

**Rozprawa habilitacyjna  
Warszawa 2010**



dr n. med. MAGDALENA ZIELIŃSKA

**CZYNNIKI MODULUJĄCE SZLAKI SYGNAŁOWE  
ZWIĄZANE Z CYKLICZNYM GMP W  
MECHANIZMIE ENCEFALOPATII  
WĄTROBOWEJ**



LS 325

4395

**ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII  
INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK W WARSZAWIE**

# *Moim Najbliższym*

## Podziękowania

*Serdecznie dziękuję za umożliwienie przeprowadzenia części badań i skorzystania z doświadczenia*

**Prof. dr hab. Andrzejowi Beręsewiczowi**

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medycznym Kształcenia  
Podyplomowego, Warszawa;

**Prof. Vincente Felipo**

Laboratory of Neurobiology, Centro de Investigación Príncipe Felipe,  
Valencia, Hiszpania;

**Prof. Simo Oja**

Department of Pediatrics, Tampere University Hospital, Finlandia;

**Prof. Pirjo Saransaari**

University of Tampere Medical School, Finlandia;

*Wszystkim współautorom publikacji:*

**Agnieszce Konopackiej**

**Wojciechowi Hilgierowi**

**Inez Fręsko**

**Sławomirowi Piaskowskiemu**

**Joannie Ruszkiewicz**

**Emilii Klemenskiej**

*Serdecznie dziękuję za współpracę i zgodę na wykorzystanie wspólnych badań.*

Panu **Profesorowi dr hab. Janowi Albrechtowi** składam szczególne podziękowania za pomoc oraz przyjazną i dyskretną stymulację mojej pracy naukowej.

*Magdalena Zielińska*

Badania przedstawione w tezach habilitacyjnych były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektów badawczych: 2P05A 06426, NN 401 055033.

**Rozprawa obejmuje cykl oryginalnych publikacji:**

- I. Konopacka A., Fręsko I., Piaskowski S., Albrecht J., **Zielińska M.**, Ammonia affects the activity and expression of soluble and particulate GC in cultured rat astrocytes. *Neurochemistry International* 48, 553-558, 2006. IF= **3,261**
- II. Konopacka A., **Zielińska M.**, Albrecht J., Ammonia inhibits the C-type natriuretic peptide-dependent cyclic GMP synthesis and calcium accumulation in a rat brain endothelial cell line. *Neurochemistry International* 52, 1160-1166, 2008. IF= **3,541**
- III. **Zielińska M.**, Fręsko I., Konopacka A., Felipo V., Albrecht J., Hyperammonemia inhibits the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) - mediated cyclic GMP synthesis in the astrocytic compartment of rat cerebral cortex slices. *Neurotoxicology* 28, 1260-1263, 2007. IF= **3,009**
- IV. Hilgier W., Fręsko I., Klemenska E. Beręsewicz A., Oja S.S., Saransaari P., Albrecht J., **Zielińska M.**, Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiology of Disease* 35, 75-81, 2009. IF= **4,518**
- V. **Zielińska M.**, Ruszkiewicz J., Hilgier W., Fręsko I., Albrecht J., Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter y+LAT2 in rat cerebral cortex: implications for nitric oxide/cGMP pathway activity. *Neurochemistry International*, (doi: 10.1016/j.neuint.2010.11.015), 2010. IF= **3,541**

Łączny współczynnik oddziaływania prac wybranych do rozprawy wynosi (IF= **17,87**).

# **Komentarz**

**do rozprawy habilitacyjnej**

## **CZYNNIKI MODULUJĄCE SZLAKI SYGNAŁOWE ZWIĄZANE Z CYKLICZNYM GMP W MECHANIZMIE ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ**

## SPIS TREŚCI

1.	WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
2.	WSTĘP .....	10
2.1	Encefalopatia wątrobowa (EW).....	10
2.1.1	Charakterystyka ogólna.....	10
2.1.2	Neurotoksyczność amoniaku .....	11
2.2	Szlaki sygnałowe związane z cGMP .....	16
3.	CEL ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....	19
4.	WYNIKI I DYSKUSJA.....	21
4.1	Zmiany ekspresji i aktywności cyklicz guanylowych: rozpuszczalnej (sGC) i związanej z błonami (pGC) w hodowli pierwotnej astrocytów szczurzych. ....	21
	Omówienie publikacji I .....	21
4.2	Synteza cGMP i zależny od niej transport jonów $Ca^{2+}$ w linii komórek śródbłonna naczyń mózgowych RBE-4 w warunkach hiperamonemii. ....	23
	Omówienie publikacji II .....	23
4.3	Rola liganda dla receptora peptydu natriuretycznego 2 (NPR2), peptydu natriuretycznego C (CNP) w szczurzym modelu hiperamonemii <i>in vivo</i> . ....	27
	Omówienie publikacji III.....	27
4.4	Modulujący wpływ glutaminy na pobudzenie szlaku glutaminian/receptor NMDA/NO/cGMP przez jony amonowe <i>in vivo</i> w modelu ostrym i w wyniku ich przedłużonego działania. ....	29
	Omówienie publikacji IV i V.....	29
5.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	33
6.	PIŚMIENNICTWO .....	35

## STRESZCZENIE ROZPRAWY

Encefalopatia wątrobowa (EW) to złożony zespół neuropsychiatryczny związany z przewlekłą, bądź ostrą niewydolnością wątroby, w którym amoniak stanowi główny czynnik patogenny. Objawy EW mają bardzo różnorodny charakter. Przez długi czas w centrum uwagi badaczy znajdowały się objawy związane bezpośrednio ze zmianami struktury i funkcji astrocytów. Astrocyty są komórkami, w których zachodzi detoksykacja amoniaku do glutaminy. Amoniak, a wedle najświeższych poglądów również nadmiar gromadzącej się glutaminy, wywołują obrzmienie tych komórek, a w konsekwencji obrzęk mózgu, stanowiący główną przyczynę zgonów chorych z ostrą, bądź wtórnie zaostroszoną EW. Z drugiej strony, EW cechują zaburzenia neuroprzekaznictwa, głównie glutaminianergicznego, w tym zmiany aktywności szlaku glutaminian-receptor NMDA-tlenek azotu (NO)-cykliczny GMP (cGMP). Uważa się, że nadaktywność szlaku NMDA/NO stanowi element wywołanego przez amoniak stresu oksydacyjno-nitracyjnego. Z kolei, obniżona dostępność cGMP warunkuje zaburzenia kognitywne. Jak dotąd, zaburzenia syntezy cGMP wiązano tylko z neuronami i tylko z powyższym szlakiem. Nie zastanawiano się również nad ewentualną współzależnością pomiędzy procesem detoksykacji amoniaku do glutaminy w astrocytach, a syntezą cGMP.

Celem rozprawy było ustalenie względnego udziału szlaków sygnałowych związanych z produkcją cGMP w mechanizmie encefalopatii hiperamonemicznych. Poza szlakiem glutaminian/receptor NMDA/NO/cGMP, chodziło tu o rolę syntezy cGMP w wyniku pobudzenia receptorów dla peptydów natriuretycznych (NPR). Drugim poruszonym zagadnieniem był udział w generacji cGMP innych, poza neuronami, typów komórek OUN: astrocytów oraz komórek śródbłonna naczyń mózgowych w warunkach toksycznego działania amoniaku *in vitro* i *in vivo*. Wreszcie, zbadano modulujący wpływ glutaminy na szlak glutaminian/receptor NMDA/NO/cGMP.

W **publikacji I** wykazano, że w warunkach toksycznego działania amoniaku dochodzi do zmian ekspresji i aktywności obu form cyklicznych guanylowych: rozpuszczalnej aktywowanej przez NO, oraz związanej z błonami, aktywowanej przez peptydy natriuretyczne w pierwotnej hodowli astrocytów szczurzych.

W **publikacji II** wykazano, że aktywacja receptora dla peptydu natriuretycznego C (CNP), prowadząca do pobudzenia przez cGMP aktywności kinazy białkowej G, stymuluje napływ jonów wapnia do wnętrza komórek śródbłonka naczyń przez napięciowozależne kanały wapniowe typu L, a proces ten ulega upośledzeniu w warunkach hiperamonemii.

W **publikacji III** wykazano, że w szczurzym modelu hiperamonemii *in vivo* dochodzi do obniżenia ekspresji i funkcji receptora dla peptydu natriuretycznego C w komórkach innych niż neurony, najprawdopodobniej w astrocytach i/lub komórkach śródbłonka naczyń.

W **publikacji IV** zbadano modulujący wpływ glutaminy na pobudzony w warunkach krótkotrwałego toksycznego działania amoniaku szlak glutaminian/NMDA/NO/cGMP. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że glutamina hamuje ten szlak, a mechanizm hamowania polega na upośledzeniu dostępności argininy jako prekursora NO, na zasadzie hamowania jej wychwytu do komórek OUN.

W **publikacji V** wykazano, że glutamina gromadząca się w mózgu w modelu przedłużonej hiperamonemii również hamuje w/w szlak, a zmniejszona dostępność argininy wiąże się ze wzrostem ekspresji i aktywności wspólnego dla argininy i glutaminy heteromerycznego transportera  $y^+LAT2$ .

Podsumowując, wyniki rozprawy jednoznacznie wskazują, że zaburzenia poziomu cGMP w mózgu warunkach encefalopatii hiperamonemicznych są skutkiem zmian jego syntezy na różnych szlakach i w różnych przedziałach komórkowych. Wykazano nadto, że aktywność szlaku glutaminian/NMDA/NO/cGMP jest sprzężona zwrotnie z nagromadzeniem się glutaminy w procesie detoksykacji amoniaku.



## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	wapń wewnątrzkomórkowy
8-Br-cGMP	8-bromo-cGMP, analog cGMP
8-pCPT-cGMP	3', 5' cykliczny monofosforan 8-(4-chlorofenyltio)guanozyny, analog cGMP (ang. 8- (4- <i>Chlorophenylthio</i> ) <i>guanosine- 3', 5'-cyclic monophosphate</i> )
ANP	peptyd natriuretyczny typu A (forma przedsionkowa), (ang. <i>atrial natriuretic peptide</i> )
ATP	adenozynotrójfosforan
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i> )
BNP	peptyd natriuretyczny typu B (forma mózgowa), (ang. <i>brain natriuretic peptide</i> )
cAMP	cykliczny 3', 5' adenzynomonofosforan
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
cGMP	cykliczny 3', 5' guanozynomonofosforan
CBF	mózgowy przepływ krwi (ang. <i>cerebral blood flow</i> )
CNG	kanały jonowe regulowane przez cGMP (ang. <i>cyclic nucleotide-gated ion channels</i> )
CNP	peptyd natriuretyczny typu C (ang. <i>C-type natriuretic peptide</i> )
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucyna
eNOS	forma NOS występująca w śródbłonku naczyń (ang. <i>endothelial NOS</i> )
EDRF	czynnika rozszerzającego naczynia (ang. <i>endothelial derived relaxing factor</i> )
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i> )
EW	encefalopatia wątrobowa
GABA	kwasy γ-aminomasłowy (ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
GABA <sub>A</sub>	receptor gabaergiczny typu A
GAPDH	dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase</i> )
GC	cyklaza guanylanowa (ang. <i>guanylate cyclase</i> )
GFAP	glejowe kwaśne białko włókienkowe (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
Gln	glutamina
Glu	kwasy glutaminowy
GMP	5' guanozynomonofosforan
GS	syntetaza glutaminy (ang. <i>glutamine synthase</i> )
GTP	5'-guazynotrójfosforan
IBMX	3-izobutylo-1-metyloksantyna (ang. <i>3-isobutyl-1-methylxantine</i> )
iNOS	indukowana forma NOS (ang. <i>inducible NOS</i> )

LTCC	kanały $\text{Ca}^{2+}$ napięciowo zależne typu L (ang. <i>voltage-dependent L-type calcium channels</i> )
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>long-term potentiation</i> )
MeAiB	metyloaminoisomaślan
MPTP	uszkodzenie mitochondriów polegające na otwarciu kanałów w błonie wewnętrznej (ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )
MRP	(ang. <i>multidrug resistance protein</i> )
$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP-aza	pompa $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ zależna od ATP
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana
NEM	N-etylo-maleimid
NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginowy
nNOS	neuronalna forma NOS (ang. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NOS	syntaza tlenu azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i> )
NP	peptyd natriuretyczny (ang. <i>natriuretic peptide</i> )
NPR-1,2	receptor peptydów natriuretycznych 1, 2 (ang. <i>natriuretic peptide receptor</i> )
NPR	receptor dla peptydów natriuretycznych (ang. <i>natriuretic peptide receptor</i> )
NPR-C	receptor dla peptydów natriuretycznych typu C (ang. <i>natriuretic clearens peptide receptor C</i> )
ODQ	1H-(1,2,4)oksadiazolo(4,3-a)chinoksalino-1-en, inhibitor sGC (ang. <i>1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one</i> )
ONS	stres oksydacyjno-nitracynjny
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PDE	fosfodiesteraza (ang. <i>phosphodiesterase</i> )
PET	pozytronowa tomografia emisyjna
pGC	błonowa cyklaza guanylanowa (ang. <i>particulate GC</i> )
pGC-A, B, C	izoforny pGC
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i> )
PKG	kinaza białkowa regulowana przez cGMP (ang. <i>protein kinase G</i> )
PMCA	pompa $\text{Ca}^{2+}$ zależna od ATP zlokalizowana w błonie cytoplazmatycznej (ang. <i>plasma membrane <math>\text{Ca}^{2+}</math> ATPase</i> )
RBE-4	linia komórek śódbłónka naczyń mózgowych szczura (ang. <i>rat brain endothelial cell line</i> )
Rp8-pCPT-cGMPS	3', 5' cykliczny tioester monofosforanowy 8-(4-chlorofenylotio)guanozyny, Rp- izomer, inhibitor PKG (ang. <i>8-(4-Chlorophenylthio)guanosine- 3', 5'- cyclic monophosphorothioate, Rp- isomer</i> )

---

SERCA	pompa wapniowa zależna od ATP, zlokalizowana w siateczce sarkoplazmatycznej (ang. <i>sarcoendoplasmic reticulum calcium ATP-ase</i> )
sGC	rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (ang. <i>soluble GC</i> )
WZW-B, C	wirusowe zapalenie wątroby typu B, C
$\gamma^+$	układ transportujący argininę
$\gamma^+L$	układ transportujący argininę

## 2. WSTĘP

### 2.1 Encefalopatia wątrobowa (EW)

#### 2.1.1 Charakterystyka ogólna

Termin „encefalopatia wątrobowa” (EW) obejmuje spektrum zaburzeń umysłowych/psychicznych, które obserwuje się u pacjentów ze schorzeniami wątroby. Ze względu na przyczyny i przebieg choroby można wyróżnić dwa podstawowe typy EW: ostrą i przewlekłą. Ostra EW rozwija się na skutek niewydolności wątroby po zatruciu lekami przeciwzapalnymi, takimi jak: paracetamol czy acetaminofen, lub na skutek ostrego wirusowego zapalenia wątroby (WZW typu A czy B). Ostra EW cechuje się gwałtownym przebiegiem oraz śmiertelnością sięgającą 70% (Schiodt i wsp., 1999; Ostapowicz i wsp., 2002; Vaquero i wsp., 2003). Przewlekła EW związana jest z marskością wątroby, różnej etiologii również wskutek zakażenia wirusowego wątroby typu C (WZW typu C). Szacuje się, że u około 50% pacjentów z marskością wątroby rozwija się EW (Butterworth, 2003; Poordad, 2007). Dane statystyczne wskazują na powszechność występowania marskości wątroby na różnym tle, a została ona jak dotąd zdiagnozowana u około 1 miliona populacji Unii Europejskiej. Większość pacjentów wykazuje symptomy EW, a średnia przeżycia wynosi około 15 lat. Liczba zgonów rocznie sięga 90 tysięcy, co przekracza 1,5 krotnie liczbę zgonów z powodu wypadków drogowych. Koszt rocznej terapii 1 pacjenta sięga 9 000 euro. Według danych z 2004 roku Polska z ok. 60 000 przypadków marskości wątroby, zajmuje 4 miejsce w grupie krajów UE (*dane EuroStat*). Powyższe informacje wskazują zatem, że EW stanowi znaczący problem epidemiologiczny w naszym kraju.

Objawy kliniczne EW mogą mieć różny stopień nasilenia – począwszy od relatywnie nieznacznego obniżenia jakości życia (tj. trudności w koncentracji, zaburzenia koordynacji ruchowej, zaburzenia zachowania, obniżenie zdolności prowadzenia pojazdów, itp.), aż po silne zaburzenia świadomości, stan śpiączki i często zgon. Diagnostyczne możliwości wykrycia EW opierają się w głównej mierze na określeniu poziomu amoniaku we krwi tętniczej i żylniej, technikach obrazowania mózgu (*spektroskopia magnetyczno-rezonansowa, CT*), badaniu EEG oraz testach psychometrycznych (tzw.: *number connection test, symbol-digit test, line tracing test, itd.*). Badania kliniczne, w których podział na stadia oparto na ocenie stanu umysłowego, według kryterium „West Haven”, wskazują na znaczącą korelację pomiędzy ciężkością EW a poziomem amoniaku we krwi (Prakash i Mullen, 2010)

Patomechanizm EW nie został w pełni wyjaśniony. Wśród czynników sprawczych podkreślano toksyczność podwyższonego stężenia amoniaku przechodzącego z krwi do mózgu, w synergii z innymi toksynami (m.in. *tioalkohole*, *merkaptany*, *mangan*). Na poziomie zmian związanych z neuroprzebieżnością szczególną uwagę zwracano na zmiany aktywności układów glutaminianergicznego i GABA-ergicznego, czy też rolę zlokalizowanych na astrocytach obwodowych receptorów dla benzodiazepin (Albrecht, 1998; Felipo i Butterworth, 2002, Hazell i Butterworth, 1999). Nowsze badania wykazały, że obok zmian zachodzących bezpośrednio w mózgu, na patomechanizm EW wpływają zmiany w narządach obwodowych, w tym infekcje i zmiany zapalne (Shawcross i wsp., 2010).

### 2.1.2 Neurotoksyczność amoniaku

Amoniak jako produkt uboczny reakcji metabolicznych aminokwasów oraz kwasów nukleinowych jest usuwany z krwi w tzw. cyklu mocznikowym (ornitynowym) zachodzącym w wątrobie (Shambaugh, 1977), oraz ze znacznie mniejszą wydajnością w reakcji syntezy glutaminy (Gln) w wątrobie, mięśniach szkieletowych, a także w mózgu (Visek, 1984; Cooper i Plum, 1987; Cooper, 1990). W przypadku niewydolności wątroby poziom toksycznych substancji, w tym również amoniaku, we krwi wzrasta (Butterworth, 2003) powodując hiperamonemię. U pacjentów z ostrą EW stężenie amoniaku we krwi tętniczej waha się od 9 do ~750  $\mu\text{M}$  (Bhatia i wsp., 2006). W szczurzym modelu stężenie amoniaku we krwi sięga nawet ~900  $\mu\text{M}$ , wobec poziomu kontrolnego gdzie wynosiło zaledwie 13  $\mu\text{M}$  (de Knecht i wsp., 1994).

Hipotezy kierujące badania nad mechanizmem neurotoksyczności amoniaku są pochodnymi dwóch dobrze udokumentowanych zjawisk: i) zmian w neuroprzebieżności glutaminergicznym (Felipo i Butterworth, 2002) oraz ii) wielostronnych skutków podwyższonego stężenia Gln w mózgu (Albrecht i wsp., 2010).

Zmiany w neuroprzebieżności glutamatergicznym powodowane przez amoniak rozumie się jako aktywację (uwrażliwienie) receptora NMDA dla kwasu glutaminowego (Glu) w fazie ostrej, oraz obniżenie jego aktywności w fazie przewlekłej. Następstwem tego w obu fazach są zaburzenia szlaku sygnałowego Glu-receptor NMDA – rozpuszczalna forma cyklazy guanylowej (sGC)- tlenek azotu (NO) – cykliczny GMP (cGMP). W ostrej EW dochodzi do nadmiernej aktywacji receptorów NMDA, która prowadzi do wzrostu produkcji

NO i akumulacji cGMP w mózgu (Hermenegildo i wsp., 2000; Hilgier i wsp., 2004). Dotychczas jednak wzrost syntezy cGMP traktowano na ogół jako obojętny dla patogenezy marker zwiększonej produkcji NO, który aktywuje sGC w kierunku syntezy cGMP. Podwyższony poziom NO stanowi składnik stresu oksydacyjno-nitracyjnego (ONS) prowadzącego do uszkodzenia i śmierci komórek nerwowych (Hermenegildo i wsp., 2000; Llansola i wsp., 2007). Podwyższony poziom cGMP zaobserwowano również we krwi pacjentów z ostrą EW (Schneider i wsp., 1994).

Po długotrwałym traktowaniu komórek OUN amoniakiem w warunkach *in vitro*, dochodzi do spadku uwalniania cGMP, co związane jest ze spadkiem aktywności szlaku NMDA/NO/cGMP (Llansola i wsp., 2007, Rodrigo i wsp., 2007). W przewlekłej EW, u szczurów z zespoleniem wrotno-czeczym, a także u szczurów z przewlekłą hiperamonemią, spadek aktywności szlaku NMDA/NO/cGMP łączono z silnie obniżoną aktywnością nNOS (Rodrigo i wsp., 2007), za co odpowiadała kinaza białkowa II fosforylująca nNOS w miejscu Ser847 (El-Mlili i wsp., 2008). Dodatkowo zmianom może podlegać aktywacja kinazy PKG, która z kolei reguluje fodylusterazy, głównie PDE5, co dodatkowo obserwowano w warunkach długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Monfort i wsp., 2004a; 2004b; Monfort i wsp., 2005).

Uszkodzenie aktywacji receptorów NMDA przez NMDA lub Glu obserwowano w hodowli neuronów po długotrwałym działaniu amoniaku (Marcaida i wsp., 1995) oraz *in vivo*, w mózgu szczurów z przewlekłą hiperamonemią (Hermenegildo i wsp., 1998). Kierunek zmian aktywności szlaku zależy od modelu doświadczalnego i struktury mózgu. U pacjentów z marskością wątroby i przewlekłą EW wykazano spadek aktywacji sGC przez NO w mózdzku i wzrost w korze, chociaż w obydwu strukturach odnotowano wzrost ekspresji podjednostek  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  sGC (Corbalan i wsp., 2002a). Również w zwierzęcych modelach przewlekłej EW obserwowano spadek aktywacji sGC przez NO w mózdzku, podczas gdy w modelach charakteryzujących się jednoczesnym uszkodzeniem wątroby i hiperamonemią, stwierdzono wzrost aktywacji sGC w korze mózgowej (Monfort i wsp., 2001; Corbalan i wsp., 2002a; Rodrigo i wsp., 2005b; Rodrigo i Felipo, 2006).

Spadek cGMP w mózgu może być przyczyną zaburzeń niektórych form uczenia i pamięci, oraz modulacji cyklu okołodobowego. Związek przyczynowy pomiędzy poziomem cGMP w mózgu i upośledzeniem procesów uczenia się w przebiegu EW wynika z roli szlaku NMDA/NO/cGMP w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (ang. *long-term*

*potentiation*, LTP), uznawanym za wykładnik procesu uczenia się. Zmniejszoną aktywację szlaku NMDA/NO/cGMP w korze mózgowej szczurów z przewlekłą EW uważa się za przyczynę upośledzenia funkcji poznawczych towarzyszących EW (Rodrigo i wsp., 2007). Ponadto, obserwowane zmiany w poziomie cGMP przekładają się na zmiany w regulacji cyklu okołodobowego, i mogą być również odpowiedzialne za zaburzenia snu u pacjentów z przewlekłą EW (Cordoba i wsp., 1998; Corbalan i wsp., 2002b).

Inny mechanizm toksycznego działania amoniaku związany jest z nadprodukcją glutaminy (Gln), do czego dochodzi w procesie detoksykacji amoniaku. W procesie tym kluczową rolę odgrywa syntetaza glutaminy (GS), enzym o astrocytarnej lokalizacji (Martinez-Hernandez i wsp., 1977; Norenberg i wsp., 1991). Sugeruje się, że bezpośredni efekt osmotyczny Gln (Hilgier i Olson, 1994; Willard-Mack i wsp., 1996) oraz deficyt energii związany z jej nadmierną syntezą w astrocytach (Takahashi i wsp., 1991), ale też bezpośrednia indukcja stresu oksydacyjnego, są przyczynami sprawczymi obrzmienia tych komórek towarzyszącymi ostrej EW, i stanowią bezpośrednią przyczynę obrzęku mózgu (Master i wsp., 1999, Takahashi i wsp., 1991; Blei, 2008). Obrzmienie astrocytów obserwowano zarówno w mózgu chorych z ostrą EW (Kato i wsp., 1992), jak i w modelach zwierzęcych EW (Dixit i Chang, 1990; Blei i wsp., 1994) oraz w hodowlach astrocytów pierwotnych poddanych działaniu jonów amonowych (Rama Rao i wsp., 2003; Widmer i wsp., 2007; Albrecht i wsp., 2010).

W ostatnim czasie sądzi się, że toksyczność Gln, a zwłaszcza wywołane przez nią zaburzenia funkcji mitochondriów w następstwie otwarcia w błonie wewnętrznej kanałów mitochondrialnych, tzw. MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) (Jayakumar i wsp., 2004, 2006; Rama Rao i wsp., 2005), są skutkiem jej degradacji do Glu i amoniaku przez glutaminazę aktywowaną fosforanem (PAG) (Albrecht i Norenberg, 2006). Uważa się, że związane z obrzmieniem astrocytów kurczenie się przestrzeni pozakomórkowej jest prawdopodobnie odpowiedzialne za wzrost efektywnego okołosynaptycznego stężenia Glu (Felipo i Butterworth, 2002) i jonów potasu (Sugimoto i wsp., 1997). Z drugiej strony, deficyt energetyczny, plus spadek aktywności transporterów dla Glu (Vaquero i Butterworth, 2006), powodują obniżenie wychwytu zwrotnego Glu do astrocytów, a jego nagromadzenie się w przestrzeni pozakomórkowej prowadzi do nadaktywacji receptorów dla Glu, w tym receptora NMDA (Felipo i Butterworth, 2002). Wzmożona synteza NO w warunkach nadpobudzenia receptora NMDA przez jony amonowe skutkuje nitracją bądź nitrozylacją GS, skutkując spadkiem jej aktywności (Schliess i wsp., 2002; Kosenko i wsp., 2003b). Gromadzący się NO

może zatem częściowo hamować aktywność GS, co z kolei prowadzi do upośledzenia detoksykacji amoniaku.

Uważa się, że w początkowej fazie EW, zanim dojdzie do nadmiernej akumulacji Gln, obrzęk mózgu związany jest z pobudzeniem receptora NMDA. Obserwuje się to u szczurów z zespołem wrotno-układowym, gdzie obrzęk pojawia się zanim dojdzie do mierzalnego wzrostu poziomu Gln w mózgu, natomiast zapobiega mu podanie inhibitora syntazy NO (Larsen i wsp., 2001). Z kolei zahamowanie poszczególnych etapów szlaku receptor NMDA/NO/cGMP łagodzi obrzmienie komórek w skrawkach mózgu poddanych działaniu jonów amonowych, pomimo utrzymującego się podwyższonego poziomu Gln (Zielińska i wsp., 2003). Czynnikiem bezpośrednio promującym obrzęk byłaby zatem nadprodukcja NO, wtórna do aktywacji szlaku NMDA/NO/cGMP przez amoniak. Dodatkowo jednak wiadomo, że do indukcji stresu oksydacyjnego w astrocytach może dochodzić w sposób bezpośredni, na skutek aktywacji oksydazy NADPH przez amoniak (Reinehr i wsp., 2007).

