

Aus der Neurologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-P. Hartung

Einfluss von Ammoniumchlorid auf neuronale Netzwerkaktivität *in vitro*
gemessen durch Mikroelektroden-Arrays

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Clara-Sophie Schwarz

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Dihné

Korreferentin: Prof. Dr. Sergeeva

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Clara-Sophie Schwarz, Stefano Ferrea, Kim Quasthoff, Janine Walter, Boris Görg, Dieter Häussinger, Alfons Schnitzler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné (2012): Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity. *Experimental Neurology* 235 (1), 368-373.

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Etablierung eines neuen in-vitro-Modells der Ammoniakneurotoxizität. Die übergeordnete klinische Fragestellung betrifft die hepatische Enzephalopathie, ein im Zusammenhang mit Leberfunktionsstörungen auftretendes neurologisches Syndrom. Bedingung für die Manifestation der hepatischen Enzephalopathie ist die bei ungenügender hepatozytärer Stoffwechsellistung stattfindende Akkumulation neurotoxischer Metabolite in Blut und Gehirn, insbesondere die Akkumulation von Ammoniak. Ammoniak schädigt die funktionelle Integrität der Astrozyten, sodass es sekundär zu einer neuronalen Störung kommt. Erhöhte enzymatische Glutaminproduktion in Astrozyten sowie exzessive Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren werden als zugrunde liegende Faktoren diskutiert. Die vertiefende Erforschung der Ammoniaktoxizität ist unabdingbar zur Entwicklung neuer Ansätze in der Behandlung der hepatischen Enzephalopathie.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die Ammoniakneurotoxizität in vitro auf funktioneller Ebene abzubilden und anhand dessen die Evaluation potentieller pharmakologischer Ansatzpunkte zur Antagonisierung zu erproben.

Dazu dienen kortikale Primärkulturen von Ratten (Organentnahmenummer O5/2009), also astrozytär-neuronale Co-Kulturen, welche sich zu neuronalen Netzwerken formieren, deren elektrophysiologische Aktivität über Mikroelektroden-Arrays detektiert wird. Mikroelektroden-Arrays ermöglichen es, das Ausmaß und die Qualität synaptischer Interaktionen von Neuronen zu bestimmen. Dies wird über die Detektion synchroner Burstaktivität erreicht, die der Multi-Unit Ableitung in vivo ähnelt. Die neuronale Netzwerkaktivität reagiert empfindlich auf Änderungen im extrazellulären Milieu, da die neuronalen Populationen alle wichtigen ionotropen Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren, α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren, γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren) besitzen und sowohl exzitatorische glutamaterge als auch inhibitorische γ -Aminobuttersäure enthaltende Neurone an der Generierung der Netzwerkaktivität beteiligt sind. Astrozyten und Moleküle der Extrazellulärmatrix modulieren die Netzwerkaktivität, sodass diese insgesamt aus einer komplexen Interaktion multipler Faktoren resultiert, welche zu einer integrativen funktionalen Entität konvergieren. Weil somit basale Aspekte der zellulären Vielfalt und Konnektivität des Gehirnparenchyms in vitro rekapituliert werden, bilden Mikroelektroden-Arrays gewissermaßen in reduktionistischer Weise Parenchymfunktionen ab.

Die elektrophysiologische Antwort der neuronalen Netzwerke auf Ammoniumchloridbelastung soll als Indikator der toxischen Ammoniakwirkung dienen und mithilfe möglicherweise entgegensetzender Substanzen erneut in Balance gebracht werden. Die hier getesteten Kandidaten zur Kompensation der Ammoniumchloridwirkung sind der Glutaminsynthetaseinhibitor Methionin-Sulfoximin sowie der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist 2-Amino-5-phosphono-Valeriansäure.

Nach 24-stündiger Inkubation neuronaler Netzwerke mit Ammoniumchlorid kommt es zu Veränderungen der neuronalen Netzwerkaktivität, die durch Inhibition der Glutaminsynthese nicht vollständig zu verhindern sind. Dies spricht gegen die Annahme, dass die unter Ammoniakeinwirkung beobachtete Glutaminakkumulation im Rahmen einer astrozytären Störung direkte elektrophysiologisch messbare Konsequenzen hat. Antagonismus am N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor hingegen vermag die genannten Veränderungen zu verhindern. Die Ergebnisse deuten daher auf eine maßgebliche Rolle des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors bei der Vermittlung der Ammoniaktoxizität hin. Insgesamt hat sich das hier vorgestellte Modell als zweckdienlich erwiesen und könnte auch zukünftig einen Beitrag zur Aufklärung der Ammoniakneurotoxizität leisten und hilfreich bei der Entwicklung therapeutischer Strategien sein.

Abkürzungsverzeichnis

[...]	molare Konzentration einer Substanz
$\mu\text{mol/l}$	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AP-5	2-Amino-5-phosphono-Valeriansäure
et al.	et alii
g	Gramm (Masse)
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunde (Zeit)
ISHEN	International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism
l	Liter (Volumen)
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
lg	dekadischer Logarithmus
MEA	Mikroelektroden-Array
mmol/l	Millimol pro Liter
mol	Mol (Stoffmenge)
MSO	Methionin-Sulfoximin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
P _i	anorganisches Phosphat
pK _a	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
RNS	Ribonukleinsäure
t _{1/2}	Halbwertszeit
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund: die hepatische Enzephalopathie.....	1
1.1.1	Neurologische Komplikationen chronischer Lebererkrankungen und akuten Lebersversagens.....	1
1.1.2	Intrakranielle Drucksteigerung im akuten Lebersversagen.....	2
1.2	Ammoniak: das Schlüsseltoxin der hepatischen Enzephalopathie	3
1.2.1	Biochemische Eigenschaften des Ammoniaks	3
1.2.2	Kumulation von Ammoniak im Zentralnervensystem	3
1.3	Die Rolle der Astrozyten	4
1.3.1	Das Astrozytenschwellen	5
1.3.2	Die Schutzfunktion der Astrozyten	5
1.4	Glutamin in der Ammoniaktoxizität	6
1.4.1	Die Theorie der osmotischen Gliopathie	6
1.4.2	Die Theorie des trojanischen Pferdes	6
1.4.3	Einfluss einer Inhibition der Glutaminsynthetase	7
1.5	Ammoniakwirkung auf Neurone	8
1.6	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren in der Ammoniaktoxizität.....	9
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	12
3	Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity; Clara-Sophie Schwarz, Stefano Ferrea, Kim Quasthoff, Janine Walter, Boris Görg, Dieter Häussinger, Alfons Schnitzler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné, Experimental Neurology, 235 (1): 368-373 (2012)	13
4	Diskussion	14
5	Schlussfolgerungen	20
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	21
7	Anhang	25
7.1	Herleitung von Kappa	25
7.2	Wiederholte Belastung neuronaler Netzwerke mit Ammoniumchlorid	26

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund: die hepatische Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie stellt ein neuropsychiatrisches Syndrom dar, das komplizierend bei chronischen Lebererkrankungen und im akuten Leberversagen jedweder Ätiologie auftreten kann. Fällt die Stoffwechsellistung der Leber ab, vermag dieser Umstand zur Akkumulation verschiedener Metabolite im Zentralnervensystem (ZNS) zu führen, die ihrerseits dort biologisch wirksam werden und entsprechende Symptome verursachen können.

Als neurologisch relevante Konsequenz eines Leberschadens ist die Verminderung der Harnstoffproduktion herauszustellen. Der Harnstoffzyklus der Hepatozyten nimmt eine Schlüsselrolle im Stickstoffstoffwechsel ein und ist wesentlich an der Entfernung portalvenösen Ammoniaks beteiligt. Sowohl bei chronischen Lebererkrankungen als auch im akuten Leberversagen kann die Ammoniakkonzentration im systemischen Blutkreislauf und nachfolgend im ZNS ansteigen. Im ZNS entfaltet überschüssiges Ammoniak dann seine Neurotoxizität (Butterworth 2002).

Auch Substanzen wie Mangan, Mercaptane, Phenole, kurzkettige Fettsäuren und aromatische Aminosäuren sollen eine Rolle bei der Vermittlung der hepatischen Enzephalopathie spielen (Butterworth 2003). Der gesteigerte Ammoniakumsatz des Gehirns ist jedoch nach bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen als der entscheidende Vorgang in der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie zu verstehen (Butterworth 2002) und bestimmt offenbar hauptsächlich den klinischen Verlauf.

Therapeutisch konzentriert man sich derzeit darauf, die Ammoniaklast im portalvenösen Blut so gering wie möglich zu halten, indem man eine proteinarme Diät empfiehlt und Ammoniakbildner der Darmflora medikamentös zurückzudrängen versucht (Butterworth 2002). Eine spezifische Therapie der hepatischen Enzephalopathie ist nicht bekannt.

