaw aktywacji MMPs w komórkach śródbłonna naczyń mózgu, wydaje się być atrakcyjnym celem dalszych badań.

Najnowsze badania na modelach EW *in vivo* wykazały, że zwiększona przepuszczalność BBB ma związek z degradacją białek tworzących TJ, spowodowaną przez zaktywowaną MMP-9 (Nguyen i wsp., 2006; Yamamoto i Nguyen, 2006; Chen i wsp., 2009). W pracach tych, rolę MMPs określono na podstawie: (i) zwiększonej zawartości MMPs w surowicy zwierząt z EW, (ii) faktu, iż inhibitor MMP hamował wzrost przepuszczalności BBB u tych zwierząt. Nie określano jednak, które komórki są źródłem nadmiaru tych enzymów, podejrzewając ich nadmierne uwalnianie z tkanek obwodowych, przede wszystkim z wątroby (Nguyen i wsp., 2006). W niniejszej pracy pokazano, że MMPs czynnie

zaangażowane w obniżenie ścisłości BBB mogą być również pochodzenia śródbłonkowego (Ryc.V.18). Zadaniem badawczym na przyszłość pozostaje identyfikacja bezpośredniego „celu” ich aktywności, tj. konkretnego białka połączeń ścisłych. W pracy Chen’a i wsp. (2009), EW związana była z degradacją białek okludyny i kładyny-5. Z kolei, w komórkach linii śródbłonka naczyń mózgu (TM-BBB) amoniak obniżał ekspresję innego rodzaju kładyny, tj. kładyny -12 (Belanger i wsp., 2007).

Wyniki doświadczeń należy interpretować z zastrzeżeniem, iż komórki RBE-4 nie są natywnymi komórkami śródbłonka, a wyciągnięte z badań wnioski będą musiały ulec weryfikacji w układach doświadczalnych *in vivo* i *ex vivo*. Należy jednak podkreślić, że komórki RBE-4 zachowują najważniejsze elementy fenotypu natywnych komórek śródbłonka naczyń mózgowych, a ich skład biochemiczny powiela najważniejsze cechy tych komórek, w tym obecność TJ oraz połączeń adhezyjnych (ang. *adherence junctions*) (Balbuena i wsp., 2011). W obecnej pracy pokazano, iż amoniak zaburza przepuszczalność pojedynczych warstw komórek, co zostało zmierzone przy użyciu Dekstranu (40kDa), znakowanego FITC (Ryc.V.15). Wcześniej udokumentowano zwiększoną przepuszczalność komórek RBE-4 dla sacharozy w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego menadionem (Lagrange i wsp., 1999), ale nie badano mechanizmu tego zjawiska. Wyniki niniejszej pracy dokumentują po raz pierwszy zaangażowanie w ten proces aktywacji MMPs; koronnym argumentem wspierającym tę tezę było wykazanie, że przepuszczalność komórek spadła w obecności wybiórczego inhibitora MMP-9 i MMP-2 (Ryc.V.19). Lagrange i wsp. (1999) przypuszczali, iż wapń może być jednym z czynników biorących udział w wywołanej stresem oksydacyjnym przepuszczalności pojedynczych warstw komórek śródbłonka, a praca Konopackiej i wsp. (2008) w której autorzy pokazali przejściowy wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia w komórkach RBE-4 traktowanych amoniakiem, po części potwierdza to założenie. Nasuwające się tu pytanie co do zależności pomiędzy akumulacją wewnątrzkomórkowego

wapnia a aktywacją MMPs jak na razie pozostaje bez odpowiedzi; badania na innych tkankach i dotyczące innych stanów patologicznych dawały niejednoznaczne rezultaty. Z jednej strony, wzrost poziomu wapnia aktywował MMPs i wzmacniał zależną od MMPs migrację komórek linii nowotworowej SCC25 (Munshi i wsp., 2002), z drugiej strony kofeina hamowała inwazyjność ludzkich komórek białaczki U937, obniżając ekspresję mRNA i białka MMP-9 i MMP-2, poprzez sygnalizację wywołaną wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia (Liu i Chang, 2010).

Obniżenie poziomu proliferacji komórek RBE-4 (Ryc.V.16) było kolejną zaobserwowaną anomalią związaną z działaniem amoniaku. Mimo iż, mechanizm tego zjawiska jest nieznan, warto zauważyć, że obniżenie proliferacji ludzkich komórek śródbłonna mikronaczyń mózgu pod wpływem wolnych kwasów tłuszczowych miało związek ze stresem oksydacyjnym oraz spadkiem błonowego potencjału mitochondrialnego (Zhou i wsp., 2009).

Możliwości przeciwdziałania ONS wywołanemu przez amoniak w komórkach RBE-4 przeanalizowano stosując związki działające na różne miejsca uchwytu w komórce. CNP, który zapobiegał powstawaniu ONS w astrocytach traktowanych amoniakiem poprzez interakcję z receptorem NPR-C (Skowrońska i wsp., 2010), w komórkach RBE-4 okazał się być nieefektywny. W przyszłości należałoby sprawdzić, czy brak efektu jest związany z brakiem receptora NPR-C na tych komórkach, czy też z brakiem któregoś z wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników pośredniczących w przekazywaniu sygnału z NPR-C. Wiadomo, iż niektóre białka powszechnie obecne w natywnych komórkach śródbłonna, mają zmienioną ekspresję lub wcale nie są wytwarzane w linii RBE-4 (Sporbert i wsp., 1999). GEE, efektywniej przechodzący przez błony komórkowe analog glutationu, zapobiegał utracie żywotności i obniżeniu zawartości GSH w hodowli neuronów (Klejman i wsp., 2005). W obecnej pracy wykazano potencjał GEE do przeciwdziałania: (i)

nadmiernemu nagromadzeniu się F₂-IsoPs, które jest markerem stresu oksydacyjnego świadczącym o uszkodzeniu błony komórkowej (Ryc.V.21A) oraz (ii) zwiększonej przepuszczalności będącej funkcjonalną konsekwencją tego uszkodzenia (Ryc.V.21B). Co ciekawe, traktowanie komórek RBE-4 amoniakiem wywołało wzrost syntezy glutationu (Ryc.V.13), analogicznie do efektu obserwowanego w astrocytach i w mózgu *in situ* po podaniu amoniaku bezpośrednio przez sondę mikrodielizacyjną (Hilgier i wsp., 2010). Zaobserwowany wzrost syntezy stanowi przejaw reakcji autoprotekcyjnej, która jednak okazała się być niewystarczająca, aby zapobiec patofizjologicznym skutkom działania amoniaku na komórki.

