

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

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

MARTA SKOWROŃSKA

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

**Autoreferat pracy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem
Prof. dr hab. Jana Albrechta**

WARSZAWA 2012

Encefalopatia wątrobowa (EW) to zespół objawów neuropsychiatrycznych i nerwowo-mięśniowych związanych z ostrym bądź przewlekłym upośledzeniem funkcji wątroby (Albrecht i Jones, 1999), pociągającym za sobą różne konsekwencje metaboliczne, w tym podwyższenie poziomu amoniaku we krwi (hiperamonemię), która jest uznawana za najistotniejszy czynnik w patofizjologii tego schorzenia.

Wysokie stężenie amoniaku w mózgu, odpowiedzialne za większość przejawów EW, jest efektem nie tylko jego zwiększonej zawartości we krwi, ale najprawdopodobniej także zwiększonego przechodzenia amoniaku przez barierę krew-mózg (BBB). Nadmiar amoniaku w mózgu uszkadza przede wszystkim astrocyty, a w znacznie mniejszym stopniu neurony. Wrażliwość astrocytów na amoniak wynika z położenia topograficznego tych komórek w obrębie tzw. jednostki nerwowo- naczyniowej; ich wypustki bezpośrednio otaczają mikronaczynia mózgu wychwytyjąc i metabolizując substraty pochodzące z krwi, a ich ciała odgradzają neurony od mikronaczyń (Tsacopoulos i Magistretti, 1996). Kluczowym efektem toksycznego działania amoniaku na astrocyty jest ich obrzmienie, które skutkuje obrzękiem mózgu, stanowiącym krytyczne powikłanie ostrej EW (Takahashi i wsp., 1991). Obrzmienie astrocytów jest powszechnie obserwowane zarówno w tkankach mózgu chorych z ostrą EW (Kato i wsp., 1992), jak i w modelach zwierzęcych EW (Blei i wsp., 1994, Rama Rao i wsp., 2003) i wykazuje dobrą korelację z poziomem amoniaku we krwi (Rose i wsp., 1999, 2000). W przypadku encefalopatii przewlekłej, astrocyty przyjmują cechy morfologiczne charakterystyczne dla komórek Alzheimerera typu II: są obrzmiałe, z dużymi jądrami, w których widać wyraźnie wyodrębnione jąderka i jasną chromatynę (Gregorios i wsp., 1985).

Jakkolwiek efekty działania amoniaku na astrocyty i neurony są stosunkowo dobrze poznane i udokumentowane, wciąż niewiele wiadomo jak wpływa on na komórki śródbłónka tworzące BBB i jak zmienia ich właściwości kluczowe dla utrzymania homeostazy mózgu, a co za tym idzie funkcjonalności samej bariery. Badania morfologiczne wykazały

wakuolizację i znaczne powiększenie się komórek śródbłonka naczyń mózgowych oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co sugeruje zwiększenie przepuszczalności i transportu pinocytarnego w obrębie BBB (Kato i wsp., 1992; Matkowskyj i wsp., 1999). Natomiast w odniesieniu do funkcji wiadomo, że amoniak moduluje transport różnych cząsteczek poprzez BBB, wpływając na całą gamę transporterów dla różnych cząsteczek na komórkach śródbłonka (James i wsp., 1978; Smith i wsp., 1978; Albrecht i wsp., 1994, 1996; Belanger i wsp., 2006, 2007).

Mimo, iż patofizjologiczne podłoże EW nie jest do końca poznane, wiadomo, że akumulacja amoniaku w mózgu następuje zarówno w przypadku ostrego jak i chronicznego uszkodzenia wątroby i jest odpowiedzialna za zaburzenia procesów bioenergetycznych (Rao i Norenberg, 2001) oraz funkcjonowania różnych układów neuroprzekąźnikowych (Albrecht i Jones, 1999). W szczególności, amoniak aktywuje obwodowe receptory benzodiazepinowe (Desjardins i Butterworth, 2002), co prowadzi do syntezy neurosteroidów pobudzających GABA-ergiczny układ hamujący (Ahboucha i wsp., 2006). Z drugiej strony, amoniak wykazuje działanie ekscytotoksyczne, związane z uwrażliwieniem receptorów NMDA (Hermenegildo i wsp., 1996). Ponadto cały szereg zaburzeń związany jest także z nadmierną produkcją glutaminy (Takahashi i wsp., 1991). Mimo wielu znaczących doniesień i obserwacji mechanizmy neurotoksyczności amoniaku nadal nie zostały do końca poznane.

