

107 ZS

H3209

Krystyna Domańska-Janik



ZABURZENIA METABOLIZMU GLUKOZY W ENERGETYCZNIE

WYRÓWNANYM NIEDOTLENIENIU MÓZGU SZCZURA

Zakład Neurochemii  
Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej  
Polskiej Akademii Nauk

# SPIS TREŚCI

	Strona
I. WSTĘP .....	1
1-1. Wprowadzenie .....	1
1-2. Cel pracy .....	10
II. MATERIAL I METODY .....	11
II-1. Model niedotlenienia .....	11
II-2. Material doświadczalny .....	13
II-3. Preparatyka mózgu .....	13
II-4. Badania przemiany podstawowej glukozy w mózgu szczura .....	14
a. Badania radioizotopowe in vivo .....	14
b. Badania metabolizmu glukozy w skrawkach mózgu szczura .....	14
c. Badania metabolizmu glukozy we frakcji cyto- plazmatycznej homogenatu mózgu szczura .....	15
II-5. Metody ekstrakcji i analizy frakcji makro- molekularnych z mózgu szczura .....	16
II-6. Oznaczanie stężeń substratów w mózgu szczura	16
a. Oznaczenia spektrofluorymetryczne G6P, G6PA, CrP, ATP, ADP, AMP i pirogronianu .....	18
b. Oznaczenia spektrofotometryczne glukozy i kwasu mlekowego .....	19
c. Oznaczenie 3'5'-cAMP przy użyciu metody radioizotopowej .....	21
II-7. Oznaczanie aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym w mózgu szczura .....	21
II-8. Analiza statystyczna wyników .....	22

III. WYNIKI BADAŃ .....	23
III-1. Charakterystyka modelu niedotlenienia .....	23
III-2. Wpływ niedotlenienia na poziom metabolitów związanych z przemianą energetyczną mózgu .	27
III-3. Ocena dynamiki metabolizmu energetycznego mózgu szczura w okresie niedotlenienia i po niedotlenieniu .....	31
III-4. Wpływ niedotlenienia na procesy syntezy związków makromolekularnych .....	38
a. Wprowadzenie .....	38
b. Określenie swoistej aktywności i dynamiki transportu znakowanej glukozy z krwi do mózgu oraz rozcieńczenia jej znacznika na szlaku przemiany podstawowej w niedotle- nieniu .....	39
c. Włączanie znacznika $U-[^{14}C]$ -glukozy do frakcji związków makromolekularnych w mózgu niedotlenianych szczurów in vivo .....	46
d. Podsumowanie .....	51
III-5. Przemiana glukozy w cyklu pentozowym /C.P./ w niedotlenieniu .....	56
a. Wprowadzenie .....	56
b. Wpływ niedotlenienia na aktywność enzymów cyklu pentozowego .....	62
c. Aktywność cyklu pentozowego w skrawkach mózgu badanych in vitro po niedotlenieniu .	62
d. Bezpośrednie badanie aktywności cyklu pen- tozowego w mózgu szczura w czasie niedotle- nienia .....	70

III-6. Zależności pomiędzy metabolizmem podstawowym glukozy, aktywnością cyklu pentozowego, a procesami syntezy związków makromolekularnych w skrawkach kory mózgu szczura in vitro .....	81
III-7. Regulacja cyklu pentozowego /C.P./ w mózgu szczura .....	83
a. Cykl pentozowy, a aktywność glikolizy we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu mózgu szczura .....	88
b. Kinetyka enzymów regulujących aktywność utleniania glukozy w cyklu pentozowym: DH-6GP i DH-6PGA .....	96
III-8. Wpływ niedotlenienia na metabolizm lipidów w mózgu szczura .....	102
a. Wbudowywanie znacznika U-[ <sup>14</sup> C]-glukozy do frakcji makromolekularnych w skrawkach mózgu szczura po przebytych niedotlenieniu .....	102
b. Wpływ niedotlenienia na skład lipidowy mózgu szczura .....	107
IV. DYSKUSJA .....	109
V. WNIOSKI .....	132
VI. PISMIENNICTWO .....	133

## SKRÓTY ZASTOSOWANE W PRACY

ADP	- Adenozyno 5'-difosforan
ATP	- Adenozyno 5'-trifosforan
AMP	- Adenozyno 5'-monofosforan
3'5'-cAMP	- Cykliczny adenozyno 3',5'-monofosforan
6-AN	- 6-amino amid kwasu nikotynowego
6A-NADP	- Fosforan 6-aminonikotynoamido adenino dinukleotydu
BSA	- Frakcja albuminowa z surowicy wołu
CP	- Cykl pentozowy
CrP	- Fosforan kreatyny
DTT	- 1,4-ditiotreitol
DHAP	- Fosfodihydroksyaceton
DH-G6P	- Oksydoreduktaza D-glukozy-6-fosforan:NADP 1.1.1.49 /Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa <sup>x</sup> /
DH-6PGA	- Oksydoreduktaza 6-fosfo-D-glukonian:NADP /dekarboksylująca/ 1.1.1.44 /Dehydrogenaza fosfoglukonianowa <sup>x</sup> /
EDTA	- Kwas etylenodwuaminoczweroocetowy
GAP	- Aldehyd 3-fosfoglicerynowy
GSH/GSSG	- Glutation /forma zredukowana/utleniona/
G6P	- Glukozy 6-fosforan
FA	- Kwasy tłuszczowe
FFA	- Wolne kwasy tłuszczowe
F-1,6-P	- Fruktozy-1,6-difosforan
F-6-P	- Fruktozy-6-fosforan
K <sub>m</sub>	- Stała Michaelisa
LO	- Lipidy obojętne

- LDH - Oksydoreduktaza L-mleczan:NAD 1.1.1.27  
/Dehydrogenaza mleczanowa<sup>x</sup>/
- NAD<sup>+</sup>/H - Dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy - forma utleniona/zredukowana /nukleotyd pirydynowy<sup>x</sup>/
- NADP<sup>+</sup>/H - Fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego /nukleotyd pirydynowy<sup>x</sup>/- forma utleniona/zredukowana
- Δ P - Wysokocenergetyczne wiązania fosforanowe
- Pi - Fosforan nieorganiczny
- PK - Fosfotransferaza ATP:pirogonian 2.7.1.40
- PCA - Kwas nadchlorowy
- PhMS - Kwas fenazyno meta-sulfonowy
- PC - Fosfatydylocholina
- PE - Fosfatydyloetanolamina
- PI - Fosfatydyloinozytol
- PS - Fosfatydyloseryna
- TCA - Kwas trójchlorooctowy
- TG - Trójglicerydy
- TRIS - Kwas 2-amino-2-hydroksymotylo-1,3-propanolowy

<sup>x</sup> Nazwy potoczne enzymów użyte w pracy.

Poza wynikami badań dotychczas nie publikowanymi fragmenty następujących uprzednio publikowanych prac włączono do rozprawy.

1. Domańska-Janik K., Wideman J.: Regulation of thiols in the brain. 2. Effect of hypoxia on the activities of cytoplasmic NADPH-producing enzymes in different parts of the rat brain. Resuscitation 1974, 3, 37-41.
2. Domańska-Janik K., Wideman J.: Regulation of thiols in the brain. 3. Glucose metabolism in the cytoplasmic fraction of rat brain during stimulation of the HMP-shunt in vitro. Resuscitation 1974, 3, 43-50.
3. Domańska-Janik K., Zaleska M.: Regulation of the Pentose Phosphate Cycle in the brain by NADPH inhibition of dehydrogenase system. Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol. 1977, 15, 119-124.
4. Domańska-Janik K., Zaleska M., Zalewska T., Witter B.: Posthypoxic glucose metabolism in rat cerebral cortex slices. Proc. Intern. Symposium "Path. Bioch. and Morph. Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension. Red. M.J. Mossakowski, I.B. Zelman, H. Kroh, Pol. Med. Publ. Warszawa, 1978, pp. 683-698.
5. Domańska-Janik K., Zalewska T.: Effects of anoxia and depolarization on the movement of carbon atom derived from glucose into macromolecular fractions in rat brain slices. J. Neurosc. Res. 1979, 4, 247-260.
6. Zalewska T., Domańska-Janik K.: Energy utilization and changes in some intermediates of glucose metabolism in normal and hypoxic rat brain after decapitation. Resuscitation 1979, 7, 199-205.

7. Domańska-Janik K., Zalewska T.: Arterial acid-base changes and brain energy metabolism in unanaesthetized rats in mild hypoxia. *Resuscitation* 1979, 7, 207-214.
8. Strosznajder J., Domańska-Janik K.: Effect of anoxia and hypoxia on brain lipid metabolism. *Neurochem. Res.* 1980, 5, 585-591.
9. Khachatrian L., Domańska-Janik K.: Regulation of cyclic AMP level in the brain cortex during hypoxia and ischemia. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.* 1980, 28, 667-673.
10. Domańska-Janik K., Zalewska T.: The effect of hypoxia on the metabolism of labeled glucose and acetate in the rat brain. *Resuscitation* 1981, 9, 243-253.
11. Domańska-Janik K., Zalewska T., Strosznajder J.: Effect of ischemia and hypoxia on rat brain glycolipids. *J. Neurosci. Res.* 1982, 7, 363-370.



## I. W S T Ę P

### I-1. Wprowadzenie

Doktryna o bezpośrednim związku czynności mózgu z przemianą energii sformułowana została w pionierskich pracach Boyle'a i Lavoisiera. W wersji nowożytnej prowadzi ona do prób opisu funkcji mózgu w kategoriach zmian /regulacji/ metabolizmu energetycznego. Użycie coraz to bardziej złożonych technik badawczych pozwalających na korelację pomiędzy czynnością, a energetyką mózgu - począwszy od pomiaru zmian temperatury, przepływu krwi, zużycia tlenu i glukozy, spektroskopowych pomiarów potencjału oksydacyjno-redukcyjnego z powierzchni kory, a skończywszy na badaniach tomograficznych mózgu przy użyciu radioizotopów - przynosiło zawsze dużo początkowych nadziei i w efekcie kontrowersyjne wyniki szeroko zakrojonych badań.

Reakcja mózgu na narastające niedotlenienie stanowi właściwy model do prześledzenia zależności pomiędzy metabolizmem energetycznym, a funkcją ośrodkowego układu nerwowego.

Odpowiedź na pytanie, w czym leży przyczyna szczególnej wrażliwości mózgu na brak tlenu, z pozoru wydaje się prosta. Mózg charakteryzuje się bardzo wysokim zapotrzebowaniem metabolicznym i prawie całkowitym brakiem rezerw energetycznych, tak więc bardzo łatwo może dojść do sytuacji kryzysowych. W warunkach prawidłowego utlenowania zapotrzebowanie energetyczne pokrywane jest poprzez ATP produkowane w tlenowej przemianie glukozy. Wzrost zapotrzebowania, sygnalizowany obniżeniem wartości ładunku energetycznego komórek, powoduje

przejście oddychania mitochondrialnego ze stanu 4 - spoczynkowego, w stan 3 - aktywnej produkcji ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji.

Efektem ograniczenia dostępności tlenu jest wzrost stopnia redukcji poszczególnych ogniw mitochondrialnego łańcucha oddechowego spowodowany brakiem końcowego akceptora elektronów. Aktywność oksydacyjnej fosforylacji słabnie prowadząc szybko do głębokiego niedoboru energetycznego i dezorganizacji wszystkich energozależnych procesów komórkowych, w tym aktywnego transportu jonów i depolaryzacji komórek z zanikiem czynności bioelektrycznej mózgu. Zakłócenie energetycznej homeostazy komórkowej powoduje dezintegrację struktur makromolekularnych, a powstające niskocząsteczkowe produkty ich rozpadu, zwiększając wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne, stają się przyczyną obrzęcia komórek i struktur subkomórkowych. Stąd na ośroł wczesnych zmian morfologicznych w ostrych stanach niedotlenienia mózgu wysuwają się: obrzęcie komórek oraz mikrowakuolizacja cytoplazmy odpowiadająca /16/ obrzęciu mitochondriów z dezintegracją ich wewnętrznej struktury. W następstwie tych wczesnych zmian, uszkadzających głównie oddychanie komórek nerwowych /36/ następują dalsze procesy zwyrodnieniowe, prowadzące w efekcie do obumierania neuronów i aktywacji odczynów glejowych.

Przedstawiony schemat niekorzystnych zjawisk metabolicznych prowadzący do szybkiego zaniku funkcji mózgu w wyniku ostrego niedoboru tlenowego spotykanego w głębokim niedotlenianiu i niedokrwieniu, stał się obowiązującym również w rozumieniu patologii zaburzeń występujących w bardziej umiarkowanych formach niedotlenienia. Za próg wystąpienia niedotlenienia,

ozyci tzw. "krytyczne  $pO_2$ " przyjęto - bardzo trudne zresztą do eksperymentalnego określenia /21, 142/ - takie stężenie tlenu, przy którym następuje wzrost stopnia redukcji mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Wprowadzone pojęcie "krytycznego  $pO_2$ " oparto głównie na wynikach badań prowadzonych na izolowanych mitochondriach "in vitro". Tak więc, zgodnie z definicją, pierwszym objawem niedotlenienia tkanki miałyby być zaburzenie oddychania mitochondrialnego, połączone z obniżeniem syntezy ATP i wystąpieniem deficytu energetycznego. Ustalono eksperymentalnie, że zjawiska te występują w mózgu dopiero przy obniżeniu stężenia parcjalnego tlenu we krwi, poniżej wartości 20 mmHg /113/.

Taka definicja niedotlenienia, czy też "krytycznego  $pO_2$ " stoi w ostrej sprzeczności z klinicznymi obserwacjami dotyczącymi zakłócenia funkcji mózgu w wyniku narastającej hipoksji, opisywanymi w licznych monografiach /21, 22/.

Kliniczne wykładniki niedotlenienia pojawiają się stosunkowo wcześnie. Początkowo na czoło objawów wysuwają się zaburzenia neuropsychiczne, przy czym np. wyraźne opóźnienie adaptacji do ciemności występuje już przy 10% spadku stężenia tlenu we krwi /117/. Z innych objawów obserwuje się różnego rodzaju zakłócenia integrującej funkcji mózgu, wyrażające się narastaniem zaburzeń świadomości wykrywanych w rutynowych testach psychofizjologicznych. Przy obniżaniu stężenia tlenu do 65% normy zaburzona zostaje pamięć świeża /short term memory/. Poniżej 50% - wyraźnym zakłóceniom ulega zdolność krytycznego sądu, a pomiędzy 40 a 30% wartości kontrolnej utlenowania krwi dochodzi do całkowitej utraty świadomości.

Przedstawionej powyżej sekwencji zaburzeń funkcji mózgu nie towarzyszą żadne objawy naruszenia równowagi energetycznej tkanki. Brak zmian poziomu ATP w mózgu w warunkach umiarkowanej hipoksji po raz pierwszy wykazano w 1944 r. /71/. Od tego czasu głównie w późnych latach 70-tych, wynik ten został potwierdzony przez szereg ośrodków badawczych /w tym również nasz/ /48/, wykazując niezależność zaburzeń funkcji mózgu w hipoksji od ogólnego bilansu energetycznego. Wykazano przy tym, że niektóre typowe reakcje neurofizjologiczne i metaboliczne mózgu towarzyszące niedotlenieniu, jak np. niespecyficzna desynchronizacja zapisu EEG, aktywacja glikolizy czy wzrost przepływu mózgowego krwi, pojawiają się już przy wartościach  $p_{aO_2}$  równych 30-40 mmHg i także znacznie wyprzedzają pierwsze objawy deficytu energetycznego /22, 99, 151/.

Wydaje się więc, że pierwotnych przyczyn dysfunkcji mózgu w zespołach umiarkowanej hipoksji należy upatrywać nie w zaburzonej energetyce, lecz w innego rodzaju zakłóceniach procesów regulacyjnych, typowych dla tkanki nerwowej, prowokowanych bezpośrednio przez niedobór tlenu, a znacznie wyprzedzających załamanie się homeostazy energetycznej. Na podstawie przytoczonej powyżej sekwencji występowania zaburzeń funkcjonalnych mózgu przy stopniowym zwiększaniu niedoboru tlenu, można sądzić, że procesy te wiążą się ściśle z takimi wyższymi czynnościami mózgu jak zdolności asocjacyjne, świadomość i pamięć. Są to w większości zaburzenia odwracalne, nie zagrażające /w przeciwieństwie do ostrych stanów anoksji lub ischemii/ bezpośrednio życiu. Jednakże, na co wskazuje analiza kliniczna, w części przypadków, szczególnie przy przedłużających się lub powtarzających epizodach niedotlenienia, zaburzenia te mogą prowadzić do

różnorodnych, trwałych zmian neuropsychicznych /67/.

Poznanie patofizjologii stanów umiarkowanej hipoksji i ich jakościowej odrębności do obrazu anoksji lub niedokrwienia powinno dać wskazówki co do możliwości swoistej terapii, zmniejszającej prawdopodobieństwo wystąpienia trwałego upośledzenia funkcji mózgu.

Stopniowemu obniżaniu stężenia parcjalnego tlenu we krwi towarzyszą typowe reakcje fizjologiczne organizmu, przeciwdziałające wystąpieniu niedotlenienia tkanek. Aktywacja chemoreceptorów powoduje hiperwentylację z towarzyszącą alkalozą oddechową /48/. Równocześnie, odwrotnie proporcjonalny do wielkości wysycenia krwi tlenem wzrost przepływu mózgowego krwi /15/ zapobiega w pewnych granicach wystąpieniu deficytu tlenowego mózgu. Te ogólnoustrojowe mechanizmy regulacyjne ulegają załamaniu przy dalszym pogłębianiu hipoksji i ilość tlenu dyfundująca z krwi do mózgu ulega ograniczeniu.

Grote i wsp. /69/ w badaniach prowadzonych na psach stwierdzili, że zmniejszenie dyfuzji tlenu do mózgu występuje już przy obniżeniu stężenia  $p_{aO_2}$  we krwi poniżej wartości 60 mmHg, podczas gdy Davies i Bronk /33/ wykazali, że oddychanie kory mózgu powinno teoretycznie funkcjonować prawidłowo do granicznego poziomu utlenowania tkanki wynoszącego 5 mmHg. W innych pracach ci sami autorzy podają, że w warunkach normoksji wartości  $p_{O_2}$  w korze mózgu wahają się w szerokich granicach od 2-10 mmHg. Podobne dane uzyskano w innych laboratoriach /90, 91/. Wynikałoby z tego, że mózg funkcjonuje zawsze w warunkach krytycznego utlenowania. Każde dodatkowe ograniczenie dyfuzji tlenu powinno więc doprowadzić do wystąpienia obszarów niedotlenienia tkanki.

W badaniach prowadzonych metodą spektrofotometrii odbiciowej na nienaruszonej korze mózgu kotów, Jöbsis i wsp. /93, 115/ stwierdzili, że układ cytochromów  $a + a^3$  ulega cyklicznemu utlenieniu i redukcji w zależności od aktywności bioelektrycznej tkanki. Autorzy ci określili również, że w warunkach spoczynkowych i normoksyjnych, układ cytochromów w korze mózgu kotów jest zredukowany co najmniej w 85% /92/. Badania redukcji układu cytochromów prowadzone metodą optycznych pomiarów powierzchni kory mózgu /92/ w hipoksji wykazały również, że istnieje stałe dostosowywanie się stopnia redukcji układu cytochromów  $a + a_3$  do niewielkich nawet zmian  $pO_2$  tkanki. Ewentualnie towarzyszące im zmiany w zużyciu tlenu i produkcji ATP są nieuchwytnie za pomocą ogólnie stosowanych metod. Powyższe dane z piśmiennictwa podkreślają różnicę w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego w korze mózgu "in situ" w porównaniu z izolowaną frakcją mitochondrialną /128/.

Jak już wspomniano, pierwsze objawy zaburzenia homeostazy energetycznej mózgu pojawiają się dopiero przy obniżeniu stężenia tlenu we krwi poniżej wartości 20 mmHg. Ta opóźniona, w stosunku do upośledzonej dyfuzji tlenu, reakcja metaboliczna tkanki, sugeruje istnienie wewnątrzkomórkowych mechanizmów kompensacyjnych, skutecznie przeciwdziałających wczesnemu wystąpieniu niedoboru związków wysokoenergetycznych. Objawem towarzyszącym tym zmianom metabolicznym mogą być narastające zaburzenia funkcjonalne mózgu, rozwijające się pomimo niezmiennego bilansu energetycznego tkanki. Założono, że przy pewnej wartości granicznej niedotlenienia mózgu, tuż przed pojawieniem się pierwszych oznak deficytu energetycznego, następuje maksymalne nasilenie i uogólnienie tych adaptacyjnych zmian metabo-

licznych. To stadium niedotlenienia nazwano umownie niedotlenieniem "umiarkowanym", w przeciwieństwie do stanów "głębokiego" niedotlenienia bądź niedokrwienia, w których homeostaza energetyczna ulega wyraźnemu załamaniu. Przeprowadzone badania nad regulacją procesów podstawowego metabolizmu mózgu miały przynieść odpowiedź na zagadnienie o zasadniczym znaczeniu, a mianowicie, dlaczego umiarkowane niedotlenienie mózgu, pomimo braku oznak zaburzonej homeostazy energetycznej, prowadzi do głębokich zaburzeń metabolicznych i funkcjonalnych, a także, w części przypadków do zmian strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego /OUN/.

W chwili podjęcia własnych badań nad oceną zmian biochemicznych mózgu towarzyszących umiarkowanym postaciom hipoksji, problemem jej odrębności jakościowej od ostrych form niedotlenienia był słabo rozróżniany. W ostatnich latach pojawiło się, równoległe do naszych badań, szereg prac podkreślających różnice mechanizmu dysfunkcji mózgu w tych dwóch postaciach niedotlenienia /4, 5, 10, 12, 119/. Powstały dwie interesujące hipotezy, dotyczące mechanizmu zaburzeń funkcjonalnych mózgu w energetycznie skompensowanym niedotlenieniu.

Pierwsza zakłada istnienie lokalnych, nie wykrywalnych przy obecnie stosowanej metodyce, niedoborów związków wysokoenergetycznych w ośrodkach pnia a przede wszystkim rdzenia przedłużonego, szczególnie istotnych dla funkcji mózgu. Dopiero poniżej granicznej wartości utlenowania krwi /20 mmHg/, spadek związków wysokoenergetycznych następuje lawinowo w całym mózgu. Pomimo licznych, ukierunkowanych badań /52, 139/, brak jest przekonujących dowodów na istnienie lokalnych, wybiórczych

zaburzeń tego typu. Koncepcja ta jest jeszcze bardziej wątpliwa w świetle przytoczonych uprzednio danych z bezpośrednich pomiarów utleniania układu cytochromów w mózgu *in vivo* /92, 93, 115/. Jeżeli mózg funkcjonuje normalnie w granicznych wartościach utleniania łańcucha oddechowego, to występowanie niedoboru tlenu w aktywnych metabolicznie obszarach, jest zjawiskiem fizjologicznym, nie wywierającym ujemnego działania na funkcjonowanie tkanki nerwowej jako całości. Należy więc przyjąć, że w mózgu istnieje bardzo wysoka zdolność kompensacji występującego lokalnie niedoboru tlenu.

Podobną nieco hipotezę wysunęli Cox i Baohelard na podstawie badań reakcji skrawków hipokampa na postępujący niedobór substratów energetycznych *in vitro* /23, 24, 25/. Wykazali oni stosunkowo wczesne zaburzenia potencjałów czynnościowych w niedotlenianych skrawkach tkankowych mózgu, wyprzedzające pojawienie się zmian w bilansie energetycznym, monitorowanym metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Uważają oni, że zaburzenie transmisji związane są z występowaniem lokalnych, niemierzalnych stosowanymi metodami, zmian stężeń ATP w niewielkich, szczególnie aktywnych pulach subkomórkowych.

Druga z omawianych hipotez dopatruje się przyczyn wczesnego zakłócenia funkcji mózgu w szczególnej wrażliwości metabolizmu neurotransmiterów na niedotlenienie /31, 32, 150/. Wykazano, że hydroksylaza tyrozynowa, kluczowy enzym procesu syntezy amin biogennych, jest szczególnie wrażliwa na wahania stężeń tlenu a jej aktywność w mózgu jest liniowo zależna od  $pO_2$  w krwi żyłnej /31/. Jednakże badania prowadzone *in vivo* w hipoksji podobnym jak stosowane przez nas nasileniu, nie potwierdziły upośledzenia syntezy amin biogennych w mózgu /17, 32/. Pewne



zwolnienie obrotu metabolicznego dopaminy, występujące w prążkowie w czasie hipoksji, zbiegało się z pobudzeniem metabolizmu innych neuroprzekaźników, między innymi noradrenaliny w pniu mózgu /170/. Wydaje się więc, że niejednolite, lokalne, często przeciwstawne zmiany metabolizmu katecholamin, obserwowane w umiarkowanej hipoksji, są raczej odbiciem uogólnionych zaburzeń funkcjonalnych, niż skutkiem zahamowania aktywności jednego, szczególnie wrażliwego układu enzymatycznego. Należałoby zatem traktować je jako wykładnik, a nie przyczynę zaburzeń funkcji mózgu w umiarkowanym niedotlenieniu.

Towarzyszące niedotlenieniu zmiany w sekrecji i wychwycie neuroprzekaźników przez zakończenia synaptyczne /39, 112, 153/, dotyczą głównie badań prowadzonych w o wiele ostrzejszych stanach niedotlenienia, z całym, towarzyszącym łańcuchem ciężkich następstw metabolicznych.

Należy wspomnieć prace wskazujące na szczególną wrażliwość neuronów cholinergicznych mózgu na niedobór tlenu. Gibson i Blass /66/ wykazali, że skompensowane energetycznie niedotlenienie powoduje znaczne obniżenie wbudowywania znakowanej cholicy do acetylocholicy. Obserwowane przez nas in vitro obniżenie wrażliwości cyklazy adenylanowej na stymulację noradrenaliną w skrawkach mózgu zwierząt poddanych hipoksji /100/ sugeruje, że również funkcja receptorów adrenergicznych może być zaburzona w niedotlenieniu.

Wszystkie omówione powyżej dane przemawiają za, w pewnym sensie nioswoistym charakterem zaburzeń w wieloskładnikowym procesie neurotransmisji mogących pojawić się w umiarkowanym niedotlenieniu. Wskazują na dużą wrażliwość tego złożonego procesu na niedobór tlenu, nie wyjaśniają jednak przyczyn tego zjawiska.

## I-2. Cel pracy

Przedstawione powyżej dane z piśmiennictwa wskazują wyraźnie na odrębny, wyprzedzający pojawienie się deficytu energetycznego, mechanizm zaburzeń towarzyszących łagodnym postaciom niedotlenienia.

Wydawało się uzasadnione przyjęcie hipotezy, że przyczyną obserwowanych zaburzeń metabolicznych i czynnościowych w skompensowanym energetycznie niedotlenieniu może być czasowe ograniczenie zużycia ATP w procesach istotnych dla funkcji, lecz nie dla utrzymania integralności /przeżycia/ komórek. Dlatego też w badaniach skoncentrowano się na ocenie podstawowych przemian zużywających ATP ze szczególnym uwzględnieniem procesów syntez związków makromolekularnych. Z uwagi na znaczenie przemiany glukozy w cyklu pentozowym i jej ścisłą korelację z procesami syntez lipidów i kwasów nukleinowych, określono jej aktywność w mózgu w czasie niedotlenienia. Część zagadnień, dotyczących regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu glukozy, a szczególnie jej wykorzystania w procesach syntezy związków makromolekularnych oraz w przemianie prowadzącej do powstania pentoz, opracowano w układach modelowych *in vitro*. Ocenę utrwalonych skutków niedotlenienia przeprowadzono na podstawie analizy zmian w lipidach mózgu, frakcji makromolekularnej najbardziej podatnej na uszkodzenia związane z deficytem tlenowym.