1.1.1 Neurologische Komplikationen chronischer Lebererkrankungen und akuten Leberversagens

Grundsätzlich muss zwischen der hepatischen Enzephalopathie bei chronischen Lebererkrankungen und derjenigen im akuten Leberversagen unterschieden werden. Die neurologischen Symptome sind in beiden Fällen potentiell reversibel. Charakteristisch für die

hepatische Enzephalopathie bei chronischen Lebererkrankungen ist ein episodenhafter Verlauf mit variablen Symptomen unterschiedlicher Ausprägung. Es sind einige Triggerfaktoren bekannt, die bei Patienten mit Leberzirrhose Episoden der hepatischen Enzephalopathie auslösen können, darunter die Verabreichung von Benzodiazepinen, Entzündungsreaktionen und Hyponatriämie (Häussinger und Schliess 2008). Häufige Beschwerden sind affektive Störungen, Konzentrationsstörungen, Fatigue und Asterixis. Ein signifikanter Anstieg des Hirndrucks ist im chronischen Verlauf ungewöhnlich (Häussinger und Schliess 2008).

Akutes Leberversagen geht zunächst mit unspezifischen Symptomen wie Oberbauchschmerz, Ikterus, Appetitlosigkeit und Abgeschlagenheit einher. Es kommt dann typischerweise zu einer Koagulopathie und hepatischer Enzephalopathie mit Verwirrungszuständen und Bewusstseinsstörungen (Pathikonda und Munoz 2010). Ätiologisch lassen sich in den U.S.A. mehr als 50% der Fälle akuten Leberversagens auf eine Medikamenteneinnahme zurückführen, wobei Paracetamol der häufigste Auslöser ist (Pathikonda und Munoz 2010). Auch virale, metabolische, vaskuläre und andere Ursachen kommen vor. Die Entwicklung eines Hirnödems mit dem Risiko der Hirnstammeinklemmung ist im akuten Leberversagen eine übliche Komplikation (Clemmesen et al. 1999).

1.1.2 Intrakranielle Drucksteigerung im akuten Leberversagen

Je akuter und fulminanter sich der Verlauf der Lebererkrankung präsentiert, desto geringer ist einerseits die Fibrosierung des Lebergewebes ausgeprägt und desto höher ist damit die Regenerationsfähigkeit dieses Organs einzuschätzen. Andererseits steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit der Hirndruckerhöhung mit beträchtlichem Mortalitätsrisiko (Pathikonda und Munoz 2010). Gegen eine intrakranielle Drucksteigerung kann sich das osmotische Diuretikum Mannitol als vorübergehend hilfreich erweisen (Kato et al. 1992). Die Notfalltransplantation einer Spenderleber jedoch stellt im akuten Leberversagen oft die einzige potentiell lebensrettende Behandlungsoption dar.

Es liegen Hinweise darauf vor, dass die Höhe der arteriellen Ammoniakkonzentration im akuten Leberversagen mit dem Mortalitätsrisiko durch die Gefahr der Hirnstammeinklemmung korreliert und als prognostischer Faktor gewertet werden kann (Clemmesen et al. 1999). Da ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten Blutammoniakwerten und der Entwicklung eines Hirnödems glaubhaft erscheint, könnte eine Reduktion der schädlichen Wirkung des Ammoniaks auf das ZNS die Entwicklung des Hirnödems als tödliche Komplikation

verzögern. Damit ließe sich Zeit gewinnen, um die Regenerationsfähigkeit der Leber auszuschöpfen.

Das Verständnis pathophysiologischer Mechanismen der Ammoniakneurotoxizität ist grundlegend für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in den geschilderten klinischen Zusammenhängen. Eine wesentliche Schwierigkeit besteht jedoch darin, innerhalb komplexer biochemischer Wechselwirkungen einen Bezug zu glialen und neuronalen Funktionen herzustellen und so sinnvolle Ansatzpunkte für eine spezifische pharmakologische Therapie herauszuarbeiten.

1.2 Ammoniak: das Schlüsseltoxin der hepatischen Enzephalopathie

1.2.1 Biochemische Eigenschaften des Ammoniaks

In wässriger Lösung liegt Ammoniak (NH_3) in einem Gleichgewicht mit dem Ammoniumion (NH_4^+) vor, die Henderson-Hasselbalchsche Gleichung lautet folglich

$$pH = pK_a + \lg \frac{NH_3}{NH_4^+}. \quad (1)$$

Im Blut wird für Ammoniak bei 37 °C im Allgemeinen ein pK_a von 9,1 bis 9,2 angegeben (Cooper und Plum 1987). Bei einem Blut- pH -Wert von circa 7,4 ist von einem Überwiegen der protonierten Form auszugehen. Die hohe Geschwindigkeit der Protonierung und Deprotonierung ermöglicht es, dass die Diffusion der lipophilen Base über die Bluthirnschranke trotz ihrer quantitativen Unterlegenheit gegenüber der geladenen Säure wahrscheinlich den entscheidenden Eintrittsmechanismus ins ZNS darstellt (Cooper und Plum 1987). Es handelt sich bei der Diffusion von Ammoniak ins ZNS um einen nicht sättigbaren Prozess. Aus den Eigenschaften des Ammoniaks (1) ergibt sich zudem die Folgerung, dass eine Alkalose die Aufnahme des Ammoniaks ins Gehirn fördert.

Ist in der vorliegenden Arbeit ohne weitere Spezifizierung von Ammoniak die Rede, so ist die protonierte Form eingeschlossen.

1.2.2 Kumulation von Ammoniak im Zentralnervensystem

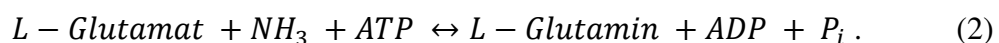
Man geht gemeinhin davon aus, dass ein großer Teil des Blutammoniaks aus dem Proteinabbau im Darmlumen stammt und von dort in den portalvenösen Kreislauf gelangt (Cooper und

Plum 1987). Im Fall eines hepatozytären Leistungsdefizits findet die Einspeisung der Stickstoffgruppen in den Harnstoffzyklus nicht mehr in gewöhnlichem Umfang statt (1.1), wodurch das überschüssige Ammoniak systemisch verfügbar wird.

Nach dem Übertritt ins ZNS durch Diffusion werden die Stickstoffgruppen sehr rasch ($t_{1/2} < 3$ s) zur Glutaminproduktion herangezogen (Cooper und Plum 1987), sodass es zu einer Akkumulation von Ammoniak im Gehirn kommt (Brusilow et al. 2010). Daher lässt sich im Leberversagen typischerweise eine Erhöhung des Verhältnisses $[Ammoniak]_{Gehirn}/[Ammoniak]_{Blut}$ beobachten, das bei gesunden Individuen 2, im chronischen Leberversagen 3 bis 4 und im akuten Leberversagen sogar bis zu 8 beträgt (Cooper und Plum 1987; Butterworth 2002). In Gehirnen gesunder Ratten findet sich eine Ammoniakkonzentration von 150 bis 300 $\mu\text{mol/l}$ (Cooper und Plum 1987). Hingegen werden im Tiermodell bei akutem Leberversagen Hirnammoniakkonzentrationen von 1 bis 5 mmol/l gemessen (Szerb und Butterworth 1992).

1.3 Die Rolle der Astrozyten

Die Glutaminproduktion bei Ammoniaküberschuss findet im Gehirn ganz überwiegend im astrozytären Kompartiment statt, wo das Enzym Glutaminsynthetase exprimiert wird (Martinez-Hernandez et al. 1977; Norenberg und Martinez-Hernandez 1979). Die Reaktionsgleichung der von der Glutaminsynthetase katalysierten Reaktion lautet:



Da die Astrozyten den Zelltyp im ZNS darstellen, der in erster Linie morphologische und funktionelle Veränderungen unter Ammoniakbelastung erfährt, wird die hepatische Enzephalopathie als primäre Astrogliopathie bezeichnet (Norenberg 1986). Lichtmikroskopisch findet diese Astrogliopathie Ausdruck in einer Volumenzunahme der Astrozyten. Die Volumenzunahme lässt sich sowohl *in vitro* bei kultivierten Rattenastrozyten unter Ammoniakbelastung (Jayakumar et al. 2006b; Abb. 1) als auch in post-mortem-Proben von Patienten mit akutem Leberversagen (Kato et al. 1992) nachweisen. Zeichen der funktionellen Beeinträchtigung der Astrozyten sind beispielsweise ihr reduzierter Glutamat-Uptake nach 24 h (Jayakumar et al. 2006b) sowie eine veränderte Kaliumhomöostase (Sugimoto et al. 1997).

1.3.1 Das Astrozytenschwellen

Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist die hepatische Enzephalopathie bei Leberzirrhose als Manifestation eines intrazellulären zerebralen Ödems zu verstehen (Häussinger und Schliess 2008), wobei die betroffenen Patienten gewöhnlich keine Zeichen erhöhten Hirndrucks ausbilden (1.1.1). Dies ist, wie bereits angeklungen, bei Patienten mit akutem Leberversagen regelhaft der Fall. Doch auch das drucksteigernde Hirnödem bei der letztgenannten Patientengruppe ist überwiegend zytotoxischer Natur und zeigt geschwollene Astrozyten, während die Blut-Hirn-Schranke weitgehend intakt erscheint (Kato et al. 1992).

