

INSTYTUT CENTRUM MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ
I KLINICZNEJ PAN

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

MAGDALENA ZIELIŃSKA

**WPLYW JONÓW AMONOWYCH NA TRANSPORT
TAURYNY W KOMÓRKACH
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO.**



LS 219
H3040

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

WARSZAWA 2002

Mojej Mamie

Serdecznie dziękuję Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi za pełną zaangażowania pomoc i wsparcie udzielone w trakcie pisania niniejszej pracy. Dzięki cennym wskazówkom i wszechstronnym radom, a także z inspiracji mojego Promotora, tworzenie tej rozprawy było pasjonującym, naukowym wyzwaniem.

Magdalena Zielińska

Pragnę szczególnie gorąco podziękować Panu Prof. Robertowi O. Law z Uniwersytetu w Leicester, współautorowi części wyników, za możliwość ich wykorzystania w niniejszej pracy.

Ponadto bardzo dziękuję Panu Prof. Simo Oja kierownikowi Zakładu Fizjologii Wydziału Medycznego Uniwersytetu w Tampere za umożliwienie mi wykonania dializacyjnej części badań.

Bardzo serdecznie dziękuję Pani dr Barbarze Zabłockiej, Panu dr Wojciechowi Hilgierowi i Pani mgr Hannie Klinowskiej za wprowadzenie mnie w tajniki ich warsztatu badawczego.

Szczególne wyrazy uznania należą się Pani Mirosławie Poławskiej, Inez Fręsko i mgr Annie Dybel za niezwykle staranną i doskonałą pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczalnej części pracy.

Mojej najbliższej Rodzinie i ☺ dziękuję za wsparcie i wytrwałość.

Magda

W niniejszej pracy wykorzystano część wyników, które opublikowano w poniższych publikacjach :

1. M. Zielińska, W. Hilgier, R.O. Law, P. Goryński, J. Albrecht "Effects of ammonia *in vitro* on endogenous taurine efflux and cell volume in rat cerebrocortical minislices: influence of inhibitors of volume-sensitive amino acid transport" *Neuroscience* 91, 631-638, 1999.
2. M. Zielińska, W. Hilgier, H.D. Borkowska, S.S. Oja, P. Saransaari, P. Goryński, J. Albrecht. "Ammonia-induced extracellular accumulation of taurine in the rat striatum *in vivo*: role of ionotropic glutamate receptors." *Neurochem. Res.*, 27, 37-42, 2002.
3. M. Zielińska, W. Hilgier, R.O. Law, J. Albrecht, "Effects of ammonia and hepatic encephalopathy on the net efflux of endogenous glutamate, aspartate and taurine from rat cerebrocortical slices; modulation by elevated K^+ concentrations", *Neurochem. Int.*, 2002 (w druku).

I. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	9
II. WSTĘP	12
II.1. Amoniak w organizmie.	12
II.2. Amoniak w mózgu w warunkach fizjologicznych.	12
II.3. Neurotoksyczne działanie amoniaku.	13
II.3.1 Kliniczne i morfologiczne objawy encefalopatii hiperamonemicznych na przykładzie encefalopatii wątrobowej.	14
II.3.1.1 Zmiany biochemiczne i behawioralne encefalopatii wątrobowej.	14
II.3.1.2 Hiperamonemia a obrzęk mózgu.	16
II.4. Modele <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> ostrych encefalopatii hiperamonemicznych (EH).	17
II.5. Patogeneza encefalopatii hiperamonemicznych, na przykładzie ostrej encefalopatii wątrobowej.	19
II.5.1. Toksyczność amoniaku a neuroprzeżywalność pobudzająca.	19
II.5.2. Udział układu GABAergicznego.	21
II.5.3. Miejsce tauryny w patomechanizmie hiperamonemii.	23
II.5.3.1. Rozmieszczenie i metabolizm Tau w normalnie funkcjonującym OUN.	23
II.5.3.2. Mechanizmy przemieszczania się Tau: transportery a kanały.	26
II.5.3.3. Funkcje Tau w OUN w warunkach normalnych.	27
II.5.3.4 Zmiany dystrybucji Tau w OUN w warunkach ostrej hiperamonemii <i>in vivo</i> i działania amoniaku <i>in vitro</i> .	30
III. CEL PRACY	32
IV. MATERIAŁY I METODY	34
IV.1. Odczynniki.	34
IV.2. Hodowle komórkowe.	34

IV.3. Metoda dializy-perfuzji <i>in vivo</i>.	35
IV.4. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).	36
IV.4.1. Przygotowanie materiału badawczego do chromatograficznego oznaczania aminokwasów.	36
IV.4.2. Chromatograficzne oznaczanie aminokwasów.	36
IV.5. Badanie wpływu endogennych aminokwasów <i>in vitro</i>.	37
IV.5.1. Wpływ endogennych aminokwasów ze skrawków kory czołowej mózgu szczura.	37
IV.5.2. Badanie wpływu endogennych aminokwasów z hodowli komórkowych.	37
IV.6. Badanie wpływu [³H] Tau z komórek glejaka C6.	38
IV.7. Pomiar objętości komórkowej.	38
IV.8. Pomiar wychwytu Tau przez komórki glejaka C6.	38
IV.9. Izolacja RNA z hodowli komórkowych.	39
IV.9.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji.	40
IV.9.2. Reakcja PCR.	40
IV.9.3. Elektroforeza.	42
IV.10. Sekwencjonowanie produktów reakcji.	42
IV.11. Oznaczanie białka.	43
IV.12. Analiza statystyczna wyników.	43
V. WYNIKI	44
V.1. Uwalnianie się Tau, a zmiany objętości komórek w skrawkach kory mózgu szczura.	44
V.1.1. Wpływ amoniaku na uwalnianie się Tau i objętość komórek: badania z zastosowaniem inhibitorów kanałów jonowych.	44
V.1.2. Wpływ Tau ze skrawków inkubowanych w obecności podwyższonych stężeń potasu.	46

V.2. Wpływ jonów amonowych na zewnątrzkomórkowy poziom Tau w prążkowie szczura <i>in vivo</i>.	48
V.3. Wpływ jonów amonowych na transport Tau w komórkach glejaka C6.	51
V.3.1. Wpływ endogennej Tau z komórek C6 w warunkach inkubacji z amoniakiem.	52
V.3.2. Wpływ [³ H]Tau w warunkach inkubacji komórek C6 z amoniakiem.	53
V.3.3. Wychwyt Tau przez komórki glejaka C6 w warunkach kontrolnych i w warunkach inkubacji z amoniakiem.	56
V.3.4. Ekspresja mRNA genu kodującego białko nośnika taurynowego (TauT).	61
V.4. Ekscytotoksyczny mechanizm obrznięcia komórek w warunkach inkubacji skrawków z amoniakiem. Rola endogennej i egzogennej Tau.	63
VI. DYSKUSJA	66
VI.1. Indukowany przez amoniak wpływ Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura, a objętość komórki: zmienne niezależne czy współzależne?	66
VI.2. Zależność wywołanego przez amoniak wpływu Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura od stężenia jonów potasu w środowisku inkubacyjnym.	69
VI.3. Gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej pod wpływem amoniaku <i>in vivo</i>: rola aktywacji iGluR.	70
VI.4. Wpływ jonów amonowych na przemieszczanie się Tau w komórkach glejaka C6: udział nośnika taurynowego (TauT).	73
VI.5. Ekscytotoksyczny mechanizm obrznięcia komórek: neuroprotekcjna rola Tau.	77
VII. WNIOSKI	80
VIII. PIŚMIENNICTWO	81

I. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

24h	- 24 godziny;
aa	- aminokwas;
ACSF	- sztuczny płyn mózgowo - rdzeniowy;
ADP	- adenozy-no-5'- dwufosforan;
AMPA	- kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4- izoksazolopropionowy;
Asp	- asparaginian;
ATCC	- bank hodowli komórkowych;
ATP	- adenozy-no-5'- trójfosforan;
BUT	- bumetanid;
C6	- linia komórek szczurzego glejaka;
cAMP	- cykliczny AMP;
cDNA	- komplementarne DNA;
CDO	- dwuoksygenaza cysteiny;
CholCl	- chlorek choliny;
CSAD	- dehydrogenaza kwasu cysteinosulfinowego;
DEPC	- dwuetylopirowęglan;
DIDS	- dwuisotiocyjanostilbeno-2,2-dwusulfonian;
DMEM	- pożywka do hodowli komórkowych;
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy;
DNQX	- 6,7- dwunitrochinoisalino-2,3-dion;
dNTP	- trójfosforan deoksyrybonukleozydu;
DTT	- ditiotreitol;
EC	- międzynarodowa klasyfikacja enzymów;
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy;
EH	- encefalopatie hiperamonemiczne;
EW	- encefalopatia wątrobowa;
f	- komplementarny starter używany w reakcji PCR;
FUR	- furosemid;
GABA	- kwas γ -aminomasłowy;
GABA _A	- kompleks receptorowy dla kwasu γ -aminomasłowego;
GABA _B	- receptory typu B dla kwasu γ -aminomasłowego
GalN	- galaktozamina;
GAPDH	- dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (EC 1.2.1.12);
GES	- guanidyno-etano-sulfonamina;
GLDH	- dehydrogenaza glutaminowa;
Gln	- glutamina;
GLT-1	- transporter Glu;
Glu	- glutaminian;
GlukNa	- glukuronian sodu;
Gly	- glicyna;
GS	- syntetaza glutaminy (EC 6.3.1.2);

F89	- linia komórek glejaka;
HAV	- wirus hepatotropowy;
HBV	- wirus hepatotropowy;
HDV	- wirus hepatotropowy;
HEV	- wirus hepatotropowy;
Hepes	- kwas N-2- hydroksy piperazyno-N-2- etanosulfonowy;
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa;
iGluR	- glutamatergiczne receptory jonotropowe;
K_M	- stała Michaelisa
MCDK	- linia komórek nerkowych;
mGluR	- glutamatergiczne receptory metabotropowe;
MK-801	-(+)-5-metylo-10,11-dwuhydro-5H-dwubenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-imina;
MPP ⁺	- rodnik 1-metylo-4-fenylopirydynowy;
mRNA	- informacyjny RNA;
MSO	- metioninosulfoksymina;
n	- liczba doswiadczeń;
Na ⁺ K ⁺ ATPaza	- pompa sodowo- potasowa;
NCBI	- serwer biomedycznych baz danych;
NEM	- N-etylomaleimid;
NIF	- kwas niiflumowy;
NMDA	- kwas N-metylo-D-asparaginianowy;
NNA	- nitroarginina;
NO	- tlenek azotu;
NOS	- syntetaza tlenku azotu (EC 1.14.13.39);
OD	- gęstość optyczna;
OPA	- ortoftaldialdehyd;
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy;
PAG	- glutaminaza aktywowana fosforanem (EC 3.5.1.2);
PBS	- buforowana sól fizjologiczna;
PCA	- kwas nadchlorowy;
PCR	- łańcuchowa reakcja polimeryzacji;
PDC	- kwas L-trans – pirrolidyno-2,4- dwukarboksylowy;
Pi	- nieorganiczny ortofosforan;
PSE	- zespolenie wrotno-układowe;
pz	- pary zasad;
PZBR	- peryferyjnie zlokalizowane receptory benzodiazepinowe;
r	- odwrotnie komplementarny starter używany w reakcji PCR;
RNA	- kwas rybonukleinowy;
RPM	- liczba obrotów na minutę;
RT	- odwrotna transkryptaza (EC 2.7.7.49);
RVD	- proces regulacyjnego zmniejszania objętości;
RVI	- proces regulacyjnego zwiększania objętości;
SD	- odchylenie standardowe średniej;
SITS	- 4-acetamido-4'-izotiocyjanostilbeno-2,2'-dwusulfonian;
TAA	- tioacetamid;

Tau	- tauryna;
TauT	- transporter taurynowy;
TBE	- Tris-boran-EDTA;
Tris	- tri(hydroksymetylo)aminometan;
V_{MAX}	- maksymalna szybkość reakcji,
VSAOC	- zależne od objętości kanały anionowe dla osmolitów;
WZW	- wirusowe zapalenie wątroby;

II. WSTĘP

II.1. Amoniak w organizmie.

Amoniak odgrywa decydującą rolę w utrzymaniu azotowej homeostazy w żywych organizmach, powstaje w znacznych ilościach jako końcowy produkt przemiany białek. Jest niestabilnym substratem i może być utylizowany na drodze procesu transaminacji. Metabolizm amoniaku jest zatem ściśle związany z metabolizmem aminokwasów. Kilka gramów amoniaku dziennie dostaje się z jelita do żyły wrotnej. Stężenie amoniaku w obwodowej krwi tętniczej utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie (70 – 113 μM u człowieka, 50 - 250 μM u szczura) (Cooper i Plum, 1987; Larsen i wsp., 2001), co dokumentuje sprawność detoksykacyjną wątroby. Nieznacznie niższe stężenie amoniaku we krwi żyłnej niż w tętniczej sugeruje, iż z krążenia amoniak jest usuwany na drodze prostej dyfuzji. W wątrobie, w pięcioetapowym cyklu Krebsa-Henseleita powstaje mocznik i glutamina (Gln) (Summerskill i Wolpert, 1970). Część wolnego amoniaku, która nie została przekształcona w wątrobie lub dostała się do krwi z procesów metabolicznych, jest metabolizowana w mózgu, mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym czy płucach do Gln.

II.2. Amoniak w mózgu w warunkach fizjologicznych.

Stężenie amoniaku w mózgu jest od 1,5 do 3 razy większe niż we krwi obwodowej. Przez barierę krew-mózg amoniak przedostaje się na drodze dyfuzji, nie wykorzystując żadnego systemu transportującego. Przy fizjologicznym pH, 98% całkowitego amoniaku występuje w formie zjonizowanej, pozostałe zaś 2% w formie gazowej NH_3 , która łatwiej penetruje barierę krew-mózg (Cooper i Plum, 1987; Kramer i wsp., 2000). Amoniak jest produktem wielu reakcji enzymatycznych, wśród których kluczowe miejsce zajmują te katalizowane przez

enzym glutaminazę aktywowaną fosforanem (PAG; EC 3.5.1.2), dehydrogenazę glutaminową (GLDH; EC 1.4.1.3), syntetazę glutaminy (GS; EC 6.3.1.2.) i enzymy metabolizmu cyklu purynowego, wśród których Gln, kwas glutaminowy (Glu) i kwas asparaginowy (Asp) są jego źródłem.

Detoksykacja amoniaku w mózgu przebiega w procesie amidacji Glu do Gln w reakcji katalizowanej przez GS (Cooper i wsp. 1979). W ten sposób, przynajmniej część Glu uwolnionego z zakończeń nerwowych jest neutralizowana poprzez wychwyt przez komórki glejowe, w których w wyniku przyłączenia jednej cząsteczki amoniaku powstaje elektrofizjologicznie nieaktywna Gln. Powszechnie uważa się, że jest to jedyna wydajna droga metabolizmu amoniaku. GS jest enzymem swoistym dla astrogleju (Norenberg i Martinez – Hernandez, 1979), co potwierdziły późniejsze badania ekspresji mRNA genu kodującego GS (Mearow i wsp., 1989). Gln pochodząca z astrocytów ulega rozkładowi do Glu w komórkach nerwowych w reakcji katalizowanej przez PAG. Obecność tego enzymu wykazano w zakończeniach komórek nerwowych (Subbalakshimi i Murthy, 1983) i w astrocytach (Schousboe, 1979). W ten sposób szlak metaboliczny $\text{Glu} \rightarrow \text{Gln} \rightarrow \text{Glu}$ zostaje zakończony.



Pomimo istotnej roli jaką amoniak odgrywa w metabolizmie, jego podwyższone stężenie jest toksyczne, szczególnie dla OUN. Musi być więc utrzymywane w mózgu na stosunkowo niskim poziomie (150-200 μM) (Cooper i Plum, 1987).

II.3. Neurotoksyczne działanie amoniaku.

Pierwsze doniesienia dokumentujące toksyczne działanie amoniaku pochodzą już z drugiej połowy XIX wieku. W 1877 roku Eck obserwował

zmiany neurologiczne u psów z zespoleniem żyły wrotnej i żyły głównej dolnej będących na diecie wysokobiałkowej, a w 1893 roku, w pracowni Pawłowa, obserwowano dużą śmiertelność zwierząt w następstwie podania amoniaku (Hahn i wsp., 1893).

II.3.1 Kliniczne i morfologiczne objawy encefalopatii hiperamonemicznych na przykładzie encefalopatii wątrobowej.

II.3.1.1 Zmiany biochemiczne i behawioralne encefalopatii wątrobowej.

Zespoły objawów chorobowych związane z upośledzeniem detoksykacyjnych funkcji wątroby określa się jako encefalopatie wątrobowe (EW). Amoniak uważa się za najistotniejszą przyczynę sprawczą EW, jak również innych chorób OUN związanych z wrodzoną lub nabytą hiperamonemią (Zieve, 1987; Szerb i Butterworth, 1992). Zmiany neurologiczne, do których dochodzi, charakteryzują się okresowymi zaburzeniami świadomości o różnym natężeniu, których końcowym stadium jest śpiączka. Zaproponowana niedawno przez Mullen terminologia wyodrębnia trzy typy EW: ostry - Typ A i przewlekłe Typy B i C (Mullen, 2000).

Tabela II.1. Typy encefalopatii wątrobowej.

Typ A (<i>Acute liver failure</i>)	Typ ostrej encefalopatii wątrobowej
Typ B (<i>Portal systemic venous Bypass without intrinsic liver disease</i>)	Zespolenie żyły wrotnej z żyłą główną dolną (PSE)
Typ C (<i>Cirrhosis/Chronic liver disease</i>)	Typ przewlekłej encefalopatii wątrobowej

wg Mullen, 2000

Niniejsza rozprawa dotyczy toksyczności amoniaku w ostrym modelu EW, zatem typ A będzie przedmiotem dalszych rozważań. EW typu A związana jest z ostrym, nagłym uszkodzeniem wątroby wywołanym np.: zakażeniem wirusami hepatotropowymi (HBV, HDV, HAV, HEV), długotrwałym stosowaniem lub przedawkowaniem leków, spośród których warto wymienić: leki znieczulenia ogólnego (halotan, metoksyfluran), przeciwpadaczkowe (fenytoina, kwas 2-propylowalerianowy), niesteroidowe przeciwzapalne (indometacyna, paracetamol) czy inhibitory oksydazy monoaminowej (MAO) lub też zatruciem substancjami hepatotoksycznymi, np. czterochlorkiem węgla lub muchomorem sromotnikowym zawierającym amanitynę (Rahman i Hodgson, 2001). W krajach Unii Europejskiej główną przyczyną wystąpienia EW typu A jest nadmierne stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W Wielkiej Brytanii np. około 50 - 60% rozpoznanych przypadków EW typu A wywołanych jest przedawkowaniem paracetamolu (Rahman i Hodgson, 2001). W Polsce główną przyczyną zachorowań na EW typu A pozostaje wirusowe zapalenie wątroby (WZW). W roku 1998 zanotowano 8106 przypadków zachorowań na WZW (typ A,B,C). Szacuje się, iż 20% spośród nich towarzyszyła EW typu A (dane Ministerstwa Zdrowia). Co roku również notuje się kilkadziesiąt zatruc muchomorem sromotnikowym, z czego u blisko połowy pacjentów dochodzi do rozpoznania EW typu A. Wysoki 70 - 80% współczynnik umieralności pacjentów to rezultat szybkiego (godziny – dni) pogłębiania i zaostrzania się objawów związanych m.in. z obrzękiem mózgu, będącym przyczyną podwyższonego ciśnienia śródczaszkowego (O'Grady i wsp., 1989). Istnieją silne dowody na cytotoksyczny charakter obrzęku (Ganz i wsp., 1989; Butterworth, 1996; Butterworth, 2001). Stężenie amoniaku we krwi obwodowej często pozostaje niezmienione (Cooper i Plum, 1987; Conn, 1993), przy czym notowano podwyższone stężenie amoniaku we krwi tętniczej (~230 μM) pacjentów z rozpoznaną EW typu A, u których stwierdzono także przepuklinę mózgową (Butterworth, 2001). Obserwuje się podwyższone stężenia aminokwasów aromatycznych, tioalkoholi, wolnych kwasów tłuszczowych o

krótkich łańcuchach, pochodnych benzodiazepiny (Zieve, 1981; Zieve 1987; Rahman i Hodgson, 2001; Venturini i wsp., 2001).

Typ B EW wiąże się z występowaniem nadciśnienia w części abdominalnej żyły wrotnej, co jest charakterystyczne dla przewlekłej niewydolności wątroby i przyczynia się do rozszerzania naczyń żylnych, które omijając wątrobę tworzą przetokę okołowrotną.

Szeroko rozpowszechniony typ C EW, ujawnia się u pacjentów w wyniku trwałego uszkodzenia wątroby (np. alkoholowej marskości wątroby). Charakterystyczne jest powolne pogłębianie się objawów i stosunkowo niska - 20% śmiertelność, jak również rzadko występujący obrzęk mózgu (Butterworth, 1996) (porównaj rozdział II.3.1.2).

W przebiegu wszystkich typów EW, można wyodrębnić cztery stadia rozwoju choroby: od spowolnienia funkcji myślowych, zmieniających się stanów emocjonalnych od euforii do depresji, obniżonej zdolności koncentracji i drażliwości (stopień I) do śpiączki wątrobowej włącznie (stopień IV) (Zieve, 1987; Albrecht i Jones, 1999; Rahman i Hodgson, 2001).

II.3.1.2 Hiperamonemia a obrzęk mózgu.

U około 80% chorych w III i IV stadium EW typu A główną przyczyną zgonów jest pogłębiający się obrzęk mózgu i związany z nim wzrost ciśnienia śródczaszkowego (Madl i wsp., 2000; Rahman i Hodgson, 2001). Wydaje się, że obrzęk można łączyć z podwyższonym stężeniem amoniaku we krwi tętniczej u tych chorych (Clemmensen i wsp., 1999). Badania ostatnich lat wykazały również, że we wcześniejszych stadiach EW (Cordoba i wsp., 2000; Häussinger i wsp., 2000) oraz przewlekłej EW (Donovan i wsp., 1998) obserwuje się zaburzenia osmotyczne w mózgu. Dla obrazu neuropatologicznego przewlekłego typu EW charakterystyczne są zmiany w morfologicznym obrazie astrogleju wraz z rozplemem astrocytów, określanym jako pierwotna gliopatia (Norenberg, 1987).

Ostrą formę EW cechuje obrzmienie astrocytów (Swain i wsp., 1992; Norenberg, 1996; Blei i Larsen, 1999) i związane z nim upośledzenie różnych funkcji metabolicznych i funkcjonalnych tych komórek (Albrecht, 1996). Cechy obrzmienia astrogleju obserwowano poza modelami *in vitro*, również w tkance mózgowej pacjentów z ostrą EW (Kato i wsp., 1992). Uważa się, iż Gln, będąca produktem detoksykacji amoniaku, jest kluczowym osmolitem odpowiedzialnym za obrzmienie astrocytów i następczy obrzęk mózgu (Brusilow, 1989; Albrecht i Dolińska, 2001). Podanie metioninosulfoksyminy (MSO) - inhibitora syntetazy glutaminy, powoduje zahamowanie syntezy Gln, co prowadzi do zmniejszenia obrzęku mózgu i obrzmienia astrocytów w korze mózgowej szczurów z hiperamonemią (Takahashi i wsp., 1991; Willard-Mack i wsp., 1996). MSO podana *in vitro* również zmniejsza wywołane amoniakiem obrzmienie hodowanych astrocytów (Norenberg i Bender, 1994) i częściowo zapobiega zwiększaniu objętości komórek glejaka F98 traktowanych jonami amonowymi (Zwingmann i wsp., 2000).

Warto wspomnieć, iż aktywacja peryferyjnie zlokalizowanych receptorów benzodiazepinowych (PZBR), umiejscowionych w OUN na zewnętrznej błonie mitochondrialnej astrocytów (Itzhak i wsp., 1993; Norenberg, 1998), może powodować obrzmienie astrocytów hodowli pierwotnych (Bender i Norenberg, 1998). Podwyższoną gęstość tych receptorów stwierdzono w traktowanych amoniakiem astrocytach (Ducis i wsp., 1989; Itzhak i Norenberg, 1994), jak również w mózgu szczurów z ostrą EW.

Nie mniej jednak mechanizm wzrastania objętości komórek ani związek przyczynowy z toksycznością amoniaku, nie został jeszcze dokładnie poznany.

II.4. Modele *in vivo* i *in vitro* ostrych encefalopatii hiperamonemicznych (EH).

Badanie zmian patologicznych towarzyszących różnym typom encefalopatii wątrobowej wymagają wykorzystania odpowiednich modeli

zwierzęcych lub hodowli komórkowych. Większość zwierzęcych modeli ostrej EH opiera się na podawaniu toksycznych stężeń amoniaku lub substancji o działaniu hepatotoksycznym. Zarówno dootrzewnowe podawanie szczurom tioacetamidu (TAA) (Hilgier i Albrecht, 1984; Zimmermann, 1989; Lassman i wsp., 1989) jak i galaktozaminy (GalN) (van Vugt, i wsp., 1983; Hamberger i Nyström, 1984) (również królikom) prowadzi do szeregu morfologicznych, biochemicznych i elektrofizjologicznych zmian, symulujących ostrą formę EH. Bezpośrednie, dootrzewnowe podanie wysokich stężeń octanu amonu wywołuje hiperamonemię prostą z następczymi przejawami ostrej EH (Marcaida i wsp., 1992; Hermenegildo i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1996) (**Tabela II.2.**).

Tabela II.2. *Zwierzęce modele ostrej encefalopatii hiperamonemicznych.*

<i>MODEL ZWIERZĘCY</i>	<i>ZALETY</i>	<i>WADY</i>
Model tioacetamidowy (TAA)	Łatwy, stosowany do analizy behawioralnej, neurochemicznej, elektrofizjologicznej.	Nieodwracalny, powoduje ostre uszkodzenie wątroby, potencjalna toksyczność TAA.
Model galaktozaminowy (GalN)	Łatwy, szybki postęp EH.	Drogi, mało wydajny, nie nadaje się do badań behawioralnych.
Model hiperamonemii prostej	Łatwy, szeroko stosowany do analizy neurochemicznej.	Nieodwracalny.

Zmodyfikowano wg Basile, 2000.

Stosowane modele EH *in vitro* opierają się na bezpośrednim działaniu odpowiedniego stężenia jonów amonowych na izolowane skrawki mózgu (Fann i wsp., 1990; Zielińska i wsp., 1999) lub hodowane komórki gleju Müllera (Faff-Michalak i wsp., 1994; Faff i wsp., 1996), astrocyty korowe (Norenberg i wsp., 1991; Albrecht i wsp., 1994), astrocyty mózdkowe, neurony (Wysmyk i wsp., 1994) i komórki glejaka F98 (Zwingmann i wsp., 2000). W zależności od stężenia jonów amonowych (1-5 mM) i czasu traktowania (10 min – 4 dni), uzyskuje się symulację ostrego lub przewlekłego modelu EH.

II.5. Patogeneza encefalopatii hiperamonemicznych, na przykładzie ostrej encefalopatii wątrobowej.

