

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

mgr inż. Joanna Anita Ruszkiewicz

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

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

Warszawa, 2014

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

*Szczególne podziękowania kieruję do **Pana dr Wojciecha Hilgiera**,
za wprowadzenie mnie w metodykę wielu badań zastosowanych w niniejszej
pracy, nieustającą gotowość do pomocy oraz cenne uwagi.*

*Pragnę również serdecznie podziękować **Inez Fręsko**,
za nieocenioną pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczeń.*

*Dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurotoksykologii** za okazaną
pomoc, życzliwość i wspianą atmosferę.*

***Michaelowi Kowalczykowi** dziękuję za przygotowanie projektu okładki.*

*Niniejszą pracę dedykuję **Joannie i Ryszardowi Atamaniuk**,
którzy wytrwale wspierali mnie podczas jej przygotowywania.*

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

Hilgier W, Węgrzynowicz M, **Ruszkiewicz J**, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2010) Direct exposure to ammonia and hyperammonemia increase the extracellular accumulation and degradation of astroglia-derived glutathione in the rat prefrontal cortex. *Toxicological Sciences* 117(1):163-168

Ruszkiewicz J, Fręsko I, Hilgier W, Albrecht J (2013) Decrease of glutathione content in the prefrontal cortical mitochondria of rats with acute hepatic encephalopathy: prevention by histidine. *Metabolic Brain Disease* 28:11-14

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektów badawczych nr S005/P-N/2007/01, NN401130839 oraz ze środków statutowych Zakładu Neurotoksykologii.

Spis treści

1. Wykaz skrótów	15
2. Wstęp	19
2.1. Encefalopatia wątrobowa (EW).....	19
2.1.1. Charakterystyka ogólna	19
2.1.2. Amoniak jako kluczowa substancja toksyczna w EW.....	20
2.1.2.1. Charakterystyka i obieg w organizmie	20
2.1.2.2. Hiperamonemia w dysfunkcji wątroby.....	21
2.1.2.3. Modele doświadczalne neurotoksyczności amoniaku	22
2.1.3. Molekularny mechanizm toksycznego działania amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)	23
2.1.3.1. Glutamina jako pośrednik toksyczności amoniaku	25
2.1.3.2. Upośledzenie funkcji mitochondriów	27
2.1.3.3. Stres oksydacyjno–nitracyjny (ONS)	29
2.1.4. Inne niż amoniak czynniki patogenetyczne w EW	31
2.1.5. Strategie terapeutyczne.....	32
2.2. Endogenne elementy antyoksydacyjnej protekcji	33
2.2.1. Glutation (GSH)	33
2.2.1.1. Synteza i metabolizm GSH w OUN	33
2.2.1.2. Rola GSH w metabolizmie wewnątrzkomórkowym i interakcjach międzykomórkowych	37
2.2.1.3. GSH w neurotoksyczności amoniaku	38
2.2.2. Tioredoksyny	39
2.2.3. Histrydina.....	41
2.2.4. Czynniki transkrypcyjne a ekspresja genów indukowana przez ONS	42
3. Cele pracy	45
4. Metody.....	47
4.1. Zwierzęce modele toksyczności amoniaku	47
4.2. Mikrodializa mózgu.....	47
4.3. Izolacja struktur mózgu	49
4.4. Izolacja mitochondriów	49
4.5. Oznaczanie poziomu GSH z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	50
4.6. Oznaczanie poziomu GSH metodą enzymatyczną	51
4.7. Określanie stopnia glutationylacji białek	52

4.8. Oznaczanie aktywności enzymatycznej	53
4.8.1. Γ - glutamyl transpeptydaza	53
4.8.2. Ligaza glutaminianowo-cysteinowa	54
4.8.3. Reduktaza glutationowa	55
4.8.4. Peroksydaza glutationowa	56
4.8.5. Reduktaza tioredoksyny	56
4.8.6. Tioredoksyna	57
4.9. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej.....	58
4.10. Analiza poziomu białka metodą immunoenzymatyczną	58
4.11. Oznaczanie poziomu białka.....	59
4.11.1. Metoda Bradforda.....	59
4.11.2. Metoda biuretowa.....	59
4.12. Analiza poziomu mRNA	60
4.12.1. Izolacja RNA z mózgu	60
4.12.2. Pomiar stężenia i czystości RNA.....	60
4.12.3. Trawienie DNazą.....	61
4.12.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji	61
4.12.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym.....	61
4.13. Analiza statystyczna	62
5. Wyniki	63
5.1. Poziom GSH pozakomórkowego w mózgu w stanach hiperamonemicznych ..	63
5.2. Poziom GSH mitochondrialnego oraz w całych strukturach mózgu w stanach hiperamonemicznych.....	64
5.3. Wpływ histydyny na poziom i metabolizm GSH w mózgu w EW	68
5.3.1. Poziom GSH	68
5.3.2. Potencjalne składowe mechanizmu odpowiedzialnego za zmiany poziomów GSH	71
5.4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna.....	76
5.5. Układ tioredoksynowy w EW oraz w warunkach ekspozycji na histydyne	76
5.6. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w EW oraz w warunkach ekspozycji na histydyne.....	80
6. Dyskusja	81
6.1. Uwagi wstępne	81
6.2. Międzykomórkowy poziom GSH.....	81
6.3. Mitochondrialny poziom GSH	86

6.4. Układ tioredoksynowy.....	91
6.5. Regulacja ekspresji genów antyoksydacyjnych.....	93
6.6. Protekcyjne działanie histydyny	94
7. Podsumowanie i wnioski	101
8. Streszczenie	103
9. Abstract.....	107
10. Bibliografia.....	109

1. Wykaz skrótów

Abc	białka posiadające kasetę wiążącą ATP (ang. <i>ATP-binding cassette</i>)
Abs	absorbancja
ABTS	2'2-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)(ang. <i>2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid)</i>)
ACV	acywicyna (ang. <i>acivicin</i>)
aCSF	szuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
ANOVA	test statystyczny (ang. <i>analysis of variance</i>)
ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. <i>antioxidant response element</i>)
ATP	adenozynotrójfosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
Asp	asparagina
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i>)
BCA	kwas bis-cynchoninowy (ang. <i>bicinchoninic acid</i>)
BSO	sulfoksymina butioniny (ang. <i>buthionine sulfoximine</i>)
CAT	katalaza (ang. <i>catalase</i>)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan (ang. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>cerebrospinal fluid</i>)
Cys	cysteina
CySS	cystyna
DIC	transporter kwasu dikarboksylowego (ang. <i>dicarboxylate carrier</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DP	dipeptydaza
DTNB	kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy
DTT	ditiotreitól
EAAT	transporter aminokwasów pobudzających (ang. <i>excitatory amino acid transporter</i>)
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EW	encefalopatia wątrobowa
GABA	kwas γ -aminomasłowy (ang. <i>γ-aminobutyric acid</i>)
GABA _A	jonotropowy receptor GABA
GABA _r	receptor GABA
GCL	ligaza glutaminianowo-cysteinowa (ang. <i>glutamate cysteine ligase</i>)
Gclc	katalityczna podjednostka enzymu GCL (ang. <i>GCL catalytic subunit</i>)
Gclm	modulująca podjednostka enzymu GCL (ang. <i>GCL modulatory subunit</i>)
γ -GT	γ -glutamylotransferaza
GLAST	transporter Glu, Asp i CySS
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
Gly	glicyna
GPx	peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	reduktaza glutationowa (ang. <i>glutathione reductase</i>)

Grx	glutaredoxyna (ang. <i>glutaredoxin</i>)
GS	syntetaza glutaminowa (ang. <i>glutamine synthetase</i>)
GSH	glutation (forma zredukowana)
GSXS	syntetaza glutationowa (ang. <i>glutathione synthetase</i>)
GSSG	glutation (forma utleniona)
GST	S-transferaza glutationowa (ang. <i>glutathione S-transferase</i>)
GSx	glutation całkowity
HA	hiperamoniemia
His	histrydyna
HO-1	oksygenaza hemowa- 1 (ang. <i>heme oxygenase-1</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
Keap1	(ang. <i>kelch-like erythroid-cell-derived protein with cap'n'collar homology-associated protein 1</i>)
m.c.	masa ciała
mGSH	mitochondrialny GSH
MHE	subkliniczna encefalopatia wątrobowa (ang. <i>minimal hepatic encephalopathy</i>)
MK-801	dizocypina
MPT	zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (ang. <i>mitochondria permeability transition</i>)
MR	mieszanina reakcyjna
mRNA	matrycowy RNA
Mrp	białko oporności wielolekowej (ang. <i>multidrug resistance protein</i>)
MSO	sulfoksymina metioniny (ang. <i>methionine sulfoximine</i>)
NAC	N-acetylo-cysteina
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NDA	2,3-naftalenodikarboaldehyd (ang. <i>2,3-naphthalenedicarboxaldehyde</i>)
NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginianowy (ang. <i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NMDAr	receptor NMDA (ang. <i>NMDA receptor</i>)
NO	tlenek azotu (ang. <i>nitric oxide</i>)
NOS	syntaza tlenku azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i>)
Nrf2	czynn timeranskrypcyjny (ang. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>)
NTB	kwask 2-nitro-5-tiobenzoesowy
OA	octan amonu
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
OGC	transporter kwasu α -ketoglutazarowego (ang. <i>oxoglutarate carrier</i>)
ONS	stres oksydacyjno-nitracyjny (ang. <i>oxidative-nitrosative stress</i>)
OPA	aldehyd orto-ftalowy (ang. <i>ortho-phthalaldehyde</i>)
OTC	cykl mocznikowy; cykl ornitynowy (ang. <i>ornithine cycle</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAG	fosforanozależna glutaminaza (ang. <i>phosphate-activated glutaminase</i>)
PBS	roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PGSx	glutation całkowity związany z białkami (ang. <i>protein GSH</i>)

PKC δ	kinaza białkowa C δ (ang. <i>protein kinase Cδ</i>)
POCh	Polskie Odczynniki Chemiczne
Prx	peroksyredoksyna (ang. <i>peroxiredoxin</i>)
PTP	kanał zmiany przepuszczalności mitochondriów (ang. <i>permeability transition pore</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy
RNS	wolne rodniki azotowe (ang. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i>)
RT-PCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR</i>)
Se	selen
Ser	seryna
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
Slc	białko nośników substancji rozpuszczonych (ang. <i>solute carrier</i>)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
SSA	kwas sulfosalicylowy (ang. <i>sulfosalicylic acid</i>)
TAA	tioacetamid
TCAC	cykl Krebsa; cykl kwasów trójkarboksylowych (ang. <i>tricarboxylic acid cycle</i>)
TNB	kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy
Tris	2-Amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
Trx	tioeredoksyna (ang. <i>thioredoxin</i>)
Trxip	białko interakcji z tioeredoksyną (ang. <i>thioredoxin interacting protein</i>)
TrxS ₂	tioeredoksyna, forma utleniona
Trx(SH) ₂	tioeredoksyna, forma zredukowana
TrxR	reduktaza tioeredoksyny (ang. <i>thioredoxin reductase</i>)
TSPO	białko translokatora 18 kDa (ang. <i>translocator protein</i>)
WZW	wirusowe zapalenie wątroby
Xc(-)	transporter Cys, CySS i Glu
XO	oksydaza ksantynowa (ang. <i>xanthine oxidase</i>)

2. Wstęp

2.1. Encefalopatia wątrobowa (EW)

2.1.1. Charakterystyka ogólna

Encefalopatia wątrobowa (EW) jest to złożony zespół neurologiczny, występujący w wyniku nagromadzenia się toksycznych substancji na skutek obniżenia funkcji detoksykacyjnych wątroby. Wyróżnia się trzy typy EW: A, B i C (Albrecht i Jones, 1999; Ferenci i wsp., 2002). Typ pierwszy to postać związana z nagłym, ostrym uszkodzeniem wątroby (typ A, ang. *acute liver failure*), występująca najczęściej w wyniku wirusowego zapalenia (WZW) lub zatrucia hepatotoksynami (acetamidofen, amanityna). Objawy są ciężkie, a występujące w ostatnim stadium zwiększenie przepływu krwi mózgowej, wzrost ciśnienia śródczaszkowego oraz obrzęk mózgu prowadzą do wysokiej (ok. 80%) śmiertelności wśród chorych (Schiodt i wsp., 1999; Ede i Williams, 1986). Typ kolejny to postać przewlekła, niezwiązana z dysfunkcją wątroby, a ze spontanicznym lub chirurgicznym ominięciem przepływu krwi przez wątrobę (typ B, ang. *bypass*), natomiast typ trzeci to postać przewlekła, będąca konsekwencją marskości wątroby (typ C, ang. *cirrhosis/chronic liver disease*), spowodowaną głównie nadużyciem alkoholu (Albrecht i Jones, 1999; Ferenci i wsp., 2002).

W przebiegu choroby wyróżnia się stadia definiowane w zależności od stopnia nasilenia zmian funkcji intelektualnych i motorycznych. Stadium 0/MHE (ang. *minimal hepatic encephalopathy*, MHE), charakteryzuje się brakiem objawów klinicznych, a może być wykryte za pomocą testów neuropsychometrycznych, ujawniających subtelne zmiany podkliniczne, takie jak obniżenie sprawności manualnej czy zaburzenia pamięci krótkotrwałej (Prakash i Mullen, 2010; Zhan i Stremmel, 2012). Stadium 1 charakteryzuje się zaburzeniami rytmu dobowego, obniżoną koncentracją, niewyraźną mową, lekkimi zaburzeniami świadomości, a także drażliwością, napadami niepokoju czy euforii. W stadium 2 występuje obniżona sprawność intelektualna, sporadyczna dezorientacja w czasie, senność, apatia i zmiany osobowości. Stadium 3 charakteryzuje niezdolność do wykonania zadań umysłowych, zaburzenia pamięci, chaotyczna mowa, dezorientacja w czasie i przestrzeni,

senność lub napady pobudzenia, a stadium 4 to śpiączka (Albrecht i Jones, 1999; Ferenci i wsp., 2002).

Przewlekłe uszkodzenie wątroby zajmuje niezmiennie wysoką pozycję wśród przyczyn zgonów w Unii Europejskiej, statystycznie 14 na 100 000 mieszkańców umiera z tego powodu (dane uśrednione z lat 1980–2010, opublikowane w roku 2012 przez Światową Organizację Zdrowia), odpowiednio w 2002 roku w Polsce wskaźnik ten wyniósł 13 na 100 000 mieszkańców (www.euro.who.int). Ok. 50% chorych na niewydolność wątroby wykazuje objawy EW (Leevy, 2007).

2.1.2. Amoniak jako kluczowa substancja toksyczna w EW

Upośledzenie funkcji detoksykacyjnych wątroby skutkuje akumulacją w organizmie wielu toksycznych związków, takich jak amoniak, kwasy tłuszczowe, fenole czy merkaptany odpowiedzialne za zaburzenie funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w EW. Wśród nich amoniak uważany jest za główny czynnik patogenny (Butterworth, 2002; Zieve, 1987).

2.1.2.1. Charakterystyka i obieg w organizmie

Wodorek azotu (III), czyli amoniak, jest związkiem o strukturze tetraedrycznej, który w zależności od, m.in. pH środowiska, występuje w formie gazowej HN_3 lub jonowej NH_4^+ . W warunkach fizjologicznych większość (ok. 98%) stanowi forma NH_4^+ (Felipo i Butterworth, 2002). W niniejszej pracy termin „amoniak” odnosił się będzie do sumy obu tych form.

Utrzymanie homeostazy amoniaku ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Głównym źródłem amoniaku jest przewód pokarmowy, gdzie jest on generowany w wyniku trawienia białek oraz częściowej deaminacji aminokwasów (Weber i wsp., 1988), metabolizmu bakterii jelitowych (Wolpert i wsp., 1970) czy hydrolizy mocznika (Wrong i wsp., 1985). Deaminacja aminokwasów, choć w znacznie mniejszym stopniu, zachodzi również w innych narządach (np. nerki), które mogą być kolejnym źródłem amoniaku we krwi. Metabolizm tego związku sprowadza się w głównej mierze do włączenia w cykl mocznikowy (in. cykl ornitynowy, ang. *ornithine cycle*, OTC), w wyniku którego amoniak przekształcany jest w

wydalany z organizmu z moczem mocznik. Cykl ten w pełnej formie występuje w wątrobie, szcążkowo także w innych narządach (Meijer i wsp., 1990; Kalaitzakis i Björnsson, 2007). Alternatywnie amoniak może być włączony w proces syntezy aminokwasów, przede wszystkim glutaminy (Gln) z glutaminianu (Glu), w reakcji katalizowanej przez zależną od adenosyno-5'-trifosforanu (ang. *adenosine triphosphate*, ATP) syntetazę glutaminową (ang. *glutamine synthetase*, GS). Proces ten zachodzi nie tylko w wątrobie (Gebhard i Mecke, 1983), ale i mięśniach szkieletowych czy mózgu (Desjardins i wsp., 1999; Ganda i Ruderman, 1976; He i wsp., 2010).

Źródło amoniaku w mózgu to przede wszystkim układ krwionośny, z którego związek ten w postaci gazowej swobodnie dyfunduje przez błony komórek tworzących barierę krew–mózg (ang. *blood–brain barrier*, BBB), natomiast postać jonowa może być aktywnie transportowana przy udziale białek błonowych (Huang i Liu, 2001; Ott i Larsen, 2004). Endogennym źródłem amoniaku w mózgu może być też deaminacja aminokwasów, głównie Gln, Glu, asparaginy (Asp) i seryny (Ser) (Cooper i Plum, 1987) oraz amin katecholowych (Hazama i wsp., 1976; Cooper i wsp., 1979). Z braku pełnego OTC, detoksykacja amoniaku w mózgu zachodzi przede wszystkim poprzez syntezę Gln z Glu, przy czym najwyższą aktywność GS wykazują komórki gleju gwiaździstego (astrocyty) (Meijer i wsp., 1990; Martinez-Hernandez i wsp., 1977; Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979). Szacuje się, że ok. 85% amoniaku jest neutralizowane na tej drodze (Albrecht i Norenberg, 2002). Duża aktywność GS w mózgu zapewnia szybkie wiązanie amoniaku, co obok gradientu pH (7,1 w mózgu, 7,4 we krwi) sprzyja dyfuzji tego związku w kierunku z krwi do mózgu (Cooper i wsp., 1979). Skutkuje to stosunkiem stężeń dochodzącym do 1:3 (krew:mózg) (Cooper i Plum, 1987). Z astrocytów Gln może być transportowana do innych komórek OUN lub przez BBB na obwód (Duffy i wsp., 1983; Svoboda i Kerschbaum, 2009). Wychwytywana przez neurony glutaminergiczne, ulegać może deaminacji przez fosfozależną glutaminazę (ang. *phosphate-activated glutaminase*, PAG) do neuroprzekaźnika Glu, wydzielanego następnie do przestrzeni presynaptycznej (Shen i wsp., 1999).

2.1.2.2. Hiperamonemia w dysfunkcji wątroby

Hiperamonemia (HA), czyli podwyższenie poziomu amoniaku we krwi, jest jedną z najpoważniejszych konsekwencji upośledzenia funkcji detoksykacyjnych wątroby.

Referencyjne stężenie amoniaku we krwi utrzymywane jest przez prawidłową pracę wątroby na poziomie maksymalnie do 100 μM i jest ok. dwukrotnie niższe od stężenia odnotowanego w mózgu (Cooper i Plum, 1987). Podczas ostrego uszkodzenia wątroby wartości te zwiększają się nawet kilkukrotnie i mogą osiągać 500 μM we krwi (Clemmensen i wsp., 1999; Jalan i wsp., 1999), przy czym stężenie w mózgu może być odpowiednio nawet 8 razy większe (Cooper i Plum, 1987). W przypadku przewlekłej marskości wątroby stężenie amoniaku w mózgu jest 3-4 krotnie większe niż we krwi (Cooper i Plum, 1987). Poziom amoniaku we krwi dobrze koreluje ze stopniem zaawansowania EW (Ong i wsp., 2003; Bernal i wsp., 2007), przez co parametr ten, obok testów psychometrycznych i elektroencefalografii jest wygodnym narzędziem w określaniu stopnia EW (Conn, 1994).

2.1.2.3. Modele doświadczalne neurotoksyczności amoniaku

W badaniach nad patomechanizmami neurotoksyczności amoniaku stosuje się zarówno modele *in vivo* (najczęściej szczurze i mysie), *ex vivo* (skrawki mózgu) jak i *in vitro* (hodowle komórkowe). Ze względu na złożoną naturę schorzenia jakim jest EW, ogromną trudność sprawia zaprojektowanie modelu odzwierciedlającego wszystkie aspekty patologii.

W przypadku EW typu A najpowszechniejszymi modelami zwierzęcym ostrego uszkodzenia wątroby jest dootrzewnowe podanie hepatotoksyny: tioacetamidu (TAA), galaktozaminy czy azoksymetanu. W przypadku przewlekłego uszkodzenia wątroby (typ B) stosuje się zespolenie wrotno-systemowe, a podwiązanie dróg żółciowych skutkuje objawami zbliżonymi do ludzkiej EW typu C. Do tej pory nie udało się opracować satysfakcjonujących modeli EW opartych na najpowszechniej występujących czynnikach etiologicznych, tj. zakażeniu wirusowym, nadużywaniu alkoholu czy też acetamidofenu (por. art. przeglądowy Butterworth i wsp., 2009). Modele czystej hiperamonemii *in vivo* polegają na dootrzewnowym podawaniu octanu amonu (OA) lub karmieniu karmą o wysokiej zawartości amoniaku lub ureaz (Aguilar i wsp., 2000; Azorin i wsp., 1989; Butterworth i wsp., 2009; Robinson i wsp., 1992). Alternatywą jest stosowanie mutantów z nieczynnym OTC (Veres i wsp., 1987). W badaniach *in vitro*, chlorkiem amonu (1-5 mM) traktuje się hodowle pierwotne astrocytów (Albrecht i wsp., 1994a; Węgrzynowicz i wsp., 2007) lub neuronów (Klejman i wsp., 2005), a także hodowlę mieszaną (Braissant i wsp., 2008). W badaniach *ex vivo* analizuje się skrawki mózgu pochodzące od zwierząt z eksperymentalną HA lub inkubuje

się z amoniakiem skrawki pochodzące od osobników zdrowych (Saran i wsp., 1998; Zielińska i wsp., 2011).

2.1.3. Molekularny mechanizm toksycznego działania amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)

Mechanizm neurotoksycznego działania amoniaku jest złożony i nie do końca poznany. Tworzy go zbiór nierzadko zazębiających się zjawisk molekularnych występujących w różnych typach komórek OUN.

Pierwszym celem oddziaływania pochodzącego z krwioobiegu amoniaku w OUN jest BBB, w której to stwierdzono subtelne zmiany, w tym zmiany przepuszczalności powiązane z degradacją białek złączy ścisłych (Chen i wsp., 2009; Nguyen i wsp., 2006). Uważa się, że zmiany te przyczyniają się do powstawania obrzęku mózgu (komponent wazogeny) (Cauli i wsp., 2011). Do naruszenia integralności BBB w uszkodzeniu wątroby przyczyniać się może cytokina prozapalna, czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), której zwiększony poziom we krwi obserwowano zarówno w modelach zwierzęcych (Wang i wsp., 2011; Jiang i wsp., 2009) jak i u chorych z EW (Wright i wsp., 2007). Ponadto istotną konsekwencją HA w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych tworzących BBB jest występowanie markerów stresu oksydacyjno-nitracyjnego (ang. *oxidative-nitrosative stress*, ONS). Szczegółowe omówienie zmian w BBB wywołanych amoniakiem zawiera praca przeglądowa Skowrońska i Albrecht (2012).

Astrocyty, których wypustki przylegają do naczyń mózgowych, są kolejnymi komórkami narażonymi na toksyczne działanie amoniaku przedostającego się z obwodu do OUN (Lockwood i wsp., 1991). Ostra HA prowadzi do obrzmienia tych komórek, a przedłużona pogłębia zmiany sprawiając, że astrocyty przyjmują postać komórek Alzheimer'a typu II, z wyraźnie powiększonym jądrem i jąderkami (Gregorios i wsp., 1985; Martinez, 1968). Zmiany morfologiczne oraz związane z tym zaburzenia molekularne, które dotyczą komórki astrocytarne, uważane są za podstawowy element patologii i prowadzą do sklasyfikowania EW jako pierwotnej glejopatii. Obrzmienie astrocytów obserwowano zarówno u chorych *post mortem* (Kato i wsp., 1992), jak i w modelach EW *in vivo* (Blei i wsp., 2004). Uważa się, że obrzmienie astrocytów stanowi główną przyczynę obrzęku mózgu

występującego zarówno u chorych z ostrą jak i przewlekłą EW (Prakash i Mullen, 2010; Häussinger i Görg, 2010), i że amoniak jest w tym procesie kluczowym czynnikiem. Obrzęk zaobserwowano też w przypadku HA niezwiązanej z uszkodzeniem wątroby: u pacjentów z upośledzeniem OTC (Brusilow i Traustman, 1986), w zwierzęcych modelach prostej HA (Hilgier i Olson, 1994) oraz podczas inkubacji *ex vivo* skrawków mózgu szczura w medium z amoniakiem (Zielińska i wsp., 2003). Obniżenie poziomu amoniaku we krwi lub jego transportu do mózgu zmniejszyło obrzęk mózgu oraz inne objawy EW (Rose i wsp., 1999, Rose i wsp., 2000). Najistotniejsze zmiany molekularne prowadzące do obrzmienia astrocytów w HA: wzrost zawartości Gln, uszkodzenie funkcji mitochondrialnych oraz ONS zostaną szczegółowo omówione w dalszej części rozprawy.

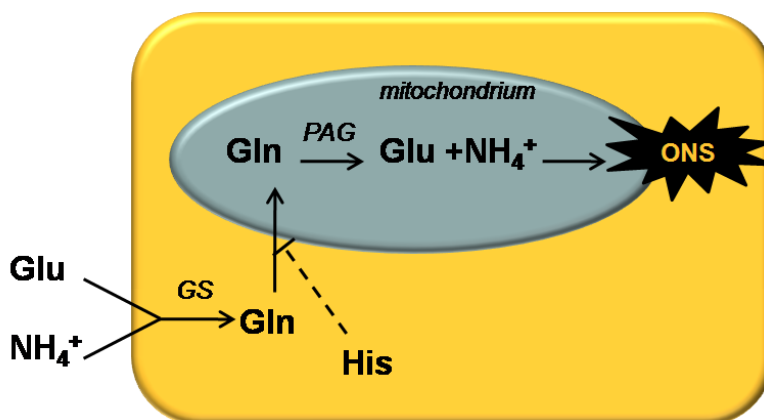
Astrocyty stanowią dla neuronów ochronę przed amoniakiem na tyle skuteczną, że w warunkach HA i EW nie stwierdza się istotnych zmian patologicznych w komórkach nerwowych (Butterworth, 2007), a występujące objawy neurologiczne zazwyczaj ustępują w znacznym stopniu po przeszczepie wątroby (Hallik i wsp., 2011). Niemniej amoniak może prowadzić do śmierci neuronów w doświadczeniach *in vitro* (Li i wsp., 2004). Pomimo braku zmian morfologicznych, HA powoduje zaburzenia neurotransmisji. Wywołana amoniakiem depolaryzacja błony komórkowej neuronów glutaminergicznych powoduje wyrzut Glu z komórek (Moroni i wsp., 1983), a obniżony wychwyt zwrotny Glu przez neurony (Oppong i wsp., 1995) i astrocyty (Albrecht i wsp., 1988; Knecht i wsp., 1997; Norenberg i wsp., 1997) skutkuje akumulacją tego neurotransmitera w przestrzeni synaptycznej. Konsekwencją tego zjawiska są zaburzenia w pobudzającej neurotransmisji glutaminergicznej, związanej z działaniem jonotropowych receptorów Glu, przede wszystkim receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (ang. *N-methyl-D-aspartic acid receptor*, NMDAr), przy czym w ostrej EW zaobserwowano nadaktywację (Michalak i wsp., 1996; Vogels i wsp., 1997), a w przewlekłej obniżenie aktywności NMDAr (Peterson i wsp., 1990; Saransaari i wsp., 1997). Modulowanie przez amoniak aktywności NMDAr przekłada się odpowiednio na wzrost lub obniżenie zależnej od jonów wapnia (Ca^{2+}) syntezy tlenku azotu (ang. *nitric oxide*, NO), a w konsekwencji cyklicznego guanozyno monofosforanu (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP), cząsteczki zaangażowanej m.in. w procesy uczenia się i pamięci (Hermenegildo i wsp., 2000; Hilgier i wsp., 2003; Hilgier i wsp., 2009; Monfort i wsp., 2001). Poza tym HA skutkuje nadaktywacją receptora metabotropowego 1 dla Glu (ang. *metabotropic Glu receptor 1*,

mGluR1) (Canaless i wsp., 2003; Cauli i wsp., 2006) oraz oddziałuje na neurotransmisję hamującą, zależną od receptorów kwasu γ -aminomasłowego (ang. *γ -aminobutyric acid receptor*, GABA_r). W przewlekłej HA zaobserwowano generalny wzrost przekaźnictwa GABA-ergicznego (Cauli i wsp., 2009), w szczurzym modelu EW zaobserwowano wzrost ekspresji podjednostek jonotropowego receptora GABA_A (Li i wsp., 2005), a w mózgu pacjentów z przewlekłą EW wzrost gęstości obwodowych receptorów benzodiazepinowych (ang. *peripheral benzodiazepine receptor*; obecnie definiowanych jako białko translokatora, ang. *translocator protein*, TSPO) (Mullen i wsp., 1990). Poza tym obserwuje się zmiany neuroprzekaźnictwa serotonergicznego (Young i wsp., 1975; Lozeva i wsp. 2004), noradrenergicznego (Michalak i wsp., 2001) oraz opioidowego (Bergasa i wsp., 2002). Postęp objawów neuropsychiatrycznych i motorycznych u pacjentów z EW wydaje się być powiązany ze wzrostem aktywności neurotransmisji hamującej i spadkiem pobudzającej.

2.1.3.1. Glutamina jako pośrednik toksyczności amoniaku

Gln w organizmie odgrywa kluczową rolę w metabolizmie azotu, a w OUN jest prekursorem głównych neurotransmiterów, Glu i GABA, oraz ważnym metabolitem energetycznym (por. art. przeglądowy Albrecht i wsp., 2007). W OUN synteza Gln z Glu i amoniaku ma miejsce w astrocytach w wyniku reakcji katalizowanej przez GS. Część nowosyntetyzowanej Gln trafia do mitochondriów astrocytarnych, gdzie jest z powrotem hydrolizowana do Glu i amoniaku z udziałem zlokalizowanej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej PAG. Niehydrolizowana Gln może być dystrybuowana między różnymi typami komórek OUN, a także poprzez BBB przesyłana na obwód. Znaczna pula trafia do neuronów, gdzie służy jako prekursor neurotransmiterów. Zwiększone stężenie Gln zaobserwowano w OUN zarówno u pacjentów z EW (Hourani i wsp., 1971; Tofteng i wsp., 2006), jak i w modelach EW *in vivo* (Hourani i wsp., 1992; Cordoba i wsp., 1996). Stwierdzono też, że poziom Gln w mózgu dobrze koreluje z HA, a także obrzękiem mózgu i zaawansowaniem EW (Laubenberger i wsp., 1997; Tofteng i wsp., 2006; Kreis i wsp., 1990). Przez długi czas uważano wzrost poziomu tego aminokwasu za zjawisko pozytywne – konsekwencję neutralizacji toksycznego amoniaku (Albrecht i wsp., 2007). Jednak późniejsze doniesienia pokazały, że Gln może pośredniczyć w mechanizmach toksyczności amoniaku. Zastosowanie inhibitora GS, sulfoksyminy metioniny (ang. *methionine sulfoximine*, MSO) doprowadziło do wzrostu przeżywalności szczurów z

indukowaną HA (Warren i Schenker, 1964). Pierwotna hipoteza przedstawiała Gln jako czynnik zaburzający równowagę osmotyczną w mózgu, poprzez stymulowanie wzrostu ciśnienia osmotycznego w astrocytach, co prowadzi do ich obrzmienia (obrzęk osmotyczny) (Brusilow i Traystman, 1986). Niemniej jednak niski udział Gln w puli mózgowych osmolitów (Pasantés-Morales i wsp., 2002) oraz jednoczesny spadek poziomu innych związków osmotycznie czynnych (isonitol, tauryna) (Cordoba i wsp., 1996), poddają to proste wyjaśnienie w wątpliwość. Dalsze eksperymenty przeprowadzane w różnych ośrodkach wykazały skuteczność MSO w zmniejszaniu obrzęku mózgu u szczurów z HA (Blei i wsp., 1994;), ciśnienia śródczaszkowego, przepływu krwi mózgowej (Blei i wsp., 1994; Master i wsp., 1999), hiperamonemicznego obrzmienia astrocytów (Norenberg i Bender, 1994; Willard-Mack i wsp., 1994), zwiększeniu przepuszczalności błon mitochondrialnych (ang. *mitochondrial permeability transition*, MPT) (Bai i wsp., 2001; Norenberg i wsp., 2004), czy ONS w astrocytach (Murthy i wsp., 2001). Uzyskano również dane przemawiające za bezpośrednim toksycznym działaniem Gln – sama Gln wywołuje MPT (Rama Rao i wsp., 2003) oraz ONS w astrocytach *in vitro* (Jayakumar i wsp., 2004), a także obrzęk mitochondriów wyizolowanych z kory mózgu szczura (Ziemińska i wsp., 2000). Powyższe obserwacje doprowadziły do zaproponowania hipotezy toksyczności Gln, tzw. hipotezy konia Trojańskiego (Albrecht i Norenberg, 2006), wedle której syntetyzowana w astrocytach, w wyniku detoksykacji nadmiaru amoniaku, Gln trafia do mitochondriów tych komórek, gdzie z udziałem PAG ulega hydrolizie do Glu i amoniaku. Amoniak w mitochondriach indukuje MPT oraz ONS, co prowadzi do dysfunkcji tych organelli i przyczynia się do obrzmienia astrocytów (Ryc.2.1). Słuszność tej hipotezy została częściowo potwierdzona w badaniu, w którym u szczurów z EW podawano dootrzewnowo histydynę (His), związek hamujący transport Gln do mitochondriów, po czym nie stwierdzono obrzęku mózgu, co interpretowano jako skutek obniżenia poziomu mitochondrialnej Gln (Rama Rao i wsp., 2010).



