

Zmiany poziomu glutationu w komórkach i przestrzeni międzykomórkowej mózgu w encefalopatii wątrobowej: protekcyjna rola histydyny

mgr inż. Joanna Anita Ruszkiewicz

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

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk
Zakład Neurotoksykologii

Warszawa, 2014

Streszczenie

Stres oksydacyjno–nitracyjny (ONS) jest jednym z kluczowych elementów neurotoksycznego działania wysokich stężeń amoniaku (hiperamonemia, HA) w encefalopatii wątrobowej (EW). Szczegóły procesów prowadzących do zachwiania równowagi między produkcją a neutralizacją reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS) w tym schorzeniu nadal nie są do końca poznane. HA indukuje w mózgu nagromadzenie wysoce reaktywnych cząstek, takich jak rodnik hydroksylowy, rodnik nadtlenny czy tlenek azotu, co skorelowane jest z nasileniem powodowanych przezeń uszkodzeń molekularnych, takich jak oksydacja RNA, nitrozylacja cysteiny czy nitracja tyrozyny. Zmiany te wskazują, że w warunkach nadmiernej ekspozycji na jony amonowe, sprawność układów odpowiedzialnych za neutralizację ROS/RNS okazuje się niewystarczająca.

Celem niniejszej pracy była ocena wrażliwości różnych elementów endogennej ochrony antyoksydacyjnej, w tym reakcji różnych składowych mechanizmów protekcyjnych na bodziec toksyczny. Badano przede wszystkim odpowiedź dominującego w komórkach układu glutationowego (GSH), a następnie alternatywnego układu tioredoksynowego (Trx). Analizie poddawano mózgi szczurów z indukowaną dootrzewnowym podawaniem octanu amonu, prostą HA oraz ostrą EW, wywoływaną podawaniem tioacetamidu (TAA). Ponadto sprawdzano jak dootrzewnowe podawanie histydyny (His), aminokwasu który okazał się efektywny w procesie łagodzenia niektórych objawów EW poprzez hamowanie transportu nadmiaru glutaminy do mitochondriów, wpływa na odpowiedź antyoksydacyjną analizowanych układów.

Zarówno w przypadku modelu HA jak i EW zaobserwowano wzrost poziomu glutationu całkowitego (GSx) w przestrzeni międzykomórkowej kory przedczołowej mózgu szczura, co zgodne jest z wcześniejszymi doniesieniami pokazującymi podobny wzrost indukowany bezpośrednim podawaniem amoniaku do mózgu szczura, a także wzrost poziomu GSx w medium w którym astrocyty korowe inkubowano z amoniakiem. Wzrost ten może wynikać z towarzyszącego EW zwiększeniu aktywności enzymu katalizującego kluczowy etap syntezy GSH (ligaza glutaminianowo–cysteinowa, GCL), a także ekspresji mRNA kodującego Mrp1, czynnik transportujący GSH na zewnątrz komórki. Wzrost zewnątrzkomórkowego GSx

ujawniał się jedynie w przypadku zahamowania γ -glutamylotranspeptydazy (γ GT), enzymu rozkładającego zewnątrzkomórkowy GSH, którego aktywność w modelu EW rośnie. Zwiększona akumulacja zewnątrzkomórkowa i degradacja GSH może służyć zwiększeniu dostępności substratów do jego syntezy w neuronach, która w normalnych warunkach jest mało aktywna.

Spadek poziomu GSx w mitochondriach (mGSx) uzyskanych z kory mózgu szczura z EW, na tle niezmienionej zawartości w całej tkance, wskazuje na tę pulę jako szczególnie wrażliwą na ROS/RNS. Zważywszy na pojawiające się doniesienia, że mitochondrialny GSH jest jęczyzkiem u wagi aktywności antyoksydacyjnej komórek, jego spadek może prowadzić do obniżenia ich potencjału protekcyjnego. Czy i jakim stopniu tak się dzieje w przypadku ekspozycji na amoniak nie jest do końca jasne. Prawdopodobną przyczyną obniżonego poziomu mGSx jest, stwierdzone wielokrotnie zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*, wieloczynnikowe uszkodzenie mitochondriów, mogące prowadzić do zaburzenia transportu GSH z i do cytoplazmy.

Pomimo obniżenia wydajności układu GSH, ujawniającego się obniżoną aktywnością peroksydazy glutationowej (GPx) w homogenatach kory mózgu szczura, EW towarzyszył wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC). Za jedną z możliwych przyczyn można uznać aktywację (być może kompensacyjną) układu tioredoksynowego, dotyczącą zarówno tioredoksyny (Trx), jak i reduktazy tioredoksynowej (TrxR).

Zwiększona TAC korelowała ze zwiększoną ekspresją mRNA kodującego kodującego czynnik transkrypcyjny Nrf2, uważany za jeden z głównych regulatorów odpowiedzi antyoksydacyjnej komórki. Możliwość aktywacji ścieżki kontrolowanej przez to białko potwierdził wzrost ekspresji podlegających jej genów, bezpośrednio zaangażowanych w działanie protekcyjne, m.in. *Ggt1*, *Gclm*, *Mrp1*.

