

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**

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

WARSZAWA 2012

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

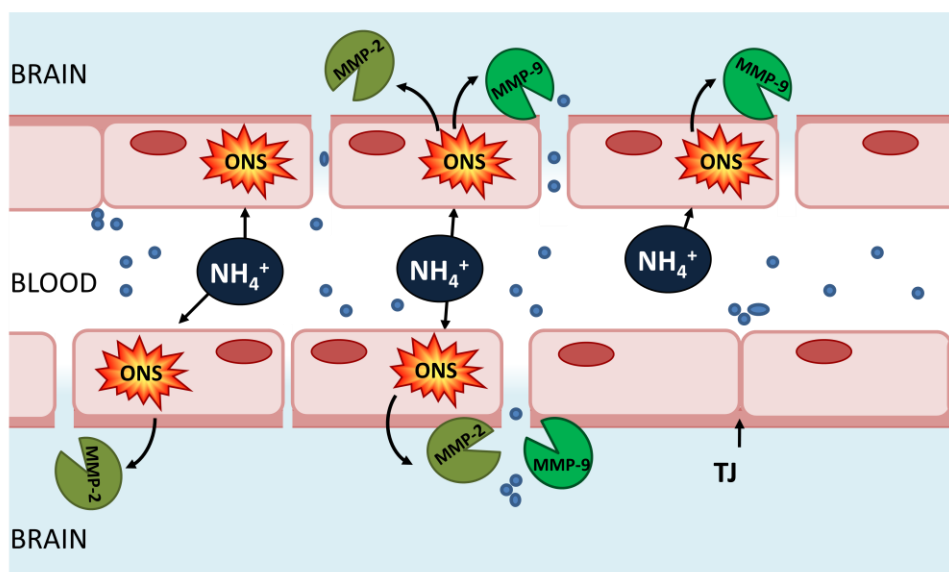
śródbłónka naczyń było przebadanie modulacji skutków ONS przez potencjalne czynniki protekcyjne o różnych punktach uchwytu. W odniesieniu do astrocytów sprawdzano hipotezę zakładającą protekcyjne działanie peptydów natriuretycznych. Przeanalizowano ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w antyoksydacyjne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

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

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

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

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



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