Ryc.2.1. Hipoteza konia Trojańskiego (Albrecht i Norenberg, 2006, zmodyfikowano), omówienie w tekście. Gln: glutamina, Glu: glutaminian, GS: syntetaza glutaminowa, His: histydyna, NH₄⁺: amoniak, ONS: stres oksydacyjno–nitracyjny, PAG: fosfozależna glutaminazę

2.1.3.2. Upośledzenie funkcji mitochondriów

Objawy toksycznego działania amoniaku w mitochondriach to, przede wszystkim, wcześniej wspomniane MPT oraz upośledzenie cyklu kwasów trójkarboksylowych (ang. *tricarboxylic acid cycle*, TCAC), prowadzące do zaburzenia metabolizmu energetycznego komórki.

MPT powstaje w wyniku otwarcia kanału w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ang. *permeability transition pore*, PTP) na skutek nagromadzenia jonów Ca²⁺, co prowadzi do kaskady zdarzeń obejmujących niekontrolowany przepływ metabolitów o masie poniżej 1,5 kDa, osmotyczne obrzmienie macierzy mitochondrialnej, a także spadek wewnątrzmitochondrialnego potencjału błonowego, prowadzące do generacji wolnych rodników oraz zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej i spadku produkcji ATP (Bai i wsp., 2001; Rasola i Bernardi, 2007). Z drugiej strony MPT może być też konsekwencją ONS (Halestrap i wsp., 1997; Hortelano i wsp., 1997). Uważa się, że pośrednikiem toksyczności amoniaku prowadzącej do MPT jest Gln (por. rozdz. 2.1.3.1.). Inkubacja astrocytów zarówno z amoniakiem (Bai i wsp., 2001), jak i Gln (Reddy i wsp., 2007) wywołuje MPT, Gln indukuje MPT także w mitochondriach izolowanych z mózgu szczura (Ziemińska i wsp., 2000). Dodanie do astrocytów inkubowanych z amoniakiem inhibitora GS – MSO zapobiegało MPT, co wskazuje na rolę syntezy Gln w tym procesie (Bai i wsp., 2001). MPT zostało zahamowane przez zastosowanie His – kompetytora transportu Gln do mitochondriów, co stwierdzono w

hodowlach astrocytów (Reddy i wsp., 2007), mitochondriach *ex vivo* (Ziemska i wsp., 2000) oraz w mózgu szczurów traktowanych TAA (Rama Rao i wsp., 2010). Uważa się, że obrzmienie astrocytów w toksyczności amoniaku jest przede wszystkim konsekwencją transportu nadmiaru Gln do mitochondriów, hydrolizą do Glu i amoniaku skutkującą MPT oraz indukcją ONS (por. rozdz. 2.1.3.1.). Późniejsze występowanie mitochondrialnej akumulacji Gln oraz MPT (Bai i wsp., 2001; Jayakumar i wsp., 2006), w stosunku do niemal natychmiastowej generacji ONS i obrzmienia (Reinehr i wsp., 2007; Alvarez-Leefmans i wsp., 2006) sugeruje, że w procesy te zaangażowane są prawdopodobnie też inne mechanizmy. Przemawiają za tym dane z badań *in vivo*, gdzie nie obserwowano MPT w modelu HA, w którym występuje stres oksydacyjny i obrzmienie astrocytów (Kosenko i wsp., 2007).

Komponent kanału PTP stanowi białko TSPO transportujące cholesterol niezbędny do syntezy steroidów, w tym neurosteroidów pobudzających GABA-ergiczną neurotransmisję. Wzrost poziomu tego białka obserwowano zarówno w modelach toksyczności amoniaku *in vitro* (Itzhak i Norenberg 1994), jak i *in vivo* (Itzhak i wsp., 1995), oraz w mózgu *post mortem* pacjentów z EW (Lavoie i wsp., 1990), co powiązano z występowaniem obrzmienia astrocytów (Panickar i wsp., 2007). Uważa się, że TSPO wpływa na MPT (McEnery i wsp., 1992). Traktowanie hodowli astrocytów ligandami TSPO indukowało MPT, odwracalne poprzez zastosowanie czynnika hamującego otwarcie PTP, cyklopsoryny A (Rama Rao i wsp., 2001). TSPO przyczynia się też do ONS – ligandy TSPO indukują nitrację reszt tyrozynowych w astrocytach oraz w mózgu szczura *in vivo* (Görg i wsp., 2003).

Kolejną, istotnie powiązaną z poprzednio omówionymi, konsekwencją toksycznego poziomu amoniaku w mitochondriach jest zaburzenie metabolizmu energetycznego komórki. U chorych z EW (Lockwood i wsp., 1991) oraz w szczurzych modelach tej patologii (Audet i Butterworth., 1998; Hilgier i wsp., 1991) wykazano mózgowy spadek zużycia głównego substratu energetycznego – glukozy. Spadek poziomu ATP stwierdzono w hodowlach astrocytów i neuronów traktowanych amoniakiem (Haghighat i wsp., 2000; Reddy i wsp., 2007), a także w mózgu szczurów z HA (Kosenko i wsp., 1994). Zjawisko to wiąże się z niewydolnością zlokalizowanego w mitochondriach TCAC, objawiającą się poprzez obniżoną aktywność karboksylazy pirogronianowej (Faff-Michalak i Albrecht, 1991) i dehydrogenazy α -ketoglutarowej (Faff-Michalak i Albrecht, 1993).

2.1.3.3. Stres oksydacyjno–nitracyjny (ONS)

ONS występuje gdy dochodzi do zachwiania równowagi między produkcją a neutralizacją reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) i azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS), w wyniku której dochodzi do nagromadzenia tych cząstek. Głównym miejscem powstawania ROS są mitochondria, gdzie w wyniku przemian łańcucha oddechowego, aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) oraz reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę α -ketoglutaranową, czy pirogronianową, generowany jest rodnik nadtlenkowy (O_2^{\cdot}), będący prekursorem wielu ROS i RNS (por. art. przeglądowe: Dikalov, 2011; Murphy, 2009). Poza mitochondriami wolne rodniki mogą być generowane m. in. przez oksydazę fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) (Reinehr i wsp., 2007), oksydazę ksantynową (ang. *xanthine oxidase*, XO) (Kaminsky i Kosenko, 2009), czy syntazę tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*, NOS) (Rama Rao i wsp., 2005). Mózg jest organem szczególnie narażonym na powstawanie ONS, zapotrzebowanie na tlen jest tu bardzo wysokie, przy masie stanowiącej średnio 2% całkowitej masy ciała, mózg zużywa ok. 20% tlenu (Clarke i Sokoloff, 1999). Poza tym akumulacji ROS w OUN sprzyja wysoka zawartość żelaza, a relatywnie niska aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy (ang. *catalase*, CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*, SOD) i peroksydazy glutationowej (ang. *glutathione peroxidase*, GPx) (por. art. przeglądowy Dringen i wsp., 2000). Wysoki stopień fosforylacji oksydacyjnej prowadzi do generacji dużej liczby ROS, dlatego też każde uszkodzenie, czy to na etapie generacji, czy eliminacji tych cząstek za pomocą układów antyoksydacyjnych, może bardzo szybko doprowadzić do przesunięcia równowagi oksydacyjno–redukcyjnej na korzyść oksydacji, pociągając za sobą zaburzenia prawidłowego funkcjonowania mózgu, obserwowane w różnych stanach patologicznych, w tym w EW.

Uważa się, że występujący w warunkach toksyczności amoniaku ONS w znacznym stopniu przyczynia się do obrzmienia astrocytów (por. rozdz. 2.1.3.1., 2.1.3.2.). Markery stresu oksydacyjnego wykryto w mózgu *post mortem* (Görg i wsp., 2010) a także we krwi chorych z EW (Negru i wsp., 1999). Wzrost stężenia rodnika hydroksylogowego ($\cdot OH$) zaobserwowano w przestrzeni międzykomórkowej mózgu szczura w warunkach ostrej HA (Hilgier i wsp., 2003). HA powodowała także wzrost produkcji O_2^{\cdot} w

cytoplazmie (Kosenko i wsp., 1997) oraz w mitochondriach wyizolowanych z mózgu szczura (Kosenko i wsp., 2003a). Poziom ROS w mózgu wzrastał po podaniu TAA (Sathyasaikumar i wsp., 2007), a występowanie obrzęku mózgu było pozytywnie skorelowane ze wzrostem syntezy NO (Larsen i wsp., 2001; Master i wsp., 1999). W badaniu wpływu toksyczności amoniaku na astrocyty *in vitro* również zaobserwowano wzrost poziomu ROS i RNS (Murthy i wsp., 2001; Skowrońska i wsp., 2010). Zwiększenie ekspresji i aktywności NOS (Rama Rao i wsp., 1995) przekłada się na wzrost poziomu azotynów i azotanów w mózgu zwierząt z EW (Genesca i wsp., 1999; Master i wsp., 1999). Zarówno HA *in vitro* jak i *in vivo* powodowała wzrost ekspresji i aktywności markera stresu oksydacyjnego, oksygenazy hemowej-1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1) (Rama Rao i wsp., 2010; Warskulat i wsp., 2002.) W modelu zespolenia wrotnego, poza wzrostem ekspresji HO-1 zaobserwowano spadek ekspresji SOD (Song i wsp., 2002). Natomiast ostre zatrucie amoniakiem spowodowało spadek aktywności CAT, SOD i GPx w mózgu szczura (Kosenko i wsp., 1997; Kosenko i wsp., 2003a).

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na znaczną rolę aktywacji NMDAr w mechanizmie toksyczności amoniaku. Antagonista NMDAr – dizocyplina (MK-801) zahamowała: produkcję ROS i RNS w hodowlach astrocytów traktowanych amoniakiem (Kruczek i wsp., 2011), nagromadzenie anionorodnika nadtlenkowego we frakcji mitochondrialnej oraz obniżenie aktywności enzymów przeciwutleniających w mózgu szczurów z ostrą HA (Kosenko i wsp. 2003a; Kosenko i wsp. 1999). Uważa się, że nadaktywacja NMDAr indukowana jest wzrostem zewnątrzkomórkowego poziomu Glu w warunkach HA (Rose i wsp., 2005; Hilgier i wsp., 1999; Ohara i wsp., 2009) i prowadzi do wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce, co aktywuje NOS, a w konsekwencji wzrost poziomu NO (Hilgier i wsp., 2003). Ponadto aktywacja NMDAr może przyczynić się do produkcji nadtlenku wodoru (H_2O_2) poprzez aktywację XO, co zostało zaobserwowane w mózgu szczura z HA (Kaminsky i Kosenko, 2009). Alternatywną drogą produkcji ROS w toksyczności amoniaku może być aktywacja generującej O_2^- oksydazy NADPH (Reinehr i wsp., 2007). Na skutek dootrzewnowego podawania TAA, w dwukrotnej dawce 300 mg/kg m.c., w odstępach 24h, w niesynaptycznych mitochondriach wyizolowanych z kory mózgu szczura zanotowano znaczący spadek aktywności białek łańcucha oddechowego: kompleksu III, zarówno po 18h jak i 24h od ostatniej iniekcji, a także kompleksu I po 24h, na co razem ze spadkiem aktywności dehydrogenazy pirogronianowej, wskazywano jako przyczynę generacji ROS, oraz zaburzeń energetycznych prowadzących do

obrzęku tych organelli, przyczyniającego się do patogenezy EW (Chadipiralla i wsp., 2012).

Konsekwencją występowania ONS w toksyczności amoniaku są liczne nieprawidłowości na poziomie molekularnym. Jedną z nich jest S-nitrozylacja reszt cysteinowych oraz nitracja reszt tyrozynowych w białkach, zachodząca na skutek przyłączenia do grup tiolowych białek anionu nadtlenoazotowego (ONOO⁻), wysoce reaktywnego rodnika powstałego w wyniku koniugacji NO z O₂. Indukowana amoniakiem nitracja białek (Häussinger i wsp., 2005) może modulować ich aktywność, np. nitracja GS (Schliess i wsp., 2002) może prowadzić do zahamowania aktywności tego enzymu (Görg i wsp., 2007), a nitracja transportera jonowego NKCC1 (ang. *Na-K-Cl cotransporter 1*), może stymulować jego aktywność, co odgrywa rolę w obrzmieniu astrocytów (Jayakumar i wsp., 2008) oraz obrzęku mózgu (Jayakumar i wsp., 2011). ONS w toksyczności amoniaku objawia się ponadto w postaci utleniania kwasów nukleinowych – amoniak indukuje selektywną oksydację kwasu rybonukleinowego (ang. *ribonucleic acid, RNA*), w tym RNA kodującego transporter glutaminianowo-asparaginianowy GLAST (ang. *glutamate-aspartate transporter*), w hodowlach astrocytów oraz w mózgu szczurów i myszy (Görg i wsp., 2008).

Uwolnienie cynku Zn²⁺ z kompleksów białkowych może być kolejnym skutkiem zachwiania równowagi redoks w komórce na skutek HA. Utlenienie grup tiolowych w cysteinie (Cys) może doprowadzić do uwolnienia Zn²⁺ z białek, co pociąga za sobą ich funkcjonalne uszkodzenie. Zależny od NO wzrost stężenia wolnego cynku [Zn²⁺] w mitochondriach i cytoplazmie astrocytów traktowanych 5 mM chlorkiem amonu korelował ze wzrostem ekspresji matrycowego RNA (mRNA) dla metalotionein oraz jądrowej akumulacji czynnika transkrypcyjnego MTF-1 (ang. *metal-regulatory transcription factor 1*) (Kruczek i wsp., 2011), co interpretowano jako odpowiedź protekcyjna (Aschner i wsp., 1998; Günther i wsp., 2012).

2.1.4. Inne niż amoniak czynniki patogenetyczne w EW

Rola amoniaku w patomechanizmie EW jest niezaprzeczalna, jednak należy pamiętać o występowaniu innych czynników, potencjalnie przyczyniających się do występowania objawów choroby, takich jak inne neurotoksyny akumulujące się w organizmie na skutek dysfunkcji wątroby (Zieve, 1987), mangan, którego poziom wzrasta we krwi i mózgu chorych na

EW (Spahr i wsp., 1996; Hauser i wsp., 1994; Hauser i wsp., 1996), hiponatremia, hipokalemia (Toris i wsp., 2011) oraz powszechnie występujące u pacjentów stany zapalne (Prakash i Mullen, 2010). W nielicznych przypadkach obecny jest też czynnik genetyczny – mutacja w promotorze genu kodującego PAG, prowadzi do zwiększenia aktywności tego enzymu, co uwrażliwia pacjentów z marskością wątroby na rozwój EW (Romero-Gomez i wsp., 2010).

2.1.5. Strategie terapeutyczne

W ostrym uszkodzeniu wątroby jak dotąd jedyną skuteczną metodą terapeutyczną jest przeszczep, jednak dostępność organów do transplantacji oraz konieczność stosowania terapii immunosupresyjnej znacząco ogranicza możliwości jej zastosowania (Asher i wsp., 1993; Stravitz i wsp., 2007). W tym przypadku funkcjonowanie uszkodzonej wątroby może być wspomagane przez zewnętrzne urządzenia hemofiltrujące (MARS) (Chiu i Fan, 2006), a w celu obniżenia obrzęku mózgu stosuje się środki odwadniające (mannitol) oraz hipotermię (Stravitz i wsp., 2007).

Dotychczasowe strategie leczenia przewlekłej EW skupiają się na procedurach prowadzących do obniżenia poziomu amoniaku we krwi lub modyfikowaniu jego metabolizmu. Terapia farmakologiczna polega przede wszystkim na obniżaniu produkcji oraz wchłaniania amoniaku w jelitach. W tym celu chorym podaje się dwucukry, jak laktuloza czy laktitol, o właściwościach przeczyszczających oraz obniżających pH, co ogranicza wchłanianie amoniaku w jelicie (Conn i Lieberthal, 1979). Ponadto, w celu zahamowania rozwoju bakterii jelitowych będących znacznym źródłem amoniaku w organizmie, pacjentom podaje się słabo wchłanialne antybiotyki, np. neomycynę (Conn i wsp., 1977), czy mniej toksyczną rifaksyminę (Bass i wsp., 2010). Wydajność usuwania amoniaku można zwiększyć poprzez pobudzenie syntezy Gln, np. podając asparaginian ornityny (Kircheis i wsp., 1997) lub bezpieczniejszy, bo prowadzący do wydalania Gln przez nerki, fenylooctan ornityny (Jalan i wsp., 2007). W przewlekłej EW, ze zmiennym powodzeniem, stosuje się też antagonistę TSPO, flumazenil (Goulenok i wsp., 2002). W celu ograniczenia spożywanej ilości białka jako źródła amoniaku w przewodzie pokarmowym, chorym zaleca się stosownie zrównoważonej, niskobiałkowej diety, optymalna zalecana dawka to 1-1,2 g białka/dzień/kg m.c. (Mullen i Dasarathy, 2004). Redukcję spożywanego białka zaleca się szczególnie w przypadku ostrego uszkodzenia wątroby, w stanach

przewlekłych stosuje się zwykle normalną dietę, by nie dopuścić do redukcji tkanki mięśniowej, metabolizującej amoniak do Gln. Białko roślinne wydaje się być bezpieczniejsze, ze względu na niższy stopień metabolizmu do amoniaku, a także wysoką zawartość błonnika wspomagającego pracę jelit i wydalanie toksyn (Amodio i wsp., 2001). Pozytywne efekty u chorych z marskością wątroby daje także stosowanie suplementacji aminokwasami z rozgałęzionym łańcuchem bocznym (Muto i wsp., 2005; Les i wsp. 2011).

Jednym z celów i skutków działania terapeutycznego w EW jest obniżenie ONS. Mannitol używany do obniżania ciśnienia śródczaszkowego posiada właściwości przeciwutleniające, a lecznicze działanie hipotermii związane jest m.in. z redukcją ONS (Globus i wsp., 1995). Podawanie pacjentom prekursora kluczowego komórkowego przeciwutleniacza jakim jest glutation (GSH), N-acetylo-cysteiny (NAC) daje pozytywne efekty w przypadku ostrego uszkodzenia wątroby o różnej etiologii (Harrison i wsp., 1991; Mumtaz i wsp., 2010).

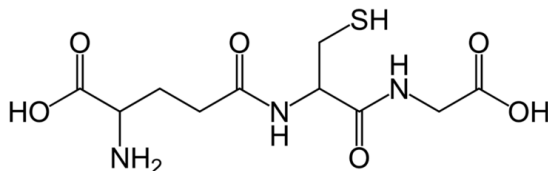
2.2. Endogenne elementy antyoksydacyjnej protekcji

2.2.1. Glutation (GSH)

2.2.1.1. Synteza i metabolizm GSH w OUN

Glutation (GSH) czyli trójpeptyd γ -glutamylcysteinyloglicyna (Ryc.2.2) jest najpowszechniej występującym niskocząsteczkowym związkem tiolowym w komórkach. Po raz pierwszy został on opisany i zidentyfikowany jako spontaniczny reduktor grup tiolowych przez Rey-Pailhade'a w 1888 roku (Meister, 1983). W warunkach fizjologicznych w komórkach związek ten występuje głównie (ok. 99%) w postaci zredukowanej (GSH), pozostałe 1% stanowi jego forma utleniona (GSSG) oraz liczne koniugaty (Slivka i wsp., 1987). Większość GSH zlokalizowana jest w cytozolu (stężenie 1-10 mM), który jest głównym miejscem syntezy tego związku; niewielka ilość zlokalizowana jest także pozakomórkowo, jest ona zwykle 100-1000 razy mniejsza. Stężenie GSH w mózgu ssaków osiąga wartości 1-3 mM (Cooper i Kristal 1997; Slivka i wsp., 1987), a w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) ok. 5 μ M (Anderson i wsp., 1989). Hodowle astrocytarne charakteryzują się poziomem GSH dochodzącym do 50 nmol/mg białka, przy stężeniu cytozolowym ok. 8 mM.

Przyjmuje się, że poziom GSH jest znacznie wyższy w astrocytach w porównaniu z neuronami (por. art. przeglądowy Dringen, 2000).



Ryc.2.2. Wzór strukturalny glutationu

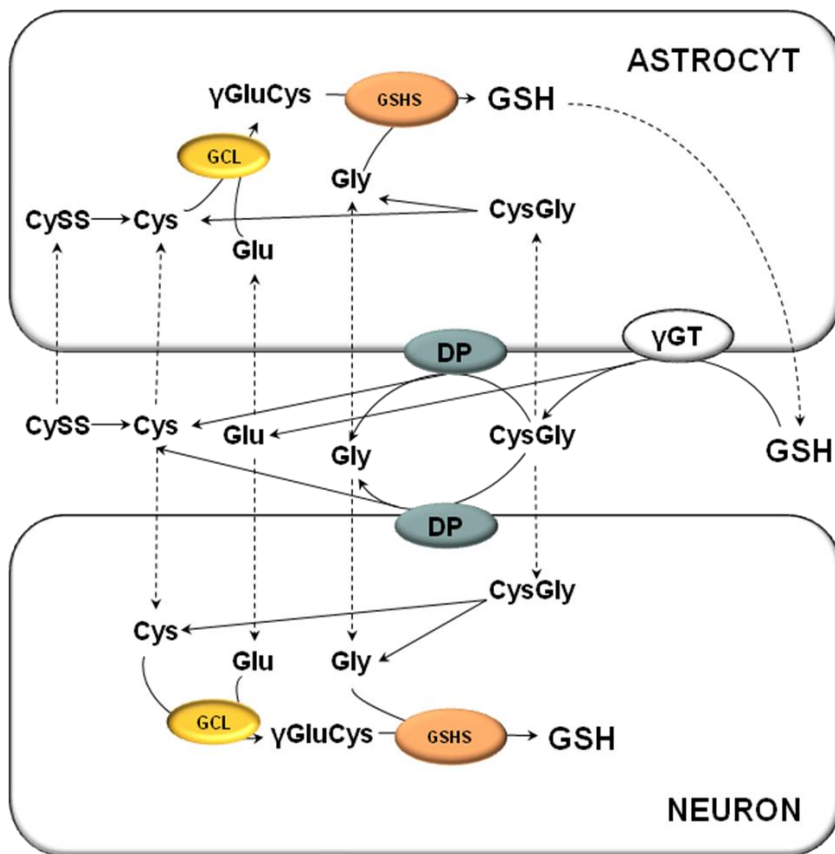
Ze względu na właściwości fizykochemiczne, GSH trudno przechodzi przez błony komórkowe, przez co jego transport z obwodu przez BBB jest utrudniony, choć istnieją też nieliczne doniesienia o funkcjonalnym, zależnym od sodu, transporterze GSH przez BBB (Kannan i wsp., 1990; Kannan i wsp., 2000). Niemniej uważa się, że główne jego źródło w OUN to synteza z dostępnych prekursorów, które mogą być transportowane przez BBB. Bez względu na typ komórek, synteza GSH odbywa się na drodze dwóch reakcji katalizowanych przez enzymy zależne od ATP. Pierwsza z nich, przy udziale ligazy γ -glutamylcysteiny (ang. *γ -glutamylcysteine ligase*, GCL; inaczej syntetaza γ -glutamylcysteiny, γ -SGC), prowadzi do powstania wiązania izopeptydowego w skutek połączenia grupy α -aminowej Cys z grupą γ -karboksylową Glu. Takie nietypowe wiązanie zapewnia GSH ochronę przed wewnątrzkomórkowymi peptydazami, a przez to stabilność jego poziomu wewnątrzkomórkowego. Jest to etap limitujący wydajność syntezy, ze względu na ograniczoną dostępność Cys w komórce (toksycznej w wyższych stężeniach) oraz hamowanie aktywności enzymu GCL poprzez negatywne sprzężenie zwrotne – akumulację GSH (Huang i wsp., 1993). Następnym etapem syntezy jest, katalizowana przez syntetazę glutationową (ang. *glutathione synthetase*, GSHS), koniugacja grupy aminowej glicyny (Gly) z grupą karboksylową Cys w γ -glutamylcysteinie (γ GluCys) (Dringen, 2000).

Wyższe stężenie GSH w astrocytach może wynikać z lepszej dostępności substratów do jego syntezy. Niski poziom Cys sprawia, że jej bardziej powszechna, utleniona forma – cystyna (CySS), po wewnątrzkomórkowej redukcji, staje się kluczowym prekursorem GSH w astrocytach (Kranich i wsp., 1996; Kranich i wsp., 1998). Może być ona wychwytywana przez niezależny od sodu, antyportowy układ transportujący Cys i Glu, Xc⁻ (Bannai i Kitamura, 1980), lub któryś z sodozależnych transporterów aminokwasów (ang. *excitatory amino acid transporter*, EAAT)

(Shanker i wsp., 2001; Bender i wsp., 2000). Dostępność Glu, który jest w tym przypadku dodatkowym czynnikiem limitującym syntezę, może być zrekompenrowana poprzez obecność jego prekursorów: Gln, Asp, ornityny lub proliny (Dringen i Hamprecht, 1996). Astrocyty mogą też wychwytywać z przestrzeni międzykomórkowej i włączać do syntezy dipeptydy γ GluCys oraz CysGly (Dringen i wsp., 1998). W neuronach, z powodu obfitości Glu, czynnikiem limitującym pozostaje Cys. Podobnie jak w przypadku astrocytów, dokomórkowy transport Cys może odbywać się przy udziale sodozależnego transportera z rodziny EAAT (Shanker i wsp., 2001). Obok Cys neurony do syntezy GSH mogą wykorzystywać γ GluCys oraz CysGly (Dringen i wsp., 1999), ale nie CySS (Kranich i wsp., 1996; Sagara i wsp., 1993), choć przenoszący CySS Xc- jest w tych komórkach aktywny (La Bella i wsp., 2007; Sagara i wsp., 1993). Degradacja GSH odbywa się w przestrzeni pozakomórkowej z udziałem białek zlokalizowanych po zewnętrznej stronie błony komórkowej i podobnie jak synteza, proces ten jest dwustopniowy. Przy udziale γ -glutamylotranspeptydazy (ang. *γ -glutamyltranspeptidase*, γ GT) dochodzi do hydrolizy wiązania izopeptydowego, w wyniku której powstaje dipeptyd CysGly, a reszta γ -glutamylowa przenoszona jest na cząsteczkę wody lub akceptor aminokwasowy, po czym wraca do komórki. W OUN γ GT występuje głównie na powierzchni komórek śródbłonna oraz stopkach astrocytarnych przylegających do naczyń (Zhang i wsp., 1997). Rozkład GSH wieńczy hydroliza CysGly do Cys i Gly z udziałem dipeptydazy (ang. *dipeptidase*, DP). Tak powstające aminokwasy mogą być następnie wychwytywane przez komórki w celu ponownej syntezy GSH. Aby GSH znalazł się w przestrzeni międzykomórkowej niezbędny jest jego aktywny eksport. Transport GSH oraz jego koniugatów na zewnątrz komórki odbywa się przede wszystkim z udziałem transporterów należących do rodziny białek posiadających kasetę wiążącą ATP (ang. *ATP-binding cassette*, Abc) – białek oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance protein*, Mrp) (Bachhawat i wsp., 2013).

Uważa się, że synteza i metabolizm GSH w OUN angażuje interakcje między astrocytami i neuronami. Większy poziom neuronalnego GSH stwierdzono w mieszanych hodowlach astrocytarno–neuronalnych niż w monotypowych hodowlach neuronalnych (Rathinam i wsp., 2006). Zahamowanie aktywności γ GT acywicyną (ang. *acivicin*, ACV) prowadziło do wybiórczego obniżenia poziomu GSH w neuronach, a nie astrocytach, co świadczyć może o zależności neuronalnej syntezy od zewnątrzkomórkowej degradacji GSH uwolnionego z gleju. Postuluje się, że astrocyty uwalniając

GSH, który jest następnie w przestrzeni międzykomórkowej rozkładany, zapewniają prekursorzy Cys i CysGly do syntezy tego związku w neuronach (Dringen i wsp.,1999; Dringen i wsp., 2000). Alternatywna hipoteza wskazuje na rolę pochodzącego z astrocytów GSH jako reduktora zewnątrzkomórkowej CySS w wyniku czego powstaje Cys, która w przeciwieństwie do CySS, może być użyta to do syntezy GSH w neuronach (Wang i Cynader, 2000). Interakcje astrocyt – neuron w syntezie GSH ilustruje Ryc.2.3.



Ryc.2.3. Synteza i metabolizm GSH w OUN (Dringen, 2000, zmodyfikowano), omówienie w tekście. γ GT: γ -glutamylotranspeptydaza, Cys: cysteina, CySS: cystyna, DP: dipeptydaza, GCL: ligaza glutaminianowo-cysteinowa Glu: glutaminian, Gly: glicyna, GSHS: syntetaza glutationowa, GSH: glutation

2.2.1.2. Rola GSH w metabolizmie wewnątrzkomórkowym i interakcjach międzykomórkowych

Obecność w strukturze GSH, należącej do reszty Cys, wysoce reaktywnej grupy tiolowej (-SH), determinuje jego antyoksydacyjne właściwości redukcji wiązań disiarczkowych oraz eliminacji związków utleniających (Hammond i wsp., 2001). Sprzyjają temu wysokie stężenie GSH w komórkach oraz niska wartość standardowego biologicznego potencjału redoks (-240 mV) (Schafer i Buettner, 2001). W procesach nieenzymatycznych GSH reaguje bezpośrednio z wolnymi rodnikami: H_2O_2 (Winterbourn i Metodiewa, 1994), $NO\cdot$ (Clancy i wsp., 1994), $ONOO^-$ (Koppal i wsp., 1999) oraz $\cdot OH$ (Bains i Shaw, 1997). Pomaga w utrzymaniu równowagi redoks w komórkach (bufor tiolowy), natomiast glutationylacja białek, czyli odwracalne przyłączenie GSH do grup -SH białek, chroni je przed nieodwracalnym utlenieniem w warunkach ONS, modulując przy tym ich aktywność (Klatt i Lamas, 2000; Giustarini i wsp., 2004). W większości przypadków glutationylacja prowadzi do obniżenia aktywności białka, jedynie przyłączenie GSH do S-transferaz glutationowych (ang. *glutathione S-transferase*, GST) wzmacnia ich działanie, polegające na koniugacji z ksenobiotykami w celu zwiększenia ich hydrofilowości, co umożliwia ich wydajne wydalenie z komórki (por. art. przeglądowy Board i Menon, 2013; Deponte, 2013). Poza tym glutationylacja odgrywa istotną rolę w procesach potranslacyjnych modyfikacji oraz biodegradacji białek (Ghezzi, 2013; Dalle-Donne i wsp., 2008). Deglutationylacja białek może przebiegać z pomocą glutaredoksyn (ang. *glutaredoxin*, Grx) lub w mniejszym stopniu przez tioredoksyny (ang. *thioredoxin*, Trx) (Ghezzi, 2013).

GSH jest donorem elektronu dla Grx, ale i GPx – kluczowych enzymów katalizujących redukcję H_2O_2 oraz organicznych nadtlenuków (ROOH). W wyniku utlenienia GSH (zarówno chemicznego jak i enzymatycznego) tworzy się disiarczek GSSG, cząsteczka regenerowana do GSH z pomocą zależnej od NADPH reduktazy glutationowej (ang. *glutathione reductase*, GR). Stosunek GSH/GSSG może służyć jako wskaźnik potencjału redoks komórki (Deponte, 2013).

Syntetyzowany wyłącznie w cytozolu GSH może być dystrybuowany w obrębie jak i poza komórkę. Transportowany do przestrzeni międzykomórkowej, podobnie jak wewnątrzkomórkowo, bierze udział w procesach detoksykacji i antyoksydacyjnej protekcji (Schafer i Buettner, 2001),

alternatywnie może brać udział w transdukcji sygnału. GSH stanowi bezpieczny rezerwuuar dla neurotoksycznej Cys (Tateishi i wsp., 1977), indukującej wzrost poziomu Glu oraz nadaktywację NMDAr (Janaky i wsp., 2000). Poza tym grupa glutamyłowa Glu w cząsteczce GSH może oddziaływać na podjednostki NMDAr (Janaky i wsp., 1999). GSH jest też istotnym nośnikiem cząsteczki regulacyjno-sygnałowej, NO, z którą łatwo tworzy koniugat, S-nitrozoglutation (GSNO) (Singh i wsp., 1996; Rauhala i wsp., 1998).

W obrębie komórki GSH może być transportowany do określonych obszarów, gdzie stanowi niezbędny element prawidłowego przebiegu wielu procesów molekularnych. W jądrze komórkowym główną rolą GSH jest utrzymanie w stanie zredukowanym reszt Cys białek odpowiedzialnych za naprawę oraz ekspresję kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), reguluje także syntezę DNA jako donor elektronu dla reduktazy rybonukleotydomowej (por. art. przeglądowe: García-Giménez i wsp., 2013; Arrigo, 1999). W siateczce śródplazmatycznej pomaga w utrzymaniu środowiska sprzyjającego tworzeniu mostków disiarczkowych, niezbędnych przy związaniu się nowosyntetyzowanych białek (Hwang i wsp., 1992; Chakravarthi i wsp., 2006). Ok. 10% komórkowego GSH stanowi GSH zlokalizowany w mitochondriach (mGSH), którego główną rolą jest ochrona przed powstającymi w mitochondriach ROS. GSH do mitochondriów trafia z udziałem zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej białek nośników substancji rozpuszczonych (ang. *solute carrier*, Slc), przede wszystkim kwasu dikarboksyłowego (ang. *dicarboxylate carrier*, DIC; Slc25a10) oraz α -ketoglutaranu (ang. *oxoglutarate carrier*, OGC; Slc25a11) (por. art. przeglądowe: Mari i wsp., 2009; Lash, 2006; Bachhawat i wsp., 2013). Zmiany w poziomie mGSH powiązane z patogenezą schorzeń OUN, takich jak niedotlenienie (Wallin i wsp., 2000) czy udar mózgu (Anderson i Sims 2002; Anderson i wsp., 2004).