Zaobserwowane w pracy antyoksydacyjne właściwości fenylomaślanu i ornityny są zgodne z wynikami uzyskanymi w innych tkankach, w których badano odpowiedź na bodźce inne niż amoniak. Wcześniejsze badania wykazały, iż niektóre z cytoprotekcyjnych produktów pośrednich, których synteza jest indukowana przez fenylomaślan (MnSOD, GSTM3, białko DJ-1) łagodziły skutki stresu oksydacyjnego w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona (Zhou i wsp., 2011) i stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) (Petri i wsp., 2006).

Obniżenie produkcji NO przez ornitynę można tłumaczyć jej zdolnością do hamowania wychwytu oraz stymulacji wyrzutu prekursora NO, argininy przez komórki śródbłonna (Kakoki i wsp., 2006). Dodatkowo, Orn może zaburzać wiązanie i magazynowanie wewnątrzkomórkowej puli argininy (Kakoki i wsp., 2006). Efekty te mogą się przejawiać nie tylko na BBB, ale także w komórkach w obrębie OUN i ulegać pogłębieniu w warunkach EW, poprzez wzrost transportu Orn przez BBB (Albrecht i wsp., 1994). Koniugat fenylomaślanu i ornityny, OP, to nowo wynaleziony lek, który służy do usuwania nadmiaru amoniaku i glutaminy z tkanek obwodowych zwierząt z hiperamonemią i EW, na zasadzie mechanizmu nie mającego nic wspólnego ze stresem oksydacyjno-nitracyjnym. Orn

jest prekursorem Glu, który „wyłapuje” jony amonowe na obwodzie, tworząc glutaminę, zaś fenylomaślan ulega przemianie do metabolicznie czynnego fenylooctanu, który następnie wiąże się z glutaminą, tworząc fenyloacetyloglutaminę, nośnik umożliwiający wydalanie nadmiaru azotu wraz z moczem (Davies i wsp., 2009). Wyniki niniejszej rozprawy wskazują, iż każdy ze składników koniugatu, działając niezależnie, chroni komórki tworzące BBB, hamując biochemiczne wykładniki stresu oksydacyjnego. Jest to przykład korzystnego działania ubocznego: ten sam lek łagodzi skutki tego samego schorzenia w dwóch różnych punktach na bazie odrębnych mechanizmów.

W sumie, wyniki prezentowane w niniejszej pracy są spójne z hipotezą, iż w warunkach ostrej niewydolności wątroby, amoniak zaburza przepuszczalność BBB poprzez wywoływanie ONS bezpośrednio w komórkach śródbłonna naczyń mózgu, co prowadzi do aktywacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i do zwiększonego transportu biernego różnych substancji przez TJ. Wykazano jednocześnie, że zmiany te można przynajmniej częściowo odwrócić stosując szereg stosunkowo prostych interwencji farmakologicznych. Być może, niektóre z zastosowanych prób zapobiegania skutkom stresu amoniakalnego na poziomie naczyń mózgowych znajdą w przyszłości zastosowanie w terapii.

Niewykluczone, że zmiany zachodzące w wypustkach astrocytów mogą wtórnie prowadzić do zmian przepuszczalności bariery o charakterze naczyniopochodnym odzwierciedlając wpływ upośledzenia metabolizmu komórek astrogleju na funkcje komórek śródbłonna naczyń. Takich badań w odniesieniu do encefalopatii hiperamonemicznej jak dotąd nie prowadzono, a sekwencja zdarzeń ujawniona w modelach doświadczalnych wskazuje, że obrzęk cytotoksyczny jest wtórny do naczyniowego. Z przyczyn oczywistych, badania przeprowadzone na linii komórek śródbłonna naczyń nie mogą odnieść się do tej kwestii. Dalsze próby będą się musiały oprzeć na użyciu bardziej skomplikowanych układów doświadczalnych, odtwarzających wzajemne relacje astrocyt - śródbłonek.

VII. WNIOSKI

Wyniki pracy potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że amoniak wywołuje stres oksydacyjno-nitracyjny w astrocytach hodowanych *in vitro* oraz dowiodły, że stres taki występuje również w traktowanych amoniakiem hodowlach komórek śródbłonna naczyń mózgowych (RBE-4). W obu typach komórek udało się zmniejszyć przejawy biochemiczne i skutki patofizjologiczne stresu przy użyciu różnych czynników protekcyjnych. Częściowa asymetria rozpatrywanych zjawisk skłania do oddzielnego przedstawienia wniosków dotyczących każdego z tych typów komórek:

Astrocyty

1. Akumulacja ROS i RNS pod wpływem amoniaku ulega obniżeniu w wyniku preinkubacji komórek z peptydami natriuretycznymi (ANP i CNP), co wskazuje na możliwość cytoprotekcyjnego działania tych peptydów. Fakt, że stymulacja NPR-C odwraca również wywołany amoniakiem wzrost objętości astrocytów, dokumentuje wymierny efekt protekcyjny na poziomie komórki jako całości.
2. Ochronne efekty peptydów natriuretycznych są związane z aktywacją NPR-C, gdyż udało się je odtworzyć przy użyciu wybiórczego agonisty NPR-C, peptydu cANP₍₄₋₂₃₎.
3. Efekty wywoływane przez cANP₍₄₋₂₃₎ na poziomie wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału tj.: spadek poziomu cAMP i spadek ekspresji białka G_{iα} oraz obserwacja, iż generacja [O₂⁻] w obecności przeciwciała przeciwko białku G_{iα} nie była hamowana przez cANP₍₄₋₂₃₎, świadczą o obecności funkcjonalnego NPR-C w komórkach astrocytów.

