

Anemari Horvat¹, Nina Vardjan²

Možganski edem: astrociti v patofiziologiji celičnega edema

Brain Edema: Astrocytes in the Pathophysiology of Cellular Edema

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: možganski edem, ionska homeostaza, astrociti, celični edem, akvaporin 4, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransporter tipa 1, adrenergični receptorji

Možganski edem se pojavi pri različnih patologijah možganov (npr. možganske poškodbe, ishemije, okužbe) in lahko privede do hudih okvar možganov, tudi smrti. Zanj je značilno prekomerno kopičenje vode v znotrajceličnem in zunajceličnem prostoru, ki je posledica porušene ionske homeostaze, predvsem ionov Na^+ . Ta ustvarja osmotski gradient, ki v prvi stopnji edema usmerja tok vode iz zunajceličnega prostora v celice, kar povzroča nabrekanje celic (celični ali citotoksični edem). V kasnejših stopnjah edema pa osmotski gradient usmerja tok vode tudi iz žilja v zunajcelični prostor, kar vodi do nabrekanja možganskega tkiva (ionski, vazogeni in hemoragični edem). Homeostazo ionov in vode v možganih uravnavajo astrociti, ki so morfološko in funkcionalno izredno heterogene celice nevroglije. Zaradi visoke prepustnosti membrane za vodo, ki je posledica izražanja vodnih kanalov akvaporinov tipa 4, so astrociti prve celice v možganih, ki se ob porušeni ionski homeostazi odzovejo s privzemom vode, kar vodi v nabrekanje celic (celični edem). Celični edem nastane le nekaj minut po poškodbi možganov. V preglednem članku bomo predstavili vzroke za nastanek in značilnosti različnih stopenj možganskega edema s poudarkom na celičnem edemu. Doslej so bili v astrocitih prepoznani številni molekularni mehanizmi in beljakovine, ki so vpleteni v nastanek celičnega edema, med drugim od ATP odvisna Na^+/K^+ -ATPaza, akvaporin tipa 4 in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransporter tipa 1, vendar pa učinkovitih tarčnih terapij za zdravljenje celičnega edema ni. Zaradi svoje vloge pri nastanku celičnega edema astrociti predstavljajo pomembno tarčo za razvoj postopkov in zdravil, ki bi preprečili ali omilili nastanek celičnega edema in s tem ostalih stopenj možganskega edema ter z njimi povezanih zapletov.

¹ Dr. Anemari Horvat, mag. funkc. biol., Laboratorij za nevroendokrinologijo – molekularna celična fiziologija (LN-MCP), Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; Laboratorij za celično inženirstvo, Celica biomedicinski center, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana

² Izr. prof. dr. Nina Vardjan, univ. dipl. mikr., Laboratorij za nevroendokrinologijo – molekularna celična fiziologija (LN-MCP), Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; Laboratorij za celično inženirstvo, Celica biomedicinski center, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana; nina.vardjan@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: brain edema, ion homeostasis, astrocytes, cellular edema, aquaporin 4, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 1, adrenergic receptors

Brain edema occurs in various brain pathologies (e.g., brain injuries, ischemia, infections) and can lead to severe brain damage, and also death. It is characterized by an excessive accumulation of water in the intracellular and extracellular space due to disturbed ionic homeostasis, primarily of the Na^+ ions. This creates an osmotic gradient driving the water flow from the extracellular space into the cells in the first stage of edema (cell swelling/cellular (cytotoxic) edema), and from the vasculature into the extracellular space in the later stages, when brain tissue swelling occurs (ionic, vasogenic and hemorrhagic edema). Brain ion and water homeostasis is regulated by astrocytes, morphologically and functionally heterogeneous neuroglial cells. Because of high membrane water permeability and due to the expression of aquaporin 4 water channels, astrocytes are the first brain cells that respond to disturbed ion homeostasis by water accumulation, leading to cell swelling (cellular edema). Cellular edema occurs only minutes after brain injury. In this review, we will discuss the triggers and the characteristics of different stages of brain edema, with a focus on cellular edema. So far, many molecular mechanisms and proteins involved in cellular edema formation have been identified in astrocytes, including the ATP-dependent Na^+/K^+ -ATPase, aquaporin 4, and the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 1, however, there are no effective target therapies for the treatment of cellular edema. Astrocytes, with their pivotal role in the cellular edema formation, represent an important therapeutic target to prevent or mitigate the cellular edema and thus other stages of brain edema and related complications.

UVOD

Možganski edem je izjemno resno in potencialno smrtonosno stanje, ki lahko prizadene vse starostne in etnične skupine ljudi (1, 2). Do t. i. odkritja možganskega edema je prišlo že v poznem 17. stoletju, kljub temu pa patofiziologija in natančni molekularni mehanizmi, ki vodijo v nastanek edema, še dandanes niso popolnoma znani (3). Po definiciji je možganski edem nabrekanje oz. otekanje možganov zaradi prekomernega kopičenja vode v znotrajceličnem in zunajceličnem prostoru, kar vodi v patološke spremembe v možganih in življenjsko nevarne zaplete (3, 4). Klinični znaki, ki kažejo na prisotnost možganskega edema, se lahko precej razlikujejo glede na lokacijo in obseg edema in vključujejo šibkost, motnje vida, epileptične napade, glavobol, slabost in bruhanje, spremenjeno duševno stanje, komo in/ali druge nevrološke motnje (1).

Na molekularni ravni je vdor vode v možgansko tkivo in nabrekanje možganov posledica porušene ionske homeostaze, ki jo povzročijo motnje v prenosu ionov prek celičnih membran in pojav osmotskega gradienta, ki usmerja tok vode v celice in medceličnino (3). V možganih za homeostazo ionov in vode skrbijo celice nevroglije, ki v nekaterih delih človeških možganov, kot je možganska skorja, presegajo število nevronov (5, 6). Med njimi imajo ključno vlogo astrociti, ki so številčne in hkrati izjemno heterogene celice nevroglije (7). Astrociti sodelujejo tudi pri uravnavanju mnogih drugih možganskih procesov tako v fizioloških kot tudi v patoloških razmerah (8, 9).

V preglednem članku bomo najprej obravnavali vzroke za pojav možganskega edema in opisali glavne značilnosti različnih stopenj edema. Na kratko bomo opi-

sali tudi vlogo glimfatičnega sistema med razvojem in odstranjevanjem možganskega edema (10). Nato bomo opredelili vlogo astrocitov v patofiziologiji celičnega edema ter molekularne mehanizme nastanka celičnega edema v astrocitih. Nazadnje bomo predstavili še usmeritve na področju zdravljenja možganskega edema s poudarkom na terapevtskem potencialu astrocitov v zdravljenju celičnega edema, kjer bomo omenili nekaj molekularnih tarč v astrocitih, ki imajo potencial na področju specifičnega zdravljenja možganskega edema v prihodnosti.

