



Prof. dr hab. Jan Albrecht

Stres oksydacyjny a funkcje astrocytów

Jan Albrecht, Joanna Ruszkiewicz

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

e-mail: jalb@cmdik.pan.pl

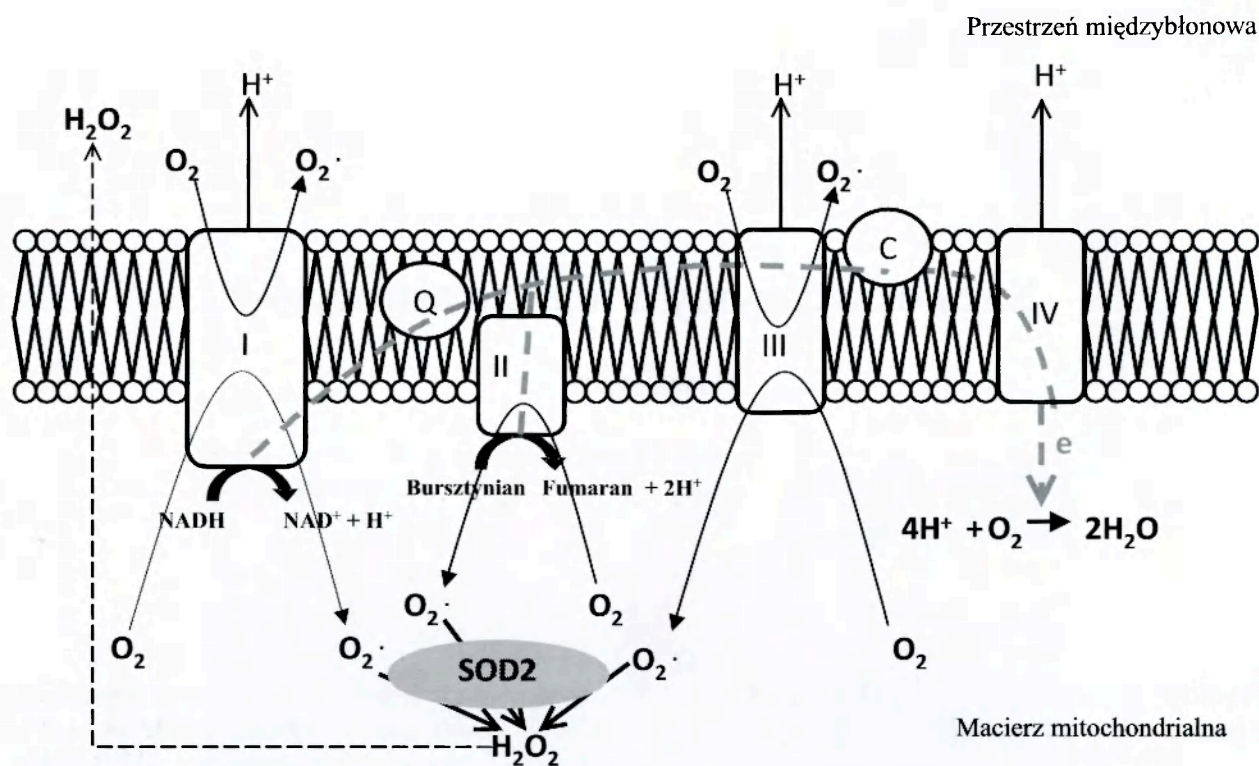
Reaktywne formy tlenu i azotu jako egzekutorzy stresu oksydacyjnego

Stres oksydacyjny jest wynikiem gromadzenia się w komórkach i tkankach nadmiaru reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA), powszechnie definiowanych jako wolne rodniki tlenowe i azotowe. Schematyczne zestawienie RFT i RFA zidentyfikowanych w materiale biologicznym przedstawiono w Tabeli 1.

Wolne rodniki tlenowe są naturalnym składnikiem zdrowych tkanek ssaków. Oblicza się, że ok. 1–3% elektronów „wycieka” z łańcucha oddechowego w mitochondriach i zamiast zredukować tlen do wody generuje rodnik nadtlenkowy (O_2^{\bullet}), będący głównym przedstawicielem, a zarazem źródłem innych aktywnych form tlenu [49]. Miejscami ucieczki elektronów są kompleks mitochondrialny I (dehydrogenaza NADH) i II (dehydrogenaza bursztynianowa), gdzie O_2^{\bullet} tworzy się głównie w macierzy mitochondrialnej.

Tab. 1. Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz reaktywne formy azotu (RFA) [wg. 13, 16, 24]

	Wzór	Nazwa	Najważniejsze reakcje powstawania RTF i RFA
Reaktywne formy tlenu (RFT)	O_2^{\bullet}	Rodnik nadtlenkowy	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet}$
	$\bullet OH$	Rodnik hydroksylowy	$O_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$
	HO_2^{\bullet}	Rodnik wodoronadtlenkowy	$O_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	H_2O_2	Nadtlenek wodoru	$O_2^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$ (reakcja Habera-Weissa)
	$^1O_2^{\bullet}$	Tlen singletowy	$O_2^{\bullet} + NO \rightarrow ONOO^-$
	O_2^{2-}	Anion nadtlenkowy	$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \rightarrow NO_2^{\bullet} + \bullet OH$
Reaktywne formy azotu (RFA)	NO^{\bullet}	Rodnik tlenu azotu	$2O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	NO_2^{\bullet}	Rodnik ditlenku azotu	$O_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	NO^+	Kation nitrozonowy	$O_2 + 2e^- \rightarrow O_2^{2-}$
	NO^-	Anion nitroksylowy	$O_2^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
	$ONOOH$	Kwas nadtlenoazotowy	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$ (reakcja Fentona)
	$ONOO^-$	Anion kwasu nadtlenoazotowego	$H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + HO_2^{\bullet} + H^+$
			$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HClO + H_2O$
		$H_2O_2 + HClO \rightarrow ^1O_2^{\bullet} + H_2O + HCl$	
		$ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO^- \rightarrow NO_2^{\bullet} + CO_3^{\bullet -}$	



