

INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

**MARTA OBARA-MICHLEWSKA**

ZMIANY EKSPRESJI I FUNKCJI KANAŁU POTASOWEGO KIR4.1  
POD WPŁYWEM TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA JONÓW AMONOWYCH  
*IN VIVO I IN VITRO*

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

WARSZAWA 2012

<http://rcin.org.pl>

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

**Obara-Michlewska M**, Pannicke T, Karl A, Bringmann A, Reichenbach A, Szeliga M, Hilgier W, Wrzosek A, Szewczyk A, Albrecht J. Down-regulation of Kir4.1 in the cerebral cortex of rats with liver failure and in cultured astrocytes treated with glutamine: implications for astrocytic dysfunction in hepatic encephalopathy. *J Neurosci Res* **2011**; 89:2018–2027

**Obara-Michlewska M**, Jiang H, Aschner M, Albrecht J. Gain of function of Kir4.1 channel increases cell resistance to changes of potassium fluxes and cell volume evoked by ammonia and hypoosmotic stress. *Pharmacol Rep* **2010**; 62(6):1237– 1242

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach polsko-niemieckiego projektu badawczego nr S005/P-N/2007/01 oraz przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu promotorskiego nr NN401 557340.

***"Wszelka sztuka powinna stać się nauką, wszelka nauka – sztuką"***

*Fryderyk Schlegel*

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi,  
Panu prof. dr hab. Janowi Albrechtowi,  
za wskazanie kierunku badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy,  
nieustającą inspirację oraz wszechstronną, nieocenioną pomoc  
niesioną na każdym etapie powstawania niniejszej pracy.*

*Marta Obara-Michlewska*

*Pragnę gorąco podziękować pracownikom Zakładu Neurotoksykologii:*

*Dr hab. Magdalenie Zielińskiej i Dr Monice Szelidze za entuzjastyczne dzielenie się wiedzą.  
Ich doświadczenie i pomoc przy planowaniu badań i interpretacji ich wyników była  
nieodzowna*

*Dr Wojciechowi Hilgierowi za profesjonalne podejście do techniki HPLC*

*Inez Fręsko za niezłomność w przeprowadzaniu doświadczeń in vivo oraz za ciągłą gotowość  
do pomocy przy wszelkich technikach laboratoryjnych*

*Annie Dybel i Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś za pracę przy prowadzeniu hodowli  
komórkowych*

*Praca w Zakładzie Neurotoksykologii była dla mnie zarówno wyzwaniem, jak i wielką  
przyjemnością – dziękuję!*

~

*Dziękuję również wielu innym pracownikom Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej,  
którzy dzięki swojej otwartości i życzliwości pomagali mi w trakcie prowadzenia badań:*

*Prof. Dr hab. Barbarze Zabłockiej oraz Dr Małgorzacie Beręsewicz i Dr Dagmarze  
Kabzińskiej za cenne wskazówki na temat technik biologii molekularnej*

*Dr Hannie Kozłowskiej za zapoznanie z techniką mikroskopii konfokalnej*

~

*Profesorowi Andreasowi Reichenbachowi, Profesorowi Andreasowi Bringmanowi  
oraz Dr Thomasowi Pannicke z Uniwersytetu w Lipsku dziękuję za wprowadzenie w projekt  
dotyczący badań nad funkcjami kanału potasowego Kir4.1 w komórkach gleju*

~

*Dziękuję Prof. dr hab. Adamowi Szewczykowi oraz Dr hab. Antoniemu Wrzosekowi z Instytutu  
Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego za owocną współpracę przy prowadzeniu badań  
nad transportem potasu.*

~

*Składam serdeczne podziękowania Profesorowi Michaelowi Aschnerowi oraz Pani Haiyan  
Jiang z Uniwersytetu Medycznego Vanderbilta w Nashville za współpracę przy  
przeprowadzaniu doświadczeń na komórkach linii HEK 293T*

~

*Profesorowi Michaelowi Norenbergowi z Uniwersytetu Medycznego w Miami  
dziękuję za pomoc w zgłębianiu mechanizmu konia Trojańskiego.*

*Marta Obara-Michlewska*

I. WYKAZ SKRÓTÓW	8
II. WSTĘP	11
II.1. Amoniak w organizmach ssaków	11
II.1.1. <i>Amoniak w ośrodkowym układzie nerwowym</i>	12
II.1.2. <i>Drogi przenikania amoniaku do mózgu</i>	13
II.2. Neurotoksyczność amoniaku	15
II.2.1. <i>Encefalopatia wątrobowa</i>	15
II.2.2. <i>Astrocyty w patomechanizmie encefalopatii wątrobowej</i>	17
II.2.3. <i>Hiperamonemiczny obrzęk mózgu</i>	18
II.2.4. <i>Patomechanizm neurotoksycznego oddziaływania amoniaku</i>	19
II.2.4.1. <i>Procesy fizjologiczne i metaboliczne ulegające zaburzeniom w mózgu</i>	
- <i>uwagi ogólne</i>	19
II.2.4.2. <i>Zaburzenia neurotransmisji glutaminianergicznej w encefalopatii wątrobowej</i>	21
II.2.4.3. <i>Stres nitrozo-oksydacyjny w hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej</i>	23
II.2.4.4. <i>Rola amoniaku w indukcji MPT</i>	24
II.3. Udział glutaminy w patomechanizmie neurotoksyczności amoniaku	24
II.4. Kanały potasowe Kir w ośrodkowym układzie nerwowym	27
II.4.1. <i>Regulacja kanałów Kir</i>	28
II.4.2. <i>Interakcje kanału Kir4.1 z innymi białkami błonowymi</i>	29
III. CELE PRACY	31
IV. MATERIAŁY I METODY	32
IV.1. Szczurzy model encefalopatii wątrobowej	32
IV.2. Hodowle pierwotne korowych astrocytów szczurzych	32
IV.3. Warunki inkubacji komórek z odczynnikami	33
IV.4. Izolacja RNA	34
IV.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji	34
IV.6. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	35
IV.7. Oznaczanie poziomu białka Kir4.1 w astrocytach metodą Western-blot	36
IV.8. Wychwyty D-[ <sup>3</sup> H] asparaginianu	38
IV.9. Wychwyty <sup>86</sup> rubidu ( <sup>86</sup> Rb) przez astrocyty	39
IV.10. Wyrzuty <sup>86</sup> rubidu ( <sup>86</sup> Rb) z astrocytów	39
IV.11. Obniżanie ekspresji Kir4.1 w astrocytach za pomocą siRNA	39
IV.12. Analiza objętości komórkowej astrocytów	40
IV.13. Oznaczanie zawartości glutaminy i glutaminianu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego metodą HPLC	41
IV.14. Oznaczanie proliferacji komórek za pomocą testu z użyciem BrdU	42
IV.15. Badanie żywotności komórek	43
IV.16. Hodowla komórek linii HEK 2937T	44
IV.17. Transfekowanie komórek linii HEK 293T	44
IV.18. Oznaczanie ilości białka Kir4.1 w komórkach HEK 293T metodą Western blot	44

IV.19. Pomiar objętości komórek HEK 293T metodą radioaktywną	45
IV.20. Wychwyty i wyrzut $^{86}\text{Rb}$ do/z komórek linii HEK 293T	45
IV.21. Oznaczanie białka	45
IV.21.1. <i>Oznaczanie białka metodą Bradford</i>	45
IV.21.2. <i>Oznaczanie białka metodą Lowry'ego</i>	46
IV.21.3. <i>Oznaczanie białka metodą BCA</i>	46
IV.22. Analiza statystyczna wyników	46
V. WYNIKI	47
V.1. Wpływ EW na ekspresję kanałów potasowych (Kir4.1, Kir2.1), kanału wodnego (akwaporyny 4) i transportera NKCC1 w korze mózgowej szczura	47
V.2. Wpływ histydyny na poziom mRNA dla Kir4.1 i NKCC1 w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną podaniem TAA	48
V.3. Wpływ memantyny na poziom mRNA dla Kir4.1 w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną podaniem TAA	48
V.4. Wpływy amoniaku i glutaminy na ekspresję mRNA i białka kanału potasowego Kir4.1, oraz na poziom mRNA kodujących transporter NKCC1 oraz transporter glutaminianu GLT-1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	49
V.5. Wpływ glutaminy na wychwyty D- $^3\text{H}$ -asparaginy w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	50
V.6. Wpływy amoniaku, glutaminy i medium hipoosmotycznego na wychwyty i wyrzut $^{86}\text{Rb}$ w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	50
V.7. Wpływy amoniaku, glutaminy oraz transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 na objętość pierwotnych korowych astrocytów szczurzych	51
V.8. Wpływy amoniaku i glutaminy na wewnątrzkomórkową zawartość glutaminy oraz na wewnątrz- i zewnątrzkomórkową zawartość glutaminianu w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	53
V.9. Wpływy glutaminianu i amoniaku na ekspresję Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	54
V.10. Wpływy glutaminianu oraz antagonistów receptorów NMDA (MK-801, AP-5, KYNA) oraz antagonisty glutaminianowych receptorów metabotropowych (MTEP) na poziom mRNA Kir4.1 w pierwotnych astrocytach szczurzych	54
V.11. Wpływy glutaminianu oraz inhibitorów jego transportu błonowego (TBOA i PDC) na poziom mRNA Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	56
V.12. Wpływy glutaminianu oraz antyoksydantów (tauryny, apocyniny, nitroargininy, dwustereu glutationu) na poziom Kir4.1 mRNA w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	56
V.13. Wpływy glutaminianu oraz inhibitorów deacetylaz histonowych (trichostatyny A i kwasu walproinowego), na poziom mRNA Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych	57
V.14. Wpływy amoniaku, glutaminy oraz transfekcji za pomocą anty-Kir4.1 siRNA na proliferację pierwotnych korowych astrocytów szczurzych	58
V.15. Wpływy amoniaku, Gln, Glu, NMDA, antagonistów receptorów glutaminianowych oraz antyoksydantów, inhibitorów HDAC i transportu Glu na przeżywalność (test MTT) pierwotnych korowych astrocytów szczurzych	59
V.16. Poziomy ekspresji białka Kir4.1 w transfekowanych komórkach linii HEK 293T	60
V.17. Wpływy amoniaku i stresu osmotycznego na wychwyty i wyrzut $^{86}\text{Rb}$ przez transfekowane (Kir4.1 <sup>+</sup> ) i kontrolne (Kir4.1 <sup>-</sup> ) komórki linii HEK 293T	60
V.18. Wpływ amoniaku na objętość komórek linii HEK 293T	62
VI. DYSKUSJA	63

---

VI.1. Obrzęk mózgu w encefalopatii wątrobowej	63
VI.2. Regulacja objętości komórkowej w ośrodkowym układzie nerwowym	64
VI.3. Ekspresja kanałów i transporterów związanych z regulacją objętości komórkowej w korze mózgowej szczura i w astrocytach <i>in vitro</i>	67
VI.4. Wpływ zmian ekspresji Kir4.1 na fizjologię astrocytów i komórek linii HEK 293T <i>in vitro</i>	71
VI.4.1. <i>Wychwyt Glu oraz wychwyt i wyrzut K<sup>+</sup></i>	71
VI.4.2. <i>Udział kanału potasowego Kir4.1 w regulacji objętości komórkowej</i>	73
VI.4.3. <i>Proliferacja astrocytów</i>	74
VI.5. Wpływ Glu na ekspresję Kir4.1 w astrocytach w świetle patomechanizmu EW	75
VII. WNIOSKI	80
VIII. STRESZCZENIE	81
IX. ABSTRACT	84
X. LITERATURA	87

## I. WYKAZ SKRÓTÓW

ALF	ostre uszkodzenie wątroby (ang. <i>acute liver failure</i> )
AMP	adenozynomonofosforan
ANOVA	test statystyczny (ang. <i>analysis of variance</i> )
AP-5	ang. <i>DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid</i>
APO	apocynina
Aqp 8	akwaporyna 8
Aqp4	akwaporyna 4
Asp	asparaginian
ATP	adenozynotrójfosforan
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i> )
BCA	kwas bis-cynchoninowy (ang. <i>bicinchoninic acid</i> )
BDL	ligacja dróg żółciowych (ang. <i>bile duct ligation</i> )
BrdU	5-bromo-2'-deoksyurydyna
BSA	albumina surowicy bydłej (ang. <i>bovine serum albumine</i> )
cAMP	cykliczny 3', 5' adenzynomonofosforan
CBF	przepływ krwi przez mózg (ang. <i>cerebral blood flow</i> )
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
cGMP	cykliczny 3', 5' guanozynomonofosforan
CIPP	białko posiadające domenę PDZ (ang. <i>channel-interacting PDZ domain protein</i> )
cpm	ang. <i>counts per minute</i>
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>cerebrospinal fluid</i> )
DAPI	4,6-diamidyno-2-fenylindol; sonda fluoroscencyjna do brawienia jąder komórkowych
db-cAMP	dibutyrylo-cykliczny AMP
DEPC	dietylopiroweglan
DGC	białkowy kompleks błonowy (ang. <i>dystrophin-glycoprotein complex</i> )
DiI	nadchloran 1,1'-dioktadecylo-3,3',3'-tetrametyloindokarbocyanianu; barwnik fluoroscencyjny
DMEM	podłoże do hodowli komórkowych (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DMSO	metylosulfinylometan (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	kwas deoksynukleinowy
DRM	białkowy kompleks błonowy (ang. <i>detergent-resistant microdomains</i> )
ECS	przestrzeń międzykomórkowa (ang. <i>extracellular space</i> )
EDTA	kwas wersenowy; kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
E <sub>K</sub>	potencjał równowagowy dla K <sup>+</sup>
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EW	encefalopatia wątrobowa
FBS	ang. fetal bovine serum
GA	fosforano-zależna glutaminaza
GABA	kwas γ-aminomasłowy
GAPDH	dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase</i> )
GEE	ester etylowy glutationu; prekursor GSH
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
GS	syntetaza glutaminy
GSH	glutation
HAV	wirus zapalenia wątroby typu A (ang. <i>hepatitis A virus</i> )
HBV	wirus zapalenia wątroby typu B (ang. <i>hepatitis B virus</i> )
HCV	wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>hepatitis C virus</i> )
HDAC	deacetylazy histonowe (ang. <i>histone deacetylase</i> )



HDACi	inhibitory HDAC
HEPES	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
His	histydyna
HPLC	wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. <i>high-pressure liquid chromatography</i> )
HRP	peroksydaza chrzanowa (ang. <i>horse raddish peroxidase</i> )
ISHEN	ang. <i>International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism</i>
[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	zwnętrzkomórkowe stężenie K <sup>+</sup>
[Na <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	zwnętrzkomórkowe stężenie jonów sodu
L-NNA	L-nitroarginina
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
mGluR	metabotropowe receptory glutaminianu
MHE	subkliniczna encefalopatia wątrobowa (ang. <i>minimal hepatic encephalopathy</i> )
MK-801	dizocilpina
MMP-9	metaloproteinaza 9
MPT	uszkodzenie mitochondriów polegające na otwarciu kanałów w błonie wewnętrznej (ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )
MRI	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. <i>magnetic resonance imaging</i> )
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )
MSO	sulfoksymina metioniny (ang. <i>methionine sulfoximine</i> )
MTEP	ang. 3-((2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl)pyridine hydrochloride
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana
NFκB	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy
NMDAr	receptory NMDA
o/n	przez noc (ang. <i>over night</i> )
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i> )
OMG	[ <sup>3</sup> H]-O-metyloglukoz
ONS	stres nitrozo-oksydacyjny (ang. <i>oxidative-nitrosative stress</i> )
OPA	aldehyd ortoftalowy
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	kwas nadchlorowy (ang. <i>perchloric acid</i> )
PCS	zespolecie wrotno-czyczne (ang. <i>portacaval shunt</i> )
PDZ	domena białkowa (ang. <i>PSD-95/Disc large/ZO-1 domain</i> )
pH <sub>i</sub>	pH wwnętrzkomórkowe
PTP	kanał zmiany przepuszczalności mitochondriów (ang. <i>permeability transition pore</i> )
RIPA	bufor lizujący do WB (ang. <i>radio-immunoprecipitation assay</i> )
RT-PCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR</i> )
PUT	putrescyna
RMP	spoczynkowy potencjał błonowy (ang. <i>resting membrane potential</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i> )
RT-PCR	reakcja łańcuchowej w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR</i> )
RVD	procesy regulacyjne prowadzące do spadku objętości komórki (ang. <i>regulatory volume decrease</i> )
RVI	procesy regulacyjne prowadzące do wzrostu objętości komórki (ang. <i>regulatory volume increase</i> )
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i> )
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

---

	(ang. <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SNAP	donor NO; S-nitrozo-N-acetylopenicylamina
SPD	spermidyna
SPM	spermina
TAA	tioacetamid
TBS-T	roztwór soli buforowany Trisem, z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>tris-buffered saline with Tween-20</i> )
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TGS	bufor do elektroforezy
TIPS	wewnątrzwątrobowe zespolenia wrotno-systemowe (ang. <i>transjugular intrahepatic portosystemic shunt</i> )
TJs	złącza ściste (ang. <i>tight junctions</i> )
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
TRI	odczynnik do izolacji całkowitego RNA (ang. <i>total RNA isolation reagent</i> )
TRP	białko o właściwościach osmosensora (ang. <i>transient receptor potential channel superfamily</i> )
TSA	trychostatyna A
VP	walproinian
VRAC	kanał odpowiedzialny jest za wyrzut osmolitów organicznych (ang. <i>volume-regulated anion channel</i> ; określane również VSOR – ang. <i>volume-sensitive outwardly rectifying anion channel</i> , lub VSOAC – ang. <i>volume-sensitive organic osmolyte and anion channel</i> )
WB	western blot

## II. WSTĘP

### II.1. Amoniak w organizmach ssaków

W roztworach wodnych amoniak ( $\text{NH}_3$ ) pozostaje w równowadze dynamicznej z jonami amonowymi ( $\text{NH}_4^+$ ):  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ . Stosunek ilościowy amoniaku do jonów amonowych jest funkcją pH i temperatury [39;293]. Ponieważ w  $37^\circ\text{C}$  pKa amoniaku we krwi wynosi 9.01 [167], w warunkach fizjologicznych występuje on w ponad 98% w formie  $\text{NH}_4^+$  [79;184]. W niniejszej pracy  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NH}_3$  określane będą łącznie jako „amoniak”.

Amoniak odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu przez organizmy żywe homeostazy azotowej. W szczególności, jest on prekursorem i/lub produktem rozpadu takich związków jak aminokwasy, monoaminy, czy zasady azotowe, które uczestniczą w szlakach metabolicznych zaangażowanych w najważniejsze biologiczne procesy, m.in. przechowywanie i przetwarzanie informacji genetycznej, neuroprzebieżność. Ponadto, utrzymanie równowagi kwasowo-zasadowej w organizmie jest ściśle związane z regulacją wydalania amoniaku.

Głównym źródłem amoniaku trafiającego do krwiobiegu jest układ pokarmowy. U zdrowych ludzi kilka gramów amoniaku dziennie trafia z jelita do żyły wrotnej [62]. Amoniak generowany w jelitach jest produktem trawienia białek zawartych w pokarmie, metabolizmu flory bakteryjnej, hydrolizy mocznika oraz deaminacji glutaminy (Gln) przez enterocyty jelita cienkiego [62]. Źródłem amoniaku są także pozostałe narządy (m. in. nerki, mięśnie szkieletowe, mózg), w komórkach których zachodzą reakcje katalizowane przez dehydrogenazę glutaminianową, fosforano-zależną glutaminazę (GA), deaminazę AMP.

Detoksykacja amoniaku zachodzi przede wszystkim w wątrobie. W hepatocytach okołowrotnych 90 – 95% amoniaku ulega przekształceniu przez enzymy cyklu mocznikowego w mocznik, ostatecznie wydalany wraz z moczem. Pozostały amoniak przekształcany jest w hepatocytach żylnych w Gln [95;232]. Reakcja ta, katalizowana przez syntetazę glutaminy (GS), zachodzi również w mięśniach szkieletowych, sercu, płucach, tkance tłuszczowej i mózgu [62].

Podsumowując, obieg amoniaku w organizmie wygląda następująco: amoniak pochodzący z jelit w ramach detoksykacji przekształcany jest w mocznik i, w mniejszym stopniu, w Gln. Amoniak, który ominie enzymy detoksykujące wątroby, trafia do krwi obwodowej, dołączając do amoniaku uwalnianego tam w wyniku procesów metabolicznych. Następnie w mięśniach szkieletowych, sercu, płucach, tkance tłuszczowej i mózgu amoniak

przekształcony zostaje w Gln, która po uwolnieniu do krwiobiegu stanowi źródło energii w jelitach i wątrobie.

Stężenie amoniaku we krwi utrzymywane jest na niskim, mikromolarnym poziomie, co ilustruje detoksykacyjną sprawność wątroby. U ludzi prawidłowe stężenie amoniaku we krwi tętniczej wynosi  $<100\mu\text{M}$ , u szczura notowano wyższe stężenia referencyjne: 50 –  $250\mu\text{M}$  (Tabela II.1).

	STĘŻENIE AMONIAKU			
	wartości referencyjne [ $\mu\text{M}$ ]	źródło danych (literatura)	wartości w patologii [ $\mu\text{M}$ ]	źródło danych (literatura)
<b>człowiek</b>				
krew tętnicza	73-103	[179]	55	[180]
	30	[180]	27-76	[249]
	70-113	ref. w [62]	343	[129]
	10-47	[26]	128	[26]
krew żylna	20-25	ref. w [62]		
CSF	20-100	ref. w [62]		
<b>szczur</b>				
krew tętnicza	35	[76]	560	[140]
	35	[140]	1000	[118]
	50-250	ref. w [62]	225	[65]
	85	[65]		
krew żylna	20-25	[277]		
	50-80	ref. w [62]		
CSF	230	[118]	1480	[118]
Mózg	390	[118]	3830	[118]
	130	[82]	330	[82]
	150-300			
<b>królik</b>				
Krew	13 $\mu\text{mol/l}$	[68]	4250-8830	[68]

Tab.II.1. Referencyjne i patologiczne wartości stężeń amoniaku w tkankach człowieka, szczura i królika.

### II.1.1. Amoniak w ośrodkowym układzie nerwowym

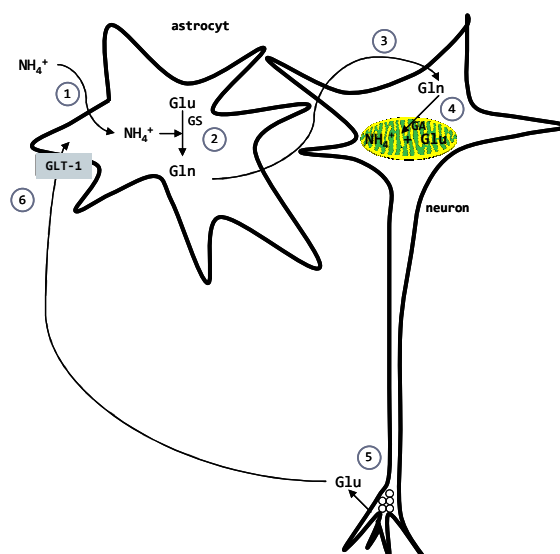
Amoniak obecny w mózgu pochodzić może z krwi obwodowej, bądź z endogennych ścieżek biochemicznych. Głównymi prekursorami endogennego amoniaku w mózgu są Gln, glutaminian (Glu) i asparaginian (Asp) [62]. Amoniak jest produktem metabolizmu neuroprzekazników aminokwasowych (Glu i Asp), amin katecholowych (adrenaliny, noradrenaliny, dopaminy), a także serotoniny. Źródło amoniaku stanowi także cykl nukleotydów purynowych oraz katalizowana przez GA deaminacja Gln.

W przeciwieństwie do dużej liczby reakcji, których produktem jest amoniak, jedyną, która w mózgu prowadzi do jego detoksykacji jest, opisana uprzednio dla hepatocytów okołozylnych, katalizowana przez GS reakcja syntezy Gln z Glu i amoniaku:

$$\text{Glu} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{P}_i$$

GS zlokalizowana jest wyłącznie w astrocytach [189;214], w związku z czym cykl glutaminian-glutamina podlega komórkowemu uprzedziałowieniu. Gln uwalniana przez astrocyty zostaje pobrana przez neurony glutaminianergiczne. W mitochondriach neuronów Gln przekształcana jest przez GA do Glu. Glu uwalniany zostaje jako neuroprzebieżnik do przestrzeni synaptycznej, skąd wychwytywany jest zwrótnie przez astrocyty (Ryc. II.1).

Wysoka aktywność GS i wydajne włączanie amoniaku do Gln powodują powstanie dużego gradientu stężenia amoniaku między mózgiem, a krwią. Sprzyja to, wraz z różnicą pH między mózgiem (~7.1) a krwią (~7.4), przenikaniu amoniaku do mózgu [79;225;237]. Stąd stosunek stężeń między mózgiem a krwią wynosi od 1.5:1 a 3:1 [62].



Ryc.II.1. Cykl glutaminian –glutamina. W astrocytach amoniak jest neutralizowany na drodze syntezy Gln (1), katalizowanej przez syntetazę Gln (2). Następnie Gln uwalniana z astrocytów trafia do neuronów (3), gdzie w mitochondriach ulega hydrolizie do amoniaku i Glu (4). Po uwolnieniu Glu jako neuroprzebieżnika (5) następuje wychwyty zwrótny Glu z przestrzeni międzysynaptycznej do astrocytów, w czym pośredniczą transportery Glu, m.in. GLT-1 (6).

Gln – glutamina, Glu – glutaminian, GS – syntetaza Gln, GA – glutaminaza

### II.1.2. Drogi przenikania amoniaku do mózgu

Amoniak w postaci gazowej ( $\text{NH}_3$ ) pokonuje barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) bez przeszkód, na drodze dyfuzji (pomimo stosunkowo niskiej rozpuszczalności w tłuszczach). W proces transportu  $\text{NH}_4^+$  zaangażowane mogą być transportery specyficzne dla  $\text{NH}_4^+$ , transportery swoiste dla innych kationów lub kanały jonowe [184;225;302] i wodne (akwaporyny) [308]. W efekcie, mimo że w warunkach fizjologicznych jon amonowy stanowi 98% całkowitej puli amoniaku, tylko ok. 25% amoniaku trafia z krążenia do mózgu w formie  $\text{NH}_4^+$  [62;79;184].

W tkankach ssaków poza układem nerwowym, w transporcie amoniaku pośredniczą białka Rh (ang. *Rhesus proteins*), homologiczne względem białek z rodziny Amt – specyficznych transporterów amoniaku występujących u roślin, mikroorganizmów i bezkręgowców [121;232]. Nieerytrocytarne homologi RhBG i RhCG ulegają ekspresji w tkankach związanych z utrzymaniem homeostazy azotowej: w układzie pokarmowym, wątrobie, nerkach [121;232;302]. Mechanizm transportu amoniaku przez RhBG i RhCG był szczegółowo badany w nerkach, jednak nierozstrzygnięta pozostaje kwestia, czy w narządzie tym transportowany jest wyłącznie  $\text{NH}_3$ , czy również  $\text{NH}_4^+$  [232;302]. Ekspresję mRNA dla RhCG w mózgu człowieka i myszy dokumentuje jedno doniesienie literaturowe [176], jednakże badania funkcjonalne nie zostały jak dotąd przeprowadzone.

Niektóre akwaporyny (3, 7, 8, 9 i prawdopodobnie 10) pośredniczą również w transporcie amoniaku [175]. Spośród nich, w mózgu ekspresji ulega (oprócz typowych dla ośrodkowego układu nerwowego kanałów dla wody – akwaporyn 1 i 4) akwaporyna 9, jednak – podobnie jak w przypadku białek Rh – jej rola w transporcie amoniaku przez błony komórkowe ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie została dotąd zbadana [308;311]. Akwaporyny obecne w mózgu, czyli 1, 4 i 9, ulegają silnej nadekspresji w stanach patologicznych, takich jak nowotwory, czy urazy [311]. Obszernie badano rolę akwaporyny 4 (Aqp4) w patomechanizmie hiperamonemicznego obrzęku mózgu [243]. Na wzmiankę zasługuje akwaporyna 8 (Aqp8), zlokalizowana w mitochondriach (m. in. hepatocytów) i pośrednicząca w mitochondrialnym transporcie amoniaku [274]. W przeciwieństwie do błony komórkowej, do mitochondriów łatwiej wnika forma zjonizowana amoniaku, ze względu na ujemny ładunek wnętrza organelli [92], jednak w przypadku Aqp8 autorzy wskazują na transport  $\text{NH}_3$  [274]. Podobnie jak w przypadku białek Rh, rola akwaporyn w transporcie amoniaku w OUN wymaga dalszych badań.

Ze względu na fakt, iż średnica i właściwości jonów amonowego i potasowego są bardzo zbliżone, uważa się, że  $\text{NH}_4^+$  może konkurować z  $\text{K}^+$  i za pośrednictwem kanałów lub transporterów potasowych przechodzić przez błony komórkowe [79;184]. Jon amonowy może zastępować także inne kationy ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ) [225;301;302]. Rozległa wiedza na temat transportu  $\text{NH}_4^+$  przez błony komórkowe w nerkach skłania do szukania analogicznych mechanizmów w OUN, jednak dane doświadczalne są niepełne [225].

W badaniach na hodowlach pierwotnych astrocytów wykazano powinowactwo  $\text{NH}_4^+$  do kanałów potasowych Kir (ang. *inwardly rectifying potassium channels*) [12;200] oraz kotransportera sodowo-chlorkowo-potasowego (ang.  *$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter*; NKCC) [141]. Ponadto, w badaniach na skrawkach hipokampalnych wykazano, że w transport  $\text{NH}_4^+$

do neuronów zaangażowana jest pompa sodowo-potasowa ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza), a do astrocytów  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza i NKCC [142]. Udział kanałów i transporterów jonowych w transporcie  $\text{NH}_4^+$  w komórkach OUN zostanie szerzej omówiony w rozdziale Dyskusja.

## II.2. Neurotoksyczność amoniaku

Pomimo faktu, iż amoniak jest nieodzowny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, jego nadmiar jest toksyczny, w szczególności dla OUN. O hiperamonemii, czyli patologicznie wysokim stężeniu amoniaku we krwi, mówimy wówczas, gdy przekracza wartości  $100\mu\text{M}$  u ludzi i  $250\mu\text{M}$  u szczurów. U zwierząt doświadczalnych notowano nawet milimolarne stężenia amoniaku we krwi (Tab.II.1.). W warunkach hiperamonemii amoniak ulega kumulacji w mózgu: stosunek stężeń amoniaku we krwi i mózgu może zwiększyć się aż do 1:8 [62].

Hiperamonemia towarzyszy wielu chorobom, przy czym może być uwarunkowana genetycznie, bądź indukowana przez czynniki egzogenne. Hiperamonemia skutkuje zaburzeniami czynności OUN (encefalopatiami). Najczęściej występującą encefalopatią hiperamonemiczną jest encefalopatia wątrobowa (EW), gdzie do nagromadzenia amoniaku dochodzi na skutek dysfunkcji wątroby i upośledzenia jej funkcji detoksykacyjnych [1].

Amoniak w patologicznie wysokich stężeniach doprowadza do zaburzeń metabolizmu energetycznego komórek OUN, przede wszystkim astrocytów [107;246;319]. Badania nad mechanizmem upośledzenia procesów energetycznych w mózgu przez amoniak sięgają lat 50 XX w. [25]. Z przeprowadzonych od tego czasu badań wynika, że amoniak bezpośrednio oddziałuje na enzymy cyklu Krebsa, łańcucha oddechowego i glikolizy, a pośrednio wpływa na metabolizm energetyczny poprzez modyfikowanie funkcjonowania cyklu jabłczan-asparaginian, z czym związana jest nadmierna synteza Gln [107]. Kontrowersje budzi jednak kwestia, w jakim stopniu, oraz w jakich strukturach, amoniak zaburza bioenergetykę mózgu. Liczne badania dotyczące tego zagadnienia nie będą obszernie omawiane w niniejszym Wstępie – z historią i stanem wiedzy na ten temat zapoznać się można w doskonałych artykułach przeglądowych [107;243;244;246;319].