Komórki śródbłónka naczyń (RBE-4)

1. Podobnie jak w astrocytach, amoniak powoduje w komórkach śródbłónka mikronaczyń gromadzenie się ROS, NO, produktów peroksydacji lipidów (F₂-isoprostanów) oraz wzrost syntezy glutationu, stanowiący typową odpowiedź na stres oksydacyjny. Skutek biologiczny tej odpowiedzi wyrażał się poprzez wzrost przepuszczalności pojedynczych warstw komórek dla Dekstranu skojarzony ze wzrostem aktywności metaloproteinaz zewnątrzkomórkowych (MMP-9 i MMP-2), bowiem dodanie specyficznego inhibitora tych MMPs cofało wzrost przepuszczalności.
2. W sumie, wyniki te odtwarzają sekwencję zdarzeń leżących u podstaw wzrostu przepuszczalności BBB i są zgodne z najnowszymi poglądami implikującymi istnienie naczyniopochodnego składnika obrzęku mózgu w EW.
3. Inkubacja w środowisku wzbogaconym o dodatkową pulę czynnika przeciwutleniającego (estru etylowego glutationu) częściowo zapobiegała wzrostowi przepuszczalności pod wpływem amoniaku, co dodatkowo świadczy o tym, że akumulacja ROS jest jedną z przyczyn upośledzenia przepuszczalności.
4. Fenylomaślan ornityny (OP), lek przeciwdziałający gromadzeniu się amoniaku na drodze metabolicznej, zapobiegał bezpośrednio stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez amoniak w komórkach śródbłónka. Wynik wskazuje, że również i ten drugi mechanizm działania OP mógłby być wykorzystany do przeciwdziałania uszkodzeniu BBB.

VIII. STRESZCZENIE

Encefalopatia wątrobowa to złożony zespół neurologiczny, którego głównym czynnikiem sprawczym jest nadmiar amoniaku w OUN, powstający na skutek jego niewydolnej detoksykacji w wątrobie. Wysokie stężenia amoniaku w mózgu, jakie obserwuje się w warunkach ostrej niewydolności wątroby, są dość dobrze skorelowane z jego zwiększoną zawartością we krwi. Jednym z najpoważniejszych powikłań tego schorzenia jest obrzęk mózgu, będący najczęstszą przyczyną śmierci chorych na ostrą EW. Z licznych badań i obserwacji wynika, iż obrzęk ten ma przede wszystkim podłoże cytotoksyczne i jest następstwem obrzmienia astrocytów, komórek OUN najbardziej narażonych na szkodliwy wpływ amoniaku. Amoniak wywołuje w astrocytach stres oksydacyjno-nitracyjny i hipotoniczny, co prowadzi do uszkodzenia komórek, zaburzeń w metabolizmie i w konsekwencji do gromadzenia się w nich nadmiaru wody. Obrzmienie astrocytów nasila stres oksydacyjno-nitracyjny, co wywołuje efekt, tzw. "błędnego koła". Nową i dość kontrowersyjną koncepcją jest udział komponenty naczyniopochodnej w obrzęku mózgu towarzyszącemu EW. Opiera się ona na doniesieniach wskazujących zależność pomiędzy wzrostem ciśnienia śródczaszkowego a wzrostem przepuszczalności BBB, będącej skutkiem degradacji białek tworzących TJ, poprzez zaktywowane metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim MMP-9. W astrocytach i neuronach OUN, ONS wywołany przez amoniak skutkuje oksydacją i nitrozylacją różnych białek i przez to bezpośrednio wpływa na funkcje i metabolizm tych komórek. Można było domniemywać, że ONS może w podobny sposób zmieniać właściwości i czynności komórek śródbłonna tworzących BBB i w ten sposób zaburzać przepuszczalność BBB dla różnych molekuł, a tym samym homeostazę mózgu. W niniejszej pracy sprawdzano hipotezę, że amoniak zmienia przepuszczalność komórek tworzących BBB, wywołując w nich ONS. Innym zadaniem

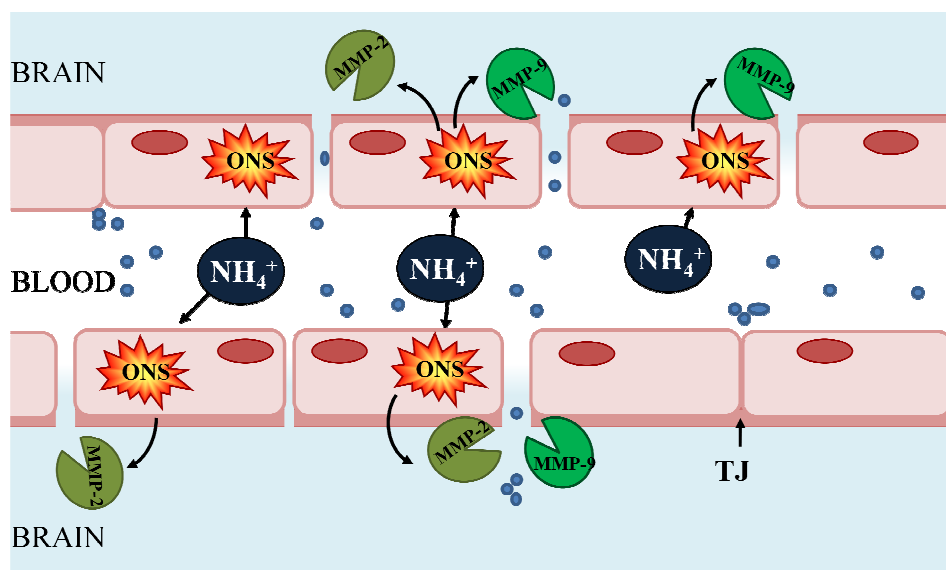
postawionym w odniesieniu zarówno do astrocytów, jak i komórek śródbłonka naczyń było przebadanie modulacji skutków ONS przez potencjalne czynniki protekcyjne o różnych punktach uchwytu. W odniesieniu do astrocytów sprawdzano hipotezę zakładającą protekcyjne działanie peptydów natriuretycznych. Przeanalizowano ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w antyoksydacyjne efekty peptydów oraz ich ochronne działanie na poziomie fizjologii komórki. Zaobserwowano, że ANP i CNP redukowały produkcję ROS zarówno w komórkach kontrolnych, jak i traktowanych amoniakiem, a efekt ten uzyskiwano również przy użyciu specyficznego agonisty receptora NPR-C, peptydu cANP₍₄₋₂₃₎. Wykazano, iż anionorodnik nadtlenkowy jest głównym wolnym rodnikiem nagromadzającym się w wyniku traktowania amoniakiem, a jego akumulacja jest hamowana zarówno przez ANP jak i cANP₍₄₋₂₃₎. Badania niniejszej pracy dokumentują po raz pierwszy obecność funkcjonalnych receptorów NPR-C na astrocytach w hodowli pierwotnej *in vitro*, których stymulacja leży u podstaw antyoksydacyjnych właściwości peptydów natriuretycznych. Ponadto pokazano, że preinkubacja z cANP₍₄₋₂₃₎ hamowała wywołaną amoniakiem nadprodukcję NO w astrocytach, co mogło przyczynić się do obniżenia stresu nitracyjnego. Stymulacja NPR-C przejawiała się zahamowaniem wywołanego amoniakiem obrzmienia komórek, co wskazuje na jej potencjalne działanie przeciwobrzękowe.