ETIOLOGIJA MOŽGANSKEGA EDEMA

Razsežnost in potek možganskega edema sta odvisna od vzroka za njegov nastanek (1, 2). Možganski edem povzročijo številne nevrološke kot tudi nenevrološke spremembe. Med nevrološke povzročitelje možganskega edema sodijo akutne poškodbe možganov ter različna bolezenska stanja, kot so možganski tumorji, ishemična kap, hemoragična kap, vnetja (meningitis, encefalitis) in okužbe z virusi in bakterijami (1, 2). Med nenevrološke povzročitelje pa prištevamo akutno povišan krvni tlak (hipertenzijo), odpoved jeter, zastrupitev z ogljikovim monoksidom in izpostavitve visokim nadmorskim višinam. Bolezenska stanja z možganskim edemom se zaradi nastanka edema pogosto prevesijo v smer višje umrljivosti (3). Prognoza bolnikov z možganskim edemom je odvisna od hitrosti postavitve diagnoze, razpoložljivih terapij in stopnje ter obsega edema. Ta je lahko omejen le na manjši del možganov ali pa zaobjema večji del možganov, kar pomeni večje tveganje za resne zaplete in smrt (11, 12).

PATOFIZIOLOGIJA MOŽGANSKEGA EDEMA

Mehanizmi nastanka možganskega edema so kljub številnim raziskavam na tem

področju še vedno razmeroma nepojasneni. Pri nastanku in razvoju možganskega edema je pomemben dejavnik krvno-možganska pregrada (KMP). KMP sestavljajo endotelijske celice možganskega žilja, ki so povezane s tesnimi stiki, bazalna membrana, periciti in astrociti (3), ki s svojimi specializiranimi izrastki (angl. *end-feet*) prekrivajo skoraj celotno površino žilja (13). Skupaj s preostalimi možganskimi celicami (nevroni, mikroglija) KMP tvori širšo strukturno-funkcionalno enoto v možganih, ki jo imenujemo nevrovaskularna enota. Znotraj nevrovaskularne enote med celicami poteka dvosmerna komunikacija, kar pomembno prispeva k uravnavanju krvnega pretoka v možganih, prepustnosti KMP za ione in molekule in uravnavanju ionske, vodne in presnovne homeostaze v možganih (oskrba možganskih celic s hranili) (3, 14). Pri možganskem edemu se komunikacija med celicami v nevrovaskularni enoti spremeni. Porušenje ionske in vodne homeostaze običajno vodi najprej v nabrekanje možganskih celic (celični ali citotoksični edem), nato pa tudi v nabrekanje možganskega tkiva, ki je omejeno z lobanjo. Lobanja fizično preprečuje nabrekanje možganov, zato naraste znotrajlobanjski (intrakranialni) tlak, kar lahko vodi do nepopravljivih poškodb možganov in tudi smrti (3).

Stopnje možganskega edema

V splošnem razvoj edema poteka v štirih stopnjah, ki pa se med seboj lahko tudi prekrivajo. Posamezne stopnje razvoja možganskega edema spremljajo značilne morfološke in molekularne spremembe tako na celični kot na tkivni ravni, kar bomo predstavili v nadaljevanju (3).

Celični (citotoksični) edem

Celični edem nastane le nekaj minut po poškodbi možganov (15). Prisoten je lahko v vseh celičnih tipih, še posebej izrazit pa je v astrocitih, ki imajo zaradi velike gostote

izražanja vodnega kanala akvaporina 4 (angl. *aquaporin 4*, AQP4) v primerjavi z nevroni tudi do štirikrat višjo prepustnost za vodo (16). Nastanek celičnega edema je v veliki meri posledica motenj v celični presnovi (pomanjkanje ATP), kar poruši homeostazo ionov in vode (17). Zaradi pomanjkanja ATP in okvare od ATP odvisne Na^+/K^+ -ATPaze osmotski gradient Na^+ prek plazemske membrane in razlika v transmembranskem potencialu usmerjata pretok ionov (Na^+ in Cl^-) in vode iz zunajceličnega prostora v notranjost celic, zaradi česar celice nabreknejo. Čeprav v teoriji celični edem sam po sebi ne zviša celokupnega volumna tekočine v možganskem tkivu (pride le do prerazporeditve vode znotraj možganskega tkiva) in zato nima neposrednega vpliva na nabrekanje možganov, lahko povzroči patološke spremembe v možganih (2, 3, 18). Funkcija KMP v tej fazi sicer ni okrnjena, zaradi patološkega vdora vode v notranjost celic pa se lahko sproži celična smrt astrocitov in drugih možganskih celic (19). Celični edem zaradi izčrpavanja Na^+ v zunajceličnini predstavlja močno gonilno silo za razvoj ionskega in vazogenega edema (3, 18).

Ionski edem

Izčrpavanje Na^+ v zunajceličnem možganskem prostoru med razvojem celičnega edema ustvari močan gradient Na^+ prek KMP, kar vodi v nastanek ionskega edema. Na tej stopnji Na^+ , ki je tudi glavni povzročitelj ionskega edema, v zunajcelični možganski prostor vstopa iz možganskega žilja prek endotelijskih celic, čemur sledita Cl^- in voda z namenom uravnavanja osmotskega in električnega gradienta (20). Zaradi prekomernega vdora vode iz žil v možgansko tkivo je, za razliko od celičnega edema, ionski edem neposredni povzročitelj nabrekanja možganov (3, 18). Tako kot pri celičnem edemu pa je tudi pri ionskem edemu funkcija KMP še vedno ohranjena (3).

Vazogeni edem

Vazogeni edem se navadno razvije nekaj (tri ali več) ur po možganski poškodbi (17). Ena izmed glavnih značilnosti te stopnje edema je tvorba prepustnih por med celicami endotelija možganskega žilja in posledično okvara funkcije KMP. Zaradi tega v zunajcelični možganski prostor poleg vode in ionov lahko vdrejo tudi plazemske beljakovine (npr. albumin in imunoglobulini (Ig G), ne pa tudi rdeče krvničke, saj je struktura možganskih kapilar še vedno ohranjena. V nasprotju s celičnim in ionskim edemom je glavni povzročitelj in gonilna sila za razvoj vazogenega edema hidrostatski tlak (skupaj z gradientom Na^+) ter v manjši meri osmotski gradient, ki ga ustvarjajo beljakovine (2, 3, 17). Plazemske beljakovine namreč lahko hitro po vstopu v zunajcelični možganski prostor privzamejo astrociti in mikroglija ter jih po lizosomski poti razgradijo (17). Gradient hidrostatskega tlaka je med drugim odvisen od znotrajlobanjskega tlaka in sistemskega krvnega tlaka (3).

Poleg omenjenih mehanizmov, ki pogostejajo razvoj vazogenega edema, pa imajo pomembno vlogo zelo verjetno tudi vnetni procesi. Pokazano je bilo, da vnetni procesi lahko močno pospešijo nastanek edema prek številnih mehanizmov, npr. povečajo krvni pretok, vplivajo na delovanje KMP in povzročijo tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. *reactive oxygen species*, ROS) (17). Znano je tudi, da se astrociti in mikroglija na različne akutne možganske poškodbe odzovejo s tvorbo proinflammatoryh citokinov, kot so interleukin (IL) 1β , dejavnik tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α) in interferon (IF) γ (17).

Hemoragični edem

Zadnja stopnja v razvoju možganskega edema se imenuje hemoragični edem, za katerega je značilen pojav možganskih krvavitev. Funkcionalnost KMP se na tej stopnji popolnoma poruši, kar povzroči vdor

vseh komponent krvi, vključno z rdečimi krvničkami in drugimi celicami, v možgansko tkivo (3, 17). Tako kot pri vazogenem edemu je tudi med razvojem hemoragičnega edema glavna gonilna sila hidrostatski tlak. Poleg zgoraj naštetih mehanizmov in značilnosti vazogenega edema je za razvoj hemoragičnega edema značilno še odmiranje endotelijskih celic žilja (3).