2.2.1.3. GSH w neurotoksyczności amoniaku

Zmiany homeostazy GSH występują w licznych stanach patologicznych i schorzeniach związanych z występowaniem ONS, w tym uszkodzeń OUN. U pacjentów z chorobą Parkinsona zanotowano spadek poziomu GSH *post mortem* w istocie szarej (Perry i wsp., 1986; Sofic i wsp., 1992) oraz wzrost stosunku GSH/GSSG w jądrze podstawnym (Sian i wsp., 1994). Obniżenie poziomu GSH zanotowano w CSF oraz w korze czołowej chorych na

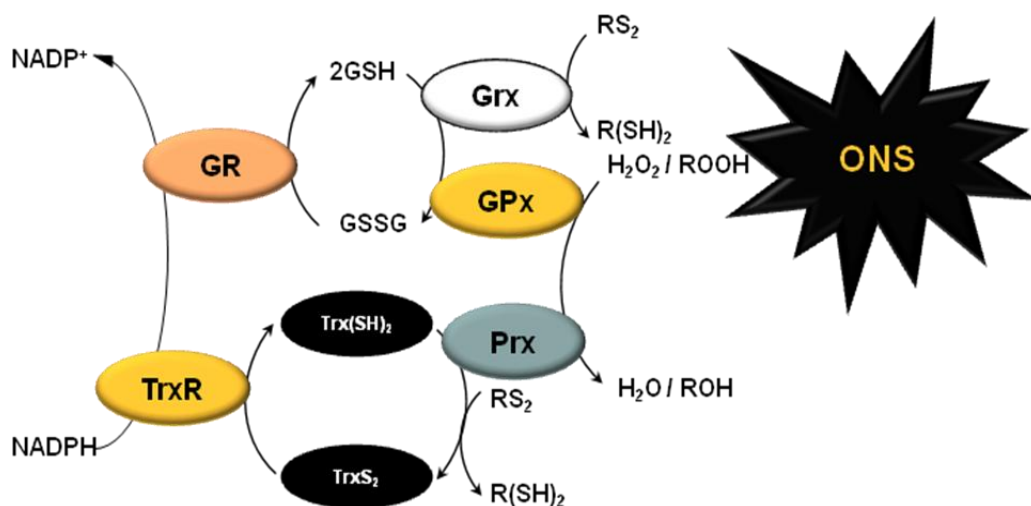
schizofrenię (Do i wsp., 2000), a wzrost poziomu GR i GPx w hipokampie w przypadku choroby Alzheimera (Lovell i wsp., 1995).

Z doświadczeń modelowych wiemy, że także amoniak wpływa na homeostazę GSH w OUN. Astrocyty poddane działaniu amoniaku wykazały czaso- i dawkozależny wzrost poziomu GSH oraz GSSG zarówno w komórkach jak i medium hodowlanym, przy czym zjawisko to zostało zahamowane przez dodanie sulfoksiminy butioniny (ang. *buthionine sulfoximine*, BSO) – inhibitora GCL, co wskazuje na wzrost syntezy jako przyczynę zaobserwowanych zmian (Murthy i wsp., 2000). Badania przeprowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii na hodowlach astrocytów pierwotnych a także linii glejaka C6 potwierdzają te obserwacje, wskazując dodatkowo na wzrost zużycia GSH, przekładający się na spadek stosunku GSH/GSSG (Węgrzynowicz i wsp., 2007). W hodowlach neuronów amoniak doprowadził do znaczącego obniżenia przeżywalności, skorelowanego ze spadkiem stosunku GSH/GSSG (Klejman i wsp., 2005), poziom GSH spadał w przypadku najwyższych stosowanych dawek (10 mM). Zastosowanie BSO doprowadziło do obniżenia zawartości zarówno GSH jak i GSH/GSSG, nie wpływając jednocześnie na przeżywalność komórek, co może wskazywać, że spadek GSH nie jest bezpośrednio odpowiedzialny za śmierć neuronów poddanych działaniu amoniaku. Z drugiej strony inkubacja z prekursorem GSH – estrem dietylowym glutationu zaowocowała, skorelowanym ze wzrostem zawartości GSH, wzrostem przeżywalności komórek w warunkach HA (Klejman i wsp., 2005). Różna odpowiedź różnych typów komórek może wskazywać na odmienne mechanizmy regulacji syntezy GSH, w tym aktywność enzymów lub dostępność prekursorów (por. rozdz. 2.2.1.1.). Astrocyty poddane działaniu amoniaku wykazują zwiększony wychwyt Cys (Węgrzynowicz i wsp., 2007), co przemawiać może za hipotezą, że zwiększona synteza GSH w astrocytach jest adaptacyjną odpowiedzią na ONS wywołany toksycznymi dawkami amoniaku.

2.2.2. Tioredoksyny

Układ tioredoksynowy TrxS₂/Trx(SH)₂, razem z układem GSSG/GSH, stanowią najpotężniejszą maszynę komórkową redukującą grupy tiolowe. Właściwości redukujące białek z rodziny Trx zapewnia zdolność do odwracalnego utleniania pary Cys w aktywnym miejscu, o dobrze zachowanej sekwencji aminokwasów (Cys-Gly-Pro-Cys) (Holmgren, 1968). Trx podczas redukcji utlenia się do disiarczku, który jest regenerowany przez reduktazę

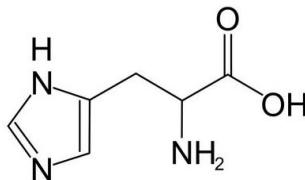
tioredoksynową (ang. *thioredoxin reductase*, TrxR) zależną od NADPH (Holmgren i Björnstedt, 1995). W komórkach ssaków występują dwa systemy tioredoksynowe: cytozolowy Trx1/TrxR1, który pod wpływem różnych czynników może być transportowany do jądra (Hirota i wsp., 1999) lub na zewnątrz komórki (Rubartelli i wsp., 1992), oraz odrębna, mitochondrialna para Trx2/TrxR2 (Hansen i wsp., 2005). Poza rolę donora elektronu dla redukujących nadtlenki peroksyredoksyn (ang. *peroxiredoxin*, Prx), Trx odpowiada za utrzymanie w stanie zredukowanym białek uczestniczących w transdukcji sygnału oraz regulacji ekspresji genów. Trx jest głównym donorem elektronu dla reduktazy rybonukleotydowej (Holmgren, 1977; Jordan i Reichard, 1998), wspomaga aktywność wielu czynników transkrypcyjnych i innych białek regulatorowych (Hirota i wsp., 1999; Hirota i wsp., 1997; Ueno i wsp., 1999; Hirota i wsp., 1997; Saitoh i wsp., 1998). Główne drogi działania układów TrxS₂/Trx(SH)₂ oraz GSSG/GSH przedstawia Ryc.2.4.



Ryc. 2.4. Podstawowe drogi działania układów TrxS₂/Trx(SH)₂ oraz GSSG/GSH (Dringen, 2000; Holmgren i Björnstedt, 1995), omówienie w tekście. GR: reduktaza glutationowa, GSH: forma zredukowana glutationu, GSSG: forma utleniona glutationu, Grx: glutaredoksyna, GPx: peroksydaza glutationowa, Prx: peroksyredoksyna, TrxS₂: forma utleniona tioredoksyny, Trx(SH)₂: forma zredukowana tioredoksyny, TrxR: reduktaza tioredoksyny, ONS: stres oksydacyjno–redukcyjny, NADPH: forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, NADPH⁺: forma utleniona fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

2.2.3. Histydyna

L-Histydyna (His) (Ryc.2.5) jest biogennym aminokwasem, który został zidentyfikowany jako skuteczny środek w zapobieganiu uszkodzeniu mitochondriów astrocytarnych (Albrecht i wsp., 2000) oraz obrzmieniu astrocytów poddanych działaniu toksycznych stężeń amoniaku lub Gln w układach *in vitro* (Reddy i wsp., 2006). His podawana dootrzewnowo zapobiegała również ONS oraz obrzękowi mózgu szczura z indukowaną TAA EW (Rama Rao i wsp., 2010). Jak dotąd ten protekcyjny efekt His w EW przypisywano hamowaniu transportu Gln do mitochondriów (czyt. „zaklinaniu” konia Trojańskiego) (por. rozdz. 2.1.2.1.), lecz właściwości fizykochemiczne tego związku pozwalają przypuszczać, że skala jego oddziaływania jest znacznie szersza.

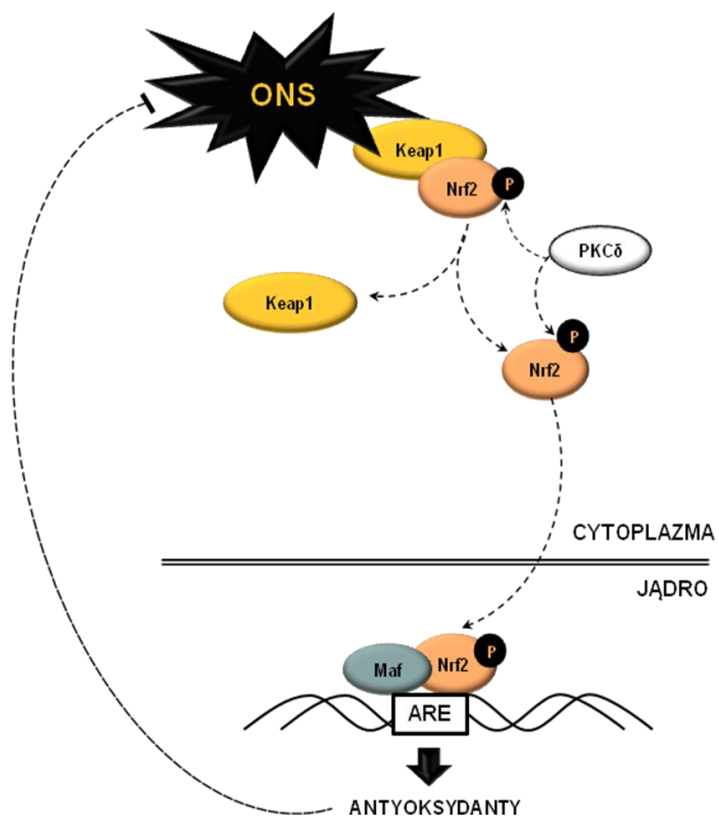


Ryc.2.5. Wzór strukturalny histydyny

Trzeciorzędowy atom azotu w pierścieniu imidazolowym His z łatwością tworzy wiązania koordynacyjne z kationami metali, m.in. miedzi (Cu^{2+}), żelaza (Fe^{2+}) oraz cynku (Zn^{2+}), co sprawia, że obecność His odgrywa kluczową rolę w metaloproteinach, takich jak hemoglobina, anhidraza węglanowa oraz SOD, a także w regulujących transkrypcję białkach, np. białkach zawierających palec cynkowy (ang. *zinc finger protein*, ZPR). Ponadto przypisuje się His rolę zmiatacza wolnych rodników – poprzez wiązanie Fe^{2+} His obniża produkcję $\cdot\text{OH}$, powstającego w zależnej od Fe^{2+} reakcji Fentona (Nagy i Floyd, 1984; Erickson i Hultin, 1988), a pierścień imidazolowy wiąże bezpośrednio inną reaktywną cząstkę, $\text{O}_2\cdot$ (Matheson i Lee, 1979). Właściwości te posiada zarówno His niezwiązana jak i stanowiąca element większych cząstek, takich jak karnozyna (β -alanylo-L-histydyna) czy anseryna (β -alanylo-N-metylo-L-histydyna) (Kohen i wsp., 1988). Choć znane są stosunkowo liczne przykłady antyoksydacyjnego działania His w różnych układach (por. art. przeglądowy Wade i Tucker, 1998), to w warunkach ONS indukowanego amoniakiem w OUN nie były jak dotąd rozpatrywane.

2.2.4. Czynniki transkrypcyjne a ekspresja genów indukowana przez ONS

Jedną z konsekwencji występowania w komórkach ONS jest modulowanie aktywności licznych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów. Wśród nich białka rejonu podstawowego zamka leucynowego (ang. *basic leucine zipper protein*, bZIP) – Nrf (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor*) odgrywają kluczową rolę w aktywowaniu systemów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych komórki. Najważniejszym przedstawicielem tej grupy jest białko Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). W stanie nieaktywnym tworzy ono kompleks z białkiem hamującym Keap1 (ang. *kelch-like erythroid-cell-derived protein with cap'n'collar homology-associated protein 1*), co warunkuje indukowaną przez zawierającą kulinę ligazę E3 ubikwityny (ang. *cullin-3-containing ubiquitin-ligase E3*) ubikwitynację i degradację w proteasomie 26S (czas półtrwania ok. 15 min) (Kobayashi i wsp., 2006; Villeneuve i wsp., 2010). Atak utleniacza lub elektrofila może zaburzać konformację Keap1, co prowadzi do uwolnienia Nrf2 z kompleksu Nrf2-Keap1. Wolne białko ulega fosforylacji, głównie za sprawą kinazy białkowej C δ (ang. *protein kinase C δ* , PKC δ) (Niture i wsp., 2009), a dalej translokacji do jądra. W jądrze komórkowym następuje przyłączenie czynników kotranskrypcyjnych, takich jak małe białka Maf (ang. *musculoaponeurotic fibrosarcoma*) (Igarashi i wsp., 1994; Katsuoka i wsp., 2005), niezbędne przy wiązaniu Nrf2 z sekwencją ARE (ang. *antioxidant response element*; mniej popularna, choć bardziej adekwatna nazwa tej sekwencji to ang. *electrophile responsive element*, EpRE), które prowadzi do wzmocnienia ekspresji (por. art. przeglądowe: Nguyen i wsp., 2003; Nguyen i wsp., 2009; Tkachev i wsp., 2011). ARE jest sekwencją charakterystyczną dla rejonu promotorowego licznych genów kodujących białka biorące udział w cytoprotekcji. Są to m.in. białka syntezy i metabolizmu GSH: GCL, γ GT, GST, GPx, oraz inne antyoksydanty: SOD, HO-1, Trx czy TrxR (Hayes i wsp., 2009; Kobayashi i Yamamoto, 2006; Baird i Dinkova-Kostova, 2011). Mechanizm aktywacji szlaku Keap1/Nrf2/ARE przedstawia Ryc.2.6.



Ryc.2.6. Schemat aktywacji szlaku Keap1/Nrf2/ARE (Tkachev i wsp., 2011). ONS: stres oksydacyjno–nitracyjny, Nrf2: czynnik transkrypcyjny Nrf2, Keap1: białko hamujące Nrf2, PKCδ: kinaza białkowa Cδ, Maf: białko regulatorowe Maf, ARE: sekwencja wiążąca Nrf2

3. Cele pracy

Celem pracy było zbadanie odpowiedzi antyoksydacyjnej układu glutationowego (GSH) w warunkach *in vivo*, w zwierzęcych modelach neurotoksyczności amoniaku. Zbadano zmiany poziomu GSH w przestrzeni międzykomórkowej oraz w mitochondriach, które stanowią główny rezerwuuar cząstek czynnych w procesie cytoprotekcji. Sprawdzono ponadto hipotezę zakładającą, że protekcyjne działanie histydyny (His) w encefalopatii wątrobowej może realizować się nie tylko poprzez znany efekt hamowania dostępności Gln do mitochondriów, ale także poprzez modulowanie odpowiedzi antyoksydacyjnej. Zbadano czy His wpływa na zdolność antyoksydacyjną wyrażoną we wzajemnej relacji zmian w układzie GSH i tioredoksynowym.

Postawiono następujące szczegółowe pytania:

1. Czy wzrost poziomu całkowitego GSH w przestrzeni międzykomórkowej mózgu, stwierdzony w wyniku bezpośredniego, domózgowego podawania jonów amonowych, występuje również w zwierzęcych modelach hiperamonemii i encefalopatii wątrobowej?
2. Czy w wyżej wspomnianych modelach występuje zjawisko obniżenia poziomu GSH mitochondrialnego, charakterystyczne dla innych schorzeń związanych ze stresem oksydacyjnym, a jeżeli tak, to jakie mogą być tego przyczyny?
3. Czy His wpływa na poziom GSH w mózgu i jaki jest ewentualny mechanizm leżący u podłoża jej działania?
4. Czy w badanych warunkach istnieje sprzężenie pomiędzy układami GSH i tioredoksynowym?

4. Metody

4.1. Zwierzęce modele toksyczności amoniaku

Eksperymenty na zwierzętach przeprowadzono na podstawie zezwolenia IV Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, bezwzględnie przestrzegając wytycznych Krajowej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Osoby biorące udział w doświadczeniach posiadały adekwatne zezwolenia.

Prostą HA uzyskiwano podając dootrzewnowo samcom szczurów szczepu Sprague–Dawley (masa 230-280 g) roztwór octanu amonu (OA) (Sigma–Aldrich) w dawce 600 mg/ kg masy ciała (m.c.), trzykrotnie, w 24 godzinnych odstępach. Na 30 min przed OA podawano 1 ml 5% roztworu glukozy (Hilgier i Olson, 1994).

Ostre uszkodzenie wątroby prowadzące do EW uzyskiwano u samców szczurów szczepu Sprague–Dawley (masa 230-280 g) stosując trzykrotne, dootrzewnowe podawanie hepatotoksyny – tioacetamidu (TAA) (Sigma–Aldrich) w 24 godzinnych odstępach. Stosowano dwie dawki, 250 lub 300 mg/ kg m.c., co wynikało ze zmian w warunkach hodowli zwierząt i związanej z tym zmiany wrażliwości na TAA. Obie dawki są stosowane w celu wywoływania EW (Albrecht i wsp., 1990; Hilgier i wsp., 1983; Hilgier i Olson, 1994; Rama Rao i wsp., 2010).

Histydynę podawano zwierzętom dootrzewnowo w dawce 100 mg/kg m.c., na 2 godziny przed każdorazowym podaniem TAA (Rama Rao i wsp., 2010).

Szczury kontrolne otrzymywały sól fizjologiczną z częstotliwością i w objętości odpowiadającej poszczególnym grupom eksperymentalnym. 24 godziny po ostatniej iniekcji zwierzęta poddawano dalszym procedurom eksperymentalnym.

4.2. Mikrodializa mózgu

Mikrodializę *in vivo* przeprowadzono w celu oznaczenia poziomu metabolitów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej kory przedczołowej mózgu

szczura. Metoda mikrodiализy opiera się na swobodnej dyfuzji pomiędzy przestrzenią zewnętrzną a wewnętrzną membrany w sondzie mikrodiализacyjnej.

Warunki doświadczenia były zbliżone do opisanych we wcześniejszych pracach Zakładu Neurotoksykologii (Hilgier i wsp., 1999; Hilgier i wsp., 2003; Hilgier i wsp., 2009). Przebieg eksperymentu wyglądał jak następuje: zwierzę poddawano wstępnemu znieczuleniu ogólnemu, umieszczając w komorze do znieczulenia, do której przez ok. 1 min z prędkością 1,2 l/min doprowadzano w powietrzu anestetyk – 4 % narcotan (Leciva) za pomocą parownika Vapor (Dräger). Tak uśpione umieszczano w aparacie stereotaktycznym (TSE Systems), zakładano maskę doprowadzającą anestetyk, po czym zredukowano znieczulenie do 1%, na którym to poziomie pozostawało do końca eksperymentu. Temperaturę ciała utrzymywano na stałym poziomie 37,5 °C przy użyciu termostatu TempControl II (TSE Systems). Wykonywano niewielkie nacięcie skóry umożliwiające odsłonięcie czaszki, po czym za pomocą wiertła trepanacyjnego nawiercano otwór, a następnie implantowano do kory przedczołowej sondę wg koordynatów względem bregmy (AP + 0,6 mm; ML – 3,0 mm; DV +4,0 mm), ustalonych na podstawie atlasu stereotaktycznego (Paxinos i Watson, 2006). Przez sondę mikrodiализacyjną CMA/12 (CMA Microdialysis AB) (wykonaną z poliaryloeterosulfonu o przepuszczalności 20 kDa, średnicy 0,5 mm i długości membrany 3,0 mm) za pomocą pompy CMA/102 (CMA Microdialysis AB) wraz z odpowiednim wyposażeniem, jak strzykawki Exmire Microsyringe 1 ml (ITO Corporation), przełącznik (CMA Microdialysis AB) i mikrowężyki 1,2 µl/100 mm (CMA Microdialysis AB) podawano z prędkością przepływu 2,5 µl/min sztuczny płyn mózgowo–rdzeniowy (ang. *artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) o składzie: 10 mM glukoza (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A, POCh), 126 mM NaCl (POCh), 27 mM NaHCO₃ (POCh), 2,4 mM KCl (POCh), 0,5 mM Na₂SO₄ (POCh), 0,5 mM KH₂PO₄ (POCh), 1,1 mM CaCl₂ (POCh), 8 mM MgCl₂ (POCh). Płyn ten przygotowywano na świeżo, tuż przed podaniem nasycając karbogenem (5% CO₂, 95% O₂) w celu uzyskania pH 7,4, filtrując za pomocą membrany Millex GP 0,22 µm (Millipore) a następnie, w części eksperymentów wzbogacając acywicyną (ACV) (końcowe stężenie 1 mM) (Sigma–Aldrich). Po 30 min od zaimplantowania sondy rozpoczynano zbieranie próbek, każde trwające 40 min. Podczas pojedynczego doświadczenia trwającego 4 godziny uzyskiwano 6 frakcji po 100µl mikrodiализatów, które następnie przechowywano w –20°C do czasu

wykonania analizy. Po zakończeniu zbierania próbek uśpione zwierzę poddawano dekapitacji i przekazywano do utylizacji (Eco ABC).

4.3. Izolacja struktur mózgu

Większość analiz wykonanych zostało na świeżo wyizolowanym mózgu szczura. W tym celu przeprowadzano dekapitację zwierzęcia, a następnie izolację mózgu, który przepłukano w zimnym buforze fosforanowym (ang. *phosphate buffered saline*, PBS) (Sigma–Aldrich), po czym oczyszczano z widocznych gołym okiem naczyń krwionośnych. Z tak przygotowanego mózgu izolowano i ważono na wadze analitycznej AG245 (Mettler Toledo) odpowiednie struktury, po czym przystępowano do homogenizacji wg poszczególnych protokołów.

4.4. Izolacja mitochondriów

Izolację frakcji mitochondrialnej przeprowadzono wg nieznacznie zmodyfikowanej metody A zaproponowanej przez Sims i Anderson (2008). Metoda ta opiera się na poprzedzonej wirowaniem frakcjonującym izolacji mitochondriów poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Percollu®, w trakcie którego organelle sedimentują do warstwy odpowiadającej ich własnej gęstości.

Wszystkie czynności wykonywane były na lodzie, a odczynniki i narzędzia schłodzone. Świeżo wyizolowaną korę przedczołową (z 2 szczurów, ok. 190 mg) oraz prążkowie (z 2 szczurów, ok. 200 mg) homogenizowano w ręcznym homogenizatorze typu szkło–szkło w 2 ml buforu B: 0,32 M sacharoza (POCH), 1 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), 10 mM Tris–HCl (Sigma–Aldrich) pH 7,4. Z tak uzyskanego homogenatu pobierano 200µl które zamrażano w –80°C do czasu dalszej analizy, natomiast resztę wirowano (1500 x g, 5 min, 4°C) w wirówce MPW-351R (MPW Medical Instruments). Zbierano supernatant, natomiast osad zawieszano w 1 ml buforu B, homogenizowano i ponownie wirowano (1500 x g, 5 min, 4°C). Następnie łączono oba supernatanty i wirowano (21000 x g, 15 min, 4°C). Otrzymany osad zawieszano w 2 ml 15% roztworu Percollu (Sigma–Aldrich) w buforze B, a następnie delikatnie nakładano na uprzednio przygotowany gradient gęstości, który stanowiła warstwa 40% pod 23% Percollem w buforze B (po 3,5 ml każdy). Tak przygotowane próbki wirowano w wirówce wysokoobrotowej

Optima LE70 (Beckmann) (30000 x g, 20 min, 4°C). W rezultacie między dolnymi warstwami uzyskiwano frakcję mitochondrialną w postaci opalizującej obrączki, którą delikatnie zbierano do czystej próbówki, po czym uzupełniano buforem B i wirowano (15000 x g, 15 min, 4°C). Otrzymany osad ponownie przemywano poprzez dodanie buforu B do pełnej objętości próbówki i odwirowanie (15000 x g, 15 min, 4°C). Tak otrzymany, lekko brunatny osad stanowiący pożądaną frakcję mitochondrialną zawieszano w 150 µl buforu B i zamrażano w -80°C do czasu dalszej analizy. Zawartość otrzymanego osadu sprawdzono w mikroskopie elektronowym transmisyjnym JEM 1011 (JEOL) dzięki uprzejmości Pani dr hab. Małgorzaty Frontczak-Baniewicz, Kierownika Środowiskowego Laboratorium Mikroskopii Elektronowej.

4.5. Oznaczanie poziomu GSH z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

W celu oznaczenia poziomu GSH w próbkach o niskich stężeniach posługiwano się techniką wysokosprawnej (wysokociśnieniowej) chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) w odwróconym układzie faz. Jest to uniwersalna metoda analizy polegająca na unieruchomieniu cząstek analizowanej próbki w porowatym, niepolarnym wypełnieniu kolumny (faza stacjonarna), a następnie wymyciu pod wysokim ciśnieniem za pomocą polarnej fazy ruchomej. Związki mniej polarne są na dłużej zatrzymywane w fazie stałej, przez co ich czas elucji i detekcji jest dłuższy niż cząstek bardziej polarnych. GSH oznaczano na podstawie metody uprzednio opisanej przez Neuschwander-Tetri i Roll (1989).

Przed oznaczeniem mikrodializaty rozcieńczano, natomiast homogenaty tkankowe oraz frakcja mitochondrialna wymagały odbiałczania. Do 100µl próbki dodawano 50 µl 0,6 M HClO₄ (POCh), wirowano (1000 x g, 10 min, 4°C) i osad zawieszano w 0,5 ml 1 M NaOH (POCh), w celu późniejszego oznaczenia w nim poziomu białka (por. roz. 4.11.1). Nadsącz zobojętniano dodając 1 M KOH (POCh), po odwirowaniu (1000 x g, 10 min, 4°C) supernatant był gotowy do oznaczenia.

Bezpośrednio przed oznaczeniem próbki poddawano działaniu silnego czynnika redukującego, ditiotreitolu (DTT) (Sigma-Aldrich), który wszystkie

utlenione formy glutationu redukuje do GSH, co umożliwia oznaczenie całkowitej puli glutationu (GSx). Do 80 µl próbki dodawano 20 µl 20 mM DTT, po czym mieszaninę inkubowano 30 min w 4°C. Następnie próbki umieszczano w autosamplerze Gina 50 (Dionex) w celu upochodnienia. Polegało ono na dodaniu do 100µl próbki 50 µl 20 mM aldehydu o-ftalowego (ang. *o-phthalaldehyde*, OPA) (Merck) w buforze alkilującym: 0,36 M H₃BO₃ (POCh) pH 10,0, 10% CH₃OH (Rathburn Chemicals), 1% β-merkaptotetanol (Carl Roth KG), a następnie inkubacji przez 1 min. OPA tworzy z pierwszorzędowymi grupami aminowymi fluorescencyjną pochodną, rejestrowaną przez detektor UV-VIS RF 2000 (Dionex) przy długości fali wzbudzenia 370 nm i emisji 450 nm. Rozdział prowadzono z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej Hypersil Gold (Thermo Scientific). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina CH₃OH (Rathburn Chemicals) i buforu KH₂PO₄/K₂HPO₄ (POCh) o pH 6,2, podawana z prędkością 1,2 ml/min przez pompę P580 (Dionex) w następującym układzie: 4 min izokratycznie 15% CH₃OH / 85% buforu, następnie, w celu przepłukania kolumny przed kolejną próbką: 1 min wzrost gradientu do 70% CH₃OH / 30% buforu, 1 min izokratycznie 70% CH₃OH / 30% buforu, 1 min spadek gradientu do 15% CH₃OH / 85% buforu, 3 min izokratycznie 15% CH₃OH / 85% buforu. W takim układzie detekcja GSH przypadła na ok. 3 min rozdziału. Stężenie w próbkach określano na podstawie krzywej standardowej GSH (Sigma–Aldrich), przygotowywanej w zakresie 0,015–1 µM w medium odpowiadającym badanej próbce.

4.6. Oznaczanie poziomu GSH metodą enzymatyczną

W celu oznaczenia stosunku GSH/GSSG, poprzez oznaczenie poszczególnych form glutationu, wykorzystano metodę enzymatyczną (Baker i wsp., 1990). Opiera się ona na redukcji odczynnika Ellman'a, kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB) do kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB) przez grupy -SH w obecności NADPH i GR, które zapewniają regenerację GSH, a przez to swoistość metody dla oznaczanego reduktora. Konsekwencją danych warunków jest wzrost poziomu TNB powodujący wzrost absorbancji, na podstawie którego, porównując ze wzrostem absorbancji dla krzywej standardowej GSH, można wyznaczyć wyjściową ilość GSx (dodatek GR redukuje obecne w próbce formy utlenione).

Ok. 50 mg tkanki homogenizowano w 0,5 ml zimnego buforu: 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (POCh) o pH 7,5, 1 mM kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (BDH Chemicals Ltd.). Do

homogenatu dodawano 0,5 ml 1% kwasu sulfosalicylowego (ang. *sulfosalicylic acid*, SSA) (Sigma–Aldrich), odbiałczany preparat następnie wirowano (2000 x g, 3 min, 4°C). Osad zawieszano w 0,5 ml 1 M NaOH (POCh) w celu oznaczenia białka (por. roz. 4.11.1.), nadsącz wykorzystywano do analizy poziomu GSH.

Do 10 µl próbki (w trzech powtórzeniach) dodawano 190 µl mieszaniny reakcyjnej: 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (POCh) o pH 7,5, 0,5 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd.), 0,15 mM DTNB (Sigma–Aldrich), 0,2 mM NADPH (Sigma–Aldrich) oraz 1 u GR (Sigma–Aldrich). Przez 10 min w 0,5 min odstępach mierzono przyrost absorbancji przy długości fali 415 nm w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad). Dokonywano dwóch oznaczeń każdej próbki: GSx wykorzystując jako standard GSH (Sigma–Aldrich), przygotowywany w zakresie stężeń 15–500 µM w 1% SSA (Sigma–Aldrich), oraz GSSG, wykorzystując jako standard GSSG (Sigma–Aldrich), przygotowywany w zakresie stężeń 1,5–50 µM w 1% SSA (Sigma–Aldrich). Przed oznaczaniem poziomu GSSG przez godzinę inkubowano w temperaturze pokojowej (ang. *room temperature*, RT) 125 µl próbki z 5 µl 2-winylopirydyny (Sigma–Aldrich), która blokuje grupy tiolowe w GSH, nie dopuszczając do ich utlenienia (Griffith, 1980), co gwarantuje, że w reakcji weźmie udział jedynie wyjściowa pula GSSG. Na podstawie krzywej standardowej wyznaczano wyjściową wartość GSx oraz GSSG w próbce. Wyniki przeliczano na zawartość białka w danej próbce. Poziom GSH dla każdej próbki wyliczano odejmując uzyskaną wartość GSSG od odpowiadającej wartości GSx.

4.7. Określanie stopnia glutationylacji białek

Metoda oznaczenia stopnia glutationylacji białek, zaproponowana przez Paroni i wsp. (1995), polega na poddaniu frakcji białkowej działaniu silnego czynnika redukującego reszty tiolowe – DTT, w celu eliminacji wiązań białko-GSH, a następnie oznaczeniu uwolnionego GSH.

Do 100 µl próbki (homogenat tkankowy lub zawiesina mitochondriów) dodawano 50 µl 0,6 M HClO₄ (POCh) i wirowano (14000 x g, 5 min, 4°C). Zebrany supernatant przeznaczano do oznaczeń wolnego, całkowitego GSH (GSx) (por. roz. 4.5.), natomiast osad zawieszano w 100 µl 0,1 M 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol (Tris)–HCl (Sigma–Aldrich) o pH 7,5, dodawano 100 µl 25 mM DTT (Sigma–Aldrich), po czym inkubowano 15 min w 4°C. Następnie dodawano 0,6 M HClO₄ (POCh) i wirowano (14000 x g, 5

min, 4°C). Supernatant posłużył do oznaczeń uwolnionego z białek GSH (PGSx) (por. roz. 4.5.), natomiast osad zawieszano w 0,5 ml 1M NaOH w celu oznaczenia zawartości białka (por. roz. 4.11.1.). Wynik przedstawiano jako liczbę moli GSH na mg białka [nmol/mg białka].

4.8. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Aktywność (A) badanych enzymów obliczano na podstawie prawa Lamberta–Beera wg poniższego wzoru:

$$A = \frac{\Delta Abs / \text{min} \cdot Vc}{\varepsilon \cdot L \cdot Vp} \left[\frac{(\text{min}^{-1}) \cdot (\text{ml})}{(\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot (\text{ml}) \cdot (\text{cm})} = \frac{\text{mM}}{\text{min}} = \frac{\text{mmol}/1000\text{ml}}{\text{min}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

$\Delta Abs/\text{min}$ (min^{-1}) – zmiana absorbancji badanej próbki w czasie

Vc (ml) – objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej

Vp (ml) – objętość próbki

ε ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) – współczynnik absorbancji danego fluorochromu dla danej długości fali i drogi optycznej równej 1 cm

L (cm) – długość drogi optycznej w danych warunkach; długość słupa cieczy wyznaczono ze wzoru na objętość walca (Vc) o promieniu 0,35 cm (jest to promień dołka w płytce 96-dółkowej)

$$L = \frac{Vc}{3,14 \cdot 0,35^2} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} = \text{cm} \right]$$

4.8.1. Γ - glutamyl transferaza

Aktywności enzymu γ GT oznaczano za pomocą gotowego odczynnika Gamma-glutamyl-transferaza (Pointe Scientific). Metoda z wykorzystaniem tego odczynnika opiera się na zdolności badanego enzymu do katalizowania reakcji przeniesienia grupy glutamylowej z L- γ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilidu na glicyloglicynę, w wyniku czego powstaje 5-amino-2-nitrobenzoesan, co jest skorelowane ze wzrostem absorbancji.

Ok. 100 mg kory mózgu szczura homogenizowano w 1 ml PBS (Sigma–Aldrich) z dodatkiem 0,1% Triton X100 (Serva), homogenat wirowano (1500 x g, 5 min, 4°C) (Zhang i wsp., 2005), po czym uzyskany supernatant służył do oznaczenia aktywności enzymu oraz ilości białka (por. roz. 4.11.2.).

Do 50 μl (ok. 400 μg białka) próbki w trzech powtórzeniach dodawano 200 μl odczynnika o temperaturze 37°C, po 30 sekundach inkubacji wykonywano pomiar absorbancji w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad) przy długości fali 415 nm, przez 10 min w 0,5 min odstępach. Wynik wyrażano jako liczbę moli powstałego fluorochromu (dla którego współczynnik absorbancji wynosi 9,5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) w czasie 1 min w 1 mg białka [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}$ białka)].

