

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

ZAKŁAD NEUROTOKSYKOLOGII

Krzysztof Milewski

**ROLA DWUMETYLOARGININ
I MECHANIZMY REGULUJĄCE ICH STĘŻENIE
W ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Magdaleny Zielińskiej**

WARSZAWA 2016

Pragnę serdecznie podziękować Pani dr hab. Magdalenie Zielińskiej za niebywałą życzliwość okazaną w ciągu minionych czterech lat. W szczególności w pamięci mej pozostanie dana mi możliwość samorealizacji i satysfakcja ze wspólnej pracy, które nie zawsze towarzyszą relacji mistrz-uczeń.

Krzysztof Milewski

Serdecznie dziękuję prof. Janowi Albrechtowi za cenne uwagi merytoryczne, które nieraz poszerzyły moje horyzonty myślowe.

Dziękuję również dr Wojciechowi Hilgierowi, znawcy techniki HPLC i szeroko pojętej „kuchni laboratoryjnej”, za wsparcie mnie dobrą radą na wielu etapach pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Inez Fręsko, która jak nikt inny potrafi mnie mobilizować do różnych działań. Twoja biegłość w postępowaniu ze zwierzętami była nieoceniona.

Pani Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś składam serdeczne podziękowania za pomoc w prowadzeniu hodowli komórkowych.

Panu dr Radosławowi Jaźwcowi ze Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas Zakładu Biofizyki IBB PAN w Warszawie dziękuję za pomoc w analizie składu pożywek hodowlanych.

Wszystkim koleżankom i koledze z Zakładu Neurotoksykologii dziękuję za wspólnie spędzony czas i przyjazną atmosferę wyróżniającą to miejsce.

Są w życiu chwile, gdy myśli się, że jest tak źle, iż już gorzej być nie może. Wtedy okazuje się, że żel wyciekł...

KM

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

1. **Milewski K**, Hilgier W, Albrecht J, Zielińska M. The dimethylarginine (ADMA)/nitric oxide pathway in the brain and periphery of rats with thioacetamide-induced acute liver failure: Modulation by histidine. *Neurochem Int.* 2015 Sep;88:26-31
2. Zielińska M, **Milewski K**, Skowrońska M, Gajos A, Ziemińska E, Beręsewicz A, Albrecht J. Induction of inducible nitric oxide synthase expression in ammonia-exposed cultured astrocytes is coupled to increased arginine transport by upregulated y(+)LAT2 transporter. *J Neurochem.* 2015 Dec;135(6):1272-81
3. **Milewski K**, Hilgier W, Fręsko I, Polowy R, Podsiadłowska A, Zołocińska E, Grymanowska AW, Filipkowski RK, Albrecht J, Zielińska M. Carnosine Reduces Oxidative Stress and Reverses Attenuation of Righting and Postural Reflexes in Rats with Thioacetamide-Induced Liver Failure. *Neurochem Res.* 2016 Feb;41(1-2):376-84.
4. Czarnecka A, **Milewski K**, Jaźwiec R, Zielińska M. Intracerebral Administration of S-Adenosylhomocysteine or S-Adenosylmethionine Attenuates the Increases in the Cortical Extracellular Levels of Dimethylarginines Without Affecting cGMP Level in Rats with Acute Liver Failure. *Neurotox Res.* 2016 Sep 8 (dostępne online)

Badania, których wyniki przedstawiono w rozprawie, były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego: NCN 2013/09/B/NZ4/00536 oraz zadania statutowego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| 1. Wykaz skrótów | 7 |
| 2. Wstęp | 10 |
| 2.1. Encefalopatia wątrobowa (EW) - charakterystyka ogólna | 10 |
| 2.2. Eksperymentalne modele EW | 11 |
| 2.3. Patomechanizm EW | 13 |
| 2.4. Rola syntezy tlenu azotu i stresu oksydacyjno-nitracyjnego (SON) w patomechanizmie encefalopatii wątrobowej | 16 |
| 2.4.1. Syntazy tlenu azotu (NOS)..... | 16 |
| 2.4.2. Synteza NO a zaburzenie przewodnictwa glutaminergicznego w EW | 18 |
| 2.4.3. Stres oksydacyjny i nitracyjny (SON) w EW | 20 |
| 2.5. L-arginina w OUN | 22 |
| 2.5.1. Transport Arg w OUN..... | 23 |
| 2.6. Metylowane pochodne argininy jako endogenne inhibitory syntezy NO | 25 |
| 2.6.1. Metabolizm metyloarginin | 26 |
| 2.6.2. Regulacja aktywności NOS przez metyloargininy | 30 |
| 2.6.3. Metyloargininy w EW | 31 |
| 2.7. Protekcyjna rola histydyny i karnozyny w EW | 33 |
| 3. Założenia i cele pracy | 37 |
| 4. Materiały i metody | 39 |
| 4.1. Modele zwierzęce | 39 |
| 4.1.1. Szczurzy model hiperamonemii prostej | 39 |
| 4.1.2. Szczurzy model ostrego uszkodzenia wątroby i suplementacja L-histydyną..... | 39 |
| 4.2. Hodowle komórkowe | 40 |
| 4.2.1. Pierwotna hodowla korowych astrocytów szczurzych | 40 |
| 4.2.2. Inkubacja astrocytów szczurzych z amoniakiem..... | 41 |
| 4.2.3. Wyciszenie ekspresji genu <i>Slc7a6</i> | 41 |
| 4.3. Analiza ekspresji genów | 42 |
| 4.3.1. Izolacja RNA z komórek i tkanek | 42 |
| 4.3.2. Pomiar stężenia i czystości RNA | 43 |
| 4.3.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji | 43 |
| 4.3.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) | 44 |
| 4.4. Oznaczanie białek metodą Western-blot | 45 |
| 4.4.1. Izolacja białka całkowitego z komórek i tkanek | 45 |
| 4.4.2. Elektroforetyczny rozdział białek i transfer na membranę nitrocelulozową | 46 |
| 4.5. Oznaczanie dimeryzacji eNOS | 47 |
| 4.6. Oznaczanie stężenia aminokwasów i pochodnych aminokwasów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) | 48 |
| 4.7. Pomiary aktywności enzymatycznej | 49 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.7.1. | Oznaczenie całkowitej aktywności proteolitycznej w wątrobie | 49 |
| 4.7.2. | Aktywność katalityczna DDAH | 50 |
| 4.7.3. | Aktywność katalityczna NOS | 50 |
| 4.7.4. | Aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2) | 51 |
| 4.8. | Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w homogenacie tkankowym..... | 52 |
| 4.9. | Pomiar ilości reaktywnych form tlenu (RFT) w homogenacie tkankowym..... | 52 |
| 4.10. | Analiza stężenia azotynów i azotanów w osoczu i mózgu | 53 |
| 4.11. | Izolacja mitochondriów..... | 54 |
| 4.12. | Wychwył znakowanej radioaktywnie [³H]L-argininy do szczurzych astrocytów korowych <i>in vitro</i> | 55 |
| 4.13. | Pomiar stężenia białka | 56 |
| 4.13.1. | Metoda Bradford | 56 |
| 4.13.2. | Metoda biuretowa..... | 56 |
| 4.14. | Oznaczenie stężenia ADMA i SDMA w pożywce hodowlanej metodą spektrometryczną | 57 |
| 4.15. | Analiza statystyczna wyników | 57 |
| 5. | <i>Wyniki</i> | 58 |
| 5.1. | Stężenie ADMA i SDMA w szczurzych modelach EW | 58 |
| 5.1.1. | Pomiar stężenia ADMA i SDMA w osoczu i homogenatach mózgu w szczurzym modelu HA | 58 |
| 5.1.2. | Pomiar stężenia ADMA i SDMA w osoczu i homogenatach mózgu w szczurzym modelu ostrego uszkodzenia wątroby (TAA). Wpływ podania His. | 59 |
| 5.2. | Metabolizm ADMA w szczurzym modelu ostrego uszkodzenia wątroby | 60 |
| 5.2.1. | Pomiar immunoreaktywności białek PRMT-1 i DDAH1/2 w wątrobie. Wpływ podania His. | 60 |
| 5.2.2. | Analiza ekspresji enzymów metabolizmu ADMA w korze mózgowej. Wpływ podania His. | 61 |
| 5.2.3. | Pomiar aktywności hydrolitycznej DDAH w wątrobie i korze mózgu. Wpływ podania His. 63 | 63 |
| 5.2.4. | Wpływ podanej egzogennie His na aktywność hydrolityczną DDAH w korze mózgu | 63 |
| 5.2.5. | Pomiar immunoreaktywności białka AGXT-2 w mitochondriach izolowanych z kory mózgowej. Wpływ podania His..... | 64 |
| 5.2.6. | Aktywność proteolityczna w wątrobie i korze mózgowej..... | 65 |
| 5.3. | Ekspresja i aktywność NOS w modelu TAA..... | 66 |
| 5.3.1. | Analiza ekspresji izoform NOS w korze mózgu. Wpływ podania His..... | 66 |
| 5.3.2. | Wpływ TAA i His na aktywność NOS w korze mózgowej | 68 |
| 5.3.3. | Wpływ TAA na dimeryzację eNOS i produkcję RFT. Wpływ podania His | 68 |
| 5.3.4. | Pomiar stężenia azotynów i azotanów w korze mózgu i osoczu. Wpływ podania His | 70 |
| 5.3.5. | Immunoenzymatyczne oznaczenie stopnia nitrozylacji tyrozyny w białkach osocza. Wpływ podania His..... | 71 |
| 5.4. | Analiza metabolizmu His oraz pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej i markerów prozapalnych w homogenatach mózgu w modelu TAA | 72 |
| 5.4.1. | Wpływ dootrzewnowego podania His na jej stężenie w osoczu i mózgu. Pomiar stężenia His i jej metabolitu karnozyny w osoczu i mózgu..... | 72 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.4.2. | Analiza metabolitów His w osoczu i korze mózgu | 74 |
| 5.4.3. | Wpływ TAA na immunoreaktywność syntazy karnozyny-1 (CARNS-1) w korze mózgu. | 74 |
| 5.4.4. | Pomiar aktywności cyklooksygenazy-2, stężenia TNF- α i ekspresji <i>Tnf-α</i> w korze mózgu. Wpływ podania His. | 75 |
| 5.5. | Pomiar stężenia ADMA i SDMA w hodowanych astrocytach traktowanych amoniakiem <i>in vitro</i>. Rola transportera γ⁺LAT2 w astrocytach <i>in vitro</i> i korze mózgowej szczurów TAA..... | 77 |
| 5.6. | Wpływ ADMA na transport [³ H]L-argininy do astrocytów <i>in vitro</i> | 80 |
| 6. | <i>Podsumowanie wyników</i> | 83 |
| 7. | <i>Dyskusja</i>..... | 85 |
| 7.1. | Stężenie metyloarginin w modelach EW | 86 |
| 7.2. | Metabolizm ADMA w modelu TAA | 89 |
| 7.3. | Ekspresja i aktywność NOS w modelu TAA..... | 95 |
| 7.4. | Protektoryjne efekty podania His, markery prozapalne i markery SON w modelu TAA | 100 |
| 7.5. | Rola transportera γ ⁺ LAT2 w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA w astrocytach traktowanych amoniakiem <i>in vitro</i> | 105 |
| 8. | <i>Wnioski</i> | 110 |
| 9. | <i>Streszczenie</i> | 112 |
| 10. | <i>Abstract</i>..... | 115 |
| 11. | <i>Literatura</i>..... | 118 |

1. Wykaz skrótów

| | |
|-----------------|---|
| ADMA | asymetryczna dwumetyloarginina |
| ADP | adenozynodwufosforan |
| AGXT-2 | aminotransferaza L-alaninoglioksydanowa-2 |
| AMP | adenozynomonofosforan |
| Arg | L-arginina |
| AU | jednostka umowna (ang. <i>arbitrary unit</i>) |
| BBB | bariera krew-mózg (ang. <i>blood brain barrier</i>) |
| BCA | kwaskw biseynhonyowy |
| BDL | zabieg zespolenia dróg żółciowych (ang. <i>bile duct ligation</i>) |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopteryna |
| CaM | Kalmodulina |
| cAMP | cykliczny adenozynomonofosforan |
| CARNS-1 | syntaza karnozyny-1 |
| CAT | transporter aminokwasów kationowych (ang. <i>cationic aminoacides transporter</i>) |
| CBF | przepływ krwi w naczyniach mózgu (ang. <i>cerebral blood flow</i>) |
| cGMP | cykliczny guanozynomonofosforan |
| COX-1 | cyklooksygenaza-1 |
| COX-2 | cyklooksygenaza-2 |
| COX-4 | podjednostka 4 cytochromu c |
| Cpm | liczba zliczeń sygnału na minutę (ang. <i>counts per minute</i>) |
| CRP | białko ostrej fazy C |
| Cyt | L-cytrulina |
| DAPI | 4',6-diamidyno-2-fenylindol, barwnik fluorescencyjny |
| DDAH | hydrolaza dimetyloargininy |
| DMEM | podłoże Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) |
| DMSO | dwumetylosulfotlenek |
| DMVG | kwask d- keto walerianowy (ang. <i>d-keto-d-(N,N-dimethylguanidine valeric acid)</i>) |
| DTT | ditiotretiol, odczynnik Clelanda |
| EDTA | kwask wersenowy; kwask etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| eNOS | śródbłnkowa izoforma syntazy tlenku azotu |
| EW | encefalopatia wątrobowa |
| FBS | bydlęca surowica płodowa (ang. <i>fetal bovine serum</i>) |
| FAD | forma utleniona dinukleotydu flawinoadeninowego |
| FMN | mononukleotyd flawinowy |
| GABA | kwask γ -aminomasłowy |
| GAPDH | dehydrogenaza gliceroaldehydrofosforanowa |
| GFAP | kwasne białko włókienkowe (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>) |
| Gln | L-glutamina |
| Glu | glutaminian |
| Gly | L-glicyna |
| GPx | peroksydaza glutationowa |
| GR | reduktaza glutationowa |
| GS | syntetaza glutaminy |

| | |
|---------------|--|
| HA | hiperamonemia |
| HO-1 | oksygenaza hemowa-1 |
| HPLC | wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>) |
| IFN- γ | interferon- γ |
| IL-1 | interleukina 1 |
| IL-6 | interleukina 6 |
| iNOS | indukowalna izoforma syntazy tlenu azotu |
| IR | (ang. <i>ischemia-reperfusion</i>) procedura chirurgiczna powodująca przejściowe niedokrwienie narządu |
| K | chem. stała szybkości reakcji |
| KGA | glutaminaza typu nerkowego |
| L-NAME | ester metylowy nitro-L-argininy |
| LNMMMA | monometyloarginina |
| LPS | lipopolisacharyd |
| MHE | subkliniczna postać encefalopatii wątrobowej (ang. <i>minimal hepatic encephalopathy</i>) |
| mPT | megakanał mitochondrialny (ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>) |
| n = | liczba osobników/ powtórzeń doświadczenia |
| NADPH | zredukowana forma kationu fosforanowego dinukleotydu nikotynamidoadeninowego |
| NF κ B | czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>) |
| NMDA | kwask N-metylo-D-asparaginowy |
| NMDAr | receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego |
| NO | tlenek azotu |
| NOS | syntaza tlenu azotu |
| nNOS | neuronalna izoforma syntazy tlenu azotu |
| NOx | azotyny i azotany |
| OA | octan amonu |
| OCT-2 | (ang. <i>organic cation transporter 2</i>) |
| ONS | stres oksydacyjno-nitracyjny |
| OPA | dialdehyd ortoftalowy |
| OP | fenylooctan ornityny |
| Orn | L-ornityna |
| OS | stres oksydacyjny |
| OTC | transkarbamylaza ornityny |
| OUN | ośrodkowy układ nerwowy |
| OX | oksydaza ksantynowa |
| PBS | roztwór soli buforowany fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCA | zespolecie wrotno-systemowe (ang. <i>portacaval anastomosis</i>) |
| PCR | reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKC | kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>) |
| PMSF | fluorek fenylometylsulfonowy |
| PRMT | N-metylotransferaza argininy |
| RBE-4 | linia komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura (ang. <i>rat brain endothelial cell line</i>) |

| | |
|---------------|--|
| RFA | reaktywne formy azotu |
| RFT | reaktywne formy tlenu |
| RT | reakcja odwrotnej transkrypcji |
| SD | odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>) |
| SDMA | symetryczna dwumetyloarginina |
| SDS | siarczan dodecyli sodu |
| SDS-PAGE | elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (ang. <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| sGC | rozpuszczalna forma cyklazy guanylowej |
| SOD | dysmutaza ponadtlenkowa |
| SON | stres oksydacyjno-nitracyjny |
| SSA | kwas sulfosalicylowy |
| TAA | tioacetamid |
| TAC | całkowita pojemność antyoksydacyjna (ang. <i>total antioxidant capacity</i>) |
| TBS-T | roztwór soli buforowany Tris, z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>tris-buffered saline with Tween-20</i>) |
| TCA | kwas trichlorooctowy |
| TNF- α | czynnik martwicy nowotworu α |

2. Wstęp

2.1. Encefalopatia wątrobowa (EW) - charakterystyka ogólna

Encefalopatia wątrobowa (EW) to zespół neuropsychiatryczny, którego bezpośrednią przyczyną jest upośledzenie detoksykacyjnej funkcji wątroby. Schorzenie to charakteryzuje się różną etiologią i zmiennym przebiegiem, co utrudnia właściwą diagnostykę oraz leczenie (Suraweera i wsp., 2016). Aktualnie obowiązującą w Europie i Ameryce Północnej klasyfikację EW opracowano w 2014 r. (Vilstrup i wsp., 2014). Zakłada ona analizę czterech podstawowych kryteriów uwzględniających przyczyny i przebieg EW. Są to: typ EW, stopień nasilenia objawów, parametr czasowy oraz występowanie czynników towarzyszących (Tabela. 1).

Tabela 1 Klasyfikacja EW

| Czynnik klasyfikacji | Kryteria/uwagi | |
|-------------------------------------|--|--|
| 1. Typ EW | Typ A (ang. <i>Acute</i>) | Skutek ostrego uszkodzenia wątroby |
| | Typ B (ang. <i>Bypass</i>) | W wyniku spontanicznego lub chirurgicznego zmniejszenia przepływu krwi przez wątrobę |
| | Typ C (ang. <i>Cirrhosis</i>) | Skutek przewlekłego uszkodzenia wątroby |
| | Typ podkliniczny (ang. <i>MHE</i>) | Subtelne zaburzenia psychomotoryczne i psychiczne występujące głównie u pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby |
| 2. Stopień nasilenia objawów | 0 | Brak objawów EW lub subtelne zaburzenia psychomotoryczne wskutek MHE |
| | I | Zaburzenia rytmu dobowego, obniżona koncentracja, niewyraźna mowa |
| | II | Obniżona sprawność intelektualna, sporadyczna dezorientacja w czasie, apatia |
| | III | Zaburzenia pamięci, chaotyczna mowa, dezorientacja w czasie i przestrzeni |
| | IV | Śpiączka |
| 3. Parametr czasowy | Epizodyczna | Pojedyncze wystąpienie lub epizody rzadsze niż co 6 miesięcy |
| | Nawracająca | Epizody częstsze niż co 6 miesięcy |
| | Przewlekła | Stałe zaburzenia intelektualne lub lokomotoryczne |
| 4. Czynniki towarzyszące | Brak lub występowanie | np. cukrzyca, sepsa |

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Vilstrup i wsp., 2014).

EW typu A jest najczęściej następstwem wirusowego zapalenia wątroby lub zatrucia hepatotoksynami (aflatoksyna, amanityna, paracetamol, kwas walproinowy). Charakteryzuje ją złe rokowanie, gdyż mogący wystąpić w ostatnim stadium obrzęk mózgu, prowadzi do wysokiej (ok. 80%) śmiertelności wśród chorych (Schiodt i wsp., 1999). Typ C, jest najczęściej występującą postacią EW. Cechuje go niski odsetek śmiertelności, a jego główną przyczyną jest marskość wątroby (Prakash i Mullen, 2010).

W ostatnim czasie coraz więcej uwagi poświęca się podklinicznej EW (ang. *minimal hepatic encephalopathy, MHE*). Dotyczy ona zarówno pacjentów, u których nie występowały wcześniej epizody EW, jak i będących w fazie remisji. Diagnoza MHE oparta jest wyłącznie na wynikach testów neuropsychomotorycznych wskazujących na subtelne upośledzenie sprawności manualnej, szybkości reakcji i pamięci krótkotrwałej. Występowanie tych objawów może być istotne dla osób wykonujących zawody wymagające szczególnej sprawności manualnej lub stanu długotrwałej koncentracji np. kierowców i lekarzy (De Rui i wsp., 2016; Zhan i Stremmel, 2012).

2.2. Eksperymentalne modele EW

Złożony patomechanizm EW nakłada na eksperymentatora konieczność uwzględnienia wielu parametrów przy wyborze zwierzęcego modelu doświadczalnego. Należy zaznaczyć, że żaden z dotąd opisanych zwierzęcych modeli EW nie oddaje pełnego spektrum objawów obserwowanych u pacjentów (Butterworth i wsp., 2009). Większość zwierzęcych modeli EW opiera się na podaniu substancji hepatotoksycznej (małe zwierzęta laboratoryjne: szczur, mysz), bądź przeprowadzeniu zabiegu chirurgicznego (małe oraz duże zwierzęta laboratoryjne np.: świnie) (Kristiansen i wsp.,

Wstęp

2014; Sharma i wsp., 2012), psy (Totsuka i wsp., 2004) i króliki (Tunon i wsp., 2003).

Najczęściej wykorzystywane do badań zwierzęce modele EW przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2 Zwierzęce modele EW

| Modele ostre (EW typu A) | Cechy modelu | |
|---|--|--|
| Hepatotoksyczne (wg podawanej substancji) | Tioacetamid (szczur) | Dobrze scharakteryzowany model, powtarzalny i odwracalny, długie (kilkudniowe) okno terapeutyczne. Droga podania: ip. [#] |
| | Paracetamol (szczur, pies, świnia) | Bezpieczny dla eksperymentatora, mała powtarzalność, zwiększa stężenie katecholamin we krwi. Droga podania: po., sq. [#] |
| | Galaktozamina (królik, szczur, świnka morska) | Wysoki koszt, powoduje uszkodzenie BBB. Droga podania: iv., ip. [#] |
| | Azoksymetan (mysz) | W krótkim czasie (24-36 h) prowadzi do wystąpienia objawów EW III i IV stopnia, częstym powikłaniem jest hipotermia. Droga podania: ip. [#] |
| Chirurgiczne | Niedokrwienie wątroby (szczur, świnia) | Zespolecie żyły wrotnej z żyłą główną przy jednoczesnym zaciśnięciu tętnicy wątrobowej skutkuje wyłączeniem krążenia wrotnego i szybką nekrozą hepatocytów. Wąskie (8 h) okno terapeutyczne. |
| | Zespolecie wrotno-systemowe (PCA) z podaniem amoniaku (szczur) | Odtwarza epizod ostrej EW w przewlekłej niewydolności wątroby |
| | Hepatoktomia (szczur, świnia) | Usunięcie 70-95% wątroby, krótki okres przeżycia, utrata znacznej ilości krwi |
| Modele przewlekłe (EW typu B i C) | | |
| Zespolecie wrotno-systemowe (ang. <i>portacaval anastomosis</i> , PCA) (szczur, pies, królik, świnia) | Zespolecie (typu koniec do boku), żyły wrotnej z żyłą główną wyłącza wątrobę z krążenia wrotnego odtwarzając EW typu B, nie powoduje zwłóknienia wątroby | |
| Zwężenie żyły wrotnej (szczur) | Prowadzi do zmniejszenia przepływu krwi przez wątrobę stosowane jako model MHE | |
| Zespolecie dróg żółciowych (ang. <i>bille duct ligation</i> , BDL) (szczur) | Model pierwotnej marskości żółciowej wątroby towarzyszy mu silny odczyn zapalny, żółtaczką, postępujące zwłóknienie wątroby, hiperamonemia, zaburzenia pamięci i uczenia | |
| Przewlekłe (2-6 tyg.) podawanie TAA lub CCl ₄ (szczur) | Modele przewlekłej niewydolności wątroby bez nadciśnienia wrotnego | |

[#] droga podania substancji hepatotoksycznej: ip.- dootrzewnowo, po.- doustnie, iv.- dożylnie, sq.- podskórnice

Bezpośrednie skutki toksyczności amoniaku tzw. „stan ostry zatrucia amoniakiem” bada się podając (najczęściej gryzoniom) dootrzewnowo źródło jonów amonu (np. octan amonu, OA). W celu wywołania przewlekłej hiperamonemii, OA dodawany jest do paszy (Aguilar i wsp., 2000), rzadziej podaje się ureazę (Deshmukh i wsp., 1990).

Do badania mechanizmów molekularnych neurotoksyczności amoniaku często używa się również modeli *in vitro*. EW jest pierwotną gliopatią (Norenberg, 1987) z tego względu najczęściej w badaniach wykorzystuje się pierwotne hodowle astrocytów (Gorg i wsp., 2008; Kruczek i wsp., 2011; Schliess i wsp., 2002). Rzadziej badania dotyczą neuronów korowych i mózdkowych (Bobermin i wsp., 2015), mieszanych hodowli astrocytarno-neuronalnych (Braissant i wsp., 2008) oraz komórek śródbłonna naczyń mózgowych (Jayakumar i wsp., 2012). W celu wywołania hiperamonemii *in vitro* do pożywki hodowlanej podaje się patofizjologiczne stężenia NH_4Cl (0.1-5 mM) oraz inne związki mające znaczenie w patomechanizmie EW np. cytokiny prozapalne (Jayakumar i wsp., 2015) i mangan (Rama Rao i wsp., 2007).

2.3. Patomechanizm EW

Upośledzenie detoksykacyjnej funkcji wątroby skutkuje systemowym nagromadzeniem związków mogących uszkadzać ośrodkowy układ nerwowy (OUN) w tym: amoniaku, fenoli, wolnych kwasów tłuszczowych, merkaptanów (Butterworth, 2003). W mózgu wzrasta ponadto stężenie aminokwasów aromatycznych (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina), które stają się prekursorami tzw. „fałszywych neurotransmiterów” (β -fenyloetanolamina, tyramina, oktopamina) zaburzających funkcjonowanie OUN (Albrecht i Jones, 1999; Butterworth, 2002; Cordoba, 2014). Może dochodzić także do gromadzenia manganu w mózgu (Rivera-Mancia i wsp., 2011; Zeron

i wsp., 2011). U pacjentów obserwuje się również hiponatremię i hipokaliemię (Ahya i wsp., 2006; Toris i wsp., 2011) oraz kwasicę metaboliczną (Ahya i wsp., 2006).

Amoniak jest głównym czynnikiem sprawczym EW (Felipo i Butterworth, 2002; Parekh i Balart, 2015). U chorych z przewlekłą EW wykazano, że stężenie amoniaku we krwi wzrasta 1,5–2 krotnie, a u osób z ostrą postacią EW rośnie nawet 4–10 krotnie (Jalan i wsp., 2004; Lockwood, 2004). W ostrej EW stężenie amoniaku w mózgu może osiągać wartość 5 mM (Giguere i Butterworth, 1984). Również w przypadku przewlekłej EW stężenie amoniaku w mózgu jest znacząco podwyższone (Cooper i Plum, 1987).

Neurotoksyczne działanie amoniaku związane jest z wieloma wzajemnie powiązаныmi mechanizmami m.in.: zaburzeniem metabolizmu energetycznego (Norenberg i wsp., 1997), dysfunkcją mitochondriów (Norenberg i wsp., 2004), stresem oksydacyjnym (Bosoi i wsp., 2014; Gorg i wsp., 2010).

Jednym z głównych skutków oddziaływania toksycznych stężeń amoniaku na mózg jest zaburzenie neurotransmisji glutaminergicznej (Hermenegildo i wsp., 2000; Rodrigo i Felipo, 2006), a w mniejszym stopniu także GABA-ergicznej (Cauli i wsp., 2009), serotoninerznej (Lozeva i wsp., 2004) i noradrenergicznej (Michalak i wsp., 2001).

Istotnym mechanizmem toksycznego oddziaływania amoniaku na mózg jest wzrost stężenia glutaminy (Gln), do którego dochodzi wskutek detoksykacji amoniaku do Gln przez zlokalizowaną wyłącznie w astrocytach syntetazę glutaminy (GS). Uważa się, że bezpośredni efekt osmotyczny Gln (Hilgier i Olson, 1994), oraz powiązane z syntezą Gln zaburzenia bilansu energetycznego (Takahashi i wsp., 1991), przyczyniają się do obrzmienia astrocytów towarzyszącego ostrej EW (Blei, 2008; Bosoi i Rose, 2013; Skowrońska i Albrecht, 2013).

Jak dotąd nie wskazano genetycznego podłoża EW, chociaż jeden z występujących często w populacji hiszpańskiej polimorfizmów genu kodującego glutaminazę typu nerkowego (KGA), (EC 3.5.1.2), polegający na zwiększonej liczbie tandemowych powtórzeń sekwencji GCA w regionie promotorowym genu, koreluje z częstszym występowaniem symptomatycznej EW. Prawdopodobną przyczyną jest wzrost aktywności KGA powodujący wzmożoną degradację Gln i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia amoniaku (Romero-Gomez i wsp., 2010). Ostatnie badania przeprowadzone na populacji koreańskiej nie potwierdziły jednak powyższej zależności (Ahn i wsp., 2016).

Ostatnie badania coraz częściej zwracają uwagę na udział systemowej odpowiedzi zapalnej wynikającej z uszkodzenia wątroby, lub będącej skutkiem towarzyszącej EW infekcji (Hung i wsp., 2013; Milewski i Oria, 2015; Shawcross i wsp., 2011; Wasmuth i wsp., 2005). U pacjentów z EW stwierdza się pozytywną korelację między stężeniem czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) w osoczu, a nasileniem objawów EW (Goral i wsp., 2011; Odeh i wsp., 2005). Co więcej, wyższe stężenia TNF- α notowano w śmiertelnych przypadkach EW (Streetz i wsp., 2000). Źródłem cytokin prozapalnych nie są wyłącznie procesy chorobowe zachodzące w wątrobie. U pacjentów z ostrą EW obserwuje się aktywację mikrogleju i astrocytów skutkującą wzmożoną syntezą cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6) w mózgu (Jiang i wsp., 2009; Wright i wsp., 2014).

2.4. Rola syntezy tlenu azotu i stresu oksydacyjno-nitracyjnego (SON) w patomechanizmie encefalopatii wątrobowej

2.4.1. Syntazy tlenu azotu (NOS)

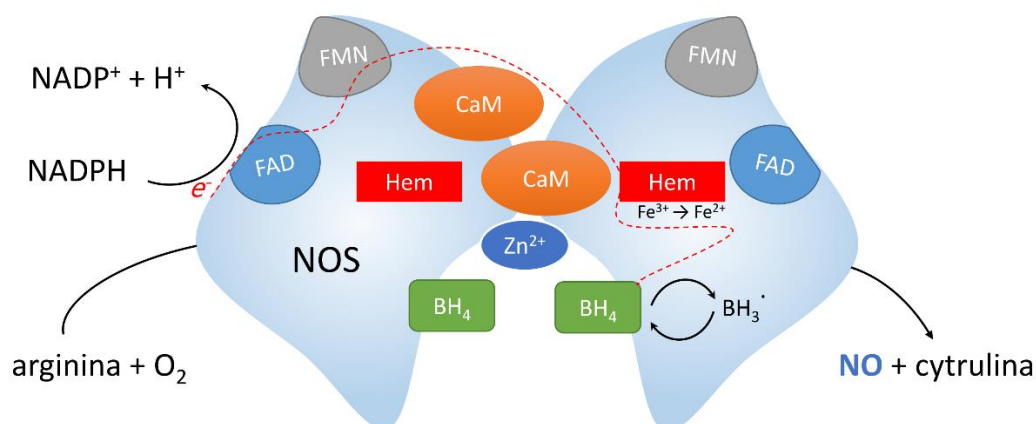
Tlenek azotu (NO) został w 1987 r. opisany jako endogenny czynnik rozkurczający naczynia krwionośne (Palmer i wsp.). Obecnie wiadomo, że cząsteczka ta pełni również funkcję wewnątrzkomórkowego przekaźnika sygnału i jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania OUN (Guix i wsp., 2005; Yuste i wsp., 2015). Głównym źródłem NO w organizmie jest reakcja enzymatycznej syntezy z L-argininy (Arg) katalizowana przez syntazy tlenu azotu (E.C. 1.14.13.39, NOS).

Opisano cztery izoformy NOS: neuronalną (nNOS), śródbłonkową (eNOS) indukowalną (iNOS) i mitochondrialną (mtNOS), przy czym ostatnia jest niedawno wyodrębnioną izoformą nNOS obecną na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Elfering i wsp., 2002). W OUN ssaków występują wszystkie wyżej wymienione izoformy NOS (Dzójlic i wsp., 2015). Ekspresja nNOS i eNOS zarówno w neuronach jak i astrocytach ma charakter konstytutywny. Forma indukowalna jest z kolei charakterystyczna dla komórek układu immunologicznego – w tym mikrogleju, ale także astrocytów (Saha i Pahan, 2006). Indukcja iNOS zachodzi pod wpływem określonych bodźców np.: cytokin prozapalnych, toksyn bakteryjnych, niedokrwienia (Duncan i Heales, 2005; Saha i Pahan, 2006). W odróżnieniu od konstytutywnych izoform NOS, aktywność iNOS jest niezależna od sygnalizacji wapniowej. Enzym ten posiada bowiem wysokie powinowactwo do kalmoduliny (CaM), i wiąże ją już przy spoczynkowym stężeniu Ca^{2+} w komórce (Dzójlic i wsp., 2015).

Do pełnej aktywności wszystkich izoform NOS oprócz przyłączenia CaM wymagane jest związanie kofaktorów: tetrahydrobiopteryny (BH_4), mononukleotydu

Wstęp

flawinowego (FMN), dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) oraz hemu (Wiesinger, 2001). BH_4 przy udziale jonów Zn^{2+} warunkuje dimeryzację cząsteczek NOS, która jest kluczowa dla syntezy NO (Rycina 1). Jednak nawet w warunkach prawidłowych, część cząsteczek eNOS nie ulega dimeryzacji, co skutkuje niepełnym przebiegiem reakcji i uwolnieniem w miejsce NO, rodnika nadtlenkowego O_2^- . Proces ten określa się mianem rozprężenia NOS.



Rycina 1 Schemat reakcji katalizowanej przez NOS. Synteza NO jest reakcją pięcioetapowego utleniania wymagającą obecności kofaktorów organicznych, jonów Zn^{2+} oraz dimeryzacji enzymu (*dokładny opis w tekście*).

Funkcja NO w mózgu wiąże się z regulacją mikrokrążenia – za co odpowiada głównie eNOS zlokalizowany w komórkach śródbłonna naczyń oraz neurotransmisyjną (w tym z opisanym w rozdziale 2.3.2 neuroprzekaznictwem glutaminergicznym) zwyczajowo łączoną z aktywnością nNOS. Należy jednak podkreślić, że również NO syntezowany przez eNOS jak i iNOS może wpływać na szlaki przekazywania sygnału w komórkach OUN (Forstermann i Sessa, 2012). NO jako neurotransmitter jest aktywny w bardzo niskich stężeniach (pikomole NO), (Madhusoodanan i Murad, 2007). W wyższych stężeniach (nanomole NO), będących głównie skutkiem aktywacji iNOS,

NO przyczynia się do indukcji stresu oksydacyjno-nitracyjnego (ONS) i uszkodzenia komórek (Dzoljać i wsp., 2015). Zagadnienie to zostanie rozwinięte w rozdziale 2.4.3.

2.4.2. Synteza NO a zaburzenie przekąźnictwa glutaminergicznego w EW

Głównym efektem sygnałowym działania NO jest rozpuszczalna cyklaza guanylowa (sGC), syntetyzująca cGMP (Madhusoodanan i Murad, 2007), a jak wspomniano w rozdziale 2.3, EW towarzyszy upośledzenie przekąźnictwa glutaminergicznego w mózgu. Hiperamonemia powoduje depolaryzację błony komórkowej neuronów glutaminergicznych skutkującą wyrzutem glutaminianu (Glu) (Moroni i wsp., 1983), czemu towarzyszy obniżony wychwyt zwrotny Glu przez neurony (Oppong i wsp., 1995) i astrocyty (Norenberg i wsp., 1997; Rose, 2002). Obserwowano również zwiększenie wyrzutu Glu z astrocytów (Rose, 2006). Zjawiska te są przyczyną akumulacji tego neuroprzekąźnika w przestrzeni synaptycznej. Dalszą konsekwencją opisanego procesu jest między innymi zaburzenie funkcji jonotropowych receptorów dla Glu, głównie receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDAr), (Hermenegildo i wsp., 2000; Llansola i wsp., 2007).

Wywołana amoniakiem aktywacja NMDAr jest jednym z głównych mediatorów jego toksyczności. Wykazano, że podanie antagonistów NMDAr obniża śmiertelność zwierząt narażonych na wysokie dawki amoniaku (Hermenegildo i wsp., 1996; Hermenegildo i wsp., 2000).

Pobudzenie NMDAr wywołuje napływ Ca^{2+} do komórki, czego jednym ze skutków jest aktywacja konstytutywnych izoform NOS. Aktywację NOS w astrocytach szczurzych traktowanych amoniakiem wykazano m.in. w układzie *in vitro* (Skowrońska i wsp., 2010).

Analogicznie w modelach zwierzęcych w pierwszej fazie odpowiedzi na bodziec hiperamonemiczny obserwowano aktywację szlaku NMDAr-NO-cGMP w mózgu (Hermenegildo i wsp., 2000; Hilgier i wsp., 2003). Wzrost poziomu cGMP wykazano również we krwi pacjentów z ostrą EW, a parametr ten ulegał obniżeniu po przeprowadzeniu transplantacji wątroby (Schneider i wsp., 1994).

Długotrwała ekspozycja neuronów na amoniak w warunkach *in vitro*, prowadzi do obniżenia stężenia cGMP, co wynika ze spadku aktywności szlaku NMDA/NO/cGMP (Llansola i wsp., 2007; Rodrigo i wsp., 2005a).

Obniżenie syntezy NO i cGMP w mózgu obserwuje się także w zwierzęcych modelach przewlekłej hiperamonemii i EW (Corbalan i wsp., 2002; El-Mlili i wsp., 2008; Rodrigo i wsp., 2005b). Wydaje się, że zahamowanie aktywności szlaku NMDA/NO/cGMP w przewlekłej EW stanowi odpowiedź kompensacyjną na pierwotną aktywację NMDAr.

Występujące w EW zmiany w syntezie cGMP są prawdopodobnie główną przyczyną występowania zaburzeń rytmu dobowego oraz pamięci w przewlekłej EW (Cabrera-Pastor i wsp., 2016; Llansola i wsp., 2013). Potwierdzają to badania wykonane na szczurach karmionych przez 3 tygodnie paszą bogatą w OA. W modelu tym, dokomorowe podanie inhibitora fosfodiesteraz (zaprinast) istotnie podwyższało stężenie cGMP w mózgu oraz poprawiało zdolność zapamiętywania u szczurów (Erceg i wsp., 2005a). Podobne wyniki uzyskano w modelu PCA, używając innego inhibitora fosfodiesteraz sildenafilu (Erceg i wsp., 2005b). Ze względu na możliwe skutki uboczne inhibitory fosfodiesteraz nie są jednak używane w terapii EW.

