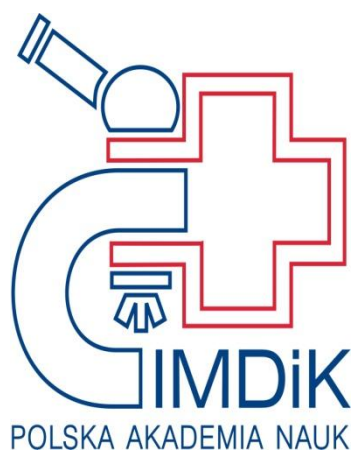


**mgr inż. Mariusz Popek**

**Udział transportera glutaminy SN1 w powstawaniu obrzęku mózgu  
i zaburzeń w neuroprzeżywalności glutamatergicznej: rola w zmianach  
obserwowanych w ostrej encefalopatii wątrobowej**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie: biologii medycznej**

**Promotor: dr hab. Magdalena Zielińska**



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN**

 Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

**KNO**

Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący  
2012-2017



**NARODOWE  
CENTRUM  
NAUKI**

**Warszawa 2018**



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

1. Popek M, Bobula B, Sowa J, Hess G, Polowy R, Filipkowski RK, Frontczak-Baniewicz M, Zabłocka B, Albrecht J, Zielińska M. Cortical Synaptic Transmission and Plasticity in Acute Liver Failure Are Decreased by Presynaptic Events. *Mol Neurobiol.* 2018 Feb;55(2):1244-1258.
2. Obara-Michlewska M, Ding F, Popek M, Verkhatsky A, Nedergaard M, Zielinska M, Albrecht J. Interstitial ion homeostasis and acid-base balance are maintained in oedematous brain of mice with acute toxic liver failure. *Neurochem Int.* 2018 May 14. pii: S0197-0186(18)30020-2.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane przez Krajowy Narodowy Ośrodek Wiodący (KNOW) a także Narodowe Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektów badawczych Pol-Nor/196190/26/2013 oraz Preludium 10, 2015/19/N/NZ5/02249.

Część doświadczeń była przeprowadzona we współpracy z:

- Środowiskowym Laboratorium Behawioralno-Metabolicznym IMDiK PAN;
- Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN;
- Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN;
- Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego Małych Zwierząt IMDiK PAN;
- Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie.



*Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Magdalenie Zielińskiej, za ciągłą motywację, bezcenne wskazówki, wyrozumiałość, stworzenie mi okazji do rozwoju i ludzką życzliwość.*

*Bezcenna była także pomoc innych członków zespołu, stanowiących Zakład Neurotoksykologii. Dziękuję:*

*Panu prof. dr hab. Janowi Albrechtowi za ogromną pomoc merytoryczną,  
Dr Wojciechowi Hilgierowi za wprowadzenie w świat mikrodializ i HPLC,  
Dr hab. Monice Szelidze za cenne rady metodologiczne,  
Dr Marcie Obarze-Michlewskiej za gotowość do pomocy o każdej porze dnia i nocy,  
Dr Krzysztofowi Milewskiemu za długie rozmowy,  
Dr Annie Czarneckiej za nowinki naukowe,  
Gosi Bogacińskiej-Karaś za życzliwość,  
Dorocie Rycko za dobre słowo,  
Inez Fręsko za wspólny śpiew i ogólną pomoc we wszystkim,  
Doktorantom (Ewelinie Majewskiej, Kasi Skowrońskiej, Kasi Dąbrowskiej,  
Karolinie Orzeł, Markowi Pawlikowi) za wspólną walkę o przetrwanie i wspaniałą atmosferę.*

*Za wiarę we mnie, wsparcie i motywację do działania dziękuję przyjaciołom i rodzinie.*

*Szczególne słowa podziękowania należą się Karolinie, która stanowi dla mnie wsparcie i robi wszystkie rzeczy wymienione wyżej, z tym że codziennie i bez przerwy.*

Mariusz



## Spis treści:

1. Wstęp.....	15
1.1.Encefalopatia wątrobowa – wiadomości ogólne.....	16
1.1.1. Charakterystyka kluczowych objawów klinicznych ostrej EW.....	18
1) Obrzęk mózgu.....	18
2) Zaburzenia neurotransmisji.....	19
1.1.2. Diagnostyka i leczenie ostrej EW.....	20
1.1.3. Modele ostrej EW.....	22
1.2.Patomechanizm EW.....	24
1.2.1. Udział stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz innych czynników w rozwoju ostrej EW.....	24
1.2.2. Rola amoniaku w patomechanizmie EW.....	27
1) Toksyczność amoniaku w OUN.....	27
2) Wpływ amoniaku na astrocyty.....	28
3) Wpływ amoniaku na komórki śródbłonna.....	31
4) Wpływ amoniaku na neurony.....	32
1.2.3. Patomechanizm objawów klinicznych ostrej EW.....	33
1) Mechanizm powstawania obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym w ostrej EW.....	33
2) Nierównowaga pomiędzy transmisją pobudzającą i hamującą w EW35.....	33
1.3.Cykl Glutamina-Glutaminian/GABA.....	37
1.4.Transport Glutaminy w OUN.....	40
1.4.1. Transportery Glutaminy.....	40
1.4.2. System N.....	40
2. Hipoteza i cele pracy.....	42
3. Materiały i metody.....	43
3.1.Modele badawcze.....	43
3.2.Metody.....	45
1) Enzymatyczne oznaczanie aktywności enzymów wątrobowych i amoniaku w surowicy.....	45
2) Pomiar stężenia wybranych cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$ i IL-6 w surowicy.....	45
3) Ocena aktywności ruchowej myszy.....	46
4) Ocena stanu neurologicznego.....	46
5) Badanie szczelności BBB.....	47
6) Analiza obrzęku przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego.....	47
7) Analiza stężeń metabolitów w mózgu z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu $^1\text{H}$ .....	49
8) Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	49
9) Izolacja RNA z kory czołowej myszy.....	50
10) Pomiar ekspresji wybranych genów.....	51
11) Przygotowanie próbek.....	51
12) Pomiar poziomu białek metodą Western Blot.....	51
13) Mikrodializa kory czołowej zwierząt swobodnie się poruszających.....	52
14) Oznaczenie stężenia aminokwasów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).....	53

15) Pomiary wybranych parametrów elektrofizjologicznych.....	53
16) Przygotowanie preparatów do mikroskopii konfokalnej.....	55
17) Badanie transportu L-[ <sup>3</sup> H]-glutaminy w skrawkach mózgowych.....	56
18) Analiza statystyczna wyników.....	57
4. Wyniki.....	58
4.1. Charakterystyka mysiego AOM modelu ostrej EW.....	58
4.1.1. Stężenie cytokin, amoniaku i aktywność enzymów wątrobowych w osoczu.....	58
4.1.2. Ocena aktywności ruchowej i stanu neurologicznego.....	59
4.2. Pomiary elektrofizjologiczne.....	61
4.2.1. Wpływ AOM na potencjały polowe (FP) i długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP).....	61
4.2.2. Wpływ AOM na pobudliwość błony neuronów piramidowych.....	62
4.2.3. Wpływ AOM na pobudzenie prądu postsynaptycznego (sEPSCs).....	64
4.3. Analiza obrzęku mózgu myszy AOM.....	66
4.3.1. Badanie szczelności bariery krew-mózg.....	66
4.3.2. Ultrastrukturalna ocena morfologiczna kory czołowej myszy AOM.....	66
4.3.3. Wyznaczenie pozornego współczynnika dyfuzji w korze czołowej myszy AOM metodą rezonansu magnetycznego.....	68
4.3.4. Pomiar stężeń metabolitów w korze czołowej myszy AOM metodą protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego.....	69
4.4. Analiza poziomu ekspresji i badanie funkcji transporterów układu N w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM.....	71
4.4.1. Analiza ekspresji transporterów SN1 i SN2 na poziomie mRNA i białka.....	71
4.4.2. Badanie aktywnego transportu [ <sup>3</sup> H]-glutaminy w skrawkach kory czołowej myszy kontrolnych i AOM.....	72
4.5. Pomiar poziomu białka SN1 po wyciszeniu techniką <i>vivo-morpholino</i> .....	74
4.5.1. Pomiar immunoreaktywności białka SN1.....	74
4.5.2. Mikroskopowa analiza białka SN1 po wyciszeniu techniką <i>vivo-morpholino</i> .....	75
4.6. Parametry elektrofizjologiczne we fragmencie kory czołowej z wyciszonym białkiem SN1.....	77
4.6.1. Wpływ wyciszenia SN1 na potencjały polowe (FP) i długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP).....	77
4.6.2. Wpływ wyciszenia białka SN1 na pobudliwość błony neuronów piramidowych.....	78
4.6.3. Wpływ wyciszenia białka SN1 na pobudzające prądy postsynaptyczne (sEPSCs).....	81
4.7. Wpływ wyciszenia białka SN1 na powstawanie obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym.....	86
4.7.1. Ultrastrukturalna ocena morfologiczna kory czołowej myszy po wyciszeniu białka SN1.....	86
4.7.2. Wyznaczenie pozornego współczynnika dyfuzji metodą rezonansu magnetycznego we fragmencie kory czołowej myszy z wyciszonym białkiem SN1.....	88



4.7.3. Pomiar stężeń metabolitów w korze czołowej myszy SN1 VM metodą protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego.....	89
4.7.4. Zewnątrzkomórkowe stężenie aminokwasów w mikrodializatach kory czołowej myszy SN1 VM.....	91
5. Dyskusja.....	92
6. Podsumowanie wyników i wnioski.....	109
7. Streszczenie/Abstract.....	111
8. Innowacyjność rozprawy doktorskiej.....	119
9. Wykaz tabel.....	120
10. Wykaz rycin.....	121
11. Bibliografia.....	124



## Wykaz skrótów:

- ACSF - sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *artificial cerebrospinal fluid*)
- ADC - pozorny współczynnik dyfuzji
- ALT - aminotransferaza alaninowa
- AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-isoxazolepropionian
- AOM - azoksymetan
- APAP - acetaminofen
- APQ-4 - akwaporyna 4
- AST - aminotransferaza asparaginianowa
- BBB - bariera krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*)
- BCA - kwas bis-cynchoninowy (ang. *bicinchoninic acid*)
- cGMP - cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
- CK-18 - cytokreatyna CK-18 (ang. *Caspase-cleaved cytokeratin 18*)
- CPP - ciśnienie perfuzyjne mózgu (ang. *cerebral perfusion pressure*)
- dATP - deoksyadenozynotrójfosforan (ang. *deoxyadenosine triphosphate*)
- dCTP - deoksycytydynotrójfosforan (ang. *deoxycytidine triphosphate*)
- DEPC - dietylopirowęglan (ang. *diethylpyrocarbonate*)
- DT - test decyzji
- EB - błękit Evansa
- EphR - receptory efryny
- Erk1 - kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo 1/2
- EW - encefalopatia wątrobowa
- FXR - farnesoidowy receptor jądrowy X
- GABA - kwas gamma-aminomasłowy
- GAD - dekarboksylaza kwasu glutaminowego
- GAH - kwas L- $\gamma$ -glutamyl hydroksamowy (ang. *gamma-glutamyl hydroxamate*)
- GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- Gln - glutamina
- Glu - glutaminian
- GS - syntetaza glutaminy
- HO-1 - oksigenaza hemowa 1
- HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

ICP - ciśnienie śródczaszkowe (ang. *intracranial pressure*)

IL-1 $\beta$  - interleukina 1 $\beta$

IL-6 - interleukina 6

iNOS - indukowalna syntaza tlenu azotu

ISHEN - Międzynarodowe Towarzystwo Encefalopatii Wątrobowej i Metabolizmu Azotowego

lncRNA - długie niekodujące RNA

LTP - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*)

MAP-2 - białko towarzyszące mikrotubulom (ang. *microtubule associated proteins*)

MAPKs - kinazy białkowe aktywowane mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

MHE - postać subkliniczną encefalopatii wątrobowej (ang. *minimal hepatic encephalopathy*)

MMP9 - metaloproteinaza 9

MPT - zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (ang. *mitochondrial permeability transition*)

NAC - N-acetylocysteina

Nf- $\kappa$ B - transkrypcyjny czynnik jądrowy kappa B

NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO - tlenek azotu

NOS - syntaza tlenu azotu

OPA - dialdehyd orto-ftalowy

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PAG - fosforanozależna glutaminaza (ang. *phosphate-activated glutaminase*)

PBR - obwodowy receptor benzodiazepinowy (ang. *peripheral-type benzodiazepine receptor*)

PBS - roztwór soli buforowany fosforanami (ang. *phosphate buffered saline*)

PE - fikoerytryna

PPF - stosunek parowanych impulsów, określający krótkotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *Paired-pulse facilitation*)

PSS - zespolenie wrotno-systemowe (ang. *portosystemic shunting*)

RBE-4 - linia komórkowa szczurzych komórek endotelialnych (ang. *rat brain endothelial cell culture 4*)

ROS - reaktywne formy tlenu (z ang. *reactive oxygen species*)

S1PR2 - receptor sfingozyno-1-fosforanowy 2

sEPSCs - spontaniczne postsynaptyczne prądy pobudzające

SIRS - zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (ang. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SNR - stosunek sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*)

Src - cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa

TBS - stymulacja theta burst

THDOC - tetrahydrodeoksykortykosteron

Thrp1 - trombospondyna 1

TLR4 - receptor Toll-podobny 4 (ang. *toll-like receptor 4*)

TNF- $\alpha$  - czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$

TRPC1 - receptor przejściowego potencjału 1

TTX - tetrodotoksyna

vti1a - białko synaptyczne pośredniczące w transporcie pęcherzyków przez interakcję z homologiem t-SNAREs 1A (z ang. *vps10p tail interactor 1a*)



## 1. WSTĘP

Amoniak jest jednym z kluczowych elementów homeostazy azotowej w organizmach żywych, a powstaje na drodze przemian metabolicznych aminokwasów, monoamin i zasad azotowych. Jako prekursor uczestniczy w syntezie związków chemicznych tworzących struktury komórkowe, odpowiadających za przechowanie i przetwarzanie informacji genetycznej oraz włączonych w przekaźnictwo synaptyczne (Cooper i Plum, 1987). Zbyt wysoki poziom amoniaku jest szkodliwy dla organizmu, w szczególności dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Na podstawie danych literaturowych przyjmuje się, że stężenie fizjologiczne amoniaku we krwi tętniczej u ludzi wynosi 73-103  $\mu\text{M}$  (Lockwood i wsp., 1979). Nowsze dane uznają za prawidłowe dużo niższe stężenia amoniaku 10 - 47  $\mu\text{M}$ , traktując stężenia powyżej 100  $\mu\text{M}$  za szkodliwe (Bhatia i wsp., 2006).

Amoniak w około 90% jest usuwany z krwi dzięki pracy wątroby w wyniku serii reakcji chemicznych zachodzących w hepatocytach (cykl mocznikowy), podczas których amoniak jest przekształcany w mocznik i wydalany z moczem.

Terminem hiperamonemia określa się zaburzenie metaboliczne charakteryzujące się podwyższonym poziomem amoniaku w surowicy krwi. Występuje w przebiegu wielu, często bezpośrednio ze sobą nie związanych schorzeń, takich jak: przewlekła i ostra encefalopatia wątrobowa, Zespół Reye'a, wrodzone deficyty enzymów cyklu mocznikowego, encefalopatia mocznikowa, encefalopatia cukrzycowa czy encefalopatia hipoglikemiczna.

O ile większość wymienionych zaburzeń można zaliczyć do tzw. chorób rzadkich, to choroby wątroby są jedną z głównych przyczyn hospitalizacji pacjentów w Polsce. Według danych statystycznych, w 2015 roku w Polsce na choroby układu trawiennego zmarło 14 758 osób, z czego aż 4 302 zgonów wiązano alkoholową chorobą wątroby, a 1 591 ze zwłóknieniem i marskością wątroby (GUS, 2017). Dane te nie obejmują zatruć, które często prowadzą do niewydolności wątroby, wśród których wykazano w 2015 roku 883 przypadki śmiertelne.

Choroby wątroby są główną przyczyną wystąpienia złożonego zespołu zaburzeń neuropsychiatrycznych określanego jako encefalopatia wątrobowa (EW). Po raz pierwszy schorzenie to zostało opisane w 1893 r. przez Nenckiego, Pavlova i Zaleskiego, którzy wskazali zaburzoną homeostazę amoniaku wskutek zespolenia wrotno-systemowego u psów, jako przyczynę wystąpienia zmian neurobehawioralnych (agresja, drażliwość, ataksja, drgawki i śpiączka) (Nencki i wsp., 1896; Shawcross i wsp., 2005).

## 1.1. Encefalopatia wątrobowa – wiadomości ogólne

Uszkodzenie wątroby, rozumiane jako obniżenie liczby prawidłowo funkcjonujących hepatocytów, prowadzi do obwodowego gromadzenia się substancji toksycznych w organizmie. Również w wyniku utrudnionego przepływu krwi przez wątrobę dochodzi do gromadzenia się związków szkodliwych, do których należy zaliczyć przede wszystkim amoniak, merkaptany, fenole czy aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina). Związki te w przeważającej większości działają neurotoksycznie i mogą powodować uszkodzenia OUN oraz prowadzić do wystąpienia EW (Raabe, 1987; Giguère i Butterworth, 1984; Crossley i wsp., 1983; Norenberg, 1987).

Klasyfikacja EW opiera się na wyodrębnieniu kilku jej typów: typu A, określanego mianem ostrej EW oraz typów B i C określanych jako przewlekłe EW. Dwoma najczęstszymi przyczynami ostrej postaci choroby są wirusowe i polekowe zapalenie wątroby. Do innych przyczyn należą: uszkodzenie wątroby wywołane niedotlenieniem, zakrzepica żył wątrobowych, choroba zarostowa żył, choroba Wilsona, zatrucie grzybami, posocznica, autoimmunologiczne zapalenie wątroby, ostre stłuszczenie wątroby w okresie ciąży, zespół HELLP (hemoliza, podwyższony poziom enzymów wątrobowych, niski poziom płytek krwi), udar cieplny i naciek złośliwy wątroby (przerzuty z raka piersi, drobnokomórkowego raka płuc i chłoniaka). Dane statystyczne obejmujące liczbę pacjentów w Polsce, u których stwierdzono zapalenie wątroby wynikające z przedawkowania leków są trudnodostępne, natomiast wiadomo, że polekowe zapalenie wątroby stanowi prawie połowę przypadków wystąpienia ostrej EW w Stanach Zjednoczonych i Europie Zachodniej. W krajach tych, najczęstszą przyczyną zatruc nadal pozostaje acetaminofen (APAP). Niezamierzone, czy też niekontrolowane spożycie tego związku prowadzi do niewydolności wątroby, co jest częstsze u pacjentów niedożywionych i/lub jednocześnie nadużywających alkohol (Shah i wsp., 2018). Manifestacja kliniczna ostrej EW typu A przebiega gwałtownie, z ciężkimi objawami klinicznymi takimi jak: drgawki, śpiączka oraz wzrostem ciśnienia wewnątrzczaszkowego, które może skutkować obrzękiem mózgu i śmiercią pacjenta.

Przewlekła EW typu B rozwija się wskutek upośledzenia funkcji detoksykacyjnej wątroby spowodowanej chirurgicznym lub spontanicznym zespoleniem wrotno-systemowym (PSS, ang. *portosystemic shunting*) powodującym ominięcie wątroby przez żyłę główną i gromadzenie się toksyn w krwiobiegu (Newell, 1984). Z kolei przewlekła postać EW typu C rozwija się wskutek marskości wątroby. Ze względu na przyczynę, można wyróżnić marskość: alkoholową, zastoinową, pozapalną, żółciową oraz spowodowaną uwarunkowaniami genetycznymi (Djiambou-Nganjeu, 2017). Manifestacja kliniczna



przewlekłej EW typu B i C jest wolniejsza i stopniowa, poza tym rzadziej obserwuje się objawy prowadzące do śmierci pacjenta.

Warto nadmienić, że oprócz tzw. objawowej EW (diagnozowanej klinicznie), wyróżnia się postać podkliniczną EW (MHE, ang. *minimal hepatic encephalopathy*), którą diagnozuje się przede wszystkim w oparciu o wyniki testów psychometrycznych. Pogorszenie jakości życia pacjentów z MHE wiąże się i najczęściej dotyczy ograniczenia sprawności w prowadzeniu samochodu, co tym samym stwarza zagrożenie bezpieczeństwa w ruchu drogowym (Bajaj, 2008). U pacjentów z MHE stwierdza się także większe ryzyko wystąpienia objawowej EW oraz wyższą śmiertelność pacjentów (Weissenborn, 2015).

Bardziej szczegółowo objawy kliniczne MHE i objawowej EW z wyodrębnionymi stadiami w 4 stopniowej skali West Haven zostały przedstawione w tabeli 1.1. (Bunchorntavakul i Reddy, 2017).

Tab. 1.1. Klasyfikacja encefalopatii wątrobowej według skali West Haven (Salgado i Cortes, 2013).

Objawy kliniczne występujące w przebiegu encefalopatii wątrobowej				
MHE	Stopień I	Stopień II	Stopień III	Stopień IV
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zaburzenia kognitywne, które nie są obserwowane w standardowym badaniu neurologicznym, a jedynie po zastosowaniu specjalistycznych testów neuropsychologicznych lub neurofizjologicznych</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brak apetytu</li> <li>• Zaburzenia snu</li> <li>• Zaburzenia koncentracji</li> <li>• Rozdrażnienie</li> <li>• Zaburzenia pisma, liczenia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Letarg</li> <li>• Ataksja</li> <li>• Ołepienie</li> <li>• Zmiana osobowości</li> <li>• Niepokój</li> <li>• Zaburzenia pamięci</li> <li>• Zaburzenia orientacji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brak koordynacji</li> <li>• Splątanie</li> <li>• Patologiczna senność</li> <li>• Urojenia</li> <li>• Sporadyczna agresja</li> <li>• Oczopląs</li> <li>• Drgawki kloniczne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Śpiączka</li> <li>• Rozszerzenie źrenic</li> <li>• Sztywność odmóżdzeniowa</li> <li>• Całkowity brak reakcji na bodźce</li> <li>• Śmierć</li> </ul>

Ze względu na temat rozprawy, który koncentrował moje badania na typie ostrym EW, poniżej zamieszczone informacje będą dotyczyły EW typu A.

### 1.1.1. Charakterystyka kluczowych objawów klinicznych ostrej EW

#### 1) Obrzęk mózgu

Obrzęk mózgu, obok sepsy i niewydolności wielonarządowej, jest jedną z trzech głównych przyczyn wysokiej śmiertelności pacjentów z ostrą EW (Clemmesen i wsp., 1999; Bernal i wsp., 2007). Ryzyko wystąpienia obrzęku mózgu jest szczególnie wysokie u pacjentów w późnej fazie choroby, gdzie obserwuje się wysokie stężenie amoniaku w surowicy krwi oraz u osób ze współtowarzyszącą infekcją i/lub zespołem ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS, ang. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) (Rolando i wsp., 2000). U ~60% pacjentów stan ten kończy się śmiercią. Obrzęk mózgu obserwowano zarówno u pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby (O'Brien i wsp., 1987; Aggarwal i wsp., 1994; Bjerring i wsp., 2009; Rai i wsp., 2008), jak i w zwierzęcych modelach ostrej EW (Dixit i Chang, 1990; Willard-Mack i wsp., 1996; Norenberg i Lapham, 1974) oraz w modelach hiperamonemicznych (Takahashi i wsp., 1991; Hilgier i Olson, 1994).

Obrzęk mózgu może rozwijać się w wyniku zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*) dla wody lub metabolitów osmogennych (składowa naczyniopochodna) lub przez zbieranie się osmolitów w komórkach mózgu (składowa cytotoksyczna). Obie składowe mogą powstawać w sposób niezależny lub być ze sobą wzajemnie powiązane. Wystąpienie składowej naczyniopochodnej związane jest z uszkodzeniem BBB, którą tworzą komórki śródbłónka naczyń złączone tzw. połączeniami ścisłymi. Towarzyszą im komórki okołonaczyniowe tzw. perycyty, które są zespolone z błoną podstawną. W skład błony podstawnej wchodzi m.in.: kolagen typu IV i V, fibronektyna oraz laminina, a jej powierzchnię pokrywają zakończenia wypustek astrocytarnych (Haseloff i wsp., 2005). Transport przez-komórkowy odbywa się na zasadzie dyfuzji lub transportu czynnego przy wykorzystaniu białek błonowych. W warunkach EW zaobserwowano zwiększoną przepuszczalność BBB (Lockwood i wsp., 1991) w materiale *post mortem* pochodzącym od pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby (Kato i wsp., 1992) oraz w niektórych modelach zwierzęcych, w tym w mysim AOM modelu ostrej EW (Shimajima i wsp., 2008; McMillin i wsp., 2015), co może być związane z rozszczelnieniem połączeń ścisłych. Trzeba jednak podkreślić, że udział rozszczelnienia BBB w rozwoju obrzęku w warunkach EW jest nadal przedmiotem dyskusji i badań (Ott i Vilstrup, 2014; Sørensen i wsp., 2009; Keiding i wsp., 2006).

Większe znaczenie w rozwoju obrzęku wydaje się mieć składowa cytotoksyczna. Nadrzędną rolę w jej wystąpieniu przypisuje się wysokiemu stężeniu amoniaku w mózgu, który prowadzi między innymi do nadprodukcji w komórkach glejowych związku osmotycznie czynnego jakim jest glutamina (Gln). Wywołane amoniakiem obrzmienie komórki glejowej wykazano zarówno w pierwotnych hodowlach astrocytów traktowanych amoniakiem (Norenberg i wsp., 1991; Rama Rao i wsp., 2003; Konopacka i wsp., 2009), jak i w modelach zwierzęcych (Willard-Mack i wsp., 1996; Swain i wsp., 1991). Gromadzenie się Gln wewnątrz komórek prowadzi do obrzmiewania wypustek astrocytarnych oraz zmniejszenia przestrzeni międzykomórkowej, co zostało wykazane w materiale *post mortem* pochodzącym od pacjentów z ostrą EW (Saksena i wsp., 2008), jak i w zwierzęcych modelach ostrej EW, m.in. galaktozaminowym (Traber i wsp., 1987) i azoksymetanowym (Matkowskyj i wsp., 1999). Uszkodzenie astrocytów pełni centralną rolę w rozwoju choroby, bezpośrednio wpływając na funkcję neuronów, dlatego też EW często określa się mianem „astroglejopatii” (Norenberg i wsp., 1992).

## 2) Zaburzenia neurotransmisji

Neuroprzekaźniki aminokwasowe biorą udział w przekazywaniu sygnału między neuronami, wykazując efekt odpowiednio pobudzający lub hamujący. Glutaminian (Glu) jest głównym przekaźnikiem w neurotransmisji pobudzającej i oddziałuje na receptory jonotropowe, wśród których można wyróżnić receptor: NMDA (N-metylo-D-asparaginian), będący najliczniej występującym kanałem wapniowym w mózgu, AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoxazolepropionian), który otwiera kanał sodowo-wapniowy i kainianowy, otwierający kanał sodowo-potasowy oraz receptory metabotropowe. Wymienione receptory jonotropowe powodują depolaryzację błony postsynaptycznej i wywołanie potencjału pobudzeniowego. W większości synaps glutamatergicznych zaobserwowano występowanie receptorów typu AMPA i NMDA. Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) jest głównym neuroprzekaźnikiem neurotransmisji hamującej. Aktywacja jonotropowego receptora dla tego neuroprzekaźnika otwiera kanał chlorkowy, powodując hiperpolaryzację błony postsynaptycznej.

W zwierzęcych modelach hiperamonemii i EW wykazano wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Glu, a przyczyny tego zjawiska zostaną opisane w kolejnych rozdziałach pracy (Moroni i wsp., 1983; De Knecht i wsp., 1994; McArdle i wsp., 1996; Michalak i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1999). Dodatkowo obserwowano obniżenie ekspresji astrocytarnych transporterów dla Glu (Knecht i wsp., 1997; Norenberg i wsp., 1997; Chan i wsp., 2000), a także zwiększoną aktywność receptorów NMDA. Obserwacje te sugerują zaburzenia

neurotransmisji glutaminergicznej w warunkach ostrej EW, co jest poważnym powikłaniem wpływającym na przebieg choroby. Może się to przekładać na szereg zaburzeń funkcji poznawczych, intelektualnych, a także motoryki i koordynacji ruchowej.

### **1.1.2. Diagnostyka i leczenie ostrej EW**

Stan pacjentów z ostrą EW jest zazwyczaj poważny, a diagnostyka skupia się w dużej mierze na pomiarze parametrów prognostycznych zgodnie z kryteriami King's College takich jak: pH krwi tętniczej, poziom bilirubiny, kreatyniny, czas protrombinowy, czas który upłynął od wystąpienia śpiączki (Shalimar i Acharya, 2015). Nadal szuka się nowych narzędzi diagnostycznych umożliwiających ocenę uszkodzenia narządów i stopnia zaawansowania choroby w odniesieniu do rokowań pacjenta i konieczności przeprowadzenia transplantacji wątroby. Świadczą o tym najnowsze badania, w których histologiczna ocena próbek pobranych z wątroby pacjentów z ostrą EW przyczyniła się do trafnego ustalenia etiologii EW w 83%. Dodatkowo wykazano, że poziom aktywności kaspazy 3/7 i cytokeratyny CK-18 (ang. *caspase-cleaved cytokeratin 18*) w krwi żyłnej były istotnie wyższe u pacjentów, którzy odzyskali sprawność bez przeszczepu wątroby, sugerując wykorzystanie pomiaru tego parametru jako markera prognostycznego regeneracji narządu (Wang i wsp., 2018). Co więcej, podkreśla się wagę właściwej i w miarę szczegółowej diagnozy pacjentów na oddziałach pediatrycznych, u których zdarza się kierowanie na przeszczep bez określenia etiologii choroby (obejmujących wirus opryszczki pospolitej HSV, chorobę Wilsona czy też zaburzenia mitochondrialnego utleniania kwasów tłuszczowych). Wykazano, że zastosowanie komputerowych metod diagnostyki i rehabilitacji neuropsychologicznej, m.in. testu decyzji zmniejszyło odsetek dzieci z ostrą EW o nieokreślonej etiologii (Narkewicz i wsp., 2018).

Pomimo faktu, że typ ostry EW pozostaje schorzeniem ze złym rokowaniem, rozwój technik ortotopowego przeszczepu wątroby przyczynił się do wzrostu przeżywalności pacjentów. Część pacjentów odzyskuje sprawność w wyniku regeneracji narządu, zaś około połowa zostaje poddana przeszczepowi wątroby. Przeszczepy wątroby u pacjentów z ostrą EW stanowią rocznie 8% wszystkich przypadków transplantacji narządów. Roczne wskaźniki przeżycia po przeszczepie wątroby w Europie wynoszą 79% (Olivo i wsp., 2018). Statystyki przeżywalności pacjentów w Europie ulegają poprawie, co jest spowodowane sprawniejszą i bardziej precyzyjną diagnostyką, lepszym zarządzaniem intensywną opieką medyczną, skuteczniejszym kwalifikowaniem narządów do przeszczepu oraz wczesnym podawaniem N-acetylocysteiny (NAC) np. pacjentom po przedawkowaniu APAP (Makin i wsp., 1995; Williams i Wendon, 1994). Rozwój technik ratujących życie pacjentom z ostrą EW widać także w Polsce, gdzie pierwszego udanego przeszczepu wątroby u osoby dorosłej dokonano

w 1994 roku w Centralnym Szpitalu Klinicznym WUM w Warszawie. Nie wypracowano jednak jak dotąd standardu postępowania z pacjentami, a określenie najlepszej opcji terapeutycznej zależy od wielu czynników, m. in. wieku pacjenta, zaawansowania choroby czy etiologii schorzenia. Aktualnie stosowane metody leczenia ostrej EW, ze względu na skupienie się w pierwszej kolejności na eliminowaniu określonych objawów klinicznych można podzielić na:

### **1) terapię ukierunkowaną na eliminację obrzęku mózgu;**

Działania te opierają się przede wszystkim na monitorowaniu ciśnienia śródczaszkowego (ICP, ang. *intracranial pressure*) i ciśnienia perfuzyjnego mózgu (CPP, ang. *cerebral perfusion pressure*). W przypadku wystąpienia podwyższonego ICP zaleca się podanie mannitolu w dawce 0,5-1,0 g/kg, lecz nie stosuje się go profilaktycznie. W niektórych przypadkach zalecane jest podawanie hipertonicznego roztworu NaCl w celu wywołania hipernatemii i zmniejszenia obrzęku mózgu. Warto również zwrócić uwagę na stosowanie hipotermii ogólnoustrojowej (obniżenie tem. Ciała do 32-35°C), którą zaleca się w krótkich odcinkach czasowych i traktuje wyłącznie jako pomoc doraźną, zwiększającą przeżycie pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby (Stravitz i wsp., 2008).

### **2) strategię obniżania stężenia amoniaku;**

Strategie te mają na celu zmniejszenie wytwarzania amoniaku w jelitach (niewchłanianie dwucukry jak laktuloza i laktitol, probiotyki), zmniejszenie pozajelitowego wytwarzania amoniaku (antybiotyki – chinolony, ketoanalgi), pobudzenie metabolizmu amoniaku (L-asparaginian L-ornityny, L-arginina), bądź eliminację nadmiaru amoniaku (hemoperfuzja) (Panasiuk, 2014; Sivolap, 2017).

### **3) inne formy terapii ukierunkowane na kontrolowanie i zapobieganie powikłaniom niestabilności hemodynamicznej, niewydolności nerek, koagulopatii, hipoglikemii i niewydalności oddychania;**

W celu zwiększenia perfuzji narządów stosuje się m. in. środki wpływające na skurcz naczyń tętniczych i żylnych, noradrenalinę, często z dodatkiem wazopresyny lub terlipresyny. Dodatkowo poprawiają one perfuzję mózgową, jednak w zaawansowanych stadiach EW na każdym etapie wymagają zachowania szczególnej ostrożności. Aktualnie obowiązujące wytyczne Amerykańskiego Towarzystwa Gastroenterologicznego nie rekomendują stosowania glikokortykoidów w leczeniu EW z nadciśnieniem śródczaszkowym (Shalimar i Acharya, 2015).

#### **4) terapie wspomagające prawidłowe funkcjonowanie wątroby i przeszczep wątroby;**

Pozaustrojowe interwencje terapeutyczne, które mają za zadanie poprawę funkcji wątroby, mogą być ogólnie sklasyfikowane jako sztuczne systemy filtracji, nie zawierające składnika biologicznego (plazmafereza, hemodializa, hemofiltracja, hemodiafiltracja, hemoperfuzja na węglu drzewnym, systemy dializy wątrobowej MARS (Stange i wsp., 1993) i PROMETHEUS (Falkenhagen i wsp., 1999) lub wykorzystujące żywe komórki wątroby (perfuzja pozaustrojowa z wątrobą zwierzęcą lub ludzką, bioreaktory z komórkami hepatocytów, systemy ELAD (ang. *extracorporeal liver assist device*; Sussman i wsp., 1992), czy AMC-BALL (ang. *Bioartificial Liver*; van de Kerkhove i wsp., 2002). Dotychczas stosowane terapie wykorzystujące czynniki biologiczne nie wpłynęły znacząco na długość przeżycia pacjentów. W większości przypadków ostrej EW jedynym skutecznym zabiegiem ratującym życie jest przeszczep wątroby. W krajach UE kierując pacjentów do przeszczepu nadal korzysta się z kryteriów brytyjskiego King's College, wskazujących pacjentów, u których spontaniczne wyzdrowienie jest wysoce nieprawdopodobne. Niektóre kryteria dotyczące parametrów prognostycznych (np. czas protrombinowy, poziom bilirubiny czy poziom mleczanu we krwi tętniczej) okazują się mało swoiste dla danego schorzenia lub czułość ich oznaczania jest niewystarczająca (Shalimar i Acharya, 2015).

##### **1.1.3. Modele ostrej EW**

Wykorzystywanie systemów skrawkowych, bądź ograniczenie się jedynie do hodowli komórkowych w badaniach patomechanizmu EW jest często niewystarczające. Jest to spowodowane dużą liczbą czynników patogennych, zależnością pracy wielu narządów – wpływu niewydolności wątroby na zmiany neurologiczne, a także skomplikowaną budową układu nerwowego. Dlatego też złożoność schorzenia, którym jest EW, wymaga wykorzystania do badań modeli zwierzęcych.

W 2009 roku Międzynarodowe Towarzystwo Encefalopatii Wątrobowej i Metabolizmu Azotowego (ISHEN) wskazało wysoką użyteczność obecnie używanych modeli zwierzęcych ostrej EW, wśród których znalazły się: modele nieuszkodzające hepatocytów (hepatektomia, dewaskularyzacja wątroby; w większości modele szczurze) oraz modele hepatotoksyczne (wykorzystujące stosowanie hepatotoksyn: galaktozaminy, acetaminofenu, tioacetamidu, azoksymetanu) (Tab. 2.1.3.).

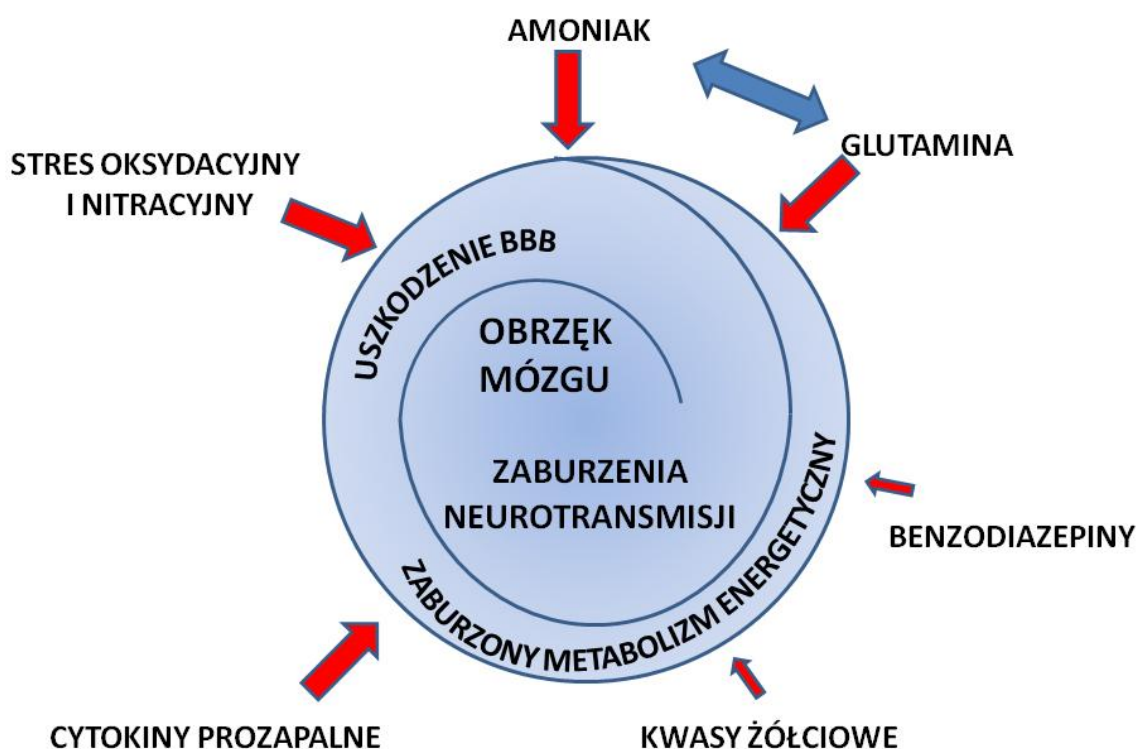
Tab. 1.1.3. Zwierzęce modele ostrej encefalopatii wątrobowej (Butterworth i wsp., 2009).

modele nieuszkodzające hepatocytów	dewaskularyzacja wątroby	szczur, królik, świnia
	hepatektomia	szczur, świnia
modele hepatotoksyczne	galaktozamina	szczur, królik, świnka morska
	acetaminofen	szczur, pies, świnia
	tioacetamid	szczur
	azoksymetan	mysz

Wszystkie modele w dużym stopniu odwzorowują obraz kliniczny choroby, natomiast najlepiej opisanymi są: szczurzy model dewaskularyzacji wątroby oraz model tioacetamidowy (Butterworth i wsp., 2009). Mysi azoksymetanowy (AOM) model ostrej EW jest stosunkowo nowym modelem, scharakteryzowanym najpierw w 1999 roku przez Matkowskyj i wsp. (1999), a później bardziej szczegółowo przez grupę Butterwortha w 2006 roku (Bélanger i wsp., 2006) i dobrze odtwarza główne cechy charakterystyczne dla ostrej EW: bardzo duży wzrost stężenia amoniaku w surowicy oraz w mózgu, podwyższone stężenia aminokwasów: glutaminianu, glutaminy, histydyny, alaniny, tyrozyny, waliny, metioniny, tryptofanu, izoleucyny, leucyny w korze mózgowej zwierząt, współwystępowanie obrzęku mózgu. Dlatego, że mysie modele są często wykorzystywane do badań mechanizmów obejmujących manipulacje genetyczne oraz ze względu na zaplanowane cele niniejszej dysertacji i planowane zastosowanie modelu wyciszenia transportera Gln techniką *vivo morpholino*, zdecydowaliśmy się na wykorzystanie w badaniach mysiego AOM modelu ostrej EW.

## 1.2. Patomechanizm encefalopatii wątrobowej

Patomechanizm EW w dalszym ciągu jest obiektem zainteresowania wielu grup badawczych. Należy jeszcze raz podkreślić, że EW jest zaburzeniem wieloczynnikowym, w którym amoniak pełni główną rolę w rozwoju i pogłębianiu się objawów choroby (Shawcross i wsp., 2005; Lockwood i wsp., 1991; Butterworth i wsp., 1987). Większość poznanych do tej pory aspektów patomechanizmu EW jest wypadkową, oprócz wysokiego stężenia amoniaku, kilku czynników patogennych, w tym stresu oksydacyjnego czy cytokin prozapalnych (Butterworth, 2016). Zostaną one w skrócie omówione poniżej.



Ryc.1.2. Główne czynniki odpowiedzialne za patomechanizm encefalopatii wątrobowej.

### 1.2.1. Udział stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz innych czynników w rozwoju ostrej EW

Wiedza na temat roli stresu oksydacyjnego w rozwoju EW jest coraz obszerniejsza. Stres oksydacyjny występuje w przypadku przechylenia równowagi między wytwarzaniem wolnych rodników a ich neutralizacją, co sprzyja wytwarzaniu reaktywnych form tlenu (ROS), biorących udział w sygnalizacji komórkowej w warunkach prawidłowych, lecz wykazujących negatywny wpływ na komórki przy wysokich stężeniach (Valko i wsp., 2007).



W białkach podatnych na utlenianie może dochodzić do modyfikacji posttranslacyjnych, obejmujących karboksylację, nitrowanie lub S-nitrozylację, czego konsekwencją może być fragmentacja łańcucha polipeptydowego i generowanie wiązań białko-białko. W rezultacie powstają funkcjonalne zmiany w aktywności enzymów, transporterów czy receptorów (Stadtman i Levine, 2000). Dodatkowo ROS mogą oddziaływać na grupy metylenowe lipidów, głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, powodując ich peroksydację i tworzenie aldehydów. Może to prowadzić do wiązania białek tworzących niefunkcjonalne kompleksy, a także do zmian przepuszczalności błon komórkowych (Poon i wsp., 2004).

Zarówno w hodowlach astrocytarnych, jak i w badaniach na zwierzętach wykazano zwiększoną produkcję ROS w odpowiedzi na podwyższone stężenie amoniaku (Murthy i wsp., 2001; Hilgier i wsp., 2003; Kosenko i wsp., 1997). Dodatkowo w badaniach *in vitro* na szczurzych hodowlach astrocytarnych poddanych inkubacji z amoniakiem (Jayakumar i wsp., 2006), oraz *in vivo* - w szczurzym tioacetamidowym modelu ostrej EW (Sathyaikumar i wsp., 2007) wykazano, że podanie antyoksydantów obniża, wywołane wysokim stężeniem amoniaku, obrzmienie astrocytów.

Ponadto, działanie ROS na kwasy nukleinowe, głównie na ich jednostkę budulcową - guaninę, która ma wyższy potencjał redoks niż inne zasady azotowe, może prowadzić do upośledzenia translacji i nieprawidłowej syntezy białek (Bosoi i Rose, 2013). Stres oksydacyjny w warunkach ostrej EW może powodować także uwolnienie jonów cynku ( $Zn^{2+}$ ) z metalotionein. Astrocytarne fluktuacje "wolnego" wewnątrzkomórkowego stężenia  $Zn^{2+}$  mogą modulować transdukcję sygnału, aktywność czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów (Krezel i wsp., 2007). W szczurzej hodowli astrocytów poddanych warunkom hipoosmotycznym udowodniono, że  $Zn^{2+}$  bierze udział w translokacji do jądra czynnika transkrypcyjnego Sp1, który jest zaangażowany w regulację ekspresji obwodowego (pozaneuronalnego) receptora benzodiazepinowego (PBR, ang. *peripheral-type benzodiazepine receptor*) (Kruczek i wsp., 2009). Ten błonowy receptor może wpływać na liczne funkcje komórkowe, m.in. steroidogenezę, oddychanie komórkowe, potencjał błony mitochondrialnej, biosyntezę hemu, apoptozę i proliferację komórek (Kołodziejczyk, 2015). Bardziej szczegółowa rola PBR w rozwoju ostrej EW zostanie opisana w kolejnych rozdziałach.

Rola stanu zapalnego w patogenezie EW została bezsprzecznie udowodniona, co dokumentuje obszerna literatura (Butterworth, 2016; Jayakumar i wsp., 2015). W warunkach ostrej EW występuje zarówno zapalenie ogólnoustrojowe, jak i wyższe stężenia cytokin w mózgu na skutek odpowiedzi komórek (głównie mikrogleju i komórek endotelialnych).