Na patomechanizm EH składa się cały szereg powiązanych ze sobą procesów: neurotoksyczne działanie amoniaku (Cooper i Plum, 1987; Conn, 1993; Butterworth, 1998), zaburzenie przepuszczalności bariery krew-mózg, nierównowaga w systemach neuroprzekąźnictwa aminokwasowego pobudzającego i hamującego (Albrecht, 1998; Jones i Basile, 1998; Albrecht i Jones, 1999; Jones, 2000; Albrecht i Zielińska, 2002), czy obecność "fałszywych" neuroprzekąźników (Ferenci i wsp., 1992; Schenker i Brady, 1994). Nie sposób w krótkim traktacie zawrzeć wszystkie elementy składające się na patomechanizm EW. W świetle obecnego stanu wiedzy dominujące wydają się: toksyczność amoniaku oraz związane z nim zaburzenia neuroprzekąźnictwa pobudzającego i po części hamującego. Rola tauryny w EH pozostaje przedmiotem spekulacji, co wiąże się ze słabym rozpoznaniem jej roli fizjologicznej.

II.5.1. Toksyczność amoniaku a neuroprzekąźnictwo pobudzające.

Glu jest głównym neuroprzekąźnikiem pobudzającym w OUN, występuje w około 80% wszystkich zakończeń nerwowych. Powszechne występowanie Glu oraz receptorów glutamatergicznych (**Tabela II.3.**) w mózgu wskazuje, że spełnia on podstawową rolę fizjologiczną związaną z pobudzeniem neuronów. Glu odgrywa istotną rolę w neurotoksyczności i wielu patologicznych stanach OUN.

Tabela II.3. Klasyfikacja receptorów glutamatergicznych.

RECEPTORY GLUTAMATERGICZNE		
RECEPTORY JONOTROPOWE iGluR	N-metyl-D-asparaginianowe (NMDA)	Kanały jonowe przepuszczalne dla Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ ; przewodność ~50pS
	α-Amino-3-hydroksy-5-metylo-4- izoksazolopropionowe (AMPA)	kanały jonowe przepuszczalne dla Na ⁺ , K ⁺ , niektóre Ca ²⁺ przewodność ~10pS
	Kainianowe (kwas kainowy)	Kanały jonowe przepuszczalne dla Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ ;
RECEPTORY METABOTROPOWE mGluR	Grupa 1 mGluR	Powiązane ze szlakiem aktywacji fosfolipazy C
	Grupa 2 mGluR	Powiązane z syntezą cyklazy adenylationowej
	Grupa 3 mGluR	

Pierwszym doniesieniem sugerującym, że w toksycznym działaniu amoniaku pośredniczą jonotropowe receptory NMDA była obserwacja, że niekompetycyjny agonista receptorów jonotropowych NMDA (MK-801) zmniejsza (z 73% do 5% -myszy i 70% do 15% -szczury) śmiertelność zwierząt z hiperamonemią wywołaną dootrzewnowym podaniem octanu amonu (12 mmol/kg masy ciała) (Marcaida i wsp., 1992). W późniejszych latach potwierdzono to spostrzeżenie wykorzystując innych antagonistów receptorów NMDA (Hermenegildo i wsp., 1996). Pobudzenie receptorów NMDA przez amoniak, może prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia i śmierci neuronów. Wydaje się, że w mechanizm ten mogą być zaangażowane: wzrost aktywności Na⁺K⁺ATPazy, co obserwowano w warunkach hiperamonemii (Albrecht i wsp., 1985; Kosenko i wsp., 1994; Ratnakumari i wsp., 1995) i wzmożona synteza tlenku azotu (NO) (Kosenko i wsp., 1995; Schliess i Häussinger, 2001). Podanie MK-801 szczurom z hiperamonemią może zapobiec aktywacji Na⁺K⁺ATPazy i obniżeniu ilości ATP (Kosenko i wsp., 1994). Wzmożona synteza NO w warunkach ostrej hiperamonemii powoduje gromadzenie się nadtlenków i obniża aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Kosenko i wsp., 1997). Zarówno nitroarginina (inhibitor NOS - syntetazy tlenku azotu) jak i MK-801

osłabiały toksyczne działanie amoniaku (Kosenko i wsp., 1998). Niezależny od receptorów NMDA mechanizm aktywacji NOS związany jest ze wzmożonym wychwytem argininy (substratu NOS) do zakończeń nerwowych (Albrecht i wsp., 1990; Rao i wsp., 1997).

Poziom stężenia Glu w mózgu był obniżony w zwierzęcych modelach ostrej EW (Lin i Raabe, 1985; Hilgier i Olson, 1994). Spadek Glu można tłumaczyć wzrostem syntezy Gln, która powstaje w procesie detoksykacji amoniaku. Daleko bardziej istotny jest obserwowany wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Glu w mózgu w zwierzęcych modelach ostrej EW (De Knecht i wsp., 1994; Michalak i wsp., 1996). Utrzymujące się, podwyższone, stężenie Glu w przestrzeni pozakomórkowej wraz z obserwowanym, obniżonym wychwytem zwrotnym aminokwasu do astrocytów (Norenberg i wsp., 1997; Knecht i wsp., 1997) i zakończeń nerwowych (Oppong i wsp., 1995) może prowadzić do odwrażliwienia receptorów Glu (Peterson i wsp., 1990). Zaobserwowano, iż zahamowanie wychwyty Glu do astrocytów może się wiązać z obniżoną ekspresją mRNA genu kodującego białko astroglejowego, swoistego dla Glu transportera GLT-1 (Norenberg i wsp., 1997; Knecht i wsp., 1997). Jednocześnie istnieją dane, iż uaktywnieniu receptorów Glu towarzyszy wzrost pozakomórkowego stężenia glicyny (Gly), która jest koagonistą receptorów NMDA (Michalak i wsp., 1996) i obniżenie gęstości receptorów GABA_B, negatywnie modulujących wpływ Glu (Oja i wsp., 1993).

II.5.2. Udział układu GABAergicznego.

Objawy kliniczne EW: zaburzenia świadomości i obniżenie zdolności motorycznych organizmu, w sposób intuicyjny można łączyć z pobudzeniem neurotransmisji hamującej, w której głównym neuroprzekaźnikiem jest kwas γ -aminomasłowy (GABA). Badania nad zawartością GABA w mózgu czy mikrodializatach w modelach zwierzęcych nie dostarczyły wyraźnych danych wskazujących na istotny udział układu GABAergicznego w patomechanizmie

ostrej formy EW. Istniejące dane wskazują, iż nie dochodzi do zmian w zawartości GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym (Moroni i wsp., 1987), tkance mózgowej (Zeneroli i wsp., 1982; Hamberger i Nyström, 1984; Wysmyk-Cybula i wsp., 1986; Zimmermann i wsp., 1989) i mikrodializatach (Hamberger i Nyström, 1984) ani do zmian w aktywności receptorów GABA. Badania transportowe zdające się potwierdzać koncepcję o pobudzeniu neurotransmisji hamującej, także nie dostarczyły zupełnie jednoznacznych wyników. Skrawki kory mózgowej (Wysmyk i wsp., 1992) i izolowane astrocyty w modelu tioacetamidowym (Albrecht i Rafałowska, 1987) oraz hodowle astrocytów traktowane na ostro amoniakiem (Bender i Norenberg, 2000) wykazywały wzrost wyrzutu znakowanego GABA w warunkach podwyższonego stężenia jonów K^+ , u których jednocześnie obserwowano obniżenie wychwytu GABA do komórek. GABA, wiążąc się ze swoistymi receptorami na błonie postsynaptycznej, wywołuje wzmożony przepływ jonów chloru przez kanały chlorowe, będące integralną częścią receptorów GABA. Badania *in vitro* symulujące ostre działanie patofizjologicznego (0,2 - 0,5 mM) stężenia amoniaku na hodowane neurony, wykazały wzrost przepływu jonów chloru zależny od stężenia amoniaku (Takahashi i wsp., 1993). Wydaje się również, że amoniak wpływa pośrednio na podwyższenie neuroprzebieżności GABAergicznego, reagując z peryferyjnie zlokalizowanymi receptorami benzodiazepinowymi (PZBR). PZBR mogą kontrolować syntezę prognerelonu i pochodnych mu neurosterydów (Majewska, 1992; Mensah-Nyagan i wsp., 1999). W tioacetamidowym modelu ostrej hiperamonemii obserwowano wzmożoną syntezę prognerelonu (Itzhak i wsp., 1995). Neurosterydy mogą wpływać na podwyższenie tonu GABAergicznego w EW, poprzez uwrażliwienie miejsca benzodiazepinowego receptora $GABA_A$. Podanie antagonisty PZBR łagodziło neurofizjologiczne symptomy hiperamonemii u szczurów (Itzhak i Norenberg, 1994), a siarczan prognerelonu powodował obniżenie wrażliwości receptora $GABA_A$ (Shen i wsp., 2000). Brak jednoznacznej zależności pomiędzy zmianami dystrybucji GABA a objawami EW skłoniły do nieuwzględnienia tego aminokwasu w dalszych częściach rozprawy.

II.5.3. Miejsce tauryny w patomechanizmie hiperamonemii.

II.5.3.1. Rozmieszczenie i metabolizm Tau w normalnie funkcjonującym OUN.

Tauryna (kwas 2-aminoetanosulfonowy) (Tau) jest prostym, siarkowym aminokwasem nie będącym składnikiem białek ani substratem energetycznym. Po raz pierwszy Tau wyizolowano w 1827 roku z żółci wołu, od którego nazwy gatunkowej *Bos taurus* zaczerpnięto nazwę nowego aminokwasu.

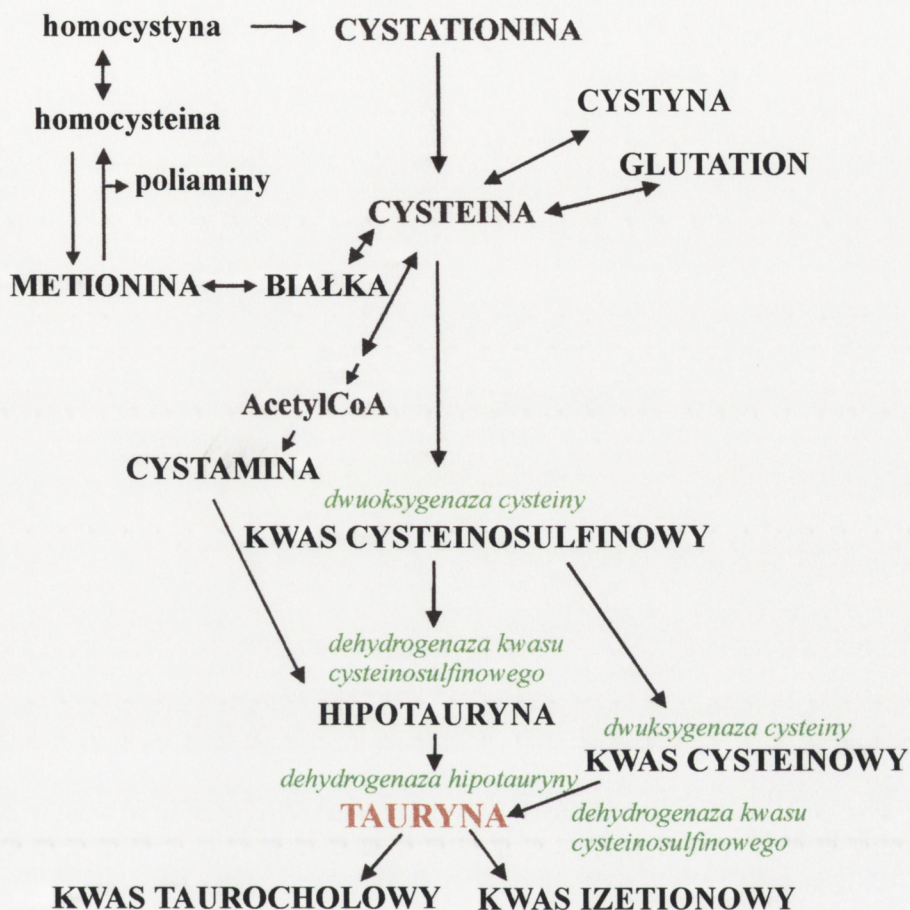
Najlepiej poznaną, jak do tej pory jedyną jednoznacznie zdefiniowaną funkcją metaboliczną Tau, jest jej udział w powstawaniu rozpuszczalnych w wodzie soli kwasów żółciowych (Vessey, 1978). Tau jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju mózgu, modulując procesy neuronalnego różnicowania się komórek, ich migracji i synaptogenezy (Oja i wsp., 1990; Trenkner, 1990; Huxtable, 1992; Sturman, 1993; El Idrisi i wsp., 1998). U kotów, gdzie jest niska aktywność głównego enzymu syntetyzującego Tau - dekarboksylazy kwasu cysteinosulfinowego, niedobór Tau powoduje m.in. zmiany degeneracyjne w siatkówce oka (Sturman i Chesney, 1995). Badania nad rolą Tau u nowo narodzonych saków (kociąt, małą) dały podstawy do rozpoczęcia wzbogacania nią mleka dla niemowląt (Chesney i wsp., 1998).

Tau jest obecna w różnych tkankach zwierzęcych w wysokich, milimolarnych stężeniach. Wartym podkreślenia jest fakt, iż tkanki pobudliwe, łącznie z mózgową, mięśniową i sercem, posiadają duży, obojętny, wewnątrzkomórkowy "magazyn" Tau (Huxtable i wsp., 1992). Najbardziej wyraźnym przykładem jest siatkówka oka, w której stężenie Tau może wynosić od 50 do 70 mM (Voaden i wsp., 1981; Sturman, 1993). W OUN ssaków Tau występuje w stężeniach wyższych niż jakikolwiek inny aminokwas z wyjątkiem Glu (Miller i wsp., 2000). W zależności od różnic gatunkowych i lokalizacji w mózgu, stężenie Tau waha się między 3-9 mM (Palkovits i wsp., 1986; Banay-Schwartz i wsp., 1993; Haugstadt i wsp., 1995; Pasantes-Morales, 1996). Tau i kluczowy enzym jej syntezy - dekarboksylaza kwasu cysteinosulfinowego (CSAD, EC 4.1.1.29) jest nierównomiernie rozmieszczona w układzie

nerwowym (Taber i wsp., 1986; Ottersen i wsp., 1988; Magnusson i wsp., 1988; Nagelhus i wsp., 1993; Reymond i wsp., 1996; Pow i wsp., 2002). Dzięki badaniom immunocytochemicznym wiadomo, że Tau jest preferencyjnie zlokalizowana w astrocytach pnia mózgu, wzgórza wzrokowego i podwzgórza oraz neuronach kory mózgowej, podwzgórza, prążkowie i mózdzku (Martin, 1992).

Tau jest bardzo słabo metabolizowana w OUN. W tkankach ssaków, w tym w OUN, Tau jest syntetyzowana z cysteiny (Peck i Awapara, 1967; Collins, 1974) powstającej w wyniku metabolizmu metioniny oraz przyjmowana wraz z pokarmem (Huxtable, 1989). W OUN obecność szlaku metabolicznego wiodącego od cysteiny potwierdziły obserwacje *in vitro* (Kuriyama i wsp., 1984) i *in vivo* (Collins i Topiwala, 1974). W wyniku szeregu reakcji na szlaku biosyntezy Tau, nazwanym również “szlakiem kwasu cysteinosulfinowego”, dochodzi do utlenienia tiolowej grupy cysteiny do kwasu cysteinosulfinowego, następującej jego dekarboksylacji do hipotauryny oraz końcowego utlenienia hipotauryny do Tau (**Rycina II.1.**). Obecność “szlaku kwasu cysteinosulfinowego” w mózgu potwierdziło występowanie endogennego kwasu cysteinosulfinowego w tkance mózgowej (Kuriyama i wsp., 1984). Dwuoksygenaza cysteiny (CDO, EC 1.13.11.20) jest pierwszym z dwu kluczowych enzymów szlaku metabolicznego Tau (Parson i wsp., 2001), katalizującym reakcję utleniania cysteiny do kwasu cysteinosulfinowego. Kluczową i ograniczającą syntezę Tau reakcją, jest reakcja katalizowana przez dekarboksylazę kwasu cysteinosulfinowego (CSAD), w wyniku czego powstaje hipotauryna (De La Rosa i Stipaniuk, 1985). Enzym CSAD uważany jest w mózgu za markera komórek syntetyzujących Tau, a jego obecność potwierdzono w astogleju (Tappaz i wsp., 1994; Reymond i wsp., 1996). Mózg jest w stanie syntetyzować jedynie ograniczoną ilość Tau zaś głównym miejscem jej syntezy pozostaje wątroba (Wu, 1984; Tappaz, 1992).

Rycina II.1. Główne szlaki metaboliczne Tau (wg Timbrell i wsp., 1995).



Metabolizm Tau jest procesem powolnym (okres półtrwania np. w organizmie szczura wynosi 15 dni) (Wright i wsp., 1987). Głównym produktem katabolizmu tego aminokwasu jest kwas izetionowy (Peck i Awapara, 1967). Relatywnie duża ilość wolnej Tau (do 60%) zostaje wydalana z moczem. Tau, w przeciwieństwie do innych aminokwasów, nie jest całkowicie resorbowana w proksymalnej części kanalików nerkowych. Jej wydalanie jednakże może być regulowane wzmożoną lub osłabioną aktywnością sodozależnego transportera taurynowego, zlokalizowanego na wewnętrznej powierzchni komórek ściany kanalików krętych pierwszego rzędu (rąbek szczoteczkowy) (Chesney i wsp., 1998).

II.5.3.2. Mechanizmy przemieszczania się Tau: transportery a kanały jonowe.

Istnienie układów transportujących Tau można było wydedukować przede wszystkim z faktu utrzymywania się, w różnych tkankach, wysokiego gradientu stężeń tego aminokwasu pomiędzy przestrzenią zewnątrzkomórkową, a wnętrzem komórki. Gradient ten, w zależności od typu komórek waha się od 1:100 do 1:10000 (Huxtable, 1992; Martin, 1992). We wczesnych latach 90-tych udało się wyizolować i opisać cDNA białka kodującego transporter Tau (TauT) w mózgu myszy (Liu i wsp., 1992), szczura (Smith i wsp., 1992), ludzkich komórkach tarczycy (Jhiang i wsp., 1993), łożysku (Rammamoorthy i wsp., 1994) oraz nerkowej linii komórkowej MCDK (Uchida i wsp., 1992). Wszystkie sklonowane transportery wykazują wysoką wzajemną homologię. Ponad 90% podobieństwa sekwencji aminokwasowych oraz podobieństwa do transporterów Gly i GABA potwierdza ich przynależność do tej samej grupy transporterów – układu BETA. Charakterystykę transporterów izolowanych z poszczególnych tkanek przedstawiono w **Tabeli II.4**. Transport Tau jest zależny od jonów sodu i chloru (Holopainen i wsp., 1987), co potwierdzają również badania wspomnianych wyżej grup badawczych.

Tabela II.4. Charakterystyka transporterów Tau.

TRANSPORTERY TAURYNY					
Tkanka z której wyizolowano transporter	Mózg myszy	Mózg szczura	Ludzkie komórki tarczycy	Łożysko	Komórki MCDK
Struktura molekularna	590 aa	621 aa	619 aa	621 aa	655 aa
K_M (Tau)	4,5 μ M	40 μ M	b.d.	6,0 μ M	9,1 μ M
K_M (β -alanina)	56 μ M	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
Występowanie	Mózg, nerka	Mózg, płuca, nerka, serce, śledziona	Mięśnie, śledziona, tarczyca, jajniki, nerka	Łożysko, mięśnie szkieletowe, serce, mózg, wątroba	Nerka, mięśnie szkieletowe, mózg, wątroba

wg Kuriyama i Hashimoto, 1998;

(b.d. – brak danych)

System transportujący Tau rozpoznaje β -alaninę i w mniejszym stopniu hipotaurynę (kwas γ -aminoetanosulfonowy). Kierując się własnościami kinetyki Michaelisa-Menten, możemy wyróżnić dwa układy transportujące Tau, różniące się między sobą powinowactwem. Wartości K_M dla obu systemów wahają się w granicach: 4-5 mM, dla układu o niskim powinowactwie i 40-80 μ M dla układu o wysokim powinowactwie (Liu i wsp., 1992; Saransaari i Oja, 1992a).

Poza transportem aktywnym Tau przedostaje się na zewnątrz przez kanały jonowe. Dzieje się tak w warunkach regulacyjnego zmniejszania (RVD; regulatory volume decrease) lub zwiększania (RVI; regulatory volume increase) objętości (Sanchez-Olea i wsp., 1991). W warunkach fizjologicznych, w których stężenie Tau wewnątrz komórki przekracza jej stężenie poza komórkę, aktywacja zależnego od objętości mechanizmu regulacyjnego usuwa Tau na zewnątrz zgodnie z gradientem stężeń. Zastosowanie specyficznych inhibitorów kanałów anionowych (SITS, DIDS, kwas niflumowy) potwierdziło udział tych kanałów w przemieszczaniu się Tau, ale także innych osmolitów w procesie RVD (Jackson i Strange, 1993; Pasantes-Morales, 1996; Roy, 1995). Udział kanałów anionowych przepuszczalnych dla osmolitów i wrażliwych na zmiany objętości (VSAOC; volume – sensitive organic osmolyte - anion channel) w przemieszczaniu się Tau obserwowano zarówno *in vivo* jak i *in vitro* w różnych stanach patologicznych (Kimelberg i Mongin, 1998).

Nie wiadomo, czy i w jakim stopniu, przenoszenie Tau za pośrednictwem Na^+ -zależnego nośnika i kanałów jonowych są procesem współzależnym.

II.5.3.3. Funkcje Tau w OUN w warunkach normalnych.

Tau przypisuje się szereg funkcji (Huxtable, 1992). Postuluje się jej udział jako neuromodulatora w hamującym neuroprzekaznictwie nerwowym, a także cytotoprotektanta oraz w procesach związanych z regulacją objętości komórki - jako osmoregulatora czy też osmosensora.

Badania grupy Okamoto (Okamoto, 1983 a,b) wykazały, że Tau powoduje hiperpolaryzację komórek Purkinjego, zwiększając ich przepuszczalność dla jonów chloru. Opisywano interakcje z receptorami GABA oraz Gly. Tau jest słabym agonistą somatycznego receptora GABA_A związanego z kanałem Cl⁻ i wrażliwego na bikukulinę, wiążącym się z miejscem benzodiazepinowym, allosterycznie je modulując (Quinn i Miller, 1992; Bureau i Olsen, 1993; Quinn i Harris, 1995; Del Olmo i wsp., 2000; Shen i wsp., 2000). Opisywano również interakcje z występującym presynaptycznie receptorem GABA_B, którego aktywacja powoduje otwarcie kanałów K⁺ i zmniejszenie przepuszczalności błon dla jonów Ca²⁺ (Kontro i Oja, 1990; Smith i Li, 1991) i z receptorami dopaminowymi (Kontro i Oja, 1986). Większość z tych obserwacji sugeruje i potwierdza przypuszczalną rolę Tau w hamującym przekaźnictwie nerwowym, jak również jej funkcję neuromodulującą.

Większość opisywanych funkcji Tau związana jest z jej uwalnianiem się z różnych komórek OUN zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Uwalnianie się Tau obserwowano w warunkach niedotlenienia, hipoglikemii, ischemii, stresu oksydacyjnego, w obecności wolnych rodników (Schurr i wsp., 1987; Torp i wsp., 1991; Uchiyama-Tsuyuki i wsp., 1994; Katoh i wsp., 1997; Saransaari i Oja, 2000) czy w warunkach działania amoniaku (porównaj rozdział II.5.3.2). Do uwalniania Tau dochodzi w wyniku aktywacji receptorów NMDA i AMPA/kainianowych (Lehmann i wsp., 1985; Segovia i wsp., 1997). Zaobserwowano wzrost pozakomórkowego stężenia Tau w skrawkach hipokampa poddanych ekscytotoksycznemu działaniu kwasu kainowego i N-metylo-D-asparaginianu (Magnusson i wsp., 1991).

W licznych badaniach, w warunkach ekscytotoksycznego działania pobudzających aminokwasów, opisywano funkcję protekcyjną (Fariello i wsp., 1982; French i wsp., 1986; Trenkner, 1990).

Egzogena Tau wykazuje również działanie ochronne w stosunku do neuronów poddanych działaniu kwasu kainowego (Boldyrev i wsp., 1999) czy MPP⁺, rodnika wywołującego degenerację neuronów dopaminergicznych (O'Byrne i Tipton, 2000). Wykazano przeciwdrgawkowe działanie Tau (Murphy

i wsp., 1985; Pasantes-Morales i wsp., 1987) oraz jej udział w zapobieganiu symptomom padaczki w modelach zwierzęcych oraz u pacjentów (van Gelder, 1983). Mechanizm protekcyjnego działania Tau nie został jeszcze poznany. Sugeruje się jej modulujący wpływ na poziom jonów Ca^{2+} (Azuma i wsp., 1987), działanie na błony komórkowe (Saransaari i Oja, 1992b; Saransaari i Oja, 2000) prawdopodobnie poprzez interakcje z receptorem GABA_A (O'Byrne i Tipton, 2000) oraz działanie osmoregulujące.

Istnieją doniesienia przypisujące Tau rolę antyoksydanta działającego bezpośrednio na reaktywne związki chemiczne np. kwas podchlorawy – tworzony przez peroksydazę krwinek białych (Timbrell i wsp., 1995), tlenek azotu (Redmond i wsp., 1996) i nadtlenek wodoru (Cozzi i wsp., 1995). Pośrednio, Tau działa protekcyjne stabilizując i zabezpieczając integralność błon komórkowych (Timbrell i wsp., 1995).

Istniejąca obszerna literatura przypisuje Tau funkcję osmoregulacyjną jak również osmosensorową w mózgu (Solis i wsp., 1988; Wade i wsp., 1988; Pasantes-Morales, 1996; Pasantes-Morales i wsp., 1998). Pogląd ten pochodzi z badań na układach *in vitro*, gdyż zmiana osmolarności medium powodowała wpływ Tau w procesie regulacji objętości (porównaj rozdział II.5.3.2). Podobnie media hipo- i hiperosmolarne w badaniach *in vivo*, powodowały gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej. Tau przypuszczalnie pełni także rolę w utrzymaniu homeostazy jonowej K^+ i Ca^{2+} w OUN (Waltz i Allen, 1987).

Nie mniej jednak wydaje się, że względna rola Tau w utrzymaniu objętości i osmolarności komórki została przez wielu autorów przeceniona. Tau jest bowiem jedną z wielu substancji osmolitycznie aktywnych biorących udział w procesach regulacyjnego zwiększania bądź zmniejszania objętości i wcale nie dominuje pod względem ilościowym (Pasantes-Morales, 1996; Miller i wsp., 2000).

II.5.3.4 Zmiany dystrybucji Tau w OUN w warunkach ostrej hiperamonemii *in vivo* i działania amoniaku *in vitro*.

W licznych modelach EH *in vitro* i *in vivo*, jak również u chorych z EW obserwowano zmiany w zawartości i dystrybucji Tau. Stężenie Tau w tkance mózgowej chorych zmarłych w wyniku przewlekłej EW było obniżone (Häussinger, 2000). Podwyższenie stężenia Tau odnotowano w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura w doświadczalnym modelu ostrej EW (Butterworth, 1996). Obniżenie stężenia Tau w tkance mózgowej obserwowano w zwierzęcym modelu ostrej EW (Bosman i wsp., 1992) i w hiperamonemii prostej (Hilgier i Olson, 1994).