NO syntezowany w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych powoduje rozluźnianie mięśniówki ścian naczyń, co zwiększa ich średnicę ułatwiając przepływ krwi. Mechanizm ten reguluje między innymi przepływ krwi w naczyniach mózgu (CBF)

(Pretnar-Oblak, 2014). U pacjentów z EW obserwuje się dynamiczne zmiany tego parametru. Stanom przewlekłym często towarzyszy spadek CBF, który uważa się za czynnik prognostyczny wystąpienia ostrego epizodu EW (Iversen i wsp., 2009; Zheng i wsp., 2013; Zheng i wsp., 2012). Z kolei, w ostrej EW często obserwuje się poprzedzający rozwój obrzęku mózgu, wzrost CBF (Ede i Williams, 1986; Jalan i wsp., 2004). Tę prostą korelację komplikuje jednak fakt, iż równolegle obserwowano obniżony CBF w stanach krytycznych (Almdal i wsp., 1989; Wendon i wsp., 1994).

2.4.3. Stres oksydacyjny i nitracyjny (SON) w EW

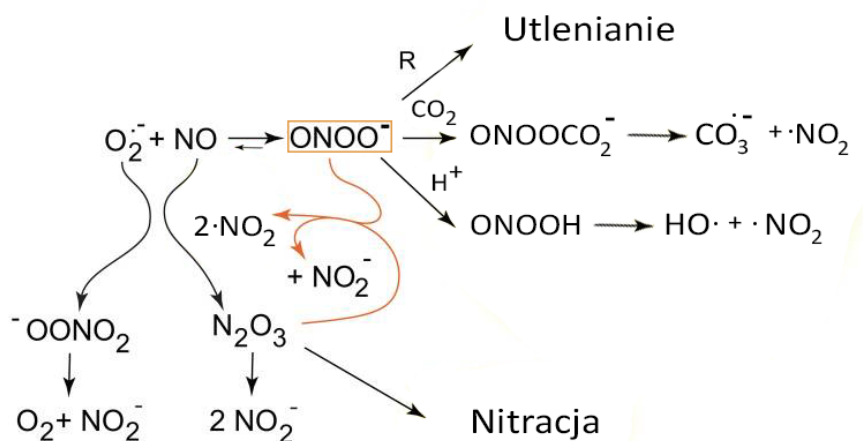
Stres oksydacyjno-nitracyjny (SON) definiowany jest jako nadmierny wzrost wewnątrzkomórkowej, a w szczególności mitochondrialnej puli reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) (Grattagliano i wsp., 2014; Ruszkiewicz i Albrecht, 2015a; Skowrońska i Albrecht, 2013). Ze względu na wysokie zapotrzebowanie tkanki nerwowej na tlen oraz relatywnie niską aktywność układów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx), mózg jest szczególnie podatny na uszkodzenia będące skutkiem SON (Dringen, 2000).

Obecnie uważa się, że SON i jego skutki są jednym z głównych mechanizmów uszkadzających komórki OUN w warunkach hiperamonemii oraz EW. Markery SON takie jak: wzrost całkowitej puli RFT lub *stricte* O_2^- i wzmożoną oksydację RNA, wykazano w traktowanych amoniakiem astrocytach *in vitro* (Gorg i wsp., 2008; Jayakumar i wsp., 2006a; Kruczek i wsp., 2011; Murthy i wsp., 2001; Skowrońska i wsp., 2010) i linii komórek śródbłonna naczyń mózgowych szczura (RBE-4), (Skowrońska i wsp., 2012a). Efekty te są w znaczącej mierze wynikiem aktywacji ścieżki NMDAr-NO-

cGMP, co wykazano stosując antagonistów NMDAR, których podanie odwracało skutki SON (Kosenko i wsp., 2003; Kruczek i wsp., 2011; Schliess i wsp., 2002).

Zwiększoną produkcję RFT w mózgu opisano także w zwierzęcych modelach ostrej HA (Hilgier i wsp., 2003; Kosenko i wsp., 1997; Kosenko i wsp., 2003). W ostrej EW wywołanej podaniem TAA wykazano akumulację RFT w różnych rejonach mózgu wykazując, że kora mózgowa, rdzeń przedłużony i most były bardziej wrażliwe na SON niż mózdzek (Sathyasaikumar i wsp., 2007). Markery stresu oksydacyjnego wykryto także we krwi chorych z EW (Negru i wsp., 1999) i w mózgach osób zmarłych w wyniku EW (Gorg i wsp., 2010).

Wolne rodniki tlenowe bardzo łatwo reagują z NO (dla reakcji $\cdot\text{O}_2^-$ z NO stała szybkości reakcji (k) wynosi $1,6 \times 10^{10}$ mol/s), wyzwalając kaskadę reakcji wolnorodnikowych będącą przyczyną stresu nitracyjnego (Ryc. 2) (Nauser i Koppenol, 2002).



Rycina 2 Schemat przebiegu reakcji wolnorodnikowych zachodzących z udziałem NO

Na poziomie molekularnym skutkami SON obserwowanymi w EW są m.in.:

- Oksydacja białek i kwasów nukleinowych (Gorg i wsp., 2008)
- Peroksydacja lipidów, skutkująca zmianami w płynności błon komórkowych (Swapna i wsp., 2006)
- S-nitrozyłacja białek (Gorg i wsp., 2008; Schliess i wsp., 2002)

Ze względu na opisany powyżej udział NO w reakcjach wolnorodnikowych, jego stężenie w tkankach lub płynach ustrojowych stanowi marker stresu nitracyjnego. Z uwagi na nietrwałość cząsteczki NO przeważnie oznacza się całkowite stężenie azotynów i azotanów traktując je jako pochodną stężenia NO lub wnioskuje na podstawie zmian ekspresji i aktywności NOS.

Zarówno zwiększona ekspresja NOS, jak i wzrost stężenia azotynów/azotanów wykazywano w eksperymentalnych modelach ostrej EW (Master i wsp., 1999; Rao i wsp., 1995; Sathyaikumar i wsp., 2007).

2.5. L-arginina w OUN

Wewnątrzkomórkowe stężenie L-argininy (Arg) definiuje dostępność substratu dla NOS z tego względu metabolizm i transport tego aminokwasu jest ważnym czynnikiem regulującym syntezę NO.

Dla ssaków głównym źródłem Arg jest białko obecne w pokarmie, ale część (15-20%) Arg pochodzi z endogennej syntezy. U dzieci, z uwagi na wysokie tempo anabolizmu oraz u osób starszych lub niedożywionych, endogenna synteza Arg może być niewystarczająca do pokrycia zapotrzebowania na ten aminokwas. Z tego względu Arg klasyfikowana jest jako aminokwas częściowo (fakultatywnie) egzogeny (Wu i wsp., 2009). Arg jest także substratem syntezy licznych związków m.in.: NO, mocznika,

ornityny, kreatyny, cytruliny, Glu, Gln, agmatyny, proliny i poliamin (Wiesinger, 2001; Wu i wsp., 2009).

Komórki OUN nie posiadają kompletu enzymów cyklu ornitynowego (mocznikowego), co jest jedną z przyczyn ich dużej wrażliwości na amoniak. W mózgu zachodzi jednak „niepełny cykl Krebsa”, jak określa się enzymatyczną syntezę Arg z cytruliny (Cyt). Stwierdzono, że hiperamonemia aktywuje ekspresję enzymów katalizujących tę reakcję w astrocytach *in vitro* (Braissant i wsp., 1999; Jackson i wsp., 1996), a w szczurzym modelu hiperamonemii wykazano wzrost ich aktywności związany głównie z komórkami glejowymi (Swamy i wsp., 2005). Informacje te dowodzą zaburzenia metabolizmu Arg i Cyt w warunkach EW, co może stanowić zarówno przyczynę, jak i skutek zmian w aktywności NOS.

2.5.1. Transport Arg w OUN

Wobec faktu, że większość zużywanej przez mózg Arg pochodzi z obwodu, kierunek i tempo transportu tego aminokwasu do i między komórkami OUN, mogą być czynnikami regulującymi aktywność NOS w mózgu (Wiesinger, 2001).

Transport Arg przez błonę komórkową odbywa się wyłącznie przez swoiste białka nośnikowe należące do układów transportujących: y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ i $B^{0,+}$ (Wiesinger, 2001). Spośród wymienionych, układ y^+ odpowiada za ok. 70% całego wychwytu Arg do komórek OUN. Należy do niego kilka białek nośnikowych dla aminokwasów zasadowych (CAT) kodowanych przez geny *SLC7A1-4* wykazujących różny poziom ekspresji i swoistości tkankowej (Tabela 3; (Wu i Morris, 1998).

Transportery układu y^+ identyfikowano w homogenacie mózgu, komórkach tworzących BBB (Stoll i wsp., 1993), w pierwotnych hodowlach neuronów korowych

i mózdkowych (Westergaard i wsp., 1993) oraz astrocytów (Hosoya i wsp., 2010; Schmidlin i Wiesinger, 1994).

Białka CAT1, CAT2B i CAT3 cechuje wysokie powinowactwo do Arg ($K_m = \text{ok. } 100 \mu\text{M}$). Ekspresja CAT1 i CAT2B w mózgu zachodzi zarówno w neuronach jak i astrocytach (Kim i wsp., 1991; MacLeod i wsp., 1994). CAT3 zlokalizowany jest z kolei wyłącznie w neuronach (Hosokawa i wsp., 1999).

Tabela 3 Transportery należące do układu γ^+

| Symbol genu | Nazwa białka | Główne miejsca ekspresji |
|---------------|--------------|--|
| <i>SLC7A1</i> | CAT1 | większość narządów poza wątrobą |
| <i>SLC7A2</i> | CAT2A | wątroba, mięśnie szkieletowe, trzustka |
| <i>SLC7A3</i> | CAT2B | mózg, wątroba |
| <i>SLC7A4</i> | CAT3 | mózg (neurony), tarczyca |

Białka systemu γ^+L oraz $b^{0,+}$ i $B^{0,+}$ oprócz aminokwasów zasadowych transportują też aminokwasy obojętne. Układ $B^{0,+}$ wymaga jonów sodu i akceptuje najszersze spektrum substratów: aminokwasy zasadowe, niskocząsteczkowe aminokwasy obojętne i aminokwasy rozgałęzione.

Białka należące do systemów γ^+ i $B^{0,+}$ są jednobiałkowymi glikoproteinami, z kolei γ^+L oraz $b^{0,+}$ mają budowę heterodimeryczną. Heterodimeryczne transportery Arg nie podlegają glikozylacji podczas obróbki potranslacyjnej i wymagają połączenia z błonową glikoproteiną II typu 4F2hc (Verrey i wsp., 2004).

Spośród białek należących do systemu γ^+L dwa: γ^+LAT1 i γ^+LAT2 są transporterami dla Arg. Białko γ^+LAT2 wykazuje większe powinowactwo do Arg niż γ^+LAT1 i występuje w wielu tkankach m.in. w mózgu i wątrobie (Broer i wsp., 2000; Closs i wsp., 2004). Transport aminokwasów zasadowych w tym Arg przez γ^+LAT2 jest niezależny od obecności Na^+ . Z kolei, przenoszenie przez ten transporter aminokwasów

obojętnych odbywa się wraz z jonami Na^+ (Verrey i wsp., 2004). Gradient jonów sodu i aktywny transport Arg do komórki za pośrednictwem białek CAT sprawiają, że preferowanym kierunkiem transportu przez $y^+\text{LAT1}$ i $y^+\text{LAT2}$ jest usuwanie aminokwasów zasadowych z komórki (Closs i wsp., 2004; Fotiadis i wsp., 2013).

W szczurzym modelu ostrej (Albrecht i wsp., 1990) jak i przewlekłej EW (Rao i wsp., 1997b) wykazano wzrost wychwytu Arg do synaptosomów. Co więcej, inkubacja synaptosomów pochodzących od zwierząt kontrolnych z amoniakiem, również skutkowałą zależnym od dawki wzrostem wychwytu Arg. Z kolei, w szczurzym modelu HA, wykazano także podwyższoną aktywność i ekspresję transportera $y^+\text{LAT2}$ (Zielińska i wsp., 2011). Białko $y^+\text{LAT2}$ w warunkach EW i gromadzącej się w mózgu Gln może regulować dostępność Arg dla komórek OUN i tym samym wpływać na syntezę NO (Zielińska i wsp., 2014).

2.6. Metylowane pochodne argininy jako endogenne inhibitory syntezy NO

W 1986 r. Drapier i Hibbs opisali hamujący wpływ N^G -monometyloargininy (L-NMMA) na uwalnianie azotynów i azotanów przez aktywowane makrofagi (Drapier i Hibbs, 1986). Kiedy rok później opublikowano pracę otwierającą erę badań nad rolą NO w regulacji przepływu krwi (Palmer i wsp., 1987), powiązano substrat syntezy NO z jego metylowaną pochodną, która do dzisiaj jest jednym z najczęściej stosowanych inhibitorów NOS.

Wykazanie wzrostu stężenia asymetrycznej N^G , N^G -dwumetyloargininy (ADMA) w osoczu pacjentów z niewydolnością nerek skierowało uwagę badaczy na możliwość udziału tego związku w regulacji przepływu nerkowego (Vallance i wsp., 1992a, 1992b). Od czasu tych pionierskich badań liczba prac opisujących endogenne metyloargininy w normie i patologii stale rośnie. Obecnie są one uważane za marker ryzyka wystąpienia

chorób sercowo-naczyniowych, głównie choroby niedokrwiennej serca i nadciśnienia tętniczego (Liu i wsp., 2016). ADMA jest także wiązana z takimi chorobami jak cukrzyca typu 2, astma oskrzelowa, schorzenia nerek o różnej etiologii, niewydolność wątroby (Alpoim i wsp., 2015; Calabrese i wsp., 2015; Ferrigno i wsp., 2015; Raptis i wsp., 2013; Tousoulis i wsp., 2013). W kontekście EW, schorzenia będącego przedmiotem niniejszej rozprawy, rola metyloowanych pochodnych Arg jest słabo zbadana.

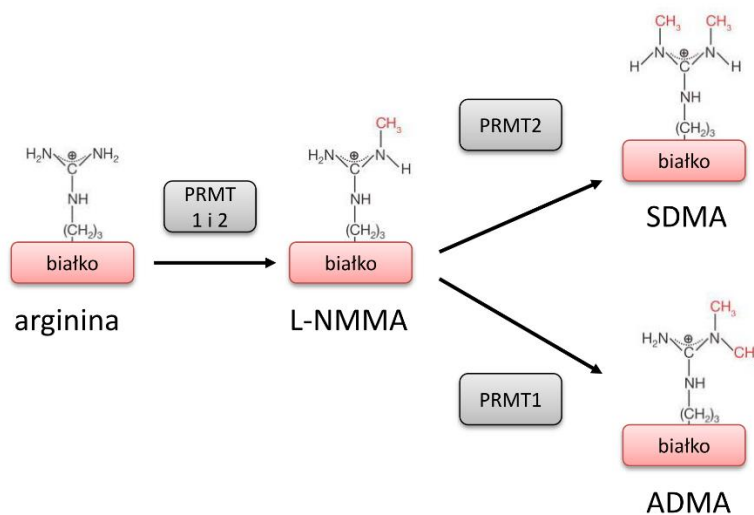
2.6.1. Metabolizm metyloarginin

U ssaków wykazano obecność trzech endogennych metyloarginin: wspomnianych L-NMMA i ADMA oraz symetrycznej N^G, N^G-dwumetyloargininy (SDMA). Związki te uwalniane są w wyniku hydrolizy białek komórkowych, w których Arg uległa naturalnie występującej metylacji (Leiper i Vallance, 1999; Teerlink i wsp., 2009).

Metylacja Arg jest elementem potranslacyjnej obróbki białek katalizowanym przez metylotransferazy argininy (EC 2.1.1.-, PRMT). Białka PRMT (u różnych organizmów zidentyfikowano przeszło 400 genów kodujących białka o aktywności PRMT) występują zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych, co tylko potwierdza znaczenie i powszechność zjawiska metylacji Arg w przyrodzie (Schapira i Ferreira de Freitas, 2014).

Białka PRMT ze względu na biochemiczną specyfikę aktywności katalitycznej dzieli się na kilka klas. U człowieka i innych ssaków występują PRMT zaliczane do klasy I i II. PRMT klasy I i II przeprowadzają dwuetapową metylację, w której pierwsze przyłączenie grupy metylowej odbywa się wspólnym mechanizmem prowadząc do syntezy L-NMMA. Następnie białka PRMT klasy I przyłączają drugą grupę metylową w asymetrycznej pozycji syntetyzując ADMA. Z kolei PRMT klasy II, przyłączają drugą grupę metylową symetrycznie, tworząc SDMA (Fackelmayer, 2005). Szczegóły

mechanizmu enzymatycznej metylacji arginyiny i regulacja PRMT zostały dokładnie opisane w obszernej pracy Moralesa i wsp., (2016). Schemat syntezy metyloarginin przez PRMT1 i 2 przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3 Schemat endogennej metylacji arginyiny

Najlepiej poznano rolę metylacji Arg w histonach, gdzie reguluje ona stopień kondensacji chromatyny, a tym samym wpływa na ekspresję genów (Di Lorenzo i Bedford, 2011). Stwierdzono m.in. że aktywność PRMT reguluje ekspresję estrogenów i licznych czynników transkrypcyjnych m.in.: p53, YY1, NF- κ B, PPAR γ , RUNX1, E2F1 i Stat1 (Bedford i Richard, 2005; Bonifer i Cockerill, 2011; Mowen i wsp., 2001; Yadav i wsp., 2003; Zhao i wsp., 2008). Metylacja Arg zachodzi również poza jądrem komórkowym wpływając na charakter późniejszych interakcji typu białko-białko (Basso i Pennuto, 2015).

Obecność w organizmie wolnych metyloarginin jest wynikiem proteolizy białek komórkowych. Zatem, tempo ich wytwarzania zależy od dwóch czynników: zmian w aktywności PRMT oraz obrotu białka (Teerlink i wsp., 2009). Na stężenie metyloarginin w tkance oraz płynach ustrojowych wpływa również tempo ich usuwania.

Związki te mogą być rozkładane enzymatycznie przez hydrolazy dwumetyloargininy (DDAH) do Cyt i metyloamin (reakcja specyficzna dla ADMA oraz L-NMMA) lub bezpośrednio wydalane z moczem. Szacuje się, że ponad 70% ADMA jest degradowane przez DDAH (Achan i wsp., 2003), co czyni z tego enzymu główny regulator stężenia ADMA w organizmie (Pope i wsp., 2009b; Teerlink i wsp., 2009).

DDAH występuje w postaci dwóch izoform DDAH-1 i DDAH-2, różniących się dystrybucją tkankową i aktywnością katalityczną. Rozkład ADMA przez DDAH-1 jest ok. 70 razy wydajniejszy niż katalizowany przez drugą izoformę enzymu (Tabela 4).

Tabela 4 Porównanie kinetyki degradacji ADMA przez DDAH1 i DDAH2. Do analizy użyto oczyszczonych enzymów rekombinowanych w systemie *E. coli*.

| Izoforma DDAH | K_m [μ M] | V_{max} [nmol/mg/min] |
|---------------|------------------|-------------------------|
| DDAH-1 | 68.7 | 356 |
| DDAH-2 | 16 | 4.8 |

Źródło: (Hong i Fast, 2007; Pope i wsp., 2009a).

Analiza ilościowa DDAH-1/2 przeprowadzona metodą dot-blot wykazała, że DDAH obecne jest w większości ludzkich narządów i tkanek (Tran i wsp., 2000). Zauważono, co potwierdziły późniejsze prace (Balasubramaniyan i wsp., 2012; Greco i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2013), że w mózgu obecne jest głównie białko DDAH-1. Wysoki poziom ekspresji tej izoformy wykazują: różne rejony kory mózgowej, hipokamp, wzgórze, skorupa, jądro niskowzgórzowe. Spośród przebadanych struktur układu nerwowego wyraźną ekspresję DDAH-2 wykazano jedynie w rdzeniu przedłużonym i rdzeniu kręgowym. Z kolei, w większości narządów mięsaszowych, w tym w wątrobie, ekspresja obu izoform DDAH zachodzi na podobnym poziomie (Tran i wsp., 2000). Na podstawie przytoczonych badań Tran i wsp., (2000) zaproponowali hipotezę zakładającą funkcjonalną kolokalizację DDAH z NOS, przy czym DDAH-1 związany jest wyraźnie z tkankami posiadającymi nNOS, a DDAH-2 z eNOS.

Pozbawienie transgenicznych myszy („*knockout genowy*”) genu kodującego DDAH-1 jest mutacją letalną. Mysie heterozygoty przeżywają, ale obserwowany u nich znaczący wzrost stężenia ADMA w osoczu hamował syntezę NO w naczyniach, co skutkowało wzrostem ciśnienia krwi w krążeniu obwodowym i płucnym (Leiper i wsp., 2007). Przy podwyższonej ilości DDAH-1 obserwowano odwrotne skutki wynikające ze wzmożonej relaksacji naczyń (Dayoub i wsp., 2008). Ponadto, aktywność NOS ulegała ok. 50% podwyższeniu zarówno w warunkach *in vitro* jak i w tkankach transgenicznych myszy (Dayoub i wsp., 2003; Stuhlinger i wsp., 2007).

Niedawno poznana, alternatywną ścieżką degradacji ADMA, jest mitochondrialna alanino-glioksyloaminotransferaza-2 (AGXT-2) (Caplin i wsp., 2012; Kittel i wsp., 2013). Enzym ten katalizuje rozkład ADMA do kwasu d-keto walerianowego (DMGV) i glicyny. Głównym miejscem ekspresji AGXT-2 są nerki i wątroba (Martens-Lobenhoffer i wsp., 2012), ale obecność zarówno transkryptu jak i białka AGXT-2 wykazano także w mózgu, w szczególności w hipokampie i prążkowie (Abe i wsp., 2014). Jak dotąd jedyną poznaną drogą transportu ADMA przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest transporter kodowany przez gen *Slc25a2* (Porcelli i wsp., 2016).

Aktywność AGXT-2 ma realne przełożenie na poziom ADMA w organizmie. Wykazano obniżenie stężenia ADMA w osoczu i wątrobie myszy z podwyższoną ekspresją AGXT-2 (Rodionov i wsp., 2010). Natomiast myszy typu „*knockout*” nieposiadające genu kodującego AGXT-2 charakteryzował wzrost stężenia ADMA w osoczu, spadek syntezy NO w śródbłonku naczyń krwionośnych i wzrost ciśnienia tętniczego (Caplin i wsp., 2012). Rola AGXT-2 w regulacji syntezy ADMA w warunkach EW nie była dotąd badana.

2.6.2. Regulacja aktywności NOS przez metyloargininy

ADMA i L-NMMA są kompetycyjnymi inhibitorami wszystkich izoform NOS. Postuluje się, że wewnątrzkomórkowe stężenie metyloarginin może być elementem regulacji tempa wytwarzania NO opartym o działanie pętli sprzężeń zwrotnych. Za tym poglądem przemawia m.in. hamowanie aktywności DDAH przez wysokie stężenia NO (Pope i wsp., 2009b), lub Arg (Wang i wsp., 2006). ADMA wydaje się być również odpowiedzialna za tzw. „paradoks argininowy” – zjawisko wzrostu syntezy NO po podaniu Arg, mimo, iż wyjściowe stężenie Arg znacząco przekraczało K_m dla NOS. Innymi słowy jest to dowód realnej inhibicji NOS przez ADMA, mimo wysokiego współczynnika Arg/ADMA i możliwości odwracania tego efektu przez wzrost stężenia Arg lub obniżenie stężenia ADMA (Closs i wsp., 2000; MacLeod, 1996).

Drugim, obok bezpośredniego hamowania, mechanizmem obniżającym syntezę NO przez metyloargininy jest regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia substratu dla NOS (Tsikas i wsp., 2000). Arg jest transportowana do komórki z udziałem białek opisanych w rozdziale 2.5.1, a modulacja jej transportu reguluje tempo produkcji NO (Sobrevia i Gonzalez, 2009). Metyloargininy konkurując o transportery z Arg (głównie CAT), mogą hamować napływ Arg do komórki (Closs i wsp., 2006; Strobel i wsp., 2012).

Ostatnio opisano transport Arg i ADMA z udziałem białka OCT-2 (ang. *organic cation transporter 2*). Transporter ten ulega silnej ekspresji w kanalikach bliższych nerek, gdzie odpowiada za usuwanie niektórych metabolitów (Koepsell i wsp., 2007). Jego obecność w mózgu wiązana jest głównie z transportem agmatyny, ale może on transportować również Arg i ADMA (Strobel i wsp., 2013).

W transporcie ADMA oprócz białek CAT uczestniczy również opisany w rozdziale 2.5.1 układ γ^+ LAT. Świadczy o tym opisany przypadek kliniczny pacjenta

cierpiącego na częste ataki dusznicy bolesnej, u którego stwierdzono obniżenie poziomu białka γ^+ LAT1 skutkujące gromadzeniem ADMA w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych i zaburzeniem aktywności eNOS (Closs i wsp., 2012). Bezpośredni wpływ ADMA na transport Arg w modelach EW, a w szczególności przez γ^+ LAT2, nie był dotąd badany.

2.6.3. Metyloargininy w EW

W schorzeniach związanych z dysfunkcją wątroby skutkujących wystąpieniem EW obserwowano podwyższone stężenie ADMA we krwi zarówno w stanach ostrych, jak i przewlekłych (Tabela 5).

Tabela 5 Wybrane schorzenia z towarzyszącą EW w których wykazano wzrost stężenia ADMA we krwi

| Rozpoznanie | Obserwacje związane ze wzrostem stężenia ADMA w osoczu | Źródło |
|-----------------------------------|---|---------------------------|
| Niewydolność wątroby wraz z sepsą | Wzrost stężenia ADMA jako czynnik pogarszający rokowanie | (Brenner i wsp., 2012) |
| Zatrucie paracetamolem | Pozytywna korelacja stężenia ADMA i poziomu cytokin prozapalnych | (Mookerjee i wsp., 2007a) |
| Poalkoholowa choroba wątroby | ADMA niweluje efekty wzmożonej syntezy NO w naczyniach obwodowych | (Lluch i wsp., 2004) |
| WZW typu C | Pozytywna korelacja stężenia ADMA z nadciśnieniem wrotnym | (Vizzutti i wsp., 2007) |
| Rozległa hepatektomia | Pooperacyjny wzrost stężenia ADMA | (Nijveldt i wsp., 2004) |
| Przewlekła niewydolność wątroby | Pozytywna korelacja stężenia ADMA z zaburzeniami poznawczymi | (Bajaj i wsp., 2013) |

W jednej z prac stwierdzono pozytywną korelację między stężeniem ADMA w osoczu, a objawami klinicznymi EW u pacjentów (Bajaj i wsp., 2013). Podwyższone stężenie ADMA u pacjentów z EW wiąże się też z procesami zapalnymi. Wykazano wyraźną korelację tego metabolitu z poziomem cytokin prozapalnych w osoczu oraz

istotne obniżenie obu badanych parametrów u pacjentów po przeszczepie wątroby (Mookerjee i wsp., 2007a).

Dostępne dane kliniczne są przeważnie niewystarczające do jednoznacznego wnioskowania o roli ADMA w patomechanizmie EW. Nie jest też jasne czy jej stężenie ulega zmianie w mózgu oraz jak wygląda dystrybucja ADMA między krwią a komórkami OUN w warunkach EW. Badania te rzadko wskazują też na bezpośrednie przyczyny zmian stężenia ADMA.

Badania na modelach zwierzęcych potwierdziły, że wzrost stężenia ADMA towarzyszy zarówno ostremu uszkodzeniu wątroby (ostra EW) (Bekpinar i wsp., 2015), jak i przewlekłemu uszkodzeniu wątroby, co wykazano m.in. w modelu BDL. U szczurów BDL podwyższone stężenie ADMA utrzymuje się nawet 4 tyg. po operacji (Sheen i wsp., 2014). W modelu tym wykazano również związek między hiperamonemią a stężeniem ADMA. Obniżenie stężenia amoniaku przez podanie fenylooctanu ornityny (OP) skutkowało istotnym spadkiem stężenia ADMA w mózgu i krwi obwodowej oraz zwiększało aktywność eNOS w mózgu (Balasubramaniyan i wsp., 2012).

Nie jest jasne, czy zmiany stężenia ADMA w EW są wynikiem wzmożonej aktywności PRMT, obniżenia tempa usuwania ADMA, czy też kombinacją tych czynników. W szczurzym modelu BDL opisywano zarówno zwiększenie ilości białka PRMT-1 w wątrobie (Tain i wsp., 2010a; Yang i wsp., 2012), jak i jego obniżenie w mózgu (Tain i wsp., 2010a). Warto dodać, że w warunkach niedokrwienia wątroby ilość transkryptu *Prmt-1* ulegała obniżeniu (Ferrigno i wsp., 2014).

Jak opisywano wyżej, wątroba jest głównym miejscem enzymatycznej degradacji ADMA w organizmie (Pope i wsp., 2009b; Sibal i wsp., 2010), zaś jej uszkodzenie skutkuje obniżeniem aktywności DDAH w tym narządzie, co jest przypuszczalnie główną

przyczyną wzrostu stężenia ADMA we krwi (Balasubramaniyan i wsp., 2012; Tain i wsp., 2010a; Tain i wsp., 2010b).

Poza modulacją ścieżki sygnalizacyjnej NMDAr-NO-cGMP, ADMA jako inhibitor syntezy NO może mieć udział w regulacji CBF w warunkach EW (por. 2.3.1). Hamujący wpływ ADMA na przepływ mózgowy był wielokrotnie wykazywany (Faraci i wsp., 1995; Segarra i wsp., 1999). Niestety brak jest danych bezpośrednio opisujących rolę ADMA w regulacji przepływu mózgowego w EW.

Dodatkowo, nieliczne badania wskazują na bezpośrednią farmakologiczną możliwość regulacji stężenia ADMA. Komercyjnie dostępne inhibitory PRMT: S-(5'-adenosylo)-L-homocysteina i S-(5'-adenosylo)-L-metionina nie są wystarczająco specyficzne (Yan i wsp., 2014).

Podsumowując, wzrost stężenia ADMA obserwowano we krwi pacjentów z EW, jak i w zwierzęcych modelach EW. Niemniej jednak rola metyloarginin w patomechanizmie EW wymaga uszczegółowienia, zwłaszcza w kontekście ostrej EW i obserwowanego w mózgu SON.

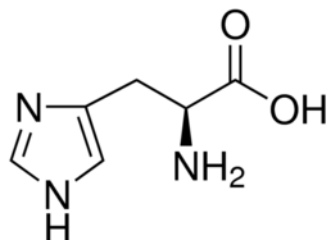
2.7. Protekcyjna rola histydyny i karnozyny w EW

Badania neurotoksycznego działania amoniaku i jego roli w patomechanizmie EW, w tym skutków SON, wiążą się z próbami przeciwdziałania obserwowanym zaburzeniom. Jednym ze związków, którego protekcyjne właściwości bada się w tym kontekście jest L-histydyna (His).

Warto w tym miejscu przytoczyć badania, w których His znosiła wywołane podaniem amoniaku (Reddy i wsp., 2006) lub Gln (Jayakumar i wsp., 2006b; Pichili i wsp., 2007) obrzmienie astrocytów *in vitro*. Powyższe obserwacje przez długi czas wiązano głównie z kompetycyjnym hamowaniem transportu Gln do mitochondriów

(Albrecht i wsp., 2000; Ziemska i wsp., 2000), ale prawdopodobnie są one również wynikiem właściwości antyoksydacyjnych cząsteczki His.

His jest aminokwasem biogennym łączącym właściwości aminokwasów zasadowych i aromatycznych ze względu na obecność pierścienia imidazolowego (Rycina 4).



Rycina 4 Wzór strukturalny L-histydyny

Pierścień imidazolowy odpowiada za biochemiczne właściwości His: wiąże kationy metali m.in. żelaza (Fe^{2+}) i cynku (Zn^{2+}), co sprawia, że bierze ona udział w regulacji aktywności katalitycznej licznych enzymów: m.in. anhidrazy węglanowej i dysmutazy ponadtlenkowej (Stifel i Herman, 1971).

His ma również silne właściwości antyoksydacyjne. Obniża produkcję $\cdot\text{OH}$, powstającego w zależnej od Fe^{2+} reakcji Fentona (Nagy i Floyd, 1984) oraz może wiązać tlen singletowy $\cdot\text{O}_2$ (Matheson i wsp., 1979).

His może być wykorzystana przez komórkę jako substrat syntezy dwupeptydu β -alanylo-L-histydyny (karnozyny). Cząsteczki karnozyny i His mają identyczny pierścień imidazolowy, dzięki czemu karnozyna wykazuje zbliżone do His właściwości antyoksydacyjne (Boldyrev i wsp., 2013; Park i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2011; Zhao i wsp., 2012).

Doświadczenia na modelach zwierzęcych pokazują, że suplementacja diety His lub karnozyną skutkuje wzrostem ich stężenia w tkankach, co przekłada się na efekty

antyoksydacyjne (Chan i wsp., 1994; Lee i wsp., 2005) i przeciwzapalne (Lee i wsp., 2005).

Związki te wykazywały też efekty osłonowe wobec wątroby. Podawanie His lub karnozyny w mysim modelu przewlekłego alkoholowego uszkodzenia wątroby spowodowało wzrost stężenia glutationu oraz aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej w wątrobie. W cytowanej pracy obserwowano ponadto spadek stężenia białek ostrej fazy (CRP) i prozapalnych cytokin TNF- α i IL-6 (Liu i wsp., 2008). Z kolei, w szczurzym modelu uszkodzenia wątroby przez TAA wykazano protekcyjne działanie karnozyny względem zmian martwiczych wątroby (Mehmetcik i wsp., 2008).

Ponadto, w szczurzym modelu choroby Parkinsona zaobserwowano, że His może hamować produkcję $\cdot\text{OH}$ w prążkowie (Obata i wsp., 2001). Oprócz działania *per se*, suplementacja His zapobiega redukcji puli mitochondrialnego glutationu w korze mózgowej pochodzącej od zwierząt z ostrą EW wywołaną podaniem TAA (Ruszkiewicz i wsp., 2013). W tym samym modelu His redukowała markery SON w mózgu: ekspresję oksygenazy hemu-1 (HO-1) i aktywację megakanalu mitochondrialnego (mPT) i dodatkowo zmniejszała obrzęk mózgu (Rama Rao i wsp., 2010).

Transport His przez BBB odbywa się z udziałem białek należących do dwóch systemów transportowych: N oraz L (Yamakami i wsp., 1998). Rolę tych transporterów wykazano także w wyizolowanym splocie naczyń szczyra (Xiang i wsp., 1998). W obu pracach system N wskazywany był jako główny transporter tego aminokwasu. Badania transportera $\text{y}^+\text{LAT2}$ pokazują, że uczestniczy on także w transporcie His (Broer i wsp., 2000). Transport His odbywa się zatem zarówno w obecności (układ N) jak i bez udziału Na^+ (układ L) i wykazuje zależność od pH (układ N) lub obecności innych aminokwasów (układ L). Z kolei za transport karnozyny z obwodu do OUN odpowiadają transportery oligopeptydów: PEPT1/2 oraz PHT1/2 (Boldyrev i wsp., 2013).

Wstęp

W dysertacji badany będzie wpływ His na stężenie ADMA, wybrane parametry związane z metabolizmem ADMA oraz parametry SON w szczurzym modelu EW. Ze względu na ścisłą zależność metabolizmu His i karnozyny można założyć, iż za niektóre efekty podania His może być odpowiedzialna karnozyna.

3. Założenia i cele pracy

Patomechanizm EW związany jest między innymi z zaburzeniami neuroprzebieżności glutaminergicznego, w szczególności zmianami aktywności szlaku NMDAr-NOS-NO. Nadmierna aktywacja tej ścieżki sygnalizacyjnej stanowi ważny mechanizm wywołanego przez amoniak, będący kluczowym dla EW czynnikiem patogennym, SON. Równoległe obserwacje wskazują na wzrost stężenia metylowanych pochodnych argininy (asymetrycznej ADMA, symetrycznej SDMA) we krwi pacjentów z EW, co może być dodatkową przyczyną zaburzeń w syntezie NO. Dokładny mechanizm ich działania na komórki OUN w warunkach EW nie został w pełni poznany. Dane literaturowe wskazują, że ADMA może bezpośrednio hamować aktywność NOS lub też regulować dokomórkowy transport argininy.

Głównym celem rozprawy jest zbadanie mechanizmów regulujących stężenie dwumetyloarginin w dwóch szczurzych modelach EW: hiperamonemii prostej i modelu ostrego uszkodzenia wątroby wywołanego podaniem TAA. Dodatkowo analizowano wpływ podania histydyny na stężenie dwumetyloarginin oraz wybrane parametry związane z mechanizmem jej działania.

Cele szczegółowe:

- Zbadanie stężenia ADMA i SDMA w osoczu i dwóch wybranych strukturach mózgu (korze i mózdzku) w szczurzych modelach EW.
- Analiza ekspresji i aktywności enzymów syntezy i degradacji ADMA w wątrobie oraz mózgu zwierząt modelowych.
- Analiza poszczególnych elementów ścieżki sygnałowej NMDAr-NOS-NO w mózgu, w szczególności pomiar ekspresji i aktywności NOS jako efektora dla ADMA.

Założenia i cele pracy

- Zbadanie wpływu His, aminokwasu wykazującego efekty protekcyjne związane bezpośrednio z redukcją SON, na wybrane parametry ścieżki NMDAr-NOS-NO.
- Pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA oraz kompetycyjnego hamowania transportu Arg przez ADMA, wraz z określeniem udziału poszczególnych układów transportujących Arg, w pierwotnej hodowli astrocytów korowych szczura *in vitro* w warunkach hiperamonemii.

Hipotezy badawcze:

- Hiperamonemia jest bezpośrednią przyczyną wzrostu stężenia ADMA w eksperymentalnych modelach EW.
- Zmieniona aktywność i/lub poziom ekspresji enzymów metabolizmu ADMA reguluje jej stężenie.
- ADMA reguluje aktywność szlaku NMDAr-NOS-NO w mózgu w szczurzych modelach EW.
- His wykazuje działanie protekcyjne wobec SON oraz zaburzeń ścieżki NMDAr-NOS-NO w EW, co może wiązać się z metabolizmem ADMA.
- ADMA reguluje dokomórkowy transport Arg w pierwotnych astrocytach korowych.

4. Materiały i metody

4.1. Modele zwierzęce

Eksperymenty na zwierzętach wykonano po uzyskaniu zgody IV Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Osoby biorące udział w doświadczeniach posiadały stosowne zezwolenia na udział w procedurach z wykorzystaniem zwierząt.

Parametry biochemiczne w modelach (stężenie amoniaku we krwi, i stężenie TNF α) były weryfikowane przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów diagnostycznych: Ammonia Assay Kit (Sigma-Aldrich) i Rat Tumor Necrosis Factor α ELISA KIT (Sigma-Aldrich), ściśle według zaleceń producenta.

4.1.1. Szczurzy model hiperamonemii prostej

Badania prowadzono na samcach szczurów stada Sprague–Dawley (CrI:SD) o masie 250-280 g. Hiperamonemię (HA) wywoływano podając dootrzewnowo roztwór octanu amonu (OA) (Sigma-Aldrich), w soli fizjologicznej w dawce 600 mg/kg m.c. trzykrotnie, w 24 godzinnych odstępach. Zwierzętom kontrolnym podawano analogicznie sól fizjologiczną.

