

Intrazelluläre Ionenhomöostase und deren Beeinträchtigung bei hepatischer Enzephalopathie

Tony Kelly und Christine R. Rose

Zusammenfassung

Hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine signifikante Begleiterscheinung akuter und chronischer Lebererkrankungen, die durch eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionsstörungen des Gehirns gekennzeichnet ist. Als Hauptursache gilt ein Anstieg der Ammoniumionenkonzentration, wobei die HE primär als eine Gliafunktionsstörung angesehen wird. Ammonium wird durch das Enzym Glutaminsynthetase in Astrozyten mit Glutamat zu Glutamin fixiert und Astrozyten weisen bei HE einen starken Anstieg ihres Glutamingehalts auf, während gleichzeitig eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration beobachtet wird. Schwellung der Astrozyten kann zu einem Hirnödem führen, welches für die hohe Mortalitätsrate von Patienten mit akutem Leberversagen verantwortlich ist. Einen bisher wenig beachteten Faktor bei der Entstehung der HE stellen durch Ammonium induzierte Veränderungen der intrazellulären Ionenhomöostase dar. Neuere Untersuchungen zeigen, dass erhöhte Ammoniumkonzentrationen neben einer Ansäuerung auch Erhöhungen der Kalzium- und der Natriumkonzentration in Astrozyten hervorrufen. In diesem Übersichtsartikel möchten wir die durch Ammonium verursachten Ionenbewegungen beschreiben und diskutieren, in wieweit diese zur Pathologie der HE beitragen könnten.

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric disorder associated with acute and chronic liver failure. Ammonium is the most likely toxin responsible for the observed neurological deficits, reaching 5 mM in the CNS during acute HE. Additionally, ammonium preferentially affects astrocytes. Conversion of glutamate to glutamine, occurring exclusively in astrocytes, is the sole pathway for ammonium detoxification, and glutamine increases in astrocytes during HE. Furthermore, elevated extracellular glutamate concentrations, commonly observed in HE patients, may result from reduced glutamate uptake into astrocytes. Finally, astrocytic swelling likely contributes to brain oedema, the predominant cause of mortality following acute liver failure. Alterations in intracellular ion concentrations may contribute to the observed cellular changes in HE. Ammonium causes intracellular acidifications, and increases intracellular calcium and sodium concentrations in astrocytes. In this review, we summarise current knowledge concerning ammonium-evoked changes in ion homeostasis, and discuss how such changes possibly contribute to the pathology of HE.

Keywords: ammonia; astrocyte; neuron; sodium; pH

Hepatische Enzephalopathie

Hepatische Enzephalopathie (HE) umfasst eine Reihe potenziell reversibler Funktionsstörungen des Gehirns, die infolge unzureichender Leberfunktion entstehen (siehe Weissenborn et al. 2005). Chronische HE, wie sie z.B. aufgrund einer durch Alkohol verursachten Leberzirrhose beobachtet wird, ist durch Persönlichkeitsveränderungen, Stimmungsschwankungen und Abnahme der intellektuellen Leistungsfähigkeit gekennzeichnet –

Symptome, die sich zum Teil schleichend entwickeln.

Akute HE tritt nach akutem Leberversagen auf, unter anderem als Folge einer viralen Hepatitis oder einer Acetaminophen (Paracetamol)-Intoxikation. Sie geht mit Störungen der Feinmotorik bis hin zur Muskelsteife (Spastik); Gang- und Standunsicherheit (Ataxie) sowie mit Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma einher. Bei der Mehrzahl der Patienten mit akutem Leberversagen kommt es zu einem Hirnödem, welches die Hauptursache für die hohe Sterblichkeitsrate

darstellt. Die einzig wirksame Behandlung bei einem durch akutes Leberversagen ausgelösten Hirnödem ist zur Zeit eine schnelle Lebertransplantation.

Zentrale Rolle von Ammonium. Für die Entstehung der bei HE beobachteten Funktionsstörungen wird hauptsächlich Ammonium (NH_4^+) bzw. Ammoniak (NH_3) verantwortlich gemacht, und die Behandlung der HE konzentriert sich vornehmlich auf die Absenkung der $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Konzentrationen im Blut bzw. Gehirn. Zum einen ist die arterielle Konzentration von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ bei HE-Patienten und in Tiermodellen der HE erhöht und ermöglicht eine Vorhersage über die Schwere der auftretenden Symptome (Felipo und Butterworth 2002). Operative Herstellung eines Umgehungskreislaufs (portocavale Anastomose), der das vom Darm kommende Blut an der Leber vorbei („ungefiltert“) in den großen Kreislauf überführt, löst chronische HE in Tieren aus. Die normale Konzentration von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ beträgt im arteriellen Blut etwa 50-100 $\mu\text{mol/l}$; diese verdoppelt sich bei chronischer HE, im zentralen Nervensystem steigt sie auf das Drei- bis Vierfache an. Demgegenüber erreichen die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Konzentrationen, die im Gehirn von Tieren bei HE im Stadium der Bewusstlosigkeit bestimmt wurden, Werte von 1-5 mM (Felipo und Butterworth 2002).

Astrozyten und HE. Nach neusten Erkenntnissen ist HE vor allem eine Gliafunktionsstörung (siehe Felipo und Butterworth 2002; Häussinger et al. 2000). Insbesondere wurde bei HE sowie nach akuter $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Exposition eine Astrozytenschwellung beobachtet, die auch als Hauptursache für das fatale Hirnödem bei akuter HE gilt. Eine anhaltende Veränderung oder gar ein Verlust von Neuronen wird dagegen nur selten im erwachsenen Gehirn nach $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Exposition beschrieben (Felipo und Butterworth 2002), und die Symptome, die für akute oder chronische HE charakteristisch sind, gehen in der Regel bei Wiederherstellung der Leberfunktion wieder zurück (Weissenborn et al. 2005).