## II. M A T E R I A Ł I M E T O D Y

### II-1. Model niedotlenienia

Badania wykonano na samcach szczurów rasy Wistar o ciężarze ciała 200-250 gramów.

Przed przystąpieniem do właściwego doświadczenia zwierzęta poddawano krótkotrwałej narkozie przy użyciu mieszaniny halo-  
tanu i podtlenku azotu według metody opisanej przez Lewisa /105/. Umożliwiało to wprowadzenie do tętnicy ogonowej kaniuli służącej następnie do pobierania próbek krwi w czasie właściwego doświadczenia, a także do założenia czujnika temperatury.

W półtorej godziny po przygotowawczym zabiegu zwierzęta umieszczano w hermetycznej komorze o pojemności 25 l. Niedotlenie hipoksyjne wywoływano przy użyciu mieszaniny gazowej zawierającej 7% tlenu w azocie, przepuszczanej przez komorę z szybkością 2 l/min. W większości doświadczeń niedotlenie prowadzono przez 2 godz. W uzasadnionych przypadkach, jak podano w odpowiednich rozdziałach pracy, przedłużano je do 3 godz. Ciepłotę ciała szczurów niedotlenianych utrzymywano na poziomie kontroli, nagrzewając je lampą lub poduszką elektryczną. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi prowadzono przez cały czas trwania eksperymentu.

Tabela 1 przedstawia porównanie parametrów krwi u szczurów badanych w półtorej godziny po zabiegu przygotowawczym /kiedy rutynowo rozpoczynano niedotlenie/, z danymi z piśmiennictwa /18, 105/, dotyczącymi szczurów nieusypianych. Otrzymane wyniki nie różnią się w sposób istotny i pozwalają traktować tę grupę zwierząt na równi ze zwierzętami nieusypianymi.

Tabela 1. Parametry gazowe krwi tętnicznej szczeniów przed niedotlenieniem w porównaniu z danymi z piśmiennictwa.

	Liczba zwierząt	paO <sub>2</sub> /mmHg/	paCO <sub>2</sub> /mmHg/	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> x /mmo.l/l/
Domańska-Janik i Zalewska /48/	8	88,1±1,25	39,9±0,32	7,39±0,014	24,0
Burlington i wsp. /18/	6	91,7±1,7	40,7±1,7	7,42±0,011	25,2
Lewis i wsp. /105/	128	90,6±1,5	40,9±0,4	7,43±0,004	27,8

x Stężenie dwuwęglanów HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> obliczono na podstawie wartości paCO<sub>2</sub> i pH z normogramu Siëgaard-Andersen'a /152/.

/Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1980, 7, 207-214/.

## II-2. Preparatyka mózgu

Mózg do badań pobierano w różnych czasach trwania niedotlenienia jak również w różnych okresach po przebytych niedotlenieniu. Zwierzęta dekapitowano i mózg wypreparowywano oddzielając opony i naczynia. Podział anatomiczny mózgu przeprowadzano wg schematu podanego przez Głowińskiego i Iversena /65/. Preparatykę prowadzono w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ .

Część oznaczeń przeprowadzano na mózgach wypreparowanych z głów szczurów, które natychmiast po dekapitacji zamrażano w ciekłym azocie. Jedną grupę badań wykonano na mózgach zwierząt w całości zamrażanych w ciekłym azocie /z wyłączeniem dekapitacji/. Dalszy podział, ważenie i ekstrakcję przeprowadzano w tych przypadkach w temperaturze nie przekraczającej  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## II-3. Materiał doświadczalny

Wypreparowany mózg używano bądź do bezpośredniej ekstrakcji badanych związków, bądź też do sporządzenia materiału do dalszych doświadczeń *in vitro*.

Skrawki mózgu o grubości  $0,4$  mm preparowano w chłodni w temperaturze nie przekraczającej  $10^{\circ}\text{C}$ . Po przemyciu zimnym  $0,9\%$  NaCl i zważeniu, umieszczano je w naczynkach Warburga /ok.  $100$  mg wilgotnej masy na naczynko/ w medium Krebsa-Ringera o pH  $7,4$ . Większość doświadczeń przeprowadzano w atmosferze tlenu, temp.  $37^{\circ}\text{C}$  i w objętości końcowej  $2$  ml, używając  $2$  mM glukozy jako substratu.

Homogenaty tkanki / $10\%$  v/v/ otrzymywano w  $0,3\%$  mannitolu z dodatkiem  $0,1$  mM EDTA o pH  $7,5$ .

Frację cytoplazmatyczną i mitochondrialną homogenatu mózgu otrzymywano drogą różnicowego wirowania, stosując rutynowe metody /129/.

#### II-4. Badania przemiany podstawowej glukozy w mózgu szczura

a/ Badania radioizotopowe in vivo przeprowadzano w różnym czasie po dootrzewnym podaniu znakowanej glukozy. Szczegółowy opis eksperymentu podano w odpowiednim rozdziale /IV-1./.

Aktywność specyficzną glukozy oznaczano zarówno we krwi, jak i w mózgu. Oznaczenia przeprowadzono w próbkach, które po odbiałczeniu i neutralizacji przesączało przez kolumny wymienniczy jonowych Dowex 1-XB oraz Dowex 50-X8, o wymiarach 0,5 x 2 cm. Stężenie glukozy i jej radioaktywność określano w wycieku z kolumny. Zgodnie z piśmiennictwem /121/ wykazano, że postępowanie to jest wystarczające do usunięcia z przesącza wszystkich polarnych metabolitów glukozy.

W badaniach tych przeprowadzono również rozdział nadsącza homogenatu mózgu otrzymanego w 5% kwasie trójchlorooctowym /TCA/ na dwie frakcje: nioaminokwasową i aminokwasową. W tym celu użyto kolumny ZeO-karb 225 wg metody podanej przez Vrba i wsp. /167/. Sprawdzenie metody przeprowadzono na standardach, rozdzielając izotopy 6- $[^3\text{H}]$ -glukozy i U- $[^{14}\text{C}]$ -leucyny.

Izolację i pomiar aktywności izotopowej frakcji makromolekularnych przeprowadzono wg metod podanych w rozdziale następnym /II-5/.

b/ Badania metabolizmu glukozy w skrawkach mózgu szczura. Skrawki tkankowe wypreparowane z mózgu umieszczano w naczynekach Warburga w warunkach podanych uprzednio.

Izotopy glukozy lub inne znaczniki o znanej aktywności specyficznej podawano z ramienia bocznego naczynka Warburga po 10 min preinkubacji skrawków.

Pomiary zużycia tlenu wykonywano manometrycznie. Dwutlenek węgla adsorbowano na bibule filtracyjnej wysyczonej 50% roztworem hiaminy, umieszczonej w studziencie naczynka Warburga. Inkubację skrawków kończono przez dodanie 0,2 ml 20% kwasu nadchlorowego /PCA/ z drugiego ramienia bocznego naczynka. Skrawki wytrząsano przez dalsze 45 min w celu całkowitego zaadsorbowania  $\text{CO}_2$  wytworzonego w czasie inkubacji. Następnie bibulę przenoszono do naczynek z płynem Braya i mierzono radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym.

Zużycie glukozy i produkcję kwasu mlekowego mierzono w medium inkubacyjnym wg metody podanej w rozdziale następnym /II-6/.

Ekstrakcję białek, lipidów i kwasów nukleinowych ze skrawków po inkubacji, przeprowadzano wg metod podanych w rozdziale II-5.

c/ Badania metabolizmu glukozy we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu mózgu szczura

Inkubację przeprowadzano również w naczynkach Warburga w warunkach jak opisano poprzednio i w końcowym stężeniu białka wynoszącym 3-3,5 mg/ml. Standardowa mieszanina inkubacyjna zawierała 1 mM ATP, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{NAD}^+$ , 30 mM nikotynamid, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM bufor glicylglicynowy o pH 7,4.

Aktywność glikolityczną oznaczano używając kolejno 5 mM roztworów glukozy, G6P i F-1,6-P jako substratów, poprzez pomiar przyrostu kwasu mlekowego w określonym czasie inkubacji.

Aktywność utleniania glukozy w reakcjach związanych z cyklem

pentozowym /DH-G6P i DH-6PGA/ mierzono poprzez sprzężenie ich z redukcją egzogenego glutationu /43/.

W tych doświadczeniach, medium inkubacyjne, identyczne jak do pomiarów aktywności glikolitycznej, zostało wzbogacone o 0,5 mM NADP<sup>+</sup> i 2,5 mM GSSG. Szybkość redukcji glutationu mierzono poprzez oznaczanie przyrostu niebiałkowych grup SH w czasie inkubacji wg metody Ellmana /54/.

## II-5. Metody ekstrakcji i analizy frakcji makromolekularnych z mózgu szczura

Kolejność ekstrakcji frakcji makromolekularnych zarówno z homogenatów tkanki jak i skrawków mózgu oparto na schemacie opisanym przez Glazera i Webera /64/.

### Lipidy

Ekstrahowano wg metody Foloha /59/. Frakcję chloroformowo: metanolową /2:1 v/v/ suszono w strumieniu azotu i rozpuszczano w chloroformie: metanolu /2:1/ do dalszej analizy metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Gangliozydy ekstrahowano do górnej fazy Foloha. Związany z lipidami kwas sialowy oznaczano wg metody rezorcynolowej Svennerholma /158/ po uprzednim usunięciu drogą dializy substancji niskoozasteczkowych.

Fosfolipidy oznaczano ilościowo w dolnej fazie Foloha przez określenie w niej fosforanu nieorganicznego wg metody Fiske-Subarrowskiej zmodyfikowanej przez Bartletta i wsp. /60/.



Glikolipidy w dolnej fazie ekstraktu Folcha oznaczano poprzez określenie ilości galaktozy wg metody orcynolowej Svennerholma /159/.

Kwasy tłuszczowe wyodrębniano poprzez saponifikację ekstraktów lipidowych wg metody Katesa /97/.

Chromatografię cienkowarstwową lipidów dolnej fazy Folcha przeprowadzano wg metody Opieńskiej-Blaut /127/.

Rozdział chromatograficzny otrzymywano na żelu krzemionkowym II w mieszaninie chloroformu : metanolu : amoniaku /14:6:1 v/v/. Poszczególne plamy wywoływano w parach jodu i identyfikowano przez porównanie ich ruchliwości z równoległe chromatografowanymi standardami.

#### Kwasy nukleinowe

Odlipidowany osad ogrzewano przez 20 min w 90°C w 5% TCA o objętości 5 krotnie przewyższającej wyjściową masę tkanki. Po odwirowaniu nadsącza osad przemywano 2 krotnie zimnym 5% TCA. Połączony nadsącz używano do oznaczeń radioaktywności i absorbcji przy długości fali światła 268,5 nm wg metody Logana i wsp. /107/ wyrażając stężenie kwasów nukleinowych ilością zawartego w nich fosforu nieorganicznego.

#### Białka

Pozostały po ekstrakcji kwasów nukleinowych osad przemywano kolejno: 96% alkoholem etylowym, acetonem i eterem etylowym. Po odwirowaniu i osuszeniu, pozostały osad ważono i rozpuszczano w NCS /preparat firmy Nuclear Chicago/ w celu pomiaru radioaktywności.

W części doświadczeń białko w pełnym homogenacie oznaczano ilościowo metodą Lowry'ego /110/.

Pomiary radioaktywności wykonywano w liczniku scyntylicyjnym Isocap 300 firmy Merck, używając firmowych scyntylatorów: spocetrafluor/toluen w przypadku frakcji niepolarnych oraz mieszaniny Braya w przypadku frakcji rozpuszczalnych w wodzie. Radioaktywność obliczano z użyciem standardów wewnętrznych i zewnętrznych i wyrażano ilością rozpadów na minutę /dpm/ w przeliczeniu na jednostki właściwe dla danych frakcji.

Azot  $\alpha$ -aminowy oznaczano wg metody ninhydrynowej /162/.

#### II-6. Oznaczanie stężeń substratów w mózgu szczura

a/ Oznaczenia spektrofluorymetryczne G6P, 6PGA, CrP, ATP, ADP, AMP i pirogronianu

Przygotowanie tkanki: 200 mg zamrożonej w ciekłym azocie tkanki homogenizowano w 0.4 ml roztworu 0,1 M HCl w 100% etanolu. Homogenat inkubowano przez 12 godz. w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$ . Następnie dodawano 2 ml 0,3 M  $\text{HClO}_4$  zawierającego 0,1 mM EDTA i wirowano przez 25 min przy 500 g. Nadsącz zbierano i uzupełniano do stałej objętości buforem 0,5 M trójetanolaminy-HCl pH 7,6 z 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Po sedymentacji klarowną frakcję używano do pomiarów.

W przypadku oznaczania substratów we krwi postępowano jak wyżej, z tym, że zamrożoną w ciekłym azocie krew ekstrahowano w objętościach obniżonych odpowiednio do wagi próby.

Pomiary wykonywano na spektrofluorymetrze firmy Aminoo-Bowman, przy długości fali wzbudzenia 340 nm i emisji 465 nm oraz

szczelinach 3/2/0,5 mm.

Dokładne warunki oznaczania poszczególnych substratów podano w załączonej tabeli 2. Skład mieszanin inkubacyjnych oparto na warunkach podanych w pracy Macmillana i Siesjö /113/.

Używano w reakcjach NADH pozbawione było zanieczyszczeń przez AMP wg metody opisanej przez Folbergrovą /57/.

Standardy: G6P, 6PGA, CrP, ATP, ADP, AMP i pirogronianu /firmy Sigma/ przygotowywano jako roztwory 1 mM, a ich dokładne stężenia oznaczano metodami spektrofotometrycznymi. Po oznaczeniu fluorometrycznym stężenia endogennych substratów, w tej samej kiuwecie wykonywano każdorazowo pomiary ich standardowych roztworów w zakresie stężeń 1-3  $\mu\text{M}$ , a w przypadku nukleotydów adeninowych od 0,5 - 7,5  $\mu\text{M}$ .

b/ Oznaczenia spektrofotometryczne glukozy i kwasu mlekowego

Do badań używano ekstraktów tkankowych otrzymywanych jak w przypadku oznaczeń fluorometrycznych.

Glukozę oznaczano przy użyciu metody enzymatycznej w sprzężonej reakcji heksokinazy i dehydrogenazy G6P wg Schmidta /145/.

Medium reakcyjne zawierało: bufor trójetanolaminowy 0,3 M pH 7,5,  $\text{MgSO}_4$  4 mM; NADP 0,4 mM; ATP 0,5 mM, heksokinazę i  $\text{NAD}^+\text{-G6P}$  o aktywności 1,5  $\mu\text{m/ml}$ .

Reakcję przeprowadzano przy długości fali 340 nm do całkowitego zatrzymania /ok. 10 min/ wobec ślepej próby odczynnikowej.

Tabela 2. Skład mieszanin inkubacyjnych do oznaczeń spektrofluorymetrycznych substratów mózgu szczura.

Substrat oznaczany	Bufor	Dodatkowe składniki	Enzymy	Ekstrakty tkanki	Czas pomiaru
G6P	Tris 100 mM pH 8,0	NADP <sup>+</sup> - 0,03 mM DTT - 0,2 mM	DH-G6P 1,0 μg/ml	100 μl	10-15 min
6PGA	Tris 100 mM pH 8,0	NADP <sup>+</sup> - 0,03 mM DTT - 0,2 mM	DH-6PGA 0,5 μg/ml	100-150 μl	10-15 min
Pirogronian	PI 100 mM pH 6,8	EDTA - 0,06 mM DTT - 0,2 mM NADH - 0,003 mM ADP - 0,1 mM Octan amonu 240 mM	LDH 0,5 μg/ml	100 μl	10 min
ATP	Tris 100 mM pH 7,5	Glukoza 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM DTT 0,2 mM NADP <sup>+</sup> 0,03 mM	Heksokinaza 1 μg/ml DH-G6P 1,0 μg/ml	10 μl	10-15 min
CrP	Tris 100 mM	j.w. z dodatkiem ADP 0,03 mM	j.w. z dodatkiem kinazy kreatyny 80 μg/ml	10 μl	20 min
ADP	PI 50 mM pH 7,0	Pirogronian 0,02 mM ATP 0,02 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 0,2 mM NADH 0,004 mM	LDH 8 μg/ml PK 2 μg/ml	100 μl	30-40 min
AMP	Ta sama próba po dodaniu kinazy adenylationowej 2 μg/ml				30-40 min

### Kwas młokowy

Oznaczano metodą enzymatyczną wg Horna i Bruna /86/ w reakcji dehydrogenazy młeczanej. Medium reakcyjne zawierało: bufor glicynowy 0,5 M pH 9,0; NAD 2,5 mM; LDH 5 j/ml. Reakcję przeprowadzano przy długości fali 340 nm do oalkowitego zatrzymania wobec ślepej próby odczynnikowej.

Pomiary wykonywano na spektrofotometrze firmy Unicam SP 500 w kiuwetach o pojemności 0,4 ml i długości drogi światła 1 cm.

#### c/ Oznaczanie 3',5'-cAMP przy użyciu metody radioizotopowej

Poziom 3',5'-cAMP był mierzony w ekstraktach mózgu przygotowanych wg zasad podanych w opisie metod spektrofluorymetrycznych. Oznaczenie było oparte na współzawodnictwie wiązania nieznakowanego, endogennego 3',5'-cAMP o miejsca wiążące radioaktywny substrat do białka o wysokim powinowactwie. Oznaczenia były wykonywane z użyciem standardowych testów firmy Boehringer.

#### II-7. Oznaczanie aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym w mózgu szczura

Aktywność enzymów badano we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu mózgu. Homogenaty tkanki otrzymywano w 0,1 M buforze fosforanowym pH 7,5 /1:9 w/v/ i wirowano 30 min w 20 000 g. Aktywność DH-G6P i DH-6PGA oznaczano wg metody Lohra /108/. W warunkach inkubacyjnych podanych w tabeli, zmiany absorbancji mierzone w długości fali 340 nm, były liniowo zależne od stężenia białka próby i czasu reakcji do 10 min trwania pomiaru. Aktywności enzymatyczne wyrażano w  $\mu$ molach NADPH powstającego

w czasie godzinnej inkubacji z 1 mg białka supernatantu stosując molowy współczynnik ekstynkcji  $E = 6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

Tabela 3. Warunki oznaczania aktywności enzymów w cytoplazmie mózgu szczura

Enzym	Bufor	Substrat	Dodatkowe składniki
DH-G6P	0,1 M Pi	0,4 mM G6P	1 mM NADP 4 mM $\text{MgCl}_2$ 4 mM EDTA
DH-6PGA	0,1 M Tris-HCl	1,0 mM 6PGA	1 mM NADP 0,5 mM EDTA 0,05% BSA

#### II-8. Analiza statystyczna wyników

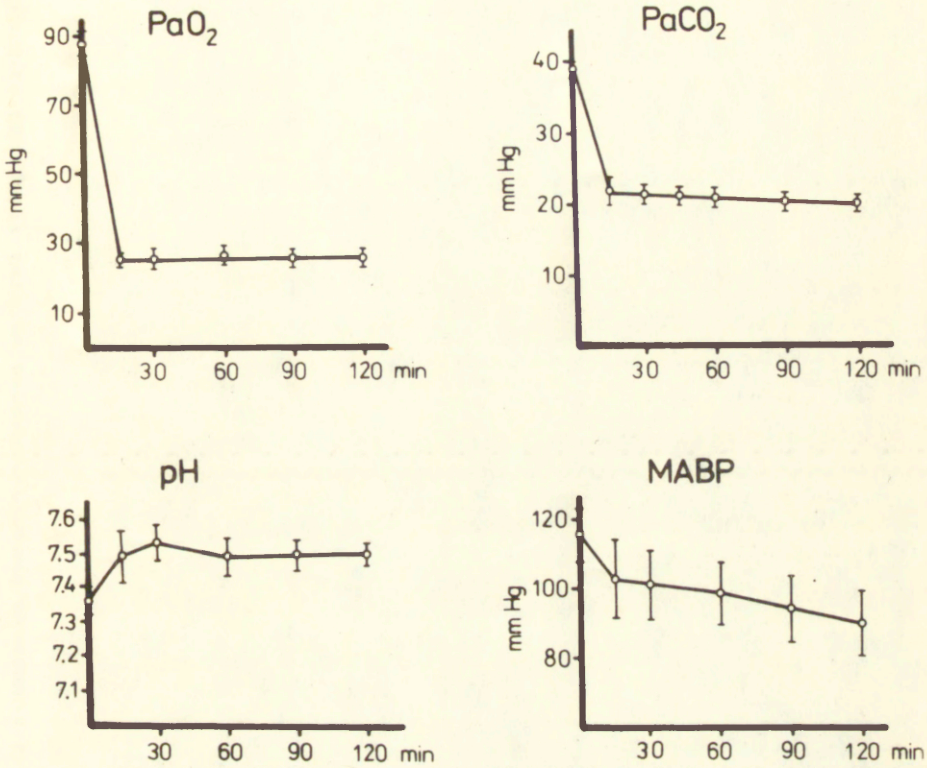
Wyniki wyrażano jako średnie arytmetyczno z podanej ilości doświadczeń  $\pm$  odchylenie standardowe /SD/ lub średni błąd standardowy /SEM/.

Znamiennosc statystyczną różnic pomiędzy danymi liczbowymi obliczano na podstawie testu t Studenta. Jako znamienne przyjmowano wartości dla których  $p < 0,05$ .

### III. W Y N I K I    B A D A Ń

#### III-1. Charakterystyka modelu niedotlenienia

W czasie niedotlenienia szczury były pobudzone ruchowo przez pierwsze 30 min, a następnie ich aktywność ruchowa sukcesywnie malała. Występująca w 2-giej godzinie stopniowa utrata reakcji szczurów na bodźce zewnętrzne wskazywała na wystąpienie śpiączki. Wartości ciśnienia parcjalnego tlenu w krwi tętniczej oscylowały na poziomie 25 mmHg /Tabela 1, Wykres 1/. Towarzyszył temu znaczny spadek ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla do poziomu 20 mmHg, spowodowany hiperwentylacją zwierząt niedotlenianych. Znaczne obniżenie  $p_{aCO_2}$  wpływało na ustalenie się tendencji do alkalizacji krwi tętniczej, pomimo towarzyszącej kwasicy metabolicznej. Wykładnikiem kwasicy metabolicznej było obniżenie się zasobu zasad oraz wysoki poziom tzw. nieskompensowanego przyrostu mleczanu /14/ w niedotlenieniu /Tabela 4/. Względna stabilność badanych zmiennych krwi w czasie trwania niedotlenienia ilustruje wykres 1. Jedynie ciśnienie tętnicze krwi obwodowej wykazywało stałą tendencję zniżkową w czasie niedotlenienia, przy czym w żadnym przypadku nie spadało poniżej 80 mmHg. Biorąc pod uwagę, że w opisanych warunkach niedotlenienia przepływ mózgowy krwi wzrasta /15/, wydaje się, że nieznaczny spadek ciśnienia obwodowego nie powinien odbić się na ukrwieniu mózgu.



**Wykres 1.** Ciśnienie cząstkowe tlenu, dwutlenku węgla, pH i średnie ciśnienie /MABP/ krwi tętniczej szczurów w czasie 2 godz. niedotlenienia mieszaniną 7% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. Średnie wyniki z 8 doświadczeń  $\pm$ SD. /Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1980, 7, 207-214/.



Tabela 4. Parametry gazowe i równowaga kwasowo-zasadowa we krwi tętnicznej szczurów poddanych niedotlenieniu.

	paO <sub>2</sub> /mmHg/	paCO <sub>2</sub> /mmHg/	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mmol/l/	Zasób zasad /mmol/l/	Mleczan /mmol/kg/	Pirogro- nian /mmol/kg/	Nadmiar mleczanu /mmol/kg/	Stosunek Mleczan Pirogro- nian
Kontrola	88,0±3,54	39,9±0,90	7,39±0,04	24,0	-0,5	0,86±0,20	0,109±0,022	-	7,9
Hipoksja 1 godz.	26,2±2,21 <sup>xx</sup>	20,6±1,19 <sup>xx</sup>	7,50±0,06 <sup>x</sup>	15,7	-4,0	3,28±0,56 <sup>xx</sup>	0,151±0,038 <sup>x</sup>	2,09	21,7
Hipoksja 2 godz.	24,5±2,78 <sup>xx</sup>	20,1±1,04 <sup>xx</sup>	7,51±0,03 <sup>xx</sup>	16,5	-4,5	3,88±0,50 <sup>xx</sup>	0,181±0,056 <sup>xx</sup>	2,45	21,4

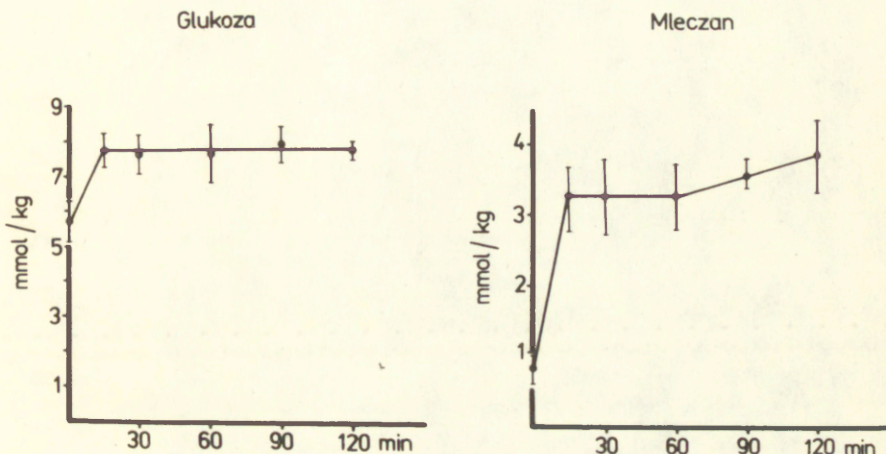
Zasób zasad obliczono wg Siggaard-Anderssen /152/. Nadmiar mleczanu wg Huekabee /141/.

Średnie wartości z 5-8 doświadczeń ±SD. Wartości różniące się znacznie od kontroli oznaczano:

<sup>x</sup>p < 0,01, <sup>xx</sup>p < 0,001.

Domanińska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1980, 7, 207-214/

Dynamika zmian poziomu glukozy i mleczanu we krwi tętniczej w czasie niedotlenienia przedstawiona jest na wykresie 2.



Wykres 2. Stężenie glukozy i kwasu mlekowego we krwi tętniczej szczurów niedotlenianych 2 godz. mieszaniną 7% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. Średnie wyniki z 8 doświadczeń  $\pm$ SD. /Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1980, 7, 207-214/.

Stężenie glukozy wzrastało do 136% wartości kontroli we wczesnym okresie niedotlenienia i pozostawało na tym poziomie przez 2 godz. trwania eksperymentu. Wzrost poziomu mleczanu we krwi

osiągał w pierwszej godzinie wartości 381% kontroli, a w drugiej dochodził do 451%.