Obserwacje pochodzące z badań mikrodializacyjnych wskazują na wzrost pozakomórkowego stężenia Tau w ostrym modelu EW (Bosman i wsp., 1992). Stężenie Tau w dializatach, pochodzących z kory mózgowej szczurów z ostrą EW, było podwyższone również w warunkach podwyższonego stężenia K^+ (Bosman i wsp., 1992).

W badaniach *in vitro* obserwowano wzmożony wypływ znakowanej Tau ze skrawków kory czołowej i prążkowień mózgu szczura z EW wywołaną TAA lub z hiperamonemią prostą (Hilgier i wsp., 1996). Również wypływ endogennej Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura w modelu TAA był zwiększony (Zielińska i wsp., 2001). Jednocześnie obserwowano obniżenie stężenia Tau w analogicznych strukturach w modelu hiperamonemii prostej (Hilgier i Olson, 1994).

Wzmożony wypływ znakowanej Tau obserwowano w traktowanych jonami amonowymi hodowanych *in vitro* astrocytach korowych (Albrecht i wsp., 1994), mózdkowych (Wysmyk i wsp., 1994) i gleju Mülera (Faff i wsp., 1997). Komórki glejaka F98 (Zwingmann i wsp., 2000) i astrocyty mózdkowe (Wysmyk i wsp., 1994) traktowane długotrwale jonami amonowymi wykazywały obniżone stężenie Tau. Wzrostu wypływu i spadku zawartości Tau w komórkach nie obserwowano w neuronach (Wysmyk i wsp., 1994).

W neurotoksycznym działaniu amoniaku mogą pośredniczyć iGluR, a ich

pobudzenie prowadzi m.in. do gromadzenia się Tau w przestrzeni pozakomórkowej prążkowiec i hipokampa szczura (Shibanoki i wsp., 1993; Segovia i wsp., 1997). Z drugiej strony są przesłanki aby przypuszczać, że wzmożone uwalnianie się Tau z komórek towarzyszy obserwowanemu w warunkach ostrego działania amoniaku obrzmieniu astrocytów. Wydaje się zatem, że w uwalnianiu i/lub gromadzeniu się Tau w przestrzeniach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych mogą współuczestniczyć mechanizmy: osmoniezależne i osmozależne.

Rola przemieszczania się Tau przez błony komórkowe, zwłaszcza w warunkach ostrego działania jonów amonowych, pozostaje nieznana. Inny problem to brak danych dotyczących udziału aktywnego transportu Tau na zewnątrz bądź do wewnątrz komórki, czy jej przepływu przez kanały jonowe zarówno w warunkach ostrej hiperamonemii *in vivo* jak i działania amoniaku *in vitro*. Wreszcie niejasna jest rola Tau w powstawaniu obrzęku mózgu lub jego zapobieganiu, zwłaszcza w hiperamonemii ostrej.

III. CEL PRACY

Jak zaznaczono we wstępie, hiperamonemia *in vivo* bądź działanie amoniakiem *in vitro*, powodują wzmożony wypływ Tau z komórek OUN, a procesowi temu przypisuje się kilka dotąd do końca nie udowodnionych funkcji, m.in. osmoregulującą i anty - ekscytotoksyczną. Tau uwalnia się również w szeregu innych stanów patologicznych OUN, a uwalnianie to często wiąże się ze zmianą objętości komórek wyrażającą obrzęk mózgu i/lub pobudzeniem iGluR. Amoniak jest jednocześnie czynnikiem ekscytotoksycznym i obrzękorodnym, co skłaniało do hipotezy, iż wyrzut Tau przez amoniak również wiąże się z obrzękiem i/lub nadaktywacją iGluR. Z drugiej strony, badania na komórkach hodowanych *in vitro* dostarczyły dowodów, że wzmożony wypływ Tau bywa niewrażliwy na czynniki regulujące objętość komórki. W niniejszej pracy, stosując modele *in vivo* (mikrodializa prążkowiec) i *in vitro* (skrawki mózgu, hodowle komórek C6 pochodzenia glijowego) oraz różne interwencje farmakologiczne, postanowiono zróżnicować zależny i niezależny od objętości wypływ Tau z komórek OUN, oraz ewentualne mechanizmy leżące u podłoża wypływu. Postanowiono odpowiedzieć na poniższe pytania szczegółowe.

1. Czy inkubacja skrawków mózgu z amoniakiem *in vitro* powoduje zmiany objętości komórek i czy zmiany te są skorelowane z wypływem Tau, oraz czy wypływ Tau ze skrawków jest modulowany przez zmiany środowiska inkubacyjnego ze spoczynkowego na depolaryzujące?
2. Jaki jest mechanizm wyrzutu Tau przez amoniak podany *in vivo*, a szczególnie jaka jest tu rola aktywacji iGluR?

3. Jaki jest wpływ ostrego i przewlekłego działania amoniakiem na komórki glejaka C6 na aktywność i kierunek transportu Tau? W szczególności zwrócono uwagę na względny udział swoistego transportera błonowego dla Tau i kanałów jonowych w procesie wychwytu i wyrzutu Tau.

4. Czy wywołane przez amoniak obrzmienie komórek skrawka ma komponentę ekscytotoksyczną i czy pozakomórkowa Tau może zapobiegać temu obrzmieniu?

IV. MATERIAŁY I METODY

IV.1. Odczynniki.

Odczynniki zakupiono w firmie Calbiochem (USA) lub Sigma (USA), odczynniki do biologii molekularnej i hodowli komórkowych w firmie GIBCO/BRL (Grand Island, NY) lub Fermentas (Vilnius, LY), płyn scyntylacyjny do pomiarów radioaktywności w firmie Packard (USA), a znakowaną izotopowo L-[1,2-³H] Tau w firmie Amersham Pharmacia Biotech (UK).

IV.2. Hodowle komórkowe.

Linia szczurza komórek glejaka C6 pochodziła z banku hodowli American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Komórki hodowano w pożywce DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium", GIBCO/BRL, USA). Pożywkę wzbogacano 10% surowicą cielęcą (Sigma, USA), antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml). Do doświadczeń użyto pasażę od 65-80. Komórki namnażano w 37°C w mieszaninie 90% powietrza i 10% CO₂. Czas namnażania wynosił 72h. Gęstość komórek w momencie użycia do doświadczeń wynosiła około $4,25 \times 10^4$ /cm². Do hodowli i późniejszych doświadczeń używano szalek o średnicy 6 cm, natomiast do doświadczeń wychwytowych używano płytek 24 studzienkowych.

Doświadczenia wychwytowe i wypływowe prowadzono również na komórkach hodowanych w obecności 10 mM NH₄Cl (dalej opisywano jako "amoniak") przez 24 h. Do badania opóźnionego efektu działania amoniaku, komórki były hodowane przez 24 h w obecności 10 mM NH₄Cl, a następnie przez kolejne 24 h w standardowej pożywce.

IV.3. Metoda dializy-perfuzji *in vivo*.

Badania *in vivo* przeprowadzano metodą dializy-perfuzji prążkowiec szczura (Borkowska i wsp., 1999). Do badań używano szczurów rasy Wistar o ciężarze 180-220 g, które poddawano 4% narkozie halotanowej przez 2 minuty, po czym utrzymywano ją na poziomie 1% do końca trwania doświadczenia. Zwierzęta umieszczano w urządzeniu stereotaktycznym Kopf'a, temperaturę ciała zwierząt kontrolowano przy pomocy termometru (CMA 150, CMA Microdialysis, Szwecja), utrzymując na stałym poziomie 37°C. Sondę dializacyjną o parametrach membrany 2 x 0,5 mm (CMA 12, CMA Microdialysis, Szwecja) umieszczano w prążkowiec szczura zgodnie z koordynatami: AP= +1,3 mm, L= +3,5 mm, D= -5,5 mm w stosunku do bregmy (Paxinos i Watson, 1982). Do perfuzji używano sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (ACSF) o następującym składzie: (mM) Na⁺ 155, Cl⁻ 132, K⁺ 2,87, Ca²⁺ 1,10, i Mg²⁺ 0,83, pH 7,0 podawanego za pomocą pompy infuzyjnej z szybkością przepływu 2,5 µl/min (Lillrank i wsp., 1994). Próby mikro-dializacyjne zaczynano zbierać po upływie 30 min (stabilizacja perfuzji) co 20 min (15 frakcji) i natychmiast zamrażano w -20°C. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta dekapitowano a pozycję sondy dializacyjnej w prążkowiec weryfikowano przy użyciu mikrotomu kriostatowego.

Chlorek amonu o stężeniu 60 mM podawano w ACSF przez sondę dializacyjną przez 40 min (7 i 8 frakcja). Przepuszczalność membrany dla jonów amonowych sprawdzano, mierząc ilość amoniaku, który przeszedł przez sondę przy użyciu standardowego zestawu (nr kat.171-A; Sigma, USA).

Wszystkie substancje farmakologicznie czynne (Tocris, UK) podawano w stężeniu 1mM, bezpośrednio przez sondę dializacyjną w ACSF przez 100 min, począwszy od 4 zbieranej frakcji.

IV.4. Metoda wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

IV.4.1. Przygotowanie materiału badawczego do chromatograficznego oznaczania aminokwasów.

Liofilizowane skrawki kory czołowej mózgu szczura zawieszano w 0,6 M kwasie perchlorooctowym (PCA), a następnie poddawano trzykrotnej, 10 –o sekundowej sonifikacji. Nadsącz odwirowywano (15 min; 10000 x g) i neutralizowano 3 M KOH.

IV.4.2. Chromatograficzne oznaczanie aminokwasów.

Do rozdziału aminokwasów stosowano metodę wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej o fazach odwróconych (reversed-phase HPLC). Do elucji używano mieszaninę buforu fosforanowego (0,075 M KH_2PO_4 , 10% v/v metanolu, pH 6,2) (faza A) i metanolu ze wzrastającym w czasie jego stężeniem (15-70%) (faza B). Po uprzedniej reakcji upochodnienia z 50 μl ortoftaldialdehydu (OPA), w buforze boranowym pH 8,5 i w obecności 2-merkaptioetanolu (Kilpatrick, 1991), 50 μl próbki наносono na kolumnę chromatograficzną (Hypersil C18; 250 x 4,6 mm, ThermoQuest, UK). Do detekcji stosowano detektor fluorescencyjny (2144, Pharmacia LKB, Szwecja lub RF-10AXL, Shimadzu, Japonia).

Powyższą metodę oznaczania aminokwasów stosowano do analizy:

- dializatów pochodzących z prądkowia mózgu szczura, używając systemu chromatograficznego Shimadzu (Japonia);
- wpływów endogennych aminokwasów i ich zawartości w skrawkach kory czołowej mózgu szczura;
- wpływów endogennych aminokwasów z komórek glejaka C6, używając systemu chromatograficznego Dionex (Niemcy).

IV.5. Badanie wpływu endogennych aminokwasów *in vitro*.

IV.5.1. Wpływ endogennych aminokwasów ze skrawków kory czołowej mózgu szczura.

Do doświadczeń używano szczurów rasy Wistar o ciężarze 150-220 g. Zwierzęta dekapitowano, skrawki kory czołowej o grubości 300-400 μm , ciężarze 5-10 mg inkubowano przez 20 min w 350 μl standardowego buforu o następującym składzie: (mM) NaCl 126; MgSO_4 1,29; NaH_2PO_4 1,29; KCl 5; CaCl_2 0,8; HEPES 15; D-glukoza 10; NaOH 11,7; pH 7,4), w temperaturze pokojowej (18-21°C) delikatnie mieszając. Medium i skrawki liofilizowano, a stężenia poszczególnych aminokwasów oznaczano metodą HPLC (punkt IV.4.2).

W zależności od rodzaju doświadczenia do buforów inkubacyjnych dodawano 5 mM octan amonu oraz odpowiednio dobrane związki farmakologicznie czynne (Sigma, USA).

IV.5.2. Badanie wpływu endogennych aminokwasów z hodowli komórkowych.

Do badań używano hodowli komórkowych glejaka C6 hodowanych wg procedury opisanej w punkcie IV.2. Po odpłukaniu pożywki, 10 min inkubacja komórek przebiegała w temperaturze 37°C. Stosowano standardowy bufor o składzie: (mM) NaCl 150; KCl 3; CaCl_2 2; MgCl_2 0,8; glukoza 5; HEPES 10; pH 7,4. Bufor z uwolnionymi endogennymi aminokwasami zbierano i poddawano analizie chromatograficznej.

IV.6. Badanie wypływu [³H] Tau z komórek glejaka C6.

Komórki inkubowano przez 10 minut w 37°C, w buforze o pH 7,4 zawierającym: (mM) NaCl 150; KCl 3; CaCl₂ 2; MgCl₂ 0,8; glukozę 5; Hepes 10; 2,5 μM Tau; 0,1 μCi L-[1,2-³H] Tau w objętości końcowej 0,5 ml. Czterokrotnie płukano standardowym buforem nie zawierającym radioaktywnej Tau. Bufor zmieniano co 2 min, a cała procedura trwała 20 min (10 zbieranych frakcji). Komórki poddawano lizie inkubując je w 37°C przez 30 minut w 1 M roztworze NaOH. Radioaktywność ³H we frakcjach i lizatach mierzono w płynie scyntylicyjnym "Insta-Gel plus II" firmy Packard w liczniku scyntylicyjnym firmy Beckman. Wypływ znakowanej Tau wyrażano jako wypływ frakcyjny, tj. procent uwolnionego z komórek aminokwasu.

IV.7. Pomiar objętości komórkowej.

Objętość komórkową szacowano, oznaczając przestrzenie pozakomórkowe znakowaną [¹⁴C] inuliną. Wszystkie pomiary objętości komórkowej w skrawku wykonano na Uniwersytecie w Leicester (Law, 1982; Law, 1994a,b).

IV.8. Pomiar wychwytu tauryny przez komórki glejaka C6.

Komórki preinkubowano (10 min) a następnie inkubowano przez 10 minut w 37°C, w buforze o pH 7,4 zawierającym: (mM) NaCl 150; KCl 3; CaCl₂ 2; MgCl₂ 0,8; glukozę 5; Hepes 10; 0,1 μCi L-[1,2-³H] Tau w objętości końcowej 0,25 ml. W doświadczeniach kinetycznych stężenie nieznakowanej Tau wynosiło 0,0025 mM – 0,15 mM w objętości końcowej 0,25 ml. W przypadku doświadczeń kompetycyjnych stosowano 5 mM roztwory glutaminy, hipotauryny, β-alaniny i GES (50 krotny nadmiar). Reakcję zatrzymywano

dodając 2 ml oziębionego do 4°C buforu bezsodowego, zawierającego 150 mM chlorek choliny (CholCl), czynność powtarzano czterokrotnie. Komórki poddawano lizie inkubując je w 37°C przez 30 minut w 1 M roztworze NaOH.

Zależność transportu od jonów sodu lub chloru, badano, stosując podczas inkubacji media zawierające, odpowiednio, takie same stężenia glukuronianu sodu (GlukNa) lub CholCl. Radioaktywność ^3H w lizatach mierzono w płynie scyntylicyjnym "Insta-Gel plus II" firmy Packard w liczniku scyntylicyjnym firmy Beckman. Kinetykę wychwytu obliczano w programie GraphPad Prism, 3.0.

IV.9. Izolacja RNA z hodowli komórkowych.

Całkowite RNA izolowano z komórek glejaka C6 metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987), zmodyfikowaną, używając odczynnika TRIzol Reagent (Life Technologies, GIBCO/BRL, NY). Komórki rosące na 6 cm szalkach, po odpłukaniu medium hodowlanego buforem PBS, zawieszano w 2 ml TRIzol-u i inkubowano przez 5 minut w 23°C. Do zawiesiny dodawano 0,4 ml chloroformu. Całość wytrząsano przez 15 sekund i inkubowano przez 3 minuty w 23°C. Próbkę wirowano przy 12,000 x g przez 15 minut w 4°C. Do fazy wodnej, zawierającej RNA, dodawano 1 ml izopropanolu, inkubowano w 23°C przez 10 minut, a następnie wirowano przy 12,000 x g przez 10 minut w 4°C. Osad przemywano 2 ml 75% etanolu i wirowano przy 7,500 x g przez 5 minut w 4°C. Czystość i stężenie RNA zawieszzonego w wodzie zawierającej 0.1% dietylopirowęglan (DEPC) mierzono w spektrofotometrze Ultrospec 2000 firmy Pharmacia Biotech i oznaczano według zasady, że OD 1 oznacza w przybliżeniu stężenie 40 µg/ml RNA. Stosunek odczytów gęstości optycznej przy 260 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) był informacją o stopniu czystości preparatu. Dla RNA otrzymywanego przy użyciu odczynnika TRIzol stosunek ten powinien być większy od 1,6.

IV.9.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji.

Całkowite wyizolowane RNA (5 µg) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy, w celu otrzymania cDNA (DNA komplementarnego do mRNA), przy użyciu zestawu Superscript II (Life Technologies, GIBCO/BRL, NY).

Mieszaninę zawierającą 1 µl oligo(dT₁₂₋₁₈), 1 µl 10 mM dNTP mix, RNA, w objętości zależnej od stężenia cDNA i wodę uzupełniającą do objętości końcowej 12 µl, inkubowano przez 5 minut w 65°C, po czym co najmniej 1 minutę w lodzie. Następnie dodawano 4 µl 5x buforu RT (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl wody i inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Po dodaniu 1 µl enzymu Superscript mieszaninę inkubowano przez 50 minut w 37°C a następnie przez 15 minut w 70°C.

IV.9.2. Reakcja PCR.

Uzyskane cDNA (2 µl) amplifikowano metodą PCR używając starterów, wykonanych przez firmę TIB Molbiol według sekwencji komplementarnych do sekwencji w GenBank (**Tabela IV.1.**).

Jednocześnie analizowano poziom ekspresji genu kodującego konstytutywne białko dehydrogenazę fosforanu aldehydu glicerynowego (GAPDH).

Tabela IV.1.

<i>cDNA</i>	<i>nr</i>	<i>starter</i>	<i>sekwencja (5' – 3')</i>	<i>piśmiennictwo</i>	<i>produkt PCR (pz)</i>	<i>temp. asocjacji starterów (°C)</i>	<i>liczba cykli</i>
TauT	gi: 8394317	f r	ccaggggaagagcccaggc gatcagtcacggagcagcacc	Smith i wsp., 1992	748	65	30
GAPDH	gi: 182979	f r	tgaaggtcggagtcacggattgg catgtaggccatgaggtccaccac	Tokunaga i wsp., 1987	996	65	30

Mieszanina do wielokrotnego powielania sekwencji DNA (PCR; ang. polymerase chain reaction) zawierała następujące składniki:

- 10x PCR Bufor (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% Tween 20)	2,5 μl
- MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μl
- dNTP (10 mM)	1,0 μl
- cDNA	2,0 ul
Starter TauT - f (10 μM)	1,0 μl
Starter TauT - r (10 μM)	1,0 μl
oraz	
Starter GAPDH - f (10 μM)	1,0 μl
Starter GAPDH - r (10 μM)	1,0 μl

Polimeraza Taq (0,5 jednostek/μl) - 0,5 jednostek/reakcję

Każdą próbkę uzupełniano wodą do objętości 25 μl.

Próbki cDNA z mieszaniną PCR były inkubowane w aparacie MJ Research thermal cycler PTC-100 wg następujących warunków (**Tabela IV.1.**): wstępna denaturacja (3 min, 94°C), denaturacja (1 min, 94°C x ilość cykli), asocjacja starterów (1 min, 65 °C x ilość cykli), wydłużanie łańcucha (1 min, 72°C x ilość cykli), faza końcowego wydłużania łańcucha (7 min, 72°C).

IV.9.3. Elektroforeza.

Produkty PCR (10 μl) poddawano elektroforezie w 1,2% żelu agarozowym w buforze 0,5 x TBE (0,045 M TRIS-boran, 0,0001 M EDTA) przy natężeniu 60 V. Żel i bufor zawierały bromek etydyny. Poziom ekspresji białek TauT, CSAD badano w odniesieniu do ekspresji genu kodującego białko ekspresjonowane konstytutywnie GAPDH (**Tabela IV.1.**). Obraz zapisywano przy użyciu systemu Nucleovision firmy Nucleotech, zaś analizę densytometryczną prążków przeprowadzano przy pomocy programu GelExpert 4.0.

IV.10. Sekwencjonowanie produktów reakcji.

Sekwencjonowaniu poddano produkty reakcji RT-PCR z użyciem odpowiednich zestawów starterów, po czym poddano je elektroforezie na 1,2% żelu agarozowym w buforze 0,5 x TBE i oczyszczano stosując zestaw DNA Clean-up firmy Akor Laboratories.

Do próbki zawierającej DNA dodawano roztworu wiążącego, zawierającego sól chaotropową, w ilości 400 µl / 200 µl próby. Po wymieszaniu, zawartość próbki nanoszono na minikolumnę ze złożem krzemionkowym i wirowano przez 30 sekund przy 15,000 RPM. Następnie do kolumny dodawano 600 µl roztworu płuczącego i wirowano w tych samych warunkach. Czynności te powtarzano dwukrotnie w celu wymycia DNA ze złoża. Do osuszonej kolumny dodawano 15 µl wody, inkubowano przez 3 minuty w 23°C i wirowano przez 1 minutę przy 15,000 RPM. Elektroforetycznie sprawdzano wydajność oczyszczania.

Dalsze etapy wykonano dzięki uprzejmości Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Nukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN z zastosowaniem zestawu DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits firmy Amersham Pharmacia Biotech przy użyciu aparatu 377 DNA Sequencer firmy ABI PRISM.

Otrzymane sekwencje nukleotydów porównywano z sekwencjami zawartymi w bazie danych NCBI z wykorzystaniem ogólnodostępnego programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

IV.11. Oznaczanie białka.

Białko oznaczano w lizatach komórek zawieszonych w 1M NaOH metodą Bradforda (1976) używając albuminy cielęcej jako standardu.

100 ml odczynnika Bradforda zawiera 10 mg barwnika Coomassie Brilliant Blue, 5 ml 96% etanolu i 10 ml 86% kwasu ortofosforowego. 270 µl tego odczynnika

dodawano do 30 μ l lizatu i mierzono ekstynkcję przy długości fali 595 nM w spektrofotometrze firmy Kontron Instruments.

IV.12. Analiza statystyczna wyników.

Wszystkie wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD). Liczbę doświadczeń (n) podano w legendach do Tabel i Rycin. Znamienność statystyczną różnic określano stosując test One-Way ANOVA z programu Sigma Plot 6.0 lub programu GraphPad Prism 3.0.

V. WYNIKI

V.1. Uwalnianie się Tau, a zmiany objętości komórek w skrawkach kory mózgu szczura.

V.1.1. Wpływ amoniaku na uwalnianie się Tau i objętość komórek: badania z zastosowaniem inhibitorów kanałów jonowych.

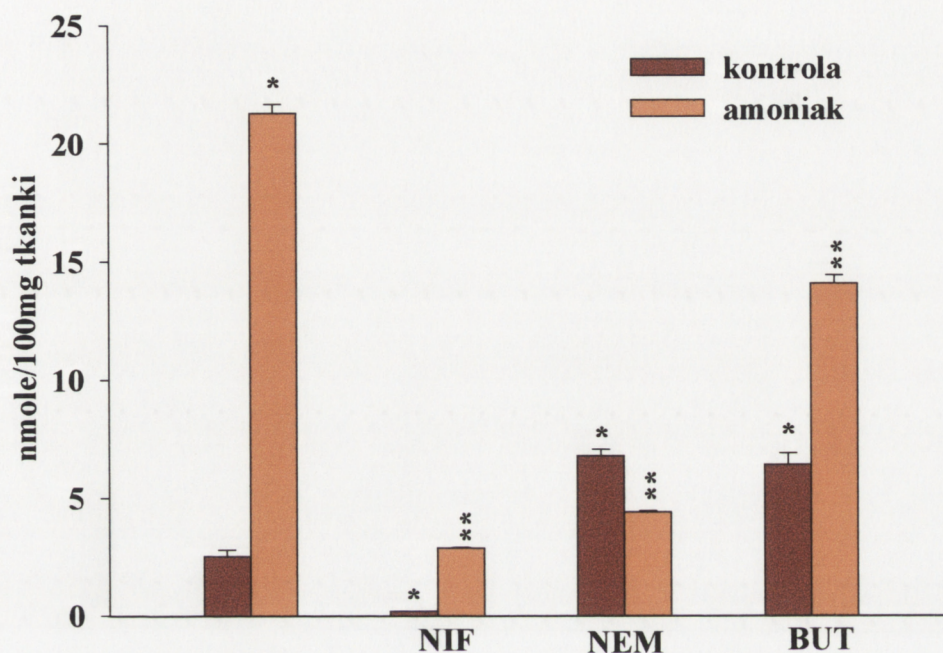
Skrawki kory czołowej mózgu szczura ("kontrola") inkubowano w standardowym medium w obecności inhibitorów kanałów anionowych: 50 μM kwasu niflumowego (NIF) i 100 μM N-etylomaleimidu (NEM) oraz 50 μM bumetanidu (BUT), będącego inhibitorem wymiennika $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. Ilość Tau uwolnionej ze skrawków kontrolnych w przeciągu 20 min wynosiła $2,53 \pm 0,26$ nmola/100 mg tkanki. Jednocześnie badano wpływ 5 mM octanu amonu ("amoniak") na uwalnianie się Tau ze skrawków kontrolnych. Inkubacja tych skrawków w obecności amoniaku powodowała wzrost wypływu Tau do medium o 741% (**Ryc.V.1.**).

NIF obecny w medium całkowicie hamował wypływ Tau ze skrawków kontrolnych nie traktowanych amoniakiem oraz częściowo znosił uwalnianie się Tau wywołane amoniakiem. Obserwowane stężenie Tau w medium inkubacyjnym było obniżone o 87% (**Ryc.V.1.**).

NEM o 168% stymulował wypływ Tau ze skrawków kontrolnych nie traktowanych amoniakiem. Wywołany amoniakiem wzrost gromadzenia się Tau był hamowany przez NEM, a stężenie Tau w medium było o 80% obniżone (**Ryc.V.1.**).

BUT stymulował wypływ Tau ze skrawków kontrolnych nie traktowanych amoniakiem o 156%, a obniżał o 33% jej wypływ w obecności amoniaku (**Ryc.V.1.**).

Ryc.V.1. Wpływ 5mM octanu amoniaku ("amoniak"), 50 μ M kwasu niflumowego (NIF), 100 μ M N-etylomaleimidu (NEM) i 50 μ M bumetanidu (BUT) dodanych razem lub osobno, na uwalnianie się Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczurów ("kontrola").