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że traktowanie komórek śródbłonka naczyń amoniakiem generuje w nich ONS, na co wskazywała nadprodukcja ROS i NO_x oraz F₂-izoprostanów, będących produktami peroksydacji lipidów. Za jedną z przyczyn nadprodukcji RNS pod wpływem amoniaku można uznać wzmożoną ekspresję y⁺LAT2, hybrydowego transportera aminokwasowego, który bierze udział w dostarczaniu do komórek prekursora do syntezy NO, argininy. Jednocześnie zaobserwowano, że amoniak zwiększał zewnątrzkomórkową aktywność MMP-9 i MMP-2, a także przepuszczalność pojedynczych warstw komórek śródbłonka dla markera wagowego, FITC- Dekstranu (40 kDa). Wzrostowi

przepuszczalności zapobiegała preinkubacja z inhibitorem MMPs, SB-3CT, oraz z antyoksydantem, estrem glutationu (GEE), co wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie MMPs w wywołane amoniakiem obniżenie ścisłości połączeń międzykomórkowych oraz na kluczową rolę ONS w tym procesie. Sekwencję zdarzeń w komórkach śródbłonka naczyń poddanych działaniu jonów amonowych, zaczynając od ONS a kończąc na wzroście przepuszczalności BBB, przedstawiono na **Ryc.VIII.1**.

Generowany przez amoniak ONS był też hamowany przez ornitynę, fenylomaślan oraz ich koniugat fenylomaślan ornityny (OP). Dowodzi to, iż OP oprócz swoich ochronnych właściwości wynikających z usuwania nadmiaru amoniaku z organizmu, ma też bezpośrednie własności cytoprotekcyjne, prawdopodobnie oparte o działanie antyoksydacyjne jego składników.

Podsumowując, wyniki badań potwierdzają, że amoniak jest przyczyną powstawania obrzęku o podłożu cytotoksycznym, a jednocześnie wspierają świeże doniesienia o możliwości udziału w jego patogenezie komponenty naczyniopochodnej. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują, iż cechą wspólną obu mechanizmów jest generacja ONS, odpowiednio w astrocytach i komórkach śródbłonka tworzących BBB. Hamowanie ONS może zapobiegać szkodliwym skutkom działania amoniaku, co uzasadnia podjęcie prób stosowania niektórych substancji cytoprotekcyjnych (np. cANP₍₄₋₂₃₎; OP) w modelach hiperamonemii *in vivo*, a w dalszej kolejności, u chorych z EW.



Ryc.VIII.1. Zmiana ścisłości bariery krew- mózg spowodowana degradacją białek tworzących TJ towarzyszy hiperamonemii związanej z niedoczynnością wątroby, a jedną z głównych przyczyn tej zmiany jest najprawdopodobniej wzrost aktywności MMPs. Wyniki zawarte w rozprawie pokazują, że komórki śródbłonna tworzące BBB mogą także być źródłem rozszczelniających barierę metaloproteinaz. Traktowanie komórek RBE-4 amoniakiem zwiększało przepuszczalność pojedynczych warstw tych komórek dla Dekstranu znakowanego FITC (40kDa) (granatowe kółka), a wzrost tej przepuszczalności był związany z generacją ONS i wzrostem zewnątrzkomórkowej aktywności MMPs.

ABSTRACT

Excessive accumulation of ammonia in the brain is a main causative factor in hepatic encephalopathy (HE), a neurological and neuropsychiatric syndrome associated with inefficient detoxification of ammonia in the liver. High concentrations of ammonia in the brain, resulting from acute liver failure, are well correlated with its elevated concentration in the blood. Brain edema related to astrocytic swelling is the most serious complicating factor of HE and major cause of death in patients with acute liver failure. According to many studies and observations, ammonia-induced CE is mainly cytotoxic in its nature, resulting from swelling of astrocytes, which are most exposed to detrimental effect of ammonia. Ammonia causes astrocytic swelling by triggering a vicious cycle of oxidative/ nitrosative stress (ONS) and hypotonic stress, concomitant with an array of metabolic disturbances.

One recently highly disputed and controversial issue is the existence of a vasogenic component of HE- induced CE. It has been observed that progression of intracranial pressure in the course of ALF is strictly correlated with the increase in blood brain barrier (BBB) permeability. Specifically, these ALF-related changes have been linked to events secondary to tight junction (TJ) protein degradation mediated by MMP-9. In astrocytes and neurons, ammonia-induced ONS leads to the oxidation and/or nitration of proteins and nucleic acids, and in this way directly modifies functions and metabolism of these cells. It may be speculated that ammonia by inducing ONS can also change the physiological properties of BBB-forming cells and in this way influence BBB permeability and alter brain homeostasis. Here, we tested the hypothesis that ammonia induces changes in blood-brain barrier (BBB) permeability by a mechanism coupled to ONS evoked in the BBB-forming cerebral capillary endothelial cells. We also tested the ability of a number of cytoprotective compounds to counter the effects of ammonia, both in astrocytes and brain capillary endothelial cells.

According to astrocytes, the hypothesis assuming protective effects of natriuretic peptides (NPs) was tested. We envisaged the possibility that NPs may attenuate ammonia-induced ROS formation and that this may involve interaction with NPR-C. Signaling pathways associated with antioxidative properties of NPs and their cell protective actions have been subject of analysis.

We report that ANP and CNP reduces ROS formation both in ammonia-treated and non-treated astrocytes. The ROS reducing effect also occurred upon incubation with the NPRC- interacting ANP analog, cANP₍₄₋₂₃₎. Furthermore, the superoxide anion was the major ROS species accumulating following ammonia treatment and its accumulation was reduced both by ANP and cANP₍₄₋₂₃₎. The study documented the presence of a functional NPR-C receptor on astrocytes, the stimulation of which counteracts oxidative stress in these cells. Moreover, cANP₍₄₋₂₃₎ attenuated, by an as yet unknown mechanism, ammonia-induced accumulation of NO, and could in this way reduce nitrosative stress. Stimulation of NPR-C inhibited ammonia-induced astrocytes swelling, manifesting its potential as an edema-preventing agent.