Astrozytenschwellen hat weitreichende Konsequenzen auf den astrozytären Stoffwechsel einschließlich der Verursachung von oxidativem Stress (Jayakumar et al. 2006a). Es konnte nachgewiesen werden, dass hypoosmotisches Astrozytenschwellen unabhängig von Ammoniak zur Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen führt, ein Schritt, der wahrscheinlich Teil eines komplexen Signalwegs ist (Schliess et al. 2004). Auch fördert Astrozytenschwellen die Oxidation von Ribonukleinsäure (RNS) besonders in Synapsennähe und hat so möglicherweise Auswirkungen auf die Qualität der Translation an Synapsen und damit auf die synaptische Übertragung (Görg et al. 2008). Die Relevanz dieser einzelnen Veränderungen in Bezug auf die funktionelle Integrität des ZNS ist noch weitgehend unklar. Es herrscht jedoch Einigkeit darüber, dass das Anschwellen der Astrozyten ein zentrales Ereignis der Ammoniaktoxizität darstellt.

1.3.2 Die Schutzfunktion der Astrozyten

Daneben ist die Rolle der Astrozyten in der hepatischen Enzephalopathie auch noch unter einem anderen Aspekt zu betrachten: Zwar stellt dieser Zelltyp offensichtlich das primäre Ziel der Ammoniaktoxizität in vivo dar, doch schützen Astrozyten gleichzeitig die Neurone durch schnelle Verstoffwechslung des Ammoniaks vor dessen destruktivem Potenzial. So wurde gezeigt, dass degenerative Veränderungen, die unter Ammoniakwirkung in vitro bei rein neuronalen Kulturen zu beobachten waren, in Co-Kultur mit Astrozyten nicht auftraten (Rao et al. 2005). Es ist also davon auszugehen, dass Ammoniak eine direkte Wirkung auf Neurone hat, die in vivo durch die Schutzfunktion der Astrozyten nicht in einem relevanten Ausmaß zum Tragen kommt, was die Reversibilität der Symptome plausibel macht.

1.4 Glutamin in der Ammoniaktoxizität

Die Annahme, dass Glutamin, das ja bei der Verstoffwechslung des Ammoniaks in Astrozyten anfällt (1.2.1), über Initiierung des Astrozytenschwellens die Ammoniakneurotoxizität vermittelt, ist weit verbreitet (Albrecht et al. 2010; Brusilow et al. 2010), allerdings bestehen auch Zweifel an ihr (Kosenko et al. 2003). Zwei Theorien zur Beantwortung der Frage, auf welche Weise Glutamin Ammoniakneurotoxizität vermitteln könnte, sind hervorzuheben.

1.4.1 Die Theorie der osmotischen Gliopathie

Nach der Theorie der osmotischen Gliopathie verursache Glutaminakkumulation im astrozytären Zytoplasma die Entstehung osmotischen Stresses, sodass es bei anhaltender Ammoniakbelastung zu einem Erschöpfen der volumenregulatorischen Kapazität komme (Brusilow et al. 2010). Das regulatorische Gegengewicht zur Glutaminakkumulation bestehe im Abbau organischer Osmolyte. Die Theorie der osmotischen Gliopathie findet Unterstützung in der Beobachtung, dass es in kultivierten Astrozyten bereits nach drei Stunden Ammoniakbelastung zu einem Verlust der Osmolyte Myo-Inositol und Hypotaurin kommt (Zwingmann und Leibfritz 2005). Bei der Untersuchung von Patienten mit Leberzirrhose mithilfe der Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie konnte ein abgeschwächtes Myo-Inositol-Signal auch in vivo nachgewiesen werden (Häussinger et al. 1994).

1.4.2 Die Theorie des trojanischen Pferdes

Nach der Theorie des Trojanischen Pferdes dringe das im Zytoplasma der Astrozyten anfallende Glutamin in die Mitochondrien ein, wo daraus glutaminaseabhängig Ammoniak freigesetzt werde. Mitochondriales Ammoniak soll oxidativen Stress induzieren. Dadurch komme es zu einem Zusammenbrechen des Membranpotenzials der inneren Mitochondrienmembran und zu einer Zunahme der mitochondrialen Membranpermeabilität. Der nun über das mitochondriale Kompartiment hinausgehende oxidative Stress gebe den Anstoß zur Volumendysregulation (Norenberg et al. 2007). Für diese Theorie spricht, dass Glutaminaseaktivität in Astrozytenmitochondrien nachgewiesen werden konnte (Kvamme et al. 2008). In Astrozyten ammoniakbelasteter Ratten allerdings ist die Glutaminaseaktivität nicht so hoch, wie man es bei Annahme der Theorie des Trojanischen Pferdes erwarten würde (Kanamori und Ross 1995). Die Beobachtung, dass das Astrozytenschwellen in Zellkultur nach Ammoniakbelastung erst auftritt, wenn die Glutaminkonzentration nach anfänglichem

Anstieg bereits wieder in den Normbereich abgesunken ist, kann wiederum als Argument für einen komplexeren Signalweg, wie er in der Theorie des Trojanischen Pferdes postuliert wird, oder zumindest gegen ein unmittelbar osmotisches Schwellen interpretiert werden (Jayakumar et al. 2006a; Albrecht et al. 2010).

Zusammenfassend gehen die beiden vorgestellten Theorien davon aus, dass Glutamin Mediator der Neurotoxizität des Ammoniaks sei und stellen das Astrozytenschwellen in den Mittelpunkt ihrer Betrachtung.

1.4.3 Einfluss einer Inhibition der Glutaminsynthetase

Für eine Schlüsselrolle des Glutamins sprechen auch Versuche mit dem Glutaminsynthetaseinhibitor Methionin-Sulfoximin (MSO), die gezeigt haben, dass MSO die mittlere letale Dosis (LD_{50}) für Ammoniumacetat in Versuchstieren erheblich erhöht (Brusilow et al. 2010). Auch ammoniakinduziertes Astrozytenschwellen lässt sich durch MSO verhindern (Tanigami et al. 2005). Darüber hinaus kann durch MSO die Konzentrationserhöhung des extrazellulären Kaliums, welche möglicherweise Ausdruck einer Beeinträchtigung der Astrozytenfunktion unter Ammoniakeinwirkung ist, verhindert werden (Sugimoto et al. 1997).

Die Studienlage zu den nutzbringenden Eigenschaften des MSO im Zusammenhang mit der Ammoniakneurotoxizität zeigt sich jedoch widersprüchlich. So beobachteten Raabe und Onstad (1982), dass MSO im Tierversuch mit Katzen die zur Erzeugung elektrophysiologischer Veränderungen notwendige Konzentration von Ammoniumacetat erheblich senkt. Auch sei MSO im Stande, allein verabreicht, dieselben Veränderungen wie Ammoniumacetat hervorzurufen. So vermuten die Autoren unter MSO-Einwirkung eine endogene Ammoniakintoxikation durch Inhibition der Glutaminsynthese, die sich elektrophysiologisch genauso manifestiere wie eine Intoxikation mit von außen zugeführtem Ammoniak. Nach Interpretation Raabes und Onstads komme es bei der Verabreichung von MSO und Ammoniumacetat zur Kumulation des endogenen und des von außen zugeführten Ammoniaks, weswegen zum Erreichen desselben Effekts nach Vorbehandlung mit MSO weniger Ammoniumacetat infundiert werden müsse (Raabe und Onstad 1982).

Zu der Annahme, dass funktionelle Einschränkungen nicht mit der Glutaminkonzentration, sondern mit der Ammoniakkonzentration im Gehirn korrelieren, passen auch die Ergebnisse

einer Studie mit Ratten (Kanamori et al. 1996). Bei Infusion von Ammoniumacetat kommt es unabhängig von einer Vorbehandlung mit MSO ab einer Hirnammoniakkonzentration von 3 $\mu\text{mol/g}$ zu einer Enzephalopathie vierten Grades (Tabelle 1), während gleichzeitig sehr unterschiedlich hohe Glutaminkonzentrationen von 5 bis 23 $\mu\text{mol/g}$ in den Gehirnen zu verzeichnen sind. Die Progression zur Enzephalopathie vierten Grades soll nach Kanamori et al. (1996) nicht durch Glutaminakkumulation zustande kommen, sondern durch Sättigung der Glutaminsynthetase mit daraus resultierendem Anstieg der Ammoniakkonzentration.

Stadium	Neurologischer Befund
I	affektive Störungen; Verwirrung; Konzentrationsschwäche; Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus
II	zusätzlich Schläfrigkeit, aber leicht erweckbar; Asterixis
III	verstärkte Schläfrigkeit, noch erweckbar
IV	Koma

Tabelle 1: Stadieneinteilung der hepatischen Enzephalopathie. Tabelle bearbeitet nach Pathikonda und Munoz 2010.