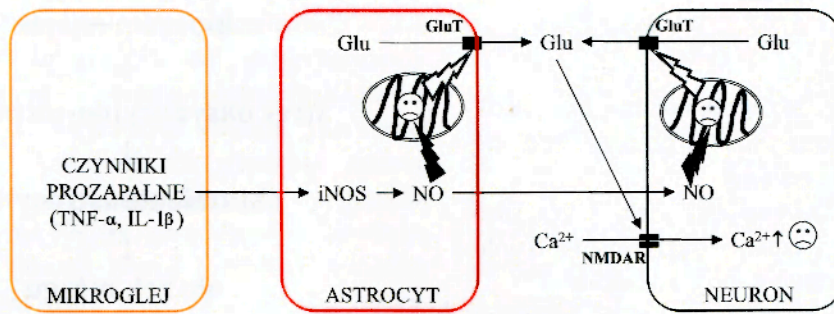
Ryc. 1. Powstawanie rodnika nadtlenkowego $O_2^{\cdot -}$ w procesie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. SOD2, dysmutaza nadtlenkowa typu 2; Q, koenzym Q; C, cytochrom c [wg. 11, zmodyfikowano]. Dokładny opis zamieszczono w tekście

Inne enzymy których aktywność skutkuje wytwarzaniem $O_2^{\cdot -}$ to dehydrogenazy ketoglutaranowa, pirogronianowa i glicerolo-3-fosforanu. Wolne rodniki tworzą się również w wyniku β -oksydacji kwasów tłuszczowych i w mitochondrialnym kompleksie III. Dysmutaza nadtlenkowa typu 2 (SOD2) neutralizuje $O_2^{\cdot -}$ do nadtlenku wodoru (H_2O_2), który jako cząsteczka obojętna uwalniany jest z mitochondriów (Ryc. 1) niezależnie od ich stanu energetycznego [11]. H_2O_2 jest po części neutralizowany przez peroksydazę glutationową, a donorem elektronów jest glutation (GSH), najważniejszy przeciwutleniacz komórkowy, któremu prawie w całości poświęcony będzie rozdział “Stres wywołuje obrzmienie astrocytów indukując obrzęk cytotoksyczny mózgu”. Nadmiar uwolnionego H_2O_2 jest substratem dla powstającego w reakcji Fentona rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), który uszkadza DNA i RNA, oraz katalizuje peroksydację lipidów błonowych i wewnątrzkomórkowych.

Znacząca ilość wolnych rodników tlenowych powstaje poza mitochondriami. Ich głównymi źródłami są zlokalizowana w błonie komórkowej oksydaza NADPH, oraz obecna w cytoplazmie oksydaza ksantynowa. Rodniki

te generowane są również przez indukowaną formę syntazy tlenku azotu (Inducible nitric oxide synthase, iNOS): przestawienie „linii produkcyjnej” iNOS z NO na aktywne formy tlenu następuje w następstwie ataku na enzym wolnych rodników pochodzących z innych źródeł (Ryc. 2). Literatura przedmiotu wskazuje na występowanie sprzężenia dodatniego generacji aktywnych form tlenu przez wszystkie cztery główne źródła [11].

Rodnik tlenku azotu (NO^{\cdot}), dalej dla uproszczenia definiowany jako tlenek azotu (NO) jest źródłem reaktywnych form azotu, a zarazem ich najważniejszym przedstawicielem. NO jest związkiem o powszechnie znanym, szerokim spektrum oddziaływań fizjologicznych, aczkolwiek syntetyzowany w nadmiarze wykazuje działania neurotoksyczne, co zostanie omówione w rozdziale “Fala stresowa przenosi się z astrocytów na neurony”. W zależności od warunków środowiska tkankowego, NO ulega przemianie do kationu nitrozonowego (NO^+), bądź do anionu nitroksylowego (NO^-). NO^- ma wysokie powinowactwo do białkowych grup -SH i tworzy z nimi S-nitrozotiole (R-S-NO), zmieniając w ten



Ryc. 2. Rola astrocytarnego NO w zapalnym uszkodzeniu neuronów. Glu, glutaminian; GluT, transporter glutaminianu; iNOS, indukowana izoforma syntazy tlenku azotu; NMDAR, receptor glutaminianu; TNF- α , czynnik martwicy nowotworów α ; IL-1 β , interleukina 1 β [wg. 6, zmodyfikowano]. Dokładny opis zamieszczono w tekście

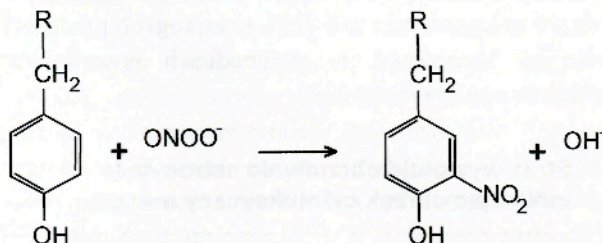
sposób konformację i aktywność białek. Z kolei, RS-NO pochodzący z GSH uszkadza mitochondria. Wszystkie 3 rodniki cechuje bardzo krótki, mierzony w sekundach, okres półtrwania. Z połączenia O_2^{\cdot} z NO^{\cdot} powstaje wysoce toksyczny nadtlenoazotyn ($ONOO^{\cdot}$), który reaguje z resztami tyrozynowymi w białkach, tworząc N-nitrotyrozinę i przez to zmieniając ich własności. Reakcja ta jest zarazem dodatkowym źródłem toksycznego rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) (Ryc. 3).

W przebiegu ewolucji komórki i tkanki „pogodziły się” ze stałą obecnością wolnych rodników w sposób aktywny, rozwijając mechanizmy pozwalające wykorzystywać je w istotnych procesach fizjologicznych. Rodnik nadtlenkowy bierze m. in. udział w regulacji oddychania, produkcji erytropoetyny czy relaksacji mięśni gładkich, oraz pośredniczy w reakcjach odpornościowych [13]. Tlenek azotu rozluźnia mięśnie gładkie naczyń krwionośnych regulując w ten sposób krążenie krwi, a nadto jest czynnikiem inicjującym kaskadę zdarzeń w których pośredniczy cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP); oba powyższe mechanizmy działania NO stanowią o jego niepośled-

niej roli w procesie regulacji krążenia mózgowego i sygnalizacji międzyneuronalnej. W ostatnich latach ukazało się szereg znakomitych artykułów przeglądowych traktujących o roli NO w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [5, 15].