Treatment of a rat brain endothelial cell line with ammonia caused accumulation of ONS markers: ROS, NO and products of lipid peroxidation, F₂-isoprostanes. One possible explanation for excessive RNS production is the fact that ammonia increases the expression of y⁺LAT2, a transporter that mediates the uptake to the cells of the nitric oxide precursor, arginine. At the same time, ammonia increased the activity of extracellular matrix metalloproteinases (MMP-2/MMP-9) and increased cell permeability to fluorescein isothiocyanate-dextran (40 kDa), The increase of cell permeability was ameliorated upon co-treatment with a MMP inhibitor, SB-3CT and with an antioxidant, glutathione diethyl ester, which also reduced F₂-isoprostanes. Ammonia-induced ONS was attenuated by a cytoprotective agents l-ornithine, phenylbutyrate, and their conjugate l-ornithine

phenylbutyrate (OP), an ammonia-trapping drug used to treat hyperammonemia. This shows that apart from its known peripheral protective effect, OP also possess direct cytoprotective effects in endothelial cells, most likely related to the attenuation of biochemical manifestations of ONS.

The results support the concept that ONS and ONS-related activation of MMPs in cerebral capillary endothelial cells contribute to the alterations in BBB permeability and to the vasogenic component of cerebral edema associated with acute liver failure.

In conclusion, the results confirm that oxidative/nitrosative stress induced directly by ammonia in astrocytes and in the cerebral capillary endothelial cells is the trigger for events leading to both cytotoxic and vasogenic CE. Therefore, agents reducing ONS, such as the ones examined in the present study (cANP₍₄₋₂₃₎; OP) are good candidates for application in future therapies aimed at counteracting the detrimental effects of ammonia, first in animals with experimentally induced hyperammonemia, and eventually in patients with HE.

IX. LITERATURA

- Ahluwalia A, MacAllister RJ, Hobbs AJ (2004) Vascular actions of natriuretic peptides. Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Res Cardiol* 99:83-89.
- Akerboom TP, Bilizer MM, Sies H (1982) The relationship of biliary GSSG efflux and intracellular GSSG content in perfused rat liver. *J Biol Chem* 257:4248-4252.
- Albrecht J (2010) Hepatic encephalopathy in our genes? *Ann Intern Med* 153:335-336.
- Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Kapuściński A, Quack G (1994) Increase of the brain uptake index for L-ornithine in rats with hepatic encephalopathy. *Neuroreport* 5:671-673.
- Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Quack G (1996) Contrasting effects of thioacetamide-induced liver damage on the brain uptake indices of ornithine, arginine and lysine: modulation by treatment with ornithine aspartate. *Metab Brain Dis* 11: 229-237.
- Albrecht J, Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 170:138-146.
- Albrecht J, Norenberg MD (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788-794.
- Alexander B, Li X, Benjamin IS, Segal MB, Sherwood R, Preston JE (2000) A quantitative evaluation of the permeability of the blood brain barrier of portacaval shunted rats. *Metab Brain Dis* 15: 93-103.
- 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.
- Bajaj JS, Cordoba J, Mullen KD, Amodio P, Shawcross DL, Butterworth RF, Morgan MY; International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) (2011) Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy--an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment Pharmacol Ther* 33:739-747.
- Balbuena P, Li W, Ehrich M (2011) Assessments of tight junction proteins occludin, claudin 5 and scaffold proteins ZO1 and ZO2 in endothelial cells of the rat blood-brain barrier: cellular responses to neurotoxicants malathion and lead acetate. *Neurotoxicology* 32: 58-67.
- Bélanger M, Asashima T, Ohtsuki S, Yamaguchi H, Ito S, Terasaki T (2007) Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. *Neurochem Int* 50: 95-101.
- 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.

- Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J (2010) Acute liver failure. *Lancet* 376: 190-201.
- Blei AT (2005) The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 47: 71-77.
- Blei AT (2008) Brain edema in acute liver failure. *Crit Care Clin* 24: 99-114.
- 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.
- Boran MS, Garcia A (2007) The cyclic GMP-protein kinase G pathway regulates cytoskeleton dynamics and motility in astrocytes. *J Neurochem* 102: 216-230.
- 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.
- Broër A, Wagner CA, Lang F, Broër S (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y⁺LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 349: 787-795.
- Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z (1999) The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 31: 27-38.
- 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 (2002) Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int* 41: 81-85.
- Butterworth RF (2007) Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22: 309-320.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E (2003) Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology* 37: 277-285.
- Cauli O, López-Larrubia P, Rodrigo R (2011) Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 140:638-645.
- Cauli O, López-Larrubia P, Rodrigues TB (2007) Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem* 103: 1334-1343.
- Chen F, Hori T, Ohashi N, Baine AM, Eckman CB, Nguyen JH (2011) Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 53:1294-1305.

- Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH (2009) Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 50: 1914-1923.
- Chomczyński P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156- 159.
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J (1999) Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29:648-653.
- Conn HO, Leevy CM, Vlahcevic ZR (1977) Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial. *Gastroenterology* 72: 573–583.
- Cooper AJ, McDonald JM, Gelbard AS, Gledhill RF, Duffy TE (1979) The metabolite fate of ¹³N-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.
- Cooper AJ (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, Di Mauro S, Barchi RL, Kunk LM (Eds.) *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth- Heinemann, Boston, pp. 1195-1230.
- Cordoba J, Blei AT (1996) Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16: 271-280.
- Costa MA, Elesgaray R, Caniffi C, Fellet A, Mac Laughlin M, Arranz C (2010) Role of nitric oxide as a key mediator on cardiovascular actions of atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H778– H786.
- Darmaun D, Welch S, Rini A, Sager BK, Altomare A, Haymond MW (1998) Phenylbutyrate induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism. *Am J Physiol* 274:E801-E807.
- Davies NA, Wright G, Ytrebø LM, Stadlbauer V, Fuskevåg OM, Zwingmann C, Davies DC, Habtesion A, Hodges SJ, Jalan R (2009) L-ornithine and phenylacetate synergistically produce sustained reduction in ammonia and brain water in cirrhotic rats. *Hepatology* 50:155-164.
- De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P (2010) Atrial natriuretic peptide and oxidative stress. *Peptides* 31: 1412–1419.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62: 649-671.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95.
- Elesgaray R, Caniffi C, Ierace DR, Jaime MF, Fellet A, Arranz C, Costa MA (2008) Signaling cascade that mediates endothelial nitric oxide synthase activation induced by atrial natriuretic peptide. *Regul Pept* 151: 130–134.