Neben diesen gegensätzlichen Überlegungen besteht die Möglichkeit, dass die mehrfach dokumentierte vorteilhafte Wirkung des MSO unter bestimmten experimentellen Bedingungen auch anderen Effekten jenseits der Glutaminsynthetaseinhibition geschuldet sein könnte (Kosenko et al. 2003). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Studienlage betreffend der Rolle des Glutamins und der Nützlichkeit des MSO als widersprüchlich beurteilt werden muss.

1.5 Ammoniakwirkung auf Neurone

Wie schon erwähnt, liegen vielfach Hinweise auf eine direkte Wirkung des Ammoniaks auf Neurone vor. Aus Spannungsklemme-Experimenten an Riesenaxonen des Tintenfischs ist bereits lange bekannt, dass Ammoniumionen neuronale Membranen depolarisieren können und deren Erregbarkeit erhöhen (Binstock und Lecar 1969). Binstock und Lecar zeigten, dass Ammoniumionen Kationenkanäle passieren können und in natriumfreiem Medium den frühen

Natriumstrom des Aktionspotenzials durch spannungsabhängige Natriumkanäle sowie in kaliumfreiem Medium den verzögerten Kaliumstrom ersetzen können.

In vivo spielt elektrophysiologisch wahrscheinlich ein durch Ammoniumionen veränderter Chloridtransport über die neuronale Membran zunächst eine gewichtigere Rolle als die Depolarisation durch die Passage von Ammoniumionen durch Kationenkanäle (Raabe 1990): Es kommt bereits bei einer Ammoniakkonzentration von 1 mmol/l zu einer Störung des Chloridgradienten über der neuronalen Membran, sodass die Hyperpolarisation im Rahmen postsynaptischer Inhibition beeinträchtigt ist. Auf diese Weise kann das Entstehen von Aktionspotenzialen nicht mehr suffizient unterdrückt werden. Ab einer Konzentration von 2 mmol/l kommt es darüber hinaus zur Membrandepolarisation aufgrund extrazellulären Kaliumanstiegs bei gestörter astrozytärer Kaliumaufnahme sowie durch kaliumartiges Verhalten der Ammoniumionen wie oben beschrieben. Die Depolarisation präsynaptischer Terminale kann zu einer Blockierung der synaptischen Übertragung führen. Betrachtet man mehrere hintereinander geschaltete exzitatorische Neurone, potenziert sich dieser Effekt. Sind diese exzitatorischen Neurone einem inhibitorischen Interneuron vorgeschaltet, führt dies zu einem verminderten Input an das inhibitorische Neuron, sodass es im Ergebnis neben der Beeinträchtigung der postsynaptischen Inhibition auch zu einer Störung der präsynaptischen Inhibition innerhalb komplexer neuronaler Schaltkreise kommt. Dieser Umstand könnte Ursache einer verminderten Aktivität des quantitativ wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) sein, wie Szerb und Butterworth (1992) vermuten. Netto soll es nach Raabe (1990) in Schaltkreisen, die polysynaptische Exzitation sowie prä- und postsynaptische Inhibition enthalten, zu einem Erregungsanstieg kommen. Zu dieser Idee passt die Beobachtung, dass Plasmaultrafiltrate von Patienten mit hepatischer Enzephalopathie die elektrische Aktivität innerhalb neuronaler Netzwerke von Mäusen in vitro auf Mikroelektroden-Arrays (MEAs) tendenziell erhöhen (Loock et al. 2001).

1.6 N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren in der Ammoniaktoxizität

Als mögliche Folge der neuronalen Membrandepolarisation wird auch das Lösen des Magnesiumblocks aus dem Ionenkanal des N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptors diskutiert, ein Ereignis, das unmittelbar Auslöser der vielbeachteten NMDA-Rezeptoraktivierung unter Ammoniakbelastung sein könnte (Hermenegildo und Monfort 1999). Für die tragende Rolle der Membrandepolarisation und des Lösens des Magnesiumblocks bei der NMDA-Rezeptoraktivierung spricht die Beobachtung, dass die Potenzierung der NMDA-

Rezeptoraktivierung durch Ammoniak nach NMDA-Gabe im magnesiumfreien Medium fehlt (Szerb und Butterworth 1992).

Ein natürlicher Agonist der NMDA-Rezeptoren ist Glutamat. Im Rahmen der astrozytären Veränderungen (Abb. 1) kommt es 24 h nach Beginn der Ammoniakexposition zu einer verminderten Glutamataufnahme aus dem Extrazellulärraum (Jayakumar et al. 2006b), was im Verlauf ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren spielen könnte.



Abb. 1: Reaktion kultivierter Rattenastrozyten auf Ammoniumchlorid. mmol/l heißt Millimol pro Liter, h heißt Stunde; Zeitangaben entnommen aus Jayakumar et al. 2006a und Jayakumar et al. 2006b.

Insgesamt soll es bei akuter Ammoniaküberladung zu einer exzessiven NMDA-Rezeptor-Aktivierung und der damit verbundenen Exzitotoxizität kommen, während unter chronisch-moderater Ammoniakbelastung adaptive Prozesse im NMDA–Stickstoffmonoxid (*NO*)–zyklisches Guaninmonophosphat–Signalweg für die zentralnervöse Dämpfung verantwortlich sein könnten (Llansola et al. 2007). Dies erklärt möglicherweise klinische Unterschiede zwischen der chronisch-moderaten und der akuten Ammoniakintoxikation.

Durch Depolarisation astrozytärer Membranen soll es unter Ammoniakbelastung auch zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf der Astrozytenoberfläche kommen (Schliess et al. 2002). Ausgehend von der Betrachtung der hepatischen Enzephalopathie als primäre Astrogliopathie könnte dies neben der Glutaminsynthese ein zentrales Ereignis in der Genese der Astrozytenveränderungen sein.

Es wäre prinzipiell denkbar, dass die Depolarisation der Astrozytenmembran und damit die Aktivierung astrozytärer NMDA-Rezeptoren vor allem Folge einer glutaminbedingten

Volumenänderung der Astrozyten ist oder dass die NMDA-Rezeptoraktivierung anstelle der Glutaminproduktion den Anstoß zu den morphologischen und funktionellen Veränderungen der Astrozyten gibt. In jedem Fall ist davon auszugehen, dass sich Astrozytenschwellen, oxidativer Stress und NMDA-Rezeptoraktivierung gegenseitig verstärken (Häussinger und Schliess 2008).

Die bereits erwähnten Phänomene der Proteintyrosinnitrierung und RNS-Oxidation lassen sich *in vitro* durch Antagonisten am NMDA-Rezeptor unterbinden (Görg et al. 2008; Schliess et al. 2004). Dass der NMDA-Rezeptoraktivierung auch *in vivo* eine fundamentale Bedeutung zukommt, legt die Wirksamkeit von NMDA-Rezeptorantagonisten gegen akute Ammoniaktoxizität bei Mäusen nahe (Hermenegildo et al. 1996). Die Beobachtung, dass NMDA-Rezeptorantagonisten die Aktivität der Glutaminsynthase steigern (Kosenko et al. 2003), spricht daher eher gegen die Annahme, dass erhöhte Glutaminproduktion den Auslöser für die pathologische Kaskade der Ammoniakneurotoxizität darstellt.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Schwierigkeit beim Verständnis der hepatischen Enzephalopathie und der Ammoniakneurotoxizität besteht darin, innerhalb der komplexen metabolischen Verstrickungen Brücken zur funktionellen Ebene zu schlagen. Untersuchungen in vivo haben das Problem, dass es aufgrund der Komplexität des Wirkungsgefüges beinahe unmöglich ist, Zusammenhänge klar herauszuarbeiten.

Da man davon ausgeht, dass in vivo eine Funktionsstörung der Astrozyten ausschlaggebend für die Manifestation der Enzephalopathie ist, wurde in vitro das Augenmerk besonders auf die Untersuchung der Astrozyten gelegt. Unmittelbare Ursache der klinischen Symptomatik ist jedoch eine (sekundäre) neuronale Störung, die sich zum Beispiel in Asterixis ausdrückt. Im Hinblick auf die Suche nach pharmakologischen Ansatzpunkten ist also das Zusammenspiel von Astrozyten und Neuronen auf funktioneller Ebene, das heißt auf Netzwerkebene, von höchstem Interesse. In der vorliegenden Untersuchung wird daher mit astrozytär-neuronalen Co-Kulturen gearbeitet, die elektrisch aktive neuronale Netzwerke bilden. Um die elektrische Aktivität zu messen, kommen MEAs zur Anwendung.

Die Arbeitsgruppe Dihné beschäftigt sich unter anderem mit der Analyse neuronaler Aktivität auf MEAs (siehe zum Beispiel Illes et al. 2007). Eine der vielfältigen Möglichkeiten dieser Methode ist die Untersuchung einer pharmakologischen Manipulation der Netzwerkaktivität (Martinoia et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit soll die Behandlung neuronaler Netzwerke mit Ammoniumchlorid auf MEAs zur Erforschung der Ammoniakneurotoxizität etabliert werden.