Die erhöhte Empfindlichkeit von Astrozyten gegenüber Neuronen auf $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ kommt sehr wahrscheinlich durch astrozytenspezifische Signal- und Stoffwechselwege zustande, die besonders sensitiv auf $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ansprechen. Dazu gehört der Glutamat-Glutamin-Zyklus bzw. die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin. Im Gehirn wird Ammonium durch das Enzym Glutaminsynthetase, welches fast ausschließlich in Astrozyten lokalisiert ist, umgewandelt. Dabei wird Glutamat mit Ammonium zu

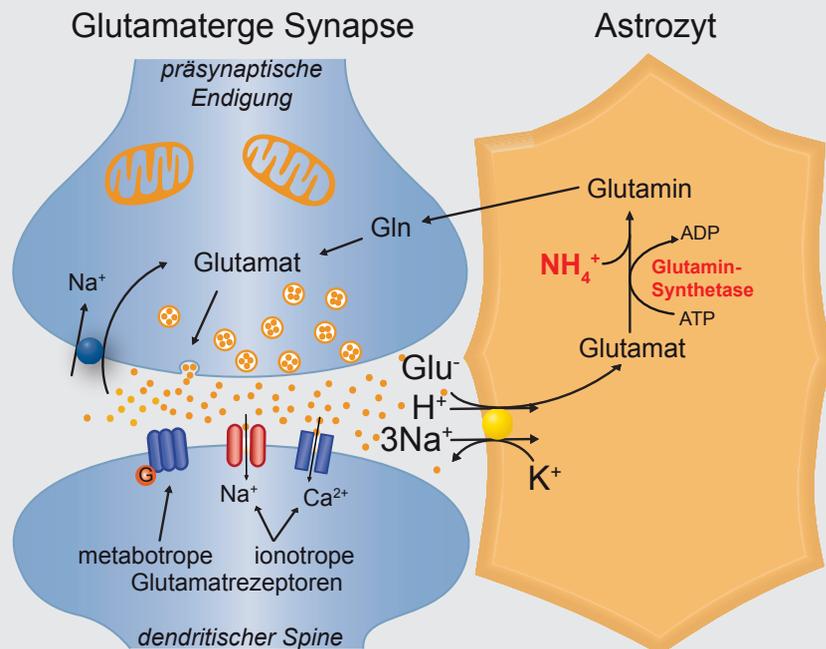


Exkurs 1

Der Glutamat-Glutamin-Zyklus, gliale Glutamataufnahme und HE

Das an der präsynaptischen Endigung freigesetzte Glutamat bindet an metabotrope und ionotrope Rezeptoren und löst so eine Reaktion in der postsynaptischen Zelle aus. Freigesetztes Glutamat wird gleichzeitig durch hochaffine Transporter, die vorwiegend in Astrozyten lokalisiert sind, aufgenommen.

in Gliazellen an, verschiebt sich das Umkehrpotenzial für den Transport in negative Richtung und verringert damit die treibende Kraft und die Kapazität der Zellen für die Aufnahme von Glutamat. In den Astrozyten wird Glutamat mit NH_4^+ durch das Enzym Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt, welches wiederum den Neuronen zur Glutamatsynthese zur Verfügung gestellt wird. Kennzeichen der HE ist eine erhöhte $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Konzentration im Gehirn. Die Umwandlung von Glutamat in Glutamin in Astrozyten



Umkehrpotenzial für den Glutamattransport (nach Zerangue und Kavanaugh, Nature 383, 1996); n = Anzahl pro Zyklus transportierter Ionen

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} (n_{\text{Na}} + n_{\text{H}} - n_{\text{K}} - n_{\text{Glu}}) \ln \left(\frac{[\text{Na}_o]}{[\text{Na}_i]} \right)^{n_{\text{Na}}} \times \left(\frac{[\text{Glu}_o]}{[\text{Glu}_i]} \right)^{n_{\text{Glu}}} \left(\frac{[\text{H}_o]}{[\text{H}_i]} \right)^{n_{\text{H}}} \left(\frac{[\text{K}_i]}{[\text{K}_o]} \right)^{n_{\text{K}}}$$

Gliale Glutamataufnahme wird hauptsächlich durch die Glutamattransporter EAAT1 und 2 (*Excitatory Amino Acid Transporters* 1, 2) vermittelt und wird durch den Kotransport eines Protons und dreier Natriumionen sowie den Antiport eines Kaliumions getrieben. Dadurch ist die Aktivität der Transporter bzw. deren Umkehrpotenzial (E_{rev}) vor allem vom einwärtsgerichteten Gradienten für Natriumionen abhängig (siehe Beziehung von Zerangue und Kavanaugh). Steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration

ist dabei der einzig bedeutsame Weg für die Entfernung des Ammoniums, und es kommt zu einer Erhöhung des intrazellulären Glutamin/Glutamat-Verhältnisses. Gleichzeitig wird eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration beobachtet, welche auf verstärkte Glutamataufnahme zurückgeführt wird. Die erhöhte intrazelluläre Glutaminkonzentration trägt zur Schwellung von Astrozyten bei, welche ein weiteres typisches Kennzeichen der HE ist.

Glutamin fixiert, welches nach Aufnahme in die Neurone wieder zu Glutamat umgewandelt wird (Glutamat-Glutamin-Shuttle; siehe Exkurs 1). Astrozyten weisen bei HE eine starke Erhöhung ihres Glutamingehalts auf, darüber hinaus wird eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration beobachtet, die für die auftretenden klinischen Symptome mitverantwortlich gemacht wird.

Ammonium beeinflusst auch die Volumenregulation von Astrozyten. Die intrazelluläre Akkumulation von Glutamin fördert eine Schwellung der Astrozyten, der durch eine Freisetzung von Osmolyten wie Myo-Inositol und Taurin entgegengewirkt wird. Schwellung der Astrozyten führt zur Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickoxidverbindungen, die wiederum die Zellschwellung verstärken (Häussinger und Görg 2010). Bei akuter HE betrifft die Schwellung der Astrozyten sowohl die Zellkörper als auch die Ausläufer und kann so massiv sein, dass das oben angesprochene fatale Hirnödem entsteht (Felipo und Butterworth 2002). Auch die direkte Injektion von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, ein Modell zur Untersuchung der akuten HE, verursacht in Versuchstieren Hirnschwellungen, die vorwiegend durch die Anschwellung von Astrozyten zustande kommen.

Bei chronischer HE kommt es zu einer milderen Form der Astrozytenschwellung (Häussinger et al. 2000). Histologisch ist chronische HE bei Patienten durch sog. Alzheimer Typ II-Astrozyten gekennzeichnet, deren charakteristische Merkmale angeschwollene Zellkörper sowie typische Veränderungen im Zellkern wie ein prominenter Nucleolus und klar sichtbares, umgrenztes Chromatin sind (Felipo und Butterworth 2002). In der Tat werden Alzheimer Typ II-Astrozyten sowohl in Tiermodellen der HE als auch in Zellkultur durch chronische $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Belastung induziert.