Enns GM, Berry SA, Berry GT, Rhead WJ, Brusilow SW, Hamosh A (2007) Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med* 356:2282-2292.

Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, Mulcahy RJ (2002) Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamatecysteine ligase modifier subunit gene. *J Biol Chem* 277: 30730–30737.

Eroglu Y, Byrne WJ (2009) Hepatic Encephalopathy. *Emerg Med Clin N Am* 27: 401-414.

Faff L, Reichenbach A, Albrecht J (1996) Ammonia-induced taurine release from cultured rabbit Müller cells is an osmoresistant process mediated by intracellular accumulation of cyclic AMP. *J Neurosci Res* 46: 231–238.

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.

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.

Goldbecker A, Buchert R, Berding G, Bokemeyer M, Lichtinghagen R, Wilke F, Ahl B, Weissenborn K (2010) Blood-brain barrier permeability for ammonia in patients with different grades of liver fibrosis is not different from healthy controls. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1384–1393.

Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D (2008) Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48:567-579.

Görg B, Wettstein M, Metzger S (2005) Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* 41:1065–1073.

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

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297: 1186-1190.

Guerrini VH (1994) Effect of antioxidants on ammonia induced CNS-renal pathobiology in sheep. *Free Rad Res* 21: 35-43.

Hahn M, Massen O, Nencki M, Pavlov I (1893) *Arch Exp Pathol Pharmacol* 32: 161-173.

Hallik M, Tamme K, Väli T, Starkopf J (2011) Successful liver transplantation after 21 days of hepatic coma. *ASAIO J* 57: 545-546.

Häussinger D, Görg B (2010) Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab* 13: 87–92.

- Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F (2005) Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20: 285-294.
- Häussinger D, Schliess F (2005) Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 47:64-70.
- Häussinger D, Schliess F (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57: 1156-1165.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr (1996) Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187.
- Hernandez R, Martínez-Lara E, Del Moral ML, Blanco S, Canuelo A., Siles E, Esteban FJ, Pedrosa JA, Peinado MA (2004) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* 126: 879-887.
- Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe AS (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. A dissection and tissue culture manual for the nervous system. In: *A dissection and tissue culture manual for the nervous system* (A S, J D, A V, B H, eds), pp 105-108. New York: Alan R. Liss.
- Hilgier W, Węgrzynowicz M, Ruszkiewicz J, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2010) Direct exposure to ammonia and hyperammonemia increase the extracellular accumulation and degradation of astroglia-derived glutathione in the rat prefrontal cortex. *Toxicol Sci* 117: 163-168.
- 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, 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.
- Hjelle OP, Chaudhry AC, Ottersen OP (1994) Antisera to glutathione: characterization and immunocytochemical application to the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 6: 793-804.
- Horowitz ME, Schafer DF, Molnar P, Jones EA, Blasberg RG, Patlak CS, Waggoner J, Fenstermacher JD (1983) Increased blood brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology* 84: 1003-1011.
- 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.
- 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 CY, Fujimura M, Noshita N, Chang YY, Chan PH (2001) SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 163-173.

- Ichai P, Samuel D (2008) Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl Suppl* 2: S67-79.
- Imura H, Nakao K, Itoh H (1992) The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 13: 217-249.
- Ito S, Ohtsuki S, Katsukura Y, Funaki M, Koitabashi Y, Sugino A, Murata S, Terasaki T (2011) Atrial natriuretic peptide is eliminated from the brain by natriuretic peptide receptor-C-mediated brain-to-blood efflux transport at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 457-66.
- Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A (2004) Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* 41: 613-620.
- Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ (2007) L-Ornithinephenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 69: 1064-1069.
- James JH, Escourrou J, Fischer JE (1978) Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science* 200: 1395-1397.
- Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B 3rd, Reddy PV, Norenberg MD (2008) Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* 283:33874-33882.
- Jayakumar AR, Panickar K, Norenberg MD (2002) Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce the formation of free radicals in cultured neural cells. *J Neurochem* 83: 1226-1234.
- Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy CR, Norenberg MD (2006) 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.
- Kakoki M, Kim HS, Edgell CJ, Maeda N, Smithies O, Mattson DL (2006) Amino acids as modulators of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: 297-304.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M (1985) The regulation of hepatic GSH. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25: 714-744.
- Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R (1992) Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15:1060-1066.
- Kiemer AK, Vollmar AM (1998) Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 273: 13444-13451.
- Kiemer AK, Vollmar AM (2001) Induction of L-arginine transport is inhibited by atrial natriuretic peptide: a peptide hormone as a novel regulator of inducible nitric-oxide synthase substrate availability. *Mol Pharmacol* 60: 421-426.
- Kircheis G, Nilius R, Held C, Berndt H, Buchner M, Görtelmeyer R, Hendricks R, Krüger B, Kuklinski B, Meister H, Otto HJ, Rink C, Rösch W, Stauch S (1997) Therapeutic efficacy of