Vloga glimfatičnega sistema pri možganskem edemu

Za razvoj možganskega edema je potreben zunanji (sistemski) vir vode. Le-ta prodira v možgansko tkivo iz dveh večjih virov, in sicer krvnega obtoka ter cerebrospinalne tekočine (3, 17). Predvideva se, da ima pri prenosu vode skozi osrednje živčevje (OŽ) pomembno vlogo t. i. glimfatični sistem, ki ima v OŽ podobne funkcije kot limfni sistem na periferiji (21). Glimfatični sistem tvorijo:

- cerebrospinalna in intersticijska tekočina,
- perivaskularni ali Virchow-Robinovi prostori ob možganskih arterijah in arteriolah ter venah in venulah,
- astrociti, ki prek vodnih kanalov AQP4 na membrani svojih specializiranih izrastkov, ki mejijo na žilje, pospešujejo izmenjavo cerebrospinalne in intersticijske tekočine, in
- limfne žile v možganskih ovojnicah, po katerih voda zapuša OŽ (10, 22).

Glimfatični sistem s transportom vode omogoča odstranjevanje odpadnih snovi, kot so nepravilno zvite beljakovine (β -amiloid, beljakovina tau), stranski produkti celične presnove, odvečni živčni prenašalci in druge molekule ter imunske celice (10, 17, 23, 24).

Razumevanje mehanizmov odstranjevanja možganskega edema je še vedno pomanjkljivo. Znano je, da absorpcija edema ob uspešnem zdravljenju lahko traja tudi nekaj tednov (17). Proces zelo verjetno poteka s pomočjo glimfatičnega sistema, ki odvečno vodo z odpadnimi snovmi usmer-

ja prek perivaskularnih prostorov proti limfnim žilam, ki vodijo iz OŽ (21, 23).

ASTROCITI IN CELIČNI EDEM

Nevroni so bili zaradi svoje električne vzdražnosti in zmožnosti hitrega prenosa informacij dolgo časa v središču raziskav, usmerjenih v razumevanje delovanja OŽ. V zadnjih treh desetletjih pa v ospredje raziskav prihajajo celice nevroglije, med katere v grobem uvrščamo astrocite, oligodendrocite in mikroglijo. Oligodendrociti s svojimi izrastki ovijajo aksone in tvorijo mielinske ovojnice in s tem omogočajo hiter prenos informacij v OŽ. Mikroglija so imunske celice, podobne perifernim makrofagom, in sodelujejo pri vnetnem odzivu v OŽ, astrociti pa so številčne ter morfološko in funkcionalno izredno heterogene celice nevroglije, ki skrbijo za homeostazo OŽ (8, 25). Astrociti se zelo dobro prilagajajo spremembam v okolju, kar imenujemo plastičnost, o čemer bomo govorili v tem poglavju (7).

Vloga astrocitov v osrednjem živčevju

Sprva je veljalo prepričanje, da imajo astrociti v OŽ le pasivno, podporno vlogo nevromu, a danes vemo, da so aktivno vpleteni v uravnavanje številnih možganskih procesov v fizioloških in patoloških razmerah (8, 26). Poleg tega, da astrociti vzdržujejo homeostazo ionov (med drugim Na^+ in K^+) in vode v možganih, so tudi pomemben gradnik KMP. Astrociti zagotavljajo tudi presovno podporo energijsko potratnim nevronom in vzdržujejo presovno homeostazo, uravnavajo pretok krvi skozi možgane in cikel spanja in budnosti (9). Odgovorni so za odstranjevanje odvečnih signalov iz zunajceličnega prostora, izločajo pa tudi lastne signalne molekule, t. i. glijotransmiterje (npr. ATP, glutamat, D-serin in atrijski natriuretični peptid), prek katerih lahko aktivno vplivajo na sinaptični prenos informacij in tako na procese signalizacije

v OŽ (9). Na ta način astrociti sodelujejo pri uravnavanju višjih kognitivnih funkcij, kot sta učenje in tvorba spomina (27).

Morfološka plastičnost astrocitov

Nabrekanje astrocitov

Astrociti imajo sposobnost, da svojo prostornino in obliko neprestano (tudi v odsotnosti patoloških stanj) prilagajajo razmeram v okolju, kar imenujemo morfološka plastičnost (28). Ko se zaradi pomanjkanja energije v možganih poruši ionska homeostaza (osmotski stres), kar se sprva kaže kot kopičenje Na^+ v možganskih celicah, so astrociti zaradi svoje visoke prepustnosti membrane za vodo glede na ostale možganske celice prve celice v možganih, ki začnejo nabrekati, kar vodi v celični edem (29). Astrociti so vpleteni tudi v razvoj drugih stopenj možganskega edema, zato predstavljajo pomembno tarčo za razvoj postopkov in zdravljenj za zdravljenje možganskega edema (3).

Astrociti v hipotoničnih razmerah začnejo hitro nabrekati, čemur sledi uravnavano zmanjšanje volumna celic (angl. *regulatory volume decrease*), kar je povezano s spremembami v osmotskem gradientu (30). Raziskave na astrocitih *in vitro* so pokazale, da nabrekanje astrocitov zaradi hipotoničnega stresa povzroči razvijanje (angl. *unfolding*) astrocitne membrane in aktivira sproščanje glijotransmiterjev (31–34). Hipotonični stres, ki povzroči nabrekanje astrocitov, zviša znotrajcelično koncentracijo Ca^{2+} v astrocitih tako *in vitro* kot *in vivo*, najverjetneje prek aktivacije mehansko občutljivih kationskih kanalov prehodnega receptorskega potenciala, poddružina V, član 4 (angl. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*, TRPV4) ali Ca^{2+} -kanalov tipa L (30, 31, 33, 35, 36). To povzroči prehod Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora v celice. Poleg tega lahko prek od ATP odvisne avtokrine aktivacije purinergičnih recep-

torjev P2 Ca^{2+} v citosol prehaja iz znotrajceličnih zalog v endoplazemskem retikulumu (33, 37). Ali porast v znotrajcelični koncentraciji Ca^{2+} zaradi aktivacije mehansko občutljivih Ca^{2+} -kanalov v membrani astrocitov prispeva k nabrekanju astrocitov ali nabrekanje omili, še ni dobro raziskano.

Zvišana zunajcelična koncentracija K^+ (10 mM) v fizioloških razmerah prav tako sproži nabrekanje astrocitov *in vitro* (38). Pri tem se zviša znotrajcelična koncentracija cikličnega AMP (cAMP), kar poveča prevodnost vodnih kanalov AQP4, ki so v membrani astrocitov, in sproži kopičenje AQP4 v plazemski membrani (39, 40). Del tega procesa je od cAMP odvisna proteinska kinaza A (PKA), ki fosforilira AQP4 in poveča njegovo prevodnost (38). Po drugi strani pa močno (patološko) zvišana zunajcelična koncentracija K^+ (35 mM) prepreči povečanje prevodnosti AQP4 in s tem zelo verjetno tudi nabrekanje astrocitov *in vitro*. Mehanizem je najverjetneje odvisen od aktivnosti kanalov Kir (angl. *inward-rectifying potassium channel*) in porasta v znotrajcelični koncentraciji Ca^{2+} , ki prek aktivacije fosfataze kalcinevrin povzroči defosforilacijo AQP4 (38).