4.1.2. Szczurzy model ostrego uszkodzenia wątroby i suplementacja L-histydyną

W celu wywołania niewydolności wątroby, trzykrotnie w odstępie 24 h podawano dootrzewnowo TAA w dawce 300 mg/kg m.c. Zwierzętom kontrolnym podawano sól fizjologiczną.

His podawano dootrzewnowo w dawce 100 mg/kg m.c. na 2 h przed każdym podaniem TAA. Badany materiał tj. krew i tkanki mózgu (kora czołowa, kora mózdzku) pobierany był po 24 h od ostatniego podania TAA. W tym czasie obserwowano pojawienie się behawioralnych symptomów ostrej EW: apatię, osłabione odruchy posturalne, płytki oddech. Zebrane tkanki były natychmiast mrożone przez zanurzenie w ciekłym azocie, i przechowywane w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Krew pobierano z serca do strzykawki opłaszczonej EDTA (Stratagene). Do dalszych prac wykorzystywano osocze pozyskane przez odwirowanie krwi (2000 x g, 10 min., 4°C).

4.2. Hodowle komórkowe

4.2.1. Pierwotna hodowla korowych astrocytów szczurzych

Pierwotną hodowlę szczurzych astrocytów korowych zakładano zgodnie z metodą opisaną przez Hertz'a i współpracowników (1989). Korę mózgową pobierano od 1 - 2 dniowych osesków szczurów stada Wistar i przecierano przez sterylną siatkę nylonową o średnicy porów $80\ \mu\text{m}$ (Millipore) na szalkę Petriego zawierającą pożywkę DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), (Gibco/BRL) z 20% zawartością bydlęcej surowicy płodowej (ang. *fetal bovine serum*, FBS), (Gibco/BRL) oraz antybiotykami: penicyliną (50 U/ml) i streptomycyną (50 mg/ml) (Gibco/BRL). Komórki hodowano w inkubatorze (Kebo BioMed) w temperaturze 37°C , w atmosferze: 90% powietrza i 10% CO_2 , na różnej wielkości szalkach i płytkach hodowlanych (Costar, Corning) w zagęszczeniu $1-2 \times 10^5/\text{cm}^2$. Pożywkę zmieniano dwa dni po wysianiu, a następnie dwa razy w tygodniu, stopniowo obniżając zawartość FBS do 10% po dwóch tygodniach hodowli. Począwszy od trzeciego tygodnia, dodawano do hodowli 0,25 mM dibutyrylo-cAMP w celu pobudzenia astrocytów do morfologicznego różnicowania się. Eksperymenty przeprowadzano na hodowlach 3 - 4 tygodniowych.

4.2.2. Inkubacja astrocytów szczurzych z amoniakiem

Do pożywki hodowlanej podawano wodny roztwór NH_4Cl (dla uproszczenia określany dalej jako „amoniak”). W doświadczeniach podawano 5 mmol/L NH_4Cl na 48 h. Do komórek nietraktowanych amoniakiem (kontrolnych) podawano równoważną objętość sterylnej wody.

4.2.3. Wyciszenie ekspresji genu *Slc7a6*

Hodowlę astrocytów prowadzono jak w pkt. 4.2.1. Po usunięciu pożywki i trzykrotnym przemyciu sterylnym PBS komórki odklejano od szalki za pomocą trypsyny. Następnie astrocyty wysiewano na płytki 6-dołkowe (2×10^5 komórek na dołek), w pożywce DMEM z 10% FBS. Wyciszenie genu *Slc7a6* uzyskiwano przez podanie mieszaniny 4 sekwencji wyciszających (siRNA) o długości 21 nukleotydów każda łączących się z różnymi regionami genu *Slc7a6* (Qiagen, USA). 5 μl siRNA rozcieńczano w 300 μl pożywki OptiMEM (Gibco) i inkubowano przez 30 min w temp. pokojowej z 9 μl HiPerFect transfection reagent (Qiagen).

Odczynnik HiPerFect tworzy kompleksy z siRNA ułatwiając jego przechodzenie przez błony komórkowe – transfekcję. Komórki hodowano z mieszaniną wyciszającą (10 μl /dołek) w standardowych warunkach przez 48 h. Komórkami kontrolnymi wobec transfekowanych siRNA były komórki hodowane w obecności samego odczynnika HiPerfect (tzw. kontrola „mock”).

4.3. Analiza ekspresji genów

4.3.1. Izolacja RNA z komórek i tkanek

Całkowity kwas rybonukleinowy (RNA) izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich) bazującego na metodzie opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Tkanę (ok. 30 mg) homogenizowano w 0,5 ml odczynnika TRI Reagent. Zawiesinę przenoszono do czystej próbówki dodawano 0,1 ml chloroformu, wytrząsano przez 30 sek i inkubowano przez 5 min w RT. Następnie próbki wirowano (12 000 x g, 15 min., 4°C) w celu rozdzielenia fazy wodnej i organicznej. Nadsącz (faza wodna) zawierający RNA przenoszono do nowej próbówki i dodawano 0,5 ml izopropanolu (Sigma-Aldrich) celem wytrącenia RNA z roztworu. Próbkę inkubowano przez 10 min w temp. pokojowej i ponownie wirowano (12 000 x g, 10 min., 4°C). Nadsącz usuwano, a osad przemywano 1ml 75% etanolu (POCH), inkubowano przez 5 min w temp. pokojowej i wirowano (7500 x g, 5 min., 4°C). Etanol usuwano susząc osad w temperaturze 45°C, a następnie rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz.

W przypadku izolacji RNA z astrocytów używano szalek o średnicy 10 cm (ok. 1×10^5 komórek). Pożywkę hodowlaną zlewano, a jej resztki usuwano przez dwukrotne przemycie sterylnym PBS. Komórki zalewano 1 ml TRI Reagent, inkubowano 5 min w temp. pokojowej i przenoszono zawiesinę do czystych próbówek. Dalsze etapy izolacji wykonywano analogicznie do wcześniej opisanej procedury izolacji RNA z tkanki.

4.3.2. Pomiar stężenia i czystości RNA

Stężenie RNA mierzono spektrofotometrycznie na aparacie NanoDrop ND100 (Thermo Scientific) przy długościach fali 260 nm i 270 nm, względem wody wolnej od DNA i RNA przyjmując, że gęstość optyczna $OD_{260} = 1$ odpowiada 40 μg RNA. Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania dostarczonego przez producenta. Próbki o współczynniku 260/270 nm większym od 1,7 uważano za wolne od zanieczyszczeń i używano w dalszych procedurach.

4.3.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy wyizolowanego RNA stosowano zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystem). Reakcję prowadzono w termocyklerze (Biometra) w następujących warunkach: 10 min w 25°C, 120 min w 37°C, 5 min w 85°C.

Skład roztworu reakcyjnego:

2 μl 10 x stężonego RT Buffer

0,8 μl 25 x stężonej mieszaniny trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP)

2 μl 10 x stężonej mieszaniny przypadkowych starterów (RT Random Primers)

1 μl odwrotnej transkryptazy (MultiScribeTM Reverse Transcriptase)

4,2 μl H₂O (wolnej od aktywności rybonukleaz)

1 μg RNA (w 10 μl H₂O)

4.3.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Poziom cDNA badanych transkryptów oznaczano metodą real-time PCR polegającą na analizie ilościowej produktu PCR w czasie fazy jego wykładniczego wzrostu. Cykl, w którym dana próbka osiąga poziom linii progowej wyznaczającej wzrost wykładniczy produktu reakcji nazywany jest cyklem progowym – Ct (ang. *Cycle Threshold*).

Do reakcji używano odczynnika TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) oraz znakowane fluorescencyjnie startery TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Reakcję prowadzono w roztworze o składzie:

- 1 μl cDNA
- 0,5 μl Gene Expression Assay
- 5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix,
- 3,5 μl wody

Reakcje prowadzono w trzech powtórzeniach na przeznaczonych do tego celu płytkach 96 dołkowych (Thermo Scientific) z wykorzystaniem aparatu ABI 7000 (Applied Biosystems) w następujących warunkach:

- 10 min w 95°C (aktywacja polimerazy), 40-55 cykli: 15 s w 95°C (denaturacja),
- 1 min w 60°C (przyłączenie starterów).

Wyniki odnoszono do ilości transkryptu β-aktyny, jako genu referencyjnego. Do obliczania względnej zmiany ilości mRNA stosowano tzw. metodę $\Delta\Delta Ct$ (Livak i Schmittgen, 2001). Uzyskane wyniki odnoszono do poziomu kontrolnego ustalając jego wartość równą 1. Do obliczeń stosowano następujące wzory:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{genu badanego})} - Ct_{(\text{genu referencyjnego})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{próby badanej})} - \Delta Ct_{(\text{kalibratora})}$$

Uzyskaną wartość zgodnie ze stosowaną metodą normalizowano: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Wszystkie użyte startery są komercyjnie dostępne i zostały zakupione w firmie Applied Biosystems (Tabela 6).

Tabela 6 Wykaz użytych w reakcji RT-PCR starterów TaqMan (Applied Biosystems)

| Białko kodowane przez badany gen | Numer katalogowy | cd. | cd. |
|----------------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| NOS2 | Rn 00561646_m1 | PRMT-1 | Rn 00821202_g1 |
| NOS3 | Rn 02132634_s1 | TNF- α | Rn 01525859_g1 |
| DDAH-1 | Rn 00574200_m1 | β -aktyna | Rn 00667869_m1 |

4.4. Oznaczanie białek metodą Western-blot

4.4.1. Izolacja białka całkowitego z komórek i tkanek

Komórki hodowano na szalkach hodowlanych o średnicy 10 cm płukano trzykrotnie buforem PBS o temperaturze 37°C. Komórki zawieszano w 1ml PBS, i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Po odwirowaniu (5000 x g, 5 min., 4°C), uzyskany osad komórkowy zawieszano w buforze lizującym (20 mM Tris, 130 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,5 mM DTT, inhibitory fosfataz 1:100 (v/v), inhibitory proteaz 1:200 (v/v), pH 6,8. Osad inkubowano przez 10 min w 4°C, homogenizowano z użyciem ultradźwięków, a następnie wirowano (12000 x g, 20 min., 4°C). Uzyskany supernatant używano do dalszych badań.

Izolację białka z tkanek prowadzono na lodzie (w temp. ok. 4°C). Około 100 mg tkanki homogenizowano w ręcznym homogenizatorze typu teflon- szkło. Bufor lizujący dodawano w stałej proporcji 5 μ l/mg tkanki.

Stężenie białka mierzono metodą biuretową opisaną w rozdziale 4.12. Pozostałą część roztworu łączono w stosunku 1:1 z buforem do nakładanie prób na żel poliakrylamidowy zawierającym β -merkaptoetanol i denaturowano (5 min, 95°C). Wszystkie użyte odczynniki zakupiono w firmie Sigma-Aldrich.

4.4.2. Elektroforetyczny rozdział białek i transfer na membranę nitrocelulozową

Białka rozdzielano na 10% żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (warunki denaturujące) w buforze (192 mM glicyna, 25 mM Tris, 0,35 mM SDS, pH 8,3) korzystając z zestawu do elektroforezy i transferu białek (Bio-Rad). Na żel nakładano 30-50 µg białka/próbę, a rozdział prowadzono przy stałym napięciu 120 V. Celem kontroli przebiegu rozdziału i późniejszego transferu białek na błonę nitrocelulozową, na żel nakładano barwny standard mas molekularnych 10-250 kDa (Thermo-Scientific).

Przeniesienie białek na błonę nitrocelulozową 0,25 µm (Bio-Rad) prowadzono tzw. „metodą mokrą” w buforze (25 mM Tris; 192 mM glicyna; 20% metanol; 0,01% SDS) przy stałym natężeniu 350 mA, 1,5 h, 4°C. Jakość transferu sprawdzano przy użyciu barwnika ponceau red, który wiąże się nietrwale z białkami.

Błony nitrocelulozowe blokowano przez 1 h w 5% odtłuszczonym mleku krowim lub 5% roztworze albuminy bydlęcej (BSA) rozpuszczonych w buforze TBST (25 mM Tris; 0,5M NaCl; pH 7,5; 0,1% Tween-20). Następnie nakładano przeciwciała pierwszorzędowe i inkubowano zgodnie z zaleceniami producenta lub w ustalonych eksperymentalnie warunkach (Tabela 7).

Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano buforem TBST (3x, 10 min) i nakładano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe związane z peroksydazą chrzanową, zawieszona w roztworze wykorzystywanym do blokowania (Tabela 8).

Celem detekcji związanych przeciwciał na błony nitrocelulozowe nakładano chemiluminescencyjny substrat peroksydazy chrzanowej (ECL, Bio-RAD) i odczytywano sygnał w ciemni automatycznej (G-BOX, Syngene). Obrazy zapisywano za pomocą programu GeneSnap (wersja 7.12.01). Analizę densytometryczną prążków przeprowadzono przy pomocy programu GeneTools ver. 4.02.01. Wyniki odnoszono do

ilości białka referencyjnego dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) lub w przypadku białek mitochondrialnych podjednostki 4 cytochromu c (COX-4).

4.5. Oznaczanie dimeryzacji eNOS

Aktywność NOS podlega wieloczynnikowej regulacji. Jednym ze zjawisk warunkujących prawidłowe funkcjonowanie enzymu jest jego dimeryzacja. W standardowej metodzie Western-blot denaturacja białka ma na celu zniszczenie III i IV rzędowej struktury, ułatwiając rozdział i późniejszą reakcję z przeciwciałem. Zatem, *de facto* oznaczana jest pula monomerów enzymu. W celu określenia ilości dimerów eNOS zastosowano warunki niedenaturujące, tzn. użyto buforu obciążającego niezawierającego β -merkaptoetanolu, a przed nałożeniem na żel prób nie podgrzewano. Elektroforezę prowadzono w 4 °C.

Tabela 7 Wykaz użytych przeciwciał pierwszorzędowych

| Białko | Pochodzenie | Producent | Numer katalogowy | Warunki inkubacji |
|----------------------------|-------------|----------------|------------------|---------------------------------------|
| PRMT-1 | Królik | Cell Signaling | 2449 | 1:1000 w 2,5% mleku przez noc, 4°C |
| NOS1 | Mysz | Santa Cruz | Sc-55521 | 1:100 w 5% mleku przez noc, 4°C |
| NOS2 | Królik | Santa Cruz | Sc-649 | 1:250 w 5% mleku przez noc, 4°C |
| NOS3 | Królik | Santa Cruz | Sc-654 | 1:250 w 5% mleku przez noc, 4°C |
| DDAH-1 | Mysz | Santa Cruz | Sc-271337 | 1:250 w 5% BSA przez noc, 4°C |
| DDAH-2 | Koza | Thermo Fisher | PA5-17996 | 1:2500 w 5% BSA przez noc, 4°C |
| HO-1 | Mysz | Abcam | ab13248 | 1:1000 w 5% mleku przez noc, 4°C |
| Nitrozylowan a tyrozyna | Królik | Cell Signaling | 9691 | 1:1000 w 5% BSA przez noc, 4°C |
| AGXT-2 | Królik | MyBioSource | 2033904 | 1:800 w 5% BSA przez noc, 4°C |
| GAPDH | Królik | Sigma-Aldrich | G9545 | 1:5000 w 5% mleku 1 h, temp. pokojowa |
| COX-4 | Koza | Santa Cruz | Sc-69360 | 1:250 w 5% BSA 3 h, temp. pokojowa |

Tabela 8 Wykaz użytych przeciwciał drugorzędowych znakowanych peroksydazą chrzanową

| Przeciwciało | Producent | Nr katalogowy | Warunki inkubacji |
|---------------|---------------|---------------|--|
| Anty-królicze | Sigma-Aldrich | A0545 | 1:10000 w 5% mleku lub BSA 1 h, temp. pokojowa |
| Anty-kozie | Santa Cruz | sc-2020 | 1:5000 w 5% mleku lub BSA 1 h, temp. pokojowa |
| Anty-mysie | GE Healthcare | RPN201V | 1:5000 w 5% mleku lub BSA 1 h, temp. pokojowa |

4.6. Oznaczanie stężenia aminokwasów i pochodnych aminokwasów metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

Stężenie badanych substancji drobnocząsteczkowych (Arg, Cyt, His, ADMA, SDMA, karnozyna, histamina) oznaczano techniką wysokosprawnej (wysokociśnieniowej) chromatografii ciekowej (HPLC) w odwróconym układzie faz z detekcją fluorymetryczną. Do rozdzielów używano systemu złożonego z pompy, automatycznego podajnika próbek, termostatu kolumn chromatograficznych (Dionex), kolumny ze złożem Hypersil Gold (Thermo Electron), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (Dionex).

Korę mózgu homogenizowano w roztworze powodującym denaturację białek zawierającym 0,1 M HCl i metanol (1:1 v/v) (Kilpatrick, 1991). Homogenaty wirowano (12000 x g, 20 min., 4°C), pobierano supernatant i zobojętniano 1 N NaOH do pH ok 7,5. Osocza otrzymane tak jak opisano w pkt. 4.1.2. odbiałczano dodając 2 µl 50% TCA /ml osocza, wirowano (12000 x g, 10 min., 4°C) i zobojętniano 1 N NaOH. Badane związki były znakowane w reakcji z dialdehydem orto-ftalowym (OPA). OPA łączy się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dając fluorescencyjną pochodną. Przed każdym rozdziałem, do 60 µl próbki, dodawano 60 µl 0,4 M buforu boranowego, pH 9,85 zawierającego 1,5 mM OPA oraz 0,25% β-merkaptioetanol. Po 2 min. inkubacji, 50 µl próbki było automatycznie przenoszone na kolumnę. Podczas

rozdziálu fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i 50 mM buforu fosforanowego pH 6,2 (20% MetOH / 80% bufor fosforanowy, faza A) oraz 100% MetOH (faza B). Wymywanie prowadzono przy prędkości 1,2 ml/min. Fluorymetrycznych pomiarów orto-ftalaldehydowych pochodnych dokonywano przy długościach fal: wzbudzenia, λ_{ex} = 370 nm, oraz emisji λ_{em} = 450 nm (Kilpatrick, 1991). Wynik analizy ustalano na podstawie krzywej stężenia badanego związku. Powyższe warunki rozdziálu nieznacznie modyfikowano w zakresie stężenia i pH użytego buforu fosforanowego oraz prędkości przepływu w oparciu o dane literaturowe: Arg, Cyt (Kilpatrick, 1991), ADMA, SDMA (Pi i wsp., 2000), His, histamina (Frattini i Lionetti, 1998), karnozyna (Gopalakrishnan i wsp., 1999).

4.7. Pomiary aktywności enzymatycznej

4.7.1. Oznaczenie całkowitej aktywności proteolitycznej w wątrobie

Do pomiaru całkowitej aktywności proteaz w homogenacie wątroby użyto zestawu Pierce Protease Assay Kit (nr kat. 23263, Pierce). Tkanę homogenizowano w 50 mM buforze boranowym pH 8.5 w proporcji 5 μ l/mg tkanki. Homogenat następnie wirowano (12000 x g, 20 min., 4°C). Supernatant przenoszono do czystych probówek, rozcieńczano 10 krotnie w 50 mM buforze boranowym pH 8.5. Na płytkę 96-dołkową nakładano najpierw 100 μ l komercyjnego roztworu kazeiny posiadającej związane reszty aminowe. Następnie dodawano 50 μ l badanej próby i inkubowano przez 20 min w 37°C. Po tym czasie dodawano 50 μ l odczynnika TNBSA tworzącego barwny produkt z uwolnionymi w trakcie trawienia kazeiny resztami aminowymi. Absorbancję odczytano przy 450 nm. Wyniki w postaci średniej gęstości optycznej (OD) po odjęciu tła uśredniono i przedstawiono jako % kontroli.

4.7.2. Aktywność katalityczna DDAH

Aktywność DDAH mierzono zmodyfikowaną metodą kolorymetryczną Prescott–Jones (Tain i Baylis, 2007). Metoda oparta jest na reakcji barwnej Cyt będącej produktem aktywności DDAH z „odczynnikiem reakcji barwnej” powstałym przez zmieszanie tuż przed użyciem 0,8% diacetylu monoksimu w 5% kwasie octowym z 0,5% antypiryną w 50% kwasie siarkowym (1:2 v/v).

Tkanekę homogenizowano na lodzie w 100 mM buforze fosforanowym pH 6,5 (5 µl buforu/mg tkanki), a następnie inkubowano z ureazą (100 U/ml homogenatu 5 min, 37°C). Po 100 µl próby dodawano do 400 µl 1 mM ADMA w buforze fosforanowym i do 400 µl buforu fosforanowego (próba ślepa). Reakcję prowadzono w łaźni wodnej (90 min, 37°C), po czym zatrzymywano przez dodanie 500 µl 4% SSA. Próbkę wirowano (10000 x g, 10 min., 4°C), 100 µl supernatantu przenoszono na płytkę 96-dołkową i dodawano 100 µl odczynnika reakcji barwnej. Płytkę inkubowano w ciemności (2 h, 60°C), schładzano na lodzie i mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm. Wynik odnoszono do krzywej standardowej Cyt i przeliczano na białko całkowite.

4.7.3. Aktywność katalityczna NOS

Aktywność NOS mierzono przy użyciu zestawu NOS detect Assay (Stratagene), w którym wykorzystano katalizowaną przez NOS reakcję biochemicznej przemiany Arg do Cyt. Użycie wyznakowanego radioaktywnie substratu [³H]L-argininy pozwoliło na monitorowanie powstającego produktu (Cyt), a wykorzystanie odmiennego punktu izoelektrycznego obu substancji umożliwiło oddzielenie produktu od mieszaniny reakcyjnej. 50 mg tkanki homogenizowano w 250 µl buforu do homogenizacji (Stratagene). Następnie próby wirowano (12 000 x g, 30 min., 4°C), zbierano nadsącz i mierzono w nim stężenie białka metodą Bradford opisaną w podrozdziale 4.8.1.

Materiały i metody

Supernatanty rozcieńczano tak, aby stężenie białka w każdym wynosiło ok. 2 µg/µl.

Reakcję enzymatyczną prowadzono przez 1 h w temperaturze 37°C, w roztworze reakcyjnym:

10 µl próby

25 µl 2 x stężonego buforu do reakcji (Stratagene)

5 µl 10 mM NADPH (rozcieńczony w 10 mM Tris- HCl pH =7.4)

1 µl [³H]argininy (1 µCi/µl)

5 µl 6 mM CaCl₂

3 µl H₂O

Reakcję zatrzymywano dodając do każdej próbki 400 µl buforu przerywającego reakcję (Stratagene). Do prób dodawano złożo (equilibrated resin) wiążące Arg, następnie przenoszono je na kolumnienki i wirowano (12000 x g, 1 min, 4°C). Procedurę przemycia na złożu przeprowadzono dwukrotnie. Aktywność NOS oznaczano mierząc radioaktywność eluentu w aparacie Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Perkin-Elmer). Wyniki wyrażono jako liczbę zliczeń sygnału (cpm) /g tkanki / min.

4.7.4. Aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2)

Aktywność COX-2 w osoczu oznaczono przy pomocy zestawu COX Fluorescent Activity Assay Kit (Cayman Chemical). COX wykazuje dwie aktywności enzymatyczne: cyklooksygenazy i peroksydazy. W użytej metodzie wykorzystuje się aktywność peroksydazy powodującą przejście 10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazyny (ADHP) w mającą właściwości fluorescencyjne rezorufinę. Krew zebraną na EDTA wirowano (2000 x g , 10 min, 4°C) i pobierano osocze. Reakcję z ADHP prowadzono wg protokołu załączonego przez producenta na płytce 96-dołkowej w obecności inhibitora COX-1 SC-560. Fluorescencję odczytywano przy długościach fal; λ_{ex} = 540 nm i λ_{em} = 595 nm na

aparacie FLUOstar Omega (BMG Labtech). Aktywność COX-2 wyrażano jako nmole produktu (resorufiny) /min/ml.

4.8. Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w homogenacie tkankowym

TAC oznaczano za pomocą zestawu OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Cell Biolabs) postępując wg protokołu producenta. Metoda oparta jest o reakcję redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^{1+} przez związki o właściwościach przeciwutleniających w tym przez kwas moczowy. Jony Cu^{1+} w następnym etapie reagują z załączonym przez producenta związkiem dając barwny produkt. Korę mózgu homogenizowano w buforze „Assay buffer” (100 mg/0,5 ml). Reakcję przeprowadzono wg protokołu producenta (10 min, temp. pokojowa) po jej zahamowaniu odczytywano absorbancję przy $\lambda = 490$ nm. Wyniki odnoszono do krzywej standardowej kwasu moczowego i wyrażano jako nM kwasu moczowego /g tkanki/min.

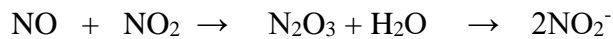
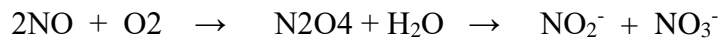
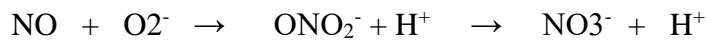
4.9. Pomiar ilości reaktywnych form tlenu (RFT) w homogenacie tkankowym

Korę mózgu homogenizowano w buforze Locke'a pH 7,35 (50 mg tkanki/1 ml) o składzie: 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,2 mM CaCl_2 ; 1,2 mM MgCl_2 ; 10 mM glukoza; 10 mM HEPES. W celu sprawdzenia czy aktywność NOS wpływa na produkcję RFT do części prób podano Arg w stężeniu końcowym 1 mM i/lub niespecyficzny inhibitor NOS L-NAME (100 μM) lub EDTA (1 mM), które wiążąc Ca^{2+} hamuje głównie aktywność nNOS i eNOS. Próby inkubowano 10 min w temp. pokojowej następnie rozcieńczano 10 krotnie buforem Locke'a i podzielono na dwie części. Do pierwszej dodano 10 μM sondę fluorescencyjną reagującą z rodnikami tlenowymi DCFDA (Thermo Fisher)

w DMSO (5 μ l sondy/1 ml homogenatu). Do drugiej dodano równoważną objętość DMSO (próba ślepa). Próby odczynnikowe służące do odjęcia tła sporządzono przez dodanie sondy fluorescencyjnej lub DMSO do buforu Locke'a. Próby inkubowano w ciemności przez 5 min. Następnie odczytywano fluorescencję (trzykrotnie co 5 min) przy długościach fal λ_{ex} = 485 nm i λ_{em} = 520 nm na aparacie FLUOstar Omega (BMG Labtech). Wyniki przedstawiono w jednostce umownej (AU) wyrażającej przyrost fluorescencji (po odjęciu tła) między ostatnim a pierwszym pomiarem (po 15 min od pierwszego pomiaru).

4.10. Analiza stężenia azotynów i azotanów w osoczu i mózgu

NO, będąc wysoce niestabilną cząsteczką, łatwo wchodzi w serię reakcji prowadzących do powstania trwalszych produktów:



Całkowite stężenie azotanów (NO_3^-) i azotynów (NO_2^-) zostało wykorzystane jako marker produkcji tlenku azotu. Oznaczenia wykonywano przy użyciu zestawu Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical).

W pierwszym etapie przekształcano azotany w azotyny w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotanową. W drugim, zastosowano reakcję Griess'a, przekształcając azotyny w barwny produkt, ciemnofioletowy związek azowy, którego absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy λ = 540 nm wobec krzywej standardowej.

Osocze przed pomiarem odwirowano (12000 x g, 10 min) i przesączano przez filtr o średnicy porów 0,22 μ m. Tkankę homogenizowano na lodzie w PBS o pH 7,4 i odwirowywano (12000 x g, 20 min, 4°C). Otrzymany supernatant przesączono przez

filtr o średnicy porów 0,22 μm . Reakcję redukcji azotanów prowadzono przez 5 h w temperaturze pokojowej. Dalsze etapy procedury przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Wyniki obliczano w przeliczeniu na ilość białka mierzonego metodą Bradford, a następnie przedstawiano jako % kontroli.

W dalszej części pracy w stosunku do wyników uzyskanych powyższą metodą lub bazujących na niej danych literaturowych używane jest określenie „stężenie azotynów i azotanów”.

4.11. Izolacja mitochondriów

Izolację frakcji mitochondrialnej przeprowadzono wg metody zaproponowanej przez Sims i Anderson (2008), i opartej na poprzedzonej wirowaniem frakcjonującym izolacji mitochondriów poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Percollu, w trakcie którego organelle sedymentują do warstwy odpowiadającej ich własnej gęstości.

Temperatura w trakcie wykonywania całej izolacji była utrzymywana na poziomie ok. 4°C. Korę mózgu homogenizowano w ręcznym homogenizatorze typu teflon–szkło w 2 ml „buforu B”: 0,32 M sacharoza, 1 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl pH 7,4. Homogenat wirowano (1500 x g, 5 min, 4°C). Nadsącz zbierano, a osad zawieszano w 1 ml buforu B, homogenizowano i ponownie wirowano (1500 x g, 5 min, 4°C). Następnie łączono oba nadsącze 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 nakładano na uprzednio przygotowany gradient gęstości, który stanowiła warstwa 40% pod 23% Percollem w buforze B (po 3,5 ml każdy). Próby 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 odwirowano (15000 x g, 15 min, 4°C). Tak otrzymaną frakcję mitochondrialną zawieszano w 100 µl buforu B i zamrażano w -80°C do dalszej analizy.

4.12. Wychwyty znakowanej radioaktywnie [³H]L-argininy do szczurzych astrocytów korowych *in vitro*

Astrocyty hodowano na płytkach 24-dołkowych. Pożywkę hodowlaną usuwano i przemywano komórki trzykrotnie PBS o temperaturze 37°C. Następnie komórki inkubowano przez 15 min w 37°C w buforze Krebsa: 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 0.8 mM MgCl₂; 5 mM glukoza; 10 mM HEPES, pH 7,4. Po tym czasie wymieniano bufor Krebsa na bufor zawierający znakowaną izotopowo Arg 1 µCi/ml [³H]L-argininy (Hartman, Niemcy). W celu określenia udziału poszczególnych układów transportujących Arg (y⁺; y^{+L}; b⁰⁺; B⁰⁺) użyto metody opisanej przez Nicholson i wsp. (2002). Metoda oparta jest na kompetycyjnym hamowaniu poszczególnych układów transportujących Arg przez użycie buforu Krebsa pozbawionego jonów sodu (Na⁺(-)) i/lub konkurujących z Arg aminokwasów L-alaniny (Ala) i L-leucyny (Leu) (Tabela 9).

Inkubację prowadzono przez 20 min w 37°C następnie zatrzymywano wychwyty [³H]L-argininy przez odciągnięcie buforu i zalanie komórek 2 ml buforu Krebsa (4°C). Komórki przemywano trzykrotnie. Następnie przeprowadzono lizę komórek dodając 500 µl 1 N NaOH i inkubowano 60 min w 37°C w łaźni z wytrząsaniem. Lizat komórkowy (400 µl) przenoszono do fiolek scyntylicyjnych i zalewano 2 ml płynu scyntylicyjnego Insta-GelPlus (Perkin-Elmer).

Materiały i metody

Radioaktywność mierzono w liczniku Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Perkin-Elmer). Pozostałą część lizatu wykorzystywano do pomiaru stężenia białka metodą Bradford.

Tabela 9 Metoda wyliczenia udziału poszczególnych układów transportowych w wychwycie Arg do astrocytów

| Warunki inkubacji | Czynne transportery Arg | Metoda wyliczenia |
|----------------------------------|--|---------------------|
| A. Na ⁺ (+) | γ^+ ; γ^+L ; b^{0+} ; B^{0+} | $B^{0+} = A - B$ |
| B. Na ⁺ (-) | γ^+ ; γ^+L ; b^{0+} | $b^{0+} = B - C$ |
| C. Na ⁺ (-); 5 mM Ala | γ^+ ; γ^+L | $\gamma^+L = C - D$ |
| D. Na ⁺ (+); 5 mM Leu | γ^+ | $\gamma^+ = D$ |

4.13. Pomiar stężenia białka

4.13.1. Metoda Bradford

Do 30 μ l odpowiednio rozcieńczonej próby dodawano 270 μ l odczynnika Bradford: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma–Aldrich), 4,75% etanol (POCH), 8,5% H₃PO₄ (POCH). Krzywą wzorcową zawartości białka sporządzano z roztworu albuminy (Sigma-Aldrich) w 1 N NaOH lub wodzie w zakresie stężeń 0,05–0,5 mg/ml. Odczytu absorbancji przy długości fali 595 nm dokonywano w spektrofotometrze płytkowym MR680 (Bio-Rad). Każdą próbkę mierzono trzykrotnie, określenia stężenia białka względem krzywej wzorcowej dokonywano przy użyciu oprogramowania dołączonego do czytnika płytek (Bio-Rad).

4.13.2. Metoda biuretowa

Do 10 μ l odpowiednio rozcieńczonej próby dodawano 200 μ l odczynnika przygotowanego wg protokołu BCA Protein Assay Kit (Pierce). Krzywą wzorcową

zawartości białka sporządzano z roztworu BSA (Sigma-Aldrich), 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 (Bio-Rad).

4.14. Oznaczanie stężenia ADMA i SDMA w pożywce hodowlanej metodą spektrometryczną

Pożywkę zbierano i odbiałczano przez dodanie 50% TCA, w stosunku 100:1 a następnie wirowano ($12.000 \times g$, 12 minut, 4°C). Wartość pH supernatantu doprowadzano do ~7,4 przy użyciu 1 N NaOH. Próbkę ponownie wirowano ($12000 \times g$, 12 minut, 4°C), po czym pobierano supernatant i używano do oznaczeń. Pomiar stężenia ADMA i SDMA w pożywkach wykonano w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Zakładu Biofizyki IBB PAN w Warszawie na spektrometrze typu potrójnego kwadrupola Waters Xevo TQ-S wyposażonym w optykę jonową typu „StepWave”. Aparat ten był sprzężony z chromatografem cieczowym o TQ-S Waters.

4.15. Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki wyrażano jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe (SD). Liczbę powtórzeń (n) podano w opisach rycin i tabel. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5.0 stosując test t-Studenta w przypadku porównania dwóch grup eksperymentalnych oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Bonferroniego, w przypadku większej liczby grup eksperymentalnych. Za istotne statystycznie uznano wyniki dla których poziom istotności (p) był mniejszy niż 0,05.

5. Wyniki

5.1. Stężenie ADMA i SDMA w szczurzych modelach EW

Pierwszym celem rozprawy było wykazanie czy w badanych modelach: HA i ostrym uszkodzeniu wątroby (TAA) dochodzi do zmian stężenia ADMA i SDMA w osoczu i/lub homogenatach kory mózgowej.

5.1.1. Pomiar stężenia ADMA i SDMA w osoczu i homogenatach mózgu w szczurzym modelu HA

U szczurów HA nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu ADMA lub SDMA zarówno w osoczu krwi jak i korze mózgowej (Tabela 10). Wskazuje to, że hiperamonemia nie jest bezpośrednią przyczyną zmian w stężeniu ADMA obserwowanych u pacjentów z EW i w innych zwierzęcych modelach EW.

Ze względu na temat rozprawy dotyczący roli dwumetyloarginin w EW, nie kontynuowano prac na szczurzym modelu hiperamonemii prostej.

Tabela 10 Stężenie ADMA, SDMA i Arg w korze mózgowej i osoczu szczurów HA

| | | Kontrola (n = 6) | HA (n = 6) |
|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------|
| Kora mózgu | ADMA [nmol/g tk.] | 0,6 ± 0,1 | 0,6 ± 0,09 |
| | SDMA [nmol/g tk.] | 0,3 ± 0,05 | 0,4 ± 0,06 |
| | Arg [nmol/g tk.] | 6,2 ± 0,9 | 6,4 ± 0,5 |
| Osocze | ADMA [μmol] | 1,2 ± 0.1 | 1,3 ± 0.2 |

5.1.2. Pomiar stężenia ADMA i SDMA w osoczu i homogenatach mózgu w szczurzym modelu ostrego uszkodzenia wątroby (TAA). Wpływ podania His.

U szczurów TAA wykazano podwyższenie stężenia ADMA zarówno w osoczu o ok. 50% (Tabela 12), jak i w korze mózgowej o ok. 20% (Tabela 11). Celem weryfikacji czy wzrost stężenia ADMA jest specyficzny dla kory mózgu zbadano również stężenie ADMA i SDMA w mózdzku. Wykazano, że także w tej strukturze wzrasta stężenie ADMA. Dootrzewnowe podanie His skutkowało zniesieniem wywołanego przez TAA wzrostu stężenia ADMA w korze mózgowej, ale stosunek Arg/ADMA w tej strukturze nie zmieniał się istotnie. His nie miała wpływu na stężenie ADMA w osoczu i mózdzku. Stężenie SDMA w mózgu nie zmieniało się pod wpływem badanych czynników. Stężenia Arg w osoczu szczurów TAA obniżało się i wykazywało tendencję do obniżenia w grupie TAA+His, co dodatkowo wpływało na zmniejszenie stosunku Arg/ADMA w osoczu obu grup (Tabela 12).