Zakres tematyczny rozdziału

Stres oksydacyjny (i nitracynny) leży u podłoża większości schorzeń OUN, niezależnie od tego czy mają podłożę genetyczne, środowiskowe, czy mieszane, uczestniczy w patogenezie chorób degeneracyjnych, ale często i tych o charakterze odwracalnych zaburzeń homeostazy. Rozdział nie charakteryzuje szczegółowo zmian dotyczących układu nerwowego jako całość, w tym zwłaszcza komórkę nerwową; traktuje o nich obfita literatura przedmiotu, do której odniesienia Czytelnik znajdzie w kompetentnie napisanych, obszernych artykułach przeglądowych [6, 13, 49]. Niniejszy artykuł poświęcony jest w całości udziałowi astrocytów w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a w szczególności roli tej odpowiedzi w kształtowaniu się zmian patologicznych w OUN, dotyczących zarówno funkcji neuronów jak i potencjału neuroprotekcynego astrocytów.



Ryc. 3. Reakcja nitrozytacji tyrozyny

Skutki stresu oksydacyjnego w astrocytach: scenariusze

Teoretycznie antycypować można trzy scenariusze następstw stresu oksydacyjnego w astrocytach, które wzajemnie się nie wykluczają. Szeregując je od naj-

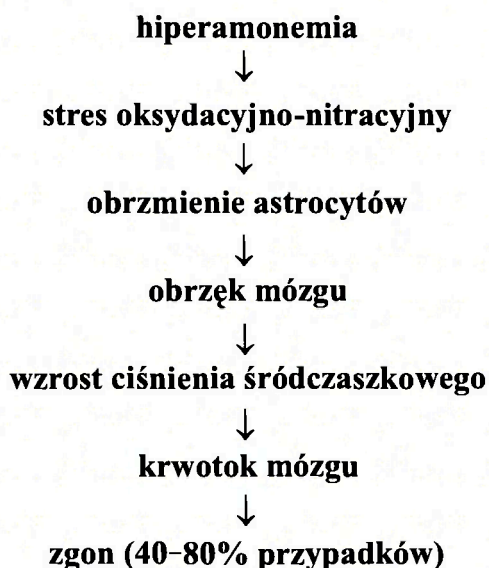
mniej do najbardziej korzystnego, przedstawiałyby się one następująco:

1. Astrocyt posługując się egzekutorami stresu (reaktywnymi formami tlenu i azotu) przenosi falę stresową bezpośrednio na neurony
2. Stres upośledza strukturę i/lub metabolizm astrocytów w sposób, który rzutuje negatywnie na fizjologię i funkcje układu nerwowego jako całości
3. Stres wspomaga lub uruchamia funkcje neuroprotekcyjne astrocytów

W większości stanów patologicznych oun scenariusze te współistnieją i żaden samoistnie nie decyduje o przebiegu choroby. Poniżej przytoczono dane ilustrujące każdy z wariantów w najbardziej sugestywny sposób.

Fala stresowa przenosi się z astrocytów na neurony

Choć szereg danych doświadczalnych pośrednio wskazuje, że rolę czynników przenoszących stres z astrocytów na neurony mogą odgrywać wszelkie RFT oraz RFN, mocne dowody udało się jak dotąd zgromadzić w odniesieniu do NO (por. artykuł przeglądowy [8]), a mechanizm układu się wedle następującego ciągu zdarzeń: Czynniki patogenne odpowiedzialne za schorzenia zwyrodnieniowe oun (np. β -amyloid w chorobie Alzheimera) wywołują stan zapalny w mikrogleju, a stres oksydacyjny i nitracynjny w astrocytach jest wynikiem oddziaływania na nie wytwarzanych w mikrogleju cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów α (*Tumor necrosis factor α* ; TNF- α) czy interleukina 1 β (IL-1 β). Cytokiny, często w kooperacji z czynnikiem patogennym, aktywują indukowaną postać syntazy tlenu azotu (*Inducible nitric oxide synthase*; iNOS), a uwalniany NO uszkadza neurony, co zamyka błędne koło procesu zapalnego. Za śmierć neuronów odpowiedzialne jest uszkodzenie mitochondriów. Celem ataku NO jest kompleks mitochondrialny IV, natomiast ONOO⁻ i R-S-NO uszkadzają kompleksy mitochondrialne I, II i IV, oraz enzymy mitochondrialne: syntazę ATP i akonitazę, a R-S-NO dodatkowo przyczynia się do otwarcia megakanałów mitochondrialnych (*Mitochondrial permeability transition*; mPT). Inna fala przeniesienia stresu jest skutkiem upośledzenia przez NO funkcji mitochondriów astrocytarnych. Niedobór energetyczny powoduje nadmierne uwalnianie kwasu glutaminowego (Glu), nadpobudzenie receptorów jonotropowych (zarówno



Ryc. 4. Sekwencja zdarzeń towarzyszących ostrej encefalopatii wątrobowej (EW) bądź zaostrzeniu fazy przewlekłej

NMDA jak i AMPA) na neuronach i w rezultacie efekt ekscytotoksyczny [6]. W tym przypadku mamy również do czynienia z efektem błędnego koła: uszkodzenie neuronów zwiększa uwalnianie z nich Glu i jego stężenie w przestrzeni pozakomórkowej. Powyżej opisaną sekwencję zdarzeń ilustruje Ryc. 4.

Dodatkowym efektem gromadzenia się Glu jest zahamowanie do komórkowego transportu cystyny (CySS) i spadek syntezy GSH [40]. Informacje o roli GSH w reakcji astrocytów na stres zawarto w rozdziale “Stres wywołuje obrzemie astrocytów indukując obrzęk cytotoksyczny mózgu”.

Uważa się, że cytokiny prozapalne indukują syntezę NOS przede wszystkim w mikrogleju i że to mikroglej przerzuca toksyczne RFA na astrocyty. Choć często tak jest, sytuacja ta bynajmniej nie stanowi reguły. Wybiórcza reaktywność iNOS w astrocytach, pod nieobecność reakcji w mikrogleju, odnotowywano w mózgu pochodzących od chorych na stwardnienie rozsiane [30], oraz rogach przednich rdzenia kregowego w przypadkach stwardnienia zanikowego bocznego [39].