W ostatnich latach rozważa się istotny udział stresu oksydacyjnego i nitracyjnego (ONS) w patogenezie toksycznego oddziaływania amoniaku. Uważa się, że ONS indukuje kaskadę patofizjologiczną obejmującą patologiczne zmiany w astrocytach, prowadzące do zakłóceń komunikacji astrocyt - neuron i zaburzeń plastyczności synaptycznej, a konsekwencje tego stresu stanowią podłoże głównych patofizjologicznych przejawów EW, zwłaszcza obrzęku mózgu, głównej przyczyny zgonów w jej zaostrej postaci. Fakt, że w dotychczasowych badaniach nad obrzękiem hiperamonemicznym główny nacisk kładziono na

astrocyty wynikał z przekonania o absolutnej nadrzędności mechanizmu cytotoksycznego (upośledzenia metabolizmu astrocytów) nad naczyniopochodnym, którego udziału nie brano pod uwagę zakładając brak wpływu amoniaku na funkcjonowanie BBB. Najświeższe wyniki badań świadczą jednak o tym, że obrzęk mózgu towarzyszący ostrej EW może mieć związek z subtelnymi zmianami w funkcjonowaniu BBB, co implikuje zmiany w funkcjonowaniu komórek śródbłónka naczyń mózgowych jako elementu komórkowego tej bariery. Bardzo fragmentaryczny charakter dotychczasowej wiedzy o wpływie amoniaku na komórki śródbłónka w zestawieniu ze stosunkowo bogatą wiedzą o ONS indukowanym w astrocytach, skłonił do zbadania, czy amoniak wywołuje ONS w komórkach śródbłónka i czy skutkuje to zmianami w przepuszczalności.

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

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

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

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

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

Astrocyty

1. Akumulacja wolnych rodników tlenowych i azotowych pod wpływem amoniaku ulega obniżeniu w wyniku preinkubacji komórek z peptydami natriuretycznymi (ANP i CNP), co wskazuje na możliwość cytoprotekcyjnego działania tych peptydów. Fakt, że stymulacja NPR-C odwraca również wywołany amoniakiem wzrost objętości

astrocytów, dokumentuje wymierny efekt protekcyjny na poziomie komórki jako całości.

2. Ochronne efekty peptydów natriuretycznych są związane z aktywacją NPR-C, gdyż udało się je odtworzyć przy użyciu wybiórczego agonisty NPR-C, peptydu cANP₍₄₋₂₃₎.
3. Efekty wywoływane przez cANP₍₄₋₂₃₎ na poziomie wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału tj.: spadek poziomu cAMP i spadek ekspresji białka G_{ia} oraz obserwacja, iż generacja [$\cdot\text{O}_2^-$] w obecności przeciwciała przeciwko białku G_{ia} nie była hamowana przez cANP₍₄₋₂₃₎, świadczą o obecności funkcjonalnego NPR-C w komórkach astrocytów.

Komórki śródbłoka naczyń (RBE-4)

1. Podobnie jak w astrocytach, amoniak powoduje w komórkach śródbłoka mikronaczyń gromadzenie się ROS, NO, produktów peroksydacji lipidów (F₂-isoprostanów) oraz wzrost syntezy glutationu, stanowiący typową odpowiedź na stres oksydacyjny. Skutek biologiczny tej odpowiedzi wyrażał się poprzez wzrost przepuszczalności pojedynczych warstw komórek dla Dekstranu skojarzony ze wzrostem aktywności metaloproteinaz zewnątrzkomórkowych (MMP-9 i MMP-2), bowiem dodanie specyficznego inhibitora tych MMPs cofało wzrost przepuszczalności.