Zastosowanie His w modelu EW doprowadziło do zniesienia niektórych (choć nie wszystkich) zmian zachodzących w wyniku podawania TAA, His podwyższała poziom mGSx, normalizowała obniżoną aktywność GPx, a także podwyższoną aktywność układu Trx/TrxR, co zgodne jest z przewidywanym, protekcyjnym działaniem tego związku. Również u szczurów kontrolnych, iniekcja His skutkowała wzrostem poziomu GSx w przestrzeni międzykomórkowej, wzrostem całkowitego poziomu GSx, poziomu mGSx oraz aktywności GCL, a także całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Sugeruje

to, iż działanie His nie ogranicza się jedynie do pierwotnie przyjętego hamowania transportu glutaminy do mitochondriów, którego konsekwencją może być ograniczenie uszkodzeń tych organelli oraz obniżenie ONS w EW, ale może być też związane z innymi antyoksydacyjnymi właściwościami tego związku, zarówno bezpośrednimi, jak i tymi bardziej złożonymi. To ostatnie sugeruje zmieniona ekspresja wielu spośród analizowanych genów, w tym czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Powyżej opisane własności protekcyjne czynią His obiecującym kandydatem do zastosowania w terapii EW skierowanej na obniżanie ONS.

Abstract

Oxidative–nitrosative stress (ONS) is a key factor in the pathomechanism of neurotoxicity evoked by high concentrations of ammonia (hyperammonemia, HA), which leads to hepatic encephalopathy (HE). Detailed mechanism responsible for an imbalance between production and neutralization of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in HE is still unknown. High concentration of ammonium ions stimulates accumulation of highly reactive compounds, like hydroxyl radical, superoxide and nitric oxide, correlated with molecular impairments related to their accumulation, e.g. RNA oxidation, cysteine nitrosylation and tyrosine nitration. These changes indicate that mechanisms responsible for ROS/RNS scavenging become inefficient.

The aim of the dissertation was to evaluate the sensitivity of the different elements of the endogenous antioxidant response to ammonia neurotoxicity and to delineate some of the underlying mechanisms. The main focus was on glutathione (GSH), the most abundant low molecular antioxidant compound. Additionally, key elements of the thioredoxin system were studied. Two rat models were used; a simple HA in which rats received intraperitoneal injections of ammonium acetate, and acute HE model mimicking toxic liver failure, produced by administration of the hepatotoxin, thioacetamide (TAA). Effect of intraperitoneal administrations of histidine (His), which was reported to prevent some changes evoked by ammonia in HE, was also studied.

An increase in extracellular accumulation of total glutathione (GSx) was observed in prefrontal cortex of rat brain both in HA and HE model, which is consistent with previously shown elevation of extracellular GSH level during direct ammonia treatment on the brain and on cultured astrocytes. Increased activity of a key enzyme in GSH synthesis (glutamyl – cysteine ligase, GCL) and up-regulated expression of mRNA coding the key GSH transporter, Mrp1 seem to contribute to the observed changes. However, increased GSx level was only observed when γ GT, the enzyme catalyzing extracellular GSH degradation, was inhibited, which is consistent with the increase of the enzyme activity earlier reported for this HE model. GSH efflux from astrocytes and its subsequent degradation are considered to be a part of a protective response of astrocytes, serving to provide additional substrates for neuronal GSH synthesis, which normally is not an efficient process. HE specifically reduced

mitochondrial GSx (mGSx) level, without affecting its total brain content, underscoring the exceptionally high sensitivity of mGSx pool to ammonia toxicity. Multifactorial mitochondrial damage, observed frequently in both *in vitro* and *in vivo* studies, which leads to disrupted bidirectional mitochondrial GSH transport, is likely to be the cause of mGSx reduction.

Despite the decreased glutathione peroxidase (GPx) activity which pointed to the decreased efficiency of the GSH system, the total antioxidant capacity (TAC) was increased. In this light, upregulation of thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) activities may be considered as an efficient compensatory response.

Increased TAC in HE correlates with increased mRNA expression of Nrf2, a transcription factor which is a key endogenous regulator of antioxidant response. Upregulated expression of genes controlled by Nrf2 (e.g. *Ggt1*, *Gclm*, *Mrp1*) suggests elevated activation of the pathway regulated through this protein.

His treatment abolished some (albeit not all) changes evoked by TAA administration. His increased the mGSx level, normalized GPx activity and Trx/TrxR system activity, which is consistent with the expected protective action of this compound. His given to control rats increased the extracellular and total brain tissue GSx level, mGSx level, GCL activity and TAC. It implies that the protective effect of His dynamics is not limited to commonly postulated inhibition of glutamine transport into mitochondria, which protects from mitochondrial damage and ONS during HE, but can be related to other, direct or indirect, antioxidant properties of this compound, as suggested by upregulated expression of antioxidant genes, including Nrf2. In view of the fact that His corrects so many HE-induced insufficiencies of the antioxidant system in the brain, it may in the future be considered as a promising agent in HE therapy targeted to reducing ONS.