Stres wywołuje obrzemie astrocytów indukując obrzęk cytotoksyczny mózgu

Tak zdefiniowany scenariusz odgrywa decydującą rolę w patogenezie encefalopatii hiperamonemicznych (EH), grupy schorzeń będących następstwem

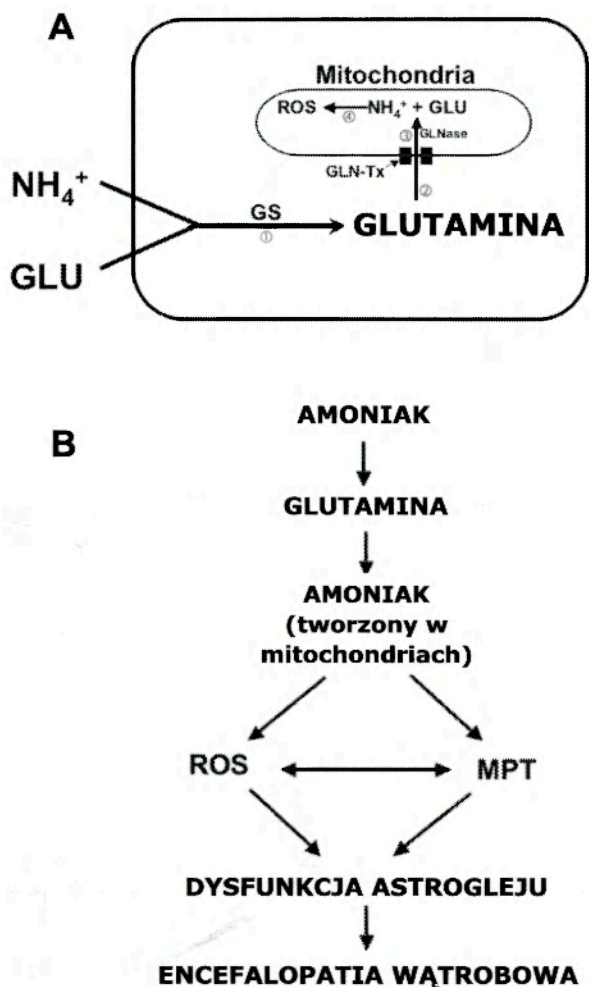
przechodzenia z krwi do mózgu nadmiernych stężeń jonów amonowych (określanych dalej terminem amoniak). EH stanowi jedyną grupę schorzeń których mechanizm można zdefiniować mianem „pierwotnej astroglejopatii”: większość ich objawów stanowi pochodną dysfunkcji astrocytów [1]. Najczęściej występującą formą EH jest encefalopatia wątrobowa (EW), bardzo złożony zespół neuropsychiatryczny związany z ostrą bądź przewlekłą niewydolnością (marskością) wątroby, którego kolejne stadia zaawansowania cechuje stopniowy spadek aktywności ruchowej i zaburzenia świadomości, w efekcie prowadzące do tzw. śpiączki wątrobowej [2]. Amoniak dostający się do mózgu oddziałuje przede wszystkim na astrocyty, stąd objawy neurologiczne EW odzwierciedlają w przeważającej mierze zaburzenia funkcji neuromodulacyjnych tych komórek; wielu badaczy klasyfikuje EW jako pierwotną glejopatię; termin ten można zawęzić do „astroglejopatii”. Najczęstszą przyczyną zgonów z powodu ostrej EW w przebiegu ostrej niewydolności wątroby (*Acute Liver Failure*; ALF), bądź w stadium zaostżenia jej formy przewlekłej, jest obrzęk mózgu skutkujący wzrostem ciśnienia śródczaszkowego i krwotokiem mózgu [10, 47]. Przytoczone poniżej dane doświadczalne jednoznacznie implikują stres oksydacyjny i nitracyny w astrocytach jako przyczynę hiperamonemicznego obrzęku mózgu (Ryc. 4).

Ostra hiperamonemia, bądź bezpośrednie podanie amoniaku do mózgu szczura metodą mikrodializy, prowadzi do akumulacji $\cdot\text{OH}$ i NO w mikrodializatach różnych jego struktur [19–21]. Obrzęk mózgu wywołany dożylnym podaniem amoniaku szczurom z przewlekłą niewydolnością wątroby skorelowany jest ze wzrostem syntezy NO [31, 28]. Inkubacja hodowli pierwotnych astrocytów w obecności amoniaku powoduje wzrost objętości tych komórek (ich obrzmienie) [32]. Traktowanie astrocytów amoniakiem indukuje w nich RFT oraz iNOS, a w następstwie stymuluje nitrozylację tyrozyny; wszystkim tym efektom zapobiega farmakologiczne blokowanie receptora NMDA dla Glu oraz syntezy NO [41]. Współzależność wywołanych przez amoniak aktywacji receptora NMDA, stresu oksydacyjno-nitracynowego i obrzęku mózgu wykazano w modelu skrawków kory mózgu: wzrost objętości komórek cofał się w obecności antagonistów receptora NMDA, inhibitora NOS oraz antyoksydanta, tauryny [55]. W kolejnych badaniach wykazano, że do wzrostu objętości astrocytów przyczynia się aktywacja przez amoniak sprzężonego

z syntezą NO szlaku cGMP-kinaza białkowa G [26]. W warunkach hodowli komórkowej, amoniak aktywował szlak NMDA/NO w astrocytach, przy braku tego efektu w komórkach nerwowych, mikrogleju czy fibroblastach [27]. W powyższej pracy dowiedziono, iż indukcja RFT i RFA w astrocytach traktowanych amoniakiem zależy od uwalniania wewnątrzkomórkowego wapnia. Wykazanie udziału receptora NMDA w kształtowaniu się poamoniakalnych zmian w astrocytach zasługuje na podkreślenie w świetle trudności, jakie towarzyszyły próbom udokumentowania obecności aktywności tego receptora w hodowlach astrocytów nie poddanych działaniom czynników patogennych [33, 52]. Mechanizm leżący u podstaw ujawniania się aktywności receptora NMDA pod wpływem amoniaku pozostaje nieznanym.