4.8.2. Ligaza glutaminianowo-cysteinowa

Metoda opisana przez White i wsp. (2003) opiera się na zdolności GCL do katalizowania syntezy γ -glutamylcysteiny (γGC), która łącząc się z 2,3-naftalenodikarboaldehydem (ang. *2,3-naphthalenedicarboxaldehyde*, NDA) daje fluorescencyjną pochodną, mierzoną wobec negatywnej kontroli, jaką jest reakcja prowadzona w obecności inhibitora GCL, BSO. Wykorzystując fakt, że pochodne NDA- γGC oraz NDA-GSH mają niemal nierozróżnialną intensywność fluorescencji, w krzywej standardowej zamiast drogiego wzorca γGC użyto GSH.

Ok. 150 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,8 ml buforu B: 20 mM Tris (Sigma–Aldrich), 1m M EDTA (BDH Chemicals Ltd), 250 mM sacharoza (POCh), 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (POCh), 2 mM Ser (Sigma–Aldrich); wirowano (10000 x g , 10min, 4°C), po czym supernatant ponownie wirowano (15000 x g, 20 min, 4°C) i tak uzyskany nadsącz wykorzystywano do dalszych procedur analizy aktywności enzymu oraz poziomu białka (por. roz. 4.11.2.).

Do 50 μl próbki (ok. 350 μg białka) dodawano 50 μl mieszaniny reakcyjnej MR: 400 mM Tris (Sigma–Aldrich), 2 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (POCh), 2 mM Ser (Sigma–Aldrich), 20 mM Glu (Sigma–Aldrich), 40 mM MgCl_2 (POCh), 40 mM ATP (Sigma–Aldrich), w dwóch wariantach, +/- 10 mM BSO (Sigma–Aldrich); inkubowano 5 min w 37°C, po czym inicjowano reakcję syntezy dodając 50 μl 2mM Cys (Sigma–Aldrich) w buforze B, dokładnie mieszano i inkubowano 30 min w RT. Reakcję przerywano dodając 50 μl 200 mM SSA (Sigma–Aldrich) w buforze B i pozostawiając na 20 min na lodzie, po czym odwirowywano (1500 x g, 5 min, 4°C). Do tak uzyskanego nadsączu (20 μl , w trzech powtórzeniach) dodawano 180 μl roztworu NDA: 40 mM Tris (Sigma–Aldrich) pH 10, 50 mM NaOH (POCh), 1 mM NDA (Sigma–Aldrich) w dimetylosulfotlenku (ang.

dimethyl sulfate, DMSO) (Sigma–Aldrich); inkubowano 30 min w RT chroniąc przed światłem. Poziom fluorescencji mierzono w spektrofotometrze płytkowym Fluostar Omega (BMG Labtech) przy długości fali wzbudzenia 472 nm i emisji 528 nm. Różnica fluorescencji między próbkami +/-BSO wskazuje na poziom nowopowstałego γ GC, który to porównywano do wartości dla krzywej wzorcowej GSH (Sigma–Aldrich), przygotowanej w buforze B w zakresie stężeń 0–100 μ M i traktowanej w ten sam sposób, co analizowane próbki (MR bez BSO, Cys dodana tuż przed SSA). Uwzględniając czas inkubacji oraz zawartość białka w danej próbce wyznaczono aktywność GCL jako ilość moli γ GC powstałej czasie 1 min w przeliczeniu na 1 mg białka [nmol/(min•mg)].

4.8.3. Reduktaza glutationowa

Aktywność GR wyznaczono z wykorzystaniem zestawu odczynników Glutathione Reductase Assay Kit (Abcam) wg protokołu producenta. Metoda opiera się na zdolności katalitycznej GR do redukcji GSSG do GSH, który to następnie reaguje z DTNB tworząc TNB, co skorelowane jest ze wzrostem absorbancji.

Ok. 100 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 1 ml zimnego buforu B, wirowano (10000 x g, 15 min, 4°C), po czym uzyskany supernatant przeznaczano do dalszej analizy aktywności enzymu i poziomu białka (por.roz. 4.11.2.).

Do 100 μ l próbki (ok. 400 μ g białka) dodawano 5 μ l 3% H_2O_2 , inkubowano 5 min w RT, po czym dodawano 5 μ l roztworu katalazy i dalej inkubowano 5 min w RT. Zabieg ten ma na celu utlenienie GSH. Próbkę rozpipetowywano po 10 μ l w trzech powtórzeniach, uzupełniono do 50 μ l buforem B, po czym dodawano 50 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej GSSG, NADPH oraz DTNB w buforze B i odczytywano absorbancję w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad) przy długości fali 415 nm w ciągu 10 min, co 0,5 min. Przyrost absorbancji dla próbek porównywano z wartościami dla wzorca TNB przygotowywanego w buforze B w zakresie stężeń 0–5 nM. Uwzględniając czas odczytu oraz stężenie białka w próbce, wyznaczano aktywność GR, jako liczbę moli powstałego TNB w czasie 1 min w 1 mg białka [nmol/(min•mg)].

4.8.4. Peroksydaza glutationowa

Metoda oznaczania aktywności GPx opisana przez Ursini i wsp. (1985) opiera się na zdolności katalitycznej tego enzymu do neutralizowania H_2O_2 z wykorzystaniem układu GSH i NADPH jako regeneratora. Zużycie NADPH w tej reakcji odpowiada spadkowi absorbancji.

Ok. 100 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,8 ml buforu: 50 mM Tris (Sigma–Aldrich) pH 7,5, 0,25 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), 0,5 mM DTT (Sigma–Aldrich), wirowano (10000 x g, 5 min, 4°C) i tak uzyskany supernatant przeznaczano do oznaczeń aktywności enzymatycznej i białka (por. roz. 4.11.2.).

Do 10 μ l próbki (ok. 40 μ g białka) w trzech powtórzeniach dodawano 180 μ l mieszaniny reakcyjnej: 100 mM Tris (Sigma–Aldrich) pH 7,6, 0,5 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), 1 mM DTT (Sigma–Aldrich), 1 mM GSH (Sigma–Aldrich), 0,2 mM NADPH (Sigma–Aldrich), 0,08 u GR (Sigma–Aldrich) oraz +/- 0,2 mM nadtlenku tertbutylu (donor H_2O_2), aby uwzględnić niespecyficzne zużycie NADPH. Dokonywano pomiaru absorbancji w spektrofotometrze płytkowym Fluostar Omega (BMG Labtech) przy długości fali 340 nm, przez 5 min, co 0,5 min. Aktywność enzymu wyznaczano na podstawie różnicy wartości zmiany absorbancji w czasie w próbkach +/- donor H_2O_2 oraz uwzględniając współczynnik absorbancji dla NADPH (6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$) i wyrażano w molach zużytego NADPH w czasie 1 min w 1 mg białka [nmol/(min•mg)].

4.8.5. Reduktaza tioredoksyny

Aktywność TrxR wyznaczano z wykorzystaniem zestawu odczynników Thioredoxin Reductase Assay Kit (Sigma–Aldrich) wg protokołu producenta. Metoda ta opiera się na zdolności TrxR do redukcji DTNB do TNB w obecności NADPH, co można monitorować dzięki zmianie absorbancji.

Ok. 200 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,8 ml buforu B: 100 mM PBS pH 7, 10 mM EDTA, wirowano (10000 x g, 5 min, 4°C), po czym supernatant używano do analizy aktywności oraz poziomu białka (por. roz. 4.11.2.).

Do 10 μ l próbki (ok. 100 μ g białka) w trzech powtórzeniach dodawano 190 μ l mieszaniny reakcyjnej: 100 mM PBS, 10 mM EDTA, 0,24 mM NADPH, 3 mM DTNB, +/- inhibitor TrxR, aby uwzględnić niespecyficzną redukcję DTNB. Dokonywano pomiaru absorbancji w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad) przy długości fali 415 nm w ciągu 2 min co 10 sek. Aktywność wyznaczano uwzględniając zmiany absorbancji w czasie dla próbek +/- inhibitor TrxR oraz współczynnik absorbancji dla TNB ($14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i wyrażono w molach powstałego TNB w czasie 1 min w 1 mg białka [$\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$].

4.8.6. Tioredoksyna

Aktywność Trx wyznaczono na podstawie metody opisanej przez Arner i Holmgren (1999), która opiera się na zdolności Trx do katalizowania redukcji mostków disiarczkowych w insulynie w obecności TrxR oraz NADPH, które zapewniają jej regenerację. Po zatrzymaniu reakcji zredukowane grupy tiolowe przekształcają DTNB do TNB, co przekłada się na zmianę absorbancji.

Ok. 100 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,8 ml buforu: 50 mM Tris-HCl (Sigma–Aldrich) pH 7,6, 5 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma–Aldrich), wirowano ($10000 \times g$, 5 min, 4°C), po czym uzyskany supernatant wykorzystywano do analizy aktywności enzymu oraz poziomu białka (por. roz. 4.11.2.).

Do 10 μ l próbki (ok. 40 μ l białka) w trzech powtórzeniach dodawano 40 μ l buforu: 100 mM kwasu 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy (HEPES) (Sigma–Aldrich) pH 7,6, 3 mM EDTA (BDH Chemicals Ltd), 0,9 mM NADPH (Sigma–Aldrich), 0,38 mM insulina (Sigma–Aldrich), +/- 125 nM TrxR (Sigma–Aldrich), po czym inkubowano 20 min w RT. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 250 μ l 1mM DTNB (Sigma–Aldrich) w 6 M chlorowodoru guanidyny (Sigma–Aldrich), a pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 415 nm w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad). Wynik wyznaczano na podstawie różnic absorbancji dla próbek +/- TrxR, uwzględniając czas inkubacji oraz współczynnik absorbancji dla TNB w chlorowodoru guanidyny ($13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), i wyrażano w molach powstałego TNB w czasie 1 min w 1 mg białka [$\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$].

4.9. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej

Całkowitą zdolność antyoksydacyjną (ang. *total antioxidant capacity*, TAC) oznaczano z wykorzystaniem zestawu Antioxidant Assay Kit (Sigma–Aldrich) postępując wg protokołu producenta. Analiza opiera się na właściwości endogennych przeciwutleniaczy do hamowania, indukowanego dodaniem H₂O₂, powstawania rodnika mioglobiny, utleniającego następnie związek ABTS (ang. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*) do rodnika ABTS⁺ o intensywnie zielonym zabarwieniu.

Ok. 100 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,5 ml buforu Assay Buffer, po czym wirowano (12000 x g, 15 min, 4°C), otrzymany supernatant wykorzystywano do analizy aktywności antyoksydacyjnej oraz poziomu białek (por. roz. 4.11.2.).

Do 10µl próbki (ok. 40 µg białka) w trzech powtórzeniach dodawano 20 µl roztworu mioglobiny oraz 150 µl roztworu ABTS, po czym inkubowano 5 min w RT. Po tym czasie dodawano 100 µl roztworu hamującego reakcję (Stop Solution) i wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali 415 nm w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad) wobec przygotowanej w taki sam sposób krzywej standardowej roztworu wzorcowego antyoksydantu (TroloksTM – pochodna witaminy E), w zakresie stężeń 0–420 µM. Wynik wyrażano jako liczbę moli przeciwutleniacza w próbce zawierającej 1 mg białka [nmol/mg białka].

4.10. Analiza poziomu białka metodą immunoenzymatyczną

Poziom białka regulatorowego oddziałującego z tioredoksyną (ang. *thioredoxin interacting protein*, Trxip) wyznaczo w wykorzystaniem zestawu odczynników Thioredoxin–interacting protein ELISA Kit (MyBioSource) wg protokołu producenta. Ogólna zasada działania testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. *enzyme–linked immunosorbent assay*) opiera się na wiązaniu pożądanego białka z przeciwciałem unieruchomionym w studziencie płytki 96-dołkowej, a następnie dodaniu rozpoznającego to białko przeciwciała znakowanego enzymem, który w obecności substratów katalizuje reakcję dającą barwny produkt.

Ok. 100 mg tkanki (kora mózgu szczura) homogenizowano w 0,5 ml PBS pH 7,4, po czym wirowano (400 x g, 20 min, 4°C) i otrzymany supernatant wykorzystywano do analizy ELISA oraz poziomu białka całkowitego (por. roz. 4.11.2.).

Mieszninę 40 µl próbki (ok. 100 µg białka), 10 µl roztworu przeciwciała anti-Trxip znakowanego biotyną oraz 50 µl roztworu związanej z peroksydazą chrzanową streptoawidyny (która wiąże biotynę) inkubowano przez godzinę w 37°C w opłaszczonej przeciwciałem płytce (próbki w dwóch powtórzeniach). Następnie mieszaninę wylewano, płytkę przepłukiwano, po czym dodawano 100 µl mieszaniny substratów do reakcji katalizowanej przez peroksydazę. Po 10 min inkubacji w 37°C reakcję przerywano poprzez dodanie roztworu kwasu (Stop Solution), po czym mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad). Stężenie oznaczanego białka wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej Trxip sporządzonej w zakresie 1–16 ng/ml, a uzyskaną wartość przeliczono na zawartość całkowitego białka w próbce [ng/mg białka].

4.11. Oznaczanie poziomu białka

4.11.1. Metoda Bradforda

Metoda ta opiera się na zmianie zabarwienia odczynnika na skutek tworzenia kompleksu z białkiem (Bradford, 1976).

Do 30 µl próbki (w trzech powtórzeniach) dodawano 270 µl odczynnika: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma–Aldrich), 4,75% C₂H₅OH (POCH), 8,5% H₃PO₄ (POCH). Krzywą wzorcową zawartości białka sporządzano z roztworu albuminy (Sigma–Aldrich) w 1 M NaOH w zakresie stężeń 0,05–0,5 mg/ml. Odczytu absorbancji przy długości fali 595 nm dokonywano w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad).

4.11.2. Metoda biuretowa

Metoda ta opiera się na redukcji przez białka jonów Cu²⁺ do Cu⁺ oraz zdolności Cu⁺ do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem biconchinowym (ang. *bicinchoninic acid*, BCA) (Smith i wsp., 1985).

Do 10 μ l próbki (w trzech powtórzeniach) dodawano 200 μ l odczynnika przygotowanego wg protokołu dołączonego do zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce). Krzywą wzorcową zawartości białka sporządzano z roztworu albuminy (Sigma–Aldrich) w roztworze odpowiadającym analizowanej próbce, w zakresie stężeń 0,05–2 mg/ml. Po 30 min inkubacji w 37°C dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 570 nm w spektrofotometrze płytkowym MR680 (BioRad).

4.12. Analiza poziomu mRNA

4.12.1. Izolacja RNA z mózgu

Izolację RNA przeprowadzano wg metody Chomczynski i Sacchi (1987). Tkanekę (ok. 50 mg) homogenizowano w ręcznym homogenizatorze typu teflon–szkło w 1 ml odczynnika TRI (ang. *total RNA isolation reagent*) (Ambion). Zawiesinę przenoszono do czystej próbówki, dodawano 0,2 ml chloroformu (Sigma–Aldrich), po czym mieszaninę energicznie wytrząsano przez ok. 15 sek, inkubowano przez 5 min w RT, a następnie wirowano (12000 x g, 15 min, 4°C). Do zebranej fazy wodnej, zawierającej RNA, dodawano 0,5 ml izopropanolu (Sigma–Aldrich), wytrząsano 15 sek, po czym mieszaninę inkubowano 10 min w RT i wirowano (12000 x g, 10 min, 4°C). Tak otrzymany osad zalewano 1 ml schłodzonego 75% etanolu (POCh) i wirowano (10000 x g, 15 min, 4°C). Alkohol usuwano, osad suszono w RT, po czym zalewano 30 μ l wody. Woda użyta na każdym etapie analizy mRNA była wolna od RNaz – roztwór 0,1% dietylopirowęgla (Sigma–Aldrich).

4.12.2. Pomiar stężenia i czystości RNA

Stężenie wyizolowanego RNA oznaczano na podstawie pomiaru gęstości optycznej (ang. *optical density*, OD) przy długości fali 260 nm, wg reguły iż $OD(260\text{ nm}) = 1$ dla próbki o stężeniu 40 μ g/ml RNA. Jeśli stosunek wartości $OD(260\text{ nm})/OD(280\text{ nm})$ był większy od 1,7, próbkę uważano za czystą i używano do dalszych procedur. Pomiarów dokonywano na spektrofotometrze NanoDropND100 (Thermo Scientific).

4.12.3. Trawienie DNazą

W celu usunięcia potencjalnych cząstek DNA, próbki poddawano działaniu DNazy I (Ambion), wg protokołu producenta. Do 8 μ l próbki (odpowiednio rozcieńczonej, zawierającej 1 μ g RNA) dodawano 0,1 μ l DNazy I (2U/ μ l) (Ambion) oraz 0,9 μ l 10x stężonego buforu do reakcji (Ambion), inkubowano 30 min w 37°C, następnie dodawano 1 μ l 50 mM EDTA i inkubowano kolejne 10 min w 75 °C w celu inaktywacji enzymu.

4.12.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję syntezy komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) na matrycy wyizolowanego RNA, czyli reakcję odwrotnej transkrypcji, przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) wg protokołu producenta. Mieszaninę reakcyjną o składzie: 2 μ l 10x RT Buffer, 0,8 μ l 25x dNTP Mix, 2 μ l 10x RT Random Primers, 1 μ l MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 4,2 μ l wody dodawano do 10 μ l RNA (1 μ g odpowiednio rozcieńczony), po czym inkubowano w termocyklerze (Biometra) w następujących po sobie warunkach: 10 min w 25°C, 120 min w 37°C, 5 min w 85°C.

4.12.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

W celu określenia zmiany w poziomie ekspresji badanych genów wykonywano analizę opartą na reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR). W tym celu wykorzystano uprzednio uzyskane cDNA, mieszninę TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) oraz znakowane fluorescencyjnie startery Gene Expression Assay (Applied Biosystems) wymienione poniżej. Na 10 μ l mieszaniny reakcyjnej przypadało: 1 μ l cDNA, 0,5 μ l Gene Expression Assay, 5 μ l TaqMan Universal Master Mix, 3,5 μ l wody. Stosowano następujące warunki reakcji: 10 min w 95°C (aktywacja polimerazy), następnie 40 cykli: 15 sek w 95°C (denaturacja), 1 min w 60°C (przyłączanie starterów). Reakcję wykonywano w aparacie ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Każdą próbkę amplifikowano w trzech powtórzeniach. Relatywną zmianę poziomu mRNA obliczano wg metody $\Delta\Delta C_T$ (Livak i Schmitgen, 2007) wobec kontroli endogennej – poziomu

mRNA β -aktyny. Oznaczano poziom ekspresji genów kodujących następujące białka: Mrp1 (Abcc1, Rn00574093_m1), OGC (Slc25a11, Rn0574440_m1), DIC (Slc25a10, Rn00591522_m1), Nrf2 (Nfe2L2, Rn00477784_m1), γ GT (Ggt1, Rn00587709_m1), Gclm (Gclm, Rn00568900_m1), GPx1 (Gpx1, Rn00577994_g1), Trx1(Txn1, Rn00587437_m1), Trx2 (Txn2, Rn00584162_g1), Trxip (Txnip, Rn01533891_g1), TrxR1(Txnrd1, Rn01503798_m1), TrxR2 (Txnrd2, Rn00574868_g1), β -aktyna (Actb, Rn00667869_m1). W nawiasach podano nazwę genu oraz nr referencyjny sondy Taq Man (Applied Biosystems).

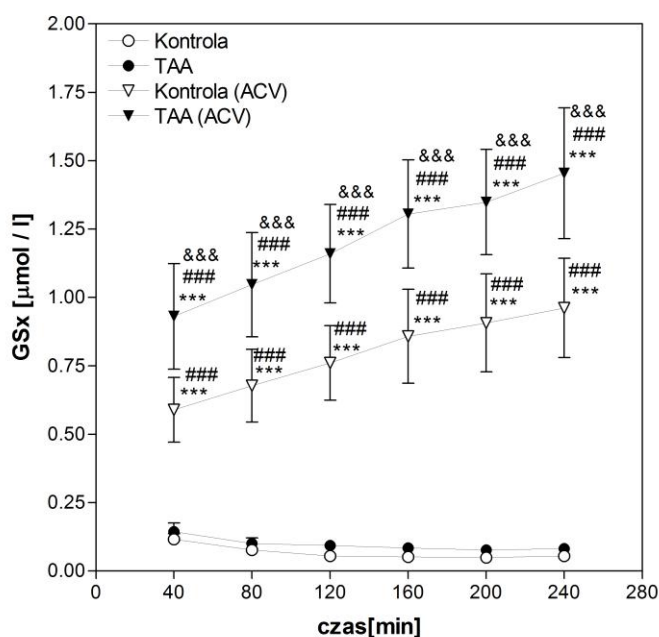
4.13. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki wyrażano jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Liczbę doświadczeń podano w legendach do rycin. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 3.0 stosując test t-Studenta w przypadku porównania dwóch grup eksperymentalnych oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukey'a w przypadku większej liczby grup eksperymentalnych, za graniczny poziom istotności przyjmując 0,05.

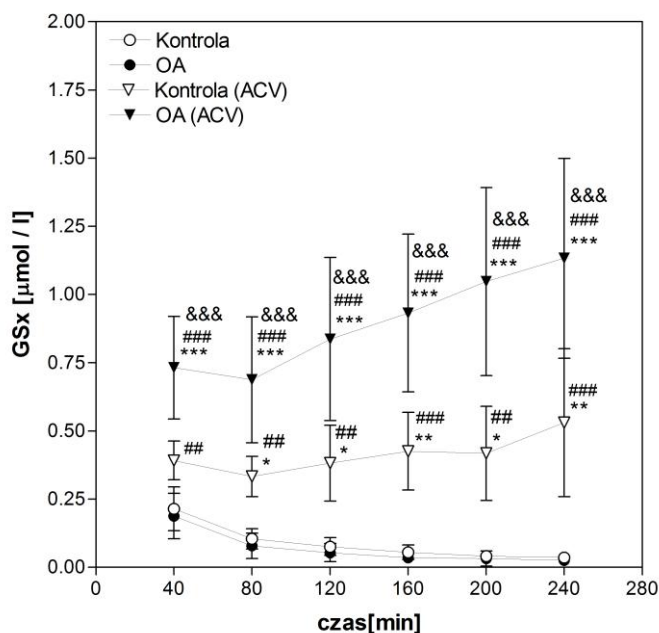
5. Wyniki

5.1. Poziom GSx pozakomórkowego w mózgu w stanach hiperamonemicznych

Zbadano poziom GSx w mikrodializatach mózgu odpowiadających przedziałowi pozakomórkowemu. Zastosowanie acywicyny (ACV), inhibitora enzymu rozkładającego zewnątrzkomórkowy GSH – γ GT, pozwoliło zaobserwować podwyższony poziom przeciwutleniacza zarówno w mikrodializatach pochodzących od szczurów z EW w modelu TAA (Ryc.5.1), jak i w warunkach HA prostej, po dootrzewnowym podaniu OA (Ryc.5.2). Fakt, iż wzrost ten obserwowany był jedynie w obecności ACV sugeruje, że wzmożone uwalnianie GSH kompensowane jest przez jego zwiększony rozkład z udziałem γ GT.



Ryc.5.1. Poziom całkowitego glutationu (GSx) w mikrodializatach kory przedczołowej mózgu szczura z encefalopatią wątrobową wywołaną dootrzewnowym podaniem tioacetamidu (TAA; 250 mg/kg m.c.) oraz pod wpływem inhibitora γ GT, acywicyny (ACV). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 10-11 niezależnych doświadczeń.***p<0,001 vs Kontrola, ###p<0,001 vs TAA, &&&p<0,001 vs Kontrola (ACV).



Ryc.5.2. Poziom całkowitego glutationu (GSx) w mikrodializatach kory przedczołowej mózgu szczura z hiperamonemią wywołaną dootrzewnowym podaniem octanu amonu (OA) oraz pod wpływem inhibitora γ GT, acywicyny (ACV). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 5-9 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ## $p < 0,01$ vs OA, ### $p < 0,001$ vs OA, && $p < 0,001$ vs Kontrola (ACV).

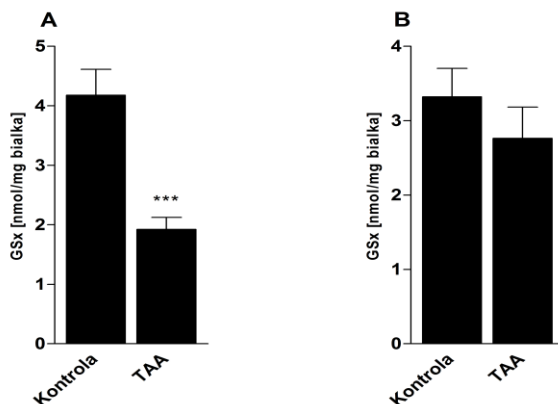
5.2. Poziom GSH mitochondrialnego oraz w całych strukturach mózgu w stanach hiperamonemicznych

W modelach prostej hiperamonemii oraz ostrej encefalopatii wątrobowej zbadano krytyczną dla potencjału neuroprotekcynnego komórki pulę glutationu mitochondrialnego (mGSH).

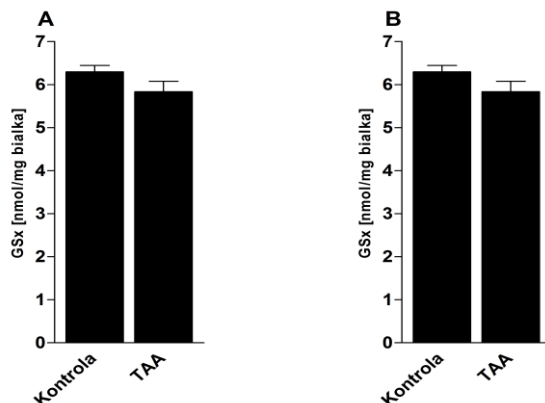
W modelu EW zaobserwowano spadek o ok. 54% poziomu całkowitego mGSH (mGSx) w korze przedczołowej mózgu szczura (Ryc.5.3A), przy jednoczesnym braku wyraźnych zmian w prążkowiu (Ryc.5.3B). Zmiany w korze objęły wybiórczo mGSx, bowiem GSx w całej tkance (homogenaty) w nie uległ znaczącej zmianie (Ryc.5.4A), podobnie jak w przypadku prążkowia (Ryc.5.4B). Zmiany w poziomie mGSH miały charakter odwracalny – po 21 dniach od wywołania EW poziom mGSx w korze przedczołowej powracał do

poziomu zbliżonego do warunków kontrolnych (Ryc.5.5A), przy względnie stabilnym poziomie w przypadku całej puli w obu strukturach (Ryc.5.5C,D).

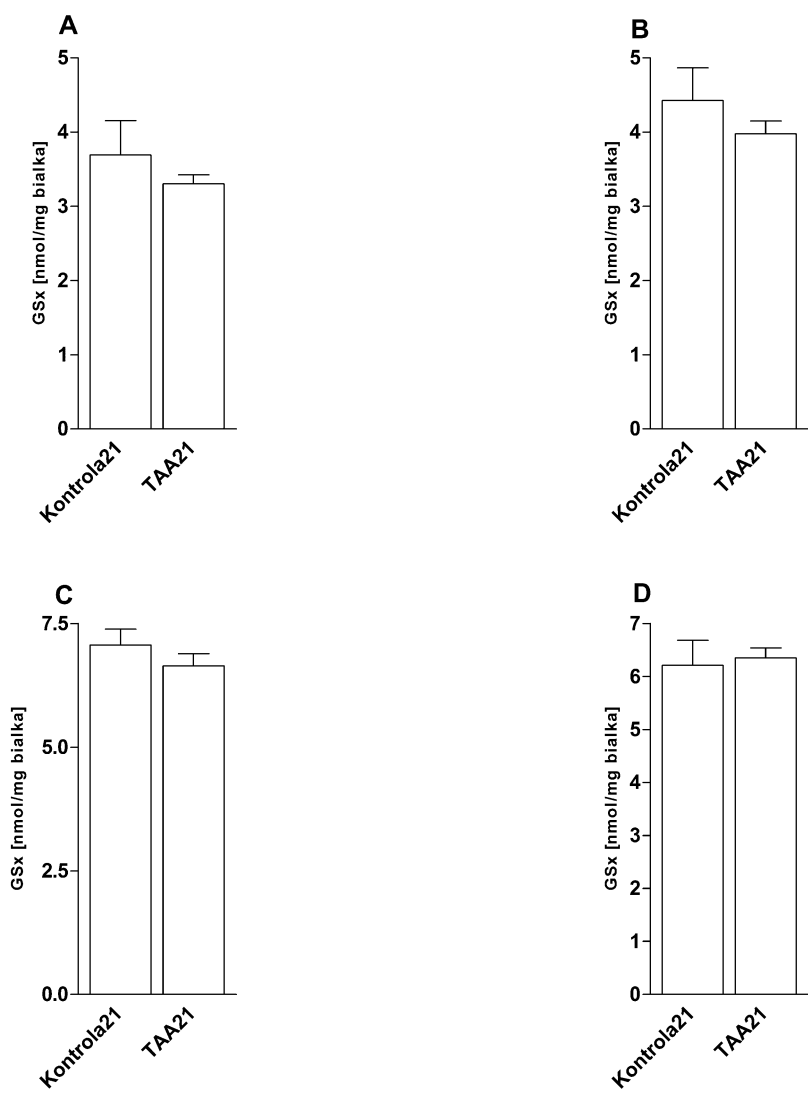
W modelu HA nie zaobserwowano zmian w poziomie GSx zarówno w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej czy prążkowie (Ryc.5.6A,B), jak i w homogenatach obu struktur (Ryc.5.6C,D). Brak zmian w modelu HA sprawił, że kolejne badania ograniczono do kory mózgu szczura w modelu EW.



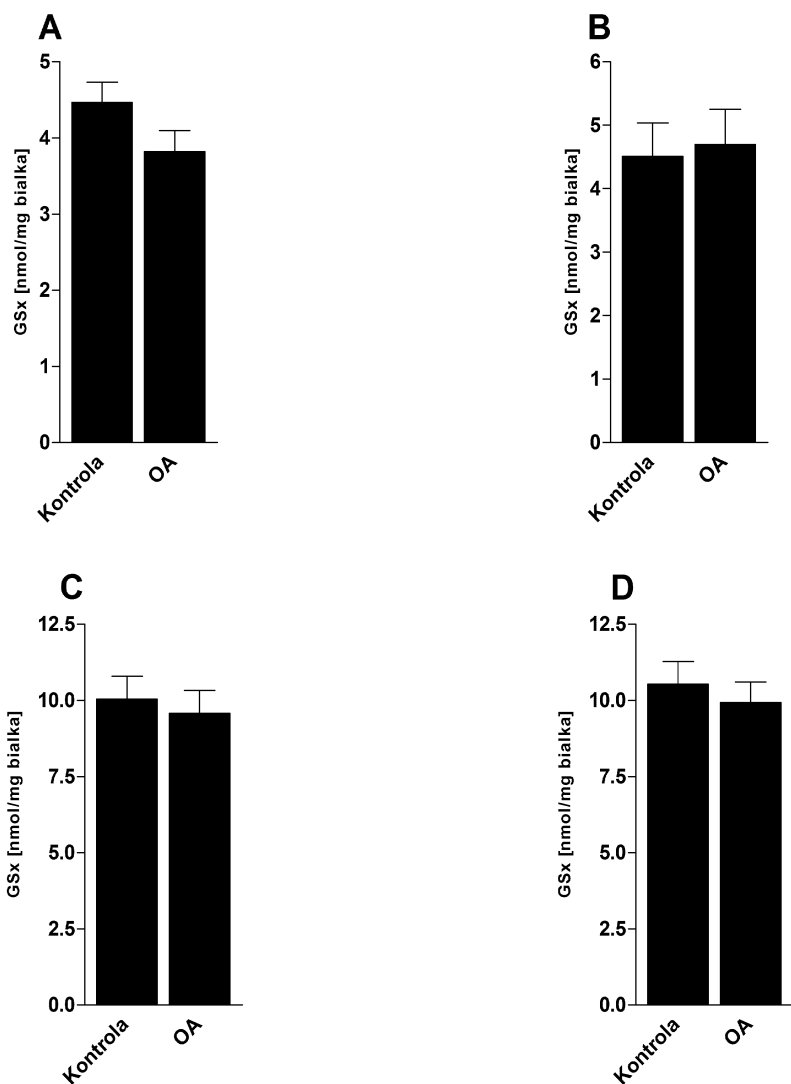
Ryc.5.3. Poziom glutationu całkowitego (GSx) w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej (A) i prążkowie (B) mózgu szczurów kontrolnych (Kontrola) oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 5-6 niezależnych doświadczeń. *** $p < 0,001$ vs Kontrola.



Ryc.5.4. Poziom glutationu całkowitego (GSx) w homogenatach kory przedczołowej (A) i prążkowie (B) mózgu szczurów kontrolnych (Kontrola) oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 5-7 niezależnych doświadczeń.



Ryc.5.5. Poziom glutationu całkowitego (GSx) w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej (A) i prążkowie (B) oraz w homogenatach kory przedczołowej (C) i prążkowie (D) mózgu szczurów kontrolnych (Kontrola21) oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA21; 250 mg/kg m.c.) 21 dni po podaniu hepatotoksyny. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 5-7 niezależnych doświadczeń.



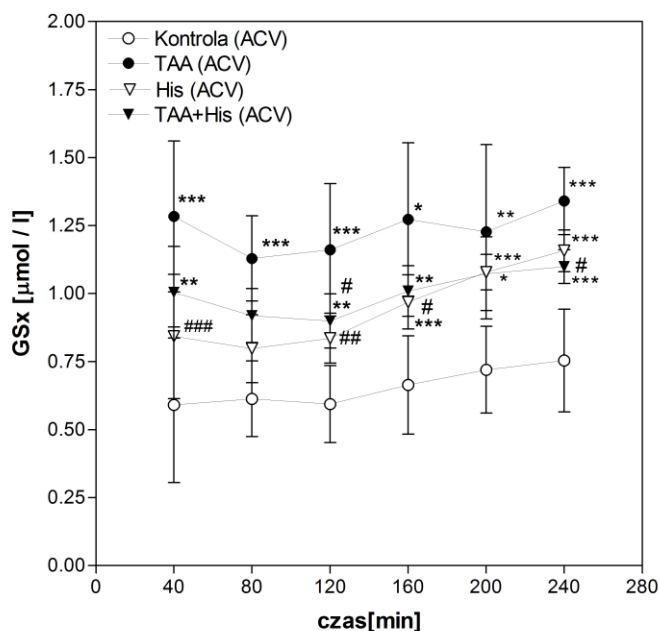
Ryc.5.6. Poziom glutationu całkowitego (GSx) w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej (A) i prążkowiec (B) a także w homogenatach kory przedczołowej (C) i prążkowiec (D) mózgu szczurów kontrolnych (Kontrola) oraz z hiperamonemią wywołaną octanem amonu (OA). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.