Wzajemna współzależność dwóch podstawowych mechanizmów toksycznego działania amoniaku nie została jak do tej pory zweryfikowana. Należy wziąć zatem pod uwagę możliwość wzajemnego potęgowania się skutków aktywacji szlaku NMDA/NO/cGMP i gromadzenia się Gln w zaawansowanych stadiach choroby. Dlatego też w niniejszej rozprawie postanowiono zbadać wzajemny wpływ wspomnianych mechanizmów, a dokładniej modulujące działanie Gln na szlak sygnałowy Glu-receptor NMDA – sGC - NO – cGMP.

Mechanizm obrzęku mózgu w EW ma głównie charakter cytotoksyczny (Ranjan i wsp., 2005). Obrzęk cytotoksyczny jest pochodną metabolicznych skutków nadmiernego gromadzenia się amoniaku: zaliczamy do nich Gln i stres oksydacyjno-nitracynny (ONS), a nadto zmiany wewnątrzkomórkowego pH oraz wzrost stężenia Glu,  $K^+$  i mleczanu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w mózgu (Vaquero i wsp., 2004), co w efekcie prowadzi do obrzmienia astrocytów. Z drugiej strony, są dane wskazujące na to, iż EW towarzyszą subtelne zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) (Kato i wsp., 1992). Zmiany barierowe, o których będzie mowa w odrębnym fragmencie tekstu oraz zaburzenia mózgowego przepływu krwi (CBF), stanowiące jeden z najczęściej występujących objawów u chorych z hiperamonemią towarzyszącą ostrej niewydolności wątroby (Larsen i wsp., 2001), przemawiają za współdziałaniem czynnika wazogennego w hiperamonemicznym obrzęku mózgu. U zwierząt z doświadczalną EW, obrzęk mózgu mierzony wzrostem



zawartości wody, bądź spadkiem ciężaru właściwego, pozostaje w związku przyczynowym ze zwiększonym CBF (Cordoba i wsp., 1999), a najświeższe badania wskazują na lepszą korelację czasową obrzęku ze wzrostem CBF, niż z gromadzeniem się Gln w mózgu (Larsen i wsp., 2001, Schliess i wsp., 2006). Jednym z istotnych objawów ostrej EW jest upośledzenie autoregulacji krążenia mózgowego (Vaquero i wsp., 2004). U większości chorych obserwuje się tzw. przekrwienie (hiperemię) związane z obrzękiem mózgu i wzrostem ciśnienia śródczaszkowego. Objawy te są główną przyczyną wysokiej śmiertelności w przebiegu EW (Vaquero i wsp., 2004; Aggarwal i wsp., 2005).

Wazogeny, a po części także i cytotoksyczny obrzęk mózgu może być związany z dysfunkcją komórek śródbłonna mikronaczyń mózgu. W regulacji krążenia mózgowego, a także w przepuszczalności BBB (Chen i wsp., 2000) kluczową rolę odgrywają zmiany w tych komórkach zawartości jonów wapnia wewnątrzkomórkowego  $[Ca^{2+}]_i$  (Ledoux i wsp., 2006). Wykazano na przykład, że peptyd natriuretyczny typu B (BNP), poprzez aktywację receptora NPRA, powoduje wzrost poziomu  $[Ca^{2+}]_i$  w komórkach śródbłonna obwodowych naczyń krwionośnych (Zolle i wsp., 2000). Inny NP, peptyd natriuretyczny typu C (CNP) stanowi formę dominującą spośród wszystkich NP w OUN, a zwłaszcza w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych, (Vigne i wsp., 1994; Kone, 2001). Przypuszcza się, że szlak CNP/NPRB/cGMP, aktywny w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych (Vigne i Frelin, 1992) może uczestniczyć w regulacji krążenia mózgowego (Chen i Burnett, 1998) oraz wpływać na przepuszczalność BBB (Vigne i wsp., 1994; Chen i wsp., 2000).

Zmiany BBB w EW do niedawna uważano za pomijalne: wyjątek stanowiły najcięższe przypadki ostrej EW, w których dokumentowano przerwanie bariery (Traber i wsp., 1987; Kato i wsp., 1992; Blei, 2005). Prace powstające w ostatnich dziesięcioleciach wskazują, że subtelne zmiany mogą towarzyszyć EW o umiarkowanym nasileniu. Oprócz obserwowanej znacznej wakuolizacji i powiększenia komórek śródbłonna naczyń mózgowych oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej, sugerującej zwiększenie przepuszczalności i transportu pinocytarnego w obrębie BBB (Kato i wsp., 1992; Matkowskyj i wsp., 1999) zaobserwowano zmieniony skład lipidowy oraz zmienioną płynność błon komórkowych w korze mózgowej szczurów z ostrą hiperamonemią, indukowaną tioacetamidem (Swapna i wsp., 2006). Dodatkowo kilka doniesień bezpośrednio wskazuje na zmiany w ekspresji białek tworzących tzw. połączenia ścisłe (ang. *tight junction*) między komórkami śródbłonna (Belanger i wsp., 2007; Chen i wsp., 2009, Lv i wsp., 2010), a zatem warunkujących prawidłowe funkcjonowanie BBB.

Warto podkreślić, że amoniak nie jest jedynym czynnikiem toksycznym w EW: spotyka się przypadki braku korelacji pomiędzy poziomem amoniaku, a stopniem zaawansowania choroby (Lockwood, 2004). Stąd coraz częściej podkreśla się zaangażowanie mechanizmów modulujących jego neurotoksyczność, w pierwszym rzędzie zapalenia systemowego (Rolando i wsp., 2000, Jalan i wsp., 2004; Shawcross i wsp., 2004; Arias i wsp., 2006, Wright i Jalan, 2007). Czynniki „pozaamoniakalne” nie będą jednak przedmiotem szczegółowych rozważań w niniejszej rozprawie.

## 2.2 Szlaki sygnałowe związane z cGMP

Zmiany stężenia cGMP są uważane za jeden z wykładników molekularnych EW w OUN (por. § 2.1.1): fakt ten usprawiedliwia przypomnienie zasadniczych elementów wiedzy na temat jego syntezy

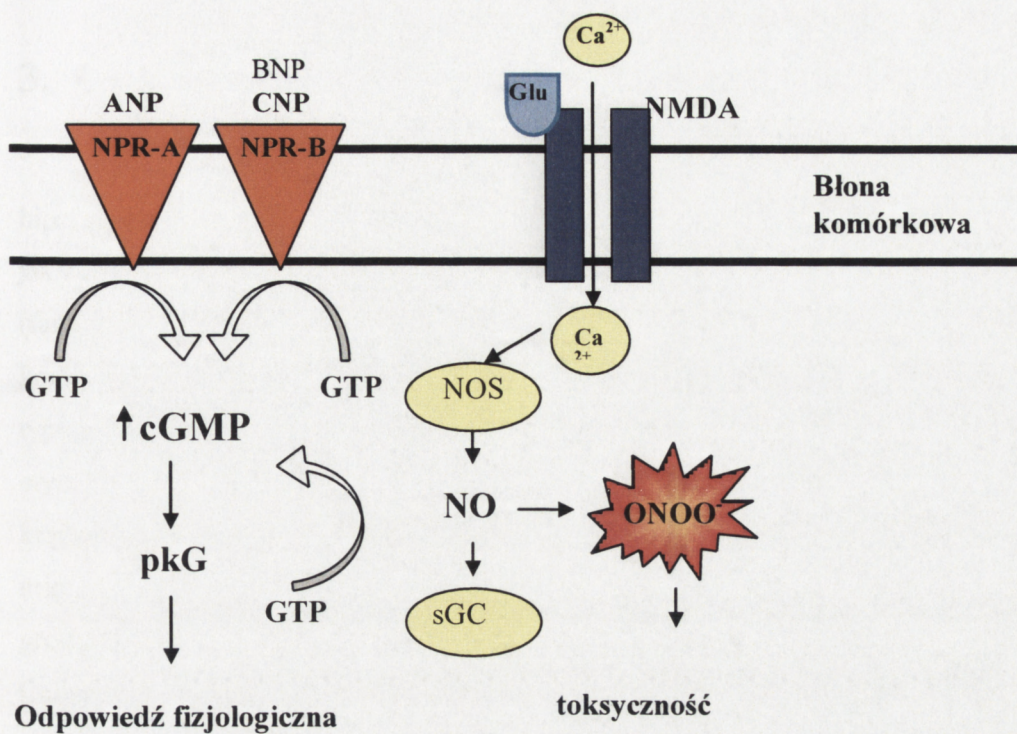
Cykliczny 3', 5' guanozynomonofosforanu (cGMP) należy do wtórnych przekaźników i bierze udział w różnych procesach fizjologicznych, np.: wazodylatacji (Pelligrino i Wang, 1998; Okamura i wsp., 2002; Mergia i wsp., 2006), apoptozie (Thippeswamy i wsp., 2005; Ciani i wsp., 2006), regulacji kształtu i objętości komórki (Sauviat i wsp., 2006; Boran i Garcia, 2007), czy procesach charakterystycznych dla układu nerwowego, jak uczenie się i pamięć (Monfort i wsp., 2004a;b), neurogenezie (Wang i wsp., 2005), kontroli cyklu okołodobowego (Golombek i wsp., 2004), fototransdukcji (Diederer i wsp., 2007). Za syntezę cGMP odpowiadają dwie formy cyklaz guanylowych (GC): rozpuszczalna i związana z błonami (Lukas i wsp., 2000).

*Rozpuszczalna cyklaza guanylanowa* (ang. *soluble*, sGC) (EC 4.6.1.2) o cytozolowej lokalizacji jest heterodimerem złożonym z podjednostek  $\alpha$  ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ) i  $\beta$  ( $\beta 1$  i  $\beta 2$ ), z których każda zbudowana jest z trzech domen funkcjonalnych. Do aktywności enzymatycznej wymagana jest obecność obydwu podjednostek, ale tylko podjednostka  $\beta$  posiada aktywną domenę katalityczną (Harteneck i wsp., 1990; Liu i wsp., 1997; Lucas i wsp., 2000). Rozpuszczalna GC określana też mianem GC zależnej od tlenku azotu (NO), (Arnold i wsp., 1977; Ignarro i wsp., 1987; Zhao i wsp., 1999; Cary i wsp., 2005) jest obecna w mózgu zarówno w neuronach jak i w astrocytach (de Vente i Steinbusch, 1992).

*Cyklazy guanylanowe związane z błonami* tworzą drugą grupę enzymów syntetyzujących cGMP (ang. *particulate*, pGC) (EC 4.6.1.2). Występują jako oligomery lub homodimery

zbudowane z podjednostek a te, z domen: zewnątrzkomórkowej, międzybłonowej, domeny homologicznej do kinaz oraz domeny katalitycznej (Lucas i wsp., 2000). Spośród znanych 7 izoform tego enzymu, dwie (pGC-A lub NPR1 lub NPRA(ang. *natriuretic peptide receptor A*), pGC-B lub NPR2 lub NPRB (ang. *natriuretic peptide receptor B*) są receptorami peptydów natriuretycznych (NP): ANP (ang. atrial NP), BNP (ang. brain NP) oraz CNP (ang. C-type NP), a jedna – pGC-C lub NPRC (ang. *natriuretic peptide receptor C*)- receptorem enterotoksyn bakteryjnych, guanyliny i uroguanyliny, a ponadto jako tzw. „clearance receptor” odpowiada za usuwanie ligandów (Lucas i wsp., 2000). NP wiążą się z różnym powinowactwem do poszczególnych receptorów. Przyjmuje się, że NPR1 wiąże zarówno ANP jak i BNP, natomiast NPR2 przede wszystkim CNP (Suga i wsp., 1992; Potter i wsp., 2006). W OUN w największej ilości występuje NPR2 (Lucas i wsp., 2000; Pandey, 2005), forma NPRA, w największej ilości występuje w astrocytach (de Vente i Steinbusch, 1992). Peptyd CNP jest dominującą formą występującą w mózgu (Kone, 2001), a najważniejszym miejscem jego syntezy są komórki śródbłonna obwodowych (Suga i wsp., 1992; Chen i Burnett, 1998) i mózgowych naczyń krwionośnych (Vigne i wsp., 1994), co jest związane z jego działaniem wazoregulacyjnym (Chen i Burnett, 1998).

Cykliczny GMP działa poprzez trzy główne efekторы: kinazy białkowe zależne od GMP (ang. *protein kinase G*, PKG), kanały jonowe regulowane przez cGMP (ang. *cyclic nucleotide gated ion channels*, CNG) oraz fosfodiesterazy (ang. *phosphodiesterase*, PDE) (Lucas i wsp., 2000). Usuwanie cGMP z komórki zachodzi w wyniku hydrolizy wiązania fosfodiesterowego przez wspomniane fosfodiesterazy, z których w degradacji cGMP spośród znanych 11 enzymów, biorą udział PDE5, 6 i 9 oraz degradujące zarówno cGMP jak i cAMP PDE1, 2, 3, 10 oraz 11 (Lugnier, 2006). Usuwanie cGMP z komórki odbywa się również na drodze jego transportu na zewnątrz przez zależne od ATP transportery należące do rodziny MRP (ang. *multidrug resistance protein*), do których zaliczamy MRP4, MRP5 i MRP8 (Sager, 2004). Szlaki sygnałowe związane z cGMP przedstawiono na Ryc. 1.



**Ryc. 1.** Szlaki sygnałowe związane z cGMP. Aktywacja receptorów NMDA powoduje napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , aktywację NOS i syntezę NO. Rozpuszczalna forma cyklazy guanylowej (sGC) ulega aktywacji, w wyniku czego następuje synteza cGMP z GTP. Peptydy natriuretyczne: ANP, BNP i CNP aktywują receptory NPR-A i NPR-B, co również prowadzi do syntezy cGMP.

### 3. CEL ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

Zmiany poziomu cGMP stanowią istotny element w patogenezie encefalopatii hiperamonemicznych, w tym EW. W dotychczasowych badaniach, zmiany te rozpatrywano jako efekt oddziaływania przez amoniak na receptory NMDA i następnie, podwyższenia (faza ostra EW) lub obniżenia (faza przewlekła EW) aktywności szlaku NMDA/NO/cGMP w komórkach nerwowych. Komórki nerwowe, nie są jednak jedynym, a nawet najistotniejszym typem komórek OUN, na które oddziałuje amoniak. Objawy EW będące główną przyczyną wysokiej śmiertelności w przebiegu schorzenia, takie jak obrzęk mózgu i upośledzenie krążenia mózgowego, wynikają przede wszystkim z zaburzenia funkcji astrocytów, a w dużej mierze także komórek śródbłonka naczyń mózgowych. Do tej pory nie zbadano wpływu gromadzącego się amoniaku na syntezę cGMP w typach komórek OUN innych niż neurony. Celem rozprawy było ustalenie udziału szlaków sygnałowych związanych z produkcją cGMP, w astrocytach oraz w komórkach śródbłonka naczyń mózgowych, w warunkach toksycznego działania amoniaku *in vitro* lub/i *in vivo*. Wysoka aktywność w tych komórkach szlaku syntezy cGMP angażującego błonowe cyklazy guanylowe, stanowiła przesłankę do przebadania w nich obu dróg i) Glu/receptor NMDA/tlenek azotu/cGMP oraz ii) NP/cGMP.

Amoniak w mózgu metabolizowany jest w astrocytach do glutaminy (Gln). Gromadzenie się w mózgu nadmiaru Gln uważa się za czynnik sprawczy obrzęcia astrocytów i co za tym idzie, hiperamonemicznego obrzęku mózgu. Powstało pytanie, czy i w jakim stopniu, dwa zasadnicze elementy patogenezy EW: zmiany syntezy cGMP i gromadzenie się Gln są ze sobą powiązane?

#### **Cele szczegółowe dotyczyły:**

1. Zbadania zmian ekspresji i aktywności cyklaz guanylowych: rozpuszczalnej i związanej z błonami, w warunkach toksycznego działania amoniaku w hodowli pierwotnej astrocytów szczurzych.
2. Zbadania ekspresji i funkcji receptora dla peptydu natriuretycznego typu C (NPR2), w hodowli komórek śródbłonka naczyń mózgowych w warunkach toksycznego działania amoniaku.

3. Wykazania ekspresji i roli swoiście działającego liganda dla receptora peptydu natriuretycznego B (NPR2), peptydu natriuretycznego C (CNP) w szczurzym modelu hiperamonemii *in vivo*.
4. Zbadania modulującego wpływu Gln na szlak Glu/receptor NMDA/NO/cGMP w ostrym szczurzym modelu hiperamonemii.
5. Wyjaśnienia molekularnego podłoża modulującego wpływu Gln na szlak Glu/receptor NMDA/NO/cGMP w podostrym szczurzym modelu hiperamonemii.

## 4. WYNIKI I DYSKUSJA

### 4.1 Zmiany ekspresji i aktywności cyklaz guanylowych: rozpuszczalnej (sGC) i związanej z błonami (pGC) w hodowli pierwotnej astrocytów szczurzych.

#### Omówienie publikacji I

Konopacka A., Fręsko I., Piaskowski S., Albrecht J., Zielińska M., Ammonia affects the activity and expression of soluble and particulate GC in cultured rat astrocytes.

*Neurochemistry International* 48, 553-558, 2006.

IF = 3,261

Zmiany stężenia cGMP są uważane za jedne z wykładników molekularnych EW w OUN (Corbalan i wsp., 2002b; Rodrigo i Felipo, 2006). Dochodzi do nich zarówno w warunkach hiperamonemii prostej, jak i w modelach HE związanych z upośledzeniem funkcji wątroby (Hermenegildo i wsp., 1998; Corbalan i wsp., 2002a; Hilgier i wsp., 2004, Rodrigo i Felipo, 2006). Zarówno w hiperamonemii, jak i w ostrej EW obserwuje się nadmierną aktywację szlaku NMDA/NO/cGMP (Hermenegildo i wsp., 2000; Hilgier i wsp., 2004), natomiast w warunkach przewlekłej hiperamonemii dochodzi do spadku syntezy cGMP (Llansola i wsp., 2007). Wykazano, że zmianom poziomowi cGMP towarzyszy wzrost ekspresji białek sGC $\alpha$ 1 oraz  $\alpha$ 2, przy niezmienionej ekspresji podjednostki  $\beta$ 1 (Monfort i wsp., 2001; Corbalan i wsp., 2002a). Podobne zmiany dotyczyły chorych z marskością wątroby (Corbalan i wsp., 2002b).

Zaburzenia syntezy cGMP obserwowane w mózgu najczęściej interpretowano wyłącznie jako zmiany zachodzące w neuronach (Rodrigo i wsp., 2005a) i związane jedynie ze zmianami aktywności sGC. Tymczasem astrocyty oraz komórki śródbłonka naczyń mózgowych budujące BBB posiadają obie formy cyklaz guanylowych odpowiadających za syntezę cGMP: sGC i pGC (Sporbert i wsp., 1999; Lucas i wsp., 2000). Dodatkowo, obrzęk mózgu i upośledzenie krążenia mózgowego będące jednymi z głównych objawów EW, uważa się za pochodną zmian zachodzących w astrocytach i śródbłonku.

Badania zawarte w publikacji I poszerzają dotychczasowy stan wiedzy o informacji, że i) zmiany syntezy cGMP w odpowiedzi na amoniak zachodzą nie tylko w neuronach, ale także w astrocytach, oraz ii) zaburzeniom ulega podstawowa (niestymulowana) synteza



cGMP co wiąże się ze zmianami zachodzącymi na poziomie ekspresji obu form cyklicznych guanylowych: nie tylko sGC, ale również pGC.

W hodowli pierwotnej astrocytów amoniak w stężeniu uznawanym za patofizjologiczne (5mM) stymulował syntezę cGMP (po 1h), a następnie ją obniżał (po 24h). Zmiany w syntezie cGMP korelowały ze zmianami na poziomie ekspresji mRNA i białka podjednostek sGC:  $\alpha 1$  oraz  $\beta 1$ . Obserwowany wzrost cGMP w krótkim czasie toksycznego działania amoniaku wynikał ze stymulującego wpływu amoniaku na aktywność obu form cyklicznych guanylowych, ewentualnie z innych możliwych przyczyn, nie badanych w publikacji, takich jak np.: dostępność substratu (GTP), obecność NO/NP, obniżenie transportu cGMP. Fakt, że wszystkie inkubacje prowadzono w obecności inhibitora PDE, pozwolił na nieuwzględnienie przy interpretowaniu wyników wpływu amoniaku na degradację cGMP, jakkolwiek taki wpływ mógłby w szczególnych warunkach (np. wzmocnienia synaptycznego) mógłby mieć miejsce (Monfort i wsp., 2004a;b).

Najczęściej występującą izoformą cyklicznej guanylowej związanej z błonami w mózgu jest receptor NPR2 (Lucas i wsp., 2000; Pandey, 2005), który odpowiada za syntezę znacznej części cGMP w OUN. Drugi z receptorów dla peptydów natriuretycznych biorący udział w syntezie cGMP to NPR1, zlokalizowany głównie w astrocytach (de Vente i Steinbusch, 1992). W pracy wykazano podwyższoną ekspresję mRNA dla obu receptorów po 24h inkubacji astrocytów w obecności amoniaku, co sugerowało, iż w przeciwieństwie do sGC, amoniak mógł podwyższać aktywność pGC. Hipotezę tę zweryfikowano przez wykazanie wzrostu syntezy cGMP pod wpływem amoniaku w obecności inhibitora sGC.

Bardziej wyraźne zmiany syntezy cGMP w astrocytach traktowanych 5 mM amoniakiem w porównaniu ze zmianami wywołanymi 1 mM stężeniem amoniaku, obserwowanymi wyłącznie po 24 h inkubacji nie korelowały ze zmianami poziomu ekspresji białka sGC oraz mRNA genów kodujących białka NPR1 i 2. Nieznaczące zmiany syntezy cGMP, lub ich brak przy niższym stężeniu amoniaku, potwierdzają wcześniejsze obserwacje Rodrigo i wsp. (2005a), którzy nie obserwowali zmian w astrocytach poddanych działaniu 0,1 mM amoniaku, ani na poziomie ekspresji sGC, ani na poziomie produkcji cGMP, po stymulacji donorem NO. Należy zaznaczyć, że w większości badań dotyczących różnych aspektów toksyczności amoniaku w astrocytach *in vitro* stosowano 1 mM lub wyższe stężenia amoniaku (Hertz i wsp., 2000), oraz to, iż w mózgu pacjentów oraz zwierząt z ostrą hiperamonemią obserwowano stężenia amoniaku przekraczające 1 mM (Swain i wsp., 1992; Szerb i Butterworth, 1992; Mans i wsp., 1994).



Ostatnie badania wskazują, że u pacjentów z marskością wątroby dochodzi do wzrostu poziomu liganda pGC, ANP, we krwi (Montoliu i wsp., 2005). Efekty tego wzrostu nie są znane, wykazano jednak, że podobny wzrost poziomu ANP we krwi, występujący po urazach mózgu, przyczynia się do zwiększenia przepuszczalności BBB i obrzęku typu wazogennego (Fukui i wsp., 2003) (por. dyskusję poniżej).

## 4.2 Synteza cGMP i zależny od niej transport jonów $\text{Ca}^{2+}$ w linii komórek śródbłonka naczyń mózgowych RBE-4 w warunkach hiperamonemii.

### Omówienie publikacji II

Konopacka A., Zielińska M., Albrecht J., Ammonia inhibits the C-type natriuretic peptide-dependent cyclic GMP synthesis and calcium accumulation in a rat brain endothelial cell line.

*Neurochemistry International* 52, 1160-1166, 2008.

IF = 3,541

Komórki śródbłonka naczyń mózgowych szczura RBE-4 (*Rat Brain Endothelial cell line*) są z powodzeniem stosowane jako model BBB, posiadają bowiem właściwości natywnego śródbłonka naczyń mózgowych, m.inn.: brak przepuszczalności dla cząsteczek, które w warunkach fizjologicznych *in vivo* nie przekraczają BBB czy obecność niektórych białek wchodzących w skład tzw. połączeń ścisłych (Roux i Couraud, 2005). Dodatkowo, komórki tej linii nie syntetyzują sGC, (Sporbert i wsp., 1999), co czyni je użytecznymi do badań nad alternatywnym szlakiem syntezy cGMP, a aktywującym błonową cyklazę guanylową (pGC).

Peptyd natriuretyczny typu C (CNP) dominuje w OUN (Kone, 2001), a miejscem jego syntezy jest śródbłonek naczyń mózgowych (Vigne i wsp., 1994), który jednocześnie, poprzez szlak syntezy cGMP, aktywnie uczestniczy w regulacji wazodylatacji i krążenia mózgowego (Mori i wsp., 1997; Chen i Burnett, 1998). Jak opisano w § 2.2.1. procesy te ulegają zaburzeniom w EW. Duża liczba miejsc wiążących CNP jest cechą, która odróżnia komórki śródbłonka naczyń mózgowych od komórek śródbłonka aorty, zaś zachodzący za pośrednictwem receptora NPR2 proces syntezy cGMP jest bardzo wydajny (Vigne i Frelin, 1992; Vigne i wsp., 1994). Badania *in vitro* przeprowadzone na komórkach śródbłonka

naczyń wykazały istotną, aczkolwiek różną rolę obu cyklaz: sGC i pGC, w transporcie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , wynikającą wg autorów z odmiennej lokalizacji wewnątrzkomórkowej tych enzymów (Zolle i wsp., 2000).

W publikacji II wykazano, że dodanie  $1\mu\text{M}$  CNP indukowało syntezę cGMP w komórkach linii RBE-4, zaś amoniak w stężeniu  $5\text{ mM}$  ten wzrost hamował (po 45 minutach stymulacji CNP) w stosunku do komórek kontrolnych, przy niezmienionej podstawowej syntezie cGMP. Zaobserwowano, że amoniak powodował znaczący spadek ilości CNP związanego z receptorem NPR2, co mogło wynikać zarówno ze zmniejszenia ilości receptora NPR2 dostępnego na powierzchni komórki, lub z uszkodzenia wiązania CNP do receptora. Internalizacja receptora może również zmniejszać dostępność receptora na powierzchni komórki, bowiem takie zjawisko wywołane przyłączeniem NP, opisywano w odniesieniu do receptora NPR1 (Pandey, 2001; Fan i wsp., 2005). Najwyższy poziom internalizacji obserwowano po  $\sim 10$  min od podania NP (Pandey, 2001). W naszych badaniach nie wykazano internalizacji NPR2 wskutek interakcji z CNP, a opisany proces nie wpływał na efekt działania amoniaku, ponieważ spadek ilości związanego CNP obserwowano już po 20 sekundach inkubacji a wyniki uzyskane w poszczególnych punktach czasowych nie różniły się wzajemnie.

Jak wspomniano w podrozdziale 2.3. jednym z efektorów cGMP jest PKG, odgrywająca kluczową rolę w transporcie  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang i Robinson, 1997). Najczęściej spotykanym efektem aktywacji PKG jest obniżenie poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , natomiast odwrotny efekt obserwowano w wyniku podania PKG bezpośrednio do neuronów ślimaka (Paupardin-Tritsch i wsp., 1986). Podanie BNP do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych powodowało wzrost poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Zolle i wsp., 2000). W publikacji II wykazano wzrost poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  w komórkach RBE-4 na skutek stymulacji peptydem CNP. Komórki kontrolne RBE-4, bez stymulacji CNP, wykazywały niezmienny poziom  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  przez 1,5 h. Zastosowanie swoistego inhibitora kanałów LTCC blokowało stymulowany przez CNP napływ  $\text{Ca}^{2+}$ . Proces regulacji kanałów LTCC przez CNP obserwowano w neuronach olbrzymiokomórkowych, jednakże tam efekt ten był niezależny od cGMP i zachodził za pośrednictwem receptora NPR-C (ang. *natriuretic peptide clearance receptor*) (Rose i wsp., 2005b). W omawianej pracy, w komórkach RBE-4 wzrost poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na skutek stymulacji CNP był jednoznacznie związany z aktywacją szlaku cGMP/PKG, ponieważ zastosowanie Rp8-pCPT-cGMPS, inhibitora PKG, całkowicie znosiło ten efekt. W literaturze opisywano zarówno hamujące (Nishimura i wsp., 1992; Meriney i wsp., 1994) jak i

stymulujące efekty działania PKG (Paupardin-Tritsch i wsp., 1986; Wang i wsp., 2000; Zsombok i wsp., 2005), dlatego można uznać, iż mechanizm regulacji kanałów LTCC przez PKG zależny jest od typu komórek czy też warunków doświadczalnych.