Nabrekanje astrocitnih izrastkov, kjer poteka večina izmenjave snovi med okoljem in astrocitom in med astrocitom in sosednjimi celicami, lahko okvari funkcijo KMP in spremeni arhitekturo zunajceličnega prostora ter medcelične povezave. Slednje lahko zmanjša difuzijo molekul v zunajceličnem prostoru, kar lahko vpliva na učinkovitost odstranjevanja presnovnih odpadkov, pa tudi na prenos in odstranjevanje presežka signalnih molekul ter s tem na signalne procese v možganih (17, 41). Tovrstne spremembe lahko povzročijo prekomerno vzdražnost nevronskih mrež, ki je za možgane toksična (t. i. ekscitotoksičnost), in prispevajo k razvoju patoloških stanj ter tako pospešijo razvoj možganskega edema.

Stelacija astrocitov

Morfologija astrocitov *in vitro* in *in situ* se lahko hitro spremeni tudi po aktivaciji receptorjev na površini astrocitov (28). V nasprotju z nevroni astrociti niso električno vzdražni, ker ne tvorijo akcijskih potencialov. Astrociti se prek številnih receptorjev odzivajo na zunajcelične signale s posebno vrsto vzdražnosti, t. i. citosolno vzdražnostjo. Ta se med drugim izrazi kot porast v znotrajcelični koncentraciji sekundarnih obveščevalcev, kot sta cAMP in Ca^{2+} (9, 42). Astrociti so pomembna tarča noradrenergičnega sistema, saj na svoji površini izražajo vse podtipse adrenergičnih receptorjev (43). Noradrenalin, ki je tudi nevro-modulator in sodeluje pri tvorbi spomina, med drugim uravnava možgansko presnovo in plastičnost (44). V OŽ se noradrenalin sprošča iz zadebelitev (t. i. varikozitet) vzdolž noradrenergičnih nevronov (zunajsinaptično sproščanje). Slednji izvirajo iz jedra *locus coeruleus* v možganskem deblu, od koder se aksoni noradrenergičnih nevronov razvejijo po celotnem OŽ in dosežejo tudi možgansko skorjo. Ob aktivaciji jedra *locus coeruleus* tako pride do globalnega sproščanja noradrenalina v možganih in aktivacije možganskih celic, tudi astrocitov. Dokazano je bilo, da noradrenalin in adrenalin sprožita v astrocitih *in vitro* prek aktivacije β -adrenergičnih receptorjev zvišanje znotrajcelične koncentracije cAMP, kar povzroči izrazite morfološke spremembe; zmanjša se površina prečnega prereza celic, medtem ko se obseg celic in število izrastkov povečata, kar imenujemo stelacija (45, 46). Stelacija astrocitov se po aktivaciji β -adrenergične/cAMP signalne poti v zgodnji fazi uravnava prek od cAMP odvisne PKA, v poznejši fazi pa vključuje tudi proteinsko kinazo p-ERK (fosforilirana z zunajceličnim signalom regulirana proteinska kinaza; angl. *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*), ki je MAP-kinaza. (47). Znano je, da tudi glutamat lahko inhibira od β -adrenergične/

cAMP signalne poti odvisno stelacijo astrocitov *in vitro* (48).

Noradrenalin in adrenalin sta bila v preteklosti prepoznana kot stresna signala, ki ščitita tkivo pred poškodbami (49). Zunajcelična koncentracija noradrenalina se v OŽ ob določenih patoloških stanjih močno poveča (50), kar bi lahko imelo zaščitno funkcijo in prek aktivacije stelacije tudi omejilo nastanek celičnega edema v astrocitih (35) (glej tudi poglavje Terapevtski potencial astrocitov v zdravljenju celičnega edema).

Mehanizmi prehajanja vode v astrocite

Voda v notranjost astrocitov lahko prehaja po treh različnih poteh (3, 9, 19):

- z difuzijo prek membran,
- prek ionskih transporterjev, kjer na en cikel skupaj z ioni v celice prehaja tudi določeno število molekul vode, in
- predvsem prek transmembranskih vodnih kanalov AQP4 in nekaterih drugih transporterjev, npr. transporterjev za glukozo (GLUT (angl. *glucose transporter*) 1 in 2 ter natrij-glukoznih kotransporterjev (angl. *sodium-glucose cotransporter 1*, SGLT1). (slika 1).

Akvaporini omogočajo pasivno dvosmerno prehajanje vode prek celičnih membran v smeri osmotskega gradienta. V OŽ je znanih 14 različnih tipov vodnih kanalov oz. akvaporinov (39). Med njimi sta najpomembnejša AQP1, ki je izražen v epiteljskih celicah v predelu horoidnega pleteža, kjer nastaja večina cerebrospinalne tekočine, in AQP4, ki je najbolj razširjen vodni kanal v možganih in je izražen predvsem v astrocitih (39). AQP4 je ključnega pomena za nastanek in odstranjevanje celičnega edema in drugih stopenj možganskega edema (33, 51). Na podlagi raziskav na fiksiranih preparatih podganjih možganov se je pokazalo, da se v fizioloških razmerah AQP4 v astrocitih izraža predvsem v membrani specializiranih izrastkov, ki tvorijo

KMP (52). Znano je, da različne poškodbe OŽ, med njimi tudi možganski edem, lahko vplivajo na razporeditev AQP4 iz znotraj-celičnih mešičkov na plazemsko membrano (od cAMP odvisna eksocitoza mešičkov z AQP4) in prerazporeditev AQP4 po celotni plazemski membrani (19, 40). To lahko dodatno poveča prepustnost membrane astrocitov za vodo in prispeva k razvoju celičnega edema.

Molekularni mehanizmi nastanka celičnega edema

Celični edem nastane že nekaj minut po možganski poškodbi. Hiter razvoj celičnega edema v astrocitih je posledica prostorske razporeditve astrocitov v OŽ, saj so astrociti v neposrednem stiku z zunanjimi viri vode, in njihove visoke prepustnosti za vodo (tudi do štirikrat višja v primerjavi z nevroni) zaradi izražanja vodnih kanalov AQP4 (16, 19).

Glavna gonilna sila za nastanek celičnega edema je porušena homeostaza Na^+ . Ta se odraža kot kopičenje Na^+ v celicah zaradi motenj v aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze, ki so posledica patoloških sprememb v OŽ. Mehanizmi nastanka celičnega edema se lahko razlikujejo glede na vzrok nastanka celičnega edema (2). V astrocitih lahko nastanek celičnega edema sprožijo različni endogeni signali (npr. K^+ , glutamat in H^+) in/ali eksogeni signali (npr. amonijak in cianid) (3, 19). Ti lahko povzročijo *de novo* izražanje beljakovin in/ali spremenijo aktivnost ter raven konstitutivno izraženih beljakovin (3, 53). V nadaljevanju bomo predstavili vlogo različnih signalov in z njimi povezanih molekularnih mehanizmov pri razvoju celičnega edema, ki vključujejo konstitutivno izražene beljakovine v astrocitih.