HE und glutamaterge Transmission. Ein weiteres Merkmal der HE sind die erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration und eine veränderte glutamaterge Neurotransmission (siehe Rose 2002). Nach Injektion von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ in die Blutbahn zur Auslösung von akuter HE steigt die extrazelluläre Glutamatkonzentration innerhalb von 20 min an und erreicht ihren Peak 60 min nach der Injektion. Darüber hinaus beobachtet man in einem vergleichbaren Zeitraum eine Aktivierung neuronaler NMDA-Rezeptoren. Der Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration könnte von einer erhöhten Glutamatausschüttung oder einer herabgesetzten Glutamataufnahme herühren, und es gibt experimentelle Hinweise für die Existenz beider Mechanismen (Rose 2002). Interessanterweise hat eine Anzahl

von Untersuchungen berichtet, dass NH_4^+ / NH_3 eine kalziumabhängige Freisetzung von Glutamat aus Astrozyten hervorruft (Rose et al. 2005; Görg et al. 2010; Rose 2002; siehe unten). Darüber hinaus wurde bei Tiermodellen der HE eine Herabsetzung der Glutamataufnahme nach chronischer Exposition mit NH_4^+ / NH_3 beschrieben und dies wurde auf eine Reduktion der Expression der glialen Glutamattransporter zurückgeführt (siehe Rose 2002; Exkurs 1).

Ionengradienten und Ionentransport

Eine bislang wenig beachtete Ursache für die HE-induzierten Veränderungen der glialen Zellfunktion könnten Veränderungen der Ionengradienten und der intrazellulären Ionenhomöostase darstellen. Die Herstellung und Aufrechterhaltung von Ionengradienten über der Plasmamembran ist eine Grundvoraussetzung für die Entstehung des zellulären Membranpotenzials, elektrischer Signalgebung und von Transportprozessen, die auf den Ionengradienten beruhen. Dabei ist die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, die unter

ATP-Verbrauch intrazelluläre Natriumionen im Verhältnis 3:2 gegen extrazelluläre Kaliumionen austauscht, von herausragender Bedeutung. Eine Vielzahl sekundär und tertiär aktiver Transporter verwendet den so hergestellten einwärts gerichteten Natriumgradienten, um weitere Gradienten für Kalium-, Magnesium-, Protonen-, Bikarbonat-, Kalzium- oder Chloridionen zu etablieren.

Die Aktivität dieser Transporter resultiert in spezifischen Unterschieden zwischen den extra- und intrazellulären Konzentrationen der transportierten Ionen. Während die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum bei etwa 3-4 mM liegt, ist die intrazelluläre Kaliumkonzentration etwa 130 mM. Für Natrium liegen die extra- und intrazellulären Konzentrationen bei ungefähr 145 und 8-15 mM. Trotz der Tatsache, dass der intrazelluläre pH oft nahe dem extrazellulären pH ist (7.1-7.3), existiert ein einwärtsgerichteter elektrochemischer Gradient für Protonen und Bikarbonat, da deren Gleichgewichtspotenzial nahe bei 0 mV liegt, die Zellen aber ein negatives Membranpotenzial haben (Deitmer und Rose 1996). Der steilste

elektrochemische Gradient existiert für Kalziumionen. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt in Ruhe weniger als 100 nM, während die extrazelluläre Kalziumkonzentration bei etwa 2 mM liegt. Die intrazellulären Chloridkonzentrationen bei reifen Neuronen und Astrozyten unterscheiden sich stark voneinander. Während die Chloridkonzentration reifer Neurone niedrig gehalten wird (5-10 mM), beträgt sie in Astrozyten zwischen 30 und 60 mM, was zu einem deutlich positiveren Chlorid-Gleichgewichtspotenzial bei Astrozyten im Vergleich zu Neuronen führt.

Ionenbewegungen und gliale Glutamat-aufnahme. Neuronale Aktivität führt zu signifikanten Ionenbewegungen über die Plasmamembran. Diese kommen nicht nur durch die Öffnung ionotroper Transmitterrezeptoren und durch andere Ionenkanäle zustande, sondern in erheblichem Maße auch durch die Aktivität verschiedener Ionentransporter. Dies können zum einen Transporter sein, die durch die Änderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen und/

World Precision Instruments

www.wpi-europe.com

Electrophysiology

Biosensing

Behaviour

Anesthesia

Stereotaxics

Blood Pressure

NEUROSCIENCE SOLUTIONS FROM WORLD PRECISION INSTRUMENTS
from intracellular recording in single cells to behavioural studies in whole animals

see us next at:
FENS2010
Amsterdam July 3-7
Booth 222

World Precision Instruments Germany GmbH Zossener Str. 55-58 D-10961 Berlin
Tel. +49 (0)30 6188845 Fax +49 (0)30 6188670 E-mail wpi@wpi-europe.com



oder des Membranpotenzials aktiviert werden, wie z. B. die Na^+/K^+ -ATPase, oder der in Astrozyten exprimierte elektrogene $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport. Zum anderen ist auch der Transport von Glutamat oder GABA an den direkten Transport von Ionen gekoppelt.

Insbesondere führt Aktivierung der natriumabhängigen Glutamattransporter EAAT1 und 2 zu signifikanten Änderungen der intrazellulären Natriumkonzentration und des pH in Astrozyten (siehe Kelly et al. 2009; siehe Exkurs 1). Die Aufnahme von synaptisch freigesetztem Glutamat in die Astrozyten ist mit der gleichzeitigen Aufnahme von drei Natriumionen sowie einem Proton im Austausch gegen ein Kaliumion verbunden. Das Umkehrpotenzial für diesen elektrogenen Prozess liegt im stark positiven Bereich (siehe Exkurs 1). Dadurch kann Glutamat extrazellulär auf Werte unter $1 \mu\text{M}$ gehalten werden, während in den Astrozyten eine Glutamatkonzentration im millimolaren Bereich vorliegt. Umgekehrt beeinflussen Änderungen der Konzentration der transportierten Ionen wiederum das Umkehrpotenzial bzw. die treibende Kraft für die Glutamataufnahme (siehe Exkurs 1). Entsprechend wurde gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. bei Sauerstoffmangel, ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration im Extremfall zu einer Umkehr der treibenden Kraft für den Glutamattransport und damit zu einem Auswärtstransport vom Glutamat führen kann.

Ammoniumtransport und ammonium-induzierte pH-Veränderungen

Wie oben erläutert, spielen Ammonium bzw. Ammoniak eine zentrale Rolle bei der Entstehung der HE. Daher sind die Mechanismen des Transports von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ über die Plasmamembran von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der auftretenden Funktionsstörungen. Zelltypspezifische Transportmechanismen könnten dabei zumindest zum Teil zelltypspezifische Effekte von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ erklären.