Jednakże jak przedstawiono w tabeli 4, pomimo narastania stężenia mleczanu w drugiej godzinie trwania niedotlenienia równowaga kwasowo-zasadowa krwi pozostawała niezmienną w stosunku do wartości otrzymanych po jednogodzinnej hipoksji. Poziom pirogronianu wzrastał równolegle do poziomu mleczanu i stosunek mleczan/pirogronian nie ulegał zmianie począwszy od 15 minut niedotlenienia. Stabilność zmiennych krwi obwodowej w ciągu 2 godz. eksperymentu wskazuje na prawidłową adaptację układową /krążenia, oddychania, reakcji hormonalnych/ organizmu szczura do występującego niedostatku tlenowego i stanowi argument przeciwko załamaniu się krążenia i narastaniu komponentu niedokrwiennego jako dodatkowego czynnika patogenicznego wkładającego obraz badanej hipoksji.

### III-2. Wpływ niedotlenienia na poziom metabolitów związanych z przemianą energetyczną mózgu

Poziom związków wysokoenergetycznych /ATP oraz sumy nukleotydów adeninowych/ w mózgu szczura nie zmieniał się w sposób istotny w ciągu 2 godz. trwania niedotlenienia /Tabela 5/. Jedynie stężenie fosforanu krotajny /CrP/ ulegało nieznacznemu lecz statystycznie znamiennemu obniżeniu. Biorąc jednak pod uwagę, że w warunkach znacznej akumulacji mleczanu, stała równowagi pH-zależnej reakcji kinazy kreatynowej ulega przesunięciu, należy przyjąć, że wybiórcze obniżenie poziomu substratu tej reakcji w tkance nie odzwierciedla deficytu energetycznego, a jedynie zmianę wewnątrzkomórkowego pH /113/ w kierunku kwasicy metabolicznej.

Tabela 5. Stężenia metabolitów w mózgu szczurów poddanych niedotlenieniu.

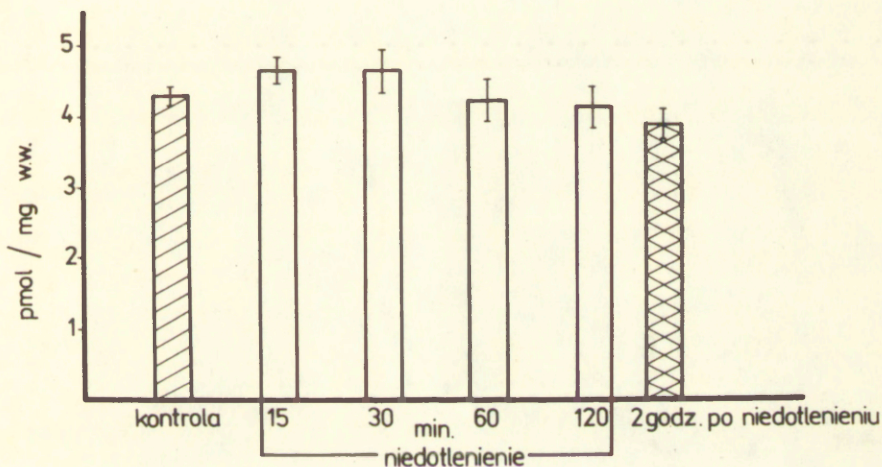
	ATP /mmol/kg/	CrP /mmol/kg/	ATP+ADP+AMP /mmol/kg/	Glukoza /mmol/kg/	Pirogronian /mmol/kg/	Mleczan /mmol/kg/	G6P /mmol/kg/	Stosunek Mleczan Pirogronian
kontrola	3,16±0,25	3,99±0,25	3,65	1,53±0,21	0,091±0,007	1,88±0,52	0,110±0,006	20,6
15 min.	2,90±0,29	3,18±0,33 <sup>x</sup>	3,61	1,14±0,17 <sup>x</sup>	0,175±0,022 <sup>x</sup>	9,8 ±1,85 <sup>x</sup>	0,063±0,005 <sup>x</sup>	56,0
30 min.	3,13±0,08	3,38±0,55 <sup>xx</sup>	3,69	1,61±0,28	0,172±0,018 <sup>x</sup>	9,0 ±0,41 <sup>x</sup>	0,105±0,012	52,3
60 min.	2,82±0,06	3,40±0,43 <sup>xxx</sup>	3,41	2,13±0,33 <sup>x</sup>	0,158±0,029 <sup>x</sup>	8,0 ±0,45 <sup>x</sup>	0,095±0,005	50,6
20 min.	3,04±0,10	3,36±0,09 <sup>x</sup>	3,55	2,50±0,31 <sup>x</sup>	0,168±0,011 <sup>x</sup>	8,27±0,79 <sup>x</sup>	0,202±0,025 <sup>x</sup>	49,2

Średnie wartości z 4 doświadczeń oznaczonych w 2 powtórzeniach ±SD.

Wyniki różniące się znamienne od wartości kontrolnych oznaczano: <sup>x</sup>p < 0,001, <sup>xx</sup>p < 0,01, <sup>xxx</sup>p < 0,001.

/Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1980, 7, 207-214/.

Niedotlenienie nie wpływało również w sposób istotny na stężenie 3',5'-cAMP w mózgu szczura. Wykres 3 ilustruje otrzymano wyniki. Nieznaczny wzrost poziomu 3',5'-cAMP, zaznaczający się w pierwszych 30 min. trwania niedotlenienia, nie miał cech znamienności statystycznej. W grupie szczurów badanych w pierwszej i drugiej godzinie niedotlenienia, jak również w dwie godziny po zakończeniu niedotlenienia, stężenie 3',5'-cAMP w mózgu kształtowało się na poziomie wartości kontrolnych.



Wykres 3. Wpływ niedotlenienia na stężenie 3',5'-cAMP w mózgu szczura.

Średnie wyniki z 4 do 8 doświadczeń wykonywanych w 2 powtórzeniach  $\pm$ SEM.

/Khachatryan, Domańska-Janik, Bull. Pol. Acad. Sci. 1980, 10, 667-673/.

Pomimo braku bezpośrednich wykładników zakłóconej równowagi energetycznej mózgu, pod wpływem niedotlenienia, obserwowano znaczne przyspieszenie glikolizy beztlenowej /Tabela 5/ przejawiające się gromadzeniem młoczanu, którego stężenie docho- dziło do 500% wartości kontrolnej. Również istotne zmiany ob- serwowano w stężeniach pośrednich metabolitów przemiany gliko- litycznej mózgu w czasie hipoksji.

Zawartość pirogronianu wzrastała już po 15 min. niedotlenienia o około 100% i utrzymywała się na tym poziomie do końca doświad- czenia. Również stosunek młoczanu do pirogronianu utrzymywał się na stałym, zwiększonym w czasie niedotlenienia poziomie. Nato- miast stężenie glukozy w tkance, po początkowym spadku do 74% wartości kontrolnej w grupie zwierząt niedotlenianych przez 15 min, wykazywało stałą tendencję wzrostową, osiągając po 2 godz. 163% wartości kontrolnej. W grupie szczurów niedotle- nianych przez 2 godz. wzrastał jednocześnie poziom G6P o 83% w stosunku do kontroli.

Dynamika zmian stężeń metabolitów związanych z przemianą glikolityczną w mózgu wskazuje na aktywację glikolizy na pozio- mie reakcji enzymatycznych leżących na drodze przemiany G6P do pirogronianu /48/. Wzrastające stężenie G6P w drugiej godzinie niedotlenienia może wskazywać również na stopniową stymulację reakcji heksokinazowej w mózgu. Ewentualny mechanizm takiej stymulacji był omawiany w naszych wcześniejszych pracach /44, 48/. Jednakże ze względu na kontrowersyjne poglądy na temat rzeczywistego stężenia wewnątrzkomórkowego glukozy w mózgu, szczególnie w warunkach niedotlenienia /zagadnienie to będzie poruszane później/ trudno jest o jednoznaczną interpretację tego zjawiska.

### III-3. Ocena dynamiki metabolizmu energetycznego mózgu szczura w okresie niedotlenienia i po niedotlenieniu

W poprzednim rozdziale przedstawiono wyniki oznaczeń stężeń substratów związanych z metabolizmem energetycznym mózgu szczurów poddanych umiarkowanemu niedotlenieniu. Stały poziom podstawowych związków wysokoenergetycznych u badanych zwierząt nie wyklucza jednak zmian szybkości ich zużywania w energochłonnych procesach metabolicznych, co zapobiegałoby wystąpieniu deficytu energetycznego nawet przy zmniejszonej ogólnej ich syntezie.

W celu scharakteryzowania takich skompensowanych zmian regulacyjnych które mogłyby występować w umiarkowanym niedotlenieniu, zastosowano do badań tzw. "metaboliczny układ zamknięty" opisany przez Lowryego w 1964 r. /111/.

#### Technika doświadczenia

Szczury, zarówno kontrolne jak i poddane 2 godz. niedotlenieniu dekapitowano i głowy zamrażano w ciekłym azocie w ściśle określonym czasie od momentu dekapitacji /1, 3, 10, 30 sek./.

Wyściowe stężenie substratów w mózgu /w tzw. czasie "0"/ oznaczano u zwierząt w całości zamrażanych w ciekłym azocie.

W mózgach szczurów po dekapitacji, wskutek całkowitego odcięcia dopływu krwi, następują skrajne warunki anoksyjno-ischemiczne, z maksymalną stymulacją glikolizy beztlenowej, jako jedyne źródła energetycznego, oraz z szybkim wyczerpywaniem się rezerw energetycznych.

Zarówno szybkość powstawania mleczanu jak i zużycia reszt fosforanowych w związkach wysokoenergetycznych /CrP, ATP, ADP/

odzwierciodlają w tych warunkach aktywność metabolizmu podstawowego mózgu i potencjonalne możliwości regulacyjne tych procesów w tkance<sup>x</sup>.

Wykres 4 przedstawia zużycie związków wysokoenergetycznych /  $\Delta \sim P$ / w mózgu po dekapitacji jako funkcję czasu mierzonego od odcięcia dopływu krwi do mózgu. Prostoliniowość przebiegu krzywej w okresie 30 sek. po dekapitacji w grupie kontrolnej wskazuje na możliwość wykonywania dalszych badań szybkości zużycia rezerw wysokoenergetycznych /  $\Delta \sim P$ / w tej właśnie grupie czasowej. Zagięcie się krzywej w grupie badanej bezpośrednio po niedotlenieniu może odzwierciedlać zmianę proporcji w wykorzystywaniu wysokoenergetycznych reszt fosforanowych. W grupie zwierząt badanych w 6 godz. po niedotlenieniu funkcja zużycia  $\Delta \sim P$  odzyskuje swój prostoliniowy charakter.

Szczegółowe wartości stężeń substratów, które posłużyły do obliczenia szybkości zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych, przedstawiono w tabeli 6.

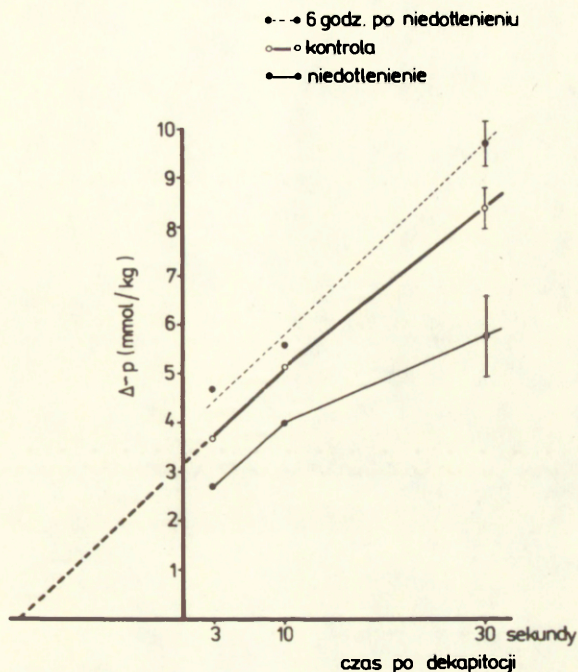
U zwierząt dekapitowanych bezpośrednio po 2 godzinnym niedotlenieniu, szybkość zużycia związków wysokoenergetycznych - CrP i ATP - zostaje wydatnie obniżona.

W tej samej grupie szczurów niedotlenionych szybkość zużycia glukozy i produkcja mleczanu w wyniku dekapitacji wzrastała znamienne /Tabela 6/.

---

<sup>x</sup> Należy zwrócić uwagę, iż sama dekapitacja wywołuje potężny stres i wpływ tego dodatkowego czynnika na regulację metabolizmu mózgu jest sprawą otwartą.





Wykres 4. Wpływ niedotlenienia na zużycie związków wysokoenergetycznych /  $\Delta \sim P$  / w mózgu szczurów po dekapitacji.

Średnie wyniki z 6 doświadczeń w każdej grupie czasowej. Odchylenie standardowe podano dla najdłuższych czasów po dekapitacji.

/Zalewska, Domańska-Janik, Resuscitation 1980, 7, 199-205/.

Tabela 6. Szybkość zużycia poszczególnych substratów energetycznych po dekapitacji w mózgu szczura w normie, niedotlenieniu i po przebytych niedotlenieniu.

	Fosfokreatyna	ATP	ADP	Glukoza	Mleczan
		/ mmol/30 sek./	/ kg tkanki /		
Kontrola	3,65±0,26	2,21±0,31	0,35±0,17	1,31±0,22	2,73±1,23
Niedotlenienie	2,43±0,94 <sup>x</sup>	1,54±0,30 <sup>x</sup>	0,32±0,09	1,84±0,32 <sup>x</sup>	3,62±1,50 <sup>x</sup>
6 godz. po niedotlenieniu	3,97±0,45	2,76±0,22 <sup>x</sup>	0,29±0,03	1,47±0,52	4,91±1,80 <sup>x</sup>

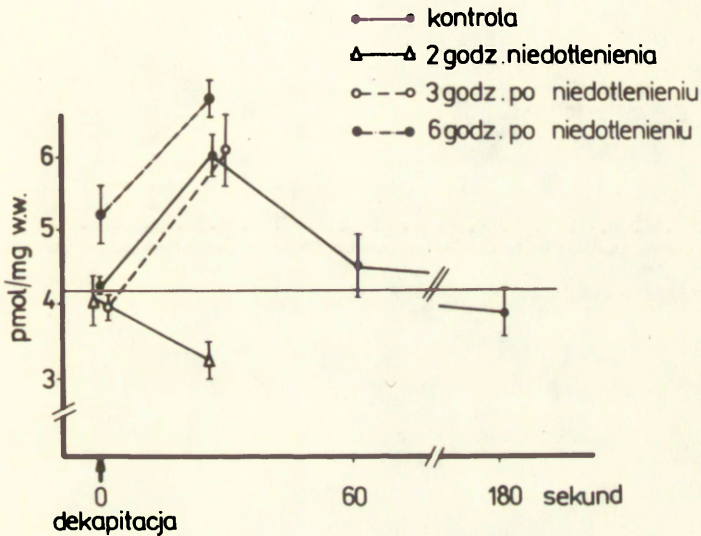
Wyniki przedstawiają różnicę stężeń substratów oznaczanych bezpośrednio w tzw. czasie "0" i w 30 sek. po dekapitacji.

Do obliczeń posłużyły średnie arytmetyczne z 6 doświadczeń w każdej grupie ±SD.

Wartości różniące się znacznie od kontroli /p < 0.05/ oznaczono x.

/Zalewska, Domańska-Janik, Resuscitation 1980, 7, 197-205/.

Szczególnie interesującą wydaje się obserwacja, że w mózгах szczurów po niedotlenieniu poziom  $3',5'$ -cAMP nie zmienia się pod wpływem dekapitacji /Wykres 5/. Stanowi to wyraźną różnicę w porównaniu do grupy kontrolnej, w której obserwowano znamien-ny wzrost stężenia tego metabolitu w 30 sek. po dekapitacji.



Wykres 5. Wpływ niedotlenienia na stężenie  $3',5'$ -cAMP w mózgu szczurów po dekapitacji. Średnie wyniki z 4-8 doświadczeń  $\pm$ SEM. /Khachatryan, Domańska-Janik, Bull. Pol. Acad. Sci. 1980, 10, 667-673/.

Otrzymane wyniki wskazują wyraźnie, że w wyniku niedotlenienia dochodzi do zmiany regulacji przemiany podstawowej mózgu - zarówno aktywności glikolitycznej jak i metabolizmu wysokoenergetycznych reszt fosforanowych. Ponieważ zastosowany wzór obliczania szybkości zużycia rezerw wysokoenergetycznych /Wykres 4/ nie uwzględniał energii otrzymywanej drogą przemiany glikolitycznej, wprowadzono drugi sposób obliczenia metabolizmu wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych /  $\Delta \sim P$  / 63/.

Jak przedstawiono w zbiorczej tabeli 7 - bezpośrednio po niedotlenieniu następuje obniżenie szybkości zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych do ok. 70% wartości kontrolnych, połączone ze zwiększeniem możliwości wykorzystania przemiany beztlenowej /glikolitycznej/ w skrajnych warunkach zapotrzebowania energetycznego /podekapitacyjna ischemia anoksyjna/.

W okresie 6 godz. od zakończenia hipoksji obserwowano w tkance zmiany regulacyjne o odwrotnym charakterze. W wyniku dokapitacji dochodziło do statystycznie znamiennego przyspieszenia zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych w mózgu badanych zwierząt o 17% w stosunku do kontroli. Nieznaczna aktywacja glikolizy beztlenowej w stosunku do całości przemian energetycznych pozostawała w dalszym ciągu utrzymana. Jednocześnie z opisanym kierunkiem zmian podstawowego metabolizmu energetycznego obserwowano powrót typowej reakcji stymulacyjnej układu cyklazy adenylanowej na dekapitację już w ciągu 3 godz. rooksygenacji niedotlenionych szczurów i statystycznie znamienne podwyższenie poziomu 3'-5'-cAMP w mózgu ze wzmożoną odpowiedzią stymulacyjną w 6 godz. po niedotlenieniu /Wykres 5/

Tabela 7. Wpływ niedotlenienia na szybkość zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych w mózgu szczura po dekapitacji.

	$\Delta \sim P$	/mmol/min/kg/	% udziału glikolizy
	A	B	
Kontrola /8/	16,84±1,08	22,40±3,2	25
Hipoksja /8/	11,66±2,06 <sup>x</sup>	18,76±6,52	38
6 godz. po niedotlenieniu /6/	19,56±1,00 <sup>x</sup>	28,23±5,0 <sup>x</sup>	31

Wartości  $\Delta \sim P$  obliczono na podstawie:

A - metody Lowry'ego i wsp. /111/ wg wzoru :

$$\Delta \sim P = \Delta (2 \text{ ATP} + \text{ADP} + \text{CrP})$$

B - metody Gatfielda i wsp. /63/ wg wzoru :

$$\Delta \sim P = \Delta (2 \text{ ATP} + \text{ADP} + \text{CrP}) + 2 \Delta \text{Gluc.} + 1,45 (\Delta \text{Mlecz.} - 2 \Delta \text{Gluc.})$$

Do obliczeń posłużyły wyniki z ilości doświadczeń podanej w nawiasach wyrażone jako średnio arytmetyczne  $\pm SD$ .

<sup>x</sup> - wartości różniące się znamienne od kontroli / $p < 0.05$ /.

/Zalewska, Domańska-Janik, Resuscitation 1980, 7, 199-205/.

### III-4. Wpływ niedotlenienia na procesy syntezy związków makromolekularnych

#### III-4 a. Wprowadzenie

Ostre niedotlenienie, powodując gwałtowny spadek puli związków wysokoenergetycznych w mózgu wywołuje również gwałtowne zahamowanie energozależnych procesów syntezy związków makromolekularnych: białek, lipidów i kwasów nukleinowych /49/. Bardziej dyskusyjny jest natomiast wpływ mniej drastycznych stanów hipoksyjnych na te procesy. Z badań Kosowa i wsp. /101/, Yatsu i Mossa /168/, Morimoto i wsp. /123/, Mela /119/ oraz z badań własnych w układach *in vitro* /47/, wydaje się, że nawet umiarkowane niedotlenienie może uszkadzać w sposób istotny skomplikowane procesy syntezy biochemicznych w mózgu. Mechanizm tych uszkodzeń, wiązany częściowo z dyskretnymi zaburzeniami energetyki tkanki, jest wysoce spekulatywny i nie oparty na bezpośrednich badaniach doświadczalnych mózgu w czasie trwania niedotlenienia *in vivo*.

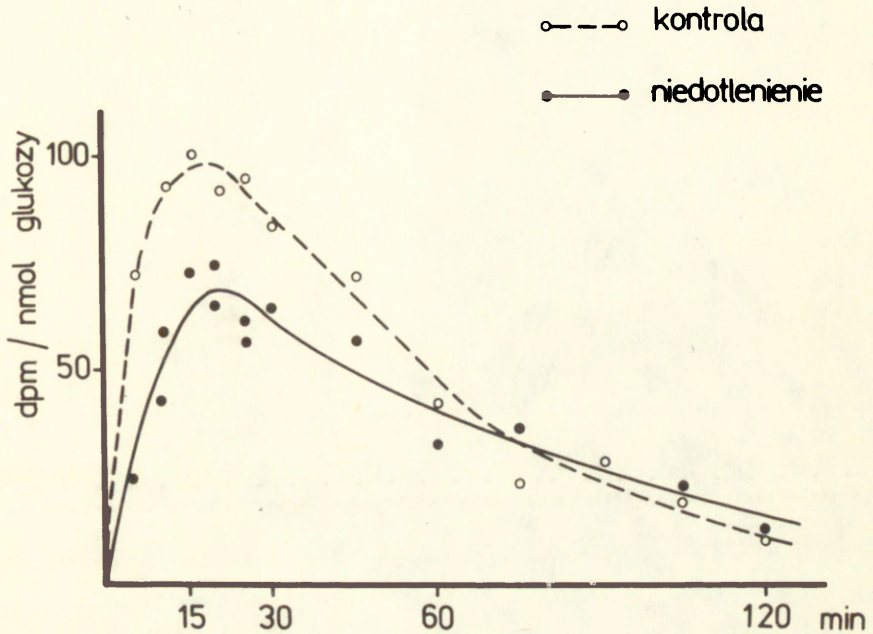
Jak wykazano w rozdziałach poprzednich, umiarkowane niedotlenienie cechuje znaczna reorientacja procesów przemiany podstawowej, wyrażająca się głównie aktywacją glikolizy i spadkiem szybkości zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych. Odpowiedź na pytanie, czy łączy się to ze zmianą dynamiki syntezy wewnątrzkomórkowych, wymagała podjęcia próby bezpośrednich badań tego procesu w trakcie niedotlenienia mózgu *in vivo*.

Warunkiem koniecznym do tego typu badań, który opisany model spełniał, była względna stabilność metabolizmu glukozy w czasie doświadczenia. W poprzednich rozdziałach wykazano, że zarówno poziom glukozy i mleczanu, jak i parametry gazowe krwi oraz ciśnienie tętnicze, ustalały się na względnie stałym poziomie po 15 minutach od chwili rozpoczęcia niedotlenienia. Dlatego też posłużono się techniką jednorazowego podania izotopu glukozy do jamy otrzewnowej, co najmniej po 15 min. wstępnego niedotlenienia zwierzęcia. Aby nie przerywać hipoksji w momencie podawania izotopu, wykonywano ją poprzez rękaw foliowy przymocowany do komory niedotlenieniowej. Badania przeprowadzono w dwóch etapach.

Wstępnie określono dynamikę zmian swoistej aktywności znakowanej glukozy we krwi i mózgu. Obliczono również stopień rozcieńczenia znacznika w podstawowych przedziałach na szlaku przemiany glukozy w mózgu. Następnie przeprowadzono pomiar włączania znacznika glukozy do względnie końcowych /tzn. o bardzo wolnym obrocie metabolicznym/ produktów jej przemiany w mózgu, w ustalonym czasie 2 godz. od podania izotopu.

III-4 b. Określenie swoistej aktywności i dynamiki transportu znakowanej glukozy z krwi do mózgu oraz rozcieńczenia jej znacznika na szlaku przemiany podstawowej w niedotlenieniu

Dynamikę zmian aktywności specyficznej izotopu  $U-[^{14}C]$ -glukozy /aktywność specyficzna 5 mCi/mmol/ we krwi w czasie 2 godzin od jej podania dootrzewnowego w ilości 250  $\mu$ Ci/kg masy, ilustruje wykres 6.



Wykres 6. Wpływ niedotlenienia na specyficzną aktywność glukozy we krwi tętniczej szczurów po dootrzewnowym podaniu U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy w dawce  $250 \mu\text{Ci}/\text{kg}$  masy. /Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1981, 9, 243-253/.

Aktywność specyficzna znakowanej glukozy we krwi osiągała najwyższą wartość pomiędzy 20 a 30 min od chwili podania izotopu. U zwierząt niedotlenionych była ona wyraźnie obniżona w fazie szybkiej, a spadek aktywności w okresie późniejszym przebiegał mniej gwałtownie niż u zwierząt kontrolnych. Stanowiło to



odbicie zwiększonego stężenia glukozy we krwi u zwierząt w czasie niedotlenienia /Wykres 2/ co wpływało na stopień rozcieńczenia izotopu i obniżenie jego aktywności specyficznej.

Badania zmian aktywności całkowitej znacznika glukozy w mózgu przeprowadzono dekapitując zwierzęta w czasie 10, 20 i 30 minut po dootrzewnym podaniu izotopu 6- $[^3\text{H}]$ -glukozy o aktywności specyficznej 1 mCi/mmol w ilości 100  $\mu\text{Ci/kg}$  masy.

Głowy zamrażano w ciekłym azocie i dalszą preparatykę przeprowadzano w temperaturze nie przekraczającej  $-20^{\circ}\text{C}$  jak podano w rozdziale II. Jednocześnie pobierano krew do badania aktywności całkowitej i stężenia glukozy /Tabela 8/ również wg techniki podanej w rozdziale II.

Wykres 7 ilustruje przyrost radioaktywności w tkance mózgowej szczurów kontrolnych i niedotlenionych. Pomimo obniżenia specyficznej aktywności glukozy we krwi w niedotlenieniu /Wykres 6/ nie obserwowano znamiennych różnic w radioaktywności całkowitej mózgu. Sugerowało to wzrost szybkości transportu glukozy z krwi do mózgu w warunkach niedotlenienia.

W krótkim czasie po podaniu izotopu glukozy prawie cała radioaktywność oznaczana w mózgu zawarta była we frakcji związków drobnocząsteczkowych, rozpuszczalnych w TCA. Aby określić stopień rozcieńczenia izotopu w tej puli pośrednich produktów przemiany podstawowej, oddzielono frakcję aminokwasową od reszty związków rozpuszczalnych w TCA. Radioaktywność pojawiająca się w aminokwasach po podaniu izotopu glukozy jest zrównoważona z radioaktywnością metabolitów cyklu Krebsa i odzwierciedla pośrednio ich aktywność w warunkach doświadczenia.

Tabela 8. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia na transport i szybkość metabolizmu glukozy w mózgu szczura.