Zvišana koncentracija zunajceličnega K^+

Zunajcelična koncentracija K^+ se ob povečani možganski aktivnosti zviša s ~3 mM (mirovanje) na 8–15 mM, v primeru hudih patoloških sprememb pa celo na 30–80 mM (54).

Ob tem astrociti s privzemanjem K^+ aktivno odstranjujejo odvečni K^+ v zunajceličnini, kar povzroči patološko nabrekanje celic (celični edem). Astrociti zunajcelični K^+ odstranjujejo prek dveh različnih mehanizmov:

- aktivni privzem K^+ v astrocite s pomočjo črpalke Na^+/K^+ -ATPaze in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransporterja tipa 1 in
- prerazporeditev K^+ med astrociti prek presledkovnih stikov vzdolž koncentracijskega gradienta (55).

Povečano izražanje $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransporterja tipa 1 zaradi visoke koncentracije zunajceličnega K^+ ima ključno vlogo pri nastanku celičnega edema, saj ta kotransporter skupaj z ioni v celice prepušča tudi vodo (19). Porast v zunajceličnem K^+ lahko poveča prepustnost AQP4 za vodo (glej poglavje Morfološka plastičnost astrocitov), kar lahko ob določenih stanjih predstavlja dodatno pot za vstop vode v celice in tako pripomore k nastanku celičnega edema v astrocitih (slika 1) (38).

Zvišana koncentracija zunajceličnega glutamata

Poškodbe možganov povzročijo patološko zvišanje zunajcelične koncentracije glutamata (z ~10 μM na ~200 μM), ki je pomemben ekscitatorni živčni prenašalec (3). Glutamat povzroči nastanek celičnega edema prek dveh različnih mehanizmov (3, 56, 57):

- z vezavo na metabotropne glutamatne receptorje tipa 5 (mGluR5), izražene na membrani astrocitov, ki so sklopljeni z Na^+/K^+ -ATPazo in AQP4, in
- prek vstopa skozi $\text{Na}^+/\text{glutamatne}$ transporterje tipa 1 in 2 (angl. *excitatory amino acid transporter 1 and 2*, EAAT1 in 2), ki so prav tako sklopljeni z AQP4 (slika 1).

Oba mehanizma pospešita prehajanje vode v astrocite. Od glutamata odvisen nastanek celičnega edema prav tako poveča izražanje AQP4, kar dodatno prispeva k nabrekanju astrocitov (58).

Zunajcelična acidoza

Možganske poškodbe pogosto spremlja pomanjkanje kisika, kar ustvarja anaerobne razmere in poveča tvorbo laktata. Zaradi tega prihaja do zakisanja (acidoze) zunajceličnine (59). Ko pH pade pod 6,8, se v astrocitih sprožijo mehanizmi za uravnavanje ionske homeostaze, kar vodi v nastanek celičnega edema *in vitro* (60). V ta proces sta vpletena dva transporterja: Na^+/H^+ -izmenjevalec in elektrogeni $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -kotransporter (slika 1) (3, 19). Ionski gradient Na^+ , ki pri tem nastane, usmerja tok vode v celice, pri čemer je zelo verjetno udeležen tudi AQP4, saj laktat v astrocitih *in vitro* lahko poveča raven izražanja AQP4 na plazemski membrani (61).

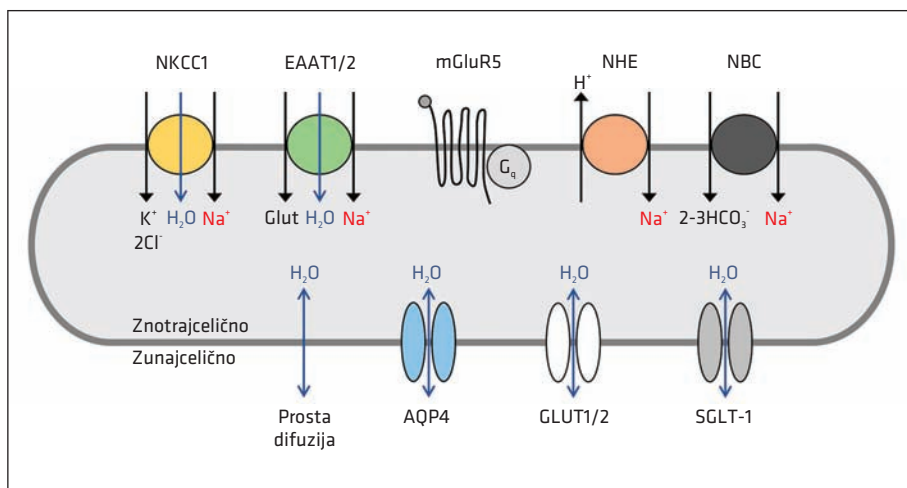
Zvišana koncentracija zunajceličnega amonijaka

Akutna odpoved jeter zviša koncentracijo amonijaka v zunajceličnini možganov (nad 5 mM) in povzroči celični edem v astrocitih (62, 63). Po privzemu lahko amonijak

v astrocitih povzroči oksidativni stres (tvorbo ROS), kar vodi v motnje v delovanju mitohondrijev in posledično okvaro celične presnove in funkcije Na^+/K^+ -ATPaze (63). Poleg tega je bilo pokazano, da amonijak v astrocitih *in vitro* aktivira $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransporter tipa 1 ter poveča raven izražanja tako omenjenega kotransporterja, kot tudi AQP4, kar predstavlja, kot že prej omenjeno, dve različni poti vstopa vode v celice (64, 65).

ZDRAVLJENJE MOŽGANSKEGA EDEMA

Klinični znaki možganskega edema so raznoliki. Možganski edem lahko poteka tudi asimptomatsko, kar zahteva izjemno kompleksen pristop k zdravljenju. Zaradi pomanjkljivega razumevanja patofiziologije in molekularnih mehanizmov nastanka možganskega edema so bile terapije sprva usmerjene le v zaščito nevronov pred škodljivimi učinki edema. Zdaj vemo, da pri nastanku možganskega edema sodelujejo



Slika 1. Shematski prikaz poti prenosa ionov in vode med nastankom celičnega edema v astrocitih. NKCC1 – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporter tipa 1, EAAT1/2 – $\text{Na}^+/\text{glutamatni}$ transporterji tipa 1 in 2 (angl. *excitatory amino acid transporter 1 and 2*), mGluR5 – metabotropni glutamatni receptor tipa 5, NHE – izmenjevalec Na^+/H^+ (angl. *Na^+/H^+ exchanger*), NBC – elektrogeni kotransporter $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (angl. *electrogenic $\text{Na}^+/\text{bicarbonate}$ cotransporter*), Glut – glutamat, AQP4 – akvaporin tipa 4 (angl. *aquaporine 4*), GLUT1/2 – transporter za glukozo tipa 1 in 2 (angl. *glucose transporter type 1 and 2*), SGLT1 – transporter za glukozo (angl. *sodium-glucose cotransporter 1*).

tudi druge možganske celice, kot so astrociti, ki bi lahko predstavljali novo tarčo za razvoj zdravil (3, 19, 53).