Ziel ist es, folgende Hypothesen zu testen:

- i) Ammoniak induziert Veränderungen der neuronalen Netzwerkaktivität auf MEAs; diese Veränderungen sind geeignet, Ammoniakneurotoxizität auf funktioneller Ebene in vitro abzubilden.
- ii) Anhand dessen lassen sich protektive Strategien gegen die Ammoniakneurotoxizität in Form von Glutaminsynthetaseinhibition mit MSO und NMDA-Rezeptorantagonisierung mit 2-Amino-5-phosphono-Valeriansäure (AP-5) testen.

- 3 Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity; Clara-Sophie Schwarz, Stefano Ferrea, Kim Quasthoff, Janine Walter, Boris Görg, Dieter Häussinger, Alfons Schnitzler, Hans-Peter Hartung, Marcel Dihné, Experimental Neurology, 235 (1): 368-373 (2012)**

4 Diskussion

Eine Kommission der ISHEN (International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism), die eingerichtet worden war, um gängige experimentelle Modelle der hepatischen Enzephalopathie zusammenzutragen und Gebiete mit hohem Entwicklungsbedarf zu identifizieren, kam 2009 zu der Auffassung, dass neuronalen Co-Kulturen besondere Aufmerksamkeit entgegenzubringen sei (Butterworth et al. 2009). Die Arbeit mit Co-Kulturen bietet vielfältige Möglichkeiten zur Erhellung pathophysiologischer Mechanismen der Ammoniaktoxizität, die bisher nicht ausgereizt wurden.

Der immunzytochemisch erbrachte Nachweis von Astrozyten sowie exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen innerhalb der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Netzwerke bestätigt, dass eine Beteiligung der genannten Komponenten an den auf MEAs beobachteten Reaktionen in Betracht zu ziehen ist. Dies schafft die Voraussetzung zur Interpretation der neuronalen Aktivitätsänderungen unter Ammoniumchlorideinwirkung und ermöglicht weitere Versuche, die gezielt den Beitrag einzelner Bestandteile des Netzwerks zur letztendlich gemessenen Aktivitätsänderung untersuchen. Obwohl also mit der hier genutzten Methode eine Annäherung an die komplexen Verhältnisse *in vivo* versucht wird, lassen sich die Vorteile eines *in-vitro*-Modells nutzen: geringe Kosten, exakte Kontrolle der Bedingungen, Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, komplexe pathophysiologische Zusammenhänge zu entwirren (Butterworth et al. 2009).

Zur möglichst differenzierten Analyse räumlich-zeitlicher Muster der Netzwerkaktivität werden in der vorliegenden Arbeit zwei Parameter erhoben: die Burstrate und Kappa (hier das arithmetische Mittel von Kappas nach Cohen) zur Quantifizierung der Synchronizität des neuronalen Feuerns. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Veränderung der Burstrate in kortikalen Kulturen ein sensibler Marker für die Wirksamkeit bioaktiver Substanzen ist (Martinoia et al. 2005). Der Synchronizität wird innerhalb wichtiger Funktionen des Gehirns, beispielsweise beim Lernen, Bedeutung beigemessen (Li et al. 2007). Es ist daher zur differenzierten Beschreibung der Wirkung des Ammoniumchlorids auf funktioneller Ebene unverzichtbar, neben der Burstrate auch die Synchronizität in geeigneter Form zu erfassen.

Die Herleitung von Cohens Kappa kommt im Anhang (7.1) ausführlich zur Darstellung. Da es sich bei der Betrachtungsweise der Synchronizität hier um ein Multi-Rater-Problem und nicht

um ein Inter-Rater-Problem handelt, d.h. die Übereinstimmung zwischen vielen Beurteilern (Elektroden) und nicht zwischen nur zwei Beurteilern von Interesse ist, könnte bei der Analyse der neuronalen Aktivität auch das Kappa nach Fleiss (Fleiss 1981, S. 225 ff.) zur Anwendung gebracht werden. Bei einem Vergleich von Fleiss' Kappa mit dem arithmetischen Mittel von Kappas nach Cohen kommt jedoch Conger (1980) zu dem Schluss, dass der letztgenannten Methode der Vorzug zu geben sei. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Vorgehensweise bietet eine hohe Genauigkeit zur Analyse der neuronalen Aktivität und wird, wie sich gezeigt hat, auch der Detektion von Aktivitätsunterschieden gerecht.

Ein möglicher Schwachpunkt im hier vorgestellten experimentellen Design liegt in der Wahl der Messzeitpunkte. Für ein erstes Ausloten der Möglichkeiten dieser Methodik sind die gewählten Messzeitpunkte geeignet, im Hinblick auf weitere Untersuchungen jedoch könnte ein Überarbeiten des Protokolls sinnvoll sein. Die ungleichen und mitunter sehr langen Abstände zwischen den einzelnen Messungen erlauben keinen vollständigen Überblick über den zeitlichen Verlauf der neuronalen Aktivität. Die Geschehnisse im Zeitraum von 30 min nach Hinzugeben des Ammoniumchlorids bis 24 h danach bleiben im Dunkeln. Vielleicht läge in der Kenntnis des genauen Verlaufs der neuronalen Aktivität die Möglichkeit, Aktivitätsänderungen mit pathologischen Veränderungen, die über 48 h in astrozytären Kulturen beobachtet wurden, zu korrelieren (Jayakumar et al. 2006a; Jayakumar et al. 2006b). Bereits die bei dem für diese Arbeit gewählten Messprotokoll sich andeutende Verlaufsdynamik der Aktivitätsänderungen leistet diesbezüglich interessanten Überlegungen Vorschub.

Bei einer Ammoniumchloridkonzentration von 5 mmol/l lässt sich zwischen dem frühen, nicht-signifikanten Anstieg der Burstrate nach 2 min und ihrem statistisch signifikanten Anstieg nach 24 h temporär eine Rückkehr der Burstrate in die Nähe des Ausgangsniveaus beobachten. Möglicherweise kommt es zunächst durch den schlagartigen Anstieg der Ammoniumionenkonzentration im Nährmedium zu einer Veränderung von Ionenströmen über neuronale Membranen (Raabe 1990), die die kurzzeitige Exzitation zu Anfang der Ammoniakexposition bewirkt. Die rasch voranschreitende Ammoniakfixation durch die Glutaminsynthese der Astrozyten (Norenberg und Martinez-Hernandez 1979) ist vermutlich Grundlage der sich anschließenden Rekompensation der Burstrate. Diese Phase der Rekompensation ist also wahrscheinlich durch die begrenzte Kapazität der Astrozyten hinsichtlich der Ammoniakfixation limitiert. In astrozytären Kulturen kommt es 12 h nach Applikation von 5 mmol/l Ammoniumchlorid zu einer Volumenzunahme der Astrozyten, die

48 h nach der Gabe des Ammoniumchlorids ihr Maximum erreicht (Jayakumar et al. 2006a). Eine Abnahme des Glutamat-Uptakes durch Astrozyten manifestiert sich nach 24 h (Jayakumar et al. 2006a) und ist, wie die Volumenzunahme, Ausdruck einer astrozytären Funktionsstörung. Es ist hinlänglich bekannt, dass Glutamatrezeptoragonisten Einfluss auf die Burstrate nehmen (Martinoia et al. 2005, Illes et al. 2007). Eine mit der verminderten astrozytären Glutamataufnahme assoziierte Zunahme der extrazellulären Glutamatkonzentration (Rose 2006) ist daher eine denkbare Ursache des statistisch signifikanten Anstiegs der Burstrate nach 24 h.

Alles in allem ist es möglich, dass das hier vorgestellte Modell durch eine schnelle, primär neuronale Reaktion auf Ammoniumionen sowie eine spätere, sekundär neuronale Antwort geprägt ist. Die letztgenannte Veränderung ist im Hinblick auf die primäre Astrogliopathie, die die hepatische Enzephalopathie in vivo darstellt (1.3), für pharmakologische Versuche interessanter. Beim Versuch, ammoniakbedingte Veränderungen gezielt zu verhindern, sollte das Augenmerk auf der 24-h-Messung liegen.