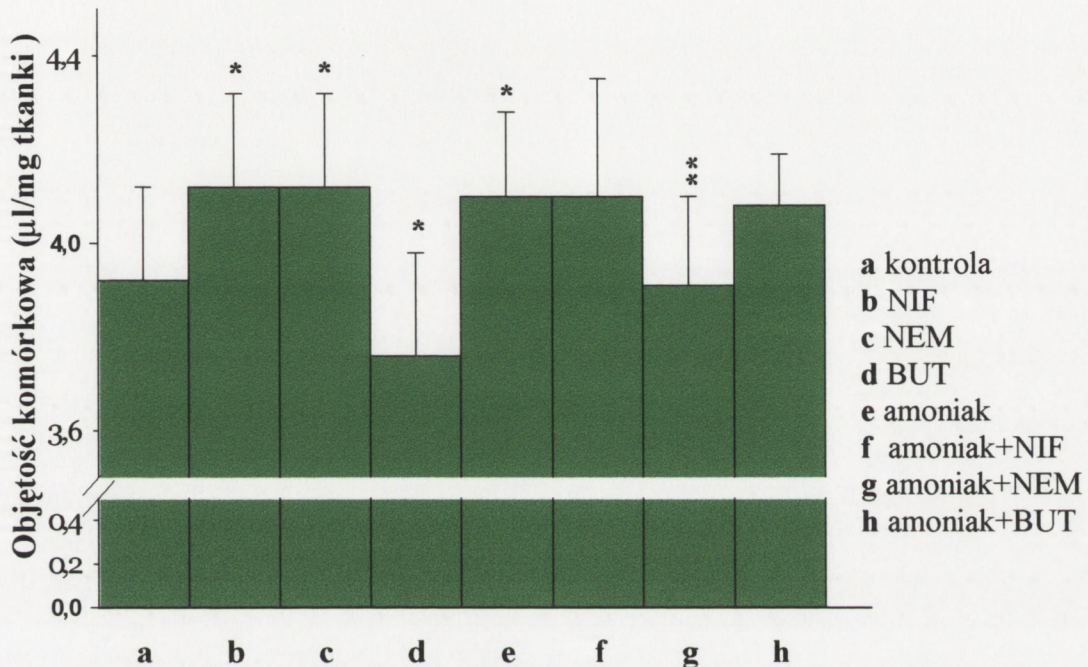
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=8).

* różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej w skrawkach nie traktowanych amoniakiem ("kontrola") przy $p < 0,05$;

** różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej w skrawkach z amoniakiem przy $p < 0,05$;

Dane dotyczące zmian objętości komórkowej, szacowane pomiarem tzw. przestrzeni inulinowej zamieszczono na Ryc.V.2. Obecność amoniaku w medium o 4% zwiększała objętość komórek w skrawku. Zarówno NIF, jak i NEM o 4,5% podwyższał objętość komórek w skrawkach kontrolnych nie traktowanych amoniakiem. BUT natomiast, obniżał objętość komórek w skrawku o 4,6%. Wywołany amoniakiem wzrost objętości, ulegał redukcji w obecności NEM.

Ryc.V.2. Wpływ 5 mM octanu amonu ("amoniak"), 50 μ M kwasu niflumowego (NIF), 100 μ M N-etylomaleimidu (NEM) i 50 μ M bumetanidu (BUT) dodanych razem lub osobno, na objętość komórkową mierzoną w skrawkach kontrolnych kory czołowej mózgu szczura ("kontrola").



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=16).

* różnica znamiennej w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

**różnica znamiennej w stosunku do wartości w skrawkach z amoniakiem przy $p < 0,05$;

V.1.2. Wpływ Tau ze skrawków inkubowanych w obecności podwyższonych stężeń potasu.

W tym cyklu doświadczeń badano uwalnianie Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura w warunkach podwyższonych stężeń jonów K^+ . Wybrano takie stężenia K^+ , które symulowały warunki spoczynkowe (5 mM K^+), fizjologicznie depolaryzacyjne (7,5 i 10 mM K^+) i z pogranicza patologii (15 mM K^+).

Wpływ różnych stężeń K^+ na uwalnianie Tau przedstawiono na Rycinie V.3. i wyrażono albo jako wpływ frakcyjny, tj. % uwolnionego podczas inkubacji aminokwasu w stosunku do całkowitej jego ilości w skrawku (A), albo

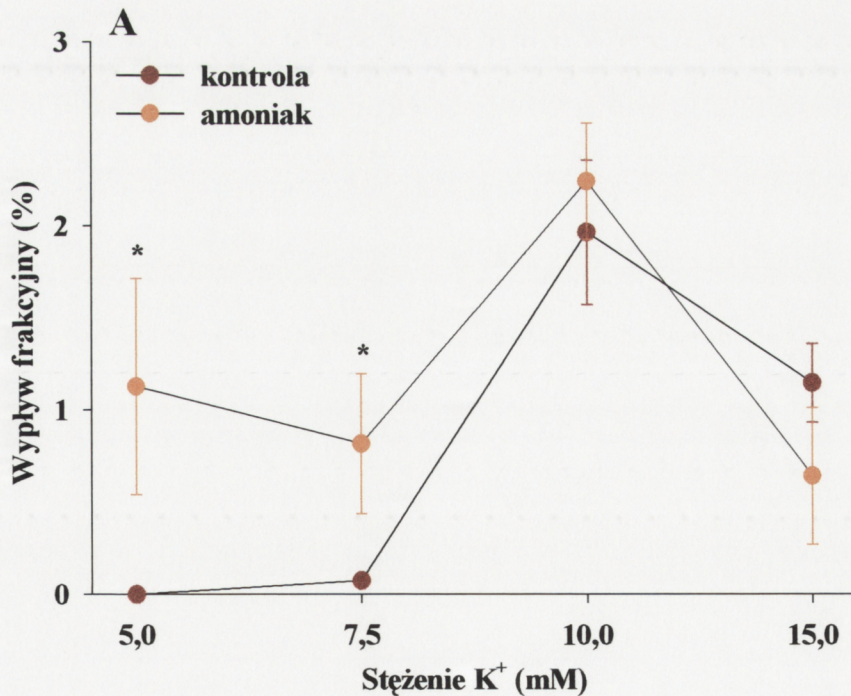
w wartościach absolutnych określających ilość uwolnionego w badanych warunkach do medium aminokwasu (**B**).

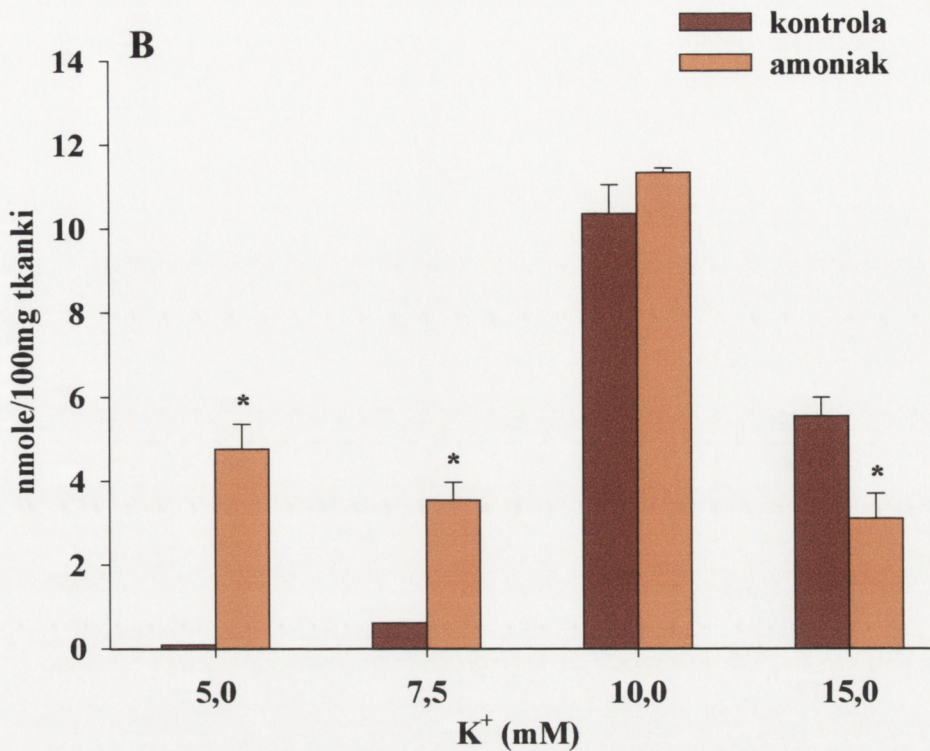
W warunkach podwyższonych stężeń K^+ w przedziale 7,5 – 15 mM obserwowano wzrost wypływu Tau do medium (**Ryc.V.3.**). Wypływ frakcyjny Tau w obecności amoniaku wynosił 1,12 i 0,80% w 5 i 7,5 mM K^+ i był wyższy niż wypływ Tau przy tych samych wartościach stężenia K^+ pod nieobecność amoniaku (**Ryc.V.3A.**). Stężenie uwolnionej do medium Tau w obecności amoniaku oraz 5 i 7,5 mM K^+ wynosiło $4,75 \pm 0,60$ i $3,54 \pm 0,43$ nmoli/100mg tkanki (**Ryc.V.3B.**).

Ryc.V.3.

A Wypływ frakcyjny Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczurów ("kontrola") w obecności lub pod nieobecność 5 mM octanu amonu ("amoniak") w warunkach wzrastających stężeń K^+ .

B Stężenie uwolnionego do medium Tau w różnych warunkach inkubacji.





Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=8);

*różnica znamionowa w stosunku do wartości kontrolnej w warunkach tego samego stężenia K⁺ przy p<0,05;

V.2. Wpływ jonów amonowych na zewnątrzkomórkowy poziom Tau w prążkowie szczura *in vivo*.

Stosując metodę dializy-perfuzji badano mechanizm gromadzenia się Tau w przestrzeniach pozakomórkowych pod wpływem podawanego przez sondę dializacyjną chlorku amonu ("amoniak") w stężeniu 60 mM. Rzeczywiste stężenie przechodzącego przez membranę sondy amoniaku wynosiło ~5 mM, co zmierzono używając komercyjnie dostępnego zestawu do oznaczania stężenia amoniaku.

Substancje farmakologicznie czynne: MK-801 - antagonistę receptora NMDA ((+)-5-metylo-10,11-dwuhydro-5H-dwubenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-imina), furosemid (FUR)- inhibitor kotransportu Na⁺/K⁺/Cl⁻, PDC - inhibitor

transportu Glu (kwas L-trans – pirrolidyno-2,4- dwukarboksylowy) oraz DNQX - antagonistę receptora AMPA (6,7-dwunitrochinoisalino-2,3-dion), podawano bezpośrednio przez sondę w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF), każdą w stężeniu 1mM.

Wpływ poszczególnych czynników na stężenie Tau w mikrodializatach w warunkach kontrolnych podano w **Tabeli V.1**. Zmierzony kontrolny poziom Tau wynosił $0,63 \pm 0,17$ nmoli/ml. MK-801, FUR oraz PDC, stymulował gromadzenie się Tau w przestrzeniach pozakomórkowych.

Tabela V.1. Wpływ związków farmakologicznie czynnych na gromadzenie się Tau w mikrodializatach prązkowia.

<i>Czynniki</i>	<i>Stężenie Tau (nmole/ml)</i>
-	$0,63 \pm 0,17$
MK-801	$1,75 \pm 0,24^*$
FUR	$1,15 \pm 0,22^*$
PDC	$1,00 \pm 0,17^*$
DNQX	$0,77 \pm 0,21$

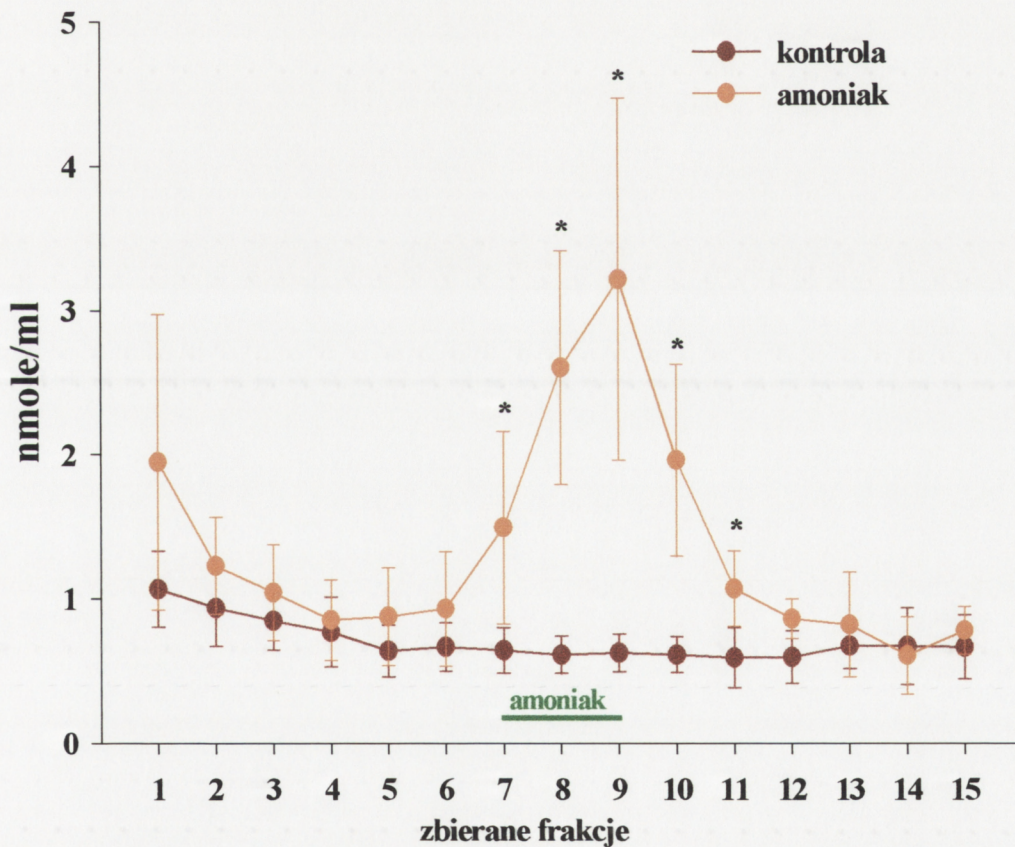
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=6).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

Wpływ kontrolny Tau do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wywołany podaniem 60 mM amoniaku z uwzględnieniem kolejnych zbieranych frakcji został przedstawiony w wartościach absolutnych na **Rycinie V.4**. **Rycina V.5** przedstawia zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Tau wywołane jednoczesnym podaniem amoniaku i substancji farmakologicznie czynnych, które zostały wyrażone w procentach wartości kontrolnej. Jako wartość wpływu kontrolnego przyjęto całkowitą ilość aminokwasu uwolnionego w okresie od 60

do 120 minuty (frakcje 4 – 6). Amoniak podawany bezpośrednio przez sondę dializacyjną powodował wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Tau o 154% (Ryc.V.5.). MK-801 i DNQX obniżał wywołane amoniakiem gromadzenie się Tau odpowiednio o: 35 i 33%, zaś PDC wzmacniał gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej o 148%.

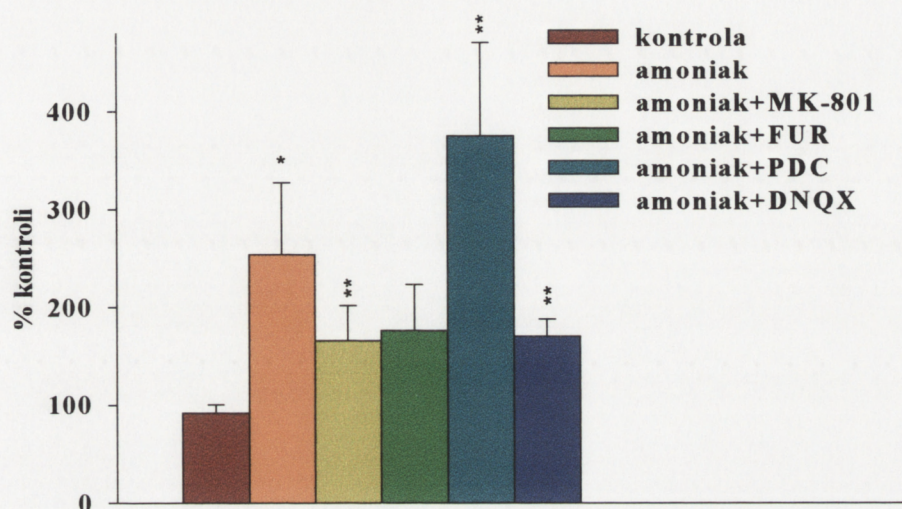
Ryc.V.4. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Tau w prążkowiu szczura *in vivo* w warunkach superfuzji ACSF („kontrola”) oraz wywołane podaniem 60 mM chlorku amonu („amoniak”).



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=6).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

Ryc.V.5. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Tau w prążkowie szczura *in vivo* wywołane podaniem samego 60 mM chlorku amonu ("amoniak") bądź podawanego jednocześnie z 1mM MK-801, FUR, PDC i DNQX.



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=6).

*różnica znamienne w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

**różnica znamienne w stosunku do wartości amoniaku przy $p < 0,05$;

V.3. Wpływ jonów amonowych na transport Tau w komórkach glejaka C6.

Opisane poniżej doświadczenia przeprowadzono na linii komórek glejaka C6, która posiada analogiczne do hodowanych astrocytów kanały objętościowo-zależne, odpowiedzialne za przepuszczanie substancji osmotycznie czynnych oraz kanały transportujące Tau (Jackson i Strange, 1993; Lohr i wsp., 1994; Mountain i wsp., 1996; Kimelberg i Mongin, 1998).

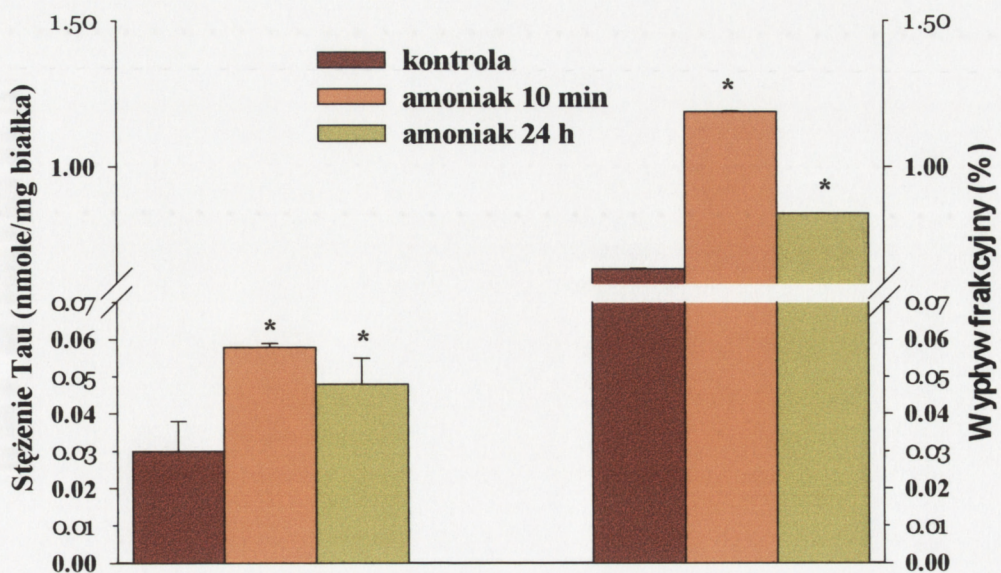
Komórki C6 hodowane 24h w obecności 10 mM chlorku amonu i krótkotrwale (10 min) nim traktowane, były obserwowane pod mikroskopem odwróconym i nie wykazywały widocznych zmian morfologicznych.

V.3.1. Wyptyw endogennej Tau z komórek C6 w warunkach inkubacji z amoniakiem.

Wyptyw endogennej Tau z komórek hodowanych w warunkach kontrolnych ("kontrola"), komórek hodowanych 24h w obecności 10 mM chlorku amonu ("amoniak 24h") i komórek traktowanych przez 10 min 10 mM chlorkiem amonu ("amoniak 10 min"), przedstawiono w wartościach absolutnych oraz jako wyptyw frakcyjny na **Ryc.V.6**. Zaobserwowano dużą zgodność efektów wyrażonych obydwojma sposobami. Stężenie endogennej Tau uwolnionej z komórek kontrolnych wynosiło $0,03 \pm 0,01$ nmola/mg białka. Obserwowano wzrost wyptywu Tau o 93% w wyniku 10 min traktowania komórek amoniakiem oraz wzrost wyptywu o 60% w wyniku hodowania w obecności jonów amonowych.

Frakcyjny wyptyw endogennej Tau z komórek kontrolnych wynosił $0,65 \pm 0,001\%$. Obserwowany wzmożony wyptyw aminokwasu z komórek, w warunkach inkubacji z amoniakiem przez 10 min i 24 h, był wyższy odpowiednio o 83 i 29%.

Ryc.V.6. Wyptyw endogennej Tau, wyrażony w wartościach absolutnych (A) oraz jako wyptyw frakcyjny (B), z komórek kontrolnych ("kontrola") oraz traktowanych przez 24h ("amoniak 24h") i 10 min ("amoniak 10 min") 10 mM chlorkiem amonu.



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=5-8).

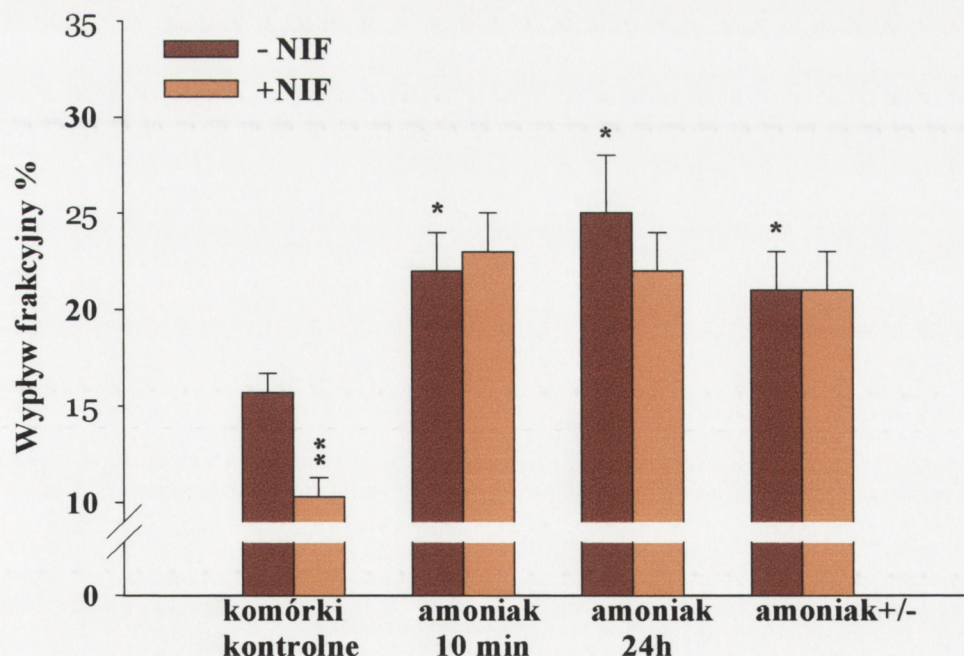
*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej dla $p < 0,05$;

V.3.2. Wpływ [³H]Tau w warunkach inkubacji komórek C6 z amoniakiem.

Wpływ znakowanej izotopowo Tau z komórek glejaka C6 badano w różnych warunkach inkubacji z jonami amonowymi. Komórki traktowano, jak w doświadczeniach poprzednich 10 mM chlorkiem amonu przez 10 min i 24h (“amoniak 10 min”, “amoniak 24h”). Dodatkowo badano wpływ [³H]Tau z komórek hodowanych 24h w obecności 10 mM chlorku amonu a następnie 24h w standardowej pożywce (“amoniak+/-”).

Jednocześnie badano działanie 200 μM kwasu niflumowego (NIF) na wpływ znakowanej Tau w opisanych powyżej różnych warunkach inkubacji z jonami amonowymi. Wyniki przedstawiono na Ryc.V.7.

Ryc.V.7. Wpływ frakcyjny [³H]Tau z komórek glejaka C6 różnie traktowanych 10 mM chlorkiem amonu. Wpływ obecności 200 μM kwasu niflumowego (NIF).



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=8-20).

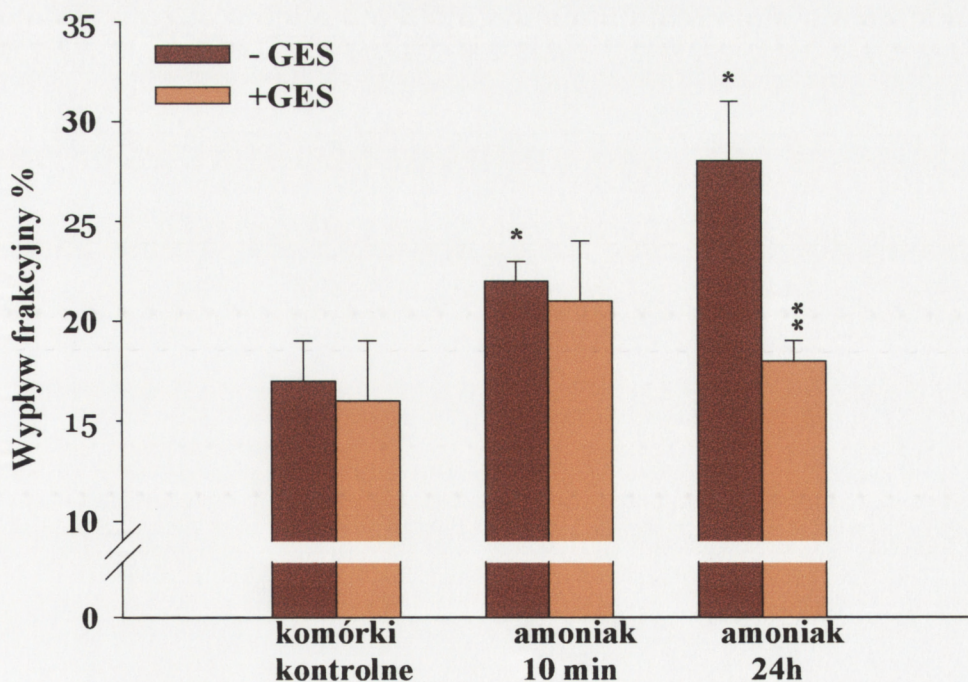
*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej wpływu przy p<0,05;

**różnica znamionna w stosunku do wartości wpływu pod nieobecność NIF przy p<0,05;

Zarówno 24h, jak i krótkotrwałe traktowanie komórek jonami amonowymi powodowało wzrost uwalniania się znakowanej Tau z komórek odpowiednio o 59% i 40%. Wzmoczony wypływ [^3H]Tau z komórek obserwowano również po zmianie pożywki na standardową. NIF o 34% hamował wypływ [^3H]Tau z komórek kontrolnych, pozostawiając niezmiennym wypływ aminokwasu we wszystkich warunkach inkubacji z jonami amonowymi (Ryc.V.7.).

Obecność 500 μM guanidyno-etano-sulfonaminy (GES) w buforze inkubacyjnym nie wpływała na uwalnianie się [^3H]Tau z komórek kontrolnych, obniżała natomiast o 36% uwalnianie się [^3H]Tau z komórek hodowanych 24h w obecności amoniaku do poziomu nie odbiegającego od obserwowanego z komórek kontrolnych (Ryc.V.8.).

Ryc.V.8. Wypływ frakcyjny [^3H]Tau z komórek glejaka C6 różnie traktowanych 10 mM chlorkiem amonu. Wpływ obecności 500 μM guanidynoetanosulfonaminy (GES).