Večina trenutno odobrenih pristopov k zdravljenju edema je nespecifičnih, ciljno usmerjene terapije so zelo redke (1, 3). Učinkovitost zdravljenja možganskega edema je med drugim odvisna od vzroka za nastanek in od stopnje edema (celični, ionski, vazogeni ali hemoragični) ter od časa pričetka zdravljenja, saj so si lahko učinki določenih terapij v različnih časovnih točkah nasprotujoči (17). Zdravljenje otežuje tudi možnost, da ob poškodbi v različnih predelih možganov sočasno potekajo različne stopnje možganskega edema (epicenter možganske poškodbe ima drugo stopnjo edema glede na področja možganov, ki so oddaljena od epicentra), in da imajo trenutno razpoložljive diagnostične metode (pregled glave in vratu, nevrološki pregled, CT glave, MR in krvni testi) omejeno zmožnost natančnega določanja stopnje možganskega edema (2, 3, 17).

Primarni cilj terapij, ki se danes najpogosteje izvajajo v praksi, je preprečiti posledice možganskega edema (simptomatsko zdravljenje) ter nato, če je možno, odpraviti prvotno bolezensko stanje, ki je možganski edem povzročilo. Med te terapije sodijo dekompresijska kraniotomija, osmotska terapija in terapija z glukokortikoidi (1, 3). Dekompresijska kraniotomija pomaga zmanjšati znotrajlobanjski tlak (pritisk možganskega tkiva na lobanjo) tako, da se kirurško odstrani del lobanje. Pri kraniotomiji je pomembno, da se poseg opravi pravočasno (najbolj optimalno na stopnji celičnega ali ionskega edema), saj v nasprotnem primeru lahko pride celo do poslabšanja edema (3, 66). Cilj osmotske terapije je ustvariti intravaskularni osmotski gradient, ki bi usmerjal tok vode iz možganskega tkiva v žile, in s tem zmanjšati znotrajlobanjski tlak. Pri tem se najpogosteje uporabljata manitol in hipertonična raztopina kristaloidov. Stranski učinki, ki se

lahko pojavijo, so poškodba ledvic in dehidracija (1, 20). Terapija z glukokortikoidi pa je učinkovita predvsem za zdravljenje vazogenega edema. Najpogosteje se uporablja deksametazon, ki lahko prosto prehaja KMP, in pomaga pri ponovni vzpostavitvi normalnega delovanja KMP, vendar je njegova uporaba pri zdravljenju edema, ki nastane po akutni poškodbi možganov, lahko celo škodljiva, ima pa tudi močne stranske učinke (1, 18, 67).

Terapevtski potencial astrocitov v zdravljenju celičnega edema

Simptomatsko zdravljenje možganskega edema, opisano v zgornjem odseku, učinkuje predvsem na izboljšanje posledic naprednejših stopenj edema, kot sta vazogeni in hemoragični edem. Take terapije imajo pogosto visoko stopnjo tveganja in relativno nizko učinkovitost. Zato je napredek na področju tarčnega zdravljenja v zgodnjih stopnjah, ko je edem še v razvojni fazi (npr. celični edem), ključnega pomena za izboljšanje prognoze bolezni. Zaradi številnih raziskav se je razumevanje molekularnih mehanizmov nastanka različnih stopenj možganskega edema v zadnjih letih bistveno izboljšalo, kar je tudi prineslo velik napredek na področju tarčnega zdravljenja. Trenutno poteka več kliničnih raziskav, ki preizkušajo učinkovitost različnih farmakoloških sredstev proti edemu, ki so opisane v drugih preglednih člankih (11, 18). V tem članku pa se bomo osredotočili predvsem na terapevtski potencial astrocitov v zdravljenju celičnega edema.

Zdravljenje celičnega edema, ki se v OŽ razvije predvsem v astrocitih, je v praksi še slabo uveljavljeno (3, 19, 53). Dosedanje raziskave so razkrile številne molekularne mehanizme, ki poganjajo razvoj celičnega edema v astrocitih (glej poglavje Molekularni mehanizmi nastanka celičnega edema). Zaradi tega so astrociti obetavna terapevtska tarča za razvoj naprednih terapij za preprečevanje nastanka in razvoja celičnega

edema. V nadaljevanju bomo predstavili nekaj potencialnih pristopov za zdravljenje celičnega edema.

Akvaporin 4

Hormonska terapija s ščitničnim hormonom trijodotironinom (T3) na mišjem modelu možganske kapi, ki najverjetneje deluje prek zmanjšane izražanja AQP4, je povzročila bistveno zmanjšanje prizadetega območja in zmanjšanje edema (68). Več raziskav poroča tudi o pozitivnih učinkih izbitja gena (angl. *knockout*) za AQP4 na uravnavanje volumna vode v OŽ v patoloških razmerah (16, 51). Na mišjem modelu kapi in hiperhidracije (vbrizganje destilirane vode v intraperitonealni (i.p.) prostor), kar je standardni način za povzročanje celičnega edema, je splošno izbitje gena za AQP4 močno zmanjšalo edem in hkrati izboljšalo preživetje ter nevrološko stanje živali (51). Skladno s temi rezultati je pogojno izbitje AQP4 v astrocitih zmanjšalo kopičenje vode v možganih po ip. injekciji vode (16).

Funkcija AQP4 se lahko uravnava tudi s farmakološkimi sredstvi. Novejša raziskava je pokazala, da inhibicija funkcije AQP4 s TGN-020 (angl. *n*-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)nicotinamide) deset minut po sprožitvi možganske kapi v podganah zmanjša nabrekanje možganov, ocenjeno en dan po kapi. Po 14 dneh se je izboljšalo tudi nevrološko stanje teh živali (69). Farmakološka inhibicija funkcije AQP4 v zgodnjih stopnjah edema, kot je celični edem, bi lahko torej predstavljala nov način zdravljenja edema v prihodnosti. V doslej opisanih raziskavah so za testiranje učinkovitosti različnih pristopov k zdravljenju uporabljali le živalske modele. Trenutno poteka le ena klinična raziskava (identifikacijska številka klinične raziskave: NCT03804476), katere prva faza je bila zaključena, in preverja varnost, toleranco ter farmakokinetiko učinkovine AER-271 (angl. [2-[[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl]-4-chlorophenyl] dihydrogen

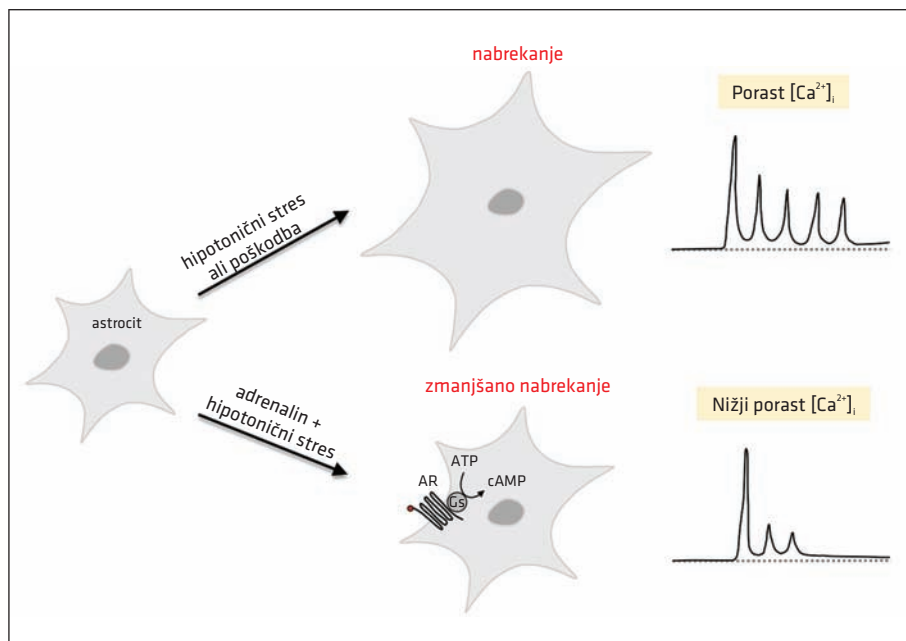
phosphate), na zdravih ljudeh (70). AER-271 je inhibitor AQP4 in je bil zasnovan z namenom preprečevanja edema po možganski kapi.