W komórkach RBE-4 poddanych działaniu 5 mM amoniaku przez 1 h zaobserwowano nieznaczny wzrost zawartości  $Ca^{2+}$  w odpowiedzi na CNP. Mechanizm, za pomocą którego amoniak interferuje z zależnymi od CNP zmianami  $[Ca^{2+}]_i$ ; dodatkowo obejmował nieznaczną akumulację  $[Ca^{2+}]_i$  obserwowaną w buforze pozbawionym jonów  $Ca^{2+}$ , wynikającą prawdopodobnie z uwalniania wapnia z rezerwuarów wewnątrzkomórkowych. Również ta, zależna od CNP i niezależna od obecności  $Ca^{2+}$  zewnątrzkomórkowego, akumulacja  $[Ca^{2+}]_i$ , była blokowana przez inhibitor PKG, co świadczy o zaangażowaniu szlaku cGMP/PKG. Mobilizację  $[Ca^{2+}]_i$  z retikulum endoplazmatycznego w astrocytach (Rose i wsp., 2005a; Hillmann i wsp., 2008) oraz komórkach śródbłonna aorty (Danthuluri i wsp., 1990) pod wpływem amoniaku, tłumaczono jako skutek alkalinizacji cytozolu, natomiast wzrost poziomu  $[Ca^{2+}]_i$  był niezależny od  $Ca^{2+}$  zewnątrzkomórkowego.

Wyniki przedstawione w publikacji II sugerują, że zależność od  $Ca^{2+}$  zewnątrzkomórkowego jest cechą, która odróżnia wzrost zawartości  $[Ca^{2+}]_i$  następujący w komórkach inkubowanych z amoniakiem pod wpływem stymulacji CNP od wzrostu zawartości  $[Ca^{2+}]_i$  pod wpływem samego amoniaku. Zastąpienie jonów  $Na^+$ , N-metylo-D-glukaminą (NMDG), powodowało stopniowy wzrost zawartości  $[Ca^{2+}]_i$  w komórkach RBE-4 na skutek stymulacji CNP. Podobny efekt Zolle i wsp. (2000) w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, interpretowali jako zahamowanie wypływu  $Ca^{2+}$  przy udziale pompy  $Ca^{2+}$  zależnej od ATP (ang. *plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase*, PMCA).

Cykliczny GMP reguluje poziom  $[Ca^{2+}]_i$  na kilku poziomach. W komórkach śródbłonna naczyń mózgowych cGMP obniża aktywność  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP-azy (Pontiggia i wsp., 1998), prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej i zwiększenia napływu  $Ca^{2+}$  przez kanały LTCC. Spadek akumulacji cGMP pod wpływem amoniaku mógłby zatem przyczynić się do wzrostu aktywności  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP-azy, a pośrednio, do zmniejszenia depolaryzacji błony komórkowej i napływu  $Ca^{2+}$ . W mózgu szczurów we wczesnych stadiach encefalopatii hiperamonemicznej (Albrecht i wsp., 1985) oraz z ostrą hiperamonemią (Kosenko i wsp., 1994) wykazano wzrost aktywności  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP-azy.

Aktywacja szlaku CNP/NPR2/cGMP w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych (Vigne i Frelin, 1992) może również aktywnie uczestniczyć w regulacji krążenia mózgowego (Chen i Burnett, 1998), a proces ten jest zależny od zmian zawartości  $[Ca^{2+}]_i$  (Tiruppathi i wsp., 2002, 2006). Akumulacja cGMP w komórkach mięśniowych naczyń inicjuje procesy prowadzące do spadku poziomu  $[Ca^{2+}]_i$ , czego wynikiem jest rozszerzenie naczyń krwionośnych (Weisbrod i wsp., 1998), zaś wzrost poziomu  $[Ca^{2+}]_i$  w komórkach mięśniowych powoduje ich skurcz prowadzący do zwężenia naczynia. W komórkach śródbłonna jest odwrotnie: wzrost poziomu  $[Ca^{2+}]_i$  przyczynia się do nasilenia produkcji NO, które w rezultacie prowadzi do rozszerzenia naczyń (Ledoux i wsp., 2006).

Wyniki zawarte w publikacji II wskazują, że aktywacja szlaku CNP/cGMP/PKG powoduje napływ  $Ca^{2+}$  do komórki, co podkreśla ważną rolę tego szlaku w procesie wazodylatacji. Zaś upośledzenie syntezy cGMP w odpowiedzi na CNP pod wpływem amoniaku, oraz związane z tym ograniczenie napływu  $Ca^{2+}$  do komórek śródbłonna może być jedną z przyczyn zaburzeń krążenia mózgowego obserwowanych u pacjentów oraz zwierząt z EW (Vaquero i wsp., 2004).

W przedstawionej interpretacji należy również wziąć pod uwagę fakt, iż jedną z istotnych dla procesu wazodylatacji konsekwencji wzrostu stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych jest produkcja NO. Syntetyzowany NO przedostaje się do mięśni gładkich, gdzie stymuluje sGC oraz działa również w miejscu produkcji. Jak wspomniano, komórki RBE-4 nie zawierają sGC, dlatego też nie rozważano możliwości modulacji aktywności szlaku CNP/NPR2/PKG przez sGC, co obserwowano w niektórych modelach doświadczalnych (de Frutos i wsp., 2003; Madhani i wsp., 2006). Role sGC i pGC w komórkach śródbłonna wydają się podzielone: cGMP syntetyzowany przez pGC hamował wpływ  $Ca^{2+}$  z komórki, natomiast pula syntetyzowana przez sGC była odpowiedzialna za zahamowanie wychwytu  $Ca^{2+}$  do retikulum endoplazmatycznego (Zolle i wsp., 2000). Wyniki te są zgodne z dobrze udokumentowanym zjawiskiem rozkurczowego działania CNP i NO. W wyniku stymulacji CNP powstaje znacznie więcej cGMP, niż po stymulacji NO, zaś rozkurcz komórek śródbłonna pod wpływem CNP jest znacznie mniejszy (Rivero-Vilches i wsp., 2003).

Aktywacja szlaku CNP/NPR2/cGMP w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych może wpływać na przepuszczalność BBB (Vigne i wsp., 1994; Chen i wsp., 2000). Najświeższe badania sugerują naruszenie integralności BBB w modelach hiperamonemii

ostrej (Chen i wsp., 2009; Lv i wsp., 2010). Obniżenie syntezy cGMP w odpowiedzi na CNP w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych poddanych działaniu amoniaku oraz związane z tym zaburzenia transportu  $[Ca^{2+}]_i$  mogą być przyczyną mniej lub bardziej subtelnych zmian w błonie komórkowej, cytoszkielecie lub połączeniach ścisłych pomiędzy komórkami.

Zwiększenie poziomu cGMP mogłoby prowadzić do przywrócenia równowagi, analogicznie do tego, co obserwowano w hodowli ludzkich komórek śródbłonna naczyń mózgowych poddanych działaniu cytokin prozapalnych (Wong i wsp., 2004).

### **4.3 Rola liganda dla receptora peptydu natriuretycznego 2 (NPR2), peptydu natriuretycznego C (CNP) w szczurzym modelu hiperamonemii *in vivo*.**

#### **Omówienie publikacji III**

**Zielińska M., Fręsko I., Konopacka A., Felipo V., Albrecht J., Hyperammonemia inhibits the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) - mediated cyclic GMP synthesis in the astrocytic compartment of rat cerebral cortex slices.**

*Neurotoxicology* 28, 1260-1263, 2007.

IF = 3,009

Cykliczny GMP moduluje wiele istotnych funkcji korowych, takich jak uwalnianie niektórych neurotransmiterów z pewnych obszarów mózgu, komunikację międzykomórkową, wzmocnienie synaptyczne czy procesy uczenia się i zapamiętywania, (Boulton i wsp. 1995; Hawkins, 1996). Jak wspomniano w wielu miejscach niniejszego komentarza, zaburzenia w syntezie cGMP, jego wzmożona produkcja w modelu ostrym hiperamonemii, czy też obniżona synteza w modelu przewlekłym są najczęściej związane ze szlakiem NMDA/NO (Montoliu i wsp., 2010; Felipo i wsp., 2006). Nie mniej jednak, istniejąca alternatywna droga syntezy cGMP w odpowiedzi na interakcję peptydów natriuretycznych (NP) z ich receptorami (ang. *natriuretic peptide receptor*, NPR), stanowiła jak dotąd nieporuszony obszar badawczy.

W publikacji III badano i) wpływ hiperamonemii na syntezę cGMP w wyniku aktywacji receptora peptydu natriuretycznego 2 przez przyłączenie liganda – peptydu natriuretycznego typu C (CNP), oraz ii) typ komórek, w których proces ten się odbywa.

Spośród dwóch izoform receptorów dla peptydów natriuretycznych, których katalityczna podjednostka wykazuje aktywność cyklazy guanylowej, a tym samym syntetyzuje cGMP, w największej ilości w OUN występuje NPR2 (Lucas i wsp., 2000;

Pandey, 2005). Badania immunocytochemiczne potwierdziły jego obecność zarówno w astrocytach jak i neuronach (Deschepper, 1998; Sumners i Tang, 1992). Równolegle wiadomo, że peptyd CNP, naturalny ligand NPR2 (Herman i wsp., 1996; Koller i wsp., 1991), jest dominującą formą występującą w mózgu (Kone, 2001). Choć podstawowym miejscem syntezy CNP są komórki śródbłonka obwodowych (Suga i wsp., 1992; Chen i Burnett, 1998) i mózgowych naczyń krwionośnych (Vigne i wsp., 1994), peptyd ten jest również obecny w mózgu (Potter i wsp., 2006).

Stymulacja korowych skrawków mózgowych 1  $\mu$ M stężeniem CNP generowała  $\sim 4$  pmoli/mg/ml cGMP, wydajność procesu syntezy była zatem zbliżona do obserwowanej w obecności donora NO. Zakładając, że układ skrawkowy odzwierciedla proporcje charakterystyczne dla warunków *in situ*, synteza cGMP stymulowana przez CNP mogłaby mieć znaczenie fizjologiczne. Hiperamonemia wywołana u szczurów przez trzykrotne podanie dootrzewnowe octanu amonu, powodowała obniżenie stymulowanej przez CNP syntezy cGMP. Nie obserwowano różnic między tkanką kontrolną a pochodzącą od szczurów z hiperamonemią w ekspresji mRNA genu kodującego białko NPR2, co świadczy o posttranskrypcyjnym mechanizmie obniżenia funkcji receptora NPR2. W omawianej publikacji CNP-zależna synteza cGMP w skrawkach kontrolnych miała miejsce zarówno w neuronalnym jak i astrocytarnym kompartmentcie, ponieważ nie ulegała ona zmianie w następstwie preinkubacji skrawków w obecności fluoroocetanu, selektywnego inhibitora metabolizmu energetycznego astrocytów (Goncalves i wsp., 1995; Swanson i Graham, 1994). W skrawkach uzyskanych od szczurów z hiperamonemią, zależna od CNP synteza cGMP ulegała obniżeniu w przedziale komórkowym wrażliwym na fluoroocetan, a zatem obejmującym astrocyty. Z wielu publikacji wiadomo, że właśnie astrocyty są komórkami, które ulegają uszkodzeniu w warunkach hiperamonemii (Albrecht, 2005; Norenberg, 1996). Należy jednak wziąć również pod uwagę, że pozaneuronalną, wrażliwą na fluoroocetan część mózgu stanowią nie tylko astrocyty (Hassel i wsp., 1992; Fonnum i wsp., 1997), ale również komórki śródbłonka naczyń mózgowych (Rist i wsp., 1996) w których amoniak zmniejsza wiązanie CNP do NPR2 oraz syntezę cGMP. Udział komórek śródbłonka naczyń w odpowiedzi na hiperamonemie wydają się prawdopodobne w świetle wyników u zyskanych w publikacji III, bezpośrednio wskazujących na spadek gęstości NPR2 oraz różnych odpowiedzi komórkowych indukowanych przez CNP, w traktowanej amoniakiem linii RBE-4.

Wyniki zawarte w publikacji III jednoznacznie wykazały, że hiperamonemia wpływa nie tylko na produkcję cGMP związaną ze szlakiem aktywującym sGC, ale także szlak alternatywny, w którym do syntezy cGMP dochodzi wskutek interakcji CNP i receptora NPR2. Dodatkowo wykazano, że miejscem, gdzie szlak ten jest zmieniony są astrocyty, a być może także komórki śródbłonna naczyń.

#### **4.4 Modulujący wpływ glutaminy na pobudzenie szlaku glutaminian/receptor NMDA/NO/cGMP przez jony amonowe *in vivo* w modelu ostrym i w wyniku ich przedłużonego działania.**

##### **Omówienie publikacji IV i V**

**Hilgier W., Fręsko I., Klemenska E. Beręsewicz A., Oja S.S., Saransaari P., Albrecht J., Zielińska M.,** Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis.

*Neurobiology of Disease* 35, 75-81, 2009.

IF = 4,518

**Zielińska M., Ruszkiewicz J., Hilgier W., Fręsko I., Albrecht J.,** Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter y+LAT2 in rat cerebral cortex: implications for nitric oxide/cGMP pathway activity.

*Neurochemistry International*, doi: 10.1016/j.neuint.2010.11.015, 2010

IF = 3,541

Encefalopatię wdrobową cechują zaburzenia neuroprzebieżnictwa, głównie glutaminianergicznego, u podłoża których leżą przede wszystkim zmiany aktywności szlaku Glu-receptor NMDA- NO - cGMP (Felipo i Butterworth, 2002). Nadmierna aktywacja szlaku NMDA/NO/cGMP stanowi jeden z elementów wywołanego przez nadmiar amoniaku stresu oksydacyjno-nitracyjnego (ONS). Z drugiej strony, gromadząca się wskutek detoksykacji amoniaku Gln (Cordoba i wsp., 1996; Larsen i wsp., 2001; Kosenko i wsp., 2003a), równolegle przyczynia się do powstawania obrzmienia mózgu zarówno na drodze nierównowagi osmotycznej (Willard-Mack i wsp., 1996), jak i uszkodzenia mitochondriów i następczej indukcji ONS (Norenberg i wsp., 2004; Albrecht i Norenberg, 2006).

Wzajemnego wpływu obu zjawisk nie badano.

O możliwości modulacyjnego wpływu Gln na szlak NMDA/NO/cGMP świadczyć mogły obserwacje hamującego działania Gln na produkcję czynnika rozszerzającego naczynia EDRF (ang. *endothelial derived relaxing factor*) w tkankach obwodowych (Hecker i wsp., 1990; Sessa i wsp., 1990; Swierkosz i wsp., 1990; Arnal i wsp., 1995). Kolejną przesłankę stanowiły badania pochodzące z Zakładu Neurotoksykologii, w których podając bezpośrednio przez sondę mikrodializacyjną inhibitor syntazy glutaminy MSO wykazano dodatkowy wzrost gromadzącego się w warunkach ostrego działania amoniaku cGMP w mikrodializatach prądkowia (Hilgier i wsp., 2008).

W publikacji IV zbadano bezpośredni wpływ manipulacji wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym poziomem Gln na produkcję wolnych rodników azotowych (NO<sub>x</sub>) jak i cGMP *in vivo* – wykorzystując technikę mikrodializy prądkowia mózgu szczura. Wykazano, że egzogenie podana Gln w stężeniu 5 mM, jak również czynniki farmakologiczne podwyższające jej poziom zewnątrzkomórkowy: inhibitor glutaminazy, DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucyna) czy inhibitor transportu Gln do neuronów MeAiB (metyloaminoisomaślan), powodowały spadek stężenia NO<sub>x</sub> oraz cGMP w mikrodializatach zarówno kontrolnych jak i obniżały to podwyższone na skutek perfuzji amoniakiem. DON, stosowany w identycznych stężeniach w hodowanych astrocytach traktowanych amoniakiem podwyższał stężenie Gln (Norenberg i wsp., 2004; Rama Rao i wsp., 2005). W innych badaniach wykazywano, że DON dodatkowo blokuje transport aminokwasów poprzez system L, zwiększając transport Gln z izolowanych naczyń mózgowych (Hilgier i wsp., 1992). W innych badaniach podanie MeAiB, inhibitora systemu transportowego A dla Gln przez sondę mikrodializacyjną prowadziło do wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia Gln w acych z kory mózgowej szczur (Kanamori i Ross, 2005; 2006).

Gln w stężeniach 5 i 10 mM również powodowała obniżenie stężenia cGMP w badaniach *in vitro* (skrawki mózgowe). Brak efektu Gln na aktywność sGC stymulowaną bezpośrednio podaniem donora NO na syntezę cGMP w tych warunkach, świadczyło o tym, że Gln działa prawdopodobnie na poziomie dostępności argininy (Arg) jako substratu do syntezy NO (Knowles and Salter, 1998). Arg niezbędna do syntezy NO w komórkach pochodzi najczęściej z dwóch źródeł: z krwi obwodowej, lub też jako produkt powstający w wyniku odzyskiwania jej z cytruliny (Cit) w enzymatycznym szlaku Cit-Arg (Braissant et al., 1999). Biorąc pod uwagę stosunkowo szybki efekt działania Gln (perfuzja 80 min) bardziej prawdopodobnym wydawał się mechanizm interakcji Gln z Arg na poziomie transportu tych aminokwasów przez błony komórkowe.



Arg jest transportowana do komórek za pośrednictwem nośników białkowych wchodzących w skład dwóch głównych układów transportowych  $y^+$  oraz  $y^+L$ , spośród których  $y^+L$  oprócz aminokwasów zasadowych transportuje aminokwasy obojętne, jak leucyna (Leu) czy Gln (Deves i Boyd, 1998; Dye i wsp., 2004; Closs i wsp., 2006). Odwrotnie, Arg hamowała transport Gln i Leu w w synaptosomach kory mózgowej szczura (Rao i Murthy, 1994). W omawianej publikacji IV, perfuzja prądkowia 3 mM Arg odwracała efekt Gln, co świadczyło o konkurencji tych dwóch aminokwasów o to samo białko transportujące. Efekt ten obserwowano również wówczas, gdy sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy był pozbawiony jonów sodu. Jedynym białkiem nośnikowym zdolnym do katalizowania wymiany Gln z Arg w mózgu jest należący do układu  $y^+L$  heteromeryczny transporter  $y^+LAT2$ , (Wagner i wsp., 2001; Bröer i wsp., 2000). W publikacji IV przedstawiono dane wskazujące, że dwa inne substraty transportera  $y^+LAT2$ : Leu oraz niemetabolizujący się jej analog *cyklo*-Leu- (Bröer i wsp., 2007) w hamowały syntezę cGMP takim samym stopniu jak Gln. Należy zaznaczyć, iż dotychczas nie badano innych potencjalnych mechanizmów hamowania syntezy NO. Jednym z nich mogłoby być obniżenie przez Gln dostępności Cit do produkcji Arg (Wu i Meininger, 1993), innym hamujące działanie metabolitu Gln, glukozaminy (Wu i wsp., 2001); oba mechanizmy wydają się mieć znaczenie w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych. W świetle publikacji IV, mechanizm hamującego działania Gln na aktywność szlaku NO/cGMP w komórkach OUN polegałby jednak głównie na ograniczeniu dostępności Arg jako substratu do syntezy NO. W sumie, praca ujawniła oddziaływanie gromadzącej się w nadmiarze Gln na kolejny ważny mechanizm neurotoksycznego działania amoniaku. Dotychczas zgromadzone dane nie pozwalają jednak jednoznacznie wyrokować, czy i w jakim stopniu mamy tu do czynienia z oddziaływaniem patogennym czy kompensacyjnym.

Śledzenie zagadnienia modulującej roli Gln na szlak NMDA/NO/cGMP w warunkach hiperamonemii kontynuowano w omawianej publikacji V. W pracy wykorzystano szczurzy model hiperamonemii podostrej, polegający na trzykrotnym dootrzewnowym podaniu octanu amonu w odstępach 24 godzinnych (Hilgier i Olson, 1994) W modelu tym dochodziło do obniżenia stężenia cGMP zarówno w tkance, jak i w mikrodializatach kory mózgu, a równocześnie, zgodnie z opisywaną wcześniej charakterystyką modelu (Hilgier i Olson, 1994) obserwowano wzrost stężenia Gln. Zjawiskom tym towarzyszyła podwyższona ekspresja transportera  $y^+LAT2$ . Pomiary transportu Arg i Gln w skrawkach kory wykazały jego podwyższoną aktywność. Charakterystyka funkcjonalna transportera  $y^+LAT2$  była zbieżna z opisywaną w transferowanych oocytach (Broer i wsp., 2000), fibroblastach

(Nicholson i wsp., 2002), czy komórkach OUN (Bae i wsp., 2005; Heckel i wsp., 2003). Najbardziej charakterystyczne parametry świadczące o wzmożonej aktywności transportera to: swoiste hamowanie wychwytu [ $^3\text{H}$ ]glutaminy w obecności Glu, hamowanie wychwytu [ $^3\text{H}$ ]argininy przez Gln w warunkach eliminujących układ  $\gamma^+$  (obecność N-etylo-maleimidu, NEM) (Devés i wsp., 1993), stymulacja wychwytu [ $^3\text{H}$ ]argininy w obecności *cyklo*-Leu do skrawków pochodzących od szczurów hiperamonemicznych, zależna od jonów sodu stymulacja wypływu [ $^3\text{H}$ ]argininy w obecności Gln czy podwyższony wypływ [ $^3\text{H}$ ]argininy ze skrawków w obecności NEM.

Uzyskane dane nie są wystarczające dla pełnego oceny roli transportera  $\gamma^+\text{LAT2}$  w mózgu w warunkach hiperamonemii. Po pierwsze, dostępność Gln dla procesu jej wymiany z Arg przez błony komórkowe może być kontrolowana przez inne białka nośnikowe dla Gln, należące do układu N i zlokalizowane w astrocytach i/lub do układu A, obecne na błonach komórkowych neuronów (Chaudhry et al., 2002). Zachowanie się tych dwu klas transporterów w hiperamonemii jest aktualnie przedmiotem prowadzonych przez mnie badań, we współpracy z prof. Chaudhry na Uniwersytecie w Oslo. Po drugie, otwartym pozostaje pytanie, który z typów komórek (astrocyty vs neurony) są miejscem lokalizacji transportera  $\gamma^+\text{LAT2}$ . Przyjęto, że hiperamonemia wpływa na szlak NO/cGMP w neuronach (por. § 2.2.), wiadomo jednak, że stymulacja syntezy NO poprzez amoniak ma miejsce również w astrocytach (Häussinger and Görg, 2010), a obecność transportu aminokwasów za pośrednictwem układu  $\gamma^+\text{L}$  wykazano w obu typach komórek (Heckel et al., 2003).

Niezależnie od pozostających wątpliwości, publikacja V dość jednoznacznie dokumentuje udział wzmożonej aktywności transportera  $\gamma^+\text{LAT2}$  w hamowaniu szlaku NO/cGMP przez Gln.



## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Zmiany w poziomie cGMP i aktywności związanych z nim szlaków metabolicznych odgrywają znaczącą rolę w patogenezie encefalopatii hiperamonemicznych; uważa się zwłaszcza, że deficyt cGMP odpowiada za zaburzenia psychomotoryczne, a po części kognitywne, związane z przewlekłą encefalopatią wątrobową (EW). Mechanizm tych zaburzeń nie jest jednak jak dotąd gruntownie poznany.

W niniejszej rozprawie habilitacyjnej wykazano, iż na syntezę cGMP w warunkach encefalopatii hiperamonemicznej wpływają dwa równorzędne szlaki jego syntezy:

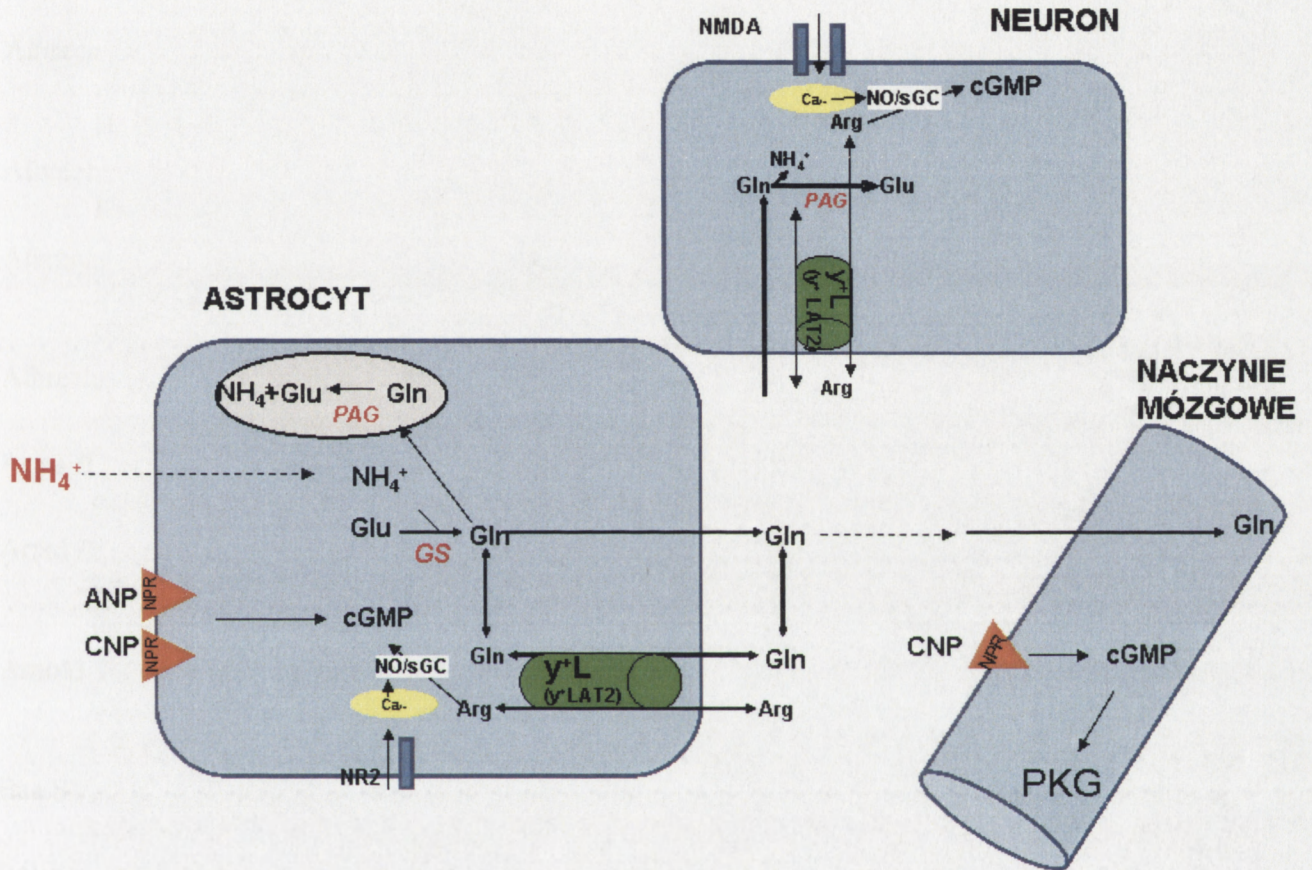
- i) glutaminian/receptor NMDA/NO/sGC/cGMP oraz
- ii) peptydy natriuretyczne/NPR/cGMP.