### II.2.1. Encefalopatia wątrobowa

Amoniak uznawany jest za główny czynnik patogenny w EW [3;234]. Hiperamonemia występuje u 90% pacjentów z dysfunkcją wątroby [39]. Istnieje dobrze udokumentowana



korelacja między stopniem hiperamonemii, a stopniem zaawansowania EW [26;58;145;160;222].

Wyróżnia się dwa główne typy EW: ostrą i przewlekłą. W postaci ostrej (tzw. typ A), do nagłej, szybko postępującej niewydolności wątroby dochodzi wskutek zatrucia silnymi hepatotoksynami (np. amanityną, paracetamolem, lekami anestetycznymi) lub zakażenia wirusami hepatotropowymi (HAV, HBV, HCV). Śmiertelność w ostrej EW sięga 80% [128, 44]. Upośledzenie funkcji detoksyfikacyjnych wątroby doprowadzające do postaci przewlekłej EW, wynikać może z dwóch przyczyn: spontanicznego lub chirurgicznego (zabieg TIPS; ang. *transjugular intrahepatic portosystemic shunt*) wyłączenia wątroby z krążenia przez zespolenie wrotno-czyczne (typ B EW) lub z marskości (typ C).

Objawy EW obejmują spektrum dysfunkcji motorycznych i intelektualnych. Zależnie od stopnia nasilenia objawów, wyróżnić można cztery stadia EW, przy czym pierwsze, najlżejsze, charakteryzują m. in. zmiany rytmu snu i czuwania, nieznaczne zmiany nastroju, natomiast stadium czwarte to brak świadomości, śpiączka (Tabela II.2.).

stopień EW	objawy
MHE	zaburzenia kognitywne, które nie są obserwowane w standardowym badaniu neurologicznym, a jedynie po zastosowaniu specjalistycznych testów neuropsychologicznych lub neurofizjologicznych
I	lekkie zaburzenia świadomości, obniżone koncentracja i tempo wykonywania zadań umysłowych, euforia lub depresja, drażliwość, zmiany rytmu snu i czuwania, bełkotliwa mowa
II	senność, letarg, wyraźne upośledzenie zdolności wykonywania zadań umysłowych, zmiany osobowości, nieprawidłowe zachowanie, dezorientacja w czasie
III	niezdolność do wykonania jakichkolwiek zadań umysłowych, senność ale i napady pobudzenia i agresji, dezorientacja w czasie i przestrzeni, zaburzenia pamięci
IV	brak kontaktu z otoczeniem, śpiączka (z lub bez odpowiedzi na bodziec bólowy)

Tab.II.2. Objawy kliniczne EW w zależności od stopnia zaawansowania choroby. (wg [5])

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia z 2000 r., w krajach Unii Europejskiej marskość wątroby diagnozuje się w 14 przypadkach na 100 000 obywateli, a skutkuje ona 60 000 zgonami rocznie, co stanowi liczbę większą niż liczba ofiar wypadków drogowych. Raport nie podaje u jakiej liczby chorych z marskością stwierdza się objawy EW, jednak na podstawie różnych badań klinicznych szacuje się, że hiperamonemia i EW towarzyszą ponad 50% przypadków marskości wątroby. Ponadto, oprócz tzw. objawowej EW (diagnozowanej za pomocą testów klinicznych), wyróżnia się EW subkliniczną (ang. *minimal hepatic encephalopathy*; MHE), której objawy stwierdzane są na podstawie testów



psychometrycznych. Pogorszenie jakości życia pacjentów z MHE polega m. in. na ograniczeniu sprawności w prowadzeniu samochodu, co stwarza zagrożenie bezpieczeństwa w ruchu drogowym [27;234;312]. Ponadto, wśród pacjentów z MHE stwierdza się większe ryzyko wystąpienia objawowej EW, oraz wyższą śmiertelność [194].

Do badań nad neurotoksycznym oddziaływaniem amoniaku oraz patomechanizmem EW, stosuje się modele *in vivo* (najczęściej szczurze i mysie), *ex vivo* (na skrawkach mózgowych) oraz hodowle *in vitro*, głównie korowych astrocytów pierwotnych. Dokładną charakterystykę modeli do badań, zatwierdzonych i rekomendowanych przez ISHEN (International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism; [48]), zamieszczono w Tabeli II.3. W celu dokonania wybiórczej oceny roli amoniaku w EW, stosuje się model tzw. hiperamonemii prostej, indukowany poprzez dootrzewnowe podanie octanu amonu, co nie uszkadza wątroby [115].

<b>zwierzęce modele encefalopatii wątrobowej</b>	mysz, szczur	Typ A	dootrzewnowe podawanie hepatotoksyn: tioacetamidu (TAA), galaktozaminy, acetaminofenu, azoksymetanu
		Typ B	zespolecie wrotno-systemowe (ang. <i>portacaval-shunt</i> ; PCS)
		Typ C	ligacja dróg żółciowych (ang. <i>bile duct ligation</i> ; BDL)
<b>zwierzęce modele hiperamonemii prostej (bez dysfunkcji wątroby)</b>	mysz, szczur	dootrzewnowe podawanie octanu amonu	
		karmienie karmą o dużej zawartości amoniaku	
		model transgeniczny, wrodzonej, indukowanej hiperamonemii (ang. <i>OCT deficiency</i> )	
<b>modele <i>in vitro</i></b>	astrocyty pierwotne, rzadziej neurony	do medium hodowlanego podaje się chlorek amonu (NH <sub>4</sub> Cl) - amoniak	
<b>modele <i>ex vivo</i></b>	skrawki kory mózgowej, hipokampa	skrawki mogą pochodzić od zwierząt z wywołaną EW lub hiperamonemią prostą, lub od zwierząt zdrowych, i być traktowane chlorkiem amonu podczas inkubacji	

Tab. II.3. Modele do badań nad neurotoksycznością amoniaku i EW.

### II.2.2. Astrocyty w patomechanizmie encefalopatii wątrobowej

Zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla EW dotyczą niemal wyłącznie astrocytów, a jedynie bardzo rzadko neuronów, wobec czego EW uważa się za pierwotną gliopatię [1;45;46]. Wybiórczość toksyczności amoniaku wobec astrocytów wynika z faktu, iż współtworząc BBB, astrocyty przejmują „uderzenie” amoniaku pochodzącego z krwi obwodowej, a następnie jego detoksykację, która – jak wspomniano w podrozdziale II.1.1. – odbywa się na drodze syntezy Gln, katalizowanej przez GS, enzym o lokalizacji wyłącznie astrocytarnej.

Dla EW znamieną jest tzw. astrocytoza Alzheimera typu II, charakteryzująca się występowaniem grup astrocytów o mocno powiększonych, nagich jądrach komórkowych z chromatyną ulokowaną na obwodzie oraz proliferacją DNA, co dokumentują badania neuropatologiczne mózgow zmarłych na EW [188], zwierząt z EW wywoływana doświadczalnie [38;206;213], a także obserwacje spod mikroskopu świetlnego i elektronowego pierwotnych hodowli astrocytów szczurzych traktowanych amoniakiem [89;90].

Obrzmienie astrocytów jest cechą charakterystyczną hiperamonemii i EW – występuje u chorych z ostrą niewydolnością wątroby [139] i śpiączką hiperamonemiczną [1], w modelach zwierzęcych [72;206;212;278;290;306], a także w traktowanych amoniakiem astrocytach *in vitro* [153;198;207;239;272].

### **II.2.3. Hiperamonemiczny obrzęk mózgu**

Obrzęk mózgu występuje zarówno u pacjentów z ostrą [18;29;236;300], jak i przewlekłą (także MHE) EW [97;98;234]. W przypadkach EW przewlekłej obrzęk jest umiarkowany, jednak może odpowiadać za niektóre objawy neurologiczne [94;234]. W przypadkach ostrej EW obrzęk mózgu doprowadza natomiast do wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego (stadium IV EW), stanowiąc bezpośrednią przyczynę zgonów [44;127;128].

Amoniak jest głównym sprawcą obrzęku mózgu w EW. Bezpośrednią przesłanką pozwalającą tak twierdzić jest fakt, iż obrzęk mózgu towarzyszy hiperamonemii *per se* (tj. bez uszkodzenia wątroby), co stwierdza się zarówno u pacjentów z upośledzeniem cyklu mocznikowego [40], jak i w zwierzęcych modelach hiperamonemii prostej [115;280]. Pod wpływem amoniaku obrzmieniu ulegają również, w warunkach *ex vivo*, komórki w skrawkach kory mózgowej szczura [170;316;317].

Obrzęk mózgu jest skorelowany ze zwiększonym przepływem krwi przez mózg (ang. *cerebral blood flow*; CBF). Wzrost CBF może zwiększać ciśnienie wewnątrzczaszkowe i pogłębiać obrzęk poprzez zwiększenie przepływu wody przez BBB i wywołanie hiperemii [127]. W klinice, podwyższony CBF jest czynnikiem ryzyka, predestynującym do wystąpienia obrzęku mózgu [305].

Obrzęk mózgu towarzyszący EW/hiperamonemii jest w głównej mierze cytotoksyczny, obrzmieniu ulegają upośledzone metabolicznie astrocyty. Zmiany

patologiczne, jakim ulegają astrocyty w warunkach EW/hiperamonemii szerzej opisane zostaną w następnym podrozdziale.

Oprócz komponenty cytotoksycznej, do powstania obrzęku mózgu przyczynia się także komponenta wazogenna, co stwierdzano w modelach hiperamonemii i EW [49;50]. Powstawanie obrzęku wazogenego związane jest ze zmianami przepuszczalności BBB, co – w umiarkowanym stopniu – ma miejsce w warunkach patogenicznego oddziaływania amoniaku [39;271-273].

Amoniak bezpośrednio przyczynia się do degradacji białek współtworzących BBB – złączy ścisłych (ang. *tight junctions*; TJs) oraz kładyn i okładyn. W mysim galaktozaminowym modelu ostrego uszkodzenia wątroby obrzęk mózgu występuje wtórnie do uszkodzenia TJs, na skutek aktywacji metaloproteinazy 9 (MMP-9) [55;204], a wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego jest wprost proporcjonalny do aktywności MMP-9 [49]. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu TJs oraz obniżenie poziomu ekspresji białek z nimi związanych – okładyn – stwierdzano również u pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby [182] oraz w modelach zwierzęcych: galaktozaminowym [182] i acetaminofenowym [297]. W wymienionych pracach wykazano, że bezpośrednim czynnikiem powodującym zakłócenie integralności BBB był TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor*). Podwyższenie poziomu TNF- $\alpha$  i innych cytokin prozapalnych we krwi występuje zarówno u pacjentów z ostrą i przewlekłą niewydolnością wątroby [285;307], jak i u zwierząt modelowych [135].

Na rolę amoniaku w powstawaniu wazogenego obrzęku mózgu wskazuje również wzrost przepuszczalności komórek linii RBE4, wywodzących się z komórek śródbłonna naczyń mózgowych [273]. W komórkach tych stwierdzono również aktywację MMP-9 oraz wzrost poziomu izoprostanów pod wpływem jonów amonowych [273]. Amoniak moduluje funkcjonowanie BBB wpływając nie tylko na skład błon komórek współtworzących barierę, ale także na funkcjonowanie transporterów błonowych. Amoniak zaburza transport aminokwasów przez BBB: dużych neutralnych, oraz ornityny i argininy [271].

#### ***II.2.4. Patomechanizm neurotoksycznego oddziaływania amoniaku***

##### *II.2.4.1. Procesy fizjologiczne i metaboliczne ulegające zaburzeniom w mózgu – uwagi ogólne*

Neurotoksyczne oddziaływanie amoniaku, leżące u podstaw patomechanizmu EW, obejmuje wiele ząębających się i samonapędzających mechanizmów. Amoniak zakłóca funkcje astrocytów, prowadząc do:

- zaburzeń metabolizmu energetycznego
- zmian pH wewnątrzkomórkowego (pH<sub>i</sub>)
- zmian własności elektrofizjologicznych błon komórkowych
- nierównowagi osmotycznej i zaburzeń gospodarki wodno-jonowej
- zaburzeń neurotransmisji: glutaminianergicznej, GABAergicznej, serotonergicznej
- zaburzeń transmisji na szlaku receptory NMDA-NO-cykliczny GMP
- stresu nitrozo-oksydacyjnego (ang. *oxidative-nitrosative stress*; ONS)
- wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych (ang. *mitochondrial permeability transition*; MPT)
- zapalenia układowego [1;34].

Uważa się, że obrzmienie astrocytów będące – jak już wspomniano – bezpośrednią przyczyną obrzęku mózgu, stanowi wypadkową wywołanych przez amoniak i wzajemnie przyczynowo powiązanych zaburzeń metabolizmu komórkowego, w tym w szczególności akumulacji osmolitów (w tym Gln), nierównowagi wodno-jonowej, ONS, indukcji MPT, obniżenia metabolizmu energetycznego oraz działania cytokin prozapalnych [1;3;44;99;172;217]. Znamienne dla hiperamonemii/EW zaburzenie równowagi między neuroprzebiegiem pobudzającym a hamującym, również dotyczy dysfunkcji astrocytów, jako funkcjonalnej składowej synapsy trójdzielnej [10;216].

Rola amoniaku, jako głównego czynnika sprawczego w patomechanizmie EW, nie jest kwestionowana. Dyskusji natomiast podlega udział innych, towarzyszących czynników, z których wymienia się m.in.: akumulację innych neurotoksyn (np. manganu), czy stany zapalne o charakterze wielonarządowym bądź ograniczone do mózgu [3;234]. Obok amoniaku, jako pierwotnej przyczyny uruchamiającej kaskadę zdarzeń prowadzącą do EW [99;216], należy pamiętać o nierzadko współwystępujących czynnikach zwiększających ryzyko wystąpienia pełnoobjawowej EW: hiponatremii, hipokalemii, kwasicy/zasadowicy metabolicznej, niektórych lekach (np. benzodiazepinach), infekcjach, dysfunkcji nerek [289].

Niedawno, Romero-Gomez i wsp. [252] wykryli występowanie mutacji w promotorowym regionie genu kodującego ludzką glutaminazę. *In vitro*, mutacja ta powoduje zwiększenie ekspresji tego enzymu. U tych pacjentów cierpiących na marskość wątroby, u których występuje mutacja, stwierdza się również częstsze występowanie symptomatycznej EW. Jest to pierwsze doniesienie w literaturze implikujące udział czynnika genetycznego w patogenezie EW [2;252].

W kolejnych podrozdziałach omówione zostaną wybrane aspekty neurotoksycznego oddziaływania amoniaku, ze szczególnym uwzględnieniem tych mechanizmów, które

przyczyniają się – w sposób pośredni lub bezpośredni – do powstania obrzęka astrocytów i obrzęku mózgu. Nacisk położony będzie również na zaburzenia neurotransmisji i udział receptorów NMDA (NMDAr) w patomechanizmie EW.

W astrocytach *in vitro* oraz w mózgu szczura *in vivo*, następuje nadprodukcja reaktywnych form tlenu i azotu pod wpływem amoniaku, ale także stwierdza się obecność cytokin prozapalnych, benzodiazepin i hiponatremii – współwystępujących z hiperamonemią czynników ryzyka, przyczyniających się do patomechanizmu EW [99]. Amoniak i pozostałe wymienione czynniki indukują ONS na drodze zależnej od NMDAr i  $Ca^{2+}$  [85;199;250;265;266]. Aktywacja NMDAr związana jest z usunięciem bloku magnezowego na skutek depolaryzacji, a następnie wyrzutu Glu z komórek astrogleju i ponownego, autokrynnego, pobudzenia NMDAr [99;218]. Pomiędzy ONS a obrzękiem astrocytów istnieje zależność typu błędnego koła, utrudniająca, czy wręcz uniemożliwiająca wskazanie przyczyny w patomechanizmie EW: ONS powodują obrzęk astrocytów, i odwrotnie – obrzęk astrocytów, wywołane np. szokiem hipoosmotycznym, indukuje ONS [99].

#### II.2.4.2. Zaburzenia neurotransmisji glutaminianergicznej w encefalopatii wątrobowej

Objawy neuropsychiatryczne EW tłumaczy się m.in. nierównowagą w neurotransmisji pobudzającej i hamującej. W ostrych przypadkach EW dominuje nadpobudzenie i ekscytotoksyczność związane głównie z aktywacją NMDAr, natomiast w stanach przewlekłych nierównowaga przesuwa się w stronę przekaźnictwa GABAergicznego [3;178].

Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Glu obserwuje się w mózgu pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby [287;288], a także zwierząt w modelach *in vivo*, z towarzyszącą hiperamonemią i obrzękiem mózgu [33;69;115;191;192;197;255]. Wzrost ten może tłumaczyć takie objawy kliniczne jak nadpobudliwość i drgawki, nierzadkie w ostrej niewydolności wątroby (ang. *acute liver failure*, ALF) [253;254].

Wzrost stężenia Glu w przestrzeni synaptycznej wywoływany jest przez amoniak: akumulacja Glu towarzyszy hiperamonemii i/lub EW, i odwrotnie – fizjologiczne obniżenie ilości amoniaku w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF, ang. *cerebrospinal fluid*) koreluje ze spadkiem zewnątrzkomórkowego stężenia Glu [255].

Za wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Glu może odpowiadać obniżenie wychwytu i/lub zwiększenie wyrzutu Glu z astrocytów [253;254]. Obniżenie wychwytu Glu obserwowano w modelach EW/hiperamonemii *in vivo* [223;267] i *in vitro* [21;51;132]. Uważa się, że za obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu Glu odpowiada spadek

ekspresji sodo-zależnych transporterów Glu: GLT-1 (EAAT-2) [148;210] i GLAST (EAAT-1) [51;313]. Zwiększenie wyrzutu Glu z astrocytów hodowanych w obecności amoniaku pokazali Görg i wsp. [86].

W warunkach ostrej intoksykacji amoniakiem, następuje nadpobudzenie NMDAr [178], co prowadzi do ekscytotoksyczności wobec neuronów [83]. Od niedawna proponuje się także, że mechanizm ten może również dotyczyć astrocytów [45], jakkolwiek obecność funkcjonalnych NMDAr na astrocytach stanowi przedmiot sporów (por. dalsze fragmenty dysertacji).

W modelach hiperamonemii prostej wielokrotnie wykazano, że ostre zatrucie amoniakiem doprowadza do śmierci zwierząt na drodze zależnej od NMDAr [102;103;157;185]. Nadpobudzenie NMDAr na skutek ostrego podania jonów amonowych potwierdzono również w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (ang. *magnetic resonance imaging*; MRI) [50]. Za udziałem NMDAr w ostrej neurotoksyczności amoniaku przemawia fakt, iż antagoniści NMDAr (m.in. memantyna, MK-801) poprawiają parametry kliniczne (m.in. obrzęk mózgu) i obniżają śmiertelność zwierząt narażonych na hiperamonemię [102;103;156;157;185;294].

Indukowane amoniakiem nadpobudzenie NMDAr prowadzić może do:

- obniżenia poziomu ATP w mózgu [118;157;159;263], co może odbywać się poprzez zwiększenie aktywności  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy [9;157;186;248] lub zaburzenie aktywności enzymów mitochondrialnych poprzez zależny od NMDA napływ  $\text{Ca}^{2+}$  [157;158]
- indukcji ONS (por. kolejny podrozdział).

W warunkach ostrej hiperamonemii notowany jest wzrost cyklicznego GMP (cGMP), co jest wyznacznikiem ekscytotoksyczności Glu. Ów wzrost cGMP w mikrodializatach z mózgow sznurów, którym przez sondę mikrodializacyjną podawano amoniak, jest zależny od pobudzenia NMDAr, gdyż jednoczesne podawanie antagonistów NMDAr znosi efekt amoniaku [103;114]. Obserwuje się przy tym również wzrost poziomu azotanów/azotynów (możliwych do oznaczenia produktów utleniania NO – markerów ONS i pobudzenia szlaku NMDA-NO-cGMP) [116].

W przeciwieństwie do ostrego zatrucia dużymi dawkami amoniaku, w przewlekłej, umiarkowanej hiperamonemii nie obserwuje się nadpobudzenia NMDAr – przeciwnie, następuje obniżenie aktywności szlaku sygnałowego NMDA-NO-cGMP [178], co uważane jest za proces kompensacyjny. W stanach przewlekłych wzrost poziomu cGMP indukowany podaniem NMDA lub SNAP (donora NO) jest niższy – zarówno w modelu hiperamonemii prostej, bez uszkodzenia wątroby [104], jak i u zwierząt z PCS [193]. U osób z marskością



wątroby, aktywność cyklazy guanylanowej w odpowiedzi na podanie SNAP była niższa niż u zdrowych [63]. Cykliczny GMP jest zaangażowany w procesy uczenia się i pamięci [75;146;178;195], stąd postuluje się, że zaburzenia szlaku NMDA-NO-cGMP odpowiadają za zaburzenia kognitywne i pamięciowe obserwowane u pacjentów z przewlekłą EW [303;304], czy u zwierząt z EW wywołaną doświadczalnie [77;78].

#### II.2.4.3. Stres nitrozo-oksydacyjny w hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej

Amoniak powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu i azotu (w tym wyjątkowo toksycznego nadtlenoazotynu, ONOO<sup>-</sup>), w następstwie czego dochodzi do ONS. Indukowany amoniakiem ONS stwierdzano:

- *in vitro*: w hodowlach pierwotnych astrocytów [88;96;199;266;270;272]
- *in vivo*: w mózgach szczurów, w modelu hiperamonemii prostej [155] i PCA [190] oraz EW indukowanej TAA [262], lub którym domózgowo podawano amoniak poprzez sondę mikrodializacyjną [113]
- we krwi chorych [203] oraz mózgach osób zmarłych na EW [87].

Za indukcję ONS przez amoniak odpowiada z jednej strony podwyższona ekspresja i aktywność syntaz tlenku azotu [105;247], a z drugiej obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej, dysmutazy nadtlenkowej i katalazy [154;155]. Amoniak może indukować ONS również na drodze niezależnej od NMDAr – poprzez aktywację oksydazy NADPH, co wykazano w astrocytach *in vitro* i w skrawkach kory mózgowej szczura *ex vivo* [250;272]. ONS w konsekwencji prowadzi do upośledzenia funkcji komórkowych na skutek oksydacji białek i kwasów nukleinowych, peroksydacji lipidów, nitracji reszt tyrozynowych i s-nitrozylacji reszt cysteinowych w białkach i glutationie (GSH), indukcji MPT.

Oksydację RNA (mogącą wpływać na ekspresję genów i proces translacji białek), niekiedy zależną od NMDAr, stwierdzono w astrocytach pierwotnych traktowanych amoniakiem oraz w szczurzym modelu hiperamonemii [88], a zwiększony poziom 8-hydroksyguanozyny, markera oksydacji RNA, stwierdzono również *post mortem* w mózgach osób zmarłych na EW [87].

Nitracja reszt tyrozynowych przez ONOO<sup>-</sup>, indukowana przez amoniak, dotyczy takich białek jak GS, receptor benzodiazepinowy, NKCC. Nitracja GS prowadzi do obniżenia aktywności enzymu, co tłumaczy się jako próbę kompensacji wobec nadmiernego gromadzenia się Gln [84;96]. W przypadku NKCC, nitracja prowadzi do jego nadmiernej

aktywacji, co uważane jest za przyczynę zaburzeń równowagi jonowej, prowadzącej do obrzmienia astrocytów [131]. Indukowaną amoniakiem, zależną od NMDAr nitrację astrocytarnych GS, receptorów benzodiazepinowych i GAPDH ujawniły również badania na astrocytach hodowanych *in vitro* [266]. W tej samej pracy wykazano, że reaktywne formy azotu aktywują poprzez fosforylację kinaz MAP (ang. *miogen-activated protein kinase*; MAPK), Erk1/Erk2 oraz p38-MAPK. Udział szlaku sygnałowego z udziałem MAPK w neurotoksyczności amoniaku potwierdzili również Jayakumar i wsp. [132]. Fosforylacja MAPK prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB, zaangażowanego w odpowiedzi na czynniki prozapalne [216]. Aktywacja NFκB w hodowlach astrocytarnych następuje pod wpływem amoniaku [270].

#### II.2.4.4. Rola amoniaku w indukcji MPT

MPT definiowane jest jako wzrost przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla małych (<1500 Da) cząsteczek, na skutek indukowanego wzrostem stężenia  $Ca^{2+}$  otwarcia kanału PTP (ang. *permeability transition pore*) w mitochondriach [216]. Amoniak indukuje MPT w hodowlach astrocytarnych [19;215], a mechanizm tego procesu obejmuje stres oksydacyjny – stosowanie antyoksydantów przeciwdziała MPT [241]. Konsekwencją MPT i rozprzęgnięcia wewnątrzmitochondrialnego potencjału błonowego (ang. *mitochondria inner membrane potential*;  $\Delta\Psi_m$ ) jest zaburzenie fosforylacji oksydacyjnej i spadek produkcji ATP, generacja wolnych rodników, obrzmienie mitochondriów [216].

### II.3. Udział glutaminy w patomechanizmie neurotoksyczności amoniaku

Glutamina jest aminokwasem najobficiej występującym we krwi (ok. 550mM u człowieka; [251]) i posiada szerokie spektrum działania. Gln stanowi źródło energii dla komórek i jako uniwersalny nośnik azotu, jest prekursorem w syntezie innych aminokwasów, peptydów czy nukleotydów [7;279]. Obecność Gln jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju OUN w trakcie embriogenezy, na co wskazują badania skutków wrodzonego niedoboru GS u myszy i ludzi [93;100]. Aktywność i ekspresja GS ulegają zmianom/modulacji pod wpływem takich czynników jak stres oksydacyjny, zapalenie czy infekcja wirusowa (ref. w [56]). Na każdym etapie rozwoju, Gln odgrywa istotną rolę w neuroprzebieżności aminokwasowym: w OUN Gln jest cząsteczką łączącą metabolizm amoniaku i syntezę neuroprzebieżników – Glu i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), i jako taka może modulować



działanie synapsy trójdzielnej [7;8]. Poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, np. NFκB, Gln w różnych tkankach ssaków reguluje ekspresję szeregu genów zaangażowanych w takie procesy jak proliferacja, różnicowanie i przeżywalność komórek [37;279]: nie jest jednak jasne, czy i w jakim stopniu procesy te odgrywają rolę w mózgu.

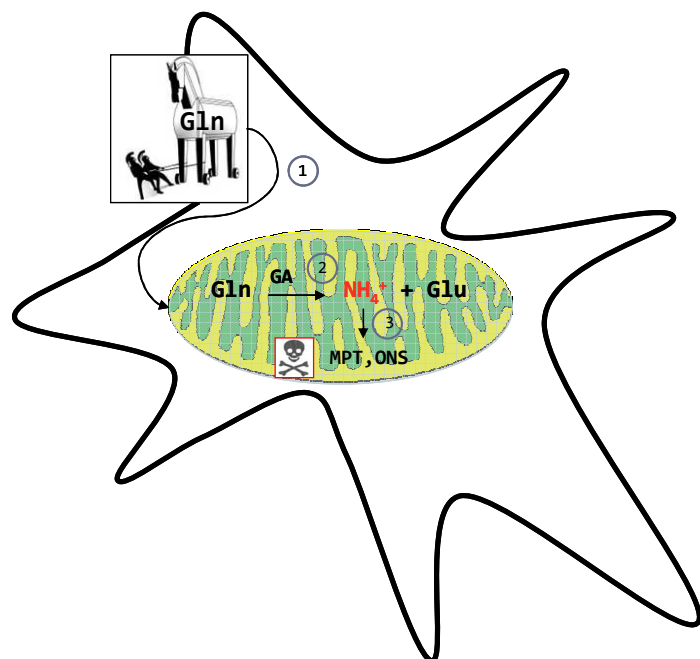
Jak już wspomniano, w OUN detoksykacja amoniaku, przebiega w astrocytach: w reakcji katalizowanej przez GS, z amoniaku i Glu syntetyzowana jest Gln. W warunkach patologicznie wysokiego stężenia amoniaku, Gln, jako produkt jego detoksykacji, również ulega akumulacji w OUN i CSF, co wykazano u chorych z EW i w modelach EW *in vivo* [64;161;187;286]. Co więcej, poziom Gln w mózgu koreluje nie tylko z poziomem hiperamonemii [286], ale także ze stopniem obrzęku mózgu i zaawansowania EW [151;168;169;269]. Towarzyszące hiperamonemii nagromadzenie Gln długo uważano za obojętne dla funkcji OUN. Dane doświadczalne zgromadzone na przełomie XX i XXI wieku doprowadziły do zmiany tego poglądu. Bazując na tych danych, Albrecht i Norenberg [6] zaproponowali tzw. hipotezę konia Trojańskiego, mówiącą, że syntetyzowana w cytoplazmie astrocytów Gln trafia następnie do mitochondriów, gdzie jest hydrolizowana przez GA z powrotem do amoniaku i Glu. Amoniak generowany bezpośrednio w mitochondriach przyczynia się do indukcji MPT, ONS i tym samym dysfunkcji mitochondriów, a w konsekwencji do powstania obrzmienia komórki (Ryc.II.2). Hipoteza konia Trojańskiego oparta jest m.in. na licznych doniesieniach dokumentujących skuteczność sulfoksyminy metioniny (MSO), inhibitora GS, w przeciwdziałaniu neurotoksyczności amoniaku. Stosowanie MSO obniżało:

- śmiertelność szczurów wywołaną infuzją amoniaku [298]
- obrzęk mózgu u szczurów z hiperamonemią [30;280]
- wywołane amoniakiem obrzmienie astrocytów *in vivo* [282;306] i *in vitro* [125;208;323]
- ciśnienie wewnątrzczaszkowe [30] i CBF [190]
- poziom zewnątrzkomórkowego K<sup>+</sup> [276]
- stres oksydacyjny w astrocytach *in vitro* [199;215]
- MPT w hodowlach astrocytarnych [19].

Oprócz przesłanek opartych na danych uzyskanych z użyciem MSO, pojawiły się opisy bezpośredniego neurotoksycznego działania Gln. W hodowlach astrocytów Gln wywołuje stres oksydacyjny [134] i indukuje MPT [240]. Gln wywoływała również indukcję MPT i obrzęk mitochondriów izolowanych z kory mózgowej szczura [318], a także potęgowała wywołane amoniakiem obrzmienie mitochondriów [74]. Hipotezę konia Trojańskiego w modelu EW *in vivo* po części potwierdzili Rama Rao i wsp. [245]: szczurom, którym

podawano TAA, podawano jednocześnie histydynę (His) – inhibitor transportu Gln do mitochondriów. U zwierząt przyjmujących His zaobserwowano zmniejszenie obrzęku mózgu, co interpretowano jako wyraz obniżenia poziomu wewnątrzmitochondrialnej Gln jako źródła amoniaku.

Słuszność hipotezy konia Trojańskiego i centralna rola Gln w neurotoksyczności amoniaku podlega ciągłej analizie i weryfikacji [7;11;39;99], co szerzej omówione zostanie w rozdziale Dyskusja. W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że pierwotnie hipoteza konia Trojańskiego przypisywała całe działanie patogeniczne uwolnionemu z Gln amoniakowi, niejako ignorując, że drugim uwolnionym produktem jest Glu. Wyniki badań prezentowane w niniejszej dysertacji obejmują m.in. próbę wypełnienia „luki glutaminianowej” w tej hipotezie.



Ryc.II.2. Hipoteza konia Trojańskiego (Albrecht i Norenberg, 2006), proponująca pośrednictwo Gln w neurotoksyczności amoniaku. Gln gromadząca się w warunkach hiperamonemii/EW, transportowana jest do mitochondriów astrocytarnych (1), gdzie ulega hydrolizie (katalizowanej przez GA) do Glu i amoniaku (2). Generowany w mitochondriach amoniak powoduje indukcję MPT i ONS, doprowadzając w ten sposób do dysfunkcji komórek.