Die biphasische Entwicklung der Burstrate nach der Applikation von Ammoniumchlorid lässt sich wiederholt beobachten, wenn nach der 24-h-Messung ohne Vornehmen eines Mediumwechsels sofort wieder Ammoniumchlorid verabreicht wird (7.2), die Gesamtkonzentration also in einem zweiten Schritt erhöht wird. Im Kontrast dazu verstreicht der biphasische Verlauf bei direkter Verabreichung von 10 mmol/l Ammoniumchlorid. Der Unterschied zwischen zweistufiger Konzentrationserhöhung und direkter Verabreichung einer hohen Konzentration ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Ammoniakfixation durch Astrozyten im vorgestellten in-vitro-Modell eine entscheidende Rolle zukommt. Werden 10 mmol/l Ammoniumchlorid auf einen Schlag verabreicht, überfordert dies offenbar sofort die astrozytären Kapazitäten und die Ammoniumionen können über eine kurze Phase der anfänglichen Exzitation hinaus ihre primäre Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit entfalten. In dieser unphysiologisch hohen Konzentration kann dabei neben Einflüssen auf Chlorid- und Kaliumströme (Raabe 1990) auch die Passage von Ammoniumionen durch Natriumkanäle eine Rolle spielen (Cooper und Plum 1987). Jedoch soll die hepatische Enzephalopathie in vitro durch ein gestörtes astrozytär-neuronales Zusammenspiel abgebildet werden, also durch mutmaßlich sekundäre neuronale Funktionsstörungen. Trotz der Deutlichkeit der Wirkung des Ammoniumchlorids in einer Konzentration von 10 mmol/l erscheint daher die niedrigere Konzentration von 5 mmol/l als die bessere Wahl für weitere Versuche.

Bei Betrachtung der Aktivitätsänderungen unter Ammoniumchlorideinwirkung zeigt sich in Bezug auf die beiden hier erhobenen Parameter ein inverses Verhalten. Der Anstieg der Burstrate geht mit einer Erniedrigung der Kappawerte einher. Die Neurone feuern unter Ammoniumchlorideinwirkung häufiger, gleichzeitig jedoch weniger synchron. Hierin deutet sich vage ein möglicher Bezug zu neurologischen Defiziten in vivo an. Einerseits weisen ammoniakintoxikierte Ratten eine beeinträchtigte Lernfähigkeit auf (Monfort et al. 2009). Andererseits zeigen hippocampale neuronale Netzwerke aus Ratten auf MEAs nach der Durchführung eines Lerntrainings zu Lebzeiten der Ratten in vitro eine erhöhte Synchronizität (Li et al. 2007). Es ist Li und Zouh in ihrer Studie offenbar gelungen, die in neuronaler Plastizität begründete in-vivo-Manipulation von ZNS-Funktionen in vitro abzubilden. Daraus lässt sich freilich noch nicht ableiten, dass der umgekehrte Fall, also eine in vitro beobachtete Synchronizitätsabnahme, Rückschlüsse auf hypothetische Störungen höherer Gehirnfunktionen in vivo zulässt. Auch ist das methodische Vorgehen der Gruppe um Li und Zhou mit dem hier gewählten Vorgehen nicht ohne weiteres vergleichbar. Doch legen die Ergebnisse von Li und Zouh zumindest nahe, dass die Veränderung der Synchronizität eine funktionelle Ebene repräsentiert. Im Hinblick auf pharmakologische Tests wären also Substanzen besonders interessant, mithilfe derer es gelänge, den Synchronizitätsverlust unter Ammoniumchlorideinwirkung zu kompensieren.

Der erste Kandidat, der allein und in Kombination mit Ammoniumchlorid getestet wurde, um Möglichkeiten der Modifikation ammoniakinduzierter Veränderungen auszuloten, ist der Glutaminsynthetaseinhibitor MSO (1.4.3). MSO allein bewirkt einen Anstieg der Burstrate bei gleichzeitiger Erniedrigung des Kappas. Zwar handelt es sich dabei um statistisch nicht-signifikante Veränderungen, doch ist diese Beobachtung dahingehend interessant, als dass die Wirkung des MSO tendenziell der Wirkung des Ammoniumchlorids entspricht. In einer Untersuchung an Katzen (Raabe und Onstad 1982) hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass MSO in vivo dieselben elektrophysiologischen Veränderungen hervorzurufen vermag wie Ammoniumacetat. Zwar unterscheidet sich das Modell Raabes und Onstads erheblich von der hier vorgestellten Vorgehensweise, jedoch könnte die zugrunde liegende Ursache der Beobachtung, dass MSO die Wirkung von Ammoniumsalzen imitiert, dieselbe sein. Raabe und Onstad äußerten die Vermutung, dass die Ursache der Veränderungen unter MSO-Einwirkung eine endogene Ammoniakvergiftung durch die Inhibition der Glutaminsynthetase sei. Bei der Kombination von MSO und Ammoniumchlorid würde man unter Annahme dieser

Hypothese erwarten, dass sich auf einen endogenen Ammoniaküberschuss exogenes Ammoniak aufhäuft und MSO den Effekt des Ammoniumchlorids verstärkt.

Dieser Fall tritt nicht ein. Zwar ist die Synchronizität bei der Kombination von MSO und Ammoniumchlorid stark erniedrigt, der für die Burstrate entsprechend erwartete Anstieg bleibt jedoch aus. Die Burstrate tendiert stattdessen zu Werten unterhalb der Basisaktivität. Während also in den experimentellen Gruppen, die jeweils einer der beiden Substanzen ausgesetzt worden sind, der Synchronizitätsverlust mit einer erhöhten Burstrate einhergeht, ist bei Kombination beider Substanzen ein Synchronizitätsverlust nicht mit erhöhten, sondern mit erniedrigten Burstraten assoziiert. Der Grund für diese Diskrepanz ist unbekannt. Hochkonzentrierte Anwendung von NMDA-Rezeptoragonisten führt auf MEAs zu einer Suppression der Burstrate (Martinoia et al. 2005). Man kann spekulieren, dass es durch Addition des endogenen und des exogenen Ammoniaks zu einer so exzessiven NMDA-Rezeptoraktivierung (1.6) kommt, dass die Burstrate abnimmt. Entscheidend ist, dass mit MSO kein Schutz vor den Ammoniakwirkungen gelingt.

Die zweite potentiell protektive Substanz, die in der vorliegenden Arbeit getestet wird, ist der NMDA-Rezeptorantagonist AP-5. AP-5 senkt als kompetitiver Antagonist eines exzitatorischen Neurotransmitters am NMDA-Rezeptor erwartungsgemäß kurz nach seiner Applikation die Burstrate, die sich jedoch bei der 24-h-Messung wieder auf dem Ausgangsniveau zeigt. Nach dem beschriebenen hierarchischen Vorgehen bei der Bewertung der statistischen Signifikanz kann dieser frühe Einbruch der Burstrate unter AP-5-Einwirkung nicht als signifikant bezeichnet werden, da die 24-h-Messung prioritär betrachtet wird. Allerdings kommt es unter AP-5-Einwirkung nach 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Kappawerte. Prinzipiell passt dies zu der Beobachtung, dass NMDA als NMDA-Rezeptoragonist die Synchronizität neuronaler Netzwerke reduzieren kann (Illes et al. 2007). Die NMDA-Rezeptoraktivität hat offenbar eine Bedeutung für die Synchronisierung der Netzwerke. Bemerkenswert ist jedoch die Latenz zwischen der Suppression der Burstrate und dem Anstieg des Kappas. Es gilt zwar, dass der große Abstand zwischen den letzten beiden Messungen keine genaue zeitliche Einordnung dieser Veränderungen erlaubt, doch eine zeitliche Diskrepanz zwischen beiden Ereignissen ist sicher. Der Grund dafür mag eine Modifikation komplexer Signalkaskaden über die kurzzeitige Verringerung der NMDA-Rezeptoraktivität hinaus sein. Da insgesamt die Veränderungen unter AP-5-Einwirkung denjenigen unter Ammoniumchlorideinwirkung

entgegengesetzt sind, könnten NMDA-Rezeptorantagonisten eine Möglichkeit zur Kompensation der Ammoniaktoxizität sein.

In Hinblick auf die Gruppe, die simultan AP-5 und Ammoniumchlorid erhalten hat, lässt sich folgendes feststellen: Obwohl AP-5 allein keinen Einfluss mehr auf die Burstrate nach 24 h hat, vermag es den Anstieg der Burstrate unter Ammoniumchlorideinwirkung zu diesem Zeitpunkt zu unterdrücken. Bei Betrachtung der Kappawerte zeigt sich außerdem, dass AP-5 im Gegensatz zu MSO im Stande ist, die durch Ammoniumchlorid induzierten Veränderungen der Synchronizität nach 24 h zu verhindern. Zwar drückt AP-5 als kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist nur kurzfristig auf die Burstrate, doch zeigt sich auch nach 24 h noch die Wirkung des AP-5 im Sinne einer Protektion vor den Wirkungen des Ammoniumchlorids. Offenbar gelingt es, durch NMDA-Rezeptorantagonisten früh in die Signalkaskade einzugreifen, die schließlich zu den veränderten Aktivitätsmustern unter Ammoniumchlorideinwirkung führt.

5 Schlussfolgerungen

In ihrer Gesamtheit deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Beeinflussung der Aktivität primärer neuronaler Netzwerke auf MEAs mit Ammoniumchlorid ein nützliches Modell der Ammoniakneurotoxizität darstellt. Die Verwendung von Co-Kulturen auf MEAs ermöglicht die Abbildung der hepatischen Enzephalopathie als primäre Astrogliopathie mit sekundären neuronalen Funktionsstörungen *in vitro*. Die neuronalen Netzwerke reagieren sensibel auf eine pharmakologische Manipulation, indem sie sie auf einer funktionellen Ebene beantworten. Auch für die Bearbeitung anderer metabolischer und toxikologischer Fragestellungen könnte die Arbeit mit MEAs daher eine Bereicherung sein.