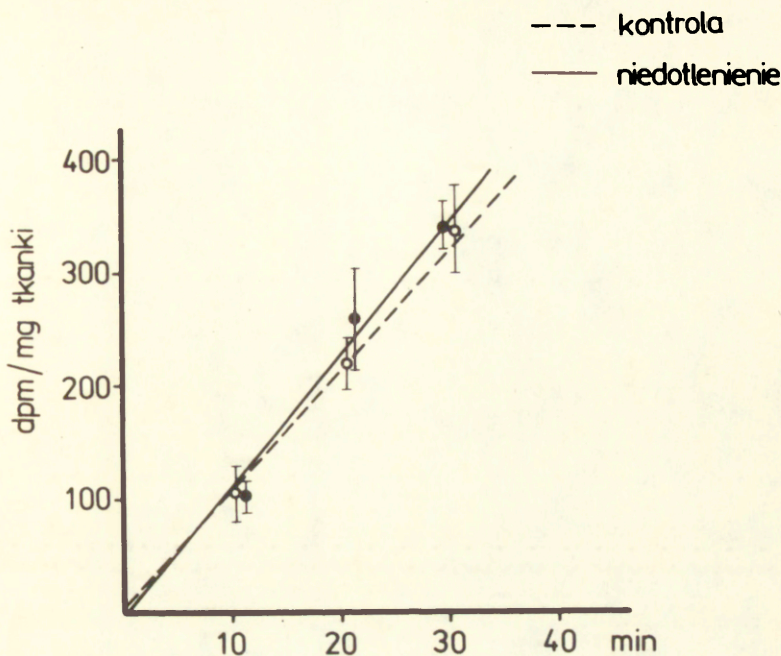
	Kontrola	Niedotlenienie
Radioaktywność we krwi dpm/ml $\times 10^{-3}$	355 $\pm$ 72,3	352 $\pm$ 89,1
Stężenie glukozy we krwi $\mu\text{mol/ml}$	7,1 $\pm$ 0,35	9,8 $\pm$ 2,1 <sup>x</sup>
Radioaktywność w mózgu dpm/g tk. $\times 10^{-3}$	220 $\pm$ 25,9	263 $\pm$ 46,3
Radioaktywność frakcji aminokwasowej dpm/g tk. $\times 10^{-3}$	121 $\pm$ 11,4	92 $\pm$ 14,3 <sup>x</sup>
Stężenie azotu $\alpha$ -aminowego w mózgu mg/g tk.	0,57 $\pm$ 0,066	0,58 $\pm$ 0,034
<u>Obliczono:</u>		
1. Jednokierunkowy trans- port glukozy z krwi do mózgu $\mu\text{mol/g tk./min}$	0,44	0,73
2. Szybkość przepływu /flow/ znacznika do frakcji aminokwasowej mózgu $\mu\text{mol/g tk./min}$	0,24	0,25

Badania przeprowadzono w 20 min po dootrzewnowym podaniu 100 uCi 6- $^{3}\text{H}$ -glukozy/kg masy ciała szczura.

Grupie zwierząt niedotlenionych podano izotop 1,5 godz. od początku niedotlenienia.

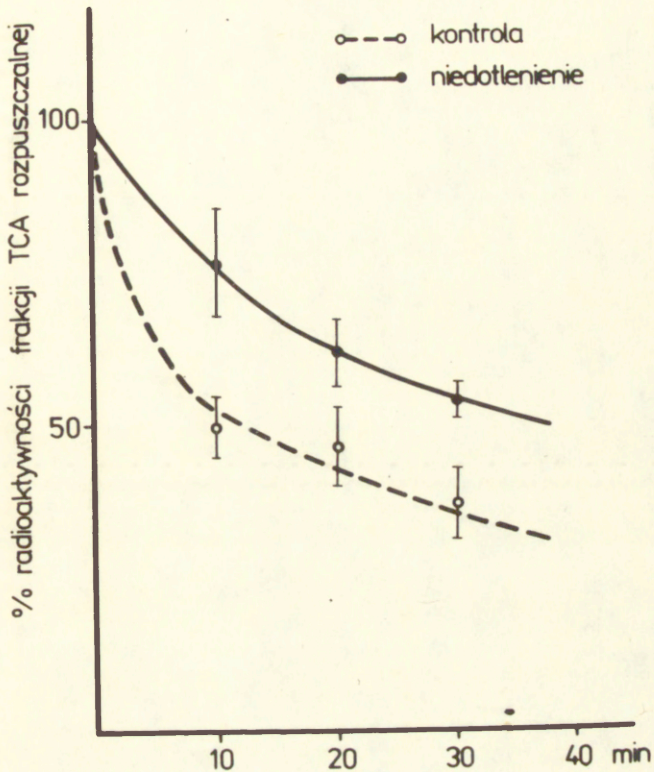
Wyniki przedstawiają średnią 3 doświadczeń, w których oznaczenia przeprowadzono w 2 powtórzeniach  $\pm\text{SD}$ .

x - wartości różniące się znamionnie /p < 0.05/ od kontroli.



Wykres 7. Radioaktywność frakcji rozpuszczalnej w 5% TCA homogenatu mózgu szczura po dootrzewnowym podaniu 6- $[^3\text{H}]$ -glukozy w dawce 100  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$  masy ciała. Średnie z 3 doświadczeń  $\pm\text{SD}$ . /Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1981, 9, 243-253/.

Jak wynika z wykresu 8, przepływ znacznika glukozy do frakcji aminokwasowej mózgu był względnie szybki i obejmował już po 10 min. prawie 50% radioaktywności całej frakcji rozpuszczalnej w TCA. W grupie zwierząt niedotlenionych przepływ ten ulegał wyraźnemu zwolnieniu o około 30% w stosunku do kontroli. Podobnie kształtowała się zmiana aktywności specyficznej glukozy w krwi w niedotlenieniu, obniżając się również do 70% wartości kontrolnej.



Wykres 8. Radioaktywność całkowita frakcji homogenatu mózgu szczura zawierającej nieaminokwasowe metabolity przemiany glukozy w różnym czasie po podaniu do-otrzewnowym 6- [<sup>3</sup>H]-glukozy w dawce 100 µCi/kg masy. Średnie wyniki z 3 doświadczeń ±SD.  
/Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1981, 9, 243-253/.

Wyniki przedstawione na wykresach 7 i 8, a dotyczące czasu 20 minut po iniekcji izotopu  $6-[^3\text{H}]\text{-glukozy}$ , posłużyły do obliczenia parametrów transportu i rozcieńczenia znacznika glukozy w mózgu w normie i niedotlenieniu przedstawionych w tabeli 8.

Do obliczenia transportu glukozy z krwi do mózgu i przepływu izotopu do frakcji aminokwasów, posłużono się równaniem /62/

$$V_{\text{Glu.}} = \frac{[^3\text{H}]_t}{\left[ \int_0^t \text{sa Glu. dt} \right] \times t}$$

gdzie:

- $V_{\text{Glu.}}$  - jednokierunkowy transport glukozy z krwi do mózgu / $\mu\text{mol/g tk./min/}$
- $[^3\text{H}]_t$  - całkowita radioaktywność mózgu w określonym czasie po iniekcji izotopu / $\text{dpm/g tk./}$
- $\left[ \int_0^t \text{sa Glu. x dt} \right]$  - aktywność specyficzna glukozy we krwi w czasie trwania eksperymentu / $\text{dpm}/\mu\text{mol/}$
- $t$  - czas od momentu podania izotopu do pomiaru aktywności /20 min/

Do obliczenia przepływu znacznika do frakcji aminokwasowej posłużono się tą samą metodą, zastępując wartości radioaktywności całkowitej znacznika w mózgu, radioaktywnością odzyskaną we frakcji aminokwasowej.

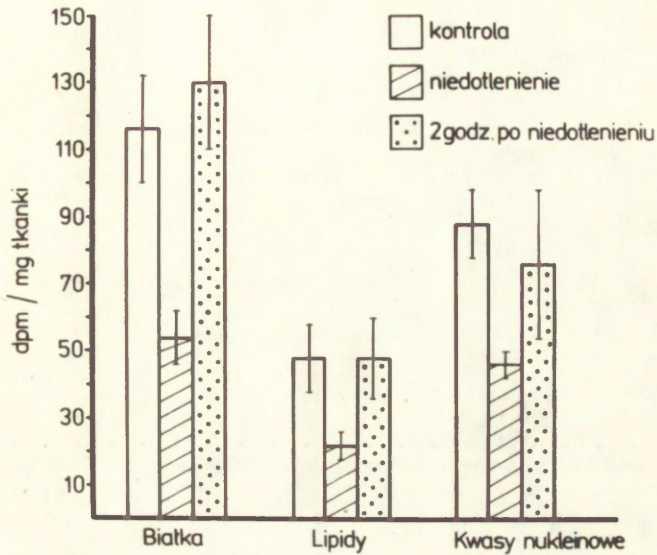
Na podstawie oznaczeń radioaktywności glukozy we krwi i mózgu przedstawionych na wykresach 7 i 8 można przyjąć, że przyrost radioaktywności w tych przestrzeniach jest prostoliniowy do 20 min. po iniekcji izotopu.

Podstawiając otrzymane wartości do wzoru, otrzymujemy wynik wskazujący na znaczny wzrost transportu glukozy w niedotlenieniu z 0,44  $\mu\text{mol/g tk./min}$  do 0,73  $\mu\text{mol/g tk./min}$  /Tabela 8/. Wartość przepływu znacznika glukozy do frakcji aminokwasowej nie zmieniała się w niedotlenieniu i wynosiła 0,24  $\mu\text{mol/g tk. min}$  dla obu grup badanych.

Oznaczano wielkość puli aminokwasów /stężenie azotu  $\alpha$ -aminowego/ w mózgu szczura. Również i ta wielkość nie ulega zmianie w czasie niedotlenienia.

III-4 c. Włączanie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji związków makromolekularnych w mózgu niedotlenianych szczurów *in vivo*.

W oparciu o przedstawiono wyżej wyniki, informujące o rozmieszczeniu znacznika glukozy we krwi i podstawowych pulach metabolicznych mózgu szczurów kontrolnych i niedotlenionych, oznaczono piętno U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy wbudowywane do względnie końcowych produktów jej przemiany w mózgu: białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Po 2 godz. od chwili podania dootrzewnowego izotopu U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy zwierzętom kontrolnym, ok. 8% całkowitej radioaktywności mózgu znajdowano w lipidach, 15% we frakcji białkowej i około 12% we frakcji kwasów nukleinowych. W wyniku niedotlenienia całkowite wbudowywanie znacznika do wszystkich badanych frakcji makromolekularnych w mózgu szczur obniżało się znamienne w stosunku do kontroli co przedstawiło na wykresie 9. Gdy znacznik podawano bezpośrednio po przebyty niedotlenieniu, a zwierzęta dekapitowano po 2 godzinach, wbudowywanie izotopu do białek, lipidów i kwasów nukleinowych powracało do wartości kontrolnych.



Wykres 9. Wpływ niedotlenienia na całkowitą radioaktywność frakcji makromolekularnych mózgu szczura. Izotop U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy podano dootrzewnowo w dawce 250  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$  na 2 godz. przed oznaczeniem. Średni wynik z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

Oznaczano aktywność specyficzną izotopu we frakcji białek i lipidów. Pomiar przeprowadzono w 4 strukturach mózgu: korze, prążkowie, hipokampie i pniu mózgu. Uzyskano wyniki przedstawia tabela 9.

Tabela 9. Aktywność specyficzna białek i lipidów mózgu szczura po podaniu U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy w normie i niedotlenieniu.

	Lipidy dpm/mg lipidów	Białka dpm/mg białka
<b>Kontrola</b>		
Kora	1154 $\pm$ 50,0	1068 $\pm$ 172,2
Hipokamp	1174 $\pm$ 154,8	1010 $\pm$ 112,5
Prążkowie	710 $\pm$ 181,0	806 $\pm$ 157,4
Pień mózgu	916 $\pm$ 142,2	996 $\pm$ 176,6
<b>Niedotlenienie</b>		
Kora	299,8 - 196,7	296,0 - 226,8
Hipokamp	304,9 - 206,2	308,4 - 200,0
Prążkowie	211,2 - 111,1	240,7 - 154,8
Pień mózgu	233,7 - 163,7	295,4 - 207,6

Warunki doświadczenia jak opisano na wykresie 9.

Średnie wyniki kontroli  $\pm$ SD oraz najwyższy i najniższy wynik uzyskany u zwierząt niedotlenionych podano na podstawie 3 doświadczeń.

/Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1981, 9, 243-253/.

Najwyższą aktywność specyficzną badanych frakcji otrzymano w korze mózgu i hipokampie. Również obniżenie aktywności specyficznej pod wpływem niedotlenienia było największe w tych właśnie strukturach i osiągało wartość odpowiadającą ok. 30% aktywności kontroli.



Badając wbudowywanie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do subfrakcji lipidowych w pólkulach mózgu in vivo stwierdzono, że około 20% całkowitej radioaktywności lipidów wbudowuje się do frakcji lipidów obojętnych /LO/, zawierających wolne kwasy tłuszczowo dwu- i trójglicerydy oraz cholesterol /Tabela 10/. Do frakcji glicerofosfolipidów cholinowych /PC/ wbudowywało się około 50% radioaktywności, natomiast jedynie 9,5% z całkowitej radioaktywności znajdowano we frakcji glicerofosfolipidów inozytowych /PI/ i serynowych /PS/. Do glicerofosfolipidów etanolaminowych /PE/ było wbudowane 20% radioaktywności. W kwasach tłuszczowych /FA/ po saponifikacji lipidów odzyskiwano ponad 50% całkowitej radioaktywności glukozy wbudowywanej do lipidów.

Ocena wpływu niedotlenienia wskazywała, że poza obniżeniem całkowitej radioaktywności lipidów tylko nieznacznie oddziaływało ono na procentowy rozkład izotopu w poszczególnych subfrakcjach. Piętno izotopu obniżało się w glicerofosfolipidach inozytowych i serynowych oraz etanolaminowych wraz ze wzrostem proporcji w znakowaniu frakcji lipidów obojętnych. Proporcjonalnie więcej znacznika odzyskiwano również w kwasach tłuszczowych lipidów izolowanych z mózgu zwierząt niedotlenionych w porównaniu z kontrolnymi.

Tabela 10. Rozkład radioaktywności znacznika  $U-^{14}C$ -glukozy wbudowanej do frakcji lipidowych mózgu szczura.

	% całkowitej radioaktywności lipidów				
	PI + PS	PC	PE	LO	FA
Kontrola /3/	9,5 ± 1,3	49,6 ± 3,9	20,3 ± 1,81	20,6 ± 0,96	54,0 ± 0,57
Niedotlenienie /8/	7,3 ± 2,25 <sup>x</sup>	49,1 ± 2,62	15,9 ± 1,09 <sup>x</sup>	27,7 ± 3,54 <sup>x</sup>	68,0 ± 6,51 <sup>x</sup>

Średnie wyniki z ilości doświadczeń podanej w nawiasach ±SD. Warunki doświadczenia jak opisano na wykresie 9.

x - wartości różniące się znamienne /p < 0.05/ od kontroli. /Domańska-Janik, Zalewska, Resuscitation 1981, 9, 243-253/.

transport z krwi do mózgu stanowi znaczne przybliżenie do netto.

Choć pomimo oznaczonego stężenia glukozy w mózgu, koeficient przenikania wzrasta z wartości 1,53 mmol/kg do 2,50 dla 2/ nie wiadomo było jakie jest jej wewnętrzne stężenie, a więc również jej rzeczywiste stężenie w przestrzeni do której odbywa się transport z krwi.

Willan i Siesjö /113/ oznaczyli, że stężenie glukozy w mózgowo-rdzeniowym szczurów wynosi w normoksji 1,53 mmol/kg, natomiast w hipoksji o podobnym cięciu jak badana przez nas / $p_{aO_2} = 28 \text{ mmHg}$ / spada do 0,53 mmol/kg. Na tej podstawie, przyjmując, że bariera krew-mózg znajduje się w równowadze z płynem mózgowo-rdzeniowym, otrzymujemy następujące stężenie glukozy w tych przestrzeniach, które umożliwiają jej transport.

Tabela 11. Stężenie glukozy po obu stronach bariery krew-mózg

	$G_E$	$G_e^x$	
	/stężenie glukozy w pełnej krwi/	/stężenie glukozy w płazmie/	/wewnętrzne stężenie glukozy/
		$\mu\text{mol/ml}$	
kontrola	$7,1 \pm 0,35$	10,7	

Podstawiając te wartości do wzoru opisującego transport glukozy przez barierę krew-mózg drogą transportu ułatwionego:

$$\frac{[G_e - G_i] \times K_m \times V_{max}^x}{[G_e + K_m] [G_i + K_m]}$$

można obliczyć przypuszczalną jego wartość.

Wynosi ona 0,49  $\mu\text{mol/g/min}$  w kontroli i 0,77  $\mu\text{mol/g/min}$  w hipoksji, przyjmując wartości  $K_m = 6 \mu\text{mol/g}$  tk. i  $V_{max} = 2,5 \mu\text{mol/g/min}$  /149/ za niezmiennie w czasie hipoksji.

Obserwujemy więc dużą zgodność otrzymanego wyniku z eksperymentalnym, izotopowym oznaczeniem jednokierunkowego transportu glukozy do mózgu w niedotlenieniu /Tabela 8/. Zgodność obliczonej szybkości transportu glukozy na podstawie jej stężeń we krwi i mózgu z wartością otrzymaną w doświadczeniu izotopowym, przemawia za prawidłowością przyjętych założeń. Przy minimalnej zmianie stężenia glukozy w mózgu w kompartmentcie do którego zachodzi jej transport z krwi /z wartości 4,83 do 4,41  $\mu\text{mola/ml}$ /, wzrost transportu w niedotlenieniu odpowiadałby wzrostowi gradientu stężeń po obu stronach bariery krew-mózg. W przypadku przyjęcia alternatywnej hipotezy, że rozkład glukozy w mózgu jest homogenny i odpowiada oznaczonemu dla całej tkanki /czyli 1,53 vs. 2,5  $\text{mmol/kg}$ /, należałoby również przyjąć, że wzrost transportu glukozy do mózgu w niedotlenieniu, pomimo zmniejszenia gradientu stężeń, zachodzi na skutek zmiany parametrów kinetycznych bariery. Hipoteza taka jest trudna do przyjęcia. Po pierwsze, wydaje się na podstawie licznych badań

<sup>x</sup> Wzór ten stanowi rozwinięcie równania Michaelisa Mentena dla transportu glukozy przez barierę krew-mózg /149/.

że wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy w komórkach nerwowych jest wartością pomijalną, a szybkość jej fosforylacji równa jest /lub przekracza/ szybkości jej transportu przez błony komórkowe /111/. Po drugie, trudno byłoby przyjąć, że stężenie wewnątrzkomórkowe glukozy wzrasta w niedotlenieniu.

Aktywność jej przemiany glikolitycznej, a szczególnie aktywność cytoplazmatycznej heksokinazy, enzymu bezpośrednio odpowiedzialnego za fosforylację glukozy, wzrasta w tych warunkach /66/. Po trzecie, założenie o prawie niezmiennym przez niedotlenienie wewnątrzkomórkowym stężeniu glukozy w przedziałach do których odbywa się jej transport z krwi, zgodne jest z przedstawionymi powyżej wynikami, wskazującymi na brak rozcieńczenia znacznika 6- $[^3\text{H}]$ -glukozy na szlaku jej wewnątrzkomórkowej przemiany do aminokwasów /Tabela 8/.

Za rzekomy wzrost oznaczanego dla całej tkanki stężenia glukozy w mózgu w niedotlenieniu, byłoby więc odpowiedzialne zwiększenie się przestrzeni do której odbywa się jej transport z krwi. Zgodnie z współczesnymi poglądami przestrzeń ta odpowiada morfologicznie cytoplazmie gleju okołonaczyniowego oraz przestrzeni międzykomórkowej mózgu. Jak łatwo obliczyć z porównania zmian stężeń glukozy uzyskanych eksperymentalnie na całym mózgu i obliczonych na podstawie zmian jej stężeń we krwi /Tabela 2 i 11/ przestrzeń ta ulegałaby znacznemu powiększeniu w czasie niedotlenienia.

Tabela 12. Wielkość przestrzeni mózgu do której odbywa się transport glukozy z krwi.

	Stężenie glukozy oznaczone w całym mózgu	Stężenie glukozy w przestrzeni do której odbywa się transport	Wielkość przestrzeni zajmowanej przez glukozę
	nmol/kg		% całkowitej masy mózgu
Kontrola	1,53	4,83	32
Niedotlenienie	2,50	4,41	56

Jak już uprzednio wspomniano, brak dodatkowego rozcieńczenia znacznika 6- $[^3\text{H}]$ -glukozy w puli aminokwasowej w grupie zwierząt niedotlenionych i jego równowaga z radioaktywnością glukozy we krwi u tych zwierząt /Tabela 8/ wskazuje, że w mózgu istnieje gwałtownie spalana pula glukozy, której wielkość nie zmienia się w niedotlenieniu. Ponieważ aminokwasy powstające z glukozy znajdują się w równowadze dynamicznej ze związkami pośrednimi cyklu Krebsa, wskazuje to pośrednio, że również i ich radioaktywność pochodząca ze znakowanej glukozy nie ulega wewnątrzkomórkowemu rozcieńczeniu w niedotlenieniu i jest proporcjonalna do radioaktywności glukozy we krwi. W przypadku puli aminokwasowej można oznaczyć szybkość przepływu /flow/ znacznika glukozy do aminokwasów. Szybkość ta nie zmienia się w niedotlenieniu i wynosi 0,39  $\mu\text{moli/mg}$  azotu  $\alpha$ -aminowego/min w obu grupach badanych. Niezmiennosc szybkości przepływu znacznika glukozy do puli aminokwasowej wskazuje, że również jego przepływ do puli kwasów dwu- i trójkarboksylowych związanych w cyklem Krebsa, nie

zmienia się w umiarkowanym niedotlenieniu.

Tak więc w tym stadium skompenowanego energetycznie niedotlenienia mózgu szczura nie obserwuje się oznak ograniczenia tlenowego metabolizmu glukozy w cyklu Krebsa.

### III-5. Przemiana glukozy w cyklu pentozowym /C.P./ w niedotlenieniu

#### III-5 a. Wprowadzenie

Do zainteresowania się tą stosunkowo niewielką frakcją przemiany wewnątrzkomórkowej glukozy, która po ufosforylowaniu do G6P zbacza z głównego szlaku przemiany glikolitycznej i ulega bezpośrednio utlenieniu i dekarboksylacji na pierwszym węglu łańcucha węglowodanowego, skłoniła jej specyficzna rola biologiczna, łącząca się ściśle z podjętym tematem badań. O ile szlak glikolityczny i cykl Krebsa stanowią główne źródło zabezpieczając produkcję związków wysokoenergetycznych w komórce, o tyle C.P. wiąże się z procesami anabolicznymi, dostarczając wielu niezbędnych substratów do podstawowych syntez komórkowych /78/. Wśród nich do najważniejszych należy zaliczyć:

- 1 Rybozo-5-fosforan - substrat niezbędny do syntezy nukleotydów i polinukleotydów.
2. Zredukowaną formę  $\text{NADP}^+/\text{H}$  - dawcę aktywnego wodoru, który może ulec bezpośredniej inkorporacji do cząsteczki biorącej udział w syntezie. Są to główne reakcje hydrogenacji i hydroksylacji przebiegające w cytoplazmie i obejmujące:

- a/ Syntezę "do novo" kwasów tłuszczowych jak i dalszą elongację łańcucha tych kwasów,
- b/ Hydroksylację i desaturację kwasów tłuszczowych,
- c/ Syntezę amin biogennych /163/ oraz innych związków o wysokiej aktywności biologicznej np. tyrozyny lub sterydów kory nadnerczy.

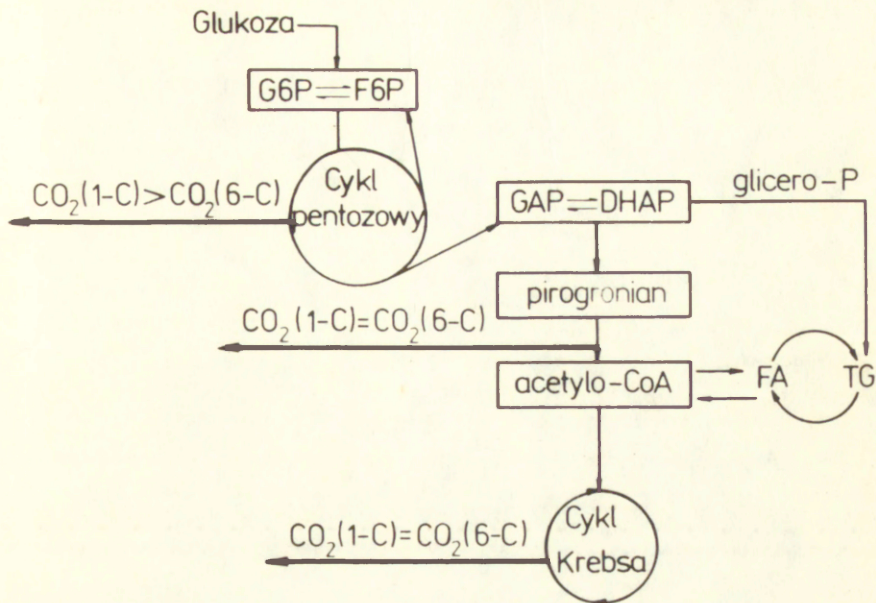
Z drugiej strony, powstający w cyklu pentozowym NADPH, poprzez swoje sprzężenie z reduktazą glutationową jest odpowiedzialny za utrzymanie prawidłowego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego cytoplazmy. Układ  $\text{NADP}^+/\text{H}$  i  $\text{GSH}/\text{GSSG}$  jest jednym z podstawowych czynników antyoksydacyjnych spełniających rolę zabezpieczającą przed gromadzeniem się wodoronadtlenków w reakcjach peroksydacji /82/.

Ochrona prawidłowego poziomu grup SH w komórce determinuje integralność i wybiórczą przepuszczalność komórkowych układów błonowych jak i biologiczną aktywność wielu enzymów i hormonów. Podwyższenie potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, ułatwia wyjście potasu na zewnątrz, a tym samym powoduje zmianę potencjału spoczynkowego /102/. Podsumowując, zaburzenie przemiany pentozowej glukozy miałyby dezintegrujący wpływ na metabolizm komórki, głównie na procesy syntezy wewnątrzkomórkowych oraz, przy zachwianiu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, na integralność struktury błony oraz aktywność wielu enzymów. Pomimo niewątpliwego znaczenia biologicznego tej drogi przemiany glukozy, która prowadząc do wytwarzania pentoz, sprzęga się z wieloma podstawowymi szlakami anabolizmu komórkowego, dane na temat jej aktywności i regulacji w mózgu są fragmentaryczne i niejednolite.



Główną tego przyczynę należy upatrywać w trudnościach metodycznych oceny aktywności C.P. Badania i wnioski, oparte głównie na określeniu aktywności enzymów powszechnie uznawanych za regulacyjne dla tej przemiany, a więc aktywności obu dehydrogenaz /DH-G6P i DH-6PGA/ /45/ dają jedynie wgląd w potencjalną zdolność tkanki do przeprowadzenia reakcji dekarboksylacji heksoz do pentoz. Nie informują natomiast o aktualnej aktywności przemiany pentozowej. Założy ona od wielu dodatkowych czynników regulacyjnych, takich jak oddziaływania allosterycznych inhibitorów i aktywatorów, kompartmentacji wewnątrzkomórkowej sprzężonych procesów metabolicznych oraz od innych zmiennych czynników, których określenie i ocena jest niemożliwa na obecnym etapie rozwoju wiedzy i metodyki badawczej. Dlatego też dalsze badania aktywności C.P. zostały wzbogacone o metodę izotopową, pozwalającą określić bezpośrednio względną frakcję glukozy metabolizowanej w cyklu pentozowym, w stosunku do frakcji metabolizowanej w szlaku glikolitycznym i w cyklu Krebsa.