Gln – glutamina, Glu – glutaminian, GA – glutaminaza, ONS – stres nitrozo-oksydacyjny

## II.4. Kanały potasowe Kir w ośrodkowym układzie nerwowym

Komórki glejowe posiadają wiele typów kanałów potasowych, jednakże za charakterystyczne dla gleju funkcje, a więc za wysoką, selektywną przepuszczalność dla jonów  $K^+$  oraz za utrzymanie silnie ujemnego błonowego potencjału spoczynkowego (ang. *resting membrane potential*; RMP), odpowiadają kanały Kir (dokomórkowe prostownicze kanały potasowe; wewnątrzprostownicze kanały potasowe; ang. *inwardly rectifying potassium channels*) [41]. W komórkach makrogleju, czyli w astrocytach i oligodendrocytach, a także w komórkach gleju Müllera i Bergmanna, przewodnictwo  $K^+$  odbywa się w głównej mierze poprzez kanały Kir, jakkolwiek badania elektrofizjologiczne wykazały heterogenność populacji astrocytów co do stopnia spolaryzowania i aktywności Kir [32;41].

Utrzymanie prawidłowego gradientu  $K^+$ , tzw. buforowanie przestrzenne (ang. *spatial buffering*) (mózg), czy syfonowanie (siatkówka), jest główną rolą astrocytów i komórek gleju Müllera. Jony potasu, uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej na skutek aktywności neuronalnej, są wychwytywane przez glejowe kanały Kir, a następnie uwalniane do obszarów o mniejszym stężeniu  $K^+$  (np. do naczyń), co w przypadku astrocytów umożliwia struktura syncytialna i złącza szczelinowe (ang. *gap junction*) [41;221]. Uważa się, że za utrzymanie właściwego RMP oraz za buforowanie  $K^+$  w głównej mierze odpowiedzialny jest kanał Kir4.1 [20;221;257].

Na podstawie cech molekularnych i właściwości elektrofizjologicznych rodzinę kanałów Kir dzieli się na 7 podrodzin: Kir1.x – Kir7.x. Dodatkowo, funkcjonalne zróżnicowanie kanałów Kir potęguje fakt, iż formują one homo- lub heterotetramery. Podjednostka kanału Kir zbudowana jest z dwóch domen transbłonowych, regionu formującego kanał oraz domen C- i N-końcowych, zlokalizowanych cytoplazmatycznie.

Ze względów funkcjonalnych natomiast, wyróżnia się 5 typów Kir:

- dokomórkowe wewnątrzprostownicze (Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3)
- aktywowane białkami G (Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3, Kir3.4)
- regulowane przez ATP (Kir6.1, Kir6.2)
- zależne od ATP (Kir1.1, Kir4.1)
- inne (Kir5.1 oraz TREK1-2 oraz TASK1-5) [41].

Zasadniczo, kanały Kir umożliwiają napływ potasu do komórki. Kanały „silnie rektyfikujące” (ang. *strongly rectifying*) (Kir2.x, Kir3.x) pośredniczą niemal wyłącznie w dokomórkowym ruchu potasu, natomiast poprzez kanały typu „słabo rektyfikujące”

(ang. *weakly rectifying*) (Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x, Kir7.x) następuje również wypływ  $K^+$  (zależnie od gradientu potasowego). Zróżnicowanie budowy podjednostkowej moduluje działanie kanałów Kir:

- homomeryczny Kir4.1 jest kanałem słabo rektyfikującym, natomiast heteromer Kir4.1/Kir2.1 jest silnie rektyfikujący, podobnie jak homomer Kir2.1
- Kir5.1 nie tworzy homomerów – funkcjonalne są jedynie heteromery Kir4.1/Kir5.1, zaś heteromer Kir2.1/Kir5.1 jest nieczynny
- Kir3.x występuje jedynie jako heteromery w obrębie tej samej podrodziny [41].

#### **II.4.1. Regulacja funkcji kanałów Kir**

Kanały Kir utrzymują potencjał spoczynkowy błon komórkowych (RMP) na poziomie bliskim potencjału równowagowego dla  $K^+$  ( $E_K$ ), ustalając w ten sposób wartość progową dla wzbudzenia [257]. W miejscu, w którym następuje wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego potasu ( $[K^+]_e$ ),  $E_K$  staje się bardziej pozytywny w stosunku do RMP, co daje siłę napędową dla napływu  $K^+$  do wnętrza komórki (ang. *inward currents*). Po zamknięciu kanałów, następuje rozprowadzenie  $K^+$  do innych, oddalonych regionów syncytium, gdzie  $E_K$  jest bardziej negatywny w stosunku do RMP, co promuje wypływ  $K^+$  na zewnątrz komórek.

Dalsza depolaryzacja potencjału błonowego prowadzi do blokady kanałów Kir i w efekcie do zablokowania wypływu  $K^+$  (ang. *outward currents*): w sytuacji, gdy  $E_K$  jest bardziej pozytywny niż RMP, wypływ jonów potasu jest blokowany, przy czym blokowanie jest zależne od  $[K^+]_z$  – wraz ze wzrostem  $[K^+]_z$ , blok jest zwalniany, czyli przepływ potasu wzrasta [220]. Czynniki ułatwiającymi zależny od napięcia blok kanału Kir są poliaminy – spermina (SPM), spermidyna (SPD) i putrescyna (PUT) oraz jony magnezu, blokujące kanał od strony cytoplazmatycznej. Siła działania poszczególnych czynników przedstawia się następująco:  $SPM^{4+} > SPD^{3+} > PUT^{2+} \approx Mg^{2+}$  [220]. Działanie wszystkich kanałów Kir podlega blokowi poliaminowo-magnezowemu, jednak stopień jego zależności od napięcia różni się w zależności od podrodziny Kir – kanały silnie rektyfikujące są wysoce wrażliwe, natomiast słabo rektyfikujące są umiarkowanie wrażliwe na blok magnezowo-poliaminowy [257]. Przewodnictwo potasowe przez Kir o właściwościach silnie rektyfikujących ulega zablokowaniu przy RMP wyższym od  $E_K$  już o ok. 50mV, natomiast kanały słabo rektyfikujące pozostają otwarte i umożliwiają wypływ potasu nawet przy mocno zdepolaryzowanych potencjałach (np. +80mV) [220].

Kanały Kir1.1 i Kir4.1 są również zależne od pH wewnątrzkomórkowego: mówiąc bardzo ogólnie, obniżenie pH cytoplazmy powoduje zamknięcie kanału, a mechanizm bramkowania polega na zmianach konformacyjnych domeny cytoplazmatycznej [257;268].

Kir4.1 posiada w domenie cytoplazmatycznej sekwencję wiążącą ATP Walker type A, co oznacza, że aktywność kanału jest zależna od obecności Mg-ATP [109;281].

#### ***II.4.2. Interakcje Kir4.1 z innymi białkami błonowymi***

Zaangażowanie kanałów Kir4.1 w buforowanie czy syfonowanie  $K^+$  wiąże się ściśle z ich lokalizacją komórkową – najwięcej Kir4.1 znajduje się w zakończeniach wypustek astrocytów i komórek Müllera kontaktujących się bezpośrednio z naczyniami krwionośnymi [108;126;150], co ma ułatwiać transportowanie jonów potasu. Ponadto, komórkowa lokalizacja zależy od tego czy Kir4.1 występuje jako homo- czy heteromer (Kir4.1/Kir5.1): heteromery zlokalizowane są w zakończeniach w pobliżu synaps i umożliwiają wychwyt  $K^+$ , podczas gdy homomery ulegają ekspresji w bliskości naczyń krwionośnych, umożliwiając wyrzut nadmiaru  $K^+$  [108;126;149]. Sposób subkomórkowego rozmieszczenia Kir4.1 odzwierciedla więc czynnościowe właściwości Kir4.1, a także implikuje występowanie funkcjonalnych zależności między Kir4.1 a innymi białkami znajdującymi się w obrębie wspólnej domeny błonowej.

Kir4.1 posiada w domenie C-końcowej region rozpoznający i wiążący białka zawierające domenę PDZ (ang.: *PSD-95/Disc large/ZO-1 domain*) typu I (motyw Ser – X(Asn) – Val) [59;120]. W komórkach glejowych wykazano interakcję Kir4.1 z takimi białkami zawierającymi domenę PDZ, jak: PSD-95 i innym białkiem z tej rodziny, SAP97 [120], oraz z  $\alpha$ -syntrofina, wchodzącą w skład kompleksu DGC (ang. *dystrophin-glycoprotein complex*) [59;108]. Wykazano również, że w mózdzku myszy, Kir4.1 współwystępuje z kolejnym białkiem posiadającym domenę PDZ – CIPP (ang: *channel-interacting PDZ domain protein*) [165]. Co ciekawe, CIPP neuronalny agreguje również z podjednostką NR2 NMDAr oraz z neureksynami i neuroliginami, co czyni je potencjalnym łącznikiem między strukturalnie różnymi, ale funkcjonalnie połączonymi białkami okolicy synaptycznej [13;165].

Kir4.1 kolokalizują w obrębie tych samych domen błonowych w astrocytach (ang. *detergent-resistant microdomains*, DRM) z akwaporynami, zwłaszcza Aqp4 [202]. Na tej podstawie postuluje się, iż kanały potasowe i wodne są funkcjonalnie współzależne, co ma usprawniać utrzymywanie prawidłowego ciśnienia osmotycznego w przestrzeni

pozakomórkowej poprzez połączenie buforowania  $K^+$  i osmotycznie związanej wody [15;59;110;201]. Zagadnienie to zostanie dokładniej omówione w rozdziale Dyskusja.

### III. CELE PRACY

Rola transportu jonów i wody przez błony komórkowe w mechanizmie obrzmienia astrocytów w warunkach zwiększonej ekspozycji na jony amonowe (hiperamonemii) nie jest dokładnie znana. Dane literaturowe wskazują, iż w astrocytach znaczącą rolę w homeostazie jonowej pełnią kanały potasowe, w tym głównie kanał potasowy Kir4.1. Dlatego w pracy postanowiono przebadać ekspresję i niektóre własności kanału Kir4.1 w mózgu warunkach EW w modelu *in vivo* oraz, dla porównania, w astrocytach *in vitro*.

Nowe dane postulują rolę Gln jako mediatora neurotoksyczności amoniaku, postanowiono więc porównać wpływ amoniaku i Gln na ekspresję i funkcję tego kanału. Zmierzono się również z hipotezą, że czynnikiem modulującym ekspresję kanału może być gromadzący się w trakcie EW Glu i że modulacja ta może angażować receptor NMDA na astrocytach.

Sformułowano następujące szczegółowe zadania badawcze:

- czy EW w modelu *in vivo* oraz jony amonowe podawane do hodowli astrocytów *in vitro* wpływają na ekspresję mRNA i białka kanału Kir4.1?
- czy i w jakim stopniu efekty wywołane w astrocytach przez amoniak dają się odtworzyć przez traktowanie Gln czy Glu (model *in vitro*)
- czy hamowanie aktywności receptora NMDA moduluje ekspresję kanału Kir4.1 w modelach *in vivo* i *in vitro*?
- czy ewentualne zaburzenie ekspresji Kir4.1 wpływa na transport jonów potasu
- czy obrzmienie astrocytów, główny patofizjologiczny wykładnik toksyczności jonów amonowych w warunkach EW, ma związek z ekspresją kanału Kir4.1 *in vitro*.

Doświadczenia na hodowanych astrocytach uzupełniono o pomiary na komórkach linii HEK 293T, które cechuje niski bazalny poziom ekspresji Kir4.1. W tych badaniach postawiono pytanie, czy transfekcja Kir4.1 do tych komórek zmienia podatność transportu jonów potasu i objętości komórki na zmiany wywołane przez jony amonowe i/lub stres hipoosmotyczny.

## IV. MATERIAŁY I METODY

### IV.1. Szczurzy model encefalopatii wątrobowej

Doświadczenia na zwierzętach przeprowadzono przestrzegając wytycznych Krajowej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, na podstawie zezwolenia IV Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Do badań wykorzystano samce szczurów rasy Long-Evans, o masie 250-350g oraz rasy Sprague-Dowley, o masie do 200-250g. Ostrą niewydolność wątroby u tych zwierząt indukowano poprzez trzykrotne (w odstępach 24-godzinnych) dootrzewnowe podanie substancji hepatotoksycznej, TAA (Sigma-Aldrich), w dawce 250 mg/kg masy ciała (m.c.).

Zwierzętom podawano również (dootrzewnowo) His (Sigma-Aldrich) w dawce 100mg/kg m.c., 2 godziny przed każdą iniekcją TAA, lub memantynę (Sigma-Aldrich) w dawce 10mg/kg m.c., 30 minut przed każdorazowym podaniem TAA. Zwierzęta kontrolne otrzymywały (trzykrotnie co 24 godziny) dootrzewnowo zbliżoną objętość soli fizjologicznej, His (100mg/kg m.c.) lub memantynę (10 mg/kg m.c.).

24 godziny po ostatnim podaniu TAA i/lub pozostałych substancji zwierzęta uśmiercano za pomocą dwutlenku węgla i dekapitowano. Z mózgu izolowano korę mózgową i zamrażano w suchym lodzie.

Model TAA, zaprojektowany przed prawie 30 laty w Zakładzie Neuropatologii a później doskonalony w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN, pozwala na odtworzenie kolejnych stadiów EW i całej gamy objawów, łącznie z obrzękiem mózgu [115]. Ostatnio, model ten został zarekomendowany do badań nad patomechanizmem EW przez ISHEN [48].

### IV.2. Hodowle pierwotne korowych astrocytów szczurzych

Hodowle prowadzono według metody Hertz'a i wsp. [106]. Jednodniowe oseski szczurze (rasy Sprague-Dowley) znieczulano poprzez okładanie lodem, dekapitowano i izolowano korę mózgową. Tkanek przecierano kolejno przez nylonowe filtry o średnicach 80 i 40 $\mu$ M (Millipore). Następnie komórki wysiewano (w gęstości 2 $\times$ 10.000 komórek/cm<sup>2</sup>) do pożywki DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) wzbogaconej 20% bydlęcą surowicą płodową (ang. *fetal bovine serum*; FBS) (Gibco). Pożywkę wymieniało dwa razy w tygodniu, przy czym w drugim tygodniu stosowano 15%, a w trzecim 10% FBS. Ponadto, w trzecim tygodniu hodowli do pożywki dodawano 0.25mM dibutyrylo-cAMP



(db-cAMP) (Sigma-Aldrich), aby zaindukować dojrzewanie (różnicowanie morfologiczne) astrocytów.

Do pożywki DMEM dodawano (oprócz FBS i db-cAMP) antybiotyki (50U/ml penicyliny i 50 mg/ml streptomycyny) (Sigma-Aldrich) oraz 2.5mM Gln (Sigma-Aldrich). Komórki hodowano w standardowych warunkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) na szalkach lub płytkach plastikowych (Nunc) przez 3 tygodnie.

### IV.3. Warunki inkubacji komórek z odczynnikami

Doświadczenia przeprowadzano na astrocytach nietraktowanych (kontrolnych) oraz traktowanych przez 72 godziny (72h):

- 5 lub 10mM NH<sub>4</sub>Cl (określanym dalej jako „amoniak”)
- 5mM Gln
- 2mM Glu.

Pozostałe czynniki, których wpływ badano, dodawane do medium hodowlanego astrocytów na 72h, łącznie z Glu lub oddzielnie:

- 100μM kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)
- antagoniści receptorów NMDA:
  - 50μM MK-801
  - 50μM AP-5
  - 100μM kwas kynureninowy (KYNA)
- MTEP, antagonist metabotropowych receptorów Glu (mGluR) grupy I
- inhibitory transportu Glu
  - 100μM PDC
  - 100μM TBOA
- inhibitory stresu nitrozo-oksydacyjnego:
  - 10 mM tauryna (Tau)
  - 300μM apocynina (APO)
  - 100μM nitroarginina (L-NNA)
  - 3mM ester etylowy glutationu (GEE)
- inhibitory deacetylaz histonowych:
  - 250nM trychostatyna A (TSA)
  - 1mM walproinian (VP).

Komórki linii HEK 293T, kontrolne (tj. transfekowane pustym wektorem) oznaczane Kir4.1<sup>-</sup> lub z nadekspresją Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>) traktowano 5mM amoniakiem przez 72h.

#### IV.4. Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Ambion) [57].

Fragment tkanki zalewano 1ml TRI Reagent'u i homogenizowano w homogenizatorze szklanym. Komórki, rosnące na szalkach o średnicy 6cm, przepłukiwano 1ml zimnego buforu PBS i zalewano 1ml TRI Reagent'u na 3 minuty. Homogenat tkankowy lub lizat komórkowy przenoszono do probówek typu Eppendorf.

Następnie, do 1ml homogenatu/ lizatu dodawano 0.2ml chloroformu (Sigma-Aldrich) i wytrząsano energicznie. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej (ang. *room temperature*; RT) próbki wirowano (12.000×g, 15 minut, 4°C). Fazę wodną (górną) przenoszono do nowych probówek i, w celu wytrącenia RNA, dodawano 0.5ml izopropanolu (Sigma-Aldrich), wytrząsano intensywnie przez 15 sekund i inkubowano 10 minut w RT. Następnie roztwór wirowano (10.000×g, 10 minut, 4°C). Nadsącz usuwano, a osad płukano 1ml schłodzonego 75% etanolu (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.) i wirowano (10.000×g, 10 minut, 4°C). Odciągano nadsącz, suszono próbki (~20 minut, 37°C) i zawieszano w 15 (komórki) lub 20µl (tkanka) H<sub>2</sub>O. W celu inaktywowania RNaz wodę uprzednio poddawano działaniu 0.1% dietylopirowęgla (DEPC) i autoklawowano (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>).

Stężenie i czystość preparatów RNA oznaczano w spektrofotometrze NanoDrop ND1000, mierząc gęstość optyczną (ang. *optical density*, OD) przy długości fali 260 i 280nm, stosując zasadę, że OD<sub>260</sub> = 1 odpowiada 40µg RNA, a stosunek OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> równy 2 oznacza czysty RNA. Do reakcji odwrotnej transkrypcji stosowano preparaty o stosunku OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> wyższym niż 1.7.

#### IV.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Przed reakcją odwrotnej transkrypcji, próbki RNA poddawano działaniu DNazy I (Ambion): 10U DNazy I/ml próbki, 30 minut, 37°C. DNazę I inaktywowano termicznie, w obecności 5mM EDTA (Ambion): 10 minut, 75°C.

Do odwrotnej transkrypcji używano 1µg RNA, uzupełniając objętość próbek H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> do 10µl. Reakcję syntezy cDNA przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reakcję odwrotnej

transkrypcji (skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli IV.5.1) przeprowadzono w termocyklerze (Biometra), w następujących warunkach: 10 minut w 25°C, 120 minut w 37°C, 5 sekund w 85°C.

		składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość [ $\mu$ l]
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	<i>bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji</i>	10× RT Buffer	2
	<i>mieszanina deoksynukleotydów</i>	25× dNTP Mix (100mM)	0.8
	<i>primery</i>	10× RT Random Primers	2
	<i>odwrotna transkryptaza</i>	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
		H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	4.2
		1 $\mu$ g RNA	10
całkowita objętość mieszaniny			20

Tab.IV.5.1. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

#### IV.6. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Zmiany poziomu mRNA dla genów: Kir4.1 (Kcnj10), Kir2.1 (Kcnj2), NKCC1 (Slc12a2), GLT-1 (Slc1a2), Aqp4 i  $\beta$ -aktyny (Actb; używana jako gen referencyjny) określono stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* PCR; RT-PCR). Do analizy stosowano sondy (znakowane fluorescencyjnie startery) TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) (Tabela IV.6.1.) oraz TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Do reakcji real-time PCR używano 1 $\mu$ l matrycy cDNA (w trzech powtórzeniach), a całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej (skład: Tabela IV.6.2.) wynosiła 10 $\mu$ l. Reakcja RT-PCR dla wszystkich badanych genów przebiegała w wystandardyzowanych warunkach (10 min. aktywacji polimerazy w 95°C, 40 cykli: 15 sekund denaturacji w 95°C, 1 minuta przyłączania w 60°C) w aparacie ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Względną zmianę poziomu mRNA liczono według metody  $\Delta\Delta C_t$  [177].

symbol genu	nazwa genu	numer referencyjny sondy TaqMan (ang. assay ID)	numer sekwencji w bazie GenBank	długość produktu
Kcnj10	Kir4.1	Rn00581058_m1	<a href="#">NM_031602.1</a>	78
Kcnj2	Kir2.1	Rn00568808_s1	<a href="#">NM_017296.1</a>	65
Slc12a2	NKCC1	Rn00582505_m1	<a href="#">NM_031798.1</a>	67
Slc1a2	GLT-1	Rn00568080_m1	<a href="#">NM_017215.2</a>	77
aquaporin 4	Aqp4	Rn005663196_m1	<a href="#">NM_001142366.1</a>	55
Actb	β-aktyna	Rn00667869_m1	<a href="#">NM_031144.2</a>	91

Tab. IV.6.1. Sondy TaqMan (Applied Biosystems) stosowane w reakcji RT-PCR.

składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość [μl]
cDNA	1
TaqMan Gene Expression Assay	0.5
TaqMan Universal PCR Master Mix	5
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	3.5
całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej	10

Tab IV.6.2. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji RT-PCR.

#### IV.7. Oznaczanie poziomu białka Kir4.1 w astrocytach metodą Western-blot

Izolowanie białka z tkanki oraz z komórek przeprowadzono z użyciem buforu RIPA (ang. *radio-immunoprecipitation assay*), o składzie: 0.01M fosforan sodu (pH7.2), 0.15M NaCl, 0.1%SDS, 1% deoksychoalan sodu, 1% NP-40 (Igepal; Fluka), 2mM EDTA. Na świeżo do buforu dodawano 50mM fluorek sodu (Sigma-Aldrich), inhibitory proteaz (1:200) i fosfataz (1:100) (Sigma-Aldrich).

Tkanekę homogenizowano, zalewano 0.5ml buforu RIPA, homogenizowano w homogenizatorze szklanym i przenoszono do probówek typu Eppendorf.

Komórki, rosnące na szalkach o średnicy 10cm, przepłukiwano PBS, zalewano 1ml PBS i zeszkrobywano delikatnie skrobaczką. Następnie komórki przenoszono do probówki typu Eppendorf i wirowano na niskich obrotach (2500×g, 5 minut, 4°C). Znad osadu komórek usuwano nadsącz i dodawano 120μl buforu lizującego RIPA.

Homogenat tkankowy i lizat komórkowy poddawano sonifikacji i wirowano (10.000×g, 10 minut). Supernatant, zawierający białka cytoplazmatyczne i uwolnione z błon komórkowych, przenoszono do nowych probówek i oznaczano zawartość białka metodą Lowry'ego, według protokołu załączonego przez producenta zestawu odczynników (Pierce).

Próbki białka (30µg) uzupełniano buforem RIPA do równej objętości, dodawano odczynnik denaturujący (Invitrogen) wraz z buforem obciążającym i barwiącym (Loading Buffer, Invitrogen) i gotowano (99°C) przez 5 minut.

Równe ilości białka (30µg) nakładano na denaturujący żel poliakrylamidowy (10%) i dokonywano rozdziału elektroforetycznego białek (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) w buforze do elektroforezy (TGS 10x, BioRad), w aparacie firmy BioRad (napięcie 150mV, ok. 1 godziny). W celu identyfikacji wielkości prążków uzyskanych po rozdziale, na żel razem z próbkami nakładano marker Precision Plus Protein Kaleidoscope 10-250 kDa (Bio-Rad). Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad) dokonywano w buforze do transferu, w aparacie firmy Bio-Rad (natężenie 350mA, 1.5h). Wydajność transferu sprawdzano stosując barwienie roztworem odczynnika Ponceau S (Sigma-Aldrich).

Membranę z białkami po transferze inkubowano przez noc (ang. *over night*; o/n) w 4°C w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze TBS-T (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*), w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-Kir4.1 (1:500; Alomone-Laboratories) w 5% mleku odtłuszczonym w TBST-T, o/n w 4°C.

Membranę płukano trzykrotnie TBS-T i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (ang. *horse raddish peroxidase*, HRP) (Sigma-Aldrich, 1:8000, w 5% mleku w TBS-T). Następnie przepłukiwano trzykrotnie i inkubowano 3 minuty z substratem dla HRP, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Detekcji sygnału chemiluminescencyjnego dokonywano za pomocą systemu G-Box (SynGene).

Następnie membranę trzykrotnie przepłukiwano TBS-T, a następnie usuwano białka związane z membraną (tzw. stripping) za pomocą roztworu 0.1M glicyny o pH 2.9. Następnie membranę ponownie blokowano (mleko 5%, o/n). Po przepłukaniu TBS-T, membranę inkubowano przez godzinę z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-GAPDH (1:10000, Sigma-Aldrich), stosowanym jako kontrola wewnętrzna.

Analizę densytometryczną prążków wykonywano za pomocą oprogramowania GeneTools (SynGene). Wyniki przedstawiano jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego (GAPDH) i porównywano do kontroli (wyniki wyrażono jako procent kontroli). Skład żeli i buforów używanych do WB przedstawia Tabela IV.7.1. (wszystkie odczynniki potrzebne do ich sporządzenia zakupiono w firmie Sigma-Aldrich).

żel rozdzielający	10% akrylamid/bisakrylamid (stosunek wagowy 73:1), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% nadsiarczan amonu
żel zagęszczający	4% akrylamid/bisakrylamid, (stosunek wagowy 73:1), 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,05% nadsiarczan amonu
bufor do elektroforezy (TGS)	25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3
bufor do transferu	25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol, 0,01% SDS
bufor TBS-T	50 mM Tris pH 7,5; 0,9% NaCl, 0,5% Tween-20

Tab.IV.7.1. Skład buforów używanych do WB.

#### IV.8. Wychwyt D-[<sup>3</sup>H] asparagianu

Wychwyt Asp (niemetabolizowanego analogu Glu) badano inkubując astrocyty (hodowane na płytkach 24-dołkowych; Nunc) w buforze Krebsa o składzie (w mM): 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 10 glukoza i wysycanym 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.4, zawierającym D-Asp (100μM) oraz D-[<sup>3</sup>H] Asp (0.1 μCi/ml) (Polatom) przez 10 minut w 37°C. Następnie bufor usuwano, a komórki przepłukiwano 3-krotnie zimnym buforem Krebsa, aby zatrzymać wychwyt. Następnie komórki zalewano 500μl 1M NaOH i przez 30 minut poddawano lizie w 37°C. 400μl lizatu przenoszono do fiolek scyntylicyjnych i zalewano 2 ml płynu scyntylicyjnego InstaGell (Packard). Radioaktywność próbek (ang. *counts per minute*; cpm) mierzono w liczniku scyntylicyjnym (Wallac 1409) przez 5 minut. Pozostały lizat komórkowy służył do oznaczenia ilości białka metodą Bradford (1976). Wyniki wyrażono jako stosunek cpm do ilości białka i przedstawiono jako procent kontroli.

#### IV.9. Wychwyt <sup>86</sup>rubidu (<sup>86</sup>Rb)

Wychwyt <sup>86</sup>Rb badano według opisu Fishera i Marguliesa [80]. Astrocyty (hodowane na płytkach 24-dołkowych) inkubowano przez 10 minut w buforze o składzie (w mM): 122 (wariant kontrolny) lub 60 (wariant hipoosmotyczny) NaCl, 5 RbCl (Sigma-Aldrich), 1 MgSO<sub>4</sub>, 0.15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 glukoza, 20 HEPES, <sup>86</sup>RbCl (1μCi/ml) (Polatom). Następnie bufor odciągano, a w celu zatrzymania reakcji komórki trzykrotnie przepłukiwano buforem zawierającym (w mM): 140 N-metylo-glukaminę, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 3 BaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Bufor ten blokuje aktywność metaboliczną i kanały Kir. Lizę komórek, pomiar radioaktywności oraz oznaczenie białka wykonywano tak, jak opisano powyżej dla wychwyty D-[<sup>3</sup>H] Asp.

#### IV.10. Wyrzut <sup>86</sup>Rb

Doświadczenia wyrzutowe przeprowadzono według Qesada i wsp. [235]. Komórki inkubowano w DMEM zawierającym <sup>86</sup>RbCl (2.5 µCi/ml) (Polatom) przez 1 godzinę w 37°C. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem (nie zawierającym izotopu): kontrolnym (NaCl 122mM) lub hipotonicznym (60mM). Bufor (1ml) zmieniano co 2 minuty przez 24 minuty – zebrano 6 frakcji (3 pierwsze odrzucono – w tym czasie ustalał się bazalny wypływ <sup>86</sup>Rb). Po zebraniu ostatniej frakcji, komórki zalewano 1M NaOH i poddawano lizie przez 30 minut w 37°C. Pomiaru radioaktywności w próbkach (frakcjach i lizacie komórkowym) dokonano tak, jak opisano powyżej. Wyrzut <sup>86</sup>Rb wyrażono jako wypływ frakcyjny, tj. procent całkowitej radioaktywności (frakcje plus lizat komórkowy).

#### IV.11. Obniżanie ekspresji Kir4.1 w astrocytach za pomocą siRNA

Obniżanie ekspresji Kir4.1 w astrocytach za pomocą siRNA wykonywano według Kucheryavykh i wsp. [164].

21-nukleotydowe duplekisy RNA specyficzne dla Kir4.1 (sekwencja sensowna: GAGAUAGCACCGUACGUUAdTdT) zakupiono w Qiagen. Komórki transfekowano wg protokołu producenta (Qiagen): „*fast-forward protocol for transfection of adherent cells with siRNA*” [164].

Do doświadczeń używano trzytygodniowych, dojrzałych hodowli astrocytów. Komórki trypsynizowano i wysiewano w gęstości 50.000-60.000 do 0.5 ml medium hodowlanego DMEM (10% FBS) na płytce 24-dołkowej w dniu transfekcji. 5nM siRNA zawieszano w 100µl OptiMEM (bez FBS, antybiotyków, etc.) (Sigma-Aldrich), wraz z 3µl odczynnika do transfekcji HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut aby pozwolić na uformowanie się kompleksów siRNA-HiPerfect. Następnie, po kropli, dodawano do świeżo wysianych komórek i delikatnie mieszano. Komórki hodowano w standardowych warunkach przez 72h. Komórkami kontrolnym wobec transfekowanych kompleksami siRNA-HiPerfect były komórki hodowane w obecności samego odczynnika do transfekcji HiPerfect (tzw. kontrola „mock”).

Po tym czasie, badano poziom mRNA dla Kir4.1 w komórkach metodą real-time PCR. Ponieważ ilość komórek w dołku płytki 24-dołkowej była mała, do izolacji RNA i do reakcji real-time PCR w tym przypadku używano zestawu odczynników TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct Kit (Ambion). Komórki przepłukiwano PBS, trypsynizowano i wirowano w 0.5ml



PBS na niskich obrotach (2500×g, 5 minut). Znad osadu komórek usuwano nasącz i dodawano 25µl buforu lizującego. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji według protokołu TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct Kit (Tabela IV.11.1.).

	składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość [µl]
TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct Kit	2×RT buffer	12.5
	20×EnzymeMix	1.25
	lizat komórkowy	11.25
	całkowita objętość	25

Tab. IV.11.1. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji przeprowadzanej z użyciem zestawu odczynników TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct Kit (Ambion).

Do reakcji RT-PCR stosowano 2µl matrycy cDNA, a skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela IV.11.2.

składnik	objętość [µl]
TaqMan Gene Expression	5
TaqMan Gene Expression Assay (sonda, primer)	0.5
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	2.5
cDNA	2
całkowita objętość	10

Tab. IV.11.2. Skład mieszaniny reakcyjnej do real-time PCR przeprowadzanej z użyciem zestawu odczynników TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct Kit (Ambion).

## IV.12. Analiza objętości komórkowej astrocytów

Analizę objętości astrocytów przeprowadzano według Konopackiej i wsp. [153]. Astrocyty (10.000 komórek) z 3-tygodniowej hodowli pierwotnej, po trypsynizacji przesiewano na szkiełka o średnicy 13mm (Assistent) pokryte polilizyną (Sigma) i umieszczone w płytkach 24-dołkowych.

Komórki hodowano bez dodatków, bądź w obecności amoniaku lub Gln przez 72h. W przypadku doświadczeń z siRNA anty-Kir4.1, komórki transfekowano według opisanego wyżej protokołu „fast-forward protocol for transfection of adherent cells with siRNA” (Qiagen), również wysiewając komórki na szkiełka polilizynowane.