Głównymi cytokinami, których poziom we krwi wzrasta są interleukiny 1 $\beta$  oraz 6 (IL-1 $\beta$ , IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Wykazano, że TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  mogą modulować ekspresję i aktywność metaloproteinazy 9 (MMP9), która w warunkach fizjologicznych jest zależnym od jonów cynku enzymem proteolitycznym biorącym udział w rozkładzie macierzy pozakomórkowej, w procesach takich jak: rozwój embrionalny, rozmnażanie, angiogeneza, gojenie się ran, migracja komórek. W warunkach patofizjologicznych może powodować degradację laminy lub wpływać na połączenia ścisłe komórek endotelialnych, co skutkuje rozszczelnieniem BBB obserwowanym np. w mysim AOM modelu ostrej EW (Sharief i Thompson, 1992; Chastre i wsp., 2014). Dodatkowo w tym samym modelu wykazano, że dootrzewnowe podanie etanerceptu, białka neutralizującego TNF- $\alpha$ , opóźnia rozwój choroby i zmniejsza stan zapalny. Przekłada się to na mniejszą liczbę uszkodzeń hepatocytarnych, obniżenie stresu oksydacyjnego i obniżenie poziomu cytokin prozapalnych produkowanych w mózgu, wskazując na potencjalną rolę TNF- $\alpha$  w rozwoju EW (Chastre i wsp., 2012). Mechanizm tłumaczący udział cytokin w powstawaniu obrzęku cytotoksycznego nie jest do końca poznany. Wykazano, że w hodowlach astrocytarnych amoniak i cytokiny współuczestniczą w wywoływaniu obrzmiewania tych komórek, z pierwszorzędym udziałem amoniaku, który inicjuje aktywację transkrypcyjnego czynnika jądrowego-kappa B (Nf- $\kappa$ B) (Rama Rao i wsp., 2010). W rozwoju EW podkreśla się udział aktywacji mikrogleju, który indukuje odpowiedź zapalną, syntezę i uwalnianie cytokin takich jak: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Odpowiedź taką mogą wywoływać między innymi wysokie stężenie Glu czy prozapalne cytokiny obwodowe (Garden i wsp., 2006).

W ostatnich latach ponownie zwrócono uwagę na inne związki toksyczne gromadzące się w krwiobiegu na skutek niewydolności wątroby, takie jak: benzodiazepiny czy kwasy żółciowe. Rola benzodiazepin w kontekście uszkodzeń astrocytów zostanie omówiona w dalszej części dysertacji (rozdział 2.2.3.2). W wyniku uszkodzenia wątroby, wskutek upośledzonego mechanizmu wychwytu zwrotnego w wątrobie oraz zmienionej mikroflory jelitowej, poziom kwasów żółciowych w surowicy zwiększa się (Kakiyama i wsp., 2013), co prawdopodobnie przyczynia się do rozwoju kardiomiopatii (Ma i wsp., 1997) i wazodylatacji u pacjentów ze schorzeniami wątroby (Bomzon i Ljubuncic, 1995). Co więcej, u szczurów z podwiązanymi przewodami żółciowymi stwierdzono, że profil kwasów żółciowych, szczególnie kwasu lithocholowego w korze czołowej jest zwiększony w porównaniu do kontroli. Sugeruje to, że podwyższenie obwodowego poziomu kwasów żółciowych przekłada się na ich poziom w mózgu (Tripodi i wsp., 2012). Wykazano także, że pacjenci, którzy zmarli w wyniku ostrej niewydolności wątroby mieli podwyższone stężenie wolnych kwasów

żółciowych w płynie mózgowo-rdzeniowym, w odróżnieniu od pacjentów bez objawów choroby wątroby (Bron i wsp., 1977). W AOM modelu ostrej EW wykazano podwyższone stężenie kwasów żółciowych zarówno w osoczu jak i w korze czołowej myszy (McMillin i wsp., 2016; McMillin i wsp., 2017). Ta sama grupa badawcza wykazała, że obniżenie poziomu kwasów żółciowych w surowicy i korze czołowej wskutek krótkotrwałego karmienia cholestyraminą (związkiem zmniejszającym stężenie cholesterolu) nie wpłynęło na uszkodzenie wątroby, jednak znacznie opóźniło wystąpienie objawów neurologicznych. Postuluje się, że bezpośredni związek pomiędzy gromadzącymi się kwasami żółciowymi, a zaburzeniami neurotransmisji w EW może być związany z nadmierną aktywacją farnesoidowego receptora jądrowego X (FXR) zlokalizowanego w neuronach, którego ekspresja jest znacząco podwyższona we wczesnych stadiach schorzenia. Dodatkowo, kwasy żółciowe mogą aktywować receptor sfingozyno-1-fosforanowy 2 (S1PR2), który, jak wykazano w badaniach wykorzystujących inne modele EW, promuje powstawanie stanu zapalnego.

### **1.2.2. Rola amoniaku w patomechanizmie EW**

W wyniku uszkodzenia wątroby homeostaza amoniaku w organizmie zostaje zaburzona, a poziom tej neurotoksyny rośnie w krwiobiegu. Toksyczność amoniaku została bezspornie udowodniona i była wielokrotnie wykazywana w badaniach *in vitro* i *in vivo*, zarówno wykorzystujących proste modele hiperamonemiczne (Takahashi i wsp., 1991), jak i ostatnio myszy model wyciszenia syntetazy glutaminy (GS) w wątrobie (Qvartskhava i wsp., 2015).

#### **1) Toksyczność amoniaku w OUN**

Amoniak w organizmie występuje w równowadze pomiędzy formą jonową  $\text{NH}_4^+$  oraz niejonową  $\text{NH}_3$ . Obecnie uważa się, że transport amoniaku przez BBB odbywa się zarówno przez dyfuzję prostą ( $\text{NH}_3$ ), jak i w wyniku transportu wspomaganego ( $\text{NH}_4^+$ ), jednak nadal nie wiadomo, która ścieżka w warunkach ostrej EW jest dominująca (Ott i Vilstrup, 2014). Napływ amoniaku do mózgu wzrasta równoległe do jego stężenia we krwi (Sørensen, 2013), jednak mózg nie ma efektywnego cyklu mocznikowego, w związku z czym zdolność do jego usuwania jest ograniczona. Głównym sposobem eliminacji toksycznego amoniaku w mózgu jest synteza Gln w wyniku reakcji Glu z amoniakiem katalizowana przez enzym – GS, zachodząca w astrocytach. Astrocyty regulują szereg kluczowych i krytycznych dla utrzymania prawidłowych procesów w ośrodkowym układzie nerwowym, w tym neurotransmisji, synaptogenezy, regulacji pH, homeostazy jonów i wody,

metabolizmu energetycznego, a także są zaangażowane w dostarczanie czynników wzrostu i składników odżywczych do komórek nerwowych (Wang i Bordey, 2008).

## 2) Wpływ amoniaku na astrocyty

Jedną z głównych konsekwencji oddziaływania wysokiego stężenia amoniaku na astrocyty jest produkcja ROS. Rodniki azotowe odgrywają ważną rolę w sygnalizacji komórkowej (Valko i wsp., 2007). Jak wspomniano wyżej, wysokie stężenie RNS może powodować nitrację reszt tyrozynowych białek, co powoduje zmianę ich funkcji bądź ich inaktywację. Opisano taki typ modyfikacji między innymi dla GS, receptora PBR, kinazy Erk1 (kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo 1/2), której aktywacja reguluje cykl komórkowy, proliferację i różnicowanie, oraz dla kotransportera Na-K-Cl, przenoszącego jony sodu, potasu i chloru przez błonę komórkową (Häussinger i Görg, 2010). Jednym z mechanizmów wyjaśniających wpływ amoniaku na produkcję ROS jest aktywacja enzymu oksydazy NADPH, który jest donorem elektronu w reakcji jednoelektronowej redukcji tlenu, katalizując w ten sposób produkcję ROS (Reinehr i wsp., 2007). W pierwotnej hodowli astrocytów wykazano, że amoniak powoduje aktywację fosforylacji seryny p47phox, która jest kluczowa dla aktywacji oksydazy NADPH. Fosforylacja p47phox prowadzi także do aktywacji receptora NMDA, wzmocnienia wyrzutu  $Ca^{2+}$ , aktywacji sfingomielinazy i aktywacji kinazy białkowej C $\zeta$  (Reinehr i wsp., 2007; Görg i wsp., 2013). Nie mniej istotnym elementem toksycznego działania amoniaku na astrocyt jest jego rola w uszkodzeniu mitochondriów, dokładniej opisana w kolejnym rozdziale, a także obniżenie aktywności i ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, takich jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, tioredoksyna, peroksydaza glutationowa (Ruszkiewicz i Albrecht, 2015; Lemberg i Fernández, 2009). Wykazano także, że w hodowlach astrocytarnych oraz w badaniach *in vivo* w szczurzym modelu EW amoniak, cytokiny prozapalne i benzodiazepiny powodują wzmożoną produkcję ROS/RNS, szczególnie tlenu azotu poprzez aktywację receptora NMDA i mechanizm wapniowo-zależny (Murthy i wsp., 2001; Schliess i wsp., 2004; Reinehr i wsp., 2007).

Wykazano, że w pierwotnej hodowli zarówno mysich jak i w szczurzych astrocytów korowych inkubowanych z 5 mM octanem amonu dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Schliess i wsp., 2002; Rose i wsp., 2005). Dodatkowo, stężenia amoniaku na poziomie 1-5 mM powodują podwyższenie stężenia jonów wapnia w astrocytach mysich skrawków mózgowych pochodzących z różnych regionów mózgu (Haack i wsp., 2014). Wykazano, że amoniak indukuje wzrost stężenia jonów wapnia na drodze kilku mechanizmów, do których należą: nadaktywacja receptora NMDA, zmiana pH wewnątrzkomórkowego prowadząca do uwalniania jonów wapnia z magazynów

retikulum endoplazmatycznego, a także uszkodzenie mitochondriów w astrocytach, skutkujące nierównowagą energetyczną prowadzącą do niskiej aktywności pomp jonowych ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-azy,  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATP-azy, wymiennika  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ ) (Rose i wsp., 2005; Oja i wsp., 2017). Wysokie stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje zwiększenie przepuszczalności mitochondriów dla substancji o masie cząsteczkowej do 1500 Da (Haworth i Hunter, 1979). Prowadzi to do zaburzenia gradientu elektrochemicznego błony komórkowej oraz zwiększonego zużycia ATP związanego z aktywacją  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy. Równolegle, transport jonów wapnia powoduje obniżenie potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej powodując zahamowanie syntezy ATP (Kosenko i wsp., 1994; Bernardi, 1996). Z kolei astrocytarne fale wapniowe mogą bezpośrednio wpływać na stężenie jonów wapnia w sąsiadujących neuronach, jednocześnie stymulując uwalnianie Glu z astrocytów (Gabryel i wsp., 2015; Moroni i wsp., 1983). Najnowsze badania wykazują także, iż amoniak powoduje zwiększoną ekspresję kanału jonowego - receptora przejściowego potencjału 1 (TRPC1) (Liang i wsp., 2014) oraz wzrost poziomu ekspresji izoformy astrocytarnego kanału wapniowego Cav1.2 (Wang i wsp., 2015), co dodatkowo zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia.

Wysokie stężenie amoniaku wpływa bezpośrednio na poziom ekspresji genów wielu białek astrocytarnych poprzez regulację aktywności różnych ścieżek sygnalizacyjnych związanych z regulacją transkrypcji. W hodowlach astrocytarnych wykazano wpływ amoniaku na aktywację kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPKs), które razem ze stresem oksydacyjnym wpływają na NF- $\kappa$ B (Sinke i wsp., 2008). Fosforylacja inhibitora z rodziny I $\kappa$ B powoduje uwolnienie NF- $\kappa$ B, który przedostaje się do jądra i wpływa na transkrypcję genów kodujących białka, między innymi oksydazy NADPH oraz indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), generującej produkcję tlenu azotu. Może on także aktywować fosfolipazę A2 a także cyklooksygenazę-2, pośrednio powodując produkcję kwasu arachidowego i prostaglandyn, metabolitów wywołujących obrzmienie astrocytów (Baldwin, 1996; Staub i wsp., 1994). Dodatkowo, zarówno w hodowlach astrocytarnych traktowanych amoniakiem, jak w szczurzym modelu hiperamonemii, stwierdzono wzrost poziomu i fosforylację natywnego białka p53, które działa jako czynnik transkrypcyjny (Kosenko i wsp., 2007; Panickar i wsp., 2009). Białko p53 wpływa na aktywację i dezaktywację genów, jest inhibitorem replikacji DNA wpływając na cykl komórkowy oraz jest zaangażowane w regulację apoptozy (Agostini i wsp., 2017). Najnowsze badania sugerują rolę długich niekodujących RNA (lncRNA) zaangażowanych w koordynowanie ekspresji genów, w patomechanizmie EW. W mysim AOM modelu ostrej EW, w korze czołowej zwierząt w fazie śpiączki wykazano, że 868 transkryptów ulega zmianie względem kontroli, z czego

ekspresja 486 była obniżona. Analiza bioinformatyczna wykazała, że część z nich reguluje szlaki biologiczne obejmujące m. in. interakcję cytokin z receptorami, szlak sygnalizacyjny MAPK, szlak sygnalizacyjny insuliny i szlak sygnałowy Nf- $\kappa$ B (Silva i wsp., 2017). Najświeższe dane literaturowe wskazują także na modyfikację ekspresji microRNA. Ich poziom ekspresji zmieniał się w astrocytach poddanych ekspozycji na amoniak oraz w mózgu myszy AOM (Oenarto i wsp., 2016; Vemuganti i wsp., 2014). W pierwszym z przytoczonych badań, dotyczyła ona 185 genów potencjalnie regulowanych przez zmieniony poziom microRNA, z czego 43 (m.in. oksygenaza hemowa 1 (HO-1)), o potencjalnie istotnej roli w patomechanizmie EW (Oenarto i wsp., 2016). Natomiast w mysim modelu ostrej EW wykazano zmienionych 470 microRNA, z czego statystycznie istotnie podwyższonych było 37 (w 20 microRNA), a obniżonych 17. Sugeruje się, że mogą one wpływać na białka ścieżek molekularnych obejmujących m.in. szlak Wnt, MAP-k, PI3-k-AKT czy transmisję glutaminergiczną (Vemuganti i wsp., 2014). Zarówno w hodowlach astrocytarnych jak i modelu szczurzym wykazano podwyższony poziom ekspresji mRNA oraz białka HO-1 (Wang i wsp., 2013; Warskulat i wsp., 2002). Dodatkowo traktowanie szczurzych astrocytów pierwotnych z Il-1 $\beta$  powodowało podwyższenie poziomu HO-1 w komórkach (Chastre i wsp., 2010). Sugeruje to, że HO-1 w warunkach EW przyczynia się do pogłębienia stresu oksydacyjnego, który może być częściowo wywołany reakcjami wolnorodnikowymi z udziałem wolnego żelaza produkowanego w wyniku degradacji hemu przez HO-1. Zaobserwowano także, że zahamowanie ekspresji HO-1 przez protoporfirynę cynkową obniża poziom ekspresji APQ-4 i zmniejsza poziom stresu oksydacyjnego, co wydaje się istotnym czynnikiem w patomechanizmie EW, lecz wymaga dodatkowego potwierdzenia (Wang i wsp., 2013; Loboda i wsp., 2008).

Z kolei długotrwała (1-10 dni) ekspozycja astrocytów na amoniak powodowała obniżenie zarówno zewnątrzkomórkowego jak i wewnątrzkomórkowego poziomu trombospondyny 1 (Thrp1). Trombospondyny są dużymi oligomerycznymi białkami macierzy pozakomórkowej, które pośredniczą w oddziaływaniach komórka - komórka i komórka - macierz zewnątrzkomórkowa przez wiązanie szeregu receptorów błonowych, innych zewnątrzkomórkowych białek macierzy i cytokin, modulując w ten sposób proliferację, migrację i apoptozę komórki oraz wpływając na synaptogenezę (Christopherson i wsp., 2005). W hodowlach neuronalnych traktowanych pożywką z hodowli astrocytarnej, wykazano obniżenie ilości białek synaptycznych: synaptofizyny, synaptotagminy i PSD-95, co odwracało dodanie rekombinowanej Thrp1. Dodatkowo w szczurzym modelu przewlekłej EW obserwowano obniżenie ilości Thrp1 oraz synaptofizyny w korze czołowej (Jayakumar i wsp., 2014). Co istotne, w badaniach własnych, niezwiązanych bezpośrednio z przedmiotem

rozprawy, wykazaliśmy obniżenie ekspresji wybranych białek synaptycznych, w tym również synaptofizyny i synaptotagminy we frakcjach błonowych kory czołowej myszy AOM. Równolegle obserwowaliśmy charakterystyczne dla EW zmiany parametrów elektrofizjologicznych, jednak bezpośrednia zależność pomiędzy obniżeniem ekspresji ww. białek, a obniżeniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, obniżeniem średniej częstotliwości czy podwyższeniem amplitudy spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających (sEPSCs) rejestrowanych w neuronach piramidalnych warstwy II/III kory czołowej w pracy nie została wykazana (Popek i wsp., 2018). Nieprezentowane w doktoracie wyniki własne wskazujące na obniżenie poziomu białka Thr1 w korze czołowej myszy z ostrą EW sugerują, że regulowany przez astrocyty poziom Thr1 może być istotnym czynnikiem wpływającym na ilość białek synaptycznych w EW, jednak dokładne wyjaśnienie tej zależności wymaga przeprowadzenia kolejnych badań.

### 3) Wpływ amoniaku na komórki śródbłonka

Komórki śródbłonka naczyń mózgu, będące integralną strukturalną składową BBB, są pierwszą barierą dla wysokich stężeń toksycznego amoniaku. Badania uszkodzeń BBB w EW jako całej struktury, jak i poszczególnych jej składowych są nadal prowadzone. Aktualna wiedza pozwala określić wywołane amoniakiem uszkodzenia w strukturze i funkcji BBB jako subtelne (Pilbeam i wsp., 1983; Chen i wsp., 2009). Wykazano, że morfologia komórek śródbłonka jest zmieniona, komórki są powiększone i obserwuje się pęcherzyki pinocytarne, sugerujące zwiększenie przepuszczalności BBB (Kato i wsp., 1992; Matkowskyj i wsp., 1999). Dodatkowo obserwowano zmiany w funkcji bariery, w szczególności wykazano w różnych modelach EW, wpływ amoniaku na zwiększoną przepuszczalność BBB dla różnych aminokwasów, w tym L-tryptofanu (James i wsp., 1978), L-tyrozyny, L-fenylalaniny (Smith i wsp., 1978) i L-argininy (Albrecht i wsp., 1994, 1996).

Wykorzystując hodowlę komórek linii RBE-4 (ang. *rat brain endothelial cell line 4*), wykazano wywołany pod wpływem inkubacji z amoniakiem wzrost produkcji ROS oraz syntezy glutationu, świadczący o odpowiedzi komórek RBE-4 na stres oksydacyjny. Wzrost stężenia zewnątrzkomórkowych metaloproteinaz MMP-9 i -2 powodował równocześnie zwiększoną przepuszczalność komórek, co było odwracane przez dodanie do hodowli czynnika przeciwutleniającego obniżającego stres oksydacyjny lub obniżenie poziomu amoniaku poprzez dodanie fenylomaślanu ornityny (Skowrońska i wsp., 2012a; Skowrońska i wsp., 2012b). Wykazano także, że komórki śródbłonka mózgu narażone na działanie amoniaku i cytokin prozapalnych mogą uwalniać czynniki, które przyczyniają się do obrzęku astrocytów poprzez aktywację receptora Toll-podobnego 4, tzw. TLR4 (ang. *toll-like receptor*

4). Amoniak aktywując TLR4-zależną ścieżkę sygnalizacyjną powoduje podwyższenie stężenia wapnia w astrocytach, wzmożoną produkcję wolnych rodników, a w konsekwencji prowadzi do obrzmiewania astrocytów (Jayakumar i wsp., 2014).

#### **4) Wpływ amoniaku na neurony**

Toksyczny wpływ amoniaku na neurony jest w dużej mierze minimalizowany poprzez protekcyjne działanie astrocytów. Wiąże się to ze zdolnością astrocytów do neutralizacji wolnych rodników, detoksykacją amoniaku zachodzącą w tych komórkach, oraz z ich działaniem neurotroficznym (Rao i wsp., 2005). Dodatkowo, wywołany amoniakiem wzrost syntezy glutationu w astrocytach może, oprócz celów autoprotekcyjnych, zwiększać dostępność prekursorów do neuronalnej syntezy glutationu. Jest to przykład mechanizmu, który może przyczynić się do względnej oporności neuronów na amoniak (Hilgier i wsp., 2010; Dringen i wsp., 1999). Przyjmuje się, że w warunkach ostrej EW uszkodzenie neuronów jest niewielkie, jednak wykazano martwicę i apoptozę tych komórek u pacjentów z uszkodzeniem wątroby o różnej etiologii, takimi jak: encefalopatia Wernickego, nabyte zwyrodnienie wątroby czy parkinsonizm związany z marskością wątroby. Mechanizmy zidentyfikowane jako potencjalnie zaangażowane w śmierć komórek nerwowych w warunkach niewydolności wątroby obejmują ekscytotoksyczność z udziałem receptora NMDA, kwasicę mleczanową, stres oksydacyjny i obecność cytokin prozapalnych (Butterworth, 2007).

Amoniak wpływa na funkcje neuronów oddziałując na receptory jonotropowe. Wykazano, że zwiększony poziom amoniaku powoduje obniżenie liczby receptorów AMPA, odpowiedzialnych za pobudzenie synaptyczne (Szerb i Butterworth, 1992; Schroeter i wsp., 2015), wywołuje zaburzenia homeostazy jonów, w tym wapnia oraz powoduje depolaryzację błony komórek neuronalnych wpływając na działanie receptora NMDA. Dodatkowo może wpływać na potranslacyjną modyfikację białek poprzez wapniowo-zależny szlak Ras/MAP kinaza/ ERK1/2, który prowadzi do aktywacji jądrowych kinaz Rsk 1-3, mających zdolność fosforylacji białek regulujących transkrypcję (Cruzalegui i Bading, 2000). Jedne z nowszych badań sugerują także wpływ amoniaku na synchronizację pobudzeń pomiędzy poszczególnymi obszarami sieci neuronalnej. Eksperyment przeprowadzony na komórkach izolowanych z kory mózgowej 18-dniowych szczurów wykazał, że amoniak powoduje wzrost aktywności, przy jednoczesnej desynchronizacji globalnej sieci neuronalnej. Co więcej stwierdzono, że astrocytarny metabolizm Gln może być zaangażowany w zwiększoną globalną aktywność sieci, ale nie w jej desynchronizację. Natomiast nadmierna aktywacja



receptorów NMDA może leżeć u podstaw obu zjawisk potwierdzając po raz kolejny, że receptor ten jest zaangażowany w rozwój ostrej EW (Schwarz i wsp., 2012).

### **1.2.3. Patomechanizm objawów klinicznych ostrej EW**

#### **1) Mechanizm powstawania obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym w ostrej EW**

Patologiczne stężenie amoniaku powoduje nadprodukcję Gln, która jest produktem jego detoksykacji. Akumulację tego aminokwasu wykazano w komórkach gleju w OUN, jak i w płynie mózgowo rdzeniowym u pacjentów i w mózgach i płynach ustrojowych zwierząt w modelach EW (Cordoba i wsp., 1996; Tofteng i wsp., 2006). Dodatkowo, wykazano korelację pomiędzy poziomem Gln w mózgu, a stopniem jego obrzęku i zaawansowaniem choroby (Kojic i wsp., 2005; Laubenberger i wsp., 1997; Shawcross i wsp., 2004). Gln wykazuje działanie osmotyczne, a jej wewnątrzkomórkowa akumulacja prowadzi do nierównowagi osmotycznej i jest jedną z przyczyn obrzmiewania astrocytów (Blei i wsp., 1994). Uważa się, że wzmożone uwalnianie innych osmolitów, jak na przykład tauryny (Chepkova i wsp., 2006), czy mio-inozytolu (Cordoba i wsp., 1996) jest mechanizmem kompensacyjnym wobec osmotycznego charakteru działania Gln. Wydaje się jednak, że w ostrej niewydolności wątroby mechanizmy te mogą być niewystarczające, aby zrekompensować szybki wzrost wewnątrzkomórkowej Gln w astrocytach (Ott i Vilstrup, 2014). Dodatkowo efekt osmotyczny gromadzącej się w astrocytach Gln regulowany jest poprzez kanały wodne – akwaporyny AQP-4, kontrolujące dystrybucję wody przez błonę komórkową. Sugeruje się, że pobudzenie przez amoniak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK, mitogen-activated protein kinase), powoduje zwiększenie poziomu AQP-4, co z kolei skutkuje napływem wody do komórki (Wright i wsp., 2010). Wyrównywanie równowagi jonowej odbywa się za pośrednictwem kanałów jonowych, zwłaszcza poprzez kanały potasowe Kir 4.1, zlokalizowane w okolicy naczyń krwionośnych (Nagelhus i wsp., 1999). Wykazano, że wychwyt jonów potasu do komórek za pośrednictwem Kir4.1 zapobiega obrzękowi komórek glejowych w warunkach hiposmotycznych (Pannicke i wsp., 2004; Iandiev i wsp., 2006). Niedawno stwierdzono, że hodowanie szczurzych astrocytów w pożywce z podwyższonym stężeniem Gln skutkuje obniżeniem ekspresji Kir4.1, czego nie zaobserwowano podczas ekspozycji tych komórek na amoniak. Dodatkowo, w szczurzym modelu ostrej EW zaobserwowano również obniżenie ekspresji tego białka, sugerując jego udział w zaburzeniu homeostazy jonowej, co skutkuje wzmocnieniem cytotoksycznej składowej obrzęku i zmniejszeniem wychwytu Glu. W obrębie

komórek, Gln przedostaje się do mitochondriów, gdzie pod wpływem PAG jest rozkładana do Glu i amoniaku. Zgodnie z zaproponowaną przez Albrechta i Norenberga (Albrecht i Norenberg, 2006) hipotezą Konia Trojańskiego, wysokie stężenie powstałego w mitochondriach amoniaku powoduje wystąpienie stresu oksydacyjnego i nitracyjnego. ROS prowadzi do naruszenia przepuszczalności błon mitochondrialnych za pośrednictwem indukcji MPT (ang. *mitochondrial permeability transition*). W konsekwencji następuje utrata potencjału błonowego mitochondriów, uwolnienie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz niektórych białek, co powoduje osmotyczny obrzęk macierzy mitochondrialnej i zahamowanie produkcji energii (Bai i wsp. 2001). Sygnał  $\text{Ca}^{2+}$  indukowany amoniakiem może być sprzężony z podwyższeniem stężenia mitochondrialnego  $\text{Ca}^{2+}$  i tym samym może wyzwać wytwarzanie nadtlenu, który może łączyć się z tlenkiem azotu (NO) do peroksynitrytu (NOOO-). Reaktywne półprodukty azotowe odpowiadają za nitrowanie reszt tyrozyny różnych białek i działają m.in. jako metabolity sygnałowe w celu zwiększenia fosforylacji białek astrocytarnych. Depolaryzacja błony może także usunąć blokadę  $\text{Mg}^{2+}$  receptora NMDA, jednak mechanizmy aktywacji receptora NMDA przez amoniak w astrocytach nie są do końca wyjaśnione (Murthy i wsp., 2001; Schliess i wsp., 2002). Sugeruje się, że nadaktywność neuronalnego receptora NMDA, wywołana m.in. podwyższonym stężeniem Glu powoduje nadprodukcję NO i ROS. Skutkuje to pogłębieniem obrzmienia astrocytów, co zaobserwowano po zastosowaniu MK-801, niekompetycyjnego agonisty receptora NMDA, który skutecznie zredukował obrzmienie astrocytów w skrawkach wyizolowanych z kory mózgowej szczurów poddanych działaniu amoniaku (Zielińska i wsp., 2003). Na innych modelach wykazano, że blokowanie receptora NMDA zapobiega śmierci zwierząt, bez względu na zastosowanie inhibitorów kanałów (MK-801, ketamina), kompetycyjnych agonistów receptora (AP-5), czy też związków hamujących funkcje receptora poprzez działanie w miejscu wiązania glicyny (etanol, butanol) (Marcaida i wsp., 1992; Hermenegildo i wsp., 1996). W tym miejscu należy jednak przypomnieć, że za pierwotną przyczynę produkcji ROS uważa się aktywację oksydazy NADPH (patrz rozdział 2.2.2.2), co sugeruje pogłębienie patologii EW wskutek uszkodzenia mitochondriów, zgodnego z hipotezą Konia Trojańskiego (Reinehr i wsp., 2007). W odniesieniu do powyżej opisanych mechanizmów zasadne wydaje się postawienie hipotezy zakładającej, że główną konsekwencją podwyższonego stężenia Gln w warunkach ostrej EW jest wystąpienie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu.

## 2) Nierównowaga pomiędzy neurotransmisją pobudzającą i hamującą w EW

Objawy klinicznej w ostrej EW wynikają w dużej mierze z nierównowagi między neurotransmisją pobudzającą i hamującą (Zimmermann i wsp., 1989; Jones i wsp., 1984; Monfort i wsp., 2002). W modelach ostrych wykazano wzmożoną pobudliwość układu glutaminergicznego, co potwierdziły doświadczenia z użyciem inhibitorów głównego ionotropowego receptora Glu – receptora NMDA. Zastosowanie memantyny w szczurzym modelu całkowitego niedokrwienia wątroby skutkowało poprawą stanu neurologicznego zwierząt, normalizacją parametrów EEG, a także obniżeniem stężenia Glu (Vogels i wsp., 1997). Istotne w kontekście właściwej pracy receptorów błonowych jest wykazane podwyższone stężenie zewnątrzkomórkowego Glu zarówno u pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby (Tofteng i wsp., 2002), jak i modelach ostrej EW, m.in. galaktozaminowym modelu króliczym (Hamberger i wsp., 1984; de Knecht i wsp., 1994), tioacetamidowym modelu szczurzym (McArdle i wsp., 1996; Hilgier i Olson, 1994.), czy badaniach własnych wykonanych z wykorzystaniem azoxymetanowego modelu mysiego (Popek i wsp., 2018). Wysokie stężenie uwolnionego do szczelin synaptycznych Glu prowadzi do nadmiernego pobudzenia receptora NMDA. Dodatkowo, pobudzenie receptora może być wywołane wysokim stężeniem L-glicyny, która jest jego modulatorem, a której podwyższone stężenie zewnątrzkomórkowe stwierdzono w modelu ostrej EW (Michalak i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1999). Na jego aktywność może wpływać także zahamowanie syntezy kwasu kynureninowego, antagonisty jonotropowych receptorów glutaminianowych, co wykazano w szczurzym modelu hiperamonemicznym i skrawkach kory mózgowej szczurów poddanych działaniu amoniaku (Saran i wsp., 1998). Receptor NMDA tworzy kompleks z białkiem gęstości postsynaptycznej 95 i neuronalną izoformą syntetazy tlenu azotu (Christopherson i wsp., 1999), a konsekwencją jego aktywacji jest zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego wolnego wapnia, który po związaniu z kalmoduliną aktywuje syntazę tlenu azotu (NOS), prowadząc do syntezy tlenu azotu (NO) (Garthwaite i wsp., 1988). Patologiczne stężenie NO prowadzi do akumulacji nadtlenu i redukcji aktywności enzymów antyoksydacyjnych, a to z kolei do wystąpienia stresu oksydacyjnego i uszkodzenia komórek nerwowych. Wykazano, że użycie inhibitora syntetazy NO - nitroargininy w szczurzym modelu hiperamonemii, przywraca aktywność enzymom antyoksydacyjnym i obniża poziom nadtlenu (Kosenko i wsp., 1998). Wzrost aktywności receptora NMDA wpływa także na aktywność NMDA-zależnej ścieżki sygnalizacyjnej Glu-NO-cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cGMP). W prawidłowo funkcjonującym mózgu, produkcja NO w części postsynaptycznej powoduje aktywację cyklazy guanylanowej, która katalizuje syntezę cGMP uwalnianego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

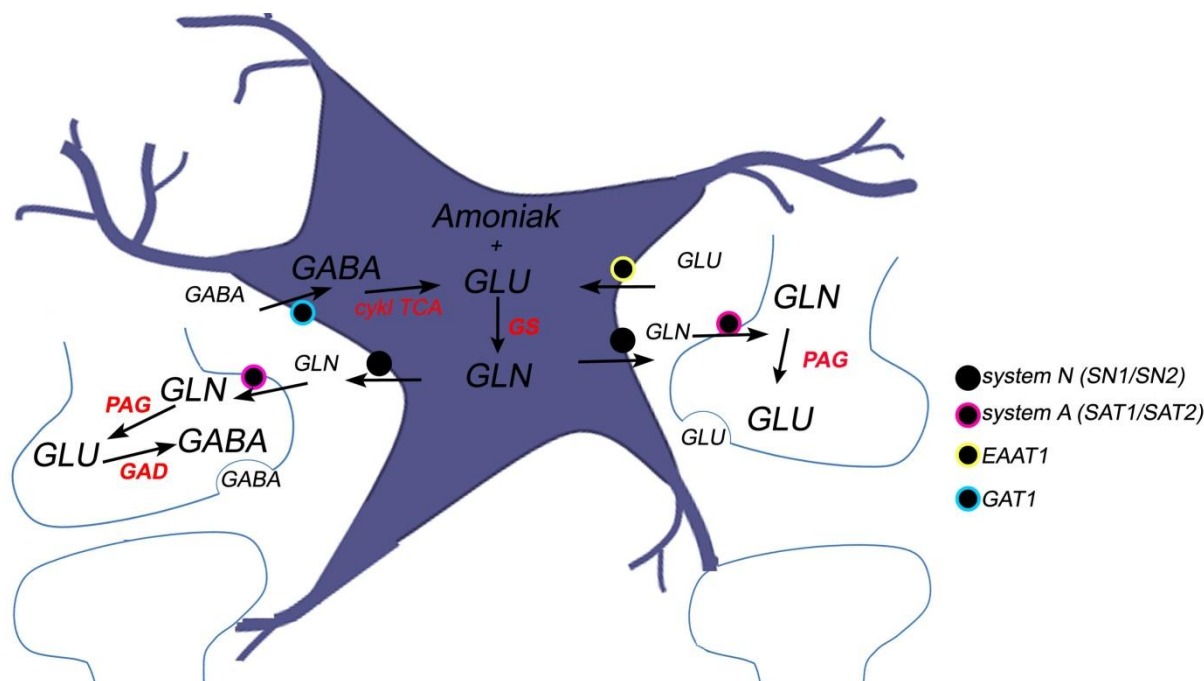
Zewnątrzkomórkowy cGMP jest dobrym wskaźnikiem nadmiernej stymulacji receptorów NMDA w mózgu (Kosenko i wsp., 2003, Hermenegildo i wsp. 2000, Hilgier i wsp. 2004). Dodatkowo stymulacja receptora NMDA może wpłynąć na aktywność  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazy a co za tym idzie prowadzić do wyczerpania zapasów ATP (Marcaida i wsp., 1996), a także powodować degradację białka towarzyszącego mikrotubulom (MAP-2) odpowiedzialnego za obniżenie polimeryzacji mikrotubul, co skutkuje zaburzeniem transportu pęcherzyków przez aksony (Felipo i wsp., 1993). Inny receptor jonotropowy - AMPA, bierze udział w tzw. szybkim przekąźnictwie synaptycznym, a obniżenie jego aktywności może przekładać się na parametry elektrofizjologiczne, jak obniżenie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Wen i wsp., 2013; Popek i wsp., 2018). W hipokampie szczurów w modelu hiperamonemicznym wykazano obniżenie poziomu ekspresji podjednostki receptora AMPA – GluA1 i podwyższenie GluA2 oraz obniżenie fosforylacji obu podjednostek odpowiednio na serynie 831 i 880. Dodatkowo wykazano, że zmiany te mogą być regulowane między innymi przez podwyższone stężenie cytokiny IL-1 $\beta$ , która pośrednio aktywuje cytoplazmatyczną kinazę tyrozynową src, odpowiedzialną za opisane zmiany (Taoro-Gonzalez i Felipo, 2018; Hernández-Rabaza i wsp., 2016). W modelach ostrej EW zanotowano obniżenie ilości miejsc wiązania ligandów receptorów AMPA oraz kainowego (Michalak i Butterworth, 1997).

W modelach ostrej EW główną uwagę kieruje się na nadmierną stymulację receptora glutaminergicznego, marginalizując rolę receptora GABA-ergicznego. Wysuwano hipotezy, że rozszczelnienie BBB sprzyja przenikaniu GABA pochodzącego z przewodu pokarmowego, zaś zwiększona liczba receptorów GABA w mózgu stwierdzona w niewydolności wątroby zwiększa wrażliwość mózgu na neuronalne hamowanie GABA-ergiczne, oraz że zwiększona liczba miejsc wiążących ligandy pośredniczy w zwiększonej wrażliwości na benzodiazepiny i barbiturany (Jones i wsp., 1984). Obserwacje te jednak potwierdzono wykorzystując niewielką liczbę modeli zwierzęcych ostrej EW i wymagają dalszych badań. W warunkach przewlekłej EW wypadkowa działania (netto) neurotransmisji pobudzającej i hamującej jest przesunięta w kierunku hamującej (Albrecht i Jones, 1999), co tłumaczone jest nadmierną stymulacją receptorów GABA-ergicznych.

Duże znaczenie w regulacji pracy kompleksów receptorowych GABA/benzodiazepinowych przypisuje się stężeniom neurosteroidów, w tym pregnenolonu i metabolitom progesteronu, tetrahydroprogesteronowi (allopregnanolon) i tetrahydrodoksykortykosteronowi (THDOC). U pacjentów z uszkodzeniem wątroby zaobserwowano we krwi podwyższony poziom progesteronu (Farthing i wsp., 1982), który w normalnych warunkach jest metabolizowany przez wątrobę. Zarówno progesteron jak i inne neurosteroidy mogą przenikać przez BBB

w warunkach EW (Zhu i wsp., 2001), przez co zmiany w ich stężeniu obwodowym mogą przekładać się na ich stężenie w mózgu. W eksperymentalnych modelach ostrego uszkodzenia wątroby zaobserwowano wzrost stężenia wymienionych wyżej neurosteroidów w różnych regionach mózgu (Bosman i wsp., 2015). Inne, niewynikające bezpośrednio z uszkodzenia wątroby mechanizmy, które prowadzą do wzrostu stężeń neurosteroidów w mózgu w ostrej EW nie są jeszcze dobrze znane, jednak sugeruje się, że mogą obejmować neurosteroidogenezę *de novo* po aktywacji mitochondrialnego receptora PBR. Podwyższenie poziomu ekspresji tego receptora zaobserwowano między innymi w modelu ostrej EW (Bélanger i wsp., 2005; Butterworth, 2010), zaś bezpośrednią tego przyczyną może być patofizjologiczne stężenie amoniaku i cytokin prozapalnych oddziałujących na astrocyty. Aktywacja miejsc wiążących receptora PBR powoduje zwiększenie transportu cholesterolu do mitochondrium, a następnie stymulację szlaku metabolicznego kończącego syntezą allopregnanolonu i THDOC, dwóch neurosteroidów o silnie dodatnim allosterycznym działaniu modulującym kompleks receptora GABA-A (Ahboucha i wsp., 2012).

### 1.3. Cykl glutamina-glutaminian/GABA



Ryc.1.3. Schemat przedstawiający cykl glutamina-glutaminian/GABA.

Cykl Gln-Glu/kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) jest kluczowy dla syntezy głównego neuroprzekaźnika pobudzającego – Glu, oraz hamującego GABA. Zarówno zaburzenia syntezy Gln – centralnego aminokwasu cyklu (Jayakumar i wsp., 2016), jak i nieprawidłowości w transporcie któregośkolwiek z aminokwasów (Leke i wsp., 2016), wpływają na poziom pozostałych. Świadczy to o ścisłej zależności pomiędzy astrocytami a neuronami. Uwalnianie syntetyzowanej w astrocytach Gln odbywa się przy udziale swoistych transporterów tego aminokwasu – systemu ASC, L oraz N, z których ten ostatni jest najwydajniejszym specyficznym transporterem Gln (Mackenzie i Erickson, 2004). Część tego aminokwasu z przestrzeni międzykomórkowej jest wychwytywana do otaczających neuronów przez transportery systemu A (SAT1 i SAT2) (Melone i wsp., 2004, 2006) i służy do produkcji neuroprzekaźników. Glu powstaje z Gln, w wyniku reakcji katalizowanej przez glutaminazę (PAG). Następnie Glu jest uwalniany do szczeliny synaptycznej pobudzając receptory na błonie postsynaptycznej. Z przestrzeni synaptycznej Glu wychwytywany jest przez astrocyty przy udziale transporterów EAAT1 i ponownie zużywany w reakcji z amoniakiem do produkcji Gln zamykając cykl. Połączona z cyklem Krebsa synteza GABA-y zachodzi przy udziale enzymu – dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD) w reakcji z Glu. GABA jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym, oddziałując na swoiste receptory powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej (hamowanie postsynaptyczne), oraz może wpływać na uwalnianie neuroprzekaźników w synapsach (hamowanie presynaptyczne) (Walls i wsp., 2015). Recykling GABA może odbywać się dwiema drogami: może być powrotnie wychwycony przez neuron i gromadzony w pęcherzykach synaptycznych do ponownego użycia, lub zostać wychwycony przez astrocyty, gdzie w wyniku kilku przemian chemicznych, w tym cyklu Krebsa, jest przekształcany do Gln.

W szczurzym modelu ostrej EW, w korze czołowej i mózdzku, zaobserwowano pobudzenie aktywności cyklu Gln-Glu, co tłumaczone jest wysokim stężeniem metabolizowanego amoniaku, a skutkuje utrzymaniem właściwego stężenia amoniaku i Glu (Singh i wsp., 2014). Nierównowaga między stężeniem neurotransmiterów może wynikać z wysokich stężeń Gln oraz zaburzeń w aktywności lub/i ekspresji transporterów Gln, które szerzej omówione zostaną w kolejnych rozdziałach. Także zaburzenia aktywności enzymów katalizujących przemiany Gln, Glu i GABA mogą leżeć u podłoża zmian aktywności cyklu. Pomimo wzrostu poziomu Gln w OUN w warunkach hiperamonemii, nie zauważono zmian ekspresji enzymu katalizującego reakcję syntezy Gln (Desjardins i wsp., 1999), natomiast wykazano zmniejszoną o 1/3 aktywność GS (Desjardins i wsp., 1999). Spadek aktywności GS w tych

warunkach może być wywołany nadprodukcją ROS, odpowiedzialnych za nitrację reszt tyrozyny, co skutkuje obniżeniem aktywności katalitycznej GS (Schliess i wsp., 2002). Wysokiemu stężeniu amoniaku oraz Gln w szczurzym modelu EW towarzyszy wzrost ekspresji i aktywności PAG, zlokalizowanej w mitochondriach kory czołowej, zwojach podstawnych i mózdzku (Romero-Gomez i wsp., 2006). Może się to przekładać na wzrost poziomu Glu oraz amoniaku w neuronach. Obniżony poziom ekspresji astrocytarnych transporterów Glu (EAAT-2/GLT-1 i EAAT-1/GLAST) może z kolei odpowiadać za nieprawidłowy wychwyt tego aminokwasu ze szczelin synaptycznych i zaburzenia cyklu Glu-Gln. Dane dotyczące szczurzych hodowli astrocytarnych oraz szczurzego modelu hiperamonemii wykazują indukowane amoniakiem obniżenie poziomu ekspresji mRNA oraz białka obu transporterów (Vaquero i Butterworth, 2006; Dąbrowska i wsp., 2017) sugerując ich udział w zewnątrzkomórkowym gromadzeniu się Glu. Najnowsze badania przeprowadzone na mysim modelu ostrej EW oraz mysich hodowlach astrocytarnych i hodowlach mieszanych astrocytarno-neuronalnych sugerują jednak, że ekspresja transporterów Glu może nie ulegać zmianie (w przypadku GLT-1 w mysim modelu) lub być podwyższona (w przypadku GLAST w mysim modelu i obu transporterów w hodowlach mieszanych) (Dąbrowska i wsp., 2017). Autorzy sugerują, że kwestia ich udziału w zewnątrzkomórkowej akumulacji Glu wymaga dalszych badań, a mechanizmami zaangażowanymi w ten proces mogą być nierównowaga jonowa wynikająca z zaburzonej ekspresji kanałów Kir4.1 (patrz rozdz. 2.2.3.1), zmieniona aktywność sodowo/potasowych wymienników NKCC1 (Jayakumar i wsp., 2008), a także wapniowo-zależny wyrzut Glu z astrocytów (Rose i wsp., 2005). Receptorami, które mogą regulować uwalnianie niektórych neurotransmitterów z astrocytów są receptory efryny (EphR), należące do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych. Te transbłonowe białka po związaniu z ligandami pochodzącymi z sąsiedniej komórki aktywują dwukierunkową kaskadę sygnałową. W dorosłym mózgu pośredniczą w przekazywaniu informacji między astrocytami, a neuronami, regulując tworzenie synaps i wpływając na plastyczność synaptyczną (Goldshmit i wsp., 2006). Efryny mogą silnie wpływać na neurotransmisję poprzez stymulację uwalniania Glu i D-seryny z astrocytów oraz wychwyty Glu ze szczeliny synaptycznej. Wykazano, że w hodowlach astrocytarnych traktowanych amoniakiem dochodzi do zmian w poziomach ekspresji genów różnych izoform EphR, spośród których największe znaczenie może mieć EphR A4, której poziom ekspresji zarówno na poziomie mRNA jak i białka był podwyższony. Podobne wyniki zaobserwowano w materiale *post mortem* pozyskanym od pacjentów z marskością wątroby, co może sugerować potencjalne implikacje do zaburzeń neurotransmisji w EW (Sobczyk i wsp., 2015).

## 1.4. Transport glutaminy w OUN

Niezaburzony transport Gln, jednego z kluczowych aminokwasów cyklu Gln-Glu/GABA między astrocytami a neuronami jest konieczny dla prawidłowego funkcjonowania cyklu i neurotransmisji. Zmiany aktywności i funkcji transporterów astrocytarnych Glu i Gln wydają się przyczyniać do upośledzenia neurotransmisji glutaminergicznej, i jednocześnie obrzęku mózgu, dwóch głównych objawów obserwowanych w rozwoju ostrej EW (Zielińska i wsp., 2014; Takahashi i wsp., 1991; Bjørnsen i wsp., 2014; Chaudhry i wsp., 2002; Dąbrowska i wsp., 2017). Wiedza na temat szczegółów mechanistycznych jest ograniczona.