Ammoniak (NH_3) ist eine schwache Base und reagiert daher in Abhängigkeit vom vorherrschenden pH mit Wasser unter Bildung von Ammonium (NH_4^+). Bei physiologischem pH (um 7.2) liegen 98% in der protonierten Form, also als Ammonium vor. Die unprotonierte Form NH_3 kann als ungeladenes Molekül frei über Zellmembranen diffundieren. In der Zelle verbindet sich NH_3 mit einem Proton und NH_4^+ wird gebildet (Abbildung 1). Daher resultiert der NH_3 -Einstrom und sein Reaktionsgleichgewicht mit NH_4^+ in einer Nettoanreicherung von NH_4^+ (Marcaggi und Coles 2001). Zusätzlich zu dem rein passiven Einstrom von NH_3 , der unabhängig vom

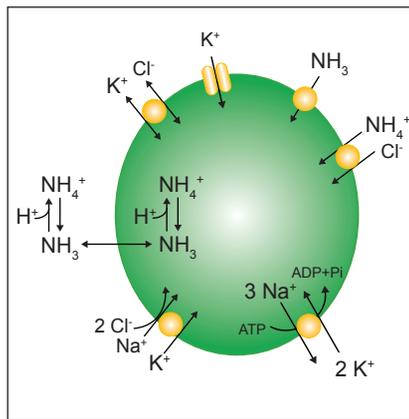


Abb. 1: Mögliche Transportwege für $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ über die Zellmembran einer putativen Zelle. Ammoniak (NH_3) kann frei über die Zellmembran diffundieren. NH_3 ist eine schwache Base und nimmt in der Zelle ein Proton auf, was zu einem Anstieg des pH, d. h. einer Alkalinisierung führt. Ammoniumionen (NH_4^+) haben ähnliche ionale Eigenschaften wie Kaliumionen und können durch Kaliumkanäle über die Zellmembran gelangen. Des Weiteren kann NH_4^+ über verschiedene kaliumabhängige Transporter (NKCC, KCC, Na^+/K^+ -ATPase; siehe Text) transportiert werden. Schließlich haben neuere Untersuchungen Hinweise auf die Existenz spezifischer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Transporter ergeben. Der Einstrom von NH_4^+ in die Zelle bewirkt die Freisetzung von Protonen und damit eine Ansäuerung. Neben pH-Veränderungen kann $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ durch die Aktivierung der genannten Ionentransportmechanismen auch Veränderungen in der intrazellulären Konzentration anderer Ionen, wie z. B. Natrium, Kalium oder Chlorid bewirken.

Zelltyp abläuft, existiert im Sammelrohr der Niere ein mit dem Rhesusfaktor verwandtes Protein, welches NH_3 transportiert und dessen Ausscheidung fördert.

Die intrazelluläre Umwandlung von NH_3 in NH_4^+ verbraucht Protonen. Experimentelle Zugabe von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ führt daher zunächst zu einer intrazellulären Alkalinisierung, die sowohl in Neuronen, als auch in Astrozyten beobachtet wird. Wird das $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ wieder entfernt, diffundiert das NH_3 verstärkt nach außen und lässt in der Zelle Protonen zurück, was in einer vorübergehenden intrazellulären Ansäuerung resultiert (Abbildung 1; vgl. Abbildung 2, Kelly et al. 2009). Aufgrund seiner Eigenschaft, den intrazellulären pH zu verändern, wurde und wird die sog. „Ammonium-Vorpuls“-Technik häufig eingesetzt, um Mechanismen der intrazellulären pH-Regulation und Pufferung zu untersuchen. Dabei werden die Zellen für wenige Minuten

mit einer millimolaren Konzentration von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (normalerweise durch Zugabe von Ammoniumchlorid, NH_4Cl) überspült und die daraus resultierenden Veränderungen des intrazellulären pH unter verschiedenen Versuchsbedingungen analysiert.

Auch Ammonium kann über die Zellmembran gelangen. Dies liegt vor allem daran, dass die ionalen Eigenschaften (Ionendurchmesser, Hydrathülle) von NH_4^+ sehr ähnlich denen von Kaliumionen sind und NH_4^+ durch Kaliumkanäle gelangen oder auch Kaliumionen an Transportern ersetzen kann (Abbildung 1). In kultivierten Neuronen wurde z. B. gezeigt, dass der Einstrom von NH_4^+ durch einwärtsgerichtete Kaliumkanäle bewerkstelligt wird. Der Einstrom von NH_4^+ hat die intrazelluläre Freisetzung von Protonen zur Folge und führt somit zu einer Ansäuerung. Kationen-Chlorid-Kotransporter tragen ebenfalls zum Einstrom von NH_4^+ bei, und Unterschiede in der Expression dieser Transporter zwischen Neuronen und Gliazellen könnten zu der differenziellen Sensitivität der unterschiedlichen Zelltypen beitragen. Bei kultivierten Neuronen wird die NH_4^+ -Aufnahme vornehmlich über Kalium-Chlorid-Kotransporter (KCC) bewerkstelligt, wohingegen bei kultivierten Astrozyten der natriumabhängige Kalium-Chlorid-Kotransport (NKCC) beitragen könnte (Titz et al. 2006).

Weitere Studien haben zusätzliche Transportwege für NH_4^+ in diverse andere Zelltypen vorgeschlagen. Zum Beispiel besitzen Gliazellen der Bienenretina einen speziellen NH_4^+ -Chlorid-Kotransporter und in einigen Invertebraten-Neuronen wird die NH_4^+ -Aufnahme über die Na^+/K^+ -ATPase vermittelt (Marcaggi und Coles 2001).

Folgen ammoniuminduzierter Veränderungen des intrazellulären pH. Ein Merkmal der HE ist ein Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration, ein Phänomen, welches durchgehend bei Patienten und Tiermodellen der HE beobachtet wird (siehe Felipo und Butterworth 2002; Rose 2002). Während bei chronischer HE eine verringerte Expression glialer Glutamattransporter für die erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration verantwortlich gemacht wird, scheinen bei akuter HE andere Ursachen zu greifen. Wie oben beschrieben (vgl. Abbildung 1) führt die Applikation von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ zu Veränderungen des intrazellulären pH, die aus einer anfänglichen Alkalinisierung (Einstrom von NH_3), gefolgt von einer Ansäuerung (Einstrom von NH_4^+) bestehen. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde berichtet, dass eine transiente, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierte Alkalinisierung kultivierter kortikaler Astrozyten die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern nach sich zieht, die wiederum zu einer Freisetzung

von Glutamat aus den Astrozyten führt (Rose et al. 2005; siehe auch Görg et al. 2010).