5.3. Wpływ histydyny na poziom i metabolizm GSH w mózgu w EW

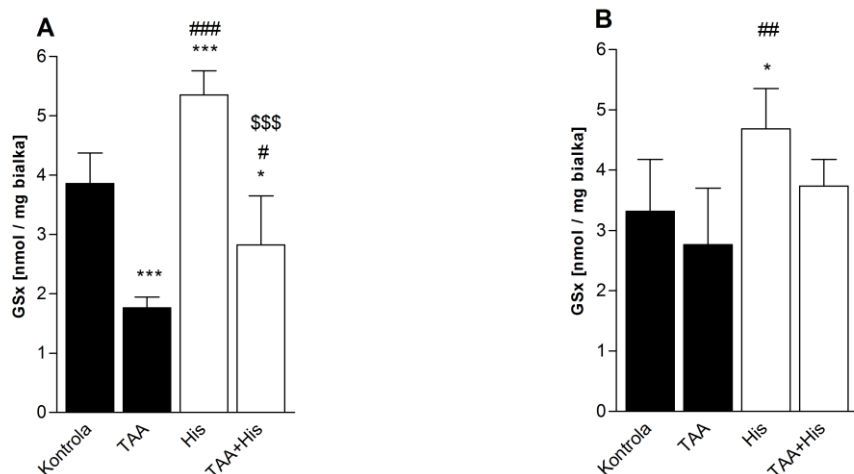
Kolejnym krokiem było sprawdzenie hipotezy, że protekcyjne działanie histydyny (His) w toksyczności amoniaku może realizować się nie tylko poprzez efekt hamowania nadmiernego przedostawania się Gln do mitochondriów („zaklinanie konia Trojańskiego”), ale także poprzez wpływ na równowagę redoks. Sprawdzone czy His wpływa na poziomy GSH, jego metabolizm oraz całkowitą zdolność antyoksydacyjną w EW.

5.3.1. Poziom GSH

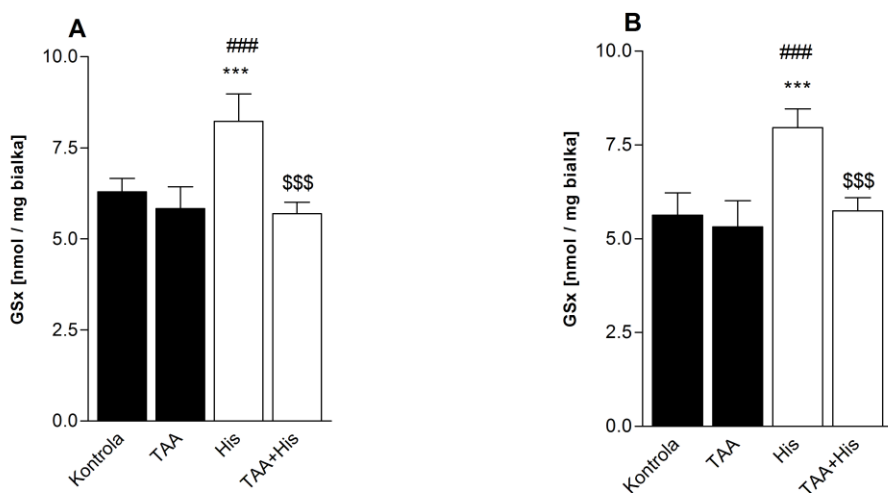
Dootrzewnowe podawanie His w dawce 100 mg/kg m.c. zaowocowało znaczącym wzrostem poziomu GSx w przestrzeni międzykomórkowej, co zaobserwowano w warunkach *in vivo* w mikrodializatach kory przedczołowej mózgu szczura zarówno u szczurów kontrolnych jak i poddanych działaniu TAA (Ryc.5.7). His powodowała podwyższenie poziomu mGSx w modelu EW (Ryc.5.8) oraz wzrost poziomu mGSx u szczurów kontrolnych (Ryc.5.8). Podwyższała poziom GSx w homogenatach obu badanych struktur mózgu pobranych od zwierząt kontrolnych, choć nie wywoływała tego efektu u szczurów z EW (Ryc.5.9).



Ryc.5.7. Wpływ histydyny (His) na poziom glutationu całkowitego (GSx) w mikrodializatach kory przedczołowej mózgu szczura w warunkach kontrolnych oraz w encefalopatii wątrobowej wywołanej tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Mikrodializę prowadzono w obecności inhibitora rozkładu glutationu, acywicyny (ACV). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-8 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola (ACV), ** $p < 0,01$ vs Kontrola (ACV), *** $p < 0,001$ vs Kontrola (ACV), # $p < 0,05$ vs TAA (ACV), ## $p < 0,01$ vs TAA (ACV), ### $p < 0,001$ vs TAA (ACV).



Ryc.5.8. Wpływ histydyny (His) na poziom glutationu całkowitego (GSx) w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej (A) i prążkowie (B) mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, # $p < 0,05$ vs TAA, ## $p < 0,01$ vs TAA, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His



Ryc.5.9. Wpływ histydyny (His) na poziom glutationu całkowitego (GSx) w homogenatach kory przedczołowej (A) i prążkowie (B) mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-7 niezależnych doświadczeń. *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His.

5.3.2. Potencjalne składowe mechanizmu odpowiedzialnego za zmiany poziomów GSH

W celu ustalenia mechanizmu zaobserwowanych zmian poziomu GSx w korze mózgu szczura z ostrą EW (wzrost GSx międzykomórkowego, spadek mGSx) oraz protekcyjnego działania His, sprawdzono przede wszystkim ekspresję oraz aktywność białek syntezy oraz metabolizmu GSH.

Mrp1 jest prawdopodobnie najważniejszym z transporterów GSH na zewnątrz komórki (Hirringer i ws., 2002). EW powodowała wzrost poziomu mRNA dla Mrp1 (Abcc1) w korze mózgu szczura, wzrost ten nie został zahamowany przez His (Ryc. 5.10).

Nie zaobserwowano znaczących zmian zarówno w aktywności GR (Ryc.5.11B), stosunku GSH/GSSG (Ryc.5.11A), a także w relatywnym poziomie ekspresji mRNA transporterów DIC (Slc25A10; Ryc.5.12A) oraz OGC (Slc25a11; Ryc.5.12B), zarówno w mózgu z EW jak i na skutek podawania His, co może wskazywać, że przyczyną spadku mGSx nie są zaburzenia w mechanizmie aktywnego transportu GSH do mitochondriów.

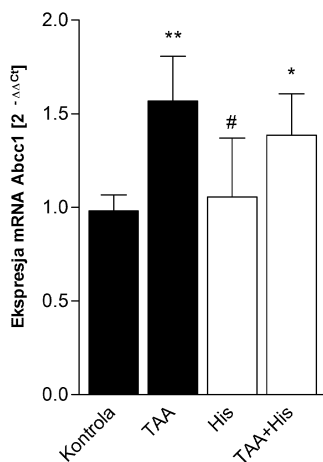
Analiza poziomu glutationylacji białek (PGSx) nie wykazała żadnych istotnych zmian w stopniu wiązania GSH z białkami mitochondrialnymi (Ryc.5.13A), jak i pochodzących z homogenatów kory mózgu szczura, zarówno w modelu EW jaki i po podaniu His (Ryc.5.13B), co sugeruje iż warunki w zastosowanym modelu nie wpływają na ten proces. Próba referencyjna w modelu EW uzyskanym po podaniu TAA w dawce 300 mg/kg m.c. wykazała zmiany zgodne z zaobserwowanymi podczas podawania TAA w dawce 250 mg/kg m.c., zarówno w poziomie GSx mitochondrialnego (Ryc.5.13A) jak i w całej tkance (Ryc.5.13B).

Podanie zarówno TAA jak i His indukowało ok. 30% wzrost aktywności enzymu decydującego o szybkości syntezy GSH – GCL (Ryc.5.14A), co wiązało się ze zwiększoną ekspresją mRNA kodującego modulującą podjednostkę tego enzymu, Gclm (Ryc.5.14B).

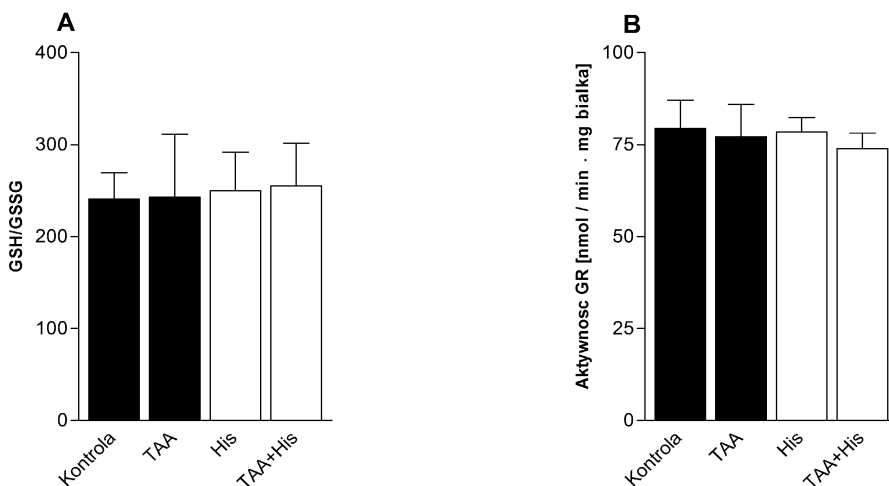
Aktywność enzymu rozkładającego zewnątrzkomórkowy GSH – γ GT wzrosła w modelu EW (Ryc.5.15A), co znalazło odzwierciedlenie w poziomie transkryptu genu kodującego to białko (Ggt1) (Ryc.5.15B). Na poziomie

mRNA His obniżała ekspresję Ggt1 zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w przypadku EW (Ryc.5.15B), lecz nie zmieniało to aktywności kodowanego przezeń enzymu (Ryc.5.15.A).

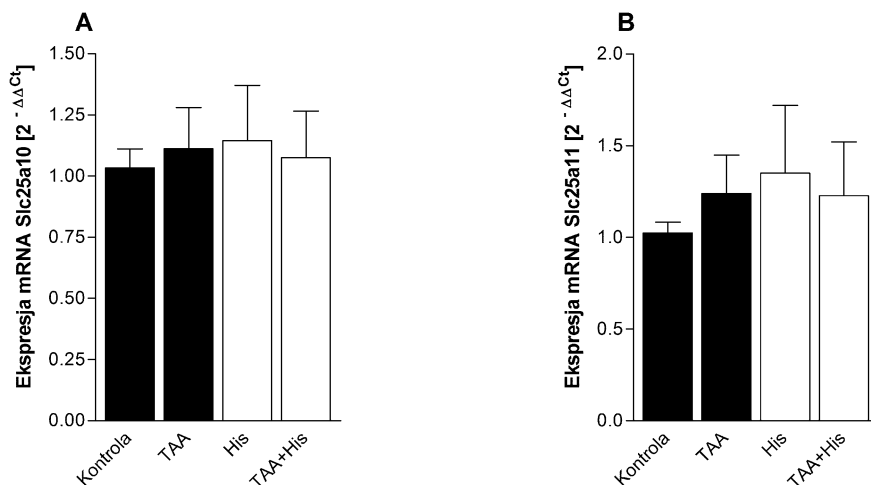
Sprawdzono również ekspresję i aktywność jednego z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych zużywających GSH, GPx. W EW zaobserwowano obniżenie zarówno aktywności (17%) (Ryc.5.16A), co zgodne jest z danymi uzyskanymi uprzednio przez inny zespół badawczy (Murthy i wsp., 2001) jak i ekspresji mRNA (27%) dla kluczowej izoformy (Liddell i wsp., 2006) tego enzymu – Gpx1 (Ryc.5.16B). Podanie His zapobiegało spadkowi zarówno aktywności GPx, jak i ekspresji Gpx1, przy czym sama His indukowała 18% wzrost aktywności badanego enzymu (Ryc.5.16A), ale 30% spadek mRNA dla Gpx1 (Ryc.5.16B).



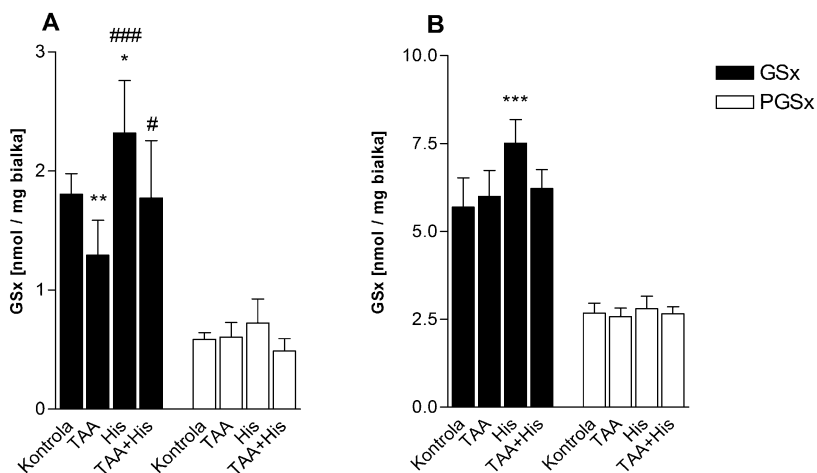
Ryc.5.10. Wpływ histydy (His) na poziom ekspresji mRNA kodującego białko transportujące GSH na zewnątrz komórki, Mrp1 (Abcc1) w korze przedczołowej mózgu szczura w warunkach kontrolnych oraz w encefalopatii wątrobowej wywołanej tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD uzyskaną z 4-6 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, # $p < 0,05$ vs TAA.



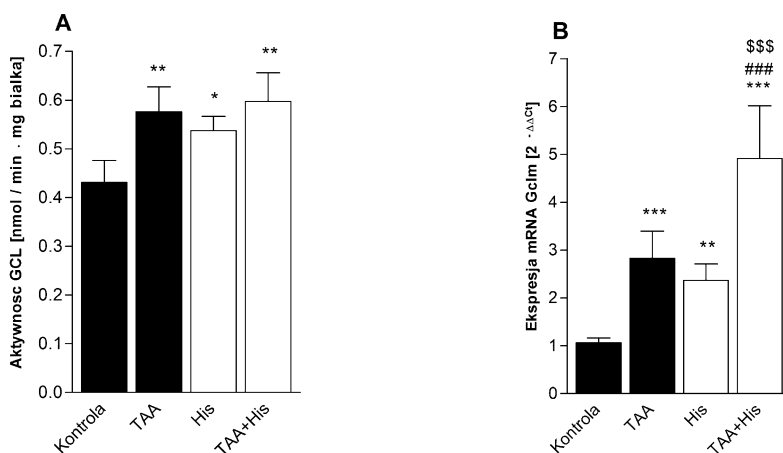
Ryc.5.11. Wpływ histydyny (His) na poziom GSH/GSSG (A) oraz aktywność reduktazy glutationowej (GR) (B) w homogenatach kory przedczołowej mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4 niezależnych doświadczeń.



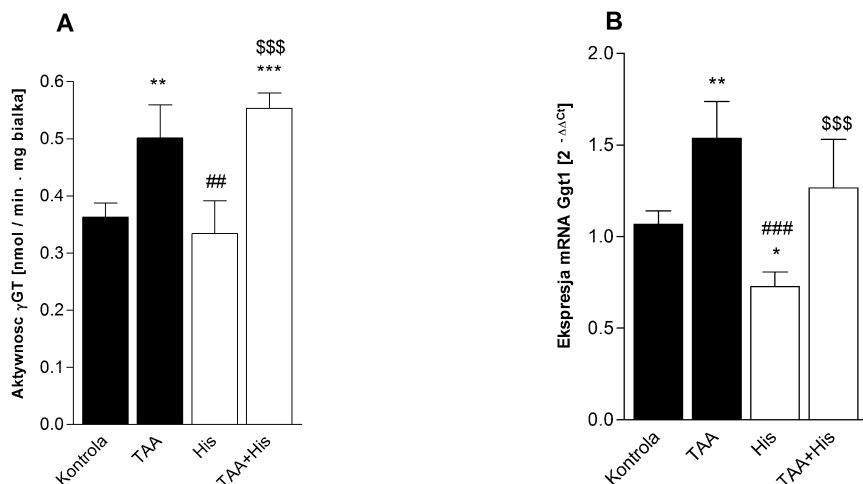
Ryc.5.12. Wpływ histydyny (His) na poziom ekspresji mRNA kodującego białka transportujące GSH do mitochondriów DIC (Slc25a10) (A) oraz OGC (Slc25a11) (B) w korze przedczołowej mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4-6 niezależnych doświadczeń.



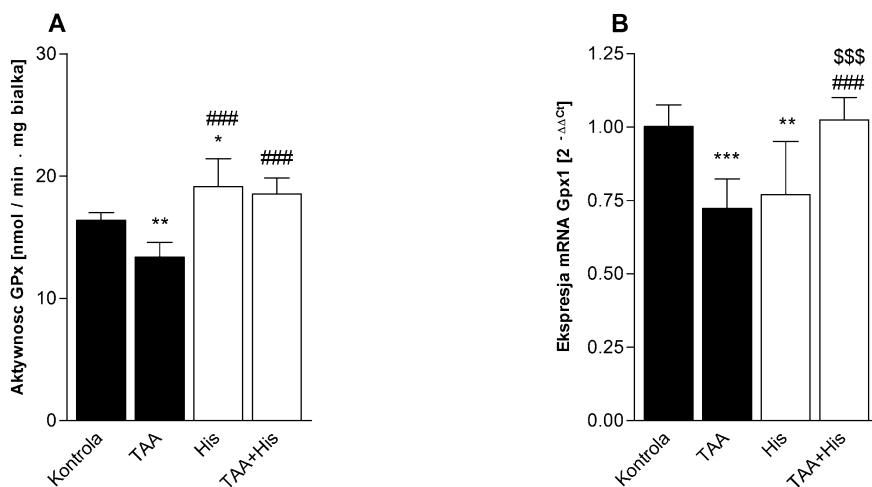
Ryc.5.13. Wpływ histydy (His) na poziom glutationu całkowitego wolnego (GSx) oraz związanego z białkami (PGSx) w mitochondriach (A) oraz homogenatach (B) kory mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-8 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, # $p < 0,05$ vs TAA, ## $p < 0,01$ vs TAA.



Ryc.5.14. Wpływ histydy (His) na aktywność ligazy glutaminianowo-cysteinowej (GCL) (A) oraz poziom ekspresji mRNA kodującego modułującą podjednostkę tego enzymu (Gclm) (B) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4-6 (A) / 4 (B) niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ## $p < 0,01$ vs TAA, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His.



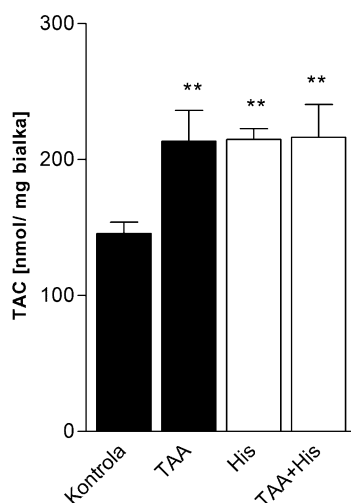
Ryc.5.15. Wpływ histydy (His) na aktywność γ –glutamylotranspeptydazy (γ GT) (A) oraz ekspresję mRNA genu kodującego ten enzym (Ggt1) (B) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 250 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4-6 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ## $p < 0,01$ vs TAA, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His.



Ryc.5.16. Wpływ histydy (His) na aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) (A) i ekspresję mRNA białka kodującego peroksydazę glutationową 1 (Gpx1) (B) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-7 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His.

5.4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna

Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAC) w korze mózgu szczura wzrosła o ok. 50% zarówno w modelu EW jak i w przypadku podawania His, zarówno samej jak i razem z TAA, przy czym efekty nie sumują się w przypadku zastosowania obu czynników (Ryc.5.17).



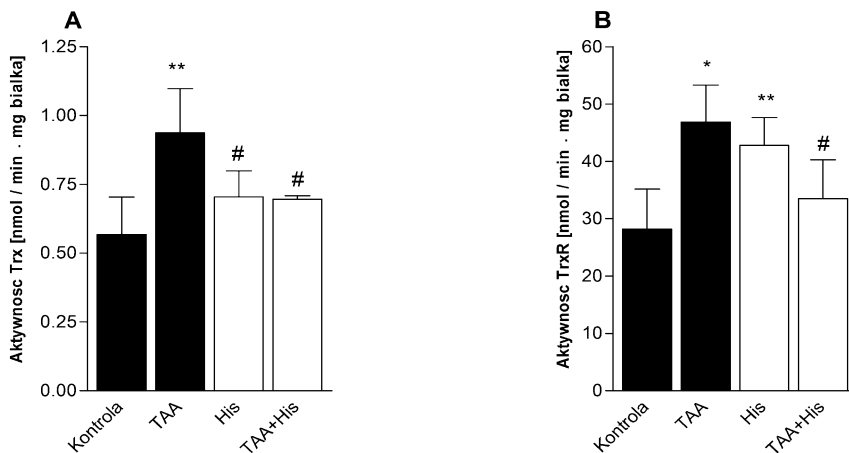
Ryc.5.17. Wpływ histydyzny (His) na całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 3-4 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola.

5.5. Układ tioredoksynowy w EW oraz w warunkach ekspozycji na histydynę

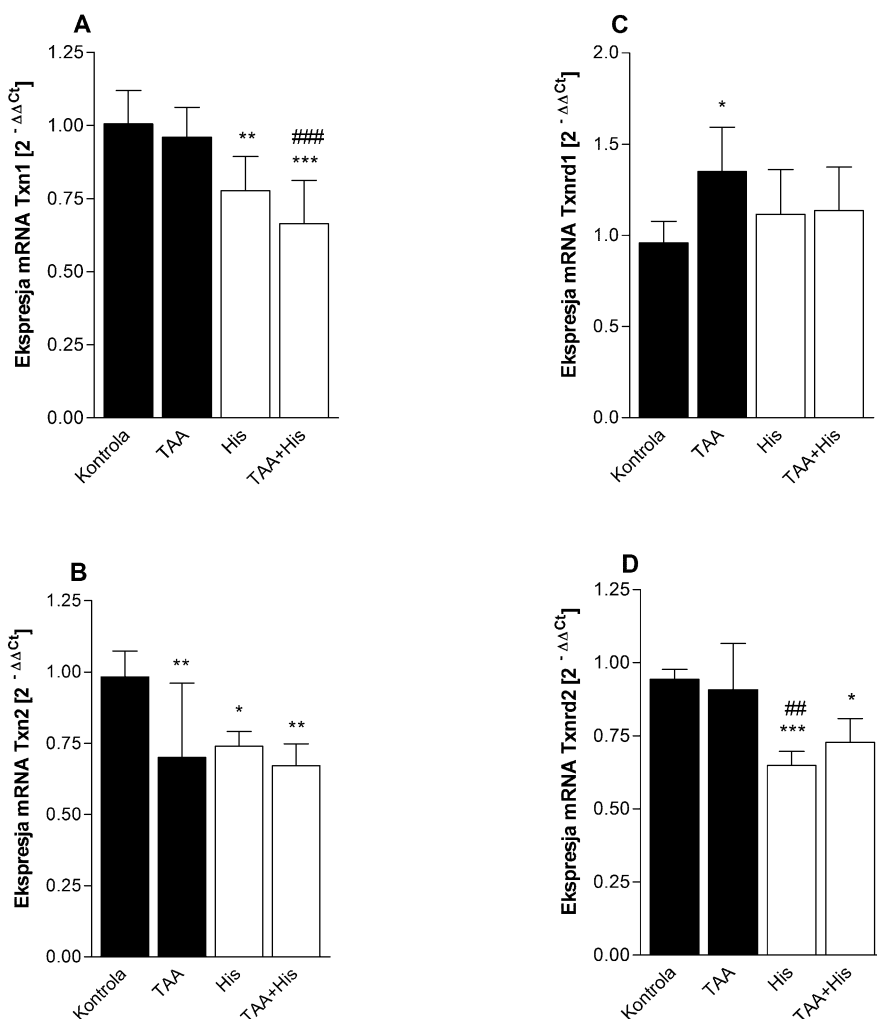
Niepełna zgodność danych dotyczących zmienionej aktywności układu glutationowego oraz wykazanego wzrostu TAC skłoniła do zbadania alternatywnego do GSH układu antyoksydacyjnego, opartego na tioredoksynie (Trx).

Zarówno Trx (Ryc.5.18A) jak i TrxR (Ryc.5.18B) wykazują istotny wzrost aktywności w modelu EW. Podawanie His skutkowało zniwelowaniem zmian aktywności obu białek obserwowanych po podaniu TAA, przy czym sama His indukowała wzrost aktywności TrxR (Ryc.5.18B). Odpowiedź na poziomie mRNA głównych lizoform analizowanego układu

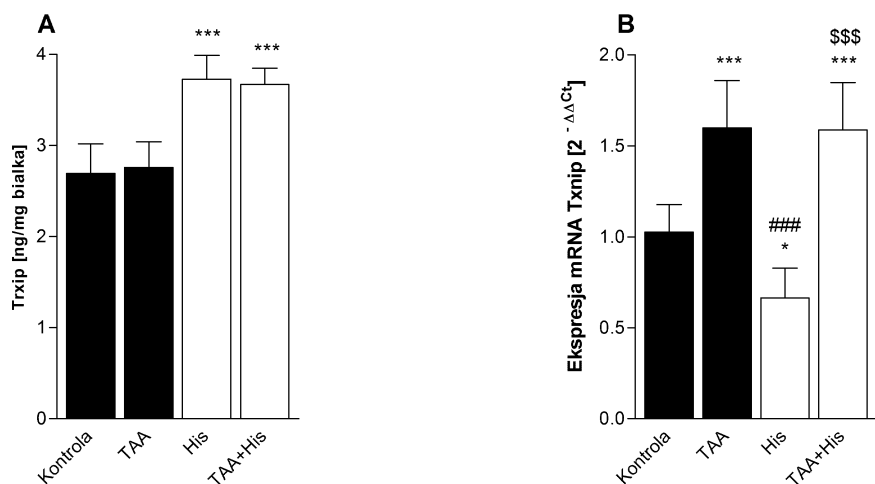
antyoksydacyjnego (Ryc.5.19) nie pokrywała się ze zmianami aktywności. Wynik sugeruje, że zmiany w aktywności enzymów nie są konsekwencją aktywacji mechanizmów transkrypcyjnych, a raczej jakiegoś mechanizmu potranslacyjnego. Teoretycznie mechanizm taki mógłby polegać na modulowaniu aktywności Trx przez endogenne regulator – białko hamujące tioredoksynę (ang. *thioredoxin interacting protein*, Trxip). Analiza poziomu tego białka z wykorzystaniem techniki ELISA wykazała brak zmian w ekspresji Trxip w modelu EW oraz znaczący wzrost pod wpływem podawania His zarówno u zwierząt kontrolnych (38%), jak i z EW (36%) (Ryc.5.20A). Wzrost (66%) ekspresji mRNA dla Trxip (Txnip) w EW, brak istotnych zmian pod wpływem jednoczesnego podawania His oraz obniżenie pod wpływem samej His (Ryc.5.20B) raz jeszcze wskazują na złożony system regulacji ekspresji.



Ryc.5.18. Wpływ histydyny (His) na aktywność tioredoksyny (Trx) (A) oraz reduktazy tioredoksyny (TrxR) (B) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 4-5 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola, ** $p < 0,01$ vs Kontrola, # $p < 0,05$ vs TAA.



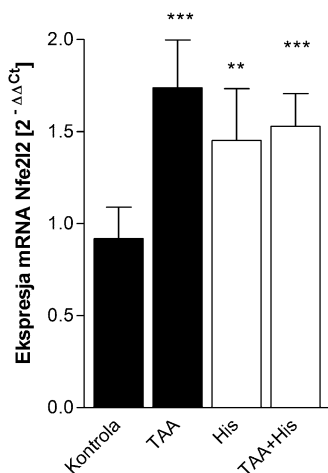
Ryc.5.19. Wpływ histydy (His) na ekspresję mRNA genów kodujących białka: cytoplazmatyczną izoformę tioredoksyny (Trx1; Txn1) (A) mitochondrialną izoformę tioredoksyny (Trx2; Txn2) (B), cytoplazmatyczną izoformę reduktazy tioredoksyny (TrxR1; Txnrd1) (C) oraz mitochondrialną izoformę reduktazy tioredoksyny (TrxR2; Txnrd2) (D) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD uzyskaną z 5-8 niezależnych doświadczeń. *p<0,05 vs Kontrola, **p<0,01 vs Kontrola ***p<0,001 vs Kontrola, ##p<0,01 vs TAA. ###p<0,001 vs TAA.



Ryc.5.20. Wpływ histydyny (His) na ekspresję białka hamującego tioredoksynę – Trxip (A) oraz mRNA genu kodującego to białko (Txnip) (B) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-8 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola, ### $p < 0,001$ vs TAA, \$\$\$ $p < 0,001$ vs His.

5.6. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w EW oraz w warunkach ekspozycji na histydynę

Wiele z przedstawionych powyżej elementów, należących zarówno do układu glutationowego jak i tioredoksynowego, podlega kontroli poprzez czynnik transkrypcyjny Nrf2. Niemal 100% wzrost ekspresji mRNA dla Nrf2 (Nfe2l2) w korze mózgu szczura z EW (Ryc.5.21) może mieć charakter reakcji kompensacyjnej na stres oksydacyjny i odpowiadać za część wykazanych uprzednio zmian. Podobny wzrost (ok. 70%) spowodowany podaniem His, zarówno niezależnym, jak i w obecności TAA, sugeruje zbieżność mechanizmów odpowiadających za uzyskany efekt.



Ryc.5.21. Wpływ histydyny (His) na ekspresję mRNA genu kodującego czynnik transkrypcyjny Nrf2 (Nfe2l2) w korze mózgu szczurów kontrolnych oraz z encefalopatią wątrobową wywołaną tioacetamidem (TAA; 300 mg/kg m.c.). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD uzyskaną z 6-8 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ vs Kontrola, *** $p < 0,001$ vs Kontrola.

6. Dyskusja

6.1. Uwagi wstępne

Stres oksydacyjno–nitracyjny (ONS) uważany jest za jedną z głównych przyczyn toksycznego działania amoniaku i ważny element w patogenezie encefalopatii wątrobowej (EW). Wzrost poziomu markerów ONS stwierdzono zarówno u chorych jak i w modelach EW, jednak geneza tego zjawiska nie jest do końca jasna (por. rozdz. 2.1.3.3.). Przede wszystkim nie są dobrze poznane elementy odpowiedzi antyoksydacyjnej. Głównym przedmiotem badań w niniejszej pracy był glutation (GSH), najpowszechniej występujący niskocząsteczkowy związek o właściwościach redukujących (por. rozdz. 2.2.1.). Jego dystrybucję w korze i prążkowie mózgu zbadano w szczurzym modelu hiperamonemii (HA) oraz ostrej EW. Sprawdzone również jak, skuteczna w przypadku znoszenia licznych objawów toksyczności amoniaku, histydyna (His) (por. rozdz. 2.2.3., 2.1.3.1.) wpływa na zmienioną w EW dystrybucję oraz metabolizm GSH. W warunkach EW oraz po zastosowaniu His rozpatrzono ponadto inny endogenny układ antyoksydacyjny, oparty na właściwościach redukcyjnych tioredoksyny (Trx), a także ekspresję regulującego oba układy czynnika transkrypcyjnego Nrf2.

6.2. Międzykomórkowy poziom GSH

Zarówno w modelu ostrej EW wywołanej tioacetamidem (TAA) (Ryc.5.1), jak i prostej HA uzyskanej poprzez dootrzewnowe podanie octanu amonu (OA) (Ryc.5.2) zaobserwowano znaczący wzrost międzykomórkowej zawartości glutationu całkowitego (GSx) oznaczanego w mikrodializatach kory przedczołowej mózgu szczura. Poziom badano w obecności acywicy (ACV), inhibitora enzymu rozkładającego międzykomórkowy GSH – γ GT, co umożliwiło określenie poziomu GSx w momencie przedostania się do przestrzeni międzykomórkowej (Hultberg i Hultberg, 2005). Uzyskany wynik jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami pokazującymi wzrost poziomu GSx w przestrzeni międzykomórkowej kory przedczołowej mózgu szczura w wyniku krótkotrwałego, bezpośredniego podawania 60 mM chlorku amonu (amoniaku) *in vivo* przez sondę mikrodializacyjną (Węgrzynowicz i wsp., 2007). Fakt, że wzrost ujawnił się tylko w obecności ACV wskazuje na zwiększenie napływu antyoksydantu do przestrzeni międzykomórkowej,

będące prawdopodobnie skutkiem wzrostu komórkowej syntezy i/lub aktywności systemów transportujących związki na zewnątrz oraz/lub spadkiem międzykomórkowej degradacji. Postuluje się, że wzrost poziomu międzykomórkowego GSx pod wpływem amoniaku jest skutkiem wzrostu syntezy oraz uwolnienia z astrocytów. Taki międzykomórkowy GSH stałby się źródłem prekursorów dla syntezy GSH w neuronach, a przez to mógłby się przyczynić do ich ochrony. Badania z użyciem hodowli mieszanych wykazały, że GSH syntetyzowany w astrocytach ma działanie protekcyjne w odniesieniu do neuronów w warunkach stresu nitracyjnego (Gegg i w sp., 2005), toksyczności 6-hydroksydopaminy (Sandhu i w sp., 2009), metylorteci (Morken i w sp., 2005) czy Glu (Shih i w sp., 2003). GSH uwalniany z astrocytów, a następnie rozkładany przez enzymy zewnątrzkomórkowe γ GT oraz DP, jest istotnym źródłem prekursorów do neuronalnej syntezy tego związku (Sagara i w sp., 1993; Dringen i w sp., 1999). Inkubowanie z chlorkiem amonu hodowli pierwotnych szczurzych neuronów korowych skutkowało, skorelowanym ze spadkiem przeżywalności, obniżeniem poziomu wewnątrzkomórkowego GSx, któremu zapobiegało podanie łatwo przenikającego przez błony komórkowe estru etylowego GSH (Klejman i w sp., 2005). Z drugiej strony, kiedy inkubowano z chlorkiem amonu hodowle pierwotne astrocytów, obserwowano wzrost zawartości GSx komórkowego, co uważa się za odpowiedź adaptacyjną w warunkach toksyczności indukowanej amoniakiem (Murthy i w sp., 2000; Węgrzynowicz i w sp., 2007). Zjawisku temu towarzyszył wzmożony wychwytywanie CySS, kluczowego prekursora astrocytarnej syntezy tego przeciwutleniacza (Węgrzynowicz i w sp., 2007). Akumulacji zewnątrzkomórkowego GSx w obecności amoniaku przeciwdziałało podanie inhibitora GCL – BSO, zarówno w przypadku dodania tego związku do medium hodowlanego astrocytów (Murthy i w sp., 2000), jak i do aCSF podawanego *in vivo* przez sondę mikrodializacyjną do kory przedczołowej mózgu szczura (Hilgier i w sp., 2010). W tych samych warunkach *in vivo* akumulację GSx obniżyło swoiste dla astrocytów zahamowanie TCAC przez fluoroocetan (Hilgier i w sp., 2010). Powyższe przytoczone dane przemawiają za tym, że w neurotoksyczności amoniaku za międzykomórkową akumulację GSx odpowiada wzmożona synteza tego związku w astrocytach. W korze mózgu szczura z EW zanotowano wzrost aktywności enzymu katalizującego pierwszy etap syntezy GSH, GCL (Ryc.5.14.A), a także wzrost ekspresji mRNA dla modulującej jego aktywność podjednostki Gclm (Ryc.5.14.B). Mimo iż za aktywność tego enzymu odpowiada przede wszystkim katalityczna podjednostka ciężka Gclc, to jednak wrażliwe na stan redoks utworzenie holoenzymu z podjednostką Gclm obniża

znacząco Km (stała Michaelisa) dla Glu oraz podwyższa Km dla GSH, co powoduje, że aktywność enzymu jest w mniejszym stopniu hamowana przez sprzężenie zwrotne, co w konsekwencji przekłada się na wzrost akumulacji GSH (Huang i wsp., 1993a; Huang i wsp., 1993b). Wiele prooksydantów indukuje ekspresję obu podjednostek (por. art. przeglądowy Lu, 2013), w czym istotny udział ma obecność w rejonie promotorowym sekwencji ARE (por. rozdz. 2.2.4.). W badaniach *in vitro* amoniak indukował ekspresję ciężkiej podjednostki zarówno w astrocytach jak i linii glejaka C6 (Węgrzynowicz, 2008). Choć badany w całej tkance, wzrost aktywności oraz ekspresji GCL można, z dużym prawdopodobieństwem, przypisać przede wszystkim astrocytom, gdyż wielokrotnie stwierdzono, że są one głównym miejscem syntezy GSH w OUN (por. art. przeglądowy Dringen, 2000).