Amoniak indukuje RFT, FRA i obrzmienie astrocytów również na szlaku niezależnym od receptora NMDA, głównie poprzez aktywację NADH oksydazy: oba efekty ulegały znacznemu złagodzeniu pod wpływem inhibitora tego enzymu, apocyjaniny [36]. O zaangażowaniu NADPH oksydazy świadczy również spostrzeżenie, iż zależna od tego enzymu generacja rodnika (O_2^-) w traktowanych amoniakiem astrocytach ulega znacznemu złagodzeniu w wyniku aktywacji receptora dla peptydu natriuretycznego typu C (NPR-C) [43]. Swoisty agonista NPR-C zapobiegał również wzrostowi objętości komórek pod wpływem amoniaku [44].

Amoniak przedostający się z krwiobiegu do mózgu jest neutralizowany w astrocytach do glutaminy (Gln), w reakcji katalizowanej przez syntazę glutaminy (GS), która jest enzymem swoistym dla astrocytów. Poza rolę jedynej wydajnej „pułapki” dla amoniaku, Gln pełni funkcję prekursora dla neuronalnej puli neuroprzekazników aminokwasowych (Glu i kwasu γ -aminomasłowego), a związana z tą funkcją wędrówka z astrocytów do neuronów czyni z niej ważny łącznik metaboliczny pomiędzy przedziałami komórkowymi [4]. Badania doświadczalne na zwierzęcych modelach hiperamonemii wykazały jednak, że w warunkach przeciążenia mózgu amoniakiem, gromadząca się w nadmiarze Gln ma działanie toksyczne o charakterystyce replikującej znane objawy encefalopatii hiperamonemicznych, w tym EW. Ta zła prawda o Gln wyszła na jaw dzięki zastosowaniu specyficznego inhibitora syntezy Gln, metionino-sulfoksyminy (MSO), którego podanie powodowało, wraz z obniżeniem poziomu Gln w mózgu, złagodzenie obrzęku mózgu [45], a w skali



Ryc. 5. A. Losy amoniaku w astrocycie: (1) synteza glutaminy z udziałem syntazy glutaminowej (GS); (2) transport glutaminy do mitochondriów przez transporter glutaminowy (GLN – Tx); (3) hydroliza z udziałem fosfozależnej glutaminazy (*phosphate-activated glutaminase*; PAG; na ryc. „GLNase”) do glutaminianu (GLU) i amoniaku; (4) powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT, na ryc. „ROS”) pod wpływem amoniaku [3, za zgodą wydawcy]. **Ryc. B.** Glutamina jako pośrednik toksyczności amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. MPT – zmiana przepuszczalności błon mitochondrialnych („mitochondrial permeability transition”). [3, za zgodą wydawcy]

komórek obrzmienia perycytów [54] i astrocytów okołonaczyniowych [46]. U chorych w zaawansowanym stadium EW oczekujących na przeszczep wątroby poziom Gln w mikrodializatach kory mózgu był w wysokim stopniu skorelowany z wartością ciśnienia śródczaszkowego [47]. Badania na astrocytach hodowanych *in vitro* wykazały, że obrzmieniorodne działanie Gln wiąże się z wywołaniem przez nią stresu oksydacyjnego i następstwami tego stresu dla

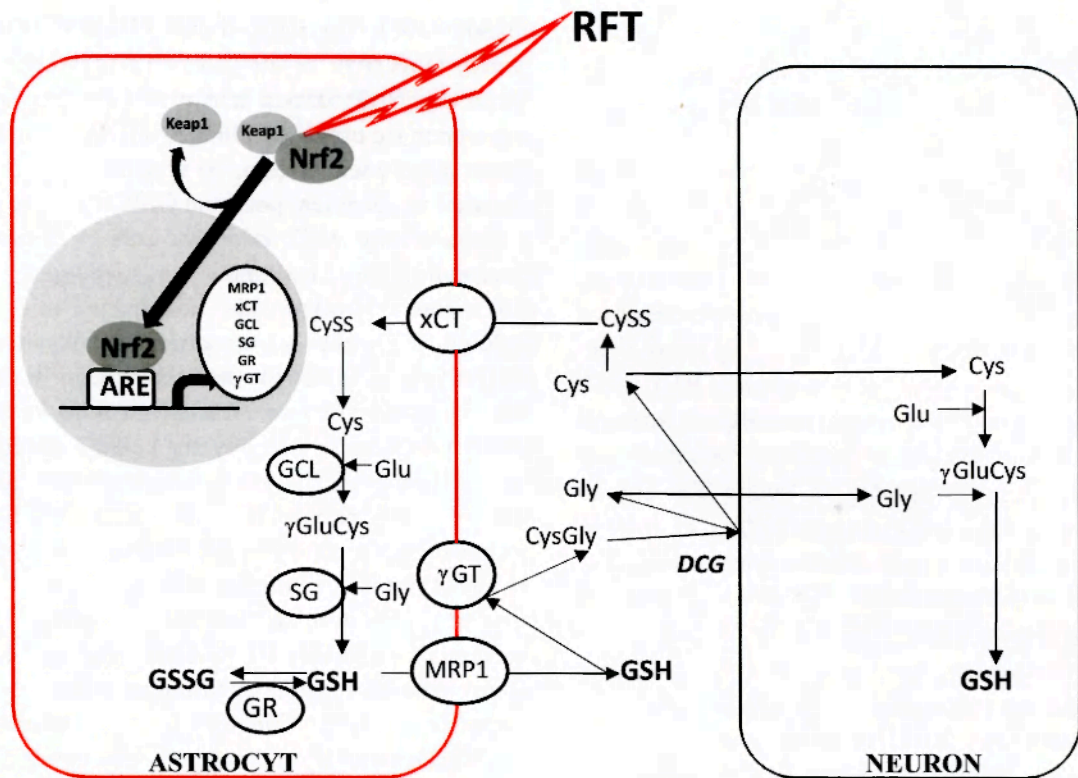
funkcji mitochondriów. Inkubacja mitochondriów niesynaptycznych (jest to frakcja wzbogacona w mitochondria astrocytarne) w obecności Gln powoduje ich obrzmienie związane z mPT, a efektowi temu zapobiega zahamowanie domitochondrialnego transportu Gln przez histydynę (His) [56]. Gln indukuje RFT w astrocytach [23] i powoduje ich obrzmienie, odwracalne w obecności His i MSO [34]. Wreszcie, His podany dootrzewnowo redukuje mPT i obrzęk mózgu w modelu EW *in vivo* [35]. Przedstawione powyżej dane potwierdzają, iż Gln pełni w mechanizmie EW (czy szerzej: EH) rolę „konja Trojańskiego”: jej nadmiar powstający w procesie detoksykacji amoniaku przedostaje się za pośrednictwem nośnika histydynowego do wnętrza mitochondriów, gdzie ulega rozkładowi do Glu i amoniaku (Ryc. 5a). Uwolniony z Gln amoniak (jak żołnierz spuszczonego po drabinie z wnętrza konia) upośledza funkcję mitochondriów, co prowadzi do powstania nadmiaru RFT, obrzmienia astrocytów i obrzęku mózgu, zamykając błędne koło uszkodzeń (Ryc. 5b) [3].