Kotransporter Na⁺/K⁺/2Cl⁻ tipa 1

V fizioloških razmerah Na⁺/K⁺/2Cl⁻-kotransporter tipa 1 prenaša skupaj z ioni Na⁺, K⁺ in Cl⁻ tudi določeno število molekul vode (3, 55). Ob razvoju celičnega edema v astrocitih, ki nastane zaradi zvišane zunajcelične koncentracije K⁺, se raven izražanja Na⁺/K⁺/2Cl⁻-kotransporterja tipa 1 poveča, kar omogoča prenos večjega volumna vode v celice (3). Dodatek inhibitorja Na⁺/K⁺/2Cl⁻-kotransporterja tipa 1 bumetanida (10 μM) zmanjša nabrekanje astrocitov *in vitro* po izpostavitvi visoki koncentraciji zunajceličnega K⁺ (75 mM) (71). Podoben učinek je viden tudi v astrocitih izoliranih iz miši z izbitim genom za Na⁺/K⁺/2Cl⁻-kotransporter tipa 1 (72). Bumetanid je prav tako zmanjšal nabrekanje astrocitov *in vitro*, ki so bili izpostavljeni visoki koncentraciji amonijaka (5 mM) (64).

Adrenergični receptorji

Astrociti so pomembna tarča noradrenergičnega sistema v OŽ (44). Nedavne raziskave so pokazale, da predhodna stimulacija z adrenalinom (1 μM) in selektivnim agonistom β-adrenergičnih receptorjev izoprenalinom (10 μM), ki v astrocitih inducirata stelacijo, bistveno zmanjša nabrekanje astrocitov (celični edem), izpostavljenih hipotoničnemu stresu *in vitro*. Dodatek adrenalina je prav tako inhibiral nabrekanje astrocitov *in vivo* v možganih miši po ip. injekciji vode (hiperhidracija) in v podgani po poškodbi hrbtenjače. Mehanizem, prek katerega aktivacija adrenergičnih receptorjev zmanjša nabrekanje astrocitov, zelo verjetno vključuje s cAMP posredovano zmanjšanje s hipotoničnostjo sprožene Ca²⁺-citosolne vzdraženosti v astrocitih (slika 2) (35).



Slika 2. Shematski prikaz zmanjšane nabrekanosti in Ca^{2+} -citosolne vzdražnosti astrocitov po aktivaciji adrenergičnih receptorjev v hipotoničnih razmerah. $[Ca^{2+}]_i$ – znotrajcelična koncentracija kalcija, AR – adrenergični receptorji, Gs – G-protein, ki stimulira nastanek cAMP (35).

ZAKLJUČEK

Možganski edem je pogost spremljevalec različnih patoloških stanj, kot so možganska kap, akutne poškodbe možganov, vnetja, okužbe in tumorji, in lahko močno vpliva na njihov potek (1, 11, 20). Poznamo štiri različne stopnje razvoja možganskega edema: celični, ionski, vazogeni in hemoragični edem (3). Dosedanje raziskave so pomembno prispevale k razumevanju molekularnih mehanizmov različnih stopenj možganskega edema, kar je omogočilo napredek na področju razvoja zdravil za možganski edem. Kljub temu pa je v praksi zdravljenje možganskega edema pogosto še vedno le simptomatsko. Napredek na področju tarčnega zdravljenja je izrednega pomena, predvsem za celični edem, ki predstavlja prvo in s tem najpomembnejšo stopnjo možganskega edema, saj vpliva na razvoj ostalih stopenj edema. Potencial različnih celičnih in molekularnih terapevtskih

tarč za zdravljenje celičnega edema je slabo izkoriščen, kar pušča še veliko prostora za napredek.

Astroцитi predstavljajo eno najpomembnejših potencialnih tarč za zdravljenje celičnega edema v OŽ, saj so to prve celice, ki ob poškodbi OŽ nabreknejo (3, 19). Njihov neposreden stik s KMP in s tem z zunanjim virom vode ter njihova visoka prepustnost za vodo zaradi izražanja vodnih kanalov AQP4 astrocite postavlja v ospredje patofiziologije celičnega edema in tudi drugih stopenj možganskega edema (3). Ker celični edem negativno vpliva tudi na samo fiziologijo astrocitov, ki v možganih zagotavljajo homeostazo (9), lahko le-to predstavlja dodaten zaplet v razvoju možganskega edema (9). Dosedanje raziskave molekularnih mehanizmov, ki so v astrocitih vpleteni v nastanek celičnega edema, so izpostavile nekaj možnih tarč za zdravljenje celičnega edema (npr. vodni kanal AQP4,

Na⁺/K⁺/2Cl⁻-kotransporter tipa 1 in β-adrenergična/cAMP-signalna pot) (3, 19, 53). Znanstveni napredki na področju razumevanja patofiziologije celičnega edema in zgodnje diagnostike celičnega edema kot prve stopnje možganskega edema bi v prihodnosti lahko privedli do tarčnega zdravljenja celičnega edema, kar bi zmanjšalo možnost za nastanek ostalih stopenj možganskega edema, ki lahko vodijo tudi v smrt.

VIRI FINANČNIH SREDSTEV

Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS: P3-0310, J3-2523, J3-50104, IO-0034, IO-0022).

IZJAVA O NAVZKRIŽJU INTERESOV

Avtorji prispevka izjavljajo, da nimajo navzkrižja interesov.

LITERATURA

1. Nehring SM, Tadi P, Tenny S. Cerebral edema. Statpearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022
2. Dalby T, Wohl E, Dinsmore M, et al. Pathophysiology of cerebral edema – A comprehensive review. *J Neuroanaesth Crit Care*. 2020; 8 (3): 163–72.
3. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016; 36 (3): 513–38.
4. Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci*. 2015; 16 (5): 9949–75.
5. Min R, van der Knaap MS. Genetic defects disrupting glial ion and water homeostasis in the brain. *Brain Pathol*. 2018; 28 (3): 372–87.
6. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016; 524 (18): 3865–95.
7. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*. 2012; 814: 23–45.
8. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. 2012; 121 (1): 4–27.
9. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev*. 2018; 98 (1): 239–89.
10. Mestre H, Mori Y, Nedergaard M. The brain's glymphatic system: Current controversies. *Trends Neurosci*. 2020; 43 (7): 458–66.
11. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 2019; 145 (Pt B): 230–46.
12. Battey TW, Karki M, Singhal AB, et al. Brain edema predicts outcome after nonlacunar ischemic stroke. *Stroke*. 2014; 45 (12): 3643–8.
13. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, et al. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010; 58 (9): 1094–103.
14. Bell AH, Miller SL, Castillo-Melendez M, et al. The neurovascular unit: Effects of brain insults during the perinatal period. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 13: 1452.
15. van der Toorn A, Syková E, Dijkhuizen RM, et al. Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn Reson Med*. 1996; 36 (1): 52–60.
16. Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, et al. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (AQP4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (43): 17815–20.
17. Thrane AS, Rangroo Thrane V, Nedergaard M. Drowning stars: Reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends Neurosci*. 2014; 37 (11): 620–8.