Szlak pierwszy był już rozpatrywany wcześniej, ale jego zmiany w warunkach EW opisywano prawie wyłącznie w neuronach (Hermenegildo i wsp., 1998; Montoliu i wsp., 2010). W niniejszej rozprawie (**publikacja I**) wykazano, że do zmian aktywności tego szlaku i wynikających stąd zmian poziomu cGMP w warunkach hiperamonemii dochodzi również w astrocytach. Ponadto właśnie w astrocytach, amoniak wywoływał zmiany syntezy cGMP na szlaku ii) (**publikacje I i III**). Upośledzenie przez amoniak syntezy cGMP na szlaku uruchamianym przez peptydy natriuretyczne obserwowano również w komórkach śródbłonka naczyń mózgowych będących substratem bariery krew-mózg (**publikacja II**). Ograniczenie w warunkach hiperamonemii napływu  $Ca^{2+}$  do tych komórek zależnego od CNP może być jedną z przyczyn zaburzeń krążenia mózgowego obserwowanych w EW

Wykazano, że glutamina (Gln), gromadząca się w procesie detoksykacji amoniaku i sama po części pośrednicząca w neurotoksyczności jonów amonowych może modulować/hamować aktywność szlaku NMDA/NO/cGMP (**publikacje IV i V**). Mechanizm jej oddziaływania z tym szlakiem polega przede wszystkim, jeżeli nie wyłącznie, na upośledzeniu dostępności argininy (Arg) jako prekursora do syntezy NO, na zasadzie hamowania jej wychwytu do komórek OUN. Efekt ten wiąże się ze wzrostem ekspresji i aktywności wspólnego dla Arg i Gln heteromerycznego transportera  $\gamma^+LAT2$ : w tych warunkach, nadmiar Gln obniża wychwyt Arg do wnętrza komórki, jednocześnie zwiększając jej wyrzut.

W sumie, uzyskane wyniki eksponują, wedle wiedzy autorki po raz pierwszy w literaturze przedmiotu, współdziałanie dwu procesów patogennych: akumulacji Gln i

zaburzeń syntezy cGMP, których zaangażowanie w EW dotąd uważano za wzajemnie od siebie niezależne. Jednocześnie, wyniki mocno podkreślają rolę otoczenia komórkowego neuronów – astrocytów, ale również i komórek śródbłonna naczyń, w patogenezie tego schorzenia. Poniższa rycina przedstawia szlaki metaboliczne, których wzajemne powiązania w warunkach EW stanowiły przedmiot niniejszej rozprawy.



Ryc. 2. Szlaki syntezy cGMP a transport i metabolizm glutaminy w OUN: udział różnych typów komórek.

Synteza cGMP przebiega zarówno w astrocytach jak i w neuronach, angażując dwa szlaki. Szlak pierwszy rozpoczyna się aktywacją glutaminianergicznego receptora NMDA, co prowadzi do zwiększenia syntezy tlenku azotu (NO), który aktywuje rozpuszczalną formę cyklazy guanylowej (sGC) i prowadzi do syntezy cGMP. Szlak drugi rozpoczyna się przyłączeniem peptydów natriuretycznych ANP/CNP do zewnątrzkomórkowej domeny ich receptorów (NPR), co też prowadzi do syntezy cGMP. Amoniak ( $NH_4^+$ ) jest w astrocytach metabolizowany do glutaminy (Gln) w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminy (GS). Gromadząca się Gln jest transportowana do mitochondriów (szary owal) gdzie ulega rozkładowi do glutaminianu (Glu) i jonów amonowych przez glutaminazę (PAG). Nadmiar Gln jest wytransportowywany z komórki w procesie angażującym różne systemy transportowe, m.inn. heteromeryczny transporter dla argininy (Arg), transportujący wymiennie Arg z Gln: w ten sposób może regulować dostępność Arg do syntezy NO. W naczyniach mózgowych - w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych do syntezy cGMP dochodzi wskutek aktywacji receptorów dla peptydów natriuretycznych, a zsyntetyzowany cGMP bierze udział w regulacji dostępności  $Ca^{2+}$  do tych komórek.

## 6. PIŚMIENICTWO

- Aggarwal S, Obrist W, Yonas H, Kramer D, Kang Y, Scott V, Planinsic R (2005) Cerebral hemodynamic and metabolic profiles in fulminant hepatic failure: relationship to outcome. *Liver Transpl* 11:1353-1360.
- Albrecht J (1998) Roles of neuroactive amino acids in ammonia neurotoxicity. *J Neurosci Res*. 51:133-8.
- Albrecht J (2005) Astrocytes in ammonia neurotoxicity: a target, a mediator and a shield. In: Aschner M, Costa LG, editors. *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Boca Raton: CRC Press; p. 329-42.
- Albrecht J, Norenberg MD (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788-794.
- Albrecht J, Wysmyk-Cybula U, Rafalowska U (1985) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and GABA uptake in astroglial cell-enriched fractions and synaptosomes derived from rats in the early stage of experimental hepatogenic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 72:317-320.
- Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD (2010) Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol*. 80:1303-1308.
- Arias JL, Aller MA, Sanchez-Patan F, Arias J (2006) The inflammatory bases of hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18:1297-1310.
- Arnal JF, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG (1995) Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J. Clin. Invest.* 95:2565-2572.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3203-3207.
- Bae SY, Xu Q, Hutchinson D, Colton CA (2005) Y<sup>+</sup> and y<sup>+</sup> L arginine transporters in neuronal cells expressing tyrosine hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1745:65-73.
- 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.
- Bhatia V, Singh R, Acharya SK (2006) Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* 55:98-104.
- 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.
- Boulton CL, Southam E, Garthwaite J (1995) Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 69:699-703.
- Braissant O, Honegger P, Loup M, Iwase K, Takiguchi M, Bachmann C (1999) Hyperammonemia: regulation of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase genes in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Neurosci. Lett.* 266:89-92.

- Bröer A, Wagner CA, Lang F, Bröer S (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349:787-795.
- Bröer S, Bröer A, Hansen JT, Bubb WA, Balcar VJ, Nasrallah FA, Garner B, Rae C (2007) Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *J. Neurochem.* 102:1758-1770.
- Butterworth RF (2003) Hepatic encephalopathy. *Alcohol Res Health* 27:240-246.
- Cary SP, Winger JA, Marletta MA (2005) Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13064-13069.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH (2002) The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J. Cell Biol.* 157:349-355.
- 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.
- Chen HH, Burnett JC Jr. (1998) C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3:S22-28.
- Chen Y, McCarron RM, Azzam N, Bembry J, Reutzler C, Lenz FA, Spatz M (2000) Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebrovascular endothelial responses and signal transduction. *Acta Neurochir Suppl* 76:131-135.
- Ciani E, Calvanese V, Crochemore C, Bartesaghi R, Contestabile A (2006) Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J Cell Sci* 119:3161-3170.
- Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A (2006) Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* 213:67-77.
- Cooper AJ (1990) Ammonia metabolism in normal and portacaval-shunted rats. *Adv Exp Med Biol* 272:23-46.
- Cooper AJ, Plum F (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* 67:440-519.
- Corbalan R, Chatauret N, Behrends S, Butterworth RF, Felipo V (2002a) Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology* 36:1155-1162.
- Corbalan R, Montoliu C, Minana MD, Del Olmo JA, Serra MA, Aparisi L, Rodrigo JM, Felipo V (2002b) Altered modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in patients with liver disease. *Metab Brain Dis* 17:295-301.
- Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT (1998) High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 27:339-345.
- Cordoba J, Crespín J, Gottstein J, Blei AT (1999) Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 116:686-693.
- Cordoba J, Gottstein J, Blei AT (1996) Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24: 919-923.
- Danthuluri NR, Kim D, Brock TA (1990) Intracellular alkalinization leads to Ca<sup>2+</sup> mobilization from agonist-sensitive pools in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 265:19071-19076.

- de Frutos S, Saura M, Rivero-Vilches FJ, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M (2003) C-type natriuretic peptide decreases soluble guanylate cyclase levels by activating the proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta* 1643:105-112.
- de Knegt RJ, Gramsbergen JB, Schalm SW (1994)  $^{45}\text{CaCl}_2$  autoradiography in brain from rabbits with encephalopathy from acute liver failure or acute hyperammonemia. *Metab Brain Dis* 9:153-160.
- de Vente J, Steinbusch HW (1992) On the stimulation of soluble and particulate guanylate cyclase in the rat brain and the involvement of nitric oxide as studied by cGMP immunocytochemistry. *Acta Histochem* 92:13-38.
- Deschepper CF (1998) Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol* 19:20-46.
- Devés R, Angelo S, Chavéz P (1993) N-Ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J. Physiol.* 468:753-766.
- Devés R, Boyd CAR (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 78:487-545.
- Diederer RM, La Heij EC, Markerink-van Ittersum M, Kijlstra A, Hendrikse F, de Vente J (2007) Cyclic GMP synthesis by human retinal pigment epithelial cells is mainly mediated via the particulate guanylyl cyclase pathway. *Ophthalmic Res* 39:55-59.
- Dixit V, Chang TM (1990) Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of liver support systems. *ASAIO Trans* 36:21-27.
- Dye JF, Vause S, Johnston T, Clark P, Firth JA, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD (2004) Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 18:125-137.
- El-Mlili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, Cauli O, Felipo V (2008) Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J Neurochem* 106:440-1449.
- Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR (2005) Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol Pharmacol* 67:174-183.
- Felipo V (2006) Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy *World J Gastroenterol* 12: 7737-7743.
- Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67:259-279.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21:106-113.
- Fukui S, Fazzina G, Amorini AM, Dunbar JG, Marmarou A (2003) Differential effects of atrial natriuretic peptide on the brain water and sodium after experimental cortical contusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1212-1218.
- Golombek DA, Agostino PV, Plano SA, Ferreyra GA (2004) Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem Int* 45:929-936.
- Goncalves J, Grove KL, Deschepper CF. (1995) Generation of cyclic guanosine monophosphate in brain slices incubated with atrial or C-type natriuretic peptides: comparison of the amplitudes and cellular distribution of the responses. *Regul Pept* 57:55-63.

- Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272:221-223.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576:120-124.
- Häussinger D, Görg B (2010) Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.* 13:87-92.
- Hawkins RD (1996) NO honey, I don't remember. *Neuron* 16:465-467.
- Hazell AS, Butterworth RF (1999) Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:99-112.
- Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggård EE Vane JR (1990) The metabolism of L- arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8612-8616.
- 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* 369:165-87.
- Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31:709-715.
- Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Munoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V (1998) Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 10:3201-3209.
- Hertz L, Yu AC, Kala G, Schousboe A (2000) Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. *Neurochem Int* 37:83-102.
- Hilgier W, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2004) A novel glycine site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/CGMP pathway by ammonia. *Brain Res* 1015:186-188.
- Hilgier W, Olson JE (1994) Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 62:197-204.
- Hilgier W, Puka M, Albrecht J (1992) Characteristics of large neutral amino acid-induced release of preloaded L-glutamine from rat cerebral capillaries in vitro: effects of ammonia, hepatic encephalopathy, and gamma-glutamyl transpeptidase inhibitors. *J. Neurosci Res* 32:221-226.
- Hilgier W, Węgrzynowicz M, Mączewski M, Beręsewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2008) Effect of glutamine synthesis inhibition with methionine sulfoximine on the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the rat striatum treated acutely with ammonia: a microdialysis study. *Neurochem. Res.* 33:267-272.
- Hillmann P, Kose M, Sohl K, Muller CE (2008) Ammonium-induced calcium mobilization in 1321N1 astrocytoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:36-47.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61:866-879.
- 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.



- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Schousboe A, Norenberg MD (2004) Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46:296-301.
- Jayakumar AR, Rao KV, Murthy Ch R, Norenberg MD (2006) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* 48:623-628.
- Kanamori K, Ross BD (2005) Suppression of glial glutamine release to the extracellular fluid studied in vivo by NMR and microdialysis in hyperammonemic rat brain. *J. Neurochem.* 94:74-85.
- Kanamori K, Ross BD (2006) Kinetics of glial glutamine efflux and the mechanism of neuronal uptake studied in vivo in mildly hyperammonemic rat brain. *J. Neurochem.* 99:1103-1113.
- 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.
- Knowles RG, Salter M (1998) Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation. *Methods Mol.Biol.* 100:67-73.
- Koller KJ, Love DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa M, Matsuo H, Goeddel DV (1999) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by Ctype natriuretic peptide (CNP). *Science* 252:120-123.
- Kone BC (2001) Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 51:429-441.
- Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V (1994) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Neurochem* 63:2172-2178.
- Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadell M, Erceg S, Sanchez-Perez AM, Felipo V (2003b) Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int* 43:493-499.
- Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V (2003a) Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res* 981:193-200.
- Larsen FS, Gottstein J, Blei AT (2001) Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J. Hepatol.* 34:548-554.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 21:69-78.
- Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13414-13419.
- Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, Piedrafita B, El Mlili N, Felipo V (2007) NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:321-335.
- Lockwood AH (2004) Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19:345-349.
- 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* 52:375-414.
- Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109:366-398.
- Lv S, Song HL, Zhou Y, Li LX, Cui W, Wang W, Liu P (2010) Tumour necrosis factor- $\alpha$  affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. *Liver Int.* 30:1198-1210.

- Madhani M, Okorie M, Hobbs AJ, MacAllister RJ (2006) Reciprocal regulation of human soluble and particulate guanylate cyclases in vivo. *Br J Pharmacol* 149:797-801.
- Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA (1994) Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 63:1829-1838.
- Marcaida G, Minana MD, Burgal M, Grisolia S, Felipo V (1995) Ammonia prevents activation of NMDA receptors by glutamate in rat cerebellar neuronal cultures. *Eur J Neurosci* 7:2389-2396.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- 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) Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol* 277:G455-462.
- Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D (2006) Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 116:1731-1737.
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369:336-339.
- Monfort P, Corbalan R, Martinez L, Lopez-Talavera J, Cordoba J, Felipo V (2001) Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* 104:1119-1125.
- Monfort P, Muñoz MD, Felipo V (2004a) Hyperammonemia impairs long-term potentiation in hippocampus by altering the modulation of cGMP-degrading phosphodiesterase by protein kinase G. *Neurobiol Dis* 15:1-10.
- Monfort P, Muñoz MD, Felipo V (2005) Chronic hyperammonemia in vivo impairs long-term potentiation in hippocampus by altering activation of cGMP dependent-protein kinase and of phosphodiesterase 5. *J Neurochem* 94:934-942.
- Monfort P, Muñoz MD, Kosenko E, Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V (2004b) Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia. *Neurochem Int* 45:895-901.
- Montoliu C, Kosenko E, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Felipo V (2005) Correlation of nitric oxide and atrial natriuretic peptide changes with altered cGMP homeostasis in liver cirrhosis. *Liver Int* 25:787-795.
- Montoliu C, Rodrigo R, Monfort P, Llansola M, Cauli O, Boix J, ElMlili N, Agusti A, Felipo V (2010) Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications *Metab Brain Dis* 25:39-48.
- Mori Y, Takayasu M, Suzuki Y, Shibuya M, Yoshida J, Hidaka H (1997) Vasodilator effects of C-type natriuretic peptide on cerebral arterioles in rats. *Eur J Pharmacol* 320:183-186.
- Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-13.
- Nicholson B, Manner CK, MacLeod CL (2002) Cat2 L-arginine transporter-deficient fibroblasts can sustain nitric oxide production. *Nitric Oxide* 7:236-243.
- Nishimura T, Akasu T, Krier J (1992) Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate regulates calcium channels in neurones of rabbit vesical pelvic ganglia. *J Physiol* 457:559-574.

- Norenberg MD (1996) Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis.* 16:245-53.
- Norenberg MD, Baker L, Norenberg LO, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT (1991) Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res.* 16:833-836.
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2004) Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36:303-307.
- Okamura T, Ayajiki K, Fujioka H, Shinozaki K, Toda N (2002) Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide. *Jpn J Pharmacol* 88:32-38.
- Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM (2002) Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 137:947-954.
- Pandey KN (2001) Dynamics of internalization and sequestration of guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A. *Can J Physiol Pharmacol* 79:631-639.
- Pandey KN (2005) Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 26:901-932.
- Paupardin-Tritsch D, Hammond C, Gerschenfeld HM, Nairn AC, Greengard P (1986) cGMP-dependent protein kinase enhances Ca<sup>2+</sup> current and potentiates the serotonin-induced Ca<sup>2+</sup> current increase in snail neurones. *Nature* 323:812-814.
- Pelligrino DA, Wang Q (1998) Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. *Prog Neurobiol* 56:1-18.
- Pontiggia L, Winterhalter K, Gloor SM (1998) Inhibition of Na, K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. *FEBS Lett* 436:466-470.
- Poordad FF (2007) Review article: the burden of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 25 Suppl 1:3-9.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72.
- Prakash R, Mullen KD (2010) Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7:515-25.
- Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD (2003) Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport* 14:2379-2382.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 47:31-38.
- Ranjan P, Mishra AM, Kale R, Saraswat VA, Gupta RK (2005) Cytotoxic edema is responsible for raised intracranial pressure in fulminant hepatic failure: in vivo demonstration using diffusion-weighted MRI in human subjects. *Metab Brain Dis* 20:181-192.
- Rao KV, Murthy CR (1994) Synaptosomal high affinity transport systems for essential amino acids in rat brain cortex. *Neurosci. Lett.* 175:103-106.
- Rao VL, Audet RM, Butterworth RF (1997) Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res* 765:169-172.
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Haussinger D (2007) Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55:758-771.
- Rist RJ, Romero IA, Chan MW, Abbott NJ (1996) Effects of energy deprivation induced by fluorocitrate in immortalised rat brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 730:87-94.

- Rivero-Vilches FJ, de Frutos S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M (2003) Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C891-898.
- Rodrigo R, Erceg S, Felipo V (2005a) Neurons exposed to ammonia reproduce the differential alteration in nitric oxide modulation of guanylate cyclase in the cerebellum and cortex of patients with liver cirrhosis. *Neurobiol Dis* 19:150-161.
- Rodrigo R, Erceg S, Rodriguez-Diaz J, Saez-Valero J, Piedrafita B, Suarez I, Felipo V (2007) Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J Neurochem* 102:51-64.
- Rodrigo R, Felipo V (2006) Brain regional alterations in the modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in liver cirrhosis. Role of hyperammonemia and cell types involved. *Neurochem Int* 48:472-477.
- Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, Felipo V (2005b) Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 130:435-443.
- Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R (2000) The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 32:734-739.
- Rose C, Kresse W, Kettenmann H (2005a) Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* 280:20937-20944.
- Rose RA, Anand-Srivastava MB, Giles WR, Bains JS (2005b) C-type natriuretic peptide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat magnocellular neurosecretory cells by activating the NPR-C receptor. *J Neurophysiol* 94:612-621.
- Roux F, Couraud PO (2005) Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol* 25:41-58.
- Sager G (2004) Cyclic GMP transporters. *Neurochem Int* 45:865-873.
- Sauviat MP, Boydrion-Le Garrec R, Masson JB, Lewis RL, Vernoux JP, Molgo J, Laurent D, Benoit E (2006) Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins. *Blood Cells Mol Dis* 36:1-9.
- Schioldt FV, Atillasoy E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KV, Stribling R, Crippin JS, Flamm S, Somberg KA, Rosen H, McCashland TM, Hay JE, Lee WM (1999) Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl Surg* 5:29-34.
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Haussinger 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, Haussinger D (2006) Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem* 387:1363-1370.
- Schneider F, Lutun P, Boudjema K, Wolf P, Tempe JD (1994) In vivo evidence of enhanced guanylyl cyclase activation during the hyperdynamic circulation of acute liver failure. *Hepatology* 19:38-44.
- Sessa WC, Hecker M, Mitchell JA, Vane JR (1990) The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8607-8611.

- Shambaugh GE, 3rd (1977) Urea biosynthesis I The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. *Am J Clin Nutr* 30:2083-2087.
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R (2004) Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 40:247-254.
- Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD, (2010) Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis, *Hepatology* 51:1062-1069.
- Sporbert A, Mertsch K, Smolenski A, Haseloff RF, Schonfelder 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.
- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, i wsp. (1992) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229-239.
- Sugimoto H, Koehler RC, Wilson DA, Brusilow SW, Traystman RJ (1997) Methionine sulfoximine, a glutamine synthetase inhibitor, attenuates increased extracellular potassium activity during acute hyperammonemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:44-49.
- Summers C, Tang W. (1992) Atrial natriuretic peptide receptor subtypes in rat neuronal and astrocyte glial cultures. *Am J Physiol* 262:C1134-43.
- Swain M, Butterworth RF, Blei AT (1992) Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15:449-453.
- Swanson RA, Graham SH (1994) Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res* 664:94-100.
- Swapna I, Sathyaikumar KV, Murthy Ch R, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B (2006) Changes in cerebral membrane lipid composition and fluidity during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 98:1899-1907.
- Swierkosz TA, Mitchell JA, Sessa WC, Hecker M, Vane JR (1990) L-Glutamine inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor from the rabbit aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:143-148.
- Szerb JC, Butterworth RF (1992) Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 39:135-153.
- 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.
- Thippeswamy T, McKay JS, Morris R, Quinn J, Wong LF, Murphy D (2005) Glial-mediated neuroprotection: evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glia communication in the peripheral nervous system. *Glia* 49:197-210.
- Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB (2006) Ca<sup>2+</sup> signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* 13:693-708.
- Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB (2002) Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39:173-185.
- Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT (1987) Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7:1272-1277.

- Vaquero J, Butterworth RF (2006) The brain glutamate system in liver failure. *J Neurochem* 98:661-669.
- Vaquero J, Butterworth RF (2007) Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions. *Neurol Res* 29:683-690.
- Vaquero J, Butterworth RF (2008) Hepatic encephalopathy in acute liver failure. In: *International Hepatology Updates: Hepatic encephalopathy* (Romero-Gomez M, ed). Barcelona: Permanyer.
- Vaquero J, Chung C, Blei AT (2004) Cerebral blood flow in acute liver failure: a finding in search of a mechanism. *Metab Brain Dis* 19:177-194.
- Vaquero J, Chung C, Cahill ME, Blei AT (2003b) Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 23:259-269.
- Vigne P, Frelin C (1992) C-type natriuretic peptide is a potent activator of guanylate cyclase in endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun* 183:640-644.
- Vigne P, Lund L, Frelin C (1994) Cross talk among cyclic AMP, cyclic GMP, and Ca(2+)-dependent intracellular signalling mechanisms in brain capillary endothelial cells. *J Neurochem* 62:2269-2274.
- Visek WJ (1984) Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J Dairy Sci* 67:481-498.
- Wagner CA, Lang F, Bröer S (2001) Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C1077-C1093.
- Wang L, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M (2005) Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1150-1158.
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 68:443-456.
- Wang Y, Wagner MB, Joyner RW, Kumar R (2000) cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovasc Res* 48:310-322.
- Weisbrod RM, Griswold MC, Yaghoubi M, Komalavilas P, Lincoln TM, Cohen RA (1998) Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 125:1695-1707.
- Widmer R, Kaiser B, Engels M, Jung T, Grune T (2007) Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondria-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 464:1-11.
- Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW (1996) Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 71:589-599.
- Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent SR (2004) Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Exp Neurol* 190:446-455.
- Wright G, Jalan R (2007) Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora's box? *Hepatology* 46:291-294.
- Wu G, Haynes TE, Li H, Yan W, Meininger CJ (2001) Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *Biochem. J.* 353:245-252.

- Wu G, Meininger CJ (1993) Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 265:H1965–H1971.
- Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14753-14758.
- 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.
- Zolle O, Lawrie AM, Simpson AW (2000) Activation of the particulate and not the soluble guanylate cyclase leads to the inhibition of Ca<sup>2+</sup> extrusion through localized elevation of cGMP. *J Biol Chem* 275:25892-25899.
- Zsombok A, Schrofner S, Hermann A, Kerschbaum HH (2005) A cGMP-dependent cascade enhances an L-type-like Ca<sup>2+</sup> current in identified snail neurons. *Brain Res* 1032:70-76.



## **PUBLIKACJA I**





Brief communication

## Hyperammonemia inhibits the natriuretic peptide receptor 2 (NPR-2)-mediated cyclic GMP synthesis in the astrocytic compartment of rat cerebral cortex slices

Magdalena Zielińska<sup>a</sup>, Inez Fresko<sup>a</sup>, Agnieszka Konopacka<sup>a</sup>, Vicente Felipo<sup>b</sup>, Jan Albrecht<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurotoxicology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Pawinskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Laboratory of Neurobiology, Centro de Investigacion Principe Felipe, Valencia, Spain

Received 23 April 2007; accepted 31 May 2007

Available online 14 June 2007

### Abstract

The decrease of cyclic GMP (cGMP) level in the brain, contributing to cognitive and memory deficit in hyperammonemia (HA), has been attributed to the interference of ammonia with the NMDA/nitric oxide/soluble guanylate cyclase (GC)/cGMP pathway in neurons. The present study tested the hypotheses that (a) HA also affects cGMP synthesis elicited by stimulation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR-2) with its natural ligand, C-type natriuretic peptide (CNP) and (b) the latter effect may involve astrocytes, the ammonia-sensitive cells. In the cerebral cortical slices of control rats, CNP stimulated cGMP synthesis in a degree comparable to the NO donor, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) used at an optimal concentration. Fluoroacetate (FA), a metabolic inhibitor specifically affecting astrocytic mitochondria, inhibited the CNP-dependent cGMP synthesis by about 50%. Ammonium acetate-induced HA decreased by 68% the CNP-dependent cGMP generation in slices incubated in the absence of FA. In slices incubated in the presence of FA, cGMP synthesis in slices derived from HA rats did not differ from that in control slices. The results indicate that HA inhibits CNP-dependent cGMP synthesis in the FA-vulnerable, astrocytic compartment, but not in the FA-resistant compartment(s) of the brain. HA did not affect the expression of NPR-2 mRNA in the cerebral cortex tissue as tested using real-time PCR, indicating that the effect of ammonia involves as yet unidentified events occurring posttranscriptionally. Deregulation of NPR-2 function in astrocytes by ammonia may contribute to neurophysiological symptoms of HA.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Hyperammonemia; Hepatic encephalopathy; C-type natriuretic peptide (CNP); Natriuretic peptide receptor 2 (NPR-2); Cyclic GMP; Cerebral cortex slices; Astrocytes; Fluoroacetate

### 1. Introduction

Ammonia is a well-documented pathogenic factor in neurological disorders associated with hyperammonemia (HA), including hepatic encephalopathy (HE). The NMDA/NO/cGMP pathway is impaired in the brains of rats with HA (Corbalan et al., 2002; Hermenegildo et al., 1998, 2000) or following intracerebral perfusion with ammonia (Hilgier et al., 2004) and in the brain of cirrhotic patients with HE (Corbalan et al., 2002). Decreased cGMP production in the NMDA/NO/sGC pathway has been implicated in memory and attention deficit in the HA and HE rats, which could be corrected by

treatments raising intracerebral cGMP level (Erceg et al., 2005a,b). The above data underscore the role of altered cGMP synthesis in the pathogenesis of HA or HE (reviewed in Albrecht and Węgrzynowicz, 2007; Felipo, 2006).

Generation of cGMP is also mediated by a family of particulate guanylate cyclases (pGCs) which act as natriuretic peptide receptors (NRP) (Lucas et al., 2000). Of the two cGMP-generating NPR subtypes, NPR-2 (pGC-B) is more abundant in the vertebrate brain than NPR-1 (pGC-A) (Herman et al., 1996), and C-type natriuretic peptide (CNP), the natural NPR-2 ligand (Herman et al., 1996; Koller et al., 1991), is ubiquitously distributed among the brain structures (Potter et al., 2006). We, therefore, hypothesized that changes in the activation of NPR-2 by CNP may likewise contribute to impaired cGMP generation in the brain during HA. In this study, we induced HA in rats by repeated injections of ammonium acetate (Hilgier and Olson,

\* Corresponding author. Tel.: +48 22 6685323; fax: +48 22 6685532.

E-mail address: [jalb@cmdik.pan.pl](mailto:jalb@cmdik.pan.pl) (J. Albrecht).