Obok amoniaku, do czynników patogennych indukujących objawy EW zalicza się inne czynniki pojawiające się na obwodzie (hiponatremię, cytokiny prozapalne), jak również wytwarzane w mózgu benzodiazepiny [2]. Czynniki te po spółu generują błędne koło stres oksydacyjny/obrzemie astrocytów/obrzęk mózgu/stres oksydacyjny. W polu rażenia tego koła znajdują się wszelkiego typu interakcje astrocyt-neuron, co skutkuje zmianami w plastyczności synaptycznej i zaburzeniami neuroprzewodnictwa [18]. Można tym samym pokusić się o nieco przewrotne stwierdzenie, że stres oksydacyjny w astrocytach „koordynuje” patogenne działanie amoniaku i innych czynników w EW.

Stres wspomaga lub uruchamia funkcje neuroprotektoryjne astrocytów

Rola glutationu (GSH) i regulacja jego syntezy w astrocytach w warunkach stresu oksydacyjnego: aktywacja układu Nrf2-ARE

GSH jest kluczowym antyoksydantem we wszystkich tkankach ssaków, w tym w komórkach oun. Redukujące działanie GSH opiera się na aktywności dwu enzymów wykorzystujących GSH jako substrat: peroksydazy (GPx) i S-transferazy (GST). GSH neu-



Ryc. 6. Aktywacja szlaku Nrf2-ARE w komórkach astrogleju w warunkach stresu oksydacyjnego i jego wpływ na syntezę i metabolizm GSH w OUN. ARE, białko ARE; Cys, cysteina; CySS, cystyna; CysGly, cysteinylglicyna; DCG, dipeptydaza cysteinylglicynowa; GCL, ligaza glutaminianowo-cysteinowa; Glu, glutaminian; γ GluCys, γ -glutamylcysteina; Gly, glicyna; GR, reduktaza glutationowa; GSH, glutation zredukowany; GSSG, glutation utleniony; γ GT, γ -glutamylotransferaza; Keap1, białko wiążące Nrf2; MRP1, transporter glutationu; Nrf2- czynnik transkrypcyjny kontrolujący ARE; RFT, reaktywne formy tlenu; SG, syntetaza glutationowa; xCT, transporter cystyny [wg. 29, zmodyfikowano]

tralizuje działanie całego wachlarza neurotoksyn egzo- i endogennych [12, 14]. Synteza GSH w OUN jest przedmiotem interakcji astrocyt-neuron (Ryc. 5). W szczególności, neurony posiadają bardzo ograniczoną zdolność poboru ze środowiska CySS, w związku z czym syntetyzują GSH posługując się prekursorami pochodzącymi z GSH astrocytarnego: cysteiną (Cys) i cysteino-glicyną (CysGly) [12, 38]. Badania z użyciem mieszanych hodowli neuronalno-astrocytarnych wykazały, że synteza GSH w neuronach wzrasta w obecności astrocytów i zależy od degradacji astrocytarnego GSH przez g-glutamylotransferazę (gGT) [12]. Badania własne wykazały, iż zarówno w warunkach in vitro jak i in vivo, amoniak pobudza syntezę GSH w astrocytach, jego uwalnianie do przestrzeni pozakomórkowej oraz degradację przez gGT [22, 53], a jednym z czynników propobudzenia syntezy jest aktywacja astrocytarnego wychwytu CySS [53]. O tym, że pobudzenie syntezy GSH w astrocytach

może mieć ochronny wpływ na komórki nerwowe pośrednio świadczy spostrzeżenie, iż spadkowi żywotności hodowli neuronów po inkubacji z amoniakiem zapobiegało dodanie do hodowli dietyloestru glutationu, pochodnej GSH łatwo penetrującej błony komórkowe [25].

Wcześniejsze badania w różnych układach modelowych w tkankach ssaków ujawniły mechanizm, za pośrednictwem którego stres oksydacyjny aktywuje syntezę GSH oraz pobudza jego funkcje detoksykacyjne. RFT pobudzają ścieżkę sygnałową Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*); ARE (*Antioxidant Response Element*) (Ryc. 6). Czynnik transkrypcyjny Nrf2 jest syntetyzowany w sposób konstytutywny w cytoplazmie i podlega bezpośredniej translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywuje ARE i wzmacnia transkrypcję podległych mu genów. W warunkach niskiego poziomu stresu, Nrf2 po wykonaniu swojego dzieła jest za pośrednictwem tzw. białka Keap1 (*Kelch-like*

ECH-associated protein 1) kierowany do cytoplazmy w celu degradacji. Stres oksydacyjny rozluźnia „uścisk” Keap1 i powoduje zwiększoną aktywność Nrf2.

W grupie genów podległych Nrf2 których ekspresja ulega znacznemu zwiększeniu w astrocytach poddanych stresowi oksydacyjnemu zidentyfikowano geny kodujące enzymy zaangażowane w procesy syntezy i degradację GSH: ligaza glutaminianowo-cysteinowa, SG, γ GT, transporter xCT (Ryc. 6), enzymy wykorzystujące GSH w procesie neutralizacji RFT (GST, GPx), oraz inne białka przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu (oksydaza hemowa, tioredoksyna) [29]. Badania porównawcze na hodowlach komórkowych wykazały, że ekspresja Nrf2 i aktywność promotora ARE jest o rząd wielkości wyższa w astrocytach niż w neuronach [42]. W mieszanej hodowli astrocytarno-neuronalnej, transfekcja Nrf2 do astrocytów (z ominięciem neuronów) chroniła sąsiadujące z nimi neurony przed śmiercią w następstwie stresu glutaminianowego. Efekt ochronny nie pojawił się w obecności inhibitora syntezy GSH (butionylsulfoksyminy), co jednoznacznie wskazuje, że synteza GSH *de novo* w astrocytach stanowi warunek konieczny i dostateczny dla efektu neuroprotekcynowego [42].