Po 48h hodowli, w celu wyznakowania błon komórkowych, do pożywki dodawano lipofilną sondę fluorescencyjną DiI (Molecular Probes), w stężeniu końcowym 1.25µg/ml (roztwór podstawowy: 2.5mg/ml w etanolu). Po 24h pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano trzykrotnie zimnym PBS i utrwalano przez 10 min w 2% roztworze paraformaldehydu w PBS. Następnie płukano 3-krotnie PBS i montowano preparaty na szkiełkach podstawowych przy użyciu Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories), zawierającego sondę fluorescencyjną DAPI, znakującą jądra komórkowe.

Preparaty skanowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510 stosując powiększenie 40x. Fluorescencję DiI wzbudzano laserem o długości fali 543nm i odczytywano przy długości 590nm, natomiast długości fal wzbudzenia i emisji dla DAPI wynosiły odpowiednio 405nm i 533nm. Skanowanie wykonywano na wielu płaszczyznach fokalnych, oddalonych od siebie o 0,23µm i obejmujących całą grubość preparatu. Uzyskane obrazy poddano analizie komputerowej przy użyciu programu ImageJ – „3D objects counter function” (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Dla każdego układu doświadczalnego wykonano 3 niezależne doświadczenia.

#### **IV.13. Oznaczanie zawartości glutaminy i glutaminianu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego metodą HPLC**

Po 72h hodowli w obecności amoniaku, Gln lub Glu, komórki przepłukiwano trzykrotnie zimnym PBS (Gibco), inkubowano z 0.5 ml kwasu sulfosalicylowego (1% roztwór w PBS) przez 5 minut. Komórki zeskrobywano skrobaczką i wirowano (12.000×g, 10 minut, 4°C). Zbierano supernatant i doprowadzano jego pH do ok.7 przy pomocy 10M KOH (do każdej próbki dodawano jednakową objętość: KOH lub PBS). Osad komórkowy natomiast rozpuszczano w 0.5ml 1M NaOH i oznaczano w nich białko metodą Bradford [36].

W celu zmierzenia zewnątrzkomórkowej zawartości Gln i Glu w komórkach (hodowanych 72h w obecności amoniaku lub Gln), zbierano 1ml pożywki znad komórek. W celu odbiałczania, próbki były zakwaszane 30% kwasem nadchlorowym (PCA) w stosunku 10:1 i wirowane (12.000×g, 12 minut, 4°C). pH supernatantu pobranego znad osadu było następnie zobojętniane przy użyciu 10M KOH. Po zobojętnieniu próbki ponownie wirowano (12.000×g, 12 minut, 4°C), po czym pobierano supernatant do oznaczeń.

Stężenie Gln i Glu mierzono za pomocą metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *high pressure liquid chromatography*, HPLC) z odwróconym układem faz, z detekcją fluorymetryczną [143].

Pomiar zawartości aminokwasów (Gln i Glu) poprzedzono wyznaczeniem krzywej standardowej, w zakresie stężeń 4 – 62 pmol/próbkę, na podstawie której wyznaczano stężenie Gln i Glu w poszczególnych próbkach. Do rozdzielania używano systemu złożonego z pompy Ultimata 3000 (Dionex), autosamplera Gina 50 (Dionex), kolumny ze złożem Hypersil Gold (Thermo), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (Dionex). Aminokwasy w próbkach, przed podaniem na kolumnę, upochadniano (do produktu fluorescencyjnego) w reakcji z dialdehydem orto-ftalowym (OPA), w obecności  $\beta$ -merkaptoetanolu. Podczas rozdzielania fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i 50mM buforu fosforanowego ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 6.2. Elucję, przy prędkości 1.2 ml/min., prowadzono izokratycznie (10% metanol / 90% bufor fosforanowy) do 6 min. Fluorymetrycznych pomiarów pochodnych OPA dokonywano przy długościach fal detektora: 370nm (wzbudzenie) oraz 450nm (emisja). Pik dla Glu przypadał na ok. 3, a dla Gln na ok. 5 min. rozdzielania. Aby przepłukać kolumnę przed kolejnym rozdzielaniem, zwiększano gradientowo udział metanolu w fazie ruchomej do 70%, po czym powracano do wyjściowego składu fazy ruchomej.

#### **IV.14. Oznaczanie proliferacji komórek za pomocą testu z użyciem BrdU**

Proliferacja astrocytów była określana za pomocą metody oceniającej ilość wbudowanego do DNA dzielących się komórek analogu pirymidynowego, 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU). Ilość BrdU wbudowanej do DNA oznaczano kolorymetrycznie za pomocą testu ELISA – zestawu Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche).

Do doświadczeń używano trzytygodniowych hodowli astrocytów. Komórki trypsynizowano i wysiewano (w gęstości 9.000/dołek) na płytki 96-dołkowe (Nunc). Transfekcję siRNA anty Kir4.1 przeprowadzano wg protokołu dla płytek 96-dołkowych. Różnica w stosunku do protokołu transfekcji opisanego wcześniej polegała na tym, że dla równomiernego rozprowadzenia kompleksów siRNA-HiPerfect w małej objętości DMEM (200 $\mu$ l), najpierw nakraplano uformowane kompleksy, a potem dodawano zawiesinę komórkową. W momencie wysiewu komórek poddawanych transfekcji siRNA (oraz kontroli „mock”), wysiewano również komórki, którym do medium dodawano także amoniak i Gln.

Po 48h hodowli w warunkach standardowych, do pożywki dodawano BrdU na kolejne 24h. Po wyznakowaniu, komórki na płytce utrwalano (200 $\mu$ l odczynnika FixDenat z zestawu,

30 minut, RT), następnie inkubowano (90 minut, RT) z przeciwciałem anti-BrdU, skoniugowanym z HRP. Po 3-krotnym przepłukaniu buforem (Washing solution/PBS), inkubowano (30 minut, RT) z substratem dla HRP (100 $\mu$ l). Następnie reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 25 $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbancję mierzono w czytniku spektrofotometrycznym (MR680, Bio-Rad) przy długości fal: 450nm i 690nm (pomiar referencyjny).

#### **IV.15. Badanie żywotności astrocytów**

Do badania żywotności astrocytów zastosowano metodę MTT. Zasada tej metody opiera się na zdolności metabolizowania przez mitochondrialne dehydrogenazy bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) do formazanu. Reakcja zachodzi tylko w żywych komórkach, a stężenie formazanu jest proporcjonalne do przeżywalności komórek w hodowli.

Komórki hodowano na płytkach 24-dołkowych w obecności związków, których wpływ badano, przez 72h. Po upływie tego czasu, aby wykonać test, komórki przepłukiwano PBS (37°C) i dodawano roztwór MTT (Sigma-Aldrich) w PBS (0.5mg/ml) na 30 minut. Następnie roztwór odciągano i dodawano 300 $\mu$ l DMSO (Sigma-Aldrich), rozpuszczającego formazan. Po krótkiej inkubacji na kołysce, przenoszono po 200 $\mu$ l próbek na płytkę 96-dołkową i za pomocą spektrofotometru płytkowego (MR680, Bio-Rad), mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli.

#### IV.16. Hodowla komórek linii HEK 2937T

Komórki linii HEK 293T (ang. *human epithelial kidney cells*) (ATCC CRL-11268) hodowano w pożywce DMEM wzbogacanej FBS (10%), Gln (2mM) i antybiotykami (1% penicylina-streptomycyna) w standardowych warunkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

#### IV. 17. Transfekowanie komórek linii HEK 293T

Plazmid pcDNA3.1(+) oraz plazmid pcDNA3.1(+) zawierający cDNA Kir4.1 był prezentem Dr Yoshihisa Kurachi z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu w Osace (Japonia).

Komórki HEK 293T transfekowano metodą chemiczną, stosując odczynnik do transfekcji Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 CD według protokołu producenta (Invitrogen). Selekcję i hodowlę komórek transfekowanych prowadzono pod kontrolą G418 (1mg/ml) w medium hodowlanym. Komórki kontrolne, transfekowane pustym plazmidem określane będą Kir4.1<sup>-</sup>, natomiast transfekowane plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1<sup>+</sup>.

#### IV.18. Oznaczanie ilości białka Kir4.1 w komórkach HEK 293T metodą Western blot

Komórki zbierano i homogenizowano stosując bufor lizujący Triton X-100, zawierający dodatkowo mieszaninę inhibitorów (Roche). Komórki homogenizowano poprzez sonifikację (na lodzie). Stężenie białka w homogenatach oznaczono stosując metodę BCA, wg protokołu producenta (Pierce).

Na żel poliakrylamidowy (10%) nakładano 20µg białka. Po elektroforezie białka transferowano na membranę nitrocelulozową. Niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał blokowano inkubując membranę przez noc w roztworze 5% BSA. Membrany inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-Kir4.1 (1:400, Alomone Labs) przez 2h. Następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, koniugowanym z HRP. Detekcję chemiluminescencji przeprowadzono z użyciem substratu SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Jako gen referencyjny zastosowano β-aktynę.

#### IV.19. Pomiar objętości komórek HEK 293T metodą radioaktywną

Pomiaru objętości komórkowej dokonano wykorzystując [<sup>3</sup>H]-O-metyloglukozę (OMG) Metoda, opisana przez Kletzięna i wsp. [147], zakłada, że transportery glukozy

transportują ją do wnętrza komórki aż do wyrównania gradientu stężeń po obu stronach błony. Wobec tego, ilość glukozy jest wprost proporcjonalna do objętości komórki.

Komórki inkubowano z 1mM OMG i 1 $\mu$ Ci [ $^3$ H]-OMG przez 35 minut. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie zimnym buforem zawierającym (w mM): 290 sacharozę, 1-Tris nitrate pH 7.4, 0.5 azotan wapnia, 0.1 floretynę (Sigma-Aldrich). Bufor ten hamuje aktywność transporterów glukozy. Następnie komórki poddawano lizie w 0.5 ml 1M NaOH. W 400 $\mu$ l mierzono radioaktywność – tak, jak to opisano dla wychwytu radioaktywnego Asp. W 100 $\mu$ l lizatu oznaczono zawartość białka metodą BCA (Pierce).

#### **IV.20. Wychwyty i wyrzuty $^{86}$ Rb do/z komórek linii HEK 293T**

Doświadczenia, w których badano wychwyty i wyrzuty  $^{86}$ Rb do i z komórek linii HEK 293T przeprowadzono tak, jak to opisano dla astrocytów (podrozdziały IV.9 i IV.10).

#### **IV. 21. Oznaczanie białka**

Sposób przygotowania próbek do oznaczania białka opisany jest w poszczególnych podrozdziałach. W próbkach traktowanych NaOH białko oznaczano metodą Bradford, natomiast w próbkach do WB (w buforach lizujących z Tritonem X-100 lub RIPA), metodą Lowrego lub BCA.

##### ***IV.21.1. Oznaczanie białka metodą Bradford***

30 $\mu$ l lizatu komórkowego (lub standardu do krzywej wzorcowej) nanoszono (w trzech powtórzeniach) do dołka na płytce 96-dołkowej i dodawano 270 $\mu$ l odczynnika Bradford (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,75% etanol, 8,5% kwas fosforowy). Absorbancję odczytywano przy długości fali 595nm za pomocą spektrofotometru płytkowego (MR680, Bio-Rad). Ilość białka wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów albuminy (BSA; Sigma-Aldrich) o stężeniu 1 – 10  $\mu$ g/próbę w 0,5 M NaOH [36].

#### **IV.21.2. Oznaczanie białka metodą Lowry'ego**

Stężenie białka oznaczano przy użyciu Modified Lowry Protein Assay Reagent Kit (Pierce).

40µl badanej próby lub standardu наносono do dołka na płytce 96-dołkowej, w 3 powtórzeniach. Następnie dodawano 200µl odczynnika Lowry'ego (Modified Lowry Reagent, Pierce) i energicznie mieszano. Płytkę przykrywano i inkubowano przez 10 minut w RT. Po upływie tego czasu, do dołków dodawano 20µl wodnego roztworu odczynnika Folin-Ciocalteu (w proporcji 1:1) i ponownie mieszano. Po 30 minutach inkubacji w RT mierzono absorbancję przy długości fali 750 nm, w spektrofotometrze (MR680, Bio-Rad) Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej, wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów BSA o stężeniach 0,05 – 2 mg/ml) [181].

#### **IV.21.3. Oznaczanie białka metodą BCA**

Metoda biuretowa opiera się na zdolności białek do redukcji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$ , oraz zdolności  $\text{Cu}^+$  do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem bis-cynchoninowym (BCA). Do badan używano zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce). 25µl badanej próby lub standardu наносono do dołka na płytce 96-dołkowej, w 3 powtórzeniach. Następnie dodawano 200µl odczynnika „WR” (sporządzonego poprzez zmieszanie odczynników „A” i „B” w stosunku 50:1). Po 30 minutach inkubacji w RT mierzono absorbancję przy długości fali 562nm, w spektrofotometrze (MR680, Bio-Rad) Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej, wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów BSA o stężeniach 0,05 – 2 mg/ml).

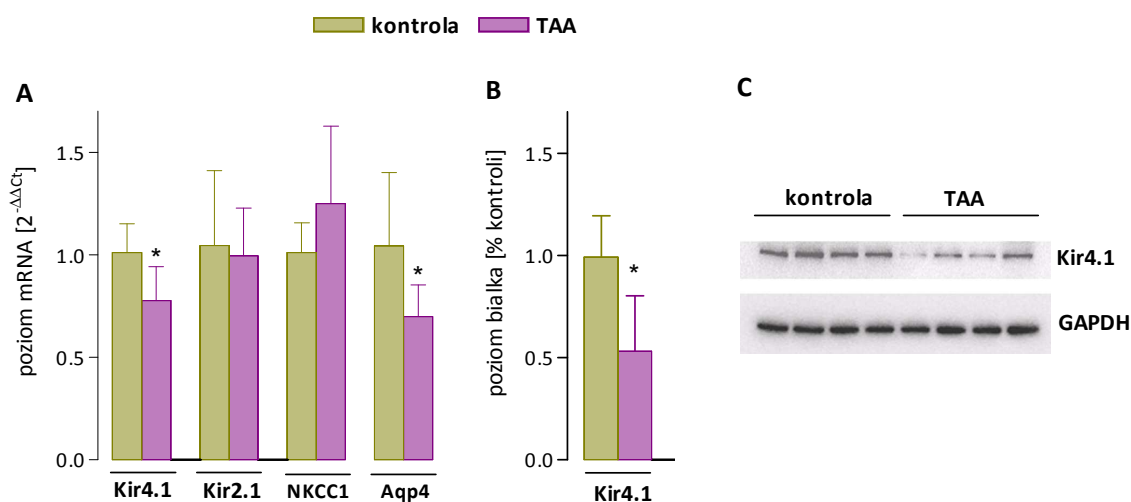
#### **IV.22. Analiza statystyczna wyników**

Wszystkie wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Liczbę doświadczeń podano w legendach do rycin. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 3.0, stosując testy: t-Studenta i Manna-Whitneya U oraz ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego. Poziom ufności  $p < 0.05$  uznano za znamienne statystycznie.

## V. WYNIKI

### V.1. Wpływ EW na ekspresję kanałów potasowych (Kir4.1, Kir2.1), kanału wodnego (akwaporyny 4) i transportera NKCC1 w korze mózgowej szczura

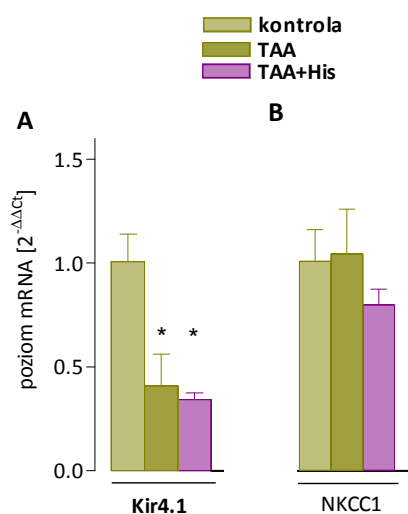
W korze mózgowej szczurów, u których wywołano EW poprzez podanie TAA, zaobserwowano obniżenie ekspresji kanału potasowego Kir4.1 – poziom mRNA uległ obniżeniu o ok. 23% (Ryc.V.1A), a białka o ok. 46% (Ryc.V.1B,C). Obniżeniu o ok. 34% uległ poziom mRNA kanału wodnego – Aqp4 (Ryc.V.1A). Nie uległ natomiast zmianie poziom mRNA kanału potasowego Kir2.1, ani transportera sodowo-potasowo-chlorkowego NKCC1 (Ryc.V.1A).



**Ryc.V.1.** Wpływ EW na poziom mRNA dla Kir4.1, Kir2.1, Aqp4 i NKCC1 (A) oraz na poziom białka Kir4.1 (B,C) w korze mózgowej szczurów.(C) typowy obraz immunodetekcji białek Kir4.1 i GAPDH  
Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z analizy 4 – 7 kontrolnych i 6 – 10 traktowanych TAA szczurów rasy Long-Evans.\*  $p < 0.05$  w teście U Mann'a-Whitney'a

## V.2. Wpływ histydyny na poziom mRNA dla Kir4.1 i NKCC1 w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną podaniem TAA

Szczurom, u których wywoływano EW, wraz z TAA podawano His, która w zastosowanej dawce działa jako inhibitor transportu Gln do mitochondriów [245]. His nie miała wpływu na wywołane podaniem TAA obniżenie poziomu mRNA dla (Ryc.V.2A; por. Ryc.V.1A, 3A), ani na niezmienny w tych warunkach poziom mRNA dla NKCC1 (Ryc.V.2B; por. Ryc.V.1A).



Ryc.V.2. Wpływ His na poziom mRNA Kir4.1 (A) i NKCC1 (B) w korze mózgowej szczurów Sprague-Dowley z EW indukowaną TAA.

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z analizy 3 szczurów rasy Sprague-Dowley dla każdego wariantu.

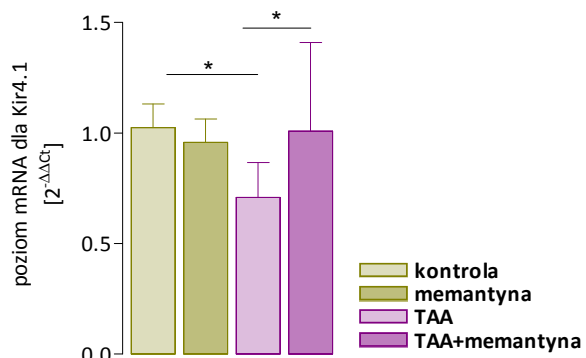
\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

## V.3. Wpływ memantyny na poziom mRNA dla Kir4.1 w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną podaniem TAA

W celu zbadania udziału NMDAr w mechanizmie prowadzącym do spadku ekspresji kanału potasowego Kir4.1 w mózgu szczurów z EW (Ryc. V.1 i V.2A), szczurom, jednocześnie z TAA, podawano memantynę – antagonistę NMDAr.

Memantyna zniwelowała efekt TAA, przywracając do wartości wyjściowych poziom mRNA dla Kir4.1 w korze mózgowej zwierząt z EW (Ryc.V.3.). Podanie samej memantyny nie wywołało zmian w poziomie mRNA Kir4.1 w korze mózgowej szczurów (Ryc.V.3.).



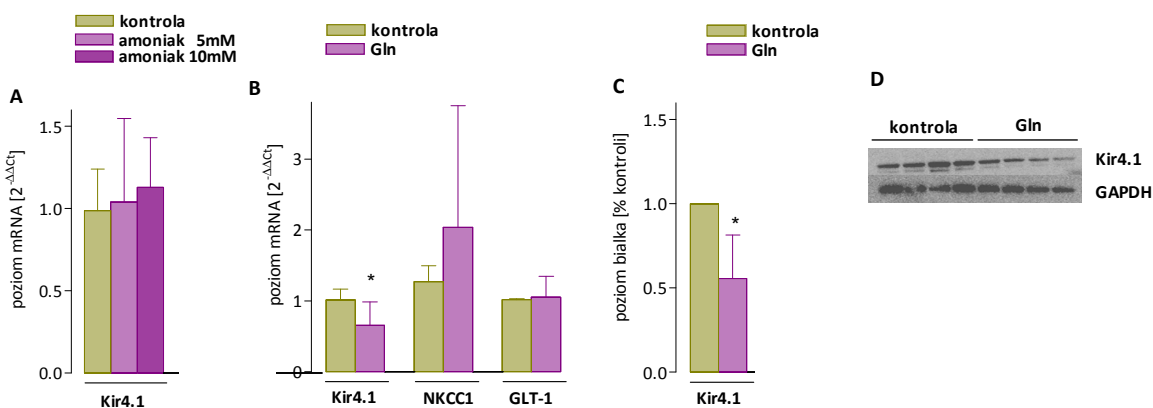


Ryc.V.3. Wpływ memantyny na poziom mRNA Kir4.1 w korze mózgu szczurów z EW indukowaną TAA. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z analizy 7-13 szczurów rasy Sprague-Dowley.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

#### V.4. Wpływ amoniaku i glutaminy na ekspresję mRNA i białka kanału potasowego Kir4.1, oraz na poziom mRNA kodujących transporter NKCC1 oraz transporter glutaminianu GLT-1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Pierwotne hodowle korowych astrocytów szczurzych poddawano działaniu amoniaku (5 i 10mM) i Gln (5mM) przez 72h. Amoniak nie spowodował zmian w poziomie mRNA dla Kir4.1 w astrocytach (Ryc.V.4A.). W przeciwieństwie do amoniaku, Gln obniżała ekspresję Kir4.1, zarówno na poziomie mRNA (Ryc.V.4B), jak i białka (Ryc.V.4C,D) – odpowiednio o ok. 46 i 44%. Gln nie wpłynęła natomiast na poziom mRNA dla NKCC1 (Ryc.V.4B) i GLT-1 (Ryc.V.4B).



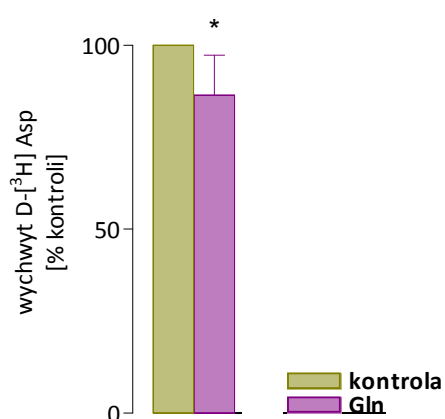
Ryc.V.4. Wpływ amoniaku lub glutaminy na poziom mRNA Kir4.1 i NKCC1 (A,B) oraz na poziom białka Kir4.1 (C) w szczurzych astrocytach *in vitro*. (D) typowy obraz immunodetekcji białek Kir4.1 i GAPDH

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3 – 6 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w teście U Mann'a-Whitney'a

### V.5. Wpływ glutaminy na wychwyt D-[<sup>3</sup>H]-asparagianu w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Gln, obecna w medium hodowlanym w stężeniu 5mM przez 72h, spowodowała obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu D-[<sup>3</sup>H]-Asp – nie podlegającego metabolizowaniu analogu Glu, o ok. 13% (Ryc.V.5), w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach standardowych, czyli w obecności 2.5mM Gln.



Ryc. V.5. Wpływ Gln na wychwyt D-[<sup>3</sup>H]-asparagianu w astrocytach *in vitro*. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 8 niezależnych doświadczeń.  
\*  $p < 0.05$  w sparowanym teście t-Studenta

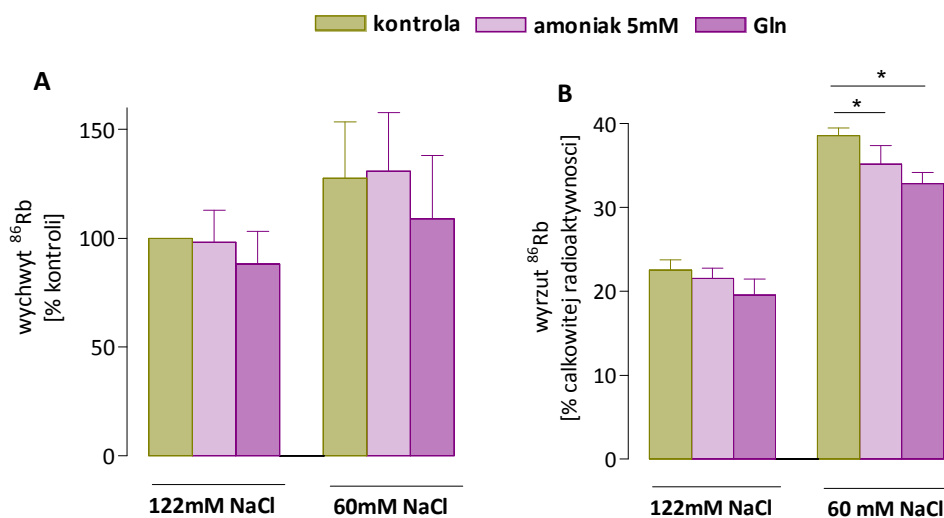
### V.6. Wpływ amoniaku, glutaminy i medium hipoosmotycznego na wychwyt i wyrzut <sup>86</sup>Rb w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Badano wpływ amoniaku (5mM/72h) i Gln (5mM/72h) na zdolność astrocytów do wychwytu (Ryc.V.6A) i wyrzutu (Ryc.V.6B) <sup>86</sup>Rb. Ponieważ uważa się, że wyrzut potasu przez kanały Kir4.1 może być związany z regulacją objętości komórkowej w warunkach stresu osmotycznego [71;229], a zaburzenia funkcjonowania kanałów i transporterów zaangażowanych w regulację objętości komórkowej ujawniać się mogą dopiero po ich poddaniu stresowi hipoosmotycznemu [137;309], wychwyt i wyrzut <sup>86</sup>Rb przez astrocyty badany był zarówno w medium kontrolnym (122mM NaCl), jak i w medium hipoosmotycznym (60mM NaCl).

Nie zaobserwowano wpływu amoniaku i Gln na wychwyt <sup>86</sup>Rb ani w warunkach kontrolnych, ani hipoosmotycznych (Ryc.V.6A).

W warunkach kontrolnych ani amoniak, ani Gln nie wpłynęły na wyrzut <sup>86</sup>Rb z astrocytów (Ryc.V.6B). W warunkach hipoosmotycznych ujawnił się natomiast efekt uwrażliwienia

komórek – wzrost wyrzutu  $^{86}\text{Rb}$  w komórkach poddanych działaniu Gln i amoniaku był niższy, niż w przypadku komórek nie poddanych ich działaniu (Ryc.V.6B).



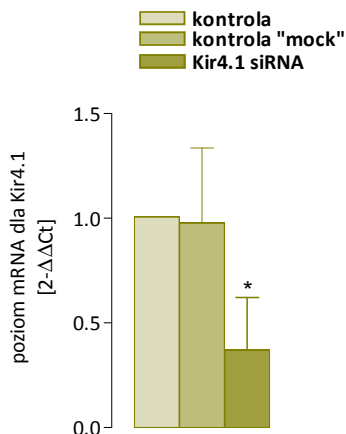
Ryc.V.6. Wpływ amoniaku i Gln oraz stresu hipoosmotycznego na wychwyt (A) i wyrzut (B)  $^{86}\text{Rb}$  przez szczurze astrocyty *in vitro*.

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroni

### V.7. Wpływ amoniaku, glutaminy oraz transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 na objętość pierwotnych korowych astrocytów szczurzych

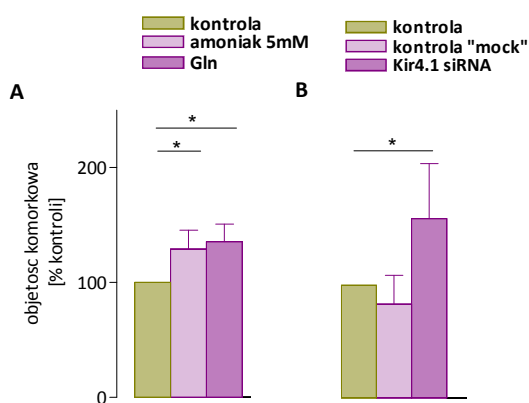
Skuteczność specyficznego wyciszenia ekspresji kanału Kir4.1 za pomocą zaprojektowanych dupleksów siRNA sprawdzono określając względny poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach metodą RT-PCR. W komórkach transfekowanych siRNA anty-Kir4.1 nastąpiło obniżenie poziomu mRNA tego kanału o 63% w stosunku do komórek kontrolnych, w tym także wobec kontroli „mock” (Ryc.V.7.1).



Ryc.V.7.1. Wpływ transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 na poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach *in vitro*. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3 niezależnych doświadczeń.  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

Hodowanie korowych astrocytów szczurzych w obecności amoniaku lub Gln (5mM/72h) spowodowało zwiększenie objętości komórkowej astrocytów, odpowiednio o 29 i 35% (Ryc.V.7.2A). Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez inne grupy badawcze, stosujące do pomiaru objętości komórkowej astrocytów metodę Kletzienna [132].

Selektywne zablokowanie ekspresji Kir4.1 w astrocytach za pomocą siRNA skutkowało zwiększeniem objętości komórkowej o 59%, w porównaniu do komórek kontrolnych – nietransfekowanych oraz poddawanych działaniu samego odczynnika do transfekcji, bez dupleksów siRNA (kontrola „mock”) (Ryc.V.7.2B).



Ryc.V.7.2. Wpływ amoniaku i Gln (A) oraz transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 (B) na objętość komórkową astrocytów *in vitro*.

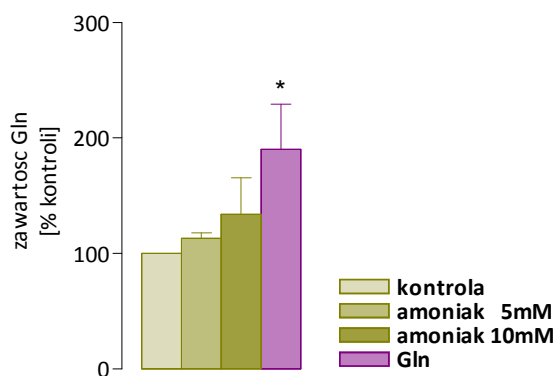
Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

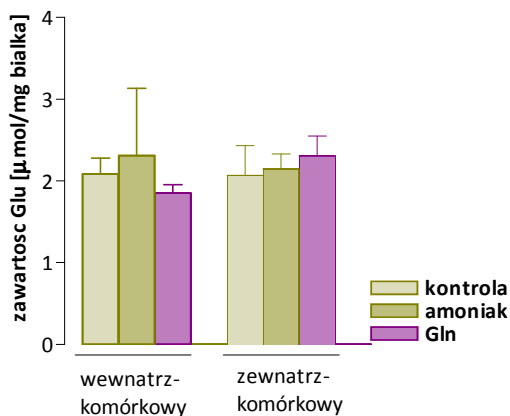
### V.8. Wpływ amoniaku i glutaminy na wewnątrzkomórkową zawartość glutaminy oraz na wewnątrz- i zewnątrzkomórkową zawartość glutaminianu w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Traktowanie hodowli astrocytarnych amoniakiem (5 i 10mM przez 72h) nie spowodowało wewnątrzkomórkowej akumulacji Gln (Ryc.V.8.1). Natomiast hodowanie komórek w obecności 5mM Gln przez 72h skutkowało wzrostem wewnątrzkomórkowej zawartości Gln o ok. 90% (Ryc.V.8.1). Komórki kontrolne, zarówno w stosunku do traktowanych amoniakiem jak i Gln, hodowane były w warunkach standardowych, czyli w obecności 2.5mM Gln. Poziom Gln w komórkach kontrolnych, oznaczony metodą HPLC, wynosił  $2.9 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/mg}$  białka.

Ekspozycja astrocytów na amoniak (5mM), czy Gln (5mM) przez 72h, pozostały bez wpływu na wewnątrz- i zewnątrzkomórkową zawartość Glu (Ryc.V.8.2).