1994; Hilgier et al., 1996), and compared CNP-dependent generation of cGMP in the cerebral cortical slices derived from HA and untreated rats. Previous studies have suggested that ammonia-induced impairment of the NMDA/NO/cGMP route occurs predominantly in neurons (Rodrigo et al., 2005). In this study, we evaluated the CNP-dependent cGMP production independently in neurons and astrocytes, by measuring the effect in slices incubated in the presence or absence of a selective inhibitor of the astrocytic tricarboxylic acid cycle (i.e., an aconitase inhibitor), fluoroacetate (FA) (Goncalves et al., 1995; Swanson and Graham, 1994). We also compared the expression of NPR-2 mRNA in brains derived from control and HA rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. HA model

Adult male Wistar rats (150–180 g) were reared under standard conditions at the local animal facility. HA with cerebral metabolic changes and symptoms typical of subacute HE was induced by 3 i.p. injections of ammonium acetate (600 mg/kg) at 24 h intervals (Hilgier and Olson, 1994; Hilgier et al., 1996). Control rats were analogically injected with sodium saline solution.

### 2.2. Cyclic GMP synthesis in cerebral cortical slices

Animals were decapitated and the brains were immediately transferred into ice-cold Krebs–Ringer bicarbonate buffer (Krebs buffer) of the following composition: 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at pH 7.4. After preparation the cortices were cut into 300 μm slices using a manual chopper. The slices were transferred to borosilicate glass vials containing Krebs buffer. Each vial received its own supply of a 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. The slices were preincubated under these conditions for 30 min in a water bath at 37.4 °C, and thereafter were incubated for 60 min with or without 1 mM FA, a selective glial toxin (a stock solution was freshly prepared before each experiment). To remove FA at the end of the incubation period slices were washed in Krebs buffer for 15 min. The slices were then further incubated for 15 min with C-type natriuretic peptide at 1 μM concentration, which produced about 75% of the maximum effect noted at 10 μM CNP (not shown). To prevent degradation of cGMP a phosphodiesterase inhibitor 3-isobutylmethylxanthine (IBMX) at 0.5 mM was added to the Krebs buffer. After treatment the slices were homogenized in glass–Teflon homogenizer in 300 μl of the assay kit buffer containing 4 mM EDTA and disrupted by sonication. Samples were boiled for 5 min, centrifuged (14,000 × g, 5 min) and cGMP was measured in the supernatant. Protein determination in the pellets was performed according to Bradford's procedure (Bradford, 1976). Identical incubation conditions were used in experiments analyzing cGMP generation in the presence of S-nitroso-N-acetyl-penicillamide (SNAP).

### 2.3. cGMP determination

cGMP was determined with cGMP Enzyme Immunoassay Biotrak (EIA) System (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol with minor modifications as described by Konopacka et al. (2006).

### 2.4. Real-time PCR analysis

Total RNA was isolated using TRI Reagent (Sigma), then 1 μg was reverse-transcribed using the SuperScript II (Invitrogen) and Oligo (dT) 15 primers (Promega). Real-time PCR was performed in 96 well plates with the ABI 7500 apparatus (Applied Biosystems) using the MGB Taqman probe assay. Primers and probes for NPR-2 and endogenous control β-actin were purchased from Applied Biosystems (Rn 00587693-m1 and Rn 00667869-m1, respectively). Each reaction contained 5 μl Taqman Universal PCR Mastermix in a total volume of 10 μl, and 1.25 μl cDNA was added to the reaction. The Real-time PCR reactions were performed at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The results of the analysis were calculated in relation to the β-actin product, and results were calculated according to, and expressed by an equation ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) that gives the amount of target, normalized to an endogenous reference and relative to a calibrator.  $C_t$  is the threshold cycle for target amplification (Livak and Schmittgen, 2001).

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance followed by the Dunnett's comparison test or the two-tailed Student's test.

## 3. Results

One micromolar CNP concentration was used to stimulate cGMP synthesis in cerebral cortical slices, which is well within the concentration range routinely employed in similar studies by other authors (De Frutos et al., 2003; Goncalves et al., 1995). In control slices, the stimulation of cGMP synthesis by CNP amounted to ~4 pmoles/mg/ml (Fig. 1), which was of the same order of magnitude as that attained by an NO donor, SNAP at 1 mM concentration ( $4.15 \pm 0.54$  pmoles/mg/ml, mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ ). This suggests that in the brain *in situ*, the CNP-mediated cGMP synthesis may attain physiological significance.

Preliminary experiments with the HA model have included two administrations of ammonium acetate, to reflect the asymptomatic, onset stage (Hilgier and Olson, 1994). No alteration in cGMP synthesis under any conditions used was noted at this stage (data not shown), which prompted to focus further experiments on symptomatic HA induced by three administrations. HA so induced decreased the CNP-dependent cGMP production in the cerebral cortical slices by about 68% (Fig. 1). FA inhibited CNP-dependent cGMP accumulation in slices from control rats by 50%, indicating that roughly this

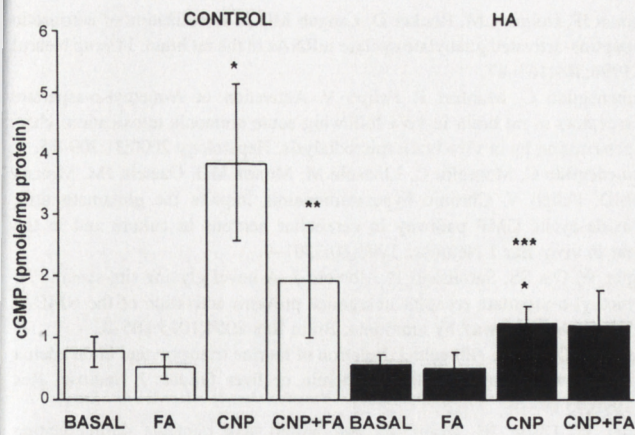


Fig. 1. cGMP production without stimulation ("basal") and in response to 1  $\mu$ M CNP measured in slices derived from control and HA rats, in the presence or absence of 1 mM FA. Results are mean  $\pm$  S.D. for 8–9 independent experiments.  $p < 0.05$  vs. \* "basal"; \*\* "CNP"; \*\*\* $p < 0.05$ : "CNP-HA" vs. "CNP-control".

proportion of cGMP synthesis could be attributed to astrocytes. Interestingly, FA did not further decrease the CNP-induced cGMP synthesis in HA slices indicating that HA depressed the synthesis almost exclusively in the FA-vulnerable, astrocytic compartment (Fig. 1). The expression of NPR-2 mRNA did not change significantly in rats with short-term HA (Fig. 2).

#### 4. Discussion

Cyclic GMP is a key messenger in several signal transduction pathways in the CNS, and mediates its effects by binding three classes of proteins: cGMP-gated ion channels, cGMP-dependent protein kinases and phosphodiesterases (PDEs) (for review see Lucas et al., 2000). cGMP has been shown to play a critical role in a plethora of vital neural functions, among these the sleep–wake cycle and some form of learning and memory and cognitive functions, which have been found impaired at various stages of HA or HE (Corbalan et al., 2002; Erceg et al., 2005a,b; Steindl et al., 1995). Ammonia impairs the glutamate/NO/cGMP pathway, which includes interference with the activation of sGC by NO (Hermenegildo

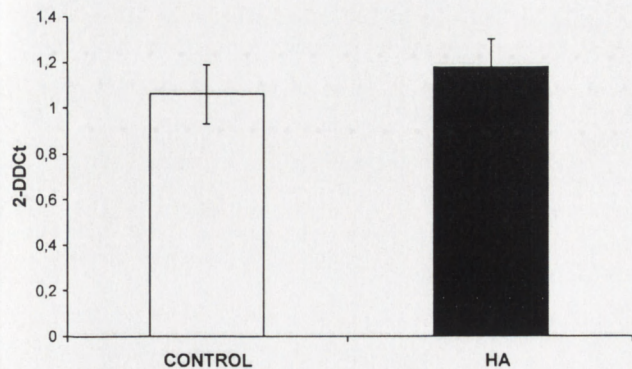


Fig. 2. Expression of mRNA's coding for NPR-2 in the cerebral cortex of control rats and rats with HA induced by 3 i.p. administrations of ammonium acetate. Results are mean  $\pm$  S.D.; ( $n = 6$ ) \* $p < 0.05$  vs "control".

et al., 1998, 2000; Hilgier et al., 2004; for a review see Felipo, 2006). Accordingly, depression of cGMP synthesized in this pathway has been held responsible for cognitive deficits in animals with experimentally induced HA or HE (Erceg et al., 2005a,b). The present study shows that impaired stimulation of pGC activity contained in NPR-2 may likewise contribute to changes in cGMP levels evoked in the brain by HA. We have specifically selected to analyze NPR-2-dependent cGMP generation using C-type natriuretic peptide (CNP) because CNP is a NPR-2 ligand (Herman et al., 1996; Koller et al., 1991), and NPR-2 is the predominant natriuretic peptide receptor in the cerebral cortex (Herman et al., 1996; Potter et al., 2006). Also, as opposed to the other natriuretic peptides, CNP is not stored in granules and is thus more freely available for interaction. In addition, CNP circulates in low quantities and lacks potent natriuretic functions which make it well suited to act by paracrine or autocrine modes (Kone, 2001). Nonetheless, the possibility that ammonia alters the ANP- and BNP-mediated cGMP synthesis may deserve attention in future studies.

NPR-2 has been detected immunocytochemically both in astrocytes and neurons (Deschepper, 1998; Summers and Tang, 1992). To discriminate between the cell types involved in the CNP-mediated cGMP synthesis in the cerebral cortical slices we used fluoroacetate (FA), a drug that is taken up selectively by astrocytes and reversibly inhibits their metabolism (Goncalves et al., 1995; Swanson and Graham, 1994). The present results clearly show that in control slices the process takes place in both the FA-resistant and FA-vulnerable compartment of the slices. However, the depression of CNP-mediated cGMP synthesis appeared to predominantly affect the FA-vulnerable, astrocytic compartment. This inference is consistent with astrocytes being the CNS cells whose metabolism and function are the primary target of the toxic action of ammonia (Albrecht, 2005; Norenberg, 1996).

Expression of NPR-2 mRNA in the slices was not altered by HA, indicating that depression of receptor function was due to one or some of the posttranscriptional events. Experiments to identify the mechanism are under way in our laboratories. Of note, the latter result contrasted with the increased expression noted in astrocytes treated with pathophysiologically elevated (5 mM) ammonia concentration (Konopacka et al., 2006). This discrepancy may reflect difference in the response of astrocytes in the native milieu versus cells grown in culture.

#### 5. Conclusion

Previous studies have suggested that deregulation of cGMP synthesis in the brain, one of the events that contribute to neuropsychiatric manifestations associated with HA, predominantly reflects disturbances of the NMDA/NO/cGMP pathway involving sGC in neurons. The present study implicates, to our knowledge for the first time, altered C-type natriuretic peptide-pGC (NPR-2) interaction as an additional cause of reduction of cGMP level in hyperammonemic brain. The study also identifies astrocytes as the most likely locus, where the CNP-NPR-2-cGMP is impaired and encourages detailed

investigations towards the molecular mechanism underlying this change. In the future, concerted intervention to activate sGC- and pGC-mediated cGMP synthesis may become a modality to treat patients with attention and/or memory deficit accompanying liver failure-related HA.

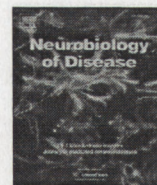
### Acknowledgement

The study was supported by Polish Ministry of Science and Education, Grant no. 2PO5A06426.

### References

- Albrecht J, Węgrzynowicz M. Cyclic GMP in blood and minimal hepatic encephalopathy: fine-tuning of the diagnosis. *J Mol Med* 2007;85:203–5.
- Albrecht J. Astrocytes in ammonia neurotoxicity: a target, a mediator and a shield. In: Aschner M, Costa LG, editors. *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 329–42.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Corbalan R, Chatauret N, Behrends S, Butterworth RF, Felipo V. Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology* 2002;36:1155–62.
- De Frutos S, Saura M, Rivero-Vilches FJ, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. C-type natriuretic peptide decreases soluble guanylate cyclase levels by activating the proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta* 2003;1643:105–12.
- Deschepper CF. Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol* 1998;19:20–46.
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Montoliu C, Felipo V. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res* 2005a;1036:115–21.
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 2005b;41:299–306.
- Felipo V. Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2006;12:7737–43.
- Goncalves J, Grove KL, Deschepper CF. Generation of cyclic guanosine monophosphate in brain slices incubated with atrial or C-type natriuretic peptides: comparison of the amplitudes and cellular distribution of the responses. *Regul Pept* 1995;57:55–63.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996;369:165–87.
- Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 2000;31:709–15.
- Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Munoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 1998;10:3201–9.
- Hilgier W, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. A novel glycine site-specific *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/CGMP pathway by ammonia. *Brain Res* 2004;1015:186–8.
- Hilgier W, Olson JE, Albrecht J. Relation of taurine transport and brain edema in rats with simple hyperammonemia or liver failure. *J Neurosci Res* 1996;45:69–74.
- Hilgier W, Olson JE. Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1994;62:197–204.
- Koller KJ, Love DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa M, Matsuo H, Goeddel DV. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991;252:120–3.
- Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001;51:429–41.
- Konopacka A, Fresko I, Piaskowski S, Albrecht J, Zielinska M. Ammonia affects the activity and expression of soluble and particulate GC in cultured rat astrocytes. *Neurochem Int* 2006;48:553–8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;53:375–414.
- Norenberg MD. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996;16:245–53.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006;27:47–72.
- Rodrigo R, Erceg S, Felipo V. Neurons exposed to ammonia reproduce the differential alteration in nitric oxide modulation of guanylate cyclase in the cerebellum and cortex of patients with liver cirrhosis. *Neurobiol Dis* 2005;119:150–61.
- Steindl PE, Finn B, Bendok B, Rothke S, Zee PC, Blei AT. Disruption of the diurnal rhythm of plasma melatonin in cirrhosis. *Ann Intern Med* 1995;123:274–7.
- Summers C, Tang W. Atrial natriuretic peptide receptor subtypes in rat neuronal and astrocyte glial cultures. *Am J Physiol* 1992;262:C1134–43.
- Swanson RA, Graham SH. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res* 1994;664:94–100.

## **PUBLIKACJA IV**



## Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis

Wojciech Hilgier<sup>a</sup>, Inez Fręško<sup>a</sup>, Emilia Klemenska<sup>b</sup>, Andrzej Beręsewicz<sup>b</sup>, Simo S. Oja<sup>c,d</sup>, Pirjo Saransaari<sup>d</sup>, Jan Albrecht<sup>a</sup>, Magdalena Zielińska<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurotoxicology, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Medical Center of Postgraduate Education, Warsaw, Poland

<sup>c</sup> Department of Pediatrics, Tampere University Hospital, Tampere, Finland

<sup>d</sup> University of Tampere Medical School, Finland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2008

Revised 8 April 2009

Accepted 11 April 2009

Available online 18 April 2009

#### Keywords:

Striatum

Microdialysis

Glutamine

Arginine

Ammonia neurotoxicity

Cyclic GMP

### ABSTRACT

Brain L-glutamine (Gln) accumulation and increased activity of the NO/cGMP pathway are immediate consequences of acute exposure to ammonia. This study tested whether excess Gln may influence NO and/or cGMP synthesis. Intrastriatal administration of the glutaminase inhibitor 6-diazo-5-oxo-L-norleucine or the system A-specific Gln uptake inhibitor methylaminoisobutyrate increased microdialysate Gln concentration and reduced basal and ammonia-induced NO and cGMP accumulation. Gln applied *in vivo* (via microdialysis) or *in vitro* (to rat brain cortical slices) reduced NO and cGMP accumulation in the presence and/or absence of ammonia, but not cGMP synthesis induced by the NO donor sodium nitroprusside. Attenuation of cGMP synthesis by Gln was prevented by administration of L-arginine (Arg). The L-arginine co-substrates of  $\gamma^+$ LAT2 transport system, L-leucine and cyclo-leucine, mimicked the effect of exogenous Gln, suggesting that Gln limits Arg supply for NO synthesis by interfering with  $\gamma^+$ LAT2-mediated Arg uptake across the cell membrane.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Ammonia is a well documented pathogenic factor in neurological disorders associated with hyperammonemia (HA), including hepatic encephalopathy, infants with defects in the urea cycle, Reye's syndrome etc. (Albrecht and Jones, 1999; Felipe and Butterworth, 2002). Neurotoxic effects of ammonia are mediated, among other factors, by sensitization and subsequent overactivation of NMDA receptors, leading to increased nitric oxide (NO) synthesis and accumulation of toxic oxygen- and nitrogen free radicals, which gives rise to generation of toxic peroxynitrite (Kosenko et al., 1998; Schliess et al., 2002) and contributes to astrocytic swelling (Zielińska et al., 2003; Reinehr et al., 2007). Increased production of NO in the brain is coupled to enhanced accumulation of cGMP that has been recognized as a marker of acute hyperammonemic conditions (Hermenegildo et al., 2000; Hilgier et al., 2004). Another immediate effect of ammonia in the brain is Gln accumulation (Swain et al., 1992; Cordoba et al., 1996; Larsen et al., 2001; Kosenko et al., 2003), which in severe hyperammonemic conditions may exceed 20 mM (Swain et al., 1992). Excess Gln is thought to contribute to ammonia-induced cerebral edema, either by increasing osmotic pressure in astrocytes (Willard-Mack et al., 1996), and/or by

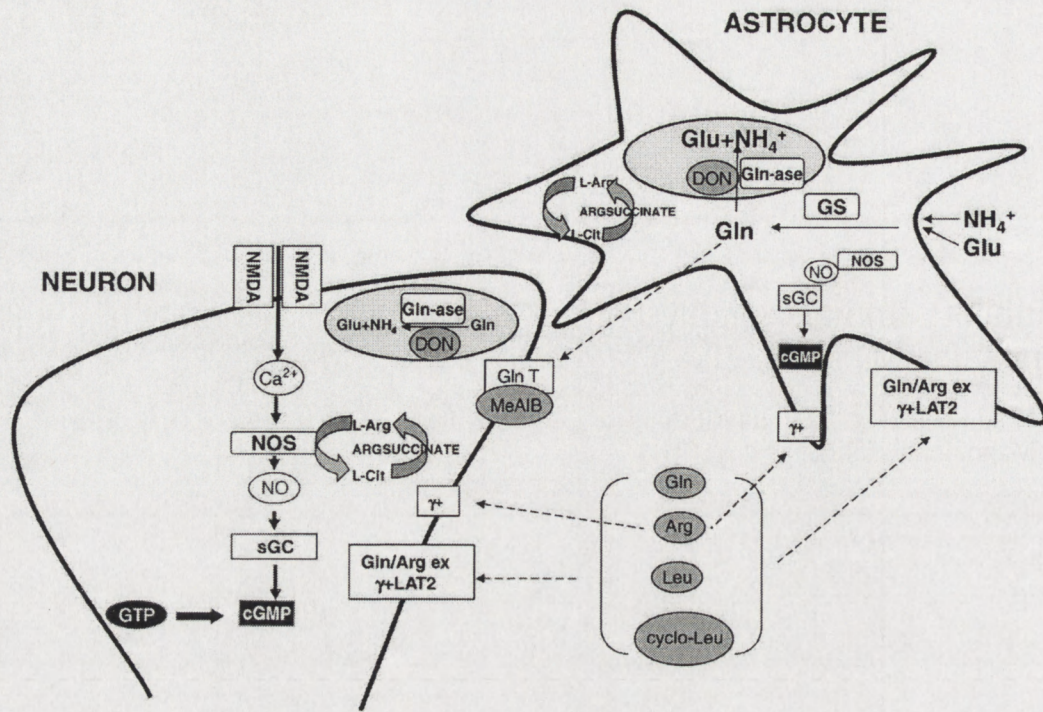
causing mitochondrial damage subsequent to intramitochondrial liberation of ammonia, promoting generation of free radicals (Norenberg et al., 2004; Albrecht and Norenberg, 2006).

Since several reports demonstrated that in peripheral tissues exogenously added Gln inhibits NO synthesis (Hecker et al., 1990; Sessa et al., 1990; Swierkosz et al., 1990; Arnal et al., 1995), we hypothesized that Gln inhibits NO synthesis in the brain and if so, its excessive accumulation in there might attenuate the oxidative/nitrosative stress-related aspect of ammonia neurotoxicity. The first indirect evidence that Gln may inhibit ammonia-induced NO synthesis and cGMP accumulation in the brain was derived from a study using the present experimental setting, with drugs being applied directly to the striatum *in vivo* via a microdialysis probe. In the latter study, reduction of the Gln content in striatal microdialysates from ~20  $\mu$ M to less than 5  $\mu$ M by inhibition of glutamine synthetase (GS) with methionine sulfoximine (MSO) increased ammonia-induced cGMP accumulation (Hilgier et al., 2008). However, the propensity of MSO to activate glutamatergic neurotransmission and promote excitation (Zielińska et al., 2004) hampers unequivocal interpretation of the results. Here we measured the effect of increasing extracellular (microdialysate) Gln by direct administration of (i) the glutaminase inhibitor 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), (ii) the inhibitor of Gln clearance via transport system A methylaminoisobutyrate (MeAiB), and (iii) Gln at the pathophysiologically relevant (5 mM) concentration. Gln concentration in the low millimolar range (up to 8 mM) has

\* Corresponding author. Fax: +48 22 6685532.

E-mail address: [madziul@cmdik.pan.pl](mailto:madziul@cmdik.pan.pl) (M. Zielińska).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).



**Fig. 1.** Modulation of cGMP synthesis by glutamine: hypothetical steps and tools used to interfere with the steps. Activation of ionotropic glutamate receptors (NMDA receptors) on neurons increases intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), activates nitric oxide synthase (NOS) and produces nitric oxide (NO), which in turn activates soluble guanylate cyclase (sGC) leading to increased formation of cGMP. NO production in neurons and astrocytes is dependent on the availability of arginine (Arg) which is provided by uptake to the cells *via* system A transporter and/or by intracellular recycling of citrulline (Cit) to Arg. Ammonia is detoxified in astrocytes by amidation of glutamate to glutamine (Gln) by glutamine synthase (GS). Gln is hydrolyzed in mitochondria (light grey oval structures) by phosphate-activated glutaminase (Gln-ase) to Glu and ammonia. Gln is transported into neurons mainly *via* system A transporter (GlnT). Tools used to manipulate intra- or extracellular Gln concentration: Gln alone; inhibitor of Gln-ase 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON); system A-specific Gln uptake inhibitor methyl-amino-isobutyrate (MeAIB). Exogenously added Arg, leucine (Leu) and cyclo-leucine (cyclo-Leu) as well as sodium removal from media (not illustrated in the graph), served to characterize the role of Gln/Arg exchange by system  $\gamma$ -LAT2 in NO synthesis from Arg.

been recently recorded in brain microdialysates of patients in hepatic coma (Tofteng et al., 2006). Using both *in vivo* (microdialysis) and *in vitro* systems (brain slices) we also tested how addition of Gln affects cGMP synthesis in the absence or presence of the NO donor sodium nitroprusside (SNP). After having established that Gln inhibits NO synthesis but not generation of cGMP by an exogenous NO donor, we identified impaired arginine (Arg) supply *via* the Arg/Gln exchanger/cotransporter  $\gamma$ -LAT2 as a possible target of interference by Gln. Cellular and subcellular targets for pharmacological tools used in this study are depicted in the scheme in Fig. 1.

## Materials and methods

### Animal preparation and microdialysis

The study was performed essentially as described earlier (Hilgier et al., 2003). Adult male Sprague–Dawley rats, 200–230 g, were used. The rats were anesthetized with 4% halothane in air within 2 min and then maintained under anesthesia with 1% halothane in air delivered at 1.2 l/min. They were placed in a stereotactic frame with blunt ear bars and a small incision (3–5 mm) was made in the skin over the skull. Holes were drilled for the skull screws and the concentric microdialysis probes implanted in the left and right caudate-putamens [coordinates from bregma, AP = 0.5, ML =  $\pm$  3.0, DV =  $-$  6.0, according to the atlas of Paxinos and Watson (1982)].

Microdialysis probes of a concentric design (0.5 mm O.D., 3-mm dialyzing membrane) were used (CMA 12, CMA/Microdialysis AB, Sweden). The probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM):  $\text{Na}^+$  150;  $\text{K}^+$  3.0;  $\text{Ca}^{2+}$  1.2,  $\text{Mg}^{2+}$  0.8;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  31.0;  $\text{Cl}^-$  155; pH 7.4, at a rate of 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Ammonium chloride (“ammonia”), and/or each of the Gln content-modifying

agents were infused for 40 min. The concentrations of infused reagents in the extracellular space were estimated from probe efficiency measurements, indicating a recovery from the superfusion fluid of ~10–12% (Zielińska et al., 2002). Accordingly, ammonia, Gln, L-leucine (Leu) and cyclo-leucine (cyclo-Leu) during infusions were 5 mM each and that of Arg 3 mM.  $\text{Na}^+$  ions (sodium chloride) in the ACSF in the experiments specified were replaced with the equimolar concentration of choline chloride. A previous study verified that this procedure causes no discernible tissue damage; there was no leakage of the cellular content to the extracellular space, as revealed by the absence of changes in amino acids not released by neurotransmission-related processes (see Zielińska et al., 2002). For cGMP assays, microdialysate fractions were collected to tubes containing 4 mM EDTA.

### Isolation and incubation of cerebral cortical slices

Animals were decapitated and the brains were immediately transferred into ice-cold Krebs-Ringer bicarbonate buffer (Krebs buffer) of the following composition: 118 mM NaCl, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM glucose, aerated with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  at pH 7.4. After preparation the cortices were cut into 300  $\mu\text{m}$  slices using a manual chopper. The slices were transferred to borosilicate glass vials containing Krebs buffer. Each vial received its own supply of a 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  gas mixture. The slices were preincubated under such conditions for 30 min in a water bath at 37.4  $^\circ\text{C}$  and thereafter incubated for 30 min with or without different concentrations of Gln. To prevent degradation of cGMP, the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutylmethylxanthine (IBMX) at 0.5 mM was added to the Krebs buffer. After treatment the slices were homogenized in a glass-Teflon homogenizer in 300  $\mu\text{l}$  of the assay kit buffer containing 4 mM EDTA and disrupted

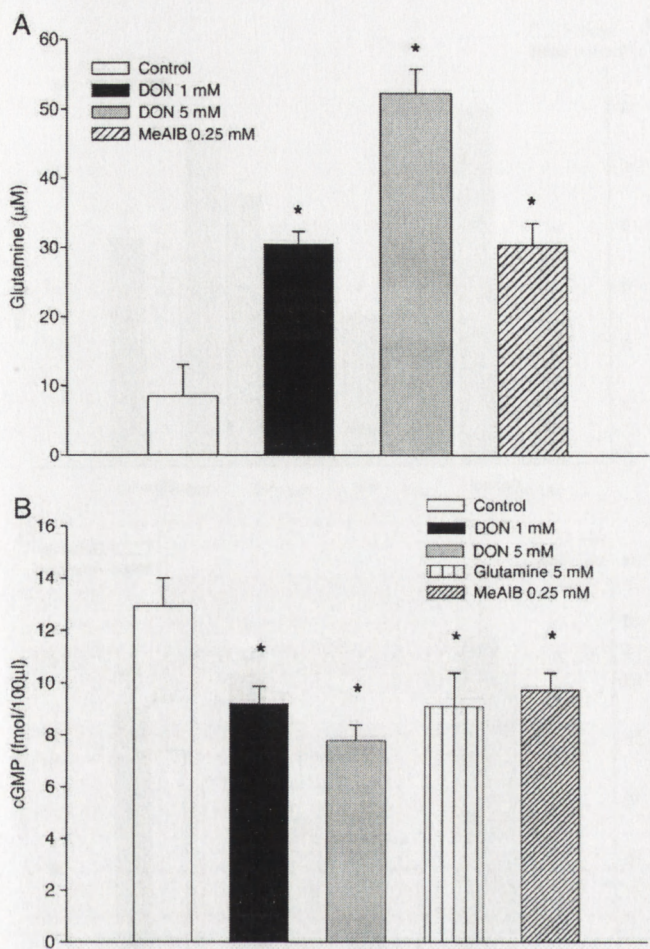


Fig. 2. Effects of perfusion with 1 mM or 5 mM DON and 0.25 mM MeAiB on (A) Gln concentration and (B) cGMP accumulation in striatal microdialysates. Results are means  $\pm$  SD of the Gln or cGMP concentration in the fractions collected from 80–240 min of perfusion ( $n = 5–10$ ). \* $p < 0.05$  vs. control.

by sonication. Samples were boiled for 5 min, centrifuged (14,000  $g$ , 5 min) and cGMP was measured in the supernatant. Protein determination in the pellets was performed according to Bradford's (1976) procedure.