Dane eksperymentalne uzyskane przy użyciu szerokiego i nowoczesnego instrumentarium biologii molekularnej potwierdzają, iż aktywność tych elementów odpowiedzi antyoksydacyjnej których synteza zależy od układu Nrf2-ARE, w tym w pierwszym rzędzie GSH, stanowi ważny mechanizm autoprotekcji neuronów w schorzeniach zwyrodnieniowych oun. Kierunkowa transfekcja Nrf2 do astrocytów myszy z nokautem Nrf2 (Nrf2^{-/-}) zmniejszała wrażliwość komórek nerwowych na MPTP, neurotoksynę modulującą chorobę Parkinsona. W szczególności, transfekcja w sposób swoisty zapobiegała ubytkowi neuronów dopaminergicznych w substancji czarnej, co wyrażało się zmniejszeniem spadku aktywności hydroksylazy tyrozynowej, a także zawartości dopaminy i jej metabolitów [9]. U myszy z mutacją SOD1 G93A odwzorowującą objawy stwardnienia zanikowego bocznego (SLA), transfekcja Nrf2 do astrocytów podwyższała poziom GSH w mózgu, jednocześnie przedłużając przeżycie zwierząt, opóźniając pojawienie się objawów klinicznych SLA, w tym zmniejszając zakres odnerwienia mięśni [51]. U myszy z tą samą mutacją,

nokaut GCL-enzymu warunkującego szybkość syntezy GSH (Ryc. 6) spowodował skutki odwrotne do transfekcji Nrf2: skrócił czas przeżycia, przyspieszył pojawianie się objawów klinicznych SLA i zwiększył zakres odnerwienia mięśni, co w sposób wyraźny korelowało ze spadkiem poziomu GSH w mózgu [50].

Astrocytarny Nrf2 odgrywa rolę w hartowaniu (preconditioning) neuronów na niedotlenienie/niedokrwienie. Krótkotrwała inkubacja mieszanych hodowli neuronalno-astrocytarnych z nokautem Nrf2 (Nrf2^{-/-}) w warunkach umiarkowanego niedoboru tlenu i glukozy (*Oxygen Glucose Deprivation*; model OGD) uodporniała neurony na kolejne długotrwałe OGD, w stopniu znacznie mniejszym niż miało to miejsce w przypadku identycznych hodowli pochodzących z myszy dzikich (Nrf2^{+/+}) [7]. Krótkotrwałe (hartujące) niedokrwienie mózgu myszy prowadziło do wzrostu zależnej od Nrf2 ekspresji oksygenazy hemowej I i tioredoksyny, dwu kluczowych elementów instrumentarium antyoksydacyjnego; identyczny efekt odnotowano w hodowanych komórkach astrogleju ludzkiego hodowanych w obecności niskich (również hartujących) stężeń nadtlenu wodoru [7].

Neuroprotekcynna odpowiedź astrocytów na stres niezależna od układu Nrf2-ARE

Nieliczne, ale dobrze udokumentowane dane uzyskane w modelach *in vitro* imitujących incydent niedotleniowo/niedokrwienno wskazują, że korzystna dla otaczających neuronów odpowiedź astrocytów na stres oksydacyjny może również nastąpić na drodze omijającej układ Nrf2-ARE. Ruscher i wsp. [37] wykazali, iż w astrocytach hodowanych *in vitro*, OGD aktywuje czynnik transkrypcyjny HIF-1, co skutkuje wzmożoną syntezą erytropoetyny (EPO). Nowo syntetyzowana EPO wywoływała tolerancję ischemiczną w komórkach nerwowych: medium pobrane z astrocytów „zahartowanych” OGD zapobiegało śmierci neuronów poddanych podobnemu incydentowi niedokrwienno-niedotleniowemu, ale ten korzystny efekt zniknął w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi EPO. Dokładne omówienie tego dość złożonego mechanizmu Czytelnik znajdzie w pracy przeglądowej Trelenbarga i Dirnagla [48]. Haskew-Layton i wsp. [7] badali wpływ umiarkowanego stresu wywołanego w astrocytach na drodze transdukcji oksydazy D-aminokwasów: zabieg ten zwiększa w umiarkowany sposób komórkową syntezę

H₂O₂. Tak aktywowane astrocyty chroniły współhodowane z nimi neurony przed stresem wywołanym przez kwas homocysteinowy w sposób niezależny od wygaszenia w nich ekspresji Nrf2.

Uwagi końcowe

Artykuł nie pretenduje do miana wyczerpującego przeglądu wszystkich danych literaturowych na omawiany temat: chcieliśmy zwrócić uwagę na rosnące zainteresowanie zagadnieniem odpowiedzi astrocytów na stres oksydacyjny i na rokowania wynikające z podjęcia takich badań dla rozumienia mechanizmów patogenezы różnych schorzeń i ustalania strategii terapeutycznych.

W tekście przedstawiono trzy warianty odpowiedzi astrocytów szeregując je od najmniej do najbardziej korzystnego. Godzi się podkreślić dwie sprawy: i) jak już wspomniano we wstępie, w większości schorzeń wszystkie trzy scenariusze współlistniają ze sobą; ii) scenariusz 3, ten najkorzystniejszy, nigdy nie spełnia się samoistnie w 100%. Aby korzystna odpowiedź astrocytów na stres mogła być skuteczna, musi być wzmacniana od zewnątrz. Przedstawione powyżej udane próby wzmacniania odpowiedzi układu Nrf2-ARE na poziomie doświadczenia mogą w przyszłości – po odpowiednim rozwinięciu i przystosowaniu do potrzeb kliniki – stać się podstawą skutecznej terapii schorzeń OUN, zwłaszcza tych o charakterze zwyrodnieniowym.