### 1.4.1. Transportery glutaminy

Nośniki pośredniczące w transporcie Gln między astrocytami a neuronami są ważnym czynnikiem wpływającym na neurotransmisję. Transport Gln jest regulowany głównie przez systemy zależne od sodu, N, ASC i A (Palacín i Kanai, 2004) oraz niezależny od sodu system L (Solbu i wsp., 2010; Bode, 2001). Transportery wykazują specyficzną lokalizację komórkową, systemy N i ASC występują na błonach astrocytów, system A może być obecny zarówno w astrocytach jak i neuronach, podczas gdy system L jest związany tylko z neuronami. Nośniki przenoszące Gln różnią się od siebie swoistością substratową, zależnością od pH, jonów i energii, kinetyką transportu oraz mogą być regulowane przez inne czynniki zewnętrzne.

### 1.4.2. System N

System N został opisany po raz pierwszy w 1980 roku jako wątrobowy transporter Gln, asparaginy i histydyny (Kilberg i wsp., 1980), a następnie, zauważono jego obecność w na błonie komórkowej astrocytów (Chaudhry i wsp., 1999). Oprócz wątroby i mózgu zaobserwowano jego obecność w innych narządach, m.in. mięśniach, nerkach, żołądku, płucach, śledzionie. Głównymi przedstawicielami układu N są astrocytarne białka SN1 i SN2, z których SN1 występuje bardziej powszechnie (Chaudhry i wsp., 1999; Mackenzie i Erickson, 2004). Transportery SN7 i SN8 są obecne również na błonie neuronów (Hägglund i wsp., 2015; Bagchi i wsp., 2014), lecz ich udziałowi w rozwoju EW nie przypisuje się obecnie ważnej roli. SN1 i SN2 są kodowane odpowiednio przez geny *Slc38a3* oraz *Slc38a5*. System N charakteryzuje się wąską swoistością substratową transportując Gln, histydyne, asparaginę i serynę. Jest zależny od jonów sodu oraz jonów wodoru. Wykazano, że jest hamowany przy niskim pH (Bode, 2001). Zgodnie z tymi zależnościami, aminokwasy są przenoszone wraz z jonami sodu w jednym kierunku, natomiast jony wodoru w przeciwnym. Wykazuje on także tolerancję na zastąpienie jonów sodu jonami litu (Nagaraja i Brookes,



1996). Izoformy SN1 i SN2 mają duże powinowactwo do transportu Gln, jednak mają inne preferencje substratowe. Podczas gdy SN1 preferuje transport histydyny i asparaginy, SN2 wykazuje większą swoistość dla seryny. SN2 posiada sekwencję podobną do SN1 w 61% , a jego funkcje nie są do końca poznane. Jego ekspresja w ośrodkowym układzie nerwowym jest nierównomierna. Największy poziom tego białka zlokalizowano w korze nowej, hipokampie, prążkowie i rdzeniu kręgowym, natomiast umiarkowany we wzgórzu, podwzgórzu i pniu mózgu. Posiada mniejszą swoistość substratową do Gln niż druga izoforma, dlatego wydaje się, że to SN1 jest głównym astrocytarnym transporterem Gln. SN1 może przenosić ten aminokwas w obu kierunkach w zależności od jej stężenia po obu stronach błony i gradientu jonów  $H^+$ . Jednak wykazano, że izoforma ta jest najczęściej zlokalizowana w komórkach glejowych sąsiadujących z synapsami glutaminergicznymi i GABAergicznymi, co sugeruje udział transportera w dostarczaniu substratu do produkcji neuroprzekaźników i preferencję do transportu aminokwasu na zewnątrz komórki. Stwierdzono także, że SN1 charakteryzuje się wysoką aktywnością przy fizjologicznym stężeniu Gln, predyspozycją do transportu Gln na zewnątrz komórki niezależnie od występowania innych aminokwasów obojętnych oraz wzrostem aktywności zależnym od zwiększonego stężenia Glu. W związku z tym uznaje się, że transporter SN1 jest najbardziej wydajnym transporterem Gln w astrocytach (Albrecht i wsp., 2007; Mackenzie i Erickson, 2004). SN1 może być regulowany zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. Do tej pory wykazano, że kinaza białkowa C fosforyluje serynę 52 transportera SN1 regulując jego degradację i kotwiczenie do błony komórkowej (Nissen-Meyer i wsp., 2013; Nissen-Meyer i wsp., 2011). Zaobserwowano także, że istotną rolę w regulacji ekspresji SN1 może pełnić czynnik transkrypcyjny Sp1, który reguluje ekspresję SN1 w nerkach myszy w warunkach kwasicy metabolicznej (Balkrishna i wsp., 2014). Dodatkowo na podstawie badań własnych stwierdziliśmy, że w warunkach EW w szczurzym modelu tioacetamidowym dochodzi do obniżenia ekspresji SN1 na poziomie białka (Zielińska i wsp., 2014). W związku z tym, że jest on odpowiedzialny za transport aminokwasu na zewnątrz komórki, a tym samym dostarczenie substratu w cyklu Gln-Glu/GABA, może wpływać na powstawanie objawów klinicznych obserwowanych w rozwoju EW. Kluczowa zatem może okazać się jego rola w powstawaniu obrzęku mózgu oraz zaburzeń neurotransmisji.

## **2. HIPOTEZA I CELE PRACY**

### **HIPOTEZA:**

Deficyt transportera SN1 powoduje zmiany w parametrach elektrofizjologicznych charakteryzujących neurotransmisję glutamatergiczną oraz obrzęk kory czołowej mózgu o charakterze cytotoksycznym, głównych klinicznych objawach obserwowanych w ostrej EW.

### **CELE:**

1. Wykazanie zmian w parametrach elektrofizjologicznych oraz obecności cytotoksycznej i naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu w korze czołowej myszy w azoksymetanowym (AOM) modelu ostrej EW.
2. Zbadanie, czy wyciszenie transportera glutaminy SN1 techniką *vivo-morpholino* u zwierząt zdrowych odtworzy: a) zmiany elektrofizjologiczne oraz b) powstawanie obrzęku kory czołowej obserwowane w modelu ostrej EW.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Modele badawcze:

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone za zgodą lokalnej komisji etycznej ds. Doświadczeń na zwierzętach w Warszawie zgodnie z pozwoleniem o numerze 55/2015. Szacowana liczba zwierząt wykorzystanych w eksperymentach to 200 samców myszy C57BL/6 (kolonia zwierząt IMDiK, Polska Akademia Nauk w Warszawie), o masie ciała  $27,0 \pm 5,1$  g. Myszy miały swobodny dostęp do wody i karmy i były trzymane w stałej temperaturze, wilgotności i w 12-godz. cyklu światło-ciemność. Jeśli nie podano inaczej, doświadczenia przeprowadzono w 22 godz. po iniekcji AOM, u myszy w modelu KO-SN1 w 96 godz. po implantacji pompy osmotycznej. Wybór punktów czasowych był oparty na wynikach neurologicznych myszy.

- 1) **MODEL AOM**– Badania wykonano na samcach myszy C57BL6 w wieku od 2-3 miesięcy. Ostłą niewydolność wątroby wywoływano przez jednorazowe, dootrzewnowe podanie hepatotoksyny – azoksymetanu (AOM, Sigma-Aldrich) w dawce 100 mg na kg masy ciała zwierzęcia. Przez cały czas trwania eksperymentu zwierzęta były obserwowane przez wykwalifikowaną osobę. W celu zapobieżenia hipotermii zwierzętom zapewniono dodatkowe źródło ciepła w postaci maty grzewczej umieszczonej pod klatką. Aby nie dopuścić do wystąpienia hipoglikemii u zwierząt w modelu AOM, co 8-10 godz. dootrzewnowo podawano 5% roztwór glukozy w soli fizjologicznej, w celu uzupełnienia elektrolitów, natomiast zwierzęta kontrolne otrzymywały odpowiednią objętość soli fizjologicznej. Zwierzęta dekapitowano po ok. 22-24 godz. od podania AOM, po ich uprzednim uśpieniu przy użyciu izofluranu (Baxter). W 2009 roku model AOM został zarekomendowany przez ISHEN do badań patomechanizmu ostrej EW (Butterworth i wsp., 2009). Wybrany model odtwarza kolejne stadia EW oraz dobrze odwzorowuje występowanie najważniejszych objawów klinicznych ostrej EW, tj. zmiany w parametrach biochemicznych (podwyższony poziom amoniaku oraz cytokin prozapalnych w osoczu), a także występowanie obrzęku kory czołowej mózgu. W Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN został on wprowadzony wraz z rozpoczęciem realizacji zadań zaplanowanych w niniejszej pracy doktorskiej.

**2) MODEL SN1 VM (*vivo-morpholino*)** – Badania wykonano na samcach myszy C57BL6 w wieku od 2-3 miesięcy, o masie 25-32g. Myszy były trzymane w pomieszczeniu, w którym przeprowadzano doświadczenia na 3 dni przed rozpoczęciem procedur i przeprowadzono handling, mający zapewnić maksymalny komfort zwierzętom. Mysz usypiano wziewnie mieszanką 4% izofluranu i powietrza, a następnie umieszczano zwierzę w stoliku stereotaktycznym i unieruchamiano. Po upewnieniu się, że mysz nie odczuwa bólu (podczas procedury zwierzę było uśpione 1,5-2% izofluranem) dezynfekowano skórę 70% etanolem i wykonywano niewielkie nacięcie skóry głowy. Fragment czaszki oczyszczano, a następnie za pomocą peanu, w okolicy grzbietowej, pod skórą zwierzęcia, przygotowano miejsce na pompę osmotyczną (Alzet). W czaszce zwierzęcia nawiercano niewielki otwór (koordynaty zgodne z atlasem stereotaktycznym - AP +2.0, ML -1.0, DV -1.5) (Paxinos i Franklin, 2012). Przygotowaną 24 godz. wcześniej pompę (wypełnioną i umieszczoną na noc w soli fizjologicznej o temp. 37°C w celu wymuszenia osmozy) umieszczono pod skórą zwierzęcia. W celu wyciszenia białka SN1 stosowano oligonukleotydy o sekwencji: 5'ATGGCTCAGAGACCACCCAGAACA3' lub 5'CTGCTCTCACACTGACAGTCAGGTA3'; (Gene-Tools LLC Summerton Way Philomath, OR, USA) w stężeniu 1,2 mg/kg/dzień przez 4 dni, szybkość przepływu 0,25 µl/godz. Obie sekwencje selektywnie wyciszały białko SN1. Do większości badań zastosowano pierwszą sekwencję. Natomiast u zwierząt kontrolnych pompę wypełniano solą fizjologiczną lub oligonukleotydami niewyciszającymi SN1, o sekwencji różniącej się w stosunku do sekwencji wyciszającej (5'ATGCCTCACACACCACCCGACAACA3'), obie sekwencje nie powodowały zmian w badanych później parametrach (patrz Wyniki). Wylot kaniuli umieszczano w przygotowanym wcześniej miejscu w korze czołowej myszy i przytwierdzano ją do czaszki za pomocą szybko schnącego kleju Loctite 464. Pozostałą przestrzeń zabezpieczano. Obligatoryjnie podawano podskórnie środek przeciwbólowy (Ketonal; 2,5 mg/kg m.c.). Po wybudzeniu kontrolowano stan zdrowotny myszy pod kątem oznak bólowych i ewentualnych komplikacji pooperacyjnych. Dalsze badania wykonywano po 96 godz. od zaimplantowania pompy.

### **3.2. Metody:**

#### **1) Enzymatyczne oznaczanie enzymów wątrobowych i amoniaku w surowicy**

Zwierzę dekapitowano w uśpieniu stosując wziewnie izofluran (4% w powietrzu). Pobierano około 1 ml krwi pobierano bezpośrednio do probówki Eppendorf i pozostawiano na 20 min do utworzenia skrzepu. Próbkę odwirowywano przy prędkości 8000 xg przez 6 min otrzymując surowicę (supernatant). Następnie, stosując testy enzymatyczne dla amoniaku, aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST), zgodnie z dostarczonym przez producenta protokołem przeprowadzono reakcję i mierzono absorbancję przy użyciu spektrofotometru Ultrospec III (Pharmacia Biotech; Uppsala, Szwecja), przy długości fali 340 nm co 60 sekund przez 2 min w 37 ° C. Do reakcji używano po 100 µl surowicy a objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 1000 µl. Każdą próbkę mierzono w 3 powtórzeniach i liczono średnią. W oparciu o różnicę absorbancji w czasie ( $\Delta$ abs/min) wyniki wyrażono jako IU/l dla aktywności enzymów i w µg/ml dla stężenia amoniaku.

#### **2) Pomiar stężenia wybranych cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$ i IL-6 w surowicy**

Krew pobierano bezpośrednio do probówki Eppendorf i po utworzeniu skrzepu odwirowano przy prędkości 8000 xg przez 6 min. Test immunologiczny oparty na mikrosferach (cytometryczny układ kulek (CBA), BD Biosciences) przeprowadzono zgodnie z protokołem komercyjnym z modyfikacjami (<http://www.bio-rad.com/en-uk/category/cell-sorting?ID=OK1GR1KSY>; Baran, 2008). W skrócie, sześć populacji mikrosfer o wyraźnych intensywnościach fluorescencyjnych barwiono przy użyciu barwników (emisja 650 nm). Kulki te zostały pokryte przeciwciałami przeciwko cytokinom i zmieszane z rekombinowanymi wzorcami lub surowicą i przeciwciałami cytokinowymi sprzężonymi z fikoerytryną (PE) (emisja 585 nm) w celu utworzenia kompleksów kanapkowych. Wstępne ustawienia przyrządów wyznaczono za pomocą kulek do ustawiania cytometru (BD) zgodnie z instrukcjami producenta; 2000 zdarzeń zostało zmierzonych i przeanalizowanych. Populację monomerycznej mikrosfery bramkowano na rozpraszaczach przednich i bocznych. Dane analizowano na wykresach punktowych, dwukolorowych fluorescencyjnych, reprezentujących różne populacje mikrosfer (emisja 650 nm) i stężenie cytokin (zgodnie z emisją PE 585 nm). Mierzono średnie wartości intensywności fluorescencji. Zastosowano czteroparametryczne krzywe kalibracji logistycznej, a wyniki wyrażono jako pg/ml.

### 3) Ocena aktywności ruchowej myszy

Ocenę aktywności ruchowej myszy wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Behawioralno-Metabolicznym. Zwierzęta umieszczano indywidualnie w klatkach (43 x 27 x 15 cm) ze świeżą ściółką, przykrytych metalową siatką o rozmiarach oczek 1x1 cm, aby umożliwić obserwację z góry. W trakcie przeprowadzania eksperymentu pomieszczenie było oświetlone słabym czerwonym światłem. Zwierzęta były rejestrowane przez kamerę na podczerwień acA1300-60NIR (Bassler AG, Niemcy) przez 4 godz., a dalszą analizę przeprowadzono przy pomocy Ethovision XT 10 (Noldus Information Technology, Holandia). Oceniano odległość (mierzoną w cm) jaką zwierzęta pokonały w 15-minutowych interwałach czasowych, a także ogólną ruchliwość zwierząt obejmującą czas w ruchu/bezruchu (brak zmiany miejsca w klatce), szybkość poruszania się (w cm/s), oraz częstotliwość ruchu/bezruchu zwierząt.

### 4) Ocena stanu neurologicznego

Ocenę stanu neurologicznego myszy wykonywano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Behawioralno-Metabolicznym. Stan neurologiczny określono w grupie myszy (n=12) przez ocenę odruchów: rogówkowego, wrażliwości małżowiny usznej, wibrynowego, wyprostnego oraz strachu i zaburzenia równowagi, przyznając każdorazowo punkty: 0 dla braku widocznych odruchów, 1 dla odruchu słabego lub opóźnionego lub 2 dla odruchu prawidłowego, co dało ocenę neurologiczną w zakresie od 0 do 12. Odruchy mierzono co 2 godz. po dootrzewnowym podaniu AOM. Odruch rogówkowy oceniano, dotykając oko zanurzonym w soli fizjologicznej bawełnianym patyczkiem i obserwując reakcję mrugnięcia (Belanger i wsp., 2006; Crawley, 2007). Określając odruch wrażliwości małżowiny usznej, płatek ucha dotykano bawełnianym patyczkiem i obserwowano cofnięcie małżowiny usznej (Crawley, 2007; Corne, 1963). Oceniając reakcję wibrynową, wąsiki były dotykane szczoteczką i obserwowano ruch głowy zwierzęcia (Corne, 1963; Ossato i wsp., 2015). Odruch strachu badano powodując nagły, nieoczekiwany hałas za osobnikiem i oceniając jego reakcję (Matkowsky i wsp., 1999; Papadopoulos i Verkman, 2005). Odruch wyprostny zmierzono poprzez umieszczenie myszy na plecach i ocenę szybkości powrotu zwierzęcia do pozycji wyjściowej (Crawley, 2007; Jaholkowski i wsp., 2011). Odruch zaburzenia równowagi był testowany poprzez umieszczenie osobnika pojedynczo w klatce bez ściółki i szybkie poruszanie nią w kilku kierunkach, oceniając jak zwierzę radzi sobie z zachowaniem równowagi (Crawley, 2007; Rangroo Thrane i wsp., 2013).

## 5) Badanie szczelności BBB

Stopień uszkodzenia BBB zbadano wykorzystując właściwości błękitu Evansa (EB). Do żyły ogonowej wstrzykiwano 2% roztwór EB zawieszony w roztworze soli buforowanym fosforanami (PBS, o składzie: 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7,4) i pozwolono na cyrkulację odczynnika w organizmie przez 2 godz. W celu wykonania perfuzji, zwierzę znieczulano ogólnie poprzez dootrzewnowe podanie mieszanki ksylazyny (7,5-16 mg/kg i.p.) i ketaminy (90-100 mg/kg i.p. to jest 0,9 do 1,0 ml/kg). Po upewnieniu się, że nie jest ono wrażliwe na żadne bodźce zewnętrzne i nie odczuwa bólu, umieszczano je na plecach, unieruchamiając kończyny tak aby ułatwić dostęp do okolic klatki piersiowej i brzucha. Szybkim nacięciem okolic żeber odsłaniano serce i wprowadzano igłę w koniuszek serca, tak by znajdowała się ona w lewej komorze. Nacinano żyłę główną górną, jednocześnie rozpoczynając perfuzję z heparyną (100 IU/ml) w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl); przepływ wymuszony był grawitacyjnie. Czynność przeprowadzano aż do całkowitego wypłukania barwnika (do momentu aż wypływający płyn był bezbarwny). Próbkki tkanki (ok. 40 mg kory i ok. 10 mg hipokampa) ekstrahowano na lodzie i ważono w celu późniejszej normalizacji, a następnie homogenizowano ręcznie homogenizatorem typu teflon/szkło, na lodzie, w 50% kwasie trichlorooctowym (tak aby otrzymać 30% homogenat). Odwirowywano w temperaturze 4°C (15000 xg przez 15 minut). Absorbancję supernatantów mierzono w 2 powtórzeniach, przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego (MR680, Bio-Rad) przy długości fali 620 nm. Wyznaczenie stężenia EB w próbkach poprzedzono wyznaczeniem krzywej standardowej, w zakresie stężeń 0,034 – 0,100  $\mu\text{g}$  EB/200  $\mu\text{l}$  50% kwasu trichlorooctowego, na podstawie której wyznaczano stężenie EB w poszczególnych próbkach, które później przeliczono na gram tkanki użytej do pomiaru.

## 6) Analiza obrzęku przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego

Doświadczenia przeprowadzono we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego Małych Zwierząt. Obrazy uzyskano ze zwierząt grupy kontrolnej, kontrolnej dla myszy wyciszonych K VM, grupy SN1 VM oraz grupy zwierząt z wywołaną podaniem AOM ostrą EW. Mózgi skanowano za pomocą systemu Bruker BioSpec 70/30 Avance III pracującego przy 7T, z transmitującą cylindryczną cewką o częstotliwości radiowej (wewnętrzna średnica 8,6 cm) i odbiorczą cewką matrycową dedykowaną do mózgow myszy (2x2 elementy) umieszczoną nad głową zwierzęcia. Zwierzęta umieszczono w pozycji leżącej z głową umieszczoną w aparacie stereotaktycznym i przez maskę znieczulono 1,5-2% mieszaniną izofluranu z tlenem

i powietrzem. Podczas eksperymentu monitorowano parametry fizjologiczne, takie jak: tempo oddychania, temperaturę, rytm pracy serca.

Lokalizatory wykorzystano do dokładnego pozycjonowania zwierząt w magnesie. Strukturalne poprzeczne obrazy MR obejmujące cały mózg uzyskano za pomocą T2-ważonego TurboRARE (TR / TE = 6000/30 ms, współczynnik RARE = 4, rozdzielczość przestrzenna = 78  $\mu\text{m}$  x 78  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$ , 35 przekrojów, brak przerw, liczba średnich (NA) = 4, czas skanowania = 25 minut).

Uzyskiwano obrazy wazone metodą dyfuzji wirowania obejmujące cały mózg (TR / TE = 7000/27 ms, wartości  $b = 0, 600, 1110 \text{ s/mm}^2$ , liczba kierunków = 1, rozdzielczość przestrzenna = 156  $\mu\text{m}$  x 156  $\mu\text{m}$  x 700  $\mu\text{m}$ , 25 plastry, brak przerw, czas skanowania = 33 min).

Mapy pozornego współczynnika dyfuzji (ADC) obliczono przez dopasowanie trzech punktów eksperymentalnych przy użyciu oprogramowania Bruker ParaVision 5.1. Następnie dane zostały wyeksportowane do formatu DICOM i przekształcone do formatu NifTI i przetworzone przy użyciu oprogramowania SPM ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/)). W pierwszym etapie przetwarzania wszystkie orientacje obrazów zostały dostosowane. Mapy ADC zarejestrowano (transformacja sztywna) jako strukturalne obrazy wazone T2 i znormalizowano (transformacja afiniczna) do przestrzeni matrycowej mózgu myszy *in vivo* (MRM NeAt; Ma i wsp., 2008). Baza danych MRM NeAt obejmuje atlasy 12 indywidualnych obrazów MR mózgu *in vivo* MR u myszy C57BL / 6J w wieku 12-14 tygodni; każdy z 20 ręcznie oznaczonymi strukturami anatomicznymi. Każdy atlas poszczególnych struktur mózgu uzyskano przez automatyczne znakowanie całego mózgu za pomocą atlasu MRM NeAt i macierzy transformacji (uzyskanej w etapie normalizacji). Ten automatyczny algorytm etykietowania został zaimplementowany jako niestandardowy skrypt MATLAB (<http://www.mathworks.com/products/matlab/>) wykorzystujący zmodyfikowane funkcje zapewniane przez oprogramowanie IBASPM (Alemán-Gómez i wsp., 2006; <http://www.thomaskoenig.ch/Lester/ibaspm.htm>). W części analizy mapy ADC zostały nałożone na odpowiadający im indywidualny atlas, a średnie wartości ADC z każdej struktury zostały obliczone przy użyciu niestandardowych skryptów MATLAB.



## 7) Analiza stężeń metabolitów w mózgu z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu $^1\text{H}$

Poszczególne widma metabolitów w mózgu rejestrowano wykorzystując spektroskopię protonową o krótkim echu, przy użyciu sekwencji PRESS (TR/TE = 2000/20 ms, 512 średnich, 2048 punktów, czas skanowania równy 17 minut) z tłumieniem wody VAPOR, tłumieniem objętości zewnętrznej, oraz korektą dryftu częstotliwości (kątem przechylenia  $5^\circ$ ). Korektę prądów wirowych przeprowadzono na skanerze. Każdy pomiar przeprowadzono w dwóch oddzielnych objętościach (VOI). Pierwszy VOI ( $6 \times 2 \times 1,5 \text{ mm}^3$ ) obejmował hipokamp drugi ( $4 \times 2 \times 1,5 \text{ mm}^3$ ) obejmował korę czołową. Globalne podkładowe liniowe i wtórne korygowano za pomocą protokołu ADJ\_1st\_2nd\_order. Następnie lokalne podkładowe liniowe i wtórne automatycznie dostosowywano za pomocą FASTMAP w objętości sześcienniej, która zawierała objętość obszaru zainteresowania ( $6 \times 6 \times 6 \text{ mm}^3$  dla hipokampa i  $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$  odpowiednio dla kory czołowej). Standardowa szerokość linii wody była utrzymywana na poziomie około 9-12 Hz.

Stężenia metabolitów określono przy użyciu metody analizy kombinacji liniowej LCModel (Provencher, 2001; <http://www.s-venvencher.com/pages/lcmodel.shtml>). Sygnał wody niezwiązanej mierzony z takiej samej objętości był używany jako wewnętrzny punkt odniesienia dla bezwzględnego oznaczania metabolitów. Stężenia wyrażano w jednostkach instytucjonalnych (i.u.). Stosunek sygnału do szumu (SNR) wynosił zwykle około 12-25.

## 8) Transmisyjna mikroskopia elektronowa

### A) Analiza zmian morfologicznych

Perfuzję zwierząt przeprowadzano tak jak opisano w punkcie 5 (Badanie szczelności BBB), z tą różnicą, że po 30 sekundach perfuzji solą fizjologiczną z heparyną, stosowano bufor o składzie: paraformaldehyd (2%), aldehyd glutarowy (2,5%) w 0,1 M buforze kakodylowym, pH 7,4. Niezwłocznie izolowano korę mózgową i utrwalano w tym samym roztworze przez 20 godz. (w  $4^\circ\text{C}$ ). Następnie tkankę umieszczano w mieszaninie 1% OsO<sub>4</sub> i 0,8% K<sub>4</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>]. Korę czołową myszy cięto na ultracienkie skrawki, które były umieszczane na siatkach miedzianych. U myszy SN1 VM próbki pobierano z okolicy obejmującej koniec zaimplantowanej kaniuli, tj. AP + 2,0, ML - 1,0, DV -1,5 zgodnie z atlasem stereotaktycznym, a u myszy AOM - porównawczo z miejsca o identycznych koordynatach stereotaktycznych.

Ocenie ultrastrukturalnej poddano wszystkie elementy jednostki nerwowo-naczyniowej (ang. *neurovascular unit*) w materiale pobranym od zwierząt kontrolnych i zwierząt poddanych eksperymentowi.

## **B) Oznaczenia immunocytochemiczne**

Perfuzję zwierząt przeprowadzono tak jak w punkcie 5, stosując 20 ml PBS, a następnie paraformaldehyd (4%) w PBS, pH 7,4. Postępowanie z tkanką było takie samo jak w punkcie 8.A. Następnie skrawki o grubości 60 nm były umieszczane na siatkach niklowych i inkubowane przez 10 min. w 10% nadtlenku wodoru, płukane przez 15 min. i umieszczane na 10 min. w 1% roztworze surowicy koziej w PBS. SN1 znakowano poliklonalnym, króliczym przeciwciałem pierwszorzędowym anti-SN1 otrzymanym od Prof. Farrukha Chaudry z Uniwersytetu w Oslo, w rozcieńczeniu 1:100. Przeciwciało drugorzędowe stanowiło osłe anti-królicze przeciwciało koniugowane z 6 nm złotem koloidalnym (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania, nr Ab105294) w rozcieńczeniu 1:50.

## **9) Izolacja RNA z kory czołowej myszy**

Całkowity RNA izolowano z kory czołowej myszy wykorzystując metodę ekstrakcji przy użyciu tiocyjanianu guanidyny, fenolu i chloroformu, opartą na procedurze opisanej przez Chomczyński i Sacchi; 1987. Do wyizolowanego fragmentu kory czołowej myszy dodawano 1 ml odczynnika do izolacji całkowitego RNA (TRI Reagent, Ambion). Po 5 min. lizat przenoszono do probówek i dodawano 200  $\mu$ l chloroformu, po czym wytrząsano ręcznie. Po 3 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, próbki wirowano w 4°C przez 15 min., przy 12000 x g. Supernatant zawierający RNA przeniesiono do probówek i dodano 500  $\mu$ l izopropanolu. Po 10 min. inkubacji próbki zwirowano w 4°C przez 10 min., przy 12000 x g. Do osadu dodawano 1 ml 75% etanolu i wirowano w 4°C przez 5 min., przy 7500 x g. Etanol usuwano, a osad rozpuszczano w wodzie zawierającej 0,1% inhibitor rybonukleaz - dietylopirowęglan (DEPC). Metodą spektrofotometryczną, przy użyciu spektrofotometru Ultrospec 2000 (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, Wielka Brytania) dokonano pomiaru ilości wyizolowanego całkowitego RNA przy długości fali 260 nm.

Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 1  $\mu$ g RNA oraz odczynniki z zestawu High Capacity cDNA Reversed Transcription Kit (Applied Biosystems). Skład mieszaniny reakcyjnej o całkowitej objętości 20  $\mu$ l zawierał: bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji (2  $\mu$ l), trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (2  $\mu$ l), starter komplementarny do końca 3' matrycowego RNA (0,8  $\mu$ l), a także odwrotną

transkryptazę, przepisującą całkowity mRNA na cDNA (1  $\mu$ l), wodę DEPC (4,2  $\mu$ l) oraz 10  $\mu$ l RNA (1  $\mu$ g). Reakcja została przeprowadzona w termocyklerze (Biometra), w warunkach: 10 min. w 25°C, 120 min. w 37°C, 5 sek. w 85°C.

#### 10) Pomiar ekspresji wybranych genów

Poziom mRNA dla transporterów SN1 oraz SN2 oznaczano metodą real-time PCR, wykorzystując sondy Taqman Gene Exp. Assay (Applied Biosystems), odpowiednio Mm01230670\_m1, Mm00549967\_m1 i  $\beta$ -aktynę jako gen referencyjny Rn00567869\_m1. Do reakcji użyto 1  $\mu$ l cDNA. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10  $\mu$ l. Reakcja została przeprowadzona w aparacie ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), w warunkach: aktywacja polimerazy 10 min. w 95°C oraz 40 cykli obejmujących: 15 sekund denaturacji w 95°C, 1 minuta przyłączania w 60°C. Względną zmianę ilości mRNA wyznaczano metodą  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak i Schmittgen, 2001).

#### 11) Przygotowanie próbek

Fragmenty kory czołowej homogenizowano ręcznie w buforze lizującym (20 mM Tris-HCl pH 6,8; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; inhibitory fosfataz 1:100; inhibitory proteaz 1:200) i wirowano (12000 x g; 10 min).

Zebrane lizaty zamrożono w -80°C. Przed mrożeniem oznaczono białko, wykorzystując metodę BCA (metoda z kwasem bis-cynchoninowym) względem krzywej standardowej, mierząc absorbancję przy długości fali 570 nm. Metoda BCA jest modyfikacją reakcji biuretowej i polega na reakcji redukcji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$  w środowisku zasadowym przez składniki białek (cysteina, tryptofan i inne). Kwas bisinchoninowy reaguje z jonami miedziowymi tworząc stabilny kompleks, którego maksimum absorbancji wynosi 562 nm.

#### 12) Pomiar poziomu białek metodą Western Blot

15-30  $\mu$ g homogenatu denaturowano i rozdzielano na 12% żelu poliakrylamidowym (o składzie: 30% roztwór akrylamid/bis-akrylamid; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; woda; 10% SDS; 10% APS; TEMED). Następnie przeprowadzano pół-suchy transfer (30 min) na membranę nitrocelulozową w buforze do transferu (48 mM Tris; 39 mM Glicyna; 0,0375% SDS; 20% metanol). Reakcję blokowano w 5% mleku odtłuszczonym w TBST (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 50 mM KCl 0,2% Tween-20; pH 7,6). Membrany inkubowano z przeciwciałem anti-SN1 (1:1000, 14315-1-AP, ProteinTech, Manchester, UK) lub anti-SN2 (1:500, sc-50681, Santa-Cruz Biotechnology) przez noc w 4°C. Białkiem referencyjnym była dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang.

*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, 1:10000; Sigma). Detekcji dokonano metodą chemiluminescencyjną, a sygnał mierzono w aparacie G-Box (Syngene) i analizowano densytometrycznie za pomocą programu GeneTools (Syngene).

### 13) Mikrodializa kory czołowej zwierząt swobodnie się poruszających

Mysz w znieczuleniu ogólnym (izofluran 2%, wziewnie) była unieruchomiona przy pomocy stolika stereotaktycznego. Następnie po upewnieniu się, że zwierzę nie reaguje na bodźce zewnętrzne, skóra głowy została zdezynfekowana 70% etanolem. W sterylnych warunkach, wykonano niewielkie nacięcie na głowie myszy, a poprzez rozsuniecie skóry wypreparowana została czaszka w taki sposób, aby otrzymać pole ok. 0,6 cm/1 cm. W miejscu wyznaczonym stereotaktycznie względem bregmy (AP + 2,0, ML – 0,8, DV – 0,5) wywiercono niewielki otwór o średnicy 1mm. Kaniulę wprowadzano na odpowiednią głębokość do kory czołowej, a następnie stabilizowano przy użyciu szybkoschnącego kleju Loctitte 464. Przed wybudzeniem, zgodnie z zaleceniami dla pooperacyjnego stosowania leków przeciwbólowych, każda poddana operacji mysz otrzymała obligatoryjnie 1 dawkę ketoprofenu (5 mg/kg, podskórnie). Po zakończeniu zabiegu zwierzę zostało umieszczone w klatce ustawionej na poduszce ogrzewającej i/lub owinięte w tkaninę lub papier aby zachowało odpowiednią temperaturę ciała i było monitorowane do czasu odzyskania pełnej mobilności, równoznacznej z całkowitym wybudzeniem ze znieczulenia.

Po 24 godz. od implantacji kaniuli mysz usypiano wziewnie izofluranem (4%, podtrzymanie 1,5-2,5%), a następnie wylot kaniuli łączono z ruchomym ramieniem, będącym elementem zestawu do mikrodializy dla wolno biegających zwierząt. Wolne ramię aparatu połączone było ze zwierzęciem cienkim drucikiem, poruszającym się zgodnie z ruchami zwierzęcia, jednocześnie nie ograniczając jego ruchów i nie narażając na stres. Po wyjęciu zatyczki, kaniulę zastąpiono sondą mikrodializacyjną. Po zakończeniu tej czynności zwierzę umieszczano w klatce ustawionej na poduszce grzewczej i monitorowano. Czas potrzebny do zaimplantowania sondy, w którym mysz była znieczulona to około 3 min.

W celu zebrania frakcji mikrodializatów przez sondę przepuszczono sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ACSF, ang. *artificial cerebrospinal fluid*) o składzie (w mM): NaCl (130), KCl (5), CaCl<sub>2</sub> (2,5), MgSO<sub>4</sub> (1,3), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25), NaHCO<sub>3</sub> (26), i D-glukoza (10), napowietrzany przez 15min mieszaniną 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Po ustabilizowaniu warunków (1 godzina w przepływie 2,5 µl/godz), próbki zbierano co 40 minut (100 µl) przez 4 godziny (sześć frakcji). Po tym czasie AOM był wstrzykiwany dootrzewnowo,

a po 16 godzinach próbki zbierano co 40 minut. Wszystkie próbki natychmiast zamrażano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 14) **Oznaczenie stężenia aminokwasów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)**

Stężenie aminokwasów oznaczano wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) z detektorem fluorescencyjnym. System do rozdzielania mikrodiagnostów składał się z pompy Ultimata 3000 (Dionex; Sunnyvale, USA), autosamplera Gina 50 (Dionex), kolumny ze złożem Hypersil Gold (Thermo Electron Co.; Waltham, USA), oraz detektora fluorymetrycznego RF 2000 (Dionex). Przed nałożeniem na kolumnę, do każdej próbki (50  $\mu\text{l}$ ) dodano przy pomocy autosamplera 50  $\mu\text{l}$  0,1 M buforu boranowego, pH 10,0, zawierającego 1,5 mM dialdehydu orto-ftalowego (OPA) oraz 0,25 %  $\beta$ -merkaptoetanol. Upochodnienie polegało na reakcji związków z OPA, który łączy się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dając fluorescencyjną pochodną (Kilpatrick, 1991). Podczas rozdzielania fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i 50 mM buforu fosforanowego ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) o pH 6,2. Prędkość przepływu wynosiła 1,2 ml/min a faza ruchoma była mieszana izokratycznie (20% MetOH / 80% bufor fosforanowy). Fluorymetrycznego pomiaru upochodnionych związków dokonywano przy długościach fal: wzbudzenia 370 nm oraz emisji 450 nm. Między kolejnymi oznaczeniami kolumnę przepłukiwano zwiększając gradient udziału metanolu w fazie ruchomej z 20% do 80%, po czym przez kolejną minutę prowadzono elucję w tych warunkach, a przez następną powracano do wyjściowego składu fazy ruchomej. Rozdział kończono po 15 min. od nałożenia próbki na pętlę. Stężenie aminokwasów było wyznaczane na podstawie wcześniej wyznaczonej krzywej standardowej dla każdego z oznaczanych związków w zakresie stężeń 0,1-1,5  $\mu\text{M}$ .

#### 15) **Pomiary wybranych parametrów elektrofizjologicznych**

##### **Przygotowanie skrawków mózgowych**

Zwierzęta znieczulano izofluranem (Aerrane, Baxter). Ich mózgi zostały szybko usunięte z czaszek i zanurzone w zimnym sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) o składzie (w mM): NaCl (130), KCl (5),  $\text{CaCl}_2$  (2,5),  $\text{MgSO}_4$  (1,3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,25),  $\text{NaHCO}_3$  (26) i D-glukoza (10), napowietrzanym mieszaniną 95%  $\text{O}_2$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Przednie płaty korowe (o grubości 400  $\mu\text{m}$ ) wycinano w płaszczyźnie czołowej za pomocą wibrującego mikrotomu (Leica). Skrawki inkubowano w temperaturze  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

## **Pomiar potencjałów polowych (FP) i indukcja długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP)**

Pojedyncze skrawki umieszczono w komorze rejestracyjnej, w której zostały poddane superfuzji (2,5 ml/min) ze zmodyfikowanym ACSF zawierającym (w mM): NaCl (132), KCl (2), CaCl<sub>2</sub> (2,5), MgSO<sub>4</sub> (1,3), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25), NaHCO<sub>3</sub> (26) i D-glukoza (10), napowietrzanym mieszanicą 95% O<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> (temperatura: 32 ± 0,5°C). Koncentryczną stymulującą elektrodę bipolarną (FHC, USA) umieszczono w warstwie korowej V. Zastosowano bodźce o częstotliwości 0,033 Hz i czasie trwania 0,2 ms z zastosowaniem jednostki izolacji impulsu o stałym prądzie (WPI). Mikropipety szklane wypełnione ACSF (2-5 MΩ) wykorzystano do rejestracji potencjałów polowych. Mikroelektrody odbierające sygnał umieszczono w warstwie korowej II / III oraz w V jeśli chodzi o myszy w modelu KO-SN1. Odpowiedzi zostały wzmocnione (wzmacniacz EXT 10-2F, NPI), przefiltrowane (1 Hz-1 kHz), przekształcone A/D (częstotliwość próbkowania 10 kHz) i zapisane na komputerze PC przy użyciu interfejsu Micro1401 i oprogramowania Signal 2 (CED).

Dla każdego skrawka wykonano krzywą reakcji na bodziec (reakcja-wyjście). Aby uzyskać krzywą, stopniowo zwiększano intensywność stymulacji (15 kroków, 5 - 100 μA). Odpowiedź rejestrowano przy każdej intensywności stymulacji. Następnie dostosowano intensywność stymulacji w celu wywołania odpowiedzi w zakresie 30% maksymalnej amplitudy. LTP indukowano za pomocą stymulacji theta burst (TBS). TBS składał się z dziesięciu ciągów bodźców o częstotliwości 5 Hz, powtarzanych 5 razy co 15 sekund. Każdy ciąg składał się z pięciu impulsów przy 100 Hz. Podczas TBS czas trwania impulsu zwiększono do 0,3 ms.

W teście sparowanego impulsu zastosowano dwa bodźce o tym samym natężeniu i czasie trwania (0,1 ms) w 3 różnych odstępach (25, 50 75 ms). PPF (ang. *Paired-pulse facilitation*) wyrażano jako stosunek początkowej amplitudy drugiej do pierwszej wywoływanej odpowiedzi (FP2/FP1) z zastosowaniem średnich z 5 następujących po sobie odpowiedzi. Początkową amplitudę FP1 przyjęto jako 100%, a do porównania grup zastosowano test sumy rang Manna-Whitneya.

## **Pomiar potencjału błonowego komórki metodą patch-clamp**

Poszczególne plastry umieszczono w komorze rejestracyjnej zamontowanej na scenie mikroskopu Axioskop (Zeiss) i poddano superfuzji przy 2 ml/min ze zmodyfikowanym ACSF o następującym składzie (w mM): 132 NaCl, 2 KCl, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub> i 10 D-glukozy 10, napowietrzano z 95% O<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> (temperatura: 32 ± 0,5°C). Pipety rejestrujące zostały wyciągnięte ze szklanych kapilar borokrzemowych (Harvard Apparatus) za pomocą ściązacza Sutter Instrument P97. Roztwór pipetowy zawierał (w mM): 130 K-glukonian, 5 NaCl, 0,3 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 0,4 Na-GTP i 1 EGTA (osmolarność: 290 mOsm, pH = 7,2). Pipety miały otwartą oporność końcówki wynoszącą ok. 6 MΩ. Pobrano komórki piramidowe z miejsc położonych w przybliżeniu 2 mm z boku do linii środkowej i ok. 0,3 mm poniżej powierzchni paczki. Sygnały rejestrowano za pomocą wzmacniacza SEC 05LX (NPI), filtrowano przy częstotliwości 2 kHz i digitalizowano przy 20 kHz za pomocą interfejsu Digidata 1440A i oprogramowania Clampex 10 (Molecular Devices). W niektórych eksperymentach do ACSF dodawano tetrodotoksynę (TTX, Sigma-Aldrich) w celu zablokowania kanałów Na<sup>+</sup>.

### **16) Przygotowanie preparatów do mikroskopii konfokalnej**

Mysz usypiano 4% izofluranem, dekapitowano, a mózg umieszczano na suchym lodzie. Po umieszczeniu w kriotomie o temperaturze -20°C, po 1 godzinie rozpoczęto cięcie tkanki na skrawki o grubości 20 μm, które umieszczano pojedynczo na szkiełkach podstawowych. Preparaty przechowywano w -80°C.

Preparaty obrysowano markerem olejowym i postępowano zgodnie z procedurą: utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu w sterylnym PBS przez 20 minut, płukano 3 razy PBS, blokowano i permeabilizowano skrawki w 10% roztworze surowicy koziej w PBS z 0,5% TRITONEM X-100, inkubowano z przeciwciałem anty-SN1 (1:500, 14315-1-AP, ProteinTech, Manchester, UK) lub GFAP (1:500, G3893, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dwukrotnie rozcieńczonej mieszaninie permeabilizująco-blokującej przez noc w 4°C. Płukano 3 razy PBS w temp. pokojowej, inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488, 1:500, Life Technologies lub goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 546 1:500, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) dla SN1 i GFAP, odpowiednio, w dwukrotnie rozcieńczonej mieszaninie permeabilizująco-blokującej przez 1 godzinę w temp. pokojowej. Płukano 3 razy PBS, zamykano preparat

szkiełkiem nakrywkowym używając Vectashield (Vector Laboratories Ltd, USA) z barwnikiem jądrowym 4',6-diamidyno-2-fenylindol-em (DAPI).

## 17) **Badanie transportu L-[<sup>3</sup>H]glutaminy w skrawkach mózgowych**

### **Przygotowanie materiału**

Wyizolowane mózgi umieszczano na szalce Petriego. Po wstępnym oczyszczeniu i stabilizacji (Loctitte 646) półkul na szalce, dodawano bufor Krebsa (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukoza, 200 mM sulphinpyrazone and 10 mM Hepes, pH 7,4, temp 37°C) i krojono tkankę na 200 nm skrawki używając urządzenia do cięcia tkanek (McIlwain Tissue Chopper, Campden Instruments LTD). Skrawki preinkubowano w buforze Krebsa napowietrzanym mieszaniną 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> przez 30 minut w 37°C.

### **Wychwyty L-[<sup>3</sup>H]glutaminy**

Wychwyty L-[<sup>3</sup>H]glutaminy wykonywano w 3 wariantach:

- 1) mieszaninę inkubacyjną stanowił bufor Krebsa z 0,5 µCi/ml L-[3,4-<sup>3</sup>H (N) -]Gln (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, specyficzna radioaktywność 37 MBq/ml) i nieznakowaną Gln w stężeniu 100 µM w celu wyznaczenia wychwyty całkowitego Gln;
- 2) do buforu Krebsa dodawano L-alaninę (5 mM) i L-leucynę (5 mM) jako inhibitory kompetycyjne układów A, L i ASC;
- 3) do buforu Krebsa dodawano kwas L-γ-glutamylu hydroksamowy (GAH, 5 mM), będący swoistym inhibitorem dla układu N. Inkubację w każdym z wariantów kończono po 4 min przez dodanie zimnego buforu (4°C), następnie usunięcie całego buforu, po czym przeprowadzono trzy cykle płukania 2 ml buforu Krebsa w temperaturze 4 °C. Skrawki ważono z dokładnością do dziesiątej części miligrama. Radioaktywność skrawków mózgowych mierzono w liczniku scyntylicyjnym w 4 ml płynu scyntylicyjnego Wallac 1409 (Perkin - Elmer, Finlandia).

### **Wyrzut L-[<sup>3</sup>H]glutaminy**

Skrawki inkubowano w buforze Krebsa w obecności 0,5 µCi/ml L- [3,4-<sup>3</sup>H (N) -]Gln (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, o specyficznej radioaktywności 37 MBq/ml) i nieznakowanej Gln w stężeniu 100 µM) przez 30 minut w 37°C. Następnie skrawki



przenoszono do komór przepływowych i płukano buforem w przepływie ciągłym z prędkością 0,5 ml/min. Zbierano 10 frakcji w 1 minutowych odstępach czasowych. Skrawki płukano buforem inkubacyjnym bez oraz w obecności inhibitorów kompetycyjnych: L-alaniny (5 mM) i l-leucyny (5 mM) oraz GAH (5 mM). Radioaktywność każdej frakcji w skrawkach mierzono w liczniku scyntylicyjnym po dodaniu 2ml płynu scyntylicyjnego Wallac 1409 (Perkin - Elmer, Finlandia).