#### cGMP determination

cGMP was determined with cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (Amersham Biosciences, Bristol, UK) according to the manufacturer's protocol with some modifications.

#### Glutamine determination

Glutamine was analysed using HPLC with fluorescence detection after derivatisation in a timed reaction with *o*-phthalaldehyde (OPA) plus mercaptoethanol, as described earlier (Zielińska et al., 1999). Derivatised samples (50  $\mu$ l of microdialysate) were injected onto 150  $\times$  4.6 mm 5  $\mu$ m Hypersil ODS column, eluted with a mobile phase of 0.075 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution containing 10% (v/v) methanol, pH 6.2 (solvent A), and methanol (solvent B). The methanol gradient was 20–70% and the elution time 20 min.

#### NOx assay

Stable NO metabolites, nitrates and nitrites, were converted to NO gas and their chemiluminescence was measured using Sievers Nitric

Oxide Analyzer (Boulder, CO, USA) as described before (Mączewski and Beręsewicz, 2003). Fifty  $\mu$ l samples of microdialysates were injected into the glass purger. The apparatus was calibrated daily against a range of known concentrations of sodium nitrite and sodium nitrate.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance followed by the Dunnett's comparison test or the two-tailed Student's test.

#### Results

Perfusion with 1 mM and 5 mM DON or with 0.25 mM MeAiB significantly increased the microdialysate Gln concentration from  $8.5 \pm 3.5 \mu\text{M}$  to  $30.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$ ,  $52.2 \pm 3.5 \mu\text{M}$  and  $30.4 \pm 3.1 \mu\text{M}$  after each drug application, respectively (Fig. 2A). Perfusion with either of these agents decreased the "basal" cGMP concentration in microdialysates by  $\sim 30$  and 40% with 1 and 5 mM DON and  $\sim 30\%$  with 5 mM Gln and 25% with 0.25 mM MeAiB (Fig. 2B). "Ammonia" infusion increased the cGMP concentration from  $13.1 \pm 0.5 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$  to  $29.6 \pm 1.2 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$  (Fig. 3A). Ammonia-induced cGMP

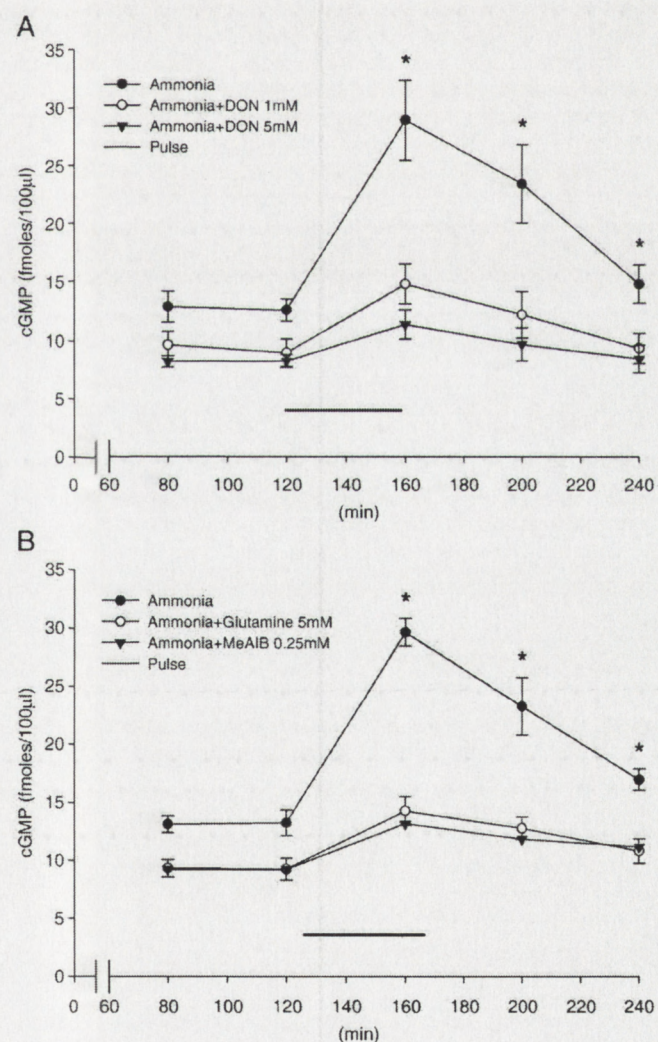
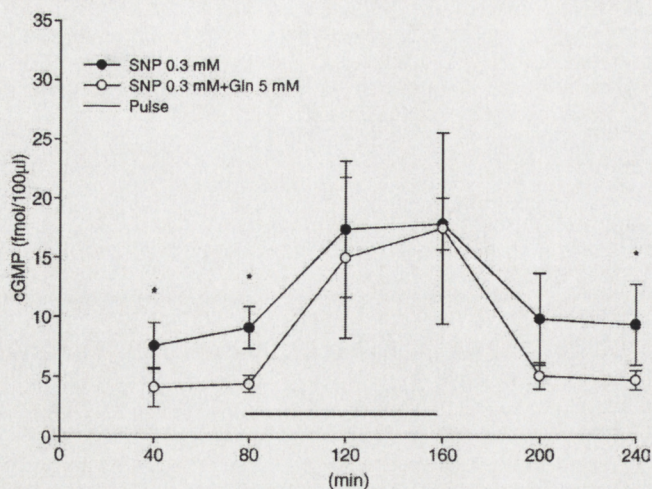


Fig. 3. Effects of perfusion with 5 mM ammonia (A) in the presence or absence 1 mM and 5 mM DON and (B) 5 mM Gln and 0.25 mM MeAiB on the cGMP concentration in striatal microdialysates. Results are means  $\pm$  SD of the fractions collected during perfusion ( $n = 5–10$ ). \* $p < 0.05$ .



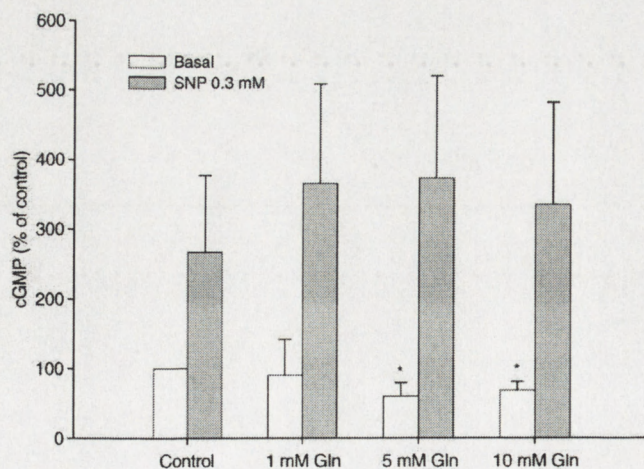


**Fig. 4.** Effects of perfusion with 0.3 mM SNP in the presence or absence of 5 mM Gln on the cGMP concentration in striatal microdialysates. Results are means  $\pm$  SD of the fractions collected during perfusion ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ .

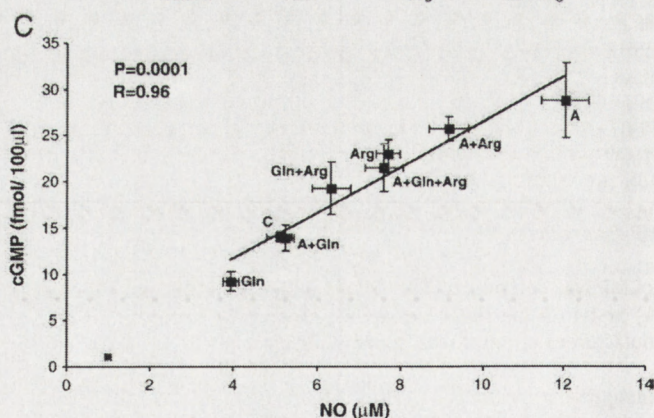
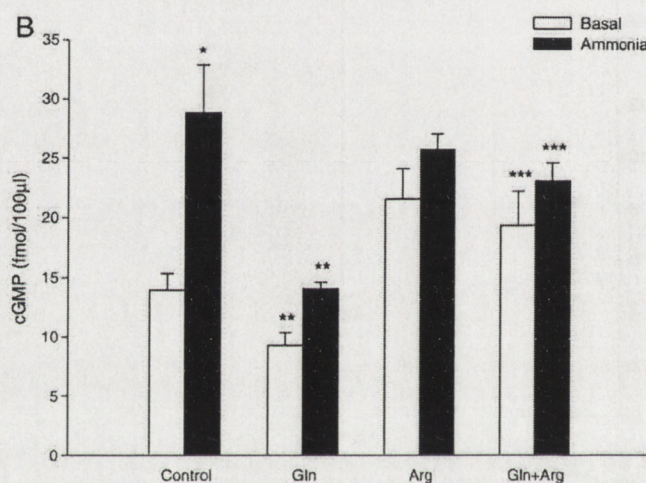
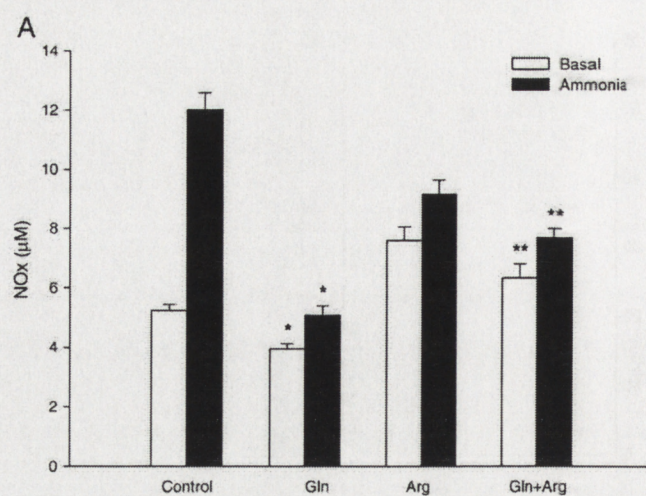
accumulation in the presence of 1 mM DON, 5 mM DON, and 0.25 mM MeAiB was down to 66%, 39% and 35% of the respective values measured in the absence of the drugs, respectively. (Figs. 3A, B). Glutamine applied at the 5-mM concentration reduced ammonia-dependent cGMP accumulation to 54% (Fig. 3B).

To see whether the effect of Gln is upstream or downstream of NO synthesis, we used SNP as an NO donor to activate soluble GC. Glutamine at the 5-mM concentration decreased “basal” cGMP formation to  $\sim 50\%$  but did not alter SNP-induced cGMP formation measured in microdialysates (Fig. 4), indicating that the effect is at the level of Arg transport rather than by affecting NO production *per se*. The *in vitro* experiments on rat brain cortical slices confirmed the dose-dependent inhibition of cGMP formation by Gln (Fig. 5) whereas the SNP-dependent (0.3 mM, 15 min) cGMP formation was unaffected.

Exogenously applied 3 mM Arg *via* microdialysis probes reversed the reduction in NOx evoked by Gln both in “basal” and “ammonia” microdialysates (Fig. 6A). Arginine also restored the Gln-reduced formation of cGMP from  $9.2 \pm 1.1$  to  $19.3 \pm 2.9$  fmol/100  $\mu$ l in “basal” and from  $14.1 \pm 0.5$  to  $23.0 \pm 1.5$  fmol/100  $\mu$ l in “ammonia” microdialysates (Fig. 6B). The mean concentrations of NOx and cGMP from the same individuals are shown in Fig. 6C; a significant positive correlation ( $P = 0.0001$ ,  $R = 0.96$ ) between both parameters was



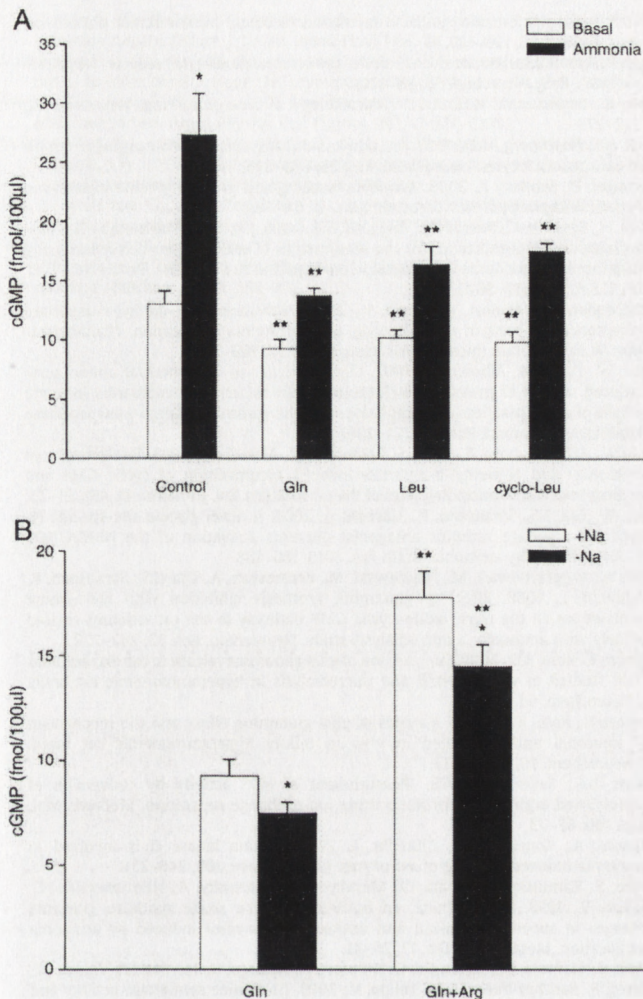
**Fig. 5.** Effects of 1, 5 and 10 mM Gln on cGMP accumulation in rat brain cortical slices in the presence or absence of 0.3 mM SNP. Results are means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$  vs. control.



**Fig. 6.** Effects of perfusion with 5 mM ammonia in the presence or absence 5 mM Gln and/or 3 mM Arg on the NOx concentration (A) and cGMP content (B) in striatal microdialysates. Results are means  $\pm$  SD of the fractions collected from 120–240 min of perfusion ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  vs. “basal”; \*\* $p < 0.05$  vs. “control”; \*\*\* $p < 0.05$  vs. “Gln”. Panel (C) shows a significant positive correlation ( $P = 0.0001$ ,  $R = 0.96$ ) between NOx and cGMP.

obtained. Compensation of the effects of Gln by Arg indicates that Gln may affect the access of Arg by competing for a common transport system.

The sodium independence observed indicates the system  $y^+L$  isoform  $y^+LAT2$  transporter as the one which accepts both Arg and Gln. Accumulation of cGMP reduced by Gln was restored by Arg in



**Fig. 7.** Effects of perfusion (A) with 5 mM ammonia in the presence or absence 5 mM Gln, 5 mM Leu and 5 mM *cyclo*-Leu on the cGMP content and (B) with 5 mM Gln and 3 mM Arg in the presence or absence  $\text{Na}^+$  on the cGMP concentration in striatal microdialysates. Results are means  $\pm$  SD of the fractions collected from 120–240 min of perfusion ( $n=6$ ). \* $p<0.05$  vs. "basal"; \*\* $p<0.05$  vs. "control" (A); \* $p<0.05$  vs. +Na, \*\* $p<0.05$  vs. Gln (B).

$\text{Na}^+$ -containing ACSF by 92% and in  $\text{Na}^+$ -free ACSF by 93% (Fig. 7B). Addition of 5 mM Leu or its non-metabolizable analogue *cyclo*-Leu, mimicked Gln in reducing "basal" and "ammonia"-induced cGMP formation in microdialysates (Fig. 7A). Cyclic GMP was decreased by Leu and *cyclo*-Leu from  $13.0 \pm 1.1$  fmol/100  $\mu\text{l}$  to  $10.2 \pm 0.7$  and  $9.8 \pm 0.9$  fmol/100  $\mu\text{l}$ , respectively, and ammonia-induced cGMP formation from  $27.3 \pm 3.5$  to  $16.4 \pm 1.5$  and  $17.5 \pm 0.6$  fmol/100  $\mu\text{l}$ , respectively.

## Discussion

The present study demonstrates for the first time that direct administration of pathophysiologically relevant concentrations of Gln inhibits ammonia-induced and spontaneous accumulation of NO and cGMP *in vivo*. In the *in vivo* setting, the concentrations of NO and cGMP were measured in the microdialysates not in the tissue. However, since diffusion of these two molecules to the extracellular space is an instant process, the obtained data do genuinely reflect the activity of the NO/cGMP pathway in the brain tissue (Fedele and Raiteri, 1999; Vallebuona and Raiteri, 1994). Further key findings of this study are that (i) the effect of direct administration of Gln can be reproduced by two pharmacological manipulations which increase extracellular Gln, (ii) the inhibitory effect of Gln does not involve

interference with soluble GC, and (iii) one possible Gln target is inhibition of Arg supply by the  $\text{y}^+\text{LAT2}$  transporter, a cell membrane entry site common to Gln and Arg. These aspects deserve further comments.

Ammonium chloride ("ammonia") applied by microdialysis probe at the 5 mM concentration increases the Gln content in brain microdialysates (Zielińska et al., 2002; Hilgier et al., 2008). The two pharmacological manipulations in the present study; inhibition of Gln degradation with the phosphate-activated glutaminase inhibitor DON and inhibition of Gln transport into cells via the A system by MeAIB likewise increased the Gln content in the extracellular space. DON at the 1 mM concentration has been previously employed to increase intracellular Gln and to model its adverse effects in cultured ammonia-treated astrocytes (Norenberg et al., 2004; Rama Rao et al., 2005). An alternative or additional mechanism of DON action could be inhibition of its transport to the cells or exchange with other amino acids via the system L. In concert with this assumption, DON has enhanced Gln release from isolated rat cerebral capillaries (Hilgier et al., 1992). Application of MeAIB via microdialysis probes at concentrations comparable to those used now has likewise increased extracellular Gln in rat cerebral cortical microdialysates (Kanamori and Ross, 2005; 2006).

Cyclic GMP synthesis induced by the NO donor was not changed by exogenously applied Gln both *in vivo* and in cerebral cortical slices *in vitro*, indicating an upstream target of Gln action. The synthesis of NO requires Arg for the reaction catalyzed by nitric oxide synthase (Knowles and Salter, 1998). Arginine can be obtained from blood or by intracellular recycling of L-citrulline (Cit) to Arg in the enzymatic shunt involving arginosuccinate synthetase and arginosuccinate lyase, both enzymes abounding in neural cells (Braissant et al., 1999). However, the rapid onset of the effect points to a third possibility, i.e., inhibition of the Arg supply by Gln via transmembrane transport.

Transport of Arg in mammalian tissues is mediated by  $\text{y}^+$  and  $\text{y}^+\text{L}$  systems of which  $\text{y}^+\text{L}$  also accepts Gln and large neutral amino acids including Leu (reviewed by Deves and Boyd, 1998; Closs, 2002). Inversely, transport of Gln and Leu can be inhibited by Arg (Rao and Murthy, 1994). These characteristics are typical for  $\text{y}^+\text{L}$  transport system (Deves and Boyd, 1998; Dye et al., 2004).

The  $\text{y}^+\text{LAT2}$  isoform of the system  $\text{y}^+\text{L}$  is the only transport system described so far for which Gln and Arg are substrates (Wagner et al., 2001). This system can bind and translocate Arg and Gln and other neutral amino acids and its specificity depends on the presence of  $\text{Na}^+$  ions (Wagner et al., 2001). Our observation that Arg was able to restore Gln-reduced NOx and cGMP formation indicates that the  $\text{y}^+\text{LAT2}$  may indeed be involved. In agreement with this notion, two  $\text{y}^+\text{L}$  transport system substrates Leu and its non-metabolizable analogue *cyclo*-Leu, which are substrates of the transport system  $\text{y}^+\text{L}$  (Bröer et al., 2007), were able to mimic the effect of Gln, whereas the restoration by Arg occurred in the absence of  $\text{Na}^+$  as effectively as in its presence (Dye et al., 2004). However, inhibition by Gln of the recycling of the Arg precursor Cit is a possibility that cannot be completely ruled out. Such competition between Cit and Gln for uptake has been suggested by Wu and Meininger (1993) to operate in peripheral endothelial cells. The same group suggested one additional possibility: inhibition by a Gln metabolite glucosamine (Wu et al., 2001). To date, inhibition of Arg uptake by Gln has been dismissed as a potential contributor to NO synthesis depression in endothelial cells (Arnal et al., 1995), suggesting that the mechanisms of Gln action may be tissue-specific.

One observation difficult to reconcile with the above scheme is that Arg alone tended to suppress ammonia-induced activation of the NO/cGMP pathway (Figs. 6A, B). Earlier studies have shown that hyperammonemia or ammonia *in vitro* stimulate Arg uptake to astrocytes (Hazell and Norenberg, 1998) and synaptosomes (Albrecht et al., 1990; Rao et al., 1997), which should result in increased rather than decreased NO synthesis. Inhibition of Arg uptake by ammonia

administered via microdialysis probe may be specific to the cellular environment of the probe.

While in the physiological setting Gln may serve as a natural modulator of NO synthesis in the brain, the pathophysiological impact of the inhibitory action of Gln on the NO/cGMP pathway during ammonia neurotoxicity is difficult to interpret in simple terms. The main adverse consequence of hyperammonemia at the cellular level is astrocytic swelling, which often contributes to fatal cerebral edema (Blei, 2007). Cell swelling has been suggested to be a part of the vicious circle with oxidative and nitrosative stress (Schliess et al., 2006, Blei, 2007), including nitration and S-nitrosylation of proteins (Schliess et al., 2002; Häussinger and Schliess, 2005). Excessive activation of the NMDA/NO/cGMP pathway is a major source of nitrogen radicals and peroxynitrates at the early stage of hyperammonemia (Kosenko et al., 1998; Hilgier et al., 2008), and cGMP may directly contribute to astrocytic swelling (Konopacka et al., 2009). An attractive hypothesis emerges from the above considerations that Gln, by reducing NOx and cGMP, would tend to counteract these deleterious effects. However, the beneficial role of Gln in hyperammonemia in animal models or patients remains to be proven. If at all significant, it would most likely be confined to the early, acute stage of ammonia exposure. In moderately hyperammonemic animals, direct contribution of accumulating Gln to astrocytic swelling and brain edema comes to light within a few hours (Willard-Mack et al., 1996). Furthermore, nitrosative stress associated with prolonged hyperammonemic insult leads to a durable decrease of glutamine synthetase activity in the brain (reviewed by Kosenko et al., 2003).

It should be emphasized that the approach used in this study addresses the response of the NO/cGMP pathway to ammonia at the whole tissue level, without consideration of the complex interactions between the different CNS cell types, in particular neurons and astrocytes (see the scheme in Fig. 1). Clearly, further studies are needed to address the cell-specific responses of the NO/cGMP pathway to ammonia and their modulation by Gln.

## Acknowledgments

The study was supported by the Ministry of Science and Education of Poland, grants: N N401 0550 33 (MZ) and S 005/P-N/2007/01 (JA), and the competitive research funding of Pirkanmaa hospital district.

## References

- Albrecht, J., Jones, E.A., 1999. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* 170, 138–146.
- Albrecht, J., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44, 788–794.
- Albrecht, J., Hilgier, W., Rafalowska, U., 1990. Activation of arginine metabolism to glutamate in rat brain synaptosomes in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: an adaptative response? *J. Neurosci. Res.* 25, 125–130.
- Arnal, J.F., Münzel, T., Venema, R.C., James, N.L., Bai, C.L., Mitch, W.E., Harrison, D.G., 1995. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J. Clin. Invest.* 95, 2565–2572.
- Blei, A.T., 2007. Brain edema in acute liver failure: can it be prevented? Can it be treated. *J. Hepatol.* 46, 564–569.
- Bradford, M.M., 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.
- Braissant, O., Honegger, P., Loup, M., Iwase, K., Takiguchi, M., Bachmann, C., 1999. Hyperammonemia: regulation of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase genes in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Neurosci. Lett.* 266, 89–92.
- Bröer, S., Bröer, A., Hansen, J.T., Bubbs, W.A., Balcar, V.J., Nasrallah, F.A., Garner, B., Rae, C., 2007. Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *J. Neurochem.* 102, 1758–1770.
- Closs, E.I., 2002. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 99–107.
- Cordoba, J., Gottstein, J., Blei, A.T., 1996. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24, 919–923.
- Deves, R., Boyd, C.A.R., 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 78, 487–545.
- Dye, J.F., Vause, S., Johnston, T., Clark, P., Firth, J.A., D'Souza, S.W., Sibley, C.P., Glazier, J.D., 2004. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 18, 125–137.
- Fedele, E., Raiteri, M., 1999. In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog. Neurobiol.* 58, 89–120.
- Felipo, V., Butterworth, R.F., 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67, 259–279.
- Hazell, A.S., Norenberg, M.D., 1998. Ammonia and manganese increase arginine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 23, 869–873.
- Häussinger, D., Schliess, F., 2005. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* 47, 64–70.
- Hecker, M., Sessa, W.C., Harris, H.J., Anggård, E.E., Vane, J.R., 1990. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8612–8616.
- Hermenegildo, C., Monfort, P., Felipo, V., 2000. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31, 709–715.
- Hilgier, W., Puka, M., Albrecht, J., 1992. Characteristics of large neutral amino acid-induced release of preloaded L-glutamine from rat cerebral capillaries in vitro: effects of ammonia, hepatic encephalopathy, and gamma-glutamyl transpeptidase inhibitors. *J. Neurosci. Res.* 32, 221–226.
- Hilgier, W., Anderzhanova, E., Oja, S.S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2003. Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 468, 21–25.
- Hilgier, W., Oja, S.S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2004. A novel glycine site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/cGMP pathway by ammonia. *Brain Res.* 1015, 186–188.
- Hilgier, W., Węgrzynowicz, M., Mączewski, M., Beręsewicz, A., Oja, S.S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2008. Effect of glutamine synthesis inhibition with methionine sulfoximine on the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the rat striatum treated acutely with ammonia: a microdialysis study. *Neurochem. Res.* 33, 267–272.
- Kanamori, K., Ross, B.D., 2005. Suppression of glial glutamine release to the extracellular fluid studied in vivo by NMR and microdialysis in hyperammonemic rat brain. *J. Neurochem.* 94, 74–85.
- Kanamori, K., Ross, B.D., 2006. Kinetics of glial glutamine efflux and the mechanism of neuronal uptake studied in vivo in mildly hyperammonemic rat brain. *J. Neurochem.* 99, 1103–1113.
- Knowles, R.G., Salter, M., 1998. Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation. *Methods Mol. Biol.* 100, 67–73.
- Konopacka, A., Konopacki, F., Albrecht, J., 2009. Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J. Neurochem.* 109, 246–251.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Kaminsky, A., Hermenegildo, C., Felipo, V., 1998. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metab. Brain Dis.* 13, 29–41.
- Kosenko, E., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Rodrigo, R., Hernandez-Viadel, M., Erceg, S., Sanchez-Perez, A.M., Felipo, V., 2003. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem. Int.* 43, 493–499.
- Larsen, F.S., Gottstein, J., Blei, A.T., 2001. Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J. Hepatol.* 34, 548–554.
- Mączewski, M., Beręsewicz, A., 2003. Role of nitric oxide and free radicals in cardioprotection by blocking Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 46, 139–147.
- Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., 2004. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 303–307.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D., 2005. Differential response of glutamine in cultured neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 79, 193–199.
- Rao, K.V., Murthy, C.R., 1994. Synaptosomal high affinity transport systems for essential amino acids in rat brain cortex. *Neurosci. Lett.* 175, 103–106.
- Rao, V.L., Audet, R.M., Butterworth, R.F., 1997. Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* 765, 169–172.
- Reinehr, R., Görg, B., Becker, S., Qvarnkvist, H., Bidmon, H.J., Selbach, O., Haas, H.L., 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.
- Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H.J., Herrmann, A., Butterworth, R.F., 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.
- Sessa, W.C., Hecker, M., Mitchell, J.A., Vane, J.R., 1990. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8607–8611.
- Swain, M., Butterworth, R.F., Blei, A.T., 1992. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15, 449–453.
- Swierkosz, T.A., Mitchell, J.A., Sessa, W.C., Hecker, M., Vane, J.R., 1990. L-Glutamine inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor from the rabbit aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 143–148.
- Tofteng, F., Hauerberg, J., Hansen, B.A., Pedersen, C.B., Jørgensen, L., Larsen, F.S., 2006. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and

- alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J. Cereb. Blood Flow Met.* 26, 21–27.
- Vallebuona, F., Raiteri, M., 1994. Extracellular cGMP in the hippocampus of freely moving rats as an index of nitric oxide (NO) synthase activity. *J. Neurosci.* 14, 134–139.
- Wagner, C.A., Lang, F., Bröer, S., 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1077–C1093.
- Willard-Mack, C.L., Koehler, R.C., Hirata, T., Cork, L.C., Takahashi, H., Traystman, R.J., Brusilow, S.W., 1996. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 71, 589–599.
- Wu, G., Meininger, C.J., 1993. Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 265, H1965–H1971.
- Wu, G., Haynes, T.E., Li, H., Yan, W., Meininger, C.J., 2001. Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *Biochem. J.* 353, 245–252.
- Zielińska, M., Hilgier, W., Law, R.O., Goryński, P., Albrecht, J., 1999. Effects of ammonia in vitro on endogenous taurine efflux and cell volume in rat cerebrocortical minislices: influence of inhibitors of volume-sensitive amino acid transport. *Neuroscience* 91, 631–638.
- Zielińska, M., Hilgier, W., Borkowska, H.D., Oja, S.S., Saransaari, P., Goryński, P., Albrecht, J., 2002. Ammonia-induced extracellular accumulation of taurine in the rat striatum in vivo: role of ionotropic glutamate receptors. *Neurochem. Res.* 27, 37–42.
- Zielińska, M., Law, R.O., Albrecht, J., 2003. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem. Int.* 43, 299–303.
- Zielińska, M., Stańej, A., Law, R.O., Albrecht, J., 2004. Effects of methionine sulfoximine on the glutamine and glutamate content and cell volume in rat cerebral cortical slices: involvement of mechanisms not related to inhibition of glutamine synthesis. *Neurotoxicology* 25, 443–449.