- L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology* 25:1351- 1360.
- Klejman A, Wegrzynowicz M, Szatmari EM, Mioduszezewska 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.
- Konopacka A, Fręsko 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.
- Konopacka A, Konopacki FA, Albrecht J (2009) Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J Neurochem* 109 Suppl 1: 246-251.
- Konopacka A, Zielińska M, Albrecht J (2008) Ammonia inhibits the C-type natriuretic peptide-dependent cyclic GMP synthesis and calcium accumulation in a rat brain endothelial cell line. *Neurochem Int* 52: 1160-1166.
- Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Rad Biol Med* 26: 1369-1374.
- 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 Rad Res* 27: 637-644.
- 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.
- Lagrange P, Romero IA, Minn, A, Revest PA (1999) Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 27: 667-672.
- Larson AM, Polson J, Fontana RJ (2005) Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 42:1364–1372.
- Laursen H, Schrøder H, Westergaard E (1975) The effect of portocaval anastomosis on the permeability to horseradish peroxidase of cerebral vessels of the rat. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83: 266–268.
- Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, Krizbai I, Hennig B, Bauer HC, Bauer H (2011) Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxid Redox Signal* 15:1305-1323.
- Li Y, Omori K, Suzukawa J, Inagaki C (2004) Calcineurin-mediated BAD Ser-155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 357: 73-75.
- Liu WH, Chang LS (2010) Caffeine induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in human leukemia U937 cells via Ca²⁺/ROS-mediated suppression of ERK/c-fos pathway and activation of p38 MAPK/c-jun pathway. *J Cell Physiol* 224: 775-785.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
- Lo WD, Ennis SR, Goldstein GW, McNeely DL, Betz AL (1987) The effects of galactosamine-induced hepatic failure upon blood brain barrier permeability. *Hepatology* 7: 452–456.
- Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, Demarco KM, Nametz N, Davis TP (2010) Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1625-1636.
- Lockwood AH (2004) Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 345-349.
- Lockwood AH, Yap EW, Wong WH (1991) Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 337–341.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 53:375-414.
- Maack T (2006) The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:198-207.
- Master S, Gottstein J, Blei AT (1999) Cerebral blood flow and the development of ammonia induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 30: 876-880.
- Matkowskyj KA, Marrero JA, Carroll RE, Danilkovich AV, Green RM, Benya RV (1999) Azoxy methane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol* 277: G455-462.
- Maybodi L, Pow DV, Kharazia VN, Weinberg RJ (1999) Immunocytochemical demonstration of reduced glutathione in neurons of rat forebrain. *Brain Res* 817: 199-205.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52: 711–760.
- Meli DN, Christen S, Leib SL (2003) Matrix metalloproteinase-9 in pneumococcal meningitis: activation via an oxidative pathway. *J Infect Dis* 187: 1411-1415.
- Milatovic D, Yin Z, Gupta RC, Sidoryk M, Albrecht J, Aschner JL, Aschner M (2007) Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol Sci* 98: 198-205.
- Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y, Aschner M (2009) Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 240: 219-225.
- Mindikoglu AL, Regev A, Schiff ER (2006) Hepatitis B virus reactivation after cytotoxic chemotherapy: the disease and its prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1076–1081.

- 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.
- Misono KS (2011) Natriuretic peptides and their receptors. *FEBS J* 2011 278 doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08114.x.
- Monfort P, Munoz MD, Felipo V (2004) Hyperammonemia impairs long-term potentiation in hippocampus by altering the modulation of cGMP-degrading phosphodiesterase by protein kinase G. *Neurobiol Dis* 15: 1-10.
- Morales A, Miranda M, Sanchez-Reyes A, Colell A, Biete A, Fernández-Checa JC (1998) Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of c-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. *FEBS Lett* 427: 15-20.
- Morrow JD, Roberts LJ 2nd (1999) Mass spectrometric quantification of F₂-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol* 300: 3-12.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Munoz SJ (2008) Hepatic Encephalopathy. *Med N Am* 92 : 795-812.
- Munshi HG, Wu YI, Ariztia EV, Stack MS (2002) Calcium regulation of matrix metalloproteinase- mediated migration in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 277: 41480-41488.
- 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.
- Murthy KS, Teng B, Jin J, Makhlof M (1998) G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol* 275: 1409-1416.
- 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.
- Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevelev D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, Genco P, Golde T, Richelson E, Dickson D, McKinney M, Eckman CB (2006) Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 44: 1105-1114.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 61:303-310.
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2009) Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 24: 103-117.
- O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R (1989) Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 97:439-445.
- Ohara K, Aoyama M, Fujita M, Sobue K, Asai K (2009) Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 462:109-112.

- Ohno N, Itoh H, Ikeda T, Ueyama K, Yamahara K, Doi K, Yamashita J, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yurugi T, Kook H, Komeda M, Nakao K (2002) Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. *Circulation* 105:1623- 1626.
- Olde Damink SW, Jalan R, Deutz NE (2003) The kidney plays a major role in the hyperammonemia seen after simulated or actual GI bleeding in patients with cirrhosis. *Hepatology* 37: 277-285.
- Oria M, Romero-Giménez J, Arranz JA, Riudor E, Raguer N, Córdoba J (2012) Ornithine phenylacetate prevents disturbances of motor-evoked potentials induced by intestinal blood in rats with portacaval anastomosis. *J Hepatol* 56: 109-114.
- Ott P, Larsen FS (2004) Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* 44:185- 198.
- Pella R (1991) The protective effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on cells damaged by oxygen radicals is mediated through elevated cGMP-levels, reduction of calcium-inflow and probably G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 174:549-555.
- Petri S, Kiaei M, Kipiani K, Chen J, Calingasan NY, Crow JP, Beal MF (2006) Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 22: 40-49.
- Phelps ME, Hoffman EJ, Raybaud C (1977) Factors which affect cerebral uptake and retention of $^{13}\text{NH}_3$. *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.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72.
- Prado J, Baltrons MA, Pifarré P, García A (2010) Glial cells as sources and targets of natriuretic peptides. *Neurochem Int* 57: 367-374.
- Prins BA, Weber MJ, Hu RM, Pedram A, Daniels M, Levin ER (1996) Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271: 14156-14162.
- Qian JY, Haruno A, Asada Y, Nishida T, Saito Y, Matsuda T, Ueno H (2002) Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress-induced thrombosis and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries. *Circ Res* 91:1063-1069.
- Rahman I, Smith CA, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W (1996) Induction of c-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP- 1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 396: 21–25.
- Rahman T, Hodgson H (2001) Clinical management of acute hepatic failure. *Intensive Care Med* 27:467-476.

- Raichle ME, Larson KB (1981) The significance of the $\text{NH}_3\text{-NH}^+$ equilibrium on the passage of ^{13}N -ammonia from blood to brain. A new regional residue detection model. *Circ Res* 48: 913-937.
- Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD (2003) Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res* 74:891-897.
- Rama Rao KV, Reddy PV, Tong X, Norenberg MD (2010) Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol* 176: 1400–1408.
- Ramirez SH, Potula R, Fan S, Eidem T, Papugani A, Reichenbach N, Dykstra H, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Persidsky Y (2009) Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1933-1945.
- Rao VLR, Audet RM, Butterworth RF (1995) Increased nitric oxide synthase activities and L- ^3H arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem* 65: 677-681.
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvarskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D (2007) Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55:758-771.
- Richman PG, Meister A (1975) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by non allosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250:1422-1426.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V (2010) Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139: 675-684.
- Romero-Gomez M, Jover M, Del Campo JA (2010) Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. A cohort study. *Ann Intern Med* 153: 281-288.
- Romero-Gómez M (2005) Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20: 319-325.
- Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L (2004) Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 41: 49-54.
- 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.
- Rose C, Michalak A, Rao KV, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF (1999) Lornithine- L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* 30: 636-640.
- Rose RA, Giles WR (2008) Natriuretic peptide C receptor signaling in the heart and vasculature. *J Physiol* 586: 353–366.