#### 18) **Analiza statystyczna wyników**

Wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM). Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu programu GraphPad Prism 5.0, stosując testy: t-Studenta i Manna-Whitneya U oraz ANOVA z testem post hoc Bonferroniego. Za istotny statystycznie uznawano poziom ufności  $p < 0,05$ . Liczbę zwierząt w każdym doświadczeniu oraz zastosowany test statystyczny zamieszczono w opisie do rycin.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka mysiego AOM modelu ostrej EW

#### 4.1.1. Stężenie cytokin, amoniaku i aktywność enzymów wątrobowych w osoczu

Metodą cytometrii przepływowej oznaczono stężenie cytokin o charakterze prozapalnym – IL-6 oraz TNF- $\alpha$  w osoczu myszy kontrolnych i AOM. Wykazano około 21-krotny wzrost stężenia IL-6 i 5-krotny wzrost stężenia TNF- $\alpha$  u myszy AOM w stosunku do kontroli (Tab. 4.1.1.). Przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów w osoczu zwierząt obu grup oznaczono stężenie amoniaku oraz aktywności enzymów wątrobowych, będących markerami uszkodzenia wątroby – aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST). Wykazano 26-krotny wzrost stężenia amoniaku, 5-krotny wzrost aktywności AST oraz 12-krotny wzrost ALT w osoczu myszy AOM w stosunku do kontroli (Tab. 4.1.1). Uzyskane wyniki wskazują w grupie AOM na uszkodzenie wątroby oraz towarzyszącą hiperamonemię, co cechuje typ ostrej EW.

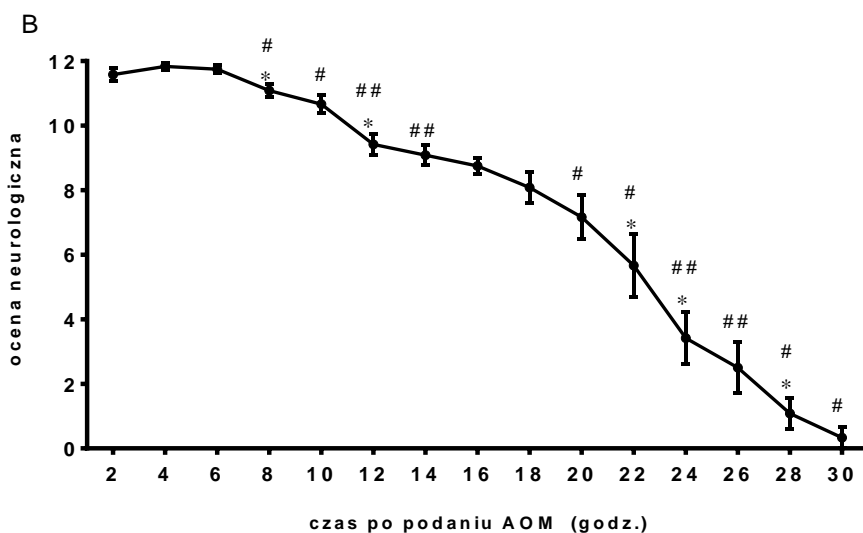
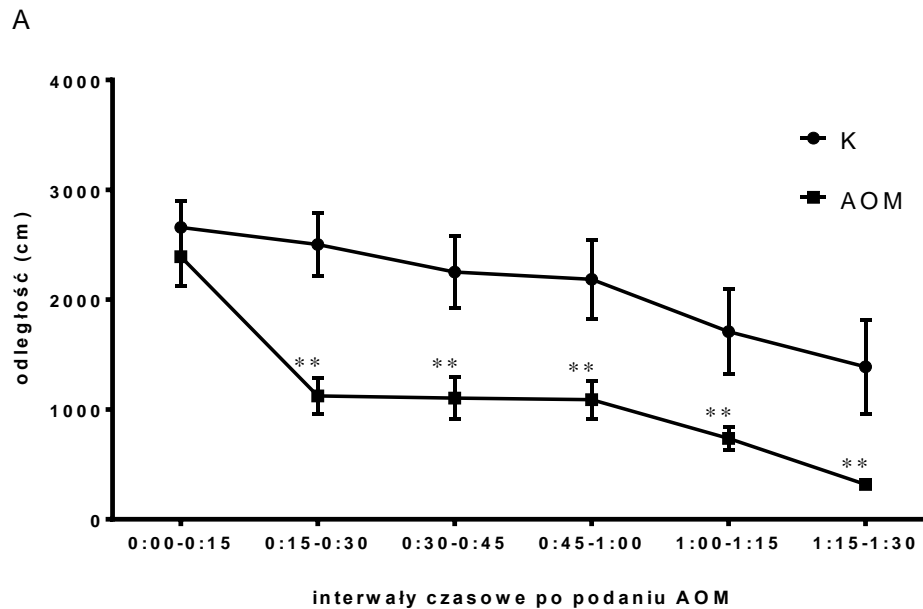
Tab. 4.1.1. Stężenie cytokin IL-6, TNF- $\alpha$ , amoniaku oraz aktywność enzymów wątrobowych w osoczu myszy kontrolnych i AOM.

	K	AOM
IL-6 (pg/ml)	10,0 +/- 2,2	214,5 +/- 34,5 *
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	3,1 +/- 0,2	14,7 +/- 1,8 *
AST (IU/I)	172,4 +/- 30,6	805,4 +/- 92,2 *
ALT (IU/I)	46,5 +/- 6,1	559,0 +/- 52,8 *
Amoniak ( $\mu$ g/ml)	5,2 +/- 1,1	140,0 +/- 1,0 *

Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

#### 4.1.2. Ocena aktywności ruchowej i stanu neurologicznego

Aktywność ruchową myszy AOM oraz ocenę ich stanu neurologicznego wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Behawioralno-Metabolicznym IMDiK. Mierzono dystans jaki pokonały myszy AOM w stosunku do kontroli w czasie 90 minut po podaniu hepatotoksyny. Analizowano pokonywane odległości w czasie kolejnych interwałów 15-to minutowych. Dodatkowo określono stan neurologiczny zwierząt na podstawie oceny wybranych 6 odruchów (rogówkowego, wrażliwości małżowiny usznej, wibrysowego, wyprostnego oraz odruchu strachu i zaburzenia równowagi), które były oceniane w skali trzystopniowej (2 -odruch prawidłowy, 0 -brak odruchu). Odruchy były oceniane niezależnie przez dwóch eksperymentatorów, co 2 godziny po podaniu AOM. Wykazano zależną od czasu, istotnie statystycznie mniejszą odległość przebytą przez myszy AOM w stosunku do kontroli, w każdym z analizowanych interwałów czasowych (Rys.4.1.2.A). Po 90 minutach myszy AOM wykazywały minimalną ruchliwość. W ocenie neurologicznej myszy AOM stwierdzono stopniowo pogarszający się ich stan neurologiczny (Rys.4.1.2.B). U większości osobników, opóźnioną reakcję na bodziec wywołujący strach obserwowano po około 8 godzinach. Towarzyszyło temu, lub następowało bezpośrednio po nim, obniżenie zdolności zachowania równowagi, natomiast całkowity brak zachowania równowagi występował po ok. 20 godz. W późniejszym czasie osłabieniu ulegał odruch wibrysowy (mniejsza pobudliwość w ok. 12 godz.). Odruchy występujące po podrażnieniu ucha, oka i odruch wyprostny były statystycznie istotnie słabsze najwcześniej po około 20 godz. po podaniu AOM i korelowały z wystąpieniem ostatniej fazy EW w czterostopniowej ocenie (Matkowskyj i wsp., 1999; Bélanger i wsp., 2006 ). Wyniki świadczą o szybkim pogarszaniu się funkcji motorycznych zwierząt AOM, a także progresywnym osłabianiu ocenianych odruchów neurologicznych. Myszy AOM zapadały w śpiączkę między 18-20 godz. po podaniu hepatotoksyny, co odzwierciedla fazę IV pacjentów z ostrą EW.



Ryc. 4.1.2. (A) Aktywność ruchowa (odległość) myszy w ciągu pierwszych 90 min po dootrzewnowym podaniu AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 9 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej, \* $p < 0,01$  w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya). (B) Ocena neurologiczna myszy AOM wykonana na podstawie analizy 6 wybranych odruchów. Wyniki przedstawiono jako średnią z 12 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej, \* $p < 0,05$  w porównaniu do wyników z poprzedniej sesji (2 godziny wcześniej), # (##)  $p < 0,05$  ( $p < 0,01$ ) w porównaniu do wyniku z dwóch sesji wcześniej (4 godziny wcześniej) (test Manna-Whitneya).

## 4.2. Pomiary elektrofizjologiczne

### 4.2.1. Wpływ AOM na potencjały polowe (FP) i długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP)

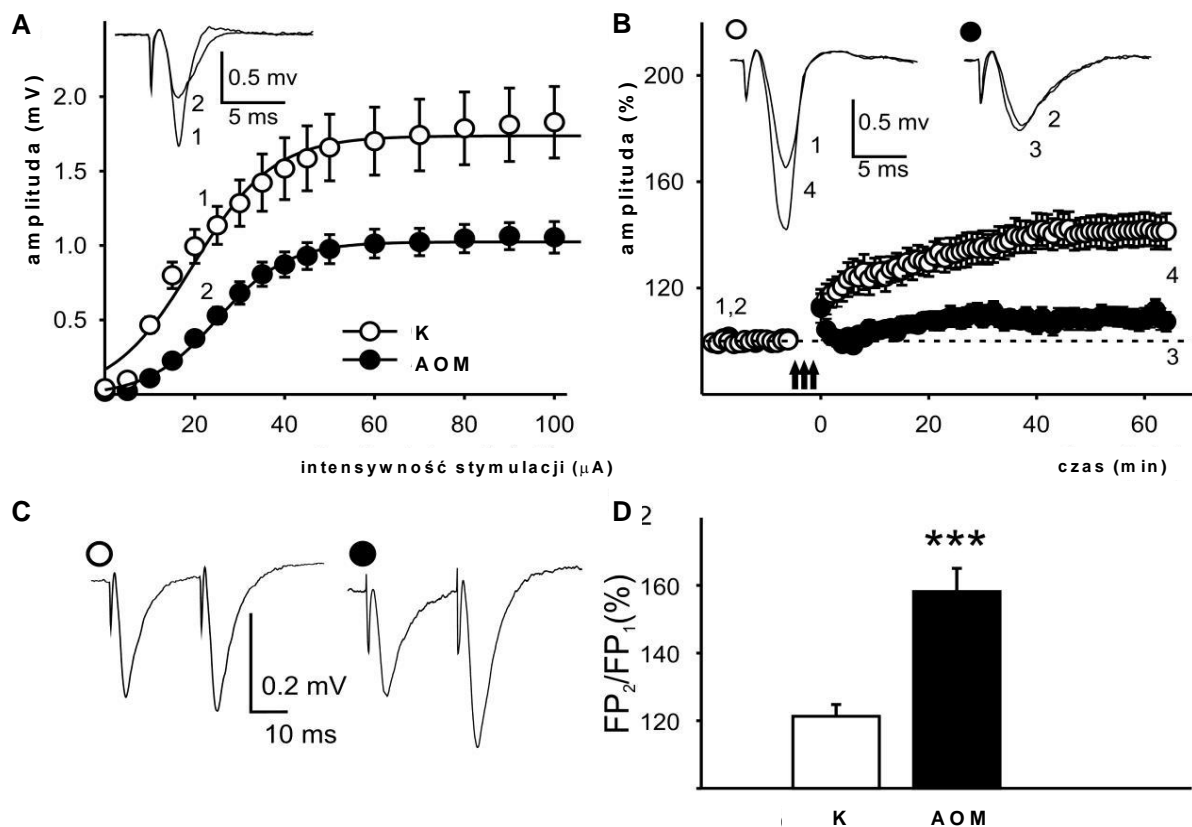
W skrawkach kory izolowanych z mózgu myszy w objawowej fazie EW zaobserwowano znaczne obniżenie amplitudy FP w szerokim zakresie intensywności stymulacji (Ryc.4.2.1.A). Dane dotyczące parametrów charakteryzujących krzywe wejściowo-wyjściowe FP (Tab. 4.2.1.) wskazują na upośledzenie pobudzenia transmisji synaptycznej indukowanego w korze czołowej przez AOM. Wykazano, że LTP był znacząco osłabione o ~24% w skrawkach preparowanych ze zwierząt traktowanych AOM w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.2.1.B).

Stosunek parowanych impulsów, świadczący o krótkotrwałym wzmocnieniu synaptycznym, podwyższył się o ~30% w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.2.1.D). Dane te sugerują, że AOM może indukować zmiany w mechanizmach pobudzających uwalnianie neuroprzekaźnika.

Tab.4.2.1. Parametry charakteryzujące krzywą odpowiedzi potencjałów polowych na bodziec w połączeniach neuronalnych myszy kontrolnych oraz w modelu AOM w fazie objawowej EW, obliczone na podstawie rozkładu Boltzmanna. Intensywność bodźca wywołującego FP ~0,1 mV w amplitudzie;  $V_{max}$  - maksymalna amplituda FP;  $u_h$  - połowa maksymalnej stymulacji;  $S$  - współczynnik proporcjonalny do nachylenia krzywej;  $n$  - liczba skrawków.

	$V_{max}$ (mV)	$u_h$ ( $\mu$ A)	$S$	$n$
K 18h	$1,8 \pm 0,4$	$19,38 \pm 6,2$	$8,2 \pm 3,59$	18
AOM 18h	$1,05 \pm 0,36^{**}$	$27,77 \pm 5,04^{**}$	$7,59 \pm 3,1$	25

Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej,  $***p < 0,001$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

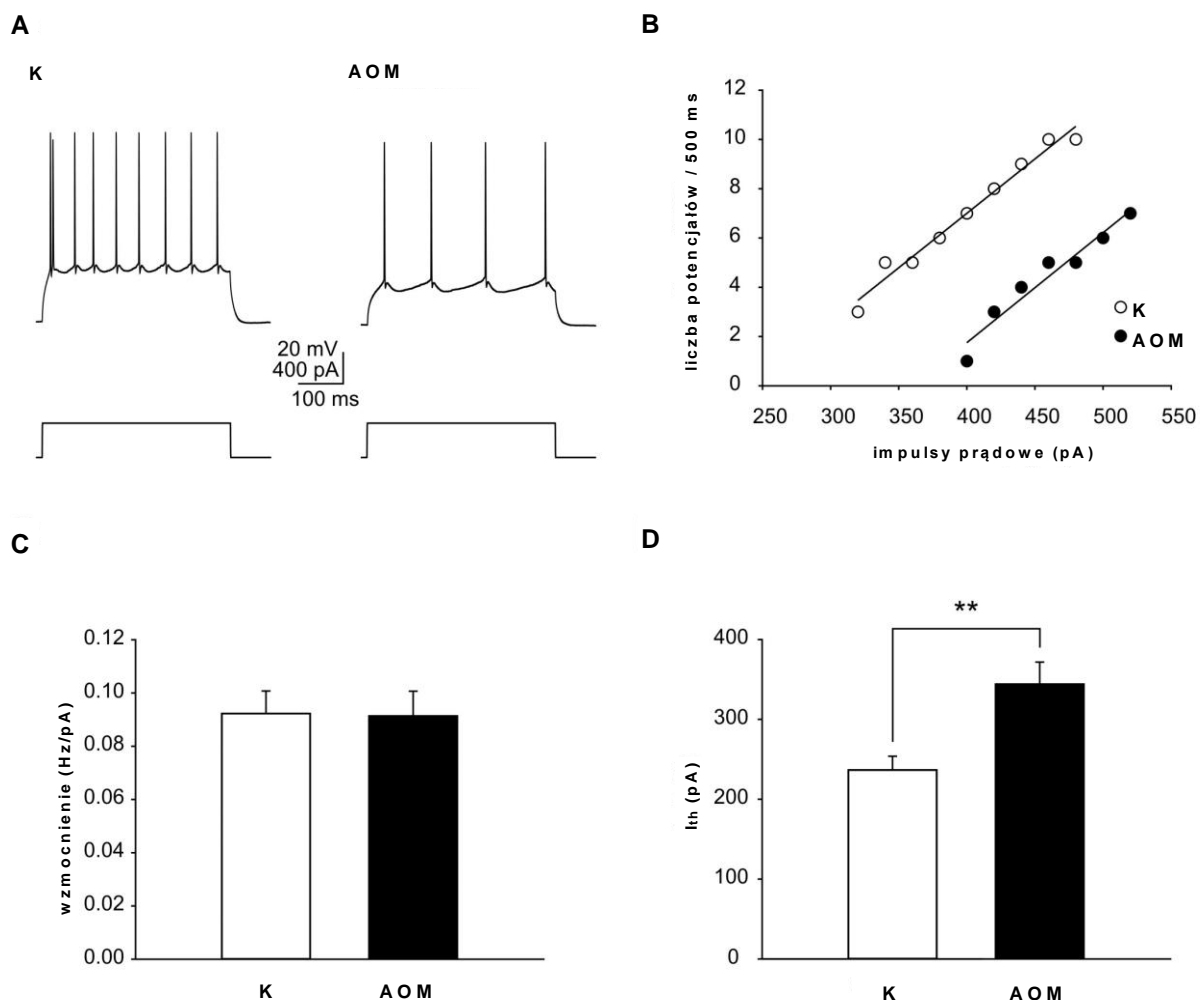


Ryc.4.2.1. (A) Związek pomiędzy intensywnością bodźca a średnią amplitudą potencjałów polowych w skrawkach korowych myszy kontrolnych i w modelu AOM (B) Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne mierzone u skrawkach korowych myszy kontrolnych i w modelu AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią amplitudę (FP) z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej. (C) Przykład poszczególnych potencjałów polowych generowanych w odpowiedzi na drugi impuls stymulujący w stosunku do potencjałów polowych generowanych w odpowiedzi na pierwszy impuls stymulujący (FP1 /FP2) w skrawkach myszy kontrolnych i w modelu AOM. (D) Podsumowanie ilościowe zjawiska parowania impulsów, świadczącego o krótkotrwałym wzmocnieniu synaptycznym, wyrażone jako wskaźnik PPF ( $\pm$  SEM). Uzyskane wartości z 6 niezależnych doświadczeń wyrażano procentowo  $\pm$  błąd standardowy średniej, za 100 % przyjmując średnie nachylenie odpowiedzi na pierwszy bodziec stymulujący, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (jednoczynnikowa ANOVA).

#### 4.2.2. Wpływ AOM na pobudliwość błony neuronów piramidowych

Badania metodą patch-clamp wykazały, że w skrawkach mózgowych myszy w objawowej fazie EW spoczynkowy potencjał błonowy neuronów warstwy II / III był istotnie zmniejszony w stosunku do skrawków korowych z myszy kontrolnych, odpowiednio o  $\sim 6\%$  i  $\sim 7\%$ . Oporność wejściowa neuronów była obniżona o  $\sim 26\%$  w skrawkach korowych myszy

w modelu AOM w stosunku do kontroli (Ryc.4.2.2.A). Nie zaobserwowano zmian pobudliwości neuronów piramidowych, jednakże wartość progowa dla generowania potencjału czynnościowego była wyższa o ~45% niż w grupie kontrolnej (Ryc.4.2.2.D). Dane te sugerują, że azoksymetan indukuje głęboką modyfikację podstawowych właściwości elektrofizjologicznych neuronów piramidowych.



Ryc.4.2.2. (A) przykład odpowiedzi neuronu piramidowego izolowanego z myszy kontrolnych i odpowiedź komórki pochodzącej od myszy po podaniu AOM na impuls depolaryzujący. (B) stosunek natężenia prądu do prędkości wzrostu odpowiedzi komórek pochodzących od myszy kontrolnych i w modelu AOM. (C) Średnie wzmocnienie (nachylenie wartości indukowanego prądu w zależności od szybkości odpowiedzi). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej. (D) Średni próg pobudzenia neuronów piramidowych z myszy kontrolnych i modelu AOM, I<sub>th</sub> – minimalne natężenie prądu, które umożliwia wygenerowanie potencjału czynnościowego. Wyniki przedstawiono jako średnią z: 23 komórek od 6 myszy kontrolnych i 21 komórek od 6 myszy po podaniu AOM  $\pm$  błąd standardowy średniej. \*\*p<0,01 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya).

### 4.2.3. Wpływ AOM na pobudzające prądy postsynaptyczne (sEPSCs)

Wykazano ~30% obniżenie średniej częstotliwości sEPSC w neuronach pochodzących od myszy po wstrzyknięciu AOM w porównaniu do kontroli (Tab.4.2.3; Ryc.4.2.3.C). Zaobserwowano również ~10% zwiększenie średniej amplitudy sEPSC oraz ~24% zwiększenie średniej czasowej zaniku sEPSC (Tab.4.2.3; Ryc.4.2.3.D, F).

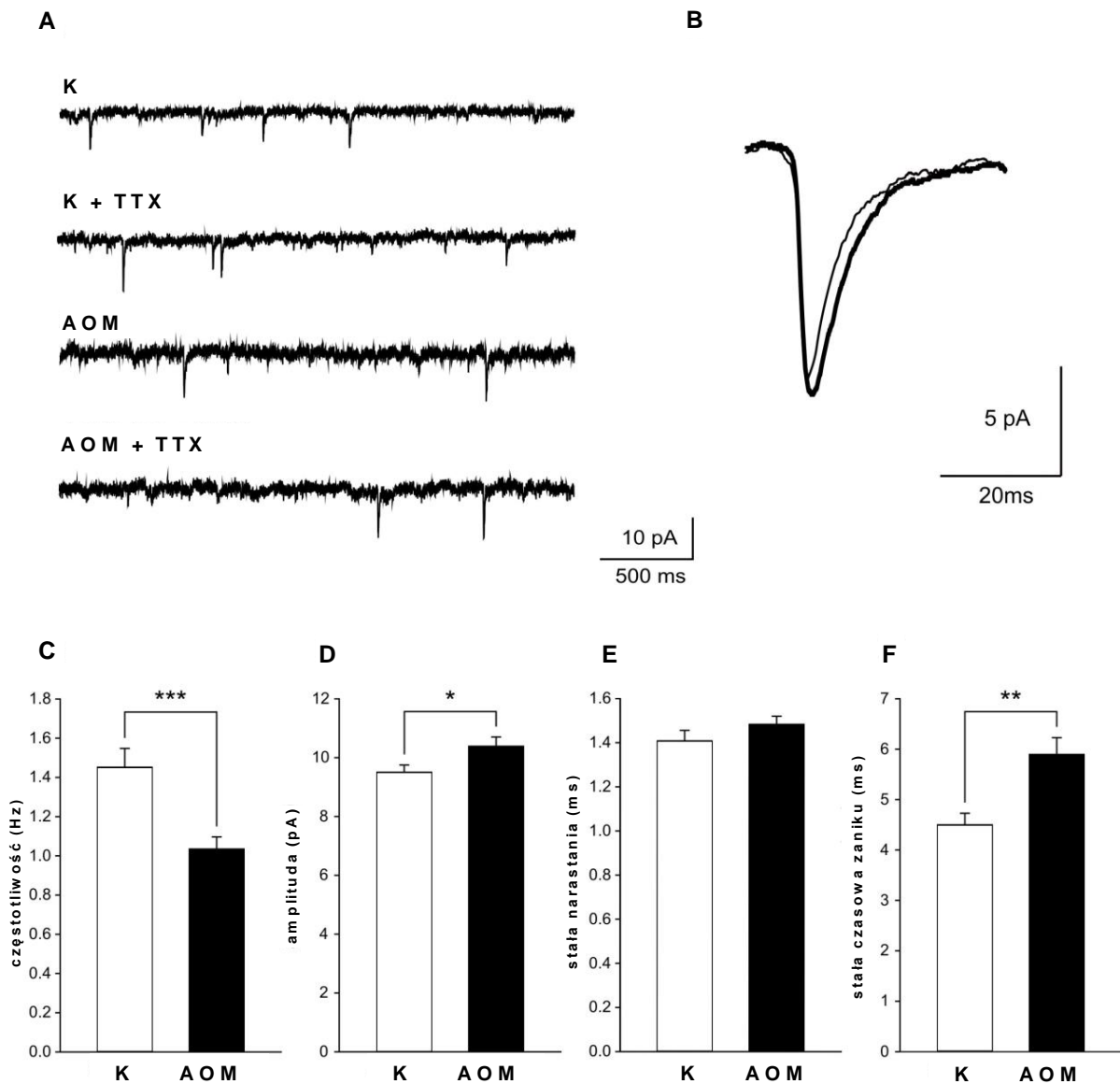
Wpływ blokady kanału Na<sup>+</sup> badano poprzez dodanie 1 μM TTX do ACSF, jednak nie zaobserwowano znaczących zmian w żadnym z mierzonych parametrów (Tab. 4.2.3.). Można zatem stwierdzić, że zarejestrowane prądy postsynaptyczne odpowiadają miniaturowym EPSC (mEPSC), które są produktem niezależnego od aktywności, spontanicznego uwalniania Glu z zakończeń presynaptycznych. Dane te sugerują zmiany w spontanicznej pobudzającej transmisji synaptycznej, w tym w uwalnianiu Glu, indukowanego w korze czołowej myszy w wyniku podania AOM.

Tab. 4.2.3. Porównanie parametrów sEPSC i mEPSCs w neuronach piramidowych w skrawkach korowych myszy kontrolnych oraz w modelu AOM.

	sEPSC	mEPSC
K		
Częstotliwość (Hz)	1,34 ± 0,06	1,31 ± 0,06
Amplituda (pA)	9,43 ± 0,19	9,28 ± 0,18
Stała narastania (ms)	1,42 ± 0,02	1,41 ± 0,02
Stała czasowa zaniku (ms)	4,58 ± 0,11	4,59 ± 0,11
AOM		
Częstotliwość (Hz)	1,03 ± 0,02	1,03 ± 0,02
Amplituda (pA)	10,29 ± 0,24	10,22 ± 0,24
Stała narastania (ms)	1,49 ± 0,08	1,51 ± 0,07
Stała czasowa zaniku (ms)	5,91 ± 0,09	5,90 ± 0,10

Wyniki przedstawiono jako średnią z: 12 komórek od 5 myszy kontrolnych i 12 komórek od 4 myszy w modelu AOM ± błąd standardowy średniej.



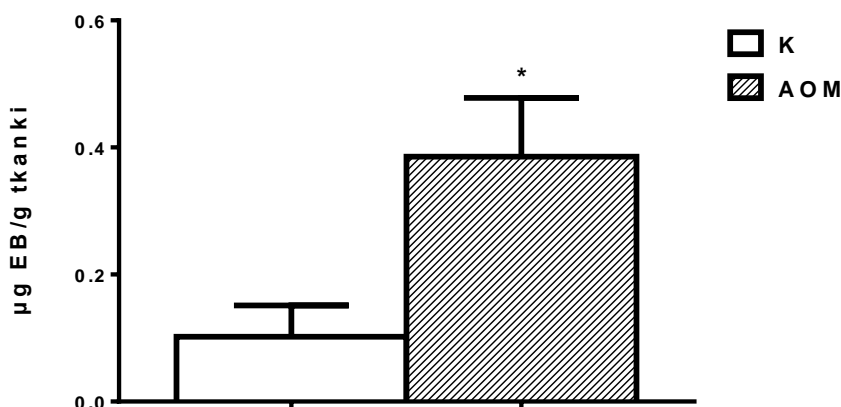


Ryc. 4.2.3. (A) Przykład typowego zapisu sEPSC z neuronu kontrolnego i neuronu pochodzącego od myszy po podaniu AOM przed i po dodaniu TTX (B) Superpozycja średnich wszystkich indywidualnych sEPSC odczytanych podczas 4-minutowych zapisów z neuronu kontrolnego (cienka linia) i pochodzącego od myszy z modelu AOM (gruba linia). (C) średnia częstotliwość sEPSC, (D) średnia amplituda sEPSC, (E) średni czas narastania sEPSC i (F) średnia stała czasowa zaniku sEPSCs. (C-F) Wyniki przedstawiono jako średnią z: 23 komórek od 6 myszy kontrolnych i 21 komórek od 6 myszy po podaniu AOM  $\pm$  błąd standardowy średniej. \* $p < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya).

### 4.3. Analiza obrzęku mózgu myszy AOM

#### 4.3.1. Badanie szczelności bariery krew-mózg

W homogenatach kory czołowej pochodzących od myszy AOM w fazie IV EW obserwowano ok. 4-krotny wzrost stężenia błękitu Evansa w przeliczeniu na gram tkanki, świadczący o zwiększonej przepuszczalności BBB i obecności naczyniopochodnej komponenty obrzęku (Ryc.4.3.1.).



Ryc.4.3.1. Stężenie błękitu Evansa (EB) w korze mózgowej myszy kontrolnych i AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

#### 4.3.2. Ultrastrukturalna ocena morfologiczna kory czołowej myszy AOM

Wszystkie analizy morfologiczne zostały wykonane we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej.

W badanym materiale obserwowano 4 grupy naczyń kapilarnych o różnej budowie morfologicznej:

- 1) Naczynia o niezmięnionej budowie ultrastrukturalnej.
- 2) Naczynia charakteryzujące się prawidłowym, niezmięzionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadające nieliczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie komórek śródbłonkowych. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonkowych była gładka. Połączenia między komórkami śródbłonkowymi nie wykazywały cech morfologicznych wskazujących na nieszczelność. Otoczone były błoną podstawną o prawidłowej budowie morfologicznej.

Pod błoną podstawną obecne były przynaczyniowe wypustki astrocytów charakteryzujące się jaśniejszą elektronowo cytoplazmą, z niewielkimi cechami obrzęku.

3) Naczynia charakteryzujące się zmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadającym liczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie oraz mikrokosmki na powierzchni luminalnej komórek śródbłonkowych. Pomędzy komórkami śródbłonkowymi widoczna była szczelina wskazująca na nieszczelność ścisłego połączenia. Pod błoną podstawną tych naczyń obecne były elektronowo-jasne wypustki astrocytów o cechach obrzęku.

4) Naczynia charakteryzujące się zmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadającym liczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie oraz mikrokosmki na powierzchni luminalnej komórek śródbłonkowych. Pomędzy komórkami śródbłonkowymi widoczna była szczelina wskazująca na nieszczelność ścisłego połączenia. Pod błoną podstawną, która była czasami pogrubiała występowały przynaczyniowe wypustki astrocytów o niezmienionej budowie morfologicznej.

Dokonano oceny półilościowej wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych.

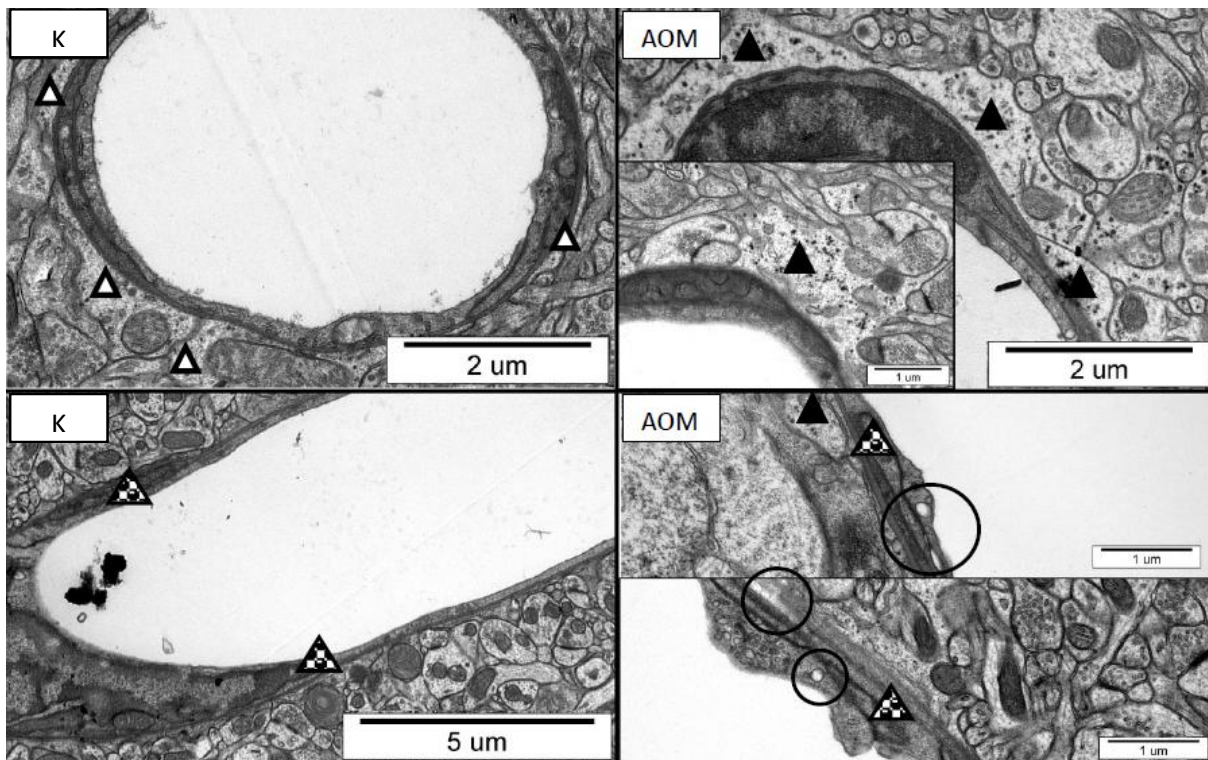
Tab.4.3.2. Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM.

	GRUPA 1	GRUPA 2	GRUPA 3	GRUPA 4
KONTROLA	61 % ± 2%	34 % ± 7 %	2 % ± 0,5%	1 % ± 1%
AOM	38 % ± 1% *	23 % ± 2 %	20 % ± 2 % *	19 % ± 1 % *

Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 dla kontroli i 4 dla AOM niezależnych doświadczeń ± błąd standardowy średniej, w każdym doświadczeniu analizowana 50 kolejnych naczyń, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

Na podstawie powyższych obserwacji oraz wyników potwierdzających zwiększoną przepuszczalność BBB stwierdzono, że u myszy AOM doszło do uszkodzenia BBB, co świadczyło o obecności naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu.

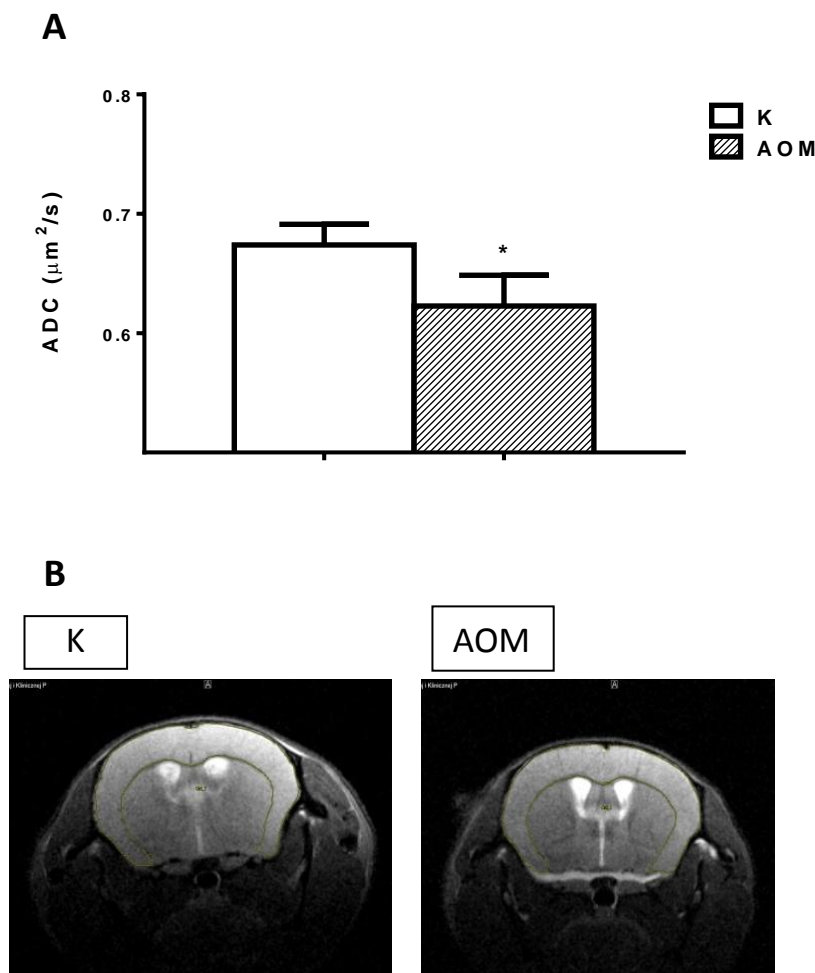
Powyższe cechy morfologiczne wskazywały, że u ~43% myszy AOM występowały wyraźne cechy obrzęku o charakterze cytotoksycznym.



Ryc.4.3.2. Zdjęcia ultrastruktury kory czołowej myszy kontrolnych i AOM, gdzie  $\triangle$  oznacza astrocyty kontrolne,  $\blacktriangle$  astrocyty obrzmiałe,  $\blacktriangle$  komórki endotelialne,  $\circ$  pęcherzyki pinocytarne i szczeliny między komórkami śródbłonka.

#### 4.3.3. Wyznaczenie pozornego współczynnika dyfuzji w korze czołowej myszy AOM metodą rezonansu magnetycznego

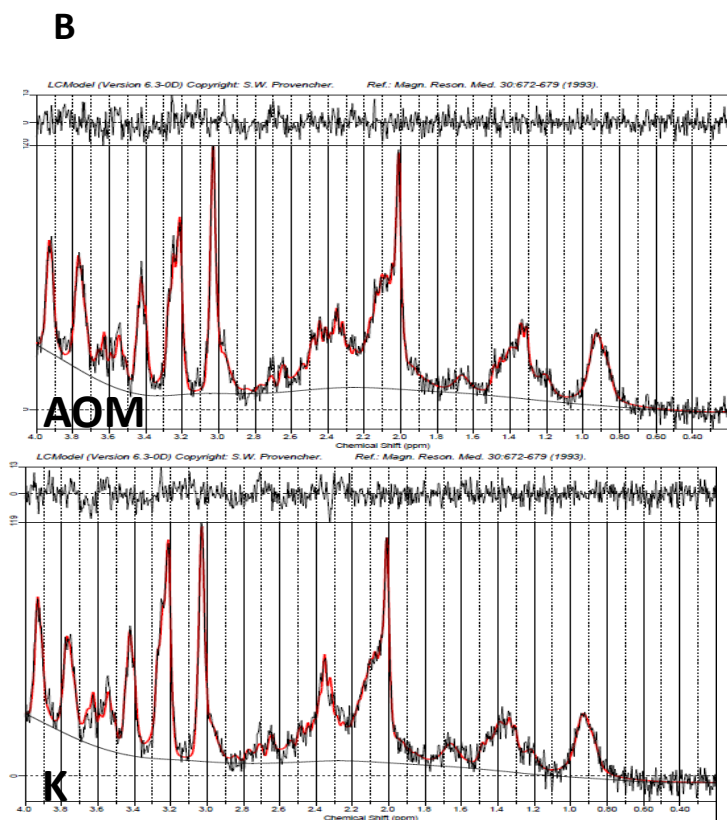
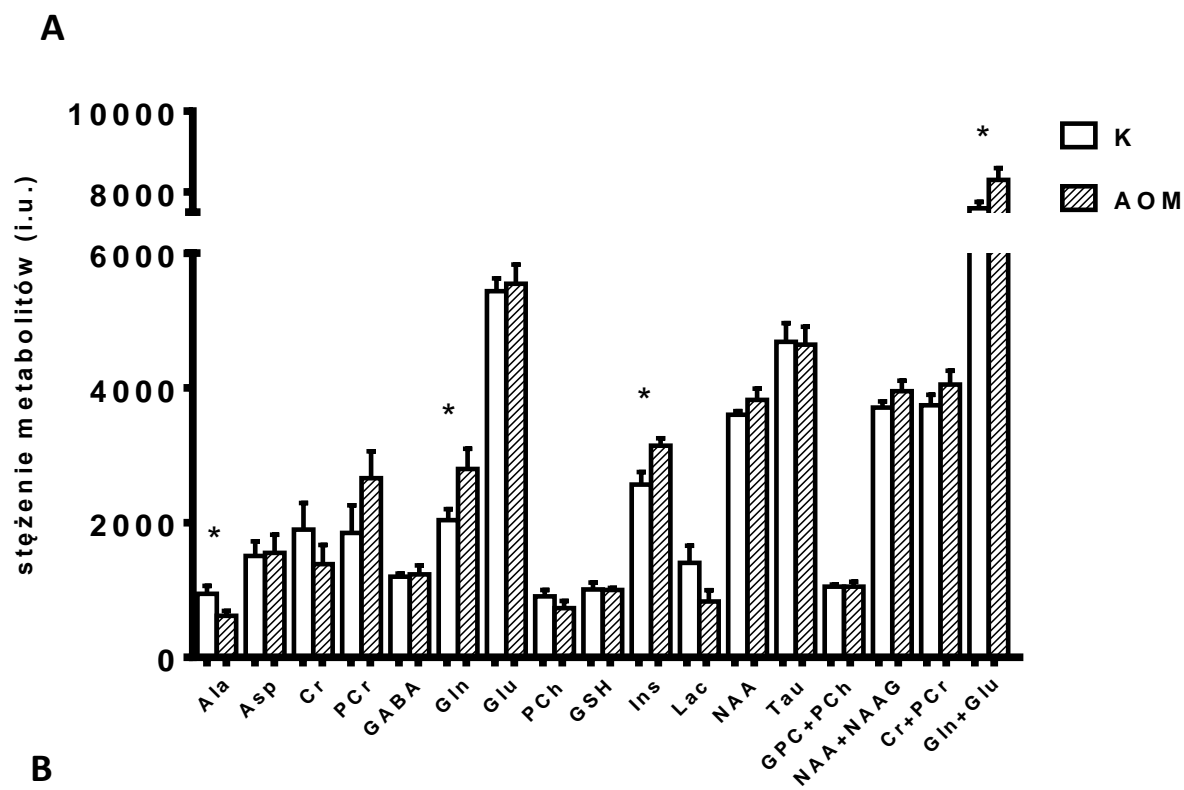
Wyznaczenie pozornego współczynnika dyfuzji (ang. *apparent diffusion koeficjent*; ADC) pozwala na analizę zmian dyfuzji cząsteczek płynu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej. Umożliwia to porównanie wielkości przestrzeni, w której znajdują się cząsteczki wody. Ograniczenie dyfuzji cząsteczek w badanym regionie mózgu świadczy o zmniejszonej przestrzeni zewnątrzkomórkowej potwierdzając cytotoksyczny charakter obrzęku mózgu, podczas gdy jego podwyższenie sugerowałoby przewagę składowej naczyniopochodnej (Chavarria, Cordoba, 2015). W korze czołowej myszy AOM wykazano obniżoną o ~10% wartość parametru ADC świadczącą o cytotoksycznym charakterze obrzęku (Ryc. 4.3.3.A).



Ryc.4.3.3. (A) Wartość pozornego współczynnika dyfuzji ADC w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 10 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (B) Zdjęcia przedstawiające obraz MRI przekroju mózgu z zaznaczonym obszarem poddanym analizie.

#### 4.3.4. Pomiar stężeń metabolitów w korze czołowej myszy AOM metodą protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego

Analiza spektroskopowa kory czołowej myszy AOM wykazała wzrost stężenia Gln o  $\sim 37\%$ , inozytolu o  $\sim 22\%$ , łącznie analizowanego stężenia Gln i Glu o  $\sim 10\%$  oraz spadek stężenia alaniny o  $\sim 35\%$  w porównaniu do myszy kontrolnych (ryc.4.3.4.A).

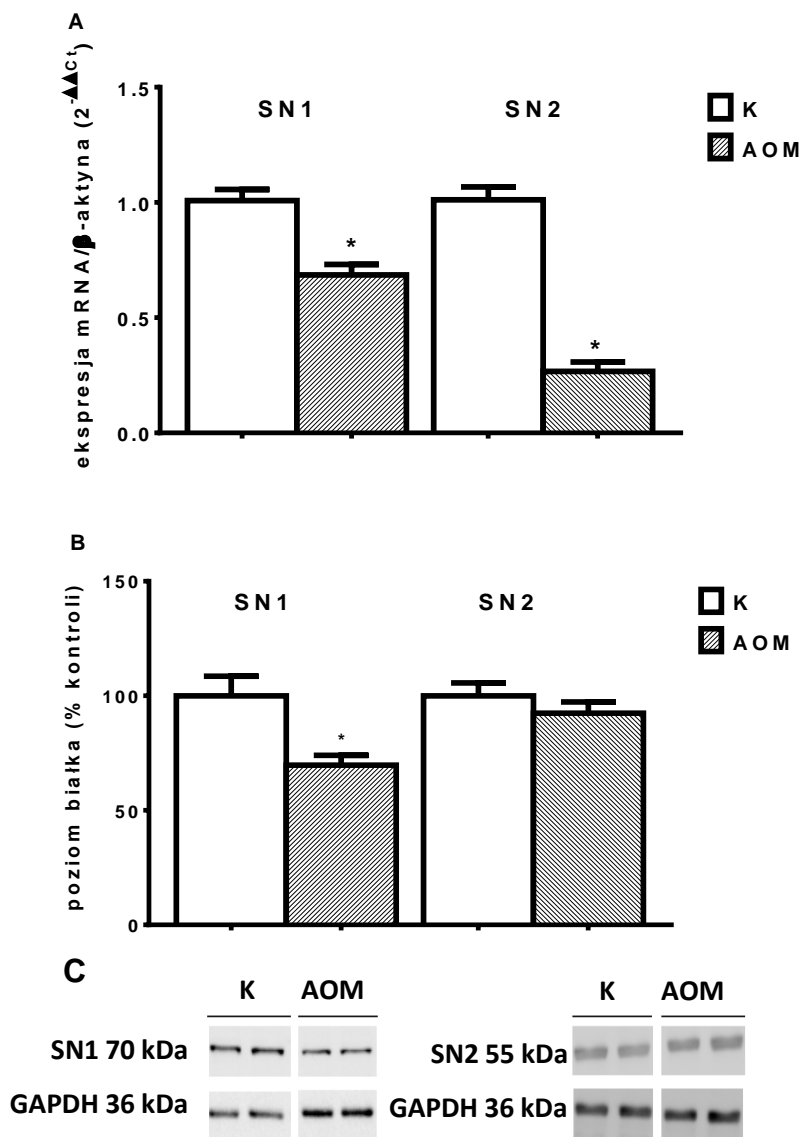


Ryc.4.3.4. (A) Analiza spektroskopowa metabolitów w korze myszy kontrolnych i AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (B) Przykładowe widma spektroskopowe metabolitów zarejestrowane w korze myszy kontrolnych i AOM.