Tabela 11 Stężenie badanych aminokwasów w mózgu szczura, *p < 0,05; **p < 0,001 różnica znamienna względem kontroli, †p < 0,05 różnica znamienna względem TAA

| | Kontrola (n = 8) | His (n = 8) | TAA (n = 10) | TAA+His (n = 10) |
|------------|---------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| Kora mózgu | ADMA [nmol/g tk.] | 0,49 ± 0,04 | 0,52 ± 0,03 | 0,62 ± 0,04* |
| | SDMA [nmol/g tk.] | 0,24 ± 0,03 | 0,29 ± 0,04 | 0,28 ± 0,02 |
| | ADMA/SDMA | 1,99 ± 0,25 | 1,78 ± 0,25 | 2,16 ± 0,19 |
| | Arg [nmol/g tk.] | 127,7 ± 9,54 | 118,45 ± 11,98 | 109,35 ± 7,88 |
| | Arg/ADMA | 258,9 ± 15,8 | 227,42 ± 36,14 | 177,29±20,21** |
| | Cyt [nmol/g tk.] | 37,36 ± 1,33 | 35,45 ± 9,2 | 33,78 ± 6,25 |
| Mózdzek | ADMA [nmol/g tk.] | 0,56 ± 0,04 | 0,65 ± 0,06 | 0,94 ± 0,07* |
| | SDMA [nmol/g tk.] | 0,29 ± 0,03 | 0,33 ± 0,02 | 0,36 ± 0,04 |

Tabela 12 Stężenie ADMA i Arg w osoczu krwi szczura, *p < 0,05

| | Kontrola (n = 8) | His (n = 8) | TAA (n = 10) | TAA+His (n = 9) |
|--------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| ADMA [μmol] | 1,13 \pm 0,22 | 1,27 \pm 0,26 | 2,08 \pm 0,42* | 2,24 \pm 0,67* |
| Arg [μmol] | 110,21 \pm 16,03 | 98,34 \pm 25,43 | 75,44 \pm 11,18* | 87,66 \pm 24,73 |
| Arg/ADMA | 94,86 \pm 18,02 | 82,93 \pm 13,21 | 42,7 \pm 10,74* | 43,56 \pm 14,02* |

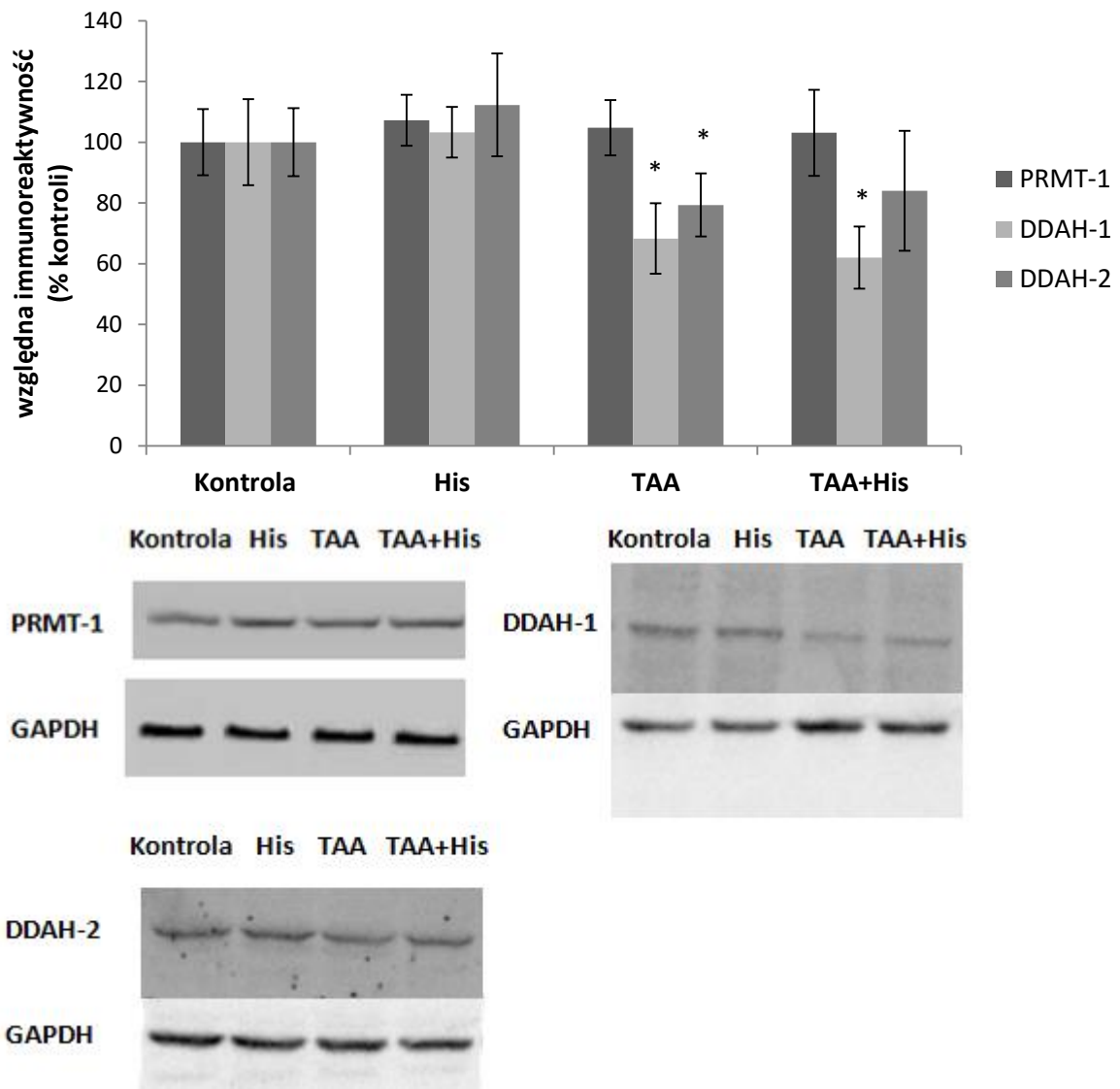
5.2. Metabolizm ADMA w szczurzym modelu ostrego uszkodzenia wątroby (TAA)

Zbadano, czy wzrost stężenia ADMA obserwowany w modelu TAA wynika ze zmiany tempa syntezy i/lub enzymatycznej degradacji ADMA.

5.2.1. Pomiar immunoreaktywności białek PRMT-1 i DDAH1/2 w wątrobie.

Wpływ podania His.

Uszkodzenie wątroby nie wpływa istotnie na ilość białka PRMT-1 w tym narządzie (Rycina 5). Z kolei, poziom immunoreaktywności białek DDAH-1 i DDAH-2 był obniżony. W szczególności dotyczyło to poziomu białka DDAH-1, którego było ok. 30% mniej niż w kontroli. Podanie His nie zapobiegło spowodowanemu przez TAA obniżeniu ilości białka DDAH-1 i DDAH-2 w wątrobie (Rycina 5).



Rycina 5 Immunoreaktywność białek metabolizmu ADMA: PRMT-1, DDAH-1 i DDAH-2 w wątrobie szczura, * $p < 0,05$, $n = 4$

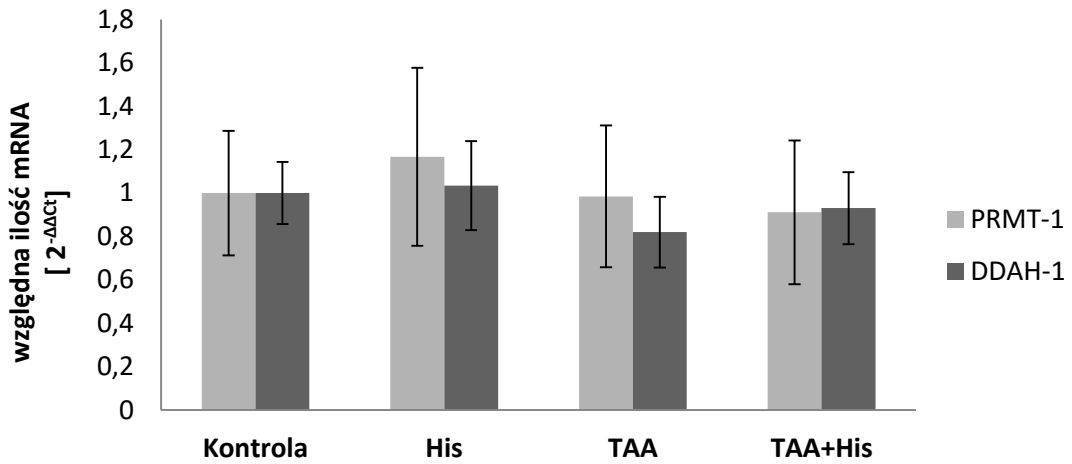
5.2.2. Analiza ekspresji enzymów metabolizmu ADMA w korze mózgowej.

Wpływ podania His.

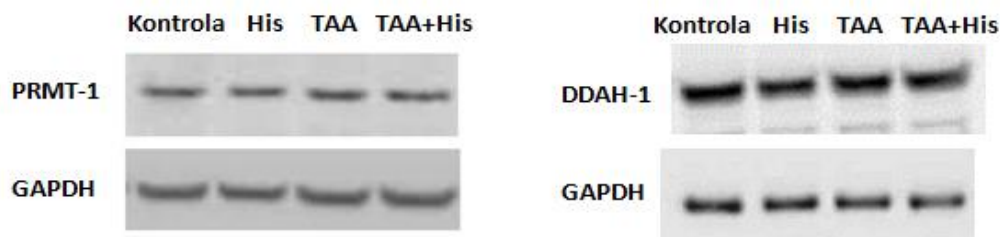
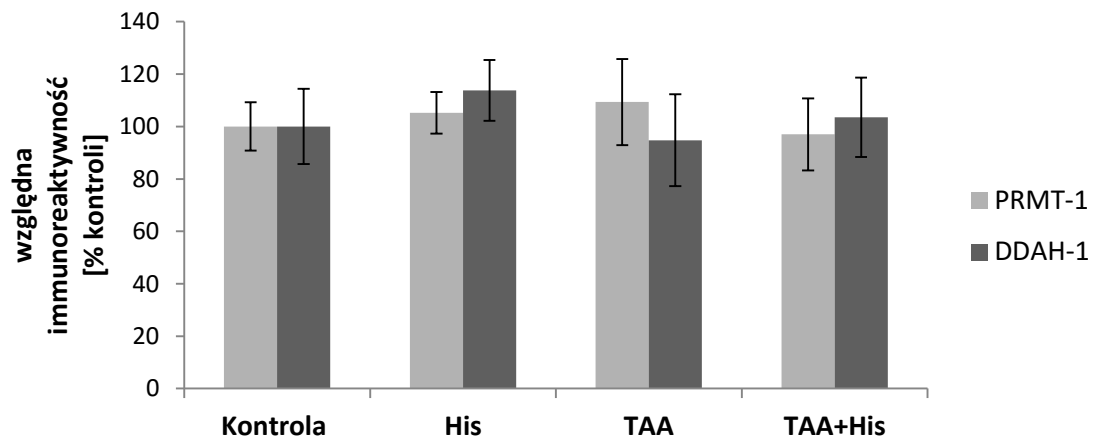
Badanie poziomu ekspresji enzymów odpowiedzialnych za syntezę i degradację ADMA w korze mózgowej, nie wykazało znamienych różnic w ilości mRNA lub białka (Rycina 6, 7). Świadczy to, że zmiana tempa metabolizmu ADMA w mózgu nie jest

Wyniki

przyczyną obserwowanego w modelu TAA wzrostu stężenia tej dwumetyloargininy w korze mózgowej.



Rycina 6 Względna ekspresja genów kodujących białka PRMT-1 i DDAH-1 w korze mózgowej szczura, n = 6

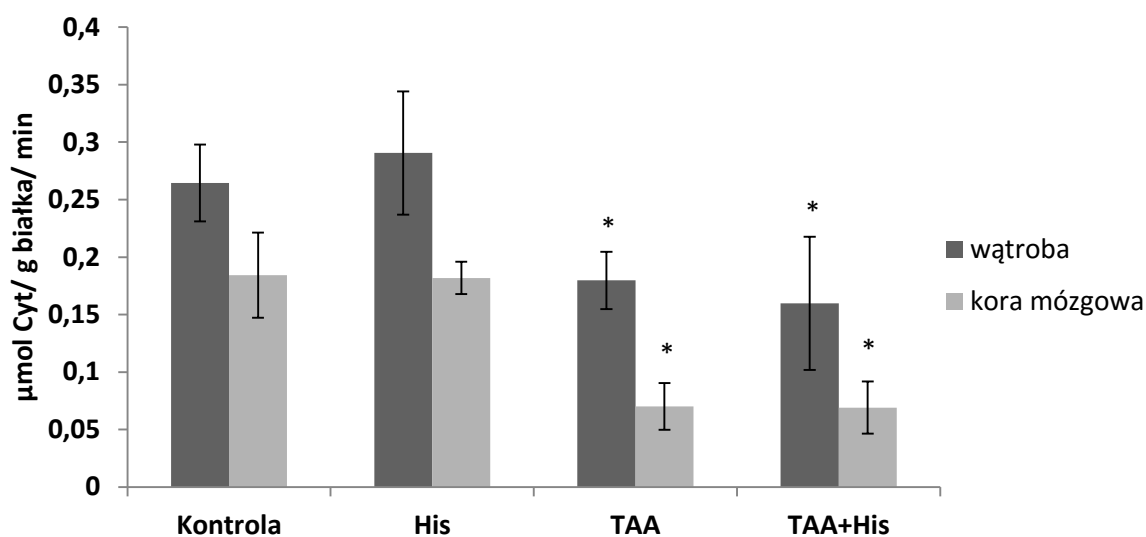


Rycina 7 Immunoreaktywność białek PRMT-1 i DDAH-1 w korze mózgowej szczura, n = 4

5.2.3. Pomiar aktywności hydrolitycznej DDAH w wątrobie i korze mózgu.

Wpływ podania His.

Mimo, że istotne obniżenie względnego poziomu białek DDAH stwierdzono jedynie w wątrobie szczurów TAA, aktywność hydrolityczna DDAH była ok. dwukrotnie zmniejszona zarówno w wątrobie jak i w korze mózgowej (Rycina 8). Nie stwierdzono istotnego wpływu podania His na aktywność DDAH.



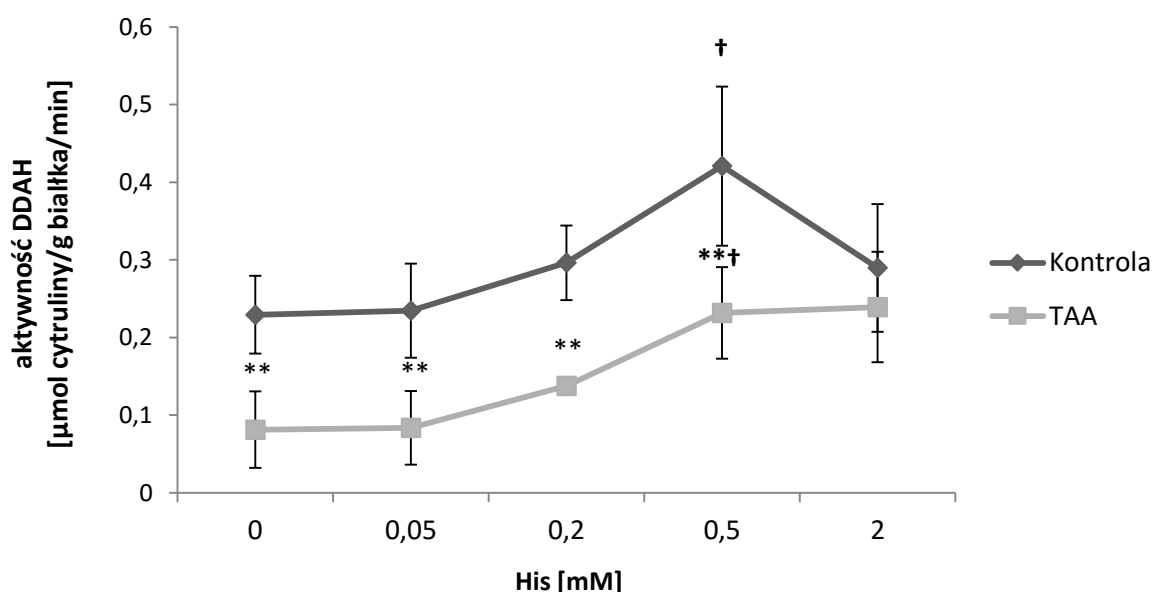
Rycina 8 Aktywność DDAH w mózgu i wątrobie szczura, *p < 0,05, n = 6

5.2.4. Wpływ podanej egzogennie His na aktywność hydrolityczną DDAH w korze mózgu

Do homogenatów kory mózgowej pochodzącej od szczurów kontrolnych i TAA dodano His w zakresie stężeń 0,005-2 mM i inkubowano przez 10 min w 37°C. Następnie zmierzono aktywność hydrolityczną DDAH. W obu badanych grupach stwierdzono istotne podwyższenie aktywności DDAH przy stężeniu 0,5 mM. His w stężeniu 2 mM była nieefektywna (Rycina 9). Doświadczenie potwierdziło znaczny spadek aktywności DDAH u szczurów TAA w stosunku do zwierząt kontrolnych.

Wyniki

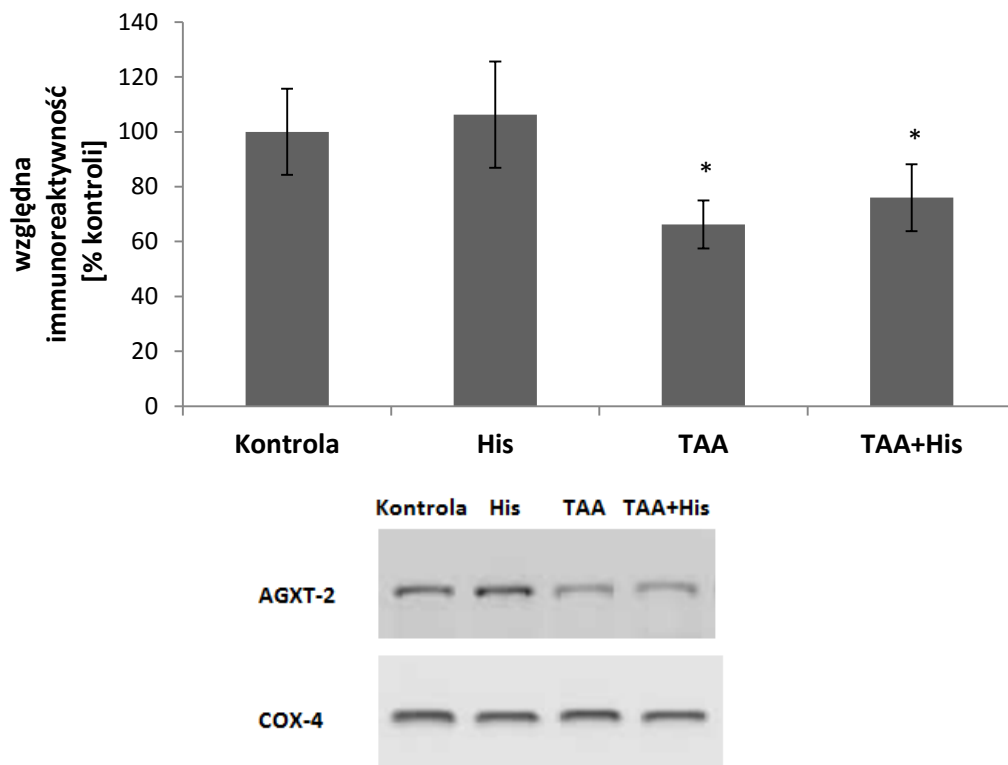
Mimo, że nie wykazano wpływu dootrzewnowego podania His na aktywność DDAH w mózgu ani wątrobie (Rycina 9), nie można jednoznacznie wykluczyć udziału His w regulacji aktywności badanego enzymu. Wymagana jest jednak bezpośrednia interakcja DDAH z His w odpowiednio wysokim stężeniu. Zatem wpływ podania His na aktywność DDAH może się nie ujawnić po 24 h od jej podania, kiedy jak wykazano w rozdziale 5.4.1 stężenie His w osoczu nie odbiega od poziomu kontrolnego, zaś w mózgu jest jedynie nieznacznie podwyższone.



Rycina 9 Aktywność DDAH po podaniu His do homogenatu kory mózgowej szczura, ** $p < 0,01$ względem szczurów kontrolnych test t-Studenta, † $p < 0,05$ względem 0 mM His, (jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z nieparametrycznym testem Bonferroniego), $n = 8$

5.2.5. Pomiar immunoreaktywności białka AGXT-2 w mitochondriach izolowanych z kory mózgowej. Wpływ podania His.

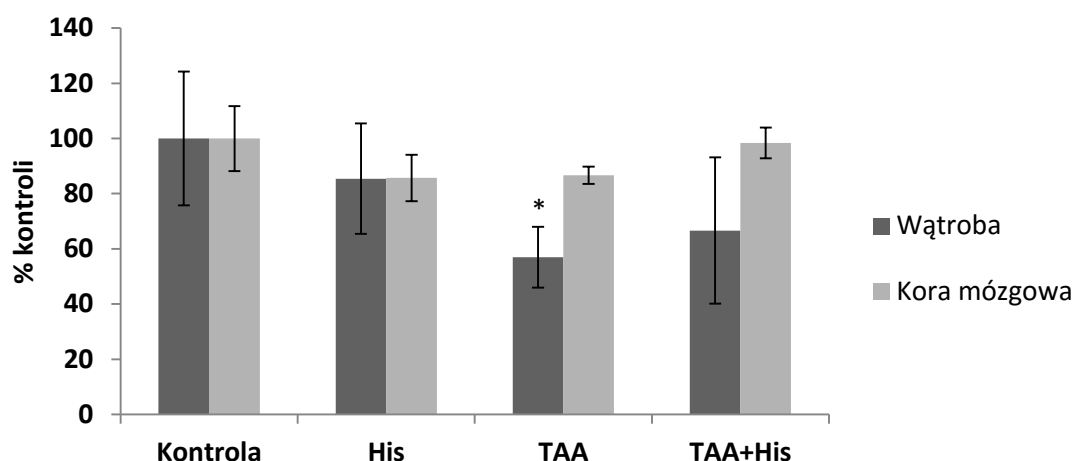
W mitochondriach kory mózgowej szczurów TAA zaobserwowano istotne zmniejszenie względnego poziomu AGXT-2 odpowiadającego za alternatywną względem DDAH ścieżkę rozkładu ADMA. Nie odnotowano istotnych różnic w przypadku zwierząt, którym podano His (Rycina 10).



Rycina 10 Immunoreaktywność białka AGXT-2 w mitochondriach kory mózgowej szczura, * $p < 0,05$ względem kontroli, $n = 3$

5.2.6. Aktywność proteolityczna w wątrobie i korze mózgowej

Na stężenie wolnych dwumetyloarginin w organizmie oprócz aktywności PRMT i ich usuwania (głównie degradacja enzymatyczna) wpływa także tempo proteolizy. Z tego względu zdecydowano się oznaczyć całkowitą aktywność proteolityczną w wątrobie i korze mózgowej. Nie stwierdzono zmian w aktywności proteolitycznej kory mózgu (Rycina 11). Z kolei w wątrobie szczurów TAA stwierdzono istotne obniżenie badanego parametru. Wyniki pomiaru aktywności proteolitycznej w wątrobach zwierząt otrzymujących His nie różniły się statystycznie od kontroli.



Rycina 11 Aktywność proteolityczna wątroby i kory mózgowej * $p < 0,05$, $n = 5$

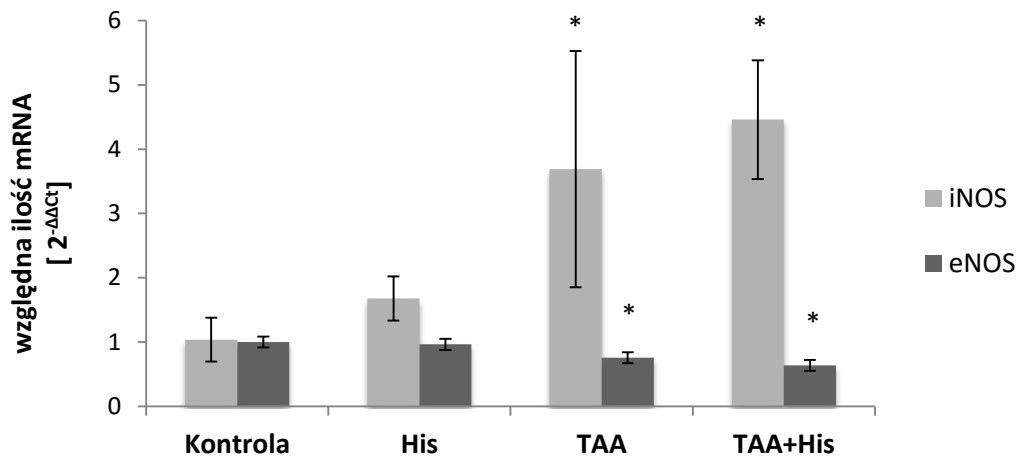
5.3. Ekspresja i aktywność NOS w modelu TAA

Zaburzenie szlaku NMDA/NO/cGMP jest kluczowym elementem patomechanizmu EW. Mimo to, ani pełnego profilu ekspresji, ani aktywności NOS w mózgu szczurów z ostrą EW jak dotąd nie zbadano. Zagadnienie to staje się szczególnie istotne wobec wykazanego w badanym modelu TAA wzrostu stężenia ADMA.

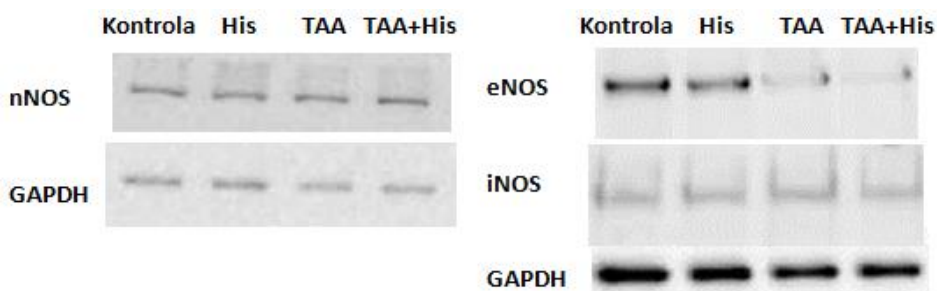
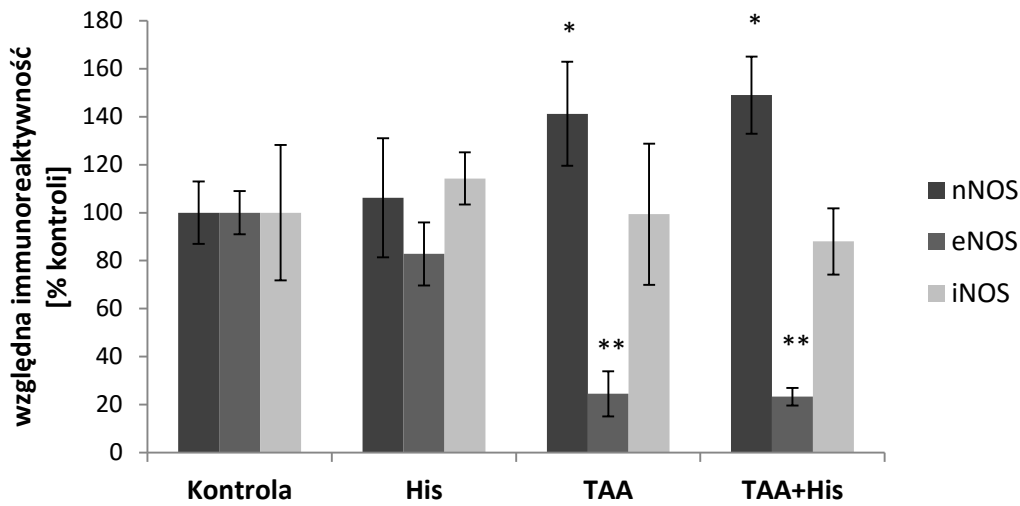
5.3.1. Analiza ekspresji izoform NOS w korze mózgu. Wpływ podania His.

Wykazano obniżenie ekspresji genu *enos* na poziomie mRNA i indukcję ekspresji *inos* pod wpływem TAA (Rycina 12). His nie wpływała istotnie na te parametry. Badanie ilości białka potwierdziło wywołany TAA spadek ekspresji eNOS w homogenacie kory mózgowej, natomiast ilość białka iNOS nie odbiegała istotnie od wartości kontrolnych (Rycina 13). Szczury TAA cechował ponadto wzrost ilości białka nNOS w korze mózgowej.

Wyniki



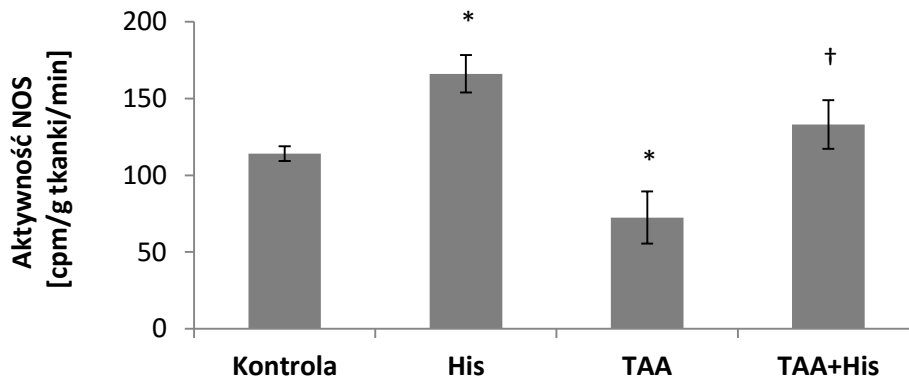
Rycina 12 Ekspresja mRNA kodującego iNOS i eNOS w korze mózgowej szczura, * $p < 0,05$, $n = 4$



Rycina 13 Względna immunoreaktywność białek nNOS, eNOS i iNOS w korze mózgowej szczura, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, $n = 4$

5.3.2. Wpływ TAA i His na aktywność NOS w korze mózgowej

W korze mózgowej szczurów TAA wykazano ok. 30% obniżenie aktywności NOS. Podanie His istotnie odwracało ten efekt. Warto zauważyć, że samo podanie His powodowało wzrost aktywności NOS (Rycina 14).



Rycina 14 Aktywność całkowita NOS w korze mózgowej szczura, * $p < 0,01$ względem kontroli, † $p < 0,05$ względem TAA, $n = 4$

5.3.3. Wpływ TAA na dimeryzację eNOS i produkcję RFT. Wpływ podania His

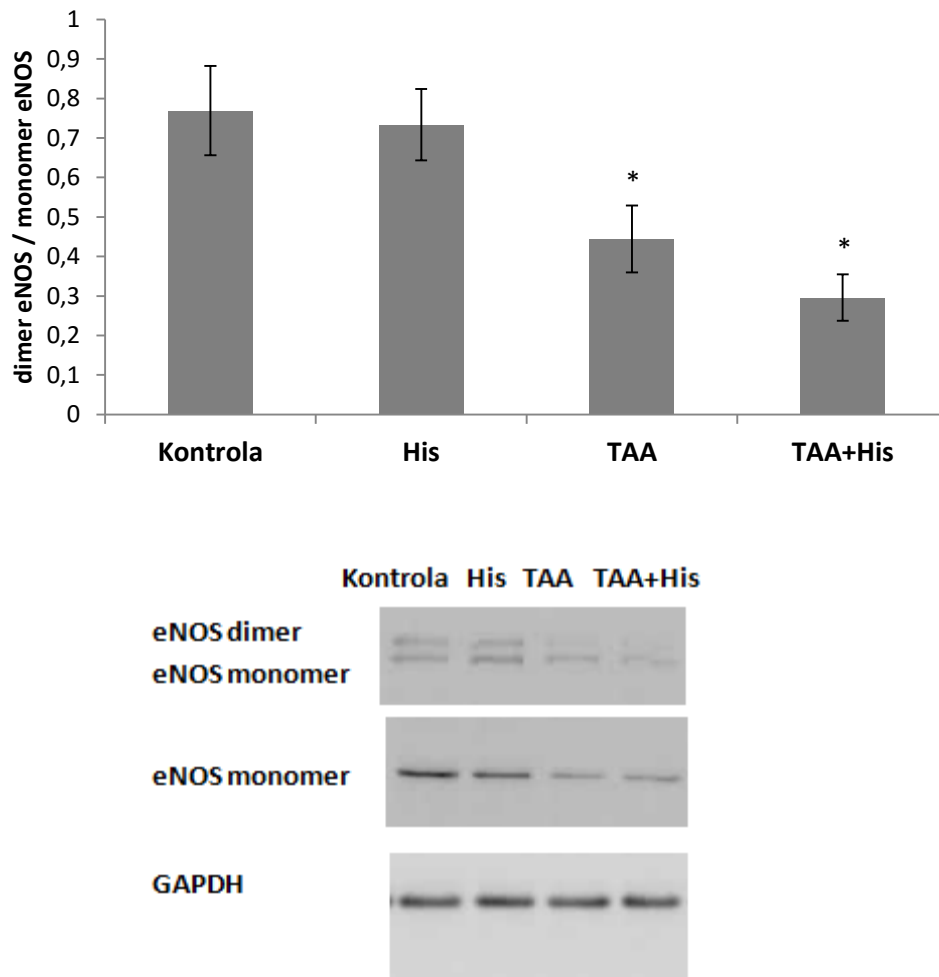
W korze mózgowej szczurów TAA stwierdzono spadek ilości dimerów eNOS, a także obniżenie stosunku dimer eNOS/monomer eNOS. Wskazuje to na dodatkowy mechanizm, tzw. stan rozprężenia enzymu, który obok zmniejszonej ekspresji może upośledzać właściwe funkcjonowanie eNOS (Rycina 15).

Wykazano dalej, że rozprężony eNOS jest dodatkowym źródłem produkowanych w mózgu RFT. Zmierzono ilość produkowanych RFT w homogenacie kory mózgowej szczurów kontrolnych i TAA (nie badano szczurów otrzymujących His, gdyż jej podanie nie miało wpływu na dimeryzację eNOS).

Ilość powstających RFT była istotnie wyższa w korze mózgowej szczurów TAA. Wykazano również, że obecność Arg w stężeniu 1 mM powoduje wzrost fluorescencji,

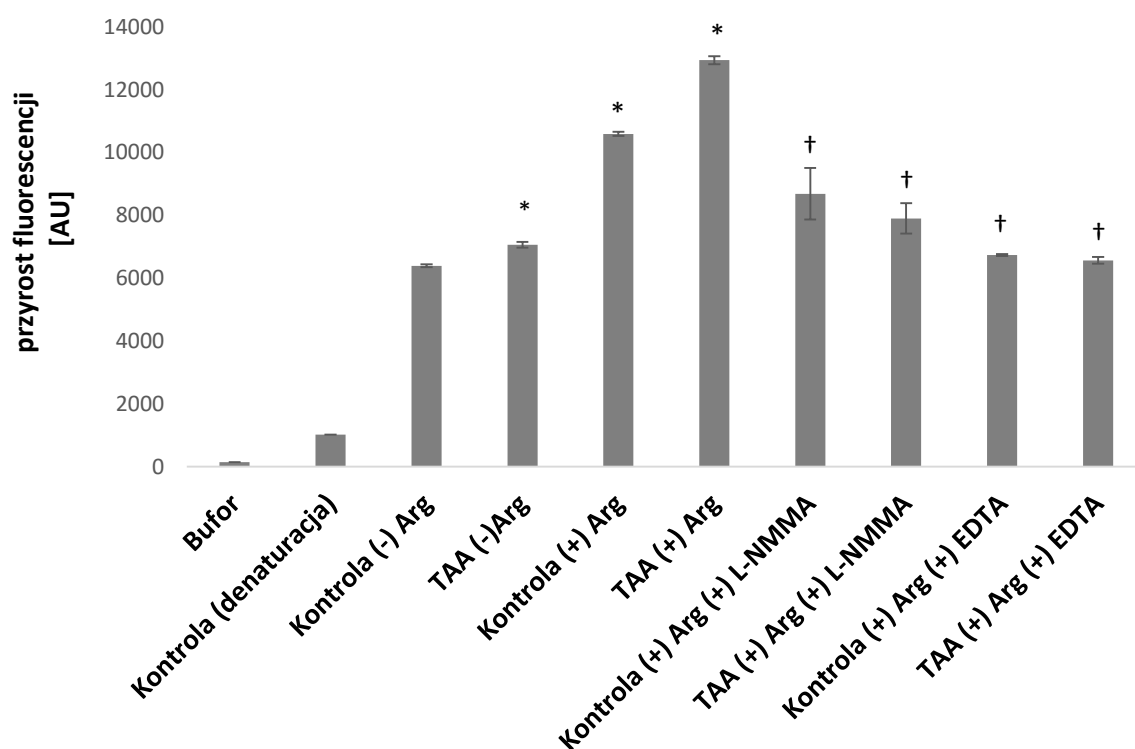
Wyniki

a zatem ilości RFT. Odwrotnie, obecność inhibitora NOS – L-NMMA lub EDTA powodowała istotny spadek produkcji RFT. Potwierdzeniem, że obserwowane zmiany w ilości RFT zależą od aktywności enzymatycznej było wykazanie, że ilość RFT w zależności od czasu w inaktywowanej termicznie próbie nie zmienia się (Rycina 16).



Rycina 15 Dimeryzacja podjednostek eNOS w korze mózgowej, * $p < 0,05$, $n = 3$

Wyniki

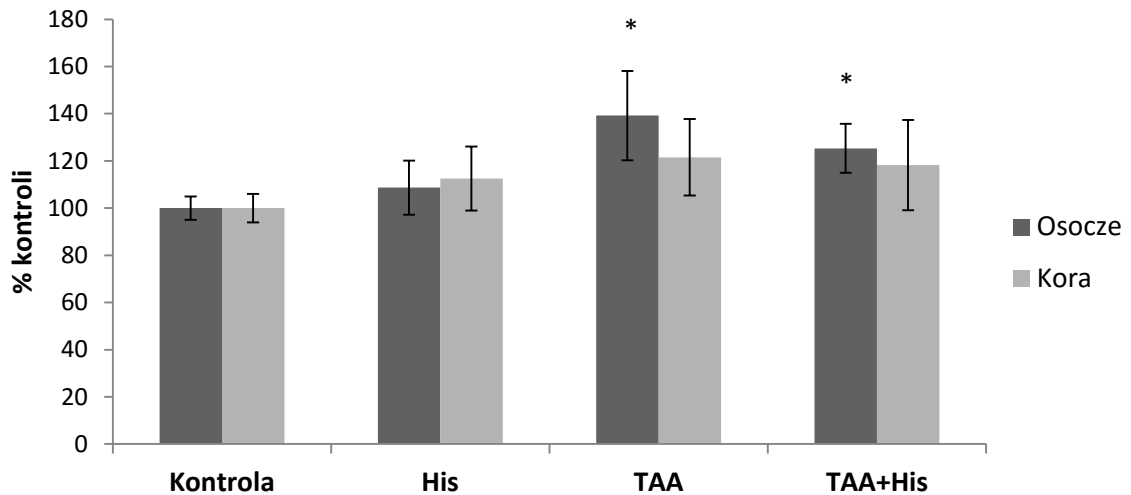


Rycina 16 Wpływ podania Arg i inhibitorów NOS na produkcję RFT w homogenacie kory mózgu szczura, * $p < 0,001$ względem kontroli (-) Arg, † $p < 0,001$ względem odpowiadającej grupy (+) Arg, $n = 3$

5.3.4. Pomiar stężenia azotynów i azotanów w korze mózgu i osoczu. Wpływ podania His

Stężenie azotynów i azotanów w korze mózgu nie zmieniało się istotnie. Natomiast w osoczu było o ok. 40% podwyższone wskutek podania TAA. Również w grupie otrzymującej TAA i His, stężenie azotynów i azotanów było wyższe niż w kontroli, ale wzrost był mniej widoczny (ok. 25%) (Rycina 17).

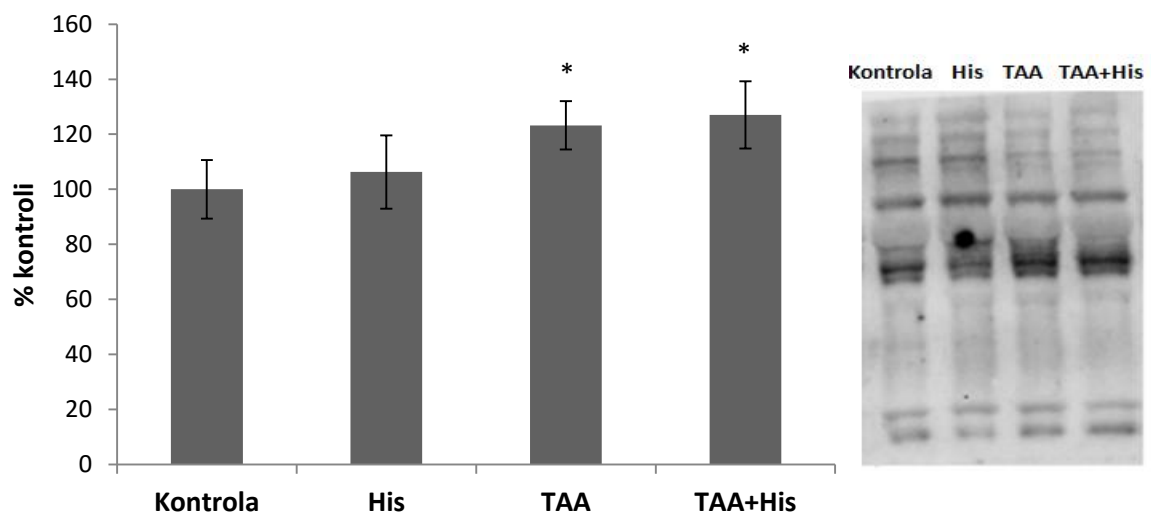
Wyniki



Rycina 17 Pomiar stężenia azotynów i azotanów w korze mózgowej i osoczu szczura , *p < 0,05, n = 4

5.3.5. Immunoenzymatyczne oznaczenie stopnia nitrozytacji tyrozyny w białkach osocza. Wpływ podania His

Wykazano wzrost ilości nitrozylowanej tyrozyny w białkach osocza krwi (Rycina 18). Wynik ten potwierdza obserwowany wcześniej wzrost stężenia azotynów i azotanów w osoczu, Podanie His nie wpływało na badane parametry.