2. W sumie, wyniki te odtwarzają sekwencję zdarzeń leżących u podstaw wzrostu przepuszczalności BBB i są zgodne z najnowszymi poglądami implikującymi istnienie naczyniopochodnego składnika obrzęku mózgu w EW.
3. Inkubacja w środowisku wzbogaconym o dodatkową pulę czynnika przeciwutleniającego (estru etylowego glutationu) częściowo zapobiegała wzrostowi przepuszczalności pod wpływem amoniaku, co dodatkowo świadczy o tym, że akumulacja ROS jest jedną z przyczyn upośledzenia przepuszczalności.
4. Fenylomaślan ornityny (OP), lek przeciwdziałający gromadzeniu się amoniaku na drodze metabolicznej, zapobiegał bezpośrednio stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez amoniak w komórkach śródbłónka. Wynik wskazuje, że również i ten drugi mechanizm działania OP mógłby być wykorzystany do przeciwdziałania uszkodzeniu BBB.

Podsumowując, wyniki prezentowane w niniejszej pracy potwierdzają współdziałanie skutków ONS w astrocytach i w komórkach śródbłónka naczyń w procesie patogenezy obrzęku mózgu towarzyszącego ostrej niewydolności wątroby. W odniesieniu do komórek śródbłónka opisano ważny element mechanizmu leżącego u podłoża zaburzeń przepuszczalności BBB. Mechanizm polega na bezpośrednim wywołaniu w tych komórkach ONS, co prowadzi do aktywacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i do zwiększonego transportu biernego różnych substancji przez połączenia ścisłe. Wykazano jednocześnie, że zmiany w każdym z typów komórek można przynajmniej częściowo odwrócić stosując szereg stosunkowo prostych interwencji farmakologicznych. Być może,

niektóre z zastosowanych prób zapobiegania skutkom stresu amoniakalnego na poziomie naczyń mózgowych znajdują w przyszłości zastosowanie w terapii.

Niewykluczone, że zmiany zachodzące w wypustkach astrocytów mogą wtórnie prowadzić do zmian przepuszczalności bariery o charakterze naczyniopochodnym odzwierciedlając wpływ upośledzenia metabolizmu komórek astrogleju na funkcje komórek śródbłónka naczyń.

Takich badań w odniesieniu do encefalopatii hiperamonemicznej jak dotąd nie prowadzono, a sekwencja zdarzeń ujawniona w modelach doświadczalnych wskazuje, że obrzęk cytotoksyczny jest wtórny do naczyniowego. Z przyczyn oczywistych, badania przeprowadzone na linii komórek śródbłónka naczyń nie mogą odnieść się do tej kwestii.

Dalsze próby będą się musiały oprzeć na użyciu bardziej skomplikowanych układów doświadczalnych, odtwarzających wzajemne relacje astrocyt - śródbłonek.

LITERATURA

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

Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Quack G (1996) Contrasting effects of thioacetamide-induced liver damage on the brain uptake indices of ornithine, arginine and lysine: modulation by treatment with ornithine aspartate. *Metab Brain Dis* 11: 229-237.

Albrecht J, Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 170:138-146.

Bélanger M, Asashima T, Ohtsuki S, Yamaguchi H, Ito S, Terasaki T (2007) Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. *Neurochem Int* 50: 95-101.

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

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

Desjardins P, Butterworth RF (2002) The "peripheral-type" benzodiazepine (omega 3) receptor in hyperammonemic disorders. *Neurochem Int* 41: 109-114.

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

Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana MD, Felipo V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res.* 1996 Oct;21(10):1237-44.

James JH, Escourrou J, Fischer JE (1978) Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science* 200: 1395–1397.

Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R (1992) Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15:1060–1066.

Matkowskyj KA, Marrero JA, Carroll RE, Danilkovich AV, Green RM, Benya RV (1999) Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol* 277: G455-462.

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

Rao KV, Norenberg MD (2001) Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis* 16: 67-78.

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

Rose C, Michalak A, Rao KV, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF (1999) Lornithine- L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* 30: 636-640.

Smith AR, Rossi-Fanelli F, Ziparo V, James JH, Perelle BA, Fischer JE (1978) Alterations in plasma and CSF amino acids, amines and metabolites in hepatic coma. *Ann Surg* 187: 343–350.

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

Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16: 877-885.