O ile wzrost poziomu GSx w przestrzeni międzykomórkowej mózgu szczura w obu analizowanych modelach ujawnił się jedynie w obecności inhibitora γ GT – ACV, to przy bezpośrednim podaniu chlorku amonu do przestrzeni międzykomórkowej mózgu szczura znaczący wzrost poziomu GSx zanotowano pod nieobecność ACV (Węgrzynowicz i wsp., 2007). Różnica ta wynika prawdopodobnie z różnej odpowiedzi γ GT na ostrą i przewlekłą stymulację amoniakiem. Wzrost aktywności γ GT w korze przedczołowej mózgu szczura z EW indukowaną TAA (Ryc.5.15A) może być konsekwencją wzrostu ekspresji kodującego ją genu (Ryc. 5.15B). Wynik ten jest zgodny z uprzednio stwierdzoną aktywacją γ GT w astrocytach wyizolowanych z kory przedczołowej mózgu szczurów traktowanych TAA (Stastny i wsp., 1988) oraz homogenatach mózgu szczura z długotrwałą HA (Hilgier i wsp., 1990). W tej ostatniej pracy nie stwierdzono istotnych zmian aktywności tego enzymu w przypadku krótkotrwałej HA, co sugeruje, że amoniak nie jest bezpośrednią ich przyczyną. W warunkach *in vitro* długotrwanie utrzymujący się w czasie wzrost aktywności γ GT, zaobserwowany w hodowlach pierwotnych astrocytów traktowanych 5 i 10 mM chlorkiem amonu, współistniał z brakiem zmian w poziomie zewnątrzkomórkowego GSx w tych warunkach (Hilgier i wsp., 2010). Natomiast w doświadczeniu, w którym stwierdzono wzrost zewnątrzkomórkowego GSx po trzydniowej inkubacji z 5 mM amoniakiem, aktywność astrocytarnej γ GT była niezmienną (Murthy i wsp., 2000). Zmiana ekspresji genu kodującego γ GT, a w konsekwencji poziomu i aktywności białka jest bardzo często następstwem stresu oksydacyjnego. Wiele oksydantów lub prooksydantów, takich jak XO (Markey i wsp., 1998), NO₂ (Takahashi i wsp., 1997), O₂ (Knickelbein i wsp., 1996) czy H₂O₂ (Ripple i wsp., 1997) stymulują ekspresję γ GT, przy czym dokładny mechanizm

indukcji nie jest znany. Struktura genu kodującego γ GT jest złożona, a transkrypcja kontrolowana przez kilka promotorów, np. u szczura jest ich 5, co prowadzi do powstania siedmiu transkryptów o specyficznej lokalizacji tkankowej (Chikhi i wsp., 1999; Zhang i Forman, 2009). Aktywacja ekspresji zależy może od rodzaju czynnika indukującego, od jego stężenia i miejsca działania (typ tkanki), a aktywacja poszczególnych promotorów w odpowiedzi na stres wydaje się być mocno zindywidualizowana (por. art. przeglądowy Zhang i Forman, 2009).

Syntetyzowany w komórkach GSH eksportowany jest na zewnątrz przy udziale białek błony cytoplazmatycznej, spośród których należący do rodziny Abc, *Abcc1* (*Mrp1*), występujący w niemal wszystkich typach tkanek ssaków, jest najlepiej zbadanym i obecnie uważanym za kluczowy. Badania *in vitro* wykazują, że *Mrp1* w znacznej mierze odpowiada za astrocytarny transport GSH na zewnątrz komórki (Hirringer i wsp., 2002; Tobias i wsp., 2006). Analiza ekspresji na poziomie mRNA wykazała relatywny wzrost tego transkryptu w korze mózgu szczura z EW wywołaną TAA (Ryc.5.10), co może wskazywać, że w warunkach tych za zwiększoną zawartość międzykomórkowego GSx odpowiada nie tylko stymulacja astrocytarnej syntezy, ale i układu transportującego GSH z komórki. *Mrp1* charakteryzuje się relatywnie niskim powinowactwem do samego GSH i znacznie wydajniej transportuje wszelkie jego koniugaty, co potwierdzają wyniki badań wykorzystujących zarówno nadekspresję (Lautier i wsp., 1996; Mao i wsp., 2000) jak i nokaut genu go kodującego (Lorico i wsp., 1997; Wijnholds i wsp., 1997) w różnych typach tkanek. Z drugiej strony, niepełne zablokowanie wypływu GSH z komórki w konsekwencji zastosowania inhibitora *Mrp1* (MK571) sugeruje udział innych transporterów (Hirringer i wsp., 2002). Badania z wykorzystaniem hodowli astrocytów wyprowadzonych z myszy z nokautem *Mrp1*(-/-) oraz *Mrp5*(-/-) wykazały ok. 60 % udział *Mrp1* w eksporcie GSH, przy równoczesnym braku zaangażowania, również obecnego w astrocytach, transportera *Mrp5* (Minich i wsp., 2006). Rolę *Mrp1* w astrocytarnym eksporcie GSH wykazano w odpowiedzi na warunki stresowe indukowane formaldehydem (Tulpule i Dringen, 2011) oraz chlorkiem miedzi (Scheiber i Dringen, 2011). Niewielki udział *Mrp1* w eksporcie GSH pokazano ostatnio także na hodowli pierwotnych neuronów traktowanych formaldehydem (Tulpule i wsp., 2013) oraz H_2O_2 (Hohnholt i Dringen, 2014). Oprócz *Mrp*, powinowactwo do GSH mogą wykazywać inne białka przenośnikowe, np. należące do rodziny Abc białko *Abcg2* (Brechtbuhl i wsp., 2010) oraz transportujący aniony organiczne polipeptyd *Oatp1* (ang. *organic*

anion transporting polipeptyde), który w szczurzych hepatocytach został zidentyfikowany jako transporter organicznych jonów do wnętrza komórki z wykorzystaniem GSH jako wymiennika (Li i wsp., 1998). Również koneksyny tworzące połączenia szczelinowe między komórkami, przepuszczalne dla jonów nieorganicznych oraz cząstek <1kDa, odgrywają rolę w transporcie GSH z astrocytów (Rana i Dringen, 2007). Względny udział poszczególnych układów transportujących GSH w odpowiedzi na amoniak wymaga dalszych badań.

Wzrost transportu GSH na zewnątrz komórki może też być indukowany przez Glu, którego poziom międzykomórkowy wzrasta w korze mózgu szczura w modelu EW (Hilgier i wsp., 2014). Wiadomo, że nawet mikromolarne stężenia Glu w medium hodowlanym stymulują w hodowli pierwotnej astrocytów wzrost zewnątrzkomórkowego GSH (Frade i wsp., 2008). Doświadczenia na hodowli komórek siatkówki wskazują na rolę astrocytarnego, sodozależnego transportera Glu – GLAST w wymianie Glu/GSH (Garcia i wsp., 2011). Hipotezę zależnego od Glu wyrzutu GSH w EW wzmacnia zaobserwowany wzrost ekspresji GLAST zarówno w mózgach *post mortem* chorych na EW (Görg i wsp., 2010) jak i w szczurzym modelu przewlekłej EW (Suarez i wsp., 2000), pomimo iż w hodowlach astrocytów inkubacja z amoniakiem doprowadziła do spadku ekspresji i aktywności tego transportera (Zhou i wsp., 1999; Chan i wsp., 2000).

Choć proces jest słabo zbadany, w rozpatrywaniu zjawiska akumulacji międzykomórkowego GSH nie można wykluczyć obniżonego wychwytu GSH przez komórki mózgu. Uważa się, że ze względu na swój ujemny ładunek w fizjologicznym pH (Lash, 2005) GSH jest trudno transportowany do komórki i bardzo słabo przez BBB (por. art. przeglądowy Bachhwat, 2013). Niemniej jednak niezależny od aktywności γ GT wychwyt GSH stwierdzono w komórkach śródbłonna naczyń szczura (Kannan i wsp., 1990), w unieśmiertelnionych komórkach ludzkiego śródbłonna naczyń (Kannan i wsp., 1999; Kannan i wsp., 2000) oraz liniach astrocytów ludzkich i szczurzych (Kannan i wsp., 2000). W szczurzych hepatocytach stwierdzono, że transport GSH odbywa się dwukierunkowo jedynie w obecności dużych stężeń zewnątrzkomórkowego GSH, natomiast przy niskich stężeniach fizjologicznych GSH jest transportowany jedynie w kierunku na zewnątrz (Garcia-Ruiz, 1992). Podążając tym tropem, w warunkach EW zwiększona aktywność γ GT, prowadząca do sukcesywnej degradacji międzykomórkowego GSH, przemawia na korzyść tego drugiego scenariusza.

6.3. Mitochondrialny poziom GSH

Mitochondria wyizolowane z kory przedczołowej mózgu szczura z EW charakteryzowały się znaczącym obniżeniem poziomu GSx w stosunku do wartości uzyskanych u zwierząt kontrolnych (Ryc.5.3.A), natomiast w mitochondriach wyizolowanych z prądkowia odnotowano niezmienną tendencję spadkową (Ryc.5.3.B). Jednocześnie w obu strukturach poziom GSx oznaczony w homogenatach tkankowych, z których następnie izolowano mitochondria, nie różnił się znacząco od wartości kontrolnych (Ryc.5.4). W modelu prostej HA wywołanej OA w mitochondriach wyizolowanych z kory przedczołowej mózgu szczura widoczna była jedynie nieznamienista tendencja spadkowa poziomu GSx (Ryc.5.6.A), przy braku zmian w mitochondriach prądkowia (Ryc.5.6.B), oraz w homogenatach obu struktur (Ryc.5.6.C,D).

Mitochondria są w komórce głównym źródłem ROS, dlatego obecność mGSH jest kluczowa w utrzymaniu tamtejszej równowagi redoks, niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania tych organelli, a przez to całej komórki. Wielokrotnie stwierdzono, iż spadek poziomu mGSH koreluje ze spadkiem przeżywalności i zwiększonym uwrażliwieniem komórek na ONS oraz inne szkodliwe czynniki (Colell i wsp., 1998; Colell i wsp., 2001; Coll i wsp., 2003; Fernandez-Checa i wsp., 1991; Zhao i wsp., 2002). W hodowlach neuronów ziarnistych całkowite usunięcie GSH spowodowało śmierć komórek, czego nie zaobserwowano po wybiórczym obniżeniu poziomu GSH cytoplazmatycznego (Wüllner i wsp., 1999). Usunięcie mGSH z astrocytów *in vitro* uwrażliwiało te komórki na działanie ROS i RNS (Muydermann i wsp., 2004; Muyderman i wsp., 2007). Obniżenie stężenia lub wzrost utlenienia mGSH jest zjawiskiem powszechnym w wielu stanach toksycznych i patologicznych związanych z występowaniem ONS. Spadek poziomu mGSH zanotowano w szczurzym modelu przewlekłego poalkoholowego uszkodzenia wątroby (Garcia-Ruiz i wsp., 1994; Fernandez-Checa i wsp., 1993), marskości wątroby (Krahenbuhl i wsp., 1992; Krahenbuhl i wsp., 1995) oraz w zespole poreperfuzyjnym (Grattagliano i wsp., 1999). Zmiany te dotyczą także mózgu, spadek mGSH obecny jest w mózgu szczurów z cukrzycą (Mastrocola i wsp., 2005), jako jeden z wcześniejszych objawów niedotlenienia mózgu szczurzych noworodków (Wallin i wsp., 2000) oraz w modelu udaru (Anderson i Sims 2002; Anderson i wsp., 2004).

Wobec braku w mitochondriach aktywności enzymów syntezy GSH przyjmuje się, że jego obecność tamże jest wynikiem aktywnego transportu z

cytoplazmy (Griffith i Meister, 1985; Mari i wsp., 2009; Lash, 2006). W związku z tym zaobserwowany spadek poziomu mGSx mógłby wynikać ze: (1) zmniejszonej dostępności cytozolowego GSH, (2) zaburzonego transportu, (3) wycieku GSH przez MPT oraz/lub (4) zwiększonego zużycia wewnątrzmitochondrialnego, prowadzącego do obniżenia ilości wolnego GSH, np. glutationylacja.

Wydaje się, że ograniczenie dostępności GSH do mitochondrialnego wychwytu jest mało prawdopodobną przyczyną spadku mGSx w EW. Wskazuje na to brak zmian w poziomie GSx w homogenatach kory przedczołowej mózgu szczura z EW (Ryc.5.4A) a także niezmienny poziom utlenionej formy GSSG, wyrażony w stosunku GSH/GSSG (Ryc.5.11A), oraz pośrednio także niezmienniona aktywność GR (Ryc.5.11.B). Te dwa ostatnie parametry sugerują, iż w badanych warunkach nie ulega zmianie relatywna ilość zredukowanej formy GSH, transportowanej przez błony mitochondrialne. Jedynie zwiększony transport na zewnątrz komórki (por. rozdz. 6.2.) mógłby przyczynić się do obniżenia ilości cytoplazmatycznego GSH, w stosunku do niezminionej całkowitej ilości tego antyoksydantu w całej tkance, a w konsekwencji prowadzić do zmniejszenia ilości GSH przechodzącego do mitochondriów. Tę hipotezę może wspierać zaobserwowana analogia w poszczególnych strukturach – bezpośrednio podawanie jonów amonowych do mózgu szczura wywołało znaczny wyrzut GSx do przestrzeni międzykomórkowej kory przedczołowej, podczas gdy w prążkowi widoczna była jedynie niezamienna tendencja (Węgrzynowicz i wsp., 2007). W analizowanym modelu zmiany mGSx w prążkowi są również niezamienne (Ryc.5.3B), co sugeruje współzależność obu zjawisk. Aby to potwierdzić, należałoby oznaczyć poziom GSH cytoplazmatycznego, co w przypadku analizowania tkanki jest obecnie nieosiągalne.

GSH z łatwością dyfunduje przez poryny w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Kojer i wsp., 2012), jednak ze względu na swój ujemny ładunek oraz relatywnie ujemnie naładowane środowisko macierzy mitochondrialnej, do przekroczenia wewnętrznej błony mitochondrialnej wymagany jest aktywny system transportujący z użyciem energii lub wymiennika jonowego (Mari i wsp., 2009; Lash, 2006; Wadey i wsp., 2009). Nieprawidłowe funkcjonowanie tego systemu mogłoby odpowiadać za spadek poziomu GSH stwierdzony w korze przedczołowej mózgu szczura z EW. Analiza ekspresji mRNA wykazała brak istotnych zmian w transkrypcji genów kodujących zarówno transporter DIC (Slc25a10) (Ryc.5.12.A) jak i OGC

(Slc25a11) (Ryc.5.12.B) w korze przedczołowej mózgu szczura z EW. Jednak nie można wykluczyć, że pomimo niezmienionej ekspresji mRNA, dochodzi do zmian na poziomie translacji lub modyfikacji potranslacyjnych. Teoretycznie, jednym z czynników modulujących aktywność tych transporterów, mogłoby być utlenianie reszt Cys pod wpływem stresu oksydacyjnego (Lash 2006). Innym powodem może być ograniczona dostępność substratów – zarówno DIC jak i OGC są antyportowymi, elektroobojętymi przekaźnikami anionów organicznych. Podstawową rolą DIC jest dostarczanie do mitochondriów kwasów dikarboksylowych niezbędnych w TCAC (jabłczan, z którym GSH konkuruje o transport) na wymianę z fosforanem nieorganicznym (Klingenberg 1979; Palmieri, 2004; Kamaga i wsp., 2010). OGC natomiast transportuje do mitochondriów głównie jabłczan, na wymianę z pośrednim produktem TCAC, α -ketoglutaranem (De Palma i wsp., 2010). W tym świetle spadek poziomu mGSx w modelu EW można by powiązać ze spadkiem metabolizmu energetycznego w neurotoksyczności amoniaku, zaobserwowanym zarówno u chorych z EW (Lockwood i wsp., 1991), jak i w doświadczeniach modelowych (Hilgier i wsp., 1991; Kosenko i wsp., 1994; Haghighat i wsp., 2000; Reddy i wsp., 2007). W szczurzym modelu EW indukowanej TAA zaobserwowano niemal 40% obniżenie poziomu α -ketoglutaranu w mózgu (Hilgier i Albrecht, 1984). Brak tego substratu mógłby powodować spadek transportu GSH do mitochondriów. Podwyższenie poziomu α -ketoglutaranu w okresie powrotu do normy, 14 dni po dwukrotnym podaniu TAA można by powiązać z brakiem zmian w poziomie mGSx w mitochondriach wyizolowanych z kory mózgu szczura 21 dni po ostatniej z 3 iniekcji tej hepatotoksyny (Ryc.5.5A). Powiązanie mitochondrialnego transportu GSH z metabolizmem energetycznym komórki uwypukla jeszcze bardziej wagę tej puli antyoksydantu. Zwiększenie metabolizmu energetycznego przekładające się na wzrost produkcji α -ketoglutaranu, skutkuje m.in. zwiększeniem produkcji ROS w mitochondriach, co pociąga za sobą zwiększone zapotrzebowanie na GSH w celu utrzymania równowagi oksydacyjno–redukcyjnej (Lash 2006).

Kolejną przyczyną obniżenia mGSx może być uszkodzenie błon mitochondrialnych. Badania mitochondrialnego wychwytu GSH w szczurzych hepatocytach pokazują, iż proces ten może być istotnie zahamowany na skutek zmniejszenia płynności błony mitochondrialnej, której wskaźnikiem jest wzrost stosunku zawartości cholesterolu do fosfolipidów, modulujący szczególnie aktywność transportera OGC (Collel i wsp., 1997; Collel i wsp., 1998). W korze mózgu szczurów z HA indukowaną jednorazowym podaniem OA (25

mmol/kg m.c.) oraz z EW w następstwie dwukrotnego podania TAA, zaobserwowano spadek płynności błon komórkowych oraz spadek zawartości cholesterolu (Swapna i wsp., 2006a; Swapna i wsp., 2006b), niemniej nie można wykluczyć, że w analizowanych warunkach ten efekt jest inny. W licznych modelach neurotoksyczności amoniaku zaobserwowano wzrost ekspresji zlokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka translokatora (TSPO), którego kluczową funkcją jest transport cholesterolu niezbędnego w syntezie steroidów (Papadopoulos i wsp., 1997), ale i zaangażowanie w indukcję MPT, czyli zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej (Panickar i wsp., 2007; Rama Rao i Norenberg, 2012). Zarówno w modelach EW, HA (Norenberg i wsp., 2006), a także w wyniku bezpośredniego działania amoniaku na astrocyty (Itzhak i Norenberg, 1994) zaobserwowano wzrost ekspresji tego białka. Powiązано to z indukcją ONS w OUN (Jayakumar i wsp., 2002; Häussinger i wsp., 2005), oraz ze zwiększonym poziomem neurosteroidów, które oprócz oddziaływania na układ GABA-ergiczny (Ahboucha i wsp., 2006), mogą powodować oraz pogłębiać wywołane amoniakiem rozproszenie potencjału błony mitochondrialnej w astrocytach, prowadzące do MPT (Rama Rao i Norenberg, 2012). Otwarcie mitochondrialnego kanału PTP powoduje niekontrolowany przepływ małych cząstek, w tym najprawdopodobniej GSH, choć brak jest jednoznacznych danych na ten temat. Przyjmuje się, że stężenie GSH mitochondrialnego jest zbliżone do cytozolowego (Mari i wsp., 2009), choć Wahllander i wsp. (1979) pokazali, że w mitochondriach wyizolowanych ze szczurzych hepatocytów stężenie GSH jest wyższe niż w cytoplazmie. Przy braku tego typu informacji dla OUN, zgodny z gradientem wyciek na skutek otwarcia kanału PTP nie może być wykluczony jako przyczyna obniżenia poziomu mGSx. Brak istotnych statystycznie zmian w poziomie mGSx w modelu prostej HA wydaje się przemawiać na korzyść tej hipotezy. W podobnym modelu ostrego zatrucia OA (12 mmol/ kg m.c.), wyizolowane z mózgu szczurów mitochondria niesynaptyczne charakteryzowały się niezmiennym potencjałem błonowym, co wskazuje na nienaruszony kanał PTP (Kosenko i wsp., 2007). Jeszcze inne badania nad prostą HA wykazały brak obrzmienia oraz MPT, pomimo napływu jonów Ca^{2+} do mitochondriów (Kosenko i wsp., 2000), co wskazuje na zależność między poziomem mGSx a integralnością błon mitochondrialnych. Warto tu również zauważyć, że niedobór GSH mógłby potencjalnie stymulować MPT. Otwarcie kanału PTP indukowane jest m.in. utlenieniem nukleotydów pirymidynowych oraz disiarczków białek wewnętrznej błony mitochondrialnej (Chernyak i wsp.,

1996; Kowaltowski i wsp., 2001). Taka sekwencja zdarzeń mogłaby wystąpić w procesie indukcji MPT przez amoniak (Rama Rao i wsp., 2005).

Alternatywną przyczyną obniżenia poziomu GSx w mitochondriach mózgu w EW mogłaby być glutationylacja, czyli proces przyłączenia GSSG do reszt Cys w białkach, chroniący je przed nieodwracalnym utlenieniem w warunkach ONS. W wyniku takiej reakcji dochodzić może do obniżenia poziomu wolnego GSx, co zaobserwowano w mitochondriach wyizolowanych z mózgu szczura, poddanych działaniu wodoronadtlenku t-butyłu (Ravindranath i Reed; 1990). Brak istotnych zmian w poziomie PGSx w mitochondriach wyizolowanych z kory mózgu szczura z EW (Ryc.5.13A) wskazuje, iż stopień glutationylacji w tych warunkach nie ulega zmianie i nie powinien przyczyniać się do obniżenia mGSx. Również w homogenatach kory mózgu glutationylacja w materiale ze szczurów z EW jest na poziomie bliskim warunkom kontrolnym (Ryc.5.13B). Wynik ten jest zgodny z niezmiennym względnym poziomem GSSG (Ryc. 5.11A) i może być konsekwencją nieulagającej zmianie aktywności GR (Ryc.5.11B), obniżonej aktywności GPx (Ryc.5.16A) czy podwyższonej aktywności układu Trx/TrxR (Ryc.5.18).

Istotnych zmian w poziomie mGSx nie zaobserwowano u szczurów, u których analizę przeprowadzono 21 dni po ostatniej iniekcji TAA (Ryc.5.5A), co świadczyć może o odwracalności procesu odpowiedzialnego za spadek mGSx, podobnie jak innych objawów w tych warunkach. W modelu EW po 21 dniach stwierdzono wzrost aktywności GS (Hilgier i Albrecht 1984), efektywną detoksykację amoniaku (Albrecht i wsp., 1988) oraz wzrost aktywności karboksylazy pirogronianowej (Albrecht i wsp., 1988), co w sumie sugeruje zwiększony metabolizm astrocytarny. Po 21 dniach od dwukrotnego podania TAA nie stwierdzono również obrzęku mierzonego zawartością wody w skrawkach kory mózgu szczura (Albrecht i wsp., 1994b), co świadczy o powrocie do normy na poziomie fizjologicznym.

Wyłączny spadek mitochondrialnej puli GSx, na tle niezmiennego całkowitego GSx oraz zwiększonego uwalniania komórkowego, stanowić może najsłabsze ogniwo w antyoksydacyjnej odpowiedzi na ONS w EW, oraz przyczyniać się do dysfunkcji mitochondrialnych, takich jak MPT. Bezpośrednie przyczyny obniżonego poziomu mGSx nie zostały jednoznacznie zidentyfikowane, w modelu indukowanej TAA EW występuje wiele ząbających się patomechanizmów mogących skutkować taką zmianą. Szczegółowe analizy poszczególnych ścieżek powinny przyczynić się do określenia ich udziału w całym obrazie.

6.4. Układ tioredoksynowy

Pomimo braku zmian w całkowitej puli GSx oraz stosunku GSH/GSSG, i jednoczesnym spadkiem aktywności GPx czy poziomu mGSx, w korze mózgu szczura z EW zaobserwowano wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC) (Ryc.5.17), co świadczyć może o zaangażowaniu w odpowiedź antyoksydacyjną innych niż GSH przeciwutleniaczy. Układ tioredoksynowy, jako kolejny po GSH ważny komórkowy reduktor tiolowy, stał się potencjalnym kandydatem odpowiedzialnym za zaobserwowane zmiany. W warunkach neurotoksyczności amoniaku układ Trx/TrxR nie był jak dotąd badany, choć w innych schorzeniach neurologicznych obserwowane były zaburzenia jego aktywności i ekspresji – poziom Trx wzrastał w mózgu u noworodków szurzych poddanych hiperoksji (Bendix i wsp., 2012), w modelu mózgowego niedotlenienia u myszy (Tanaka i wsp., 2011) i u myszokoczka mongolskiego (Tomimoto i wsp., 1993).

Analiza zdolności redukcyjnej Trx oraz TrxR w homogenatach kory mózgu szczura wykazała znaczący wzrost aktywności obu białek w następstwie podawania TAA (Ryc.5.18). Może to być interpretowane jako odpowiedź na zwiększoną produkcję ROS, kompensacyjną w stosunku do niewydolnego systemu opartego na GSH (spadek mGSH i GPx). Analiza ekspresji mRNA kodującego główne izoformy (1 i 2) obu białek wykazała brak istotnej korelacji z odnotowaną zmianą aktywności (Ryc.5.19). Autorka ma świadomość, że nie jest to dowód wystarczający, bowiem oprócz analizowanych wariantów w mózgu szczura występują inne izoformy mogące potencjalnie modulować oznaczaną aktywność całej rodziny białek. Niemniej wiele źródeł wskazuje izoformy 1 i 2 jako dominujące w OUN (Hanschmann i wsp., 2013; Aon-Bertolino i wsp., 2011; Conrad i wsp., 2013). Niekonkluzywne wyniki analizy ekspresji mRNA skłoniły do poszukiwań w dalszych etapach regulacji. Z powodu mnogości wariantów zrezygnowano z analizy poziomu białek wchodzących w skład obu rodzin. Trxip, endogenne białko hamujące Trx mogłoby być czynnikiem uniwersalnie regulującym aktywność układu Trx w EW, m.in. ze względu na swoją wrażliwość na niektóre składowe patomechanizmu neurotoksyczności amoniaku, takie jak zmiana poziomu NO (Forrester i wsp., 2009), zużycia glukozy (Yu i wsp., 2010) czy nadaktywacja NMDAr (Papadia i wsp., 2008). Analiza z wykorzystaniem techniki ELISA nie wykazała zmian w ekspresji tego białka w modelu EW (Ryc.5.20A), pomimo iż relatywny poziom kodującego je mRNA uległ znaczącemu podwyższeniu (Ryc.5.20B). Niezgodność wyników analizy ekspresji na poziomie mRNA i białka wynikać może zarówno z ograniczeń

metodologicznych jak i złożoności procesów biochemicznych występujących między transkrypcją a uzyskaniem aktywnej formy białka: obróbką potranskrypcyjną mRNA, potranslacyjną modyfikacją, zwijaniem białek czy też degradacją, które w warunkach patologicznych, takich jak ONS w EW, mogą zostać zaburzone (Vogel i wsp., 2011). Aktywność Trx (Ryc.5.18A) nie koreluje negatywnie z poziomem białka Trxip, jednak należy pamiętać, że nie sama obecność białka, a wiązanie jego utlenionej formy z miejscem aktywnym zredukowanej Trx obniża zdolności redukcyjne tej drugiej (Spindel i wsp., 2012). Nagromadzenie ROS w pewnych układach prowadzi do dysocjacji wiązania Trx-Trxip (Zhou i wsp., 2010), co w przypadku modelu EW mogłoby przyczynić się do zwiększonej aktywności Trx przy relatywnie niezmiennym poziomie hamującego ją białka.

Interesującym wynikiem w modelu EW wydaje się być spadek ekspresji mRNA dla mitochondrialnej izoformy Trx2, odgrywającej rolę w prawidłowym funkcjonowaniu tych organelli. W mitochondriach wyizolowanych z wątroby myszy z nadekspresją Trx2 wykazano złagodzenie MPT indukowanego zarówno H_2O_2 jak i Ca^{2+} (He i wsp., 2008). Mechanizm tego zjawiska nie jest znany, autorzy cytowanej pracy sugerują bezpośrednią interakcję z białkami PTP lub obniżenie poziomu wolnych rodników, w konsekwencji uniknięcie indukcji MPT. Uzyskany wynik wskazuje kolejny, nie rozpartywany dotąd obszar badań nad wywołaną amoniakiem dysfunkcją mitochondriów.

TrxR, podobnie jak GPx jest selenoproteiną, a kluczowa rola selenu (Se) w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu mogłaby wskazywać na istotną rolę tego typu białek w OUN (Bellinger i wsp., 2010; Steinbrenner i Sies, 2013; Chen i Berry, 2003). Spadek poziomu Se oraz białka transportującego Se – Sepp1 (ang. *selenoprotein P1*) stwierdzono we krwi u chorych z marskością wątroby (Burk i wsp., 1998), a wzrost ekspresji na poziomie mRNA selenoprotein SelS, SelV – w mózgu *post mortem* chorych z EW (Görg i wsp., 2013). Obniżona aktywność GPx (Ryc.5.16A) oraz ekspresja mRNA dla GPx1 (Ryc.5.16B) – enzymu znacznie wrażliwszego niż TrxR na niedobory Se (Brigelius-Flohe i Maiorino, 2013), są zgodne z wcześniej wykazanymi zmianami w różnych modelach HA i EW (Murthy i wsp., 2000; Reddy i wsp., 2004; Satpute i wsp., 2014; Singh i wsp., 2008) i pozwalają przypuszczać, iż w neurotoksyczności amoniaku dochodzi do zaburzeń metabolizmu Se, co wskazuje na nowy potencjalny kierunek badań do podjęcia.

6.5. Regulacja ekspresji genów antyoksydacyjnych

Brak istotnych statystycznie zmian w poziomie GSx w homogenatach tkankowych uzyskanych z kory i prążkowiec mózgu szczura z EW (Ryc.5.4), przy jednoczesnym zwiększeniu aktywności enzymu syntetyzującego GSH – GCL (Ryc.5.14A), sugerował zwiększoną degradację GSH na skutek zwiększonej aktywności γ GT (Ryc.5.15A). Zmiany te pokrywają się ze zwiększoną ekspresją genów kodujących te białka, zarówno dla Gclm (Ryc.5.14B) jak i Ggt1 (Ryc.5.15B). Jednocześnie w tych samych warunkach nastąpił wzrost ekspresji innych czynników zaangażowanych w potencjał antyoksydacyjny komórki, Mrp1 (Ryc.5.10) oraz TrxR1 (Ryc.5.19C). Cechą wspólną tych białek jest występowanie w rejonie promotorowym kodujących je genów sekwencji ARE, podlegającej regulacji przez czynnik transkrypcyjny Nrf2, którego wzrost ekspresji na poziomie mRNA również zaobserwowano w modelu EW (Ryc.5.21). Występujący w cytoplazmie kompleks Nrf2 – Keap1 działa niczym sensor komórkowego poziomu stresu (Niture i wsp., 2013; Wasserman i Fahl 1997; Kaspar i wsp., 2009; Kobayashi i Yamamoto, 2006). Pod wpływem działania związków elektrofilnych: ksenobiotyków, utleniaczy, ale też i antyoksydantów, ulega destabilizacji umożliwiającej translokację Nrf2 do jądra oraz wiązanie do sekwencji ARE, co aktywuje ekspresję baterii cytoprotekcyjnych genów (por. rozdz. 2.2.4.). Stres oksydacyjny towarzyszący EW mógłby, podobnie jak w szeregu innych schorzeń (por. art. przeglądowe: Niture i wsp., 2013; Joshi i Johnson, 2012), aktywować tę ścieżkę, prowadzącą do stymulacji układów potencjału antyoksydacyjnego, przejawiających się zwiększoną syntezą i uwalnianiem GSH, czy mobilizacją systemu tioredoksynowego. Wzrost relatywnego poziomu mRNA dla Nrf2 nie jest ostatecznym dowodem na aktywację tego szlaku (choć ekspresja Nrf2 może być również regulowana przez Nrf2; Kwak i wsp., 2002), określenie jądrowej zawartości Nrf2 oraz wiązania z ARE pozwoliłoby ustalić czy takie zjawisko ma miejsce w badanym modelu EW. Nie wszystkie geny podlegające regulacji przez Nrf2 wykazały zwiększony poziom ekspresji mRNA. W warunkach EW w przypadku GPx1 (Ryc.5.16.B) oraz Trx2 (Ryc.5.19B) dochodziło do spadku ekspresji, zaś Trx1 nie ulegała zmianie (Ryc. 5.19.A). Wyniki te sugerować mogą przewagę innych czynników transkrypcyjnych determinujących ekspresję poszczególnych genów w tych warunkach (kompilacja na temat czynników transkrypcyjnych regulujących poszczególne geny znaleźć można na stronie www.genecards.org).