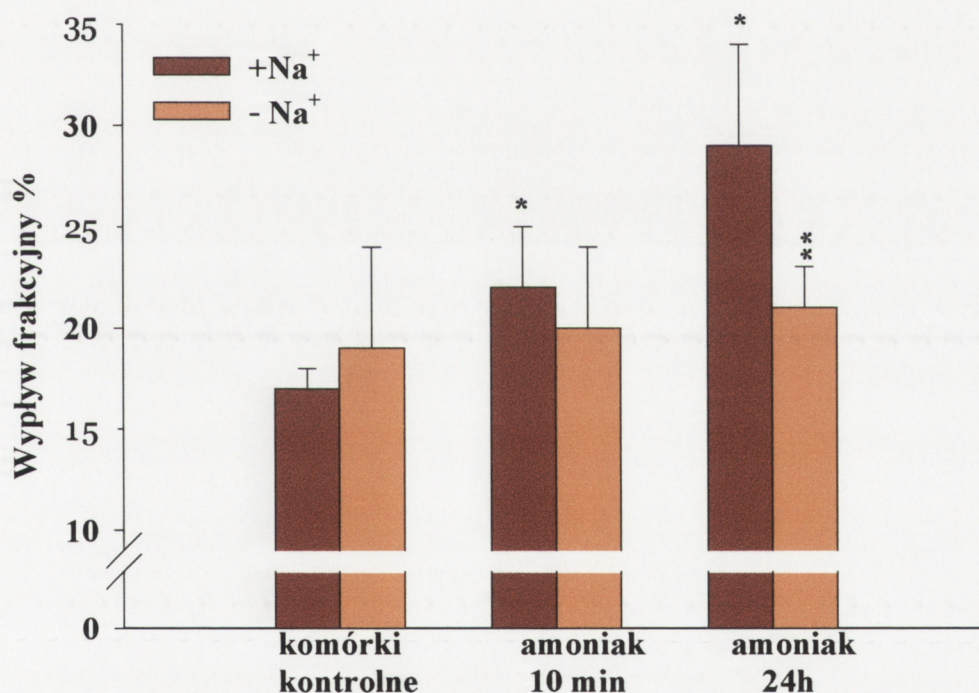
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej wypływu przy $p < 0,05$;

**różnica znamionna w stosunku do wartości wypływu pod nieobecność GES przy $p < 0,05$;

Postanowiono prześledzić wpływ [^3H]Tau z komórek C6 różnie traktowanych amoniakiem, pod nieobecność w buforze inkubacyjnym jonów Na^+ . Nieobecność w medium jonów Na^+ nie wpływała na uwalnianie [^3H]Tau z komórek kontrolnych, a także z komórek krótkotrwale traktowanych amoniakiem. W warunkach inkubacji komórek traktowanych przez 24h amoniakiem wpływ [^3H]Tau był obniżony o 40% i osiągał poziom kontrolny (Ryc.V.9.).

Ryc.V.9. Wpływ frakcyjny [^3H]Tau z komórek glejaka C6 różnie traktowanych 10 mM chlorkiem amonu. Wpływ obecności jonów Na^+ .



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=5).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej wpływu przy $p < 0,05$;

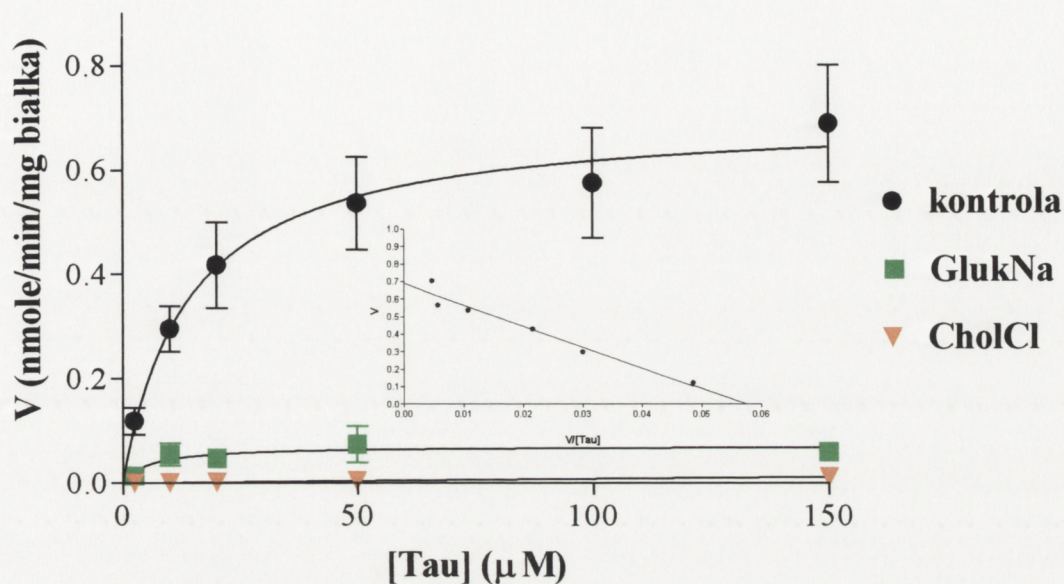
**różnica znamionna w stosunku do wartości wpływu w środowisku inkubacyjnym z jonami Na^+ przy $p < 0,05$;

V.3.3. Wychwył Tau przez komórki glejaka C6 w warunkach kontrolnych i w warunkach inkubacji z amoniakiem.

Badano udział aktywnego transportu Tau przez komórki kontrolne oraz komórki, u których indukowano zmiany różnie trwającym działaniem jonów amonowych w 10 mM stężeniu (“amoniak 24h”, “amoniak 10 min”) oraz w warunkach następczego odstawienia amoniaku (“amoniak +/-”). Wychwył Tau przez komórki miał charakter liniowy w zakresie od 2 do 20 min (dane nie umieszczone w pracy). **Rycina V.10.** przedstawia kinetykę wychwyłu Tau przez komórki kontrolne oraz zależność wychwyłu od jonów Na^+ i Cl^- . Wpływ kompetytorów: β -alaniny, hipotauryny i inhibitora transportu Tau – guanidynoetano-sulfonianu (GES) oraz Gln w stężeniu 0,5 mM (50 x nadmiar) na wychwył aminokwasu przedstawia **Ryc.V.11.**

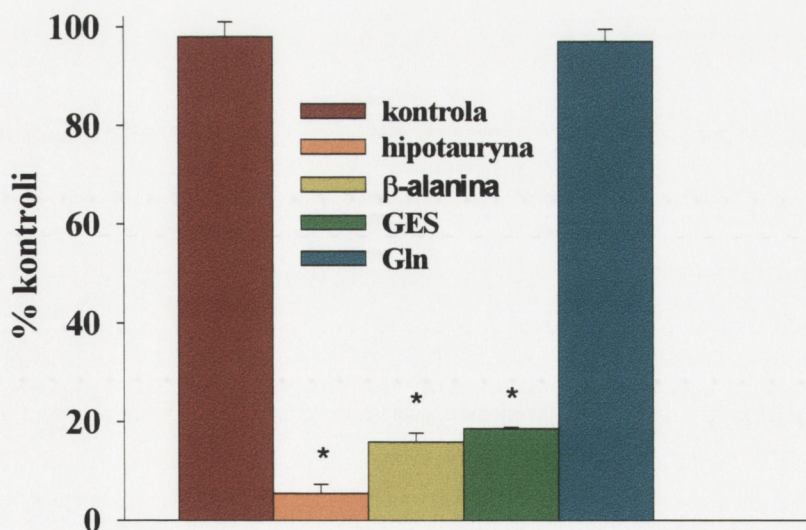
V_{MAX} wychwyłu Tau przez komórki C6 wynosiła $0,71 \pm 0,03$ nmola/min/mg białka, K_M dla wychwyłu wynosiła $14,13 \pm 2,31$ μM . Analiza kinetyczna według Michaelisa-Menten i Eadie-Hofstee wskazuje na jednoskładnikowy charakter wychwyłu. Parametry wychwyłu Tau przez komórki traktowanych przez 10 min jonami amonowymi nie wykazały wyraźnych różnic w stosunku do kontroli (**Ryc.V.12A, Tabela V.2.**). Hodowanie komórek w obecności 10 mM chlorku amonu przez 24h powodowało obniżenie V_{MAX} wychwyłu Tau o 24% (**Ryc.V.12B, Tabela V.2.**). Obserwowano powrót zmienionych parametrów wychwyłu Tau w obecności jonów amonowych, po zmianie pożywki na standardową (“amoniak+/-”) (**Ryc.V.12C, Tabela V.2.**). V_{MAX} tego wychwyłu była o 22% wyższa, niż V_{MAX} wychwyłu Tau przez komórki hodowane przez 24h z amoniakiem.

Ryc.V.10. Kinetyka wychwytu Tau przez komórki glejaka C6 i zależność wychwytu od jonów Na^+ i Cl^- . Analiza wg Michaelisa-Menten i Eadie-Hofstee (wykres wewnętrzny).



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=3-12).

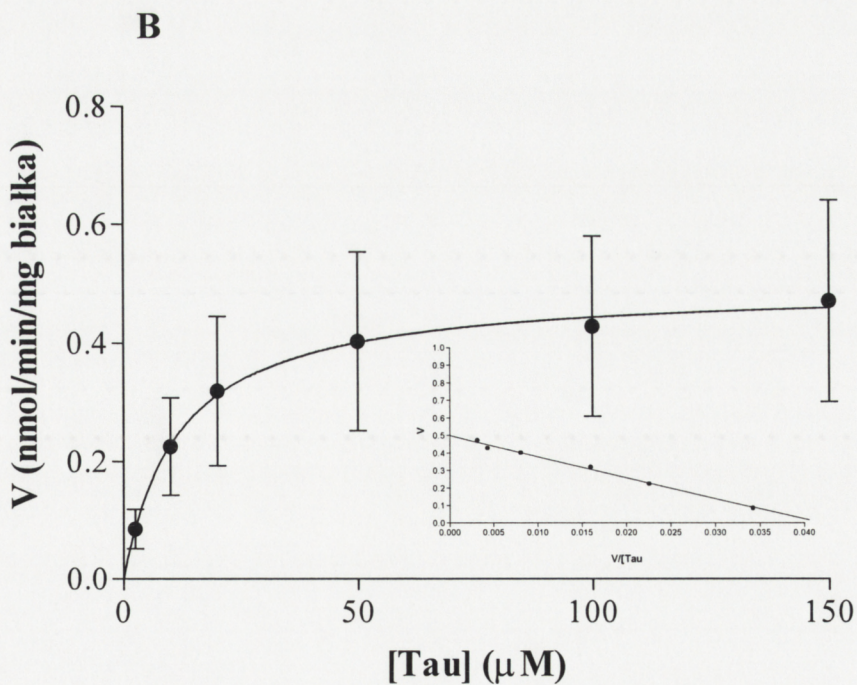
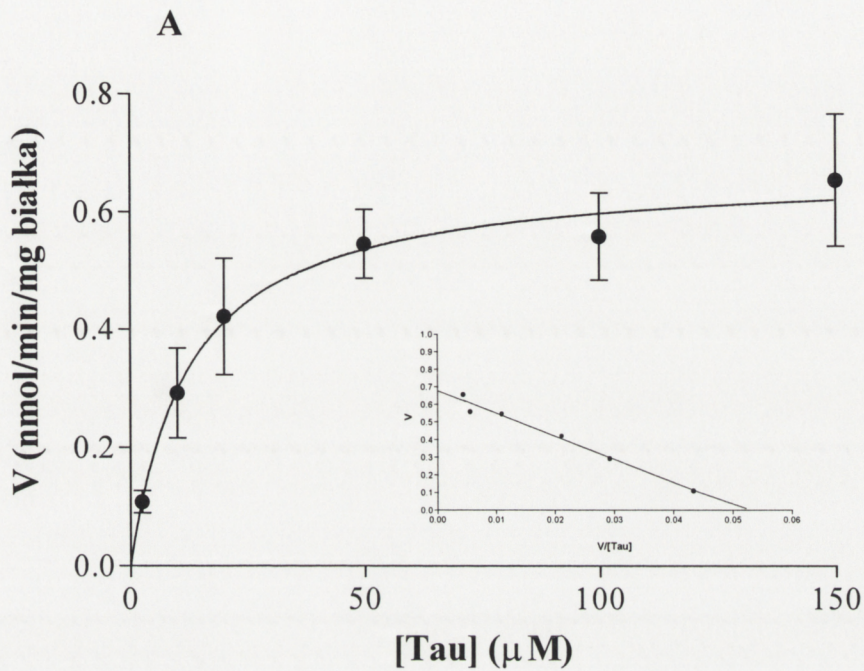
Ryc.V.11. Wpływ kompetytorów układowych oraz Gln na wychwyt Tau przez komórki C6 w warunkach kontrolnych.

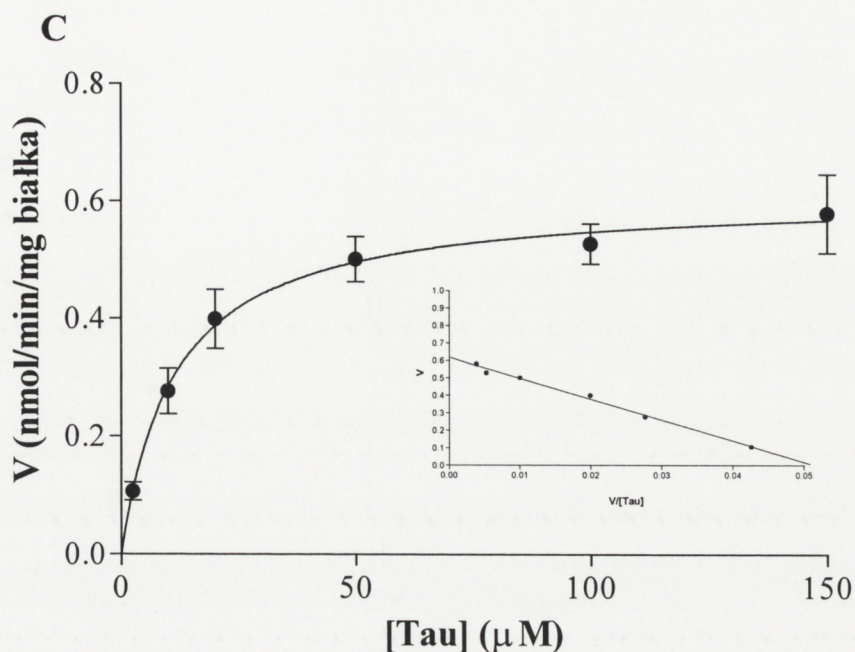


Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=4).

*różnica znamienne w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

Ryc.V.12. Kinetyka wychwytu Tau przez komórki C6 traktowane przez 10 min (A) i 24h (B) w obecności 10 mM chlorku amonu i przez komórki hodowane przez 24h w obecności 10 mM chlorku amonu i kolejne 24h w pożywce bez chlorku amonu (C). Analiza wg Michaelisa-Menten i Eadie-Hofstee (wykresy wewnętrzne).





Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=6-12).

Parametry wychwytu Tau do komórek glejaka C6 zestawiono w **Tabeli V. 2.**

Tabela V.2. Parametry kinetyczne wychwytu Tau przez komórki glejaka C6 poddane różnie trwającemu działaniu jonów amonowych.

	<i>Kontrola</i>	<i>Amoniak 10min</i>	<i>Amoniak 24h</i>	<i>Amoniak+/-</i>
V_{MAX} (<i>nmole/min/mg białka</i>)	$0,70 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,04^a$	$0,61 \pm 0,02^{a,b}$
K_M (μM)	$14,02 \pm 2,16$	$12,66 \pm 2,45$	$11,74 \pm 3,70$	$11,57 \pm 1,24$

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=6-12).

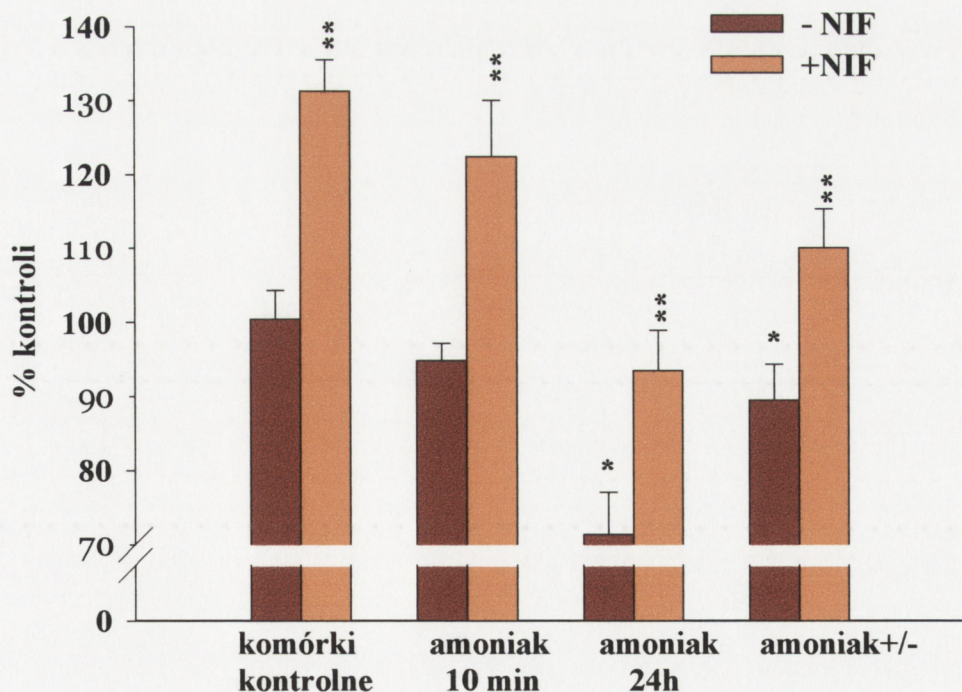
^aróżnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

^bróżnica znamionna w stosunku do wartości "amoniak 24h" przy $p < 0,05$;

Badano wpływ 200 μM stężenia NIF na wychwyt Tau przez komórki poddane różnie trwającemu działaniu jonów amonowych. Wyniki przedstawia **Ryc.V.13**. V_{MAX} wychwyty Tau była obniżona w przypadku komórek hodowanych 24h z jonami amonowymi i komórek, którym zmieniano pożywkę (amoniak+/-). NIF w różnym stopniu stymulował wychwyt Tau do komórek. W przypadku komórek kontrolnych o 32%, a różnie traktowanych amoniakiem kolejno o 28, 30 i 22% (**Ryc.V.13**).

Stymulacja wychwyty Tau przez NIF była w równym stopniu zależna od zastosowanej dawki NIF w przypadku komórek kontrolnych i komórek hodowanych przez 24h z 10 mM chlorkiem amonu, co przedstawia **Rycina V.14**.

Ryc.V.13. Względna wartość V_{MAX} dla wychwyty Tau przez komórki glejaka C6 różnie traktowanych 10 mM chlorkiem amonu. Wpływ 200 μM kwasu niflumowego (NIF).

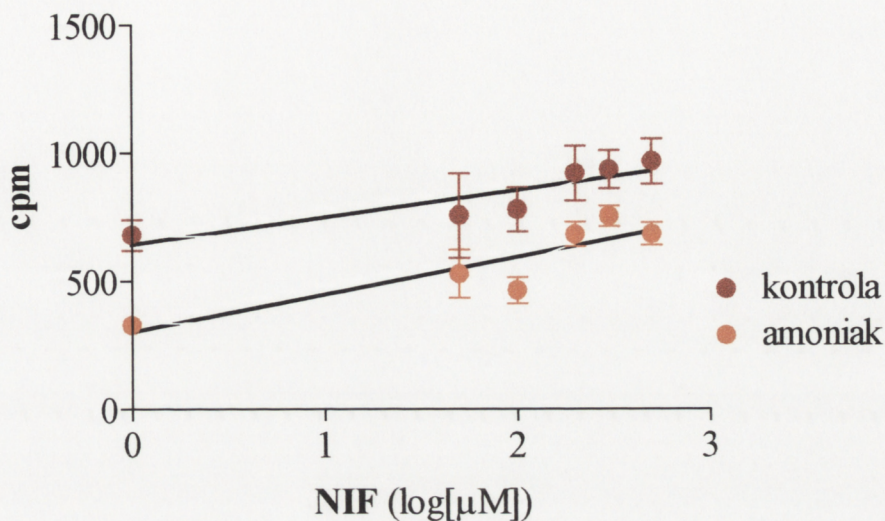


Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=5).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej wpływu przy $p < 0,05$;

**różnica znamionna w stosunku do wartości wpływu pod nieobecność NIF przy $p < 0,05$;

Ryc.V.14. Krzywa zależności wychwytu Tau od dawki NIF dla komórek kontrolnych glejaka C6 i komórek hodowanych przez 24h w obecności 10 mM chlorku amonu.



V.3.4. Ekspresja mRNA genu kodującego białko nośnika taurynowego (TauT) w komórkach glejaka C6.

Porównano ekspresję mRNA genu kodującego TauT w komórkach kontrolnych glejaka C6 ("kontrola"), komórkach hodowanych przez 24h w obecności 10 mM chlorku amonu ("amoniak 24h") oraz hodowanych przez 24h w obecności 10 mM chlorku amonu, które na kolejne 24h przeniesiono ponownie do pożywki standardowej ("amoniak +/-").

Produkty reakcji RT-PCR podano sekwencjonowaniu i porównano w programie BLAST (Altschul i wsp., 1997) z danymi dostępnymi w Banku Genów. Analiza porównawcza wykazała wysoką zgodność (93 - 98%) z sekwencją nukleotydową odpowiednich białek. W Tabeli V.3. przedstawiono wyniki uzyskane z analizy densytometrycznej poszczególnych produktów reakcji RT-PCR w stosunku do produktu reakcji RT-PCR dla konstytutywnego białka GAPDH.

Ekspresja TauT mRNA była o 65% podwyższona w komórkach hodowanych przez 24h z amoniakiem. Komórki, które przeniesiono ponownie na

24h do standardowej pożywki nie wykazywały po tym czasie zmian w ekspresji TauT mRNA w stosunku do kontroli.

Zdjęcie (**Fot.V.1**) przedstawia elektroforetyczny rozdział produktów reakcji RT-PCR na żelu agarozowym.

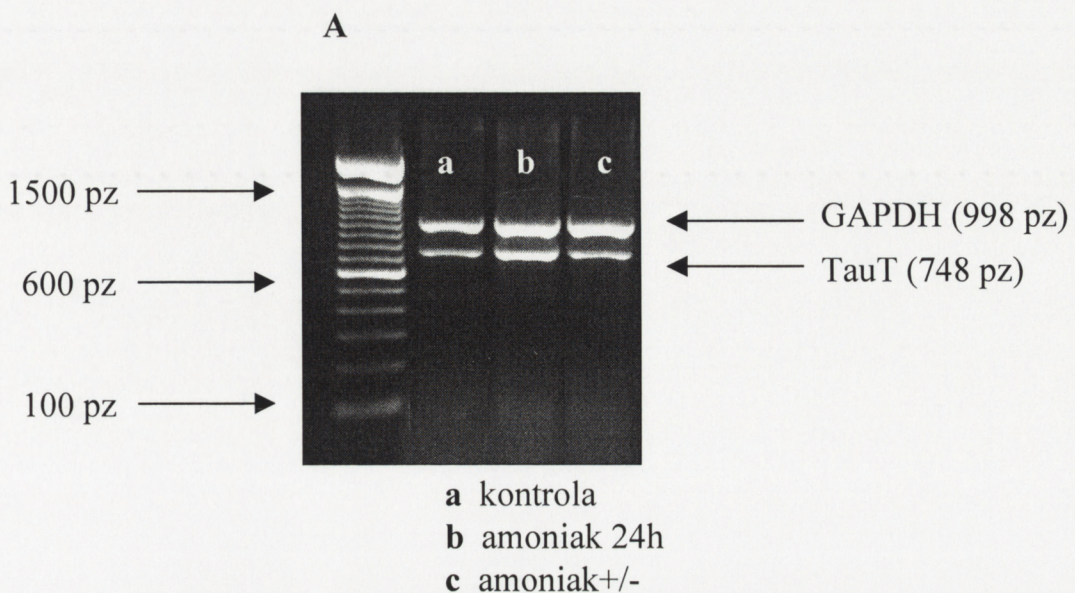
Tabela V.3. Ekspresja mRNA genu kodującego białko TauT w komórkach nie hodowanych („kontrola”), hodowanych 24h w obecności 10 mM chlorku amonu („amoniak 24h”) i komórek hodowanych 24h w obecności 10 mM chlorku amonu a następnie 24h w standardowej pożywce (amoniak +/-), mierzona stosunkiem intensywności produktu reakcji RT-PCR badanego białka do genu białka GAPDH.

	<i>TauT</i>
<i>Kontrola</i>	0,79 ± 0,09
<i>Amoniak 24h</i>	1,30 ± 0,10*
<i>Amoniak+/-</i>	0,68 ± 0,10

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=3-6).

*różnica znamionna w stosunku do wartości kontrolnej przy p<0,05;

Fot. V.1 Analiza ekspresji TauT mRNA w komórkach kontrolnych glejaka C6 („kontrola”), hodowanych 24h w obecności 10 mM chlorku amonu („amoniak 24h”) i komórkach przeniesionych ponownie do standardowego medium („amoniak+/-”).



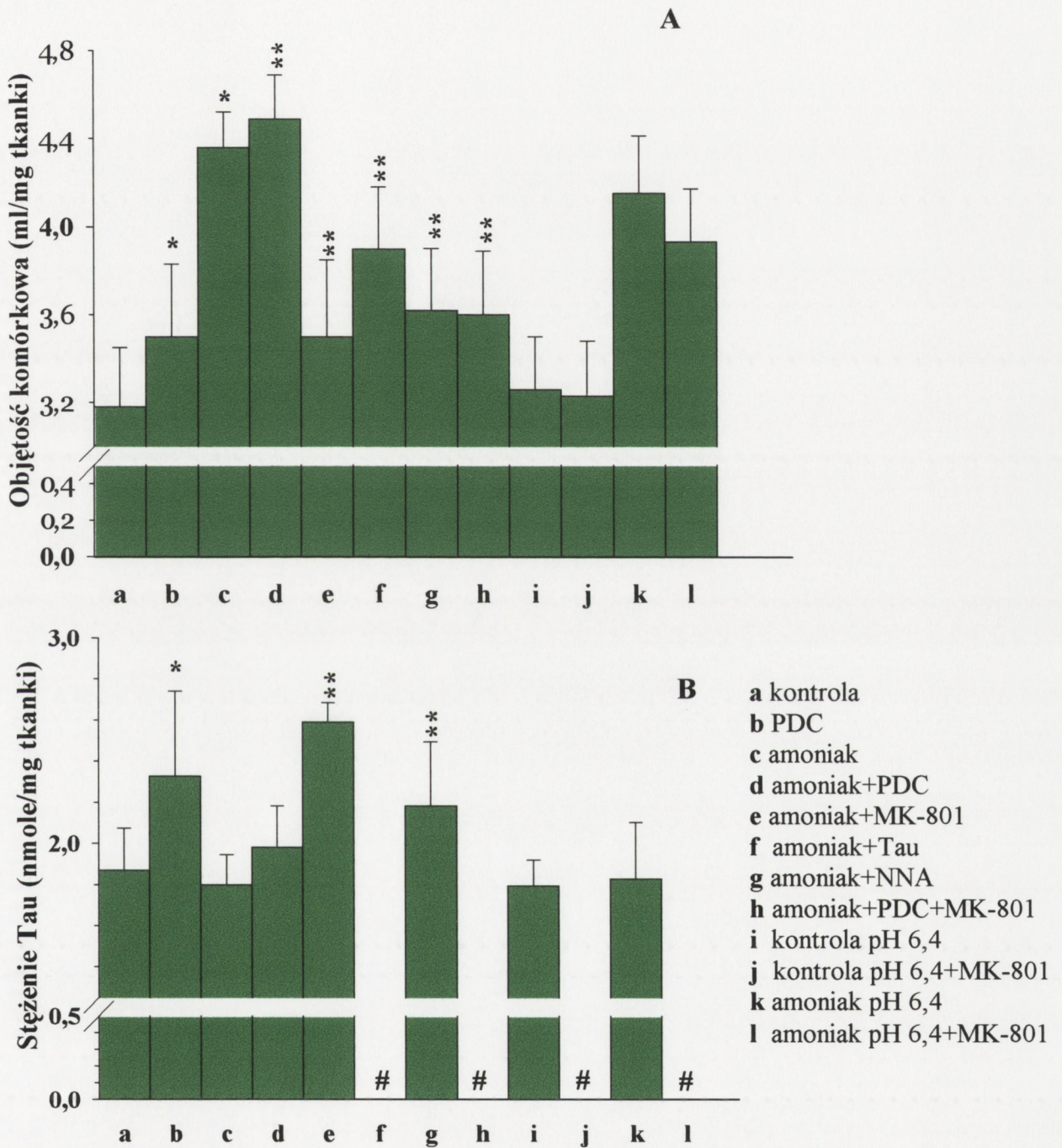
V.4. Ekscytotoksyczny mechanizm obrzmienia komórek w warunkach inkubacji skrawków z amoniakiem. Rola endogennej i egzogennej Tau.