Zasada metody sprowadza się do porównania aktywności specyficznej  $^{14}\text{CO}_2$ , wytworzonego w ozasie inkubacji tkanki *in vitro* z izotopami glukozy znakowanymi na różnych węglach łańcucha cukrowca /98/. Asymetryczność spalania 1-go i 6-go węgla glukozy zilustrowana na załączonym schemacie jest wyrazem wybiórczej dekarboksylacji 1-go węgla łańcucha glukozy poprzez dekarboksylującą dehydrogenazę kwasu 6-fosfoglukonowego /DH-6PGA/ w C.P.



Schemat ilustrujący niesymetryczność dekarboksylacji 1 i 6 węgla łańcucha glukozy w cyklu pentozowym w porównaniu z innymi reakcjami przemiany podstawowej.

/Oznaczenia zgodne z załączonym spisem skrótów/.

Wadą tej metody jest ograniczenie jej do badań in vitro, czyli praktyczna możliwość zastosowania jej do badań ewentualnych skutków niedotlenienia w okresie reoksygenacji skrawków tkankowych.

W celu określenia aktywności cyklu pentozowego bezpośrednio w mózgu żywego zwierzęcia w czasie niedotlenienia zastosowano

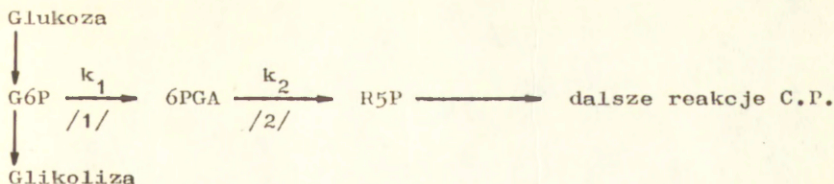
metodę wybiórczego zahamowania aktywności dehydrogenazy kwasu 6-fosfoglukonowego /DF-6PGA/.

Metodę tę wprowadzono wykorzystując możliwość zahamowania aktywności tego enzymu, poprzez podanie zwierzętom swoistego inhibitora 6-aminoamidu kwasu nikotynowego /6-AN/ /83/. Ten metaboliczny analog amidu kwasu nikotynowego jest związkiem syntetycznym, łatwo przechodzącym przez barierę krew-mózg /78/. W tkance ulega on wbudowaniu do nukleotydów pirydynowych w reakcji katabolizowanej przez mikrosomalny enzym z grupy glikohydrolaz /EC 3.3.3.6/. Powstający analog dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego lub jego fosforanu /6 A-NAD<sup>+</sup>/P<sup>+</sup> jest potencjalnym, konkurencyjnym inhibitorem reakcji zależnych od obecności nukleotydów pirydynowych. Szczególne powinowactwo wykazuje on w stosunku do drugiego enzymu cyklu pentozowego tj. DH-6PGA /78/.

Oznaczona stała inhibicji dla tej reakcji wynosi  $1,3 \times 10^{-7} M$ , gdy dla innych NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> - zależnych dehydrogenaz waha się w zakresie od  $10^{-4}$  do  $10^{-5} M$  /78/. Stężenie inhibicyjne 6A-NADP<sup>+</sup> w stosunku do DH-6PGA jest tego samego rzędu co najbardziej aktywnych inhibitorów metabolicznych np. ezeryny czy neostygminy.

Po podaniu dootrzewnowym inhibitora oznaczano szybkość gromadzenia się substratu zahamowanej reakcji DH-6PGA tj. kwasu 6-fosfoglukonowego /6PGA/.

Reakcje wpływające na stężenie 6PGA w tkance można przedstawić schematycznie:



gdzie:  $k_1$  jest stałą kinetyczną reakcji DH-G6P /1/,

$k_2$  - stałą kinetyczną DH-6PGA /2/

Aktualne stężenie 6PGA w tkance opisuje równanie:

$$\frac{d [6PGA]}{dt} = k_1 \times [G6P]_t - k_2 [6PGA]_t$$

W miarę wzrostu stężenia endogennego inhibitora reakcji /2/

wartość  $k_2 \times [6PGA]_t$  dąży do 0.

Wtedy równanie szybkości utleniania G6P w pierwszej, ograniczającej cykl reakcji przybierze postać:

$$k_1 \times [G6P]_t = \frac{d [6PGA]}{dt}$$

Oznaczając szybkość przyrostu 6PGA po zahamowaniu reakcji /2/ można określić pośrednio aktywność reakcji DH-G6P /1/.

Jest to reakcja praktycznie nieodwracalna, ograniczająca przemianę glukozy w C.P. W tej sytuacji szybkość gromadzenia się 6PGA odzwierciedla aktywność C.P. w tkance.

Wyniki doświadczeń dotyczących wpływu umiarkowanego niedotlenienia na aktywność przemiany glukozy w cyklu pentozowym, przedstawiono w trzech częściach, w zależności od użytej metody badawczej.

### III-5 b. Wpływ niedotlenienia na aktywność enzymów cyklu pentozowego

Tabele 13 a i b przedstawiają wpływ umiarkowanego niedotlenienia na aktywność dohydrogenaz cyklu pentozowego /DH-G6P i DH-6PGA/ w różnych częściach OUN. Aktywność specyficzna DH-6PGA nie ulega w tych warunkach statystycznie znamionnym zmianom. Natomiast aktywność specyficzna DH-G6P w warunkach niedotlenienia stopniowo wzrasta osiągając po 2 godz. w korze półkul mózgowych wartość wyższą o 100% od wartości kontrolnej.

### III-5 c. Aktywność cyklu pentozowego w skrawkach mózgu badanych "in vitro" po niedotlenieniu

Aktywność C.P. oceniano na podstawie dwóch metod:

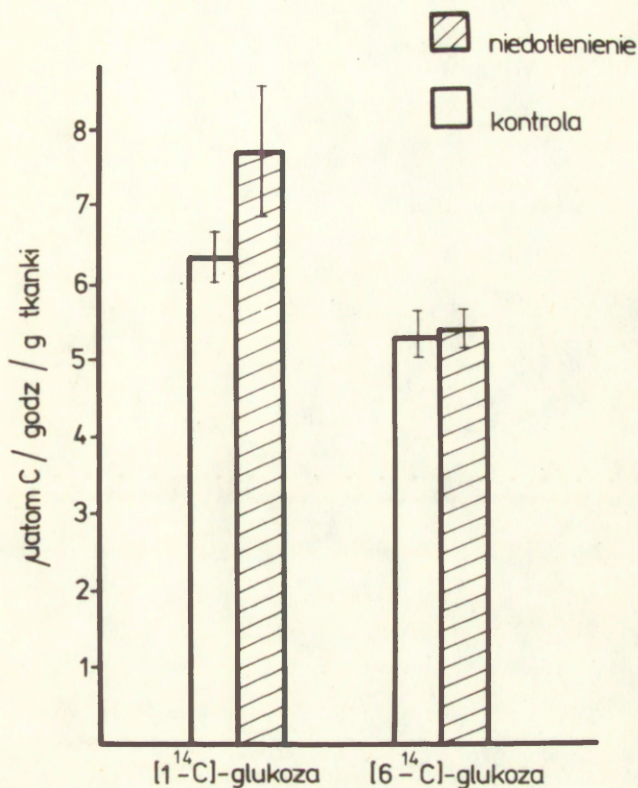
1. poprzez porównanie szybkości dekarboksylacji 1-go i 6-go węgla glukozy /98/, oznaczając stosunek  $^{14}\text{CO}_2$  wydzielonego po podaniu 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy oraz 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy,
2. poprzez porównanie szybkości wbudowywania węgla U- $^{14}\text{C}$ -glukozy i 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy do względnie końcowego produktu zrównoważonego z przomianą podstawową tj. kwasów tłuszczowych /56/.

Stwierdzono, że niedotlenienie powoduje wzrost szybkości dekarboksylacji 1-go węgla 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy w skrawkach kory mózgu szczurów dorosłych, pozostając bez wpływu na aktywność  $^{14}\text{CO}_2$  z izotopów glukozy znakowanych na węglu 6 /Wykres 10/. Oznaczony stosunek radioaktywności dwutlenku węgla z 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy do 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy wzrastał z 1,25 dla kontroli do 1,44 dla skrawków otrzymanych ze zwierząt niedotlenionych.

Tabela 13. Aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego w mózgu szczurów poddanych umiarkowanemu niedotlenieniu.

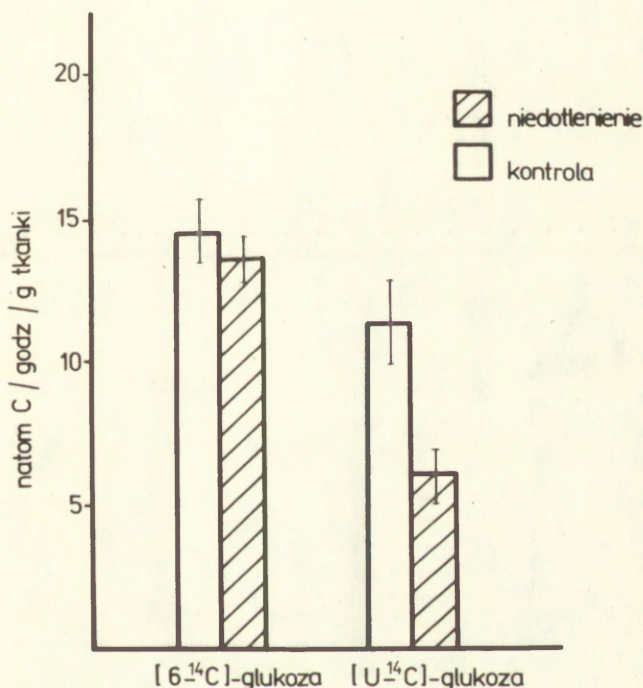
a/	Kora	Mózdzek	Aktywność DH-G6P / $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g}$ białka/	Śródmózgowie	Pień
Kontrola /6/	7, 83 $\pm$ 0,63	23,67 $\pm$ 1,83		16,66 $\pm$ 0,96	19,17 $\pm$ 0,56
Niedotlenienie 1 godz. /6/	10,17 $\pm$ 1,80 <sup>x</sup>	26,67 $\pm$ 1,87		10,32 $\pm$ 2,08	21,50 $\pm$ 1,80
Niedotlenienie 2 godz. /3/	14,67 $\pm$ 1,10 <sup>x</sup>	34,33 $\pm$ 0,63 <sup>x</sup>		24,70 $\pm$ 2,11 <sup>x</sup>	28,17 $\pm$ 0,33 <sup>x</sup>
b/	Kora	Mózdzek	Aktywność DH-6PGA / $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g}$ białka/	Śródmózgowie	Pień
Kontrola /6/	7, 83 $\pm$ 0,65	13,17 $\pm$ 1,22		11,66 $\pm$ 1,22	16,17 $\pm$ 0,78
Niedotlenienie 1 godz. /6/	7,60 $\pm$ 0,87	12,00 $\pm$ 1,52		12,33 $\pm$ 1,66	15,67 $\pm$ 1,42
Niedotlenienie 2 godz. /3/	9,17 $\pm$ 1,03	13,33 $\pm$ 0,73		13,50 $\pm$ 1,63	17,17 $\pm$ 0,27

W nawiasach podano liczbę doświadczeń  $\pm$ SD. <sup>x</sup> - Wartości różniące się znamionnie / $p < 0,05$ / od kontroli. /Domańska-Janik, Wideman, Resuscitation 1974, 3, 37-41/.



Wykres 10. Szybkość dekarboksylacji różnie znakowanych izotopów glukozy w skrawkach mózgu szczura. Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD. /Domańska-Janik, Zaleska, Zalewska, Witter, Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension, Pol.Med.Pub. 1978, 87-95/.

W grupie zwierząt niedotlenionych stwierdzono znamienne wyższe wbudowywanie węgla glukozy znakowanej na węglu 6 niż U-[ $^{14}\text{C}$ ]-glukozy /której pierwszy węgiel łańcucha ulega dekarboksylacji w C.P./, do puli kwasów tłuszczowych /Wykres 11/. W tym przypadku obliczony stosunek radioaktywności w kwasach tłuszczowych wzrastał z 1,28 do 1,86 u zwierząt niedotlenionych.



Wykres 11. Szybkość wbudowywania węgla z różnie znakowanych izotopów glukozy do kwasów tłuszczowych /FA/ w skrawkach mózgu szczura.

Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

/Domańska-Janik, Zaleska, Zalowska, Witter, Pol.Med.Pub. 1978, 87-95/.



Zgodność wyników otrzymanych za pomocą 2 różnych metod izotopowych traktujących jako "względny" produkt końcowy metabolizmu węgla glukozy dwutlenek węgla lub pulę kwasów tłuszczowych, otrzymaną po saponifikacji lipidów, przemawiają za aktywacją cyklu pontozowego w skrawkach mózgu zwierząt po niedotlenieniu.

Należy podkreślić, że w tym cyklu badań używano nieco innego modelu niedotlenienia /hipoksja hipowolomiczna/ oraz warunków i czasów inkubacji skrawków niż w badaniach późniejszych. Głównie skrócenie czasu pomiaru wytwarzania  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  z godziny do 15 min w późniejszych doświadczeniach, wpłynęło na powiększenie się różnicy pomiędzy utlenianiem 1-  $[^{14}\text{C}]$ -glukozy i 6-  $[^{14}\text{C}]$ -glukozy. Przyczyną tego było wyeliminowanie w tych warunkach dwóch niekorzystnych procesów: "ujednoczenia" specyficznie znakowanych węgla glukozy poprzez powtórne wchodzenie pośrednich metabolitów w cykle metaboliczne oraz zmiany aktywności niektórych procesów tkankowych w czasie przedłużającej się inkubacji. Tłumaczy to znaczną różnicę w bezwzględnych wartościach aktywności dwutlenku węgla wytwarzanego z różnie znakowanych izotopów glukozy, w porównaniu z wartościami otrzymanymi w badaniach późniejszych /45, 46, 47/.

W tabeli 14 przedstawiono wyniki otrzymane w badaniach utleniania izotopów glukozy przez skrawki kory mózgu szczurów poddanych uprzednio 2 godz. umiarkowanej hipoksji w warunkach opisanych w Rozdziale III-1.

Otrzymane wyniki wykazują znamienne wyższą radioaktywność  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  przy użyciu glukozy znakowanej na 1-szym węglu, w porównaniu z glukozą znakowaną na 6-tym węglu łańcucha.

Tabela 14. Aktywność przemiany glukozy w cyklu pentozowym w skrawkach mózgu szczurów kontrolnych i po niedotlenieniu.

Normoksja	Dodatkowe składniki środowiska inkubacyjnego	Radioaktywność $^{14}\text{CO}_2$ /dpm/100 mg tk./15 min z:				$^{14}\text{CO}_2$ Stosunek C <sub>1</sub> /C <sub>6</sub>
		1- $^{14}\text{C}$ -glukozy kontroli	2- $^{14}\text{C}$ -glukozy kontroli	6- $^{14}\text{C}$ -glukozy kontroli	5- $^{14}\text{C}$ -glukozy kontroli	
1		557 ± 36,2	100	208 ± 34,4	100	2,68
2	PHMS <sup>1</sup>	3598 ± 1005,8 <sup>x</sup>	646	257 ± 32,2	123	14,00
3	Ascorbinian <sup>2</sup>	933 ± 42,7 <sup>x</sup>	167	231 ± 28,3	111	4,04
4	50 mM K <sup>+</sup>	1360 ± 203,8 <sup>x</sup>	244	996 ± 55,5	479	1,36
5	6-AN <sup>3</sup>	1261 ± 62,8 <sup>x</sup>	47	211 ± 31,4	101	1,24
1		892 ± 38,8	100	203 ± 32,3	100	4,39
2	PHMS <sup>1</sup>	4231 ± 608,0 <sup>x</sup>	474	204 ± 21,4	100	20,74
3	Ascorbinian <sup>2</sup>	1252 ± 109,8 <sup>x</sup>	140	209 ± 11,3	103	5,99
4	50 mM K <sup>+</sup>	1136 ± 95,6 <sup>x</sup>	127	835 ± 64,2	411	1,36
5	6-AN <sup>3</sup>	193 ± 23,2 <sup>x</sup>	22	184 ± 13,2	91	1,05

Średnie wyniki z 5 doświadczeń ±SD. /1/ PHMS /metasiarozan fenazylny/ w stężeniu  $10^{-4}\text{M}$  i /2/ askorbinian w stężeniu 0,5 mg/ml dodawano do środowiska inkubacyjnego. /3/ 6-AN podawano zwierzętom dootrzewnowo w dawce 35 mg/kg, 9 godz. przed doświadczeniem.

<sup>x</sup> - wartości znacznie różne od kontroli. Kontrola grupy hipoksyjnej różniła się od normoksyjnej przy  $p < 0,001$ .

Wskazuje to na aktywne utlenianie glukozy w cyklu pontozowym w badanych warunkach inkubacji skrawków. Niedotlenienie wywołuje znamienne stymulację produkcji  $^{14}\text{CO}_2$  z 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy, które osiąga 160% wartości charakterystycznej dla zwierząt normoksyjnych, przy braku różnic w aktywności dwutlenku węgla wytwarzanego z 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy. Stosunek radioaktywności  $^{14}\text{CO}_2$  powstającego w trakcie spalania glukozy znakowanej w pozycji 1-szej do znakowanej w pozycji 6-toj zostaje podwyższony z wartości 2,68 do 4,39 w skrawkach mózgu zwierząt niedotlenionych. W skrawkach badanych po niedotlenieniu obserwowaliśmy również nieznaczne obniżenie aktywności spalania 6-go węgla glukozy. Maksymalna aktywność utleniania glukozy w cyklu pontozowym badana w obecności egzogennego akceptora olektorów - metasiarczanu fenazyny /PhMS/ wzrastała wyraźnie w skrawkach zarówno zwierząt kontrolnych jak i niedotlenionych. Powiększenie się tej stymulacji po niedotlenieniu /z wartości  $^{14}\text{CO}_2$  - 14 do 20/ może wynikać ze zwiększonej potencjalnej możliwości utleniania glukozy w cyklu pentozowym w wyniku opisanej w rozdziale poprzednim stymulacji DH-G6P /Tabela 13/. Obecność askorbinianu w modium inkubacyjnym również wpływała na wzrost aktywności przemiany pontozowej w skrawkach mózgu szczura. Efekt ten należałoby łączyć z zapoczątkowaniem przez askorbinianu procesów peroksydacyjnych, szczególnie w obecności tlenu /140/. W skrawkach mózgu zwierząt niedotlenionych efekt askorbinianu był nieco mniejszy, co należałoby tłumaczyć zwiększeniem aktywności C.P. w kontrolnych warunkach inkubacji tych skrawków.

Stymulacja metabolizmu energetycznego glukozy w warunkach depolaryzacji chemicznej skrawków poprzez podwyższenie stężenia potasu w środowisku, powoduje znamienne przyspieszenie spalania obydwu izotopów glukozy. Gdy jednak stymulacja produkcji  $^{14}\text{CO}_2$  z 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy osiąga ponad 400% zarówno w grupie normoksyjnej jak i niedotlenianej, to wzrost aktywności  $^{14}\text{CO}_2$  powstającego z 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy wynosi jedynie 244% dla normoksji i 127% w przypadku szczurów niedotlenionych. Wskazuje to na zmniejszenie się udziału cyklu pentozowego w metabolizmie glukozy w warunkach depolaryzacji. Zjawisko to było stosunkowo wyraźniejsze u zwierząt po niedotlenieniu.

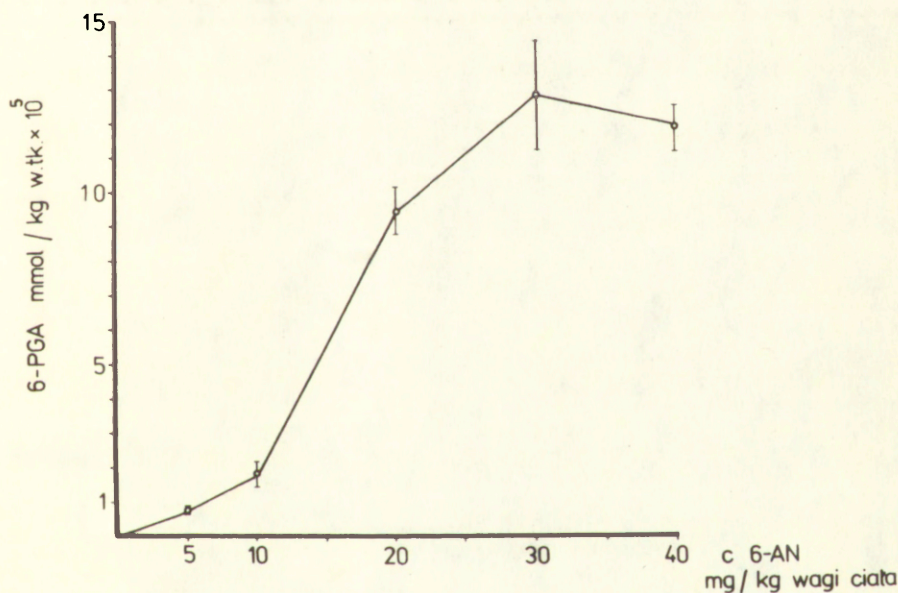
Ostatnia grupa wyników przedstawia produkcję  $^{14}\text{CO}_2$  z różnych izotopów glukozy w skrawkach mózgu szczurów po zahamowaniu aktywności cyklu pentozowego przez zastosowanie omówionego na wstępie swoistego inhibitora DII-6PGA, analogu amidu kwasu nikotynowego. Spalanie glukozy w cyklu pentozowym *in vitro* zostaje zahamowane, na co wskazuje zrównanie się wartości  $^{14}\text{CO}_2$  powstającego z 1- $^{14}\text{C}$  i 6- $^{14}\text{C}$ -glukozy. U zwierząt normoksyjnych utlenianie 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy spada do 47% pod wpływem 6-AN, a u zwierząt niedotlenianych aż do 22% wartości kontrolnej. Wskazuje to pośrednio, że za stymulację wytwarzania  $^{14}\text{CO}_2$  z 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy u zwierząt niedotlenionych jest odpowiedzialna aktywacja cyklu pentozowego, hamowana po podaniu 6-AN-u. Otrzymane wyniki wskazują wyraźnie na uaktywnienie utleniania glukozy w cyklu pentozowym w skrawkach mózgu szczurów po niedotlenieniu. Zagadnienie, czy stymulacja ta dotyczy także samego okresu ograniczenia dopływu tlenu do tkanki, czy też jest zjawiskiem występującym dopiero po

rooksygenacji tkanki w czasie jej inkubacji *in vitro* w warunkach tlenowych, nie może być rozwiązane za pomocą zastosowanej metody.

### III-5. Bezpośrednie badanie aktywności cyklu pentozowego w mózgu szczura w czasie niedotlenienia.

Określenie dawki inhibicyjnej 6-AN i dynamiki gromadzenia 6PGA w korze i pniu mózgu szczura.

Wykres 12 przedstawia zależność akumulacji 6PGA w mózgu od zastosowanej dawki 6-AN. Stężenie substratu zahamowanej reakcji badano w mózgu w 9 godz. od chwili dootrzewnowego podania 6-AN.

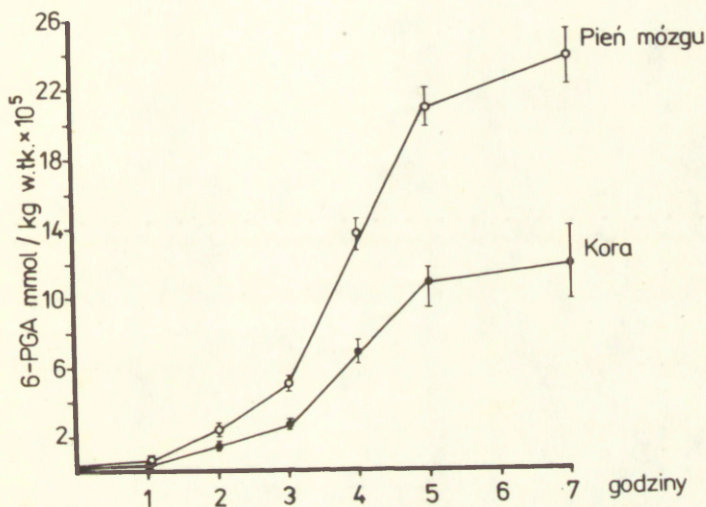


Wykres 12. Zależność stężenia kwasu 6PGA w mózgu szczura od zastosowanej dawki antymetabolitu 6-AN.

Punkty krzywej odpowiadają średniej z 3 doświadczeń.  $\pm$ SD.

Maksymalną akumulację 6PGA stwierdzono po podaniu 6-AN w dawce pomiędzy 30 a 40 mg/kg masy ciała.

Z wykresu zależności gromadzenia się 6PGA w mózgu od czasu mierzonego od chwili iniekcji 6-AN /Wykres 13/ wynika, że maksymalna jego akumulacja następuje po około 7 godz.



Wykres 13. Szybkość gromadzenia się 6PGA w mózgu szczura po podaniu 6-AN w dawce 35 mg/kg masy. Punkty odpowiadają średniej z 3-5 oznaczeń  $\pm$ SD.

Stopniowo narastające nachylenie krzywej akumulacji 6PGA w początkowym okresie doświadczenia jest wyrazem narastającego hamowania DH-6PGA przez tworzący się inhibitor. W chwili osiągnięcia maksymalnego zahamowania aktywności enzymu, stężenie jego substratu przyrasta liniowo i zależy, aż do ustalenia się końcowego stanu równowagi, jedynie od aktywności DH-G6P.

Zbliżono do liniowego narastanie 6PGA w mózgu występuje pomiędzy 3 a 5 godz. po podaniu 6-AN /Wykres 13/.

Szybkość akumulacji produktu reakcji utleniania G6P po zablokowaniu jego zużycia przez antymetabolit, odzwierciedla aktywność dehydrogenazy G6P w tkance *in vivo*. Wartości, określone dla kory i pnia mózgu szczura na podstawie wyników przedstawionych na wykresie 13, wynoszą odpowiednio 0,406 i 0,791 mmol/godz./kg masy tkanki. Dwukrotnie wyższa aktywność utleniania glukozy w C.P. w pniu mózgu w stosunku do kory odpowiada oznaczonym uprzednio aktywnościom specyficznym DH-G6P w tych strukturach *in vitro* /poprzedni rozdział, tabela 13/.

Porównując natomiast otrzymany wynik szybkości utleniania G6P w mózgu *in vivo* z maksymalną aktywnością enzymu utleniającego DH-G6P w określonej strukturze mózgu *in vitro*, okazuje się, że jedynie nieznaczna część potencjalnej możliwości utleniania G6P jest realizowana przez żywą tkankę. Dlatego też dla określenia zachowania się tej drogi przemiany glukozy w czasie niedotlenienia tak istotne wydaje się przeprowadzenie bezpośrednich badań w mózgu *in vivo*.

Wpływ 6-AN na metabolizm glukozy i związków wysokoenergetycznych w mózgu zwierząt kontrolnych i po umiarkowanym niedotlenieniu.