Rycina 18 Nitrozyłacja tyrozyny w białkach osocza krwi, *p < 0,05, n = 3

5.4. Analiza metabolizmu His oraz pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej i markerów prozapalnych w homogenatach mózgu w modelu TAA

Wykazane do tej pory efekty podania His w postaci: obniżenia stężenia ADMA w korze mózgowej szczurów TAA, podniesienia całkowitej aktywności NOS w mózgu oraz obserwowanego *ex vivo* wzrostu aktywności DDAH wymagały podjęcia próby wyjaśnienia mechanizmu tych obserwacji.

W celu ustalenia czy podanie His ma bezpośrednie działanie antyoksydacyjne, zmierzono w homogenatach kory mózgowej całkowitą pojemność antyoksydacyjną. Zbadano również wybrane markery prozapalne, co jest szczególnie istotne w kontekście łączącym wzrost ADMA z chorobami o podłożu zapalnym.

5.4.1. Wpływ dootrzewnowego podania His na jej stężenie w osoczu i mózgu.

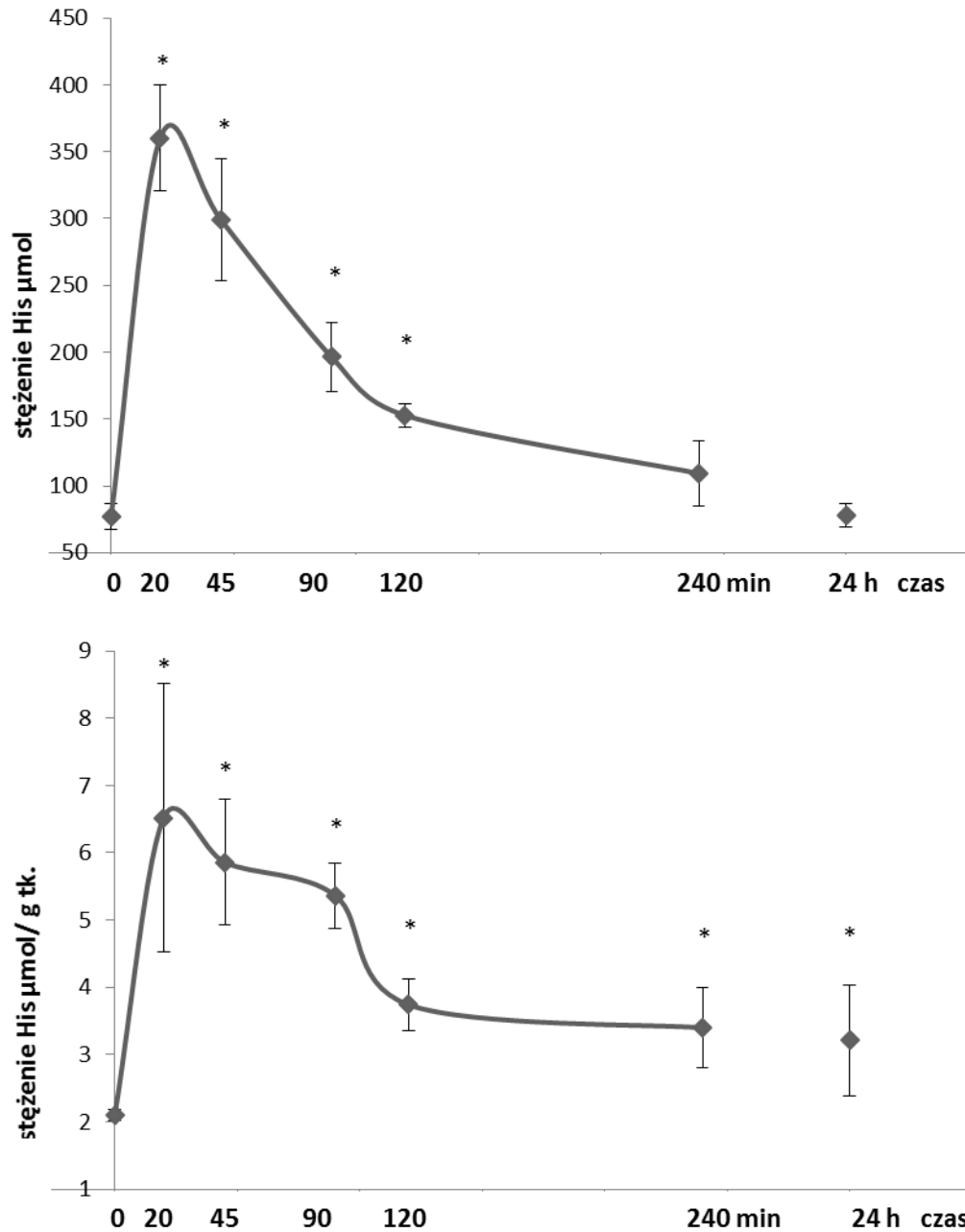
Pomiar stężenia His i jej metabolitu karnozyny w osoczu i mózgu

His podana dootrzewnowo w dawce 100 mg/kg m.c. była wcześniej stosowana w pracach na szczurzym modelu EW wywołanej podaniem TAA (Rama Rao i wsp., 2010). Jednak ze względu na brak dostępnych danych literaturowych opisujących farmakodynamikę dootrzewnowego podania His, szczególnie w odniesieniu do OUN, zmierzono stężenie His w osoczu krwi oraz korze mózgu u zdrowych szczurów w pierwszej dobie po dootrzewnowym podaniu His (Rycina 19).

Po 20 min od podania, stężenie His odpowiednio w osoczu i korze mózgu wzrosło ok. 6 i 3 krotnie, a następnie stopniowo spadało. Co ciekawe, w osoczu tempo spadku stężenia His było stosunkowo stałe i przed upływem doby parametr ten wracał do wartości kontrolnych. W mózgu wzrost stężenia utrzymywał się dłużej i był szczególnie

Wyniki

wyraźny przez pierwsze 1,5-2 h, ale również po upływie doby stężenie His w korze mózgowej było istotnie wyższe od wartości kontrolnych (Rycina 19).



Rycina 19 Stężenie His w osoczu (panel górny) i korze mózgowej (panel dolny) szczura w pierwszej dobie po dootrzewnowym podaniu His (100 mg/ kg m.c.). * $p < 0,01$ względem kontroli (punkt 0), $n = 5$

5.4.2. Analiza metabolitów His w osoczu i korze mózgu

Wtórne metabolity His: histamina i karnozyna mogą mieć znaczenie dla przebiegu EW i bezpośrednio przyczyniać się do pojawienia się niektórych efektów obserwowanych po podaniu His. Dlatego też zmierzono ich stężenie w osoczu i korze mózgowej.

Stężenie histaminy w osoczu nie zmieniało się u żadnej z badanych grup. Podanie His nie miało również wpływu na stężenie histaminy w korze mózgowej (Tabela 13). Wynik ten świadczy, że His w podawanym stężeniu nie metabolizuje się do histaminy w mózgu.

Stężenia karnozyny w osoczu nie udało się oznaczyć, natomiast w korze mózgowej szczurów TAA jej stężenie było istotnie obniżone (Tabela 13). Z kolei u obu grup otrzymujących His, stężenie karnozyny było istotnie podwyższone, co wskazuje, że część podawanej His może służyć jako substrat do syntezy karnozyny (Tabela 13).

Tabela 13 Stężenie His i jej metabolitów: histaminy i karnozyny w korze mózgowej i osoczu szczura, *p < 0,05 względem kontroli, †p < 0,05 względem TAA, n = 6 dla karnozyny n = 8 dla histaminy

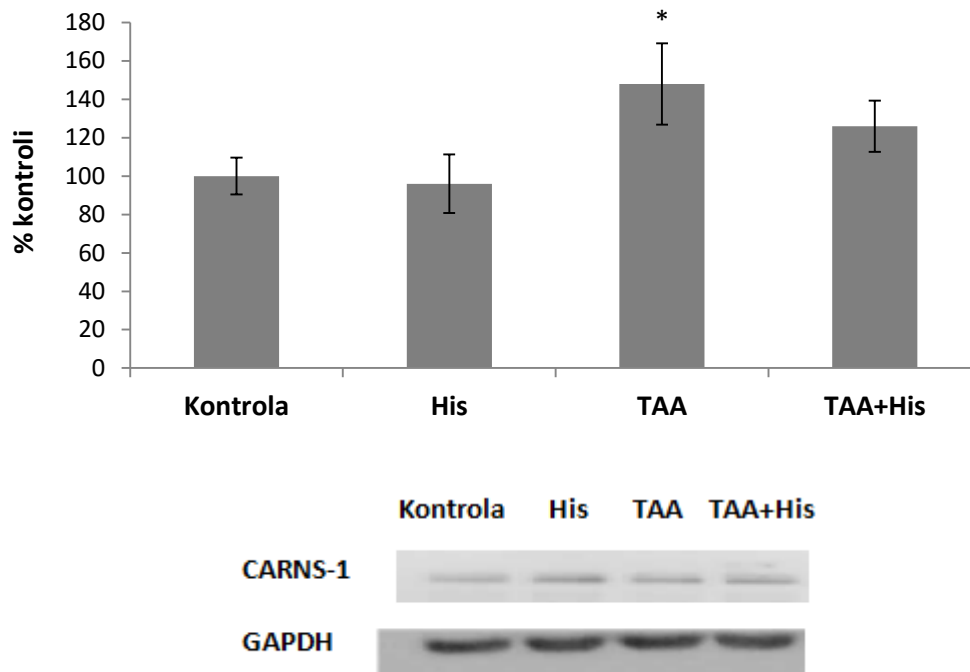
| | | Kontrola | TAA | His | TAA+His |
|------------|-----------------------------------|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Kora mózgu | Karnozyna [$\mu\text{M/g tk.}$] | 28,58 \pm 1,89 | 24,2 \pm 0,77* | 35,34 \pm 2,03* | 38,46 \pm 2,68*† |
| | Histamina [nM /g tk.] | 0,06 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 |
| Osocze | Karnozyna | Poniżej progu detekcji | | | |
| | Histamina [μM] | 0,76 \pm 0,23 | 0,59 \pm 0,16 | 0,55 \pm 0,2 | 0,84 \pm 0,28 |

5.4.3. Wpływ TAA na immunoreaktywność syntazy karnozyny-1 (CARNS-1) w korze mózgu.

Analiza Western-blot CARNS-1, enzymu odpowiedzialnego za syntezę karnozyny w mózgu wykazała istotny wzrost jej ekspresji w korze mózgowej szczurów TAA

Wyniki

(Rycina 20). W grupie otrzymującej His i TAA obserwowano tendencję wzrostową ilości CARNS-1 w stosunku do wartości kontrolnych.



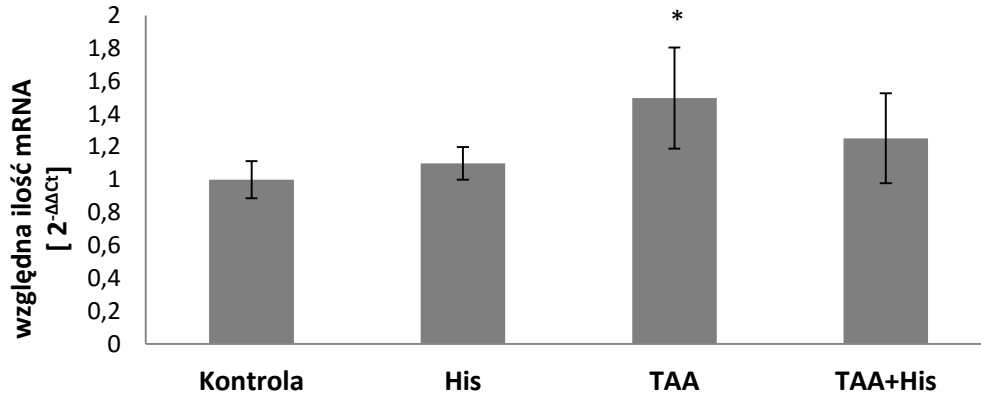
Rycina 20 Immunoreaktywność CARNS-1 w korze mózgowej szczura, * $p < 0,05$, $n = 4$

5.4.4. Pomiar aktywności cyklooksygenazy-2, stężenia TNF- α i ekspresji *Tnf- α* w korze mózgu. Wpływ podania His.

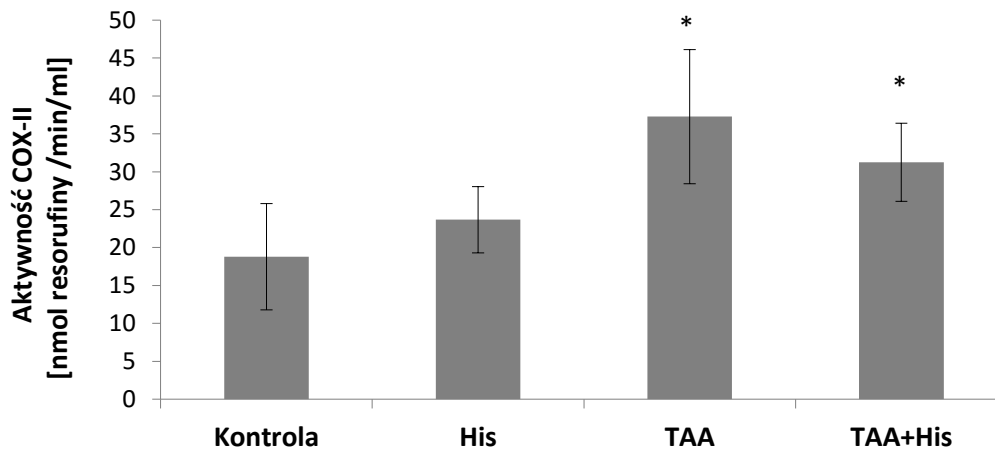
W modelu TAA wykazano ponad dwukrotny wzrost aktywności cyklooksygenazy-2 (Rycina 21) oraz wzrost stężenia TNF- α w osoczu (Tabela 14). Wykazano także zwiększoną ekspresję genu *tnf- α* w korze mózgowej szczurów TAA (Rycina 22). Powyższe obserwacje sugerują, że źródłem mogącego oddziaływać na komórki OUN TNF- α nie są wyłącznie przebiegające na obwodzie procesy wynikające z uszkodzenia wątroby, ale również TNF- α , którego ekspresja zachodzi w mózgu. Warto zaznaczyć, że ilość transkryptu *tnf- α* nie różniła się istotnie u szczurów TAA

Wyniki

otrzymujących His (Rycina 22). Ponadto można zauważyć u tej grupy tendencję w kierunku obniżenia aktywności COX-2 w osoczu (Rycina 21).



Rycina 21 Aktywność COX-2 w osoczu krwi, *p < 0,05, n = 5



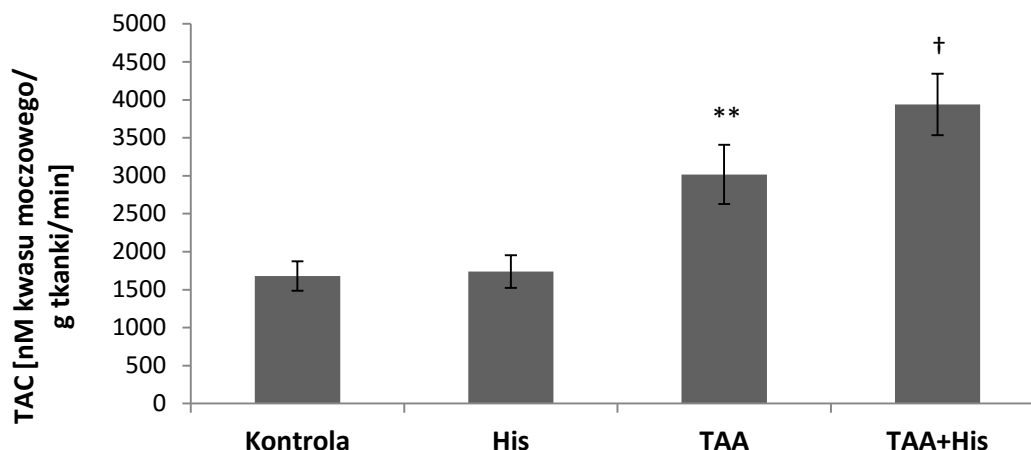
Rycina 22 Ekspresja genu kodującego TNF- α w korze mózgu szczura *p < 0,05 n = 4

Tabela 14 Stężenie TNF- α w osoczu krwi szczura, *p < 0,05 względem kontroli, n = 6

| | Kontrola | TAA | His | TAA+His |
|-----------------------|----------|------------------|------|------------------|
| TNF- α [pg/ml] | < 10 | 5750 \pm 3550* | < 10 | 7100 \pm 4700* |

Wyniki

Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC) kory mózgu szczurów TAA była podwyższona o ok. 40% (Rycina 23). Równoległe podanie His dodatkowo zwiększało TAC ok. 25%.



Rycina 23 Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC) kory mózgowej szczura **p < 0,01 względem kontroli † p < 0,05 względem TAA, n = 6

5.5. Pomiar stężenia ADMA i SDMA w hodowanych astrocytach traktowanych amoniakiem *in vitro*. Rola transportera γ^+ LAT2 w astrocytach *in vitro* i korze mózgowej szczurów TAA.

Wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA w astrocytach *in vitro* dotąd nie badano. Nie badano również wpływu ADMA na transport Arg do astrocytów w warunkach hiperamonemii, która jak wspomniano we wstępie, powoduje wzmożony wychwyty Arg do astrocytów.

Wcześniejsze badania wykazały, że inkubacja astrocytów z amoniakiem skutkowało istotnym wzrostem ilości białka γ^+ LAT2 i wynikającym z niego wzmożonym wychwytem Arg (Zielińska i wsp., 2012). Efekt ten obserwowano w szczurzym modelu HA (Zielińska i wsp., 2012) oraz wykazano w modelu TAA (dane własne niepublikowane).

Wyniki

W dysertacji wykazano istotne obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA i SDMA w astrocytach traktowanych amoniakiem (Tabela 15). Zjawisku temu towarzyszył wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Arg. Efekty te znosiła transfekcja komórek siRNA wyciszającym transkrypcję genu *Slc7a6*, który koduje y^+ LAT2.

Tabela 15 Stężenie dwumetyloarginin w astrocytach *in vitro* traktowanych amoniakiem i po wyciszeniu genu *Slc7a6*

| | Kontrola | Mock | Amoniak | Amoniak + siRNA |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| ADMA [μ M] | 7,34 \pm 1,11 | 6,91 \pm 1,47 | 4,75 \pm 1,27* | 8,29 \pm 0,84** |
| SDMA [μ M] | 5,12 \pm 1,84 | 5,29 \pm 1,02 | 4,19 \pm 1,93* | 5,6 \pm 1,31 |
| ADMA/SDMA | 1,36 \pm 0,28 | 1,33 \pm 0,31 | 1,28 \pm 0,16 | 1,47 \pm 0,52 |
| Arg [μ M] | 161,62 \pm 35,07 | 183,92 \pm 37,83 | 194,62 \pm 57,04* | 155,35 \pm 46,71 |
| Arg/ADMA | 25,16 \pm 3,76 | 28,31 \pm 4,19 | 36,53 \pm 5,14* | 22,78 \pm 7,8 |

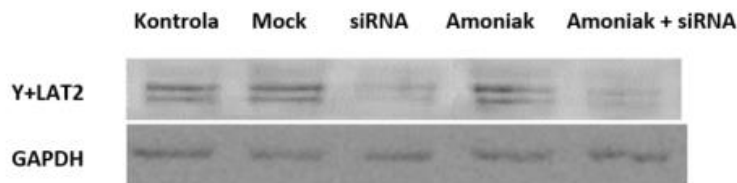
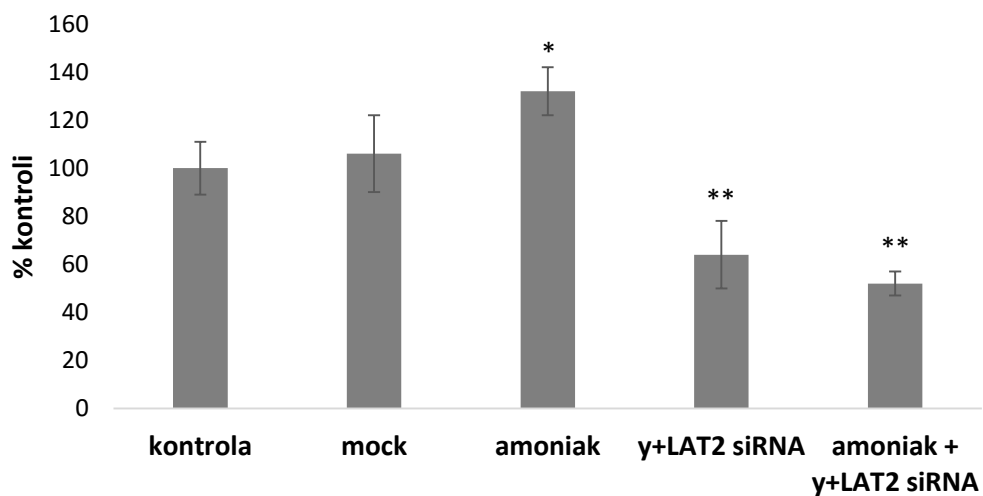
Wykonane metodą spektrometrii mas oznaczenie stężenia dwumetyloarginin w pożywce hodowlanej wykazało istotny wzrost stężenia ADMA i SDMA w pożywkach zebranych z nad astrocytów traktowanych amoniakiem (Tabela 16). Efekt ten był znoszony przez transfekcję siRNA. Łącznie z wynikiem pomiaru wewnątrzkomórkowych stężeń dwumetyloarginin, wskazuje to na udział białka y^+ LAT2 w transporcie dwumetyloarginin na zewnątrz komórki w warunkach hiperamonemii *in vitro*.

Tabela 16 Stężenie dwumetyloarginin w pożywce hodowlanej

| | Kontrola | Mock | Amoniak | Amoniak + siRNA |
|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| ADMA [μ M] | 0,365 \pm 0,03 | 0,358 \pm 0,03 | 0,410 \pm 0,04* | 0,368 \pm 0,05 |
| SDMA [μ M] | 0,864 \pm 0,24 | 1,04 \pm 0,09 | 1,378 \pm 0,16* | 1,189 \pm 0,12 |
| ADMA/SDMA | 0,44 \pm 0,05 | 0,36 \pm 0,1 | 0,29 \pm 0,06 | 0,3 \pm 0,04 |
| Arg [mM] | 0,306 \pm 0,12 | 0,309 \pm 0,04 | 0,312 \pm 0,05 | 0,301 \pm 0,09 |
| Arg/ADMA | 864,24 \pm 18,34 | 872,33 \pm 14,9 | 756,59 \pm 9,66* | 813,71 \pm 12,28 |

Wyniki

Skuteczność wyciszenia ekspresji genu *Slc7a6* zweryfikowano oznaczając immunoreaktywność białka γ^+ LAT2 w astrocytach. Potwierdzono ok. 30% wzrost ilości białka γ^+ LAT2 w astrocytach inkubowanych z amoniakiem. Transfekcja astrocytów γ^+ LAT2siRNA skutkowała ok. 50% obniżeniem ilości białka γ^+ LAT2 w komórkach kontrolnych, oraz znosiła wywołany amoniakiem wzrost ilości transportera (Rycina 24).

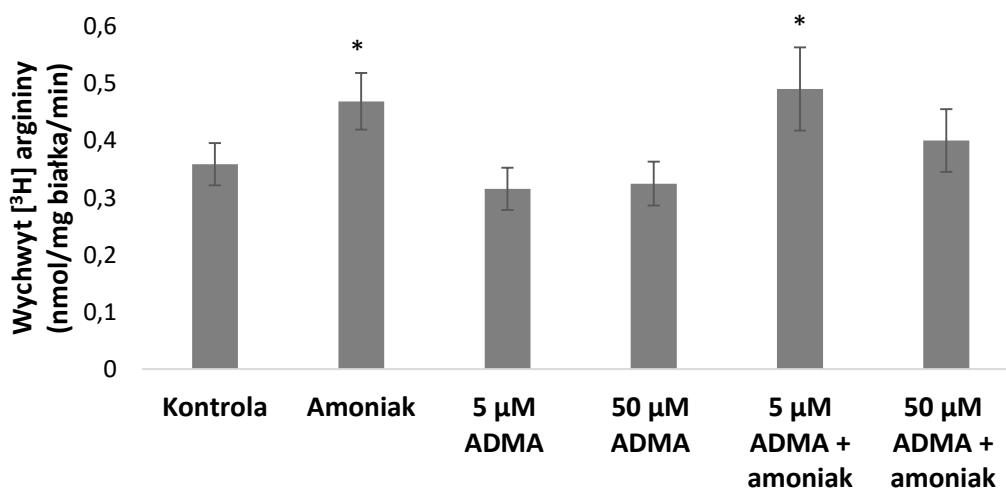


Rycina 24 Wpływ transfekcji astrocytów siRNA wyciszającym ekspresję genu *Slc7a6* mierzony immunoreaktywnością białka γ^+ LAT2 * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, $n = 4$

5.6. Wpływ ADMA na transport [³H]L-argininy do astrocytów *in vitro*

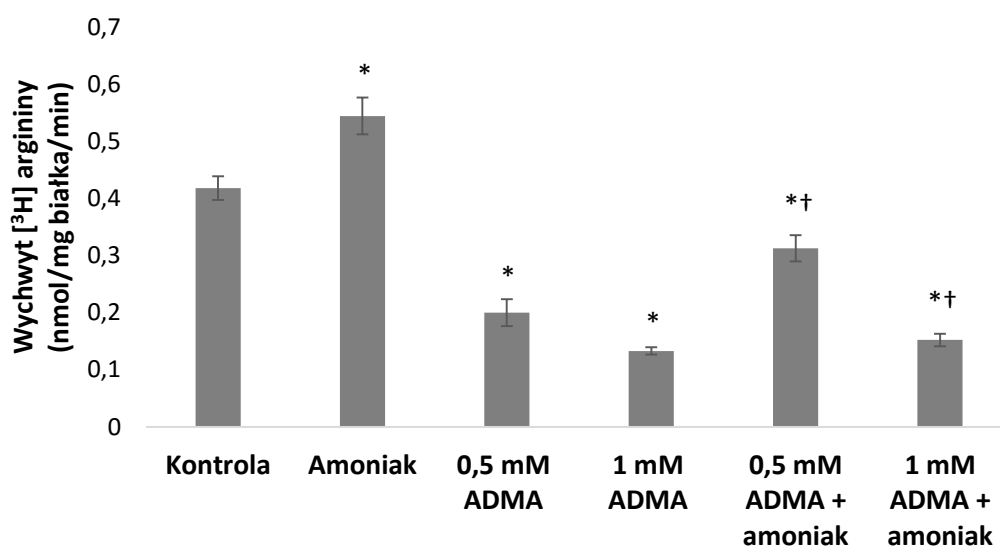
Drugim, obok bezpośredniego hamowania aktywności NOS, mechanizmem poprzez który ADMA może regulować syntezę NO, jest hamowanie dokomórkowego transportu Arg.

Wyniki potwierdziły wzrost wychwytu [³H]L-argininy do astrocytów inkubowanych z amoniakiem. Wpływ ADMA na wychwyt [³H]L-argininy badano przy stałym stężeniu Arg wynoszącym 100 μM. Zmieniano natomiast stężenie podawanej równoległe z Arg ADMA: 5 μM, 50 μM, 500 μM i 1 mM. Nie wykazano istotnego wpływu niskich stężeń ADMA na wychwyt Arg do astrocytów (Rycina 25). ADMA w stężeniach 500 μM i 1 mM hamowała wychwyt Arg o odpowiednio o ok. 50% i 70% (Rycina 26).



Rycina 25 Wpływ preinkubacji z amoniakiem i podania 5 μM, 50 μM ADMA na wychwyt [³H]L-argininy do astrocytów *p < 0,05, n = 4

Wyniki



Rycina 26 Wpływ preinkubacji z amoniakiem i podania 0,5 mM, 1 mM ADMA na wychwyt [³H]L-argininy do astrocytów *p < 0,05 względem kontroli † względem grupy traktowanej wyłącznie tożsamym stężeniem ADMA , n = 4

Wyliczony metodą wg Nicholson i wsp., (2002) udział poszczególnych układów transportowych w całkowitym wychwycie [³H]L-argininy do astrocytów *in vitro* wykazał, że w komórkach kontrolnych ok. 80% transportu [³H]L-argininy realizowane jest przez układ y⁺ i y⁺L. Podanie ADMA w stężeniu 0,5 mM i 1 mM hamuje głównie aktywność układu y⁺L. Należy jednak podkreślić, że przedstawione wartości mają jedynie charakter szacunkowy (Tabela 17).

Wyniki

Tabela 17 Wpływ ADMA na szacunkowy udział poszczególnych układów transportujących Arg w astrocytach inkubowanych z amoniakiem

| | % całkowitego wychwytu [³ H]L-argininy | | | |
|------------------------------|--|-----------------------------|------------------|----------------|
| | B ₀ ⁺ | b ₀ ⁺ | y ⁺ L | y ⁺ |
| Kontrola | 7,97 | 11,26 | 37,25 | 43,52 |
| Amoniak | 9,26 | 4,75 | 49,84 | 36,15 |
| 5 μM ADMA | 9,61 | 9,56 | 37,78 | 44,05 |
| 5 μM ADMA + amoniak | 7,08 | (-) [#] | 51,38 | 42,00 |
| 50 μM ADMA | 11,34 | 4,36 | 36,90 | 47,40 |
| 50 μM ADMA + amoniak | (-) | 8,88 | 47,62 | 46,86 |
| 0,5 mM ADMA | 26,78 | (-) | 27,27 | 45,96 |
| 0,5 mM ADMA + amoniak | 45,07 | (-) | 28,40 | 26,54 |
| 1 mM ADMA | 15,66 | 11,27 | (-) | 73,07 |
| 1 mM ADMA + Amoniak | 20,76 | 19,48 | (-) | 59,75 |

wartość mniejsza od 0

6. Podsumowanie wyników

Wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych:

1. Model HA:

Stężenia ADMA i SDMA w osoczu oraz korze mózgu nie zmieniają się.

2. Model TAA:

2.1. Stężenie ADMA jest zwiększone w osoczu i mózgu (kora przedczołowa, mózdzek). Podanie His przeciwdziało wzrostowi stężenia ADMA w mózgu.

2.2. Poziom białka DDAH-1 i DDAH-2 oraz całkowita aktywność proteolityczna w wątrobie jest obniżona. Aktywność katalityczna DDAH jest zmniejszona zarówno w wątrobie jak i korze mózgu. Obniża się ponadto poziom białka AGXT-2 w mitochondriach kory mózgu.

2.3. Całkowita aktywność NOS w korze mózgu jest obniżona, czemu przeciwdziało podanie His. Zmniejszenie aktywności NOS nie powoduje zmiany stężenia azotynów i azotanów w korze mózgu. W osoczu nitrozyłacja białek oraz stężenie azotynów i azotanów są podwyższone.

2.4. Ekspresja, poziom białka oraz stopień dimeryzacji eNOS w korze mózgu jest obniżony. Wzrasta natomiast poziom białka nNOS i ekspresja genu *inos*. Zaburzona dimeryzacja eNOS przyczynia się do zwiększenia ilości RFT w homogenacie kory mózgu.

2.5. W modelu TAA stwierdzono ponadto zwiększenie aktywności COX-2 stężenia TNF- α w osoczu oraz ekspresji *tnf- α* w korze mózgu. Wzrostowi całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) kory mózgu towarzyszyło obniżenie stężenia karnozyny, mimo wzrostu immunoreaktywności syntazy karnozyny-1. Podanie His podwyższa stężenie karnozyny w korze mózgu.

Wyniki uzyskane na pierwotnej hodowli astrocytów szczurzych:

1. W astrocytach traktowanych przez 48 h 5 mM amoniakiem zmniejsza się wewnątrzkomórkowe stężenie ADMA i SDMA.
2. Zahamowanie ekspresji transportera γ^+ LAT2 zapobiega wywołanemu amoniakiem zmniejszeniu wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA i SDMA.
3. ADMA hamuje dokomórkowy transport [^3H]Arg do astrocytach jedynie przy znacząco niższym od fizjologicznego stosunku Arg/ADMA.
4. Analiza udziału poszczególnych układów transportowych w dokomórkowym transporcie [^3H]Arg do astrocytów wskazuje, że ADMA w stężeniu 0,5 mM i 1 mM hamuje głównie aktywność systemu γ^+ L.

7. Dyskusja

U pacjentów z EW oraz w zwierzęcych modelach choroby dochodzi do zaburzeń szlaku NMDAr-NO-cGMP w mózgu, przy czym charakter obserwowanych zmian zależy od typu EW. W ostrej EW, a także na skutek izolowanej hiperamonemii wzmożona stymulacja NMDAr skutkuje aktywacją wspomnianego szlaku i wzrostem syntezy cGMP w mózgu (Hermenegildo i wsp., 2000; Hilgier i wsp., 2005; Rodrigo i Felipo, 2006). W przypadku przewlekłej EW dochodzi do, jak się uważa, adaptacyjnego hamowania aktywności szlaku NMDAr-NO-cGMP (Corbalan i wsp., 2002; Llansola i wsp., 2007).

Rola NO w EW nie ogranicza się do udziału tej cząsteczki w przekaźnictwie glutaminergicznym. Nieprawidłowa synteza NO przyczynia się do SON, który jest dobrze udokumentowanym czynnikiem uszkadzającym komórki zarówno w hiperamonemii jak i EW (Gorg i wsp., 2010; Gorg i wsp., 2008; Haussinger i Gorg, 2010). U pacjentów z EW obserwuje się także zmiany CBF, którego kluczowym regulatorem jest NO. Zmniejszony CBF opisano w przewlekłej EW (Iversen i wsp., 2009). Z kolei, wzrost CBF w ostrej EW jest uważany za jedną z przyczyn obrzęku mózgu (Jalan i wsp., 2004).

Regulacja aktywności NOS w EW jest złożona i niedostatecznie zbadana, w szczególności mało wiadomo o roli ADMA, która jest głównym endogennym inhibitorem NOS. Niejasna jest zarówno bezpośrednia przyczyna wzrostu stężenia ADMA w licznych przypadkach klinicznych EW oraz w modelach zwierzęcych, jak i udział metyloarginin w modulowaniu samego przebiegu choroby. Dla lekarzy otwarta pozostaje kwestia przydatności pomiaru stężenia ADMA w ocenie stanu pacjenta.

Dostępna literatura niemal wyłącznie dotyczy roli metyloarginin w przewlekłej EW. Z uwagi na istotne różnice między patomechanizmem ostrej i przewlekłej EW, zwłaszcza w kontekście aktywności szlaku NMDAr-NOS-NO, w niniejszej pracy starano

się wypełnić lukę dotyczącą udziału ADMA w regulowaniu aktywności NOS w ostrej EW. W badaniach posłużono się dwoma zwierzęcymi modelami doświadczalnymi odzwierciedlającymi ostrą EW: modelem hiperamonemii wywołanej dootrzewnowym podaniem OA i modelem ostrego uszkodzenia wątroby przez TAA. Udział ADMA w hamowaniu dokomórkowego transportu Arg weryfikowano w badaniach *in vitro* wykorzystując pierwotną hodowlę astrocytów korowych, ponieważ te komórki OUN ulegają najpoważniejszym dysfunkcjom w EW.

7.1. Stężenie metyloarginin w modelach EW

W modelach komórkowych i zwierzęcych wielokrotnie wykazywano, że toksyczne stężenie amoniaku bezpośrednio zaburza syntezę NO (por. rozdz. 2.4). Nie zostało jednak dowiedzione czy hiperamonemia *per se* jest przyczyną obserwowanego w EW wzrostu stężenia ADMA.

Badania własne wykazały, iż w szczurzym modelu hiperamonemii prostej nie dochodzi do zmian stężenia ADMA w osoczu lub korze mózgowej, jak również nie zmienia się stosunek Arg/ADMA, będący wykładnikiem biodostępności Arg dla NOS. Jest to według wiedzy autora pierwsza próba pomiaru ADMA w zwierzęcym modelu ostrej intoksykacji amoniakiem.

W modelu przewlekłej HA, w którym OA podawano z paszą przez 3 tyg., wykazano wzrost stężenia ADMA w osoczu szczura. W przytoczonym badaniu wzrost stężenia ADMA zaobserwowano również w operacyjnym modelu przewlekłej EW – BDL (por. wstęp, tabela 2) oraz u zwierząt, u których zabieg BDL połączono z dietą hiperamonemiczną (Tain i wsp., 2010a). Wzrost stężenia ADMA w modelu BDL wykazano także w mózgu szczura (Balasubramaniyan i wsp., 2012). Podanie fenylooctanu ornityny (OP) umożliwiającego wiązanie amoniaku do łatwo usuwanej

przez nerki fenyloacetyloglutaminy, obniżyło stężenie amoniaku w osoczu oraz stężenie ADMA w mózgu, wskazując na istnienie związku między tymi czynnikami. Z drugiej strony, mimo normalizacji stężenia amoniaku przez OP, stężenie ADMA w osoczu pozostawało podwyższone (Balasubramaniyan i wsp., 2012). Współzależność stężenia amoniaku i ADMA w modelu BDL nie została zatem jednoznacznie udowodniona. Warto również zauważyć, że w przytoczonej pracy autorstwa Huang i wsp., (2010) w modelu BDL nie odnotowano istotnego wzrostu stężenia amoniaku we krwi (mimo to stężenie ADMA było podwyższone), podczas gdy w badaniach Balasubramaniyan i wsp., stężenie amoniaku

w osoczu było 3,5 krotnie podwyższone. Powyższe niejednoznaczne obserwacje uzasadniały zatem podjęcie bardziej szczegółowych badań w niniejszej dysertacji.

Zaletą modelu hiperamonemii prostej, w porównaniu do modeli zabiegowych, jest ograniczenie wpływu innych niż amoniak, czynników mogących bezpośrednio wpływać na metabolizm ADMA. W modelu użytym w badaniach własnych hiperamonemię podtrzymuje się przez 72 h, a zatem czas oddziaływania toksycznych stężeń amoniaku na organizm jest zdecydowanie krótszy, niż pracach badawczych wykorzystujących modele przewlekłe. Opisany w dysertacji brak zmian w stężeniu ADMA i SDMA w osoczu oraz w korze mózgowej w modelu hiperamonemii prostej sugeruje, że ostra toksyczność amoniaku nie jest bezpośrednią przyczyną wzrostu stężenia ADMA w EW.

W drugim badanym modelu – ostrej EW polegającym na uszkodzeniu wątroby przez dootrzewnowe podanie hepatotoksyny TAA, wykazano wzrost stężenia ADMA zarówno w osoczu, jak i mózgu szczurów. Stężenie SDMA w osoczu i mózgu nie zmieniało się. Wyniki te upoważniają do twierdzenia, że uszkodzenie wątroby, w odróżnieniu od hiperamonemii, wpływa na metabolizm ADMA. Ostatnio opublikowane dane wskazują, że jednokrotne dootrzewnowe podanie wysokiej dawki

TAA (500 mg/kg m.c.) już po upływie doby skutkuje wzrostem stężenia ADMA w osoczu, i istotnie obniża stosunek Arg/ADMA. Nie stwierdzono natomiast zmian stężenia SDMA w osoczu (Bekpinar i wsp., 2015). Wyniki własne potwierdzają i uzupełniają cytowane obserwacje wskazując, że wzrost stężenia ADMA zachodzi również w korze mózgowej i mózdzku szczurów TAA.