#### 4.4. Analiza poziomu ekspresji i badanie funkcji transporterów układu N w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM

##### 4.4.1. Analiza ekspresji transporterów SN1 i SN2 na poziomie mRNA i białka

Poziom ekspresji na poziomie mRNA obu transporterów glutaminy SN1 i SN2, należących do systemu N był odpowiednio obniżony o ~30% i ~60% w korze czołowej myszy AOM w stosunku do kontroli (Ryc.4.4.1.A). Poziom białka SN1 w korze czołowej myszy AOM był obniżony o ~30%, przy jednoczesnym braku zmian poziomu białka SN2 (Ryc. 4.4.1.B).



Ryc.4.4.1. (A) Poziom mRNA genu kodującego SN1 i SN2 w korze myszy kontrolnych i AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (B) Poziom ekspresji białka SN1 i SN2 w korze myszy kontrolnych i AOM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (C) Reprezentatywny elektroforogram.

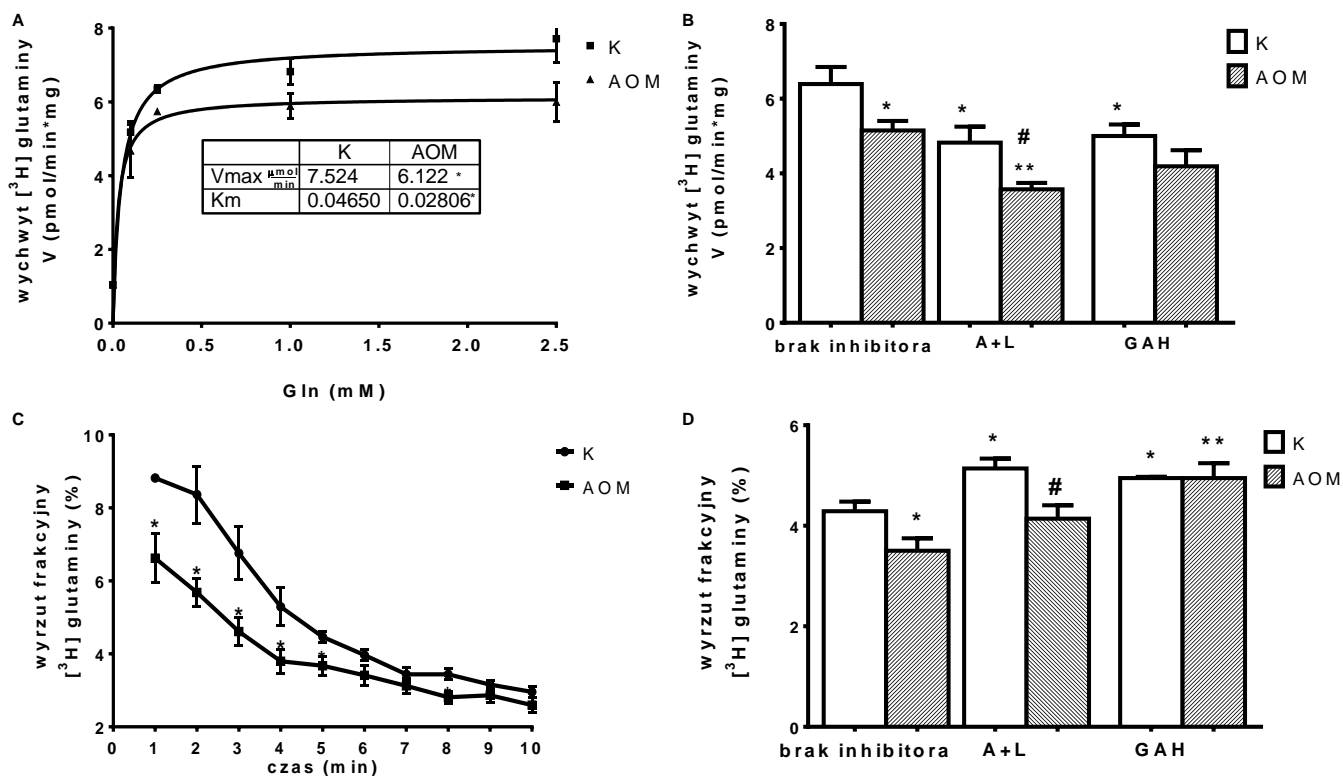
#### 4.4.2. Badanie aktywnego transportu [<sup>3</sup>H]-glutaminy w skrawkach kory czołowej myszy kontrolnych i AOM

Badania transportu znakowanej Gln przez swoiste białka transporterowe obejmowały zarówno wychwyt aminokwasu do komórek jak i jego wyrzut. Parametrami kinetycznymi opisującymi reakcję wychwytu [<sup>3</sup>H]-Gln są szybkość maksymalna wychwytu ( $V_{max}$ ) oraz stała Michaelisa ( $K_m$ ), odpowiadająca stężeniu substratu, przy którym szybkość wychwytu jest równa połowie  $V_{max}$  reakcji. W skrawkach izolowanych z kory czołowej zwierząt AOM, oba parametry były obniżone odpowiednio o ~19% i ~40% względem skrawków pochodzących z myszy kontrolnych (Ryc.4.4.2.A).

Wychwyt [<sup>3</sup>H]-Gln w skrawkach pochodzących z myszy AOM był obniżony o ~20% w odniesieniu do skrawków kontrolnych. W obecności 5 mM alaniny i 5 mM leucyny (A+L), inhibitorów kompetycyjnych układów A, L i ASC, wychwyt [<sup>3</sup>H]-Gln w skrawkach od zwierząt kontrolnych był obniżony o ~25% w odniesieniu do skrawków kontrolnych nie traktowanych. W tych samych warunkach w skrawkach pochodzących od myszy AOM zaobserwowano obniżenie wychwytu o ~26% względem skrawków kontrolnych w obecności inhibitorów oraz o ~31% w stosunku do skrawków AOM bez inhibitorów. Wychwyt [<sup>3</sup>H]-Gln w obecności 5 mM GAH (z ang. glutamate- $\gamma$ -monohydroxamate), swoistego inhibitora układu N był obniżony o ~22% w skrawkach pochodzących od myszy kontrolnych względem kontroli nie traktowanej (Ryc.4.4.2.B).

Wykazano również obniżone frakcyjne uwalnianie [<sup>3</sup>H]-Gln przez skrawki AOM w pięciu pierwszych frakcjach względem kontroli (Ryc.4.4.2.C). Dodatkowo średnie uwalnianie [<sup>3</sup>H]-Gln z frakcji 4-7 w skrawkach pochodzących z myszy AOM było obniżone o ~18% względem kontroli. W obecności inhibitorów kompetycyjnych A+L (puls we frakcjach 4-7) średnie uwalnianie [<sup>3</sup>H]-Gln było wyższe o ~20% w skrawkach pochodzących z kontroli względem skrawków nie traktowanych kompetytorami, a także o ~20% niższe w skrawkach pochodzących z myszy AOM w odniesieniu do skrawków kontrolnych po pulsie. Analogicznie, jak w przypadku doświadczeń wychwytu Gln, podanie GAH skutkowało podwyższonym uwalnianiem [<sup>3</sup>H]-Gln o ~15% w skrawkach izolowanych z myszy kontrolnych względem skrawków nie traktowanych inhibitorem. Zaobserwowano także ~40% podwyższenie uwalniania znakowanej Gln ze skrawków AOM po traktowaniu GAH względem AOM nie traktowanych (Ryc.4.4.2.D). Powyższe wyniki dokumentują funkcjonalne zaburzenie transportu Gln przez układ N w korze czołowej myszy AOM.



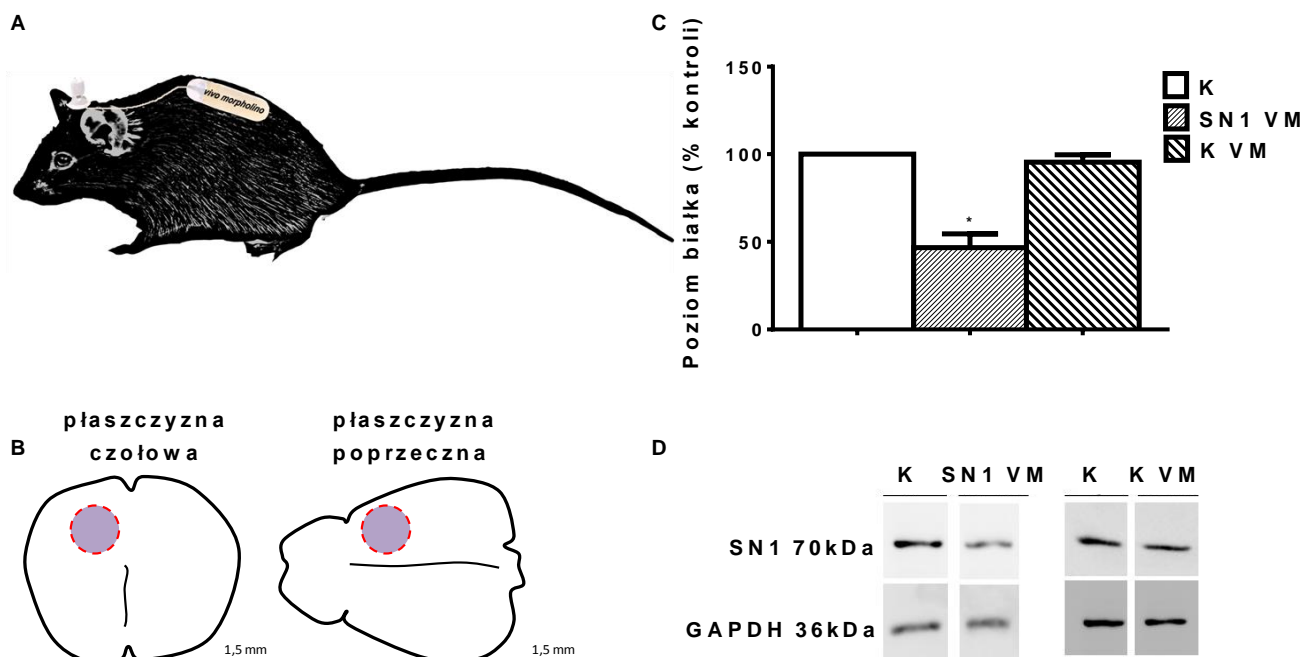


Ryc.4.4.2. (A) Kinetyka wychwytu [<sup>3</sup>H]-Gln (analiza wg Michaelisa-Menten; parametry kinetyczne w tabeli) przez skrawki kory czołowej myszy kontrolnych i AOM \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (B) Wychwyt [<sup>3</sup>H]-Gln przez skrawki kory czołowej myszy kontrolnych i AOM w obecności inhibitorów kompetycyjnych układów A, L i ASC lub inhibitora GAH. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli bez pulsu, # oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą po pulsie A + L, \*\* oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu z AOM bez pulsu (test Manna-Whitney). (C) Frakcyjne uwalnianie Gln ze skrawków kory pobranych z myszy kontrolnych i AOM, mierzone w 1-minutowych frakcjach, wyrażone jako procent uwolnionej Gln w stosunku do całkowitego początkowego wypełnienia skrawka [<sup>3</sup>H]-Gln. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli w tym samym punkcie czasowym, (test Manna-Whitney) (D) Średnie uwalnianie Gln w czasie 1 minuty podczas 4-minutowego impulsu (frakcje 4-7) bez dodatku inhibitorów, z pulsem A+L lub pulsem GAH. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli bez pulsu, # oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą po pulsie A + L, \*\* oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu z AOM bez pulsu, (test Manna-Whitney).

## 4.5. Pomiar poziomu białka SN1 po wyciszeniu techniką *vivo-morpholino*

### 4.5.1. Pomiar immunoreaktywności białka

Wykazano obniżenie o ~55% ilości transportera SN1 w wyciszonym fragmencie kory czołowej w stosunku do immunoreaktywności białka zmierzonej w odpowiadającym fragmencie półkuli kontralateralnej oraz fragmencie kory mózgu myszy, której podawano sól fizjologiczną lub oligonukleotydy niewyciszające (z ang. *mismatched*) (Ryc.4.5.1.C).



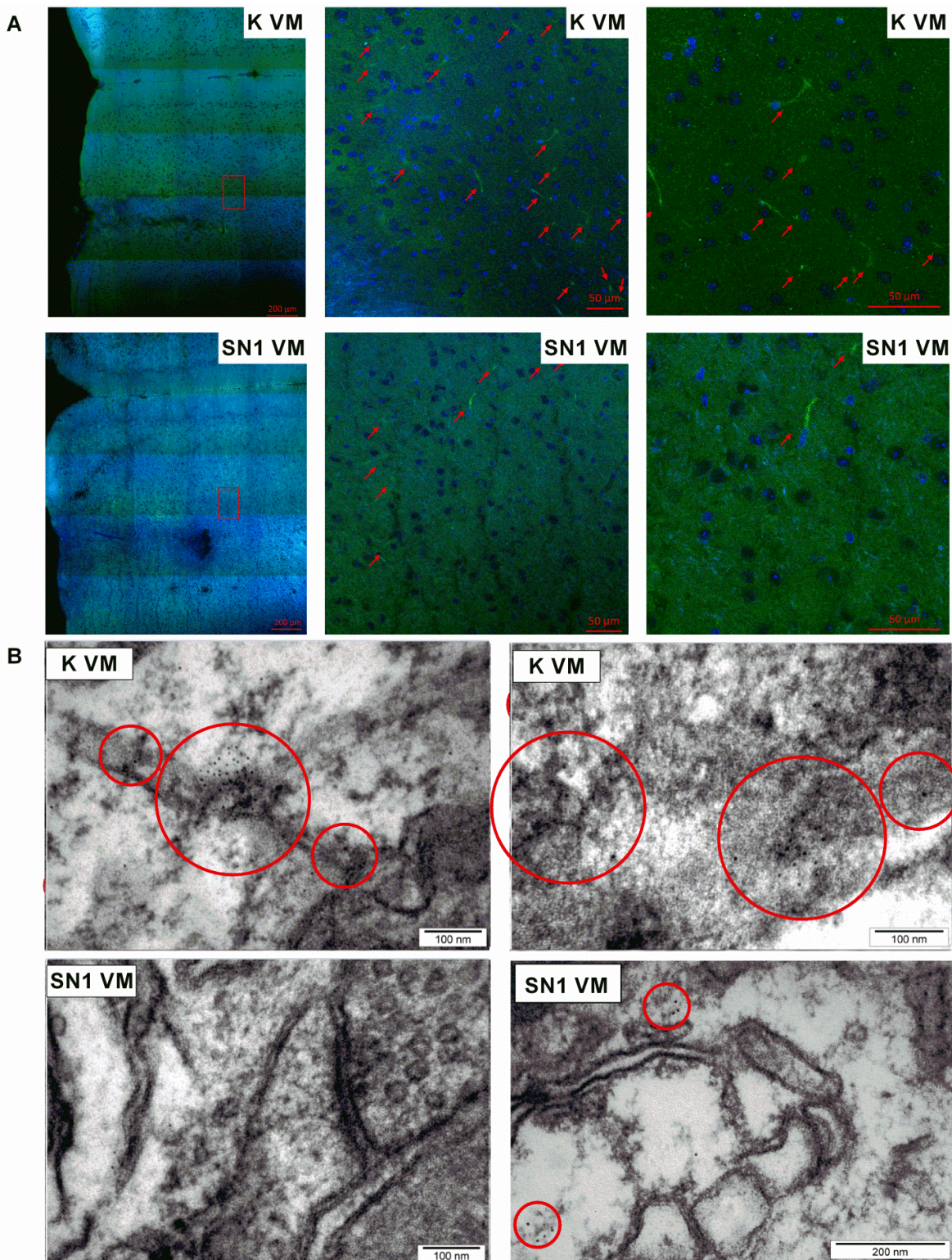
Ryc.4.5.1. (A) Grafika przedstawiająca metodę wyciszenia z użyciem pompy osmotycznej wszczepionej pod skórę zwierzęcia (B) Schematyczne przedstawienie lokalizacji i obszaru wyciszanego regionu mózgu za pomocą techniki *vivo-morpholino* (C) Poziom białka SN1 w odpowiadającym wyciszeniu obszarze kory czołowej myszy kontrolnej oraz myszy z wyciszonym SN1 i z półkuli kontralateralnej do wyciszenia. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test Manna-Whitney) (D) Reprezentatywny elektroforogram.

#### **4.5.2. Mikroskopowa analiza białka SN1 po wyciszeniu techniką *vivo-morpholino***

Metodą mikroskopii konfokalnej wykazano mniejszą ilość miejsc wyznakowanych przeciwciałem anti-SN1 w skrawkach mózgowych myszy SN1 VM w porównaniu do analizowanego fragmentu będącego lustrzanym odbiciem w półkuli kontralateralnej (Ryc.4.5.2.A). Specyficzność przeciwciała anti SN1 została potwierdzona brakiem znakowania miejsc reakcji immunohistochemicznej z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem I-rzędowym.

Ocena półilościowa wskazuje, że reakcja immunocytochemiczna występowała częściej u zwierząt z grupy kontrolnej niż u zwierząt po wyciszeniu białka SN1. Wyniki uzyskane z użyciem techniki mikroskopii konfokalnej potwierdzono techniką znakowania immunocytochemicznego z użyciem złota koloidalnego (immunogold) w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.





Ryc.4.5.2. (A) Analiza lokalizacji immunohistochemicznie znakowanego białka SN1 w wyciszonym obszarze kory czołowej myszy. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiające fragment półkuli z widocznym śladem po lokalizacji sondy (po lewej), oraz fragment obszaru kory poniżej wylotu, wybarwiony przeciwciałem anti-SN1 (zielone ślady) (B) Zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające fragment obszaru kory poniżej wylotu z wyznakowanym za pomocą złota koloidalnego białkiem SN1 (zaznaczone czerwonym owalem) u myszy z wyciszonym białkiem SN1 i bez wyciszenia.

#### 4.6. Parametry elektrofizjologiczne we fragmencie kory czołowej z wyciszonym białkiem SN1

##### 4.6.1. Wpływ wyciszenia SN1 na potencjały polowe (FP) i długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP)

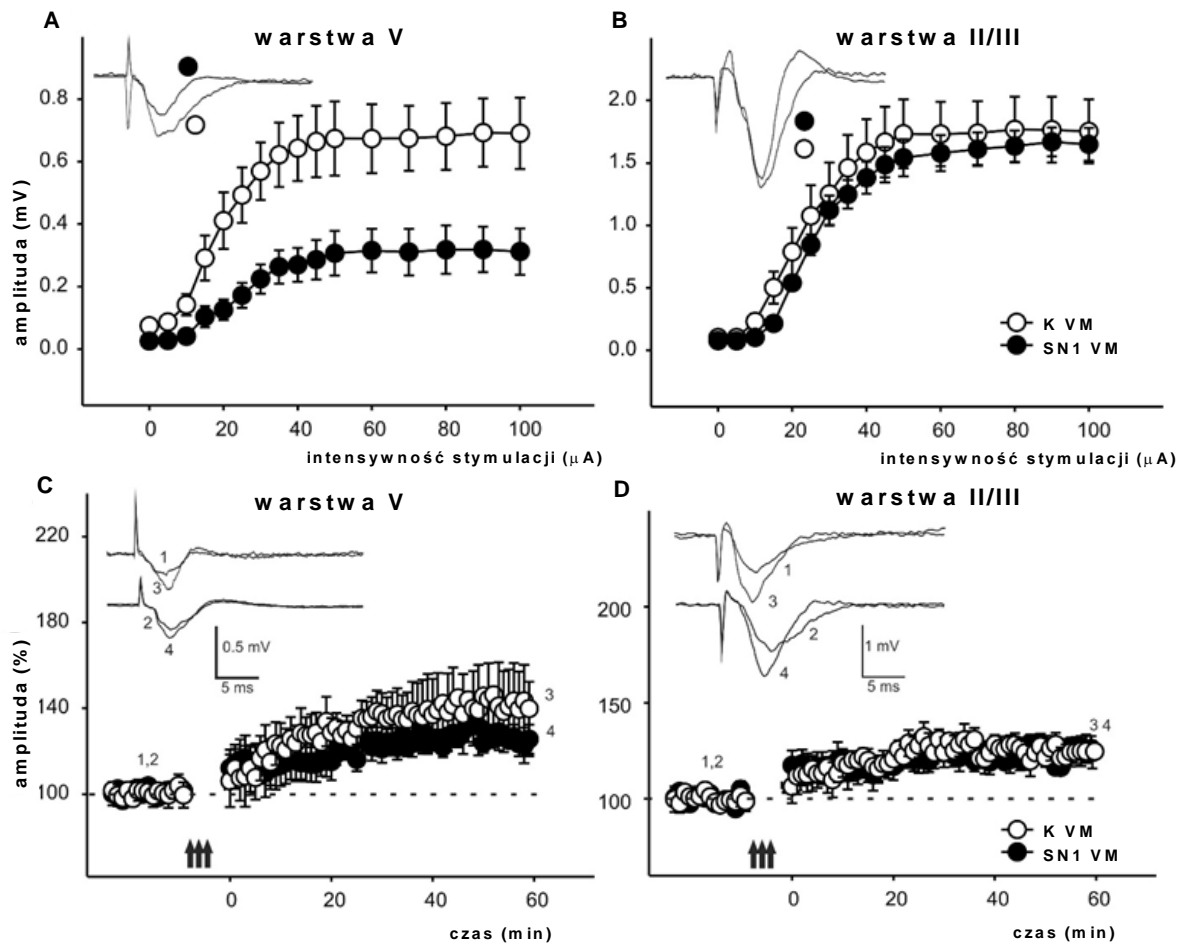
Analiza FP wykazała znaczące obniżenie amplitudy FP w szerokim zakresie intensywności stymulacji w odpowiedzi na bodziec, między neuronami warstwy V połączonymi horyzontalnie w skrawkach izolowanych z wyciszonego fragmentu mózgu myszy w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.6.1.A). Zmian nie zaobserwowano pomiędzy neuronami połączonymi wertykalnie, tzn. z warstwy V do II/III (Ryc. 4.6.1.B). Dane charakteryzujące krzywe wejściowo-wyjściowe FP (Tab. 4.6.1.) wskazują na obniżenie wartości maksymalnej amplitudy ( $V_{max}$ ) o ~55% oraz podwyższenie o ~31% intensywności stymulacji określającej wartość FP w połowie maksymalnej amplitudy w komórkach połączonych horyzontalnie w wyciszonym fragmencie kory w porównaniu do kontroli.

Nie wykazano istotnie statystycznych zmian w LTP między komórkami w połączeniach horyzontalnych, ani wertykalnych, jednak wskazano wyraźną tendencję do osłabienia się LTP w neuronach warstwy V połączonych horyzontalnie analizowanych w skrawkach z wyciszonym transporterem SN1, w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.6.1.C-D).

Tab.4.6.1. Parametry charakteryzujące odpowiedź potencjałów polowych na bodziec w połączeniach horyzontalnych i wertykalnych, obliczone na podstawie rozkładu Boltzmanna.

Połączenie horyzontalne w warstwie V				
	$V_{max}$ (mV)	$U_h$ ( $\mu$ A)	S	n
K VM	$0,68 \pm 0,10$	$22,02 \pm 1,56$	$5,25 \pm 0,61$	10
SN1 VM	$0,31 \pm 0,07^{**}$	$29,89 \pm 1,04^{**}$	$4,50 \pm 1,06$	6
Połączenie wertykalne między warstwami V a II/III				
K VM	$1,75 \pm 0,26$	$25,53 \pm 1,43$	$6,47 \pm 0,49$	9
SN1 VM	$1,61 \pm 0,13$	$27,19 \pm 1,27$	$6,51 \pm 0,99$	8

Intensywność bodźca wywołującego FP ~0,1 mV w amplitudzie;  $V_{max}$  - maksymalna amplituda FP;  $u_h$  - połowa maksymalnej stymulacji; S - współczynnik proporcjonalny do nachylenia krzywej; n- liczba skrawków. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej,  $^{**}p < 0,02$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).



Ryc. 4.6.1. (A, B) Związek pomiędzy intensywnością bodźca a średnią amplitudą potencjałów polowych neuronów połączonych horyzontalnie w warstwie V (A) oraz połączonych wertykalnie między warstwami V a II/III (B) analizowanych w skrawkach korowych myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1. (C, D) Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne mierzone między neuronami warstwy V (C) oraz warstwy V i II/III (D) w skrawkach korowych myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1. Wyniki w (A, B, C, D) przedstawiono jako średnią amplitudę (FP) z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej.

#### 4.6.2. Wpływ wyciszenia białka SN1 na pobudliwość błony neuronów piramidowych

Wykazano  $\sim 10\%$  zmniejszenie potencjału spoczynkowego pomiędzy neuronami warstwy II/III pochodzącymi od zwierząt wyciszonych a zwierzętami kontrolnymi, przy braku zmian w oporności wejściowej neuronów. Nie wykazano zmian w wewnętrznej pobudliwości ani progu dla generowania potencjału czynnościowego neuronów piramidalnych warstwy II/III (Tab.4.6.2.).

Nie było znaczących różnic w żadnym z parametrów opisujących pobudliwość błony neuronów piramidowych warstwy V.

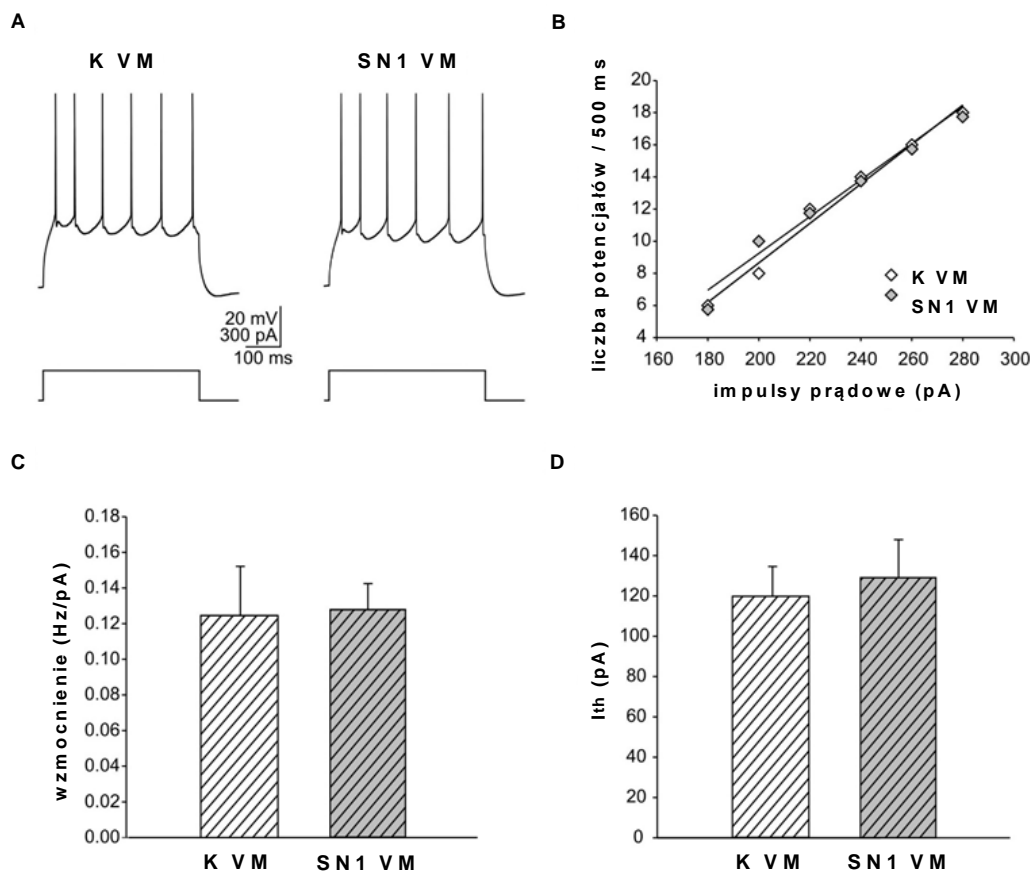
Tab.4.6.2. Parametry charakteryzujące właściwości błonowe neuronów piramidowych warstwy II/III (górny panel) oraz warstwy V (dolny panel).

<b>Komórki warstwy II/III</b>				
	Kontrola	KO-SN 1	Test	p
Potencjał spoczynkowy (mV)	-68,80 ± 2,33	-62,33 ± 1,33 *	Mann-Whitney	p=0,03
Oporność wejściowa (MΩ)	83,40 ± 22,80	107,93 ± 9,36	Mann-Whitney	p=0,13
Wzmocnienie (Hz/pA)	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,01	Mann-Whitney	p=0,66
Reobaza (pA)	119,88 ± 14,74	129,20 ± 18,88	t-Test	p=0,72
n	10	12		
<b>Komórki warstwy V</b>				
Potencjał spoczynkowy (mV)	-63,11 ± 1,12	-62,67 ± 0,86	Mann-Whitney	p=0,75
Oporność wejściowa (MΩ)	95,55 ± 8,87	89,04 ± 7,02	t-Test	p=0,49
Wzmocnienie (Hz/pA)	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	t-Test	p=0,82
Reobaza (pA)	203,17 ± 22,91	214,34 ± 21,75	Mann-Whitney	p=0,39
n	17	18		

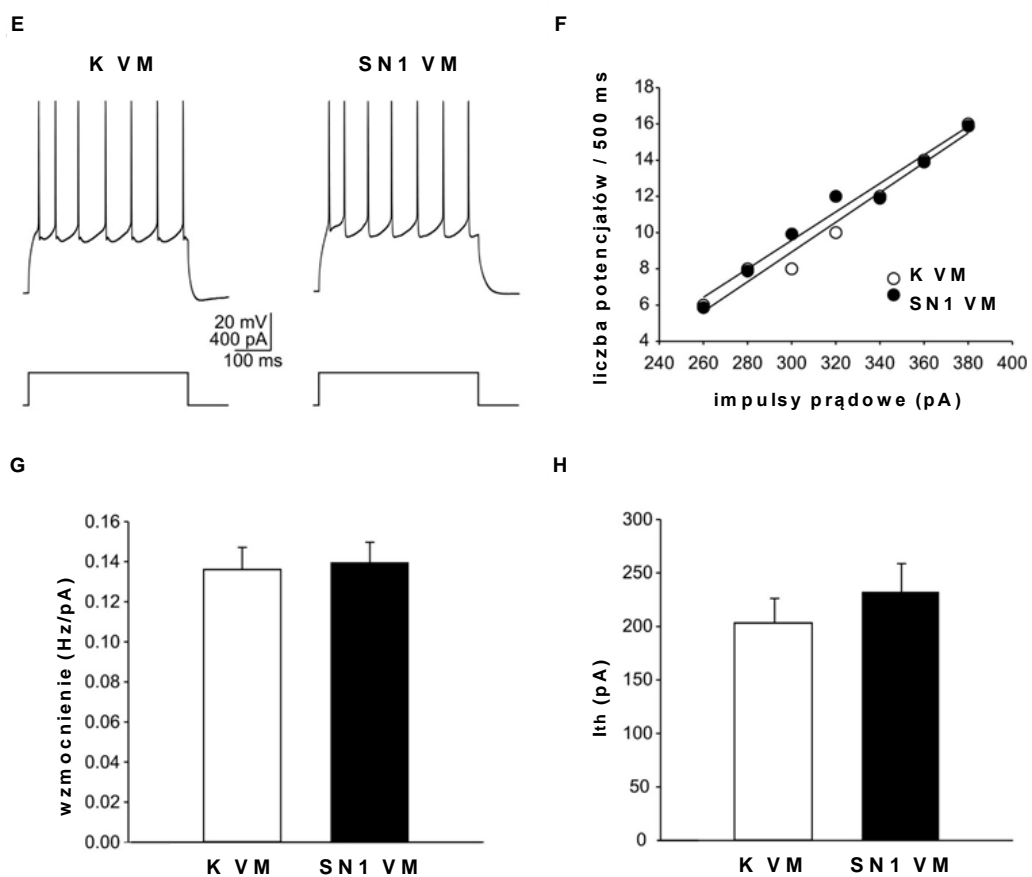
Wyniki przedstawiono jako średnią z: 10 komórek od 4 osobników dla kontroli oraz 12 komórek od 5 osobników z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy II/III oraz 17 komórek od 4 myszy kontrolnych i 18 komórek od 5 myszy z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy V ± błąd standardowy średniej. \*p<0,05 w stosunku do kontroli (test Manna-Whitneya).



### warstwa II/III



### warstwa V





Ryc. 4.6.2. (A, E) przykład odpowiedzi neuronu piramidowego izolowanego z II/III (A) oraz V (E) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych na impuls depolaryzujący. (B, F) stosunek natężenia prądu do prędkości wzrostu odpowiedzi komórek pochodzących z II/III (B) oraz V (F) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych (C, G) Średnie wzmocnienie (nachylenie wartości indukowanego prądu w zależności od szybkości odpowiedzi). Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej. (D, H) średni próg pobudzenia neuronów piramidowych z II/III (D) oraz V (H) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych. Wyniki przedstawiono jako średnią z: 10 komórek od 4 osobników dla kontroli oraz 12 komórek od 5 osobników z wyciszonym białkiem dla neuronów izolowanych z warstwy II/III oraz 17 komórek od 4 osobników kontrolnych i 18 komórek od 5 osobników z wyciszonym białkiem dla neuronów izolowanych z warstwy V  $\pm$  błąd standardowy średniej.

#### **4.6.3. Wpływ wyciszenia białka SN1 na pobudzające prądy postsynaptyczne (sEPSCs)**

Wyciszenie białka SN1 nie spowodowało znaczącej zmiany względem kontroli w żadnym z mierzonych paramterów: średniej częstotliwości, średniej amplitudy, średniego czasu narastania i średniej stałej czasowej zaniku sEPSCs neuronów piramidowych ani w warstwie II/III, ani V (Tab.4.6.3.A; Ryc.4.6.3.C-F).

Blokada kanału Na<sup>+</sup> nie spowodowała znaczącej zmiany ani parametrów sEPSC w warstwie II/III ani w V (Tab.4.6.3.B). Tak więc jest prawdopodobne, że większość sEPSC zapisanych w standardowym ACSF odpowiada miniaturowym EPSC (mEPSC).

Tab. 4.6.3.A Porównanie parametrów sEPSCs w neuronach piramidowych warstwy II/III (górny panel) i V (dolny panel) ze skrawków myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1.

sEPSC				
Komórki warstwy II/III				
	K VM	SN1 VM	Test	p
Częstotliwość (Hz)	0,46 ± 0,08	0,56 ± 0,08	t-Test	p=0,407
Amplituda (pA)	-8,59 ± 0,33	-8,49 ± 0,27	t-Test	p=0,806
Stała narastania (ms)	1,55 ± 0,06	1,49 ± 0,06	t-Test	p=0,517
Stała czasowa zaniku (ms)	5,31 ± 0,58	5,26 ± 0,30	t-Test	p=0,940
n	10	12		
Komórki warstwy V				
Częstotliwość (Hz)	0,83 ± 0,08	0,66 ± 0,07	t-Test	p=0,108
Amplituda (pA)	-8,57 ± 0,40	-8,84 ± 0,33	t-Test	p=0,610
Stała narastania (ms)	1,63 ± 0,09	1,59 ± 0,10	Mann-Whitney	p=0,380
Stała czasowa zaniku (ms)	6,19 ± 0,40	5,92 ± 0,42	t-Test	p=0,684
n	17	18		

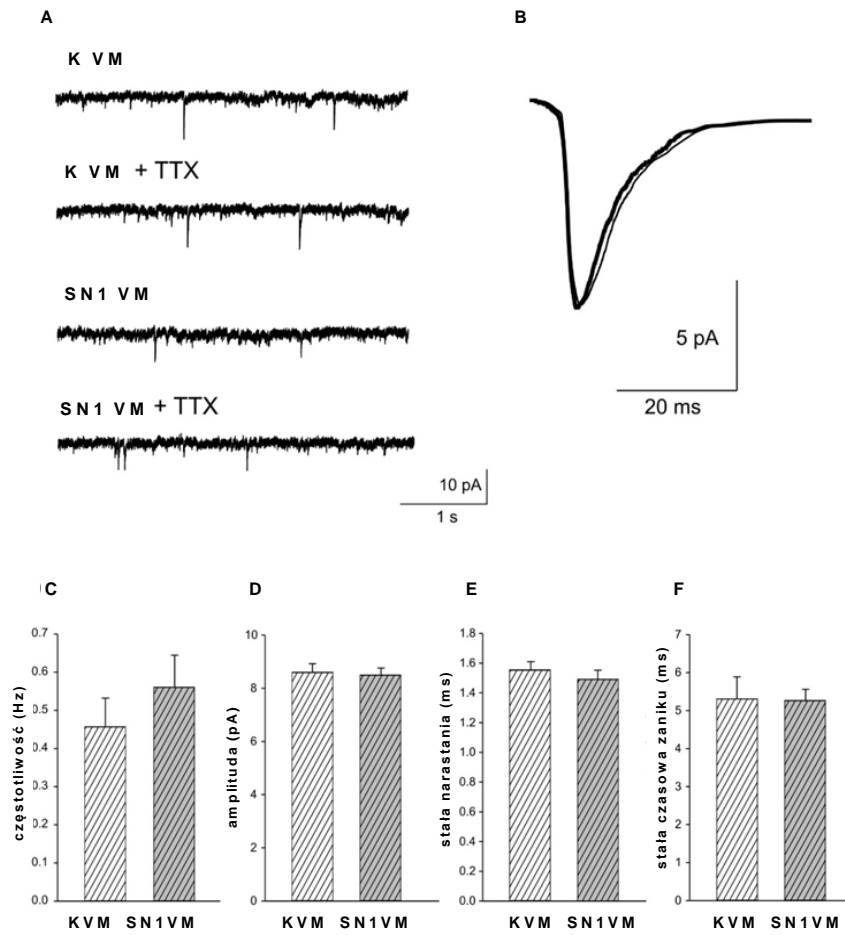
Wyniki przedstawiono jako średnią z: 10 komórek od 4 osobników dla kontroli oraz 12 komórek od 5 osobników z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy II/III oraz 17 komórek od 4 myszy kontrolnych i 18 komórek od 5 myszy z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy V ± błąd standardowy średniej.

Tab.4.6.3.B Porównanie parametrów sEPSC i mEPSCs w neuronach piramidowych warstwy II/III (górny panel) oraz V (dolny panel) w skrawkach korowych myszy kontrolnych i wyciszonych.

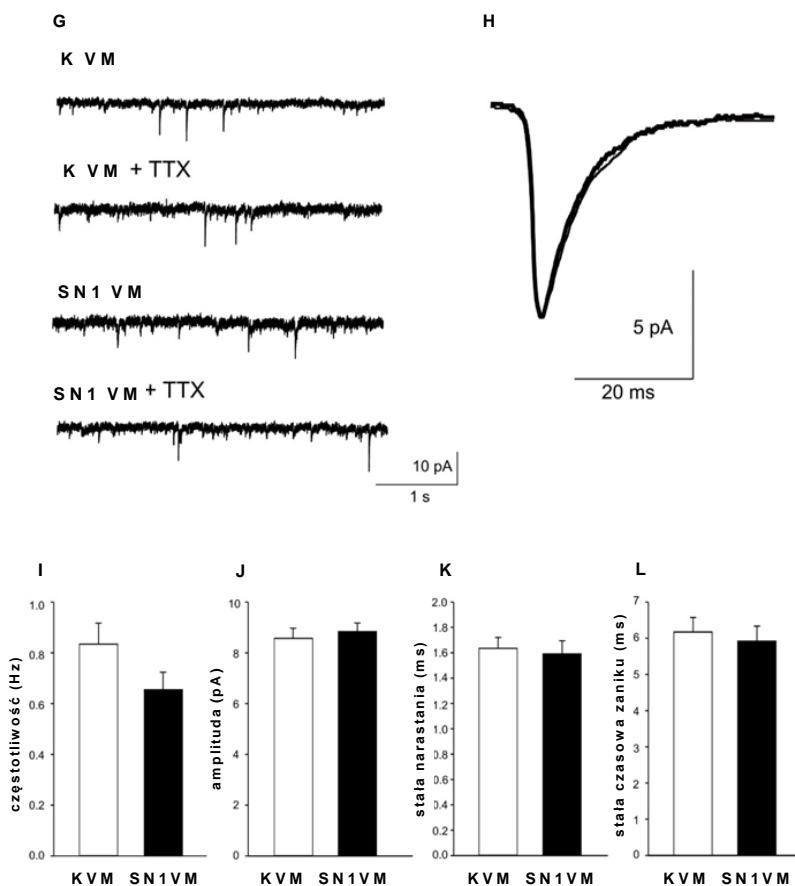
Komórki warstwy II/III			
K VM			
	sEPSC	mEPSC	p
Częstotliwość (Hz)	0,47 ± 0,09	0,47 ± 0,08	p=0,466
Amplituda (pA)	-8,39 ± 0,43	-8,36 ± 0,42	p=0,381
Stała narastania (ms)	1,53 ± 0,07	1,52 ± 0,06	p=0,472
Stała czasowa zaniku (ms)	5,64 ± 0,61	5,65 ± 0,58	p=0,800
SN1 VM			
Częstotliwość (Hz)	0,50 ± 0,05	0,49 ± 0,05	p=0,131
Amplituda (pA)	-8,19 ± 0,20	-8,18 ± 0,23	p=0,742
Stała narastania (ms)	1,50 ± 0,06	1,49 ± 0,05	p=0,844
Stała czasowa zaniku (ms)	5,44 ± 0,45	5,45 ± 0,43	p=0,857
Komórki warstwy V			
K VM			
Częstotliwość (Hz)	0,63 ± 0,08	0,52 ± 0,03	p=0,151
Amplituda (pA)	-8,56 ± 0,92	-7,74 ± 0,48	p=0,329
Stała narastania (ms)	1,77 ± 0,25	1,98 ± 0,16	p=0,533
Stała czasowa zaniku (ms)	6,52 ± 0,65	7,68 ± 0,46	p=0,193
SN1 VM			
Częstotliwość (Hz)	0,47 ± 0,06	0,35 ± 0,06	p=0,098
Amplituda (pA)	-9,49 ± 0,52	-9,15 ± 0,47	p=0,091
Stała narastania (ms)	1,52 ± 0,07	1,84 ± 0,23	p=0,262
Stała czasowa zaniku (ms)	5,90 ± 0,71	5,63 ± 0,62	p=0,165

Wyniki przedstawiono jako średnią z: 4 komórek od 4 osobników dla kontroli oraz 4 komórek od 5 osobników z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy II/III oraz 5 komórek od 4 myszy kontrolnych i 5 komórek od 5 myszy z wyciszonym białkiem SN1 dla warstwy V ± błąd standardowy średniej.

warstwa II/III



warstwa V



Ryc.4.6.3. (A, G) Przykład typowego zapisu sEPSC z neuronów warstwy II/III (A) oraz V (G) w skrawkach izolowanych od myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1 przed i po dodaniu TTX (B, H) Superpozycja średnich wszystkich indywidualnych sEPSC odczytanych podczas 4-minutowych zapisów z neuronu warstwy II/III (B) i V (H) skrawków myszy kontrolnych (cienka linia) i z wyciszonym białkiem (gruba linia). (C, I) średnia częstotliwość sEPSC, (D, J) średnia amplituda sEPSC, (E,K) średni czas narastania sEPSC i (F, L) średnia stała czasowa zaniku sEPSCs. (C-L) Wyniki przedstawiono jako średnią z: 10 komórek od 4 osobników dla kontroli oraz 12 komórek od 5 osobników po wyciszeniu SN1 dla warstwy II/III oraz 17 komórek od 4 myszy kontrolnych i 18 komórek od 5 myszy po wyciszeniu SN1 dla warstwy V  $\pm$  błąd standardowy średniej.

#### 4.7. Wpływ wyciszenia białka SN1 na powstawanie obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym

##### 4.7.1. Ultrastrukturalna ocena morfologiczna kory czołowej myszy po wyciszeniu białka SN1

W badanym materiale występowały 3 grupy naczyń kapilarnych o różnej budowie morfologicznej.

W grupie kontrolnej (KVM):

- 1) Naczynia o niezmienionej budowie ultrastrukturalnej.
- 2) Naczynia charakteryzujące się prawidłowym, niezmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadające nieliczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie komórek śródbłonkowych. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonkowych była gładka. Połączenia między komórkami śródbłonkowymi nie wykazywały cech morfologicznych wskazujących na nieszczelność. Widoczne były niewielkie zmiany ultrastrukturalne w postaci poszerzenia błony podstawnej, pod którą obecne były przynaczyniowe wypustki astrocytów o niezmienionej budowie morfologicznej.
- 3) Naczynia charakteryzujące się niewielkimi zmianami morfologicznymi śródbłonka, posiadające nieliczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie. Pomędzy komórkami śródbłonkowymi widoczne były niewielkie rozszczelnienia połączeń między komórkami śródbłonka. Pod błoną podstawną, czasami pogrubiałą występowały przynaczyniowe wypustki astrocytów o niezmienionej budowie morfologicznej.

Tab.4.7.1.A Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy kontrolnych.

	GRUPA 1	GRUPA 2	GRUPA 3
KONTROLA VM	27 % ± 2 %	65 % ± 2 %	8 % ± 1%

Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń ± błąd standardowy średniej, w każdym doświadczeniu analizowana 50 kolejnych naczyń, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

W grupie zwierząt wyciszonych (SN1 VM):

- 1) Naczynia o niezmienionej budowie ultrastrukturalnej.
- 2) Naczynia charakteryzujące się prawidłowym, niezmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadające nieliczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie komórek śródbłonkowych. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonkowych była gładka. Połączenia między komórkami śródbłonkowymi nie wykazywały cech morfologicznych wskazujących na nieszczelność. Otoczone były błoną podstawną o prawidłowej budowie morfologicznej. Pod błoną podstawną obecne były przynaczyniowe wypustki astrocytów charakteryzujące się jasną elektronowo cytoplazmą, z niewielkimi cechami obrzęku.
- 3) Naczynia charakteryzujące się prawidłowym, niezmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadające nieliczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie komórek śródbłonkowych. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonkowych była gładka. Połączenia między komórkami śródbłonkowymi nie wykazywały cech morfologicznych wskazujących na nieszczelność. Otoczone były błoną podstawną o prawidłowej budowie morfologicznej. Pod błoną podstawną obecne były przynaczyniowe wypustki astrocytów charakteryzujące się dużym obrzękiem okołonaczyniowym, sięgającym daleko poza strefę okołonaczyniową.