Accepted Manuscript

Title: Application  
of the polynomial  
method in algebra

Author: Marek  
Dąbrowski, Andrzej

2010  
1001  
1001

## PUBLIKACJA V

Received date  
Accepted date  
Published date

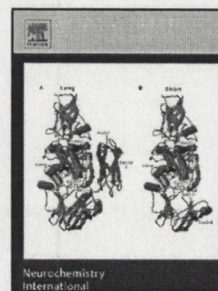
Please note that  
I, the author, do  
not retain the  
copyright in the  
manuscript

This is a PDF file  
As a service to  
the community  
before it is published  
this file may be used  
subject to the usual  
conditions of use

## Accepted Manuscript

Title: Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter  $\gamma^+$ LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway

Authors: Magdalena Zielińska, Joanna Ruszkiewicz, Wojciech Hilgier, Inez Fręsko, Jan Albrecht



PII: S0197-0186(10)00355-4  
DOI: doi:10.1016/j.neuint.2010.11.015  
Reference: NCI 2765

To appear in: *Neurochemistry International*

Received date: 2-8-2010  
Revised date: 17-11-2010  
Accepted date: 19-11-2010

Please cite this article as: Zielińska, M., Ruszkiewicz, J., Hilgier, W., Fręsko, I., Albrecht, J., Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter  $\gamma^+$ LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway, *Neurochemistry International* (2010), doi:10.1016/j.neuint.2010.11.015

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter  $\gamma^+$ LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway**

Magdalena Zielińska\*, Joanna Ruszkiewicz, Wojciech Hilgier, Inez Fręsko, Jan Albrecht

Department of Neurotoxicology, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5 Str, 02-106 Warsaw, Poland

phone/fax: +48 22 6086470/+48 22 6086442

\*corresponding author: e-mail: [madziul@cmdik.pan.pl](mailto:madziul@cmdik.pan.pl)

**Abstract**

The pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE) is associated with hyperammonemia (HA) and subsequent exposure of the brain to excess of ammonia. Alterations of the NO/cGMP pathway and increased glutamine (Gln) content are collectively responsible for many HE symptoms, but how the two events influence each other is not clear. Previously we had shown that Gln administered intracerebrally inhibited the NO/cGMP pathway in control rats and even more so in rats with HA, and we speculated that this effect is due to inhibition by Gln of arginine (Arg) transport (Hilgier et al., 2009). In this study we demonstrate that a 3-day HA in the ammonium acetate model increases the expression in the brain of  $\gamma^+$ LAT2, the heteromeric transporter which preferentially stimulates Arg efflux from the cells in exchange for Gln. The expression of the basic amino acid transporter CAT1, transporting Arg but not Gln remained unaffected by HA. Multiple parameters of Arg or Gln uptake and/or efflux and their mutual dependence were altered in the cerebral cortical slices obtained from HA rats, in a manner indicating enhanced  $\gamma^+$ LAT2-mediated transport. HA elevated Gln content and decreased cGMP content as measured both in the cerebral cortical tissue and microdialysates. Intracortical administration of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), which inhibits Gln fluxes between different cells of the CNS, attenuated the HA-induced decrease of cGMP in the microdialysates of HA rats, but not of control rats. The results suggest that, reduced delivery of Arg due to enhanced  $\gamma^+$ LAT2-mediated exchange of extracellular Gln for intracellular Arg may contribute to the decrease of NO/cGMP pathway activity evoked in the brain by HA.

Key words: hyperammonemia; ammonia; glutamine;  $\gamma^+$ LAT2 transporter; arginine; cGMP;



## 1. Introduction

Ammonia toxicity plays a causative role in different neurological disorders associated with hyperammonemia (HA) including hepatic encephalopathy (HE) (Albrecht and Jones, 1999; Felipo and Butterworth, 2002). Acute ammonia neurotoxicity is thought to be contributed by overactivation of NMDA receptors which leads to increased nitric oxide (NO) synthesis and accumulation of toxic oxygen- and nitrogen free radicals, and is coupled to enhanced accumulation of cGMP (Hermenegildo et al., 2000; Hilgier et al., 2004). Prolonged HA is accompanied by decreased NMDA receptor-dependent NO synthesis and a decrease of cGMP accumulation. The decrease of cGMP, particularly pronounced in the cerebellum (Hermenegildo et al., 1998) and hippocampus (Monfort et al., 2004), contributes to cognitive symptoms of HE associated with these structures (Cauli et al., 2009; Felipo, 2006).

The factors responsible for the decreased NO/cGMP activity have not been fully elucidated. Available evidence implicates downregulation of NMDA receptors (Peterson et al., 1989; Saransaari et al., 1997) and/or increased cGMP degradation due to the protein kinase G-mediated stimulation of phosphodiesterases (Monfort et al., 2004). However, no attention has been paid to the possibility that HA may also modulate the supply of the NO precursor, arginine (Arg). In brain cells, Arg is supplied by protein breakdown or transported from the blood through several different classes of cationic amino acids transporters. While in the brain Arg can also be recycled from citrulline produced by the NOS activity, through argininosuccinate synthetase (AS) and argininosuccinate lyase (AL) activities (Wiesinger, 2001), this pathway is preferentially induced in cytokine-stimulated cells *in vitro* (Schmidlin and Wiesinger, 1998; Zhang et al., 1999) but is only rarely observed *in vivo* (Heneka et al., 1999); hence, Arg delivery by cell membrane transport appears to dominate in resting astrocytes (Gensert and Ratan, 2006). Two transport systems:  $y^+$  and  $y^+L$  mediate Arg entry into CNS cells. System  $y^+$  carriers are a family of cationic amino acid transporters called CAT

with four proteins identified so far (Closs et al., 2006). The  $y^+L$  system is represented by 4F2hc/ $y^+LAT1$  and 4F2hc/ $y^+LAT2$  transporters, which in addition to Arg and other cationic amino acids accept neutral amino acids including Gln; the transport of the latter is coupled to  $Na^+$  influx (Dye et al., 2004). Of these two transporters, the brain expresses only  $y^+LAT2$  (Heckel et al., 2003; Wagner et al., 2001). Of note, whilst  $y^+LAT2$  mediates the influx of several neutral and cationic amino acids with similar efficiency, the efflux of cationic amino acids in exchange for Gln is much more efficient than *vice versa* (Bröer et al., 2000). However, the physiological role of this transporter is not clear at present.

Our interest in the Arg/Gln exchange stemmed from the evidence that ammonia detoxification in HA leads to excessive Gln accumulation in the brain (Cordoba et al., 1996; Hourani et al., 1971; Swain et al., 1992). Gln accumulating intracellularly contributes to ammonia-induced cerebral edema (Brusilow and Traystman, 1986) by a complex mechanism involving osmotic stress (Willard-Mack et al., 1996), and/or astrocytic mitochondrial damage (Albrecht and Norenberg, 2006; Norenberg et al., 2004). However, a portion of Gln produced in astrocytes leaves the cells by diffusion or active transport (Chaudhry et al., 1999), and this extracellular Gln is actively transferred to neurons and to the periphery across the cerebral endothelial cells (Lee et al., 1998; O'Kane et al., 2004). A recent study revealed that administration of Gln to the extracellular space of the brain by a microdialysis probe decreases the synthesis of NO and cGMP (Hilgier et al., 2009). Furthermore, modulation of the effect by inhibitors of Gln transport and/or degradation suggested that Gln inhibits Arg uptake, and/or increases its efflux, indirectly implicating Arg/Gln exchange (Hilgier et al., 2009). We therefore hypothesized that inhibition of NO synthesis as well as reduction of cGMP levels seen in brain during hyperammonemia may be at least partly related to increased exchange of the excess of extracellular Gln for Arg due to increased  $y^+LAT2$  activity. To test this hypothesis we compared  $y^+LAT2$  expression at the mRNA and protein

level and the  $\gamma^+$ LAT2 transporter activity in the cerebral tissue of control and rats with HA induced by systemic administration of ammonium acetate. Next we verified that similar to what was previously seen in cerebellum, HA in the present model decreases the cGMP content in the cerebral cortical tissue (slices) and microdialysates. To study the possible link between the  $\gamma^+$ LAT2 transporter activity and cGMP synthesis, we tested whether cGMP accumulation in HA-affected cerebral cortex *in vivo* is modulated by 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), which inhibits Gln degradation (Hilgier et al., 1992), but also Gln fluxes by inactivating different Gln transporters at the cell membrane (Low et al., 1991; Taylor et al., 1992).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Hyperammonemic model

HA was induced by 3 i.p. injections of ammonium acetate (600 mg per kg) at 24h intervals and sacrificed by cervical dislocation 24h after third injection (Hilgier and Olson, 1994). The animals lost weight (~5%), were drowsy, and showed a gradually decreasing responsiveness to external stimuli. In addition, they developed brain edema, and showed moderately elevated blood ammonia and brain ammonia and Gln levels (for further details of the model see Hilgier and Olson, 1994, and references therein). Control rats, analogically injected with sodium saline solution, were asymptomatic.

### 2.2. Animal preparation and microdialysis

The study was performed essentially as described earlier (Hilgier et al., 2004). Adult male Sprague-Dawley rats, 200-230g, were used. The rats were anesthetized with 4% halothane in air within 2 min and then maintained under anesthesia with 1% halothane in air delivered at 1.2 l/min. They were placed in a stereotactic frame with blunt ear bars and a small incision (3-5 mm) was made in the skin over the skull. Holes were drilled for the skull screws

and the concentric microdialysis probes implanted in the left and right caudate-putamen [coordinates: 3mm anterior from the bregma, 1.0 mm lateral from the sagittal suture and 4mm ventral from dural surface] according to the atlas of Paxinos and Watson (1986)].

Microdialysis probes of a concentric design (0.5 mm O.D., 3-mm dialyzing membrane) were used (CMA 12, CMA/Microdialysis AB, Sweden). The probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM):  $\text{Na}^+$  150;  $\text{K}^+$  3.0;  $\text{Ca}^{2+}$  1.2,  $\text{Mg}^{2+}$  0.8;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  31.0;  $\text{Cl}^-$  155; pH 7.4, at a rate of 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . DON were infused for 120 min at 5 mM concentration. For cGMP assays, microdialysate fractions were collected to tubes containing 4 mM EDTA.

### 2.3. Preparation of cerebral cortical slices

Male Wistar rats (150–220 g body weight) were used throughout. In essence, a previously described procedure was followed (Zielińska et al., 1999) with slight modifications. Animals were decapitated and the brains were immediately transferred into ice-cold Krebs-Ringer bicarbonate buffer (Krebs buffer) of the following composition: 118 mM NaCl, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM glucose, aerated with 95 %  $\text{O}_2$  and 5 %  $\text{CO}_2$  at pH 7.4. The cortices were cut into 300  $\mu\text{m}$  slices using a manual chopper and transferred to borosilicate glass vials containing fresh buffer and supplied of a 95 %  $\text{O}_2$  and 5 %  $\text{CO}_2$  gas mixture. Slices were preincubated for 30 min at 37.4 °C and thereafter incubated for 5 min with the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutylmethylxanthinine (IBMX) at 0.5 mM for cGMP determination.

### 2.4. cGMP determination

cGMP was determined with cGMP Enzyme Immunoassay Biotrak (EIA) System (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol with modifications (Hilgier et al., 2009).

### 2.5. Amino acids determination in cerebral cortical microdialysates

Glutamine was analysed using HPLC with fluorescence detection after derivatisation in a timed reaction with o-phthalaldehyde (OPA) plus mercaptoethanol, as described earlier (Zielińska et al., 1999). Derivatised samples (50 µl of microdialysate) were injected onto 150 x 4.6 mm 5 µm Hypersil ODS column, eluted with a mobile phase of 0.075M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution containing 10% (v/v) methanol, pH 6.2 (solvent A), and methanol (solvent B). The methanol gradient was 20–70% and the elution time 20 min.

## 2.6. Transport experiments

*Uptake:* Uptake was carried out in cerebral cortical slices pre-incubated as described in & 2.3. The reaction was started by adding L-[<sup>3</sup>H]arginine or L-[<sup>3</sup>H]glutamine, each at 100 µmol/L final concentration and the incubation was continued for 4 or 7 min, respectively. Kinetics of [<sup>3</sup>H]arginine uptake was determined in Na<sup>+</sup>-containing medium over varying extracellular Arg concentrations (2.5-1000 µM). The incubation was terminated by a rapid vacuum filtration through 2.5 cm 0.45 µm Millipore filter disks (Millipore, Ireland), followed by three washes with 2 ml with Krebs buffer maintained at 4°C. The radioactivity on filter disks was measured in a Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Perkin - Elmer, Finland).

To measure Arg uptake driven by exchange with the non-metabolizable  $\gamma^+$ LAT2 co-substrate *cyclo*-leucine, the slices before the start of uptake were preincubated for 15 min with 10 mM *cyclo*-leucine.

*Release:* Cerebral cortical slices were incubated in Krebs buffer at 37°C containing 0.5 µCi/ml [<sup>3</sup>H]arginine for 15 min in the presence and absence of 1mM N-ethyl-maleimide (NEM), an agent which inhibits the  $\gamma^+$  - mediated transport. After incubation, the tissues were transferred to 6-chamber perfusion system at 37 °C (Brandel, USA) and superfused continuously with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> saturated Krebs buffer with or without 5 mM Gln at a rate of 0.5 ml/min. 1-min perfusate samples were collected and [<sup>3</sup>H]arginine radioactivity released from the preparations was measured.

### 2.7. Real-time PCR analysis

Total RNA from rat cortex and/or astrocytes respectively, was isolated using TRI Reagent (Sigma), then 1 µg was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystem). Real time PCR was performed in 96 well plates with the ABI 7500 apparatus (Applied Biosystems) using the MGB Taqman probe assay. Primers and probes for  $\gamma$ -LAT2, CAT1 and endogenous control  $\beta$ -actin were purchased from Applied Biosystems (Rn 01431908\_m1, Rn 00565399\_m1 and Rn 00667869\_m1, respectively). Each reaction contained 5 µl Taqman Universal PCR Mastermix in a total volume of 10 µl, and 1 µl cDNA was added to the reaction. The real time PCR reactions were performed at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C. The results of the analysis were calculated in relation to the  $\beta$ -actin product, and results were calculated according to, and expressed by an equation ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) that gives the amount of target, normalized to an endogenous reference and relative to a calibrator. CT, is the threshold cycle for target amplification (Livak and Schmittgen, 2001).

### 2.8. Protein isolation and Western Blot analysis

Isolated rat brain cerebral cortex were homogenized and/or incubated at 4°C with Triton Lysis Buffer (20 mM Tris pH 6.8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 1mM PMSF) containing Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). The brain homogenate was centrifuged for 10 min at 12, 000x g and 4°C. The supernatants was transferred to a new Eppendorf tube and used for further investigations as a cytosolic fraction. Protein (30 µg) was boiled with SDS for polyacrylamide gel sample buffer for 10 min, separated on SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membrane. Immunodetection of proteins were made using SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore) according to SNAP i.d. system protocol. Blots were

blocked with 0.25% non-fat dry milk in TBS-T buffer. Incubation with antibodies against  $\gamma^+$ LAT2 (1:250, Santa Cruz, sc-136884 (h)) was done in TBS-T buffer with 0.25% non-fat dry milk at room temperature for 0.5h followed by 10 minutes incubation with peroxidase-conjugated-anti-rabbit antibodies (1:2500, Sigma) for detection by SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). The first antibody was stripped off with 0.1M glycine, pH 2.9, and second incubation was performed with an antibody against GAPDH (10 minutes incubation at room temperature, (1:3300, Sigma).

### 2.9. Protein determination

Determination of protein in cerebral cortical slices was performed according to Bradford (1976). Protein concentration in the cytosol fraction used in Western Blot analysis was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951), using Modified Lowry Protein Assay Reagent (Pierce).

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance followed by the Dunnett's comparison test or the two-tailed Student's test.

## 3. Results

Expression of  $\gamma^+$ LAT2 at the mRNA and protein level was increased in the cerebral cortex from HA rats by ~35% and ~140%, respectively (Fig. 1A), whereas expression of CAT1 mRNA was not changed (Fig. 1A).

Kinetics of [ $^3$ H]arginine uptake to the rat cortical slices was analyzed using Michaelis-Menten nonlinear analysis (Fig. 2A), and linearized transformations: Eadie-Hofstee (Fig. 2B) and Lineveaver-Burke (Fig. 2C). All three analyzes revealed a simple, one component of the uptake.  $V_{\max}$  of the uptake increased from ~ 28.2 pmole/min/mg tissue in control slices to ~ 40.5 pmole/min/mg tissue in HA slices, whereas the  $K_m$  value was not changed by HA (~ 1.6

mM vs ~ 1.7 mM) (Fig. 2).

Experiments described in Figs. 3-6 analyzed the contribution of the  $y^+$ LAT2 transporter to the changes in Arg transport evoked by HA and/or added Gln. One of the characteristic features of  $y^+$ LAT2 transporter is inhibition of [ $^3$ H]arginine uptake by Gln in the presence of  $Na^+$  ions. Addition of 5 mM Gln by 35% inhibited [ $^3$ H]arginine uptake in cerebral cortical slices in a  $Na^+$ -dependent manner (Fig. 3). Glutamate (Glu), but not aspartate (Asp) at 10 mM markedly decreased [ $^3$ H]glutamine uptake in both control and HA slices (Fig. 4), also consistent with the reported characteristics of the  $y^+$ LAT2 system (Bröer et al., 2000). Pre-incubation with 1mM N-ethylmaleimide (NEM), a partial irreversible inhibitor of  $y^+$  system transport (Devés et al., 1993), reduced [ $^3$ H]arginine uptake in control and HA slices by 72 and 58%, respectively (Fig. 5). However, [ $^3$ H]arginine uptake resistant to 1mM NEM (i.e. that mediated by  $y^+$ LAT2) was reduced by the  $y^+$ LAT2 competitor, 5mM Gln in HA slices (by ~40%) but not in control slices (Fig. 5), confirming preferential involvement of  $y^+$ LAT2 in Arg uptake in the HA-affected brain.

In a separate set of experiments, [ $^3$ H]arginine uptake activity in control cortical slices preincubated with the  $y^+$ LAT2 co-substrate *cyclo*-leucine was decreased in control slices by ~40% (from basal value of  $16 \pm 5$  pmole/mg protein/min (mean  $\pm$  SD, n=7) and by ~62% in HA slices (from basal value of  $26 \pm 4$  pmole/mg protein/min (mean  $\pm$  SD, n=7) confirming activation of the  $y^+$ LAT2 system by ammonia (see also Hilgier et al., 2009).

Both in  $Na^+$  free and  $Na^+$ -containing media [ $^3$ H]arginine release was less active in HA slices than in control slices not perfused with 5 mM Gln or preincubated with NEM, (a decrease from 13.6% to 8.2%) (Fig. 6). The Gln-dependent [ $^3$ H]arginine release in the presence of  $Na^+$  was ~40% higher in slices from HA rats than in control slices (~17% vs ~12% release) (Fig. 6). The absence of  $Na^+$  in the media reduced the Gln-dependent [ $^3$ H]arginine release from HA slices to 8.6%, but did not affect the release in control slices



(Fig. 6). Pre-incubation with 1mM NEM, which inhibits the  $y^+$ -mediated, but not the  $y^+LAT2$ -mediated Arg transport (Deves et al., 1993), also increased [ $^3H$ ]arginine release from HA slices, but not from control slices (Fig. 6). Collectively, the data of Fig 5 and 6 indicate increased involvement of  $y^+LAT2$  in Arg transport during HA.

HA increased Gln content of the rat cerebral cortical microdialysates from the control level of  $12.3 \pm 1.0 \mu M$  to  $19.6 \pm 3.5 \mu M$  (Fig. 7). Infusion of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) increased Gln content to  $35.1 \pm 8.6 \mu M$  and  $50.6 \pm 7.5 \mu M$  in control and HA microdialysates, respectively (Fig. 7). HA decreased by  $\sim 50\%$  the cGMP concentration in rat brain cortical slices (Fig. 8), and by  $\sim 75\%$  cGMP in cortical microdialysates (Fig. 9). Cortical infusion of 5 mM 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) increased by  $\sim 60\%$  the cGMP concentration in microdialysates of HA rats. DON did not affect the cGMP content in control rats (Fig. 9).

#### 4. Discussion

The present study confirmed the hypothesis that a 3-day hyperammonemia (HA) in the ammonium acetate model increases the activity of the  $y^+LAT2$  transporter in the brain, and demonstrated that this increased activity is associated with increased expression of  $y^+LAT2$  mRNA and protein. The aspects of Arg or Gln uptake and/or release that came to light or became augmented in the cerebral cortical slices derived from HA rats as compared to control slices, appeared compatible with the functional characteristics of the  $y^+LAT2$  system-mediated transport earlier described in *Xenopus laevis* transfected oocytes (Broër et al., 2000), fibroblasts (Nicholson et al., 2002), CNS astrocytes and neurons (Bae et al., 2005; Heckel et al., 2003) or adrenal cells (Repetto et al., 2006). These include i) specific inhibition of Gln uptake by Glu, but not by Asp (Fig. 4), ii) inhibition of Arg uptake by Gln in the presence of NEM (Fig. 5), a condition eliminating the uptake mediated by system  $y^+$  (Devés

et al., 1993), iii) increased trans-stimulation of Arg uptake by *cyclo*-leucine in cerebral cortical slices derived from HA rats as compared to control rats (text in the Results section), iv) sodium-dependent stimulation of Gln-mediated Arg efflux, and v) increased spontaneous Arg efflux in the presence of NEM (Fig. 6).

In a previous study we observed that the NO and cGMP contents in the microdialysates of rat striatum were reduced upon co-administration of exogenous Gln or inhibitors of Gln uptake, both in control conditions and when the NO/cGMP pathway was activated by intrastriatal infusion of ammonia (Hilgier et al., 2009). We implicated the  $\gamma^+$ LAT2 system in this response as it preferably mediates Arg efflux in exchange for the inflowing Gln (Broër et al., 2000). On this basis we speculated that under conditions of prolonged, systemic hyperammonemia which as a rule is associated with increased Gln content (for references see Introduction), the  $\gamma^+$ LAT2-mediated exchange of intracellular Arg for extracellular Gln may reduce the intracellular Arg pool available for NO synthesis and in this way inhibit the operation of the NO/cGMP pathway. In this study we confirmed that similar to cerebellum (Hermenegildo et al., 1998), HA is associated with decreased cGMP accumulation in the cerebral cortex tissue (Fig. 8) and microdialysates (Fig. 9), which coincides with, and may be causally related to, the increased brain Gln content as measured in the microdialysates (Fig. 7). In the experiments not shown here we confirmed the earlier reported increase of Gln content in the cerebral cortical tissue in this model (Hilgier and Olson, 1994). Since no specific inhibitors of Gln/Arg exchange are available to date, we used DON instead. DON inhibits Gln degradation (Hilgier et al. 1992, and references therein), which is reflected by increased Gln content in the extracellular space, as noted in the microdialysates of control and HA slices (Fig. 7). However, in addition, DON inactivates multiple Gln transporters in the mammalian tissues (Goldstein et al., 1975; Low et al., 1991; Taylor et al, 1992). We assumed that inactivation of these Gln transport sites will inhibit Gln

influx to the CNS cells and subsequently mitigate outflow of Arg, leading to a relative increase of cGMP. Indeed, DON specifically attenuated the depression of cGMP accumulation in the cerebral cortical microdialysates of HA rats in which  $\gamma^+$ LAT2 activity was increased, but failed to increase the cGMP content in the microdialysates from control rats. This result suggested that the increase of  $\gamma^+$ LAT2-mediated Arg outflow in exchange for Gln could contribute to the reduction of intracellular Arg and subsequently to the decrease of the NO/cGMP pathway activity imposed by HA. Of note, the cGMP content measured in the presence of DON in brain microdialysates from HA rats amounted to not more than ~50% of the control level. The relatively moderate effect of DON may reflect the relatively more important contribution of the increased cGMP degradation by phosphodiesterase to the decrease of the brain cGMP content during hyperammonemia (Monfort et al., 2004; Montoliu et al., 2010).

Two major interrelated issues regarding the role of the  $\gamma^+$ LAT2-mediated Gln/Arg exchange in the brain during HA remain to be resolved. Firstly, Arg efflux by  $\gamma^+$ LAT2 may be modulated by Gln arising in the different CNS cells *via* routes controlled by other Gln transporting proteins. Among these routes, the system N mediated efflux from astrocytes and system A-dependent uptake to neurons may play a significant role (Chaudhry et al., 2002). Studies on the effect of ammonia on the expression and activity of the different Gln transporting in brain are definitely needed to clarify this issue. To the same end, an advent of more specific tools with which to selectively inhibit the  $\gamma^+$ LAT2 activity is awaited to unambiguously prove the participation of this transporter in the events described above. The other question is whether the changes in the  $\gamma^+$ LAT2-mediated Gln/Arg exchange occur in neurons or astrocytes. The classical view is that ammonia-induced alterations of the NO/cGMP pathway are neuronal in nature (see Introduction). However, more recent evidence implicates increased NO synthesis in the acute toxic effects of ammonia on astrocytes

(reviewed by Häussinger and Görg, 2010). Since soluble guanylate cyclase, the enzyme catalyzing NO-dependent cGMP synthesis is present in astrocytes (Sardón et al., 2004), modulation of the NO/cGMP pathway by Gln/Arg exchange and its alteration by ammonia may also occur in these cells. Transport of neutral and cationic amino acids conforming to the characteristics of the hybrid system  $y^+L$  was detected both in cultured astrocytes and neurons (Heckel et al., 2003).