Ammoniuminduzierte Veränderungen der intrazellulären Natriumkonzentration

Kürzlich in unserem Labor durchgeführte Arbeiten beschäftigten sich erstmals mit der Frage, ob $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ neben dem intrazellulären pH auch die intrazelluläre Natriumkonzentration beeinflusst (Kelly et al. 2009). Dazu wurden primär kultivierte Astrozyten des Hippocampus der Ratte mit einer Blutersatzlösung überspült, die 5 mM $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ im Austausch gegen Natriumionen enthielt. Intrazelluläre pH-Messungen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs BCECF zeigten wie erwartet, dass die Applikation von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ innerhalb von einer Minute eine vorübergehende Alkalinisierung auslöste, die von einer anhaltenden Ansäuerung auf Werte von durchschnittlich pH 7.05 abgelöst wurde (Abbildung 2A; Kelly et al. 2009). Nach Wegnahme des $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ wurde eine transiente Ansäuerung beobachtet, bevor der pH wieder auf seinen ursprünglichen Ruhewert von etwa pH 7.25 stieg.

Die quantitative Bestimmung der Natriumkonzentration in den kultivierten Astrozyten mithilfe des natriumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs SBFI (siehe Exkurs 2) zeigte, dass $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ neben der Veränderung des intrazellulären pH auch zu starken Veränderungen der intrazellulären Natriumkonzentration führt. In der Tat stieg die Natriumkonzentration in den Astrozyten bei Überspülung mit $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ dauerhaft von einem Ruhewert von etwa 18 mM auf durchschnittlich etwa 40 mM an (Abbildung 2B). Dieser Effekt war ebenfalls reversibel und nach Entfernen des $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ kehrte die Natriumkonzentration auf den Ruhewert zurück.

Hemmung HCO_3^- -abhängiger pH-Regulationsmechanismen durch Anwendung einer HCO_3^- -freien Blutersatzlösung verstärkte den $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierten Abfall des intrazellulären pH und schwächte den Natriumanstieg ab, was darauf hinweist, dass $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ zu einer Aktivierung pH-regulatorischer Transportmechanismen führt (Kelly et al. 2009). Jedoch war der $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierte Natriumanstieg nicht einfach eine Konsequenz intrazellulärer pH-Regulationsmechanismen. Tatsächlich wiesen die Experimente darauf hin, dass weitere natriumabhängige Mechanismen beim Einwärtstransport von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ beteiligt sind. Um die Beteiligung des natriumabhängigen Kalium-Chlorid-Kotransporters (NKCC) zu untersuchen, haben wir den spezifischen Blocker Bumetanid angewendet. Hemmung des NKCC mit Bumetanid hatte

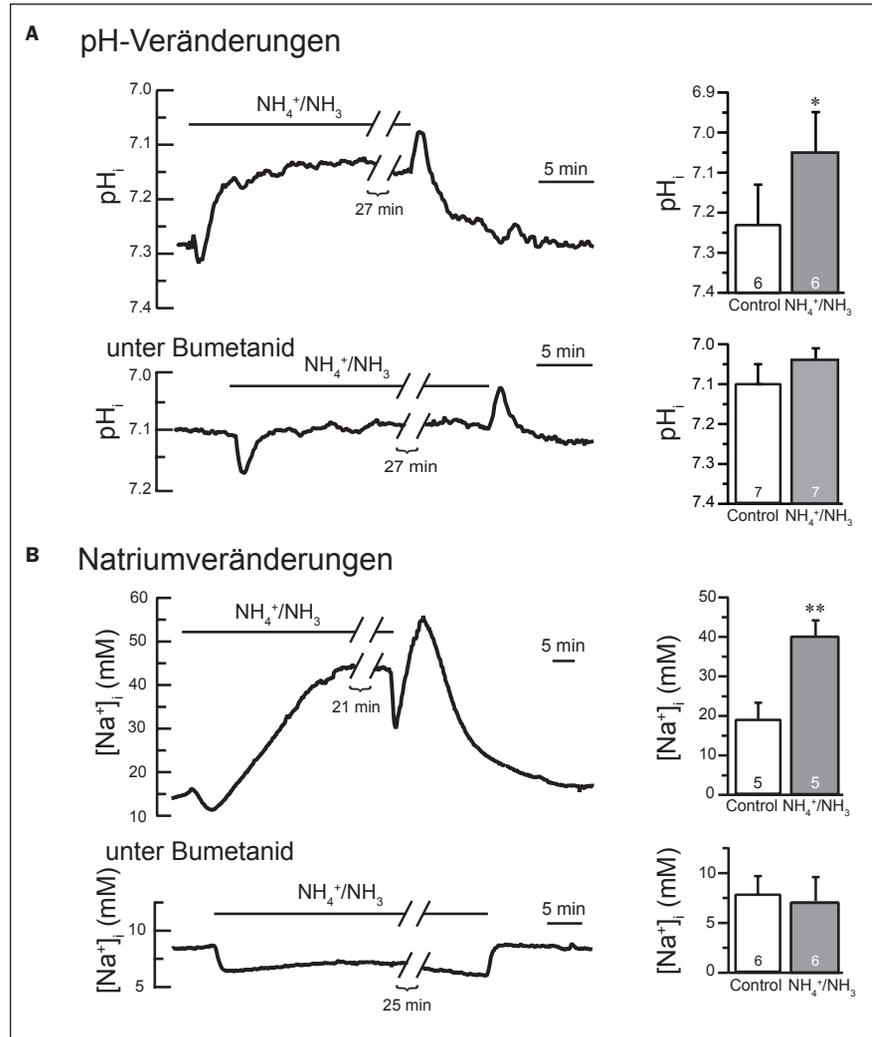


Abb. 2: Ammoniuminduzierte pH- und Natriumveränderungen und Rolle des NKCC in kultivierten hippocampalen Astrozyten. A: Applikation von 5 mM $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ bewirkt eine kurzzeitige Alkalinisierung, die von einer andauernden Ansäuerung gefolgt ist. Der pH_i verringert sich durchschnittlich um 0.19 Einheiten (siehe rechtes Histogramm mit Mittelwert und Standardabweichungen). Findet die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Zugabe im Beisein des NKCC-Blockers Bumetanid statt, erfolgt keine signifikante Ansäuerung mehr (vgl. Histogramm rechts). B: $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ verursacht einen sehr starken, andauernden Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration (obere Messspur), der im Beisein von Bumetanid nicht zu beobachten ist (untere Messspur). Die rechte Seite zeigt Histogramme, in denen Mittelwerte mit Standardabweichung mehrerer Messungen dargestellt sind (verändert und mit Zustimmung übernommen aus: Kelly et al. (2009), *Glia* 57:921-934; ©Wiley-Liss).

deutliche Auswirkungen auf die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierten pH- und Natriumänderungen der kultivierten Astrozyten. Obwohl die zuvor erwähnten transienten Veränderungen nach $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Gabe noch beobachtet wurden, verhinderte Bumetanid sowohl die anhaltende Ansäuerung (Abbildung 2A), als auch die starke Erhöhung der Natriumkonzentration (Abbildung 2B).

Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass die Aktivierung des NKCC durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ der grundlegende Mechanismus ist, der für

die beobachtete Ansäuerung als auch für den starken Anstieg der Natriumkonzentration in kultivierten Astrozyten verantwortlich ist. Darüber hinaus scheint NKCC auch der hauptsächliche Mechanismus für den Einwärtstransport von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ zu sein. Diese Daten sind in Einklang mit früher berichteten Befunden, die auf eine Beteiligung des NKCC am NH_4^+ -Einstrom hinwiesen (Titz et al. 2006).

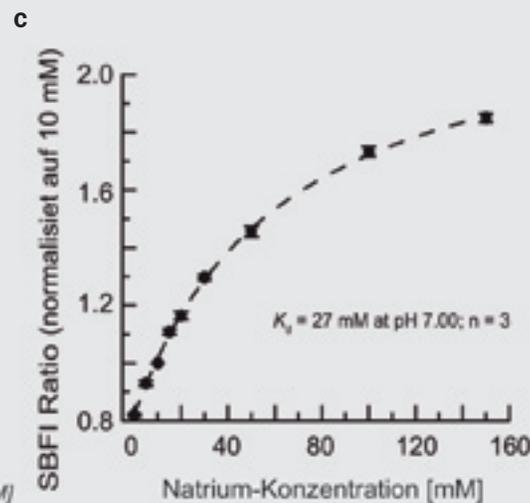
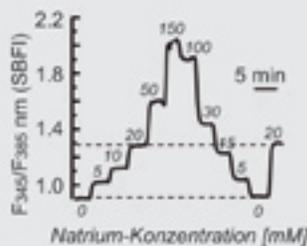
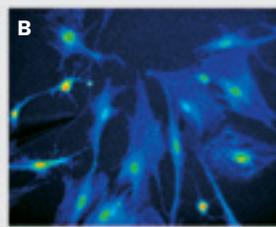
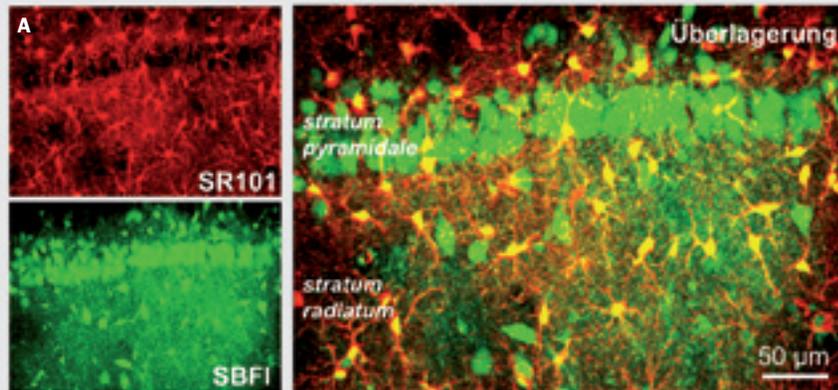
Bei Neuronen hängt der Mechanismus des NH_4^+ -Einstroms vermutlich vom



Exkurs 2

Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Ionensensitive Fluoreszenzfarbstoffe erlauben die quantitative Bestimmung intrazellulärer Ionenveränderungen mit



bildgebenden Verfahren. (A) Injektion des AM-(Acetomethyl-) Esters des natriumsensitiven Farbstoffs SBFI in einen hippocampalen Hirnschnitt mittels einer Glaspipette (Technik nach Stosiek et al. 2003, *PNAS* 100) führt zur gleichzeitigen Beladung von Astrozyten und Neuronen (grüner Kanal). Gleichzeitig wurde das Präparat mit dem vitalen Astrozytenmarker SR101 beladen (roter Kanal), sodass Astrozyten und Neurone in der Überlage-

rung klar zu trennen sind (siehe Nimmerjahn et al. 2004, *Nature Methods*; Kafitz et al. 2008, *J Neurosci Methods*). (B) Oben links: durch Inkubation mit SBFI-AM beladene, kultivierte Astrozyten. Unten links: Werden die beladenen Zellen mit Eichlösungen überspült, die den Natriumporenbildner Gramicidin enthalten, kann eine Eichung der Fluoreszenzsignale

mithilfe von ratiometrischem Imaging vorgenommen werden (siehe Rose und Ransom 1996, *J Physiol.*). Änderungen der Natriumkonzentration führen dann zu reproduzierbaren Änderungen in der Fluoreszenzemission von SBFI. Rechts: Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Kalibrierungen. Anhand solcher Eichkurven können die Fluoreszenzmesswerte auf absolute Natriumkonzentrationen umgerechnet werden.

Reife- bzw. Differenzierungsgrad ab. Das Expressionsniveau von NKCC ist in vielen unreifen Neuronen (postnataler Tag 0-10) hoch und nimmt danach stark ab. In reifen Neuronen wird der NH_4^+ -Einstrom

daher wahrscheinlich über alternative Mechanismen stattfinden und publizierte Daten weisen hier auf eine Beteiligung des Kalium-Chlorid-Kotransports (KCC) hin (Titz et al. 2006). Diese Daten lassen

vermuten, dass die Einstromwege von NH_4^+ in Neuronen und Astrozyten tatsächlich unterschiedlich sind.

Ammoniuminduzierte Ionenverschiebungen und Veränderungen der glialen Glutamataufnahme

Die Beobachtung, dass $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ Veränderungen sowohl des intrazellulären pH als auch der Natriumkonzentration in Astrozyten hervorruft, führte zu der Frage, ob $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ durch die Verringerung der einwärtsgerichteten Gradienten für Protonen und Natrium auch eine Verringerung der natriumabhängigen Glutamataufnahme in die Astrozyten hervorrufen könnte (vgl. Exkurs 1). Dies könnte für das Krankheitsbild der HE relevant sein, welches durch eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration gekennzeichnet ist.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, haben wir gliale Glutamattransporter selektiv mit dem transportierten Agonisten D-Aspartat aktiviert. Kurzzeitige Applikation von D-Aspartat führte zu einer transienten intrazellulären Ansäuerung sowie zu einem transienten Natriumanstieg in den Astrozyten, die die Aktivität des Glutamattransports widerspiegeln (vgl. Exkurs 1; Abbildung 3A; Kelly et al. 2009). In Gegenwart von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ war die Amplitude der D-Aspartat-induzierten Ansäuerung und der Natriumerhöhung um 80-90% reduziert, was auf eine starke Reduktion der glialen Glutamataufnahme schließen lässt (Abbildung 3A).