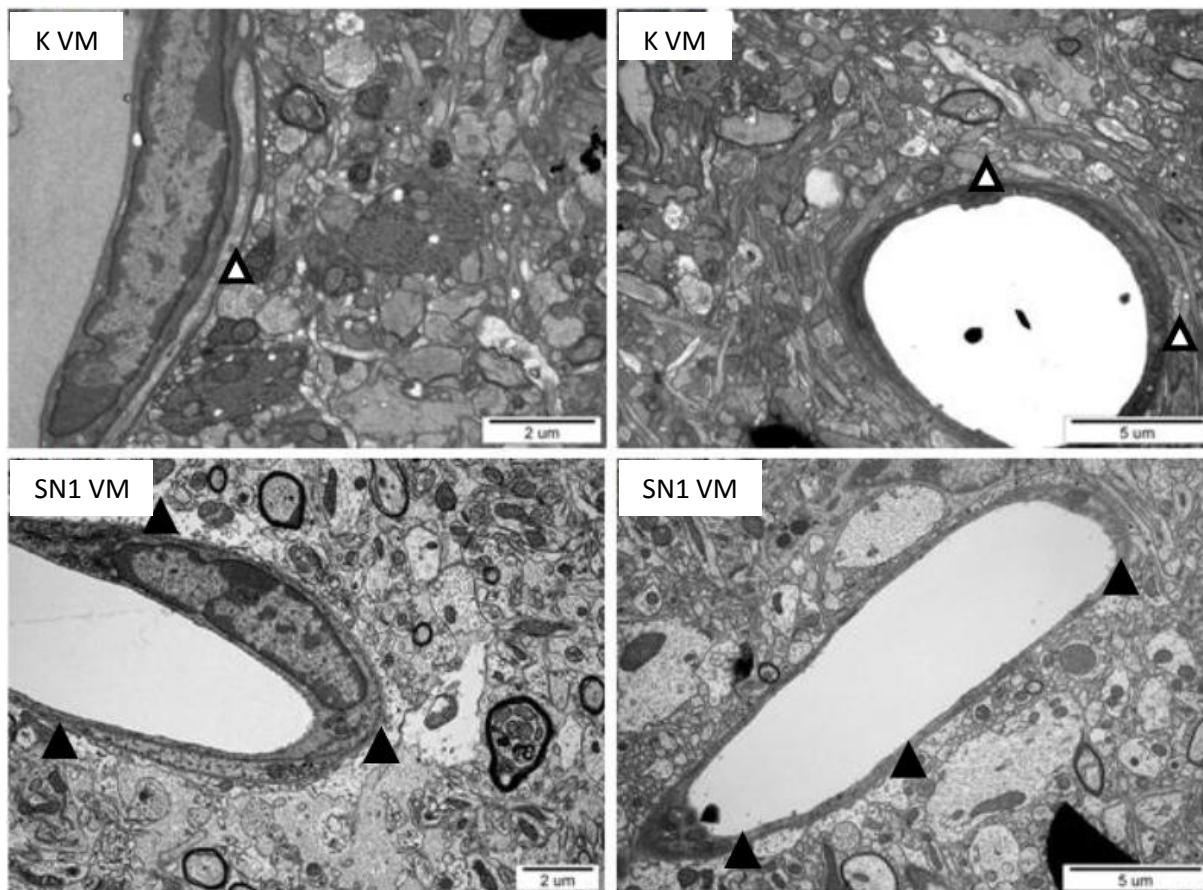
Tab.4.7.1.B Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy z wyciszonym białkiem SN1.

	GRUPA 1	GRUPA 2	GRUPA 3
WYCISZONE SN1 VM	37 % ± 4 %	23 % ± 2 %	40 % ± 2 %

Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych doświadczeń ± błąd standardowy średniej, w każdym doświadczeniu analizowana 50 kolejnych naczyń, \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

Na podstawie analizy mikroskopowej u myszy kontrolnych wykazano niewielkie uszkodzenia morfologiczne w komórkach śródbłonka i brak zmian wskazujących na obrzęk cytotoksyczny.

U zwierząt z lokalnie wyciszonym białkiem SN1 nie stwierdzono uszkodzeń komórek śródbłonka, ale wykazano że u ~63% występuje niewielki lub duży obrzęk cytotoksyczny.

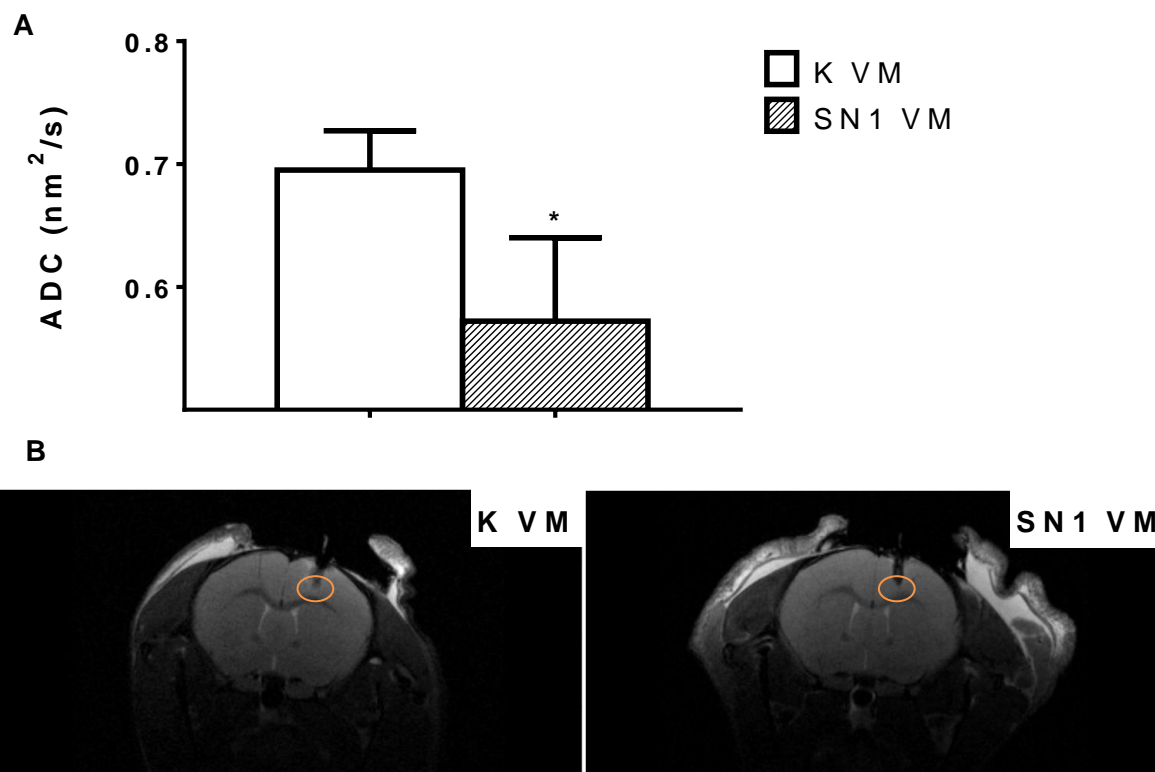


Ryc. 4.7.1. Zdjęcia ultrastruktury miejsca wyciszenia białka SN1 kory czołowej myszy (SN1 VM) i myszy bez wyciszenia (K VM).  $\triangle$  oznacza astrocyty kontrolne, a  $\blacktriangle$  astrocyty obrzmiałe.

#### 4.7.2. Wyznaczanie pozornego współczynnika dyfuzji metodą rezonansu magnetycznego we fragmencie kory czołowej myszy z wyciszonym białkiem SN1

Wyznaczenie parametru ADC w korze mózgowej myszy z wyciszonym SN1 oraz kontrolnych zostało przeprowadzone w obszarze 3x3 mm z pominięciem wylotu sondy. W korze czołowej myszy SN1 VM wykazano obniżoną o  $\sim 18\%$  wartość parametru ADC świadcząca o cytotoksycznym charakterze obrzęku mózgu (Ryc.4.7.2.A).

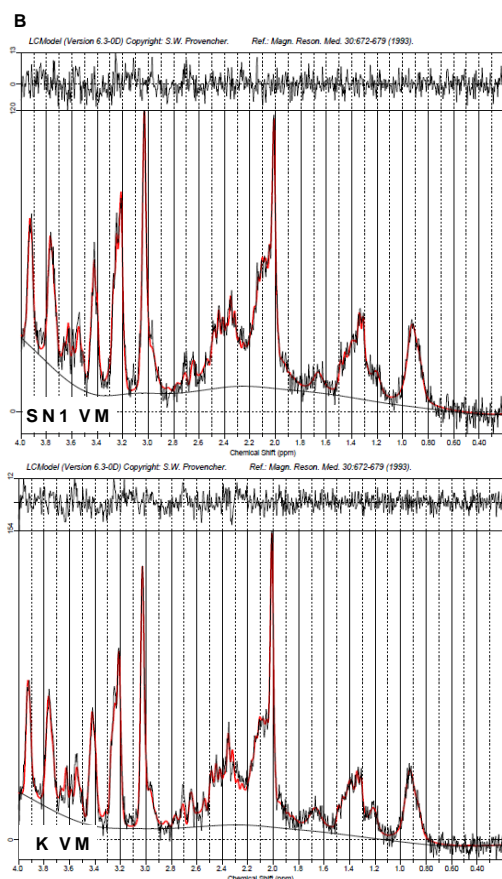
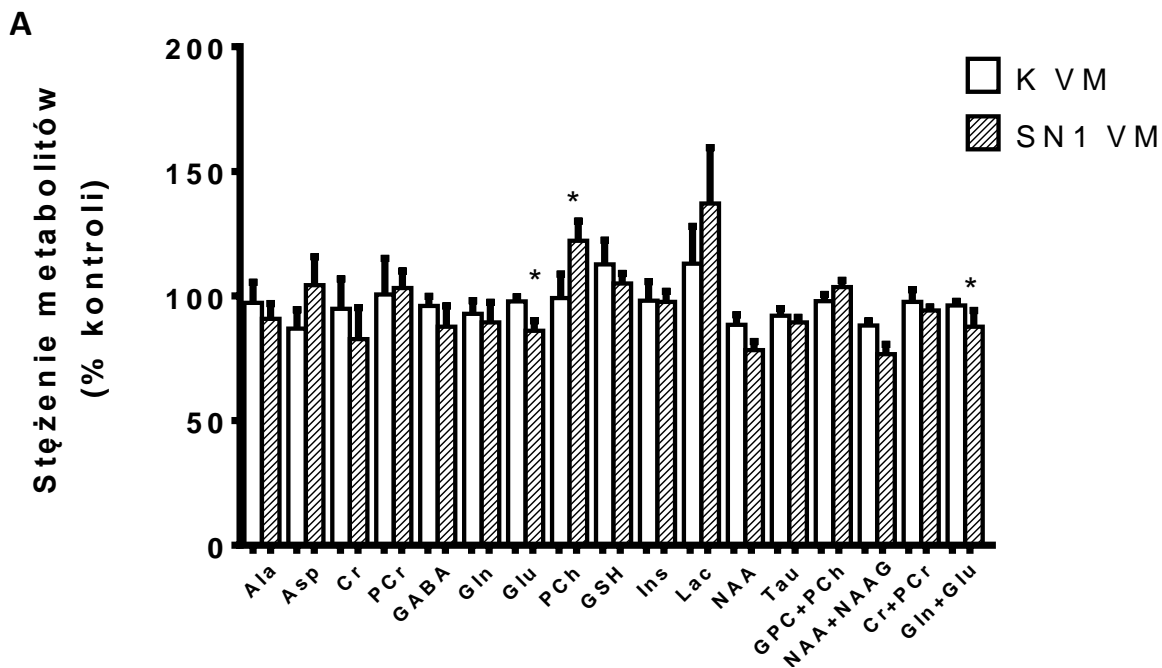




Ryc. 4.7.2. (A) Wartość pozornego współczynnika dyfuzji ADC u myszy C VM i SN1 VM. Wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (B) Zdjęcia przedstawiające obraz MRI przekroju mózgu z zaznaczonym obszarem analizy (kora) u myszy C VM i SN1 VM.

#### 4.7.3. Pomiar stężeń metabolitów w korze czołowej myszy SN1-VM metodą protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego

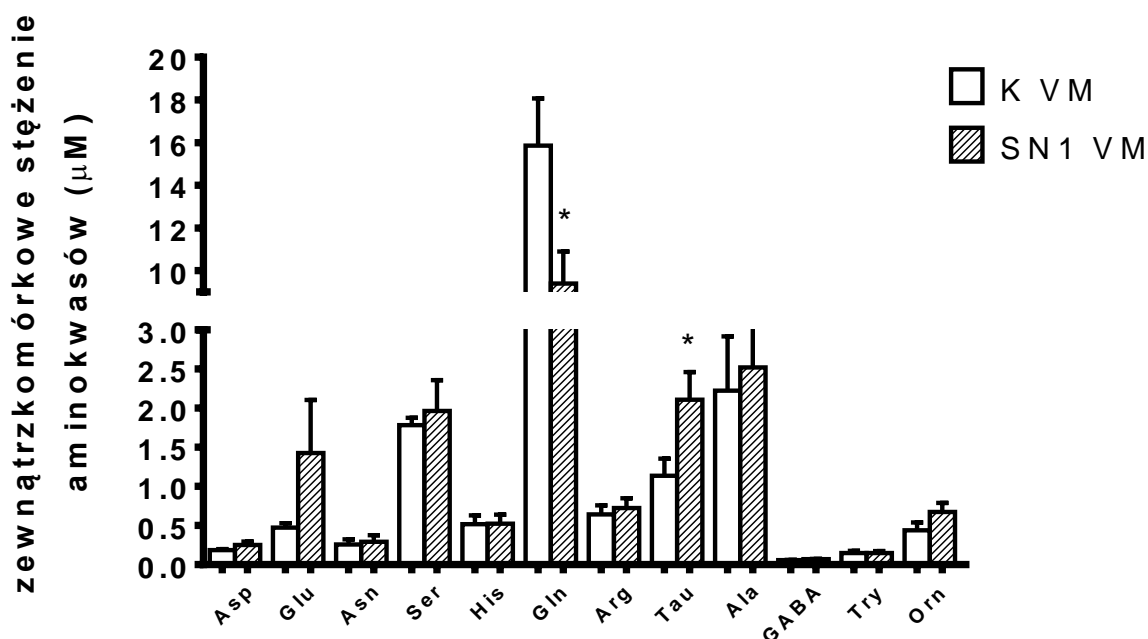
Analiza spektroskopowa fragmentu kory czołowej wykazała obniżenie stężenia Glu o ~15%, łącznie analizowanego stężenia Gln i Glu o ~13% oraz podwyższenie stężenia fosfocholiny o ~22% w porównaniu do myszy kontrolnych (Ryc.4.7.3.A).



Ryc.4.7.3. (A) Analiza spektroskopowa metabolitów we fragmencie kory czołowej u myszy kontrolnych (K VM) i wyciszonych (SN1 VM). Wyniki przedstawiono jako średnią z 7 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej  $*p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta). (B) Przykładowe widma spektroskopowe metabolitów zarejestrowane w wyciszonym fragmencie kory oraz w odpowiadającym miejscu kontrateralnie.

#### 4.7.4. Zewnątrzkomórkowe stężenia aminokwasów w mikrodializatach kory czołowej myszy SN1 VM

Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej zmierzono stężenia aminokwasów w mikrodializatach pochodzących z fragmentu kory czołowej myszy SN1 VM z wyciszonym transporterem SN1. Wykazano obniżone zewnątrzkomórkowe stężenia Gln o ~40%, oraz wzrost stężenia tauryny o ~85% w porównaniu do myszy kontrolnych (Ryc.4.7.4.). Dodatkowo stężenie Glu, pomimo braku znamienności statystycznej wykazywało wyraźną tendencję wzrostową.



Ryc. 4.7.4. Zewnątrzkomórkowe stężenia aminokwasów we fragmencie kory myszy z wyciszonym białkiem SN1. Wyniki przedstawiono jako średnią z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  błąd standardowy średniej \* $p < 0,05$  w stosunku do kontroli (test T-Studenta).

## 5. DYSKUSJA

Na patomechanizm EW w podobnym stopniu składają się zmiany wywołane głównym czynnikiem patogennym jakim jest amoniak przedostający się do mózgu w nadmiarze z krwi obwodowej (Felipo i Butterworth, 2002) oraz zmiany obwodowe, w tym przede wszystkim stan zapalny (Butterworth, 2013). Neurotoksyczne działanie amoniaku w mózgu opisują dwie kluczowe obserwacje, z których pierwsza dotyczy zmian w neuroprzebieżności glutaminergicznej (Felipo i Butterworth, 2002) zaś druga wiązana jest z nadmierną produkcją glutaminy (Gln). Gln jest głównym produktem detoksykacji amoniaku powstającym w swoistej dla astrocytów reakcji amidacji glutaminianu (Glu) (Waniewski, 1992), która bezpośrednio, bądź pośrednio przyczynia się do obrzmienia astrocytów (Desjardins i wsp., 2012). Ugruntowane przekonanie ostatniego dziesięciolecia jednoznacznie wskazuje na fakt, iż obrzmienie astrocytów związane z nagromadzeniem się w nich wody stanowi główny mechanizm inicjujący obrzęk mózgu w warunkach ostrej EW.

W tym miejscu należy wspomnieć, że dane wykazujące brak zadowalającej korelacji pomiędzy gromadzeniem się Gln, zaburzeniami energetycznymi i nadaktywnością receptora NMDA z jednej strony, a obrzękiem i neurofizjologicznymi przejawami EW z drugiej są również dostępne (Albrecht i wsp., 2010). Obserwacje takie wykazano u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym eksponowanych na wysokie stężenia amoniaku. W tym przypadku obrzęk pojawiał się zanim doszło do mierzalnego wzrostu poziomu Gln w mózgu (Larsen i wsp., 2001). W badaniach *ex vivo* zaś wykazano, że ingerencja w poszczególne etapy szlaku receptor NMDA- NO- cykliczny GMP prowadziła do zmniejszenia obrzmienia komórek skrawków mózgu poddanych działaniu jonów amonowych, pomimo utrzymującego się w nich podwyższonego stężenia Gln (Zielińska i wsp., 2003).

Wydaje się, że istotną rolę w regulacji stężenia Gln w komórce może odgrywać transport i białka w nim uczestniczące. Wyjaśnienie tego aspektu patomechanizmu EW stało się punktem wyjścia do podjęcia badań, których wyniki stanowią podstawę przedkładanej dysertacji.

Głównym celem pracy było sprawdzenie hipotezy zakładającej, że retencja Gln wewnątrz astrocytów, przyczynia się do wystąpienia obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym oraz że zaburzenia transmisji glutaminergicznej, są wynikiem upośledzonej aktywności lub/i ekspresji zlokalizowanego na błonie transportera SN1.

EW opisuje się jako astroglejopatię uznając, że główne zmiany patomorfologiczne dotyczą astrocytów, które pełnią nadrzędną rolę w regulacji homeostazy jonowej, osmotycznej oraz regulują przekazywanie synaptyczne, m.in. poprzez cykl Gln-Glu/GABA. Obrzmienie astrocytów obserwowano w materiale *post mortem* pochodzącym od pacjentów z ostrą EW (Kato i wsp., 1992) jak i w badaniach *in vivo* - w szczurzym tioacetamidowym modelu ostrej EW (Sathyaikumar i wsp., 2007) oraz *in vitro* wykonanych na szczurzej hodowli astrocytów poddanych inkubacji z amoniakiem (Jayakumar i wsp., 2006). Jak omówiono we wstępie, w wyniku detoksykacji amoniaku dochodzi do zwiększonej produkcji Gln w astrocytach. Wysokie stężenie Gln wykazano zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów i w modelach EW *in vivo* (Cordoba i wsp., 1996; Kojic i wsp., 2005). Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy poziomem Gln w mózgu pacjentów z EW, który wzrastał wraz pogłębieniem objawów EW w ten sposób, że niezauważalne były statystycznie istotne zmiany w bezobjawowej i minimalnej EW względem kontroli, natomiast u pacjentów z widocznymi objawami poziom Gln był podwyższony i statystycznie wyższy u pacjentów w 2 fazie choroby w porównaniu do chorych w fazie 1 (Laubenberger i wsp., 1997). Podobną zależność zaobserwowano u pacjentów z marskością wątroby w fazie bezobjawowej, u których podaniem mieszaniny aminokwasów wywołano hiperamonemię. Dowiedziono, że wraz z pogorszeniem wyników w teście pamięci krótkotrwałej znacząco wzrastał stosunek Glu/Gln oraz obniżał się stosunek mioinozytolu/kreatyny (mI/Cr). Wyniki te sugerują, że wywołany amoniakiem wzrost stężenia Gln wpływa na stan neurologiczny pacjentów (Shawcross i wsp., 2004). Dowodów na udział Gln w rozwoju obrzęku mózgu dostarczyła grupa Larsena. W pracy zmierzono stężenie Gln w mózgu w odniesieniu do ciśnienia śródczaszkowego (ICP), towarzyszącego rozwojowi obrzęku mózgu. Pacjentów z ostrą EW podzielono na dwie grupy, z niepodwyższonym ICP (poniżej 20 mmHg) oraz z wysokim ICP (powyżej 20 mmHg) i wykazano zależność wzrostu stężenia Gln w mózgu od wzrastającego ICP (Tofteng i wsp., 2006).

Przez cytotoksyczną składową obrzęku mózgu rozumie się stan nadmiernego gromadzenia płynu wewnątrz komórek. Powstawanie obrzęku o charakterze cytotoksycznym w warunkach ostrej EW obejmuje osmotyczne właściwości Gln, głównej substancji gromadzącej się w astrocytach, a także osmotycznie czynnych produktów glikolizy beztlenowej i ich pochodnych (mleczan, alanina) (Chatauret i wsp., 2003; Albrecht, 2003). Ich wysokie stężenie w komórkach powoduje wystąpienie nierównowagi osmotycznej, skutkującej napływem wody do komórek, ale też uwrażliwieniem astrocytów na działanie innych czynników patogennych takich jak cytokiny prozapalne czy benzodiazepiny (Aldridge i wsp.,

2015; Prakash i Mullen, 2010). Innym mechanizmem uwzględniającym gromadzenie się Gln w komórkach i jej rolę w patomechanizmie EW jest hipoteza Konia Trojańskiego, zakładająca że wysokie stężenie Gln w mitochondriach przekłada się na wysokie stężenie Glu i toksycznego amoniaku wskutek reakcji katalizowanej przez PAG. To z kolei prowadzi do wystąpienia kaskady zdarzeń obejmujących powstawanie ROS, naruszenie przepuszczalności błon mitochondrialnych, uwolnienie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz zahamowanie produkcji ATP (Albrecht i Norenberg, 2006).

Możliwe jest jednak, że przyczyną gromadzenia się Gln w astrocytach w warunkach ostrej EW jest zwiększona retencja Gln w komórce spowodowana zaburzeniem jej transportu na zewnątrz.

Transport Gln w astrocytach jest realizowany głównie przez układy zależne od jonów sodu, N, ASC i A (Palacín i Kanai, 2004; Pochini i wsp., 2014). Układ N cechuje dosyć wąska swoistość substratowa (Gln, histydyna i asparagina), a należą do niego m.in. SN1 (Boulland i wsp., 2002) i SN2 (Cubelos i wsp., 2005). Transporter SN1 wydaje się być najważniejszym białkiem regulującym wyrzut Gln z astrocytów. Świadczą o tym takie właściwości jak: optymalna aktywność przy fizjologicznym stężeniu Gln ( $K_m \sim 0,4 \text{ mM}$ ) oraz zdolność do transportu Gln niezależnie od obecności innych aminokwasów (Mackenzie i Erickson, 2004). Co więcej, wydajność transportu Gln przez SN1 zwiększa się wraz ze wzrastającym stężeniem wewnątrzkomórkowego Glu (Bröer i wsp., 2004). Właściwość ta jest szczególnie ważna biorąc pod uwagę fakt, że Glu pochodzący z neuronów stanowi  $\sim 80\text{-}90\%$  puli substratu do syntezy Gln w astrocytach (Kanamori i wsp., 2002). Warto zauważyć, że SN1 jest ekspresjonowany w komórkach glejowych sąsiadujących z synapsami glutaminergicznymi i GABAergicznymi, co sugeruje jego uczestnictwo w dostarczaniu substratu do produkcji neuroprzekazników i świadczy o preferencji do transportu Gln na zewnątrz komórki. SN2 występuje w układzie nerwowym mniej powszechnie niż SN1, i oprócz transportu Gln pośredniczy także w wyrzucie glicyny, niezbędnej do regulacji aktywności receptora NMDA (Hamdani i wsp., 2012). Jednak szczegółowa rola każdego z tych białek w regulacji transportu Gln w astrocytach w warunkach EW nie jest jeszcze w pełni poznana.

W szczurzym modelu BDL (Leke i wsp., 2015), oraz w modelu hiperamonemicznym (Zielińska i wsp., 2014) nie wykazano zmian ekspresji genu oraz białka SN1 a także SN2 (w modelu BDL wykazano wzrost poziomu ekspresji SN2 mRNA, który jednak nie uwidocznił się w zmienionej ilości białka). Natomiast w szczurzym modelu dewaskularyzacji wątroby wykazano obniżenie ilości transportera SN2 (Desjardins i wsp., 2012), podczas gdy

w tioacetamidowym szczurzym modelu ostrej EW wykazano spadek ilości białka SN1 (Zielińska i wsp.; 2014). Obserwacje te stały się punktem wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych badań, zgodnie z założeniem, że zmiany w ilości i aktywności transporterów mogą być jedną z przyczyn retencji Gln w komórkach przyczyniając się tym samym do powstawania cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu a także wpływając na neurotransmisję poprzez zaburzenie cyklu Gln-Glu/GABA.

Na potrzeby dysertacji w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN wprowadzono i scharakteryzowano myszy AOM model ostrej EW. Wykazano swoiste dla ostrej EW zmiany w parametrach biochemicznych krwi (Tab.4.1.1). Podwyższenie aktywności ALT i AST w osoczu świadczące o uszkodzeniu wątroby, potwierdzające uszkodzenie wątroby podwyższone stężenia: amoniaku i cytokin o charakterze prozapalnym – Il-6 i TNF- $\alpha$  (Butterworth, 2016; Jayakumar i wsp., 2015). Dodatkowo obniżenie ruchliwości (Ryc. 4.1.2.A) i pogarszający się stan neurologiczny myszy AOM (Ryc.4.1.2.B) dobrze odwzorowywał zmiany behawioralne obserwowane u pacjentów z ostrą EW. W stopniowym zaniku odruchów neurologicznych myszy w modelu AOM można wyodrębnić 4, charakterystyczne dla progresji EW, stopnie objawów neurologicznych świadczące o rozwoju choroby. Natychmiastowe obniżenie ruchliwości myszy po podaniu AOM, połączone ze zmniejszonym spożyciem wody i karmy wskazują na 1 stopień rozwoju EW (Matkowskyj i wsp., 1999). Osłabienie odruchu wibrycyjnego w ok. 12 godz. po podaniu hepatotoksyny koreluje z 2 stopniem, następnie całkowity brak zachowania równowagi oraz słabnięcie odruchów po podrażnieniu ucha widoczne w 16 godz. uznaje się za rozpoczęcie 3 fazy choroby. Widoczny zanik odruchu rogówkowego oraz brak odruchu wyprostnego zwierzęcia następujące w 22 godz. traktowane są jako ostatnia faza charakteryzująca się śpiączką kończącą się śmiercią osobnika (Chastre i wsp., 2014; Crawley, 2007).

Uważa się, że wspomniane zmiany behawioralne charakterystyczne dla ostrej EW są związane z nierównowagą pomiędzy neurotransmisją pobudzającą a hamującą. Szczegółowo opisana we wstępie rola receptora NMDA w rozwoju objawów choroby jest związana z jego wzmożoną pobudliwością i obserwowanym w warunkach ostrej EW podwyższeniem stężenia uwalnianego do szczelin synaptycznych Glu, który prowadzi do nadmiernego pobudzenia receptora (Tofteng i wsp., 2002; Hilgier i wsp., 1994; Popek i wsp., 2018). Zwiększone pobudzenie NMDA na skutek podania jonów amonowych w modelu szczurzym potwierdzono metodą obrazowania rezonansu magnetycznego (MRI) (Cauli i wsp., 2007). Udział NMDA w patomechanizmie neurotoksycznego oddziaływania amoniaku i EW potwierdziły doświadczenia z użyciem jego niekompetycyjnego antagonisty - memantyny w szczurzym

modelu całkowitego niedokrwienia wątroby, które skutkowało poprawą stanu neurologicznego zwierząt, normalizacją parametrów EEG, a także obniżeniem stężenia Glu (Vogels i wsp., 1997). Ponadto, zastosowanie inhibitora kanału - MK-801 w hodowlach astrocytarnych zmniejsza wywołane Glu obrzmienie (Chan i wsp., 1990). Natomiast w mysim modelu hiperamonemii udowodniono, że niezależnie od rodzaju zastosowanego inhibitora receptora NMDA (MK-801, ketamina, AP-5, butanol) dochodzi do obniżenia śmiertelności u zwierząt (Hermenegildo i wsp., 1996), podkreślając istotną rolę aktywności jonotropowego receptora Glu w toksyczności amoniaku. Przytoczone dane potwierdzają istotną rolę receptora NMDA w rozwoju objawów ostrej EW, jednak w celu pełnego zobrazowania zmian zachodzących na poziomie komórkowym niezbędne jest wykorzystanie technik elektrofizjologicznych.

Badania elektrofizjologiczne pozwalają na pomiar m.in. efektywności przekazywania sygnału między synapsami, wartości potencjałów polowych wyrażających zbiorcze pole elektryczne wywoływane wolną aktywnością postsynaptyczną wszystkich komórek w badanym regionie (Martin, 1991), a także określenie parametrów dotyczących potencjału spoczynkowego i czynnościowego błony neuronów oraz jej pobudliwości. Obecna wiedza na temat zmian w parametrach elektrofizjologicznych neuronów w warunkach EW koncentrowała się przede wszystkim na części postsynaptycznej, która może być zaburzona w wyniku oddziaływania receptora NMDA (Monfort i wsp., 2002). W skrawkach hipokampa pochodzących od szczurów hiperamonemicznych wykazano obniżenie wartości długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) względem skrawków kontrolnych (Muñoz i wsp., 2000). W uproszczeniu, molekularna zasada występowania LTP związana jest ze zsynchronizowanym działaniem receptorów AMPA, biorących udział w depolaryzacji komórek oraz działaniem receptorów NMDA, wykrywających zbieżność między aktywnością synapsy, a globalną depolaryzacją błony neuronu. Pobudzenie receptora AMPA powoduje wzrost potencjału błony w wyniku wprowadzenia do wnętrza komórki jonów sodu. Po osiągnięciu wystarczającego potencjału i w wyniku stymulacji glutaminergicznej uaktywnione zostają kanały receptorów NMDA (Bermúdez-Rattoni, 2007). W pierwotnych hodowlach neuronalnych pochodzenia szczurzego poddanych działaniu amoniaku (5-10mM) wykazano obniżenie pobudzenia glutaminergicznej transmisji synaptycznej bez znaczącego wpływu na dostępność Glu i aktywność receptora NMDA (Raabe, 1992). Dodatkowo w skrawkach szczurzych hipokampa poddanych działaniu amoniaku (1-5mM) udokumentowano odwracalną depolaryzację błony oraz obniżenie wartości amplitudy i wydłużenie czasu działania potencjałów czynnościowych neuronów (Fan i wsp., 1990). Jednak opisane wyżej obserwacje ograniczają się do efektów krótkotrwałych (od sekund do



minut), których nie można w pełni odnieść do progresji objawów w ostrej EW trwających wiele godzin czy kilka dni.

Dane dotyczące zaburzeń neurotransmisji glutaminergicznej oraz pogarszający się stan neurologiczny myszy, którym podawano AOM, sugerują nieprawidłowości w przekazywaniu informacji w korze czołowej i skłoniły nas do przeprowadzenia szczegółowych badań właściwości elektrofizjologicznych neuronów piramidowych i synaps pobudzających w stadium objawowym ostrej EW. Niezamieszczone w dysertacji wyniki dotyczące parametrów elektrofizjologicznych w bezobjawowej fazie EW wskazują na brak istotnych zmian w większości parametrów charakteryzujących transmisję synaptyczną, m.in. amplitudzie potencjałów polowych oraz częstotliwości i amplitudzie spontanicznych/miniaturowych postsynaptycznych prądów pobudzających. Jednak pomimo braku tych zmian, parametr określający krótkotrwałe wzmocnienie synaptyczne (PPF) był podwyższony o ~12%. Zmiana ta może być związana z presynaptycznym mechanizmem obejmującym sygnalizację wapniową powstałą w wyniku napływu wapnia przez bramkowane napięciem kanały wapniowe (Carter i wsp., 2002). Wyniki sugerowały, że we wczesnym, bezobjawowym stadium EW mogą występować zaburzenia w mechanizmach buforowania wapnia w obrębie szczelin synaptycznych.

W późniejszym, objawowym stadium EW stosunek parowanych impulsów był podwyższony o ~30% (Ryc.4.2.1.D), jednak towarzyszyły mu inne znaczące zmiany. Zauważono m.in. obniżenie częstotliwości sEPSC/mEPSC oraz zmniejszenie amplitudy potencjałów polowych komórek piramidowych II/III warstwy kory czołowej myszy w późnej fazie EW (Ryc.4.2.3.C,D). Zmiany te z kolei mogły być związane ze zmniejszeniem prawdopodobieństwa uwalniania neuroprzebieżników i/lub zmniejszeniem liczby miejsc je uwalniających (Li i Prince, 2002). Nasze wyniki własne, nie będące częścią dysertacji, sugerują ponadto zaburzenie presynaptycznego mechanizmu kontrolującego uwalnianie Glu, związane z nieprawidłową dystrybucją białek zaangażowanych w dokowanie pęcherzyków do błony presynaptycznej (Popek i wsp., 2018). Wykazaliśmy obniżenie stosunku ilości synaptofizyny i synaptotagminy, będących integralnymi białkami błonowymi występującymi w pęcherzykach presynaptycznych, we frakcji błonowej względem cytozolowej w korze czołowej myszy AOM. Zmniejszona ilość tych białek w błonie pęcherzyków synaptycznych może powodować zaburzenia w ich dokowaniu do błony presynaptycznej. Ponadto podwyższony poziom ekspresji białek syntaksyny-1 i stosunku frakcji błonowej do cytozolowej białka Munc-18-1 sugerowały odpowiedź kompensacyjną wobec niewystarczającej ilości pęcherzyków ulegających interakcji z tymi białkami. Syntaksyna-1

i Munc-18-1 tworzą kompleks białek fuzyjnych, biorących udział w zależnym od kompleksy SNARE dokowaniu pęcherzyków do błony presynaptycznej. Dokładne poznanie mechanizmu obserwowanych zmian wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań uwzględniających zmiany poziomu ekspresji i dystrybucji innych białek synaptycznych, np. należących do kompleksu SNARE SNAP-25 czy synaptobrewiny. Dodatkowo, analiza morfologiczna komórek w korze czołowej myszy przy wykorzystaniu mikroskopii elektronowej dostarczyła informacji na temat obecności zwiększonej liczby pęcherzyków synaptycznych w przestrzeni presynaptycznej myszy AOM. Obserwacja ta potwierdza tym samym obniżoną zdolność fuzji pęcherzyków z błoną presynaptyczną w porównaniu do kontroli. Wykazany w korze myszy AOM obniżony poziom ekspresji białka *vtila* (z ang. *vps10p tail interactor 1a*), działającego z białkiem błonowym 7 związanym z pęcherzykami synaptycznymi, białka zaangażowanego w spontaniczne uwalnianie neurotransmiterów (Crawford i Kavalali, 2015) można wiązać z obniżeniem częstotliwości sEPSC, co potwierdzają badania wcześniejsze wykorzystujące hodowle neuronalne otrzymane z hipokampów szczurzych (Ramirez i wsp., 2012).

W neuronach pochodzących z kory czołowej myszy w fazie objawowej ostrej EW zauważono także zwiększenie amplitudy i dłuższą stałą czasową sEPSC/mEPSC (Tab.4.2.3). Zmiany te wydają się być pochodzenia postsynaptycznego, a związane mogą być zarówno ze zwiększoną ilością Glu w pęcherzykach synaptycznych, jak i ze wzrostem aktywności jonotropowego receptora NMDA (Ren i wsp., 2011).

W mysim modelu AOM wykazano podwyższone zewnątrzkomórkowe stężenie Glu (Popek i wsp., 2018). Zwiększoną aktywność receptora NMDA wykazano w innych modelach ostrej EW (Kosenko i wsp., 2003, Hermenegildo i wsp., 2000]. Ponadto zaobserwowano zmniejszoną oporność wejściową neuronów, co odpowiada obserwacjom w szczurzych skrawkach hipokampa poddanych działaniu amoniaku. Wyniki te sugerują wpływ warunków ostrej EW na wystąpienie długotrwałych zmian parametrów określających potencjały czynnościowe neuronów (Fan i Szerb, 1993). Dokładny mechanizm powstawania zmian widocznych w omawianym modelu wymaga dalszych badań.

W skrawkach kory mózgowej myszy AOM, w obu badanych punktach czasowych wykazano obniżenie LTP (Ryc.4.2.1.B). Upośledzenie LTP wykazano we wcześniejszych badaniach w warunkach EW (Muñoz i wsp., 2002; Felipo, 2013), które jednak skupiały się głównie na roli modulacji szlaku NMDA-sGC-nNOS-NO-cGMP (Muñoz i wsp., 2000, Monfort i wsp., 2009a i 2009b). W badaniach własnych wykazaliśmy zwiększony poziom białek kluczowych dla aktywności postsynaptycznej (kompleks NR1/PSD-95/nNOS) przy jednoczesnym obniżeniu parametru LTP (Popek i wsp., 2018). Wydaje się wysoce prawdopodobne zatem, że

u podstaw obniżonego LTP mogą leżeć mechanizmy niezależne od kompleksu tworzonego przez podjednostki receptora NMDA. Mogą one obejmować np. obserwowany wzrost poziomu prozapalnych cytokin, IL-6 i TNF- $\alpha$ , ponieważ wykazano, że aktywacja poszczególnych cytokin w mózgu jest zaangażowana w regulację LTP (del Rey i wsp. 2013).

Obrzęk mózgu jest najpoważniejszą komplikacją kliniczną ostrej EW, a jego wystąpienie obserwowano zarówno u pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby (O'Brien i wsp., 1987; Aggarwal i wsp., 1994; Bjerring i wsp., 2009; Rai i wsp., 2008), jak i w zwierzęcych modelach ostrej EW (Dixit i Chang, 1990; Willard-Mack i wsp., 1996; Norenberg, 1974) i modelach hiperamonemicznych (Takahashi i wsp., 1991; Hilgier i Olson, 1994). Może się rozwijać w wyniku zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*) dla wody i związków toksycznych (składowa naczyniopochodna) lub przez gromadzenie się osmolitów w komórkach (składowa cytotoksyczna). Obie składowe mogą powstawać w sposób niezależny, lub być ze sobą wzajemnie powiązane.

Analiza morfologiczna komórek kory czołowej myszy AOM przeprowadzona przy wykorzystaniu emisyjnej mikroskopii elektronowej (EM) wykazała obecność obrzmiałych wypustek astrocytarnych stanowiących cytotoksyczną składową obrzęku mózgu (Ryc.4.3.2. górny panel). Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane wcześniej u pacjentów z ostrą EW (Kato i wsp., 1992) oraz w tym, i innych modelach ostrej EW (Nguyen 2006; Belanger i wsp. 2005).

Nowoczesnymi metodami nieinwazyjnymi, pozwalającymi dokonać oceny stopnia obrzęku mózgu, który odpowiada zaawansowaniu stanu chorobowego jest rezonans magnetyczny (MR). Badania prowadzone przy wykorzystaniu tej techniki opierają się na pomiarze sygnałów protonowych pochodzących od metabolitów lub zawartości/dyfuzji cząsteczek wody w wybranych fragmentach mózgu. Uzyskane w ten sposób wyniki pozwalają określić ich stężenia w wybranych obszarach mózgu. Głównymi markerami podlegającymi ocenie są mleczan (produkt końcowy beztlenowej glikolizy); N-acetylo-asparaginian (NAA, regulujący aktywność neuronów); Glu i Gln (aminokwasy zaangażowanego m.in. w neurotransmisję pobudzającą); kreatyna i fosfokreatyna (metabolity rezerwuaru energetycznego); pochodne choliny (składniki błon komórkowych); i mioinozytol (przypuszczalny znacznik glejowy sugerujący nierównowagę osmotyczną) (Govindaraju i wsp., 2000). Z kolei konwencjonalne obrazowanie MRI opiera się na sygnałach protonowych, których gęstość jest proporcjonalna do ilości wody (Filippi i wsp., 2011). Bardziej wyrafinowane techniki pozwalają zaobserwować interakcje pomiędzy protonami i wskazywać parametry odzwierciedlające

uszkodzenie mieliny, uszkodzenie komórek i zmiany zawartości wody w przestrzeniach międzykomórkowych (Chavarria i Cordoba, 2015). Jedną z nowoczesnych metod obrazowania, wykorzystaną w prezentowanych badaniach jest wyznaczenie parametru pozornego współczynnika dyfuzji (ADC). W szczurzym modelu hiperamonemii wykazano podwyższenie parametru ADC w hipokampie, skorupie ogoniastej i korze mózgowej co sugeruje wystąpienie naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu, oraz obniżenie wartości parametru w podwzgórzu, odzwierciedlające cytotoksyczną składową obrzęku (Cauli i wsp., 2007). Obniżenie wartości ADC zostało wykazane także w szczurzym modelu dewaskularyzacji wątroby (Chavarria i wsp., 2010). W badaniach własnych wykonanych na mysim modelu AOM wykazano ~10% obniżenie ADC obliczonego na podstawie analizy zmian dyfuzji cząsteczek płynu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej (Ryc.4.3.3.A). Wynik ten odpowiada ograniczeniu dyfuzji cząsteczek wody w korze czołowej myszy AOM, co jest tłumaczone zmniejszoną przestrzenią zewnątrzkomórkową potwierdzającą cytotoksyczny charakter obrzęku mózgu, podczas gdy jego podwyższenie sugerowałoby przewagę składowej naczyniopochodnej (Chavarria i Cordoba, 2015). Badanie to dostarczyło danych ilościowych dotyczących obecności cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu w modelu AOM.

Jak wspomniano, opisywana składowa obrzęku mózgu jest nierozdzielnie związana z astrocytami, które w warunkach fizjologicznych są zdolne do regulacji swojej objętości. Wzrost ciśnienia osmotycznego aktywuje procesy osmoregulacyjne, które mają utrzymać homeostazę komórki. Polegają one na zapewnieniu stanu równowagi wodno-elektrolitowej, w wyniku gromadzenia się osmolitów. Substancje osmoregulacyjne są niewielkimi, rozpuszczalnymi cząsteczkami organicznymi, stabilizującymi błony komórkowe, nie wpływając jednocześnie na metabolizm komórki. Ich dystrybucja wiąże się z syntezą lub pobraniem z otoczenia za pomocą specjalnych systemów transportowych. W przypadku obrzmienia komórek dochodzi do uwolnienia osmolitów organicznych, takich jak Gln, tauryna czy mioinozytol i utrzymanie stałej objętości komórki (Blum i wsp., 2010). Mechanizmy te związane są między innymi z wapnio-zależnymi kanałami jonowymi lub kanałem VRAC (ang. volume-regulated anion channel), który reguluje objętość komórki poprzez transport jonów chloru i w.w. osmolitów organicznych (Hoffmann i wsp., 2015). W warunkach ostrej EW mechanizmy regulujące normalizację objętości komórek są niewystarczające (Cordoba i wsp., 1996, Ott i Vilstrup, 2014), a w późniejszych stadiach choroby zaburzone, m.in. w wyniku zachwianej homeostazy jonów wapnia na skutek oddziaływania wysokich stężeń amoniaku na komórki (Rose i wsp., 2005; Haack i wsp., 2014). Dlatego też stężenie wymienionych wcześniej substancji osmotycznie czynnych może

świadczą o obecności cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu. W modelu AOM zaobserwowano zwiększone stężenie całkowite Gln i mioinozytolu w korze czołowej myszy (Ryc.4.3.4.A). Jak wielokrotnie wykazywano, wysokie stężenie Gln często koreluje z wystąpieniem obrzęku o charakterze cytotoksycznym (Kojic i wsp., 2005; Laubenberger i wsp., 1997; Shawcross i wsp., 2004). Podwyższony poziom mioinozytolu, który obok Gln jest jednym z głównych osmolitów organicznych w mózgu, również potwierdza wystąpienie nierównowagi osmotycznej w badanym modelu. Dane pochodzące od pacjentów z przewlekłą i ostrą EW, a także zwierzęcych modeli EW, w większości wykazują podwyższenie stężenia Gln ze współtowarzyszącym obniżeniem poziomu mioinozytolu (Gupta i wsp., 1993; Kreis i wsp., 1991; Zwingmann i wsp., 2004; Herman-Sucharska i wsp., 2010; Häussinger i wsp., 1994).

U pacjentów z przewlekłą EW obniżenie poziomu mioinozytolu tłumaczy się kompensacyjną odpowiedzią komórek na nierównowagę osmotyczną. Warto nadmienić, że podczas gdy zmiany w stężeniu elektrolitów występują szybko, zmiany stężeń osmolitów organicznych między wnętrzem, a przestrzenią zewnątrzkomórkową jest procesem powolnym. Wykazano, że obniżenie stężenia mioinozytolu w szczurzym modelu zespolenia wrotno-systemowego było zależne od czasu, a różnica jego stężenia między 1 dniem po zabiegu, a 3 tygodniem wynosiła ~25% (Cordoba i wsp., 1995). W związku z tym, że AOM model ostrej EW rozwija się w czasie krótszym niż 24 godziny możliwe jest, że czas ten jest niewystarczający do uzyskania wyników identycznych lub wysoce zbliżonych do obserwowanych u pacjentów lub w innych modelach EW z dłuższym przebiegiem w czasie. Dodatkowo podwyższenie całkowitego poziomu mioinozytolu może przekładać się na podwyższenie jego stężenia w przestrzeni międzykomórkowej, będąc odpowiedzią kompensacyjną wobec podwyższonego stężenia Gln w komórkach. Potwierdzenie tej obserwacji wymagałoby jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Zaobserwowane obniżenie całkowitego poziomu alaniny w korze czołowej myszy AOM (Ryc.4.3.4.A) może mieć więc związek ze zwiększonym zużyciem oraz zahamowaniem syntezy ATP, co wykazano uprzednio w modelach ostrej EW (Kosenko i wsp., 1994, Bernardi, 1996). W badaniach wykorzystujących szczurzy model ostrej EW wykazano, że podanie zwierzętom alaniny powoduje obniżenie ich śmiertelności, najprawdopodobniej w wyniku promowania syntezy ATP (Maezono i wsp., 1996). Również ta obserwacja wykazana w zastosowanym modelu mysim wymaga dalszej weryfikacji.