6.6. Protekcyjne działanie histydyny

Dootrzewnowe podanie roztworu His w dawce 100 mg/kg m.c. zmieniało odpowiedź układów antyoksydacyjnych w warunkach EW indukowanej TAA. His podwyższała poziom mGSx (Ryc.5.8A), przeciwdziałała obniżeniu aktywności GPx (Ryc.5.16A) oraz ekspresji mRNA dla GPx1 (Ryc.5.16B), podwyższeniu aktywności Trx i TrxR (Ryc.5.18), a także ekspresji mRNA dla TrxR1 (Ryc.5.19C) w korze mózgu szczura. U szczurów kontrolnych His powodowała wzrost poziomu GSx w mitochondriach (Ryc.5.8) i homogenatach (Ryc.5.9) zarówno kory jak i prążkowie, oraz jego poziomu pozakomórkowego w korze mózgu szczura (Ryc.5.7). W tych samych warunkach His prowadziła do wzrostu aktywności GCL (Ryc.5.14A) oraz ekspresji mRNA dla Gclm (Ryc.5.14B), wzrostu aktywności GPx (Ryc.5.16A), TrxR (Ryc.5.18B), ekspresji mRNA dla Nrf2 (Ryc.5.21), a także zwiększała całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC) (Ryc.5.17) oraz ekspresję białka Trxip (Ryc.5.20B). Zmiany te mogą być konsekwencją różnych dróg działania His: obniżenia uszkodzenia mitochondriów poprzez hamowanie transportu Gln do mitochondriów, stymulowanie odpowiedzi antyoksydacyjnej oraz bezpośrednie działanie antyoksydacyjne. Każda z tych dróg zostanie odrębnie omówiona poniżej.

Wcześniejsze badania nad protekcyjną rolą His w neurotoksyczności amoniaku ujawniły jej zdolność do hamowania zjawisk prowadzących do obrzmienia komórek glejowych. His została zidentyfikowana jako skuteczny środek w zapobieganiu uszkodzeniu mitochondriów astrocytarnych (Albrecht i wsp., 2000) oraz obrzmieniu astrocytów poddanych działaniu amoniaku lub Gln *in vitro* (Reddy i wsp., 2006). His zapobiegała również obrzękowi mózgu oraz ONS w warunkach EW *in vivo* (Rama Rao i wsp., 2010). Dotychczas korzystny efekt His w EW przypisywano hamowaniu transportu Gln do mitochondriów (czyt. „zaklinaniu” konia Trojańskiego). Gln jest transportowana do mitochondriów przy udziale układu transportującego, który wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do His, stąd obecność tego aminokwasu ogranicza nagromadzenie Gln oraz konsekwencje tego w mitochondriach, takie jak MPT czy ONS (por. rozdz. 2.1.2.1. oraz 2.1.2.2.). His znosiła indukcję MPT w hodowli astrocytów inkubowanych z amoniakiem (Reddy i wsp., 2007), w szczurzych mitochondriach *ex vivo* inkubowanych z Gln (Ziemińska i wsp., 2000) oraz w mózgu szczurów z EW (Rama Rao i wsp., 2010). Wedle najpopularniejszej interpretacji działanie His sprowadzałoby się do zapobiegania uszkodzeniu mitochondriów oraz

konsekwencji ONS, przejawiających się w obniżeniu poziomu mGSH czy aktywacji układów antyoksydacyjnych takich jak GSH oraz Trx/TrxR. Wątpliwości nasuwa niejednolita odpowiedź analizowanych układów na podanie His, która świadczyć może o tym, że za te efekty odpowiada nie tylko Gln, ale i inne czynniki patogenne w EW, a jednocześnie może sugerować inną, niż powyżej przedstawioną, drogę działania.

Zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego TAC o ok. 50% (Ryc.5.17) w konsekwencji podania zwierzętom kontrolnym His nasuwa przypuszczenie, że obok powyżej opisanego, w protekcyjne działanie His może być zaangażowany mechanizm poprawiający zdolność antyoksydacyjną komórki, w sposób bezpośredni, lub też za sprawą indukcji endogennych systemów przeciwutleniających. Wiele jest prac pokazujących protekcyjny wpływ His lub jej pochodnych na stan redoks w warunkach patologicznych, także tych dotyczących OUN. His podana poprzez sondę mikrodializacyjną (25 mM) do prążkowiec mózgu szczura zapobiegała powstawaniu rodnika hydroksylowego indukowanego przez kation 1-metylo-4-fenylpirydyny, hamującej kompleks I mitochondrialnego łańcucha oddechowego (Obata i wsp., 2001). Dootrzewnowa iniekcja roztworu His w dawce 250 mg/kg m.c. szczura zapobiegała zwiększeniu przepuszczalności BBB wywołanej infekcją bakterii *Haemophilus influenzae* (Weintrob i wsp., 1993), a znacznie niższa dawka (50-100 mg/kg m.c.) podawana szczurom dożylnie, zapobiegała konsekwencjom przemijającego niedokrwienia mózgu (Kawamoto i wsp., 1997) oraz obniżała obrzęk mózgu wywołany uszkodzeniem kriogenicznym (Ikeda i wsp., 2000). Niniejsza praca stanowi jeden z nielicznych przykładów pokazujący modulujący wpływ His na odpowiedź antyoksydacyjną. Wcześniej grupa chińskich badaczy wykazała, iż zapewnienie karpom wysokohistydynowej diety prowadzi do zwiększenia poziomu GSH oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach obwodowych tych zwierząt (Feng i wsp., 2012). Inni badacze pokazali, że His podawana podskórnie szczurom (500 mg/kg m.c.) w czasie ciąży i karmienia, powodowała wzrost poziomu GSH oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w korze mózgu oraz hipokampie 21-dniowego potomstwa (Rojas i wsp., 2010).

Fakt, że podanie His moduluje ekspresję mRNA wielu spośród analizowanych genów antyoksydacyjnych sugeruje, iż mechanizmem współodpowiedzialnym za zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego mogłoby być stymulowanie poprzez His ekspresji tych genów, np. poprzez interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi wrażliwymi na stres oksydacyjny.

Zwiększoną ekspresję na poziomie mRNA czynnika transkrypcyjnego Nrf2 zaobserwowano zarówno na skutek podawania samej His jak i w przypadku późniejszego podania TAA, przy czym efekt obu czynników nie sumuje się (Ryc.5.21) co, podobnie jak w przypadku zwiększenia zdolności antyoksydacyjnej (Ryc.5.17) czy poziomu międzykomórkowego GSx (Ryc.5.7), sugeruje zbieżność odpowiedzialnych za tę indukcję mechanizmów. Zakładając, iż jest to efekt zwiększonej aktywacji Nrf2, prawdopodobnym mechanizmem działania wydaje się być obniżenie siły wiązania Nrf2 z białkiem hamującym Keap1, poprzez interakcje His z kluczowymi dla stabilności tego czynnika jonami Zn^{2+} (Dinkova-Kostova i wsp., 2005). Sprawdzenie tej hipotezy jest jednym z głównych celów w prowadzonym przez autorkę i trwającym obecnie projekcie badawczym pt. „Cytoprotekcyjny wpływ L-histydyny na astrocyty poddane działaniu jonów amonowych” (grant NCN nr 2012/07/N/NZ3/01948), jednak do chwili składania niniejszej rozprawy nie uzyskano danych pozwalających na zdecydowane potwierdzenie tego założenia. Podobnie jak w przypadku TAA, nie wszystkie geny podlegające regulacji przez układ Nrf2/ARE wykazują zwiększoną ekspresję po zastosowaniu His, co należy interpretować jako konsekwencję złożonego systemu regulacji transkrypcji poszczególnych genów, w której obok Nrf2 bierze udział szereg innych czynników, w tym indukowanych przez ONS oraz zależnych od jonów Zn^{2+} .

Z punktu widzenia cytoprotekcji trudnym do interpretacji wynikiem jest wzrost ekspresji białka Trxip pod wpływem działania His, zarówno w warunkach kontrolnych jak i w modelu EW (Ryc.5.20A). Podobnie jak w przypadku modelu EW, również i tu występuje rozbieżność między poziomem mRNA i białka, wskazująca na udział w regulacji ekspresji złożonych procesów potranskrypcyjnych. Z punktu widzenia patomechanizmu EW, głównym czynnikiem mogącym indukować ekspresję Trxip jest podwyższone stężenie glukozy (Yu i wsp., 2010), natomiast akumulacja NO, aktywacja NMDAr oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf2 skutkują obniżeniem jego ekspresji (Spindel i wsp., 2012; He i Ma, 2012; Papadia i wsp., 2008; Forrester i wsp., 2009). Modulowanie tych ścieżek przez His mogłoby odpowiadać za uzyskany wynik. Z drugiej strony wzrost poziomu Trxip po His może być jedną z przyczyn obniżonej w stosunku do mierzonej w modelu EW aktywności Trx (Ryc.5.18A). Wzajemne relacje między działaniem His a Trxip oraz pozostałych elementów układu tioredoksynowego wymagają uzupełnienia o bardziej szczegółowe badania.

Aktywacja układów antyoksydacyjnych zazwyczaj jest interpretowana jako odpowiedź protekcyjna w warunkach ONS. W niektórych doniesieniach His występuje jako czynnik toksyczny: wzmacnia cytotoksyczność powodującą aberracje chromosomalne indukowane przez nadtlenek wodoru w fibroblastach płuc chomika (Tachon i Giacomoni, 1988), ludzkich fibroblastach embrionalnych (Oya i Yamamoto, 1988), a także wielu innych liniach komórek ssaczy (Cantoni i wsp., 1994). Ponadto indukuje peroksydację lipidów *in vitro* (Erickson i Hultin, 1992) oraz w homogenatach kory mózgu młodych szczurów (podana w przewyższających fizjologiczne stężeniach 5-10 mM, obniżających całkowity potencjał antyoksydacyjny) (Tansini i wsp., 2004). Także podskórne podawanie His (500 mg/kg m.c.) w czasie ciąży i karmienia u samic szczurów, które prowadziło do aktywacji odpowiedzi antyoksydacyjnej w mózgu potomstwa, interpretowano jako odpowiedź protekcyjną OUN na ONS indukowany przez His (Bertin Rojas i wsp., 2010). Podawanie wysokich dawek (powyżej 200 mg/kg m.c.) His wywoływało zaburzenia procesów zapamiętywania u myszy (Serafim i wsp., 2010) oraz zaburzenia lokomotoryczne u szczurów, u których histydynię wywoływano poprzez dootrzewnową iniekcję His w dawce 250 mg/kg m.c. razem z inhibitorem histydazy – nitrometanem (Dutra-Filho i wsp., 1989). Mechanizm ten implikowano w sporadycznym występowaniu zaburzeń neuromotorycznych u osób cierpiących na histydynię (Levy i wsp., 2001; Levy i wsp., 2004). Wydaje się, że w przypadku stosowania terapii z użyciem His kluczową kwestią jest ustalenie optymalnej dawki. Dawka zastosowana w niniejszej pracy (100 mg/kg m.c.) jest znacznie niższa od dawek stosowanych w powyżej przytoczonych badaniach, stwierdzających negatywne efekty działania His.

Kolejną drogą na której His mogłaby przyczynić się do zwiększenia TAC jest bezpośrednie działanie antyoksydacyjne tego aminokwasu (por. rozdz. 2.2.3). Główną właściwością His w tym procesie jest zdolność do wiązania jonów Zn^{2+} . Uwolnienie Zn^{2+} z białek jest zjawiskiem charakterystycznym dla stresu oksydacyjnego i uważanym za istotny regulator transdukcji sygnału oraz ekspresji genów (Beyersmann i Haase, 2001; Kröncke, 2001; Kröncke, 2007; Bell i Vallee, 2009; Kröncke i Klotz, 2009). W mózgu Zn^{2+} odpowiedzialny jest za plastyczność synaptyczną (Li i wsp., 2001), a zaburzenia homeostazy tego jonu występują w patomechanizmach schorzeń neurologicznych, takich jak padaczka, udar czy choroby neurodegeneracyjne (por. art. przeglądowy Hayashi, 2009). Badania nad patomechanizmem toksyczności amoniaku wykazały, że poziom wolnego

cynku [Zn^{2+}] wzrasta w konsekwencji obrzęku osmotycznego astrocytów (Kruczek i wsp., 2009) oraz w wyniku kilkugodzinnej inkubacji astrocytów z 5 mM chlorkiem amonu, zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach (Kruczek i wsp., 2011). Wzrost ten wydaje się być powiązany z syntezą NO i powoduje aktywację zależnego od Zn^{2+} czynnika transkrypcyjnego, łączącego się z sekwencją MRE (ang. *metal response element*), oraz wzrost ekspresji metalotioneiny (Kruczek i wsp., 2011). Wzrost poziomu [Zn^{2+}] może powodować depolaryzację błony mitochondrialnej (Medvedeva i wsp., 2009), a w konsekwencji indukcję MPT. Choć zjawiska tego nie potwierdzono w modelu EW, można spekulować, iż His wiążąc [Zn^{2+}] przyczynia się do złagodzenia dysfunkcji mitochondrialnych oraz moduluje omówioną wcześniej zależną do Zn^{2+} ekspresję genów.

W interpretacji protekcyjnego działania His należy również rozważyć ewentualność, że uzyskany efekt nie ma swojego źródła w mózgu, tylko wcześniej na obwodzie. His podana dootrzewnowo mogłaby działać protekcyjnie już na poziomie hepatocytów, zapobiegając ich uszkodzeniu przez TAA. Podawanie drogą pokarmową His oraz jej pochodnej – karnozyny przyniosło pozytywne rezultaty w przypadku uszkodzenia wątroby w modelu toksyczności alkoholu (Liu i wsp., 2008) oraz acetamidofenu (Yan i wsp., 2010), co przejawiało się między innymi spadkiem objawów ONS oraz obniżeniem stanu zapalnego. Fakt, że His nie cofa podwyższonego poziomu amoniaku oraz Gln w mózgu szczura z EW indukowaną TAA (Rama Rao i wsp., 2010) świadczyć może o tym, że nie chroni ona hepatocytów w stopniu wystarczającym by zapobiec hiperamonemii. Z drugiej strony wiadomo, iż His podawana dootrzewnowo z łatwością przechodzi przez BBB (Oldendorf, 1973; Xiang i wsp., 1998; Yamakami i wsp., 1998; Sakurai i wsp., 2003). Podanie szczurom His w dawce 1000 mg/kg m.c. (znacznie większej niż zastosowana w niniejszej pracy) sprawia, iż w mózgu utrzymuje się ona na wysokim, przekraczającym 200% kontroli poziomie przez ok. 3 godziny (Irisawa i wsp., 2008). U myszy, którym podano bardzo duże dawki His (500–1500 mg/kg m.c.), poziom tego aminokwasu wzrósł kilkukrotnie po godzinie od podania, ale już w drugiej godzinie zauważalna była tendencja spadkowa (Oishi i wsp., 1989), co z jednej strony pokazuje szybki transport His przez BBB, a z drugiej wskazuje na szybki metabolizm w OUN. W zastosowanym w niniejszej pracy modelu, 24 godziny po 3-krotnym, dootrzewnowym podaniu, poziom His, mierzony zarówno w osoczu jak i korze mózgu szczura, nie różnił się znacząco od poziomu charakterystycznego dla szczurów kontrolnych (dane nieopublikowane, element projektu badawczego doktoranta Zakładu

Neurotoksykologii – Krzysztofa Milewskiego), co wskazuje na efektywny metabolizm tego aminokwasu. W OUN His jest kluczowym prekursorem histaminy (Brown i wsp., 1960; Schwartz i wsp., 1972; Schwartz i wsp., 1991). Histamina w komórkach śródbłónka naczyń może przyczyniać się do rozszczelnienia połączeń ścisłych w BBB (Sakurai i wsp., 2003), a w konsekwencji zwiększenia ciśnienia wewnątrzczaszkowego oraz obrzęku mózgu (Joo i wsp., 1994; Sharma 1992). Aktywacja układu histaminergicznego odpowiadać może za szereg zaburzeń neurologicznych występujących w EW (Sergeeva i wsp., 2005; Cascino i wsp., 1982). Jednak w analizowanym modelu iniekcji His poziom histaminy nie ulegał zmianie (dane nieopublikowane, element projektu badawczego doktoranta Zakładu Neurotoksykologii – Krzysztofa Milewskiego). His może być przekształcana do cytoprotekcyjnych didpeptydów, takich jak karnozyna czy anseryna (por. art. przeglądowy Wade i Tucker, 1998), które mogą przyczyniać się do obserwowanego wzrostu potencjału antyoksydacyjnego.

Z drugiej strony w szczurzych modelach EW stwierdzono w mózgu wzrost poziomu zarówno His (Mans i wsp., 1982; Lozeva i wsp., 2004) jak i histaminy (Fogel i wsp., 1991; Rigotti i wsp., 1985; Suzuki i wsp., 1979), co interpretowano jako skutek upośledzonego metabolizmu His w wątrobie oraz rozszczelnienia BBB. Oprócz wzrostu poziomu histaminy, w mózgu *post mortem* chorych z EW, zaobserwowano zwiększenie gęstości receptora histaminowego H1 (Lozeva i wsp., 2003; Borg i wsp., 1982; Suzuki i wsp., 1979). Czterokrotne podawanie His w dawce 500 mg/kg m.c. spotęgowało akumulację histaminy, zarówno w korze jak i podwzgórzu, co skorelowano z brakiem poprawy neurologicznej u szczurów z EW wywołaną zespoleniem żyły wrotnej (Lozeva-Thomas i wsp., 2004). Pomimo iż w analizowanych modelu EW występuje wzrost poziomu His, zarówno w osoczu jak i w korze mózgu, nie przekłada się on na zmianę poziomu histaminy i zostaje zniesiony poprzez dootrzewnowe podawanie His (dane nieopublikowane, element projektu badawczego doktoranta Zakładu Neurotoksykologii – Krzysztofa Milewskiego). Choć mechanizm tego zjawiska nie jest jasny, stanowić może kolejną przesłankę przemawiającą za protekcyjnym działaniem tak podawanej His w EW.

7. Podsumowanie i wnioski

1. Zarówno encefalopatii wątrobowej (EW) jak i hiperamonemii (HA) u szczura towarzyszy wzrost poziomu całkowitego glutationu (GSx) w przestrzeni międzykomórkowej kory mózgu szczura, który jest prawdopodobnie wynikiem zwiększonej komórkowej syntezy oraz pobudzenia transportu z komórek.
2. EW ale nie HA u szczura towarzyszy odwracalny spadek poziomu GSx w mitochondriach wyizolowanych z kory mózgu, który wydaje się być powiązany przede wszystkim z zaburzeniami integralności błon mitochondrialnych. Określenie czy wybiórczość zmian w EW wynika z działania czynników innych niż amoniak wymaga dalszych badań.
3. W EW wzrasta całkowita zdolność antyoksydacyjna, pomimo niezmiennego poziomu całkowitego GSx oraz stosunku GSH/GSSG, a obniżonej aktywności peroksydazy glutationowej. Wskazuje to na rolę, obserwowanej tu, aktywacji układu tioredoksynowego, którą można interpretować jako odpowiedź kompensacyjną do częściowo upośledzonego układu GSH.
4. Podawanie dootrzewnowo histydyny (His) podwyższało poziom glutationu mitochondrialnego oraz zapobiegało wzrostowi aktywności enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej, tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksyny w EW. Sugeruje to, iż His obniża stres oksydacyjny lub przeciwdziała innemu niezidentyfikowanemu zjawisku indukującemu powyższe zmiany.
5. Podawanie dootrzewnowo His powoduje wzrost poziomu GSx w całej tkance, mitochondriach i przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu szczura, a także zmianę aktywności niektórych z badanych enzymów systemu glutationowego oraz tioredoksynowego. Przyczyną może być indukowanie przez His zmian ekspresji genów kodujących analizowane białka.

8. Streszczenie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Abstract

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

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

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

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

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

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

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

10. Bibliografia

Aguilar MA, Minarro J, Felipo V (2000) Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol* 161:704-713

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

Albrecht J, Bender AS, Norenberg MD (1994a) Ammonia stimulates the release of taurine from cultured astrocytes. *Brain Res* 660:288-292

Albrecht J, Dolinska M, Hilgier W, Lipkowski AW, Nowacki J (2000) Modulation of glutamine uptake and phosphate-activated glutaminase activity in rat brain mitochondria by amino acids and their synthetic analogues. *Neurochem Int* 36:341-347

Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Kapuściński A, Quack G (1994b) Increase of the brain uptake index for L-ornithine in rats with hepatic encephalopathy. *Neuroreport* 5:671-673

Albrecht J, Hilgier W, Łazarewicz JW, Rafałowska U, Wysmyk-Cybula U (1988) Astrocytes in acute hepatic encephalopathy: metabolic properties and transport functions. W: Norenberg MD, Hertz L, Schousboe A (Red.) *Biochemical pathology of astrocytes*, Nowy Jork: R. Liss, 465-76

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* 25:125-130

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

Albrecht J, Norenberg MD (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788-794

Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A (2007) Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci* 12:332-43

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

Alvarez-Leefmans FJ, Herrera-Perez JJ, Marquez MS, Blanco VM (2006) Simultaneous measurement of water volume and pH in single cells using BCECF and fluorescence imaging microscopy. *Biophys J* 90:608-618

- Amodio P, Caregaro L, Pattenò E, Marcon M, Del Picollo F, Gatta A (2001) Vegetarian diets in hepatic encephalopathy: facts or fantasies? *Dig Liver Dis* 33:491-500
- Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR (2004) Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neuroscience Letters* 354:163-165
- Anderson MF, Sims NR (2002) The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. *J Neurochem* 81:541-549
- Anderson ME, Underwood M, Bridges RJ, Meister A (1989) Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J* 3:2527-2531
- Aon-Bertolino ML, Romero Ji, Galeano P, Holubiec M, Badorrey MS, Saraceno GE, Hanschmann EM, Lillig CH, Capani F (2011) Thioredoxin and glutaredoxin system proteins - immunolocalization in the rat central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1810:93-110
- Arner ESJ, Holmgren A (2000) Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. W: Costa LG, Hodgson E, Lawrence DA, Reed DJ, GreenLee WF (Ed.) *Curr Protoc Toxicol* 7.4: 689-694
- Arrigo A.P (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 27:936-944
- Ascher NL, Lake JR, Emond JC, Roberts JP (1993) Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Arch Surg* 128:677-682
- Aschner M, Conklin DR, Yao CP, Allen JW, Tan KH (1998) Induction of astrocyte metallothioneins (MTs) by zinc confers resistance against the acute cytotoxic effects of methylmercury on cell swelling, Na⁺ uptake, and K⁺ release. *Brain Res* 813:254-261
- Audet RM, Butterworth RF (1998) Portacaval anastomosis results in more widespread alterations of cerebral metabolism in old versus young adult rats: implications for post-shunt encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13:69-78
- Azorin I, Minana MD, Felipo V, Grisolia S (1989) A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 10:311-314
- Bachhwat AK, Thakur A, Kaur J, Zulkifi M (2013) Glutathione transporters. *Biochim Biophys Acta* 1830:3154-3164
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2001) Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 66:981-991
- Bains JS, Shaw CA (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res* 25:335-358
- Baird L, Dinkova-Kostova AT (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85(4):241-272

Baker MM, Cerniglia GJ, Zaman A (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 190:360-365

Bannai S, Kitamura E (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 255:2372-2376

Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP (2010) Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 362:1071-1081

Bell SG, Vallee BL (2009) The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem* 10:55-62

Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ (2010) Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J* 422:11-22

Bender AS, Reichelt W, Norenberg MD (2000) Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 37:269-276

Bendix I, Weichelt U, Strasser K, Serdar M, Endesfelder S, Haefen C, Heumann R, Ehrkamp A, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M (2012) Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1484:68-75

Bergasa NV, Rothman RB, Mukerjee E, Vergalla J, Jones EA (2002) Up-regulation of central mu-opioid receptors in a model of hepatic encephalopathy: a potential mechanism for increased sensitivity to morphine in liver failure. *Life Sci* 70:1701-1708

Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J (2007) Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology* 46:1844-1852

Beyersmann D, Haase H (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14:331-341

Blei AT (2007) Brain edema in acute liver failure: can it be prevented? Can it be treated? *J Hepatol* 46:564-569

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

Board PG, Menon D (2013) Glutathione transferases, regulators of cell metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1830:3267-3288

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Braissant O, Cagnon L, Monnet-Tschudi F, Speer O, Wallimann T, Honegger P, Henry H (2008) Ammonium alters creatine transport and synthesis in a 3D-culture of developing brain cells, resulting in secondary cerebral creatine deficiency. *Eur J Neurosci* 27:1673-1685

Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ (2010) Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J Biol Chem* 285:16582-16587

Brigelius-Flohe R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830:3289-3303

Brown DD, Silva OL, McDonald PB, Snyder SH, Kies MW (1960) The mammalian metabolism of L-histidine. III. The urinary metabolites of L-histidine-C14 in the monkey, human, and rat. *J Biol Chem* 235:154-159

Brusilow SW, Traystman R (1986) Letter to the editor. *N Engl J Med* 314:786-97

Burk RF, Early DS, Hill KE, Palmer IS, Boeglin ME (1998) Plasma selenium in patients with cirrhosis. *Hepatology* 27:794-798

Butterworth RF (2002) Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 17:221-227

Butterworth RF (2007) Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:309-320

Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT (2009) Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 29:783-788

Canales JJ, Elayadi A, Errami M, Llansola M, Cauli O, Felipe V (2003) Chronic hyperammonemia alters motor and neurochemical responses to activation of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in rats *in vivo*. *Neurobiol Dis* 14:380-390

Cantoni O, Sestili P, Brandi G, Cattabeni F (1994) L-Histidine mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity is a general response in cultured mammalian cell lines and is always associated with the formation of DNA double strand breaks. *FEBS Lett* 353:75-78

Cascino A, Cangiano C, Fiaccadori F, Ghinelli F, Merli M, Pelosi G, Riggio O, Rossi FF, Sacchini D, Stortoni M, Capocaccia L (1982) Plasma and cerebrospinal fluid amino acid patterns in hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci* 27:828-832

Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipe V (2006) Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol* 45:654-661

Cauli O, López-Larrubia P, Rodrigo R (2011) Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 140:638-645

Cauli O, Mansouri MT, Agusti A, Felipo V (2009) Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology* 136:1359-1367

Chadipiralla K, Reddanna P, Chinta RM (2012) Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochem Res* 37:59-68

Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ (2006) The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* 7:271-275

Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF (2000) Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* 37:243-248

Chen J, Berry MJ (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 86:1-12

Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH (2009) Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells *in vitro* and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 50:1914-1923

Chernyak BV, Bernardi P (1996) The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem* 238:623-630

Chikhi N, Holic N, Guellaen G, Laperche Y (1999) Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B* 122: 367-380

Chiu A, Fan ST (2006) MARS in the treatment of liver failure: controversies and evidence. *Int Artif Organs* 29:660-667

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol – chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci* 91:3680-3684

Clarke DD, Sokoloff L (1999) Circulation and energy metabolism of the brain. W: Sigel GJ, Agrano BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Red.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 637-669

Clemmensen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P (1999) Cerebral herniation in patients with acute liver is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29:648-653

Colell A, Coll O, Garcia-Ruiz C, Paris R, Tiribelli C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC (2001) Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. *Hepatology* 34:964-971

Colell A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC (1998) Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 115:1541-1551

Colell A, Garcia-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodes J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC (1997) Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-l-methionine. *Hepatology* 26:699-708

Coll O, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC (2003) Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 38:692-702

Conn HO (1994) The hepatic encephalopathies. W: *Hepatic encephalopathy: syndromes and therapies*. Conn HO, Bircher J (Red.) Medi-Ed Press, Bloomington. 1-12

Conn HO, Leevy CM, Vlahcevic ZR, Rodgers JB, Maddrey WC, Seeff L, Levy LL (1977) Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial. *Gastroenterology* 72:573-583

Conn HO, Lieberthal M (1979) *The hepatic coma syndromes and lactulose*. Williams & Wilkins, Baltimore

Conrad M, Schick J, Friedmann Angeli JP (2013) Glutathione and thioredoxin dependent systems in neurodegenerative disease: What can be learned from reverse genetics in mice. *Neurochem Int* 62:738-749

Cooper AJ, Kristal BS (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* 378:793-802

Cooper AJ, McDonald JM, Gelbard AS, Gledhill RF, Duffy TE (1979) The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain. *J Biol Chem* 254:4982-4992

Cooper AJ, Plum F (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* 67:440-519

Cordoba J, Gottstein J, Blei AT (1996) Glutamine, myoinositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia induced brain edema. *Hepatology* 24:919-23

Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R (2008) Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antiox Redox Signal* 10:445-473

De Palma A, Prezioso G, Spagnoletta A, Genchi G, Scalera V (2010) The oxoglutarate/malate carrier of rat brain mitochondria operates by a uniport exchange mechanism. *J Bioenerg Biomembr* 42:371-379

Deignan JL, Cederbaum SD, Grody WW (2008) Contrasting features of urea cycle disorders in human patients and knockout mouse models. *Mol Genet Metab* 93:7-14

Deponte M (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1830:3217-3266

Desjardins P, Rao KV, Michalak A, Rose C, Butterworth RF (1999) Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis* 14:273-280

Dikalov S (2011) Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 51:1289-1301

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Wakabayashi N (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochem* 44:6889-6899

Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-KruÈger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, CueÅnod M (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebro spinal fluid and prefrontal cortex *in vivo*. *Eur J Neurosci* 12:3721-3728

Dolińska M, Hilgier W, Albrecht J (1996) Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neurosci Lett* 213:45-48

Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-4916

Dringen R, Hamprecht B (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem* 67:1375-1382

- Dringen R, Hamprecht B, Bröer S (1998) The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 71:388-393
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562-569
- Duffy TE, Plum F, Cooper AJL (1983) Cerebral ammonia metabolism *in vivo*. W:Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A (Red.) Liss, Nowy Jork. 371-388
- Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Pires RF, Gus G, Kalil AM, Wajner M (1989) Reduced locomotor activity of rats made histidinemic by injection of histidine. *J Nutr* 119:1223-1227
- Ede RJ, Williams RW (1986) Hepatic encephalopathy and cerebral edema. *Semin Liver Dis* 6:107-118
- Erceg S, Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Llansola M, Piedrafita B, Felipo V (2006) Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure. Therapeutic implications. *Neurochem Int* 48:441-446.
- Erickson MC, Hultin HO (1988) A unique role of histidine in Fe-catalyzed lipid oxidation by fish sarcoplasmic reticulum. *Basic Life Sci* 49:307-312
- Erickson MC, Hultin HO (1992) Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Biophys* 292:427-432
- Faff-Michalak L, Albrecht J (1991) Aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase activities in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: effects of *in vitro* treatment with ammonia, hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 6:187-197
- Faff-Michalak L, Albrecht J (1993) The two catalytic components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: comparison of the response to *in vitro* treatment with ammonia, hyperammonemia, and hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 18:119-123
- Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67:259-279
- Feng L, Zhao B, Chen G, Jiang W, Liu Y, Jiang J, Hu K, Li S, Zhou X (2013) Effects of dietary histidine on antioxidant capacity in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) *Fish Physiol Biochem* 39:559-571
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002) Hepatic encephalopathy – definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the Working Party at the 11th World Congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35:716-721

Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N (1991) Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies *in vitro* and *in vivo* and susceptibility to oxidant stress. *J Clin Invest* 87:397-405

Fernandez-Checa JC, Hirano T, Tsukamoto H, Kaplowitz N (1993) Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 10:469-475

Fogel WA, Andrzejewski W, Maslinski C (1991) Brain histamine in rats with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 56:38-43

Forrester M, Seth D, Hausladen A, Christine EE, Foster MW, Matsumoto A, Benhar M, Marshall HE, Stamler JS (2009) Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a feedback regulator of S-nitrosylation. *J Biol Chem* 284:36160-36166

Frade J, Pope S, Schmidt M, Dringen R, Barbosa R, Pocock J, Laranjinha J, Heales S (2008) Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes a possible neuroprotective mechanism? *J Neurochem* 105:1144-1152

Ganda OP, Ruderman NB (1976) Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism* 25:427-435

Garcia TB, Oliveira KRM, Nascimento JLM, Crespo-Lopez ME, Picanco-Diniz DLW, Mota TC, Herculano AM (2011) Glutamate Induces Glutathione Efflux Mediated by Glutamate/Aspartate Transporter in Retinal Cell Cultures. *Neurochem Res* 36:412-418

García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Foyer CH, Pallardó FV (2013) Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta* 1830:3304-3316

García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Kaplowitz N (1992) Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles. *J Biol Chem* 267:22256-22264

Garcia-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC (1994) Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest* 94:193-201

Gebhardt R, Mecke D (1983) Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells *in situ* and in primary culture. *EMBO J* 2:567-570

Gegg ME, Clark JB, Heales SJ (2005) Co-culture of neurones with glutathione deficient astrocytes leads to increased neuronal susceptibility to nitric oxide and increased glutamate-cysteine ligase activity. *Brain Res* 1036:1-6

Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, Varela E, Cadelina G, Martinez M, Lopez-Talavera JC, Esteban R, Groszmann RJ, Guardia J (1999) Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 94:169-177

- Ghezzi P (2013) Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1830:3165-3172
- Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I (2004) S-glutathionylation: from redox regulation of protein function to human diseases. *J Cell Mol Med* 8:201-212
- Globus MYT, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg M (1995) Glutamate release and free radical production following brain injury: Effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem* 65:1704-1711
- Goulenok C, Bernard B, Cadranel JF, Thabut D, Di Martino V, Opolon P, Poynard T (2002) flumazenil vs. placebo in hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 16:361-372
- Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D (2013) Gene Expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology* 57:2436-2447
- Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Hongen A, Häussinger D, Scaliest F (2003) Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37:334-342
- Görg B, Qvarthava N, Bidmon HJ, Palomelo-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D (2010) Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 52:256-265
- Görg B, Qvarthava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D (2008) Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain *in vivo*. *Hepatology* 48:567-579
- Görg B, Qvarthava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F (2007) Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett* 581:84-90
- Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH (1999) Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 86:2-8
- Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD (1985) Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:404-414
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-212
- Griffith OW, Meister A (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4668-4672
- Günther V, Lindert U, Schaffner W (2012) The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta* 1823:1416-1425