Wie oben berichtet, verhindert die Hemmung des NKCC durch Bumetanid die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierten Veränderungen des pH und der Natriumkonzentration in Astrozyten (siehe Abbildung 2). Daher untersuchten wir die Wirkung von Bumetanid auf die durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ hervorgerufene Hemmung der glialen Glutamataufnahme. In der Tat war der Effekt von $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ auf die D-Aspartat-induzierten pH und Natriumtransienten sehr viel geringer, wenn Bumetanid vorhanden war, was darauf hindeutet, dass während Hemmung des NKCC die gliale Glutamataufnahme weniger stark durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ reduziert wurde (Abbildung 3A). Dies lässt darauf schließen, dass die durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ hervorgerufenen Veränderungen des intrazellulären pH und der intrazellulären Natriumkonzentration zu einer starken Reduktion der treibenden Kraft und Aktivität der glialen Glutamattransporter führt (Abbildung 3B). Wurden diese verhindert, wurde die $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierte Verringerung der Glutamattransport-Aktivität verhindert. Der Anteil der durch $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -hervorgeführten Hemmung der Glutamattransport-

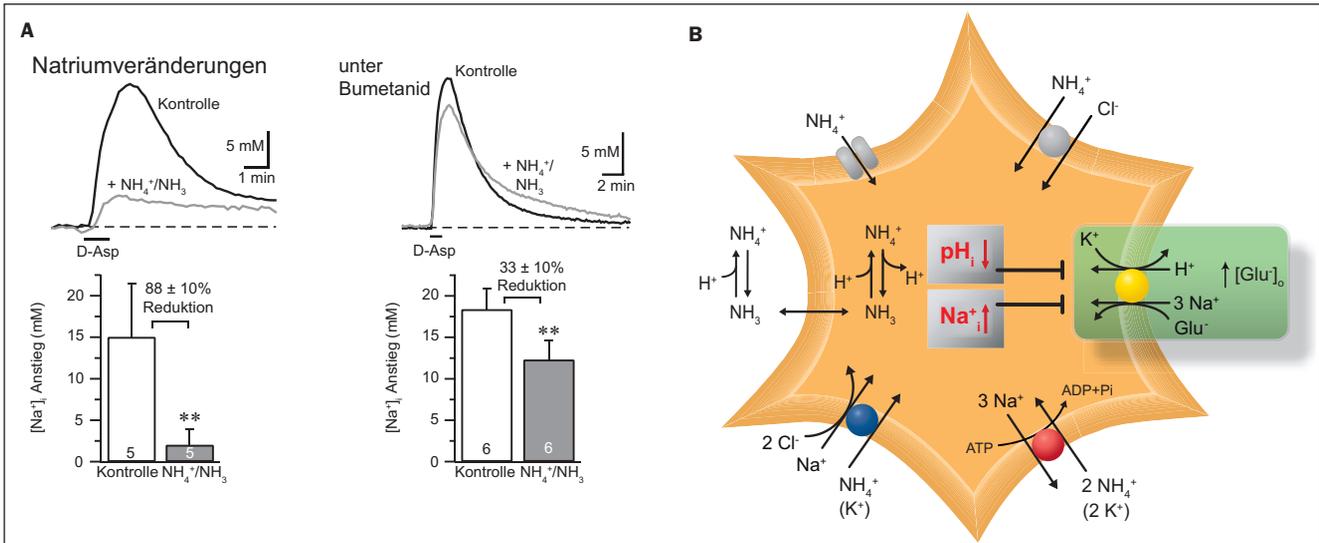


Abb. 3: Ammoniuminduzierte Ionenveränderungen bewirken eine Reduktion der Glutamataufnahme bei kultivierten Astrozyten des Hippocampus. A: Applikation von D-Aspartat (1 min, 1 mM) aktiviert die Glutamataufnahme und führt zu einem Natriumanstieg (schwarze Spur). Unter dem Einfluss von 5 mM NH₄⁺/NH₃ (graue Spur) ist die D-Aspartat-induzierte Natriumaufnahme um fast 90% reduziert. Rechts: unter dem Einfluss des NKCC-Blockers ist der Effekt von NH₄⁺/NH₃ auf die Natriumveränderung wesentlich geringer. Der untere Teil zeigt Histogramme, in denen Mittelwerte mit Standardabweichung mehrerer Messungen dargestellt sind. **B:** Modell, das die vorgeschlagenen Mechanismen ammoniuminduzierter Ionenveränderungen und der Auswirkungen auf die gliale Glutamataufnahme zusammenfasst. Ammonium wird hauptsächlich über NKCC in die Zellen transportiert. Die daraus folgende Ansäuerung und der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führen zu einer signifikanten Reduktion der treibenden Kraft für die Glutamataufnahme. ((A) verändert und mit Zustimmung übernommen aus: Kelly et al. (2009), *Glia* 57:921-934; ©Wiley-Liss).

Aktivität durch Veränderungen im pH und der intrazellulären Natriumkonzentration betrug um die 50% und entsprach in etwa dem, was durch die Reduktion der elektrochemischen Gradienten von Protonen und Natrium vorhergesagt wurde (Kelly et al., 2009).

Rolle ammoniuminduzierter Ionenveränderungen bei HE

Die oben beschriebene, bei NH₄⁺/NH₃-Applikation auftretende kurzzeitige Alkalinisierung und die darauf folgende kalziumabhängige

Freisetzung von Glutamat aus Astrozyten könnten wichtige initiale Schritte sein, die zur Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration beitragen. Des Weiteren wurde berichtet, dass durch NH₄⁺-vermittelte Kalziumerhöhungen die Tyrosin-Nitrierung

SCIENCE PRODUCTS GmbH
for Research and Therapy

Amplifiers
Data Acquisition and Data Analysis Systems
Electrodes, Wires and Glasses
Micropipette Pullers, Microforges and Bevelers
Micromanipulators
Microinjection Systems, Perfusion Systems
Stereotaxic Instruments
Stimulators and Stimulus Isolators
Tables and Faraday Cages
Temperature Controllers ... and more!