W tym miejscu warto zauważyć, że w usuwaniu SDMA z organizmu kluczową rolę pełni układ moczowy, a wzrost stężenia SDMA we krwi stanowi jeden z objawów uszkodzenia nerek (Portal i wsp., 2007). Warto nadmienić, że nerki są obok wątroby głównym miejscem enzymatycznej degradacji ADMA (Onozato i wsp., 2008; Palm i wsp., 2007). W niniejszej pracy nie badano parametrów związanych z ostrą niewydolnością nerki (np. stężenia kreatyniny, mocznika, stężenia jonów K^+ czy aktywności fosfatazy kwaśnej w surowicy). Niemniej jednak obserwacja zmian jedynie w stężeniu ADMA oraz dane literaturowe pozwalają założyć, że w modelu TAA dochodzi głównie do uszkodzenia wątroby, podczas gdy funkcja nerek pozostaje niezmienną (Fleck i wsp., 1988; Koblihova i wsp., 2014).

Jedną z przyczyn wzrostu stężenia ADMA w chorobach wątroby może być jej utrudnione usuwanie z żółcią. Za założeniem tym przemawia fakt, iż ilość ADMA w żółci wyraźnie wzrasta w modelu przejściowego niedokrwienia wątroby (ang *ischemia and reperfusion*) Ferrigno i wsp. (2014). Zwraca również uwagę fakt, że analiza porównawcza modelu przewlekłej toksyczności TAA (TAA podawany z pokarmem przez 18 tyg.) i resekcji dróg żółciowych (ang. *bile duct excision*, BDE) wykazała, że tylko w tym drugim przypadku stężenie ADMA w osoczu jest istotnie podniesione (Laleman i wsp., 2005). Trudno jednak powyższą hipotezę pogodzić z obserwacją, iż w ostrej toksyczności TAA, modelu nie naruszającym w istotnym stopniu funkcji dróg żółciowych, dochodzi do wzrostu stężenia ADMA w osoczu i mózgu.

Zawarte w pracy wyniki wskazują jednoznacznie, że zmiany stężenia ADMA obserwowane w przebiegu EW są konsekwencją uszkodzenia wątroby.

7.2. Metabolizm ADMA w modelu TAA

Przyczyną wzrostu stężenia ADMA obserwowanego w modelu TAA może być zwiększenie syntezy lub obniżenie tempa degradacji tego związku. Dla przypomnienia: metylacja Arg jest elementem potranslacyjnej modyfikacji białek i zachodzi w większości komórek organizmu. Syntezę ADMA katalizuje PRMT-1, a obecność wolnych cząsteczek ADMA jest wynikiem proteolizy białek komórkowych (McBride i Silver, 2001). Uważa się, że główną drogą eliminacji ADMA z organizmu jest jej rozkład do Cyt i metyloamin katalizowany przez DDAH (Arrigoni i wsp., 2010; Teerlink i wsp., 2009). Reakcja ta zachodzi z największą intensywnością w wątrobie i nerkach, ale również w mózgu DDAH-1 ulega silnej ekspresji (Tran i wsp., 2000). Mniejsze znaczenie wydaje się mieć degradacja ADMA przez mitochondrialny AGXT-2 i jej wydalanie z moczem (Rodionov i wsp., 2010; Teerlink i wsp., 2009).

Przedstawione w dysertacji wyniki wskazują, że w korze mózgowej szczurów TAA nie dochodzi do zmian w poziomie PRMT-1 (mRNA i białko), nie stwierdzono też zmian w immunoreaktywności białka PRMT-1 w wątrobie.

Warto zaznaczyć, że analiza ekspresji enzymu syntezy ADMA w modelu ostrego uszkodzenia wątroby jest pierwszą tego typu obserwacją, gdyż dostępna literatura w tym zakresie odnosi się wyłącznie do modeli przewlekłych EW, a wyniki są w dużym stopniu niejednoznaczne. W modelu BDL wykazano wzrost ilości białka PRMT-1 w wątrobie (Tain i wsp., 2010a; Yang i wsp., 2012). W tym samym modelu stwierdzono też zmniejszenie ilości białka PRMT-1 w mózgu (Huang i wsp., 2010). Z kolei model niedokrwienia wątroby cechował spadek mRNA kodującego PRMT-1 w wątrobie

(Ferrigno i wsp., 2014). Oba modele wykazują jednak na tyle odmienny patomechanizm/etiologię, że uzyskane wyniki nie muszą być ze sobą całkowicie sprzeczne.

Warto zauważyć, że model BDL cechują dynamiczne zmiany omawianego parametru. Po 3 dniach od zabiegu operacyjnego stwierdzono wzrost ilości białka PRMT-1 w wątrobie, podczas gdy stężenie ADMA w osoczu pozostawało niezmienione (Tain i wsp., 2010a). W badaniach innej grupy badawczej wzrost ilości białka PRMT-1 był bardzo wyraźny dwa tygodnie po zabiegu i normalizował się po upływie kolejnych dwóch tygodni. Zmiany te nie miały bezpośredniego przełożenia na stężenie ADMA w osoczu, które w obu punktach czasowych było podwyższone (Sheen i wsp., 2010).

Zupełnie pomijanym w badaniach zagadnieniem mogącym wpływać na stężenie metyloarginin jest tempo ich uwalniania z białek. Według danych literaturowych, aktywność proteolityczna jest głównym mechanizmem regulacji stężenia ADMA w erytrocytach (Davids i wsp., 2012). Wydaje się, że tempo proteolizy może ulegać zmianom w chorobach wątroby (Neuman i wsp., 2013) i zaburzeniach OUN (Dasuri i wsp., 2013; Tarasoff-Conway i wsp., 2015). Parametr ten jak dotąd nie był analizowany w kontekście EW.

Z tego względu zdecydowano się oznaczyć całkowitą aktywność proteolityczną w wątrobie i korze mózgu w użytym modelu ostrej EW. Nie stwierdzono zmian aktywności proteolitycznej w mózgu, natomiast w wątrobach zwierząt, którym podawano TAA była ona obniżona. Można założyć zatem, że parametr ten nie jest przyczyną wzrostu stężenia ADMA w modelu TAA. Biorąc pod uwagę, że mierzono całkowitą aktywność proteolityczną w przeliczeniu na masę tkanki wydaje się, że nekroza hepatocytów i postępujące zwłóknienie wątroby, będące skutkami toksyczności TAA,

mogą odpowiadać za wykazane obniżenie tempa proteolizy w wątrobie (Bergasa i wsp., 1992; Wallace i wsp., 2015).

Podsumowując, brak zmian w poziomie ekspresji PRMT-1 w wątrobie i korze mózgu oraz wynik pomiaru aktywności proteolitycznej wskazują, że nie dochodzi do wzrostu syntezy ADMA w modelu TAA, a zatem upośledzenie degradacji ADMA wydaje się być główną przyczyną jej podwyższonego stężenia.

Jak wspomniano uprzednio, za degradację ADMA odpowiadają enzymy: DDAH i AGXT-2. Analiza immunoreaktywności wykazała obniżenie ilości białka DDAH-1 i DDAH-2 w wątrobie szczurów TAA bez istotnych różnic w ilości mRNA i białka DDAH-1 w korze mózgowej. Obniżenie ilości DDAH w wątrobie opisywano w kilku modelach niewydolności wątroby (Mookerjee i wsp., 2015; Siroen i wsp., 2008; Verbeke i wsp., 2014) oraz u pacjentów z marskością wątroby (Mookerjee i wsp., 2015).

Co ciekawe, aktywność hydrolityczna DDAH uległa istotnemu obniżeniu zarówno w wątrobie, jak i mózgu szczurów TAA. Zmniejszenie ilości białka nie jest zatem jedyną przyczyną obniżenia całkowitej aktywności DDAH.

Przedstawione w rozprawie wyniki nie wskazują na wpływ dootrzewnowego podawania His na aktywność DDAH w mózgu lub wątrobie szczura. Jednocześnie eksperyment *ex vivo*, w którym zastosowano wyższe stężenia His dowiódł, że odpowiednio wysokie stężenie His może prowadzić do wzrostu aktywności DDAH w homogenacie kory mózgowej zarówno szczura zdrowego, jak i szczura TAA. Należy przypomnieć, opierając się na wynikach dynamiki metabolizmu His, że materiał w którym oznaczano aktywność DDAH był pobierany 24 h od podania His, gdy jej stężenie w korze mózgowej było jedynie nieznacznie podwyższone, a w osoczu nie odbiegało od wartości kontrolnych. Możliwe jest zatem, że bezpośrednio po podaniu His

może podnosić aktywność DDAH *in vivo* i wpływać na tempo metabolizmu ADMA. Hipoteza ta wymaga jednak dodatkowych badań.

Przyczyną obniżenia aktywności DDAH, pomimo niezmięionej ilości enzymu, może być duża wrażliwość tego białka na SON. Stwierdzono, że S-nitrozylacja cysteiny w centrum katalitycznym DDAH Cys-249 (Leiper i wsp., 2002; Vallance i Leiper, 2004) oraz Cys-273 (Knipp i wsp., 2003) skutkuje wyraźnym obniżeniem aktywności enzymu.

Bezpośredni wpływ SON na DDAH został wykazany w hepatocytach *in vitro*. Traktowanie tych komórek donorem O_2^- : 10 μ M PMS (ang. *phenazine methosulfate*) lub H_2O_2 (100 μ M) skutkowało obniżeniem ilości białka DDAH-1 i DDAH-2 oraz aktywności DDAH (Tain i wsp., 2010b). Z kolei związki o właściwościach antyoksydacyjnych jak probukol (Jiang i wsp., 2006) i tauryna (Tan i wsp., 2007) podwyższały aktywność DDAH w warunkach *in vitro*. Podobne działanie wykazała melatonina, której podanie do hodowli hepatocytów zapobiegało wywołanemu przez H_2O_2 obniżeniu aktywności DDAH. W układzie *ex vivo*, zbliżonym do użytego w badaniach własnych (homogenat wątroby), podanie 1 mM melatoniny nie wpływało jednak na aktywność DDAH (Tain i wsp., 2010b).

Powyższe dane wskazują, że jedną z przyczyn wzrostu aktywności DDAH, w obecności His w układzie *ex vivo*, mogą być antyoksydacyjne właściwości His. W modelu TAA wykazano normalizujący wpływ podania His na aktywność układu tioredoksynowego i zmniejszenie aktywności peroksydazy glutationowej w korze mózgu. Efekty te mają znaczenie protekcyjne wobec wystąpienia SON w mózgu (Ruszkiewicz i Albrecht, 2015b)

Innym czynnikiem mogącym regulować aktywność DDAH jest wewnątrzkomórkowe stężenie Zn^{2+} . Centrum aktywne DDAH posiada miejsce wiązania Zn^{2+} , ale przyłączenie tego kationu metalu, w odróżnieniu od większości enzymów

posiadających podobny motyw aminokwasowy (Vallee i Falchuk, 1993) skutkuje niemal całkowitym zahamowaniem aktywności katalitycznej (Frey i wsp., 2006; Knipp i wsp., 2001). Badanie DDAH izolowanego z bydlęcego mózgu wykazało, że w warunkach fizjologicznych ok 30% puli DDAH związane jest z Zn^{2+} (Knipp i wsp., 2001). Oznacza to, że uwalnianie Zn^{2+} z centrum katalitycznego DDAH może być ważnym mechanizmem regulującym aktywność tego enzymu.

Badania na wyizolowanym i oczyszczonym białku DDAH-1 wykazały również, że imidazol i jego pochodne, w tym His, usuwając Zn^{2+} z DDAH-1 podwyższają jego aktywność katalityczną. Co ciekawe, His jest pod tym względem efektywniejsza niż związki

o wyższym potencjale do chelatowania kationów metali takie jak EDTA czy 1,10-fenatrolina (Knipp i wsp., 2001). Prawdopodobnie efekt ten związany jest z lepszym przestrzennym dopasowaniem pochodnych imidazolu do budowy cząsteczki DDAH. Efekt usuwania Zn^{2+} z DDAH przez His może być odpowiedzialny za wykazany w dysertacji wzrost aktywności DDAH po podaniu His do homogenatu tkankowego, ale hipoteza ta wymaga dalszych weryfikacji wykraczających tematycznie poza zagadnienia postawione w celach dysertacji.

Warto przytoczyć, że zaburzenia homeostazy Zn^{2+} były wykazywane w HA i EW. W astrocytach *in vitro* i *ex vivo* wykazano zwiększenie ilości wolnego Zn^{2+} w cytoplazmie, mitochondriach oraz jądrze komórkowym wskutek inkubacji komórek z amoniakiem (5 mmol) lub TNF- α (10 ng/ml) (Kruczek i wsp., 2009). Spowodowanemu podaniem amoniaku wzrostowi wewnątrzkomórkowego stężenia Zn^{2+} towarzyszył wzrost syntezy NO (Kruczek i wsp., 2011; Kruczek i wsp., 2009). Obserwacja ta nie wyklucza jednak możliwości hamowania aktywności DDAH, a przez to zwiększenia ilości ADMA wskutek wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Zn^{2+} .

Warto w tym miejscu nadmienić, że w stanach przewlekłej niewydolności wątroby obserwowano niedobory Zn^{2+} , co jak się sądzi, zaburza aktywność enzymów cyklu mocznikowego dodatkowo przyczyniając się do wystąpienia EW (Chetri i Choudhuri, 2003; Yang i wsp., 2004). Suplementacja Zn^{2+} zwiększa produkcję mocznika w wątrobie (Marchesini i wsp., 1996) i glutaminy w mięśniach (Yoshida i wsp., 2001), częściowo zmniejszając objawy EW. Niestety nie badano dotąd bezpośredniego związku między zmianami stężenia Zn^{2+} obserwowanymi w HA i EW, a aktywności DDAH i stężeniem ADMA.

Rola AGXT-2, który jest alternatywnym do DDAH enzymem degradującym ADMA jest słabo zbadana. Obecność tego białka w mózgu szczura została niedawno dowiedziona (Abe i wsp., 2014). Przedstawiona w niniejszej pracy analiza Western-blot białka AGXT-2 potwierdziła jego obecność w mitochondriach izolowanych z kory mózgowej szczura. Wykazano także wyraźny spadek immunoreaktywności AGXT-2 u zwierząt otrzymujących TAA.

Zjawisko to może stanowić element obserwowanej w EW dysfunkcji mitochondriów. W ostrej EW wywołanej podaniem TAA wykazano m.in. 30% obniżenie syntezy ATP w mózgu (Rama Rao i wsp., 2010), obrzmienie mitochondriów (Chadipiralla i wsp., 2012), i ok. 50% obniżenie mitochondrialnej puli glutationu (Ruszkiewicz i wsp., 2013).

Obniżenie ilości AGXT-2 w korze mózgowej może mieć znaczenie dla regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA, a przez to jej udziału w regulacji NOS w tym mtNOS, co w dalszej konsekwencji może wpływać na generację SON w mitochondriach. Rolę AGXT-2 w regulacji syntezy NO potwierdzają badania linii ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC). Komórki transfekowane sekwencją kodującą AGXT-2 wykazywały podwyższoną produkcję azotynów i azotanów świadczącą

o wzroście aktywności NOS. Z kolei inkubacja komórek HUVEC z ADMA miała skutek odwrotny (Rodionov i wsp., 2010). Identyfikacja białka zaangażowanego w transport ADMA do wnętrza mitochondriów wzmocniła tezę o roli AGXT-2 w regulacji stężenia ADMA (Porcelli i wsp., 2016). Funkcja AGXT-2 w EW nie była dotąd badana, zatem uzyskany wynik stanowi atrakcyjny kierunek dla dalszych badań nad rolą ADMA w tej patologii.

7.3. Ekspresja i aktywność NOS w modelu TAA

ADMA jest kompetycyjnym inhibitorem wszystkich izoform NOS, chociaż jej powinowactwo do iNOS jest zdecydowanie niższe, niż do konstytutywnych izoform NOS (Teerlink i wsp., 2009).

Badania własne wskazują na wyraźny spadek ekspresji i ilości białka eNOS w korze mózgowej szczurów TAA, przy jednoczesnym podwyższeniu ilości białka nNOS i braku zmian w ekspresji iNOS. Zatem można twierdzić, że w ostrej EW poziom ekspresji poszczególnych izoform NOS w mózgu ulega zmianie, jednocześnie wskazując na skomplikowane mechanizmy regulacji NOS. Zawarte w dysertacji badania wskazują, że u szczurów TAA całkowita aktywność katalityczna NOS w korze mózgu jest istotnie obniżona, a efekt ten niweluje podanie His. Spadek aktywności NOS nie miał jednak przełożenia na ilość NO w korze mózgu, mierzoną jako suma azotynów i azotanów, gdyż ten parametr nie uległ istotnej zmianie. Z kolei w osoczu wykazano wzrost ilości azotynów i azotanów pod wpływem TAA. Wzrost ilości NO w osoczu szczurów TAA znalazł przełożenie w zwiększeniu nitrozytacji tyrozyny białek osocza. Parametr ten jest ważnym markerem wzmożonej produkcji ONOO⁻ będącego jednym z głównych produktów nadmiernej syntezy NO (Szabo, 2003). Pomiar ONOO⁻ w warunkach klinicznych, stanowić może istotny parametr diagnostyczny (Felipo i wsp., 2013).

Wyniki własne znajdują potwierdzenie w pracach innych grup badawczych, gdzie stosowano inhibitory NOS. Chu i wsp. wykazał, że równoległe do TAA podawanie niespecyficznego inhibitora NOS – estru metylowego nitro-L-argininy (L-NAME) w dawce 25 mg/kg mc, (Chu i wsp., 2001) w odróżnieniu od podawania 100 mg/kg mc. L-kanawaniny (Chu i wsp., 2006) hamującej aktywność iNOS: zwiększało śmiertelność zwierząt, podwyższało stężenie TNF- α w osoczu i zmniejszało dystans przebyty w trakcie testu otwartego pola, w porównaniu ze zwierzętami traktowanymi wyłącznie TAA (Bruck i wsp., 1999; Chu i wsp., 2006; Chu i wsp., 2001). Sugeruje to, że obniżenie aktywności konstytutywnych izoform NOS w modelu TAA jest negatywnym prognostykiem.

W kontekście przedstawionego w rozprawie obniżenia poziomu ekspresji eNOS i całkowitej aktywności NOS w korze mózgowej szczurów TAA, można przyjąć założenie, że podanie L-NAME wzmagając obserwowane zmiany przyczynia się do nasilenia objawów patologicznych.

Opisany we wspomnianej pracy brak protekcyjnego efektu podania kanawaniny wskazuje z kolei, że indukcja iNOS nie jest kluczowym zjawiskiem odpowiedzialnym za objawy ostrej EW wywołane podaniem TAA, co potwierdza przedstawiony w dysertacji brak zmian ilości białka iNOS w korze mózgowej i analogiczne wyniki dotyczące analizy poziomu iNOS w wątrobie szczurów TAA (Huang i wsp., 2007).

Należy jednak zwrócić uwagę, że badania własne wskazują jednocześnie na wzrost ilości mRNA kodującego iNOS w korze mózgowej szczurów TAA, co może świadczyć o tym, że białko iNOS aktywuje się w późniejszych fazach EW. Wyraźną indukcję iNOS w wątrobie wykazano m.in. w materiale biopsyjnym pobranym od pacjentów z marskością wątroby (Mohammed i wsp., 2003). Przytoczone wyniki wskazują, że indukcja iNOS jest zjawiskiem wtórnym, nie mającym kluczowego znaczenia w ostrej EW.

Zgodne z przedstawionym w rozprawie obniżeniem ekspresji i ilości białka eNOS w korze szczurów TAA są ponadto niepublikowane dane uzyskane przez dr Annę Czarnecką z Zakładu Neurotoksykologii IMDiK PAN, wskazujące na istotne obniżenie CBF w mózgu szczurów TAA.

Obserwowane obniżenie aktywności NOS w modelu ostrej EW wywołanej podaniem TAA pośrednio wspierają również wyniki dotyczące terapii statynami (inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A). W warunkach *in vitro* wykazano, że statyny mogą podnosić ekspresję *enos* (Laufs i wsp., 1998). Efekt ten opisano także w mózgu (Amin-Hanjani i wsp., 2001; McGirt i wsp., 2002; Yamada i wsp., 2000), a lowastatyna podana szczurom poddanym rozległej hepatoktomii wydłużała czas przeżycia (Cai i wsp., 2000).

W modelu TAA terapia zarówno prawastatyną (Huang i wsp., 2012) jak i simwastatyną (Huang i wsp., 2008) skutkowała zmniejszeniem śmiertelności i poprawą motoryki szczurów TAA. Jednoczesne podanie L-NAME niwelowało ten efekt (Huang i wsp., 2012; Huang i wsp., 2008). Chociaż wpływu statyn na ekspresję NOS w mózgu w warunkach EW dotąd nie badano, można przyjąć założenie, że wzrost ekspresji eNOS w odróżnieniu od zahamowania jego aktywności może mieć działanie ochronne wobec objawów EW w modelu TAA. Warto zauważyć, że podanie L-NAME w modelu przewlekłej EW (BDL) nie miało wpływu na powyższe parametry, co po raz kolejny dowodzi istotnych różnic między ostrym i przewlekłym typem EW (Chan i wsp., 2004).

Wzrost poziomu białka nNOS był wcześniej wykazany w modelach EW. W modelu PCA stwierdzono wzrost poziomu ekspresji nNOS w mózgu (Rao i wsp., 1997a), co wiązano ze wzrostem całkowitej aktywności NOS w mózgu i zwiększeniem CBF (Rao i wsp., 1995). Efekty te są długotrwałe, gdyż wzrost poziomu ekspresji nNOS,

iNOS i ilość nitrotyrozyny w korze mózgowej (Suarez i wsp., 2006) i prążkowi (Suarez i wsp., 2009) zwierząt PCA, jest obserwowana nawet po 6 miesiącach od zabiegu. Również przewlekłe podawanie TAA skutkowało wzrostem poziomu ekspresji nNOS w mózdzku (Mondal i Trigun, 2015).

Wobec wyników świadczących niezbiecie o zmianie zarówno poziomu ekspresji jak i aktywności NOS w modelu TAA, niezwykle trudno jest odpowiedzieć na pytanie jakie skutki fizjologiczne ma podwyższone stężenie ADMA w ostrej EW. W świetle wyników badań będących podstawą niniejszej dysertacji, wydaje się, że podwyższenie stężenia ADMA w mózgu może częściowo przyczyniać się do obserwowanego spadku całkowitej aktywności NOS w korze mózgowej szczurów TAA.

Zwiększenie ilości azotynów i azotanów w osoczu, bez zmian tego parametru w korze mózgowej, jest kolejnym dowodem na znaczące różnice między mechanizmami obserwowanymi w OUN i w tkankach obwodowych w modelu TAA. Jedną z możliwych przyczyn zaobserwowanego wzrostu stężenia NO we krwi szczurów TAA może być wykazany w tym modelu zwiększony poziom ekspresji eNOS w wątrobie (Huang i wsp., 2007).

Należy także zwrócić uwagę, że użyta w dysertacji metoda oznaczenia ilości azotynów odczynnikiem Griessa, po uprzedniej enzymatycznej redukcji azotanów do azotynów, jedynie w przybliżeniu opisuje faktyczną dynamikę syntezy NO (Bryan i Grisham, 2007), (wstęp rozdział 2.3.3.).

Alternatywnym wobec kompetycyjnego hamowania aktywności NOS skutkiem oddziaływania podwyższonego stężenia ADMA może być rozprężanie NOS, prowadzące do zwiększonej produkcji $\cdot\text{O}_2^-$ i nasilenia SON.

Wyniki własne dowiodły, że w modelu TAA ilość dimerów eNOS w korze mózgowej jest obniżona, co wskazuje na rozprężenie enzymu. Obserwację tę potwierdzają wyniki pomiaru produkcji RFT w warunkach podania Arg i inhibitorów NOS do homogenatu kory mózgu. Arg indukowała syntezę RFT najprawdopodobniej na drodze zależnej od rozprężenia NOS o czym świadczy znacząco wyższa produkcja RFT w korze mózgu szczurów TAA oraz obniżenie ilości RFT przez podanie inhibitorów NOS – L-NAME i EDTA. Wykazana zależność między produkcją RFT w korze mózgu, a ilością wolnego Ca^{2+} sugeruje ponadto, że iNOS nie odgrywa kluczowej roli w opisywanym zjawisku. Wynik ten jest zgodny z omówioną wcześniej niezmienną ilością białka iNOS w korze mózgu szczurów TAA.

Mechanizm rozprężenia eNOS przez zwiększone stężenie ADMA najdokładniej opisano w komórkach śródbłoka naczyń krwionośnych (Antoniades i wsp., 2009; Sud i wsp., 2008; Sydow i Munzel, 2003). Wykazano ponadto, że ADMA na drodze zależnej od rozprężenia eNOS zwiększa nitrozylację białek w komórkach śródbłoka (Sharma i wsp., 2010; Sud i wsp., 2008). Według wiedzy autora, efektu tego jak dotąd nie obserwowano w komórkach OUN.

Głównym czynnikiem przyczyniającym się do rozprężenia NOS jest niewystarczająca ilość BH_4 (Beveris i wsp., 2006; Cai i wsp., 2005). Niemniej jednak w płucach myszy, którym podano LPS wykazano, że skutki wywołanego przez ADMA rozprężenia NOS są niezależne od zmian stężenia BH_4 (Sharma i wsp., 2010).

Zawarte w dysertacji wyniki nie stanowią bezpośredniego dowodu na udział ADMA w rozprężeniu NOS w homogenatach kory mózgowej szczurów TAA, jednak w świetle przedstawionych danych literaturowych, mechanizm ten wydaje się wysoce prawdopodobny.

7.4. Protekcyjne efekty podania His, markery prozapalne i markery SON w modelu TAA

Część efektów podania His została przedstawiona we wcześniejszych częściach dyskusji, ale zagadnienie to zasługuje na dokładniejsze omówienie. His jest występującym naturalnie aminokwasem dlatego jej stosowanie wydaje się być wyjątkowo bezpieczne (Yakuji, 1981). Ostra toksyczność His wyrażona współczynnikiem śmiertelności LD₅₀ dla szczura wynosi przy podaniu doustnym 15 g/kg mc., a dootrzewnowo 2 g /kg mc., zatem jest znacząco wyższa, niż użyta w badaniach dawka 100 mg/kg mc. (Yakuji, 1981). Warto zwrócić uwagę, że ta dawka His była wcześniej stosowana w badaniach wykorzystujących model TAA i nie wykazano żadnych negatywnych skutków tej terapii (Rama Rao i wsp., 2010; Ruszkiewicz i Albrecht, 2015b; Ruszkiewicz i wsp., 2013).

Niniejsza praca skupia się przede wszystkim na zjawiskach zachodzących w korze mózgowej. Z uwagi na brak adekwatnych danych literaturowych, sprawdzono jak podanie His wpływa na stężenie tego aminokwasu w osoczu i korze mózgowej. Wykazano, że stężenie His sukcesywnie wyrównuje się w ciągu pierwszej doby od jej podania. Co istotne, zwiększone stężenie His utrzymywało się dłużej w mózgu niż w osoczu. W korze mózgowej najwyższe stężenie His (ok. 3-krotny wzrost) notuje się w pierwszych 90 min od podania. Wynik ten może świadczyć o efektywnym transporcie His do OUN, gdzie może wykazywać właściwości protekcyjne.

His może być wydalana z moczem, zużyta na syntezę białka lub metabolizowana do pochodnych tego aminokwasu (Stifel i Herman, 1971). Szczególnie ważna w tym kontekście wydaje się ścieżka metabolizmu His do histaminy. Nadmierna synteza histaminy w mózgu jest zjawiskiem niepożądanym, mogącym zaburzać m.in. rytm dobowy, termoregulację, funkcje kognitywne (np. zapamiętywanie), nasilać procesy

zapalne, zwiększać CBF i przepuszczalność bariery krew-mózg (Hu i Chen, 2012; Passani i wsp., 2014). Podwyższone stężenie histaminy może też bezpośrednio zaburzać astrocytarny metabolizm energetyczny oraz prowadzić do ich aktywacji oraz aktywacji mikrogleju (Juric i wsp., 2016).

W badaniach własnych nie stwierdzono wpływu podawania His na stężenie histaminy w osoczu i korze mózgowej. Lozeva-Thomas i wsp. wykazali wzrost stężenia histaminy w mózgu szczurów BDL, którym dootrzewnowo podawano His (4 krotnie 500 mg/kg m.c.) (Lozeva-Thomas i wsp., 2004). Z kolei w pracy wykonanej na modelu PCA pobudzenie układu histaminergicznego uzyskiwano podając His szczurom podskórnice, 3 krotnie w dawce 1000 mg/kg m.c (Fogel i wsp., 1999). Stosowana w rozprawie dawka His była 5-10 krotnie niższa niż w cytowanych pracach, co zapewne jest głównym powodem braku zmian w stężeniu histaminy w mózgu.

Badania zawarte w rozprawie wskazują na istotne zmniejszenie stężenia karnozyny w korze mózgu szczurów TAA. Ze względu na opisane we wstępie właściwości karnozyny, zjawisko to może być składową obciążenia układów antyoksydacyjnych w warunkach EW. U zwierząt, którym podawano His wystąpił istotny wzrost stężenia karnozyny w korze mózgowej, co niwelowało efekt podania TAA. Stężenie karnozyny w osoczu u wszystkich zwierząt było poniżej progu detekcji, czego przyczyną może być wysoka aktywność karnozynazy, enzymu degradującego karnozynę w osoczu (Song i wsp., 2014).

Otrzymane wyniki wskazują, że podana His jest substratem dla syntezy karnozyny w mózgu. Analiza immunoreaktywności białka odpowiedzialnego za syntezę karnozyny w mózgu, syntazy karnozyny I wskazuje z kolei, że poziom ekspresji tego enzymu jest podwyższony u szczurów TAA. Może to świadczyć o kompensacyjnej indukcji syntezy

karnozyny, jako elementu strategii obrony przed skutkami SON w mózgu (Boldyrev i wsp., 2013).

Badania własne, nie przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały, że dootrzewnowo podana karnozyna (3 krotnie, ip., 100 mg/ kg mc, analogicznie do His), wykazywała efekty protekcyjne wobec obserwowanych zaburzeń układów antyoksydacyjnych w mózgu szczura TAA. Karnozyna redukowała pulę RFT w korze mózgowej i zwiększała jej całkowitą zdolność antyoksydacyjną. Wskutek jej podania zmniejszała się oksydacja glutationu, co pośrednio potwierdza wspomnianą redukcję puli RFT. Karnozyna zmniejszała również podwyższoną przez TAA aktywność reduktazy tioredoksyny (Milewski i wsp., 2016). Wyniki te w dużym stopniu są analogiczne do wcześniej wykazanych efektów podania His, co wskazuje na wspólny mechanizm działania obu związków w OUN (Ruszkiewicz i Albrecht, 2015b; Ruszkiewicz i wsp., 2013). Oprócz opisanych efektów metabolicznych, podanie karnozyny zwiększyło przeżywalność szczurów TAA i poprawiło wyniki testów: odruchu wyprostnego i odruchów posturalnych. Wyniki te świadczą, że suplementacja karnozyną ma realne przełożenie na kondycję zwierząt z wywołaną EW (Milewski i wsp., 2016).

Ponieważ podanie His przekłada się na wzrost stężenia karnozyny w mózgu, przedstawiona w dysertacji analiza zmian stężenia His w korze mózgu nie musi znaleźć całkowitej korelacji czasowej z wystąpieniem niektórych efektów protekcyjnych, gdyż ich bezpośrednią przyczyną może być wpływ karnozyny.

Jednym z głównych skutków podania His był wzrost całkowitej aktywności NOS w korze mózgu. Dane literaturowe dotyczące wpływu His i karnozyny na aktywność NOS są niejednoznaczne. Wysokie (5 mM) stężenie karnozyny, podane do jednej z linii komórek śródbłonna, powodowało wzrost produkcji NO. Wynikało to prawdopodobnie z aktywacji przez karnozynę uwalniania jonów Ca^{2+} (Takahashi i wsp., 2009). Zjawisko

stymulacji uwalniania Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej przez karnozynę było wcześniej opisane w izolowanym sercu i kardiomiocytach (Zaloga i wsp., 1997). Powyższe badania dotyczą jednak wyłącznie tkanek obwodowych.

Z drugiej strony, w komórkach OUN wykazano, że karnozyna (Nicoletti i wsp., 2007; Severina i wsp., 2000), ale nie His (Nicoletti i wsp., 2007) może wiązać się do NOS, hamując jego aktywność. Mechanizm ten jest jedną z możliwych przyczyn obserwowanych protekcyjnych efektów podania karnozyny, wobec skutków inkubacji komórek z LPS: wzrostu parametrów prozapalnych, wzrostu poziomu ekspresji iNOS i markerów SON. Efekty te obserwowano w pierwotnej hodowli astrocytów szczurzych (Nicoletti i wsp., 2007) i hodowli komórek mikrogleju (Fleisher-Berkovich i wsp., 2009).

Zawartą w dysertacji charakterystykę modelu TAA uzupełniono pomiarem stężenia $\text{TNF-}\alpha$ w osoczu, wykazującą na znaczący wzrost ilości tej cytokiny wskutek podania TAA. Ponadto u szczurów TAA stwierdzono wzrost ekspresji genu kodującego $\text{TNF-}\alpha$ w korze mózgowej. Tezę o wystąpieniu nasilonej odpowiedzi zapalnej u szczurów TAA wspiera także obserwowany wzrost aktywności COX-2 w osoczu.

Szczegółowa rola cytokin prozapalnych w EW wykracza poza ramy niniejszej rozprawy. Należy jednak przypomnieć, że wielokrotnie wykazywano pozytywną korelację między wzrostem ich stężenia, a nasileniem objawów zarówno ostrej jak i przewlekłej EW (Goral i wsp., 2011; Odeh i wsp., 2005; Streetz i wsp., 2000). Znamienny wydaje się również fakt, że w niektórych przypadkach EW stężenie amoniaku we krwi nie zmienia się, natomiast znacząco rośnie stężenie $\text{TNF-}\alpha$ (Odeh i wsp., 2005). Wskazuje to istotny, i w dużej mierze niezależny od hiperamonemii, udział cytokin prozapalnych w patomechanizmie EW.

Dane literaturowe wskazują także na związek między podwyższonym stężeniem ADMA w osoczu, a chorobami o podłożu zapalnym np. reumatoidalnym zapaleniem

stawów i toczeniem rumieniowatym układowym (Bultink i wsp., 2005; Kwasny-Krochin i wsp., 2012). Co więcej, u pacjentów cierpiących na artropatie o różnej etiologii, wprowadzenie terapii obniżającej stężenie TNF- α zmniejszało równocześnie stężenie ADMA (Angel i wsp., 2012). Istotny wzrost stężenia ADMA notuje się także u pacjentów z sepsą (Shawcross i wsp., 2011).

Bezpośredni wpływ TNF- α na stężenie ADMA został wykazany w sznurzych astrocytach *in vitro*. Traktowanie tych komórek TNF- α obniżało ekspresję DDAH-2 i prowadziło do wzrostu stężenia ADMA (Chen i wsp., 2013). Wzrost ADMA po podaniu TNF- α wykazano także w komórkach linii glejaka sznurzego C6 (Sheen i wsp., 2016). Z kolei inkubacja astrocytów z ADMA indukowała produkcję IL-1 β i IL-6 (Chen i wsp., 2013b). Wyniki te dowodzą istotnej roli ADMA w procesach zapalnych.

U pacjentów z ostrym uszkodzeniem wątroby wykazano silną korelację między stężeniem TNF- α i ADMA we krwi. Po transplantacji wątroby stężenie obu parametrów ulega normalizacji (Mookerjee i wsp., 2007a). Wykazano także, że zarówno ADMA, jak i czynniki prozapalne są znacząco bardziej podwyższone we krwi pacjentów wskutek ostrego poalkoholowego uszkodzenia wątroby, niż w warunkach przewlekłego uszkodzenia wątroby (Mookerjee i wsp., 2007b).

Zatem wykazany w dysertacji wzrost stężenia TNF α we krwi oraz zwiększona ekspresja tej cytokiny w korze mózgu sznurów TAA mogą dodatkowo przyczyniać się do obserwowanego w tym modelu wzrostu stężenia ADMA.

Cyklooksygenazy (syntazy prostaglandyny H) są enzymami odpowiedzialnymi za syntezę prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów (Burdan i wsp., 2006). Stężenie COX-2 ulega znacznemu wzrostowi pod wpływem czynników prozapalnych np. IL-1, TNF- α , lipopolisacharydu (Pairet i Engelhardt, 1996). Indukcję COX-2 obserwuje się

m.in. w ostrym uszkodzeniu wątroby (Zhang i wsp., 2016) i przewlekłej niewydolności wątroby (Bahde i wsp., 2014), co uznaje się za jeden z dowodów przemawiających za hipotezą dotyczącą udziału czynników zapalnych w rozwoju EW (Jayakumar i wsp., 2015). W badaniach przeprowadzonych na szczurach TAA wykazano, że podanie inhibitorów COX zmniejszało śmiertelność i poprawiało parametry behawioralne zwierząt TAA (Chang i wsp., 2011).

7.5. Rola transportera γ +LAT2 w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA w astrocytach traktowanych amoniakiem *in vitro*

W licznych pracach, wzrost stężenia ADMA we krwi traktowany jest bezpośrednio jako wyznacznik dysfunkcji eNOS (Aldamiz-Echevarria i Andrade, 2012; Pope i wsp., 2009b). Należy jednak zwrócić uwagę, że NOS są enzymami wewnątrzkomórkowymi (Villanueva i Giulivi, 2010), zatem kluczowe znaczenie w regulacji ich aktywności odgrywa *de facto* wewnątrzkomórkowa pula ADMA (Teerlink, 2005).

W rozprawie po raz pierwszy zmierzono stężenie dwumetyloarginin w astrocytach *in vitro*: stężenie ADMA wyniosło ok. 7,3 μ M, a SDMA ok. 5 μ M. Stężenie ADMA w astrocytach było zatem wyższe niż wykazane w osoczu szczura (ok. 1,1 μ M).

Nieliczne publikacje dotyczą wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA. Dostępne dane wskazują na znaczące różnice w wartości wewnątrzkomórkowych stężeń ADMA i Arg w zależności od typu i pochodzenia badanych komórek. W liniach ludzkich komórek śródbłonka HUVEC i EA.hy926 wykazano stosunkowo niskie stężenie ADMA (ok. 0,34-0,37 μ M), (Chen i wsp., 2013a; Shin i wsp., 2011). Komórki EA.hy926 cechował ponadto bardzo wysoki wskaźnik Arg/ADMA wynoszący ok. 400 (Shin i wsp., 2011). Stężenie ADMA w komórkach śródbłonka naczyń szczura jest 10 razy wyższe niż

w ludzkich, a stosunek Arg/ADMA wynosi ok. 40 (Cardounel i wsp., 2007). Zaledwie jedna praca dotyczy stężenia ADMA w komórkach pochodzących z mózgu szczura. W neuronach mózdkowych szczura, stężenie ADMA wyniosło ok. 5,1 μM przy stosunku Arg/ADMA = ok. 22,5 (Cardounel i wsp., 2007). Wynik ten jest zbliżony do przedstawionego w rozprawie stężenia ADMA w astrocytach.