Poprzednie serie doświadczeń przyniosły z jednej strony informację, że jony amonowe powodują wzrost objętości komórek w skrawku, z drugiej zaś, że dochodzi do intensywnego uwalniania się w tych warunkach Tau. Postanowiono zbadać, czy mechanizm wzrostu objętości komórki, jest związany z aktywacją receptorów NMDA i/lub z syntezą NO. W tym celu prowadzono inkubację w obecności antagonisty receptora NMDA (MK-801), inhibitora transportu Glu (PDC) i/lub inhibitora syntezy NO (NNA; nitroargininy). Zbadano też neuroprotekcyjne działanie różnych stężeń egzogenicznie podanej Tau.

W przeciwieństwie do poprzednio opisanych serii badań, w niniejszych, do medium inkubacyjnego dodawano 0,4 mM kwas askorbinowy. Niedawno wykazano, że obecność kwasu askorbinowego w medium wpływa dodatnio na żywotność skrawka, a zwłaszcza chroni komórki przed samoistnym obrzmieniem (Brahma i wsp., 2000). Objętość komórkowa skrawków kontrolnych inkubowanych w takich warunkach wynosiła $3,18 \pm 27$ $\mu\text{l}/\text{mg}$ tkanki (**Ryc.V.15A**), była zatem, zgodnie z przypuszczeniami, niższa niż w skrawkach inkubowanych pod nieobecność kwasu askorbinowego (**Ryc.V.2.**). Spośród czynników dodawanych do medium inkubacyjnego pod nieobecność amoniaku, jedynie 0,5 mM PDC powodował podwyższenie objętości komórek w skrawku. Amoniak powodował wzrost objętości komórek o 37,5% i potęgował działanie PDC. Zarówno obecność MK-801, jak i NNA, w stężeniu 0,5 mM oraz 10 mM Tau, redukowała wywołany amoniakiem wzrost objętości komórek odpowiednio o: 20%, 17% i 11%. MK-801 znosił również działanie PDC (**Ryc.V.15A**).

Stężenie Tau w skrawku kontrolnym wynosiło $4,66 \pm 0,82$ nmoli/mg tkanki i ulegało podwyższeniu w wyniku inkubacji z 0,5 mM PDC. Inkubacja skrawków z amoniakiem pod nieobecność innych czynników nie wpływała na stężenie Tau, natomiast w obecności MK-801 i NNA powodowała jej wzrost (**Ryc.V.15B**).

Ryc.V.15. Wpływ 5 mM octanu amonu ("amoniak") i/lub 0,5 mM: PDC, MK-801, NNA i 10 mM Tau, na objętość komórkową skrawków kory czołowej mózgu szczura ("kontrola") (A) i zawartość Tau w skrawku (B).



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=16 dla A) lub (n=8 dla B).

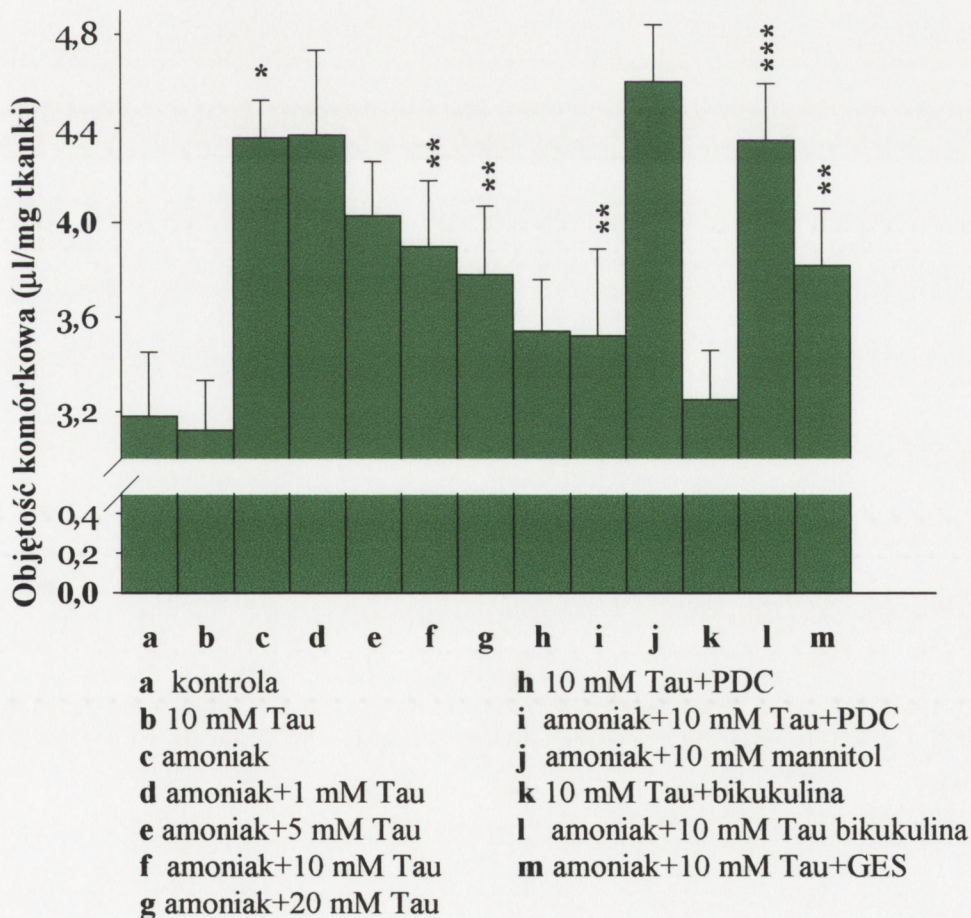
* różnica znamienna w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

** różnica znamienna w stosunku do wartości w skrawkach z amoniakiem przy $p < 0,05$;

nie mierzono;

Egzogennie podana Tau w stężeniach: 10 mM i 20 mM, redukowała o odpowiednio 11 i 13% wywołany amoniakiem wzrost objętości skrawka (Ryc.V.16.). Tau w 10 mM stężeniu znosiła efekt PDC. Obecność 10 mM mannitolu w buforze nie wpływała na wywołany PDC wzrost objętości komórek w skrawku. Działanie 10 mM Tau nie było hamowane obecnością w medium 0,5 mM GES - inhibitora transportu Tau, natomiast bikukulina – antagonist receptoru GABA_A, dodana do medium w stężeniu 0,5 mM, znosiła działanie Tau (Ryc.V.16.).

Ryc.V.16. Wpływ 5 mM octanu amonu (“amoniak”), egzogennej Tau i/lub 0,5 mM: PDC, mannitolu, GES i bikukuliny na objętość komórkową skrawków kory czołowej mózgu szczura (“kontrola”).



Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (n=16).

* różnica znamienna w stosunku do wartości kontrolnej przy $p < 0,05$;

** różnica znamienna w stosunku do wartości w skrawkach z amoniakiem przy $p < 0,05$;

*** różnica znamienna w stosunku do wartości “Tau+bikuculina” przy $p < 0,05$;

VI. DYSKUSJA

Aktywność syntezy Tau w mózgu jest stosunkowo niska (Huxtable, 1989), stąd utrzymanie właściwego stężenia Tau w OUN jest realizowane przede wszystkim poprzez jej transport, zaś efektywne przemieszczanie się pomiędzy przestrzeniami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi obserwowane w różnych stanach patologicznych, coraz częściej wiązane jest z jej funkcją protekcyjną i/lub neuromodulującą (Butterworth, 1996). Poznanie znaczenia transportu błonowego i zmian zawartości Tau w komórkach OUN w neurotoksycznym działaniu amoniaku może być częściowo utrudnione ze względu na nie do końca jasno określone funkcje tego aminokwasu.

Z wcześniejszych badań wiadomo, że amoniak powoduje wzmożone uwalnianie się znakowanej radioaktywnie Tau z hodowanych komórek *in vitro* (Albrecht i wsp., 1994; Faff i wsp., 1996), skrawków kory czołowej mózgu szczura w modelu ostrej EW wywołanej podaniem dootrzewnowo TAA i w modelu hiperamonemii prostej (Hilgier i wsp., 1996). Jednocześnie wiadomo, że w warunkach ostrego działania amoniaku dochodzi do wzrostu objętości komórki (Norenberg i wsp., 1991). Skłaniało to do sprawdzenia hipotezy o roli przemieszczania Tau w regulacji objętości komórki.

VI.1. Indukowany przez amoniak wpływ Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura, a objętość komórki: zmienne niezależne czy współzależne?

W niniejszej pracy badano wpływ endogennej Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura, które inkubowano w obecności 5 mM octanu amonu – stężenia występującego w mózgu w warunkach ostrej hiperamonemii (Cooper i Plum, 1987; Swan i wsp., 1992; Szerb i Butterworth, 1992; Conn, 1993). Postanowiono zbadać, czy mechanizm uwalniania się Tau w tych warunkach jest

związany ze zmianami objętości komórek w skrawku oraz czy wypływ Tau odbywa się poprzez kanały anionowe, a także czy ma związek z aktywnością wymiennika $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. Dlatego też zastosowano kwas niflumowy (NIF) i N-etylomaleimid (NEM) - inhibitory kanałów anionowych (Sánchez-Olea i wsp., 1992; Martinez i wsp., 1994; Keep i Xiang, 1996; Sánchez-Olea i wsp., 1996; Upton i Law, 1996) oraz bumetanid (BUT) – inhibitor wymiennika $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Yan i wsp., 2001).

Badania wykorzystujące jako materiał doświadczalny skrawki kory mózgowej szczura, stosowano już wcześniej do jednoczesnego mierzenia wypływu znakowanej izotopowo Tau i śledzenia zmian objętości komórkowej znakując przestrzeń pozakomórkową [^{14}C] inuliną w warunkach traktowania medium hipoosmotycznym (Law, 1994a; Law, 1994b; Upton i Law, 1996).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że amoniak stymuluje uwalnianie się Tau ze skrawków kontrolnych kory czołowej mózgu szczura, czemu towarzyszy wzrost objętości komórek w skrawku. We wcześniejszych badaniach, wykorzystujących szczurzy model ostrej EW wywołanej podaniem TAA, obserwowano wzrost zawartości wody w tkance mózgowej, co podobnie jak obniżenie gęstości względnej tkanki (Hilgier i Olson, 1994; Hilgier i wsp., 1996) interpretowano jako wykładnik wzrostu objętości komórkowej. Jednocześnie wzrostowi zawartości wody w korze mózgowej towarzyszyło obserwowane podwyższone stężenie Tau w tej strukturze (Hilgier i Olson, 1994).

NIF jest inhibitorem wrażliwego na zmiany osmolarności transportu Tau na zewnątrz komórki (Law, 1994a; Keep i Xiang, 1996; Sánchez-Olea i wsp., 1996). Wypływ Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura umieszczonych w środowisku hipotonicznym jest hamowany przez ten inhibitor, co z kolei wiąże się ze wzrostem objętości komórki (Law 1994a). Obserwowany wypływ Tau ze skrawków inkubowanych w środowisku izotonicznym i nie traktowanych amoniakiem był całkowicie hamowany przez NIF, czemu towarzyszył wzrost objętości komórek w skrawku (**Ryc.V.1. i V.2.**). Świadczy to o udziale i zaangażowaniu kanałów anionowych w tym procesie.

W warunkach inkubacji skrawków z amoniakiem, wypływ Tau był mniej wrażliwy na hamowanie przez NIF, a obecność tego inhibitora nie wiązała się ze zmianami objętości komórek (**Ryc.V.2.**). Zatem uwalnianie się Tau w tych warunkach może być tylko po części związane z procesami odpowiedzialnymi za regulację objętości komórkowej.

NEM w stężeniu 100 μM hamował wywołany hipotonią, zależny od objętości, wypływ Tau zarówno ze skrawków kory czołowej (Upton i Law, 1996), jak i hodowanych astrocytów (Martinez i wsp., 1994) i proces ten był związany ze wzrostem objętości komórek. W opisywanych warunkach doświadczalnych, inkubacja skrawków kontrolnych z NEM wyraźnie stymulowała wypływ Tau. Biorąc pod uwagę fakt, że NEM jest niespecyficznym inhibitorem wychwytu aminokwasów przez komórki OUN (Mullaney i wsp., 1994; Sibson i wsp., 1997), stymulujące działanie NEM na uwalnianie się Tau może być spowodowane zahamowaniem, czy też obniżeniem wychwytu zwrotnego aminokwasu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Oja i Saransaari, 1996). Wyraźne hamowanie przez NEM wypływu Tau ze skrawków w obecności amoniaku, współwystępowało z obniżeniem objętości komórek, co z kolei świadczy o istnieniu osmozależnej komponenty uwalniania aminokwasu przez amoniak.

Wymiennik $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ uczestniczy w regulacji objętości komórkowej i w transporcie jonów K^+ do wnętrza komórki. Zahamowanie przez BUT aktywności wymiennika $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ prowadzi do redukcji obrzmienia astrocytów i zmniejsza wychwyty jonów K^+ do komórek w warunkach hiposmotycznych (Mongin i wsp., 1994; Su i wsp., 2000). Obserwacja ta jest zgodna z opisywanym w naszym modelu obniżeniem objętości komórkowej w skrawkach kontrolnych, nie traktowanych amoniakiem. Spadek objętości nie wiązał się jednak z podwyższonym stężeniem Tau w medium. BUT redukował wywołany amoniakiem wzrost objętości komórek w skrawku i tylko w tym przypadku obserwowano obniżenie uwolnienia Tau do medium. Należałoby zatem przypuszczać, że w przemieszczaniu się Tau pomiędzy przestrzenią wewnątrz- i zewnątrzkomórkową pewną rolę odgrywa aktywacja tego wymiennika. Istnieją

doniesienia, iż wymiennik $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ może być aktywowany przez pobudzenie receptorów iGluR klasy NMDA (Sun i Murai, 1999; Schomberg i wsp., 2001). Taki mechanizm mógł wystąpić w warunkach inkubacji z amoniakiem. Amoniak jest czynnikiem silnie pobudzającym ten receptor (Hermenegildo i wsp., 1996), a jednym ze skutków pobudzenia jest uwalnianie Tau (porównaj rozdział VI.3.). Brak jednak dowodów na to, iż uwalnianie Tau na skutek pobudzenia receptora NMDA ma bezpośredni związek ze zmianą objętości komórki (Segovia i wsp., 1997).

W sumie wydaje się, iż indukowane przez amoniak zmiany objętości komórek i uwalnianie Tau do przestrzeni pozakomórkowej to w znacznym stopniu procesy niezależne.

VI.2. Zależność wywołanego przez amoniak wpływu Tau ze skrawków kory czołowej mózgu szczura od stężenia jonów potasu w środowisku inkubacyjnym.

Przypuszcza się, że wzmożone przemieszczanie się Tau pomiędzy przedziałami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi w OUN w różnych stanach patologicznych może pełnić funkcje neuroprotekcyjne, co jest realizowane z jednej strony poprzez interakcje Tau z błonami komórkowymi zabezpieczającymi ich integralność, ewentualnie poprzez reakcje z receptorami GABA_A , co może wpływać na pobudzenie hamującego neuroprzekaznictwa aminokwasowego (Saransaari i Oja, 1997; 2000). W badaniach omówionych powyżej wykazano, iż w obecności jonów amonowych, w warunkach spoczynkowych, dochodzi do wzmożonego uwalniania się Tau ze skrawków kontrolnych i proces ten nie wiąże się bezpośrednio z procesami odpowiedzialnymi za regulację objętości komórek. Powstało pytanie, czy mechanizm ten występuje w warunkach podwyższonych stężeń jonów K^+ , odzwierciedlających fizjologicznie bądź patologicznie wzmożoną aktywność neuronów (Somjen, 1979; Sykova, 1983; Walz i Hertz, 1983).

Wpływ amoniaku na wypływ Tau w warunkach podwyższonych stężeń jonów K^+ (7,5 – 15 mM) wydaje się słabszy niż w warunkach spoczynkowych (5 mM K^+). O ile wypływ netto Tau przez amoniak dość wyraźnie różni się w zakresie stężeń fizjologicznych (5 - 7,5 mM), niknie w warunkach depolaryzacji o charakterze patogennym (**Ryc.V.3.**). Zatem, jeżeli założymy, że wyrzut Tau przez amoniak jest funkcjonalny, to te funkcje nie ujawniają się w warunkach imitujących warunki patologiczne, uwalnianie się Tau w obecności amoniaku w 10 i 15 mM K^+ nie różniło się od wypływu w warunkach kontrolnych przy analogicznych stężeniach K^+ . Ten brak odpowiedzi na działanie amoniakiem może być związany z konkurencją pomiędzy jonami NH_4^+ i K^+ o kanał kationowy (Hille, 1992). Byłoby to również zgodne z obserwowanym brakiem wzmożonego wypływu Tau z komórek gleju Müllera w warunkach jednoczesnego działania jonów amonowych i depolaryzacji błon komórkowych jonami K^+ (Faff i wsp., 1997).

Tłumaczenie to jest do pogodzenia z uzyskanymi w badaniach wypływu Tau z astrocytów mózdkowych traktowanych amoniakiem, gdzie obecność jonów amonowych wzmagala uwalnianie się Tau z komórek przy fizjologicznych stężeniach K^+ , a jednocześnie obniżała wypływ w warunkach podwyższonego stężenia K^+ (Wysmyk i wsp., 1994).

VI.3. Gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej pod wpływem amoniaku *in vivo*: rola aktywacji iGluR.

Zastosowanie metody dializy – perfuzji pozwoliło na podanie amoniaku bezpośrednio do badanej okolicy mózgu. Możliwość dokładnego określenia stężenia amoniaku przechodzącego przez błonę dializacyjną, ułatwiła jego podanie w stężeniu zbliżonym do opisywanego w modelach ostrej hiperamonemii (Swan i wsp., 1992; Szerb i Butterworth, 1992; Conn, 1993). Jednocześnie podawano związki farmakologicznie czynne: MK-801, PDC, FUR i DNQX (wszystkie w stężeniu 1mM), których działanie miało ocenić udział receptorów dla Glu klasy NMDA i AMPA/KA oraz zaangażowanie wymiennika

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ w mechanizmie uwalniania się Tau w warunkach toksycznego działania amoniaku.

Superfuzja amoniakiem powodowała wzmożone gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej w prążkowie szczura. Obserwowane zmiany miały charakter przejściowy. Po odstawieniu bodźca, zewnątrzkomórkowe stężenie Tau wracało do poziomu podstawowego (**Ryc.V.4.**). Wyniki jednoznacznie wskazują, że amoniak jest bezpośrednim aktywatorem uwalniania Tau również *in vivo*. We wcześniejszych badaniach podwyższone stężenie Tau obserwowano w mikrodializatach kory mózgowej szczura w ostrym modelu oraz w modelu zespolenia wrotno-układowego, w fazie, w której amoniak utrzymuje się na znacznie podwyższonym poziomie (Bosman i wsp., 1992). W bezobjawowych czy też łagodnych stanach EW, którym nie towarzyszy podwyższone stężenie jonów amonowych w mózgu, pozakomórkowe stężenie Tau pozostaje niezmienione lub obniżone (Tossman i wsp., 1983; Tossman i wsp., 1987; Hilgier i wsp., 1999; Zielińska i wsp., 2001). W modelach tych jedynie w warunkach podwyższonych stężeń K^+ obserwuje się wzmożone gromadzenie Tau w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Butterworth, 1996; Hilgier i wsp., 1999; Zielińska i wsp., 2001).

Zastosowanie MK-801 - antagonisty receptora NMDA, pod nieobecność amoniaku, powodowało gromadzenie się Tau w przestrzeni pozakomórkowej w prążkowie szczura. Efekt ten można tłumaczyć jego działaniem toksycznym, niezwiązanym z bezpośrednim oddziaływaniem z receptorami NMDA (Zhang i wsp., 1996; Horvath i wsp., 1997). Jednak zarówno MK-801 jak i DNQX – antagonistą receptora AMPA/KA, powodował obniżenie wywołanego amoniakiem gromadzenia się Tau w mikrodializatach. Sugeruje to, iż uwalnianie się Tau pod wpływem amoniaku jest wtórne do aktywacji tych receptorów. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami, iż pobudzenie iGluR przez ich agonistów w warunkach kontrolnych powoduje uwalnianie Tau do mikrodializatów prążkowiec szczura (Menendez i wsp., 1993; Shibanoki i wsp., 1993; Segovia i wsp., 1997). O fakcie, iż amoniak pobudza iGluR *in vivo*, uprzednio wnioskowano pośrednio, na podstawie obserwacji obniżonej

śmiertelności szczurów i myszy (Marcaida i wsp., 1992; Hermenegildo i wsp., 1996), oraz ustąpienia patologicznych następstw hiperamonemii po podaniu memantyny (Vogels i wsp., 1997). Niniejsze wyniki stanowią pierwszą dokumentację takiego pobudzenia na poziomie regulacji uwalniania neuroaktywnego aminokwasu.

W zwierzęcych modelach ostrej EW, gromadzeniu się Tau w przestrzeni pozakomórkowej często towarzyszy wzrost Glu uwalnianego z komórek (De Knegt i wsp., 1994; Michalak i wsp., 1996). Farmakologiczne zablokowanie wychwytu zwrotnego Glu do komórek jest sprzężone z aktywacją receptorów NMDA (Velasco i wsp., 1996). PDC – wybiórczo działający analog Glu, powoduje zahamowanie wychwytu zwrotnego Glu i nie oddziałuje przy tym bezpośrednio ani z jonotropowymi ani z metabotropowymi receptorami Glu (Bloc i wsp., 1991). Superfuzja PDC wywoływała wzrost stężenia Tau w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w prążkowie szczura (Segovia i Mora, 2001; Del Arco i wsp., 2000). Obserwowane w niniejszej pracy wzmożenie przez PDC wywołanego amoniakiem gromadzenia się tego aminokwasu stanowi zatem dodatkowy dowód na zależny od iGluR mechanizm tego procesu.

Wiadomo, że wpływ Tau z komórek hodowanych *in vitro*, związany jest z uaktywnieniem kanałów jonowych (Jackson i Strange, 1993; Pasantes-Morales i wsp., 1996). Opisano wrażliwość wpływu Tau i innych aminokwasów z tkanek OUN *in vivo* i *in vitro* w warunkach stresu hipoosmotycznego i działania podwyższonych stężeń K^+ (O'Connor i Kimelberg, 1993; Vitarella i wsp., 1994) na furosemid i bumetanid - inhibitory kotransportu $Na^+/K^+/Cl^-$, a także na stilbeny (np. SITS, DIDS), będące powszechnie stosowanymi inhibitorami kanałów anionowych.

Przyczyny gromadzenia się Tau w przestrzeni pozakomórkowej, wywołane perfuzją FUR, mogą być złożone. Podobnie jak BUT zastosowany w badaniach *in vitro*, który powodował uwalnianie się Tau ze skrawków pod nieobecność amoniaku, zahamowanie przez FUR aktywności wymiennika $Na^+/K^+/Cl^-$ może prowadzić do uaktywnienia procesów związanych z regulacją

objętości, a to może powodować uwalnianie się z komórek związków osmotycznie czynnych, w tym Tau.

Wywołany superfuzją amoniaku wpływ Tau *in vivo* nie był hamowany w obecności FUR. Przypuszczalnie świadczy to o braku lub niewielkiej roli mechanizmu osmozależnego w uwalnianiu Tau w obecności amoniaku.

VI.4. Wpływ jonów amonowych na przemieszczanie się Tau w komórkach glejaka C6: udział nośnika taurynowego (TauT).

Szczegółowe badanie mechanizmu zmian transportu Tau pod wpływem amoniaku zostały przeprowadzone na linii komórkowej C6 wywodzącej się ze szczurzego glejaka. Komórki te w przeszłości z powodzeniem wykorzystywano w badaniach mechanizmu wpływu aminokwasów, w tym Tau, w procesach regulacji objętości komórki w następstwie działania bodźców osmotycznych (Jackson i Strange, 1993; Mountain i wsp., 1996; Kimelberg i Mongin, 1998).

Krótkotrwałe - 10 min traktowanie komórek amoniakiem miało na celu wywołanie hiperpolaryzacji błon komórkowych (Bender i Norenberg 2000), z kolei dłuższe - 24h symulowało model podostrej hiperamonemii (Albrecht i wsp., 1994 ; Faff i wsp., 1997; Zwingmann i wsp., 2000). Postanowiono również zbadać, czy ewentualne zmiany w określanych parametrach transportu Tau są efektem trwałym, dlatego też badaniu poddano komórki, które po 24h traktowaniu amoniakiem umieszczono ponownie na 24h w pożywce pozbawionej jonów amonowych.

W niniejszej pracy równolegle śledzono wpływ endogennej i znakowanej Tau. W badaniach prowadzonych właśnie w ten sposób brano pod uwagę ewentualność nierównomiernego wysycania wewnątrzkomórkowych puli aminokwasu, aminokwasem znakowanym. Wyniki uzyskane obiema metodami, wskazujące na wzmożony, pod wpływem amoniaku, wpływ endogennej i radioaktywnej Tau z komórek są podobne (**Ryc.V.6., Ryc.V.7.**), co jest zgodne z wcześniejszymi doświadczeniami Martina (Shain i wsp., 1989), dowodzącymi stosunkowo szybkiego wyrównywania się endo- i egzogennej puli Tau. Różnice

pomiędzy wpływem frakcyjnym [^3H]Tau i endogennej Tau mogą jednak świadczyć o tym, że to wyrównanie jest niezupełne. We wcześniejszych badaniach, wzmożony wpływ znakowanej Tau pod wpływem amoniaku obserwowano również w hodowanych *in vitro* astrocytach korowych (Albrecht i wsp., 1994), mózdkowych (Wysmyk i wsp., 1994) i gleju Müllera (Faff-Michalak i wsp., 1994; Faff i wsp., 1996; 1997), zaś endogennej Tau ze skrawków kory czołowej szczura (porównaj rozdział VI.1.).