- 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.
- Saha S, Li Y, Lappas G, Anand-Srivastava MB (2008) Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G_i alpha protein. *J Mol Cell Cardiol* 44: 336–344.
- Salvatore F, Cimino F, d' Ayello-Caracciolo M, Cittadini D (1964) Mechanism of the protection by L-ornithine-L-aspartate mixture and by L-arginine in ammonia intoxication. *Arch Biochem Biophys* 107: 499-508.
- Sarna GS, Bradbury MW, Cavanagh J (1977) Permeability of the blood-brain barrier after portocaval anastomosis in the rat. *Brain Res* 138: 550–554.
- Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P (2007) Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* 32: 517– 524.
- Sawara K, Desjardins P, Chatauret N, Kato A, Suzuki K, Butterworth RF (2009) Alterations in expression of genes coding for proteins of the neurovascular unit in ischemic liver failure. *Neurochem Int* 55: 119–123.
- Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D (2004) Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 47:21-29.
- 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.
- Schliess F, Görg B, Häussinger D (2006) Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem* 387:1363-1370.
- Shaw SG, Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A (1987) Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest* 80:1232-1237.
- 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.
- 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.
- Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, Moriyama M, Reddy PV, Norenberg MD (2008) NF-kappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J Neurochem* 106: 2302-2311.
- Skowrońska M, Albrecht J (2011) Alterations of Blood Brain Barrier Function in Hyperammonemia: An Overview. *Neurotox Res* doi: 10.1007/s12640-011-9269-4
- Skowrońska M, Zielińska M, Albrecht J (2010) Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia-treated astrocytes. *J Neurochem* 115: 1068-1076.

- Smith AR, Rossi-Fanelli F, Ziparo V, James JH, Perelle BA, Fischer JE (1978) Alterations in plasma and CSF amino acids, amines and metabolites in hepatic coma. *Ann Surg* 187: 343–350.
- Sporbert A, Mertsch K, Smolenski A, Haseloff RF, Schönfelder G, Paul M, Ruth P, Walter U, Blasig IE (1999) Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein: a consequence of nitric oxide- and cGMP-mediated signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 258-266.
- Sthal J (1936) Studies of the blood ammonia in liver disease. *Ann Intern Med* 58:1–24.
- Summers C, Tang W (1992) Atrial natriuretic peptide receptor subtypes in rat neuronal and astrocyte glial cultures. *Am J Physiol* 262: C1134–C1143.
- Sushma S, Dasarathy S, Tandon RK, Jain S, Gupta S, Bhist MS (1992) Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: A double-blind randomized trial. *Hepatology* 16: 138-144.
- Svoboda N, Kerschbaum HH (2009) L-Glutamine-induced apoptosis in microglia is mediated by mitochondrial dysfunction. *Eur J Neurosci* 30:196-206.
- 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.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16: 877-885.
- Van Caulert C, Deviller C, Halff M (1932) Troubles provoques par l'ingestion de sels ammonia caux chez l'homme atteint de cirrhose de Laennec. *Comptes Rendus Soc Biol* 111: 739–740.
- Vaquero J, Butterworth RF (2007) Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions. *Neurol Res* 29: 683- 690.
- Visek WJ (1984) Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J Dairy Sci* 67: 481-498.
- Wang W, Lv S, Zhou Y, Fu J, Li C, Liu P (2011) Tumor necrosis factor- α affects blood–brain barrier permeability in acetaminophen-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23: 552–558.
- Warren KS (1962) Ammonia toxicity and pH. *Nature* 195: 47-49.
- Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT (1999) Regulation of g-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274: 33627–33636.
- William M, Hamilton EJ, Garcia A, Bundgaard H, Chia KK, Figtree GA, Rasmussen HH (2008) Natriuretic peptides stimulate the cardiac sodium pump via NPR-C-coupled NOS activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1067–C1073.
- Woodard GE, Rosado JA (2008) Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int Rev Cell Mol Biol* 268:59-93.

Yamahara K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yurugi-Kobayashi T, Miyashita K, Tsujimoto H, Kook H, Feil R, Garbers DL, Hofmann F, Nakao K (2003) Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/ cGMP/ cGMP- dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3404-3409.

Yamamoto S, Nguyen JH (2006) TIMP-1/MMP-9 imbalance in brain edema in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 134: 307-314.

Ytrebø LM, Kristiansen RG, Maehre H, Fuskevåg OM, Kalstad T, Revhaug A, Cobos MJ, Jalan R, Rose CF (2009) L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology* 50:165-174.

Zaki AE, Wardle EN, Canalese J, Ede RJ, Williams R (1983) Potential toxins of acute liver failure and their effects on blood brain barrier permeability. *Experientia* 39: 988-991.

Zemtsova I, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schrör K, Häussinger D (2011) Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* 54: 204-215.

Zhang JW, Gottschall PE (1997) Zymographic measurement of gelatinase activity in brain tissue after detergent extraction and affinity-support purification. *J Neurosci Methods* 76: 15-20.

Zhou H, Liu X, Liu L, Yang Z, Zhang S, Tang M, Tang Y, Dong Q, Hu R (2009) Oxidative stress and apoptosis of human brain microvascular endothelial cells induced by free fatty acids. *J Int Med Res* 37: 1897-1903.

Zhou HZ, Shapiro JI, Chan L, Schrier RW (1990) Atrial natriuretic peptide protects against cold ischemic injury in the isolated and in situ rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1: 927-928.

Zhou W, Bercury K, Cumiskey J, Luong N, Lebin J, Freed CR (2011) Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson Disease. *J Biol Chem* 286: 14941-14951.

Zhu D, Hu C, Sheng W, Tan KS, Haidekker MA, Sun AY, Sun GY, Lee JC (2009) NAD(P)H oxidase-mediated reactive oxygen species production alters astrocyte membrane molecular order via phospholipase A2. *Biochem J* 421: 201-210.

Zielińska M, Fresko I, Konopacka A, Felipo V, Albrecht J (2007) Hyperammonemia inhibits the natriuretic peptide receptor 2 (NPR-2)-mediated cyclic GMP synthesis in the astrocytic compartment of rat cerebral cortex slices. *Neurotoxicology* 28: 1260-1263.

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, Ruszkiewicz J, Hilgier W, Fręsko I, Albrecht J (2011) Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter y^+ LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway. *Neurochem Int* 58: 190-195.

Ziemińska E, Dolińska, M, Lazarewicz JW (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.