- Haghighat N, McCandless DW, Geraminegad P (2000) The effect of ammonium chloride on metabolism of primary neurons and neuroblastoma cells *in vitro*. *Metab Brain Dis* 15:151-162
- Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP (1997) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272:3346-3354
- Hallik M, Tamme K, Väli T, Starkopf J (2011) Successful liver transplantation after 21 days of hepatic coma. *ASAIO J* 57:545-546
- Hammond CL, Lee TK, Ballatori N (2001) Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 34:946-954
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antiox Redox Signal* 19:1539-1605
- Hansen JM, Zhang H, Jones DP (2006) Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions, *Free Radic Biol Med* 40:138-145
- Harrison PM, Wendon JA, Gimson AES, Alexander GJM, Williams R (1991) Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 324:1852-1857
- Hauser RA, Zesiewicz TA, Martinez C, Rosemergy AS, Olanow CW (1996) Blood manganese correlates with brain magnetic resonance imaging changes in patients with liver disease. *Can J Neurol Sci* 23:95-98
- Hauser RA, Zesiewicz TA, Rosemergy AS, Martinez C, Olanow CW (1994) Manganese intoxication and chronic liver failure. *Ann Neurol* 36:871-875
- Hazama H, Ito M, Hirano M, Uchimura H (1976) Monoamine oxidase activities in neuronal and glial fractions from regional areas of rat brain. *J Neurochem* 26:417-419
- Häussinger D, Görg B (2010) Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:87-92
- Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F (2005) Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20:285-294
- Häussinger D, Schliess F (2005) Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 47:64-70
- Hayashi M (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathol* 29:1-8
- Hayes JD, McMahon M (2009) NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 34:176-188

He M, Cai J, Go JM, Johnson JM, Martin DW, Hansen JM, Jones DP (2008) Identification of Thioredoxin-2 as a Regulator of the Mitochondrial Permeability Transition. *Toxicol Sciences* 105:44-50

He Y, Hakvoort TB, Köhler SE, Vermeulen JL, de Waart DR, de Theije C, ten Have GA, van Eijk HM, Kunne C, Labruyere WT, Houten SM, Sokolovic M, Ruijter JM, Deutz NE, Lamers WH (2010) Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *J Biol Chem* 285:9516-9524

He X, Ma Q (2012) Redox regulation by nuclear factor erythroid 2-related factor 2: gatekeeping for the basal and diabetes-induced expression of thioredoxin-interacting protein. *Mol Pharmacol* 82:887-897

Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain *in vivo* following acute ammonia intoxication: characterization by *in vivo* brain microdialysis. *Hepatology* 31:709-715

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* 22:179-184

Hilgier W, Albrecht J, Krasnicka Z (1983) Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropatol Pol* 21:487-494

Hilgier W, Albrecht J, Lisy V, Stastny F (1990) The effect of acute and repeated hyperammonemia on gamma-glutamyl transpeptidase in homogenates and capillaries of various rat brain regions. *Mol Chem Neuropathol* 13:47-56

Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2003) Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 468:21-25

Hilgier W, Benveniste H, Diemer NH, Albrecht J (1991) Decreased glucose utilization in discrete brain regions of rat in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy as measured with [³H]-deoxyglucose. *Acta Neurol Scand* 83:353-355

Hilgier W, Fręsko I, Klemenska E, Beręsewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J, Zielińska M (2009) Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiol Dis* 35:75-81

Hilgier W, Kocki T, Obara-Michlewska M, Turski WA, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2014) Modulation by kynurenine of extracellular kynurenate and glutamate in cerebral cortex of rats with acute liver failure. *Pharmacol Rep* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.007>

Hilgier W, Olson JE (1994) Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 62:197-204

Hilgier W, Węgrzynowicz M, Ruszkiewicz J, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2010) Direct exposure to ammonia and hyperammonemia increase the extracellular accumulation and degradation of astroglia-derived glutathione in the rat prefrontal cortex. *Toxicol Sciences* 117:163-168

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

Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3633-3638

Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:27891-27897

Hirrlinger J, Schulz JB, Dringen R (2002) Glutathione Release From Cultured Brain Cells: Multidrug Resistance Protein 1 Mediates the Release of GSH From Rat Astroglial Cells. *J Neurosci Res* 69:318-326

Hohnholt MC, Dringen R (2014) Short time exposure to hydrogen peroxide induces sustained glutathione export from cultured neurons. *Free Radic Biol Med* 70:33-44

Holmgren A (1968) Thioredoxin. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur J Biochem* 6:475-484

Holmgren A (1977) The function of thioredoxin and glutathione in deoxyribonucleic acid synthesis. *Biochem Soc Trans* 5:611-612

Holmgren A, Björnstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Meth Enzymol* 252:199-208

Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L, Kroemer G (1997) Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 410:373-377

Hourani BT, Hamlin EM, Reynolds TB (1971) Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Arch Intern Med* 127:1033-1036

Huang C, Anderson ME, Meister A (1993a) Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268:20578-20583

Huang C, Chang L, Anderson ME, Meister A (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268:19675-19680

- Huang CH, Liu PZ (2001) New insight into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol Dis* 27:90-101
- Hultberg M, Hultberg B (2005) Glutathione turnover in human cell lines in the presence of agents with glutathione influencing potential with and without acivicin inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochim Biophys Acta* 1726:42-47
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1496-1502
- Igarashi K, Kataokata K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M (1994) Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 367:568-572
- Ikeda Y, Mochizuki Y, Matsumoto H, Nakamura Y, Dohi K, Jimbo H, Shimazu M, Hayashi M, Matsumoto K (2000) L-histidine but not D-histidine attenuates brain edema following cryogenic injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 76:195-197
- Irisawa Y, Adachi N, Liu K, Arai T, Nagaro T (2008) Alleviation of ischemia induced brain edema by activation of the central histaminergic system in rats. *J Pharmacol Sci* 108:112-123
- Itzhak Y, Norenberg MD (1994) Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [³H]PK 11195. *Neurosci Lett* 177:35-38
- 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
- Jalan R, Damink SWMO, Deutz NEP, Lee A, Hayes PC (1999) Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354:1164-1168
- Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ (2007) L-Ornithinephenylacetate: a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 69:1064-1069
- Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73:889-902
- Janaky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS (2000) Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem Res* 25:1397-1405
- Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush 3rd B, Reddy PV, Norenberg MD (2008) Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* 283:33874-33882

Jayakumar AR, Panickar KS, Norenberg MD (2002) Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J Neurochem* 83:1226-1234

Jayakumar AR, Rao KVR, Murthy CRK, Norenberg MD (2006) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* 48:623-628

Jayakumar AR, Rao KVR, Schousboe A, Norenberg MD (2004) Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46:296-301

Jayakumar AR, Valdes V, Norenberg MD (2011) The Na-K-Cl cotransporter in the brain edema of acute liver failure. *J Hepatol* 54:272-278

Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2009) Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:944-952

Joo F, Kovacs J, Szerdahelyi P, Temesvari P, Tosaki A (1994) The role of histamine in brain oedema formation. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:76-78

Jordan A, Reichard P (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67:71-98

Joshi G, Johnson JA (2012) The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7:218-229

Kalaitzakis E, Björnsson E (2007) Renal function and cognitive impairment in patients with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 42:1238-1244

Kamga C.K; Zhang SX; Wang Y (2010) Dicarboxylate carrier-mediated glutathione transport is essential for reactive oxygen species homeostasis and normal respiration in rat brain mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C497-C505

Kaminsky Y, Kosenko E (2009) Brain purine metabolism and xanthine dehydrogenase/oxidase conversion in hyperammonemia are under control of NMDA receptors and nitric oxide. *Brain Res* 1294:193-201

Kannan R, Chakrabarti R, Tang D, Kim KJ, Kaplowitz N (2000) GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Naq-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res* 852:374-382

Kannan R, Kuhlenkamp JF, Jeandidier E, Trinh H, Ookhtens M, Kaplowitz N (1990) Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest* 85:2009-2013

Kannan R, Mittur A, Bao Y, Tsuruo T, Kaplowitz N (1999) GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *J Neurochem* 73:390-399

- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 47:1304-1309
- Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R (1992) Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15:1060-1066
- Katsuoka F, Motohashi H, Ishii T, Aburatani H, Engel JD, Yamamoto M (2005) Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* 25:8044-8051
- Kawamoto T, Ikeda Y, Teramoto A (1997) Protective effect of L-histidine on transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Nerve* 49: 612-618
- Kircheis G, Nilius R, Held C, Berndt H, Buchner M, Görtelmeyer R, Hendricks R, Krüger B, Kuklinski B, Meister H, Otto HJ, Rink C, Rösch W, Stauch S (1997) Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of placebo – controlled, double – blind study. *Hepatology* 25:1351-1360
- Klatt P, Lamas S (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267:4928-4944
- Klejman A, Węgrzynowicz M, Szatmari EM, Mioduszevska B, Hetman M, Albrecht A (2005) Mechanism of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: Roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem Int* 47:51-57
- Klingenberg M (1979) Overview on mitochondrial metabolite transport systems, *Meth Enzymol* 56:245-252
- 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* 229:201-203
- Knickelbein RG, Ingbar DH, Seres T, Snow K, Johnston RB Jr, Fayemi O, Gumkowski F, Jamieson JD, Warshaw JB (1996) Hyperoxia enhances expression of gamma-glutamyl transpeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung. *Am J Physiol* 270:L115-L122
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26:221-229
- Kobayashi M, Yamamoto M (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46:113-140
- Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3175-3179

Kojer K, Bien M, Gangel H, Morgan B, Dick TP, Riemer J (2012) Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *EMBO J.* 31:3169-3182

Koppal T, Drake J, Yatin S, Jordan B, Varadarajan S, Bettenhausen L, Butterfield DA (1999) Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:310-317

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Grisolia S, Felipe V (1995) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem Res* 20(4):451-456

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipe 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

Kosenko E, Kaminsky A, Kaminsky Y, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipe V (1997) Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Rad Res* 1997; 27: 637-644.

Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipe V (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radical Biol Med* 26:1369-1374

Kosenko E, Kaminsky Y, Solomadin I, Marov N, Venediktova N, Felipe V, Montoliu C (2007) Acute ammonia neurotoxicity *in vivo* involves increase in cytoplasmic protein P53 without alterations in other markers of apoptosis. *J Neurosci Res* 85:2491-2499

Kosenko E, Kaminsky Y, Stavroskaya IG, Felipe V (2000) Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain *in vivo*. *Brain Res* 880:139-146

Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipe V (2003b) Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int* 43:493-499

Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipe V (2003a) Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication *in vivo*. *Brain Res* 981:193-200

Kowaltowski AK, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495:12-15

Krahenbuhl S, Stucki J, Reichen J (1992) Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis, *Hepatology* 15:1160-1166

- Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J (1995) Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 22:607-612
- Kranich O, Dringen R, Sandberg M, Hamprecht B (1998) Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* 22:11-18
- Kranich O, Hamprecht B, Dringen R (1996) Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett* 219:211-214
- Kreis R, Farrow N, Ross BD (1990) Diagnosis of hepatic encephalopathy by proton magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* 336:635-636
- Kröncke KD (2001) Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 3:565-575
- Kröncke KD (2007) Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch Biochem Biophys* 463:183-187
- Kröncke KD, Klotz LO (2009) Zinc fingers as biological redox switches ? *Antioxid Redox Signal* 11:1015- 1027
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Häussinger D (2011) Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem* 392:1155-1165
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D (2009) Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia* 57:79-92
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22(9):2883-2892
- La Bella V, Valentino F, Piccoli T, Piccoli F (2007) Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger(xc-) in the rat. *Neurochem Res* 32:1081-1090
- 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
- Lash LH (2005) Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:329-342
- Lash LH (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* 163:54-67

Laubenberger J, Häussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M (1997) Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 112:1610-1616

Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP (1996) Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 52:967-977

Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF (1990) Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 11:874-878

Leevy C (2007) Economic impact of treatment options for hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis (Suppl)* 2:26-31

Les I, Doval E, García-Martínez R, Planas M, Cárdenas G, Gómez P, Flavià M, Jacas C, Mínguez B, Vergara M, Soriano G, Vila C, Esteban R, Córdoba J (2011) Effects of branched-chain amino acids supplementation in patients with cirrhosis and a previous episode of hepatic encephalopathy: a randomized study. *Am J Gastroenterol* 106:1081-1088

Levy HL, Taylor RG, McInnes RR (2001) Disorders of histidine metabolism. W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Red.) *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. McGraw-Hill, New York, 1807-1820

Levy HL, Yu JJ, Waisbren SE (2004) Maternal histidinaemia: pregnancies and offspring outcomes. *J Inher Metab Dis* 27:197-204

Li XQ, Dong L, Liu ZH, Luo JY (2005) Expression of gamma-aminobutyric acid A receptor subunits alpha1, beta1, gamma2 mRNA in rats with hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 11:3319-3322

Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, Frederickson CJ (2001) Rapid translocation of Zn²⁺ from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* 86:2597-2604

Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 273:16184-16191

Li Y, Omori K, Suzukawa J, Inagaki C (2004) Calcineurin-mediated BAD Ser-155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 357:73-75

Liddell JR, Dringen R, Crack PJ, Robinson SR (2006) Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia* 54:873-879

- Liu W, Liu T, Yin M (2008) Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. *Food Chem Toxic* 15030-1509
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408
- Lockwood AH, Yap EW, Wong WH (1991) Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:337-341
- Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC (1997) Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res* 57:5238-5242
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594-1601
- Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L, Rocheleau B, Pannunzio M, Huet PM, Butterworth RF (2004) Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol* 40:742-748
- Lozeva V, Tuomisto L, Tarhanen J, Butterworth RF (2003) Increased concentrations of histamine and its metabolite, tele-methylhistamine and down-regulation of histamine H3 receptor sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *J Hepatol* 39:522-527
- Lozeva-Thomas V, Ahonen P, Chatauret N, Tuomisto L, Butterworth RF (2004) Brain histamine in experimental acute liver failure: effects of L-histidine loading. *Inflamm Res* 53(Suppl)1:S55-S56
- Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830:3143-3153
- Mans AM, Biebuyck JF, Shelly K, Hawkins RA (1982) Regional blood-brain barrier permeability to amino acids after portacaval anastomosis. *J Neurochem* 38:705-717
- Mao Q, Deeley RG, Cole SP (2000) Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 275:34166-34172
- Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antiox Redox Signal* 11:2685-2700
- Markey CM, Rudolph DB, Labus JC, Hinton BT (1998) Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J Androl* 19:92-99

- Martinez A (1968) Electron microscopy in human hepatic encephalopathy. *Acta Neuropathol* 11:82-86
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358
- Master S, Gottstein J, Blei AT (1999) Cerebral blood flow and the development of ammonia induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 30:876-880
- Mastrocola R, Restivo F, Vercellinatto I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, Boccuzzi G (2005) Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* 187:37-44
- Matheson IBC, Lee J (1979) Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 29:279-281
- McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, and Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:3170-3174
- Medvedeva YV, Lin B, Shuttleworth CW, Weiss JH (2009) Intracellular Zn²⁺ accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen-glucose deprivation model of ischemia. *J Neurosci.*29:1105-1014
- Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 70:701-748
- Meister A (1988) On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci*13:185-188
- Meredith MJ, Reed DJ (1982) Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 257:3747-3753
- Michalak A, Rose C, Butterworth RF (2001) Loss of noradrenaline transporter sites in frontal cortex of rats with acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int* 38:25-30
- 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
- Minich T, Reimer J, Schulz JB, Wielinga P, Wijnholds J, Dringen R (2006) The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J Neurochem* 97:373-384
- Monfort P, Corbalan R, Martinez L, Lopez-Talavera J, Cordoba J, Felipe V (2001) Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neurosci* 104:1119-1125

- Morken TS, Sonnewald U, Aschner M, Syversen T (2005) Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture. *Toxicol Sci* 87:169-175
- Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C (1983) The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 40:850-854
- Mullen KD, Dasarathy S (2004) Protein restriction in hepatic encephalopathy: necessary evil or illogical dogma? *J Hepatol* 41:147-148
- Mullen KD, Szauter KM, Kaminsky-Russ K (1990) "Endogenous" benzodiazepine activity in body fluids of patients with hepatic encephalopathy. *Lancet* 336:81-83
- Mumtaz K, Azam Z, Hamid S, Abid S, Memon S, Ali Shah H, Jafri W (2009) Role of N-acetylcysteine in adults with non – acetaminophen – induced acute liver failure in a center without the facility of liver transplantation. *Hepatol Int* 3:563-570
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13
- Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J* 4:1624-1633
- Murthy CR, Bender AS, Dombro RS, Bai G, Norenberg MD (2000) Elevation of glutathione levels by ammonium ions in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int* 37:255-268
- Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (2001) Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 66:282-288
- Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, Kato M, Nakamura T, Higuchi K, Nishiguchi S, Kumada H (2005) Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:705-713
- Muyderman H, Nilsson M, Sims NR (2004) Highly Selective and Prolonged Depletion of Mitochondrial Glutathione in Astrocytes Markedly Increases Sensitivity to Peroxynitrite. *J Neurosci* 24:8019-8028
- Muyderman H, Nilsson M, Sims NR (2007) Mitochondrial glutathione protects against cell death induced by oxidative and nitrate stress in astrocytes *J Neurosci* 102:1369-1382
- Nagy I, Floyd RA (1984) Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. *Biochim Biophys Acta* 790:238-250
- Negru T, Ghiea V, Pasarica D (1999) Oxidative injury and other metabolic disorders in hepatic encephalopathy. *Rom J Physiol* 36:29-36

Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ (1989) Glutathione measurement by high performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal Biochem* 179:236-241

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J Biol Chem* 284:13291-13295

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:233-260

Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, Genco P, Golde T, Richelson E, Dickson D, McKinney M, Eckman CB (2006) Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 44:1105-1114

Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J (1999) Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 274:21645-21650

Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK (2009) Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* 122:4452-4464

Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK (2013) Regulation of Nrf2- an update. *Free Rad Biol Med* 66:36-44

Norenberg MD, Bender AS (1994) Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir* 60:24-27

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

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV (2006) The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and ammonia neurotoxicity. W: Häussinger D, Kircheis G, Schliess F (Red.) *Hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism*. Springer. Dordrecht. 143-159

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310

Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2004) Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 36:303-307

Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G (2006) Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* 2006:1-6

- Obata T, Kubota S, Yamanaka Y (2001) Protective effect of histidine on para-nonylphenol-enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum. *Biochem Biophys Acta* 1568:171-175
- Ohara K, Aoyama M, Fujita M, Sobue K, Asai K (2009) Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 462:109-112
- Oishi R, Furuno K, Gomita Y, Araki Y, Saeki K (1989) Effect of acute treatment of mice with L-histidine on the brain levels of amino acids. *Japan J Pharmacol* 49:143-146
- Oldendorf WH (1973) Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids. *Am J Physiol* 224:967-969
- Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, VanLente F, Arroliga AC, Mullen KD (2003) Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 114:188-193
- Oppong KNW, Bartlett K, Record CO, Mardini HA (1995) Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* 22:553-258
- Ott P, Larsen FS (2004) Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* 44:185-198
- Oya Y, Yamamoto K (1988) The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of l-histidine. *Mutat Res* 198:233-240
- Paroni R, De Vecchi E, Cighetti G, Arcelloni C, Fermo I, Grossi A, Bonini P (1995) HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. *Clin Chem* 41:448-454
- Paxinos G, Watson C (2006) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Nowy Jork, Academic Press.
- Palmieri F (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447:689-709
- Panickar KS, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD (2007) Downregulation of the 18-kDa translocator protein: effects on the ammonia induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia* 55:1720-1727
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovskva V, Mckenzie G, Craignon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DA, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defences. *Nat Neurosci* 11(4):476-487

Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversal JL, Bernassau JM, Drieu K (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62:21-28

Pasantes-Morales H, Franco R, Ordaz B, Ochoa LD (2002) Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res* 33:237-44

Perry TL, Yong VW (1986) Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* 67:269-274

Peterson C, Giguere JF, Cotman CW, Butterworth RF (1990) Selective loss of N-methyl-D-aspartate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem* 55:386-390

Prakash R, Mullen KD (2010) Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:515-525

Rama Rao VL, Audet RM, Butterworth RF (1995) Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H] arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem* 65:677-681

Rama Rao KV, Bai G, Jayakumar AR, Norenberg MD (2001) Role of the peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in the induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Neurochem* 78(Suppl 1):25

Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (2003) Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis* 18:113-127

Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 47:31-38

Rama Rao KV, Norenberg MD (2012) Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 60:697-706

Rama Rao KV, Reddy PV, Tong X, Norenberg MD (2010) Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol* 176:1400-1408

Rana S, Dringen R (2007) Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 415:45-48

Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12:815-833

Rathinam ML, Watts LT, Stark AA, Mahimainathan L, Stewart J, Schenker S, Henderson GI (2006) Astrocyte control of fetal cortical neuron glutathione homeostasis: up-regulation by ethanol. *J Neurochem* 96:1289-1300

- Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 12:165-173
- Ravindranath V, Reed DJ (1990) Glutathione depletion and formation of glutathione-protein mixed disulfide following exposure of brain mitochondria to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 169:1075-1079
- Reddy PVB, Murthy CR, Reddanna P (2004) Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 368:15-20
- Reddy PVB, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD (2007) Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia* 55:801-809
- Reddy PVB, Rama Rao KV, Norenberg MD (2006) Histidine blocks ammonia-induced astrocyte swelling and the mitochondrial permeability transition. *J Neurochem* 96(Suppl 1):61
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D (2007) Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55:758-771
- Rigotti P, Jonung T, Peters JC, James JH, Fischer JE (1985) Methionine sulfoximine prevents the accumulation of large amino acids in brain of portacaval-shunted rats. *J Neurochem* 44:929-933
- Ripple MO, Henry WF, Rago RP, Wilding G (1997) Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89:40-48
- Robinson MB, Heyes MP, Anegawa NJ, Gorry E, Djali S, Mellits ED, Batshaw ML (1992) Quinolinic acid in brain and cerebrospinal fluid in rat models of congenital hyperammonemia. *Pediatr Res* 32:483-488
- Rojas DB, Gemelli T, de Andrade RB, Campos GA, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 37:1031-1036
- Romero-Gomez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galan JJ, Montoliu C, Baccaro E, Guevara M, Cordoba J, Soriano G, Navarro JM, Martinez-Sierra C, Grande L, Galindo A, Mira E, Manes S, Ruiz A (2010) Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. A cohort study. *Ann Intern Med* 153:281-288
- Rose C, Kresse W, Kettenmann H (2005) Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* 280:20937-20944
- Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF (2000) Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31:872-877

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

Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* 267:24161-24164

Sagara J, Miura K, Bannai S (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 61:1672-1676

Sagara J, Miura K, Bannai S (1993) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61:1667-1671

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian Thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase 1. *EMBO J* 17:2596-606

Sakurai E, Yamakami J, Sakurada T, Ochiai Y, Tanaka Y (2003) Blood-brain barrier carrier-mediated transport and metabolism of L-histidine. *Biogenic Amines* 17:335-348

Sandhu JK, Gardaneh M, Iwaszow R, Lanthier P, Gangaraju S, Ribocco-Lutkiewicz M, Tremblay R, Kiuchi K, Sikorska M (2009) Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol Dis* 33:405-414

Saran T, Hilgier W, Kocki T, Urbanska EM, Turski WA, Albrecht J (1998) Acute ammonia treatment *in vitro* and *in vivo* inhibits the synthesis of a neuroprotectant kynurenic acid in rat cerebral cortical slices. *Brain Res* 787:348-350

Saransaari P, Oja SS, Borkowska HD, Kostinaho J, Hilgier W, Albrecht J (1997) Effects of thioacetamide-induced hepatic failure on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex, striatum and hippocampus: binding of different ligands and expression of receptor subunit mRNA's. *Mol Chem Neurobiol* 32:179-194

Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P (2007) Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* 32:517-524

Satpute RM, Lomash V, Hariharakrishnan J, Rao P, Singh P, Gujar NL, Bhattacharya R (2014) Oxidative stress and tissue pathology caused by subacute exposure to ammonium acetate in rats and their response to treatments with alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. *Toxicol Ind Health* 30:12-24

Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191-1212

- Scheiber IF, Gringen R (2011) Copper-treatment increases the cellular GSH content and accelerates GSH export from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 498:42-46
- Schiodt FV, Atillasoy E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KV, Stribling R, Crippin JS, Flamm S, Somberg KA, Rosen H, McCashland TM, Hay JE, Lee WM (1999) Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl Surg* 5:29-34
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 16:739-741
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911
- Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 71:1-51
- Schwartz JC, Lampart C, Rose C (1972) Histamine formation in the brain *in vivo*: effects of histidine loads. *J Neurochem* 19:801-810
- Serafim KR, Kishi M, Canto-de-Souza A, Mattioli R (2010) L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 43:100-106
- Sergeeva OA, Schulz D, Doreulee N, Ponomarenko AA, Selbach O, Borsch E, Kircheis G, Huston JP, Haussinger D, Haas HL (2005) Deficits in cortico-striatal synaptic plasticity and behavioral habituation in rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* 134:1091-1098
- Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M (2001) The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res* 902:156-163
- Sharma HS, Nyberg F, Cervos-Navarro J, Dey PK (1992) Histamine modulates heat stress-induced changes in blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and serotonin levels: an experimental study in conscious young rats. *Neuroscience* 50:445-454
- Shen J, Petersen KF, Behar KL, Brown P, Nixon TW, Mason GF, Petroff OA, Shulman GI, Shulman RG, Rothman DL (1999) Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by *in vivo* ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8235-8240
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394-3406
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36:348-355

- Sims NR, Anderson MF (2008) Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature Prot* 3(7):1228-1239
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 271:18596-18603
- Singh S, Koiri RK, Trigun SK (2008) Acute and chronic hyperammonemia modulate antioxidant enzymes differently in cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem Res* 33:103-113
- Skowrońska M, Albrecht J (2012) Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res* 21:236-244
- Skowrońska M, Zielinska M, Albrecht J (2010) Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia-treated astrocytes. *J Neurochem* 115:1068-1076
- Slivka A, Spina MB, Cohen G (1987) Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neuroscience Letters*. 74:112-118
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- Snyder SH, McEnery MW, Verma A (1990) Molecular mechanisms of peripheral benzodiazepine receptors. *Neurochem Res* 15:119-123
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142:128-130
- Song G, Dhodda VK, Blei AT, Dempsey RJ, Rao VL (2002) GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *J Neurosci Res* 68:730-737
- Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, Bui L, Therrien G, Milette PCPC, Lebrun LH, Zayed J, Leblanc A, Pomier-Layrargues G (1996) Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* 24:1116-1120
- Spindel ON, World C, Berk BC (2012) Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms. *Antiox Redox Signal* 16:587-596
- Stastný F, Hilgier W, Albrecht J, Lisy V (1988) Changes in the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in brain microvessels, astroglial cells and synaptosomes derived from rats with hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett* 84:323-328
- Steinbrenner H, Sies H (2013) Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. *Arch Biochem Biophys* 536:152-157

Stravitz TR, Kramer AH, Davern T, Shaikh OAS, Caldwell SH, Mehta RL, Blei AT, Fontana RJ, McGuire BM, Rossaro L, Smith AD, Lee WM (2007) Intensive care patients with acute liver failure: Recommendations of the U.S. Acute Liver Failure Study Group. *Crit Care Med* 35:2498-2508

Suarez I, Bodega G, Fernandez B (2000) Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res* 859:293-302

Suzuki O, Ishii K, Nagata H, Miyairi M, Mizuno Y, Kiryu Y, Tsuchiya M (1979) Role of plasma histamine in liver injury -clinical and experimental investigations. *Gastroenterol Jpn* 14:336-343

Svoboda N, Kerschbaum HH (2009) L-Glutamine-induced apoptosis in microglia is mediated by mitochondrial dysfunction. *Eur J Neurosci* 30:196-206

Swapna I, Sathya Sai Kumar KV, Murthy CRK, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B (2006b) Changes in cerebral membrane lipid composition and fluidity during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 98:1899-1907

Swapna I, Sathya Sai Kumar KV, Murthy CRK, Senthilkumaran B (2006a) Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during acute ammonia intoxication. *Neuro Toxicol* 27:402-408

Tachon P, Giacomoni PU (1989) Histidine modulates the clastogenic effect of oxidative stress. *Mutat Res* 211(1):103-109

Takahashi Y, Oakes SM, Williams MC, Takahashi S, Miura T, Joyce- Brady M (1997) Nitrogen dioxide exposure activates gamma-glutamyl transferase gene expression in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:388-396

Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, Deguchi K, Tian F, Shang J, Matsuura T, Abe K (2011) Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidant proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1370:246-253

Tansini CM, Durigon K, Testa CG, Bello-Klein A, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2004) Effects of histidine and imidazolelactic acid on various parameters of the oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 22:67-72

Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H (1977) Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 107:51-60

Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK (2011) Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochem (Mosc)* 76(4):407-422

Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jørgensen L, Larsen FS (2006) Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and

correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:21-27

Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Kimura J, Hori K, Yodoi J (1993) Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in gerbil brain after transient global ischemia. *Brain Res* 625:1-8

Toris GT, Bikis CN, Tsourouflis GS, Theocharis SE (2011) Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med Sci Monit* 17:RA53-RA63

Tulpule K, Dringen R (2011) Formaldehyde stimulates Mrp1-mediated glutathione deprivation of cultured astrocytes. *J Neurochem* 116:626-635

Tulpule K, Hohnholt MC, Dringen R (2013) Formaldehyde metabolism and formaldehyde-induced stimulation of lactate production and glutathione export in cultured neurons. *J Neurochem* 125:260-272

Ueno M, Masutani H, Arai RJ, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, Inamoto T, Yamaoka Y, Yodoi J, Nikaiso T (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274:35809-35815

Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 839:62-70

Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118

Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237:415-417

Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD (2010) Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antiox Redox Signal* 13(11):1699-1712

Vogel C, Monteiro Silva G, Marcotte EM (2011) Protein expression regulation under oxidative stress. *Mol Cell Proteomics* DOI: 10.1074/mcp.M111.009217

Vogels BA, Maas MA, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RA (1997) Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology* 25(4):820-827

Wade MA, Tucker HN (1998) Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem* 9:308-315

Wadey AL, Muyderman H, Kwek PT, Sims NR (2009) Mitochondrial glutathione uptake: characterization in isolated brain mitochondria and astrocytes in culture. *J Neurochem* 109:101-108

Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Muller M (1979) Hepatic mitochondrial cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett* 97:138-141

Wallin C, Puka-Sundvall M, Hagberg H, Weber SG, Sandberg M (2000) Alterations in glutathione and amino acid concentrations after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Dev Brain Res*. 125:51-60

Wang XF, Cynader MS (2000) Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem* 74:1434-1442

Wang W, Lv S, Zhou Y, Fu J, Li C, Liu P (2011) Tumor necrosis factor- α affects blood-brain barrier permeability in acetaminophen-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23:552-558

Warren KS, Schenker S (1964) Effect of an inhibitor of glutamine synthesis (methionine sulfoximine) on ammonia toxicity and metabolism. *J Lab Clin Med* 64:442-449

Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess F, Häussinger D (2002) Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain *in vivo*. *Glia* 40:324-336

Wasserman W, Fahl WE (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5361-5366

Weber FL, Friedman DW, Fresard KM (1988) Ammonia production from intraluminal amino acids in canine jejunum. *Am J Physiol* 254:G264-G268

Weintrob A, Buster B, Townsend G, Scheld WM (1993) The effect of L-histidine on blood-brain barrier permeability during experimental *Haemophilus influenzae* meningitis. Abstrakt prezentacji University of Virginia, Charlottesville

Węgrzynowicz M, Hilgier W, Dybel A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2007) Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia *in vivo* and in cultured glial cells: The role of cystine uptake. *Neurochem Int* 50:883-889

Węgrzynowicz M (2008) Glutation w neurotoksyczności amoniaku: interakcje astrocyt – neuron. Praca doktorska.

White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ (2003) Fluorescence – based microtiter plate assay for glutamate – cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 318:175-180

Whitfield JB (2001) Gamma- glutamyl -transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38(4):263-355

Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased

inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3:1275-1279

Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW (1996) Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 71:589-599

Winterbourn CC, Metodiewa D (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 314:284-290

Wolpert E, Phillips SF, Summerskill WH (1970) Ammonia production in the human colon. Effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. *N Engl J Med* 283:159-164

Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R (2007) Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* 22:375-388

Wrong OM, Vince AJ, Waterlow JC (1985) The contribution of endogenous urea to faecal ammonia in man, determined by ¹⁵N labeling of plasma urea. *Clin Sci (Lond)* 68:193-199

Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Loschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T (1999) Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res* 82:53-62

Xiang J, Fowkes RL, Keep RF (1998) Chloride plexus histidine transport. *Brain Res* 183:37-43

Yamakami J, Sakurai E, Sakurada T, Maeda K, Hikichi N (1998) Stereoselective blood-brain barrier transport of histidine in rats. *Brain Res* 812:105-112

Yan S, Wu S, Yin M, Chen H, Chen H (2010) Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J Food Sci* 74:259-265

Young SN, Lal S, Sourkes TL, Feldmuller F, Aronoff A, Martin JB (1975) Relationships between tryptophan in serum and CSF, and 5-hydroxyindoleacetic acid in CSF of man: effect of cirrhosis of liver and probenecid administration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38:322-330

Yu FX, Chai TF, He H, Hagen T, Lou Y (2010) Thioredoxin-interacting Protein (Txnip) Gene Expression. Sensing oxidative phosphorylation status and glycolytic rate. *J Biol Chem* 285:25882-25830

Zhan T, Stremmel W (2012) The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int* 109:180-187

Zhang H, Forman HJ (2009) Redox Regulation of γ -Glutamyl Transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:509-515

- Zhang H, Forman HJ, Choi J (2005) γ -Glutamyl Transpeptidase in glutathione Biosynthesis. *Meth Enzymol* 401:468-483
- Zhao P, Kalthorn TF, Slattery JT (2002) Selective mitochondrial glutathione depletion by ethanol enhances acetaminophen toxicity in rat liver. *Hepatology* 36:326-335
- Zhou BG, Norenberg MD (1999) Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci Lett* 276:145-148
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunol* 11:136-141
- Zielińska M, Law RO, Albrecht J (2003) Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int* 43:299-303
- Zielińska M, Ruszkiewicz J, Hilgier W, Fręsko I, Albrecht J (2011) Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter y+LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide /cGMP pathway. *Neurochem Int* 58:190-195
- Ziemińska E, Dolińska M, Łazarewicz JW, Albrecht J (2000) Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology* 21:295-300
- Zieve L (1987) Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2(3):147-165