Udział kanałów anionowych w procesie uwalniania się Tau (ale również i innych aminokwasów) z komórek OUN został szczególnie dokładnie poznany w procesie regulacyjnego zmniejszania objętości, który uaktywnia się podczas obrzmienia komórek. Cechą osmozależnego wypływu Tau z różnych komórek OUN jest m.in. wrażliwość wypływu na inhibitory kanałów anionowych (NIF, NPPB, DIDS) (Pasantés-Morales, 1996).

Wpływ znakowanej Tau z hodowanych komórek gleju Müllera pod wpływem amoniaku nie był hamowany przez FUR, był niezależny od jonów Ca^{2+} i związany z wewnątrzkomórkowym poziomem cAMP (Faff i wsp., 1996). Jednocześnie obserwowana wrażliwość wypływu na NIF- typowy inhibitor kanałów anionowych sugerowała współistnienie drugiej – osmoniezależnej komponenty wypływu Tau.

W niniejszej pracy postanowiono określić udział kanałów anionowych w procesie wywołanego przez amoniak uwalniania się [^3H] Tau. Obecność NIF w medium w sposób wyraźny hamowała wpływ znakowanej Tau z komórek kontrolnych, podobnie jak to obserwowano w doświadczeniach na skrawkach kory czołowej mózgu szczura. Uwalnianie Tau z traktowanych amoniakiem komórek pozostawało niewrażliwe na działanie NIF (**Ryc.V.7.**). Należało zatem przyjąć, że nie był to bierny wpływ przez kanały anionowe, co skłoniło do próby określenia udziału transportu aktywnego w wywołanym amoniakiem uwalnianiu się Tau. Zastosowanie GES – inhibitora transportu Tau, prowadziło do zahamowania, wzmożonego w warunkach działania amoniaku, wypływu Tau do poziomu kontrolnego (**Ryc.V.8.**). Podobny efekt zaobserwowano przy zastosowaniu środowiska pozbawionego jonów Na^+ (**Ryc.V.9.**). Są to wyniki

zgodne z hipotezą zakładającą udział nośnika Tau w tym procesie: transport Tau jest całkowicie zależny od jonów Na^+ (patrz poniżej).

Wychwyt Tau przez komórki C6 charakteryzowany był na podstawie analizy kinetycznej transportu, intensywności hamowania przez swoiste substraty i zależności od składu jonowego medium inkubacyjnego. Aktywny transport Tau wcześniej był badany w różnych typach komórek. Z lat 80 - tych pochodzą pierwsze prace charakteryzujące układ transportujący Tau w neuronach i astrocytach pochodzenia mózdkowego i korowego (Holopainen i Kontro, 1986; Holopainen i wsp., 1987), zaś we wczesnych latach 90-tych, udało się wyizolować i opisać cDNA białka kodującego transporter Tau (TauT) m.in. w mózgu myszy (Liu i wsp., 1992) i szczura (Smith i wsp., 1992).

Analiza kinetyczna wykazała, że system transportujący Tau w komórkach C6 nie odbiega od uprzednio scharakteryzowanego układu w innych typach komórek (Holopainen i wsp., 1987; Smith i wsp., 1992). Jest to układ o wysokim powinowactwie ($K_M = 14,02 \pm 2,16 \mu\text{M}$), silnie zależny od jonów Na^+ i Cl^- oraz hamowany przez β -alaninę, hipotaurynę i GES, nie hamowany zaś przez Gln, aminokwas transportowany przez inne układy transportowe (**Ryc.V.10.**, **Ryc.V.11.**, **Tabela V.2.**).

Stres metaboliczny, hipoglikemia, hipoksja, ischemia, a także obecność NO - stany zaburzające prawidłowy metabolizm, obniżają wychwyt Tau przez komórki OUN (Saransaari i Oja, 1996; Bridges i wsp., 2001). Komórki traktowane przez 24h amoniakiem wykazywały niższą wartość prędkości maksymalnej wychwytu Tau przy niezmienionym powinowactwie do substratu. Parametry kinetyczne wychwytu Tau przez komórki, które ponownie umieszczono na 24h w standardowym medium wykazywały wyższą, zbliżoną do kontrolnej wartość V_{MAX} , co może świadczyć o odwracalności procesu (**Ryc.V.12.**, **Tabela V.2.**).

W obecności NIF, wychwyt Tau zarówno przez komórki kontrolne, jak i komórki traktowane jonami amonowymi był podwyższony (**Ryc.V.13.**). Podobne stymulujące działanie NIF obserwowano w warunkach uwalniania się [^{14}C]kreatyny z hodowanych astrocytów (Bothwell i wsp., 2002). Uwalnianie się

substancji osmotycznie czynnych przez kanały jest mechanizmem kompensacyjnym i o tyle złożonym, że zahamowanie jednej dostępnej drogi przemieszczania się substancji może prowadzić do aktywacji innej (Bothwell i wsp., 2002). W przypadku bardziej intensywnego wychwytu Tau w obecności NIF również można przyjąć takie wytłumaczenie.

Analiza ekspresji mRNA genu kodującego białko nośnika taurynowego (TauT) wykazała podwyższony poziom ekspresji w komórkach traktowanych przez 24h amoniakiem (**Fot.V.1.**, **Tabela V.3.**). Podwyższoną ekspresję TauT mRNA opisywano w komórkach różnego pochodzenia (astrocyty, neurony, komórki nabłonkowe, hepatocyty) poddanych działaniu środowiska hipertonicznego, a także w warunkach podwyższonego, zewnątrzkomórkowego stężenia Tau (Bitoun i Tappaz, 2000a; Bitoun i Tappaz, 2000b), a powyższe zmiany w poziomie ekspresji TauT mRNA uważa się za przejaw funkcji adaptacyjnych. Są to na ogół zmiany nietrwałe, ponowna zmiana warunków na warunki pierwotne powoduje całkowitą odwracalność efektu.

Uzyskane w tej pracy dane: wzmożony wpływ i obniżony wychwyt Tau przez błony komórkowe wskazują na wyraźne ukierunkowanie transportu Tau na zewnątrz komórki, co może ułatwiać neuroprotekcijną rolę aminokwasu. Dodatkowo obserwowana podwyższona ekspresja TauT w komórkach C6 traktowanych przez 24h amoniakiem, a także stwierdzony brak zaangażowania kanałów jonowych w przemieszczanie się Tau świadczy o dominującej roli aktywnego transportu w tym procesie. Poziom ekspresji TauT mRNA ma charakter przejściowej adaptacji do zmienionego środowiska, po ponownym przeniesieniu komórek z pożywki z amoniakiem do pożywki standardowej, ekspresja TauT mRNA w tych komórkach nie różniła się od ekspresji wykazanej w komórkach kontrolnych.

VI.5. Ekscytotoksyczny mechanizm obrzmienia komórek: neuroprotekcjna rola Tau.

Cytotoksyczny obrzęk mózgu wynikający ze wzrostu objętości komórek jest najpoważniejszym w skutkach przejawem neurotoksyczności amoniaku (Häussinger, 2000). Niniejsze badania *in vivo* wykazały, że jednym z czynników zapoczątkowujących uszkodzenie komórek OUN przez amoniak może być aktywacja (bądź uwrażliwienie) receptorów błonowych klasy NMDA dla Glu. Badania grupy Felipo (Hermenegildo i wsp., 2000) przeprowadzone w modelu hiperamonemii prostej jak również w modelu zespolenia wrotno - układowego u szczura (Larsen i wsp., 2001) wskazują na następce do aktywacji receptorów NMDA, gromadzenie się tlenku azotu. Postanowiono przebadać rolę aktywacji receptora NMDA i następcej akumulacji NO w procesie, wywołanego przez amoniak, wzrostu objętości komórek. Zastosowany model ulepszono zwiększając przeżywalność skrawków poprzez dodanie do medium 0,4 mM kwasu askorbinowego. Wykazano, że jego obecność chroni komórki przed samoistnym ich obrzmieniem (Brahma i wsp., 2000).

Wzrost objętości komórek w skrawku traktowanym jonami amonowymi, potwierdza wcześniejsze obserwacje, kiedy to skrawki nie były chronione antyoksydantem. Wzrost objętości komórek pod wpływem amoniaku uległ znaczącej redukcji w obecności MK-801, a także nitroargininy (NNA) – inhibitora NOS. Osłabione działanie MK-801 obserwowano w pH 6,4, przy którym nie był widoczny efekt zmniejszenia objętości komórki (**Ryc.V.15A**). Obserwacja ta jest zgodna z wykazaną obniżoną zdolnością blokowania kanału receptora NMDA przez MK-801 w niskim pH (Rajdev i Reynolds, 1993). W ten sposób potwierdzono znaczący udział komponenty ekscytotoksycznej w obrzmieniu komórek.

Związek przyczynowy pomiędzy zmianami objętości komórki a aktywacją (uwrażliwieniem) receptorów NMDA, potwierdzono w doświadczeniach z PDC, inhibitorem transportu Glu, powodującego jego nagromadzenie się w przestrzeni pozakomórkowej i aktywację iGluR (Koyama i wsp., 2000). W warunkach

inkubacji skrawków z 0,5 mM PDC obserwowano wzrost objętości komórek, który był spotęgowany w obecności amoniaku.

Dane uzyskane z chromatograficznej analizy zawartości Tau w skrawkach inkubowanych w obecności poszczególnych czynników nie potwierdziły udziału Tau w mechanizmach regulacji objętości komórkowej. W wyniku inkubacji skrawków z amoniakiem obserwowano jedynie nieznaczny spadek zawartości Tau, pomimo iż dochodziło do wyraźnego wzrostu objętości komórek, a zmianom objętości wywołanym przez różne czynniki nie towarzyszyły znaczące zmiany stężenia aminokwasu (**Ryc.V.15b**).

Dane w piśmiennictwie potwierdzają neuroprotekcyjne działanie egzogennie podanej Tau, w stosunkowo wysokich stężeniach, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (Timbrell i wsp., 1995). W niniejszych badaniach wykazano, iż dodanie Tau do medium inkubacyjnego w znacznym stopniu zapobiega wzrostowi objętości komórek pod wpływem działania amoniaku. Efekt ten jest zależny od stężenia egzogennej Tau - tylko wyższe stężenia: 10 i 20 mM redukowały wzrost objętości. To, że efekt Tau nie był prostym skutkiem podwyższenia osmolarności medium, zostało potwierdzone poprzez dodanie do medium inkubacyjnego takiego samego - 10 mM stężenia mannitolu, substancji nie wykazującej działania antyoksydacyjnego. Wykazany brak efektu świadczy wyraźnie o nie związanym ze zmianą osmolarności medium efekcie Tau.

Tau efektywnie przeciwdziałała wzrostowi objętości w obecności GES – inhibitora jej wychwytu do komórek, natomiast bikukulina – antagonist receptoru GABA_A, redukowała ten efekt (**Ryc.V.16**). Można zatem przypuszczać, że protekcyjna rola Tau jest w jakiś sposób związana z aktywacją receptorów GABA. Podobne spostrzeżenia co do ochronnej roli egzogennej Tau opisywano w warunkach działania rodnika MPP⁺, który wywołuje degenerację neuronów dopaminergicznych (O’Byrne i Tipton, 2000) oraz neuronów poddanych działaniu kwasu kainowego (Boldyrev i wsp., 1999). Opisywano również, że wysokie, 25 mM stężenie egzogennej Tau może chronić neurony przed ich uszkodzeniem wywołanym neurotoksycznym działaniem Glu (Tang i wsp., 1996; Wu i wsp., 1998). Sugeruje się, że protekcyjna rola Tau może

polegać z jednej strony na hiperpolaryzacji błon komórkowych (O'Byrne i Tipton, 2000) oraz na regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} (Wu i wsp., 1998).

W poprzednio omówionych badaniach wykazano, iż amoniak powoduje uwalnianie się Tau do przestrzeni pozakomórkowych. Można przypuszczać, że tak uwalniania Tau działa protekcyjnie, jakkolwiek biorąc pod uwagę stosunkowo niskie stężenie uwolnionego aminokwasu jest to prawdopodobnie tylko działanie lokalne.

VII. WNIOSKI

1. Działanie jonów amonowych na skrawki kory czołowej mózgu szczura powoduje zarówno wzrost objętości komórek, jak i wzmożone uwalnianie się Tau do medium inkubacyjnego. Oba procesy są jednak częściowo niezależne. Zależne od amoniaku uwalnianie Tau jest słabsze w warunkach zwiększonej depolaryzacji błony komórkowej.
2. Amoniak podany *in vivo* bezpośrednio do prążkowieca powoduje uwalnianie się Tau do przestrzeni pozakomórkowej i proces ten związany jest głównie z aktywacją iGluR. Udział mechanizmów związanych z regulacją objętości wydaje się nikły.
3. Jony amonowe aktywują wypływ Tau z hodowanych *in vitro* komórek pochodzenia glejowego (glejaka C6), głównie za pośrednictwem nośnika błonowego swoistego dla Tau (TauT). Mechanizm aktywacji obejmuje odwracalny wzrost ekspresji TauT mRNA oraz zmianę faworyzowanego kierunku transportu z “do wewnątrz” na “na zewnątrz”. Jest to zgodne z udokumentowanym w badaniach na skrawkach mózgu małym zaangażowaniem objętościowych kanałów jonowych w zależny od amoniaku wypływ Tau z komórek OUN.
4. Obrzmienie komórek w OUN wywołane podaniem amoniaku *in vitro* jest w dużej mierze wynikiem nadpobudzenia receptora NMDA i generacji NO, ma zatem charakter ekscytotoksyczny. Traktowanie komórek Tau łagodzi ich obrzmienie, a mechanizm neuroprotekcynnego działania Tau związany jest z aktywacją receptorów GABA_A. Można spekulować, iż pobudzenie aktywnego transportu Tau na zewnątrz stanowi element zaprogramowanego mechanizmu neuroprotekcynnego.

VIII. PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J., 1996, Astrocytes and ammonia neurotoxicity. Aschner M., Kimelberg HK., The role of glia in neurotoxicity, Boca Raton, FL: CRD Press, str. 137-53.
2. Albrecht J., 1998, Roles and neuroactive amino acids in ammonia neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 51: 133-138.
3. Albrecht J., Bender AS., Norenberg MD., 1994, Ammonia stimulates the release of taurine from cultured astrocytes. *Brain Res.* 660: 228-232.
4. Albrecht J., Dolińska M., 2001, Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 65: 1-5.
5. Albrecht J., Hilgier W., Rafałowska U., 1990, Activation of arginine metabolism to glutamate in rat brain synaptosomes in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: an adaptive response. *J. Neurosci. Res.* 25: 125-30.
6. Albrecht J., Jones EA., 1999, Hepatic encephalopathy: Molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* 170: 138-146.
7. Albrecht J., Rafałowska U., 1987, Enhanced potassium-stimulated γ -aminobutyric acid release by astrocytes derived from rats with early hepatogenic encephalopathy. *J. Neurochem.* 49: 9-11.
8. Albrecht J., Wysmyk-Cybula U., Rafałowska U., 1985, Na^+/K^+ -ATPase activity and GABA uptake in astroglial cell-enriched fractions and synaptosomes derived from rats in the early stage of experimental hepatogenic encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.* 72: 317-320.
9. Albrecht J., Zielińska M., 2002, The role of inhibitory amino acidergic neurotransmission in hepatic encephalopathy: a critical overview. *Metab. Brain Dis.* (w druku).
10. Altschul SF., Madden TL., Schäffer AA., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman DJ., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
11. Azuma J., Hamaguchi T., Ohta H., Takihara K., Awata N., Sawamura A., Harada H., Tanaka Y., Kishimoto S., 1987, Calcium overload-induced myocardial damage caused by isoproterenol and by adriamycin: possible role of taurine in its prevention. *Adv. Exp. Med. Biol.* 217: 167-179.

12. Banay-Schwartz M., Palkovits M., Lajtha A., 1993, Heterogeneous distribution of functionally important amino acids in brain areas of adult and aging humans. *Neurochem. Res.* 18: 417-423.
13. Basile AS., 2000, Tools of the trade: Techniques for investigating the pathogenesis of hepatic encephalopathy and what they have taught us. w: *Advances in hepatic encephalopathy & metabolism in liver disease* Yourdaydin C., Bozkaya H., (eds.), Ankara, str.139-150.
14. Bender AS., Norenberg MD., 1998, Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 54: 673-680.
15. Bender AS., Norenberg MD., 2000, Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes, *Neurochem. Int.* 36: 389-395.
16. Bitoun M., Tappaz M., 2000a, Gene expression of the transporters and biosynthetic enzymes of the osmolytes in astrocyte primary cultures exposed to hyperosmotic conditions. *Glia* 32(2):165-76.
17. Bitoun M., Tappaz M., 2000b, Taurine down-regulates basal and osmolarity-induced gene expression of its transporter, but not the gene expression of its biosynthetic enzymes, in astrocyte primary cultures. *J. Neurochem.* 75(3): 919-924.
18. Blei AT., Larsen FS., 1999, Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J. Hepatol* 31: 771-6.
19. Bloc A., Samuel D., Forini C., Dusticier N., Kerkerian-Le Goff L., 1995, Effects of ionotropic excitatory amino acid receptor antagonists on glutamate transport and transport-mediated changes in extracellular excitatory amino acids in the rat striatum. *J. Neurochem* 64: 1598-1604.
20. Boldyrev AA., Johnson P., Wei Y., Tan Y., Carpenter DO., 1999, Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage. *Neurosci. Lett.* 263: 169-172.
21. Borkowska HD., Oja SS., Oja OS., Saransaari P., Hilgier W., Albrecht J., 1999, N-methyl-D-aspartate-evoked changes in the striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites in vivo in rats with acute hepatic encephalopathy. *Neurosci. Lett.* 268(3): 151-154.
22. Bosman DK., Deutz NEP., Maas MAW., Van Eijk HMW., Smith JJH., De Haan JG., Chamuleau RAFM., 1992. Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J. Neurochem.* 59: 591-599.

23. Bothwell JH., Styles P., Bhakoo KK., 2002, Swelling-activated taurine and creatine effluxes from rat cortical astrocytes are pharmacologically distinct. *J. Membrane Biology* 185: 157-164.
24. Bradford MM., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7 (72): 248-254.
25. Brahma B., Forman RE., Stewart EE., Nicholson C., Rice ME., 2000, Ascorbate inhibits edema in brain slices. *J. Neurochem.* 74: 1263-1270.
26. Bridges CC., Ola MS., Prasad PD., El-Sherbeny A., Ganapathy V., Smith SB., 2001, Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6): C1825-1836.
27. Brusilow SW., 1986, Hepatic encephalopathy. *N. Eng. J. Med.* 314: 786-790.
28. Bureau MH., Olsen RW., 1993, GABA_A receptor subtypes: ligand binding heterogeneity demonstrated by photoaffinity labeling and autoradiography. *J. Neurochem.* 61: 1479-1491.
29. Butterworth RF., Taurine in hepatic encephalopathy. w: *Taurine 2*, Huxtable (eds), New York: Plenum Press, 1996, str. 601-606.
30. Butterworth RF., 1998, Pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Digestion* 59 (Suppl. 2), 16-21.
31. Butterworth RF., 2001, Mild hypothermia prevents cerebral edema in acute liver failure. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg* 8: 16-19.
32. Chomczyński P., Sacchi N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
33. Clemmensen JO., Larsen FS., Kondrup J., Hansen BA., Ott P., 1999, Cerebral herniation in patients with the acute failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29: 648-653.
34. Collins GGS. i Topiwala SH., 1974, The release of [¹⁴C]-taurine from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium ion concentrations. *Proc. Br. Physiol. Soc.* 2-4: 451-451.
35. Collins GGS., 1974, The rates of synthesis, uptake and disappearance of [¹⁴C]taurine in eight areas of the rat central nervous system. *Brain Res.* 76: 447-45.

36. Conn HO., 1993, Hepatic encephalopathy. w: *Diseases of the liver* Shiff, L., Schiff, E.R. (eds.). Lippincott, Philadelphia, str. 1036-1061.
37. Cordoba J., Sampedro F., Alonso J., Rovira A., Castells L., Vargas V., Esteban R., Guardia J., 2000, Subclinical hepatic encephalopathy: A clinical manifestation of low-grade cerebral edema? *Hepatology* 32: 311A.
38. Cooper AJL., Mc Donald JM., Gelbard AS., Gledhill RF., Duffy TE., 1979, The metabolic fate of ¹³-labelled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 254: 4982-4992.
39. Cooper AJL., Plum F., 1987, Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67: 440-503.
40. Cozzi R., Ricordy R., Bartolini F., 1995, Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ. Mol. Mutagen* 26: 248-254.
41. Chesney RW., Helms RA., Christensen M., Budreau AM., Han X., Sturman JA., 1998, The role of taurine in infant nutrition. w: *Taurine 3* Schaffer S., Lombardini JB., Huxtable RJ., (eds), str 463-476.
42. De Knecht RJ., Schalm SW., Van Der Rijt CCD., 1994, 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* 20: 19-16.
43. De La Rosa J., Stipaniuk MH., 1985, Evidence for a rate-limiting role of cysteine sulfinatase decarboxylase activity in taurine biosynthesis in vivo. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 565-571.
44. Del Arco A., Segovia G., Mora F., 2000, Effects of endogenous glutamate on extracellular concentrations of taurine in striatum and nucleus accumbens of the awake rat: involvement of NMDA and AMPA/kainate receptors. *Amino Acids* 19: 729-738.
45. Del Olmo N., Bustamante J., Del Rio RM., Solis, JM., 2000, Taurine activates GABA A but not GABA B receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res.* 864: 298-307.
46. Donovan JP., Schafer DF., Shaw BW., Sorrell MF., 1998, Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *The Lancet* 351:719-721.
47. Ducis I., Norenberg LOB., Norenberg MD., 1989, Effect of ammonium chloride on the astrocyte benzodiazepine receptor. *Brain Res.* 493: 362-365.

48. Eck NV., 1877, Ligature of the portal vein. *Med. J. St. Petersburg* 130: 1-2 (przetłumaczone Surg. Gynecol. Obstet. 96: 375-376, 1953)
49. El Idrissi A., Harris C., Trenkner E., 1998, Taurine modulates glutamate- and growth factors-mediated signaling mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 442: 385-396.
50. Faff L., Reichenbach A., Albrecht J., 1996, Ammonia-induced taurine release from cultured rabbit Müller cells is an osmoresistant proces mediated by intracellular accumulation of cyclic AMP. *J Neurosci. Res.* 46: 231-238.
51. Faff L., Reichenbach A., Albrecht J., 1997, Two modes of stimulation by ammonia of taurine release from cultured rabbit Müller cells. *Neurochem. Int.* 31: 301-305.
52. Faff-Michalak L., Reichenbach A., Dettmer D., Kellner K., Albrecht J., 1994, K^+ -, Hypoosmolarity-, and NH_4^+ -induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: Role of Na^+ and Cl^- ions and relation to cell volume changes. *Glia* 10: 114-120.
53. Fan P., Lavoie J., Le NLO., Szerb JC., Butterworth RF., 1990, Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *Neuroscience* 37(2): 327-334.
54. Fariello RG., Golden GT., Pisa M., 1982, Homotaurine (3-aminopropanesulfonic acid; 3APS) protects from the colvunsant and cytotoxix effect of systematically administered kainic acid. *Neurology* 32: 241-245.
55. Ferenci P., Püspök A., Steindl P., 1992, Current concepts in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Eur J Clin. Invest.* 22: 573-581.
56. French ED., Vezzani A., Whetsell WO., Schwarcz R., 1986, Antiexcitotoxix actions of taurine in the rat hippocampus studied in vivo and in vitro. *Adv Exp. Med. Biol.* 203: 349-362.
57. Ganz R., Swan M., Traber P., Dal Canto PM, Butterworth RF., Blei AT., 1989, Ammonia-induced swelling of rat cerebral cortical slices: implications for the pathogenesis of brain edema in acute hepatic failure. *Metab. Brain Dis.* 4: 213-223.
58. van Gelder NM., 1983, A central mechanism of action for taurine: osmoregulation, bivalent cations, and excitation threshold. *Neurochem. Res.* 8: 687-699.

59. Hahn M., Massen O., Nencki M., Pavlov I., 1893, *Arch. Exp. Path. Pharmac.* 32: 161-173.
60. Hamberger A., Nyström B., 1984, Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 9: 1181-1192.
61. Häussinger D., Kircheis G., Schliess F., Schliess R., Vom Dahl S., 2000, Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* 32: 1035-1038.
62. Haugstad TS., Try Valo E., Langmoen IA., 1995, Changes in brain amino acid content induced by hypoosmolar stress and energy deprivation. *Neurol. Res.* 17: 402-408.
63. Hermenegildo C., Marcaida G., Montolm C., Grisolia S., Minana M-D., Felipo V., 1996, NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem. Res.* 21: 1237-1244.
64. Hille B., 1992, Ionic channels of excitable membranes, II wydanie., Sinauer Associates, Sunderland MA, str. 111-112.
65. Hilgier W., Albrecht J., 1984, Poziom amoniaku oraz jego metabolitów w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej podczas przedłużonego działania tioacetamidu i w okresie powrotu do normy. *Neuropat. Pol.* 22: 180-184.
66. Hilgier W., Olson JE., 1994, Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 62: 197-204.
67. Hilgier W., Olson JE., Albrecht J., 1996, Relation of taurine transport and brain edema in rats with simple hyperammonemia or liver failure. *J. Neurosci. Res.* 45: 69-74.
68. Hilgier W., Zielińska M., Borkowska HD., Gadamski R., Walski M., Oja SS., Saransaari P., Albrecht J., 1999, Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J. Neurosci. Res.* 56: 76-84.
69. Holopainen I., Kontro P., 1986, High-affinity uptake of taurine and beta-alanine in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem. Res.* 11(2): 207-15.
70. Holopainen I., Malminen O., Kontro P., 1987, Sodium-dependent high-affinity uptake of taurine in cultured cerebellar granule cells and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 18: 479-483.

71. Horvath ZC., Czopf J., Buzsaki G., 1997, MK-801-induced neuronal damage in rats. *Brain Res.* 753:181-195.
72. Huxtable RJ., 1992, Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72: 101-142.
73. Huxtable RJ., Sebring LA., 1989, Towards a unifying theory for the action of taurine. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 481-485.
74. Itzhak Y., Baker L., Norenberg MD., 1993, Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia* 9: 211-218.
75. Itzhak Y., Norenberg MD., 1994, Attenuation of ammonia toxicity in mice by PK 11195 and pregnenolone sulfate. *Neurosci. Lett.* 182: 251-254.
76. Itzhak Y., Roig-Cantisano A., Dombro RS., Norenberg MD., 1995, Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res.* 705: 345-348.
77. Jackson PS., Strange K., 1993, Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.*34): C1489-C1500.
78. Jihang SM., Fithian L., Smanik P., Mc Gill J., Tong Q., Mazzaferi EL., 1993, Cloning of the human taurine transporter and characterization of taurine uptake in thyroid cells. *FEBS Lett* 318(2): 139-44.
79. Jones EA., 2000, Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Clin. Liver Dis.* 4: 467-85.
80. Jones EA., Basile AS., 1998, Does ammonia contribute to increased GABA-ergic neurotransmission in liver failure? *Metabolic Brain Disease* 13: 351-60.
81. Kato MD., Hughes RD., Keays RT., Williams R., 1992, Electromicroscopic study of the brain capillaries in cerebral edema from fulminant failure. *Hepatology* 15: 1060-1066.
82. Katoh H., Sima K., Nawashiro H., Wada K., Chigasaki H., 1997, The effect of MK-810 on extracellular neuroactive amino acids in hippocampus after closed injury followed by hypoxia in rats. *Brain Res.* 758: 153-162.
83. Keep RF., Xiang JM., 1996, Choroid plexus taurine transport. *Brain Res.* 715: 17-24.