SCIENCE PRODUCTS GmbH
Hofheimer Str. 63 · 65719 Holheim
Tel.: 06192/901396 - Fax: 06192/901398
info@science-products.com · www.science-products.com



verschiedener Proteine in Astrozyten verursachen, der eine Bedeutung bei HE zukommen könnte (Häussinger und Görg 2010).

Die Kopplung des NH_4^+ -Einstroms an Ionentransportmechanismen führt aber auch zu anhaltenden Veränderungen der intrazellulären Ionenhomöostase, die zur Entstehung des Krankheitsbilds der HE beitragen könnten. Grundsätzlich ist anzunehmen, dass Veränderungen, die während einer längeren Exposition mit $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ aufrechterhalten werden, wahrscheinlich von höherer klinischer Relevanz als kurzzeitige, nur wenige Minuten andauernde Ionenverschiebungen sind. Während bei Neuronen ein natrium-unabhängiger Transport (KCC) den NH_4^+ -Einstrom vermittelt, ist ein natriumabhängiger Transport (NKCC) am NH_4^+ -Einstrom in Astrozyten beteiligt. Der starke Einstrom von Natriumionen (sowie der mittransportierten Kalium- und Chloridionen) nach Aktivierung des NKCC wird insbesondere zu der bei akuter HE beobachteten Astrozytenschwellung beitragen. Die ist von daher von Bedeutung, da Hirnödeme die häufigste Todesursache nach akutem Leberversagen darstellen (Felipo und Butterworth 2002).

In diesem Zusammenhang zeigen unsere Daten auch, dass die gliale Glutamataufnahme durch Verringerung der treibenden Kraft für den Transport innerhalb von 30 min nach Beginn der $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Applikation stark reduziert war. Dieses Zeitfenster entspricht der beobachteten Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration in Tieren, die akuter $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Belastung ausgesetzt waren, und ist zu kurz, um auf eine Veränderung der Expressionslevel zurückzuführen zu sein.

$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -induzierte Veränderungen des intrazellulären pH könnten auch zu anderen Aspekten der HE beitragen. Der intrazelluläre pH ist ein bekannter Modulator zellulärer Funktionen und beeinflusst Enzymaktivitäten, die Leitfähigkeit von Ionenkanälen und die Aktivität von Transportmechanismen. Die nach längerer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Exposition beobachtete, anhaltende intrazelluläre Ansäuerung ähnelt der, die z. B. bei Anoxie beobachtet wird. Ansäuerungen führen im Allgemeinen zu einer Hemmung der neuronalen Erregbarkeit und von Enzymaktivitäten (Rose und Deitmer 1996). Darüber hinaus hemmt ein Absinken des pH die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, ein wichtiger Mechanismus der intrazellulären Signalgebung sowohl in Astrozyten als auch in Neuronen. Eine allgemeine Hemmung der neuronalen Erregbarkeit sowie eine Verringerung der intrazellulären Kalziumfreisetzung könnten zu den Defiziten in der Neurotransmission beitragen, die bei HE-Patienten beobachtet werden.

Obwohl noch viele grundlegende Fragen zur Entstehung der HE offen sind, weisen die bisher durchgeführten Studien somit klar darauf hin, dass ammoniuminduzierte Ionenbewegungen ursächlich zu zellulären und insbesondere glialen Funktionsstörungen bei HE beitragen könnten. Es ist zu hoffen, dass die weitere Aufklärung der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen dazu beiträgt, in Zukunft bessere Therapiemöglichkeiten für dieses Krankheitsbild zu entwickeln.

Literatur

- Felipo, V. und Butterworth, R. F. (2002): Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology* 67: 259-279.
- Görg, B., Morwinsky, A., Keitel, V., Schrör, K. und Häussinger, D. (2010): Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58: 691-705.
- Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F. und vom Dahl, S. (2000): Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *Journal of Hepatology* 32: 1035-1038.
- Häussinger, D. und Görg, B. (2010): Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13: 87-92.
- Kelly, T., Kafitz, K. W., Roderigo, C. und Rose, C. R. (2009): Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia* 57: 921-934.
- Marcaggi, P. und Coles, J. A. (2001): Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in Neurobiology* 64: 157-183.
- Rose, C. (2002): Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: Decreased uptake or increased release? *Metabolic Brain Disease* 17: 251-261.
- Rose, C., Kresse, W. und Kettenmann, H. (2005): Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *Journal of Biological Chemistry* 280: 20937-20944.
- Deitmer, J.W. und Rose, C. R. (1996): pH regulation and proton signalling by glial cells. *Progress in Neurobiology* 48: 73-103.
- Titz, S., Hormuzdi, S., Lewen, A., Monyer, H. und Misgeld, U. (2006): Intracellular acidification in neurons induced by ammonium depends on KCC2 function. *European Journal of Neuroscience* 23: 454-464.
- Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J. und Ahl, B. (2005): Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* 19: s93-s98.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 575 („Experimentelle Hepatologie“) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wir danken Dr. Peter Hochstrate für Bemerkungen zu dem Manuskript.

Kurzbiografien

Tony Kelly: Studium der Pharmakologie 1998 in Aberdeen, Schottland; Promotion 2005 in Vancouver, Kanada (Abt. Allg. Physiologie, John Church). 2006 – 2009 Post-Doktorand am Institut für Neurobiologie, Universität Düsseldorf bei Christine R. Rose. Seit 2009 Post-Doktorand am Laboratory of Experimental Epileptology and Cognition Research, Universität Bonn bei Heinz Beck.

Christine R. Rose: Studium der Biologie in Konstanz; Promotion 1990-1993 in Kaiserslautern (Allg. Zoologie, Jochen Deitmer); 1994-1997: Post-Doktorandin (DFG-Stipendium) am Dept of Neurology, Yale University School of Medicine bei Bruce Ransom und Steve Waxman. 1998-1999: Assistentin am Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes in Homburg bei Arthur Konnerth, 1999-2003: Assistentin am Physiologischen Institut der TU/LMU München; 2001: Habilitation im Fach Physiologie an der LMU München, 2003-2005: Heisenbergstipendiatin der DFG. Seit 2005: Leiterin des Instituts für Neurobiologie der Universität Düsseldorf.

Korrespondenzadressen

Tony Kelly

Laboratory of Experimental Epileptology and Cognition Research
Department of Epileptology,
Life & Brain Center
University of Bonn Medical Center
Sigmund-Freud Str. 25
53127 Bonn
Tel.: +49 228 6885-280
Fax: +49 228 885-294
E-mail: tony.kelly@ukb.uni-bonn.de

Christine R. Rose

Institut für Neurobiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstraße 1
40225 Düsseldorf
Tel.: +49 211 81 13416
Fax: +49 211 81 13415
E-Mail: rose@uni-duesseldorf.de