Wyniki przedstawione w tabeli 15 wykazują, że podanie 6-AN nie wpływa w sposób zasadniczy na poziom kluczowych metabolitów przemiany energetycznej w mózgach zwierząt kontrolnych. Jedyną znaczącą różnicą powodowaną przez 6-AN, było podwyższenie poziomu glukozy i G6P w mózgu szczurów badanych w 3, 5 i 9 godz. po podaniu inhibitora. Oznaczono również wpływ umiarkowanego niedotlenienia na stężenie metabolitów glikolitycznych i związków wysokoenergetycznych w mózgu u zwierząt po uprzednim podaniu 6-AN /Tabela 16/. Stosując niedotlenienie zarówno w 5 jak i 9 godz. po podaniu inhibitora stwierdzono znaczne statystycznie ograniczenie gromadzenia się kwasu mlekowego i obniżenie poziomu G6P. Efekt ten wiąże się prawdopodobnie z inhibicją izomerazy glukozofosforanowej /EC. 5.3.1.9/ przez nagromadzający się w tkance kwas 6-fosfoglukonowy /103/. Zahamowanie to może ograniczać przemianę glikolityczną w czasie jej zwiększonej przez niedotlenienie aktywności. Jak opisano w rozdziale poprzednim /Tabela 14/ stosując izotopową metodę oznaczania aktywności cyklu pentozowego w skrawkach mózgu wykazano, że w 9 godz. po podaniu 6-AN-u w dawce 35 mg/kg, aktywność metabolizmu glukozy w cyklu pentozowym zostaje prawie całkowicie zniesiona zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i po uprzednim niedotlenieniu.



Tabela 15. Wpływ 6-AN na stężenia wybranych metabolitów mózgu szczura.

	CrP	ATP	ADP	AMP mmol/kg św. tkanki	Glukoza	G6P	Mleczan
Kontrola	3,72±0,22	3,22±0,18	0,52±0,01	0,23±0,08	1,59±0,22	0,095±0,01	2,58±0,23
/3/							
6-AN							
Czas od podania:							
3 godz.	-	-	-	-	2,72±0,53 <sup>x</sup>	0,085±0,016	-
5 godz.	-	-	-	-	2,58±0,09 <sup>x</sup>	0,156±0,032 <sup>x</sup>	2,55±0,304
9 godz.	3,78±0,25	3,15±0,139	0,50±0,025	0,25±0,015	2,18±0,456 <sup>x</sup>	0,169±0,021 <sup>x</sup>	2,66±0,454

Średnie wartości z 4 doświadczeń oznaczone w 2 powtórzeniach ±SD.

<sup>x</sup> - oznaczono wyniki różniące się znacząco /p < 0,05/ od kontroli.

Tabela 16. Wpływ 6-AN na stężenie wybranych metabolitów w mózgu szczura poddanego niedotlenieniu.

	CrP	ATP	Glukoza mmol/kg	G6P	Mleczan
Niedotlenienie	3,21±0,32	3,12±0,12	2,58±0,11	0,201±0,02	9,28±0,45
Niedotlenienie w 3-4 godz. po podaniu 6-AN	3,54±0,41	3,23±0,167	3,14±0,571	0,156±0,015 <sup>x</sup>	5,11±0,83 <sup>x</sup>

Średnie wyniki z 5 doświadczeń ±SD.

x - oznaczono wartości różniące się znamionnie /  $p < 0,01$  / od kontroli.

Podsumowując, reakcja ogólna zwierząt na niedotlenienie po podaniu 6-AN nie różni się zasadniczo od reakcji typowej. Nie obserwuje się uszkadzającego wpływu 6-AN na metabolizm energetyczny mózgu, badany do 5 godz. po podaniu inhibitora. Tym samym wydaje się możliwe zastosowanie tego związku jako narzędzia do badań aktywności cyklu pentożowego w niedotlenieniu.

Wpływ niedotlenienia na aktywność cyklu pentożowego w mózgu szczura *in vivo*.

Wpływ niedotlenienia na szybkość gromadzenia się 6PGA w pólkulach mózgu szczura po podaniu 6-AN, inhibitora reakcji DH-6PGA, w dawce 35 mg/kg masy przedstawiony jest w kolejnych tabelach 17 i 18.

Trudnością tego doświadczenia był ograniczony i zmienny okres badania akumulacji 6PGA, w którym przyrost substratu byłby wprost proporcjonalny do czasu inhibicji. Dla kontroli zawierał się on pomiędzy 3 a 5 godz. po podaniu inhibitora i dotyczył przyrostu badanego metabolitu w zakresie stężeń od 0,3 do 1,0  $\mu\text{mola/g}$  tkanki /Tabela 17/. W wyniku zahamowania akumulacji 6PGA w niedotlenieniu, optymalny czas przyrostu metabolitu przesuwiał się w skali czasu do 6, a nawet 7 godz. po podaniu inhibitora. W tych przypadkach ilościowe porównanie szybkości akumulacji 6PGA przeprowadzano, odnosząc je do szybkości akumulacji kontroli w zakresie zbliżonych stężeń gromadzonego metabolitu. We wszystkich eksperymentach /Tabela 17/ różniących się czasem zastosowania niedotlenienia w stosunku do czasu podania inhibitora, obserwowano znaczne ograniczenie przyrostu 6PGA w tkance pólkul mózgowych poddanych hipoksji.

Tabela 17. Wpływ niedotlenienia na gromadzenie się 6PGA /mmol/kg masy tkanki/ w pótkulach mózgu szczura w różnym czasie po podaniu 6-AN.

Czas po iniekcji 6-AN /godz./	Kontrola	Numer doświadczenia			
		I	II	III	IV
0	0,012±0,002 /3/				
1	0,031±0,009 /3/	0,051	0,022		
2	0,108±0,024 /3/			0,098	
3	0,302±0,073 /5/	0,295	0,082±0,18 /5/ <sup>x</sup>	0,172±0,021 /6/ <sup>x</sup>	
4	0,656±0,061 /5/	0,653	0,972±0,068 /3/ <sup>x</sup>	0,250±0,048 /4/ <sup>x</sup>	0,628
5	1,064±0,097 /6/	0,935	1,419±0,103 /3/ <sup>x</sup>	0,369±0,045 /6/ <sup>x</sup>	
6	1,315±0,131 /4/			1,151±0,072 /3/	0,804±0,086 /3/ <sup>x</sup>
7	1,297±0,088 /4/				

Okresy niedotlenienia w poszczególnych eksperymentach zaznaczono strzałką. Linia przerywana oznacza badane okresy powrotu do normy po niedotlenieniu. Układ w skali czasu mierzony od podania 6-AN. Przedstawione wartości odpowiadają średniej z liczby doświadczeń podanej w nawiasach ±SD.

x - wyniki znacznie różne od wartości kontroli /p < 0.05/.

Wielkość zahamowania była największa w tym przypadku gdy niedotlenienie rozpoczynano przy najwyższych wyjściowych stężeniach badanego substratu tzn. po 4 godz. od podania inhibitora. Szybkość przyrostu 6PGA spadała wtedy do ok. 20% wartości kontrolnej. Ze względu jednak na charakter zależności akumulacji 6PGA od czasu /Wykres 13/ wartości leżące na obu krańcach otrzymanej krzywej mogą być zaniżone, ponieważ trudno było uzyskać identyczne stężenia 6PGA w wybranych czasach badania kontroli i niedotlenienia.

W doświadczeniu, w którym niedotlenienie rozpoczęto w 3 godzinie po podaniu 6-AN /Tabela 17, rząd III/, uzyskano wartości przyrostu 6PGA odpowiadające 33, 38, 34% kontroli kolejno w 1, 2 i 3 godz. niedotlenienia. We wszystkich grupach czasowych uzyskane wyniki wykazywały znamienność statystyczną w stosunku do kontroli.

W momencie zakończenia niedotlenienia obserwowano gwałtowny przyrost 6PGA, przewyższający w 1-szej godz. dwukrotnie wartości kontroli /Tabela 18/. Wynik ten uzyskano wtedy gdy niedotlenienie stosowano wcześniej /w 1 do 3 godz. po podaniu 6-AN/, jak również gdy zwierzęta niedotleniano w 2 do 5 godz. po podaniu inhibitora /Tabela 17, rząd II i III/.

Szybkość przyrostu 6PGA była również znamienne zwiększona w drugiej godzinie po niedotlenieniu, jednakże już tylko o 78% w stosunku do kontroli /Tabela 18/.

Gdy natomiast 2 godz. niedotlenienia zakończono bezpośrednio przed podaniem inhibitora, to szybkość narastania 6PGA w okresie pohipoksyjnym była analogiczna jak w kontroli /Tabela 17, rząd I/.

Tabela 18. Wpływ niedotlenienia na aktywność cyklu pentożowego wyrażoną przyrostem kwasu 6PGA w mózgu szczura po zahamowaniu aktywności DH-6PGA.

Kontrola	Niedotlenienie	% kontroli
$\Delta$ 6PGA /mmol/kg/godz./		
0,077	0,030	39%
0,194	0,064	33%
0,194	0,074	38% x - 33 $\pm$ 6,76%
0,354	0,119	34%
0,408	0,088	22%
Po niedotlenieniu:		
1 godzina		
0,354	0,782	221%
0,408	0,890	218%
2 godziny		
0,251	0,447	178%
3 godziny		
0,354	0,358	100%

Przyrost  $\Delta$  6PGA obliczono z wyników podanych w tabeli 17, które odpowiadają średniej z 3 do 6 doświadczeń o wysokiej znamienności różnic w wartościach otrzymanych dla grup niedotlenianych w stosunku do kontroli. Za odpowiadającą danej grupie wartość kontrolną przyjęto otrzymaną w zakresie podobnych wyjściowych stężeń 6PGA.

W tym doświadczeniu okres maksymalnej aktywacji C.P. pokrywał się prawdopodobnie z okresem latencji po podaniu 6-AN-u, wynoszącym jak wynika z krzywych kontrolnych /Wykres 13/ ok. 3-4 godz. Wydaje się więc, że w dłuższych czasach po niedotlenieniu stymulacja C.P. obserwowana we wczesnym okresie pohipoksyjnym /w pierwszej i drugiej godzinie/ zanika i nie ma większego wpływu na akumulację 6FGA począwszy od 3 godz. od zakończenia niedotlenienia.

III-6. Zależności pomiędzy metabolizmem podstawowym glukozy, aktywnością cyklu pentozowego, a procesami syntezy związków makromolekularnych w skrawkach kory mózgu szczura *in vitro*.

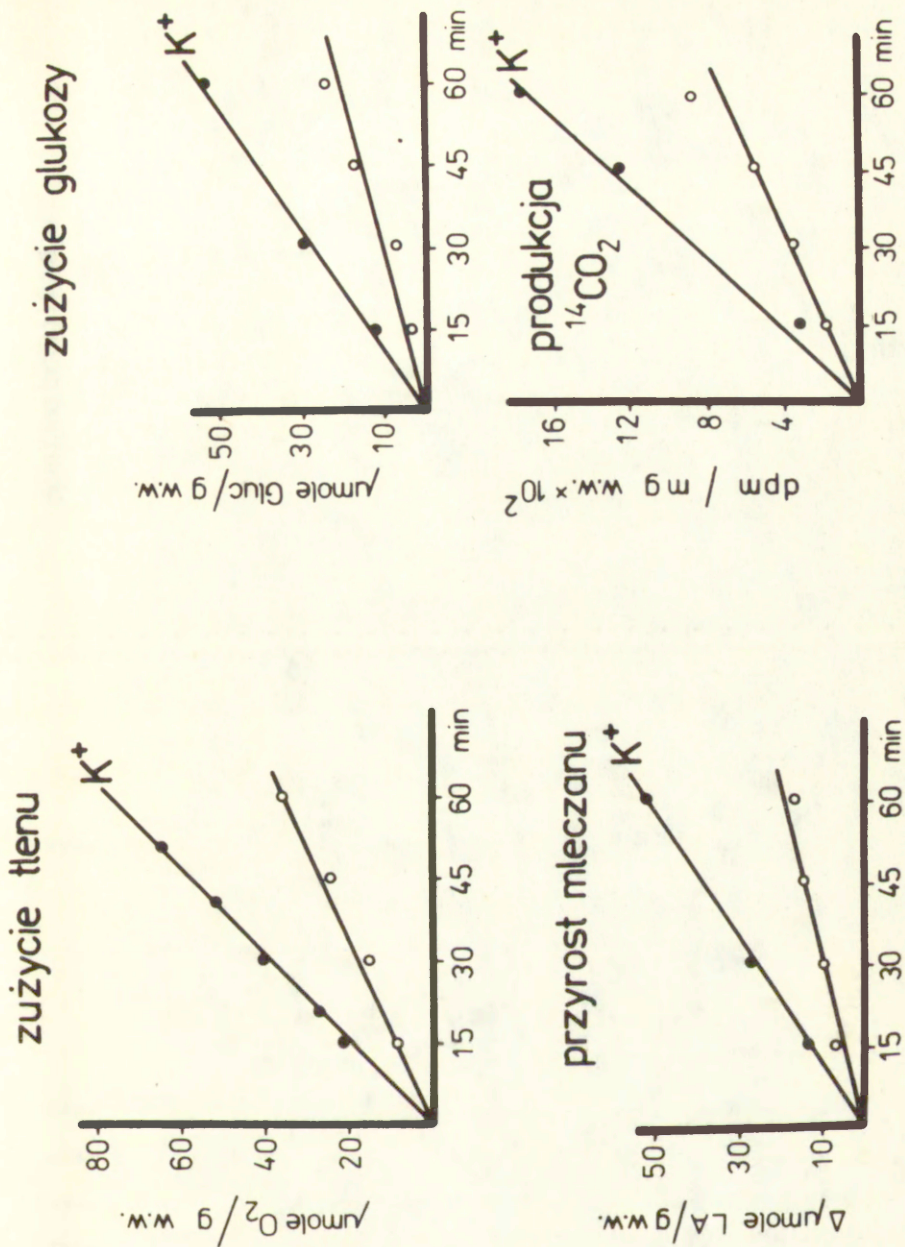
Metabolizm podstawowy skrawków kory mózgu szczura oznaczano przez pomiar szybkości zużycia tlenu i glukozy oraz przyrostu kwasu mlekowego i  $^{14}\text{CO}_2$ , jako produktów końcowych glikolizy i oddychania. Szybkość badanych procesów była proporcjonalna do czasu przez okres godzinnej inkubacji skrawków w temp.  $37^\circ\text{C}$  /Wykres 14/.

Zdolność skrawków tkanki nerwowej do syntezy związków makromolekularnych badano przy użyciu wspólnego dla nich prekursora, U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy. Wbudowywanie radioaktywności do białek, lipidów i kwasów nukleinowych również wykazywało proporcjonalność do czasu inkubacji w warunkach standardowych /Wykres 15/.

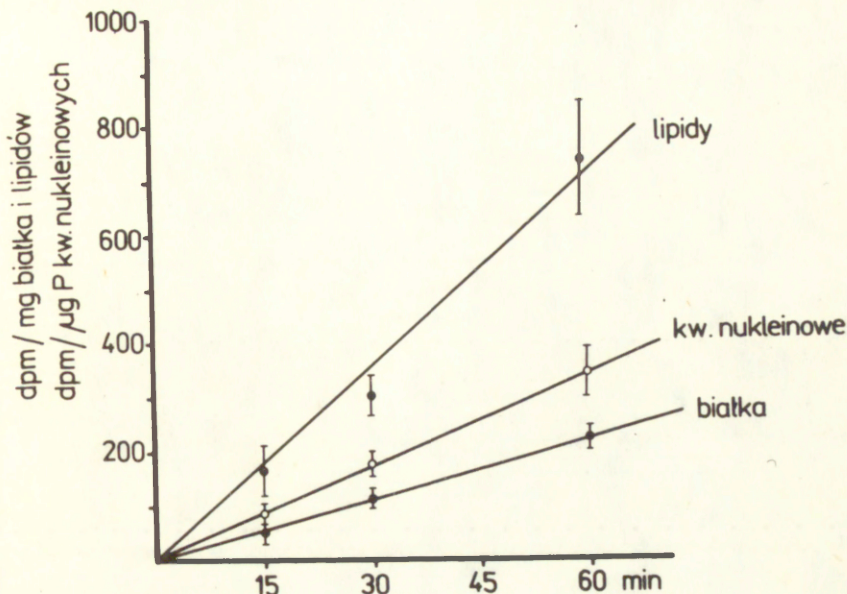
Aktywność C.P. w skrawkach oznaczano za pomocą opisanych już metod określenia asymetryczności spalania 1-go i 6-go węgla glukozy.

Za model do badań regulacji podstawowych procesów metabolizmu wewnątrzkomórkowego tkanek pobudliwych może służyć depolaryzacja chemiczna skrawków tkankowych wywoływana zwiększonym stężeniem jonów potasowych w środowisku inkubacyjnym. W warunkach tych następuje pobudzenie energozależnych układów enzymatycznych związanych z procesami transportu błonowego, a tym samym wzmożenie zapotrzebowania energetycznego komórek.





Wykres 14. Wpływ depolaryzacji na metabolizm podstawowy skrawków mózgu szczura. Warunki doświadczalne podano w Rozdz. II. Aktywność specyficzna U- $^{14}\text{C}$ -glukozy -  $0.05 \mu\text{Ci/mM}$ . Każdy punkt reprezentuje średnią z 3 doświadczeń. /Domańska-Janik, Zalewska, J. Neurosci. Res., 1979, 4, 247-260/



Wykres 15. wbudowywanie znacznika U-[<sup>14</sup>C]-glukozy do frakcji makromolekularnych mózgu szczura w różnym czasie inkubacji.

Warunki doświadczenia jak na wykresie 14.

/Domańska-Janik, Zalewska, J. Neurosci. Ros., 1979, 4, 247-260/.

Charakterystyczną odpowiedzią tkanki na depolaryzację jest aktywacja szlaków metabolicznych prowadzących do produkcji wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych.

Tabela 19 przedstawia wzrost zużycia tlenu i glukozy oraz stymulację glikolizy /przyrost młoczanu/ w warunkach depolaryzacji skrawków przez zwiększenie stężenia K<sup>+</sup> z 5 mM do 50 mM.

Tabela 19. Wpływ depolaryzacji skrawków mózgu szczura na metabolizm podstawowy glukozy.

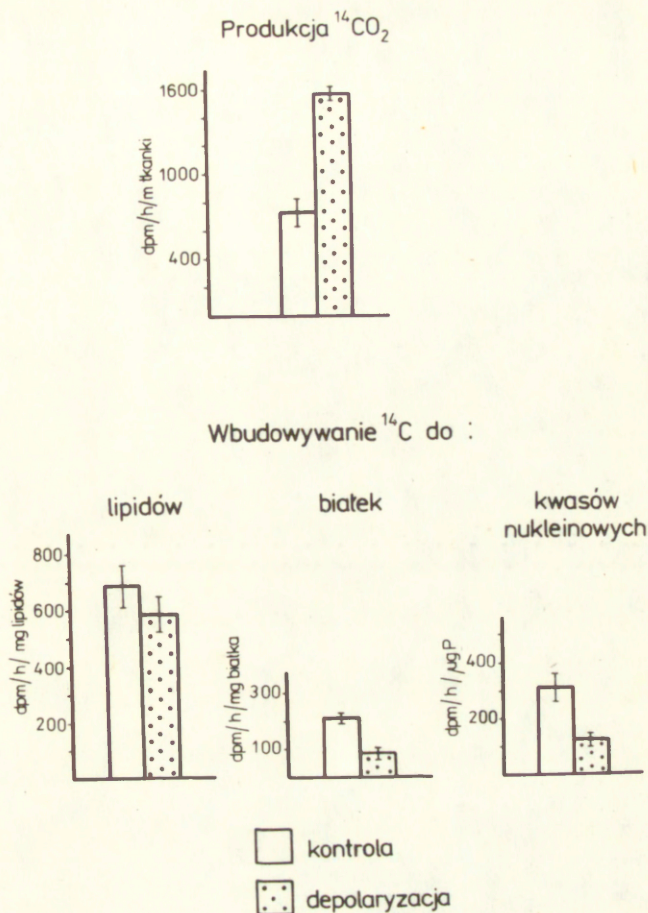
	Zużycie tlenu:	Zużycie glukozy:	Produkcja mleczanu:	Produkcja $^{14}\text{CO}_2$ z U- $^{14}\text{C}$ -glukozy:	Stosunek molowy $^{14}\text{CO}_2$ wytworzonego z glukozy do całkowitego $\text{CO}_2$
	μmole/godz./g tkanki				
Kontrola	49,3±0,80	21,3±2,33	19,4±0,88	14,9	0,30
Depolaryzacja	84,5±5,43 <sup>x</sup>	55,3±4,53 <sup>x</sup>	52,2±9,5 <sup>x</sup>	32,4	0,38

Średnie wyniki z 5 doświadczeń ±SD.

<sup>x</sup> - zaznaczono wyniki znamienne różniące się /p < 0,01/ od kontroli. /Domańska-Janik, Zalewska, J. Neurosci. Res. 1979, 4, 247-260/.

Wykazano, że stymulacja oddychania wynosi 171% a glikolizy 269%. Stwierdzono również, co jest istotne ze względu na dalsze badania, że pomimo stymulacji oddychania i glikolizy, w czasie depolaryzacji nie obserwuje się zasadniczych zmian aktywności specyficznej dwutlenku węgla. Wyklucza to możliwość rozcieńczenia znacznika glukozy na szlaku glikolitycznym i w cyklu Krebsa. Wyraża to niezmienny stosunek molowy radioaktywnego dwutlenku węgla wydzielonego w czasie oddychania w obecności U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do ilości zużytego tlenu. Przyjmując, że wskaźnik oddechowy  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  dla mózgu = 1, otrzymujemy pośrednio informację o rozcieńczeniu izotopu węgla pochodzącego z egzogennej U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy w puli całkowitego  $\text{CO}_2$  wytworzonego w czasie inkubacji.

Dadając wbudowywanie  $^{14}\text{C}$  z U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do związków makromolekularnych w warunkach depolaryzacji, wykazano zahamowanie znakowania białek i kwasów nukleinowych oraz znacznie mniejszy wpływ na znakowanie frakcji lipidowej /Wykres 16/. Jak wspomniano poprzednio, w warunkach inkubacji w obecności  $50 \text{ mM } \text{K}^+$  nie dochodzi do rozcieńczenia znacznika izotopu glukozy w pulach metabolicznych poprzedzających dekarboksylację w cyklu Krebsa. Dowodzi tego niezmienną /nawet nieznacznie zwiększoną/ aktywność specyficzna  $^{14}\text{CO}_2$  /Tabela 19/. Tym samym obniżenie wbudowywania  $^{14}\text{C}$  do związków makromolekularnych w warunkach depolaryzacji chemicznej skrawków mózgu związane jest prawdopodobnie z zahamowaniem procesów syntez tych związków. W tabeli 20 przedstawiono wpływ depolaryzacji skrawków mózgu, spowodowanej różnymi związkami chemicznymi, na glikolizę, oddychanie i aktywność spalania glukozy w cyklu pentozowym.



Wykres 16. Wpływ depolaryzacji na całkowitą aktywność znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy w  $\text{CO}_2$  i frakcjach makromolekularnych skrawków mózgu szczura. Aktywność specyficzna U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy  $-0.5 \mu\text{Ci}/\text{mM}$ . Inkubację prowadzono przez 1 godz. w warunkach podanych w rozdziale II.

Średnie wyniki z 5-7 doświadczeń  $\pm$ SD.

/Domańska-Janik, Zalewska, J. Neurosci. Res., 1979, 4, 247-260/.

Tabela 20. Wpływ depolaryzacji na ukierunkowanie metabolizmu glukozy w skrawkach kory mózgu szczura.

	Uwolnienie $^{14}\text{CO}_2$ z:		Stosunek: $^{14}\text{CO}_2\text{C}_1/\text{C}_6$	Aktywność	
	$1-[\text{C}^{14}]\text{-glukozy}$ nat/godz./g masy tkanki	$6-[\text{C}^{14}]\text{-glukozy}$		glikolizy	oddychania
					% kontroli
Kontrola	$3,06 \pm 0,35$ /5/	$1,25 \pm 0,14$ /5/	$2,46 \pm 0,35$ /5/	-	-
$\text{K}^+$ /50 mM/	$10,69 \pm 1,92$ /3/	$9,03 \pm 1,16$ /3/	$1,18 \pm 0,07$ /3/	289,5	153,5
Ouabaina /0.1 mM/	$4,67 \pm 0,22$ /3/	$2,52 \pm 0,24$ /3/	$1,85 \pm 0,10$ /3/	138,0	125,7
Glutaminian /5.0 mM/	$4,56 \pm 0,51$ /3/	$3,86 \pm 0,48$ /3/	$1,18 \pm 0,10$ /3/	261,9	149,4

Skrawki inkubowano w obecności odpowiednich izotopów glukozy o aktywności specyficznej  $0,5 \mu\text{Ci}/15 \mu\text{moli}$  w objętości 2 ml medium Krebsa-Ringera przez 15 min. w  $37^\circ\text{C}$ . Wartości kontrolne przyrostu kwasu mlekowego wynosiły  $23,3 \pm 1,88 \mu\text{mol/g}$  masy tkanki/godz., a oddychania  $40,1 \pm 2,11 \mu\text{moli O}_2/\text{g}$  masy tkanki/godz.. Średnie wartości z 3-5 doświadczeń  $\pm \text{SD}$ . /Domańska-Janik, Záleska, Pol. J. Pharm., 1980, 32, 1-9/.

Wo wszystkich tych przypadkach /pomimo odmienności mecha-  
nizmu leżącego u podstaw depolaryzacji/ obserwowano podobną  
reakcję metaboliczną, charakteryzującą się reorientacją  
przemiany glukozy w kierunku szlaku glikolitycznego i cyklu  
Krebsa, kosztem aktywności cyklu pentozowego. Zwiększenie  
stężenia potasu i glutaminianu w medium inkubacyjnym wywo-  
ływały bardzo zbliżony efekt metaboliczny. Depolaryzacja  
spowodowana ouabainą, która jest inhibitorem  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPazy}$ ,  
w mniejszym stopniu wpływała na zahamowanie przemiany  
glukozy w cyklu pentozowym.

Podsumowując, w warunkach depolaryzacji skrawków mózgu  
dochodzi do reorientacji metabolizmu glukozy w kierunku  
procesów zapewniających zwiększoną produkcję związków  
wysokoenergetycznych, ze znacznym ograniczeniem procesów  
anabolicznych tzn. syntezy związków makromolekularnych, ora-  
aktywności cyklu pentozowego. Ten typ reakcji metabolicznej  
tkanki nerwowej na depolaryzację chemiczną *in vitro* przypo-  
mina swoim charakterem reakcję zaobserwowaną *in vivo* w  
czasie trwania umiarkowanego niedotlenienia.

### III-7. Regulacja cyklu pentozowego /C.P./ w mózgu szczura

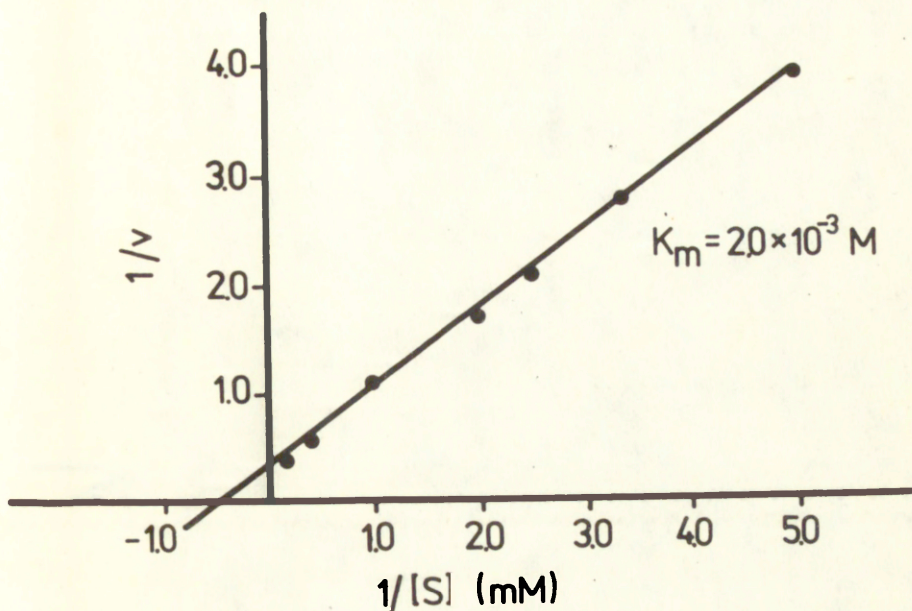
#### III-7 a. Cykl pentozowy, a aktywność glikolizy we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu mózgu szczura

Obniżenie aktywności C.P. w mózgu szczura, zaobserwowane zarówno w czasie niedotlenienia *in vivo* jak i depolaryzacji skrawków kory mózgu *in vitro*, nasuwało możliwość konkurencyjności tej drogi przemiany glukozy w stosunku do wspólnego z przemianą glikolityczną substratu-G6P.