Hinsichtlich der Pathogenese der Ammoniakvergiftung und der Bewertung möglicher pharmakologischer Ansatzpunkte legen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung folgendes nahe:

1. Übermäßige astrozytäre Glutaminproduktion gibt nicht den Ausschlag für die ammoniakbedingten Veränderungen der Aktivitätsmuster neuronaler Netzwerke.
2. Antagonismus am NMDA-Rezeptor kann funktionellen Veränderungen neuronaler Netzwerke unter Ammoniakbelastung vorbeugen.

Hier bestätigt sich also, dass der NMDA-Rezeptor ein vielversprechender möglicher Ansatzpunkt für die pharmakologische Intervention im Leberversagen zur Vorbeugung neurologischer Komplikationen ist. Substanzen mit antagonistischer Wirkung am NMDA-Rezeptor, die sich bereits in klinischer Anwendung befinden, sind das antivirale Medikament Amantadin und das Antidementivum Memantin. Diese Medikamente sind damit besonders interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen.

Alles in allem können die in Abschnitt 2 formulierten Hypothesen als bestätigt angesehen werden.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Albrecht, J.; Zielińska, M.; Norenberg, M. D. (2010): Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. In: *Biochem. Pharmacol* 80 (9), S. 1303–1308.

Binstock, L.; Lecar, H. (1969): Ammonium ion currents in the squid giant axon. In: *J. Gen. Physiol* 53 (3), S. 342–361.

Brusilow, S. W.; Koehler, R. C.; Traystman, R. J.; Cooper, A. J. L. (2010): Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. In: *Neurotherapeutics* 7 (4), S. 452–470.

Butterworth, R. F. (2002): Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. In: *Metab Brain Dis* 17 (4), S. 221–227.

Butterworth, R. F. (2003): Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices. In: *Liver Int* 23 Suppl 3, S. 5–9.

Butterworth, R. F.; Norenberg, M. D.; Felipo, V.; Ferenci, P.; Albrecht, J.; Blei, A. T. (2009): Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. In: *Liver Int* 29 (6), S. 783–788.

Clemmesen, J. O.; Larsen, F. S.; Kondrup, J.; Hansen, B. A.; Ott, P. (1999): Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. In: *Hepatology* 29 (3), S. 648–653.

Conger, A. J. (1980): Integration and Generalization of Kappas for Multiple Raters. In: *Psychological Bulletin* 88 (2), S. 322–328.

Cooper, A. J. L.; Plum, F. (1987): Biochemistry and physiology of brain ammonia. In: *Physiol. Rev* 67 (2), S. 440–519.

Fleiss, J. L. (1981): *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2. Aufl. New York u.a.: John Wiley & Sons.

Görg, B.; Qvartskhava, N.; Keitel, V.; Bidmon, H. J.; Selbach, O.; Schliess, F.; Häussinger, D. (2008): Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. In: *Hepatology* 48 (2), S. 567–579.

Häussinger, D.; Schliess, F. (2008): Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. In: *Gut* 57 (8), S. 1156–1165.

- Häussinger, D.; Laubenberger, J.; Vom Dahl, S.; Ernst, T.; Bayer, S.; Langer, M. et al. (1994): Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. In: *Gastroenterology* 107 (5), S. 1475–1480.
- Hermenegildo, C.; Monfort, P.; Felipo, V. (1999): Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: Characterization by in vivo brain microdialysis. In: *Hepatology* 31(3), S. 709-715.
- Hermenegildo, C.; Marcaida, G.; Montoliu, C.; Grisolia, S.; Miñana, M.-D.; Felipo, V. (1996): NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. In: *Neurochem. Res* 21 (10), S. 1237–1244.
- Illes, S.; Fleischer, W.; Siebler, M.; Hartung, H.-P.; Dihné, M. (2007): Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity. In: *Exp. Neurol* 207 (1), S. 171–176.
- Jayakumar, A. R.; Panickar, K. S.; Murthy, Ch. R. K.; Norenberg, M. D. (2006a): Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. In: *J. Neurosci* 26 (18), S. 4774–4784.
- Jayakumar, A. R.; Rama Rao, K. V.; Murthy, Ch. R. K.; Norenberg, M. D. (2006b): Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. In: *Neurochem. Int* 48 (6-7), S. 623–628.
- Kanamori, K.; Ross, B. D. (1995): In vivo activity of glutaminase in the brain of hyperammonaemic rats measured by ¹⁵N nuclear magnetic resonance. In: *Biochem. J* 305 (Pt 1), S. 329–336.
- Kanamori, K.; Ross, B. D.; Chung, J. C.; Kuo, E. L. (1996): Severity of hyperammonemic encephalopathy correlates with brain ammonia level and saturation of glutamine synthetase in vivo. In: *J. Neurochem* 67 (4), S. 1584–1594.
- Kato, M.; Hughes, R. D.; Keays, R. T.; Williams, R. (1992): Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. In: *Hepatology* 15 (6), S. 1060–1066.
- Kosenko, E.; Llansola, M.; Montoliu, C.; Monfort, P.; Rodrigo, R.; Hernandez-Viadel, M. et al. (2003): Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. In: *Neurochem. Int* 43 (4-5), S. 493–499.

- Kvamme, E.; Nissen-Meyer, L. S. H.; Roberg, B. A.; Torgner, I. Aa. (2008): Novel form of phosphate activated glutaminase in cultured astrocytes and human neuroblastoma cells, PAG in brain pathology and localization in the mitochondria. In: *Neurochem. Res* 33 (7), S. 1341–1345.
- Li, Y.; Zhou, W.; Li, X.; Zeng, S.; Liu, M.; Luo, Q. (2007): Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays. In: *Biosensors and Bioelectronics* 22, S. 2976–2982.
- Llansola, M.; Rodrigo, R.; Monfort, P.; Montoliu, C.; Kosenko, E.; Cauli, O. et al. (2007): NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. In: *Metab Brain Dis* 22 (3-4), S. 321–335.
- Loock, J.; Stange, J.; Mitzner, S.; Schmidt, R.; Gramowski, A.; Schiffmann, D. et al. (2001): Influence of albumin dialysis (MARS) on neuronal network activity in vitro--early results. In: *Z Gastroenterol* 39 Suppl 2, S. 28–32.
- Martinez-Hernandez, A.; Bell, K. P.; Norenberg, M. D. (1977): Glutamine synthetase: glial localization in brain. In: *Science* 195 (4284), S. 1356–1358.
- Martinoia, S.; Bonzano, L.; Chiappalone, M.; Tedesco, M.; Marcoli, M.; Maura, G. (2005): In vitro cortical neuronal networks as a new high sensitive system for biosensing applications. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20, S. 2071–2078.
- Monfort, P.; Cauli, O.; Montoliu, C.; Rodrigo, R.; Llansola, M.; Piedrafita, B. et al. (2009): Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. In: *Neurochem. Int* 55 (1-3), S. 106–112.
- Norenberg, M. D. (1986): The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. In: *Neurochem Pathol* 6 (1-2), S. 13–33.
- Norenberg, M. D.; Martinez-Hernandez, A. (1979): Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. In: *Brain Res* 161 (2), S. 303–310.
- Norenberg, M. D.; Jayakumar, A. R.; Rama Rao, K. V.; Panickar, K. S. (2007): New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. In: *Metab Brain Dis* 22 (3-4), S. 219–234.
- Pathikonda, M.; Munoz, S. J. (2010): Acute liver failure. In: *Ann Hepatol* 9 (1), S. 7–14.

- Raabe, W. (1990): Effects of NH₄⁺ on the function of the CNS. In: *Adv. Exp. Med. Biol* 272, S. 99–120.
- Raabe, W. A.; Onstad, G. R. (1982): Ammonia and methionine sulfoximine intoxication. In: *Brain Res* 242 (2), S. 291–298.
- Rama Rao, K. V.; Panickar, K. S.; Jayakumar, A. R.; Norenberg, M. D. (2005): Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. In: *Neurochem. Res* 30 (10), S. 1311–1318.
- Rose, Christopher (2006): Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. In: *Journal of Neurochemistry* 97 Suppl. 1, S. 11–15.
- Schliess, F.; Foster, N.; Görg, B.; Reinehr, R.; Häussinger, D. (2004): Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. In: *Glia* 47 (1), S. 21–29.
- Schliess, F.; Görg, B.; Fischer, R.; Desjardins, P.; Bidmon, H. J.; Herrmann, A. et al. (2002): Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. In: *FASEB J* 16 (7), S. 739–741.
- Sugimoto, H.; Koehler, R. C.; Wilson, D. A.; Brusilow, S. W.; Traystman, R. J. (1997): Methionine sulfoximine, a glutamine synthetase inhibitor, attenuates increased extracellular potassium activity during acute hyperammonemia. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab* 17 (1), S. 44–49.
- Szerb, J. C.; Butterworth, R. F. (1992): Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. In: *Prog. Neurobiol* 39 (2), S. 135–153.
- Tanigami, H.; Rebel, A.; Martin, L. J.; Chen, T-Y; Brusilow, S. W.; Traystman, R. J.; Koehler, R. C. (2005): Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. In: *Neuroscience* 131 (2), S. 437–449.
- Zwingmann, C.; Leibfritz, D. (2005): Ammonia toxicity under hyponatremic conditions in astrocytes: de novo synthesis of amino acids for the osmoregulatory response. In: *Neurochem. Int* 47 (1-2), S. 39–50.