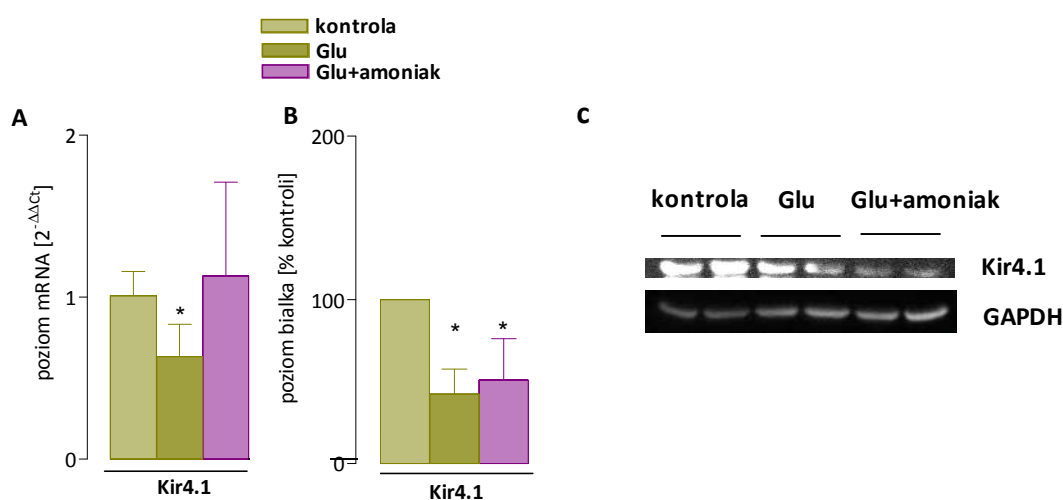
Ryc.V.8.1. Wpływ amoniaku i Gln na wewnątrzkomórkową zawartość Gln. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.  
\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego



Ryc.V.8.2. Wpływ amoniaku i Gln na wewnątrz- i zewnątrzkomórkową zawartość Glu. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3 niezależnych doświadczeń.  
\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.9. Wpływ glutaminianu i amoniaku na ekspresję Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Inkubacja astrocytów z Glu (2mM/72h) obniżała ekspresję kanału Kir4.1 o ok. 37% na poziomie mRNA (Ryc.V.9A), a o ok. 57% na poziomie białka (Ryc.V.9.B). Obecność amoniaku w mieszaninie inkubacyjnej niwelowała hamujący efekt Glu na ekspresję Kir4.1 mRNA (Ryc.V.9A), ale nie miała wpływu na obniżenie ekspresji białka Kir4.1 (Ryc.V.9.B,C).



Ryc.V.9. Wpływ Glu oraz Glu łącznie z amoniakiem na poziom mRNA (A) i białka (B) Kir4.1 w astrocytach *in vitro*. (C) typowy obraz immunodetekcji białek Kir4.1 i GAPDH

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ OS) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

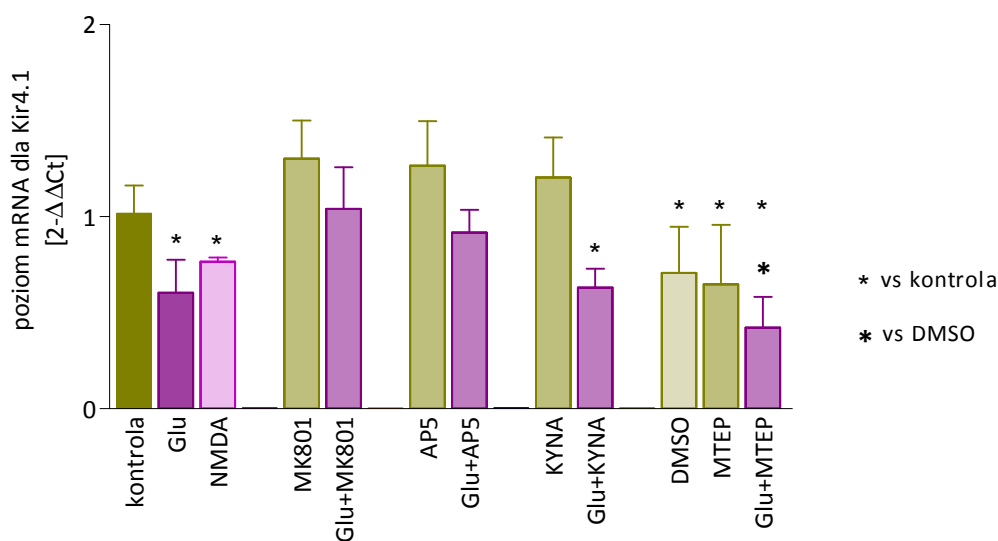
\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.10. Wpływ glutaminianu oraz antagonistów receptorów NMDA (MK-801, AP-5, KYNA) oraz antagonisty glutaminianowych receptorów metabotropowych (MTEP) na poziom mRNA dla Kir4.1 w pierwotnych astrocytach szczurzych

Obniżenie poziomu mRNA Kir4.1 w astrocytach stwierdzano także w wyniku ich inkubacji z NMDA (100 $\mu$ M/72h): spadek w stosunku do kontroli wyniósł ok. 25% (Ryc.V.10), co wskazywało, że efekt Glu może być następstwem aktywacji NMDAr, dlatego przebadano wpływ Glu w obecności antagonistów NMDAr: MK-801 (50 $\mu$ M), AP-5 (250 $\mu$ M) oraz endogennego antagonisty miejsca glicynowego NMDAr, kwasu kynureninowego (KYNA) (100 $\mu$ M). MK-801 oraz AP-5 zniosły efekt Glu, przywracając poziom mRNA dla

Kir4.1 do poziomu wyjściowego (Ryc.V.10). KYNA natomiast pozostał bez wpływu na efekt Glu (Ryc.V.10). Antagonista mGluR grupy I (MTEP; 100 $\mu$ M nie zniósł hamującego wpływu Glu na poziom mRNA dla Kir4.1 w komórkach (Ryc.V.10). Ponieważ do rozpuszczenia MTEP stosowano DMSO (rozpuszczalnikiem dla wszystkich pozostałych związków było medium hodowlane), zbadano wpływ tego rozpuszczalnika na poziom mRNA dla Kir4.1. DMSO obniża go (Ryc.V.10), więc kontrolą właściwą dla komórek traktowanych MTEP lub MTEP łącznie z Glu, były komórki traktowane DMSO. W stosunku do poziomu w tych komórkach, poziom mRNA dla Kir4.1 w komórkach traktowanych Glu łącznie z MTEP pozostał obniżony o ok. 28%.

DMSO, dodawany do medium hodowlanego w stosunku 1:100, nie wpływał na wynik testu MTT, co świadczyło o braku wpływu na przeżywalność astrocytów w hodowli (Ryc.V.15)



Ryc.V.10. Wpływ Glu, NMDA oraz antagonistów NMDAr (MK-801, AP-5, KYNA) i mGluR (MTEP) na poziom mRNA dla Kir4.1.

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ OS) uzyskaną z 3-12 niezależnych doświadczeń.

\* (względem kontroli) \* (względem DMSO)  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.11. Wpływ glutaminianu oraz inhibitorów jego transportu błonowego (TBOA i PDC) na poziom mRNA dla Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Zbadano wpływ inhibitorów transportu Glu do komórki na indukowane przez Glu obniżenie poziomu mRNA Kir4.1 w astrocytach *in vitro*.

Inkubacja z TBOA (100 $\mu$ M), nie przechodzącym przez błonę komórkową inhibitorem transportu Glu, niwelowała hamujący wpływ Glu na ekspresję mRNA dla Kir4.1 (Ryc. V.11). Natomiast PDC (100 $\mu$ M), kompetycyjny inhibitor transportu Glu, podlegający transportowi wymiennemu z Glu i tym samym mogący powodować wyrzut Glu z komórki [295], powodował obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 (Ryc.V.11), w stopniu zbliżonym do tego, gdy był stosowany łącznie z Glu (Ryc.V.11).

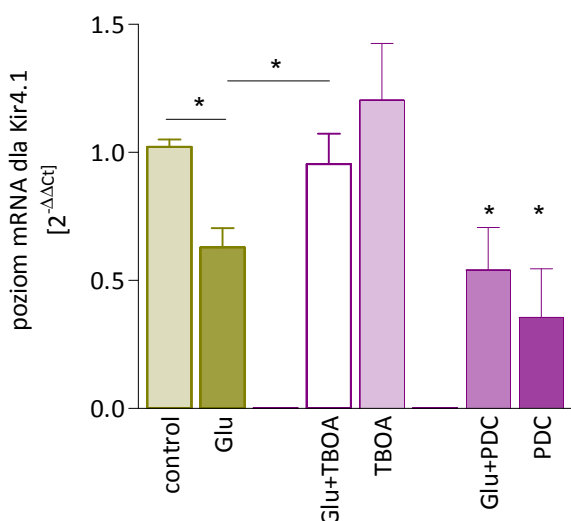


Fig.V.11. Wpływ Glu i inhibitorów transportu Glu (TBOA i PDC) na poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach *in vitro*.

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ OS) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.12. Wpływ glutaminianu oraz antyoksydantów (tauryny, apocyniny, nitroargininy, dwuestru glutationu) na poziom mRNA dla Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Zastosowane zostały następujące związki, o udokumentowanym działaniu niwelującym stres nitrozacyjny i/lub oksydacyjny, o różnych mechanizmach działania:

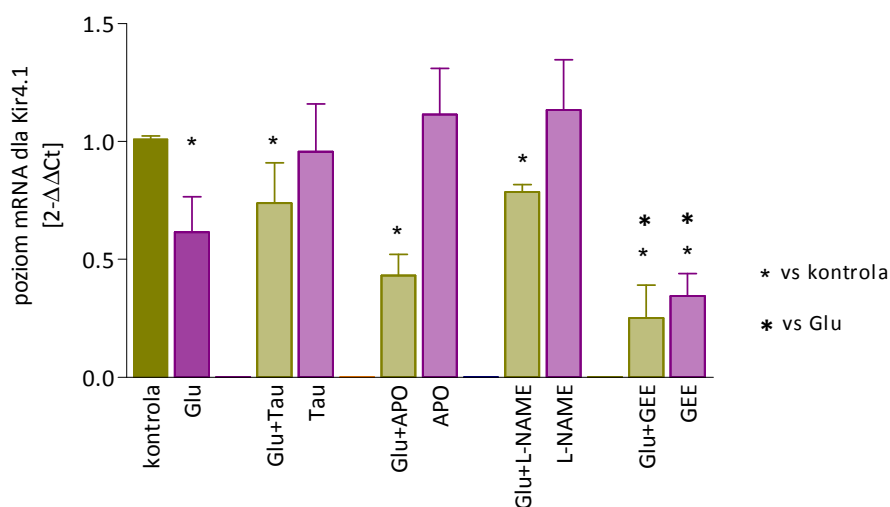
- tauryna (Tau; 10mM); agonista receptorów neuroprzekaźników hamujących i osmosensor
- apocynina (APO; 300 $\mu$ M), inhibitor oksydazy NAPDH



- nitroarginina (L-NNA; 100 $\mu$ M), inhibitor syntaz tlenku azotu; w zastosowanym stężeniu L- NNA hamuje wszystkie izoformy syntaz NO [272]

- ester etylowy glutationu; prekursor GSH (GEE; 3mM).

Tau, APO i L-NNA, podawane do medium hodowlanego łącznie z Glu, nie wpłynęły na indukowane przez Glu obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 w astrocytach (Ryc. V.12). Związki te podawane oddzielnie, również nie wywołały zmian w poziomie mRNA dla Kir4.1 (Ryc.V.12). GEE natomiast spowodował znaczne (o ok. 66%) obniżenie oraz pogłębienie (z 39 do 75% ) spadku poziomu mRNA dla Kir4.1 wywołanego przez Glu (Ryc.V.12).



Ryc.V.12. Wpływ Glu i inhibitorów stresu nitrozo-oksydacyjnego (Tau, APO, L-NAME, GEE) na poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach *in vitro*.

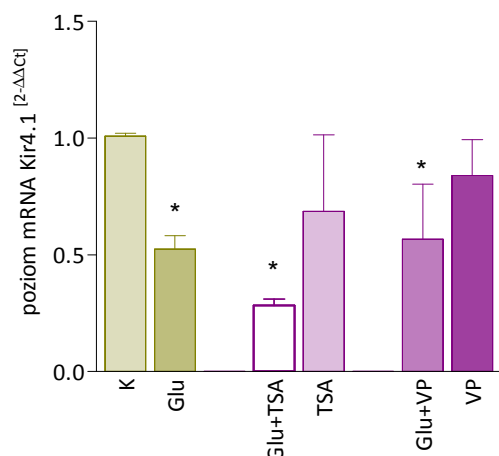
Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ OS) uzyskaną z 3-4 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.13. Wpływ glutaminianu oraz inhibitorów deacetylaz histonowych (trychostatyny A i kwasu walproinowego), na poziom mRNA dla Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych

Deacetylazy histonowe (ang. *histone deacetylase*; HDAC) po aktywacji przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ , powodują zahamowanie transkrypcji, poprzez deacetylację histonów. Inhibitory HDAC (HDACi), trychostatyna A (TSA), oraz kwas walproinowy (VP) wskazywano jako związki o działaniu m.in. antyproliferacyjnym, antynowotworowym oraz protekcyjnym wobec komórek OUN: mikrogleju i neuronów [70].

TSA (250nM) i VP (1mM) nie wpływały na wywołane przez Glu obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 (Ryc.V.13). TSA i VP podawane oddzielnie, bez Glu, nie wpłynęły na bazalny poziom mRNA dla Kir4.1 (Ryc. V.13).

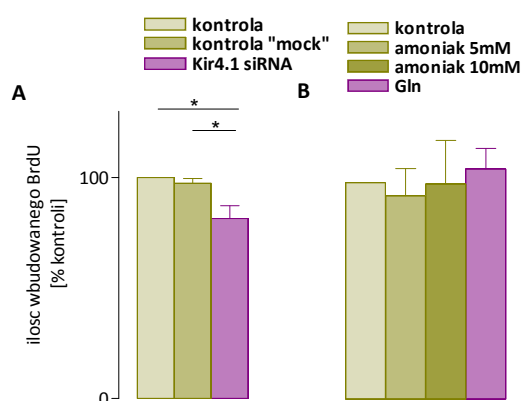


Ryc.V.13. Wpływ Glu i inhibitorów HDAC (TSA i VP) na poziom mRNA Kir4.1 w astrocytach *in vitro*. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 3-4 niezależnych doświadczeń.  
\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

#### V.14. Wpływ amoniaku, glutaminy oraz transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 na proliferację pierwotnych korowych astrocytów szczurzych

Transfekowanie astrocytów dupleksami siRNA anty-Kir4.1 i selektywne wyciszenie ekspresji kanału Kir4.1, spowodowało zmniejszenie ilości BrdU ulegającego wbudowaniu do DNA komórek, czyli obniżenie ich proliferacji, zarówno w stosunku do komórek kontrolnych, jak i kontroli „mock” (Ryc.V.14A).

Stopień proliferacji astrocytów nie ulegał zmianie pod wpływem inkubacji z amoniakiem (5 i 10mM), czy Gln (5mM) (Ryc. V.14B).



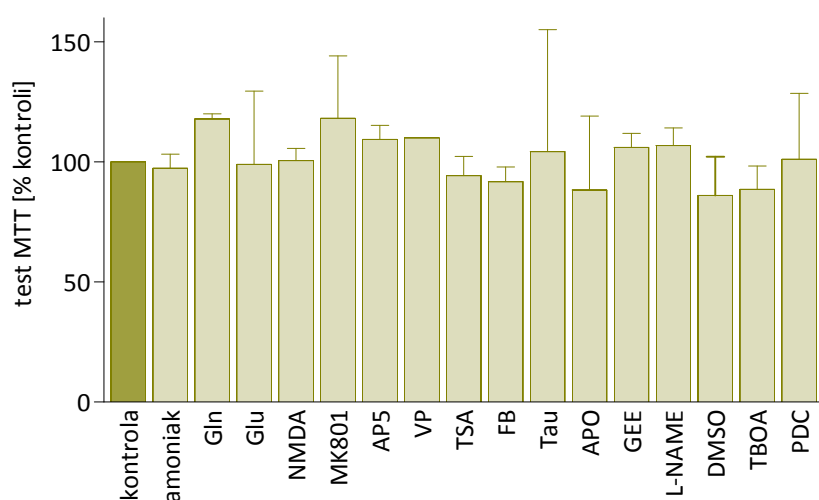
Ryc.V.14. Wpływ transfekcji za pomocą siRNA anty-Kir4.1 (A) oraz amoniaku i Gln (B) na proliferację astrocytów *in vitro*.

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.15. Wpływ amoniaku, Gln, Glu, NMDA, antagonistów receptorów glutaminianowych oraz antyoksydantów, inhibitorów HDAC i transportu Glu na przeżywalność (test MTT) pierwotnych korowych astrocytów szczurzych

Żadna ze stosowanych substancji, tj. Gln, Glu, NMDA, antagoniści receptorów glutaminianowych (MK-801, AP-5, KYNA, MTEP), inhibitory stresu nitrozo-oksydacyjnego (Tau, APO, L-NNA, GEE), inhibitory HDAC (TSA, VP) i transportu Glu (TBOA, PDC), nie wpłynęła na przeżywalność pierwotnych korowych astrocytów szczurzych w hodowli (Ryc.V.15).

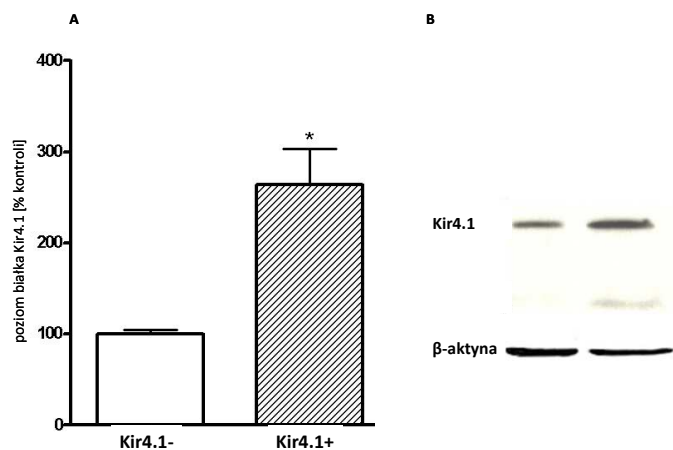


Ryc. V.15. Wpływ amoniaku, Gln, Glu, NMDA, antagonistów receptorów glutaminianowych oraz antyoksydantów, inhibitorów HDAC i transportu Glu na przeżywalność astrocytów *in vitro*, oznaczaną testem MTT

Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4-12 niezależnych doświadczeń.

### V.16. Poziom ekspresji białka Kir4.1 w transfekowanych komórkach linii HEK 293T

Skuteczność transfekcji komórek linii HEK 293T plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>) sprawdzono mierząc poziom białka metodą WB (Ryc.V.16A). Transfekcja spowodowała ok. 2.8-krotne zwiększenie poziomu białka Kir4.1 w stosunku do komórek kontrolnych (Kir4.1<sup>-</sup>) (Ryc.V.16A).



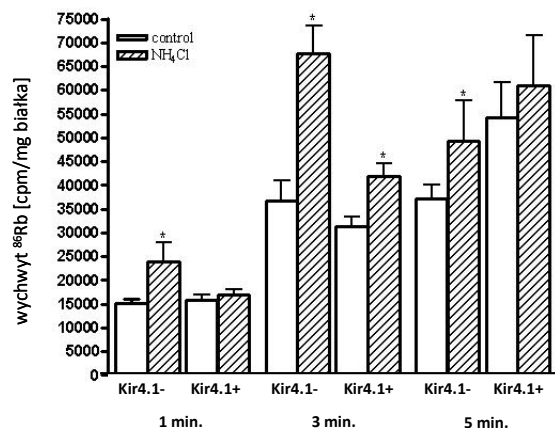
Ryc.V.16. Wpływ transfekcji komórek HEK 293T plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>) na poziom białka Kir4.1 (Kir4.1<sup>-</sup> – komórki transfekowane pustym plazmidem). (B) typowy obraz immunodetekcji białek Kir4.1 i β-aktyny.

Uzyskane wyniki są średnią (±SD) uzyskaną z 5 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w teście t-Studenta

### V.17. Wpływ amoniaku i stresu osmotycznego na wychwyt i wyrzut <sup>86</sup>Rb przez transfekowane (Kir4.1<sup>+</sup>) i kontrolne (Kir4.1<sup>-</sup>) komórki linii HEK 293T

Nadekspresja kanału potasowego Kir4.1 w komórkach HEK 293T (Kir4.1<sup>+</sup>) (Ryc.V.16A,B) nie wpłynęła na zdolność tych komórek do wychwytu <sup>86</sup>Rb (Ryc.V.17.1). Komórki Kir4.1<sup>+</sup> okazały się jednak bardziej odporne niż Kir4.1<sup>-</sup> na zmiany wywoływane przez amoniak (5mM/72h) – indukowany amoniakiem wzrost wychwytu <sup>86</sup>Rb w komórkach Kir4.1<sup>+</sup> dało się zaobserwować tylko podczas 3 minutowego wychwytu, podczas gdy w komórkach Kir4.1<sup>-</sup> wzrost wychwytu następował przy 1, 3 i 5 minutowym wychwycie i był on relatywnie większy (Ryc.17.1).

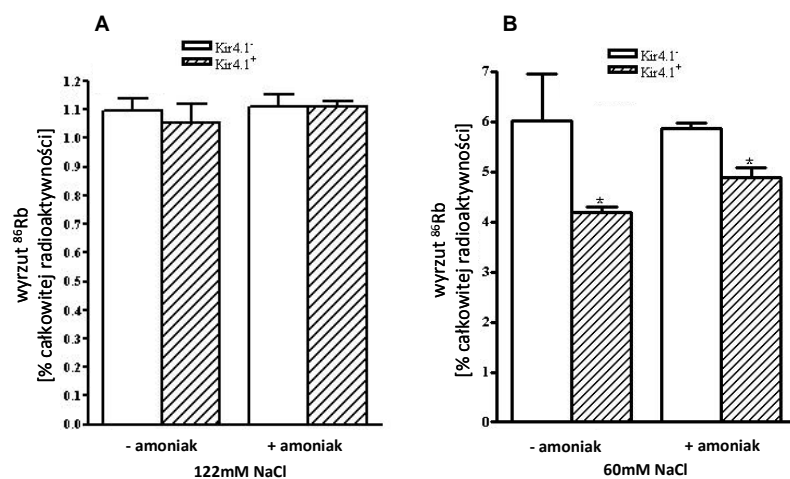


Ryc.17.1. Wpływ transfekcji plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>; Kir4.1<sup>-</sup> – komórki transfekowane pustym plazmidem) i amoniaku na wychwyt <sup>86</sup>Rb przez komórki HEK 293T.

Uzyskane wyniki są średnią (±SD) uzyskaną z 9 niezależnych doświadczeń.

\* p<0.05 w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

W warunkach kontrolnych (122mM NaCl) wyrzut <sup>86</sup>Rb nie ulegał zmianie pod wpływem transfekcji (Ryc.V.17.2A). W warunkach hipoosmotycznych wyrzut <sup>86</sup>Rb ulegał zwiększeniu zarówno w komórkach kontrolnych (Kir4.1<sup>-</sup>), jak i transfekowanych (Kir4.1<sup>+</sup>), przy czym w komórkach Kir4.1<sup>+</sup> wzrost ten był mniejszy niż w Kir4.1<sup>-</sup> (por. Ryc.V.17.2A i V.17.2B). Amoniak nie wpłynął na stopień wyrzutu K<sup>+</sup> ani w warunkach kontrolnych, ani hipoosmotycznych (Ryc.V.17.2B).



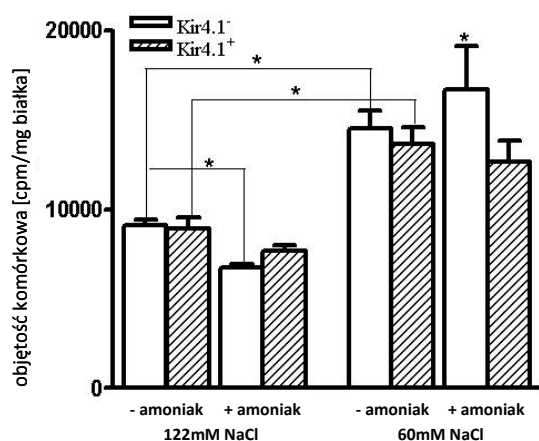
Ryc.V.17.2. Wpływ transfekcji plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>; Kir4.1<sup>-</sup> – komórki transfekowane pustym plazmidem) i amoniaku na wyrzut <sup>86</sup>Rb przez komórki HEK 293T w warunkach kontrolnych (A) i hipoosmotycznych (B).

Uzyskane wyniki są średnią (±SD) uzyskaną z 3 niezależnych doświadczeń.

\* p<0.05 w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

### V.18. Wpływ amoniaku na objętość komórek linii HEK 293T

Nadekspresja kanału potasowego Kir4.1 w komórkach HEK 293T (Kir4.1<sup>+</sup>) nie wpłynęła na objętość komórek w warunkach kontrolnych („-amoniak”, medium kontrolne, 122mM NaCl) (Ryc.V.18). Inkubacja w medium hipoosmotycznym (60mM NaCl) spowodowała zwiększenie objętości komórek kontrolnych (Kir4.1<sup>-</sup>) i transfekowanych (Kir4.1<sup>+</sup>) (Ryc.V.18). W warunkach stresu hipotonicznego (60mM NaCl) amoniak spotęgował obrzmienie komórek Kir4.1<sup>-</sup>, ale nie Kir4.1<sup>+</sup> (Ryc.V.18). W warunkach kontrolnych zaobserwowano zmniejszenie obrzmieniorodnego wpływu amoniaku na komórki Kir4.1<sup>-</sup> (Ryc.V.18).



Ryc.V.18. Wpływ transfekcji plazmidem niosącym konstrukt Kir4.1 (Kir4.1<sup>+</sup>; Kir4.1<sup>-</sup> – komórki transfekowane pustym plazmidem) i amoniaku na objętość komórek HEK 293T w warunkach kontrolnych i hipoosmotycznych. Uzyskane wyniki są średnią ( $\pm$ SD) uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

\*  $p < 0.05$  w analizie ANOVA z testem *post hoc* Bonferroniego

## VI. DYSKUSJA

### VI. 1. Obrzęk mózgu w encefalopatii wątrobowej

Obrzęk mózgu stanowi najpoważniejsze powikłanie ostrej EW oraz jej formy przewlekłej w fazie zaostrzenia (ang. *acute upon chronic hepatic encephalopathy*) [18;29;236;300]. Powoduje on wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego i wgłobienie (łac. *herniatio cerebri*), w konsekwencji doprowadzając do śmierci [44;127;128]. Śmiertelność w przypadku ostrej EW jest wysoka – sięga 80% [128]. EW jest pierwotną gliopatią – co, jak opisano we Wstępie, oznacza, że zmianom patomorfologicznym podlegają niemal wyłącznie astrocyty [1;45]. Obrzmienie astrocytów, obserwowane w EW w klinice [1;139], a także w warunkach doświadczalnych *in vivo* i *in vitro* [72;153;198;206;207;212;239;272;278;290;306], przekłada się bezpośrednio na obrzęk mózgu – w przeważającej mierze cytotoksyczny, choć ostatnio coraz częściej rozważa się udział komponenty wazogennej, związanej z upośledzeniem bariery krew-mózg [271].

Głównym czynnikiem patogennym w EW, inicjującym kaskadę zdarzeń prowadzących do obrzmienia astrocytów i obrzęku mózgu jest amoniak [1;3;5;42;47;234]. Häussinger i Schliess [99] przedstawili spójną koncepcję dotyczącą patomechanizmu obrzęku mózgu towarzyszącego hiperamonemii i EW. Według tej koncepcji, amoniak powoduje gromadzenie się Gln w mózgu, co prowadzi do obniżenia poziomu osmolitów, m.in. mioinozytolu i Tau. Wyrzut osmolitów, będący odpowiedzią kompensacyjną na nadmiar osmotycznie czynnej Gln, powoduje jednocześnie ograniczenie możliwości dalszego regulowania objętości komórkowej przez astrocyty. Zwiększa to podatność komórek na synergistyczne oddziaływanie amoniaku i innych czynników patogennych, towarzyszących EW – hiponatremii, cytokin prozapalnych, benzodiazepin [3;234;289]. Do obrzmienia w szczególności przyczynia się ONS, indukowany bezpośrednio przez amoniak, ale także przez m. in. cytokiny prozapalne. W sumie, dochodzi do sprzężenia typu błędnego koła, gdyż samo obrzmienie również powoduje ONS [99].

We Wstępie opisano, że ONS skutkuje m.in. peroksydacją lipidów [203], oksydacją i nitrozylacją białek [84;85;96;131;132;216;266;270], obniżeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych [154;155], a także oksydacją RNA [87;88]. Jednak dokładny mechanizm bezpośredniej indukcji obrzmienia przez ONS nie jest do końca poznany. Prawdopodobne jest, że ONS powoduje dezintegrację błon komórkowych [144], prowadzi do dysfunkcji białek zaangażowanych w regulację objętości komórkowej oraz dysfunkcji mitochondriów

(MPT) i upośledzenia metabolizmu energetycznego [211]. Regulacja objętości komórkowej jest procesem energochłonnym, dlatego obniżenie poziomu ATP może potęgować, a nawet wywoływać, obrzmienie astrocytów [211]. Ponadto, konsekwencją zaburzenia funkcji mitochondriów i cyklu Krebsa, jest wzrost glikolizy i nagromadzenie się mleczanu [211]. Wzrost stężenia mleczanu stwierdzano w mózgu i CSF ludzi z EW [310], a także u zwierząt doświadczalnych [283;320]. Ponieważ mleczan indukuje obrzmienie astrocytów *in vitro* [209], jego wpływ na mechanizm obrzmienia astrocytów w EW jest przedmiotem licznych badań [43;211].

Wielość czynników patogennych odgrywających rolę w mechanizmie powstawania EW znacząco utrudnia pełne wyjaśnienie patomechanizmu obrzęku i opracowanie skutecznej strategii terapeutycznej. Obecnie stosowane leczenie przewlekłej EW (której również towarzyszyć może nieznaczny obrzęk mózgu, por. Wstęp) polega w znacznej mierze na redukowaniu stężenia amoniaku we krwi i zwiększaniu wydajności jego usuwania z organizmu [130;233]. W przypadku ostrej niewydolności wątroby, jedynym sposobem leczenia jest jej przeszczep. Przeżywalność chorych na ostrą EW po transplantacji sięga 80% [17;28], jednak aż 30% oczekujących nie dożywa przeszczepu ze względu na powikłania EW, w szczególności obrzęk mózgu [17]. Stosowanie hipotermii (obniżanie temperatury ciała do 32-33°C) w celu zmniejszenia obrzęku mózgu u osób przygotowywanych do transplantacji przedłuża przeżycie na tyle, aby pacjenci mogli zostać poddani przeszczepowi [129]. Uważa się, że skuteczność hipotermii opiera się na ogólnym, nieswoistym, spowolnieniu metabolizmu [129]. W połączeniu z faktem, że procedura leczenia ostrej EW jest niezwykle kosztowna, długotrwała i obciążona dużym ryzykiem powikłań i zgonu, sprawia to, że konieczne jest pełne poznanie mechanizmu powstawania obrzęku mózgu towarzyszącego hiperamonemii i EW.

Poszerzenie wiedzy na temat patomechanizmu hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów i obrzęku mózgu w EW stanowi cel niniejszej rozprawy doktorskiej.

## **VI.2. Regulacja objętości komórkowej w ośrodkowym układzie nerwowym**

Zapobieganie obrzmieniu astrocytów wymaga wzięcia pod uwagę całej złożoności mechanizmów regulujących objętości komórek. Podlega ona zmianom nie tylko w EW, ale w wielu rozmaitych stanach patologicznych, i tak np. obrzmienie towarzyszy hipoksji/ischemii, hiponatremii, zwiększonemu stężeniu zewnątrzkomórkowego  $K^+$ , natomiast kurczenie się komórek obserwuje się w hipernatremii, przy obniżonym  $K^+$  zewnątrzkomórkowym,



hiperglikemii [119]. Stan zachwiania równowagi osmotycznej rozwija się stosunkowo powoli, dając komórkowym mechanizmom kompensacyjnym możliwość utrzymania objętości komórkowej na w miarę stałym poziomie, jednak przedłużająca się i pogłębiająca nierównowaga osmotyczna nie tylko to uniemożliwia, ale doprowadza do zmian w ekspresji białek błonowych odpowiedzialnych za regulację objętości i enzymów zaangażowanych w syntezę czy degradację osmolitów organicznych [119]. Niesie to konsekwencje dla komórkowych ścieżek sygnałowych kontrolujących metabolizm, pobudliwość, wzrost, proliferację i apoptozę [119;219].