Próbie oceny współzawodnictwa obu tych szlaków przemiany glukozy o G6P przeprowadzono we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu mózgu szczura, w której oba ciągi reakcji są zlokalizowane. Szybkość utleniania glukozy w dwu pierwszych, limitujących reakcjach C.P., oznaczano poprzez sprzężenie ich z reakcją redukcji glutationu, katalizowaną przez reduktazę glutationową. Poprzez pomiar szybkości redukcji GSSG, która w warunkach optymalnych wykazuje stechiometrię z ilością NADPH, powstającego w czasie utleniania glukozy, oceniono aktywność przemiany pentozowej. Jednocześnie szybkość glikolizy mierzono przez pomiar przyrostu kwasu mlekowego w czasie inkubacji. Dokładny skład mieszaniny i warunków inkubacji podano w rozdziale omawiającym stosowane metody /II-4/.

W warunkach, gdy oba ciągi reakcji były ograniczane wielkością stężenia wspólnego substratu glikolitycznego - G6P, oznaczono dla nich stałą Michaelisa-Mentena  $/K_m/$ . Glikoliza wykazywała stosunkowo niskie powinowactwo do G6P, a wartość  $K_m$  wynosiła 2,0 mM.  $K_m$  oznaczona dla dwu pierwszych reakcji C.P. była niższa o dwa rzędy wielkości i wynosiła 0,034 mM /Wykres 17 i 18/.

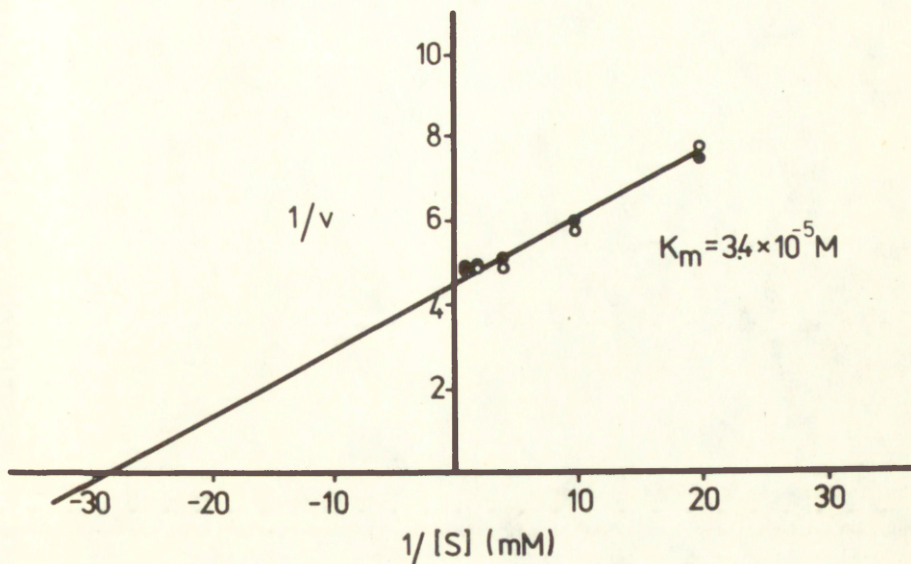




Wykres 17. Zależność szybkości glikolizy od stężenia G6P w cytoplazmie mózgu szczura przedstawiona w postaci wykresu Lineweavora-Burka.

/Domańska-Janik, Wideman, Resuscitation, 1974, 3, 43-50/.

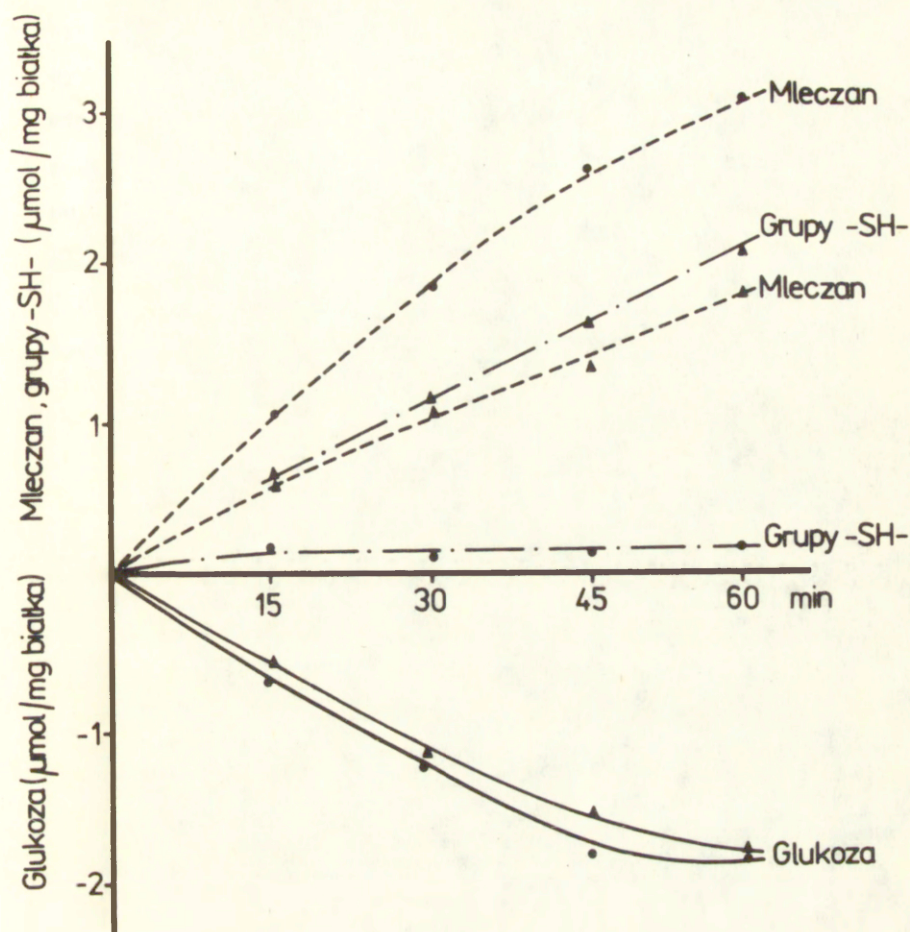
Przy tak dużej różnicy powinowactwa do wspólnego substratu, przemiana pentozowa nie może być ograniczana aktywnością glikolizy. Natomiast teoretycznie możliwa jest sytuacja odwrotna, w której aktywna przemiana pentozowa może doprowadzić do ograniczenia produkcji kwasu mlekowego.



Wykres 18. Zależność szybkości utleniania glukozy w cyklu pentozowym od stężenia glukozy / O / i G6P / ■ / w cytoplazmie mózgu szczura, przedstawiona w postaci wykresu Lineweaver-Eurka.

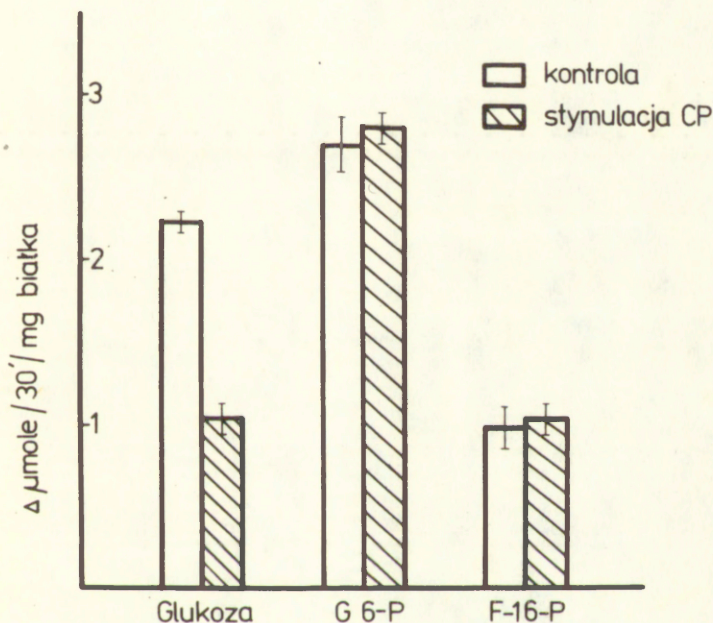
/Domańska-Janik, Wideman, Resuscitation 1974, 3 43-50/.

Wykres 19 ilustruje sytuację doświadczalną, w której przy użyciu glukozy jako substratu, aktywnie przebiegająca /stymulowana obecnością GSSG/ przemiana pentozowa powoduje znaczne ograniczenie szybkości glikolizy we frakcji cytoplazmatycznej mózgu szczura.



Wykres 19. Konkurencyjność utleniania glukozy w cyklu pentozowym w stosunku do glikolizy we frakcji cytoplazmatycznej z mózgu szozura. Aktywność glikolityczna wyrażona jest szybkością gromadzenia mleczanu. Aktywność utleniania glukozy w C.P. odpowiada szybkości redukcji glutationu i przyrostowi grup -SH. Kropki oznaczają aktywność w warunkach spoczynkowych. Trójkąty oznaczają aktywność w warunkach stymulacji C.P. /Domańska-Janik, Wideman, Resuscitation, 1974, 3, 43-50/.

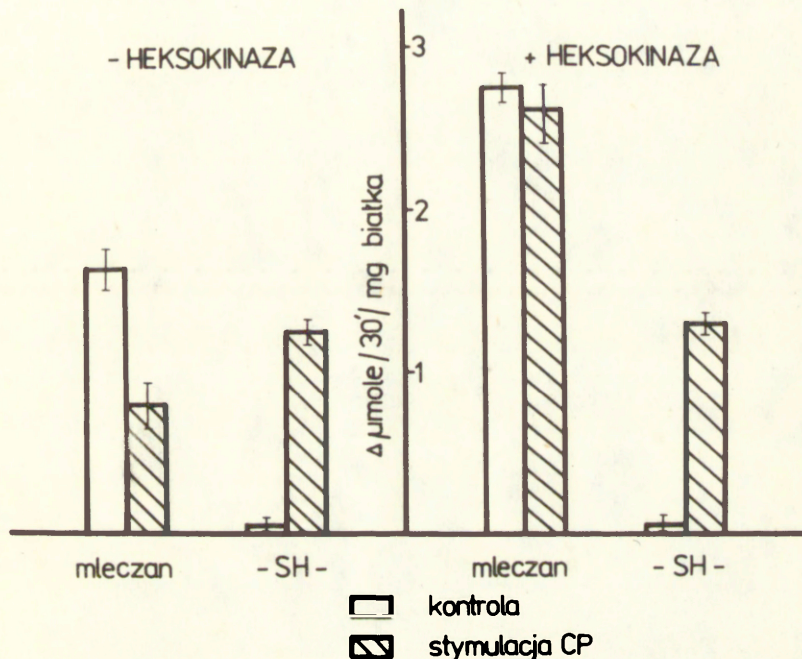
Następne doświadczenia wykazały, że zahamowanie glikolizy w tych warunkach związane jest ze zwiększonym zużyciem 36P w cyklu pentozowym, a nie np. inhibicją przez powstające w nadmiarze produkty. Przy użyciu nadmiaru G6F stanowiącego bezpośredni dla obu ciągów reakcji substrat glikolityczny, następuje zniesienie inhibicji glikolizy /Wykres 20/. Aktywność glikolityczna cytoplazmy jest również niewrażliwa na aktywację C.P., przy użyciu innego, "niższego", substratu ciągu glikolitycznego, jakim jest fruktozo 1,6-dwufosforan.



Wykres 20. Wpływ stymulacji utleniania glukozy w C.P. na aktywność glikolityczną we frakcji cytoplazmatycznej z mózgu szczura /wyrażonej jako przyrost mleczanu/, przy zastosowaniu różnych substratów glikolitycznych. Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

Różnice w reakcji glikolizy na stymulację przemiany pentozonej w obecności różnych substratów glikolitycznych wskazują, że aktywność fosforylacji glukozy do G6P ma zasadnicze znaczenie dla opisywanego efektu.

Zwiększając aktywność heksokinazy w cytoplazmie /Wykres 21/ znosi się zahamowanie glikolizy towarzyszące stymulacji C.P.



Wykres 21. Wpływ egzogennej heksokinazy na szybkość przemiany glukozy we frakcji cytoplazmatycznej z mózgu szczura. Aktywność glikolityczna wyrażona jest szybkością akumulacji mleczanu, a aktywność C.P. - przyrostem grup -SH po dodaniu utlenionego glutationu. Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

Należy zwrócić uwagę, że nawet w sytuacji, gdy glikoliza jest jedyną reakcją zużywającą glukozę w cytoplazmie mózgu szczura, aktywność jej jest częściowo ograniczana przez heksokinazę.

Zwiększenie przyrostu kwasu mlekowego obserwuje się zarówno w obecności egzogennego enzymu jak i przez zastąpienie glukozy "niższym" substratem glikolitycznym /Wykresy 20 i 21/.

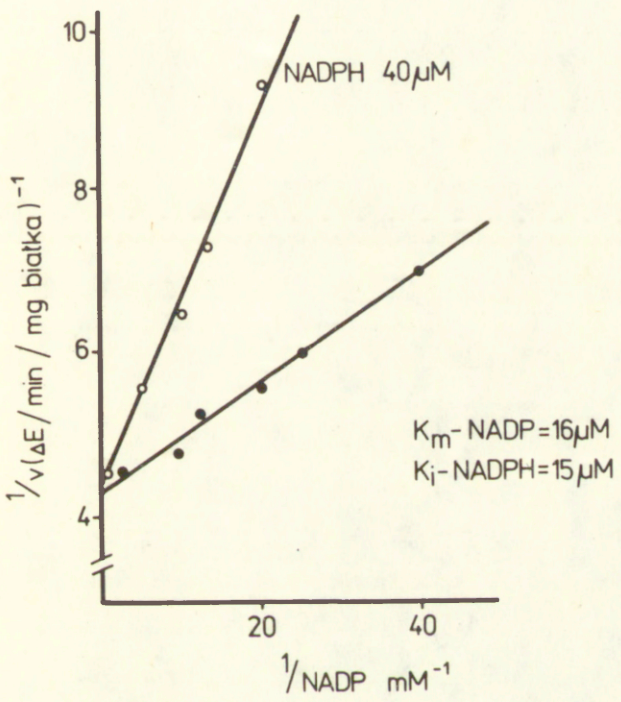
W warunkach *in vivo* wydaje się jednak, że nie dochodzi do współzawodnictwa pomiędzy glikolizą, a cyklem pentozowym.

Z jednej strony, jak wykazano zarówno w badaniach omówionych poprzednio, jak i w badaniach przedstawionych dalej, wydaje się, że C.P. nie osiąga w komórce swojej maksymalnej aktywności.

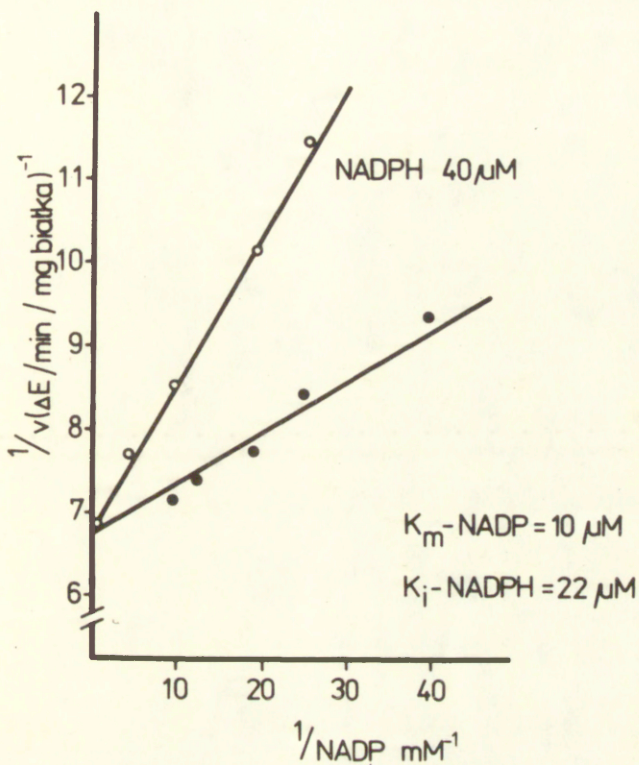
Poza tym aktywność cytoplazmatyczna heksokinazy podlega dynamicznej regulacji, związanej z przesunięciami enzymu z formy związanej z błoną mitochondrialną do cytoplazma /37, 44/. W poprzednich pracach wykazano /166/, że w warunkach zwiększonej aktywności glikolitycznej, obserwowanej w identycznym modelu niedotlenienia dochodzi w mózgu do znamienego wzrostu aktywności całkowitej heksokinazy we frakcji cytoplazmatycznej, z jednoczesnym obniżeniem jej aktywności we frakcji mitochondrialnej.

III-7 b. Kinetyka enzymów regulujących aktywność utleniania  
glukozy w cyklu pontozowym: DII-G6P i DII-6PGA

Zależność szybkości reakcji utleniania glukozy przez dehydrogenazy cyklu pentozowego, od stężeń bezpośrednich substratów reakcji przedstawiono na wykresach 22, 23 i 24.

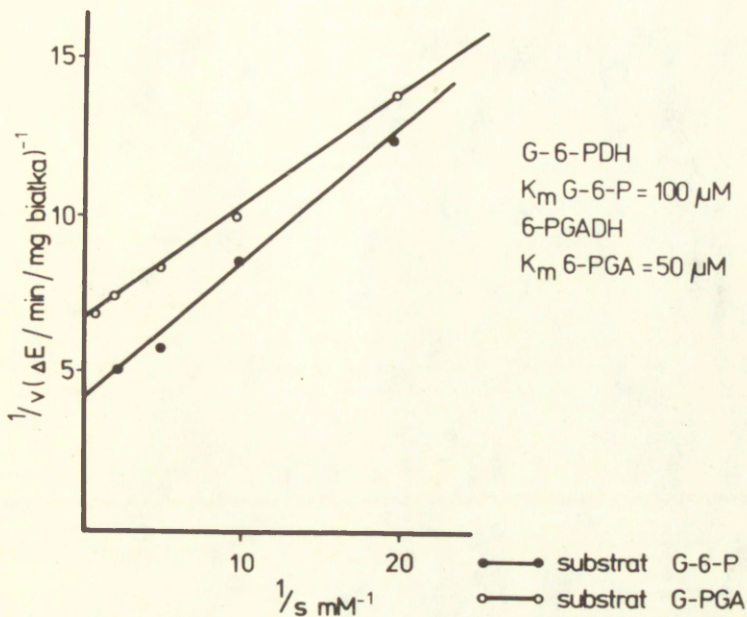


Wykres 22. Wykres Lineweavera-Eurka użyty do graficznej oceny powinowactwa DII-G6P do substratu nukleotydowego NADP<sup>+</sup>/II.  
/Domańska-Janik, Zaleska, Bull.Acad.Pol.Sci., 1977, 25, 119-124/.



Wykres 23. Wykres Lineweavera-Eurka, użyty do graficznej oceny powinowactwa DH-6PGA do nukleotydu NADP<sup>+</sup>/H. /Domańska-Janik, Zaleska, Bull.Acad.Pol.Sci., 1977, 25, 119-124/.





Wykres 24. Wykres Lineweavera-Durka, oceniający powinowactwo DH-G6P i DH-6PGA do ich substratów glikolitycznych.  
/Domańska-Janik, Zaleska, Bull. Pol. Acad. Sci., 1977, 25, 119-124/.

Tabela 21 przedstawia zestawienie otrzymanych danych.

Tabela 21. Powinowactwo enzymów utleniających glukozę w C.P.  
do substratów reakcji oraz NADPH.

	DH-G6P	DH-6PGA
	$10^{-6}$ M	
$K_m$ substratów glikolitycznych /G6P i 6PGA/	100	50
$K_m$ NADP <sup>+</sup>	16	10
$K_i$ NADPH	15	22
$K_i/K_m$ /NADPH/NADP <sup>+</sup> /	1	2

Oznaczone  $K_m$  dla substratu glikolitycznego /G6P/ reakcji DH-G6P wynosi 100  $\mu$ M. Jak podano poprzednio /rozd. III-2, tab. 5/ wewnątrzkomórkowe stężenie G6P w mózgu jest zbliżone lub wyższe od uzyskanej wartości  $K_m$ . Natomiast stężenie 6PGA, substratu drugiej reakcji cyklu pentozowego DH-6PGA w mózgu szczura, wynosi 11-15  $\mu$ M /Tabela 17/ i jest znacznie niższe od oznaczonej wartości  $K_m$  równej 50  $\mu$ M. Można więc sądzić, że ze jedynie druga reakcja C.P. może być ograniczona in vivo dostępnością substratu glikolitycznego.

Spośród wielu przebadanych metabolitów związanych z przemianą podstawową glukozy w komórce, jedynie zredukowana forma fosforanu nukleotydu adeninodwufosfopirydynowego /NADPH/, wywoływała silny efekt hamujący na kluczowe enzymy utleniające glukozę w C.P.

Hamowanie to miało charakter kompetycyjny w stosunku do właściwego kofaktora,  $\text{NADP}^+$  /Wykresy 22, 23/. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 21, powinowactwo DH-G6P do  $\text{NADP}^+$  jest nieco mniejsze, natomiast wrażliwość na inhibicję przez NADPH większa niż w przypadku DH-6PGA.

Z obliczonego stosunku  $K_{\text{I}}/K_{\text{II}}$  wynika, że DH-G6P jest dwukrotnie wrażliwsza na inhibicję wywołaną przez zredukowaną formę  $\text{NADP}^+$  od następnej reakcji cyklu, katalizowanej przez DH-6PGA.

Przedstawione dane wskazują, że aktywność pierwszego enzymu utleniającego glukozę w cyklu pentozowym, DH-G6P, podlega głównie regulacji ze strony układu oksydoredukcyjnego  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Jest to tym bardziej znaczące, że wysycenie enzymu substratem glikolitycznym *in vivo* jest zbliżone do optymalnego. Natomiast drugi enzym cyklu, DH-6PGA, jest limitowany dostępnością substratu wytwarzanego przez poprzedzającą go reakcję. Tym samym jego aktywność jest ściśle uzależniona od aktywności DH-G6P. Wskazuje to, że utlenianie glukozy w C.P. zależy głównie od aktywności DH-G6P, regulowanej stosunkiem utlenionej do zredukowanej formy kofaktora nukleotydowego.

Zrozumiałym staje się, dlaczego warunki, w których utlenianie NADPH ulega przyspieszeniu, prowadzą do stymulacji C.P.

Z przebadanych związków należy wymienić utlenioną formę glutationu, która w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową staje się specyficznym akceptorem wodoru związanego z NADPH. Drugim badanym związkiem, który stymulował C.P. w skrawkach kory mózgu był metasiarczan fenazyny /PhMS/. Jak podano w odpowiednich rozdziałach, w obecności obu tych związków dochodzi do bardzo silnej stymulacji utleniania glukozy w C.P.

/Tabela 14, Wykres 19/. Otrzymane wyniki wskazują na istotną dysproporcję pomiędzy spoczynkową aktywnością C.P. w skrawkach mózgu, a jego aktywnością maksymalną osiąganą jedynie po zniesieniu hamującego działania NADPH.

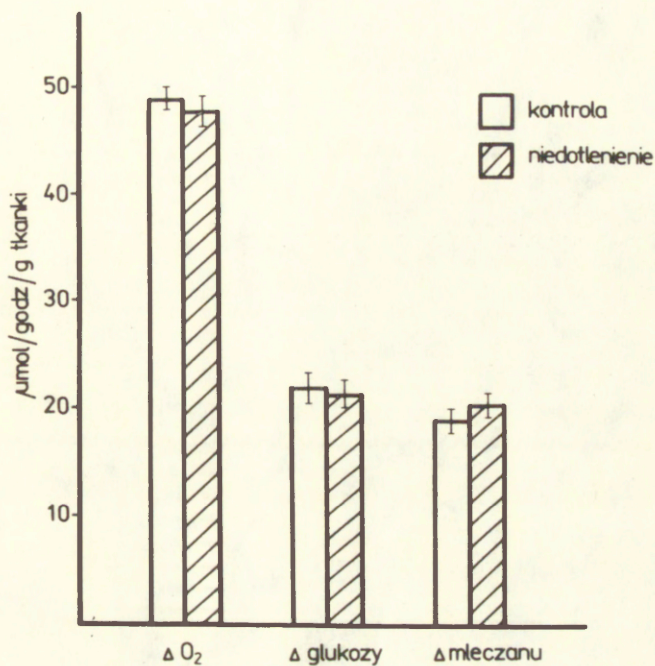
### III-8. Wpływ niedotlenienia na metabolizm lipidów w mózgu szczura

III-8 a. Wbudowywanie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji makromolekularnych w skrawkach mózgu szczura po przebytych niedotlenieniu.

Skrawki kory mózgu, uzyskane ze zwierząt niedotlenionych, wykazywały niezmienną w stosunku do kontroli aktywność metabolizmu podstawowego glukozy /Wykres 25/. Wskazuje to na nieuszkodzony podstawowy metabolizm energetyczny skrawków mózgu po przebytych niedotlenieniu.

Wykres 26 przedstawia wbudowywanie izotopu U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji białek, lipidów i kwasów nukleinowych w skrawkach kory mózgu szczurów kontrolnych i po przebytych niedotlenieniu. Wskazuje on, że jedynie wbudowywanie radioaktywnego znacznika do lipidów pozostaje znamienne obniżone w skrawkach zwierząt niedotlenionych poddanych reoksygenacji w warunkach *in vitro*. Podjęto więc dalsze, bardziej szczegółowe badania nad dynamiką i specyfiką tej inhibicji z uwzględnieniem różnych frakcji lipidowych. /Wykres 27/.

Stwierdzono, że niedotlenienie powoduje znacznie obniżenie wbudowywania radioaktywności z U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji dwuacylowych glicerofosfolipidów w tym: inozytolowych /PI/, serynowych /PS/, glicerofosfolipidów cholinowych /PC/, etanoaminowych /PE/ oraz kwasów tłuszczowych /FA/.