Piśmiennictwo:

- Albrecht J: Astrocytes in ammonia neurotoxicity: a target, a mediator and a shield. In: *The role of glia in neurotoxicity*. Eds. Aschner M, Costa LG, CRC Press, Boca Raton, 2005, 329–342.
- Albrecht J, Jones EA: Hepatic encephalopathy: Molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci*, 1999, 170, 138–146.
- Albrecht J, Norenberg MD: Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*, 2006, 44, 788–794.
- Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M: Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol*, 2011, 6, 263–276.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA: Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 2010, 468, 232–243.
- Bal-Price A, Brown GC: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*, 2001, 21, 6480–6491.
- Bell KF, Al-Mubarak B, Fowler JH, Baxter PS, Gupta K, Tsujita T, Chowdhry S i wsp: Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *PNAS*, 2011, 108, E1–E2.
- Brown GC, Bal-Price A: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol*, 2003, 27, 325–355.
- Chen P, Vargas MR, Pani AK, Smeyna RJ, Johnson DA, Wai Kan Y, Johnson JA: Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *PNAS*, 2009, 106, 2933–2938.
- 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, 648–653.
- Dikalov S: Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 1289–1301.
- 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.
- Dröge W: Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47–95.
- Fonnum F, Lock EA: The contribution of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurons: Exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 2004, 88, 513–531.
- Garthwaite J: Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, 2008, 27, 2783–2802.
- Halliwel B: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 2006, 97, 1634–1658.
- Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Smirnova NA, Ma TC, Chan KK, Murphy TH, Guo H i wsp.: Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *PNAS*, 2010, 107, 17385–17390.
- Haussinger D, Gorg B: Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13, 87–92.
- Hermenegildo C, Monfort P, Felipe 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, 31, 709–715.
- 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, 468, 21–25.
- Hilgier W, Fręsko I, Klemenska E, Beręsewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J, Zielińska M: Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis. *Neurobiol Dis*, 2009, 35, 75–81.
- Hilgier W, Węgrzynowicz M, Ruskiewicz 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, 117, 163–168.
23. Jayakumar AR, Rama Rao KV, Schousboe A, Norenberg MD: Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia*, 2004, 46, 296–301.
 24. Kanta J: The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralovc)*, 2011, 54, 97–101.
 25. Klejman A, Węgrzynowicz M, Szatmari EM, Mioduszevska B, Hetman M, Albrecht J: Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem Int*, 2005, 47, 51–57.
 26. Konopacka A, Konopacki FA, Albrecht J: Protein kinase G is involved in ammonia-induced swelling of astrocytes. *J Neurochem*, 2009, 109, 246–251.
 27. Kruczek C, Gorg B, Keutel V, Bidmon HJ, Schliess F, Haussinger D: Ammonia increases nitric oxide, free Zn²⁺ and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem*, 2011, 392, 1155–1165.
 28. Larsen FS, Gottstein J, Blei AT: Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J Hepatol*, 2001, 34, 548–554.
 29. Lee J, Calkins MJ, Chan K, Wai Kan Y, Johnson JA: Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem*, 2003, 278, 12029–12038.
 30. Liu J, Zhao M, Brosnan C, Lee S: Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*, 2001, 158, 2057–2066.
 31. Master S, Gottstein J, Blei AT: Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*, 1999, 30, 876–880.
 32. Norenberg MD, Baker L, Norenberg LO, Blicharska J, Bruce-Gregorios JH, Neary JT: Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res*, 1991, 16, 833–836.
 33. Pearce B, Albrecht J, Morrow C, Murphy S: Astrocyte glutamate receptor activation-promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci Lett*, 1986, 72, 335–340.
 34. Pichili VB, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD: Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia*, 2007, 55, 801–809.
 35. Rama Rao KV, Reddy PVB, Tong X, Norenberg MD: Brain edema in acute liver failure. Inhibition by L-histidine. *Am J Pathol*, 2010, 176, 1400–1408.
 36. Reinchr R, Gorg B, Becker S, Qvarthava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Haussinger D: Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultures astrocytes and vital brain slices. *Glia*, 2007, 55, 758–771.
 37. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J i wsp.: Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci*, 2002, 22, 10291–10301.
 38. Sagara JI, Miura K, Bannai S: Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem*, 1993, 61, 1672–1676.
 39. Sasaki S, Shibata N, Komori T, Iwata M: iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 2000, 291, 44–48.
 40. Sattler R, Tymianski M: Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol*, 2001, 24, 107–129.
 41. Schliess F, Gorg B, Fischre R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Haussinger D: Ammonia induces MK-801 – sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J*, 2002, 16, 739–741.
 42. Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH: Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*, 2003, 23, 3394–3406.
 43. Skowrońska M, Zielińska M, Albrecht J: Stimulation of natriuretic peptide receptor C attenuates accumulation of reactive oxygen species and nitric oxide synthesis in ammonia – treated astrocytes. *J Neurochem*, 2010, 115, 1068–1076.
 44. 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*, 2012, 121, 125–134.
 45. Takahashi H, Kochler RC, Brusilow SW, Traystman RJ: Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol*, 1991, 261, H825–H829.
 46. Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen TY, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC: Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience*, 2005, 131, 437–449.
 47. Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jrgensen 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, 26, 21–27.
 48. Trendelenburg G, Dirnagl U: Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: Focus on ischemic preconditioning. *Glia*, 2005, 51, 307–320.
 49. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, 44–84.
 50. Vargas MR, Johnson DA, Johnson JA: Decreased glutathione accelerates neurological deficit and mitochondrial pathology in familial ALS-linked hSOD1^{G93A} mice model. *Neurobiol Dis*, 2011, 43, 543–551.
 51. Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA: Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2008, 28, 13574–13581.

52. Verkhratsky A, Kirchhoff F: NMDA receptors in glia. *Neuroscientist*, 2007, 13, 28–37.
53. Węgrzynowicz M, Hilgier W, Dybel A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J: Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: the role of cystine uptake. *Neurochem Int*, 2007, 50, 883–889.
54. Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW: Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia – induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience*, 1996, 71, 589–599.
55. Zielińska M, Law RO, Albrecht J: Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int*, 2003, 43, 299–303.
56. Ziemińska E, Dolińska M, Lazarewicz JW, Albrecht J: Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology*, 2000, 21, 295–300.