84. Kilpatrick IC., 1991, Rapid automated HPLC analysis of neuroactive and other amino acids in microdissected brain regions and brain slice superfusates using fluorometric detection. w: *Neuroendocrine Research Methods*, Greenstein B., (eds), Harwood Academic, London, str. 555-578.
85. Kimelberg HK., Mongin AA., 1998, Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology. w: *Cell volume regulation*, (eds) Lang, F. Contrib Nephrol. Basel, Karger, str. 240-257.
86. Knecht K., Michalak A., Rose C., Rothstein JD., Butterworth RF., 1997, Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 299: 201-203.
87. Kontro P., Oja SS., 1986, Taurine interferes with spiperone binding in the striatum. *Neuroscience* 19: 1007-1010.
88. Kontro P., Oja SS., 1990, Interactions of taurine with GABA_B binding sites in mouse brain. *Neuropharmacology* 29: 243-247.
89. Kosenko E., Kaminsky A., Kaminsky Y., Valencia M., Lee L., Hermenegildo C., Felipo V., 1997, Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Rad. Res.* 27: 637-644.
90. Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Miñana MD., Grisolia S., Felipo V., 1995, Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem. Res* 20: 451-456.
91. Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Miñana MD., Marcaida G., Grisolia S., Felipo V., 1994, Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Neurochem.* 63: 2172-2178.
92. Kosenko E., Kaminsky Y., Lopata O., Muravyov N., Kaminsky A., Hermenegildo C., Felipo V., 1998, Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metab. Brain Dis.* 13(1): 29-41.
93. Koyama Y., Ishibashi T., Okamoto T., Matsuda T., Hashimoto H., Baba A., 2000, Transient treatments with L-glutamate and threo-beta-hydroxyaspartate induce swelling of rat cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* 36: 167-173.
94. Kuriyama K., Hashimoto T., 1998, Interrelationship between taurine and GABA. Schaffer SW., Lombardini JB., Huxtable RJ., (eds.) *Taurine 3*, New York, str. 329-337.

95. Kuriyama K., Ida S., Ohukuma S., 1984, Alteration of cerebral taurine biosynthesis in spontaneously hypertensive rats. *J. Neurochem.* 42: 1600-1606.
96. Kramer L., Madl C., Gendo A., Tribl B., Munda-Steind P., Grimm G., Ferenci P., 2000, Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. w: *Advances in hepatic encephalopathy & metabolism in liver disease* Yourdaydin C., Bozkaya H., (eds.), Ankara, str. 387-395.
97. Larsen FS., Gottstein J., Blei AT., 2001, Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J. Hepatol.* 34: 548-554.
98. Lassmann H., Roth E., Hortnagl H., 1989, Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 9: 594-601.
99. Law RO., 1982, Techniques and applications of extracellular space determination in mammalian tissues. *Experimentia* 38: 411-421 Birhauser Verlag.
100. Law RO., 1994a, Taurine efflux and the regulation of cell volume in incubated slices of rat cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 1221: 21-28.
101. Law RO., 1994b, Effects of extracellular bicarbonate ions and pH on volume-regulatory taurine efflux from rat cerebral cortical slices in vitro: evidence for separate neutral and anionic transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1224: 377-383.
102. Lehmann A., Lazarewicz JW., Zeise M., 1985, N-methylaspartate-evoked liberation of taurine and phosphoethanolamine in vivo: site of release. *J. Neurochem.* 45: 1172-1177.
103. Lillrank SM., O'Connor WT., Saransaari P., Ungerstedt U., 1994, In vivo effects of local and systemic phencyclidine on the extracellular levels of catecholamines and transmitter amino acids in the dorsolateral striatum of anaesthetized rats. *Acta Physiol. Scand.* 150: 109-115.
104. Lin S., Raabe., 1985, Ammonia intoxication: Effects on cerebral cortex and spinal cord. *J. Neurochem.* 44: 1525-1528.
105. Liu Q-R., López-Corcuera B., Nelson H., Mandiyan S., 1992, Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and β -alanine in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12145-12149.

106. Lohr JW., Yohe LA., 1994, Mechanisms of hypoosmotic volume regulation in glioma cells. *Brain Res.* 667: 263-268.
107. Madl C., Kramer L., Gendo A., Funk G., Bauer E., Zauner C., 2000, Prognostic accuracy of sensory evoked potentials (SEP) and arterial ammonia in predicting development of cerebral edema and death by cerebral herniation in patients with fulminant hepatic failure (FHF). *Gastroenterology* 118: 2400.
108. Magnusson KR., Koerner JF., Larson AA., Smullin DH., Skilling SR., Beitz AJ., 1991, NMDA-, kainate-, quisqualate-stimulated release of taurine from electrophysiologically monitored rat hippocampal slices. *Brain Res.* 549: 1-8.
109. Magnusson KR., Madl JE., Clements JR., Wu J-Y., Larson AA., Beitz AJ., 1988, Colocalization of taurine- and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the cerebellum of the rat with monoclonal antibodies against taurine. *J. Neurosci.* 8: 4551-4564.
110. Majewska MD., 1992, Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38: 370-395.
111. Marcaida G., Felipe V., Hermenegildo C., Minana M-D., Grisolia S., 1992, Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors, *FEBS Lett.* 296: 67-68.
112. Martin LD., 1992, Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5: 81-94.
113. Martinez A., Munoz-Clares RA., Guera G., Moran J., Pasantes-Morales H., 1994, Sulfhydryl groups essential for the volume-sensitive release of taurine from astrocytes. *Neurosci. Lett.* 176, 239-242.
114. Mearow KM., Mill JF., Vitkovic L., 1989, The ontogeny and localization of glutamine gene expression in rat brain. *Mol. Brain Res.* 674: 223-232.
115. Menendez N., Solis JM., Herreras O., Galarreta M., Conejero C., Martin del Rio R., 1993, Taurine release evoked by NMDA receptor activation is largely dependent on calcium mobilization from intracellular stores. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1273-1279.
116. Mensah-Nyagan AG., Do-Rego JL., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H., 1999, Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol.*

Rev. 51: 63-81.

117. Michalak A., Rose C., Butterworth J., Butterworth RF., 1996, Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology* 24: 908-913.
118. Miller TJ., Hanson RD., Yancey PH., 2000, Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 125: 45-56.
119. Mongin AA., Aksentsev SL., Orlov SN., Slepko NG., Kozlova MV., Maximov GV., Konev SV., 1994, Swelling-induced K⁺ influx in cultured primary astrocytes. *Brain Res*. 655: 110-114.
120. Moroni F., Riggio O., Carla V., Festuccia V., Ghinelli F., Marino IR., Merli M., Natali L., Pedretti G., Fiaccadori F., 1987, Hepatic encephalopathy: lack of changes of gamma-aminobutyric acid content in plasma and cerebrospinal fluid. *Hepatology* 7: 816-20.
121. Mountian I., Declercq PE., van Driessche W., 1996, Volume regulation in rat brain glial cells: lack of a substantial contribution of free amino acids. *Am. J. Physiol.* 270(*Cell Physiol.*39): C1319-C1325.
122. Mullaney KJ., Fehm MN., Vitarella D, Wagoner Jr DE., Aschner M., 1994, The role of -SH groups in methylmercuric chloride-induced D-aspartate and rubidium release from rat primary astrocyte cultures. *Brain Res*. 641:1-9.
123. Mullen KD., 2000, Terminology of hepatic encephalopathy work in evolution. w: *Advances in hepatic encephalopathy & methabolism in liver disease* Yourdaydin C., Bozkaya H., (eds.), Ankara, str.139-150.
124. Murphy MT., Lipton JM., Loughran P., Giesecke AH., 1985, Postanesthetic shivering in primates: inhibition by peripheral heating and by taurine. *Anesthesiology* 63: 161-165.
125. Nagelhus EA., Lehmann A., Ottersen OP., 1993, Neuronal-glia exchange of taurine during hypo-osmotic stress: a combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 54: 615-631.
126. Norenberg MD., 1987, The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6: 13-33.
127. Norenberg MD., 1996, Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16: 245-253.

128. Norenberg MD., 1998, Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 13 (4): 319-35.
129. Norenberg MD., Baker L., Norenberg LOB., Blicharska J., Bruce-Gregorios JH., Neary JT., 1991, Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem. Res.* 16, 833-836.
130. Norenberg MD., Bender AS., 1994, Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir.* 60: 24-27.
131. Norenberg MD., Hugo Z., Neary JT., Roig-Cantesano A., 1997, The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* 21: 124-133.
132. Norenberg MD., Martinez – Hernandez A., 1979, Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161: 303-310.
133. O'Byrne MB., Tipton KF., 2000, Taurine-induced attenuation of MPP+ neurotoxicity in vitro: a possible role for the GABA A subclass of GABA receptors. *J. Neurochem.* 74: 2087-2093.
134. O'Connor ER., Kimelberg HK., 1993, Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J. Neurosci.* 13(6): 2638-2650.
135. O'Grady JG., Alexander GJ., Hayllar KM., Williams R., 1989, Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 97: 439-445.
136. Oja SS., Holopainen I., Kontro P., 1990, Stimulated taurine release from different brain preparations: changes during developmental and aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* 351: 277-287.
137. Oja SS., Saransaari P., 1996, Kinetic analysis of taurine influx into cerebral cortical slices from adult and developing mice in different incubation conditions. *Neurochem. Res.* 21: 161-166.
138. Oja SS., Saransaari P., Wysmyk U., Albrecht J., 1993, Loss of GABA_B binding sites in the cerebral cortex of rats with acute hepatic encephalopathy. *Brain Res.* 629: 355-357.
139. Okamoto K., Kimura H., Sakai Y., 1983a, Ionic mechanisms of the action of taurine on cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro: intradendritic study. *Brain Res.* 260: 261-269.

140. Okamoto K., Kimura H., Sakai Y., 1983b, Taurine-induced increase of the Cl⁻ conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res.* 259: 319-323.
141. Oppong KNW., Bartlett K., Record CO., Al Mardini H., 1995, Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* 22: 553-558.
142. Ottersen OP., Madsen S., Storm-Mathisen J., Somogyi P., Scopsi L., Larsson L-I., 1988, Immunocytochemical evidence suggests that taurine is colocalized with GABA in the Purkinje cell terminals, but that the stellate cell terminals predominantly contain GABA: A light- and electronmicroscopic study of the rat cerebellum. *Exp. Brain Res.* 72: 407-416.
143. Palkovits M., Elekes I., Lang T., Patthy A., 1986, Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *J. Neurochem.* 47:1333-1335.
144. Parson RB., Waring RH., Williams AC., Ramsden DB., 2001, Cysteine dioxygenase: regional localization of protein and mRNA in rat brain. *J. Neurosci Res.* 65: 78-84.
145. Pasantes-Morales H., 1996, Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab. Brain Dis.* 11: 187-204.
146. Pasantes-Morales H., Arzate ME., Quesada O., Huxtable RJ., 1987, Higher susceptibility of taurine-deficit rats to seizures induced by 4-aminopyridine. *Neuropharmacology* 26: 1721-1725.
147. Pasantes-Morales H., Quesada O., Moran J., 1998, Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. Schaffer SW., Lombardini JB., Huxtable RJ., (eds.) *Taurine 3*, New York, str. 209-217.
148. Paxinos G., Watson C., 1982, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York.
149. Peck EJ., Awapara J., 1967, Formation of taurine and isothionic acid in rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 141: 499-506.
150. Peterson C., Giguere JF., Cotman CW., Butterworth RF., 1990, Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* 55: 386-390.
151. Pow DV., Sullivan R., Reye P., Hermanussen S., 2002, Localization of taurine transporters, taurine, and ³H taurine accumulation in the rat retina,

- pituitary, and brain. *Glia* 37: 153-168.
152. Quinn MR., Harris CL., 1995, Taurine allosterically inhibits binding of [35S]-t-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) to rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology* 34: 1607-1613.
 153. Quinn MR., Miller CL., 1992, Taurine allosterically modulates flunitrazepam binding to synaptic membranes. *J. Neurosci. Res.* 33: 136-141.
 154. Rahman T., Hodgson H, 2001, Clinical management of acute hepatic failure. *Intensive Care Med.* 27: 467-476.
 155. Rajdev S., Reynolds IJ., 1993, Effects of pH on the actions of dizocilpine at the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *British J. Pharmacol.* 109: 107-112.
 156. Ramamoorthy S., Leibach FH., Mahesh VB., Han H., Yang FT., Blakely RD., Ganapathy V., 1994, Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem. J.* 300: 893-900.
 157. Rao VLR., Audet RM., Butterworth RF., 1997, Portacaval shunting and hyperammonemia stimulate the uptake of L-[³H]arginine but not of L-[³H]nitroarginine into rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 68: 337-43.
 158. Ratnakumari L., Audet R., Quershi IA., Butterworth RF., 1995, Na⁺, K⁺, ATP-ase activities are increased in brain in both congenital and acquired hyperammonemic syndromes. *Neurosci. Lett* 197: 89-92.
 159. Redmond HP., Wang JH., Bouchier-Hayes D., 1996, Taurine attenuates nitric-oxide- and reactive oxygen intermediate-dependent hepatocyte injury. *Arch. Surg.* 131: 1287-1288.
 160. Reymond I., Almarghini K., Tappaz M., 1996, Immunocytochemical localization of cysteine sulfinate decarboxylase in astrocytes in the cerebellum and hippocampus: a quantitative double immunofluorescence study with glial fibrillary acidic protein and S-100 protein. *Neuroscience* 75: 619-633.
 161. Roy G., 1995, Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J. Membr. Biol.* 146: 35-44.
 162. Sánchez-Olea R., Morales M., Garcia O., Pasantes-Morales H., 1996, Cl channel blockers inhibit the volume-activated efflux of Cl and taurine in cultured neurons. *Am.J.Physiol.* 270: C1703-C1708.

163. Sánchez-Olea R., Morán J., Schousboe A., Pasantes-Morales H., 1991, Hyposmolarity-activated fluxes taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci. Lett.* 130: 233-236.
164. Saransaari P., Oja, SS., 1992a, Taurine transport in the mouse cerebral cortex during development and ageing. *Adv. Med. Exp. Biol.* 359: 279-287.
165. Saransaari P., Oja, SS., 1992b, Release of GABA and taurine from brain slices. *Prog. Neurobiol.* 38: 455-482.
166. Saransaari P., Oja SS., 1997, Enhanced taurine release in cell-damaging conditions in the developing and ageing mouse hippocampus. *Neuroscience* 79: 847-854.
167. Saransaari P., Oja SS., 2000, Taurine and neural cell damage. *Amino Acids* 19: 509-526.
168. Schenker S., Brady CE., 1994, Pathogenesis of hepatic encephalopathy w: *Hepatic encephalopathy: Syndromes and Therapies.* Conn HO., Bircher J., (eds), Bloomington, str 43-61.
169. Schliess F., Haussinger D., 2001, Hepatic encephalopathy and nitric oxide. *J. Hepatol.* 34: 610-612.
170. Schomberg SL., Su G., Haworth RA., Sun D., 2001, Stimulation of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ cotransporter in neurons by activation of non-NMDA ionotropic receptor and Group-I mGluRs. *J. Neurophysiol.* 85(6): 2563-75.
171. Schousboe A., Hertz L., Svenneby G., Kvamme E., 1979, Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes. *J. Neurochem.* 32: 943-950.
172. Schurr A., Tseng MT., West CA., Rigor BM., 1987, Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sci.* 40: 2059-2066.
173. Segovia G., Del Arco A., Mora F., 1997, Endogenous glutamate increases extracellular concentrations of dopamine, GABA, and taurine through NMDA and AMPA/kainate receptors in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. *J. Neurochem.* 69: 1476-1483.
174. Segovia G., Mora F., 2001, Involvement of NMDA and AMPA/kainate receptors in the effects of endogenous glutamate on extracellular concentrations of dopamine, GABA in the nucleus accumbens of the awake rat. *Brain Res. Bulletin* 54: 153-157.

175. Shain W., Madelian V., Martin DL, 1989, Inactivation of cyclic AMP-dependent taurine release from astroglia. *J. Neurochem.* 52:1455-1460.
176. Shen W., Mennerick S., Covey DF., Zorumski CF., 2000, Pregnenolone sulfate modulates inhibitory synaptic transmission by enhancing GABA A receptor desensitization. *J. Neurosci.* 20: 3571-3579.
177. Shibanoki S., Kogure M., Sugahara M., Ishikawa K., 1993, Effect of systemic administration of N-methyl-D-aspartic acid on extracellular taurine level measured by microdialysis in the hippocampal CA1 field and striatum of rats. *J. Neurochem.* 61: 1698-1704.
178. Sibson NR., Dhankhar A., Mason GF., Behar KL., Rothman DL., Shulman RG., 1997, In vivo ¹³C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Neurobiology* 94: 2699-2704.
179. Smith KE., Borden LA., Wang C-HD., Hartig PR., Branchek TA., Weinshank RL., 1992, Cloning and expression of a high affinity taurine transporter fro rat brain. *Mol. Pharmacol.* 42: 563-569.
180. Smith SS., Li J., 1991, GABA_B receptor stimulation by baclofen and taurine enhances excitatory amino acid induced phosphatidylinositol turnover in neonatal rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 132: 59-64.
181. Solís JM., Hernandez AS., Herreras O., Lerma J., Martín del Río R., 1988, Does taurine act as osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci. Lett.* 91: 53-58.
182. Somjen GG., 1979, Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annual Rev. Physiol.* 41: 159-177.
183. Sturman JA., 1993, Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73: 119-147.
184. Sturman JA., Chesney R., 1995, Taurine in pediatric nutrition. *Pediatr. Clin N. Amer.* 42: 879-897.
185. Su G., Haworth RA., Dempsey RJ., Sun D, 2000, Regulation of Na⁺K⁺Cl⁻ cotransporter in primary astrocytes by dibutyryl cAMP and high [K⁺]_o. *Am. J. Physiol.* 279: C1710-C1721.
186. Subbalaskshimi GYCV., Murthy CRK., 1983, Acute metabolic effects of ammonia on the enzymes of glutamate metabolism in isolated astroglial cells. *Neurochem. Int.* 5: 593-597.

187. Summerskill WHJ., Wolpert E., 1970, Ammonia metabolism in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 23: 633-639.
188. Sun D., Murali SG., 1999, Na⁺K⁺Cl⁻ cotransporter in immature cortical neurons: a role in intracellular Cl⁻ regulation. *J. Neurophysiol.* 81: 1939-1948.
189. Swain M., Butterworth RF., Blei AT., 1992, Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15: 449-53.
190. Szerb JC., Butterworth RF., 1992, Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Progr. Neurobiol.* 39: 135-153.
191. Sykova E., 1983, Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system. *Progress in Biophysiology and Molecular Biology* 42: 135-189.
192. Taber KH., Lin C-T., Liu J-W., Thalmann RH., Wu J-Y., 1986, Taurine in hippocampus: localization and postsynaptic action. *Brain Res.* 386: 113-121.
193. Tang X., Deupree DL., Sun Y., Wu J-Y., 1996, Biphasic effect of taurine on excitatory amino acid-induced neurotoxicity, w "Taurine: Basic and clinical aspects" Huxtable RJ., Azuma J., Nakagawa M., Kuriyama A., Baba A., ed. Plenum Publishing, str. 499-506.
194. Takahashi K., Kameda H., Kataoka M., Sanjou K., Harata N., Akaike N., 1993, Ammonia potentiates GABAA response in dissociated rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 151: 51-54.
195. Takahashi K., Koehler RC., Brusilow SW., Traystman RJ., 1991, Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral brain edema in hyperammonemic rats. *Am. J. Physiol.* 261: H825-H829.
196. Tappaz M., Almarghini K., Do K., 1994, Cysteine sulfinic acid decarboxylase in brain: identification, characterization and immunocytochemical location in astrocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 359: 257-268.
197. Tappaz M, Almarghini K., Legay F., Remy A., 1992. Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulphinate decarboxylase from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochem. Res.* 17: 849-59.
198. Timbrell JA., Seabra V., Waterfield CJ., 1995, The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmac.* 26: 453-462.

199. Tokunaga K., Nakamura Y., Sakata K., Fujimori K., Ohkubo M., Sawada K., Sakiyama S., 1987, Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* 47(21): 5616-5619.
200. Torp R., Andine P., Hagberg H., Karagulle T., Blackstad TW., Ottersen OP., 1991, Cellular and subcellular distribution of glutamate-, glutamine-, and taurine-like immunoreactivity during forebrain ischemia: a semiquantitative microscopic study in rat hippocampus. *Neuroscience* 41: 433-447.
201. Tossman, U., Eriksson S., Delin A., Hagenfeldt L., Law D., 1983, Ungerstedt U. Brain amino acids measured by intracerebral dialysis in portacaval shunted rats. *J. Neurochem.* 41: 1046-1051.
202. Tossman U., Delin A., Eriksson LS., Ungerstedt U., 1987, Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in portacaval shunted rats. *Neurochem. Res.* 12: 265-269.
203. Trenkner E., 1990, Possible role of glutamate with taurine in neuron-glia interaction during cerebellar development. *Prog. Clin. Biol. Res.* 351: 133-140.
204. Uchida S., Kwon HM., Yamauchi A., Preston AS., Marumo F., Handler JS., 1992, Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na⁺ - and Cl⁻ - dependant taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8230-8234.
205. Uchiyama-Tsuyuki Y., Araki H., Yae T., Otomo S., 1994, Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 62: 1074-1078.
206. Upton EL., Law RO., 1996, The role of sulfhydryl groups in efflux of taurine and GABA from cerebral cortical slices, w "Taurine 2", Huxtable RJ., Azuma J., Kuriyama K., Nakagawa K., Baba A., eds., Plenum, New York, str. 409-416.
207. Velasco I., Tapia R., 2002, High extracellular γ -aminobutyric acid protects cultured neurons against damage induced by the accumulation of endogenous extracellular glutamate. *J. Neurosci. Res.* 67: 406-410.
208. Velasco I., Tapia R., Massieu L., 1996, Inhibition of glutamate uptake induces progressive neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* 44: 551-561.

209. Venturini I., Corsi L., Avallone R., Farina F., Bedogni G., Baraldi C., Baraldi M., Zeneroli ML., 2001, Ammonia and endogenous benzodiazepine-like compounds in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Scand. J. Gastroenterol.* 36: 423-425.
210. Vessey DA., 1978, The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem. J.* 174: 621-626.
211. Vitarella D., DiRisio DJ., Kimelberg HK., Aschner M., 1994, Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63: 1143-1149.
212. Voaden MJ., Draedn ACI., Marshall J. i Lake N., 1981, Taurine in the retina, w "The effects of taurine on excitable tissues", Schaffer SW., Baskin SI., i Kocsis JJ., eds., Spectrum press, New York, str. 145-160.
213. van Vugt H., van Gool J., Thomas LLM., 1983, Galactosamine hepatitis, endotoxemia, and lactulose. *Hepatology* 3: 236-240.
214. Vogels BAPM., Maas MAW., Daalhuisen J., Quack G., Chamuleau AFM., 1997, Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology* 25: 820-827.
215. Wade JV., Olson JP., Samson FE., Nelson SR., Pazdernik TL., 1988, A possible role of taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 51: 740-745.
216. Waltz W., Allen AF., 1987, Evaluation of the osmoregulatory function of taurine in brain cells. *Exp. Brain Res.* 68: 290-298.
217. Walz W., Hertz L., 1983, Functional interaction between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Progress in Neurobiol.* 20: 133-183.
218. Willard-Mack CL., Koehler RC., Hirata T., Cork LC., Takahashi H., Traystman RJ., Brusilow SW., 1996, Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced swelling in the rat. *Neuroscience* 71: 589-599.
219. Wright CE., Tallan HH., Wright TR., Gillam B., Gaul GE., Sturman JA., 1987, Taurine availability and function in neurogenetic retinopathies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 217: 101-102.
220. Wu JY., 1984, GABA and taurine enzymes in mammalian brain. *Curr Top. Cell Regul.* 24: 119-128.

221. Wu JY., Tang XW., Schloss JV., Faiman MD., 1998, Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. Schaffer SW., Lombardini JB., Huxtable RJ., (eds.) *Taurine 3*, New York, str. 339-345.
222. Wysmyk U., Oja SS., Saransaari P., 1991, Taurine release from brain slices in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. *Molecul. Chem. Neuropathol.* 14, 1991.
223. Wysmyk U., Oja SS., Saransaari P., Albrecht J., 1994, Long-term treatment with ammonia affects the content and release of taurine in cultured cerebellar astrocytes and granule neurons. *Neurochem. Int.* 24: 317-322.
224. Wysmyk-Cybula U., Dąbrowiecki Z., Albrecht J., 1986, Changes in the metabolism and binding of GABA in the rat brain in thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy. *Biomed. Biochim. Acta* 3: 413-419.
225. Yan Y., Dempsey RJ., Sun D., 2001, Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat focal cerebral ischemia. *J.Cereb. Blood Flow and Metab.* 21: 711-721.
226. Zeneroli ML., Iuliano E., Racagni G., Baraldi M., 1982, Metabolism and brain uptake of Gamma-aminobutyric acid in galactosamine-induced hepatic encephalopathy in rats. *J. Neurochem.* 38: 1219-1222.
227. Zhang X., Boulton AA., Zuo D., Yu PH., 1996, MK-801 induces apoptotic neuronal death in the rat retrosplenial cortex: prevention by cycloheximide and R(-)-2-hexyl-N-methylpropargylamine. *J. Neurosci. Res.* 46: 82-89.
228. Zielińska M., Hilgier W., Borkowska HD., Oja SS., Saransaari P., Albrecht J., 2001, Lubeluzole attenuates K⁺-evoked extracellular accumulation of taurine in the striatum of healthy rats and rats with hepatic failure. *Brain Res.* 904: 173-176.
229. Zielińska M., Hilgier W., Law RO., Gorynski P., Albrecht J., 1999, Effects of ammonia in vitro on endogenous taurine efflux and cell volume in rat cerebrocortical minislices: influence of inhibitors of volume-sensitive amino acid transport. *Neuroscience* 91(2): 631-638.
230. Zieve L., 1981, The mechanism of hepatic coma. *Hepatology* 1: 360-365.
231. Zieve L., 1987, Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabol. Brain Dis.* 2: 147-165.
232. Zimmermann C., Ferenci P., Pifl C., Yurdaydin C., Ebner J., Lassman

- H., Roth E., Hortnagl H., 1989, Hepatic encephalopathy in thioacetamide induced acute liver failure in rats: Characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 9: 594-601.
233. Zwingmann C., Flogerl U., Pfeuffer J., Leibfritz D., 2000, Effects of ammonia exposition on glioma cells: Changes in cell volume and organic osmolytes studied by diffusion-weighted and high-resolution NMR spectroscopy. *Dev. Neurosci.* 2: 2463-471.