Utrzymanie właściwej objętości jest szczególnie istotne w przypadku komórek OUN, ze względu na ograniczenie topograficzne wzrostu objętości mózgu. Nawet niewielki wzrost objętości komórek OUN może znacząco wpływać na objętość przestrzeni międzykomórkowej (ang. *extracellular space*; ECS), powodując wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia neuroprzekazników [284]. Większy wzrost objętości komórkowej może prowadzić do anoksji i ischemii wskutek ucisku na naczynia krwionośne, a dalej do wgłobienia, skutkującego zatrzymaniem oddychania i krążenia [81], jak ma to miejsce w przypadku ostrej EW.

Uważa się, że w różnych stanach patologicznych, obrzmieniu ulegają głównie astrocyty [144;224]. Odmienna wrażliwość poszczególnych typów komórek na obrzmienie wynikać może z różnic w zaangażowaniu poszczególnych mechanizmów regulacji objętości komórkowej. Podatność astrocytów może wynikać m.in. z relatywnie dużej gęstości akwaporyn (głównie Aqp4) w ich błonach komórkowych [211].

Komórki OUN ulegają obrzmieniu izo- lub hipoosmotycznemu. Obrzmienie izoosmotyczne polega na zmianie dystrybucji jonów (i osmotycznie związanej wody) i zachodzi zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Obrzmienie izoosmotyczne komórek, czyli inaczej cytotoksyczne [224], towarzyszy takim stanom patologicznym jak napady drgawkowe, kwasica cukrzycowa, ischemia, urazy oraz EW [231]. Obrzmienie hipoosmotyczne wywołane jest natomiast obniżeniem osmolarności osocza [81;196]. Najczęstszą przyczyną obrzmienia hipoosmotycznego jest hiponatremia, która – jak wspomniano – często towarzyszy marskości wątroby i stanowi czynnik przyczyniający się do wystąpienia EW [81;101]. Obniżenie osmolarności osocza (tu w następstwie hiponatremii) skutkuje napływem wody do mózgu przez BBB i do komórek OUN przez ich błony plazmatyczne. Objawy neurologiczne hiponatremii są następstwem obrzęku [101].

Większość komórek jest zdolna do regulacji objętości. Komórki ulegające obrzmieniu uwalniają KCl oraz osmolity organiczne (takie jak Tau, Glu, mioinozytol) i osmotycznie związaną wodę, zmniejszając objętość do wartości bliższych fizjologicznym (ang. *regulatory*

*volume decrease*, RVD). Natomiast komórki, które muszą się kurczyć w warunkach hiperosmotycznych, przeciwnie – pobierają KCl i wodę, aby zwiększyć swoją objętość (ang. *regulatory volume increase*; RVI). W uwalnianie osmolitów organicznych i nieorganicznych zaangażowany jest szereg kanałów jonowych, zależnych i niezależnych od  $\text{Ca}^{2+}$ : transporter potasowo-chlorkowy (ang. *K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter*) i kanał VRAC (ang. *volume-regulated anion channel*; określany również VSOR – ang. *volume-sensitive outwardly rectifying anion channel*, lub VSOAC – ang. *volume-sensitive organic osmolyte and anion channel*) [31]. VRAC, wciąż niescharakteryzowany molekularnie megakanał [81], odpowiedzialny jest za wyrzut osmolitów organicznych, takich jak Tau, aminokwasy pobudzające Glu i Asp, a także ATP [24;31]. Stwierdzono, że RVD w astrocytach jest procesem zależnym od wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ , a osmoreceptorami odpowiedzialnymi za ów wzrost są białka z rodziny TRP (ang. *transient receptor potential channel superfamily*) [24]. Mechanizm RVI obejmuje natomiast aktywację ko-transportera  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (NKCC) i wymiennika  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  [119].

Wzrost stężenia Gln i spadek mioinozytolu w mózgu stwierdzano u pacjentów z ostrą [91] i przewlekłą EW [162] oraz z marskością wątroby [187;269]. Obniżenie poziomu osmolitów – mioinozytolu, Tau i Glu – notowano u szczurów z PCA [64] i ALF [321], a także *in vitro*, w korowych astrocytach szczurzych [4;125;322]. Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Tau obserwowano w mózgu szczura *in vivo* [314] oraz *ex vivo*, w preparatach pochodzących od zwierząt z EW indukowaną TAA [315]. Należy nadmienić, że Tau odgrywa w OUN rolę nie tylko jako osmolit i antyoksydant, ale także jako neuromodulator [99;122].

Wyrzut osmolitów, mający przeciwdziałać obrzmieniu komórek, jest zjawiskiem wspólnym tak dla hiperamonemii, jak i hiponatremii [101]. O ile jednak w przypadku stresu hiposmotycznego komórkowy mechanizm kompensacyjny jest skuteczny, o tyle w przypadku amoniaku astrocyty ulegają obrzmieniu, co świadczy o upośledzeniu przezeń RVD [99;101].

Postuluje się, że ważną rolę w regulacji objętości komórek OUN odgrywają kanały potasowe Kir4.1 i kanały wodne, szczególnie Aqp4 [20;24;71;172]. Doniesienia literaturowe wskazują na korelację między zaburzeniami funkcji kanałów potasowych (Kir4.1, Kir2.1) i/lub akwaporyn (głównie Aqp4), a cytotoksycznym i wazogennym obrzękiem, obserwowanym w takich schorzeniach centralnego i obwodowego układu nerwowego jak nowotwory [260;299], wodogłowie [183], niedokrwienie i zwyrodnienie siatkówki oka [124;229].

Zmiany w ekspresji Aqp4, a także kanałów potasowych Kir4.1 i Kir5.1 obserwowano u transgeniczných myszy z indukowaną hiperamonemią, wywołaną niedoborem enzymu cyklu mocznikowego, odpowiedzialnego za detoksykację amoniaku [173].

Hipoteza, że patomechanizm hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów obejmuje zaburzenia transportu jonów potasu wywodzi się z faktu, iż  $\text{NH}_4^+$  może wnikać do komórki za pośrednictwem kanałów bądź aktywnych białek transportujących  $\text{K}^+$  [172]. Oprócz wspomnianych zmian dotyczących ekspresji i/lub aktywności NKCC1 i Kir4.1, o zaburzeniach gradientu potasowego w warunkach hiperamonemii i/lub EW świadczą następujące dane doświadczalne:

- przewlekłe narażenie astrocytów *in vitro* na chlorek amonu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) powodowało zwiększenie aktywności  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$  i/lub zwiększenie wychwytu  $\text{K}^+$  przez astrocyty *in vitro* [9;136].
- ostra hiperamonemia wywoływana u szczurów poprzez infuzję octanu amonu powodowała zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{K}^+$   $[\text{K}^+]_e$  [276]
- traktowanie hodowli astrocytarnych jonami amonowymi skutkowało spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{K}^+$  i w konsekwencji depolaryzacją błony komórkowej [12].

Wpływ amoniaku na komórkowy transport jonów i, co za tym idzie, osmotycznie związanej wody na hiperamonemiczne obrzmienie astrocytów był jak dotąd rozpatrywany nieco fragmentarycznie. Dostępne dane literaturowe na ten temat omówiono oraz skonfrontowano z wynikami własnymi w kolejnych podrozdziałach.

### **VI.3. Ekspresja kanałów i transporterów związanych z regulacją objętości komórkowej w korze mózgowej szczura i w astrocytach *in vitro***

#### ***Aqp4***

Błony komórkowe są wysoce przepuszczalne dla wody [224], dlatego kanały wodne, akwaporyny, stały się przedmiotem wielu badań dotyczących patomechanizmu obrzęku [14].

Aqp4 jest najczęściej występującą akwaporyną w mózgu, obecną głównie w komórkach astrogleju [243]. Udział Aqp4 w patomechanizmie hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów, czy też obrzęku mózgu towarzyszącego EW, był wielokrotnie badany, jednak dane literaturowe są sprzeczne. W pierwotnych hodowlach korowych astrocytów poddawanych działaniu amoniaku stwierdzano zarówno wzrost [228;238], jak i brak zmian ekspresji Aqp4 [54]. Zmiany w poziomie ekspresji Aqp4 występują jednak pod wpływem cytokin prozapalnych, które wedle najnowszych poglądów stanowią ważny czynnik

patogeny w EW [54]. W szczurzych modelach hiperamonemii prostej [152] i EW (modele BDL i TAA) stwierdzano wzrost ekspresji Aqp4 w mózgu [242;296;308]. Tymczasem wyniki własne, prezentowane w niniejszej rozprawie (**Ryc.V.1A**), świadczą o spadku poziomu mRNA dla Aqp4 w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną TAA. Spadek mRNA dla Aqp4 obserwowano także w astrocytach transgenicznych myszy z indukowaną hiperamonemią, wywołaną niedoborem enzymu cyklu mocznikowego, odpowiedzialnego za detoksykację amoniaku [173]. Wobec braku jednoznacznych danych dotyczących zmian w poziomie Aqp4 w mózgu czy astrocytach pod wpływem amoniaku lub innych czynników przyczyniających się do patomechanizmu EW, nie można stwierdzić, czy zmiany ekspresji tego kanału są jedną z przyczyn obrzęku, czy też stanowią odpowiedź kompensacyjną. Aqp4 może bowiem pośredniczyć w dwukierunkowym transporcie wody przez błony komórkowe [259]. Z badań prowadzonych na zwierzętach transgenicznych z niedoborem  $\alpha$ -syntrofiny (białka kotwiczącego Aqp4 w błonie komórkowej, por. Wstęp) lub Aqp4 wynika, że obecność Aqp4 sprzyja powstawaniu obrzęku cytotoksycznemu, natomiast łagodzi obrzęk wazogeny, towarzyszący guzom i ropniom mózgu [259].

Jak opisano we Wstępie, Aqp4 występuje wspólnie z kanałem potasowym Kir4.1 w obrębie tych samych kompleksów białkowych w błonach komórkowych astrocytów, a białkiem warunkującym wspólną lokalizację jest  $\alpha$ -syntrofina [59;108]. U myszy transgenicznych z *knock-out*'em  $\alpha$ -syntrofiny, Aqp4 jedynie w ok.10% zachowuje swoją prawidłową lokalizację w okołonaczyniowych zakończeniach astrocytów [15;16]. Mimo, że ekspresja kanału Kir4.1 u tych zwierząt pozostawała niezmienną, badania elektrofizjologiczne wykazały ich zwiększoną podatność na występowanie drgawek indukowanych hipertermią. Wynika to prawdopodobnie z dwukrotnie wydłużonego czasu usuwania  $K^+$  z ECS, a wskazuje na to, że do prawidłowego buforowania jonów potasu niezbędna jest właściwa dystrybucja wody [15]. Ponadto, lokalizacja Aqp4 i Kir4.1 w obrębie komórki sugeruje udział tych kanałów w regulacji objętości komórkowej – występują częściej na zakończeniach astrocytów, w bliskości naczyń krwionośnych, a ta specyficzna polaryzacja występowania Aqp4 i Kir4.1 jest szczególnie widoczna w przypadku komórek gleju Mullera [123]. Skłoniło to do postawienia hipotezy o związku funkcjonalnym między Aqp4 i Kir4.1 [201]. Jednak najnowsze dane, prezentujące wyniki doświadczeń nie tylko immunohisto- i immunocytochemicznych, ale także funkcjonalnych, nie wskazują na taką zależność [256].

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie ukazują jednoczesny spadek poziomu mRNA dla Kir4.1 i Aqp4 w korze mózgowej pod wpływem TAA (**Ryc.V.1A**), co przemawia

za możliwością skoordynowanej regulacji ekspresji obu kanałów, ze względu na obecność w obrębie jednej domeny błonowej. Rama Rao i wsp., [242], również stosując model TAA, wykazali jednoczesny wzrost ekspresji Aqp4 i  $\alpha$ -syntrofiny. Wyjaśnienie przyczyn różnic pomiędzy wynikami obecnej pracy a przedstawionymi przez Rama Rao i wsp. [242] wymaga dalszych badań.

### **NKCC1**

Poziom mRNA NKCC1 w korze mózgowej szczurów nie ulegał zmianie pod wpływem EW indukowanej TAA (**Ryc.V.1A**), ani nie był modulowany przez jednoczesne podawanie His (**Ryc.V.2**). W warunkach *in vitro*, Gln podawana do hodowli nie wpływała na poziom mRNA NKCC1 w astrocytach (**Ryc.V.4B**). Ponieważ uzyskane wyniki dotyczą jedynie poziomu transkrypcji mRNA, nie można wyłącznie na ich podstawie wnioskować na temat udziału NKCC1 w badanych procesach. Doniesienia literaturowe dotyczące zmian na poziomie ekspresji i fosforylacji białka NKCC1 oraz jego funkcji, wyraziście wskazują na zaangażowanie tego transportera w mechanizm neurotoksycznego oddziaływania amoniaku.

Jayakumar i wsp., [131] wykazali, że traktowanie hodowli astrocytarnych 5mM amoniakiem przez 24h spowodowało wzrost zawartości białka (całkowitego i ufosforylowanego) oraz aktywności NKCC1 – nastąpił, wrażliwy na bumetanid (inhibitor NKCC), wzrost wychwytu jonów  $K^+$  i  $Na^+$  oraz wzrost objętości komórkowej astrocytów.

Aktywację NKCC1 w odpowiedzi na amoniak potwierdzili również Kelly i wsp. [141]; w cytowanej pracy, bumetanid hamował indukowane przez amoniak obniżenie  $pH_i$  i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu ( $[Na^+]_i$ ). Kelly i Rose [142] wykazali ponadto, że w astrocytach badanych *in situ* w skrawkach mózgu, w indukowanych przez amoniak zmianach  $pH_i$  i  $[Na^+]_i$  pośredniczy w głównej mierze NKCC1, a w mniejszym stopniu  $Na^+-K^+-ATPaza$ , co ujawniło stosowanie jej inhibitora, ouabainy. Wahania  $pH_i$  oraz  $[Na^+]_i$  były natomiast niezależne od kanałów chlorkowych i kanałów potasowych Kir, co ustalono dzięki zastosowaniu, odpowiednio, medium o niskiej zawartości  $Cl^-$  i jonów  $Ba^{2+}$ , jako inhibitora kanałów Kir. Badania Kelly i wsp. [141] oraz Kelly i Rose [142] wydają się więc wykluczać udział kanałów Kir w mechanizmie neurotoksycznego oddziaływania amoniaku. Badania te dotyczyły jednak krótkotrwałego (25-30-minutowego) działania amoniaku. W niniejszych badaniach zajmowano się długofalowym wpływem amoniaku na ścieżki sygnałowe, prowadzącym do zmiany ekspresji białek.

**Kir4.1**

Hipoteza dotycząca udziału kanału potasowego Kir4.1 w obrzmieniu komórek została sformułowana przez Pannicke i wsp. [230], badających mechanizm obrzęku komórek siatkówki, towarzyszącego retinopatii cukrzycowej. Według zaproponowanego mechanizmu, komórki gleju Müllera szczurów modelowych ulegają obrzmieniu na skutek obniżenia ekspresji Kir4.1 – niedobór Kir4.1 skutkuje zmniejszeniem wyrzutu jonów potasu z komórki, a akumulacja  $K^+$  powoduje gromadzenie się osmotycznie związanej wody. Napływ  $K^+$  do komórek pozostaje natomiast niezmienny, gdyż w siatkówce szczurów z modelową cukrzycą nie stwierdzono zmian ekspresji innego kanału z rodziny Kir, Kir2.1. Kir2.1 jest kanałem silnie rektyfikującym, co oznacza, że pośredniczy głównie w dokomórkowym transporcie  $K^+$  [230].

W niniejszej pracy analizowano możliwość udziału Kir4.1 w wywoływanym przez amoniak obrzmieniu astrocytów, a tym samym jego zaangażowanie w patomechanizm obrzęku mózgu towarzyszącego EW. Wykazano, że ekspresja kanału Kir4.1 ulega obniżeniu w korze mózgowej szczurów z EW indukowaną TAA, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka (**Ryc.V.1**). Jednocześnie, poziom mRNA dla Kir2.1 pozostał niezmienny (**Ryc.V.1**). Pozwala to wnioskować, że procesy zachodzące według mechanizmu zaproponowanego przez Pannicke i wsp. [230] mogą mieć miejsce również w przypadku EW indukowanej TAA. Należy mieć na uwadze, że nie badano poziomu białka dla Kir2.1. Nie można też przesądzać o zmianach właściwości tego kanału, gdyż zmiany konformacyjne, zachodzące pod wpływem amoniaku, prowadzą do zablokowania Kir2.1 [53]. W świetle przedstawionych wyników, tj. spadku ekspresji Kir4.1 w korze mózgowej szczurów z EW, skupiono uwagę na roli tego kanału w patomechanizmie hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów i obrzęku mózgu towarzyszącego EW. Poniżej opisany zostanie szereg badań, mających na celu przybliżenie roli Kir4.1 w badanej patologii.

Ponieważ wyniki badania ekspresji kanałów potasowych Kir w modelu *in vivo* – obniżona ekspresja Kir4.1 przy niezmiennym poziomie mRNA dla Kir2.1 – zdają się potwierdzać zaproponowany przez Pannicke i wsp. [230] mechanizm obrzmienia, w dalszej części pracy postanowiono głębiej zbadać mechanizm obniżenia ekspresji Kir4.1 w łatwiejszym do manipulowania układzie *in vitro* – w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych.



Zbadano wpływ amoniaku (5 lub 10mM/72h) na ekspresję w astrocytach *in vitro*. Analiza RT-PCR nie wykazała zmian w poziomie mRNA dla Kir4.1 w astrocytach poddawanych działaniu amoniaku (**Ryc.V.4A**).

Jak opisano we Wstępie, hipoteza konia Trojańskiego [6] postuluje udział Gln w neurotoksycznym oddziaływaniu amoniaku – astrocytarnie zlokalizowana GS detoksyfikuje amoniak, syntetyzując Gln, która jest metabolizowana przez mitochondrialną GA do amoniaku i Glu. Amoniak generowany bezpośrednio w mitochondriach doprowadza do uszkodzenia organelli, indukując ONS i MPT.

W warunkach hiperamonemii *in vivo*, synteza Gln przez astrocyty następuje w sposób ciągły, gdyż neurony „dostarczają” drugiego substratu do jej syntezy, Glu. W warunkach *in vitro* jednakże, synteza Gln może być limitowana ilością Glu w medium. Postanowiono więc zweryfikować hipotezę konia Trojańskiego w odniesieniu do Kir4.1 i zadano pytanie, czy traktowanie astrocytów Gln może odtworzyć obserwowany w warunkach *in vivo* spadek ekspresji Kir4.1. Prezentowane wyniki badań wsparły postawioną hipotezę – narażenie astrocytów na 5mM Gln przez 72h spowodowało obniżenie poziomu ekspresji Kir4.1 (**Ryc.V.4B,C**).

#### **VI.4. Wpływ zmian ekspresji Kir4.1 na fizjologię astrocytów i komórek linii HEK 293T *in vitro***

##### **VI.6.4.1. Wychwyt Glu oraz wychwyt i wyrzut $K^+$**

Wykonano szereg doświadczeń mających na celu wyjaśnienie, jak niedobór Kir4.1 wpływa na zdolność astrocytów do transportu Glu i  $K^+$ .

Amoniak powoduje obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu Glu [21;51;223;267]. Jest to spowodowane m.in. obniżeniem ekspresji transporterów Glu, GLT-1 i GLAST, co obserwowano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [51;210;313]. Powoduje to wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Glu, co prowadzi do ekscytotoksyczności.

Ponieważ niedobór Kir4.1 może powodować zaburzenie gradientu potasowego i depolaryzację komórek [66;164;275], zmniejszając siłę elektrochemiczną promującą dokomórkowy transport Glu, postawiono pytanie, czy Gln może odtwarzać efekt działania amoniaku w postaci obniżania wychwytu Glu. Prezentowane wyniki potwierdzają to założenie – 72h inkubacja z 5mM Gln obniżała wychwyt Glu o ok.13% (**Ryc.V.5**). Wynik ten sugeruje pośrednio, że obniżenie wychwytu Glu przez Gln może być spowodowane

obniżeniem ekspresji Kir4.1, odpowiedzialnego za wyrzut potasu. Za tym, że wywoływane przez Gln obniżenie wychwytu Glu związane jest z niedoborem Kir4.1, przemawia również fakt, że pod wpływem Gln w astrocytach *in vitro* nie zmieniał się poziom mRNA transportera Glu, GLT-1 (**Ryc.V.4B**).

Kucheryavykh i wsp., [164] zaobserwowali, że wyciszenie ekspresji Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych za pomocą siRNA, powoduje obniżenie zdolności komórek do wychwytu Glu. Obniżenie ekspresji Kir4.1 spowodowało depolaryzację potencjału błonowego astrocytów, najprawdopodobniej na skutek obniżenia wychwytu  $K^+$  i zwiększenia  $[K^+]_e$ . Powstałe w ten sposób zaburzenie gradientu potasowego powoduje zmniejszenie siły dokomórkowego transportu Glu i jego dalszą akumulację na zewnątrz komórek [164].

Blokowanie kanałów Kir za pomocą jonów  $Ba^{2+}$  powodowało wzrost  $[K^+]_e$  w skrawkach hipokampów szczurzych [66]. Astrocyty myszy transgenicznych, z *knock-out*'em genu Kir4.1, charakteryzuje depolaryzacja RMP i obniżenie zdolności wychwytu Glu [73], co również wskazuje na akumulację  $[K^+]_e$  na skutek zakłóconego brakiem Kir4.1 procesu buforowania jonów potasu.

Jednak Kucheryavykh i wsp. [164] i D'Ambrosio i wsp. [66] zanotowali również, poza innym efektami, zmniejszenie gęstości prądów odkomórkowych w warunkach obniżenia poziomu Kir4.1. Niedawna praca Stephana i wsp., [275] na astrocytach *in situ* wskazuje natomiast, że za wzrost  $[K^+]_e$  odpowiada hamowanie przez amoniak aktywności  $Na^+K^+$ -ATPazy, a do powodującego depolaryzację zwiększenia prądów dokomórkowych, przyczynia się także napływ  $NH_4^+$  przez kanały Kir.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań wykazały, że wychwyt potasu ( $^{86}Rb$ ) przez astrocyty nie jest zaburzony ani pod wpływem amoniaku, ani Gln (**Ryc.V.6A**). Dokomórkowy transport potasu nie podlega również zmianom pod wpływem stresu hipotonicznego (**Ryc.V.6A**). Obniżeniu natomiast ulega wyrzut  $K^+$  – w podobnym stopniu pod wpływem amoniaku i Gln, a efekt ten ujawnia się dopiero w warunkach narażenia na stres hipoosmotyczny (**Ryc.V.6B**), który w warunkach klinicznych jest związany z towarzyszącą hiponatremią [101].

W przypadku działania Gln, za zredukowanie wyrzutu  $K^+$  może być odpowiedzialne obniżenie ekspresji Kir4.1. Wynik ten dobrze koresponduje z założeniami teorii Pannicke i wsp. [230] co do mechanizmu przełożenia spadku ekspresji Kir4.1 na obrzmienie komórek. Jednak ponieważ amoniak również wywołuje ten sam efekt, nie wpływając na poziom



ekspresji Kir4.1, mechanizmy stojące za obserwowanym efektem działania Gln i amoniaku wymagają dalszych badań.

Zwiększenie ekspresji Kir4.1 w komórkach linii HEK 293T za pomocą transfekcji (ok. 2.8-krotne; **Ryc.V.16**), nie wpłynęło znacząco na zdolność tych komórek do wychwytu  $K^+$  (**Ryc.17.1**). Jednak komórki Kir4.1<sup>+</sup> okazały się być mniej wrażliwe na amoniak – wywoływany przezeń wzrost wychwytu  $K^+$  był większy w komórkach Kir4.1<sup>-</sup>.

Wyrzut  $K^+$  nie ulegał zmianie pod wpływem transfekcji w warunkach kontrolnych (**Ryc.17.2A**), ale pod wpływem stresu hipoosmotycznego ujawniły się różnice między komórkami Kir4.1<sup>-</sup> a Kir4.1<sup>+</sup> – wzrost wyrzutu potasu z komórek Kir4.1<sup>+</sup> był mniejszy (**Ryc.17.2B**). Amoniak natomiast nie wpłynął na wyrzut  $K^+$  z komórek (**Ryc.17.2B**).

Wyniki wskazują na większe możliwości buforowania  $K^+$  przez komórki z nadekspresją Kir4.1, w warunkach narażenia na amoniak lub stres hipoosmotyczny.

#### ***VI.6.4.2. Udział kanału potasowego Kir4.1 w regulacji objętości komórkowej.***

Jak już wspomniano, udział kanału potasowego Kir4.1 w regulacji objętości komórek gleju dokumentują następujące badania:

- obniżenie ekspresji Kir4.1 powoduje obrzmienie komórek Müllera towarzyszące takim stanom patologicznym siatkówki, jak ischemia [229] i cukrzyca [230]
- obrzmienie wypustek astrocytarnych obserwowano w rdzeniu kręgowym myszy z *knock-out*'em genu Kir4.1 [71]
- hamowanie kanałów Kir za pomocą  $Ba^{2+}$  zwiększało obrzmienie astrocytów wywołane hodowlą w warunkach niedoboru glukozy i tlenu (ang. *oxygene-glucose deprivation*; OGD) [23].

Wyniki badań zawarte w niniejszej rozprawie potwierdzają udział kanału Kir4.1 w regulacji objętości komórkowej. Selektywne wyciszenie ekspresji Kir4.1 za pomocą siRNA spowodowało wzrost objętości astrocytów *in vitro* (**Ryc.V.7.2A**).

Obrzmienie astrocytów *in vitro* wywoływane było również – w podobnym stopniu – przez amoniak i Gln (**Ryc.V.7.2B**). Wynik ten potwierdza wcześniejsze liczne doniesienia o wpływie amoniaku i Gln na wzrost objętości komórkowej astrocytów (por. Wstęp).

Za rolą Kir4.1 w regulacji objętości komórkowej przemawiają opisane w niniejszej pracy badania na komórkach linii HEK 293T transfekowanych Kir4.1. Nadekspresja Kir4.1 łagodziła obrzmienie komórek wywoływane narażeniem na stres osmotyczny, dodatkowo potęgowane przez amoniak (**Ryc.V.18**). Ponadto, zwiększenie ilości Kir4.1 zapobiegało

spadkowi objętości komórkowej wywoływanej przez amoniak (**Ryc.V.18**). Należy jednak podkreślić, że objętość komórek HEK 293T ulegała zmniejszeniu pod wpływem amoniaku, co ogranicza przydatność tych komórek w badaniach nad jego toksycznością w OUN (**Ryc.V.18**).

Traktowanie astrocytów amoniakiem (5 lub 10mM/72h) nie spowodowało zwiększenia wewnątrzkomórkowej zawartości Gln (**Ryc.V.8.1**). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszą obserwacją Jayakumara i wsp., [133], którzy stwierdzili wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości Gln jedynie po czterogodzinnej ekspozycji astrocytów na działanie amoniaku. Po dłuższym czasie (1-3 dni), poziom Gln utrzymywał się na stałym poziomie, nie odbiegającym od kontrolnego. Jednocześnie, obrzmienie astrocytów było obecne także po 1-3 dniowej ekspozycji na amoniak, wskazując na obrzmieniorodną rolę amoniaku, a nie Gln [133].

W przeciwieństwie do amoniaku, podanie Gln (5mM), powodowało jej akumulację wewnątrz komórek (**Ryc.V.8.1**). W zestawieniu z brakiem efektu amoniaku na poziom mRNA dla Kir4.1, wynik przemawia za tym, że Gln jest czynnikiem sprawczym obniżenia ekspresji Kir4.1 w patomechanizmie obrzmienia astrocytów w warunkach hiperamonemii.

Obecność Gln w medium hipoosmotycznym była warunkiem koniecznym do wywołania obrzmienia komórek gleju Müllera; sam amoniak ani sam stres hipoosmotyczny tego efektu nie wywoływały [137].

#### **VI.4.3. Proliferacja astrocytów**

Jak wspomniano we Wstępie, istnieją doniesienia wskazujące na wzrost proliferacji astrocytów w warunkach hiperamonemii/EW [38;213]. Z drugiej strony pojawiły się doniesienia mówiące o współzależności pomiędzy ekspresją Kir4.1 a proliferacją komórkową [112;171;221]. W związku z tym postawiono hipotezę że spadek Kir4.1, obserwowany pod wpływem Gln może być związany ze wzrostem proliferacji i/lub odróżnicowaniem się astrocytów. W niniejszej pracy nie wykazano wpływu amoniaku i Gln na stopień proliferacji astrocytów *in vitro* (**Ryc.V.14.B**), co pozostaje w sprzeczności z przyjętą hipotezą. Obniżenie proliferacji astrocytów zaobserwowano natomiast w wyniku wyciszenia ekspresji Kir4.1 za pomocą siRNA (**Ryc.V.14.A**). Wzajemne relacje pomiędzy wpływem amoniaku na aktywność Kir4.1 i na proliferację astrocytów wymagają dalszego wyjaśnienia.

## VI.5. Wpływ Gln na ekspresję Kir4.1 w astrocytach w świetle patomechanizmu EW

Słuszność hipotezy konia Trojańskiego w odniesieniu do Kir4.1 poddano bezpośredniej weryfikacji w modelu EW *in vivo*, stosując His – inhibitor transportu Gln do mitochondriów [245]. W cytowanej pracy, His niwelowała obrzęk mózgu u szczurów z EW indukowaną podaniem TAA [245]. Fakt, że His nie zapobiegała indukowanemu przez TAA spadkowi poziomu mRNA dla Kir4.1 w korze mózgowej (**Ryc.V.2.A**) pozwalał sądzić, że działanie Gln wg hipotezy konia Trojańskiego stanowi tylko jeden z, ale nie jedyny możliwy mechanizm. Postawiono hipotezę uzupełniającą, że ekspresja kanału Kir 4.1 może być regulowana przez Gln, drugi z produktów degradacji Gln.

Ostrą postać EW cechuje przesunięcie równowagi neuroprzekaźnikowej w kierunku pobudzenia (por. Wstęp). Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Gln, stwierdzano zarówno u chorych z EW, a także potwierdzono w modelu TAA [117;191]. Ekscytotoksyczne oddziaływanie Gln związane jest z nadpobudzeniem neuronalnych NMDAr – nadmierny napływ jonów wapnia do komórki poprzez kanał receptora prowadzi do stresu nitrozacyjnego (por. Wstęp). O ile patogenne efekty nadaktywacji neuronalnych NMDAr w hiperamonemii/EW były intensywnie badane (por. Wstęp), to NMDAr na komórkach astrocytów nie poświęcono wystarczająco dużo uwagi.

Obecność podjednostek NR1 i NR2 NMDAr – na poziomie mRNA i/lub białka – stwierdzono w korowych astrocytach mysich [264], szczurzych [60;61]. Ponadto, pod wpływem NMDA obserwowano wzrost  $Ca^{2+}$  w astrocytach *in situ* i *ex vivo* [227;264;292]. Dowodu na obecność funkcjonalnych NMDAr na astrocytach dostarczyli Lalo i wsp. [166] – w komórkach izolowanych z kory mózgowej myszy, NMDA indukował prądy jonowe, wrażliwe na działanie glicyny oraz antagonistów NMDAr, MK-801 i AP-5. Cechą, która odróżnia astroglejowe NMDAr od neuronalnych, jest brak wrażliwości na zależny od napięcia blok  $Mg^{2+}$  kanału receptora [166]. Różnica może wynikać ze składu podjednostkowego NMDAr, np. ze stosunkowo dużej zawartości podjednostki NR2B, w którą wzbogacone są NMDAr astrocytów [138]. niedawno Palygin i wsp., [226] stwierdzili w mysich astrocytach obecność podjednostki NR3, którą uprzednio przypisywano oligodendrocytom [174]. Udział poszczególnych podjednostek NMDAr w procesie aktywacji receptora w kierunku wygaszania ekspresji Kir4.1 stanowi atrakcyjne wyzwanie dla dalszych badań.