W badaniach własnych nie stwierdzono zmian w stężeniu ADMA w osoczu i mózgu w modelu HA. Wynik ten nie wyklucza możliwego wpływu podwyższonego stężenia amoniaku na wewnątrzkomórkowe stężenie ADMA.

W astrocytach inkubowanych przez 48 h z 5 mM amoniakiem wykazano istotne zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA i SDMA i jednoczesny wzrost stężenia ADMA i SDMA w pożywce hodowlanej. Wskazuje to na zwiększone uwalnianie dwumetyloarginin z astrocytów traktowanych amoniakiem. Wewnątrzkomórkowe stężenie Arg rosło pod wpływem amoniaku, nie odnotowano jednak istotnych różnic w stężeniu Arg w pożywce. Transfekcja astrocytów $y^+\text{LAT2siRNA}$ i spowodowane nią obniżenie poziomu białka $y^+\text{LAT2}$ zapobiegło zmniejszeniu wewnątrzkomórkowego stężenia dwumetyloarginin i wzrostowi stężenia Arg.

Wcześniejsze badania dowiodły, że amoniak powoduje zwiększenie ilości transportera $y^+\text{LAT2}$ w astrocytach (Zielińska i wsp., 2012) i komórkach linii śródbłonna naczyń mózgowych szczura RBE-4 (Skowrońska i wsp., 2012b). Wyciszenie ekspresji genu *Slc7a6* powodowało z kolei spadek zwiększonego pod wpływem amoniaku wychwyty Arg do astrocytów (Zielińska i wsp., 2012). Obserwacje te są zgodne z wykazanim w dysertacji wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Arg w astrocytach inkubowanych z amoniakiem.

Wzrost poziomu $y^+\text{LAT2}$ oraz zwiększony wychwyt Arg do skrawków kory mózgowej wykazano także w szczurzym modelu HA (Zielińska i wsp., 2011).

Niepublikowane wyniki własne potwierdzają wzrost ekspresji genu *Slc7a6* także w modelu TAA. Model ten cechuje m.in. wzrost stężenia amoniaku we krwi i w mózgu (Hilgier i Olson, 1994). Można zatem przypuszczać, że hiperamonemia jest czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost ilości transportera y^+LAT2 w mózgu.

Z uwagi na podobieństwo strukturalne uważa się, że ADMA transportowana jest za pośrednictwem tych samych białek nośnikowych co Arg (Closs i wsp., 2006; Teerlink i wsp., 2009). Wiodącą rolę w transporcie metyloarginin przypisuje się białkom należącym do systemu y^+ : CAT1 (Strobel i wsp., 2012), CAT2A (Strobel i wsp., 2013) i CAT2B (Closs i wsp., 1997). Udowodniono, że zwiększenie ilości CAT1 może powodować wzrost uwalniania ADMA i SDMA z komórek HEK293 (Strobel i wsp., 2012). Z drugiej strony transfekcja komórek linii EA.hy926, CAT-1siRNA nie powodowała istotnych zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu ADMA i SDMA (Shin i wsp., 2011).

Mało wiadomo na temat udziału układu y^+L w transporcie metyloarginin. Istotnych informacji dostarczyły badania pacjenta cierpiącego na częste, oporne na leczenie ataki dusznicy bolesnej. Objawy choroby ustępowały po doustnym podaniu Arg, która jednocześnie powodowała wzrost stężenia ADMA we krwi. Badanie izolowanych z krwi pacjenta monocytów wykazało obniżenie poziomu y^+LAT1 . Dalsze analizy pozwoliły ustalić, że y^+LAT1 pełni istotną funkcję w transporcie metyloarginin na zewnątrz komórki (Closs i wsp., 2012). Wcześniejsze badania, dotyczące wrodzonej nietolerancji lizyny wykazały obniżenie ilości y^+LAT1 , będące przyczyną zmniejszonej syntezy NO w śródbłonku naczyń (Kamada i wsp., 2001; Kayanoki i wsp., 1999). Mechanizmem odpowiedzialnym za to zjawisko może być, jak sugerują autorzy, niewystarczające zaopatrzenie komórek śródbłonka w Arg (Kamada i wsp., 2001).

Niemniej jednak, hipoteza zmniejszonego uwalniania metyloarginin z komórek śródbłonna i następczego hamowania eNOS, również jest prawdopodobna.

Jak dotąd nie badano bezpośredniej roli y^+LAT2 w transporcie metyloarginin, jednak funkcja białek y^+LAT1 i y^+LAT2 jest analogiczna (Closs i wsp., 2004; Rotmann i wsp., 2007). Zawarte w dysertacji wyniki jednoznacznie wskazują, że y^+LAT2 zaangażowany jest w transport dwumetyloarginin na zewnątrz komórki, gdyż wywołane amoniakiem zwiększenie ilości transportera y^+LAT2 skutkuje zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA i SDMA. Wcześniejsze badania sugerują, że główną rolą układu y^+L jest usuwanie aminokwasów o charakterze zasadowym z komórki, czego przyczyną jest naturalnie występująca po obu stronach błony komórkowej różnica stężenia jonów Na^+ (Broer i wsp., 2000; Verrey i wsp., 2004).

Wykonany w trakcie badań własnych pomiar stężenia ADMA i SDMA w świeżej pożywce hodowlanej wykazał, że zawiera ona śladowe ilości ADMA i SDMA (wynik pomiaru w granicach niedokładności pomiarowej dane nie ujęte w pracy). Z kolei stężenie Arg w świeżej pożywce (0,482 mM), jak również po 48 h hodowli (ok. 0,306 mM) jest zdecydowanie wyższe, niż stężenie wewnątrzkomórkowe (ok. 0,160 mM). Wydaje się, zatem, że preferowany kierunek przemieszczania ADMA w warunkach *in vitro* może częściowo wynikać z нефизjologicznej różnicy stężeń dwumetyloarginin i Arg między pożywką hodowlaną, a cytozolem komórki.

Transport ADMA na zewnątrz komórki i jej pobieranie z krwi przez narządy o wysokim potencjale do usuwania ADMA np. nerki nabiera szczególnego znaczenia w sytuacji niewydolności wewnątrzkomórkowych ścieżek jej degradacji (DDAH, AGXT-2) (Teerlink i wsp., 2009). Wykazano m.in., że wzrost poziomu białka CAT1 w nerce zapobiega wzrostowi stężenia ADMA w osoczu (Li i wsp., 2009). W wątrobie szczurów BDL stwierdzono ponadto istotne zmniejszenie ilości CAT-2A, co może

przyczyniać się do wzrostu stężenia ADMA w krwi. Jednak w tej samej pracy wykazano również wzrost stężenia ADMA w wątrobie i obniżenie ilości białka DDAH1/2 (Tain i wsp., 2010b). Pozwala to wysnuć wniosek, że to obniżona degradacja ADMA przez DDAH, a nie obniżenie jej transportu do hepatocytów jest główną przyczyną akumulacji ADMA

w modelu BDL.

Niemniej jednak zwiększona ekspresja białek usuwających ADMA z komórki, w tym wzrost ekspresji *Slc7a6* w mózgu szczurów TAA, może być zmianą o charakterze kompensacyjnym, przeciwdziałającą nadmiernemu gromadzeniu ADMA w mózgu.

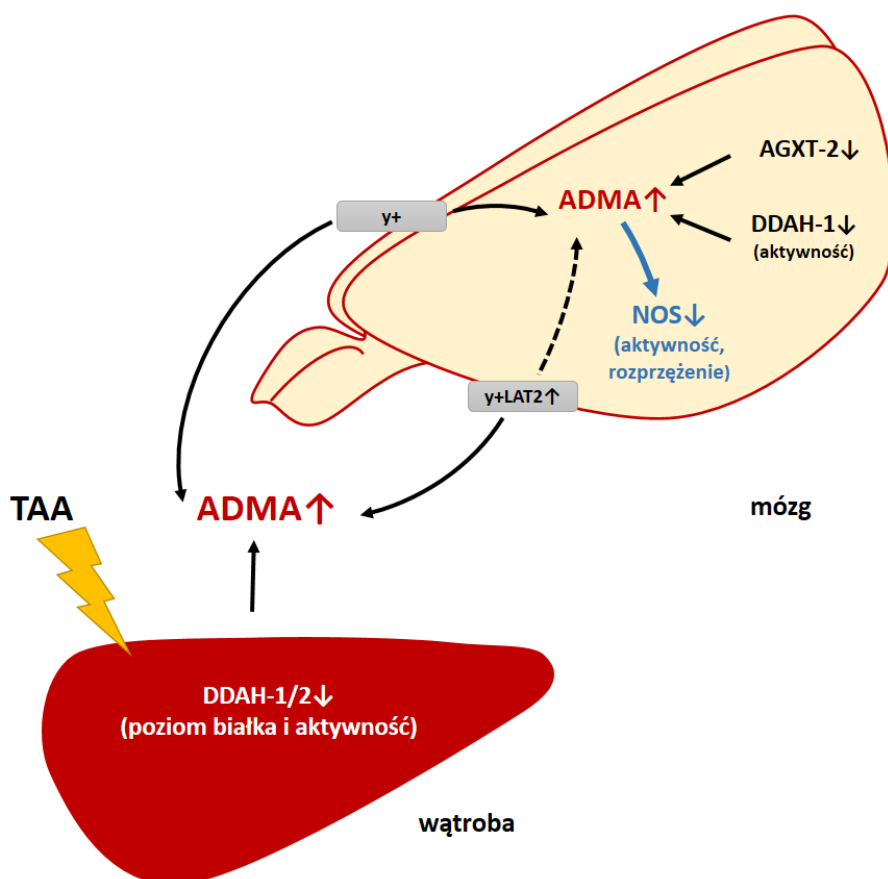
Badania zamieszczone w rozprawie wykazały, że ADMA jest słabym inhibitorem transportu Arg do astrocytów. Zatem, ADMA najprawdopodobniej nie ogranicza dostępności Arg dla astrocytarnych izoform NOS w warunkach fizjologicznego zakresu stężeń Arg i ADMA. Powyższą obserwację wzmacniają dane znaczącego hamowania transportu ADMA do komórek linii ludzkiego śródbłonka naczyń mózgu (hCMEC/D3) przez bliskie fizjologicznemu (100 μ M) stężenie Arg (Watson i wsp., 2016).

8. Wnioski

1. Wzrost stężenia ADMA obserwowano jedynie w modelu ostrego uszkodzenia wątroby (TAA), zatem hiperamonemia *per se* nie jest wiodącym czynnikiem sprawczym.
2. Zaburzona degradacja (obniżona aktywność katalityczna i/lub poziom ekspresji DDAH w wątrobie i mózgu) jest główną przyczyną obserwowanego wzrostu stężenia ADMA w modelu TAA.
3. Zmiany profilu ekspresji izoform NOS oraz wykazane rozprężenie eNOS skutkują obniżeniem całkowitej aktywności NOS w korze mózgowej szczurów TAA.
4. His obniżając stężenie ADMA w mózgu szczurów TAA powoduje wzrost całkowitej aktywności NOS na drodze zwiększenia aktywności enzymatycznej DDAH, co wykazano w warunkach *ex vivo* i/lub wzrostu syntezy karnozyny – dwupeptydu przeciwdziałającemu wystąpieniu SON.
5. Wzrost ilości transportera y^+ LAT2 w astrocytach *in vitro* traktowanych amoniakiem przyczynia się do wzmożonego uwalniania ADMA i SDMA z astrocytów.
6. ADMA nie hamuje dokomórkowego transportu Arg do astrocytów *in vitro*, przy bliskim fizjologicznemu stosunku stężenia Arg/ADMA.

Podsumowując, badania dowiodły, że ostre uszkodzenie wątroby, w odróżnieniu od hiperamonemii, zwiększa stężenie ADMA w mózgu. Proponowany mechanizm procesów odpowiedzialnych za wzrost stężenia ADMA w modelu TAA, (częściowo poparty wynikami badań *in vitro*) przedstawiono na rycinie 27. Wyniki zamieszczone w dysertacji wskazują na istotne zmiany profilu ekspresji poszczególnych izoform

i aktywności NOS w mózgu w ostrej EW, co może być związane z obserwowanym wzrostem stężenia ADMA. Wykazano ponadto, że His może przeciwdziałać wzrostowi ADMA w mózgu i częściowo znosić skutki SON.



Rycina 27 Schemat przedstawiający procesy przyczyniające się do wzrostu obwodowego i mózgowego stężenia ADMA u szczura z wywołaną podaniem TAA ostrą encefalopatią wątrobową. Uszkodzenie wątroby wywołane podaniem TAA prowadzi do spadku poziomu białek DDAH-1/2 oraz obniża ich aktywność katalityczną w wątrobie, co skutkuje wzrostem stężenia ADMA we krwi. W korze mózgu obniżona aktywność DDAH wraz z obniżeniem poziomu białka AGXT-2, hamują degradację ADMA i przyczyniają się do zaobserwowanego wzrostu stężenia ADMA. Powodowany hiperamonemią wzrost ekspresji γ^+ LAT2 może odgrywać istotną rolę w usuwaniu ADMA z astrocytów (badania *in vitro*). Wzrost stężenia ADMA w mózgu może być jedną z przyczyn wykazanego w rozprawie rozprężenia eNOS przyczyniając się do obniżenia całkowitej aktywności NOS.

9. Streszczenie

Encefalopatia wątrobowa jest zespołem neuropsychiatrycznym cechującym się złożoną etiologią i zmiennym przebiegiem. Jej pierwotną przyczyną jest niewydolność metaboliczna wątroby, prowadząca do gromadzenia się związków o charakterze neurotoksycznym.

Podstawowym kryterium różnicującym EW jest podział na typ ostry i przewlekły, co ma przełożenie na odmienny kierunek zmian w ścieżce sygnalizacyjnej NMDAr-NOS-NO, wiążących się z zaburzoną aktywnością NOS w mózgu.

Zarówno we krwi pacjentów chorych na EW o różnej etiologii, jak i u zwierząt z przewlekłą EW, stwierdzano wzrost stężenia dwumetyloargininy (ADMA), endogennego inhibitora izoform NOS. Dokładny mechanizm działania ADMA na komórki OUN w warunkach EW, zwłaszcza w modelu ostrym, nie został jednak w pełni poznany.

Celem rozprawy było zbadanie mechanizmów regulujących stężenie ADMA w dwóch szczurzych modelach EW: hiperamonemii prostej i modelu ostrego uszkodzenia wątroby wywołanego dootrzewnowym podaniem tioacetamidu (TAA). Analizowano zmiany stężenia dwumetyloarginin oraz enzymy metabolizmu ADMA, ze szczególnym uwzględnieniem kory mózgu jako struktury najbardziej obciążonej skutkami EW. Zbadano ekspresję i aktywność izoform NOS, efektorów ADMA. Ponadto analizowano wpływ dootrzewnowego podania histydyny (His), która wykazywała efekty protekcyjne zarówno w hiperamonemii *in vitro*, jak i w modelu TAA, na stężenie dwumetyloarginin oraz wybrane parametry związane z mechanizmem jej działania.

Zmiany stężenia ADMA w osoczu i homogenatach mózgu obserwowano jedynie w modelu TAA, co sugeruje, że hiperamonemia *per se* nie jest bezpośrednią przyczyną wzrostu ADMA w ostrej EW. Wzrost stężenia ADMA w modelu TAA związany jest z jej

upośledzoną degradacją, będącą skutkiem 1) obniżenia aktywności i ilości białka DDAH-1/2 w wątrobie, 2) obniżenia aktywności DDAH w korze mózgu i 3) obniżenia ilości AGXT-2, mitochondrialnie zlokalizowanego enzymu reprezentującego alternatywną ścieżkę degradacji ADMA w korze mózgu. Jednocześnie wykluczono wzrost syntezy ADMA na drodze reakcji katalizowanej przez PRMT i wzrost tempa uwalniania metyloarginin z białek.

Określono odmienny dla poszczególnych izoform NOS profil zmian poziomu ekspresji w homogenatach kory mózgu szczurów TAA oraz stwierdzono obniżenie całkowitej aktywności NOS. Wykazano, że dodatkowym mechanizmem upośledzającym funkcjonowanie NOS w modelu TAA, jednocześnie przyczyniającym się do obniżenia jego całkowitej aktywności, jest rozprężenie enzymu, zjawisko wykazane jako spadek ilości aktywnych dimerów eNOS oraz zwiększenie zależnej od NOS produkcji $\cdot\text{O}_2^-$.

Jednocześnie nie stwierdzono zmian w stężeniu azotynów i azotanów w homogenatach kory mózgowej szczurów TAA (metoda Griessa), obserwując równoległe wzrost ich stężenia w osoczu, przekładający się na wzmożoną nitrozylację reszt Tyr w białkach osocza.

Dootrzewnowe podanie His obniżyło wzrost stężenia ADMA w homogenatach kory mózgowej szczurów TAA, nie wpływając na stężenie ADMA w osoczu. Wydaje się, że mechanizm tego zjawiska związany jest ze zwiększeniem aktywności DDAH w mózgu, co wykazano w badaniach *ex vivo*.

W modelu TAA, His zwiększała całkowitą pojemność antyoksydacyjną kory mózgu, co dowiodło bezpośrednio jej antyoksydacyjnych własności. His powodowała również wzrost stężenia karnozyny w korze mózgu, co może przyczyniać się do obserwowanego zwiększenia pojemności antyoksydacyjnej mózgu.

Wyniki badań *in vitro* dowiodły, zależnego od indukowanego amoniakiem wzrostu ilości transportera y^+LAT2 , obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia ADMA i SDMA w astrocytach. Wykazano również, że ADMA kompetycyjnie hamuje zależny od układu y^+L , transport Arg do astrocytów. Efekt ten, obserwowany jedynie w przypadku wysokich (niefizjologicznych $\sim 500 \mu\text{M}$) stężeń ADMA, nie wydaje się jednak mieć kluczowego znaczenia w warunkach EW.

Wyniki dokumentują, że hiperamonemia nie zmienia stężenia ADMA w osoczu lub mózgu szczura. Z kolei, w modelu ostrego uszkodzenia wątroby dochodzi do zaburzeń funkcjonowania enzymów degradujących ADMA zarówno w wątrobie, jak i mózgu, co skutkuje wzrostem stężenia ADMA. Wzrost stężenia ADMA, obok zmian w poziomie ekspresji izoform NOS i rozprężenia NOS, może przyczyniać się do obniżenia aktywności NOS w korze mózgu szczurów TAA. Protekcyjne działanie His dotyczy jedynie części obserwowanych w modelu TAA zaburzeń związanych głównie z reakcjami wolnorodnikowymi.

10. Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neurological syndrome associated with acute or chronic liver failure. The NMDAr/NOS/NO pathway is crucially involved in the pathomechanism of HE. In acute HE, NO synthesis in the brain is thought to be increased and associated with oxidative–nitrosative stress (ONS). In turn, cGMP production in chronic HE is adaptively reduced.

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of all nitric oxide synthase (NOS) isoforms. In blood of patients with HE and in various HE animal models, elevated ADMA were observed. However, causes of ADMA increase and, even more importantly, the role of ADMA in acute HE, are not clear so far.

Our aim was to evaluate the mechanism regulating ADMA concentration in two rat models: a simple hyperammonemia in which rats received intraperitoneal injections of ammonium acetate and thioacetamide (TAA)-induced acute liver failure. We tested also effect of intraperitoneal administrations of histidine (His), which was reported to prevent some changes evoked by ammonia *in vitro* and alleviate ONS-related symptoms in HE animals.

An increase in ADMA concentration in both brain cortex and plasma was found only in TAA rats suggesting that ammonia does not interfere with ADMA metabolism. This finding was correlated with decreased DDAH protein level in liver and reduced activity in both liver and brain cortex. Moreover, a protein level of AGXT-2, a second ADMA metabolising enzyme, was decreased in isolated from brain cortex mitochondria. The ADMA synthesis *via* PRMT and total protease activity in liver and brain cortex was unaltered.

TAA-induced liver failure was associated with changes in NOS expression pattern in the brain and induced eNOS uncoupling. These abnormalities seem to affect a total NOS activity, which was reduced in HE animals. In turn, nitrite and nitrate level was unchanged in the brain and elevated in the plasma of TAA rats. TAA-induced HE was also accompanied by the increase of blood cyclooxygenase activity and elevated TNF- α content measured in the blood and a rise of TNF- α transcript in the brain, markers of the inflammatory response.

His treatment abolished some changes evoked by TAA. His attenuate ADMA elevation in the brain but does not prevent ADMA accumulation in the plasma. The mechanism of these phenomena is not clear but may be associated with ability to the increase in DDAH activity shortly after a direct application of His (based on an ex vivo study). The i.p. administration of His increased total antioxidant capacity and carnosine concentration in brain cortex of TAA rat.

In vitro studies on rat astrocytes revealed ammonia-induced decrease in intracellular ADMA and SDMA concentration with corresponding dimethylarginines accumulation in cell cultured medium. The downregulation of Arg transporter y⁺LAT2 by siRNA counteract ADMA/SDMA depletion suggesting that ammonia induced y⁺LAT2 may be responsible for ADMA efflux from astrocytes in vitro.

The effect of ADMA on Arg transport was evaluated. The inhibition of Arg uptake to the cultured astrocytes only in a very high pathophysiological concentration (500 μ M, or more) of ADMA suggested that NO synthesis substrate supply by ADMA, in these cells, seems to be insignificant.

The present study points to the increase of ADMA as a potentially important contributor to dysfunctions associated with acute HE. ADMA elevation in both blood and

brain of acute HE rat was caused by decreased ADMA degradation. Elevated ADMA may contribute together with altered NOSs isoforms expression pattern in the decrease of NOS activity in TAA rat brain. Administration of His partly attenuated TAA-induced alterations associated with ONS.

11. Literatura

- 1 Abe, M., Ochi, S., Mori, Y., Yamazaki, K., Ishimaru, T., Yoshino, Y. i wsp., Ueno, S. (2014). Distribution of D-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase in the rat brain. *BMC Neurosci*, 15, 53
- 2 Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R., Vallance, P. (2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(8), 1455-1459
- 3 Aguilar, M. A., Minarro, J., Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol*, 161(2), 704-713
- 4 Ahn, J. M., Kim, C. H., Um, S. H., Kim, K. M., Kim, T. H., Yim, S. Y. i wsp., Ryu, H. S. (2016). A validation Study Associating Glutaminase Promoter Variations with Hepatic Encephalopathy in East Asian Populations. *J Gastroenterol Hepatol*
- 5 Ahya, S. N., Jose Soler, M., Levitsky, J., Batlle, D. (2006). Acid-base and potassium disorders in liver disease. *Semin Nephrol*, 26(6), 466-470
- 6 Albrecht, J., Dolinska, M., Hilgier, W., Lipkowski, A. W., 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(4-5), 341-347
- 7 Albrecht, J., Hilgier, W., Rafalowska, U. (1990). Activation of arginine metabolism to glutamate in rat brain synaptosomes in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: an adaptative response? *J Neurosci Res*, 25(1), 125-130
- 8 Albrecht, J., Jones, E. A. (1999). Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci*, 170(2), 138-146
- 9 Aldamiz-Echevarria, L., Andrade, F. (2012). Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Int J Mol Sci*, 13(9), 11288-11311
- 10 Almdal, T., Schroeder, T., Ranek, L. (1989). Cerebral blood flow and liver function in patients with encephalopathy due to acute and chronic liver diseases. *Scand J Gastroenterol*, 24(3), 299-303
- 11 Alpoim, P. N., Sousa, L. P., Mota, A. P., Rios, D. R., Dusse, L. M. (2015). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular and renal disease. *Clin Chim Acta*, 440, 36-39
- 12 Amin-Hanjani, S., Stagliano, N. E., Yamada, M., Huang, P. L., Liao, J. K., Moskowitz, M. A. (2001). Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*, 32(4), 980-986
- 13 Angel, K., Provan, S. A., Mowinckel, P., Seljeflot, I., Kvien, T. K., Atar, D. (2012). The L-arginine/asymmetric dimethylarginine ratio is improved by anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in inflammatory arthropathies. Associations with aortic stiffness. *Atherosclerosis*, 225(1), 160-165
- 14 Antoniadou, C., Shirodaria, C., Leeson, P., Antonopoulos, A., Warrick, N., Van-Assche, T. i wsp., Channon, K. M. (2009). Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*, 30(9), 1142-1150
- 15 Arrigoni, F., Ahmetaj, B., Leiper, J. (2010). The biology and therapeutic potential of the DDAH/ADMA pathway. *Curr Pharm Des*, 16(37), 4089-4102
- 16 Bahde, R., Kapoor, S., Gupta, S. (2014). Nonselective inhibition of prostaglandin-endoperoxide synthases by naproxen ameliorates acute or chronic liver injury in animals. *Exp Mol Pathol*, 96(1), 27-35

- 17 Bajaj, J. S., Ahluwalia, V., Wade, J. B., Sanyal, A. J., White, M. B., Noble, N. A. i wsp., Heuman, D. M. (2013). Asymmetric dimethylarginine is strongly associated with cognitive dysfunction and brain MR spectroscopic abnormalities in cirrhosis. *J Hepatol*, 58(1), 38-44
- 18 Balasubramaniyan, V., Wright, G., Sharma, V., Davies, N. A., Sharifi, Y., Habtesion, A. i wsp., Jalan, R. (2012). Ammonia reduction with ornithine phenylacetate restores brain eNOS activity via the DDAH-ADMA pathway in bile duct-ligated cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302(1), G145-152
- 19 Basso, M., Pennuto, M. (2015). Serine phosphorylation and arginine methylation at the crossroads to neurodegeneration. *Exp Neurol*, 271, 77-83
- 20 Bedford, M. T., Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 18(3), 263-272
- 21 Bekpinar, S., Vardagli, D., Unlucerci, Y., Can, A., Uysal, M., Gurdol, F. (2015). Effect of rosiglitazone on asymmetric dimethylarginine metabolism in thioacetamide-induced acute liver injury. *Pathophysiology*, 22(3), 153-157
- 22 Bergasa, N. V., Borque, M. J., Wahl, L. M., Rabin, L., Jones, E. A. (1992). Modulation of thioacetamide-induced hepatocellular necrosis by prostaglandins is associated with novel histologic changes. *Liver*, 12(4 Pt 1), 168-174
- 23 Bevers, L. M., Braam, B., Post, J. A., van Zonneveld, A. J., Rabelink, T. J., Koomans, H. A. i wsp., Joles, J. A. (2006). Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*, 47(1), 87-94
- 24 Blei, A. T. (2008). Brain edema in acute liver failure. *Crit Care Clin*, 24(1), 99-114, ix
- 25 Bobermin, L. D., Wartchow, K. M., Flores, M. P., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Goncalves, C. A. (2015). Ammonia-induced oxidative damage in neurons is prevented by resveratrol and lipoic acid with participation of heme oxygenase 1. *Neurotoxicology*, 49, 28-35
- 26 Boldyrev, A. A., Aldini, G., Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*, 93(4), 1803-1845
- 27 Bonifer, C., Cockerill, P. N. (2011). Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. *Adv Exp Med Biol*, 711, 12-25
- 28 Bosoi, C. R., Rose, C. F. (2013). Brain edema in acute liver failure and chronic liver disease: similarities and differences. *Neurochem Int*, 62(4), 446-457
- 29 Bosoi, C. R., Tremblay, M., Rose, C. F. (2014). Induction of systemic oxidative stress leads to brain oedema in portacaval shunted rats. *Liver Int*, 34(9), 1322-1329
- 30 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(7), 1673-1685
- 31 Braissant, O., Honegger, P., Loup, M., Iwase, K., Takiguchi, M., Bachmann, C. (1999). Hyperammonemia: regulation of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase genes in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Neurosci Lett*, 266(2), 89-92
- 32 Brenner, T., Fleming, T. H., Rosenhagen, C., Krauser, U., Mieth, M., Bruckner, T. i wsp., Hofer, S. (2012). L-arginine and asymmetric dimethylarginine are early predictors for survival in septic patients with acute liver failure. *Mediators Inflamm*, 2012, 210454
- 33 Broer, A., Wagner, C. A., Lang, F., Broer, S. (2000). The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J*, 349 Pt 3, 787-795
- 34 Bruck, R., Aeed, H., Shirin, H., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y., Halpern, Z. (1999). The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol*, 31(1), 27-38

- 35 Bryan, N. S., Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43(5), 645-657
- 36 Bultink, I. E., Teerlink, T., Heijst, J. A., Dijkmans, B. A., Voskuyl, A. E. (2005). Raised plasma levels of asymmetric dimethylarginine are associated with cardiovascular events, disease activity, and organ damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 64(9), 1362-1365
- 37 Burdan, F., Chalas, A., Szumilo, J. (2006). Cyklooksigenaza i prostanoidy - znaczenie biologiczne. *Postepy Hig Med Dosw* 60, 129-141
- 38 Butterworth, R. F. (2002). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis*, 17(4), 221-227
- 39 Butterworth, R. F. (2003). Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices. *Liver International*, 23, 5-9
- 40 Butterworth, R. F., Norenberg, M. D., Felipo, V., Ferenci, P., Albrecht, J., Blei, A. T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*, 29(6), 783-788
- 41 Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF-alpha and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1beta, NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav Immun*
- 42 Cai, S., Khoo, J., Channon, K. M. (2005). Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 65(4), 823-831
- 43 Cai, S. R., Motoyama, K., Shen, K. J., Kennedy, S. C., Flye, M. W., Ponder, K. P. (2000). Lovastatin decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*, 32(1), 67-77
- 44 Calabrese, C., Carpagnano, G. E., Patella, V., Vatrella, A., Santus, P. (2015). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): will be or will not be a new revolutionary biomarker of bronchial asthma? *Minerva Med*, 106(5 Suppl 1), 9-11
- 45 Caplin, B., Wang, Z., Slaviero, A., Tomlinson, J., Dowsett, L., Delahaye, M. i wsp., Leiper, J. (2012). Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(12), 2892-2900
- 46 Cardounel, A. J., Cui, H., Samouilov, A., Johnson, W., Kearns, P., Tsai, A. L. i wsp., Zweier, J. L. (2007). Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem*, 282(2), 879-887
- 47 Cauli, O., Mansouri, M. T., Agusti, A., Felipo, V. (2009). Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology*, 136(4), 1359-1367, e1351-1352
- 48 Chadipiralla, K., Reddanna, P., Chinta, R. M., Reddy, P. V. (2012). Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochem Res*, 37(1), 59-68
- 49 Chan, C. Y., Huang, S. W., Wang, T. F., Lu, R. H., Lee, F. Y., Chang, F. Y. i wsp., Lee, S. D. (2004). Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest*, 34(2), 122-128
- 50 Chan, W. K. M., Decker, E. A., Chow, C. K., Boissonneault, G. A. (1994). Effect of Dietary Carnosine on Plasma and Tissue Antioxidant Concentrations and on Lipid Oxidation in Rat Skeletal-Muscle. *Lipids*, 29(7), 461-466

- 51 Chang, C. C., Wang, S. S., Huang, H. C., Chan, C. Y., Lee, F. Y., Lin, H. C. i wsp., Lee, S. D. (2011). Selective cyclooxygenase inhibition improves hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure of rat. *Eur J Pharmacol*, 666(1-3), 226-232
- 52 Chen, L., Zhou, J. P., Kuang, D. B., Tang, J., Li, Y. J., Chen, X. P. (2013a). 4-HNE increases intracellular ADMA levels in cultured HUVECs: evidence for miR-21-dependent mechanisms. *PLoS One*, 8(5), e64148
- 53 Chen, X. M., Xia, J., Zhou, T., Yuan, Q., Zhang, W. F., Hu, C. P. i wsp., Jiang, J. L. (2013b). Involvement of DDAH/ADMA pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis in rats. *Int Immunopharmacol*, 16(2), 322-331
- 54 Chetri, K., Choudhuri, G. (2003). Role of trace elements in hepatic encephalopathy: zinc and manganese. *Indian J Gastroenterol*, 22 Suppl 2, S28-30
- 55 Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159
- 56 Chu, C. J., Chang, C. C., Wang, T. F., Lee, F. Y., Chang, F. Y., Chen, Y. C. i wsp., Lee, S. D. (2006). Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of nitric oxide synthase isoforms. *J Gastroenterol Hepatol*, 21(7), 1194-1199
- 57 Chu, C. J., Wang, S. S., Lee, F. Y., Chang, F. Y., Lin, H. C., Hou, M. C. i wsp., Lee, S. D. (2001). Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Eur J Clin Invest*, 31(2), 156-163
- 58 Closs, E. I., Basha, F. Z., Habermeier, A., Forstermann, U. (1997). Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the γ^+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*, 1(1), 65-73
- 59 Closs, E. I., Boissel, J. P., Habermeier, A., Rotmann, A. (2006). Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol*, 213(2), 67-77
- 60 Closs, E. I., Ostad, M. A., Simon, A., Warnholtz, A., Jabs, A., Habermeier, A. i wsp., Munzel, T. (2012). Impairment of the extrusion transporter for asymmetric dimethyl-L-arginine: a novel mechanism underlying vasospastic angina. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(2), 218-223
- 61 Closs, E. I., Scheld, J. S., Sharafi, M., Forstermann, U. (2000). Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol*, 57(1), 68-74
- 62 Closs, E. I., Simon, A., Vekony, N., Rotmann, A. (2004). Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr*, 134(10 Suppl), 2752S-2759S; discussion 2765S-2767S
- 63 Cooper, A. J., Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev*, 67(2), 440-519
- 64 Corbalan, R., Chatauret, N., Behrends, S., Butterworth, R. F., Felipo, V. (2002). Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology*, 36(5), 1155-1162
- 65 Cordoba, J. (2014). Hepatic Encephalopathy: From the Pathogenesis to the New Treatments. *ISRN Hepatol*, 2014, 236268
- 66 Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med*, 62, 170-185
- 67 Davids, M., van Hell, A. J., Visser, M., Nijveldt, R. J., van Leeuwen, P. A., Teerlink, T. (2012). Role of the human erythrocyte in generation and storage of asymmetric dimethylarginine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(8), H1762-1770
- 68 Dayoub, H., Achan, V., Adimoolam, S., Jacobi, J., Stuehlinger, M. C., Wang, B. Y. i wsp., Cooke, J. P. (2003). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*, 108(24), 3042-3047
- 69 Dayoub, H., Rodionov, R. N., Lynch, C., Cooke, J. P., Arning, E., Bottiglieri, T. i wsp., Faraci, F. M. (2008). Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits

- asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *Stroke*, 39(1), 180-184
- 70 De Rui, M., Montagnese, S., Amodio, P. (2016). Recent developments in the diagnosis and treatment of covert/minimal hepatic encephalopathy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(4), 443-450
- 71 Deshmukh, D. R., Singh, K. R., Meert, K., Deshmukh, G. D. (1990). Failure of L-carnitine to protect mice against hyperammonemia induced by ammonium acetate or urease injection. *Pediatr Res*, 28(3), 256-260
- 72 Di Lorenzo, A., Bedford, M. T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett*, 585(13), 2024-2031
- 73 Drapier, J. C., Hibbs, J. B., Jr. (1986). Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest*, 78(3), 790-797
- 74 Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 62(6), 649-671
- 75 Duncan, A. J., Heales, S. J. (2005). Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*, 26(1-2), 67-96
- 76 Dzoljic, E., Grbatinic, I., Kostic, V. (2015). Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol*, 30(3), 159-163
- 77 Ede, R. J., Williams, R. W. (1986). Hepatic encephalopathy and cerebral edema. *Semin Liver Dis*, 6(2), 107-118
- 78 El-Mlili, N., Rodrigo, R., Naghizadeh, B., Cauli, O., Felipo, V. (2008). Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J Neurochem*, 106(3), 1440-1449
- 79 Elfering, S. L., Sarkela, T. M., Giulivi, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 277(41), 38079-38086
- 80 Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V. (2005a). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res*, 1036(1-2), 115-121
- 81 Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., Felipo, V. (2005b). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41(2), 299-306
- 82 Fackelmayer, F. O. (2005). Protein arginine methyltransferases: guardians of the Arg? *Trends Biochem Sci*, 30(12), 666-671
- 83 Faraci, F. M., Brian, J. E., Jr., Heistad, D. D. (1995). Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 2), H1522-1527
- 84 Felipo, V., Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*, 67(4), 259-279
- 85 Felipo, V., Urios, A., Valero, P., Sanchez, M., Serra, M. A., Pareja, I. i wsp., Montoliu, C. (2013). Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver International*, 33(10), 1478-1489
- 86 Ferrigno, A., Di Pasqua, L. G., Berardo, C., Rizzo, V., Richelmi, P., Vairetti, M. (2015). Changes in biliary levels of arginine and its methylated derivatives after hepatic ischaemia/reperfusion. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*
- 87 Ferrigno, A., Rizzo, V., Bianchi, A., Di Pasqua, L. G., Berardo, C., Richelmi, P., Vairetti, M. (2014). Changes in ADMA/DDAH pathway after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: the role of bile. *Biomed Res Int*, 2014, 627434

- 88 Fleck, C., Zimmermann, T., Franke, H., Braunlich, H., Dargel, R. (1988). Relation between renal and hepatic excretion of drugs: VII. Hepatic and renal excretion of phenol red in thioacetamide-induced acute and chronic liver damage. *Exp Pathol*, 33(1), 47-54
- 89 Fleisher-Berkovich, S., Abramovitch-Dahan, C., Ben-Shabat, S., Apte, R., Beit-Yannai, E. (2009). Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation. *Peptides*, 30(7), 1306-1312
- 90 Fogel, W. A., Sasiak, K., Andrzejewski, W., Stasiak, A., Wojcik, A. (1999). The manipulation of brain histamine concentrations failed to modify voluntary alcohol intake by rats. *Inflamm Res*, 48 Suppl 1, S65-66
- 91 Forstermann, U., Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-837, 837a-837d
- 92 Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacin, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 139-158
- 93 Frattini, V., Lionetti, C. (1998). Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography. Derivatization with omicron-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of "free" species. *J Chromatogr A*, 809(1-2), 241-245
- 94 Frey, D., Braun, O., Briand, C., Vasak, M., Grutter, M. G. (2006). Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure*, 14(5), 901-911
- 95 Giguere, J. F., Butterworth, R. F. (1984). Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Res*, 9(9), 1309-1321
- 96 Gopalakrishnan, J., Decker, E. A., Means, W. J. (1999). Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Sci*, 52(1), 101-110
- 97 Goral, V., Atayan, Y., Kaplan, A. (2011). The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor alpha? *Hepatogastroenterology*, 58(107-108), 943-948
- 98 Gorg, B., Qvarskhava, N., Bidmon, H. J., Palomero-Gallagher, N., Kircheis, G., Zilles, K., Haussinger, D. (2010). Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 52(1), 256-265
- 99 Gorg, B., Qvarskhava, N., Keitel, V., Bidmon, H. J., Selbach, O., Schliess, F., Haussinger, D. (2008). Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology*, 48(2), 567-579
- 100 Grattagliano, I., Calamita, G., Cocco, T., Wang, D. Q., Portincasa, P. (2014). Pathogenic role of oxidative and nitrosative stress in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(19), 5746-5759
- 101 Greco, R., Ferrigno, A., Demartini, C., Zanaboni, A., Mangione, A. S., Blandini, F. I. wsp., Tassorelli, C. (2015). Evaluation of ADMA-DDAH-NOS axis in specific brain areas following nitroglycerin administration: study in an animal model of migraine. *J Headache Pain*, 16, 560
- 102 Guix, F. X., Uribealago, I., Coma, M., Munoz, F. J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*, 76(2), 126-152
- 103 Haussinger, D., Gorg, B. (2010). Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(1), 87-92
- 104 Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Minana, M. D., Felipo, V. (1996). NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res*, 21(10), 1237-1244
- 105 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(3), 709-715