7 Anhang

7.1 Herleitung von Kappa

Um die Synchronizität des Feuerns quantifizieren zu können (siehe auch Illes et al. 2007), wurden die Spikes jedes Kanals in „Einheiten“ (Bins) von 10 ms gesammelt. Die Messwerte dieser Bins wurden danach dichotomisiert, ob entweder keine Spikes auftraten (Zuweisung des Messwertes 0) oder mindestens ein Spike gezählt wurde (Zuweisung des Messwertes 1).

Elektrode (Kanal) 1	Elektrode (Kanal) 2		
	Aktivität		
	0	1	Summe
Aktivität	Anzahl Bins		
0	A	b	$a + b = n - s_1$
1	C	d	$c + d = s_1$
Summe	$a + c = n - s_2$	$b + d = s_2$	$a + b + c + d = n$

Tabelle 2: Vierfelderschema zur Herleitung von Cohens Kappa.

Für die Elektrode 1 (2) mit s_1 (s_2) Spikes enthaltenden Bins, \ddot{u}_{12} übereinstimmenden Bins ($\ddot{u}_{12} = a + d$) und einer Summe von n Bins konnte bei voneinander unabhängig auftretenden Spikes folgendes Verhältnis übereinstimmender Bins erwartet werden:

$$p_{erwartet} = \frac{(n-s_1) \cdot (n-s_2) + s_1 \cdot s_2}{n^2}. \quad (3)$$

Für die tatsächlich angetroffene Übereinstimmung galt entsprechend:

$$p_{beobachtet} = \frac{\ddot{u}_{12}}{n}. \quad (4)$$

Anschließend wurde der Übereinstimmungskoeffizient Cohens Kappa (κ , Fleiss 1981, S. 212 ff.) für alle kombinatorisch möglichen Paare aktiver Elektroden (Elektroden, die jeweils mindestens einen Spike gemessen haben) bestimmt:

$$\kappa = \frac{p_{\text{beobachtet}} - p_{\text{erwartet}}}{1 - p_{\text{erwartet}}} . \quad (5)$$

Der Wert des Kappas kann zwischen -1 und 1 liegen, wobei Kappa bei völliger Konkordanz 1, bei zufälliger Übereinstimmung 0 und bei gegenteiligen Messungen und spalten- bzw. zeilenmäßig gleich großen Häufigkeiten -1 beträgt. Um ein Maß der Gesamtsynchronizität unter Einbeziehung nicht nur zweier, sondern aller Kanäle zu erhalten, wurde aus den Kappas aller aktiven Elektrodenpaare (s.o.) das arithmetische Mittel gebildet.

7.2 Wiederholte Belastung neuronaler Netzwerke mit Ammoniumchlorid

Um die Folgen einer wiederholten Belastung neuronaler Netzwerke mit Ammoniumchlorid zu untersuchen, wurden in einem zusätzlichen Experiment (n=5) neuronale Netzwerke mit 5 mmol/l Ammoniumchlorid behandelt, um nach 24 h dieselbe Menge Ammoniumchlorid ohne zwischengeschalteten Mediumwechsel noch einmal hinzuzufügen. Die Abfolge der Messungen war dabei dieselbe wie oben beschrieben, wurde jedoch zweimal hintereinander durchgeführt.

Diese wiederholt belastete Gruppe zeigte nach der zweiten Ammoniumchlorid-Gabe einen ähnlichen Verlauf der Burstrate wie nach der ersten: 2 min nach der zweiten Ammoniumchlorid-Gabe kam es zu einem Anstieg der Burstrate, darauf folgte ein Absinken und nach 24 h erneut ein Ansteigen der Burstrate (Abb. 2). Darüber hinaus kam es zu einer Akzentuierung des Synchronizitätsverlusts (Abb. 3). Die beschriebenen Veränderungen sind, wahrscheinlich wegen der noch geringen Stichprobengröße, nicht statistisch signifikant.

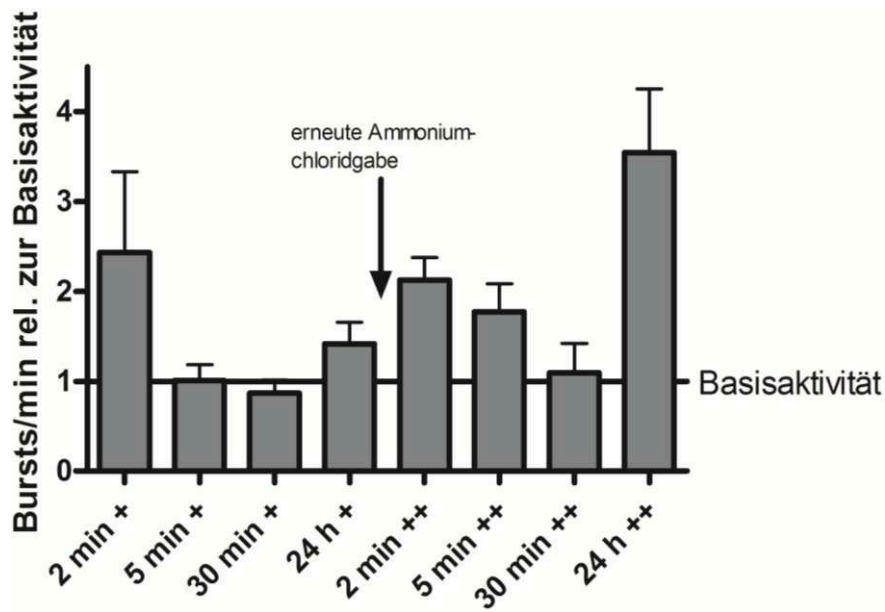


Abb. 2: Bursts/min bei repetitiver Ammoniumchloridbelastung. rel. heißt relativ, min heißt Minuten, h heißt Stunden.

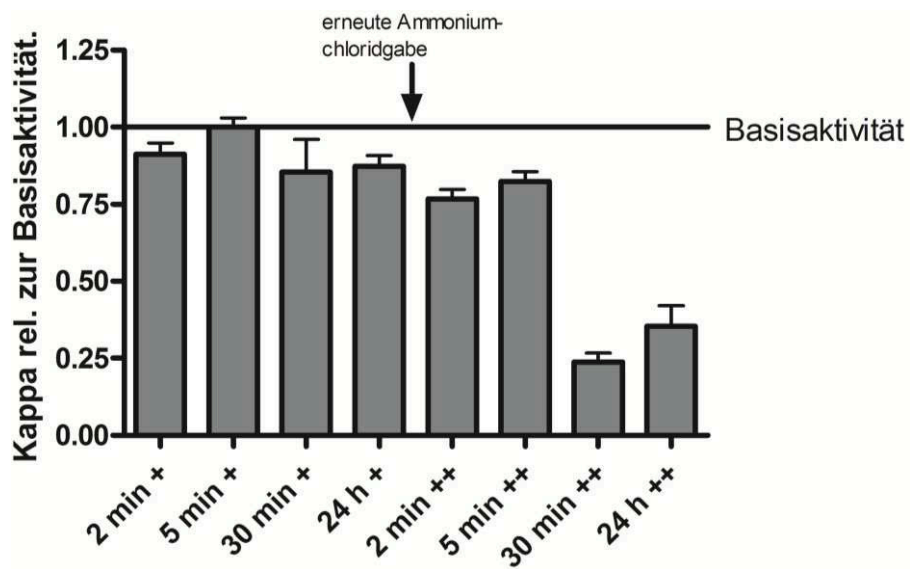


Abb. 3: Kappa bei repetitiver Ammoniumchloridbelastung. rel. heißt relativ, min heißt Minuten, h heißt Stunden.

Danksagung

Prof. Dr. Marcel Dihné danke ich herzlich für die exzellente Betreuung meiner Arbeit.

Dr. Stefano Ferrea, Kim Quasthoff, Dr. Janine Walter, Dr. Boris Görg, Prof. Dr. Dieter Häussinger, Prof. Dr. Alfons Schnitzler und Prof. Dr. Hans-Peter Hartung danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der gemeinsamen Veröffentlichung.

Dr. Sebastian Illes, Dr. Wiebke Fleischer, Manuel Hertel und Felix Beyer danke ich für die Hilfe im Labor. Stephan Theiss möchte ich für die Diskussion der Ergebnisse danken.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Clara-Sophie Schwarz