Udział astrocytarnych NMDAr w patomechanizmie neurotoksycznego oddziaływania amoniaku i EW postulowano już w badaniach wcześniejszych. MK-801 obniżał, indukowane amoniakiem, nitrację i fosforylację białek [266] oraz stres nitrozacyjny w szczurzych

astrocytach *in vitro* [163]. Ponadto, MK-801 w warunkach *in vitro* łagodził wywoływane Glu obrzmienie astrocytów [22;52].

W celu bezpośredniego zbadania zaangażowania NMDAr w mechanizm prowadzący do obniżenia poziomu Kir4.1 w układzie *in vivo*, receptor blokowano podając dootrzewnowo memantynę. Wcześniejsze badania innych autorów wykazały, że memantyna, dobrze tolerowany antagonistą NMDAr [174], zmniejszała obrzęk mózgu szczurów z hiperamonemią [294]. W doświadczeniu opisanym w niniejszej rozprawie, memantyna odwróciła hamujący efekt TAA na ekspresję mRNA dla Kir4.1 w korze mózgowej szczurów (**Ryc.V.3**). Wynik ten potwierdza rolę NMDAr w regulacji transkrypcji Kir4.1. Jednocześnie, spostrzeżenie to, w zestawieniu z danymi świadczącymi, że w korze mózgowej Kir4.1 występuje wyłącznie w astrocytach [41;111;221], dowodzi funkcjonalności NMDAr w tych komórkach w warunkach *in vivo*. Interpretacja ta jest zgodna z danymi ostatnio przedstawionymi przez Palygina i wsp. [226], którzy wykazali, że w mózgu myszy, memantyna wykazuje większe powinowactwo do NMDAr astrocytarnych, niż neuronalnych.

Szczegółowe badania nad wpływem Glu na ekspresję Kir4.1 przeprowadzono w astrocytach *in vitro*, co dawało lepszą możliwość wniknięcia w istotę mechanizmu tego efektu. Glu, dodany do hodowli komórkowych astrocytów, powodował obniżenie ekspresji Kir4.1 na poziomie mRNA i białka (**Ryc.V.9 i V.10**). Podawanie Glu razem z amoniakiem nie powodowało natomiast obniżenia ilości mRNA dla Kir4.1 (**Ryc.V.9**). Odwrócenie przez amoniak efektu Glu dodatkowo wzmacnia hipotezę, że to Glu może być czynnikiem obniżającym transkrypcję Kir4.1 – zwiększenie wydajności syntezy Gln (z Glu i amoniaku) obniża stężenie lub dostępność Glu dla efektorów komórkowych. Fakt, iż na poziomie białka stopień obniżenia ekspresji Kir4.1 przez Glu i i Glu łącznie z amoniakiem jest porównywalny (**Ryc.V.9B**), wskazuje z kolei na możliwość, że również Glu pochodzący z metabolizmu Gln przyczynia się do zmian poziomu ekspresji Kir4.1.

Dalsze badania potwierdziły wniosek wyciągnięty z badań *in vivo*, że mechanizm indukowanego przez Glu obniżenia ekspresji Kir4.1 w astrocytach jest zależny od NMDAr (**Ryc.V.10**). Po pierwsze, efekt Glu udało się odtworzyć przy użyciu samego NMDA (**Ryc.V.10**). Po drugie, antagoniści NMDAr – niekompetycyjny MK-801 i kompetycyjny AP-5 – znosiły efekt działania Glu (**Ryc.V.10**). Kwas kynureninowy (KYNA), jedyny endogeny antagonistą NMDAr [291], nie modulował natomiast wpływu Glu na poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach (**Ryc.V.10**).

Może to wynikać z różnic w powinowactwie poszczególnych antagonistów do NMDAr ze względu na ich skład podjednostkowy [67] i/lub mechanizmu działania. MK-801 jest

blokerem kanału receptora, natomiast KYNA jest antagonistą miejsca glicynowego [67;291]. Badania własne wykluczyły, jak dotąd, udział receptorów glutaminianergiczných typu I (**Ryc.V.10**).

Równolegle do badania receptorowego oddziaływania Glu na ekspresję Kir4.1, sprawdzano wpływ wewnątrzkomórkowego Glu na ten proces. W tym celu zastosowano inhibitory dokomórkowego transportu Glu - PDC i TBOA, których właściwości zostały dobrze scharakteryzowane w hodowlach astrocytarnych [295]. W zastosowanych stężeniach, ani PDC, ani TBOA nie obniżyły żywotności komórek, określanej za pomocą testu MTT (**Ryc.V.15**).

PDC jest kompetycyjnym inhibitorem transportu Glu, który może promować wyrzut Glu na zewnątrz komórki [295]. W zastosowanych warunkach doświadczalnych, PDC powodował obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 oraz nie hamował wpływu Glu na ten proces (**Ryc.V.11**). Wynik skłania do spekulacji, że zwiększenie wyrzutu endogennego Glu z komórek przez PDC promuje zewnątrzkomórkowe, receptorowe oddziaływanie Glu.

W przeciwieństwie do PDC, TBOA przywracał obniżony przez Glu poziom mRNA dla Kir4.1 do wartości kontrolnych (**Ryc.V.11**). Nie stwierdzono wpływu samego TBOA na ilość transkryptu Kir4.1 (**Ryc.V.11**). Implikuje to wniosek, że obniżenie ekspresji Kir4.1 w sposób zależny od NMDAr (**Ryc.V.10**), wspomagane jest przez wewnątrzkomórkowe oddziaływanie Glu, o nieznanym jak dotąd mechanizmie. Być może Glu działa podobnie jak amoniak, który modulował funkcje NMDAr poprzez zwiększenie fosforylacji podjednostki NR1 i zmniejszenie powinowactwa MK-801 do receptorów neuronalnych *in vitro* [261]. Inkubacja z amoniakiem lub Gln nie powodowała wzrostu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego poziomu Glu (**Ryc.V.8.2**), co mogłoby świadczyć, iż za efekt odpowiada jakaś niewielka pula Glu, nie rzutująca na całą jego zawartość

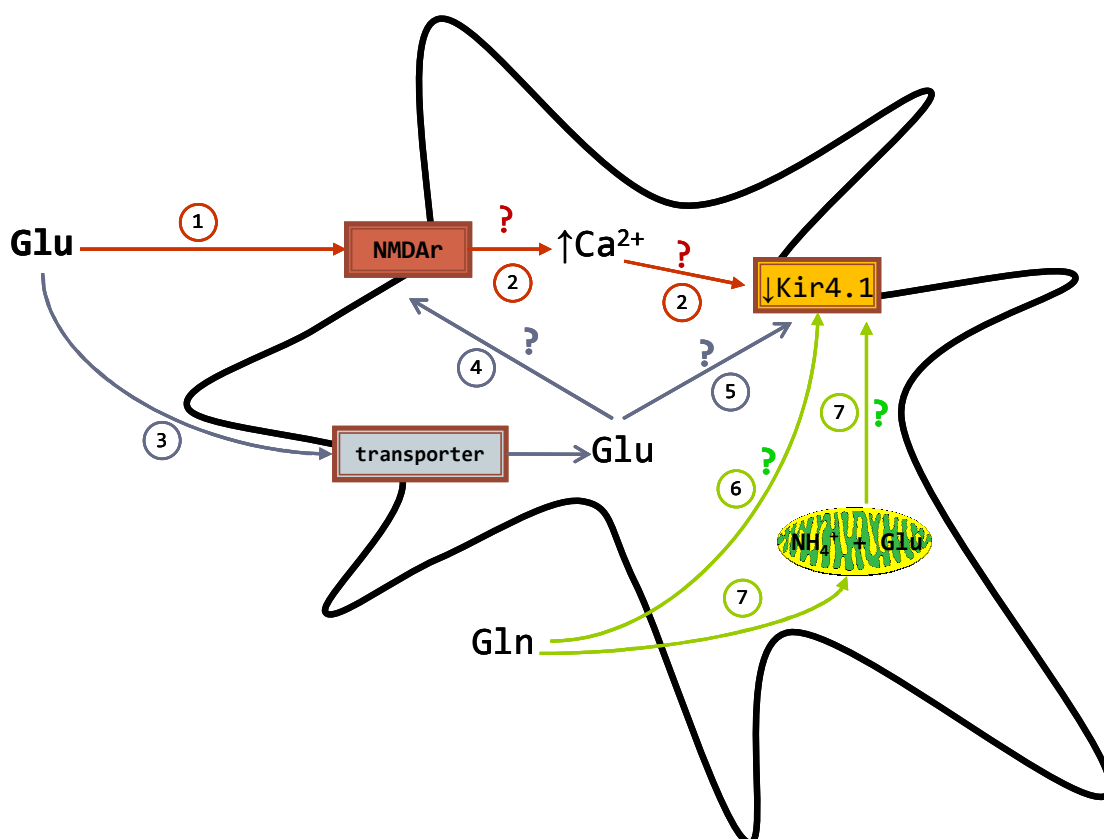
W celu dalszego poznania mechanizmu, w jaki Glu powoduje obniżenie ekspresji Kir4.1, zastosowano inhibitory ONS oraz HDACi. Przesłankę do zastosowania HDACi stanowiła wiedza, że:

- aktywacja HDAC skutkuje represją transkrypcji na skutek deacetylacji histonów w chromatynie (i odwrotnie – aktywacja acetylaz histonowych, prowadząca do hiperacetylacji histonów, jest sposobem zwiększenia procesu transkrypcji) [70];
- napływ  $Ca^{2+}$  do komórki powoduje aktywację kinazy zależnej od wapnia CaMK II, która następnie aktywuje HDAC klasy II, mogące ulegać translokacji z i do jądra komórkowego [70]

- HDACi okazały się protekcyjne wobec komórek OUN: trychostatyna A chroniła neurony przed stresem oksydacyjnym, spowodowanym niedoborem GSH, w modelach *in vivo* i *in vitro* [258]; walproinian chronił hodowle neuronalne przed ekscytotoksycznym, zależnym od NMDAr, efektem działania Glu [35]; poprzez obniżenie reakcji zapalnej TSA zwiększała przeżywalność astrocytów (oceniając testem MTT) narażonych na OGD [205]. Inhibitory HDAC nie modulowały obniżenia transkrypcji Kir4.1 wywoływanej przez Glu, żaden z wyżej wymienionych mechanizmów nie ma tu zatem zastosowania (**Ryc.V.13**).

Inhibitory stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego – Tau, APO i L-NNA – nie wpłynęły modulując na zależne od Glu obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 w astrocytach (**Ryc.V.12**). Oznacza to, że ścieżka sygnałowa, prowadząca od NMDAr do zmian ekspresji Kir4.1 nie krzyżuje się z mechanizmami wyzwalającymi stres oksydacyjny. GEE natomiast, będący przechodzącą przez błony komórkowe pochodną GSH, znacząco obniżał poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach i potęgował efekt Glu (**Ryc.V.12**). Jedną z możliwości wyjaśnienia tego zjawiska jest fakt, iż GEE może być metabolizowany do Glu przez  $\gamma$ -glutamylotranspeptydazę.

Podsumowanie uzyskanych wyników dotyczących wpływu Gln i Glu na obniżenie ekspresji kanału Kir4.1 w astrocytach, przedstawiono na Ryc. VI.1. Na schemacie zaznaczono również potencjalne ścieżki sygnałowe, mogące stanowić element mechanizmu molekularnego, prowadzącego do modulacji ekspresji Kir4.1 (Ryc.VI.1).



Ryc.VI.1. Schemat oddziaływania Glu i Gln prowadzącego do obniżenia ekspresji kanału potasowego Kir4.1 w astrocytach.

Glu powoduje obniżenie ekspresji Kir4.1 na drodze zależnej od NMDAr (1). Oprócz oddziaływania receptorowego, Glu działa również wewnątrzkomórkowo (3), poprzez zmianę właściwości NMDAr (4), lub obniżenie transkrypcji Kir4.1 w inny sposób (5). Gln również powoduje obniżenie ekspresji Kir4.1 w astrocytach: bezpośrednio (6) lub pośrednio, poprzez generację wewnątrzkomórkowej puli Glu (7). Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w zależną od Glu i Gln regulację ekspresji Kir4.1 nie zostały jak dotąd zidentyfikowane (2,6).

Gln – glutamina, Glu – glutaminian, NMDAr – receptor NMDA

## VII. WNIOSKI

1. W korze mózgowej szczurów z EW wywołaną ostrą niewydolnością wątroby (model TAA) następuje obniżenie ekspresji kanału potasowego Kir4.1, co wspiera hipotezę o zaangażowaniu tego kanału w patomechanizm schorzenia.
2. Spadek ekspresji kanału Kir4.1 obserwowany w mózgu *in vivo*, daje się odtworzyć w astrocytach po ich traktowaniu Gln i Glu lecz nie amoniakiem. Wynik wspiera jedno z założeń hipotezy konia Trojańskiego (Albrecht i Norenberg, Hepatology, 2006) mówiącej, iż glejotoksyczne działanie amoniaku w warunkach EW przynajmniej po części zależy od syntezy Gln i jej degradacji w mitochondriach.
3. Efektem patofizjologicznym spadku ekspresji Kir4.1 w astrocytach przez Gln był spadek zdolności astrocytów do wyrzutu jonów potasu. Z kolei nadekspresja Kir4.1 spowodowała spadek wrażliwości komórek linii HEK 293T na wywołane amoniakiem zmiany objętości i transportu  $K^+$  w medium hipotonicznym ( $^{86}Rb$ ). Oba wyniki łącznie dokumentują rolę Kir4.1 w utrzymaniu równowagi potasowej komórek w warunkach hiperamonemii.
4. Obniżenie ekspresji Kir4.1 na drodze transfekcji siRNA spowodowało obrzmienie komórek astrogleju w stopniu podobnym do inkubacji z Gln, co wskazuje iż upośledzenie funkcji Kir4.1 zaburza regulację objętości komórek astrogleju, a tym samym może stanowić czynnik sprawczy w patomechanizmie cytotoksycznego obrzęku mózgu w EW.
5. Indukowane w astrocytach *in vitro* obniżenie ekspresji Kir4.1 przez Glu wynika ze skojarzenia aktywacji receptorów NMDA z wewnątrzkomórkowym oddziaływaniem Glu o nieznanym mechanizmie.
6. Złagodzenie obniżenia ekspresji Kir4.1 u szczurów z EW przez podanie antagonisty receptora NMDA, memantyny, świadczy o zaangażowaniu tych receptorów w upośledzenie ekspresji Kir4.1 w warunkach *in vivo*.



## VIII. STRESZCZENIE

Encefalopatia wątrobowa (EW), będąca złożonym schorzeniem neuropsychiatrycznym, powstaje na skutek upośledzenia funkcji detoksykacyjnych wątroby. Obrzęk mózgu jest najpoważniejszym powikłaniem ostrej EW: śmiertelność z jego powodu sięga tu 80%.

EW wątrobowa jest pierwotną gliopatią, co oznacza, że zmiany patomorfologiczne obserwowane są najpierw, a nadto prawie wyłącznie w komórkach gleju, astrocytach. Astrocyty ulegają obrzmieniu w warunkach EW, co przekłada się na cytotoksyczny obrzęk mózgu z następczym wzrostem ciśnienia śródczaszkowego.

Głównym czynnikiem patogennym w EW jest amoniak. Stopień zaawansowania schorzenia na ogół koreluje ze stężeniem amoniaku we krwi, a obrzmienie astrocytów pod wpływem amoniaku udokumentowano w doświadczalnych modelach EW i hiperamonemii, oraz w astrocytach traktowanych amoniakiem *in vitro*.

Produktem detoksykacji amoniaku w mózgu jest Gln, której synteza (z amoniaku i Glu) zachodzi wyłącznie w astrocytach. Gln, gromadzącej się w nadmiarze w warunkach hiperamonemii/EW, przypisuje się rolę w pośredniczeniu neurotoksyczności amoniaku. Według hipotezy „konia Trojańskiego”, zaproponowanej przez Albrechta i Norenberga (2006), amoniak uwolniony z Gln w mitochondriach upośledza strukturę i funkcje tych organelli (zwiększa przepuszczalność błon mitochondrialnych) i w następstwie prowadzi do obrzmienia astrocytów ze wszystkimi konsekwencjami typowymi dla patogenezy EW. Doświadczeniem kluczowym w procesie dowodzenia słuszności hipotezy konia Trojańskiego było wykazanie, że His, inhibitor transportu Gln do mitochondriów, łagodzi zmiany wywołane przez Gln w mitochondriach *in vitro* oraz obrzęk mózgu w modelu EW *in vivo*.

Molekularny mechanizm obrzmienia astrocytów nie jest jednak w pełni poznany. Uważa się, że jest on wypadkową wywołanych przez amoniak i wzajemnie przyczynowo powiązanych zaburzeń: akumulacji osmolitów (w tym Gln), stresu nitrozo-oksydacyjnego (ONS), obniżenia metabolizmu energetycznego i indukcji MPT oraz działania cytokin prozapalnych. Na patomechanizm hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów składają się także zaburzenia homeostazy wodno-jonowej – postuluje się, że w regulację objętości komórkowej w tych warunkach zaangażowane są m.in. kanały potasowe Kir4.1 (ang. *inwardly rectifying potassium channel*). W OUN kanał Kir4.1 jest odpowiedzialny za buforowanie jonów K<sup>+</sup> oraz regulację objętości komórkowej astrocytów. Rola buforowania

jonów potasu w mechanizmie towarzyszącego EW/hiperamonemii obrzęcia astrocytów nie była jak dotąd szczegółowo badana. Stąd za cel niniejszej pracy postawiono zbadanie ekspresji i niektórych własności kanału Kir4.1 w mózgu w modelu EW *in vivo* oraz *in vitro*, w astrocytach poddawanych działaniu amoniaku oraz Gln.

Obniżoną ekspresję kanału Kir4.1 stwierdzono w korze mózgowej szczurów z encefalopatią wątrobową (EW) indukowaną podaniem tioacetamidu (TAA), a także w pierwotnych korowych astrocytach szczurzych, traktowanych Gln – produktem detoksykacji amoniaku, ale nie amoniakiem *per se*. W prezentowanej pracy potwierdzono zaangażowanie Kir4.1 w regulację objętości komórkowej astrocytów – selektywne wyciszenie ekspresji Kir4.1 za pomocą siRNA spowodowało obrzęcie astrocytów *in vitro*. Powyższe wyniki wskazują więc pośrednio na zaangażowanie Kir4.1 w patomechanizm obrzęku mózgu w EW. Na rolę niedoboru Kir4.1 w utrzymaniu przez komórki prawidłowego gradientu jonów potasu wskazywało również obniżanie przez Gln zdolności astrocytów do wychwytu Glu oraz do wyrzutu  $K^+$ : ten ostatni efekt ujawnił się w warunkach stresu hipoosmotycznego, stanowiącego jeden z dobrze udokumentowanych czynników patogennych w EW.

Spadek ekspresji Kir4.1, obserwowany u zwierząt w modelu EW (model TAA), nie był jednak modulowany przez His, co wskazało, że mechanizm, w jaki Gln przyczynia się do obniżenia ekspresji Kir4.1 nie ogranicza się do opisanego w hipotezie „konia Trojańskiego”. Postawiono hipotezę, że czynnikiem modulującym ekspresję kanału może być również Glu, generowany z Gln w mitochondriach bądź występujący w nadmiarze w przestrzeni pozakomórkowej. Nadmiar Glu odpowiada za ekscytotoksyczne nadpobudzenie NMDAr w neuronach, co wykazano zarówno w warunkach hiperamonemii *in vivo*, jaki w hodowlach neuronów traktowanych amoniakiem. Wcześniej wykazano, że memantyna, antagonistą NMDAr, skutecznie w łagodzi obrzęk mózgu wywołany ostrą hiperamonemią. W niniejszej pracy, memantyna odwróciła efekt TAA, przywracając poziom mRNA dla Kir4.1 do poziomu kontrolnego. Wynik ten potwierdza założenie o zaangażowaniu NMDAr w regulację transkrypcji Kir4.1.

Dalsze badania nad udziałem Glu i NMDAr w tym procesie prowadzono w astrocytach *in vitro*. Stwierdzono, że Glu obniża ekspresję kanału Kir4.1, a proces ten obejmuje aktywację NMDAr na astrocytach. Efekt Glu udało się odtworzyć przy pomocy NMDA, a obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 indukowane przez Glu niwelowane było przez antagonistów NMDAr (MK-801 i AP-5). Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami literaturowymi o istnieniu funkcjonalnych NMDAr na astrocytach *in vitro* oraz o ich zaangażowaniu w patomechanizm oddziaływania amoniaku.

Wywołane przez Glu obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1 w astrocytach ulegało zahamowaniu pod wpływem niekompetycyjnego inhibitora transportu Glu, TBOA, wskazując na istnienie wewnątrzkomórkowego mechanizmu modulowania ekspresji Kir4.1. Inhibitor kompetycyjny, PDC, który może powodować odwrócenie transportu Glu i jego wyrzut z komórki, nie znosił natomiast efektu Glu. Może to świadczyć o promowaniu przez PDC autokrynnego, receptorowego oddziaływania Glu.

Stosowanie inhibitorów deacetylaz histonowych (trychostatyny A i walproinianu), które okazywały się neuroprotektoryjne wobec neuronów i mikrogleju, nie wpływało ani na bazalny, ani na obniżony pod wpływem Glu poziom mRNA dla Kir4.1.

Podanie do hodowli astrocytarnej związków obniżających ONS (Tau, APO, L-NNA) również nie wpływało modulująco na poziom mRNA Kir4.1. Natomiast GEE, (przechodząca przez błonę pochodna GSH, ulegająca wewnątrzkomórkowemu rozkładowi do Glu), powodował znaczne obniżenie poziomu mRNA dla Kir4.1.

W sumie wyniki badań nad rolą Glu wskazują, że w warunkach EW, jego gromadzenie się w nadmiarze może być czynnikiem obniżającym ekspresję Kir4.1 w astrocytach mózgu, co czyni ten aminokwas nośnikiem toksyczności amoniaku w łańcuchu zdarzeń prowadzących do obrzmienia astrocytów i hiperamonemicznego obrzęku mózgu.

## IX. ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric disorder resulting from acute or chronic liver failure. The spectrum of HE symptoms includes motor and intellectual deficiencies. Cerebral edema is a major clinical complication of HE, leading to intracranial hypertension which is fatal for most of the patients with acute liver failure.

HE is a primary gliopathy – pathomorphological abnormalities are observed only in the astrocytes. The swelling of astrocytes is a direct cause of HE-related cytotoxic cerebral edema.

Ammonia is a neurotoxin regarded as a major pathogenic factor in acute or chronic HE. The level of blood ammonia correlates with severity of HE and ammonia-induced swelling of astrocytes was observed in patients and experimental animals with HE and in cultured astrocytes.

Hyperammonemic brain edema is thought to be related not only to ammonia itself, but to Gln, which is synthesized in astrocytes from Glu and ammonia and accumulates in excess as a byproduct of ammonia detoxification (Albrecht and Norenberg, 2006). The mechanism underlying the mediation of toxic effects of ammonia by Gln involves Gln transport into mitochondria, whereupon it is degraded to Glu and ammonia, and of the two products, ammonia is thought to cause mitochondrial dysfunction (the “Trojan horse” mechanism, Albrecht and Norenberg, 2006). The Trojan horse hypothesis was previously confirmed in the *in vivo* setting – His, the inhibitor of Gln transport into mitochondria, ameliorated brain edema accompanying HE induced in rats by intraperitoneal administration of hepatotoxic substance, TAA.

The exact molecular pathomechanism of the hyperammonemic glial swelling is not understood in detail yet. Accumulation of Gln and other osmolytes, MPT induction, bioenergetic failure, ONS and systemic inflammation, while contributing to edema formation, do not exhaust the list of causes.

Recently, it was proposed that disturbances of water and potassium homeostasis are involved in the pathomechanism of ammonia-induced astrocytic swelling as well. Consistent with this notion, hyperammonemic brain edema is aggravated by hypoosmotic imbalance due to hyponatremia. In the central nervous system, potassium buffering is executed mainly by inwardly rectifying potassium channels (Kir), mainly by the Kir4.1 channel. It abounds in astrocytes where has been implicated in bidirectional K<sup>+</sup> movement across the cell membrane and cell volume regulation.

The role of potassium buffering in the swelling of astrocytes in hyperammonemia/HE has not been investigated in detail yet, therefore the aim of the studies to be included in the dissertation was to investigate the expression and some functional properties of Kir4.1 in the *in vivo* model of HE and *in vitro* in cultured astrocytes treated with ammonia or Gln.

Decreased expression of Kir4.1 was noted in cerebral cortex of rats with the TAA-induced HE, and in cultured astrocytes treated with Gln, but not with ammonia alone.

The presented results confirmed the role of Kir4.1 in regulation of cell volume – the silencing of Kir4.1 expression by siRNA resulted in swelling of astrocytes, in the extent similar to the effect of ammonia or Gln. The results indicates indirectly to the possible engagement of Kir4.1 in the pathomechanism of brain edema in HE.

The role of Kir4.1 in maintaining the proper ionic gradient across cellular membranes underscores also the fact, that Gln decreased the ability of astrocytes to uptake Glu and to release  $K^+$ . The latter effect was manifested in conditions of hypoosmotic stress, that represents hyponatremia – a precipitating factor in the pathomechanism of HE, aggravating the ammonia-induced ionic imbalance.

The decrease of Kir4.1 expression observed in cerebral cortex of rats with TAA-induced HE was not modulated by His. It indicates that inhibition of Kir4.1 transcription does not operate solely *via* the mechanism of Trojan horse.

The supplementary hypothesis proposes that the factor modulating the Kir4.1 expression is Glu – either generated in mitochondria from Gln, either present in excess in the extracellular space. The elevation of extracellular Glu, observed both in patients and *in vivo* and *in vitro* models of acute HE or hyperammonemia, is responsible for excitotoxic overactivation of neuronal NMDA receptors (NMDAr). In the previous study, it was shown that memantine, NMDAr antagonist, attenuated brain edema accompanying acute hyperammonemia in rats. In the present study, memantine reversed the effect of TAA, preventing the Kir4.1 mRNA decrease, confirming the role of NMDAr in the mechanism of Kir4.1 transcription regulation.

Further experiments were conducted on the astrocytes *in vitro*. Treatment of cultured astrocytes with Glu or NMDA reduced Kir4.1 expression, and the effect was attenuated by antagonists of the NMDAr (MK-801 and AP-5) but not by a metabotropic Glu receptor antagonist (MTEP). This observation is consistent with available data on presence of functional NMDAr in astrocytes and their involvement in pathomechanism of ammonia neurotoxicity.

The Glu-induced decrease of Kir4.1 mRNA was abolished by a non-transportable (TBOA) but not by a transportable Glu uptake inhibitor (PDC), indicating the intracellular mechanism of Glu action.

Neither basal nor the decreased by Glu expression of Kir4.1 were affected by histone deacetylase inhibitors (trichostatin A, valproate), which are protective in microglia and neurons. The antioxidants taurine and apocynin, and the nitric oxide synthase inhibitor (L-nitroarginine) did not modulate the effect of Glu. However, Kir4.1 expression was decreased, and the effect of Glu on Kir4.1 expression was potentiated, by glutathione diethyl ester, an antioxidant which, like Gln, is degraded intracellularly to Glu.

The results of the doctoral dissertation indicate that Glu which accumulates in the ECS of the brain during HE, may be a factor decreasing the Kir4.1 expression in the astrocytes. The mechanism underlying this effect encompasses NMDAr signaling, aided by an unidentified precedent intracellular action. The Glu-induced decrease of Kir4.1 expression and, subsequently, its dysfunction, may contribute to the astrocytic swelling and hyperammonemic brain edema.

**X. LITERATURA**

1. Albrecht J. Ammonia toxicity in the central nervous system. Lajtha, A. 261-275. 2007. Springer Science&Business Media, LLC. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology.
2. Albrecht J. Hepatic encephalopathy in our genes? *Ann Intern Med* **2010**; 153: 335-336.
3. Albrecht J. Role of ammonia in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Mullen, K. D. and Prakash, R. 2012. Humana pres Inc. Hepatic encephalopathy.
4. Albrecht J, Bender AS, Norenberg MD. Ammonia stimulates the release of taurine from cultured astrocytes. *Brain Res* **1994**; 660: 288-292.
5. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* **1999**; 170: 138-146.
6. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* **2006**; 44: 788-794.
7. Albrecht J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Zielinska M, Aschner M. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol* **2010**; 6: 263-276.
8. Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci* **2007**; 12: 332-343.
9. Albrecht J, Wysmyk-Cybula U, Rafalowska U. 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* **1985**; 72: 317-320.
10. Albrecht J, Zielinska M. Glutaminian jako glioprzekaznik: wędrówka po synapsie trójdzielnej. Wierońska, J. and Pilc, A. 12-22. 2009. Wydawnictwo "Platan". Pobudzające aminokwasy III. XXVI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN.
11. Albrecht J, Zielinska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol* **2010**; 80: 1303-1308.
12. Allert N, Koller H, Siebler M. Ammonia-induced depolarization of cultured rat cortical astrocytes. *Brain Res* **1998**; 782: 261-270.
13. Alpi E, Landi E, Barilari M et al. Channel-interacting PDZ protein, 'CIPP', interacts with proteins involved in cytoskeletal dynamics. *Biochem J* **2009**; 419: 289-300.
14. Amiry-Moghaddam M, Hoddevik EH, Ottersen OP. Aquaporins: multifarious roles in brain. *Neuroscience* **2010**; 168: 859-861.
15. Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M et al. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100: 13615-13620.
16. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM et al. Alpha syntrophin deletion removes the perivascular but not the endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J* **2004**; 10.1096/fj.03-0869fj.

17. Ascher NL, Lake JR, Emond JC, Roberts JP. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Arch Surg* **1993**; 128: 677-682.
18. Babington JR, Stahl JH, Coy DL. Reversible cytotoxic edema in a cirrhotic patient following TIPS. *J Neuroimaging* **2009**; 19: 391-393.
19. Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* **2001**; 66: 981-991.
20. Bay V, Butt AM. Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* **2012**; 60: 651-660.
21. Bender AS, Norenberg MD. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* **1996**; 21: 567-573.
22. Bender AS, Schousboe A, Reichelt W, Norenberg MD. Ionic mechanisms in glutamate-induced astrocyte swelling: role of K<sup>+</sup> influx. *J Neurosci Res* **1998**; 52: 307-321.
23. Benesova J, Rusnakova V, Honsa P et al. Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One* **2012**; 7: e29725.
24. Benfenati V, Ferroni S. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* **2010**; 168: 926-940.
25. Bessman SP, Bessman AN. The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with an hypothesis for the mechanism of hepatic coma. *J Clin Invest* **1955**; 34: 622-628.
26. Bhatia V, Singh R, Acharya SK. Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* **2006**; 55: 98-104.
27. Bianchi G, Giovagnoli M, Sasdelli AS, Marchesini G. Hepatic encephalopathy and health-related quality of life. *Clin Liver Dis* **2012**; 16: 159-170.
28. Bismuth H, Samuel D, Castaing D, Williams R, Pereira SP. Liver transplantation in Europe for patients with acute liver failure. *Semin Liver Dis* **1996**; 16: 415-425.
29. Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS. The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. *Metab Brain Dis* **2009**; 24: 5-14.
30. Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **1994**; 19: 1437-1444.
31. Blum AE, Walsh BC, Dubyak GR. Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptor-dependent ATP release from 1321N1 astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**; 298: C386-C396.
32. Bolton S, Greenwood K, Hamilton N, Butt AM. Regulation of the astrocyte resting membrane potential by cyclic AMP and protein kinase A. *Glia* **2006**; 54: 316-328.