18. Stokum JA, Gerzanich V, Sheth KN, et al. Emerging pharmacological treatments for cerebral edema: Evidence from clinical studies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020; 60: 291–309.
19. Stokum JA, Kurland DB, Gerzanich V, et al. Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema. *Neurochem Res*. 2015; 40 (2): 317–28.
20. Gu Y, Zhou C, Piao Z, et al. Cerebral edema after ischemic stroke: Pathophysiology and underlying mechanisms. *Front Neurosci*. 2022; 16: 988283.
21. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012; 4 (147): 147ra11.
22. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523 (7560): 337–41.
23. Hablitz LM, Nedergaard M. The glymphatic system: A novel component of fundamental neurobiology. *J Neurosci*. 2021; 41 (37): 7698–711.
24. Xie L, Kang H, Xu Q, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 2013; 342 (6156): 373–7.
25. Parpura V, Verkhratsky A. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: Evolution of the concept. *ASN Neuro*. 2012; 4 (4): 201–5.
26. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia – more than just brain glue. *Nature*. 2009; 457 (7230): 675–7.
27. Zorec R, Horvat A, Vardjan N, et al. Memory formation shaped by astroglia. *Front Integr Neurosci*. 2015; 9 (56): 1–7.
28. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2019; 25 (6): 665–73.
29. Risher WC, Andrew RD, Kirov SA. Real-time passive volume responses of astrocytes to acute osmotic and ischemic stress in cortical slices and in vivo revealed by two-photon microscopy. *Glia*. 2009; 57 (2): 207–21.
30. O'Connor ER, Kimelberg HK. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci*. 1993; 13 (6): 2638–50.
31. Pangrsic T, Potokar M, Haydon P, et al. Astrocyte swelling leads to membrane unfolding, not membrane insertion. *J Neurochem*. 2006; 99 (2): 514–23.
32. Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, et al. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol*. 2003; 89 (4): 1870–7.
33. Thrane AS, Rappold PM, Fujita T, et al. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca^{2+} signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (2): 846–51.
34. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, et al. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*. 1990; 10 (5): 1583–91.
35. Vardjan N, Horvat A, Anderson JE, et al. Adrenergic activation attenuates astrocyte swelling induced by hypotonicity and neurotrauma. *Glia*. 2016; 64 (6): 1034–49.
36. Conner MT, Conner AC, Bland CE, et al. Rapid aquaporin translocation regulates cellular water flow: Mechanism of hypotonicity-induced subcellular localization of aquaporin 1 water channel. *J Biol Chem*. 2012; 287 (14): 11516–25.
37. Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca^{2+} response in cultured rat astrocytes. *Glia*. 1997; 20 (1): 51–8.
38. Song Y, Gunnarson E. Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. *PLoS One*. 2012; 7 (4): 1–8.
39. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14 (4): 265–77.
40. Potokar M, Stenovec M, Jorgacevski J, et al. Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia*. 2013; 61 (6): 917–28.
41. Syková E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*. 2008; 88 (4): 1277–340.
42. Vardjan N, Zorec R. Excitable astrocytes: Ca^{2+} - and cAMP-regulated exocytosis. *Neurochem Res*. 2015; 40 (12): 2414–24.
43. Hertz L, Lovatt D, Goldman SA, et al. Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Neurochem Int*. 2010; 57 (4): 411–20.
44. O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, et al. Norepinephrine: A neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res*. 2012; 37 (11): 2496–512.
45. Horvat A, Zorec R, Vardjan N. Adrenergic stimulation of single rat astrocytes results in distinct temporal changes in intracellular Ca^{2+} and cAMP-dependent PKA responses. *Cell Calcium*. 2016; 59 (4): 156–63.

46. Vardjan N, Kreft M, Zorec R. Dynamics of β -adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia*. 2014; 62 (4): 566–79.
47. Gharami K, Das S. Delayed but sustained induction of mitogen-activated protein kinase activity is associated with beta-adrenergic receptor-mediated morphological differentiation of astrocytes. *J Neurochem*. 2004; 88 (1): 12–22.
48. Shao Y, Enkvist MO, McCarthy KD. Glutamate blocks astroglial stellation: Effect of glutamate uptake and volume changes. *Glia*. 1994; 11 (1): 1–10.
49. Selye H. Ischemic necrosis: Prevention by stress. *Science*. 1967; 156 (3779): 1262–3.
50. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, et al. Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989; 9 (6): 892–6.
51. Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000; 6 (2): 159–63.
52. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*. 1997; 17 (1): 171–80.
53. Lafrenaye AD, Simard JM. Bursting at the seams: Molecular mechanisms mediating astrocyte swelling. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (2): 330.
54. Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*. 2005; 50 (4): 407–16.
55. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004; 129 (4): 877–96.
56. Bradley SJ, Challiss RA. G protein-coupled receptor signalling in astrocytes in health and disease: A focus on metabotropic glutamate receptors. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84 (3): 249–59.
57. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001; 65 (1): 1–105.
58. Shi Z, Zhang W, Lu Y, et al. Aquaporin 4-mediated glutamate-induced astrocyte swelling is partially mediated through metabotropic glutamate receptor 5 activation. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11: 116.
59. Tóth MO, Menyhárt Á, Frank R, et al. Tissue acidosis associated with ischemic stroke to guide neuroprotective drug delivery. *Biology (Basel)*. 2020; 9 (12).
60. Staub F, Baethmann A, Peters J, et al. Effects of lactic acidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990; 10 (6): 866–76.
61. Morishima T, Aoyama M, Iida Y, et al. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*. 2008; 61 (1): 18–26.
62. Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure. *J Clin Exp Hepatol*. 2015; 5 (Suppl 1): S96–S103.
63. Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis*. 2005; 20 (4): 303–18.
64. Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, et al. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem*. 2008; 283 (49): 33874–82.
65. Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, et al. Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport*. 2003; 14 (18): 2379–82.
66. Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: Molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*. 2007; 6 (3): 258–68.
67. Alderson P, Roberts I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; 2005 (1): CD000196.
68. Sadana P, Coughlin L, Burke J, et al. Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: Possible association with AQP4 modulation. *J Neurol Sci*. 2015; 354 (1–2): 37–45.
69. Sun C, Lin L, Yin L, et al. Acutely inhibiting AQP4 with TGN-020 improves functional outcome by attenuating edema and peri-infarct astrogliosis after cerebral ischemia. *Fron Immunol*. 2022; 13: 870029.
70. NIH National Library of Medicine NCBI. Phase 1 Study to assess AER-271 [citirano 2023 Sep 28]. Dosegljivo na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03804476?id=NCT03804476&rank=1>
71. Su G, Kintner DB, Sun D. Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)- induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am J Cell Physiol*. 2002; 282 (5): C1136–46.
72. Su G, Kintner DB, Flagella M, et al. Astrocytes from Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am J Cell Physiol*. 2002; 282 (5): C1147–60.