- 106** Hilgier, W., Anderzhanova, E., Oja, S. S., 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(1), 21-25
- 107** Hilgier, W., Oja, S. S., Saransaari, P., Albrecht, J. (2005). Taurine prevents ammonia-induced accumulation of cyclic GMP in rat striatum by interaction with GABAA and glycine receptors. *Brain Res*, 1043(1-2), 242-246
- 108** Hilgier, W., Olson, J. E. (1994). Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 62(1), 197-204
- 109** Hong, L., Fast, W. (2007). Inhibition of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 by S-nitroso-L-homocysteine and hydrogen peroxide. Analysis, quantification, and implications for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem*, 282(48), 34684-34692
- 110** Hosokawa, H., Ninomiya, H., Sawamura, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Fujiwara, K., Masaki, T. (1999). Neuron-specific expression of cationic amino acid transporter 3 in the adult rat brain. *Brain Res*, 838(1-2), 158-165
- 111** Hosoya, K., Ichikawa, T., Akanuma, S., Hirose, S., Tachikawa, M. (2010). Glycine and L-arginine transport in cultured Muller glial cells (TR-MUL). *Neurochem Int*, 57(3), 262-268
- 112** Hu, W. W., Chen, Z. (2012). Role of histamine and its receptors in cerebral ischemia. *ACS Chem Neurosci*, 3(4), 238-247
- 113** Huang, H. C., Chang, C. C., Wang, S. S., Chan, C. Y., Lee, F. Y., Chuang, C. L. i wsp., Lee, S. D. (2012). Pravastatin for thioacetamide-induced hepatic failure and encephalopathy. *Eur J Clin Invest*, 42(2), 139-145
- 114** Huang, H. C., Wang, S. S., Chan, C. Y., Chen, Y. C., Lee, F. Y., Chang, F. Y. i wsp., Lee, S. D. (2007). Role of hepatic nitric oxide synthases in rats with thioacetamide-induced acute liver failure and encephalopathy. *J Chin Med Assoc*, 70(1), 16-23
- 115** Huang, H. C., Wang, S. S., Lee, F. Y., Chan, C. Y., Chang, F. Y., Lin, H. C. i wsp., Lee, S. D. (2008). Simvastatin for rats with thioacetamide-induced liver failure and encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol*, 23(7 Pt 2), e236-242
- 116** Huang, L. T., Chen, C. C., Sheen, J. M., Chen, Y. J., Hsieh, C. S., Tain, Y. L. (2010). The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci*, 28(2), 169-174
- 117** Hung, T. H., Lay, C. J., Chang, C. M., Tsai, J. J., Tsai, C. C. (2013). The effect of infections on the mortality of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Epidemiol Infect*, 141(12), 2671-2678
- 118** Iversen, P., Sorensen, M., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., Vafaei, M. S., Borghammer, P. i wsp., Keiding, S. (2009). Low cerebral oxygen consumption and blood flow in patients with cirrhosis and an acute episode of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 136(3), 863-871
- 119** Jackson, M. J., Zielke, H. R., Zielke, C. L. (1996). Induction of astrocyte argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase by dibutyl cyclic AMP and dexamethasone. *Neurochem Res*, 21(10), 1161-1165
- 120** Jalan, R., Olde Damink, S. W., Hayes, P. C., Deutz, N. E., Lee, A. (2004). Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol*, 41(4), 613-620
- 121** Jayakumar, A. R., Murthy Ch, R., Norenberg, M. D. (2006a). Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci*, 26(18), 4774-4784
- 122** Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V., Norenberg, M. D. (2015). Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J Clin Exp Hepatol*, 5(Suppl 1), S21-28
- 123** Jayakumar, A. R., Rao, K. V., Murthy Ch, R., Norenberg, M. D. (2006b). Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int*, 48(6-7), 623-628

- 124** Jayakumar, A. R., Tong, X. Y., Ospel, J., Norenberg, M. D. (2012). Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. *Neuroscience*, *218*, 305-316
- 125** Jiang, J. L., Zhang, X. H., Li, N. S., Rang, W. Q., Feng, Y., Hu, C. P. i wsp., Deng, H. W. (2006). Probucof decreases asymmetrical dimethylarginine level by alternation of protein arginine methyltransferase I and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity. *Cardiovasc Drugs Ther*, *20*(4), 281-294
- 126** Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R. F. (2009). Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab*, *29*(5), 944-952
- 127** Juric, D. M., Krzan, M., Lipnik-Stangelj, M. (2016). Histamine and astrocyte function. *Pharmacol Res*, *111*, 774-783
- 128** Kamada, Y., Nagaretani, H., Tamura, S., Ohama, T., Maruyama, T., Hiraoka, H. i wsp., Matsuzawa, Y. (2001). Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest*, *108*(5), 717-724
- 129** Kayanoki, Y., Kawata, S., Yamasaki, E., Kiso, S., Inoue, S., Tamura, S. i wsp., Matsuzawa, Y. (1999). Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation. *Metabolism*, *48*(9), 1136-1140
- 130** Kilpatrick, I. C. (1991). *Rapid, automated HPLC analysis of neuroactive and other amino acids in microdissected brain regions and brain slice superfusates using fluorimetric detection* London: Harwood Academic.
- 131** Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M., Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*, *352*(6337), 725-728
- 132** Kittel, A., Maas, R., Konig, J., Mieth, M., Weiss, N., Jarzebska, N. i wsp., Rodionov, R. N. (2013). In vivo evidence that Agxt2 can regulate plasma levels of dimethylarginines in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *430*(1), 84-89
- 133** Knipp, M., Braun, O., Gehrig, P. M., Sack, R., Vasak, M. (2003). Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation. *J Biol Chem*, *278*(5), 3410-3416
- 134** Knipp, M., Charnock, J. M., Garner, C. D., Vasak, M. (2001). Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *J Biol Chem*, *276*(44), 40449-40456
- 135** Koblihova, E., Mrazova, I., Vernerova, Z., Ryska, M. (2014). Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol Res*, *63*(4), 491-503
- 136** Koepsell, H., Lips, K., Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, *24*(7), 1227-1251
- 137** Kosenko, E., Kaminsky, Y., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C., Felipo, V. (1997). Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res*, *27*(6), 637-644
- 138** Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C., Felipo, V. (2003). Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res*, *981*(1-2), 193-200
- 139** Kristiansen, R. G., Rose, C. F., Fuskevag, O. M., Maehre, H., Revhaug, A., Jalan, R., Ytrebo, L. M. (2014). L-Ornithine phenylacetate reduces ammonia in pigs with acute liver failure through phenylacetyl-glycine formation: a novel ammonia-lowering pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *307*(10), G1024-1031
- 140** Kruczek, C., Gorg, B., Keitel, V., Bidmon, H. J., Schliess, F., Haussinger, D. (2011). Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem*, *392*(12), 1155-1165

- 141** Kruczek, C., Gorg, B., Keitel, V., Pirev, E., Kroncke, K. D., Schliess, F., Haussinger, D. (2009). Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*, 57(1), 79-92
- 142** Kwasny-Krochin, B., Gluszko, P., Undas, A. (2012). Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation. *Pol Arch Med Wewn*, 122(6), 270-276
- 143** Laleman, W., Omasta, A., Van de Casteele, M., Zeegers, M., Vander Elst, I., Van Landeghem, L. i wsp., Nevens, F. (2005). A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology*, 42(6), 1382-1390
- 144** Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J. K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 97(12), 1129-1135
- 145** Lee, Y. T., Hsu, C. C., Lin, M. H., Liu, K. S., Yin, M. C. (2005). Histidine and carnosine delay diabetic, deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol*, 513(1-2), 145-150
- 146** Leiper, J., Murray-Rust, J., McDonald, N., Vallance, P. (2002). S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13527-13532
- 147** Leiper, J., Nandi, M., Torondel, B., Murray-Rust, J., Malaki, M., O'Hara, B. i wsp., Vallance, P. (2007). Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med*, 13(2), 198-203
- 148** Leiper, J., Vallance, P. (1999). Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 43(3), 542-548
- 149** Li, J., Wilson, A., Gao, X., Kuruba, R., Liu, Y., Poloyac, S. i wsp., Li, S. (2009). Coordinated regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and cationic amino acid transporter-1 by farnesoid X receptor in mouse liver and kidney and its implication in the control of blood levels of asymmetric dimethylarginine. *J Pharmacol Exp Ther*, 331(1), 234-243
- 150** Liu, W. H., Liu, T. C., Yin, M. C. (2008). Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1503-1509
- 151** Liu, X., Hou, L., Xu, D., Chen, A., Yang, L., Zhuang, Y. i wsp., Chen, Y. (2016). Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development. *Nitric Oxide*, 54, 73-81
- 152** Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408
- 153** Llansola, M., Montoliu, C., Cauli, O., Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A. i wsp., Felipo, V. (2013). Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metab Brain Dis*, 28(2), 151-154
- 154** Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O. i wsp., Felipo, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 22(3-4), 321-335
- 155** Lluch, P., Torondel, B., Medina, P., Segarra, G., Del Olmo, J. A., Serra, M. A., Rodrigo, J. M. (2004). Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*, 41(1), 55-59
- 156** Lockwood, A. H. (2004). Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 19(3-4), 345-349
- 157** Lozeva-Thomas, V., Ahonen, P., Chatauret, N., Tuomisto, L., Butterworth, R. F. (2004). Brain histamine in experimental acute liver failure: effects of L-histidine loading. *Inflamm Res*, 53 Suppl 1, S55-56

- 158** Lozeva, V., Montgomery, J. A., Tuomisto, L., Rocheleau, B., Pannunzio, M., Huet, P. M., Butterworth, R. F. (2004). Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol*, 40(5), 742-748
- 159** MacLeod, C. L. (1996). Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression. *Biochem Soc Trans*, 24(3), 846-852
- 160** MacLeod, C. L., Finley, K. D., Kakuda, D. K. (1994). $\gamma(+)$ -type cationic amino acid transport: expression and regulation of the mCAT genes. *J Exp Biol*, 196, 109-121
- 161** Madhusoodanan, K. S., Murad, F. (2007). NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochem Res*, 32(4-5), 681-694
- 162** Marchesini, G., Fabbri, A., Bianchi, G., Brizi, M., Zoli, M. (1996). Zinc supplementation and amino acid-nitrogen metabolism in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology*, 23(5), 1084-1092
- 163** Martens-Lobenhoffer, J., Rodionov, R. N., Bode-Boger, S. M. (2012). Probing AGXT2 enzyme activity in mouse tissue by applying stable isotope-labeled asymmetric dimethyl arginine as substrate. *J Mass Spectrom*, 47(12), 1594-1600
- 164** Master, S., Gottstein, J., Blei, A. T. (1999). Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*, 30(4), 876-880
- 165** McBride, A. E., Silver, P. A. (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, 106(1), 5-8
- 166** McGirt, M. J., Lynch, J. R., Parra, A., Sheng, H., Pearlstein, R. D., Laskowitz, D. T. i wsp., Warner, D. S. (2002). Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 33(12), 2950-2956
- 167** Mehmetcik, G., Ozdemirler, G., Kocak-Toker, N., Cevikbas, U., Uysal, M. (2008). Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptides*, 29(3), 425-429
- 168** Michalak, A., Rose, C., Butterworth, R. F. (2001). Loss of noradrenaline transporter sites in frontal cortex of rats with acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int*, 38(1), 25-30
- 169** Milewski, K., Hilgier, W., Fresko, I., Polowy, R., Podsiadlowska, A., Zolocinska, E. i wsp., Zielinska, M. (2016). Carnosine Reduces Oxidative Stress and Reverses Attenuation of Righting and Postural Reflexes in Rats with Thioacetamide-Induced Liver Failure. *Neurochem Res*, 41(1-2), 376-384
- 170** Milewski, K., Oria, M. (2015). What we know: the inflammatory basis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*
- 171** Mohammed, N. A., Abd El-Aleem, S., Appleton, I., Maklouf, M. M., Said, M., McMahon, R. F. (2003). Expression of nitric oxide synthase isoforms in human liver cirrhosis. *J Pathol*, 200(5), 647-655
- 172** Mondal, P., Trigun, S. K. (2015). Bacopa monnieri Extract (CDRI-08) Modulates the NMDA Receptor Subunits and nNOS-Apoptosis Axis in Cerebellum of Hepatic Encephalopathy Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 535013
- 173** Mookerjee, R. P., Dalton, R. N., Davies, N. A., Hodges, S. J., Turner, C., Williams, R., Jalan, R. (2007a). Inflammation is an important determinant of levels of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) in acute liver failure. *Liver Transpl*, 13(3), 400-405
- 174** Mookerjee, R. P., Malaki, M., Davies, N. A., Hodges, S. J., Dalton, R. N., Turner, C. i wsp., Jalan, R. (2007b). Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 45(1), 62-71

- 175** Mookerjee, R. P., Mehta, G., Balasubramaniyan, V., Mohamed Fel, Z., Davies, N., Sharma, V.i
wsp.,Jalan, R. (2015). Hepatic dimethylarginine-dimethylaminohydrolase1 is reduced in
cirrhosis and is a target for therapy in portal hypertension. *J Hepatol*, 62(2), 325-331
- 176** 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(3), 850-854
- 177** Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., David, M. (2001).
Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*,
104(5), 731-741
- 178** Murthy, C. R., Rama Rao, K. V., Bai, G., Norenberg, M. D. (2001). Ammonia-induced
production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*, 66(2),
282-288
- 179** Nagy, I., Floyd, R. A. (1984). Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins
studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. *Biochim Biophys
Acta*, 790(3), 238-250
- 180** Nauser, T., Koppenol, W. H. (2002). The rate constant of the reaction of superoxide with
nitrogen monoxide: Approaching the diffusion limit. *Journal of Physical Chemistry A*,
106(16), 4084-4086
- 181** Negru, T., Ghiea, V., Pasarica, D. (1999). Oxidative injury and other metabolic disorders in
hepatic encephalopathy. *Rom J Physiol*, 36(1-2), 29-36
- 182** Neuman, M. G., French, S. W., Casey, C. A., Kharbanda, K. K., Nanau, R. M., Rasineni, K.i
wsp.,Donohue, T. M., Jr. (2013). Changes in the pathogenesis of alcohol-induced liver
disease -- preclinical studies. *Exp Mol Pathol*, 95(3), 376-384
- 183** Nicholson, B., Manner, C. K., MacLeod, C. L. (2002). Cat2 L-arginine transporter-deficient
fibroblasts can sustain nitric oxide production. *Nitric Oxide*, 7(4), 236-243
- 184** Nicoletti, V. G., Santoro, A. M., Grasso, G., Vagliasindi, L. I., Giuffrida, M. L., Cuppari, C.i
wsp.,Rizzarelli, E. (2007). Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell
protection. *J Neurosci Res*, 85(10), 2239-2245
- 185** Nijveldt, R. J., Teerlink, T., Siroen, M. P., van der Hoven, B., Prins, H. A., Wiezer, M. J.i
wsp.,van Leeuwen, P. A. (2004). Elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in
patients developing hepatic failure after major hepatectomy. *JPEN J Parenter Enteral
Nutr*, 28(6), 382-387
- 186** Norenberg, M. D., Huo, Z., Neary, J. T., Roig-Cantesano, A. (1997). The glial glutamate
transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy
metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia*, 21(1), 124-133
- 187** Norenberg, M. D., Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R. (2004). Ammonia neurotoxicity and the
mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr*, 36(4), 303-307
- 188** 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. *Biochimica Et Biophysica Acta-General
Subjects*, 1568(2), 171-175
- 189** Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., Oliven, A. (2005). Relationship between tumor necrosis factor-
alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure.
Ann Med, 37(8), 603-612
- 190** Onozato, M. L., Tojo, A., Leiper, J., Fujita, T., Palm, F., Wilcox, C. S. (2008). Expression of
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase and protein arginine N-
methyltransferase isoforms in diabetic rat kidney: effects of angiotensin II receptor
blockers. *Diabetes*, 57(1), 172-180
- 191** Oppong, K. N., Bartlett, K., Record, C. O., al Mardini, H. (1995). Synaptosomal glutamate
transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology*,
22(2), 553-558

- 192 Pairet, M., Engelhardt, G. (1996). Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol*, 10(1), 1-17
- 193 Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z., Wilcox, C. S. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(6), H3227-3245
- 194 Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-526
- 195 Parekh, P. J., Balart, L. A. (2015). Ammonia and Its Role in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis*, 19(3), 529-537
- 196 Park, H. S., Han, K. H., Shin, J. A., Park, J. H., Song, K. Y., Kim, D. H. (2014). The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc*, 55(3), 125-130
- 197 Passani, M. B., Panula, P., Lin, J. S. (2014). Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*, 8, 64
- 198 Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Shimojo, N. (2000). Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 742(1), 199-203
- 199 Pichili, V. B., Rao, K. V., Jayakumar, A. R., Norenberg, M. D. (2007). Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia*, 55(8), 801-809
- 200 Pope, A. J., Karrupiah, K., Kearns, P. N., Xia, Y., Cardounel, A. J. (2009a). Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem*, 284(51), 35338-35347
- 201 Pope, A. J., Karupiah, K., Cardounel, A. J. (2009b). Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res*, 60(6), 461-465
- 202 Porcelli, V., Longo, A., Palmieri, L., Closs, E. I., Palmieri, F. (2016). Asymmetric dimethylarginine is transported by the mitochondrial carrier SLC25A2. *Amino Acids*, 48(2), 427-436
- 203 Portal, A. J., Austin, M., Heneghan, M. A. (2007). Novel approaches to assessing renal function in cirrhotic liver disease. *Hepatol Res*, 37(9), 667-672
- 204 Prakash, R., Mullen, K. D. (2010). Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(9), 515-525
- 205 Pretnar-Oblak, J. (2014). Cerebral endothelial function determined by cerebrovascular reactivity to L-arginine. *Biomed Res Int*, 2014, 601515
- 206 Rama Rao, K. V., Reddy, P. V., Hazell, A. S., Norenberg, M. D. (2007). Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. *Neurotoxicology*, 28(4), 807-812
- 207 Rama Rao, K. V., Reddy, P. V., Tong, X., Norenberg, M. D. (2010). Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol*, 176(3), 1400-1408
- 208 Rao, V. L., Audet, R. M., Butterworth, R. F. (1995). Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem*, 65(2), 677-678
- 209 Rao, V. L., Audet, R. M., Butterworth, R. F. (1997a). Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res*, 765(1), 169-172
- 210 Rao, V. L., Audet, R. M., Butterworth, R. F. (1997b). Portacaval shunting and hyperammonemia stimulate the uptake of L-[3H] arginine but not of L-[3H]nitroarginine into rat brain synaptosomes. *J Neurochem*, 68(1), 337-343
- 211 Raptis, V., Kapoulas, S., Grekas, D. (2013). Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease. *Nephrology (Carlton)*, 18(1), 11-21
- 212 Rivera-Mancia, S., Rios, C., Montes, S. (2011). Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *Biometals*, 24(5), 811-825

- 213** Rodionov, R. N., Murry, D. J., Vaulman, S. F., Stevens, J. W., Lentz, S. R. (2010). Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. *J Biol Chem*, 285(8), 5385-5391
- 214** Rodrigo, R., Erceg, S., Felipo, V. (2005a). Neurons exposed to ammonia reproduce the differential alteration in nitric oxide modulation of guanylate cyclase in the cerebellum and cortex of patients with liver cirrhosis. *Neurobiol Dis*, 19(1-2), 150-161
- 215** Rodrigo, R., Felipo, V. (2006). Brain regional alterations in the modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in liver cirrhosis. Role of hyperammonemia and cell types involved. *Neurochem Int*, 48(6-7), 472-477
- 216** Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compan, A., Saez-Valero, J., Erceg, S., Felipo, V. (2005b). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*, 130(2), 435-443
- 217** Romero-Gomez, M., Jover, M., Del Campo, J. A., Royo, J. L., Hoyas, E., Galan, J. J. i wsp., 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(5), 281-288
- 218** Rose, C. (2002). Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metab Brain Dis*, 17(4), 251-261
- 219** Rose, C. (2006). Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J Neurochem*, 97 Suppl 1, 11-15
- 220** Rotmann, A., Simon, A., Martine, U., Habermeier, A., Closs, E. I. (2007). Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y^{+L}. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(6), C2259-2268
- 221** Ruskiewicz, J., Albrecht, J. (2015a). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochem Int*, 88, 66-72
- 222** Ruskiewicz, J., Albrecht, J. (2015b). Changes of the thioredoxin system, glutathione peroxidase activity and total antioxidant capacity in rat brain cortex during acute liver failure: modulation by L-histidine. *Neurochem Res*, 40(2), 293-300
- 223** Ruskiewicz, J., Fresko, I., Hilgier, W., Albrecht, J. (2013). Decrease of glutathione content in the prefrontal cortical mitochondria of rats with acute hepatic encephalopathy: prevention by histidine. *Metab Brain Dis*, 28(1), 11-14
- 224** Saha, R. N., Pahan, K. (2006). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*, 8(5-6), 929-947
- 225** Sathyaikumar, K. V., Swapna, I., Reddy, P. V., Murthy Ch, R., 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(3), 517-524
- 226** Schapira, M., Ferreira de Freitas, R. (2014). Structural biology and chemistry of protein arginine methyltransferases. *Medchemcomm*, 5(12), 1779-1788
- 227** Schiodt, F. V., Atillasoy, E., Shakil, A. O., Schiff, E. R., Caldwell, C., Kowdley, K. V. i wsp., Lee, W. M. (1999). Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl Surg*, 5(1), 29-34
- 228** Schliess, F., Gorg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H. J., Herrmann, A. i wsp., Haussinger, D. (2002). Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J*, 16(7), 739-741
- 229** Schmidlin, A., Wiesinger, H. (1994). Transport of L-arginine in cultured glial cells. *Glia*, 11(3), 262-268
- 230** Schneider, F., Lutun, P., Boudjema, K., Wolf, P., Tempe, J. D. (1994). In vivo evidence of enhanced guanylyl cyclase activation during the hyperdynamic circulation of acute liver failure. *Hepatology*, 19(1), 38-44

- 231** Segarra, G., Medina, P., Ballester, R. M., Lluch, P., Aldasoro, M., Vila, J. M. i wsp., Pelligrino, D. A. (1999). Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke*, 30(10), 2206-2210; discussion 2210-2211
- 232** Severina, I. S., Bussygina, O. G., Pyatakova, N. V. (2000). Carnosine as a regulator of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry (Mosc)*, 65(7), 783-788
- 233** Sharma, S., Smith, A., Kumar, S., Aggarwal, S., Rehmani, I., Snead, C. i wsp., Black, S. M. (2010). Mechanisms of nitric oxide synthase uncoupling in endotoxin-induced acute lung injury: role of asymmetric dimethylarginine. *Vascul Pharmacol*, 52(5-6), 182-190
- 234** Sharma, V., Ten Have, G. A., Ytrebo, L., Sen, S., Rose, C. F., Dalton, R. N. i wsp., Davies, N. A. (2012). Nitric oxide and L-arginine metabolism in a devascularized porcine model of acute liver failure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303(3), G435-441
- 235** Shawcross, D. L., Sharifi, Y., Canavan, J. B., Yeoman, A. D., Abeles, R. D., Taylor, N. J. i wsp., Wendon, J. A. (2011). Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *J Hepatol*, 54(4), 640-649
- 236** Sheen, J. M., Chen, Y. C., Hsu, M. H., Tain, Y. L., Yu, H. R., Huang, L. T. (2016). Combined Intraperitoneal and Intrathecal Etanercept Reduce Increased Brain Tumor Necrosis Factor-Alpha and Asymmetric Dimethylarginine Levels and Rescues Spatial Deficits in Young Rats after Bile Duct Ligation. *Front Cell Neurosci*, 10, 167
- 237** Sheen, J. M., Chen, Y. C., Tain, Y. L., Huang, L. T. (2014). Increased circulatory asymmetric dimethylarginine and multiple organ failure: bile duct ligation in rat as a model. *Int J Mol Sci*, 15(3), 3989-4006
- 238** Sheen, J. M., Huang, L. T., Hsieh, C. S., Chen, C. C., Wang, J. Y., Tain, Y. L. (2010). Bile duct ligation in developing rats: temporal progression of liver, kidney, and brain damage. *J Pediatr Surg*, 45(8), 1650-1658
- 239** Shin, S., Mohan, S., Fung, H. L. (2011). Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the "L-arginine paradox". *Biochem Biophys Res Commun*, 414(4), 660-663
- 240** Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D., Boger, R. H. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*, 6(2), 82-90
- 241** Siroen, M. P., Wiest, R., Richir, M. C., Teerlink, T., Rauwerda, J. A., Drescher, F. T. i wsp., van Leeuwen, P. A. (2008). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt-placement increases arginine/asymmetric dimethylarginine ratio in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*, 14(47), 7214-7219
- 242** Skowrońska, M., Albrecht, J. (2013). Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochem Int*, 62(5), 731-737
- 243** 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(4), 1068-1076
- 244** Skowrońska, M., Zielinska, M., Wojcik-Stanaszek, L., Ruskiewicz, J., Milatovic, D., Aschner, M., Albrecht, J. (2012a). Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem*, 121(1), 125-134
- 245** Skowrońska, M., Zielińska, M., Wójcik-Stanaszek, L., Ruskiewicz, J., Milatovic, D., Aschner, M., Albrecht, J. (2012b). Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem*, 121(1), 125-134
- 246** Sobrevia, L., Gonzalez, M. (2009). A role for insulin on L-arginine transport in fetal endothelial dysfunction in hyperglycaemia. *Curr Vasc Pharmacol*, 7(4), 467-474

- 247 Song, B. C., Joo, N. S., Aldini, G., Yeum, K. J. (2014). Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome. *Nutr Res Pract*, 8(1), 3-10
- 248 Stifel, F. B., Herman, R. H. (1971). Histidine metabolism. *Am J Clin Nutr*, 24(2), 207-217
- 249 Stoll, J., Wadhvani, K. C., Smith, Q. R. (1993). Identification of the cationic amino acid transporter (System y+) of the rat blood-brain barrier. *J Neurochem*, 60(5), 1956-1959
- 250 Streetz, K., Leifeld, L., Grundmann, D., Ramakers, J., Eckert, K., Spengler, U. i. wsp., Trautwein, C. (2000). Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*, 119(2), 446-460
- 251 Strobel, J., Mieth, M., Endress, B., Auge, D., Konig, J., Fromm, M. F., Maas, R. (2012). Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter 1 (CAT1). *J Mol Cell Cardiol*, 53(3), 392-400
- 252 Strobel, J., Muller, F., Zolk, O., Endress, B., Konig, J., Fromm, M. F., Maas, R. (2013). Transport of asymmetric dimethylarginine (ADMA) by cationic amino acid transporter 2 (CAT2), organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1). *Amino Acids*, 45(4), 989-1002
- 253 Stuhlinger, M. C., Conci, E., Haubner, B. J., Stocker, E. M., Schwaighofer, J., Cooke, J. P. i. wsp., Metzler, B. (2007). Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 75(2), 417-425
- 254 Suarez, I., Bodega, G., Arilla, E., Felipo, V., Fernandez, B. (2006). The expression of nNOS, iNOS and nitrotyrosine is increased in the rat cerebral cortex in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32(6), 594-604
- 255 Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., Fernandez, B. (2009). Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 24(3), 395-408
- 256 Sud, N., Wells, S. M., Sharma, S., Wiseman, D. A., Wilham, J., Black, S. M. (2008). Asymmetric dimethylarginine inhibits HSP90 activity in pulmonary arterial endothelial cells: role of mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(6), C1407-1418
- 257 Suraweera, D., Sundaram, V., Saab, S. (2016). Evaluation and Management of Hepatic Encephalopathy: Current Status and Future Directions. *Gut and Liver*, 10(4), 509-519
- 258 Swamy, M., Zakaria, A. Z., Govindasamy, C., Sirajudeen, K. N., Nadiger, H. A. (2005). Effects of acute ammonia toxicity on nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, arginase and related metabolites in different regions of rat brain. *Neurosci Res*, 53(2), 116-122
- 259 Swapna, I., Sathya Sai Kumar, K. V., Murthy Ch, R., Senthilkumaran, B. (2006). Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during acute ammonia intoxication. *Neurotoxicology*, 27(3), 402-408
- 260 Sydow, K., Munzel, T. (2003). ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl*, 4(4), 41-51
- 261 Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 140-141, 105-112
- 262 Tain, Y. L., Baylis, C. (2007). Determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in the kidney. *Kidney Int*, 72(7), 886-889
- 263 Tain, Y. L., Hsieh, C. S., Chen, C. C., Sheen, J. M., Lee, C. T., Huang, L. T. (2010a). Melatonin prevents increased asymmetric dimethylarginine in young rats with bile duct ligation. *J Pineal Res*, 48(3), 212-221
- 264 Tain, Y. L., Kao, Y. H., Hsieh, C. S., Chen, C. C., Sheen, J. M., Lin, I. C., Huang, L. T. (2010b). Melatonin blocks oxidative stress-induced increased asymmetric dimethylarginine. *Free Radic Biol Med*, 49(6), 1088-1098
- 265 Takahashi, H., Koehler, R. C., Brusilow, S. W., Traystman, R. J. (1991). Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol*, 261(3 Pt 2), H825-829
- 266 Takahashi, S., Nakashima, Y., Toda, K. (2009). Carnosine facilitates nitric oxide production in endothelial f-2 cells. *Biol Pharm Bull*, 32(11), 1836-1839

- 267 Tan, B., Jiang, D. J., Huang, H., Jia, S. J., Jiang, J. L., Hu, C. P., Li, Y. J. (2007). Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. *Vascul Pharmacol*, 46(5), 338-345
- 268 Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E. i wsp., de Leon, M. J. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 11(8), 457-470
- 269 Teerlink, T. (2005). ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med*, 10 Suppl 1, S73-81
- 270 Teerlink, T., Luo, Z., Palm, F., Wilcox, C. S. (2009). Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res*, 60(6), 448-460
- 271 Toris, G. T., Bikis, C. N., Tsourouflis, G. S., Theocharis, S. E. (2011). Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med Sci Monit*, 17(2), RA53-63
- 272 Totsuka, O., Takeyoshi, I., Tsutsumi, H., Hashimoto, N., Sunose, Y., Tokumine, M. i wsp., Morishita, Y. (2004). The effects of a bradykinin B2 receptor antagonist in extended liver resection with ischemia in dogs. *Hepatogastroenterology*, 51(60), 1771-1775
- 273 Tousoulis, D., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Siasos, G., Latsios, G., Tentolouris, K., Stefanadis, C. (2013). Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol*, 62(8), 667-676
- 274 Tran, C. T., Fox, M. F., Vallance, P., Leiper, J. M. (2000). Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics*, 68(1), 101-105
- 275 Tsikas, D., Boger, R. H., Sandmann, J., Bode-Boger, S. M., Frolich, J. C. (2000). Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett*, 478(1-2), 1-3
- 276 Tunon, M. J., Sanchez-Campos, S., Garcia-Ferreras, J., Alvarez, M., Jorquera, F., Gonzalez-Gallego, J. (2003). Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med*, 141(4), 272-278
- 277 Vallance, P., Leiper, J. (2004). Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(6), 1023-1030
- 278 Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. (1992a). Accumulation of an Endogenous Inhibitor of Nitric-Oxide Synthase in Chronic-Renal-Failure. *Lancet*, 339(8793), 572-575
- 279 Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S. (1992b). Endogenous Dimethylarginine as an Inhibitor of Nitric-Oxide Synthase. *J Cardiovasc Pharmacol*, 20, S60-S62
- 280 Vallee, B. L., Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73(1), 79-118
- 281 Verbeke, L., Farre, R., Trebicka, J., Komuta, M., Roskams, T., Klein, S. i wsp., Laleman, W. (2014). Obeticholic acid, a farnesoid X receptor agonist, improves portal hypertension by two distinct pathways in cirrhotic rats. *Hepatology*, 59(6), 2286-2298
- 282 Verrey, F., Closs, E. I., Wagner, C. A., Palacin, M., Endou, H., Kanai, Y. (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch*, 447(5), 532-542
- 283 Villanueva, C., Giulivi, C. (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*, 49(3), 307-316
- 284 Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D. i wsp., Wong, P. (2014). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*, 60(2), 715-735
- 285 Vizzutti, F., Romanelli, R. G., Arena, U., Rega, L., Brogi, M., Calabresi, C. i wsp., Pinzani, M. (2007). ADMA correlates with portal pressure in patients with compensated cirrhosis. *Eur J Clin Invest*, 37(6), 509-515

- 286** Wallace, M. C., Hamesch, K., Lunova, M., Kim, Y., Weiskirchen, R., Strnad, P., Friedman, S. L. (2015). Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Lab Anim*, 49(1 Suppl), 21-29
- 287** Wang, J., Sim, A. S., Wang, X. L., Wilcken, D. E. (2006). L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. *Cell Mol Life Sci*, 63(23), 2838-2846
- 288** Wasmuth, H. E., Kunz, D., Yagmur, E., Timmer-Stranghoner, A., Vidacek, D., Siewert, E.i wsp.,Lammert, F. (2005). Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol*, 42(2), 195-201
- 289** Watson, C. P., Pazarentzos, E., Fidanboyllu, M., Padilla, B., Brown, R., Thomas, S. A. (2016). The transporter and permeability interactions of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine with the human blood-brain barrier in vitro. *Brain Res*, 1648(Pt A), 232-242
- 290** Wendon, J. A., Harrison, P. M., Keays, R., Williams, R. (1994). Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. *Hepatology*, 19(6), 1407-1413
- 291** Westergaard, N., Beart, P. M., Schousboe, A. (1993). Transport of L-[3H]arginine in cultured neurons: characteristics and inhibition by nitric oxide synthase inhibitors. *J Neurochem*, 61(1), 364-367
- 292** Wiesinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 64(4), 365-391
- 293** Wright, G. A., Sharifi, Y., Newman, T. A., Davies, N., Vairappan, B., Perry, H. V., Jalan, R. (2014). Characterisation of temporal microglia and astrocyte immune responses in bile duct-ligated rat models of cirrhosis. *Liver Int*, 34(8), 1184-1191
- 294** Wu, G., Bazer, F. W., Davis, T. A., Kim, S. W., Li, P., Marc Rhoads, J.i wsp.,Yin, Y. (2009). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37(1), 153-168
- 295** Wu, G., Morris, S. M., Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 336 (Pt 1), 1-17
- 296** Xiang, J. M., Fowkes, R. L., Keep, R. F. (1998). Choroid plexus histidine transport. *Brain Res*, 783(1), 37-43
- 297** Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M. C., Aldaz, C. M., Bedford, M. T. (2003). Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6464-6468
- 298** Yakuji, G. (1981). Analysis of L-histidine acute toxicity in rodent. *Pharmaceuticals Monthly*, 23, 1253
- 299** Yamada, M., Huang, Z., Dalkara, T., Endres, M., Laufs, U., Waeber, C.i wsp.,Moskowitz, M. A. (2000). Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20(4), 709-717
- 300** Yamakami, J., Sakurai, E., Sakurada, T., Maeda, K., Hikichi, N. (1998). Stereoselective blood-brain barrier transport of histidine in rats. *Brain Res*, 812(1-2), 105-112
- 301** Yan, L., Yan, C., Qian, K., Su, H., Kofsky-Wofford, S. A., Lee, W. C.i wsp.,Zheng, Y. G. (2014). Diamidine compounds for selective inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J Med Chem*, 57(6), 2611-2622
- 302** Yang, S. S., Lai, Y. C., Chiang, T. R., Chen, D. F., Chen, D. S. (2004). Role of zinc in subclinical hepatic encephalopathy: comparison with somatosensory-evoked potentials. *J Gastroenterol Hepatol*, 19(4), 375-379
- 303** Yang, Y. Y., Lee, T. Y., Huang, Y. T., Chan, C. C., Yeh, Y. C., Lee, F. Y.i wsp.,Lin, H. C. (2012). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) determines the improvement of hepatic endothelial dysfunction by vitamin E in cirrhotic rats. *Liver Int*, 32(1), 48-57

- 304** Yoshida, Y., Higashi, T., Nouso, K., Nakatsukasa, H., Nakamura, S. I., Watanabe, A., Tsuji, T. (2001). Effects of zinc deficiency/zinc supplementation on ammonia metabolism in patients with decompensated liver cirrhosis. *Acta Med Okayama*, 55(6), 349-355
- 305** Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, 9, 322
- 306** Zaloga, G. P., Roberts, P. R., Black, K. W., Lin, M., Zapata-Sudo, G., Sudo, R. T., Nelson, T. E. (1997). Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am J Physiol*, 272(1 Pt 2), H462-468
- 307** Zeron, H. M., Rodriguez, M. R., Montes, S., Castaneda, C. R. (2011). Blood manganese levels in patients with hepatic encephalopathy. *J Trace Elem Med Biol*, 25(4), 225-229
- 308** Zhan, T., Stremmel, W. (2012). The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int*, 109(10), 180-187
- 309** Zhang, F., Chen, L., Liu, C., Qiu, P., Wang, A., Li, L., Wang, H. (2013). Up-regulation of protein tyrosine nitration in methamphetamine-induced neurotoxicity through DDAH/ADMA/NOS pathway. *Neurochem Int*, 62(8), 1055-1064
- 310** Zhang, Q., Yang, F., Li, X., Zhang, H. Y., Chu, X. G., Zhang, H. i wsp., Gong, Z. J. (2016). Trichostatin A protects against intestinal injury in rats with acute liver failure. *J Surg Res*, 205(1), 1-10
- 311** Zhang, X., Song, L., Cheng, X., Yang, Y., Luan, B., Jia, L. i wsp., Zhang, Z. (2011). Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model. *Eur J Pharmacol*, 667(1-3), 202-207
- 312** Zhao, B., Feng, L., Liu, Y., Kuang, S., Tang, L., Jiang, J. i wsp., Zhou, X. Q. (2012). Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 18(2), 220-232
- 313** Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardanani, A., Menendez, S. i wsp., Nimer, S. D. (2008). Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev*, 22(5), 640-653
- 314** Zheng, G., Zhang, L. J., Cao, Y., Pan, Z., Qi, R. F., Ni, L. i wsp., Lu, G. M. (2013). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt induced short- and long-term cerebral blood flow variations in cirrhotic patients: an arterial spin labeling MRI study. *Metab Brain Dis*, 28(3), 463-471
- 315** Zheng, G., Zhang, L. J., Wang, Z., Qi, R. F., Shi, D., Wang, L. i wsp., Lu, G. M. (2012). Changes in cerebral blood flow after transjugular intrahepatic portosystemic shunt can help predict the development of hepatic encephalopathy: an arterial spin labeling MR study. *Eur J Radiol*, 81(12), 3851-3856
- 316** Zielińska, M., Popek, M., Albrecht, J. (2014). Roles of changes in active glutamine transport in brain edema development during hepatic encephalopathy: an emerging concept. *Neurochem Res*, 39(3), 599-604
- 317** Zielińska, M., Ruszkiewicz, J., Hilgier, W., Fresko, I., Albrecht, J. (2011). Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter γ + LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway. *Neurochem Int*, 58(2), 190-195
- 318** Zielińska, M., Skowronska, M., Fresko, I., Albrecht, J. (2012). Upregulation of the heteromeric γ (+)LAT2 transporter contributes to ammonia-induced increase of arginine uptake in rat cerebral cortical astrocytes. *Neurochem Int*, 61(4), 531-535
- 319** Ziemska, E., Dolinska, M., Lazarewicz, J. W., Albrecht, J. (2000). Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology*, 21(3), 295-300