33. Bosman DK, Deutz NEP, Maas MAW et al. Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J Neurochem* **1992**; 59: 591-599.
34. Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* **2009**; 24: 95-102.
35. Bown CD, Wang JF, Young LT. Attenuation of N-methyl-D-aspartate-mediated cytoplasmic vacuolization in primary rat hippocampal neurons by mood stabilizers. *Neuroscience* **2003**; 117: 949-955.
36. 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: 248-254.
37. Brasse-Lagnel C, Lavoinne A, Husson A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *FEBS J* **2009**; 276: 1826-1844.
38. Brumback RA, Lapham LW. DNA synthesis in Alzheimer type II astrocytosis. The question of astrocytic proliferation and mitosis in experimentally induced hepatic encephalopathy. *Arch Neurol* **1989**; 46: 845-848.
39. Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics* **2010**; 7: 452-470.
40. Brusilow SW, Traystman RJ. Letter to the editor. *New England Journal of Medicine* **1986**; 314: 786.
41. Butt AM, Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* **2006**; 10: 33-44.
42. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* **2002**; 17: 221-227.
43. Butterworth RF. Molecular neurobiology of acute liver failure. *Semin Liver Dis* **2003**; 23: 251-258.
44. Butterworth RF. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2007**; 22: 309-320.
45. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a primary astrocytopathy. Parpura, V. and Haydon, P. G. 673-692. 2009. Springer Science & Business Media, LLC. Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System.
46. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* **2011**; 53: 1372-1376.
47. Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemical Patholog* **1987**; 6: 1-12.
48. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* **2009**; 29: 783-788.
49. Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigo R et al. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* **2011**; 140: 638-645.

50. Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigues TB, Cerdan S, Felipo V. Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem* **2007**; 103: 1334-1343.
51. Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* **2000**; 37: 243-248.
52. Chan PH, Chu L, Chen S. Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary cell culture. *J Neurosci Res* **1990**; 25: 87-93.
53. Chang HK, Shieh RC. Conformational changes in Kir2.1 channels during NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-induced inactivation. *J Biol Chem* **2003**; 278: 908-918.
54. Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **2010**; 25: 17-21.
55. Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* **2009**; 50: 1914-1923.
56. Chen J, Herrup K. Glutamine acts as a neuroprotectant against DNA damage, beta-amyloid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress. *PLoS One* **2012**; 7: e33177.
57. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**; 162: 156-159.
58. Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatol* **1999**; 29: 648-653.
59. Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* **2004**; 279: 28387-28392.
60. Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* **1996**; 17: 254-258.
61. Conti F, Vitellaro Zuccarello L, Barbaresi P, Minelli A, Brecha NC, Melone M. Neuronal, glial, and epithelial localization of gamma-aminobutyric acid transporter 2, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter, in the cerebral cortex and neighboring structures. *J Comparative Neurology* **1999**; 409: 482-494.
62. Cooper AJL, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* **1987**; 67: 440-519.
63. Corbalan R, Montoliu C, Minana M-D et al. Altered modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in patients with liver disease. *Metab Brain Dis* **2002**; 17: 295-301.
64. Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portacaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* **1996**; 24: 919-923.
65. Cruz NF, Duffy TE. Local cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shunts. *J Cereb Blood Flow Metab* **1983**; 3: 311-320.

66. D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR. Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *J Neurophysiol* **2002**; 87: 87-102.
67. Danysz W, Frankiewicz T, Sopala M. Receptory glutaminianergiczne. Nowak, J. Z. and Zawilska, J. B. 382-413. 2004. Wydawnictwo Naukowe PWN. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
68. de Kneegt RJ, Gramsbergen JB, Schalm SW. <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> autoradiography in brain from rabbits with encephalopathy from acute liver failure or acute hyperammonemia. *Metab Brain Dis* **1994**; 9: 153-160.
69. de Kneegt RJ, Schalm SW, van der Rijt CCD, Fekkes D, Dalm E, Hekking-Weyma I. Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: An experimental study based on in vivo brain dialysis. *J Hepatol* **1994**; 20: 19-26.
70. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **2003**; 370: 737-749.
71. Dibaj P, Kaiser M, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Neusch C. Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem* **2007**; 103: 2620-2628.
72. Dixit V, Chang TM. 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* **1990**; 36: 21-27.
73. Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* **2007**; 27: 11354-11365.
74. Dolinska M, Hilgier W, Albrecht J. Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neurosci Lett* **1996**; 213: 45-48.
75. Domek-Lopacinska KU, Strosznajder JB. Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **2010**; 41: 129-137.
76. Ehrlich M, Plum F, Duffy TE. Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia loading. *J Neurochem* **1980**; 34: 1538-1542.
77. Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipe V. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res* **2005**; 1036: 115-121.
78. Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipe V. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* **2005**; 41: 299-306.
79. Felipe V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiol* **2002**; 67: 259-279.
80. Fisher JL, Margulies SS. Na(+)-K(+)-ATPase activity in alveolar epithelial cells increases with cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**; 283: L737-L746.
81. Fisher SK, Heacock AM, Keep RF, Foster DJ. Receptor regulation of osmolyte homeostasis in neural cells. *J Physiol* **2010**; 588: 3355-3364.

82. Giguere JF, Butterworth RF. Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Res* **1984**; **9**: 1309-1321.
83. Giordano G, Sanchez-Perez AM, Montoliu C et al. Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrin 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. *J Neurochem* **2005**; **94**: 808-818.
84. Gorg B, Bidmon HJ, Keitel V et al. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**; **449**: 104-114.
85. Gorg B, Foster N, Reinehr R et al. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* **2003**; **37**: 334-342.
86. Gorg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartskhava N, Schror K, Haussinger D. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* **2010**; **58**: 691-705.
87. Gorg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ et al. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* **2010**; **52**: 256-265.
88. Gorg B, Qvartskhava N, Keitel V et al. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* **2008**; **48**: 567-579.
89. Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg LO, Norenberg MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. I. Light microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **1985**; **44**: 397-403.
90. Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **1985**; **44**: 404-414.
91. Gupta RK, Saraswat VA, Poptani H et al. Magnetic resonance imaging and localized in vivo proton spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* **1993**; **88**: 670-674.
92. Gutierrez C, Beaty G, Lopez-Vancell R, Estrada S. Mechanism of ammonium translocation in rat liver mitochondria. Finger-printing of the translocator. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **1987**; **37**: 257-275.
93. Haberle J, Gorg B, Rutsch F et al. Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N Engl J Med* **2005**; **353**: 1926-1933.
94. Haussinger D. Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* **2006**; **43**: 1187-1190.
95. Haussinger D, Gerok W. Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. *Eur J Biochem* **1983**; **136**: 421-425.
96. Haussinger D, Gorg B, Reinehr R, Schliess F. Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2005**; **20**: 285-294.
97. Haussinger D, Kircheis G, Schliess F, Schliess R, Vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* **2000**; **32**: 1035-1038.

98. Haussinger D, Laubenberger J, Vom Dahl S et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterol* **1994**; 107: 1475-1480.
99. Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* **2008**; 57: 1156-1165.
100. He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL et al. Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death. *Glia* **2010**; 58: 741-754.
101. Heins J, Zwingmann C. Organic osmolytes in hyponatremia and ammonia toxicity. *Metab Brain Dis* **2010**; 25: 81-89.
102. Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana M-D, Felipo V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* **1996**; 21: 1237-1244.
103. 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: 709-715.
104. Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M et al. 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: 3201-3209.
105. Hernandez R, Martinez-Lara E, Del Moral ML et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* **2004**; 126: 879-887.
106. Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe AS. Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. Shahar, A., DeVellis, J., Vernadakis, A., and Haber, B. 105-108. 1989. Alan R. Liss. A dissection and tissue culture manual for the nervous system.
107. Hertz L, Kala G. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab Brain Dis* **2007**; 22: 199-218.
108. Hibino H, Fujita A, Iwai K, Yamada M, Kurachi Y. Differential assembly of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem* **2004**; 279: 44065-44073.
109. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **2010**; 90: 291-366.
110. Hibino H, Kurachi Y. Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K<sup>+</sup> and water transport systems in brain astroglia. *Eur J Neurosci* **2007**; 26: 2539-2555.
111. Higashi K, Fujita A, Inanobe A et al. An inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* **2001**; 281: C922-C931.
112. Higashimori H, Sontheimer H. Role of Kir4.1 channels in growth control of glia. *Glia* **2007**; 55: 1668-1679.

113. Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. 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* **2003**; 468: 21-25.
114. 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: 186-188.
115. Hilgier W, Olson JE. Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* **1994**; 62: 197-204.
116. Hilgier W, Wegrzynowicz M, Maczewski M et al. 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* **2008**; 33: 267-272.
117. Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD et al. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* **1999**; 56: 76-84.
118. Hindfelt B, Plum F, Duffy TE. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J Clin Invest* **1977**; 59: 386-396.
119. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* **2009**; 89: 193-277.
120. Horio Y, Hibino H, Inanobe A et al. Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J Biol Chem* **1997**; 272: 12885-12888.
121. Huang CH, Liu PZ. New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol Dis* **2001**; 27: 90-101.
122. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* **1992**; 72: 101-163.
123. Iandiev I, Pannicke T, Hollborn M et al. Localization of glial aquaporin-4 and Kir4.1 in the light-injured murine retina. *Neurosci Lett* **2008**; 434: 317-321.
124. Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T et al. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* **2006**; 396: 97-101.
125. Isaacks RE, Bender AS, Kim CY, Shi YF, Norenberg MD. Effect of ammonia and methionine sulfoximine on myo-inositol transport in cultured astrocytes. *Neurochem Res* **1999**; 24: 51-59.
126. Ishii M, Fujita A, Iwai K et al. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in retina. *Am J Physiol Cell Physiol* **2003**; 285: C260-C267.
127. Jalan R, Olde Damink SWM, Hayes PC, Deutz NEP, Lee A. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* **2004**; 41: 613-620.
128. Jalan R, Rose C. Hypothermia in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **2004**; 19: 215-221.

129. Jalan R, SW OD, Deutz NE, Lee A, Hayes PC. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* **1999**; 354: 1164-1168.
130. Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ. L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* **2007**; 69: 1064-1069.
131. Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M et al. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* **2008**; 283: 33874-33882.
132. Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy C, Norenberg MD. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci* **2006**; 26: 4774-4784.
133. Jayakumar AR, Rao KV, Murthy C, Norenberg MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* **2006**; 48: 623-628.
134. Jayakumar AR, Rao KVR, Schousboe A, Norenberg MD. Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* **2004**; 46: 296-301.
135. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* **2009**; 29: 944-952.
136. Kala G, Kumarathan R, Peng L, Leenen FH, Hertz L. Stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, increase in potassium uptake, and enhanced production of ouabain-like compounds in ammonia-treated mouse astrocytes. *Neurochem Int* **2000**; 36: 203-211.
137. Karl A, Wurm A, Pannicke T et al. Synergistic action of hypoosmolarity and glutamine in inducing acute swelling of retinal glial (Muller) cells. *Glia* **2011**; 59: 256-266.
138. Kato H, Narita M, Miyoshi K et al. Implication of Src family kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in the rewarding effect of morphine. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **2006**; 26: 119-124.
139. Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* **1992**; 15: 1060-1066.
140. Kawaguchi T, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC. Glutamine-dependent inhibition of pial arteriolar dilation to acetylcholine with and without hyperammonemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**; 288: R1612-R1619.
141. Kelly T, Kafitz KW, Roderigo C, Rose CR. Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia* **2009**; 57: 921-934.
142. Kelly T, Rose CR. Ammonium influx pathways into astrocytes and neurones of hippocampal slices. *J Neurochem* **2010**; 115: 1123-1136.

143. Kilpartick I. Rapid automated HPLC analysis of neuroactive and other amino acids in microdissected brain regions and brain slice superfusates using fluorometric detection. Greenstein, B. 555-578. 1991. Harwood Academic. Neuroendocrine research methods.
144. Kimelberg H. Cell volume in the CNS: regulation and implications for nervous system function and pathology. *Neuroscientist* **2000**; 6: 13-24.
145. Kitzberger R, Funk GC, Holzinger U et al. Severity of organ failure is an independent predictor of intracranial hypertension in acute liver failure. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2009**; 7: 1000-1006.
146. Kleppisch T, Feil R. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb Exp Pharmacol* **2009**; 549-579.
147. Kletzien RF, Pariza MW, Becker JE, Potter VR. A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Analytical Biochemistry* **1975**; 68: 537-544.
148. Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* **1997**; 229: 201-203.
149. Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* **2000**; 20: 5733-5740.
150. Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **2004**; 129: 1045-1056.
151. Kojic J, Robertson PL, Quint DJ, Martin DM, Pang Y, Sundgren PC. Brain glutamine by MRS in a patient with urea cycle disorder and coma. *Pediatr Neurol* **2005**; 32: 143-146.
152. Konopacka A. Wpływ jonów amonowych na synteze i funkcje cyklicznego GMP w astrocytach i komórkach śródbłonna naczyń mózgowych szczura. 2008. Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im.M. Mossakowskiego PAN.
153. Konopacka A, Konopacki FA, Albrecht J. Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J Neurochem* **2009**; 109 Suppl 1: 246-251.
154. Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med* **1999**; 26: 1369-1374.
155. Kosenko E, Kaminsky A, Kaminsky Y et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Rad Res* **1997**; 27: 637-644.
156. Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana M-D, Grisolia S, Felipo V. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem Res* **1995**; 20: 451-456.
157. Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E et al. 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* **1994**; 63: 2172-2178.



158. Kosenko E, Kaminsky Y, Stavroskaya IG, Felipo V. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res* **2000**; 880: 139-146.
159. Kosenko E, Kaminsky YG, Felipo V, Minana MD, Grisolia S. Chronic hyperammonemia prevents changes in brain energy and ammonia metabolites induced by acute ammonium intoxication. *Biochim Biophys Acta* **1993**; 1180: 321-326.
160. Kramer L, Tribl B, Gendo A et al. Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. *Hepatology* **2000**; 31: 30-34.
161. Kreis R, Farrow N, Ross BD. Diagnosis of hepatic encephalopathy by proton magnetic resonance spectroscopy. *The Lancet* **1990**; 336: 635-636.
162. Kreis R, Farrow N, Ross BD. Localized <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. Analysis of changes in cerebral glutamine, choline and inositols. *NMR Biomed* **1991**; 4: 109-116.
163. Kruczek C, Gorg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Haussinger D. Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+) and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem* **2011**.
164. Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG et al. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* **2007**; 55: 274-281.
165. Kurschner C, Mermelstein PG, Holden WT, Surmeier DJ. CIPP, a novel multivalent PDZ domain protein, selectively interacts with Kir4.0 family members, NMDA receptor subunits, neurexins, and neuroligins. *Mol Cell Neurosci* **1998**; 11: 161-172.
166. Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* **2006**; 26: 2673-2683.
167. Lang W, Block TM, Zander R. Solubility of NH<sub>3</sub> and apparent pK of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in human plasma, isotonic salt solutions and water at 37 degrees C. *Clin Chim Acta* **1998**; 273: 43-58.
168. Laubenberger J, Haussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterol* **1997**; 112: 1610-1616.
169. Lavoie J, Giguere JF, Layrargues GP, Butterworth RF. Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* **1987**; 49: 692-697.
170. Law RO, Zielinska M, Albrecht J. Taurine counteracts cell swelling in rat cerebrocortical slices exposed to ammonia in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol* **2003**; 526: 123-129.
171. Li L, Head V, Timpe LC. Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* **2001**; 33: 57-71.
172. Lichter-Konecki U. Profiling of astrocyte properties in the hyperammonaemic brain: shedding new light on the pathophysiology of the brain damage in hyperammonaemia. *J Inher Metab Dis* **2008**; 31: 492-502.

173. Lichter-Konecki U, Mangin JM, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Gallo V. Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia* **2008**; *56*: 365-377.
174. Lipton SA. NMDA receptors, glial cells, and clinical medicine. *Neuron* **2006**; *50*: 9-11.
175. Litman T, Sogaard R, Zeuthen T. Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. *Handb Exp Pharmacol* **2009**; 327-358.
176. Liu Z, Chen Y, Mo R et al. Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. *J Biol Chem* **2000**; *275*: 25641-25651.
177. 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*: 402-408.
178. Llansola M, Rodrigo R, Monfort P et al. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2007**; *22*: 321-335.
179. Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE et al. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* **1979**; *63*: 449-460.
180. Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* **1991**; *11*: 337-341.
181. Lowry OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; *193*: 265-275.
182. Lv S, Song HL, Zhou Y et al. Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. *Liver Int* **2010**; *30*: 1198-1210.
183. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* **2006**; *23*: 2929-2936.
184. Marcaggi P, Coles JA. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells and role in signalling. *Progress in Neurobiol* **2001**; *64*: 157-183.
185. Marcaida G, Felipe V, Hermenegildo C, Minana M-D, Grisolia S. Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Letters* **1992**; *296*: 67-68.
186. Marcaida G, Kosenko E, Minana M-D, Grisolia S, Felipe V. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. *J Neurochem* **1996**; *66*: 99-104.
187. Mardini H, Smith FE, Record CO, Blamire AM. Magnetic resonance quantification of water and metabolites in the brain of cirrhotics following induced hyperammonaemia. *J Hepatol* **2011**; *54*: 1154-1160.
188. Martinez A. Electron microscopy in human hepatic encephalopathy. *Acta Neuropathol* **1968**; *11*: 82-86.

189. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* **1977**; *195*: 1356-1358.
190. Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **1999**; *30*: 876-880.
191. McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD. Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **1996**; *11*: 329-342.
192. Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* **1996**; *24*: 908-913.
193. Monfort P, Corbalan R, Martinez L, Lopez-Talavera J, Cordoba J, Felipo V. Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* **2001**; *104*: 1119-1125.
194. Montgomery JY, Bajaj JS. Advances in the evaluation and management of minimal hepatic encephalopathy. *Curr Gastroenterol Rep* **2011**; *13*: 26-33.
195. Montoliu C, Rodrigo R, Monfort P et al. Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab Brain Dis* **2010**; *25*: 39-48.
196. Morales-Mulia S, Ordaz B, Quesada O, Pasantes-Morales H. Ca<sup>2+</sup> changes and 86Rb efflux activated by hyposmolarity in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* **1998**; *53*: 626-635.
197. Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C. The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem* **1983**; *40*: 850-854.
198. Murthy CR, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced swelling by aspartate but not by ornithine in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int* **2002**; *41*: 171-176.
199. Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* **2001**; *66*: 282-288.
200. Nagaraja TN, Brookes N. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol* **1998**; *274*: C883-C891.
201. Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A et al. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* **1999**; *26*: 47-54.
202. Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* **2004**; *129*: 905-913.
203. Negru T, Ghiea V, Pasarica D. Oxidative injury and other metabolic disorders in hepatic encephalopathy. *Rom J Physiol* **1999**; *36*: 29-36.
204. Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* **2006**; *44*: 1105-1114.

205. Niu F, Zhang X, Chang L et al. Trichostatin A enhances OGD-astrocyte viability by inhibiting inflammatory reaction mediated by NF-kappaB. *Brain Res Bull* **2009**; 78: 342-346.
206. Norenberg MD. A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. Progression and reversal of the disorder. *Lab Invest* **1977**; 36: 618-627.
207. Norenberg MD, Baker L, Norenberg L-OB, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res* **1991**; 16: 833-836.
208. Norenberg MD, Bender AS. Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir* **1994**; 60: 24-27.
209. Norenberg MD, Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg L-OB. Effects of lactic acid on astrocytes in primary culture. *J Neuropat Exp Neurology* **1987**; 46: 154-166.
210. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* **1997**; 21: 124-133.
211. Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* **2007**; 22: 219-234.
212. Norenberg MD, Lapham LW. The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **1974**; 33: 422-435.
213. Norenberg MD, Lowell MD, Lapham LW, Eastland MW, May AG. Division of protoplasmic astrocytes in acute experimental hepatic encephalopathy. *American Journal of Pathology* **1972**; 67: 403-412.
214. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **1979**; 161: 303-310.
215. Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* **2004**; 36: 303-307.
216. Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* **2009**; 24: 103-117.
217. Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* **2005**; 20: 303-318.
218. Ohara K, Aoyama M, Fujita M, Sobue K, Asai K. Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* **2009**; 462: 109-112.
219. Okada Y. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys* **2004**; 41: 233-258.
220. Oliver D, Baukowitz T, Fakler B. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* **2000**; 267: 5824-5829.
221. Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem* **2008**; 107: 589-601.

222. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* **2003**; 114: 188-193.
223. Oppong KNW, Bartlett K, Record CO, Al Mardini H. Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* **1995**; 22: 553-558.
224. Ordaz B, Tuz K, Ochoa LD, Lezama R, Pena-Segura C, Franco R. Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem Res* **2004**; 29: 65-72.
225. Ott P, Larsen FS. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* **2004**; 44: 185-198.
226. Palygin O, Lalo U, Pankratov Y. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br J Pharmacol* **2011**; 163: 1755-1766.
227. Palygin O, Lalo U, Verkhatsky A, Pankratov Y. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* **2010**; 48: 225-231.
228. Pan CF, Zhu SM, Zheng YY. Ammonia induces upregulation of aquaporin-4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chin Med J (Engl)* **2010**; 123: 1888-1892.
229. Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O et al. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci* **2004**; 26: 493-502.
230. Pannicke T, Iandiev I, Wurm A et al. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* **2006**; 55: 633-639.
231. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G, Tuz KL. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* **2006**; 119: S4-11.
232. Planelles G. Ammonium homeostasis and human Rhesus glycoproteins. *Nephron Physiol* **2007**; 105: 11-17.
233. Poo JL, Gongora J, Sanchez-Avila F et al. Efficacy of oral L-ornithine-L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. Results of a randomized, lactulose-controlled study. *Ann Hepatol* **2006**; 5: 281-288.
234. Prakash R, Mullen KD. Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2010**; 7: 515-525.
235. Quesada O, Ordaz B, Morales-Mulia S, Pasantes-Morales H. Influence of Ca<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup> wfflux during regulatory volume decrease in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* **1999**; 57: 350-358.
236. Rai V, Nath K, Saraswat VA, Purwar A, Rathore RK, Gupta RK. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging* **2008**; 28: 334-341.
237. Raichle ME, Larson KB. The significance of the NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> equilibrium on the passage of <sup>13</sup>N-ammonia from blood to brain. A new regional residue detection model. *Circ Res* **1981**; 48: 913-937.

238. Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *NeuroReport* **2003**; 14: 2379-2382.
239. Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res* **2003**; 74: 891-897.
240. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis* **2003**; 18: 113-127.
241. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int* **2005**; 47: 31-38.
242. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Tong X, Curtis KM, Norenberg MD. Brain aquaporin-4 in experimental acute liver failure. *J Neuropathol Exp Neurol* **2010**; 69: 869-879.
243. Rama Rao KV, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy 2. *Metab Brain Dis* **2007**; 22: 265-275.
244. Rama Rao KV, Norenberg MD. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* **2012**; 60: 697-706.
245. Rama Rao KV, Reddy PV, Tong X, Norenberg MD. Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol* **2010**; 176: 1400-1408.
246. Rao KV, Norenberg MD. Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis* **2001**; 16: 67-78.
247. Rao VL, Audet RM, Butterworth RF. Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem* **1995**; 65: 677-678.
248. Ratnakumari L, Audet R, Qureshi IA, Butterworth RF. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -ATPase activities are increased in brain in both congenital and acquired hyperammonemic syndromes. *Neurosci Lett* **1995**; 197: 89-92.
249. Rees CJ, Oppong K, Al MH, Hudson M, Record CO. Effect of L-ornithine-L-aspartate on patients with and without TIPS undergoing glutamine challenge: a double blind, placebo controlled trial. *Gut* **2000**; 47: 571-574.
250. Reinehr R, Gorg B, Becker S et al. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* **2007**; 55: 758-771.
251. Robertson DS. The physical chemistry of brain and neural cell membranes: an overview. *Neurochem Res* **2010**; 35: 681-687.
252. Romero-Gomez M, Jover M, Del Campo JA et al. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Ann Intern Med* **2010**; 153: 281-288.
253. Rose C. Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metab Brain Dis* **2002**; 17: 251-261.

254. Rose C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J Neurochem* **2006**; 97 Suppl 1: 11-15.
255. Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* **2000**; 31: 872-877.
256. Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J Biol Chem* **2007**; 282: 21866-21872.
257. Ruppertsberg JP. Intracellular regulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* **2000**; 441: 1-11.
258. Ryu H, Lee J, Olofsson BA et al. Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100: 4281-4286.
259. Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* **2009**.
260. Saadoun S, Papadopoulos MC, Krishna S. Water transport becomes uncoupled from K<sup>+</sup> siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review. *J Clin Pathol* **2003**; 56: 972-975.
261. Sanchez-Perez AM, Felipo V. Chronic exposure to ammonia alters basal and NMDA-induced phosphorylation of NMDA receptor-subunit NR1. *Neuroscience* **2006**; 140: 1239-1244.
262. Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PV et al. Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* **2007**; 32: 517-524.
263. Schenker S, McCandless DW, Brophy E, Lewis MS. Studies on the intracerebral toxicity of ammonia. *J Clin Invest* **1967**; 46: 838-848.
264. Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* **2001**; 15: 1270-1272.
265. Schliess F, Foster N, Gorg B, Reinehr R, Haussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* **2004**; 47: 21-29.
266. Schliess F, Gorg B, Fischer R et al. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* **2002**; 16: 739-741.
267. Schmidt W, Wolf G, Grungreiff K, Meier M, Reum T. Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis* **1990**; 5: 19-31.
268. Schulte U, Fakler B. Gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels by intracellular pH. *Eur J Biochem* **2000**; 267: 5837-5841.

269. Shawcross DL, Balata S, Olde Damink SWM et al. Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2004**; 287: G503-G509.
270. Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, Moriyama M, Reddy PV, Norenberg MD. NFkappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J Neurochem* **2008**; 106: 2302-2311.
271. Skowronska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res* **2012**; 21: 236-244.
272. Skowronska M, Zielinska M, Albrecht J. Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia-treated astrocytes. *J Neurochem* **2010**; 115: 1068-1076.
273. Skowronska M, Zielinska M, Wojcik-Stanaszek L et al. Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem* **2012**; 121: 125-134.
274. Soria LR, Fanelli E, Altamura N, Svelto M, Marinelli RA, Calamita G. Aquaporin-8-facilitated mitochondrial ammonia transport. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**; 393: 217-221.
275. Stephan J, Haack N, Kafitz KW et al. Kir4.1 channels mediate a depolarization of hippocampal astrocytes under hyperammonemic conditions in situ. *Glia* **2012**; 60: 965-978.
276. Sugimoto H, Koehler RC, Wilson DA, Brusilow SW, Traystman RJ. Methionine sulfoximine, a glutamine synthetase inhibitor, attenuates increased extracellular potassium activity during acute hyperammonemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **1997**; 17: 44-49.
277. Svensson G, Anfalt T. Rapid determination of ammonia in whole blood and plasma using flow injection analysis. *Clin Chim Acta* **1982**; 119: 7-14.
278. Swain MS, Blei AT, Butterworth RF, Kraig RP. Intracellular pH rises and astrocytes swell after portacaval anastomosis in rats. *Am J Physiol* **1991**; 261: R1491-R1496.
279. Szeliga M, Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem Int* **2009**; 55: 71-75.
280. Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol* **1991**; 261: H825-H829.
281. Takumi T, Ishii T, Horio Y et al. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* **1995**; 270: 16339-16346.
282. Tanigami H, Rebel A, Martin LJ et al. Effect of glutamine synthetase inhibition of astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience* **2005**; 131: 437-449.
283. Therrien G, Giguere JF, Butterworth RF. Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **1991**; 6: 225-231.
284. Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103: 5567-5572.



285. Tilg H, Wilmer A, Vogel W et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* **1992**; 103: 264-274.
286. Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jorgensen L, Larsen FS. 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 Metab* **2006**; 26: 21-27.
287. Tofteng F, Jorgensen L, Hansen BA, Ott P, Kondrup J, Larsen FS. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* **2002**; 36: 1333-1340.
288. Tofteng F, Larsen FS. The effect of indomethacin on intracranial pressure, cerebral perfusion and extracellular lactate and glutamate concentrations in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* **2004**; 24: 798-804.
289. Toris GT, Bikis CN, Tsourouflis GS, Theocharis SE. Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med Sci Monit* **2011**; 17: RA53-RA63.
290. Traber PG, Dal CM, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* **1987**; 7: 1272-1277.
291. Turski W, Parada-Turska J. Kwas kynureninowy w mózgu i na obwodzie. Wierońska, J. and Pilc, A. 38-55. 2009. Wydawnictwo "Platan". Pobudzające aminokwasy III. XXVI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN.
292. Verkhratsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia 5. *Neuroscientist* **2007**; 13: 28-37.
293. Visek WJ. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J Dairy Sci* **1984**; 67: 481-498.
294. Vogels BAPM, Maas MAW, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau AFM. Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology* **1997**; 25: 820-827.
295. Waagepetersen HS, Shimamoto K, Schousboe A. Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem Res* **2001**; 26: 661-666.
296. Wang LQ, Zhu SM, Zhou HJ, Pan CF. [Expression of aquaporin-4 during brain edema in rats with thioacetamide-induced acute encephalopathy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **2011**; 91: 2573-2577.
297. Wang W, Lv S, Zhou Y, Fu J, Li C, Liu P. Tumor necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability in acetaminophen-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2011**; 23: 552-558.
298. Warren KS, Schenker S. Effect of an inhibitor of glutamine synthesis (methionine sulfoximine) on ammonia toxicity and metabolism. *J Lab & Clin Med* **1964**; 64: 442-449.

299. Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K<sup>+</sup> channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. *Acta Neuropathol* **2005**; 109: 418-426.
300. Watanabe A, Shiota T, Tsuji T. Cerebral edema during hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *J Med* **1992**; 23: 29-38.
301. Weiner ID, Hamm LL. Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Annu Rev Physiol* **2007**; 69: 317-340.
302. Weiner ID, Verlander JW. Role of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol* **2011**; 300: F11-F23.
303. Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B. Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2005**; 20: 359-367.
304. Weissenborn K, Heidenreich S, Ennen J, Ruckert N, Hecker H. Attention deficits in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **2001**; 16: 13-19.
305. Wendon JA, Harrison PM, Keays R, Williams R. Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. *Hepatology* **1994**; 19: 1407-1413.
306. Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T et al. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* **1996**; 71: 589-599.
307. Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* **2007**; 22: 375-388.
308. Wright G, Soper R, Brooks HF et al. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J Hepatol* **2010**; 53: 91-97.
309. Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. The developmental expression of K<sup>+</sup> channels in retinal glial cells is associated with a decrease of osmotic cell swelling. *Glia* **2006**; 54: 411-423.
310. Yao H, Sadoshima S, Fujii K et al. Cerebrospinal fluid lactate in patients with hepatic encephalopathy. *Eur Neurol* **1987**; 27: 182-187.
311. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int* **2010**; 57: 468-488.
312. Zhan T, Stremmel W. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int* **2012**; 109: 180-187.
313. Zhou BG, Norenberg MD. Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci Lett* **1999**; 276: 145-148.
314. Zielinska M, Hilgier W, Borkowska HD et al. Ammonia-induced extracellular accumulation of taurine in the rat striatum in vivo: role of ionotropic glutamate receptors. *Neurochem Res* **2002**; 27: 37-42.

315. Zielinska M, Hilgier W, Law RO, Gorynski P, Albrecht J. Effects of ammonia and hepatic failure on the net efflux of endogenous glutamate, aspartate and taurine from rat cerebrocortical slices: modulation by elevated K<sup>+</sup> concentrations. *Neurochem Int* **2002**; 41: 87-93.
316. Zielinska M, Law RO, Albrecht J. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int* **2003**; 43: 299-303.
317. Zielinska M, Stafiej A, Law RO, Albrecht J. 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* **2004**; 25: 443-449.
318. Ziemska E, Dolinska M, Lazarewicz JW, Albrecht J. Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology* **2000**; 21: 295-300.
319. Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. Brain energy metabolism in acute liver failure: studies using NMR spectroscopy. Jones, E. A., Meijer, A. J., and Chamuleau, R. A. F. M. 225-235. 2003. Kluwer Academic Publishers. Encephalopathy and nitrogen metabolism in liver failure.
320. Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] nuclear resonance study. *Hepatology* **2003**; 37: 420-428.
321. Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res* **2004**; 999: 113-118.
322. Zwingmann C, Leibfritz D. Ammonia toxicity under hyponatremic conditions in astrocytes: de novo synthesis of amino acids for the osmoregulatory response. *Neurochem Int* **2005**; 47: 39-50.
323. Zwingmann C, Richter-Landsberg C, Brand A, Leibfritz D. NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [<sup>3</sup>-<sup>13</sup>C]alanine in astrocytes, neurons and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia* **2000**; 32: 286-303.