In conclusion, the present study points to the increased Gln/Arg exchange in the CNS cells associated with increased expression and activity of the hybrid transporter  $y^+LAT2$ , as an effect of hyperammonemia that links the two previously described aspects of ammonia neurotoxicity: altered operation of the NO/cGMP pathway and increased Gln accumulation. In a more general context, this is the first report documenting that ammonia alters the expression and activity of a protein that transports Gln. As such, the study substantiates the need to analyze the response of other astrocytic Gln carriers to ammonia, in order to further elucidate the role of Gln in HE.

#### **Acknowledgment**

This study was supported by Ministry of Science and Education grant NN 401 0550 33 (MZ).

**References**

- Albrecht, J., Jones, E.A., 1999. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* 170, 138-146.
- Albrecht, J., Norenberg, M.D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44, 788-794.
- Bae, S.Y., Xu, Q., Hutchinson, D., Colton, C.A., 2005. Y<sup>+</sup> and y<sup>+</sup>L arginine transporters in neuronal cells expressing tyrosine hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 65-73.
- Bradford, M.M., 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.
- Bröer, A., Wagner, C.A., Lang, F., Bröer, S., 2000. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y<sup>+</sup>LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349, 787-795.
- Brusilow, S.W., Traystman, R., 1986. Letter to the editor. *N. Engl. J. Med.* 314, 786-797.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Edwards, R.H., 2002. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J. Cell Biol.* 157, 349-355.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., 1999. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99, 769-780.
- Closs, E.I., Boissel, J.P., Habermeier, A., Rotmann, A., 2006. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* 213, 67-77.
- Cordoba, J., Gottstein, J., Blei, A.T., 1996. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24, 919-923.

- Devés, R., Angelo, S., Chavéz, P., 1993. N-Ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J. Physiol.* 468, 753-766.
- Dye, J.F., Vause, S., Johnston, T., Clark, P., Firth, J.A., D'Souza, S.W., Sibley, C.P., Glazier, J.D., 2004. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 18, 125-137.
- Felipo, V., 2006. Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy *World J. Gastroenterol.* 12, 7737-7743.
- Felipo, V., Butterworth, R.F., 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67, 259-279.
- Gensert, J.M., Ratan, R.R., 2006. The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes. *Antioxid. Redox. Signal* 8, 919-928.
- Goldstein, L., 1975. Glutamine transport by mitochondria isolated from normal and acidotic rats. *Am. J. Physiol.* 229, 1027-1033.
- Häussinger, D., Görg, B., 2010. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.* 13, 87-92.
- Heckel T, Bröer A, Wiesinger H, Lang F, Bröer S. Asymmetry of glutamine transporters in cultured neural cells. *Neurochem Int.* 2003 Sep-Oct;43(4-5):289-98
- Heneka, M.T., Schmidlin, A., Wiesinger, H., 1999. Induction of argininosuccinate synthetase in rat brain glial cells after striatal microinjection of immunostimulants. *J Cerebr. Blood Flow Metab.* 19, 898-907.
- Hermenegildo, C., Monfort, P., Felipo, V., 2000. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31, 709-715.
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M.D., Gaztelu, J.M., Miñana, M.D.,

- Felipo, V., 1998. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3201-3209.
- Hilgier, W., Freško, I., Klemenska, E., Beresewicz, A., Oja, S.S., Saransaari, P., Albrecht, J., Zielińska, M., 2009. Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiol. Dis.* 35, 75-81.
- Hilgier, W., Oja, S.S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2004. A novel glycine site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/CGMP pathway by ammonia. *Brain Res.* 1015, 186-188.
- Hilgier, W., Olson, J.E., 1994. Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 62, 197-204.
- Hilgier, W., Puka, M., Albrecht, J., 1992. Characteristics of large neutral amino acid-induced release of preloaded L-glutamine from rat cerebral capillaries in vitro: effects of ammonia, hepatic encephalopathy, and gamma-glutamyl transpeptidase inhibitors. *J. Neurosci Res* 32, 221-226.
- Hourani, B.T., Hamlin, E.M., Reynolds, T.B., 1971. Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Arch. Intern. Med.* 127, 1033-1036.
- Lee, W.J., Hawkins, R.A., Viña, J.R., Peterson, D.R., 1998. Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *Am. J. Physiol.* 274, C1101-C1107.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods* 25, 402-408.
- Low, S.Y., Taylor, P.M., Ahmed, A., Pogson, C.I., Rennie, M.J., 1991. Substrate-specificity of glutamine transporters in membrane vesicles from rat liver and skeletal muscle investigated using amino acid analogues. *Biochem J.* 278, 105-111.

- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Monfort, P., Muñoz, M.D., 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.
- Montoliu, C., Rodrigo, R., Monfort, P., Llansola, M., Cauli, O., Boix, J., Elmlili, N., Agusti, A., Felipo, V., 2010. Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab Brain Dis.* 25, 39-48.
- Nicholson, B., Manner, C.K., MacLeod, C.L., 2002. Cat2 L-arginine transporter-deficient fibroblasts can sustain nitric oxide production. *Nitric Oxide* 7, 236-243.
- Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., 2004. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 303-307.
- O'Kane, R.L., Viña, J.R., Simpson, I., Hawkins, R.A., 2004. Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporters A, ASC, and N of the blood-brain barrier: mechanisms for neutral amino acid removal. *Am. J. Physiol.* 287, E622-E629.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Peterson, C., Giguere, J-F., Cotman C.W., Butterworth, R.F., 1990. Selective loss of N-methyl-D-aspartate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* 55, 386-390.
- Repetto, E.M., Pannunzio, V., Astort, F., Martinez, Calejman, C., Moreno, M.B., Pignataro, O.P., Cymeryng, C.B., 2006. Characterization of L-arginine transport in adrenal cells: effect of ACTH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E291-297.
- Saransaari, P., Oja, S.S., Borkowska, H.D., Kostinaho, J., Hilgier, W., Albrecht J. 1997. Effects of thioacetamide-induced hepatic failure on the N-methyl-D-aspartate receptor



- complex in the rat cerebral cortex, striatum and hippocampus: binding of different ligands and expression of receptor subunit mRNA's. *Mol. Chem. Neuropathol.* 32, 179–194.
- Sardón, T., Baltrons, M.A., García, A., 2004. Nitric oxide-dependent and independent down-regulation of NO-sensitive guanylyl cyclase in neural cells. *Toxicol Lett.* 149, 75-83.
- Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H.J., Herrmann, A., Butterworth, R.F., 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.
- Schmidlin, A., Wiesinger, H., 1998. Argininosuccinate synthetase: localization in astrocytes and role in the production of glial nitric oxide. *Glia* 24, 428–436.
- Swain, M., Butterworth, R.F., Blei, A.T., 1992. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15, 449-453.
- Taylor, P.M., Mackenzie, B., Hundal, H.S., Robertson, E., Rennie, M.J., 1992. Transport and membrane binding of the glutamine analogue 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr Biol.* 128, 181-189.
- Wagner, C.A., Lang, F., Bröer, S., 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1077-C1093.
- Wiesinger, H., 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress Neurobiol.* 64, 365–391.
- Willard-Mack, C.L., Koehler, R.C., Hirata, T., Cork, L.C., Takahashi, H., Traystman, R.J., Brusilow, S.W., 1996. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 75, 589-599.
- Zhang, W.Y., Takiguchi, M., Koshiyama, Y., Gotoh, T., Nagasaki, A., Iwase, K., Yamamoto,

K., Takshima, H., Negi, A., Mori, M., 1999. Expression of citrulline–nitric oxide cycle in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated rat astrogloma C6 cells. *Brain Res.* 849, 78–84.

Zielińska, M., Hilgier, W., Law, R.O., Goryński, P., Albrecht, J., 1999. Effects of ammonia in vitro on endogenous taurine efflux and cell volume in rat cerebrocortical minislices: influence of inhibitors of volume-sensitive amino acid transport. *Neuroscience* 91, 631-638.

**Legends to figures**

**Fig. 1.** Expression of mRNAs coding for  $\gamma^+$ LAT2 and CAT1 (A) and of  $\gamma^+$ LAT2 protein (B) in cortex of control and HA rats. Results are mean  $\pm$  SD (n=7). (\*\*).Significantly different from control, (p<0.05; T- test).

**Fig. 2.** Kinetics of [ $^3$ H]arginine uptake into cerebral cortical slices of control and HA rats. (A) Michaelis-Menten nonlinear analysis. (B) Eadie-Hofstee and (C) Lineveaver-Burke transformation. Results are mean  $\pm$  SD (n=5).

**Fig. 3.** Effect of  $\text{Na}^+$  ions in the presence or absence of 5 mM glutamine (Gln) on [ $^3$ H]arginine uptake in cerebral cortical slices. Results are mean  $\pm$  SD (n=5). (\*)Significantly different from "  $\text{Na}^+$  buffer " (p<0.05; Dunnet's test).

**Fig. 4.** Effect of the presence of 10 mM Glu and 10 mM Asp on [ $^3$ H]glutamine uptake in control and hyperammonemic (HA) rat cerebral cortical slices. Results are mean  $\pm$  SD (n=4). Significantly different from (\*)control and (\*\*)HA (p<0.05; Dunnet's test).

**Fig. 5.** Effect of instant addition of 1mM N-ethylmaleimide (NEM) and/or 5 mM Gln on [ $^3$ H]arginine uptake in rat cerebral cortical slices from control and hyperammonemic (HA) rats. Results are mean  $\pm$  SD (n=6). Significantly different from (\*)control, (\*\*)HA, (\*\*\*)control treated in the same way as HA (p<0.05; Dunnet's test).

**Fig. 6.** Effect of the presence or absence in the superfusion buffer of:  $\text{Na}^+$  ions and/or 5 mM glutamine (Gln), and of 10 min preincubation with 1mM N-ethylmaleimide (NEM), on the

efflux of newly loaded [ $^3\text{H}$ ]arginine from control and hyperammonemic (HA) rat cerebral cortical slices. Results are mean  $\pm$  SD (n=7). Significantly different from (\*)control, (\*\*)HA (p<0.05; Dunnet's test).

**Fig. 7.** Effect of hyperammonemia (HA) and/or intracerebrally added 5 mM 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) on the glutamine (Gln) content in cortical microdialysates. Results are mean  $\pm$  SD (n=5). Significantly different from (\*)control, (\*\*)HA, (p<0.05; Dunnet's test).

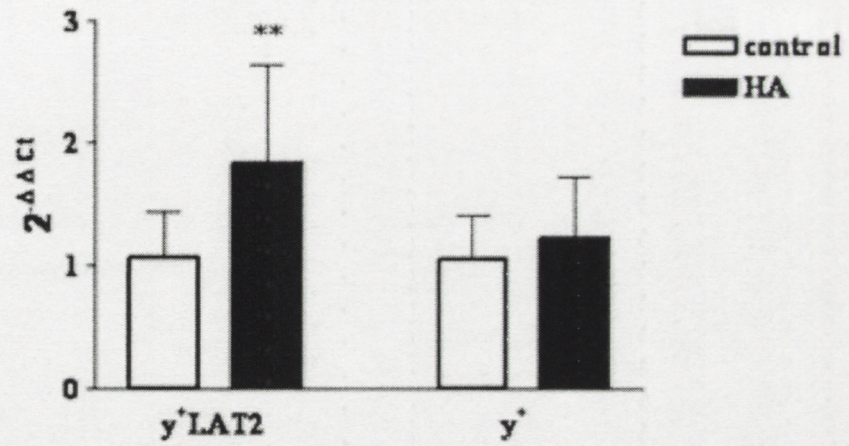
**Fig. 8.** Effect of hyperammonemia (HA) on cGMP content in cerebral cortical slices. Results are mean  $\pm$  SD (n=7). (\*\*) Significantly different from control (p<0.05; T-test).

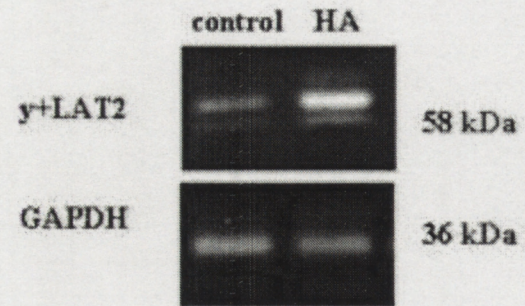
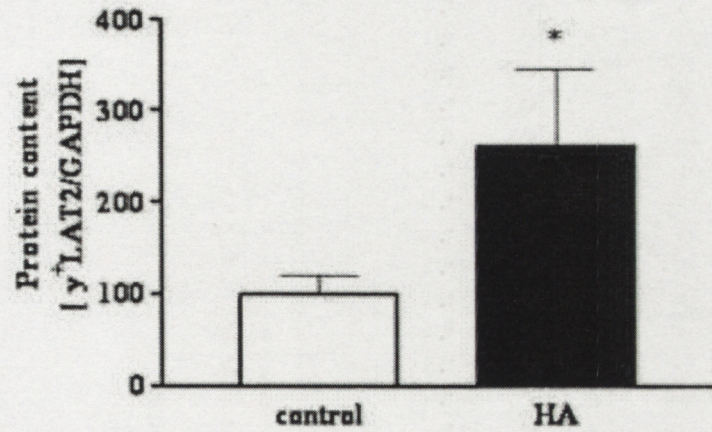
**Fig. 9.** Effect of hyperammonemia (HA) and/or intracerebrally added 5 mM 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) on cGMP content in cortical microdialysates. Results are mean  $\pm$  SD (n=6). Significantly different from (\*)control, (\*\*)HA, (p<0.05; Dunnet's test).

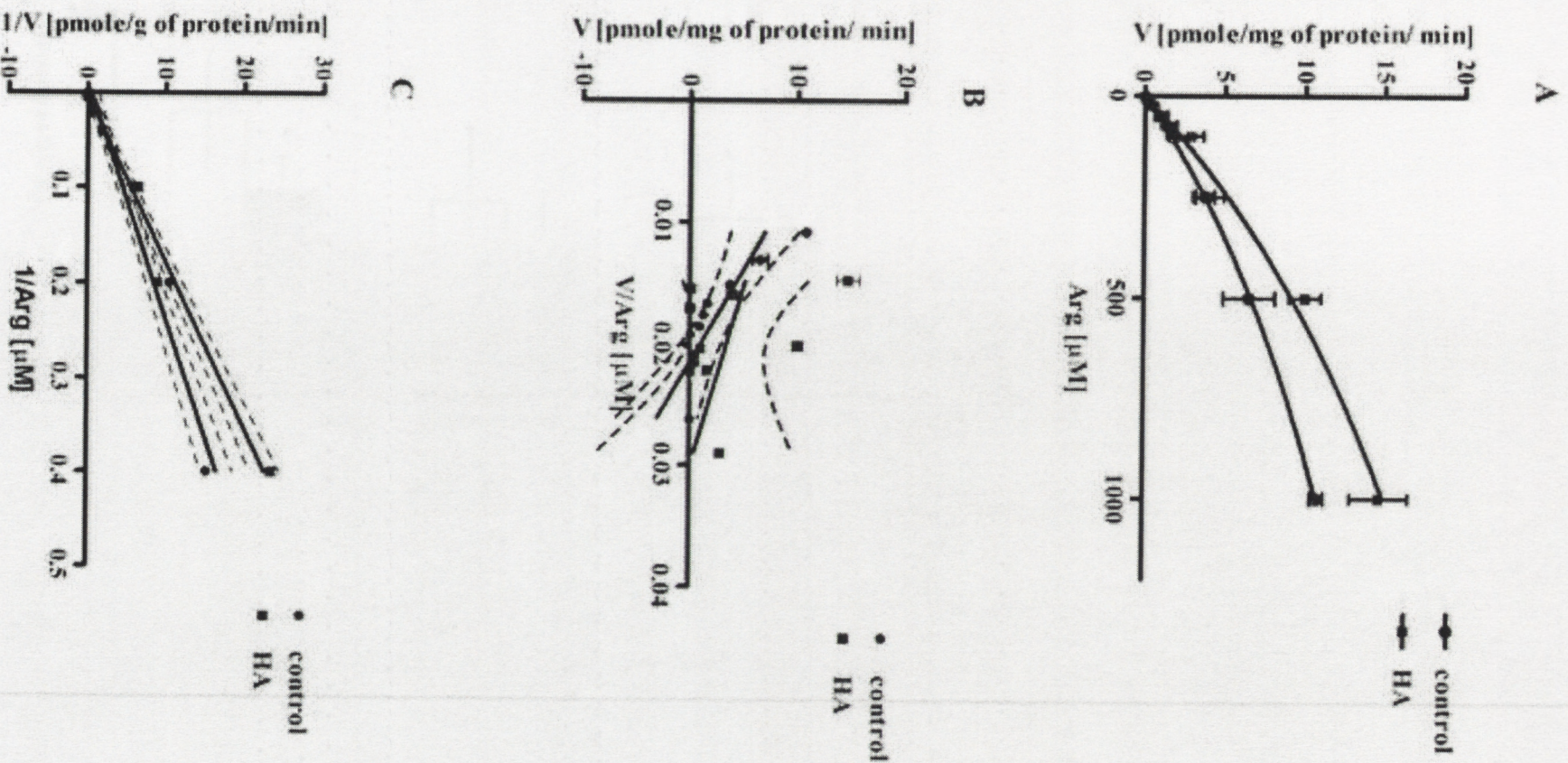
**Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter  $\gamma$ -LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway activity**

Magdalena Zielińska\*, Joanna Ruskiewicz, Wojciech Hilgier, Inez Fręsko and Jan Albrecht

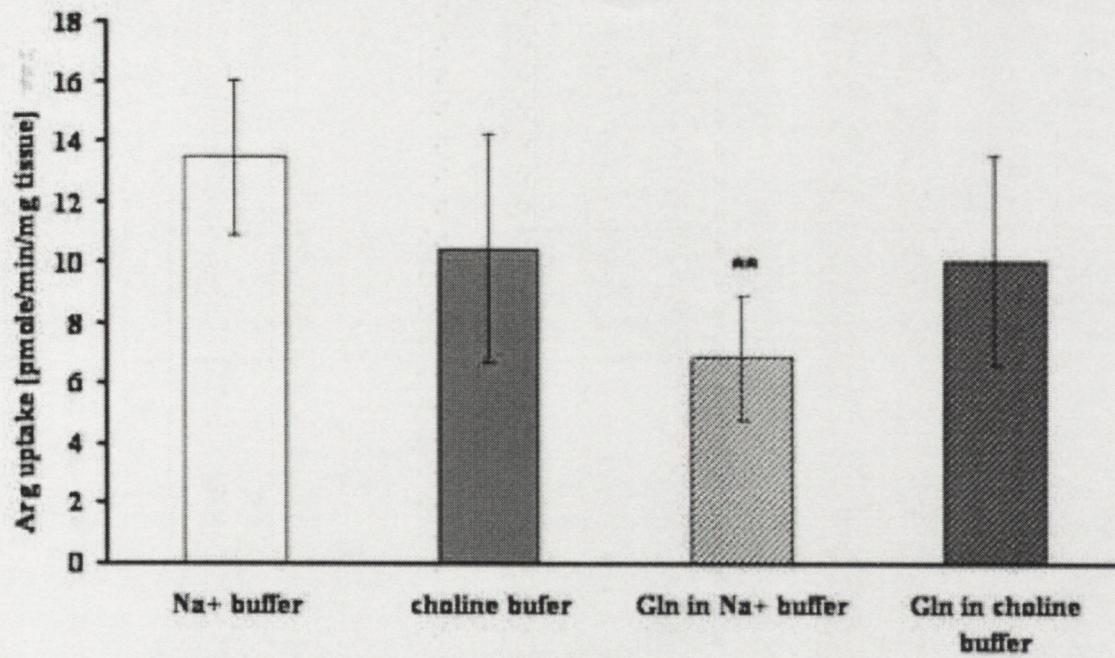
- Hyperammonemia (HA) increases the expression and activity of the heteromeric transporter  $\gamma$ -LAT2 (Arg/Gln exchanger).
- HA elevates Gln content and decreases cGMP content in the cerebral cortex.
- Inhibition of Gln fluxes between CNS cells by DON attenuated the HA-induced decrease of cGMP.
- Reduced delivery of Arg may contribute to the decrease of NO/cGMP pathway activity evoked in the brain by HA.











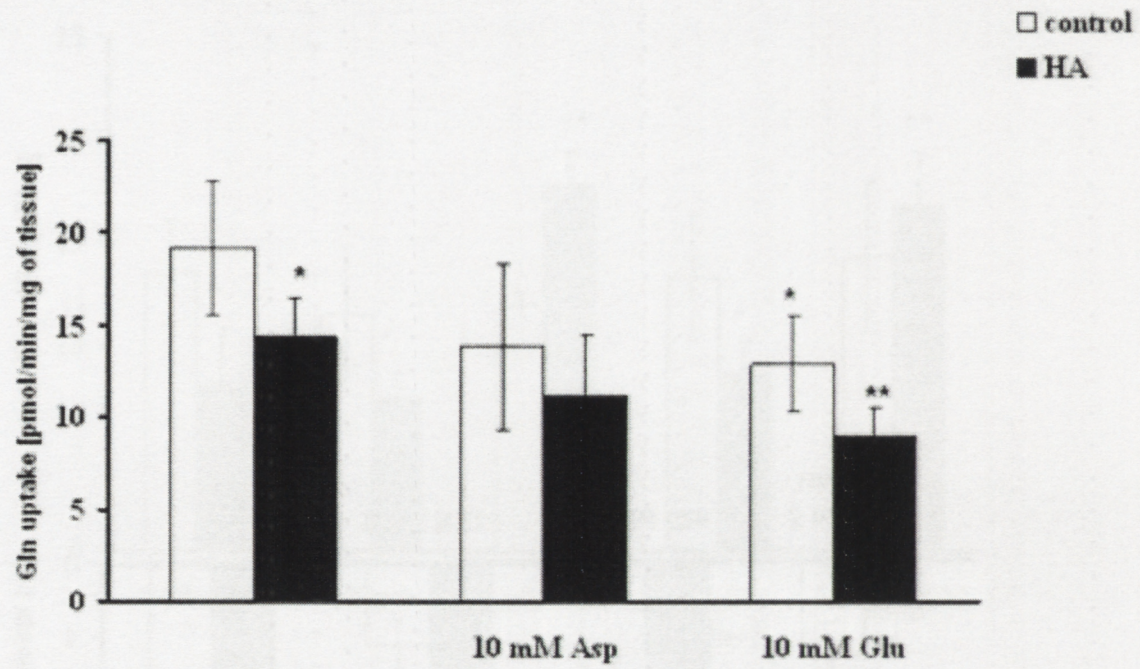
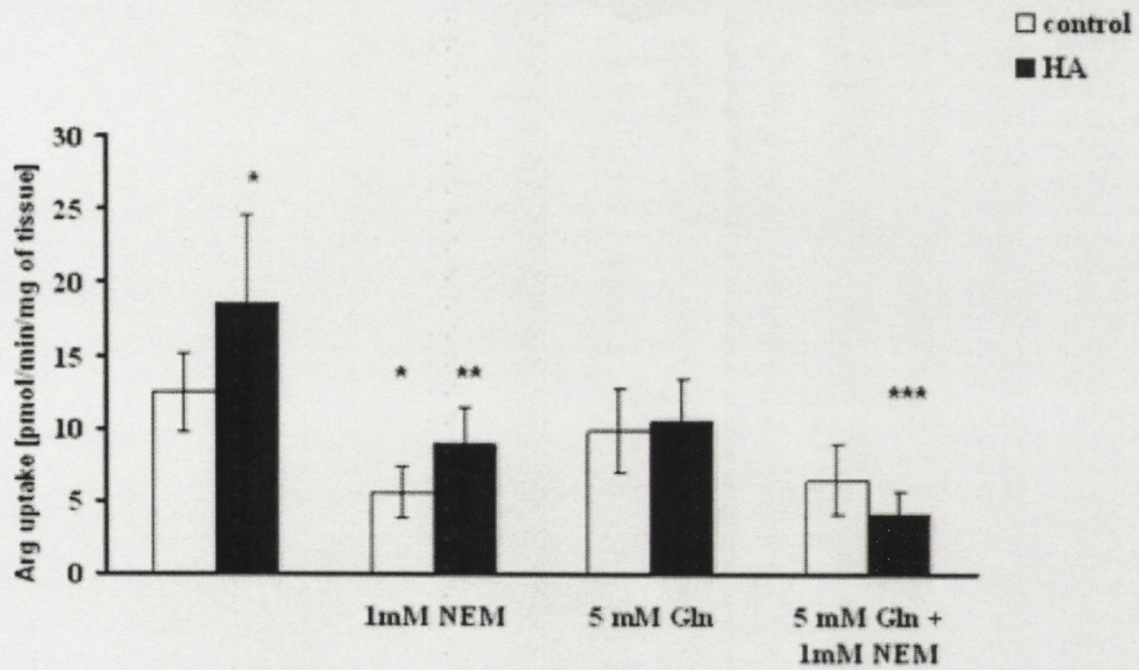


Figure5



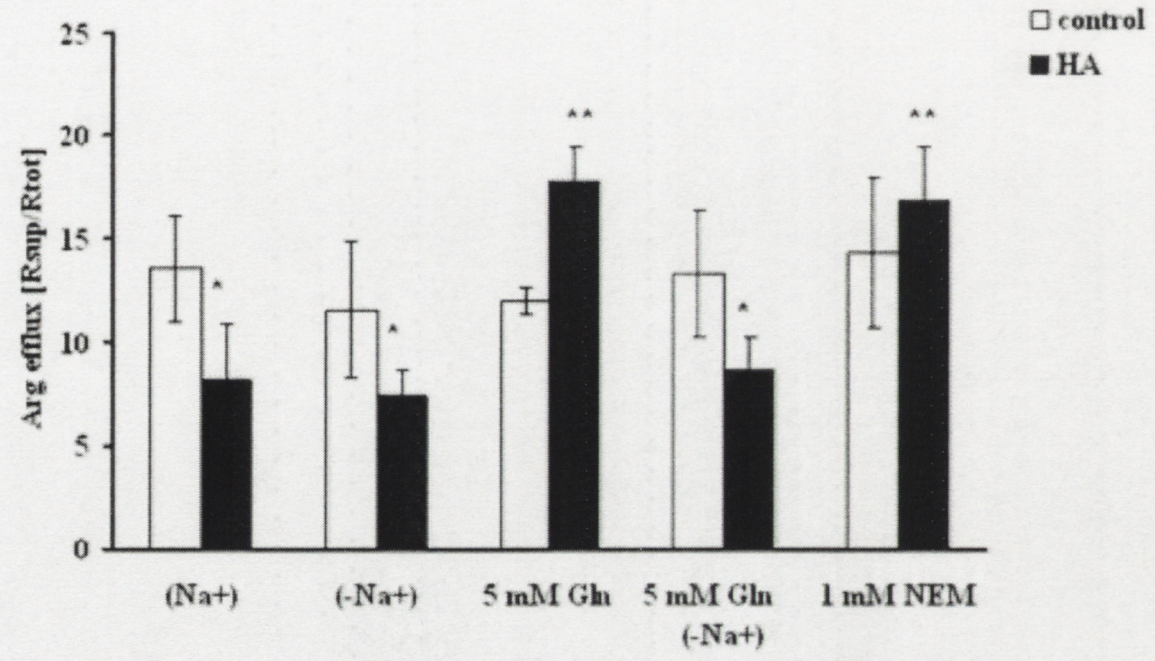


Figure7