Wykazanemu obrzękowi cytotoksycznemu w korze czołowej myszy AOM towarzyszyło uszkodzenie BBB. Uważa się, że rozszerzenie BBB wywołane amoniakiem jest subtelne

(Pilbeam i wsp., 1983; Chen i wsp., 2009), lecz w warunkach ostrej EW jej przepuszczalność dla niektórych aminokwasów zwiększa się (Albrecht i wsp., 1994, 1996). Jak wspomniano wcześniej, w niektórych regionach mózgu, tj. w hipokampie i korze mózgowej szczurów hiperamonemicznych wykazano podwyższenie parametru ADC świadczące o wystąpieniu naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu (Cauli i wsp., 2007). W AOM modelu ostrej EW wykazaliśmy zmiany w integralności BBB na poziomie morfologii komórek śródbłonka, w których zauważono liczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie oraz mikrokosmki na powierzchni luminalnej komórek śródbłonka, a także obecność szczelin pomiędzy komórkami wskazujących na nieszczelność połączeń ścisłych (Ryc.4.3.2.dolny panel). Jest to zgodne z danymi literaturowymi zebranymi od pacjentów a także modelu ostrej EW (Kato i wsp., 1992; Matkowskyj i wsp., 1999). Dodatkowo wykazano zwiększoną przepuszczalność BBB dla błękitu Evansa, co sugeruje równoległe zmiany funkcjonalne w szczelności BBB w warunkach ostrej EW (Ryc.4.3.1.). Współwystępujący obrzęk o charakterze wazogennym w badanym modelu może wpływać na ogólny bilans wodny w korze mózgowej (Nguyen, 2012). Stopień uszkodzeń komórek endotelialnych i wyniki z MRI sugerują, że wystąpienie składowej naczyniopochodnej jest wtórne do cytotoksycznej i rozwija się dopiero w późniejszych fazach choroby, jednak obserwacje te wymagają weryfikacji.

Jednym z ostatnio rozważanych mechanizmów związanych z rozwojem obrzęku mózgu może być rola układu glimfatycznego. Uważa się, że układ glimfatyczny ułatwia usuwanie substancji toksycznych i reguluje stężenie niektórych związków takich jak amyloid- $\beta$  czy też tauryna (Iliff i wsp., 2014). Wykazano jego związek i zależność od obecności w błonie astrocytarnej kanałów wodnych 4 (akwaporyn-4), których wyciszenie skutkuje dysfunkcją układu glimfatycznego, co sprzyja gromadzeniu się tauryny i rozwojowi zmian neurodegeneracyjnych w mózgu. W mysim modelu AOM ostrej EW stwierdzono śródmiażdżowe zbieranie się znacznika fluorescencyjnego po jego podaniu dożylnym, świadczące o nieprawidłowym działaniu układu glimfatycznego w tych warunkach, co z kolei może pośrednio dowodzić zaburzeń układu glimfatycznego, co może przyczyniać się do powstania/pogłębiania obrzęku (Blei, 2008; Obara-Michlewska i wsp., 2018).

Postawiona w pracy hipoteza zakładająca udział transportera SN1 w powstawaniu cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu oraz zmian w neuroprzeźnaczności glutaminergicznej, skłoniła nas w pierwszej kolejności do zbadania ekspresji i funkcji astrocytarnych transporterów Gln. Jak opisano wcześniej uznaje się, że należący do układu N transporter SN1 jest głównym białkiem odpowiedzialnym za transport Gln w obrębie astrocytów ze względu na wysokie powinowactwo do Gln. Preferowanym kierunkiem

transportu tego aminokwasu jest transport na zewnątrz komórki (Mackenzie i Erickson, 2004). W mysim AOM modelu wykazano obniżenie ekspresji genów kodujących transportery SN1 i SN2 (Ryc.4.4.1.A) oraz obniżenie poziomu białka SN1, bez zmian ilości SN2 w korze czołowej zwierząt (Ryc.4.4.1.B). Obniżenie ekspresji genu kodującego transporter SN2 nie przekłada się na poziom białka, co może być tłumaczone regulacją jego ekspresji na poziomie posttranskrypcyjnym lub posttranslacyjnym. Warto też podkreślić mniej powszechne występowanie białka SN2 w mózgu (w stosunku do SN1) oraz rolę jaką przypisuje się mu w dostarczaniu glicyny, potrzebnej do prawidłowej pracy receptora NMDA. W tkance szczurzej wykazano jego obecność w około-synaptycznej błonie astrocytarnej i uznano, że pośredniczy w elektroobojętym i dwukierunkowym transporcie Gln i glicyny. W konsekwencji, SN2 może być regulatorem prawidłowej pracy receptora NMDA, co stanowi przesłankę do tego, że poziom ekspresji tego białka powinien pozostawać na stałym poziomie (Hamdani i wsp., 2012). Natomiast wykazane obniżenie zarówno poziomu ekspresji genu jak i białka transportera SN1 może przekładać się w sposób funkcjonalny na zatrzymywanie Gln w obrębie komórki. Warto przypomnieć, że obniżenie ekspresji transportera SN1 wykazano wcześniej w szczurzym modelu ostrej EW (Zielinska i wsp. 2014).

W pracy zbadano zarówno wychwyt jak i wyrzut znakowanej izotopowo Gln w skrawkach kory myszy. Parametry określające wychwyt i wyrzut aminokwasów pozwalają wykazać funkcjonalne zmiany w pracy układów odpowiedzialnych za ich transport. Obejmują więc sumarycznie zmiany ekspresji jak i zmiany aktywności nośników białkowych w zależności od czasu inkubacji, stężenia aminokwasów oraz zastosowanych inhibitorów. Biorąc pod uwagę, że Gln w mózgu jest transportowana przez wiele układów, do których zaliczamy A, ASC, L i N, użyto odpowiednich inhibitorów, dzięki którym wykazano wybiórczy udział transportera N lub wpływ zahamowania jego aktywności na dane parametry. Wykazano, że wychwyt [<sup>3</sup>H]-Gln w skrawkach kory czołowej izolowanych z mózgow myszy AOM jest obniżony w stosunku do kontroli, a obecność kompetycyjnych inhibitorów (5mM alanina i 5mM leucyna) innych systemów transportujących Gln (systemów A, L i ASC) skutkuje obniżeniem wychwyty zarówno u myszy kontrolnych jak i AOM, odpowiednio względem skrawków nietraktowanych (Ryc.4.4.2.B). Zastosowano kompetycyjny inhibitor układu N – GAH (z ang. *glutamate-γ-monohydroxamate*) o wysokiej selektywności i skuteczności, wcześniej potwierdzonej w czasie selektywnego blokowania systemu N w trakcie mikrodializy wątroby szczurów (Baird, 2004), a także mikrodializy hipokampa myszy (Dolgodilina i wsp., 2016). W badaniach własnych zastosowanie swoistego inhibitora systemu N spowodowało obniżenie wychwyty [<sup>3</sup>H]-Gln jedynie w przypadku kontroli względem skrawków

nietraktowanych (Ryc.4.4.2.B). Wyniki te sugerują, że w modelu AOM występuje funkcjonalne zaburzenie transportu Gln do wnętrza komórki. Dodatkowo, udział systemu N w wychwycie Gln w warunkach ostrej EW, odmiennie do warunków fizjologicznych, jest niewielki, a rolę tę pełnią inne systemy transportujące. Wydaje się, że w warunkach fizjologicznych pozostałe systemy nośnikowe są zaangażowane w wychwyt Gln w podobnym zakresie co system N.

Bardziej interesujące wydają się wyniki dotyczące wyrzutu Gln, którego zaburzenia zgodnie z postawioną hipotezą mogłyby powodować lub nasilać nieprawidłową neurotransmisję i rozwój cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu. Wykazano zaburzenia w uwalnianiu [<sup>3</sup>H]-Gln przez skrawki kory myszy AOM w porównaniu do skrawków kontrolnych (Ryc.4.4.2.C). Średni wyrzut [<sup>3</sup>H]-Gln był obniżony w stosunku do kontroli, podczas gdy zastosowanie inhibitora systemów A, L i ASC wpłynęło na zwiększony wyrzut aminokwasu w kontroli względem kontroli nie traktowanej, nie wpływając na wyrzut w skrawkach pochodzących z AOM (Ryc.4.4.2.D). Zastosowanie inhibitora układu N skutkowało podwyższonym wyrzutem zarówno w skrawkach kontrolnych jak i AOM, względem swoich nietraktowanych odpowiedników. Wyniki te wskazują na zaburzenia w uwalnianiu z komórki Gln u myszy AOM. Dodatkowo zastosowanie inhibitorów układów A, L i ASC nie wpłynęło na uwalnianie aminokwasu w warunkach ostrej EW, pozostawiając wyrzut na zbliżonym poziomie co u myszy AOM nie traktowanych (Ryc.4.4.2.D). Sugeruje to nadrzędną rolę układu N w transporcie Gln na zewnątrz komórki w warunkach ostrej EW. Podsumowując, obniżona ekspresja białka SN1 oraz funkcjonalne obniżenie wychwyty i uwalniania Gln w modelu AOM wspierają postawioną w dysertacji hipotezę. Dodatkowo w badaniach transportu Gln wykazano nadrzędną rolę systemu N w uwalnianiu Gln z komórek, podczas gdy wychwyt aminokwasu zależny jest od pozostałych układów A, L i ASC.

Postanowiono sprawdzić w bardziej bezpośredni sposób czy obniżony poziom astrocytarnego transportera Gln – SN1 wpłynie na akumulację tego aminokwasu w komórkach oraz czy wywołane w ten sposób zmiany mogą przełożyć się na powstanie obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym i wpływać na neurotransmisję.

Według dostępnych danych literaturowych grupa Prof. Wagnera podjęła się wytworzenia myszy z knockoutem transportera SN1. Białko wyciszono u myszy C57/Bl6 przez mutagenezę z wykorzystaniem N-etylo-N-nitrozomocznika. Zaobserwowano m.in. podwyższenie stężenia Gln i obniżenie stężeń Glu i GABA w mózgu zwierząt bez transportera SN1, jednak nadrzędną obserwacją był silnie zahamowany rozwój osobników, hipoglikemia i śmierć około 20-tego dnia po urodzeniu. Wykazano, że pomimo dużej liczby



transporterów Gln należących do innych układów, obecnych w organizmie, nie można zrekompensować braku białka SN1, co dowodzi, że ten transporter jest odgrywa nadrzędną rolę w transporcie Gln w wątrobie, mózgu i nerkach (Chan i wsp., 2016). W związku z tak wysoką śmiertelnością i młodym wiekiem osobników, nie mogliśmy posłużyć się tym modelem do oceny i porównania wybranych parametrów charakteryzujących myszy AOM model ostrej EW, wywołany u dorosłych (2-3 miesięcy) samców. Posłużyliśmy się zatem modelem lokalnego wyciszenia białka, w którym wykorzystując technikę *vivo-morpholino*, we fragmencie kory czołowej u myszy, selektywnie wyciszono transporter SN1. Myszy kontrolne stanowiły zwierzęta poddane identycznej procedurze, z tą różnicą, że zamiast zastosowania oligonukleotydów wyciszających, użyto oligonukleotydów niewyciszających (z ang. *mismatched*) lub soli fizjologicznej. Technika *vivo-morpholino* pozwala na wybranie dowolnego regionu mózgu lub innych tkanek do którego dostarcza się zaprojektowane oligonukleotydy skutkujące blokowaniem syntezy białka na poziomie translacji. Odbywa się to poprzez iniekcję ciągłą (w wypadku użytej przez nas pompy osmotycznej do 7 dni), o wybranej szybkości dostarczania płynu. Mając świadomość ograniczeń dotyczących wybranego przez nas modelu i wyciszenia transportera jedynie we fragmencie kory mózgowej weryfikowaliśmy założone w projekcie hipotezy ograniczając się jedynie do wyciszonego fragmentu kory.

Stopień wyciszenia białka SN1 sprawdzono za pomocą techniki Western Blot, a także wykorzystując techniki mikroskopii konfokalnej i elektronowej. Stwierdzono obniżenie poziomu transportera SN1 w wyciszonym fragmencie kory o wielkości 2x2 mm o ~50% w stosunku do odpowiadającego fragmentu z półkuli kontralateralnej oraz brak zmian u myszy kontrolnych (Ryc.4.5.1.C). Dodatkowo przy użyciu specyficznych dla transportera SN1 przeciwciał uzyskano obrazy z mikroskopu konfokalnego potwierdzające, że w wybranym fragmencie kory poziom białka SN1 jest obniżony (Ryc.4.5.2.A), co zaobserwowano także w preparatach znakowanych złotem koloidalnym wykorzystując mikroskopię elektronową (Ryc.4.5.2.B). Dane te potwierdziły znaczące wyciszenie białka SN1 we fragmencie kory czołowej myszy i pozwoliły na dalszą analizę wybranych parametrów określających zmiany wywołane obniżeniem poziomu transportera.

Po raz pierwszy udokumentowaliśmy, że lokalne wyciszenie SN1 wywołuje obrzmiewanie astrocytów, co odzwierciedla obserwacje dotyczące modelu ostrej EW. Analiza morfologiczna komórek w wyciszonym fragmencie kory czołowej wykazała znaczącą obecność okołonaczyniowych wypustek astrocytarnych, z jasną elektronowo cytoplazmą, świadczącą o ich obrzmieniu. W materiale, wokół większości naczyń prekapilarnych również

obserwowano cechy obrzęku. Na podstawie analizy mikroskopowej wnioskowano, że lokalne wyciszenie transportera SN1 powoduje wystąpienie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu, podczas gdy w miejscu, w którym podawano sól fizjologiczną zmiany morfologiczne komórek są zauważalne w minimalnym stopniu (Ryc.4.7.1.). Dodatkowo dokonano pomiaru ADC w wybranym fragmencie kory czołowej okolicy zakończenia lokalizacji sondy i stwierdzono ~18% obniżenie parametru ADC w porównaniu do fragmentu kory myszy bez wyciszenia (Ryc.4.7.2.A). Zmiany te świadczą o wystąpieniu cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu w modelu *vivo-morpholino*, co odwzorowuje zmiany obserwowane w modelu ostrej EW. W przeciwieństwie do modelu AOM, w wyciszonym fragmencie nie zaobserwowano naruszenia integralności komórek śródbłonna, co sugeruje pośrednio brak przesłanek o występowaniu naczyniopochodnej składowej obrzęku w modelu wyciszenia SN1, inaczej niż w wieloczynnikowym modelu AOM.

W celu zbadania wpływu obniżonego poziomu transportera SN1 na stężenia oraz dystrybucję aminokwasów i niektórych metabolitów zmierzono całkowite (metodą spektroskopii rezonansu magnetycznego) oraz zewnątrzkomórkowe (metodą mikrodializy połączonej z wysokosprawną chromatografią cieczową) stężenie tych związków w odpowiednich fragmentach kory czołowej. Wykazano obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia Gln w wyciszonym fragmencie kory (Ryc.4.7.4.) przy jednoczesnym braku zmian stężenia całkowitego (Ryc.4.7.3.A). Sugeruje to gromadzenie się tego osmolitu w komórkach, co jest zgodne z hipotezą zakładającą udział transportera SN1 w transporcie tego aminokwasu na zewnątrz komórki. Zanotowano także podwyższenie całkowitego stężenia fosfocholiny (Ryc.4.7.3.A). Ponieważ cholina jest markerem metabolizmu fosfolipidów błony komórkowej, podwyższony poziom choliny u myszy można pośrednio łączyć ze zmianami w plastyczności błony w badanych obszarach mózgu (Senaratne i wsp., 2009). Wykazano obserwowane także w innych modelach (Zielińska i wsp., 2002; Hilgier i wsp., 2000) podwyższenie stężenia tauryny w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Ryc.4.7.4.). Taurynie przypisuje się funkcję osmoregulacyjną i osmosensoryczną w mózgu (Wade, 1988; Pasantes-Morales; 1998), co wykazano w badaniach *in vitro*, w których zmiana osmolarności medium powodowała wypływ Tau w procesie regulacji objętości komórki. W związku z tym obserwacje dotyczące podwyższonego poziomu Tau w warunkach ostrej EW tłumaczy się działającym mechanizmem kompensacyjnym wobec wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego Gln, wyrównującym nierównowagę osmotyczną po obu stronach błony komórkowej. W zwierzęcych modelach ostrej EW, gromadzeniu się tauryny w przestrzeni pozakomórkowej często towarzyszy wzrost Glu uwalnianego z komórek (De Knegt i wsp., 1994; Michalak i wsp., 1996). W modelu wyciszenia SN1 wykazano obniżenie

całkowitego stężenia Glu (Ryc.4.7.3.A) oraz silną tendencję wzrostową jego poziomu zewnątrzkomórkowego (Ryc.4.7.4). Glu powstaje w procesie hydrolizy Gln w neuronach, w związku z czym obniżenie zewnątrzkomórkowego poziomu Gln może odzwierciedlać w uproszczeniu jej poziom w neuronach powodując obniżenie całkowitego poziomu Glu.

Obserwowane zmiany w stężeniach głównych metabolitów cyklu Gln-Glu, mogą przełożyć się na zaburzenia neurotransmisji. W związku z tym zbadano wpływ zależnego od SN1 uwalniania Gln z astrocytów na transmisję glutaminergiczną, mierząc podstawowe parametry elektrofizjologiczne.

Znaczące zmiany wartości charakteryzujących transmisję synaptyczną w wyciszonym obszarze kory czołowej, takie jak obniżenie amplitudy FP w szerokim zakresie intensywności stymulacji w odpowiedzi na bodziec, między neuronami warstwy V połączonymi horyzontalnie (Ryc.4.6.1.A), obniżenie potencjału spoczynkowego pomiędzy neuronami warstwy II/III (Tab.4.6.2.) oraz tendencja w kierunku obniżenia wartości LTP indukowanego zarówno w połączeniach horyzontalnych, jak i wertykalnych (Ryc.4.6.1.C,D), udokumentowały rolę transportera SN1 w utrzymaniu prawidłowej transmisji glutaminergicznej. Powyższe wyniki są zgodne z wynikami badań wykonanych na hodowanych neuronach pierwotnych narażonych na działanie amoniaku, w których wykazano zwiększoną globalną aktywność neuronalną sieci, która jest silnie zależna od stężenia Gln zsyntetyzowanej w astrocytach, czemu nie towarzyszyło obniżenie synchronizacji sieci (Schwarz i wsp., 2012). Badania nad globalną aktywnością sieci zostały przeprowadzone na hodowli neuronalnej kory mózgowej szczurów przy wykorzystaniu zestawu mikroelektrod pozwalających na jednoczesną rejestrację sygnału w wielu punktach hodowli. Podsumowując, na podstawie omówionych wyników badań można twierdzić, że neuronalna aktywność sieci neuronalnej jest silnie zależna od Gln pochodzącej z astrocytów. Obniżone stężenie Glu w neuronach wynikające z nieprawidłowego astrocytarnego transportu Gln z komórek może odgrywać istotną rolę w zaburzeniach transmisji glutaminergicznej.

Część zarejestrowanych parametrów elektrofizjologicznych w wyciszonym obszarze mózgu znacząco różniła się od wartości zmierzonych w korze czołowej myszy AOM (Popek i wsp., 2018). Prawdopodobnie było to konsekwencją złożoności patomechanizmu EW i współdziałania wielu czynników patologicznych.

Wyniki przedstawionych badań wspierają hipotezę zakładającą udział zaburzonego transportu Gln za pośrednictwem astrocytarnego transportera Gln SN1 w indukowanej AOM dysfunkcji astrocytarnej i neuronalnej. W przyszłości regulacja poziomu i aktywności transportera SN1

może stać się cennym narzędziem terapeutycznym, pozwalającym kontrolować rozwój obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym, jak również zaburzenia transmisji glutaminergicznej związanych z ostrą EW.

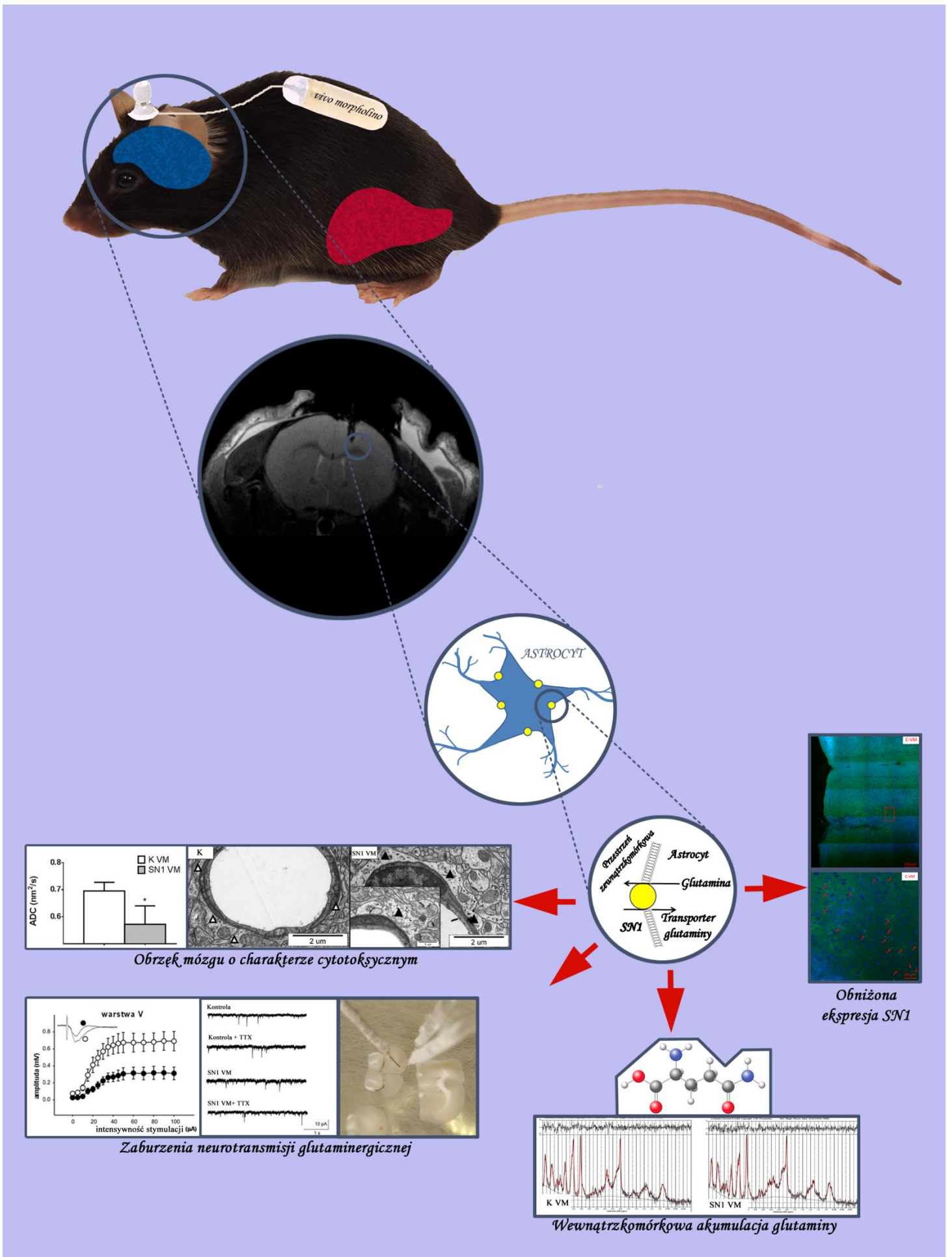
## 6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Azoksymetanowy model ostrej EW odwzorowuje parametry biochemiczne i główne objawy kliniczne charakteryzujące ostrą EW:

- podwyższone stężenie cytokin prozapalnych, amoniaku i wzrost aktywności enzymów wątrobowych w surowicy krwi;
- odpowiadające kolejnym stadiom EW zmiany behawioralne: spowolnienie ruchowe, stopniowy zanik analizowanych odruchów prowadzący do śpiączki;
- zaburzenia w neurotransmisji glutaminergicznej scharakteryzowane parametrami elektrofizjologicznymi (obniżeniem LTP, obniżeniem amplitudy potencjałów polowych, zwiększeniem wartości progowej dla generowania potencjału czynnościowego, a także obniżeniem średniej częstotliwości i zwiększeniem średniej amplitudy spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających);
- obrzęk mózgu scharakteryzowany poprzez: i) ultrastrukturalną analizę mikroskopową obrzmiałych astrocytów okołonaczyniowych, analizę MRI (obniżony parametr pozornego współczynnika dyfuzji; ADC) oraz spektrometryczną analizę metabolitów (wzrost stężenia Gln i myo-inozytolu), świadczące o cytotoksycznym charakterze obrzęku; ii) ultrastrukturalnie obecne uszkodzenia w obrębie naczyń tworzących barierę krew-mózg oraz funkcjonalnie potwierdzoną zwiększoną przepuszczalność.

2. Lokalne wyciszenie białka SN1 techniką *vivo-morpholino* spowodowało i) wystąpienie obrzęku o charakterze cytotoksycznym (analiza obrazów z mikroskopu elektronowego, obniżona wartość ADC); ii) zaburzenia neurotransmisji glutaminergicznej scharakteryzowane parametrami elektrofizjologicznymi (obniżeniem amplitudy FP w szerokim zakresie intensywności stymulacji w odpowiedzi na bodziec, między neuronami warstwy V połączonymi horyzontalnie, obniżeniem potencjału spoczynkowego neuronów warstwy II/III oraz powstaniem tendencji w kierunku obniżenia wartości LTP indukowanego zarówno w połączeniach horyzontalnych.

**Powyższe wyniki oraz wykazana w korze czołowej myszy AOM obniżona ekspresja transportera SN1 i zależne od systemu N funkcjonalne zaburzenie transportu Gln potwierdzają hipotezę o udziale transportera SN1 w powstawaniu zmian w parametrach elektrofizjologicznych charakteryzujących neurotransmisję glutamatergiczną oraz obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym w modelu ostrej EW.**



Ryc.6. Graficzne podsumowanie pracy.

## 7. STRESZCZENIE

Podwyższone stężenie amoniaku w surowicy krwi obserwuje się w przebiegu wielu zaburzeń metabolicznych, spośród których najczęściej spotykanym jest encefalopatia wątrobowa (EW). W EW, w wyniku dysfunkcji hepatocytów dochodzi do obwodowego gromadzenia się różnych związków szkodliwych tj: amoniaku, merkaptanów, fenoli, czy aminokwasów aromatycznych (tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny), które działając neurotoksycznie, powodują uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (Raabe, 1987; Giguère i wsp., 1984; Crossley i wsp., 1983; Norenberg, 1987). Typ ostry EW, z klinicznie obserwowanym gwałtownym przebiegiem, był przedmiotem mojego zainteresowania podczas badań zawartych w dysertacji. Najpoważniejsze objawy kliniczne ostrej EW to: zaburzenia neurotransmisji, które w późnych fazach choroby mogą objawiać się drgawkami i śpiączką oraz obrzęk mózgu prowadzący do śmierci pacjenta.

Patomechanizm EW jest wieloczynnikowy i obejmuje m.in. udział cytokin prozapalnych i stresu oksydacyjnego, jednak główną rolę przypisuje się podwyższonemu stężeniu amoniaku. Neurotoksyczne działanie amoniaku związane jest ze zmianami w neuroprzebieżności glutaminergicznym (Felipo i Butterworth, 2002) i wiąże się z nadmierną produkcją glutaminy (Gln), głównego produktu detoksykacji amoniaku, w reakcji amidacji Glu (Waniewski, 1992), która zachodzi w astrocytach. Gln wykazuje właściwości osmotyczne, a jej gromadzenie w komórkach powoduje wystąpienie nierównowagi osmotycznej i powstawanie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu. Wysokie stężenie Gln przekłada się na zaburzenia cyklu Gln-Glu/GABA, który sprzęga metabolizm i funkcje astrocytów z neuronami. Zwiększona produkcja Gln i/lub nieprawidłowa dystrybucja aminokwasu pomiędzy komórkami może wpływać na syntezę neurotransmiterów: pobudzającego Glu oraz hamującego GABA. Mechanizm ten może tłumaczyć zatem podwyższone stężenie Glu obserwowane w warunkach ostrej EW lub hiperamonemii (Moroni i wsp., 1983; De Knegt i wsp., 1994; McArdle i wsp., 1996; Michalak i wsp., 1996; Hilgier i wsp., 1999).

Wydaje się, że przyczyną gromadzenia się Gln w astrocytach w warunkach ostrej EW jest zwiększona retencja aminokwasu w komórce spowodowana zaburzeniem jego transportu na zewnątrz komórki. Najważniejszym białkiem regulującym transport Gln z astrocytów jest SN1. Świadczą o tym jego właściwości: wysoka aktywność przy fizjologicznym stężeniu Gln, zdolność do transportu Gln niezależnie od obecności innych aminokwasów (Mackenzie i Erickson, 2004) i korelacja wzrostu wydajności transportu Gln ze wzrastającym stężeniem wewnątrzkomórkowego Glu (Bröer i wsp., 2004). W szczurzym modelu ostrej EW wykazano

spadek ilości białka SN1 (Zielińska i wsp.; 2014). Obserwacje te stały się jednym z punktów wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych badań, zgodnie z założeniem, że zmiany w ilości i aktywności transporterów mogą być jedną z przyczyn retencji Gln w komórkach, przyczyniając się tym samym do powstawania cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu, a także wpływać na neurotransmisję.

Postawiona w pracy hipoteza zakłada udział astrocytarnego transportera SN1 w retencji Gln w komórkach, co przyczynia się do wystąpienia obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym i zaburzeń neurotransmisji glutamatergicznej, dwóch klinicznie najpoważniejszych objawów ostrej EW.

Celami niniejszej pracy było: 1) Wykazanie obecności cytotoksycznej i naczyniopochodnej składowej obrzęku mózgu oraz zmian w parametrach elektrofizjologicznych w korze czołowej myszy w azoksymetanowym (AOM) modelu ostrej EW oraz 2) zbadanie, czy wyciszenie transportera glutaminy SN1 techniką *vivo-morpholino* u zwierząt zdrowych odtworzy: a) powstawanie obrzęku kory czołowej o charakterze cytotoksycznym oraz b) zmiany w parametrach elektrofizjologicznych obserwowane w modelu ostrej EW.

W mysim AOM modelu EW wykazano wzrost aktywności enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej i asparaginowej (ALT, AST) oraz podwyższone stężenie amoniaku i cytokin prozapalnych (IL-6, TNF- $\alpha$ ) w surowicy, potwierdzając charakterystyczne cechy ostrej EW. Dodatkowo obserwowane spowolnienie ruchowe i stopniowy zanik odruchów neurologicznych wskazały, że model AOM odwzorowuje zmiany behawioralne odwzorowujące kolejne stadia EW obserwowane u pacjentów. Co więcej, stwierdzono zmiany w parametrach elektrofizjologicznych kory czołowej, tzn. obniżenie LTP, obniżenie amplitudy potencjałów polowych, zwiększenie wartości progowej dla generowania potencjału czynnościowego, a także obniżenie średniej częstotliwości i zwiększenie średniej amplitudy spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających. Wyniki dokumentują szybkie pogarszanie się funkcji motorycznych i neurologicznych zwierząt AOM.

Badania obrzęku mózgu w modelu ostrej EW obejmowały analizę morfologiczną komórek przy wykorzystaniu emisyjnej mikroskopii elektronowej, w wyniku której wykazano, że ~20% ocenionych naczyń charakteryzowało się zmienionym morfologicznie śródbłonkiem, posiadającym liczne pęcherzyki pinocytarne w cytoplazmie oraz mikrokosmki na powierzchni luminalnej komórek. Pomędzy komórkami śródbłonka widoczne były szczeliny wskazujące na nieszczelność połączeń ścisłych, co świadczyło o obecności naczyniopochodnej składowej



obrzęku mózgu. Natomiast ~25% naczyń krwionośnych charakteryzowało się obecnością przynaczyniowych wypustek astrocytarnych z cechami obrzęku, o czym świadczyła m.in. jasna elektronowo cytoplazma, wskazując na obecność obrzęku o charakterze cytotoksycznym. Rozszczelnienie bariery krew-mózg w modelu AOM potwierdzono wykazując zwiększoną o ~400% przepuszczalność dla błękitu Evansa. Dodatkowo analiza wykorzystująca technikę rezonansu magnetycznego wykazała ~10% obniżenie wartości parametru pozornego współczynnika dyfuzji (ADC) świadczącego o słabszej dyfuzji cząsteczek wody w zmniejszonej przestrzeni międzykomórkowej kory czołowej. Powyższe dane kwantyfikują obecność obrzęku o charakterze cytotoksycznym. Nierównowagę w stężeniach związków osmotycznie czynnych w korze czołowej myszy AOM potwierdzają również: podwyższone stężenie Gln o ~37%, mioinozytolu o ~22%, łącznie analizowanego stężenia Gln i Glu o ~10% oraz obniżone o ~35% stężenie alaniny w porównaniu do myszy kontrolnych.

Hipotezę o udziale transportera SN1 w powstawaniu zmian w parametrach elektrofizjologicznych charakteryzujących neurotransmisję glutamatergiczną oraz obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym wspiera wykazana w korze czołowej myszy AOM obniżona ekspresja SN1 na poziomie mRNA oraz białka (o ~30%), a także funkcjonalne zaburzenie transportu Gln między komórkami (zależnego od systemu N obniżenia wychwytu i wyrzutu tego aminokwasu).

W celu zweryfikowania hipotezy o udziale selektywnie wybranego czynnika, jakim jest deficyt astrocytarnego transportera Gln SN1 w retencji Gln w komórkach, przekładającej się na zaburzenia neurotransmisji glutamatergicznej i wystąpienie obrzęku o charakterze cytotoksycznym, posłużono się modelem lokalnego wyciszenia białka, w którym wykorzystując technikę *vivo-morpholino*, we fragmencie kory czołowej myszy, selektywnie wyciszono transporter SN1. Technika Western Blot, a także analizą mikroskopową wykazano ~50% obniżenie poziomu białka SN1. Analiza parametrów elektrofizjologicznych w wyciszonym fragmencie wykazała obniżenie amplitudy potencjałów polowych w szerokim zakresie intensywności stymulacji w odpowiedzi na bodziec, między neuronami warstwy V połączonymi horyzontalnie, obniżenie potencjału spoczynkowego neuronów warstwy II/III oraz powstanie tendencji w kierunku obniżenia wartości LTP indukowanego w połączeniach horyzontalnych. Dodatkowo analiza morfologiczna wyciszonego fragmentu kory czołowej udokumentowała, że ~40% naczyń krwionośnych charakteryzowało się obecnością przynaczyniowych wypustek astrocytarnych z cechami obrzęku o charakterze

cytotoksycznym. Ten sam charakter obrzęku potwierdzono analizą NMR określając wartość współczynnika ADC. Dodatkowo, metodą mikrodializy wykonanej na swobodnie poruszających się zwierzętach, wykazano obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia Gln o ~40%, czemu towarzyszyło niezmienione stężenie tego aminokwasu w tkance, określające zarówno przestrzeń zewnątrzkomórkową jak i wewnątrzkomórkową (metoda spektroskopii  $^1\text{H}$ ). Zaobserwowano ~85% wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia tauryny, a także obniżenie stężenia Glu o ~15%, czemu współtowarzyszył ~22% wzrost stężenia fosfocholiny ( $^1\text{H}$  NMR).

Podsumowując, mysz AOM model ostrej EW, odzwierciedlający cechy późnej fazy ostrej EW u pacjentów, wykazywał zaburzenia neurotransmisji glutamatergicznej (badania behawioralne i elektrofizjologiczne) oraz wystąpienie dwóch składowych obrzęku mózgu (ultrastrukturalna analiza morfologiczna, analiza MRI, analiza  $^1\text{H}$  NMR osmolitów). Obniżenie ekspresji białka SN1 i zaburzenia transportu Gln sugerują udział transportera SN1 w obserwowanych zmianach.

Lokalne wyciszenie transportera SN1 techniką *vivo-morpholino* spowodowało retencję Gln w astrocytach, a w konsekwencji wystąpienie cytotoksycznej składowej obrzęku mózgu (ultrastrukturalna analiza morfologiczna, analiza MRI, analiza  $^1\text{H}$  NMR i pomiar zewnątrzkomórkowych stężeń osmolitów). Co więcej, subtelne zmiany parametrów elektrofizjologicznych udokumentowały rolę transportera SN1 w utrzymaniu prawidłowej transmisji glutaminergicznej.

Wyniki badań pozytywnie zweryfikowały hipotezę zakładającą udział astrocytarnego transportera SN1 w retencji Gln, prowadząc do dysfunkcji astrocytów i neuronów, co może tłumaczyć analogiczne zmiany obserwowane w modelu ostrej EW. W przyszłości regulacja ilości i aktywności transportera SN1 może stać się cennym narzędziem terapeutycznym, pozwalającym kontrolować rozwój obrzęku mózgu o charakterze cytotoksycznym, jak również zaburzenia transmisji glutaminergicznej związanych z ostrą EW.

## **ABSTRACT:**

Hyperammonaemia is characterized by elevated ammonia in serum and is observed in various diseases, of which hepatic encephalopathy (HE) is the most common. HE is a neuropsychiatric disorder, which is usually caused by liver failure. As a result of hepatocellular dysfunctions, various neurotoxic compounds, such as: ammonia, mercaptans, phenols or aromatic amino acids (tryptophan, tyrosine and phenylalanine) accumulate in the blood. CNS damage leads to the development of HE (Raabe, 1987; Giguère et al., 1984; Crossley et al., 1983; Norenberg, 1987). Acute form of HE is characterized by rapid worsening of clinical symptoms, among which the most serious are: neurotransmission disorders, which in the late stages of the disease may manifest as convulsions or coma and brain edema, which may result in the patient's death. Therefore, the acute type of HE become the object of my scientific interest.

HE pathomechanism is multifactorial and includes participation of proinflammatory cytokines and oxidative stress, but the main role is attributed to the increased concentration of ammonia. The neurotoxicity of ammonia is associated with changes in glutamatergic neurotransmission (Felipo and Butterworth, 2002) and with excessive production of glutamine (Gln). Gln, the main ammonia detoxification product is formed in astrocytes from glutamate (Glu) amidation (Waniewski, 1992). Due to Gln osmotic properties its accumulation in the cells causes osmotic imbalance and the formation of cytotoxic component of cerebral edema. The elevated Gln evokes disturbances in the Gln-Glu/GABA cycle, reflected in the improper astrocytic and neuronal metabolism. Increased Gln production during acute HE and/or abnormal amino acid distribution between cells may affect the synthesis of Glu and GABA neurotransmitters. This explains the elevated Glu concentration observed under hyperammonemic or acute HE conditions (Moroni et al., 1983, De Knegt et al., 1994; McArdle et al., 1996; Michalak et al., 1996; Hilgier et al. 1999).

The accumulation of Gln in astrocytes under acute HE conditions may also lead in the increased amino acid cell retention caused by glutamine transport disturbances outside the cell. SN1 is the most important protein that regulates Gln transport out from astrocytes. High SN1 activity at physiological concentration of Gln, ability to transport Gln regardless of the presence of other amino acids (Mackenzie and Erickson, 2004) and correlation of growth Gln transport efficiency with increasing concentration of intracellular Glu (Bröer et al., 2004) are features of SN1 properties. The decrease of SN1 protein level was observed in the brain of rats with acute HE induced by thioacetamide (Zielińska et al., 2014). In agreement with the

assumption that changes in the expression and activity of SN1 transporter may be one of the reasons for Gln retention in cells, above mentioned observations were the starting point for further studies.

The hypothesis assumed participation of the astrocytic SN1 transporter in the retention of Gln in cells, which contributes to the occurrence of cytotoxic brain edema and glutamatergic neurotransmission disorders, two clinically most serious symptoms of acute HE.

The aims of this study were: 1) to evaluate presence of cytotoxic and vasogenic components of cerebral edema and changes in electrophysiological parameters in the frontal cortex of mice with acute HE induced by azoxymethane (AOM) injection; and 2) investigate whether silencing of the SN1 glutamine transporter by the *vivo-morpholino* method in healthy animals will reproduce a) formation of cytotoxic edema and b) electrophysiological changes observed in the acute HE model.

We observed increased activity of liver damage marker enzymes (alanine and aspartic aminotransferase, ALT, AST) and increase in the concentration of ammonia and proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ) in the serum of AOM mice. The obtained results indicated liver damage of AOM mice, accompanying with hyperammonaemia. In addition, we observed slowdown in the movement of mice and the gradual disappearance of neurological reflexes indicated that the AOM model reflects behavioral changes and stages of HE observed in the patients. Moreover, in AOM mice changes in electrophysiological parameters i.e. lowering of LTP, lowering the amplitude of field potentials, increasing the threshold value for generating the action potential, as well as lowering the average frequency and increasing the average amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents were observed. The results indicate a rapid deterioration of the motor function in AOM animals, as well as a progressive weakening of the evaluated neurological reflexes.

In order to characterize the components of cerebral edema in the studied model, ultrastructure analysis of the brain morphology was done. It was shown that ~20% of blood vessels were characterized by morphologically changed endothelium, with numerous pinocytic vesicles in the cytoplasm and microvilli on the luminal surface of endothelial cells. The crack between the endothelial cells indicating leakages of tight junctions were also observed. Above results indicate the presence of vasogenic component of the brain edema. On the other hand, ~25% of blood vessels were characterized by the presence of astrocytic endfeet with the evidence of

cytotoxic type of edema (bright electron cytoplasm). In addition the BBB leakage in this model was confirmed by an increased ~ 400% permeability to Evans blue. Moreover, analysis using magnetic resonance technique indicated ~10% reduction in the value of the parameter of apparent diffusion coefficient (ADC), indicating a decrease in water diffusion in the mice cortex due to the reduction of the extracellular space. Additionally, an increase in Gln concentration by ~ 37%, myoinositol by ~ 22%, and ~ 10% of the sum of glutamine and glutamate concentration, and a decrease in alanine by ~ 35% compared to control mice, partially confirmed the osmotic imbalance in the studied brain region.

Reduced SN1 expression at the mRNA and protein level (~ 30%) and functional impairment of Gln transport between cells (dependent on the N system of reduction of uptake and efflux of the amino acid) were in line with the hypothesis indicating the involvement of the SN1 transporter in the Gln retention and subsequent formation of changes in electrophysiological parameters characterizing glutamatergic neurotransmission and cytotoxic brain edema in the frontal cortex of AOM mice.

The deficit of the SN1 transporter, as a selective factor, which affects the Gln retention in astrocytes was studied using the *vivo-morpholino* technique based on local protein silencing. The SN1 transporter silencing in the fragment of brain cortex was reduced by ~ 50% (demonstrated by Western Blot technique, as well as analysis images from confocal and electron microscopy). Analysis of electrophysiological parameters in the silent cortex area showed a decrease in the amplitude of field potentials in a wide range of stimulation intensity in response to stimulus, between horizontal connection of neurons from V layer, reduction of resting potential of layer II/III neurons and a trend towards lowering the LTP value induced in horizontal connections. In addition, the morphological analysis of the silent brain area has documented that ~ 40% of blood vessels were characterized by the presence of astrocytic endfeet with bright electron cytoplasm, which indicates the presence of cytotoxic edema. This type of frontal edema was confirmed also by a decrease of ADC. Additionally, microdialysis on freely moving mice showed a decrease in extracellular Gln concentration by ~ 40%, which was accompanied by lack of changed in the total level of this amino acid. The increase ~ 85% in the extracellular concentration of taurine was also observed, as well as a decrease in the total Glu level by ~ 15%, which was accompanied by a ~ 22% increase in the total phosphocholine level.

In conclusion, the mouse AOM model of acute HE reflects the characteristics of the symptomatic stage of acute HE in patients. Two main clinical manifestations, such as neurotransmission impairment (behavioral and electrophysiological studies) and the occurrence of both components of cerebral edema (ultrastructure analysis, MRI technique, and  $^1\text{H}$  NMR) have been demonstrated. Reduction of the SN1 protein expression and functional changes of the Gln transport suggest the role of the SN1 transporter in the observed clinical symptoms.

Local silencing of the SN1 transporter by the *vivo-morpholino* method resulted in the occurrence of a cytotoxic component of brain edema (MRI,  $^1\text{H}$  NMR and extracellular measurement of amino acids). In addition, the subtle changes in electrophysiological parameters documented the role of the SN1 transporter in maintaining of glutamatergic transmission.

The results of the study indicate the role of the Gln transport *via* the astrocytic Gln transporter SN1 in AOM-induced astrocytic and neuronal dysfunction. In the future, regulation of SN1 transporter level and activity may become a valuable therapeutic tool allowing to control the development of cytotoxic brain edema as well as glutamatergic transmission disturbances associated with acute HE.

## 8. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Wieloaspektowe badania roli deficytu astrocytarnego transportera glutaminy SN1 jako czynnika wpływającego na rozwój obrzęku i pogorszenie niektórych parametrów elektrofizjologicznych.
- Funkcjonalne wykazanie roli transportera SN1 w mózgu myszy.
- Opracowanie modelu wyciszenia transportera SN1 w korze mózgowej dorosłych osobników.
- Połączenie różnorodnych i nowoczesnych metod (biologii molekularnej, radioizotopowych, spektroskopii, elektrofizjologii, mikroskopii konfokalnej i elektronowej, metod analizujących behavior zwierząt, mikrodializy i wysokosprawnej chromatografii cieczowej) dla określenia roli deficytu transportera SN1.

## 9. WYKAZ TABEL

Tab. 1.1. Klasyfikacja encefalopatii wątrobowej według skali West Haven (Salgado i Cortes, 2013).

Tab. 1.1.3. Zwierzęce modele ostrej encefalopatii wątrobowej (Butterworth i wsp., 2009).

Tab. 4.1.1 Stężenie cytokin IL-6, TNF- $\alpha$ , amoniaku oraz aktywność enzymów wątrobowych w osoczu myszy kontrolnych i AOM.

Tab.4.2.1. Parametry charakteryzujące krzywą odpowiedzi potencjałów polowych na bodziec w połączeniach neuronalnych myszy kontrolnych oraz w modelu AOM w fazie objawowej EW, obliczone na podstawie rozkładu Boltzmana.

Tab. 4.2.3. Porównanie parametrów sEPSC i mEPSCs w neuronach piramidowych w skrawkach korowych myszy kontrolnych oraz w modelu AOM.

Tab.4.3.2. Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM.

Tab.4.6.1. Parametry charakteryzujące odpowiedź potencjałów polowych na bodziec w połączeniach horyzontalnych i wertykalnych, obliczone na podstawie rozkładu Boltzmana.

Tab.4.6.2. Parametry charakteryzujące właściwości błonowe neuronów piramidowych warstwy II/III oraz warstwy V.

Tab. 4.6.3.A Porównanie parametrów sEPSCs w neuronach piramidowych warstwy II/III i V ze skrawków myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1.

Tab.4.6.3.B Porównanie parametrów sEPSC i mEPSCs w neuronach piramidowych warstwy II/III oraz V w skrawkach korowych myszy kontrolnych i wyciszonych.

Tab.4.7.1.A Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy kontrolnych.

Tab.4.7.1.B Półilościowa ocena kolejno wyodrębnionych grup naczyń krwionośnych w korze czołowej myszy z wyciszonym białkiem SN1.



## 10. WYKAZ RYCIN

Ryc.1.2. Główne czynniki odpowiedzialne za patomechanizm encefalopatii wątrobowej.

Ryc.1.3. Schemat przedstawiający cykl glutamina-glutaminian/GABA.

Ryc. 4.1.2. (A) Aktywność ruchowa (odległość) myszy w ciągu pierwszych 90 min po dootrzewnowym podaniu AOM. (B) Ocena neurologiczna myszy AOM wykonana na podstawie analizy 6 wybranych odruchów.

Ryc.4.2.1. (A) Związek pomiędzy intensywnością bodźca a średnią amplitudą potencjałów polowych w skrawkach korowych myszy kontrolnych i w modelu AOM (B) Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne mierzone u skrawkach korowych myszy kontrolnych i w modelu AOM. (C) Przykład poszczególnych potencjałów polowych generowanych w odpowiedzi na drugi impuls stymulujący w stosunku do potencjałów polowych generowanych w odpowiedzi na pierwszy impuls stymulujący (FP1 /FP21) w skrawkach myszy kontrolnych i w modelu AOM. (D) Podsumowanie ilościowe zjawiska parowania impulsów, świadczącego o krótkotrwałym wzmocnieniu synaptycznym, wyrażone jako wskaźnik PPF.

Ryc.4.2.2. (A) Przykład odpowiedzi neuronu piramidowego izolowanego z myszy kontrolnych i odpowiedź komórki pochodzącej od myszy po podaniu AOM na impuls depolaryzujący. (B) stosunek natężenia prądu do prędkości wzrostu odpowiedzi komórek (C) Średnie wzmocnienie (nachylenie wartości indukowanego prądu w zależności od szybkości odpowiedzi). (D) Średni próg pobudzenia neuronów piramidowych z myszy kontrolnych i modelu AOM.

Ryc. 4.2.3. (A) Przykład typowego zapisu sEPSC z neuronu kontrolnego i neuronu pochodzącego od myszy po podaniu AOM przed i po dodaniu TTX (B) Superpozycja średnich wszystkich indywidualnych sEPSC odczytanych podczas 4-minutowych zapisów z neuronu kontrolnego (cienka linia) i pochodzącego od myszy z modelu AOM (gruba linia). (C) średnia częstotliwość sEPSC, (D) średnia amplituda sEPSC, (E) średni czas narastania sEPSC i (F) średnia stała czasowa zaniku sEPSCs.

Ryc.4.3.2. Zdjęcia ultrastruktury kory czołowej myszy kontrolnych i AOM,

Ryc.4.3.1. Stężenie błękitu Evansa (EB) w korze mózgowej myszy kontrolnych i AOM.

Ryc.4.3.3. (A) Wartość pozornego współczynnika dyfuzji ADC w korze czołowej myszy kontrolnych i AOM. Wyniki (B) Zdjęcia przedstawiające obraz MRI przekroju mózgu z zaznaczonym obszarem poddanym analizie.

Ryc.4.3.4. (A) Analiza spektroskopowa metabolitów w korze myszy kontrolnych i AOM. (B) Przykładowe widma spektroskopowe metabolitów zarejestrowane w korze myszy kontrolnych i AOM.

Ryc.4.4.1. (A) Poziom mRNA genu kodującego SN1 i SN2 w korze myszy kontrolnych i AOM. (B) Poziom ekspresji białka SN1 i SN2 w korze myszy kontrolnych i AOM. (C) Reprezentatywny elektroforogram.

Ryc.4.4.2. (A) Kinetyka wychwytu  $[3H]$ -Gln (analiza wg Michaelisa-Menten) przez skrawki kory czołowej myszy kontrolnych i AOM (B) Kinetyka wychwytu  $[3H]$ -Gln przez skrawki kory czołowej myszy kontrolnych i AOM w obecności inhibitorów kompetycyjnych układów A, L i ASC lub inhibitora GAH. (C) Frakcyjne uwalnianie Gln ze skrawków kory pobranych z myszy kontrolnych i AOM, mierzone w 1-minutowych frakcjach, (D) Średnie uwalnianie Gln w czasie 1 minuty podczas 4-minutowego impulsu (frakcje 4-7) bez dodatku inhibitorów, z pulsem A+L lub pulsem GAH.

Ryc.4.5.1. (A) Grafika przedstawiająca metodę wyciszenia, z użyciem pompy osmotycznej wszczepionej pod skórę zwierzęcia (B) Schematyczne przedstawienie lokalizacji i obszaru wyciszanego regionu mózgu za pomocą techniki vivo-morpholino (C) Poziom białka SN1 w odpowiadającym wyciszeniu obszarze kory czołowej myszy kontrolnej oraz myszy z wyciszonym SN1 i z półkuli kontrlateralnej do wyciszenia. (D) Reprezentatywny elektroforogram.

Ryc.4.5.2. (A) Analiza lokalizacji immunohistochemicznie znakowanego białka SN1 w wyciszonym obszarze kory czołowej myszy. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiające fragment półkuli z widocznym śladem po lokalizacji sondy (po lewej), oraz fragment obszaru kory poniżej wylotu, wybarwiony przeciwciałem anti-SN1 (zielone ślady) (B) Zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające fragment obszaru kory poniżej wylotu z wyznakowanym za pomocą złota koloidalnego białkiem SN1 (zaznaczone czerwonym owalem) u myszy z wyciszonym białkiem SN1 i bez wyciszenia.

Ryc. 4.6.1. (A, B) Związek pomiędzy intensywnością bodźca a średnią amplitudą potencjałów polowych neuronów połączonych horyzontalnie w warstwie V (A) oraz połączonych wertykalnie między warstwami V a II/III (B) analizowanych w skrawkach korowych myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1. (C, D) Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne mierzone między neuronami warstwy V (C) oraz warstwy V i II/III (D) w skrawkach korowych myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1.

Ryc. 4.6.2. (A, E) przykład odpowiedzi neuronu piramidowego izolowanego z II/III (A) oraz V (E) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych na impuls depolaryzujący. (B, F) stosunek natężenia prądu do prędkości wzrostu odpowiedzi komórek pochodzących z II/III (B) oraz V (F) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych (C, G) Średnie wzmocnienie (nachylenie wartości indukowanego prądu w zależności od szybkości odpowiedzi). (D, H) średni próg pobudzenia neuronów piramidowych z II/III (D) oraz V (H) warstwy kory myszy kontrolnych i wyciszonych.

Ryc.4.6.3. (A, G) Przykład typowego zapisu sEPSC z neuronów warstwy II/III (A) oraz V (G) w skrawkach izolowanych od myszy kontrolnych i z wyciszonym białkiem SN1 przed i po dodaniu TTX (B, H) Superpozycja średnich wszystkich indywidualnych sEPSC odczytanych podczas 4-minutowych zapisów z neuronu warstwy II/III (B) i V (H) skrawków myszy kontrolnych (cienka linia) i z wyciszonym białkiem (gruba linia). (C, I) średnia częstotliwość sEPSC, (D, J) średnia amplituda sEPSC, (E, K) średni czas narastania sEPSC i (F, L) średnia stała czasowa zaniku sEPSCs.

Ryc. 4.7.1. Zdjęcia ultrastruktury miejsca wyciszenia białka SN1 kory czołowej myszy (SN1 VM) i myszy bez wyciszenia (K VM).

Ryc. 4.7.2. (A) Wartość pozornego współczynnika dyfuzji ADC u myszy C VM i SN1 VM. (B) Zdjęcia przedstawiające obraz MRI przekroju mózgu z zaznaczonym obszarem analizy (kora) u myszy C VM i SN1 VM.

Ryc.4.7.3. (A) Analiza spektroskopowa metabolitów we fragmencie kory czołowej u myszy kontrolnych (K VM) i wyciszonych (SN1 VM). (B) Przykładowe widma spektroskopowe metabolitów zarejestrowane w wyciszonym fragmencie kory oraz w odpowiadającym miejscu kontrlateralnie.

Ryc. 4.7.4. Zewnątrzkomórkowe stężenia aminokwasów we fragmencie kory myszy z wyciszonym białkiem SN1.

Ryc. 6. Graficzne podsumowanie pracy.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Aggarwal S, Kramer D, Yonas H, Obrist W, Kang Y, Martin M, Policare R. Cerebral hemodynamic and metabolic changes in fulminant hepatic failure: a retrospective study. *Hepatology*. 1994 Jan;19(1):80-87

Agostini M, Melino G, Bernassola F. The p53 Family in Brain Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Nov 27

Ahboucha S, Gamrani H, Baker G. GABAergic neurosteroids: the "endogenous benzodiazepines" of acute liver failure. *Neurochem Int*. 2012 Jun;60(7):707-714

Albrecht J. Glucose-derived osmolytes and energy impairment in brain edema accompanying liver failure: the role of glutamine reevaluated. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):976-978

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

Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Quack G. Contrasting effects of thioacetamide-induced liver damage on the brain uptake indices of ornithine, arginine and lysine: modulation by treatment with ornithine aspartate. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 229–223

Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci*. 1999 Nov 30;170(2):138-46. Review. Erratum in: *J Neurol Sci* 2000 Jan 1;172(1):77

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

Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:332-343

Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol*. 2010 Nov 1;80(9):1303-1308

Aldridge DR, Tranah EJ, Schawcross D. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *J Clin Exp Hepatol*. 2015 Mar; 5(Suppl 1): S7–S20

Alemán-Gómez Y, Melie-García L, Valdés-Hernandez P. IBASPM: Toolbox for automatic parcellation of brain structures . Presented at the 12th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, Available on CD-Rom in *NeuroImage*, Vol. 27, No.1, 2006

- Bagchi S, Baomar HA, Al-Walai S, Al-Sadi S, Fredriksson R. Histological analysis of SLC38A6 (SNAT6) expression in mouse brain shows selective expression in excitatory neurons with high expression in the synapses. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e95438
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*. 2001 Dec 1;66(5):981-991
- Baird FE, Beattie KJ, Hyde AR, Ganapathy V, Rennie MJ, Taylor PM. Bidirectional substrate fluxes through the system N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. *J Physiol*. 2004 Sep 1;559(Pt 2):367-381
- Bajaj JS. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 21;14(23):3609-3615
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-683
- Balkrishna S, Bröer A, Welford SM, Hatzoglou M, Bröer S. Expression of glutamine transporter Slc38a3 (SNAT3) during acidosis is mediated by a different mechanism than tissue-specific expression. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(5):1591-1606
- Baran J: Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometriach i ich zastosowanie, *Postępy Biologii Komórki*, vol. 35(24), 2008, s. 3–15
- Bélanger M, Côté J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem Int*. 2006 May-Jun;48(6-7):434-440
- Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Rose C, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure. *J Hepatol*. 2005 May;42(5):694-699
- Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007
- Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology*. 2007;46(6):1844-1852
- Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1275: 5-9

- Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS. The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. *Metab Brain Dis* 2009; 24: 5-14
- Bjørnsen L, Hadera MG, Zhou Y, Danbolt NC, Sonnewald U. The GLT-1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter is essential for glutamate homeostasis in the neocortex of the mouse. *J Neurochem* 2014, 128 (5), 641-649
- Bhatia V, Singh R, Acharya SK. Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* 2006; 55: 98-104
- Blei AT. Brain edema in acute liver failure. *Crit Care Clin.* 2008 Jan;24(1):99-114
- Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology.* 1994 Jun;19(6):1437-1444
- Blum AE, Walsh BC, Dubyak GR. Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptordependent ATP release from 1321N1 astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C386- C396
- Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr.* 2001 Sep;131(9 Suppl):2475S-2485S
- Bomzon A, Ljubuncic P. Bile acids as endogenous vasodilators? *Biochem Pharmacol.* 1995;49:581–589
- Bosman DK, van den Buijs CA, de Haan JG, Maas MA, Chamuleau RA. The effects of benzodiazepine-receptor antagonists and partial inverse agonists on acute hepatic encephalopathy in the rat. *Gastroenterology.* 1991 Sep;101(3):772-781
- Bosoi CR, Rose CF. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2013 Jun;28(2):175-178
- Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci.* 2002 May;15(10):1615-1631
- Bron B, Waldram R, Silk DB, Williams R. Serum, cerebrospinal fluid, and brain levels of bile acids in patients with fulminant hepatic failure. *Gut.* 1977 Sep;18(9):692-696

- Bröer A, Deitmer JW, Bröer S. Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia*. 2004 Dec;48(4):298-310
- Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*. 2017 Nov;21(4):769-792
- Butterworth RF. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2007 Dec;22(3-4):309-320
- Butterworth RF, Giguère JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol*. 1987 Feb-Apr;6(1-2):1-12
- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int*. 2009 Jul;29(6):783-788
- Butterworth RF. Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int*. 2010 Nov;57(4):383-388
- Butterworth RF. The liver-brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;10(9):522-528.
- Butterworth RF. The concept of "the inflamed brain" in acute liver failure: mechanisms and new therapeutic opportunities. *Metab Brain Dis*. 2016 Dec;31(6):1283-1287
- Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: the concept of synergism revisited. *Metab Brain Dis*. 2016 Dec;31(6):1211-1215
- Carter AG, Vogt KE, Foster KA, Regehr WG. Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J Neurosci*. 2002 Jan 1;22(1):21-28
- Cauli O, López-Larrubia P, Rodrigues TB, Cerdán S, Felipe V. Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem*. 2007 Nov;103(4):1334-1343
- Chan K, Busque SM, Sailer M, Stoeger C, Bröer S, Daniel H, Rubio-Aliaga I, Wagner CA. Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney. *Pflugers Arch*. 2016 Feb;468(2):213-227

- Chan PH, Chu L, Chen S. Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary cell culture. *J Neurosci Res* 1990; 25: 87-93
- Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep;37(2-3):243-248.
- Chastre A, Bélanger M, Beauchesne E, Nguyen BN, Desjardins P, Butterworth RF. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLoS One.* 2012;7(11):e49670
- Chastre A, Bélanger M, Nguyen BN, Butterworth RF. Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *Liver Int.* 2014 Mar;34(3):353-361
- Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 2010 Mar;25(1):17-21
- Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology.* 2003 Sep;125(3):815-824.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999, 99 (7), 769-780
- Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J. Neurosci* 2002, 22, 62-72
- Chavarria L, Cordoba J. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in hepatic encephalopathy. *J. Clin. Exp. Hepatol* 2015; 5, S69-S74
- Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology.* 2010 Apr;138(4):1566-1573



Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 2009; 50: 1914-1923

Chepkova AN, Sergeeva OA, Haas HL. Taurine rescues hippocampal long-term potentiation from ammonia-induced impairment. *Neurobiol Dis.* 2006 Sep;23(3):512-521

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-159

Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27467-27473

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* 2005;120:421–433

Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology.* 1999;29(3):648–653

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

Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. The accumulation of glutamine in ammonia-induced brain edema is accompanied by a decrease in other organic brain osmolytes (abstract). *HEPATOLOGY* 1995; 22:160A

Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portacaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996; 24: 919-923;161

Corne SJ, Pickering RW, Warner BT. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother.* 1963;20:106–120

Crawford DC, Kavalali ET. Molecular underpinnings of synaptic vesicle pool heterogeneity. *Traffic.* 2015 Apr;16(4):338-364

Crawley JN. What's wrong with my mouse: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007

- Crossley IR, Wardle EN, Williams R. Biochemical mechanisms of hepatic encephalopathy. *Clin Sci (Lond)*. 1983 Mar;64(3):247-252
- Cruzalegui FH, Bading H. Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Mar;57(3):402-410
- Cubelos B, González-González IM, Giménez C, Zafra F. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia*. 2005 Jan 15;49(2):230-244
- Dąbrowska K, Skowrońska K, Popek M, Obara-Michlewska M, Albrecht J, Zielinska M. Roles of glutamate and glutamine transport in ammonia neurotoxicity: state of the art and question marks. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2017 Dec 19
- de Knecht RJ, Schalm SW, van der Rijt CC, Fekkes D, Dalm E, Hekking-Weyma I. Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *J Hepatol*. 1994 Jan;20(1):19-26
- del Rey A, Balschun D, Wetzel W, Randolph A, Besedovsky HO. A cytokine network involving brain-borne IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF $\alpha$  operates during long-term potentiation and learning. *Brain Behav Immun*. 2013 Oct;33:15-23
- Desjardins P, Rao KV, Michalak A, Rose C, Butterworth RF. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis*. 1999 Dec;14(4):273-280
- Desjardins P, Du T, Jiang W, Peng L, Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure: role of glutamine redefined. *Neurochem Int*. 2012 Jun;60(7):690-696
- Dixit V, Chang TM. Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of liver support systems. *ASAIO Trans* 1990; 36:21-27
- Djiambou-Nganjeu H. Hepatic Encephalopathy in Liver Cirrhosis. *J Transl Int Med*. 2017 Mar 31;5(1):64-67
- Dolgodilina E, Imobersteg S, Laczko E, Welt T, Verrey F, Makrides V. Brain interstitial fluid glutamine homeostasis is controlled by blood-brain barrier SLC7A5/LAT1 amino acid transporter. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Nov;36(11):1929-1941

- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci*. 1999; 19:562-569
- Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G, Schrefl A, Linsberger I, Gerner FJ, Schoenhofen M. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs*. 1999 Jan;23(1):81-86
- Fan P, Lavoie J, Lé NL, Szerb JC, Butterworth RF. Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *Neuroscience*. 1990;37(2):327-334
- Fan P, Szerb JC. Effects of ammonium ions on synaptic transmission and on responses to quisqualate and N-methyl-D-aspartate in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *Brain Res*. 1993 Dec 31;632(1-2):225-231
- Farthing MJ, Green JR, Edwards CR, Dawson AM. Progesterone, prolactin, and gynaecomastia in men with liver disease. *Gut*. 1982 Apr;23(4):276-279
- Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Dec;14(12):851-858
- Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*. 2002 Jul;67(4):259-279.
- Felipo V, Grau E, Miñana MD, Grisolia S. Hyperammonemia decreases protein-kinase-C-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and increases its binding to tubulin. *Eur J Biochem*. 1993 May 15;214(1):243-249
- Filippi M, Rocca MA, De SN. Magnetic resonance techniques in multiple sclerosis: the present and the future. *Arch Neurol*. 2011 December;68(12):1514–1520
- Gabryel B, Kasprowska D, Kost A, Łabuzek K, Urbanek T. Astrocytes in ischemic stroke - a potential target for neuroprotective strategies]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Apr 3;69:384-397
- Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1:127–137

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):385-388

Giguère JF, Butterworth RF. Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Res*. 1984 Sep;9(9):1309-1321.

Główny Urząd Statystyczny; Rocznik Demograficzny 2017, Warszawa 2017

Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res Rev*. 2006 Sep;52(2):327-345

Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*. 2000 May;13(3):129–153

Gupta RK, Saraswat VA, Poptani H, Dhiman RK, Kohli A, Gujral RB, Naik SR. Magnetic resonance imaging and localized in vivo proton spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol*. 1993 May;88(5):670-674

Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys*. 2013 Aug 15;536(2):158-163

Haack N, Dublin P, Rose CR. Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions. *PLoS One*. 2014 Aug 25;9(8):e105832

Hamberger A, Nyström B. Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res*. 1984 Sep;9(9):1181-1192

Hamdani el H, Gudbrandsen M, Bjørkmo M, Chaudhry FA. The system N transporter SN2 doubles as a transmitter precursor furnisher and a potential regulator of NMDA receptors. *Glia*. 2012 Nov;60(11):1671-1683

Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* 2005; 25: 25-39

Haworth RA, Hunter DR. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979 Jul;195(2):460-467

Hägglund MGA, Hellsten SV, Bagchi S, Philippot G, Löfqvist E, Nilsson VCO, Almkvist I, Karlsson E, Sreedharan S, Tafreshiha A, Fredriksson R. Transport of L-glutamine, L-alanine,

- L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *J Mol Biol.* 2015 Mar 27;427(6 Pt B):1495-1512
- Häussinger D, Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Jan;13(1):87-92
- Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolality and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology.* 1994 Nov;107(5):1475-1480
- Herman-Sucharska I, Grzybek M, Grochowska A, Karcz P, Urbanik A. Myoinositol trends in HMRS brain spectrum of patients with hepatic encephalopathy. *Przegl Lek.* 2010;67(4):247-250
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Miñana MD, Felipo, V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* 1996; 21:1237–1244
- Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology.* 2000 Mar;31(3):709-715
- Hernández-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-González L, Malaguarnera M, Agustí A, Llansola M, Felipo V. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J Neuroinflammation.* 2016 Feb 16;13:41
- Hilgier W, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. A novel glycine site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents activation of the NMDA/NO/cGMP pathway by ammonia. *Brain Res.* 2004 Jul 23;1015(1-2):186-188
- Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. 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.* 2003 May 2;468(1):21-25
- Hilgier W, Olson JE. Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1994; 62: 197-204

Hilgier W, Law RO, Zielińska M, Albrecht J. Taurine, glutamine, glutamate, and aspartate content and efflux, and cell volume of cerebrocortical minislices of rats with hepatic encephalopathy: influence of ammonia. *Adv Exp Med Biol.* 2000;483:305-312

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

Hilgier W, Zielińska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res.* 1999 Apr 1;56(1):76-84

Hoffmann EK, Sørensen BH, Sauter DP, Lambert IH. Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell volume homeostasis, cancer and drug resistance. *Channels (Austin).* 2015;9(6):380-396

Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T, Biedermann B, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett.* 2006 Mar 27;396(2):97-101

Iilff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, Singh I, Deane R, Nedergaard M. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2014 Dec 3;34(49):16180-16193

Jaholkowski P, Mierzejewski P, Zatorski P, Scinska A, Sienkiewicz-Jarosz H, Kaczmarek L, Samochowiec J, Filipkowski RK, Bienkowski P. Increased ethanol intake and preference in cyclin D2 knockout mice. *Genes Brain Behav.* 2011;10(5):551–556

James JH, Escourrou J, Fischer JE. Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science* 1978; 200: 1395–1397

Jayakumar AR, Rao KV, Murthy ChR, Norenberg MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* 2006 May-Jun;48(6-7):623-628

Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B. 3<sup>rd</sup>, Reddy PV, Norenberg MD. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* 2008, 283 (49), 33874-33882

- Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. *Adv Neurobiol.* 2016;13:327-350
- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J Clin Exp Hepatol.* 2015 Mar;5(Suppl 1):S21-28
- Jayakumar AR, Tong XY, Curtis KM, Ruiz-Cordero R, Shamaladevi N, Abuzamel M, Johnstone J, Gaidosh G, Rama Rao KV, Norenberg MD. Decreased astrocytic thrombospondin-1 secretion after chronic ammonia treatment reduces the level of synaptic proteins: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem.* 2014 Nov;131(3):333-347
- Jones EA, Ferenci P, Pappas SC, Schafer DF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy--studies in the rabbit model of acute liver failure. *Leber Magen Darm.* 1984 Nov;14(6):282-287
- Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, Takei H, Muto A, Nittono H, Ridlon JM, White MB, Noble NA, Monteith P, Fuchs M, Thacker LR, Sikaroodi M, Bajaj JS. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol.* 2013 May;58(5):949-955
- Kanamori K, Ross BD, Kondrat RW. Glial uptake of neurotransmitter glutamate from the extracellular fluid studied in vivo by microdialysis and (13)C NMR. *J Neurochem.* 2002 Nov;83(3):682-695
- Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 1992 Jun;15(6):1060-1066
- Keiding S, Sørensen M, Bender D, Munk OL, Ott P, Vilstrup H. Brain metabolism of 13N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology.* 2006 Jan;43(1):42-50
- Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem.* 1980 May 10;255(9):4011-4019
- Kilpatrick IC. Rapid, automated HPLC analysis of neuroactive and other amino acids in microdissected brain regions and brain slice superfusates using fluorimetric detection. In *Neuroendocrine Research Methods* (ed. Grenstein B.), 1991; pp. 555–578. Harwood Academic, London

- Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett*. 1997 Jul 4;229(3):201-203
- Kojic J, Robertson PL, Quint DJ, Martin DM, Pang Y, Sundgren PC. Brain glutamine by MRS in a patient with urea cycle disorder and coma. *Pediatr Neurol* 2005; 32: 143-146
- Kołodziejczyk A. 18 kDa translocator protein – implications in cell's functions; *Postepy Hig Med Dosw*, 2015; 69: 34-50
- Konopacka A, Konopacki FA, Albrecht J. Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J Neurochem* 2009; 109 Suppl 1: 246-251
- Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Neurochem*. 1994 Dec;63(6):2172-2178
- Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis*. 1997 Mar;12(1):69-82
- Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res*. 1997 Dec;27(6):637-644
- Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipo V. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int*. 2003 Sep-Oct;43(4-5):493-499
- Kosenko E, Kaminsky Y, Lopata O, Muravyov N, Kaminsky A, Hermenegildo C, Felipo V. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metab Brain Dis*. 1998 Mar;13(1):29-41
- Kosenko E, Kaminsky Y, Solomadin I, Marov N, Venediktova N, Felipo V, Montoliu C. Acute ammonia neurotoxicity in vivo involves increase in cytoplasmic protein P53 without alterations in other markers of apoptosis. *J Neurosci Res*. 2007



- Kreis R, Farrow N, Ross BD. Localized <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. Analysis of changes in cerebral glutamine, choline and inositols. *NMR Biomed* 1991; 4: 109-116
- Krezel A, Hao Q, Maret W. The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 2007; 463:188–200
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*. 2009 Jan 1;57(1):79-92
- Larsen FS, Gottstein J, Blei AT. Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J Hepatol*. 2001 Apr;34(4):548-554.
- Laubenberger J, Haussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterol* 1997; 112: 1610-1616
- Leke R, Escobar TD, Rao KV, Silveira TR, Norenberg MD, Schousboe A. Expression of glutamine transporter isoforms in cerebral cortex of rats with chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int*. 2015 Sep;88:32-37
- Leke R, Schousboe A. The Glutamine Transporters and Their Role in the Glutamate/GABA-Glutamine Cycle. *Adv Neurobiol*. 2016;13:223-257
- Lemberg A, Fernández MA. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol*. 2009 Apr-Jun;8(2):95-102
- Li H, Prince DA. Synaptic activity in chronically injured, epileptogenic sensory-motor neocortex. *J. Neurophysiol.*, 2002; 88: 2-12
- Liang C, Du T, Zhou J, Verkhratsky A, Peng L. Ammonium increases Ca(2+) signalling and up-regulates expression of TRPC1 gene in astrocytes in primary cultures and in the in vivo brain. *Neurochem Res*. 2014 Nov;39(11):2127-2135
- Liere V, Sandhu G, DeMorrow S. Recent advances in hepatic encephalopathy. *F1000Res*. 2017 Sep 4;6:1637
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods* 2001; 25: 402-408

- Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Oct;10(10):1767-1812
- Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE, Gelbard AS, Laughlin JS, Duffy TE, Plum F. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest*. 1979 Mar;63(3):449-460
- Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991 Mar;11(2):337-241
- Ma Y, Smith D, Hof PR, Foerster B, Hamilton S, Blackband SJ, Yu M, Benveniste H. In Vivo 3D Digital Atlas Database of the Adult C57BL/6J Mouse Brain by Magnetic Resonance Microscopy. *Front Neuroanat*. 2008 Apr 17;2:1
- Ma Z, Lee SS, Meddings JB. Effects of altered cardiac membrane fluidity on beta-adrenergic receptor signalling in rats with cirrhotic cardiomyopathy. *J Hepatol*. 1997 Apr;26(4):904-912
- Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*. 2004, 447(5):784-795
- Maezono K, Mawatari K, Kajiwara K, Shinkai A, Maki T. Effect of alanine on D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Hepatology*. 1996 Nov;24(5):1211-1216
- Makin AJ, Wendon J, Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987–1993). *Gastroenterology*. 1995;109(6):1907–1916
- Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Miñana MD, Grisolia S. Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett* 1992; 296:67–68
- Marcaida G, Kosenko E, Miñana MD, Grisolia S, Felipo V. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. *J Neurochem*. 1996 Jan;66(1):99-104
- Martin JH. The collective electrical behavior of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanisms of epilepsy. In: E. Kandel i J.H. Schwartz (red.), *Principles of Neural Science* 1991. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 1137

- Matkowskyj KA, Marrero JA, Carroll RE, Danilkovich AV, Green RM, Benya RV. Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol*. 1999;277:G455–G462
- McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD. Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 1996 Dec;11(4):329-342
- McMillin M, Frampton G, Grant S, Khan S, Diocares J, Petrescu A, Wyatt A, Kain J, Jefferson B, DeMorrow S. Bile Acid-Mediated Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Signaling Promotes Neuroinflammation during Hepatic Encephalopathy in Mice. *Front Cell Neurosci*. 2017 Jul 5;11:191
- McMillin MA, Frampton GA, Seiwell AP, Patel NS, Jacobs AN, DeMorrow S. TGF $\beta$ 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab Invest*. 2015 Aug;95(8):903-913
- McMillin M, Frampton G, Quinn M, Ashfaq S, de los Santos M 3rd, Grant S, DeMorrow S. Bile Acid Signaling Is Involved in the Neurological Decline in a Murine Model of Acute Liver Failure. *Am J Pathol*. 2016 Feb;186(2):312-323
- Melone M, Quagliano F, Barbaresi P, Varoqui H, Erickson JD, Conti F. Localization of the glutamine transporter SNAT1 in rat cerebral cortex and neighboring structures, with a note on its localization in human cortex. *Cereb Cortex*. 2004 May;14(5):562-574
- Melone M, Varoqui H, Erickson JD, Conti F. Localization of the Na(+)-coupled neutral amino acid transporter 2 in the cerebral cortex. *Neuroscience*. 2006 Jun 19;140(1):281-92. Epub 2006 Apr 17
- Michalak A, Butterworth RF. Selective loss of binding sites for the glutamate receptor ligands [3H]kainate and (S)-[3H]5-fluorowillardiine in the brains of rats with acute liver failure. *Hepatology*. 1997 Mar;25(3):631-635
- Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology*. 1996 Oct;24(4):908-913

Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Rodrigo R, Llansola M, Piedrafita B, El Mlili N, Boix J, Agustí A, Felipo V. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. *Neurochem Int.* 2009a Jul-Aug;55(1-3):106-112

Monfort P, Muñoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V. Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis.* 2002 Dec;17(4):237-250

Monfort P, Piedrafita B, Felipo V. Transport of AMPA receptors during long-term potentiation is impaired in rats with hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 2009b Dec;55(7):514-520

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C. The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 1983 Mar;40(3):850-854

Muñoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V. Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Monfort V Metab Brain Dis.* 2002 Dec; 17(4):237-250

Muñoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, Felipo V. Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochem Res.* 2000 Apr;25(4):437-441

Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, et al. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66:282–288

Nagaraja TN, Brookes N. Glutamine transport in mouse cerebral astrocytes. *J Neurochem.* 1996 Apr;66(4):1665-1674

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 1999 Mar;26(1):47-54

Narkewicz MR, Horslen S, Hardison RM, Shneider BL, Rodriguez-Baez N, Alonso EM, Ng VL, Leonis MA, Loomes KM, Rudnick DA, Rosenthal P, Romero R, Subbarao GC, Li R, Belle SH, Squires RH; Pediatric Acute Liver Failure Study Group. A Learning Collaborative Approach Increases Specificity of Diagnosis of Acute Liver Failure in Pediatric Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Apr 30. pii: S1542-3565(18)30455-5

Nencki M, Pawlow J and Zaleski j. Ueber den ammoniakgehalt des blutes under der organe und die harnstoffbildung bei den saugethieren. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 1896; 37:26–51.

Newell J. Portal systemic encephalopathy. Nurse Pract. 1984 Jul;9(7):26-37

Nissen-Meyer LS, Chaudhry FA. Protein Kinase C Phosphorylates the System N Glutamine Transporter SN1 (Slc38a3) and Regulates Its Membrane Trafficking and Degradation. Front Endocrinol (Lausanne). 2013 Oct 2;4:138

Nissen-Meyer LS, Popescu MC, Hamdani el H, Chaudhry FA. Protein kinase C-mediated phosphorylation of a single serine residue on the rat glial glutamine transporter SN1 governs its membrane trafficking. J Neurosci. 2011 Apr 27;31(17):6565-6575

Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. Neurochem Pathol. 1987 Feb-Apr;6(1-2):13-33

Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. Glia. 1997 Sep;21(1):124-133

Norenberg MD, Baker L, Norenberg L-OB, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. Neurochem Res 1991; 16: 833-836

Norenberg MD, Lapham LW. The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. J Neuropathol Exp Neurol 1974; 33: 422-435

Norenberg MD, Neary JT, Bender AS, Dombro RS. Hepatic encephalopathy: a disorder in glial-neuronal communication. Prog Brain Res. 1992;94:261-269

O'Brien CJ, Wise RJ, O'Grady JG, Williams R. Neurological sequelae in patients recovered from fulminant hepatic failure. Gut. 1987 Jan;28(1):93-95

Oja SS, Saransaari P, Korpi ER. Neurotoxicity of Ammonia. Neurochem Res. 2017 Mar; 42(3): 713-720

Olivo R, Guarrera JV, Pysopoulos NT. Liver Transplantation for Acute Liver Failure. Clin Liver Dis. 2018 May;22(2):409-417

Oenarto J, Karababa A, Castoldi M, Bidmon HJ, Görg B, Häussinger D. Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. Sci Rep. 2016 Jan 12;6:18493

- Ott P, Vilstrup H. Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metab Brain Dis.* 2014 Dec;29(4):901-911
- Palacín M, Kanai Y. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):490-494
- Panasiuk A. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2014, vol 8, no 2, 64–75
- Panickar KS, Jayakumar AR, Rao KV, Norenberg MD. Ammonia-induced activation of p53 in cultured astrocytes: role in cell swelling and glutamate uptake. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):98-105
- Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O et al. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26: 493-502
- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13906–13912
- Paxinos G., Franklin K., Paxinos and Franklin's the Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates 4th editio, 25th October 2012, Academic Press
- Pilbeam CM, Anderson RM, Bhathal PS. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J Pathol.* 1983 Aug;140(4):331-345
- Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem.* 2014; 2: 61
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* 2004 May;20(2):329-359
- Popek M, Bobula B, Sowa J, Hess G, Polowy R, Filipkowski RK, Frontczak-Baniewicz M, Zabłocka B, Albrecht J, Zielińska M. Cortical Synaptic Transmission and Plasticity in Acute Liver Failure Are Decreased by Presynaptic Events. *Mol Neurobiol.* 2018 Feb;55(2):1244-1258
- Prakash R, Mullen KD. Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Sep;7(9):515-525

- Provencher S. Automatic quantitation of localized in vivo  $^1\text{H}$  spectra with LCModel, NMR in Biomedicine, 2001
- Qvartskhava N, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock CB, Herebian D, Bode JG, Lang F, Häussinger D. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):5521-5526
- Raabe W. Synaptic transmission in ammonia intoxication. *Neurochem Pathol*. 1987 Feb-Apr;6(1-2):145-166
- Raabe W. Ammonium ions abolish excitatory synaptic transmission between cerebellar neurons in primary dissociated tissue culture. *J Neurophysiol*. 1992 Jul;68(1):93-99
- Rai V, Nath K, Saraswat VA, Purwar A, Rathore RK, Gupta RK. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 334-341
- Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res* 2003; 74: 891-897
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Tong X, Alvarez VM, Norenberg MD. Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2010 Oct 13;7:66
- Ramirez DM, Khvotchev M, Trauterman B, Kavalali ET. Vt1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. *Neuron*. 2012 Jan 12;73(1):121-134
- Rangroo Thrane V, Thrane AS, Wang F, Cotrina ML, Smith NA, Chen M, Xu Q, Kang N, Fujita T, Nagelhus EA, Nedergaard M. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat Med*. 2013;19(12):1643–1648
- Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res*. 2005 Oct;30(10):1311-1318
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*. 2007 May;55(7):758-771

Ren W, Palazzo E, Maione S, Neugebauer V. Differential effects of mGluR7 and mGluR8 activation on pain-related synaptic activity in the amygdala. *Neuropharmacology*. 2011 Dec;61(8):1334-1344

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*. 2000;32(4 Pt 1):734–739., 12

Romero-Gomez M, Jover M, Diaz-Gomez D, de Teran LC, Rodrigo R, Camacho I, Echevarria M, Felipe V, Bautista JD. Phosphate-activated glutaminase activity is enhanced in brain, intestine and kidneys of rats following portacaval anastomosis. *World J Gastroenterol*. 2006 Apr 21;12(15):2406-2411

Rose C, Kresse W, Kettenmann H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):20937-20944

Ruszkiewicz J, Albrecht J. 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*. 2015; 40(2):293–300

Saksena S, Rai V, Saraswat VA, Rathore RS, Purwar A, Kumar M, Thomas MA, Gupta RK. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jul;23(7 Pt 2):e111-119

Salgado M, Cortes Y. Hepatic encephalopathy: etiology, pathogenesis, and clinical signs. *Compend Contin Educ Vet*. 2013 Jun;35(6):E1-8; quiz E9

Saran T, Hilgier W, Kocki T, Urbanska EM, Turski WA, Albrecht J. Acute ammonia treatment in vitro and in vivo inhibits the synthesis of a neuroprotectant kynurenic acid in rat cerebral cortical slices. *Brain Res*. 1998 Mar 23;787(2):348-350

Sathyasaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P. Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res*. 2007 Mar;32(3):517-524

Senaratne R, Milne AM, MacQueen GM, Hall GB. Increased choline-containing compounds in the orbitofrontal cortex and hippocampus in euthymic patients with bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res*. 2009 Jun 30;172(3):205-209



Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J*. 2002 May;16(7):739-741

Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*. 2004 Jul;47(1):21-29

Schroeter A, Wen S, Mölders A, Erlenhardt N, Stein V, Klöcker N. Depletion of the AMPAR reserve pool impairs synaptic plasticity in a model of hepatic encephalopathy. *Mol Cell Neurosci*. 2015 Sep;68:331-339

Schwarz CS, Ferrea S, Quasthoff K, Walter J, Görg B, Häussinger D, Schnitzler A, Hartung HP, Dihné M. Ammonium chloride influences in vitro-neuronal Network activity. *Exp Neurol*. 2012 May;235(1):368-373

Shah NJ, John S. Liver Failure, Acute. 2018 Jan 10. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Shalimar, Acharya SK. Management in acute liver failure. *J Clin Exp Hepatol*. 2015 Mar;5(Suppl 1):S104-115

Shawcross DL, Balata S, Olde Damink SWM et al. Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G503-G509

Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, Jalan R. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis*. 2005 Sep;20(3):169-179

Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1992 May;38(1-2):27-33

Shimajima N, Eckman CB, McKinney M, Sevlever D, Yamamoto S, Lin W, Dickson DW, Nguyen JH. Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure. *J Invest Surg*. 2008 May-Jun;21(3):101-108

Silva VR, Secolin R, Vemuganti R, Lopes-Cendes I, Hazell AS. Acute liver failure is associated with altered cerebral expression profiles of long non-coding RNAs. *Neurosci Lett*. 2017 Aug 24;656:58-64

Singh S, Mondal P, Trigun SK. Acute liver failure in rats activates glutamine-glutamate cycle but declines antioxidant enzymes to induce oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum. *PLoS One*. 2014 Apr 22;9(4):e95855

Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, Moriyama M, Reddy PV, Norenberg MD. NFkappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J Neurochem*. 2008 Sep;106(6):2302-2311

Sivolap YP. Prevention and treatment of hepatic encephalopathy. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2017;117(10):144-147

Skowrońska M, Albrecht J. Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview. *Neurotox Res*. 2012a Feb;21(2):236-244

Skowrońska M, Zielińska M, Wójcik-Stanaszek L, Ruszkiewicz J, Milatovic D, Aschner M, Albrecht J. Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem*. 2012b Apr;121(1):125-134

Smith AR, Rossi-Fanelli F, Ziparo V, James JH, Perelle BA, Fischer JE. Alterations in plasma and CSF amino acids, amines and metabolites in hepatic coma. *Ann Surg* 1978; 187: 343–350

Sobczyk K, Jördens MS, Karababa A, Görg B, Häussinger D. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res*. 2015 Feb;40(2):274-283

Solbu TT, Bjørkmo M, Berghuis P, Harkany T, Chaudhry FA. SAT1, A Glutamine Transporter, is Preferentially Expressed in GABAergic Neurons. *Front Neuroanat*. 2010 Feb 8;4:1

Sørensen M. Update on cerebral uptake of blood ammonia. *Metab Brain Dis*. 2013 Jun;28(2):155-159

Sørensen M, Munk OL, Keiding S. Backflux of ammonia from brain to blood In human subjects with and without hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2009 Mar;24(1):237-242

Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208. Review

Stange J, Mitzner S, Ramlow W, Gliesche T, Hickstein H, Schmidt R. A new procedure for the removal of protein bound drugs and toxins. *ASAIO J.* 1993 Jul-Sep;39(3):M621-625

Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A. Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:1030-1039

Stravitz RT, Lee WM, Kramer AH, Kramer DJ, Hynan L, Blei AT. Therapeutic hypothermia for acute liver failure: toward a randomized, controlled trial in patients with advanced hepatic encephalopathy. *Neurocrit Care.* 2008;9(1):90-96

Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisennand HH, Kelly JH. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology.* 1992 Jul;16(1):60-65

Swain MS, Blei AT, Butterworth RF, Kraig RP. Intracellular pH rises and astrocytes swell after portacaval anastomosis in rats. *Am J Physiol* 1991; 261: R1491-R1496

Szerb JC, Butterworth RF. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1992 Aug;39(2):135-153

Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol* 1991; 261: H825-H829

Taoro-Gonzalez L, Arenas YM, Cabrera-Pastor A, Felipe V. Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *J Neuroinflammation.* 2018 Feb 8;15(1):36

Tofteng F, Jorgensen L, Hansen BA, Ott P, Kondrup J, Larsen FS. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 2002 Dec;36(6):1333-1340

Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jørgensen L, Larsen FS. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Jan;26(1):21-27

- Tripodi V, Contin M, Fernández MA, Lemberg A. Bile acids content in brain of common duct ligated rats. *Ann Hepatol*. 2012 Nov-Dec;11(6):930-934
- Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology*. 1987;7:1272–1277
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84
- van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Dauri M, Tisone G, Di Nicuolo G, Amoroso P, Spadari A, Lombardi G, Hoekstra R, Calise F, Chamuleau RA. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs*. 2002 Oct;25(10):950-959
- Vaquero J, Butterworth RF. The brain glutamate system in liver failure. *J Neurochem*. 2006 Aug;98(3):661-669
- Vemuganti R, Silva VR, Mehta SL, Hazell AS. Acute liver failure-induced hepatic encephalopathy s associated with changes in microRNA expression rofiles in cerebral cortex of the mouse [corrected]. *Metab Brain Dis*. 2014 Dec;29(4):891-899
- Vogels BA, Maas MA, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RA. Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology*. 1997 Apr;25(4):820-827
- Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U. The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism. *Neurochem Res*. 2015 Feb;40(2):402-409
- Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*. 2008 Dec 11;86(4):342-367
- Wang F, Du T, Liang C, Verkhratsky A, Peng L. Ammonium increases Ca(2+) signalling and upregulates expression of Cav1.2 gene in astrocytes in primary cultures and in the in vivo brain. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Jun;214(2):261-274

- Wang MC, Wandrer F, Schlué J, Voigtländer T, Lankisch TO, Manns MP, Bantel H, von Hahn T. Transjugular diagnostics in acute liver failure including measurements of hepato-central venous biomarker gradients. *Hepato Res.* 2018 May 4
- Wang QM, Yin XY, Duan ZJ, Guo SB, Sun XY. Role of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway in the pathogenesis and prevention of hepatic encephalopathy. *Mol Med Rep.* 2013 Jul;8(1):67-74
- Waniewski RA. Physiological levels of ammonia regulate glutamine synthesis from extracellular glutamate in astrocyte cultures. *J Neurochem.* 1992 Jan;58(1):167-174
- Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess F, Häussinger D. Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia.* 2002 Dec;40(3):324-336
- Weissenborn K. The Clinical Relevance of Minimal Hepatic Encephalopathy - A Critical Look. *Dig Dis.* 2015;33(4):555-561
- Wen S, Schroeter A, Klöcker N. Synaptic plasticity in hepatic encephalopathy - a molecular perspective. *Arch Biochem Biophys.* 2013 Aug 15;536(2):183-188
- Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T et al. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience* 1996; 71: 589-599
- Williams R, Wendon J. Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant liver failure. *Hepatology.* 1994;20(1 Pt 2):S5-10
- Wright G., Soper R., Brooks H.F. i wsp. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J. Hepatol.* 2010; 53: 91-97
- Zhu D, Wang MD, Bäckström T, Wahlström G. Evaluation and comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of allopregnanolone and pregnanolone at induction of anaesthesia in the male rat. *Br J Anaesth.* 2001 Mar;86(3):403-412
- Zielińska M, Popek M, Albrecht J. Roles of changes in active glutamine transport in brain edema development during hepatic encephalopathy: an emerging concept. *Neurochem Res.* 2014;39(3):599-604

Zielińska M, Hilgier W, Borkowska HD, Oja SS, Saransaari P, Goryński P, Albrecht J. Ammonia-induced extracellular accumulation of taurine in the rat striatum in vivo: role of ionotropic glutamate receptors. *Neurochem Res.* 2002 Feb;27(1-2):37-42

Zielińska M, Law RO, Albrecht J. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int.* 2003 Sep-Oct;43(4-5):299-303

Zimmermann C, Ferenci P, Pifl C, Yurdaydin C, Ebner J, Lassmann H, Roth E, Hörtnagl H. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology.* 1989 Apr;9(4):594-601

Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res* 2004; 999: 113-118