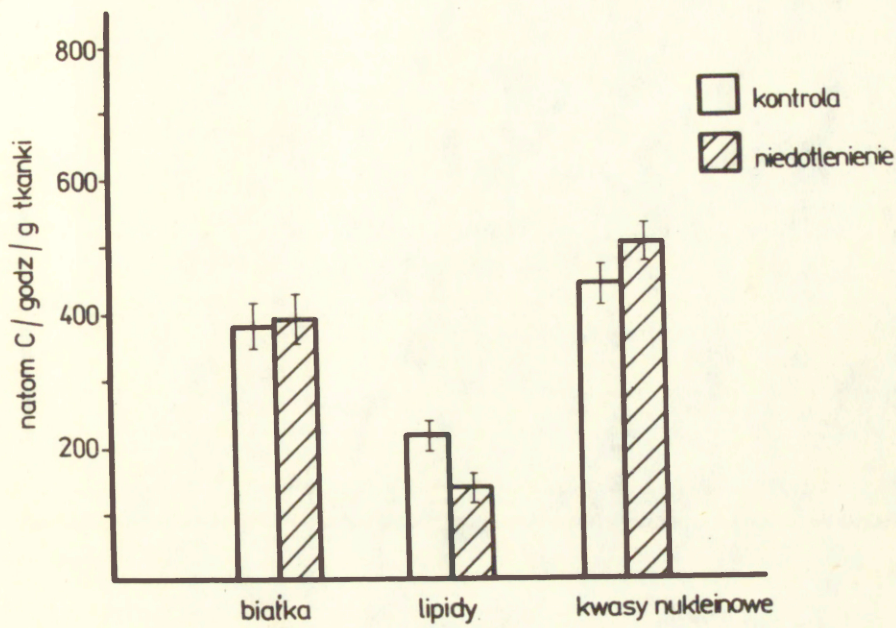
Wykres 25. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia na metabolizm podstawowy glukozy w skrawkach kory mózgu szczura.

Warunki inkubacji skrawków podano w rozdz. II.

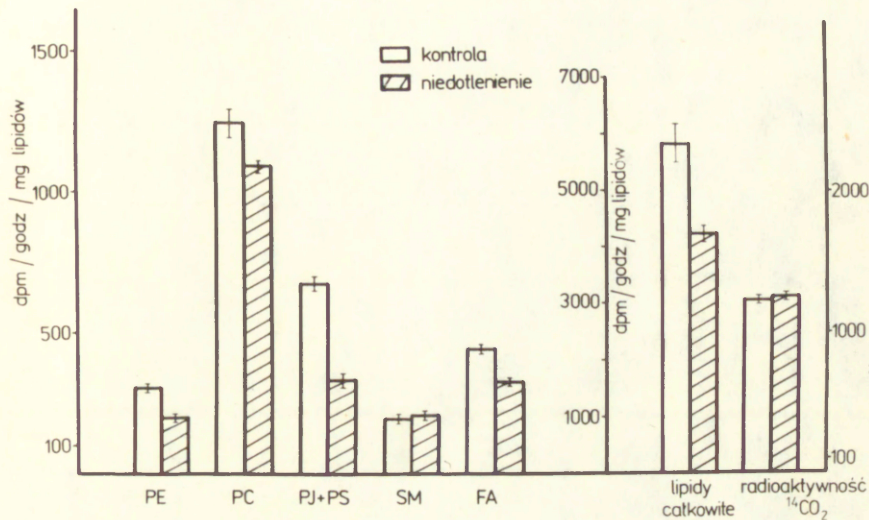
Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

/Domańska-Janik, Zaleska, Zalewska, Witter,

Pol.Med.Pub. 1978, 87-95/.



Wykres 26. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia na włączenie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy /aktywność specyficzna 1  $\mu\text{Ci}/15 \mu\text{moli}$ / do związków makromolekularnych w skrawkach mózgu szczura. Warunki inkubacji skrawków podano w rozdz. II. Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD. /Domańska-Janik, Zaloska, Zalewska, Witter, Pol.Med.Pub. 1978, 87-95/.



Wykres 27. Wpływ niedotlenienia na metabolizm i włączanie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy /aktywność specyficzna 1,25  $\mu\text{Ci} / \mu\text{mol}$ / do lipidów w skrawkach kory mózgu szczura.

Warunki inkubacji podano w rozdz. II.

Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

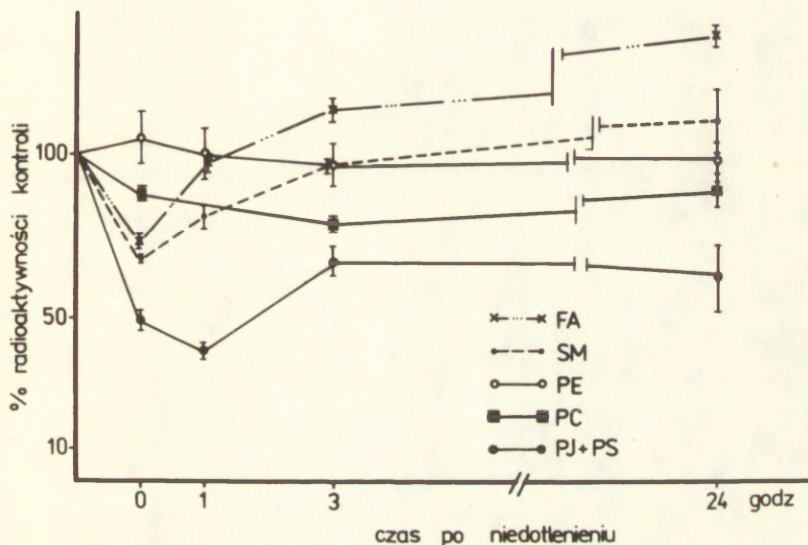
/Strosznajder, Domańska-Janik, Neurochom. Res.

1980, 5, 585-591/.



Wykres 28 obrazuje wbudowanie radioaktywności z U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do lipidów mózgu szczura w skrawkach badanych w okresie do 24 godz. po przebytych niedotlenieniu.

Wbudowanie znacznika do glicerofosfolipidów inozytowych i serynowych pozostawało przez cały ten okres zmniejszone o ok. 37% przy równoczesnym stopniowym wzroście wbudowywania izotopu do puli kwasów tłuszczowych związanych z lipidami.



Wykres 28. Włączanie znacznika U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy /aktywność specyficzna 1,25  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ / do fosfolipidów kory mózgu szczura in vitro, w różnym czasie po przebytych niedotlenieniu.

Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

/Strosznajder, Domańska-Janik, Neurochom. Res., 1980, 5, 585-591/.

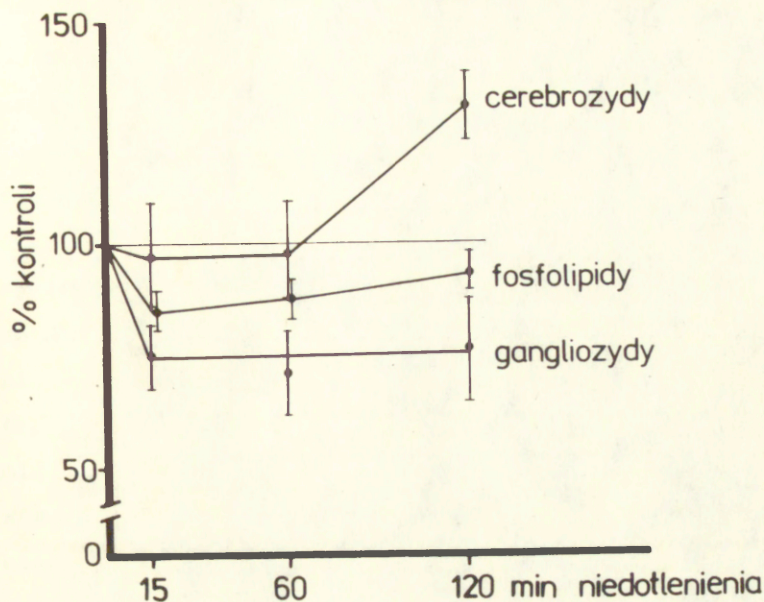
III-8 b. Wpływ niedotlenienia na skład lipidowy mózgu szczura

Wyraźne zaburzenia wbudowywania radioaktywności pochodzącej z węgli glukozy do lipidów w czasie niedotlenienia /Rozdz.

III-4/ jak również do skrawków kory mózgu szczura po niedotlenieniu, sugerowały możliwość wystąpienia zmian składu lipidowego mózgu w tym modelu eksperymentalnym.

Oznaczenia wpływu niedotlenienia na poziom fosfolipidów, glikolipidów obojętnych /cerebrozydów/ oraz glikolipidów kwaśnych /gangliozydów/ przedstawia wykres 29.

Zaobserwowano obniżenie poziomu fosfolipidów, znamienne statystycznie już po 15 min. niedotlenienia, z tendencją wzrostową w ciągu dalszych 2 godz. trwania eksperymentu. Również poziom gangliozydów /frakcji nie badanej in vitro z powodu ich znacznie wolniejszego obrotu metabolicznego/ ulegał znamiennej obniżeniu w mózgach zwierząt poddanych niedotlenieniu do około 75% wartości kontrolnej. Natomiast poziom glikolipidów obojętnych wykazywał wyraźną tendencję wzrostową w drugiej godzinie trwania niedotlenienia.



Wykres 29. Wpływ niedotlenienia na skład frakcji lipidowej półkul mózgu szczura.

Średnie wyniki z 5 doświadczeń  $\pm$ SD.

Oznaczenie poszczególnych frakcji lipidowych przeprowadzono w metod podanych w rozdz. II.

Stężenie kontrolne badanych związków w

półkulach mózgu wynosiło ( $\mu$ mol/g masy tkanki):

gangliozydów -  $1,62 \pm 0,038$ ,

fosfolipidów -  $51,7 \pm 0,65$ ,

cerebrozydów -  $15,31 \pm 0,44$ .

/Domańska-Janik, Strosznajder, Zalewska,

Neurosci. Res. 1982, 7, 363-370/.

#### IV. D Y S K U S J A

W przedstawionej serii badań wykazano, że wczesną reakcją metaboliczną mózgu na narastające niedotlenienie, wyprzedzającą załamanie się metabolizmu onergetycznego, jest reorientacja przemiany glukozy w kierunku glikolizy z zahamowaniem aktywności cyklu pentozowego oraz uogólniono ograniczenie syntez związków makromolekularnych. Przemawiają za tym obserwacje, poczynione w modelu umiarkowanej hipoksji, w którym nie notowano oznak deficytu energetycznego w mózgu. Pomimo to, już po 15 min niedotlenienia, obserwowano znaczny wzrost mleczanu z poziomu 1,88 do 9,8 mmol/kg oraz dwukrotny wzrost stosunku mleczan/pirogronian w półkulach mózgu. Wartości te utrzymywały się przed 2 godz. trwania niedotlenienia. Badania zmian pośrednich metabolitów glikolitycznych wskazują na aktywację tego procesu na poziomie stymulacji fosfofrukto-kinazy, typowej reakcji allosterycznej oddziałującej na zmiany stężeń wysokocenergetycznych związków fosforanowych /48, 126/.

Niecznany jest mechanizm mogący doprowadzić do aktywacji glikolizy w warunkach normoenergicznych. Wydaje się prawdopodobne, że za aktywację glikolizy we wczesnym stadium niedotlenienia odpowiedzialne są lokalnie występujące fluktuacje stężeń ATP, ADP i Pi, kompensowane na poziomie komórkowym i nieuchwytnie w ogólnych oznaczeniach.

Stymulacja glikolizy zbiega się czasowo z występowaniem pierwszych oznak zaburzonej aktywności bioelektrycznej

mózgu /79, 133, 135/.

Jak już wspomniano we wstępie, Bachelard i Cox /5, 23, 24, 25/ w prowadzonych in vitro badaniach reakcji skrawków mózgu na hipoksję i hipoglikemię wykazali wczesne zaburzenia wywoływanych potencjałów bioelektrycznych komórek warstwy ziarnistej hipokampa, pojawiające się w warunkach normoenergicznych. Potencjały wywoływane charakteryzują się na ogół większą odpornością na niedotlenienie niż spontaniczna aktywność bioelektryczna mózgu /79/. Inne dane z piśmiennictwa wskazują, że niedotlenienie o podobnym jak stosowano w przedstawionym cyklu badań nasileniu powoduje niespecyficzną aktywację zapisu EEG /133/. Obserwowane zwiększoną częstotliwość potencjałów miniaturowych, wzrost pobudliwości zakończeń pre- i postsynaptycznych oraz zwiększenie przewodnictwa synaptycznego /134, 135/. Lokalne zmiany stężenia jonów w środowisku związane z pobudzeniem aktywności neuronów, stają się sygnałem zwiększającym zużycie energii w procesach transportu białkowego. Powoduje to kompensacyjne uaktywnienie metabolizmu energetycznego komórek. Dochodzi więc zarówno do stymulacji glikozy jak i oddychania komórkowego, podobnie jak ma to miejsce przy depolaryzacji skrawków mózgu w badaniach in vitro przedstawionych w rozdziale III-6. Obserwuje się gromadzenie kwasu mlekowego w tkance z jednoczesnym wzrostem zużycia tlenu. Reakcja ta niweluje wpływ obszarów o zmniejszonym metabolizmie tlenowym na ogólny poziom zużycia tlenu przez mózg. Stąd, zależnie od zrównoważenia tych procesów, można obserwować bądź paradoksalnie zwiększone zużycie tlenu nawet o 200% w porównaniu z normą /11/ bądź też niezmiennione jego

wskaźniki /22, 94, 99/. Jednocześnie ze wzrostem zapotrzebowania energetycznego, związanego z aktywacją energozależnych układów enzymatycznych transportu jonowego, wewnątrzkomórkowe procesy syntezy, zużywające energię, zostają ograniczone.

Zahamowanie syntez związków makromolekularnych obserwowano w niedotlenieniu *in vivo* jako inhibicję wbudowywania uniwersalnego substratu, U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Podobne zahamowanie wbudowywania węgla  $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do związków makromolekularnych obserwowano również przy chemicznej depolaryzacji skrawków mózgu *in vitro* /Rozdz. III-6/. Ograniczenie procesów syntezy powiększa podstawową pulę energii komórki, która może być wykorzystana w celu utrzymania prawidłowego rozmieszczenia jonów w środowisku. Nawet w warunkach prawidłowych energia zużywana przez ATP-azy związane z transportem błonowym przekracza 50% ogólnego zużycia związków wysokoenergetycznych mózgu /100/. Podtrzymanie dyskryminacyjnej funkcji błony komórkowej jest głównym warunkiem zachowania integralności struktur komórkowych, nawet gdy odbywa się to kosztem czasowego ograniczenia procesów anabolicznych z towarzyszącymi temu zmianami czynnościowymi.

Jak podano we wstępie jest wysoce prawdopodobne, że mózg znajduje się zawsze w warunkach granicznego utlenowania. Tym samym reorientacja metabolizmu w kierunku procesów wytwarzających energię z ograniczeniem reakcji anabolicznych towarzyszy prawdopodobnie zawsze zwiększonej lokalnie aktywności neuronów. Podejmowane są próby badania tego procesu *in vivo* z zastosowaniem metod autoradiograficznych /13, 14, 147/. Pobudzenie lokalne czynności bioelektrycznej z

na ocenę ilościową stopnia inhibicji poszczególnych w syntezie związków makromolekularnych w umiarkowanym utlenieniu wydaje się trudna w przypadku zastosowania takiego ich prekursora jakim jest glukoza. Wymagałoby to też szybkości przepływu /flow/ znacznika do wszystkich miejsc mogących służyć jako pośrednie substraty do syntezy tych związków makromolekularnych. Wyniki przedstawionych badań pozwalają na względną ocenę zużycia glukozy w procesach anabolicznych mózgu w normie i niedotlenieniu. Jednakże stosowane do tej pory metody nie dają innej niż jakościową, oceny procesu /147/ in vivo.

Pod uwagę wszelkie ograniczenia wybranej metody i po uzyskaniu dodatkowych informacji o rozcieleniu izotopu w podstawowych pulach metabolicznych, jak podano w rozdziale III-4, można przyjąć, że ograniczenie aktywności anabolicznej mózgu w nasilającym się niedotlenieniu ma charakter uogólniony i zasadniczo odwracalny w krótkim czasie przywróceniu prawidłowego utlenowania.

W badaniach nad regulacją procesów syntez komórkowych w warunkach niedotlenienia, w ostatnich latach dużo uwagi poświęcono neurotransmiterom. Wykazano obniżenie syntez amin biogennych w niektórych obszarach mózgu jak i uogólnioną inhibicję syntezy acetylocholino /66, 170/. Hipotezę o szczególnej wrażliwości procesów anabolicznych na zmniejszające się utlenowanie tkanki nerwowej sformułował jednocześnie z naszymi

sugestiami, Blass i Gibson /12/, na podstawie badań acetylocholino. Przedstawiono powyżej badania podtrzymują ją w stosunku do szerokiej grupy związków makromolekularnych: białok, lipidów i kwasów nukleinowych.

Na zahamowanie procesów anabolicznych, wykorzystujących energię do syntez komórkowych, wskazuje pośrednio obniżenie szybkości zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych w mózgu szczurów dekapitowanych po niedotlenieniu. Mózg szczurów po dekapitacji zużywa większość wysokoenergetycznych związków fosforanowych w pierwszej minucie tych skrajnych warunków ischemicznych. U zwierząt poddanych niedotlenieniu szybkość tego procesu ulega wyraźnemu zwolnieniu z wartości  $\Delta \sim P$  16,8<sub>±</sub>1,08 mmol/kg/min do 11,6<sub>±</sub>2,02 mmol/kg/min, czyli zmniejsza się o ok. 30% w stosunku do kontroli.

Podobny efekt niedotlenienia na metabolizm podstawowy mózgu wykazali w swoich badaniach również inni autorzy /52, 55/ i interpretowali je jako pośredni dowód inhibicji anabolicznych procesów energochłonnych.

Pomimo powtórzenia tych obserwacji na własnym materiale, wydaje się niezbędne zachowanie większej rezerwy w stosunku do tej interpretacji, pierwotnie uznanej za słuszną. W późniejszych badaniach własnych wykazano bowiem inną istotną różnicę w reakcji podokapitacyjnej zwierząt kontrolnych i niedotlenionych. Typową odpowiedzią mózgu na ostre niedokrwienie jest natychmiastowy wzrost poziomu 3',5'-cAMP /39, 68, 100/. Natomiast w mózgach zwierząt niedotlenianych przez 2 godz. i poddanych dekapitacji, nie stwierdzono gromadzenia się 3',5'-cAMP w wyniku całkowitego, podokapitacyjnego



niedokrwienia. Opierając się na wynikach własnych badań *in vitro* /100/ oraz danych z piśmiennictwa /68, 106/, należy sądzić, że akumulacja cAMP w niedokrwionym mózgu zależna jest od pobudzenia  $\beta$ -receptorów adrenergicznych. Obniżenie ich wrażliwości w umiarkowanym niedotlenieniu /100/ jak również opróżnienie rezerw noradrenaliny w pęcherzykach synaptycznych zwierząt rezerpinizowanych /68/, znosi poniedokrwioną akumulację 3',5'-cAMP w mózgu szczura.

Dostępne z piśmiennictwa dane na temat wpływu niedotlenienia na aktywność  $\beta$ -receptorów w mózgu są kontrowersyjne. Opisano stymulację tego układu w warunkach skrajnego niedokrwienia podokapitacyjnego /106/. Inni autorzy wykazali zanik wrażliwości układu 3',5'-cAMP na stymulację noradrenaliną w przebiegu encefalopatii niedokrwiennej /96/. We własnych badaniach wykazano /100/ wyraźne obniżenie wrażliwości układu cyklazy adenylowej na noradrenalinę *in vitro* oraz brak akumulacji 3',5'-cAMP po dekapitacji uprzednio niedotlenionych zwierząt. Zaobserwowane różnice poziomu 3',5'-cAMP w mózgach dekapitowanych szczurów kontrolnych i niedotlenianych mogą być dodatkową przyczyną obserwowanych po dekapitacji różnic w podstawowym metabolizmie w tych dwóch grupach zwierząt.

W badaniach własnych nie stwierdzono zmian w podstawowym stężeniu 3',5'-cAMP w mózgu szczurów w czasie umiarkowanego niedotlenienia. Podobny wynik otrzymała w swoich badaniach Folbergrova /141/. Wcześniejsze badania /10/ wykazały, co prawda, obniżenie poziomu 3',5'-cAMP w warunkach umiarkowanego niedotlenienia, lecz mogło to być spowodowane mniej precyzyjną techniką otrzymywania próbek tkankowych do oznaczeń.

W cytowanej pracy stosowano technikę dekapitacji i zamrażania tkanki zarówno dla kontroli jak i niedotlenienia. W przedstawionych badaniach własnych stężenie substratów oznaczano w mózgach szczurów w całości zamrażanych w ciekłym azocie. Przy technice dekapitacyjnej krótki okres towarzyszący jej niedokrwienia /157/ mógł być przyczyną /przy opisanej różnicy reakcji układu cAMP na dekapitację/ pozornego obniżenia poziomu cAMP w mózgach zwierząt niedotlenionych w stosunku do kontroli.

Stymulacja glikolizy i zahamowanie syntez związków makromolekularnych w umiarkowanym niedotlenieniu łączy się ze znacznym ograniczeniem szybkości utleniania glukozy w cyklu pentozowym. Wniosek ten opieramy na wynikach pomiaru szybkości gromadzenia się kwasu 6-fosfoglukonowego /6PGA/, po zahamowaniu aktywności onzyму odpowiedzialnego za dalszą jego przemianę w C.P. Wykazano, że niedotlenienie powoduje znaczne zwolnienie akumulacji 6PGA w mózgu szczurów. Jak podano w opisie metody badań, przyrost 6PGA w mózgu po podaniu 6-aminoamidu kwasu nikotynowego /6-AN/ zależy od dwóch czynników:

1. Szybkości syntezy endogennego inhibitora reakcji DE-6PGA, który jest analogiem  $NADP^+$  z dodatkową grupą aminową w pozycji 6 amidu kwasu nikotynowego /6A-NADP<sup>+</sup>/
2. Od aktywności DE-G6P, enzymu limitującego utlenianie glukozy w cyklu pentozowym /Rozdział III-7 b/.

Szybkość syntezy endogennego inhibitora 6A-NADP<sup>+</sup> /fosforanu 6-aminonikotynoamido-adenino dinukleotydu/ w mózgu jest uzależniona od aktywności mikrosomalnego enzymu hydrolizującego

/77, 95/, który wykazuje działanie w stosunku do nukleotydów pirydynowych. Syntezę tego analogu nukleotydów pirydynowych w mózgu opisali Coper i Herken w 1962 roku. Mechanizm syntezy nukleotydów zawierających 6-AN przebiega następująco /77/: najpierw zachodzi reakcja hydrolizy dinukleotydu do nikotynamidu i adenozyno difosforybozy, zapoczątkowując reakcję wymiany. Adenozyno difosforyboza służy jako akceptor dla cząsteczki 6-AN, przy jego stężeniach przewyższających stężenie nikotynamidu.

Reakcja hydrolizy i wymiany nikotynamidu w cząsteczce nukleotydów pirydynowych jest reakcją niewymagającą dostarczenia energii i przebiega w obecności enzymu mikrosomalnego z szybkością zależną od stężenia związków biorących w niej udział. Substratem reakcji jest utleniona forma nukleotydów pirydynowych / $\text{NAD}^+$  lub  $\text{NADP}^+$ /. Teoretycznie szybkość reakcji wymiany w niedotlenieniu mogłaby ulegać ograniczeniu przy znacznym zmniejszeniu stężenia nukleotydów. Efektywnym inhibitorem reakcji  $\text{DP-6PGA}$  jest powstający  $6\text{A-NADP}^+$ . Jak wspomniano, jego synteza zależy od endogennego stężenia  $\text{NADP}^+$ . Reakcja ta wykazuje współzawodnictwo o 6-AN w stosunku do aktualnego stężenia  $\text{NAD}^+$ . Dostępne dane z pośmiennictwa wskazują, że układ oksydoredukcyjny  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  jest bardziej wrażliwy na niedotlenienie niż układ  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Niedotlenienie, szczególnie o niezbyt dużym nasileniu, nie wydaje się powodować deficytu  $\text{NADP}^+$ , podczas gdy stężenie  $\text{NAD}^+$  drastycznie się obniża /120/. Tak więc teoretycznie nie wydaje się prawdopodobne zahamowanie syntezy  $6\text{A-NADP}^+$  w tkance niedotlenianej, tym bardziej, że spadek poziomu  $\text{NAD}^+$  będzie ułatwiał w

mechanizmie konkurencyjnym reakcję 6-AN z  $\text{NADP}^+$ .

Za tym wnioskiem przemawia również zaobserwowane bardzo znaczne obniżenie akumulacji 6PGA w grupie zwierząt, w której niedotlenienie rozpoczynano w  $\frac{1}{4}$  godz. po podaniu 6-AN. W tym czasie endogenne stężenie 6A- $\text{NADP}^+$  jest już wysokie /78/ i nawet ewentualne zahamowanie jego wewnątrzkomórkowej syntezy nie powinno odbić się na stopniu inhibicji cyklu pentozowego. Również gwałtowny przyrost 6PGA w mózgu szczurów w pierwszej godzinie po zakończeniu niedotlenienia; wskazuje pośrednio, że aktualne stężenie inhibitora tkankowego jest wystarczające do zahamowania reakcji  $\text{DP-6PGA}$ .

Podsumowując, wydaje się, że za obniżenie akumulacji 6-fosfoglukonianu po podaniu 6-AN w mózgu szczurów w niedotlenieniu odpowiedzialne jest zmniejszenie utleniania glukozy-6-fosforanu przez  $\text{DP-G6P}$ , pierwszy i ograniczający aktywność, enzym cyklu pentozowego.

Po przerwaniu niedotlenienia sytuacja ulega gwałtownej zmianie. Szybka akumulacja 6PGA w pólkach mózgu szczurów po niedotlenieniu, jak również zaobserwowany wzrost niesymetryczności spalania różnie znakowanych izotopów glukozy / $1-^{14}\text{C}$  vs.  $6-^{14}\text{C}$ / in vitro wskazują, że po niedotlenieniu następuje znaczna stymulacja przemiany glukozy w C.P.

Obliczając szybkość przyrostu 6PGA po podaniu 6-AN w mózgu w normoksji, otrzymano średnie wartości wynoszące 0,4 mmol/kg masy/godz dla kory i 0,8 mmol/kg masy/godz dla pnia mózgu szczura /Wykres 14/.

Biorąc pod uwagę, że transportowana do mózgu glukoza jest w warunkach prawidłowych całkowicie metabolizowana przez

tkankę /75/ można przyjąć, że szybkość jej transportu do mózgu odpowiada szybkości metabolizmu. W przedstawionych powyżej doświadczeniach oznaczyliśmy tę wartość na 0,44 mmola/kg masy/min. Według danych z piśmiennictwa u nieusypianych szczurów wartość ta waha się od 0,54 - 0,65 mmola/kg masy/min /26/. Inni autorzy /6/ określali jej wartość na poziomie 0,48 mmola/kg masy/min, a nawet 0,96 mmola/kg masy/min /62/ lub znacznie niższą, wynoszącą 0,14 mmola/kg masy/min /144/.

Opierając się na własnych oznaczeniach, przemiana pentozowa zużywa 0,4 mmol/kg masy/godz. czyli 1.5% całej spalanej glukozy w korze mózgu i 0,8 mmol/kg masy/godz., czyli około 3% w pniu mózgu. W niedotlenieniu, pomimo wzrostu transportu glukozy, aktywność jej spalania w C.P. spada do około 30% wartości kontrolnych. Pomimo, że oznaczona szybkość akumulacji 6PGA w mózgu mieści się w wartościach aktywności C.P. oznaczanych metodami pośrednimi przez innych autorów /80, 81/, to należy zachować krytycyzm co do ściśle ilościowej interpretacji przedstawionych wyników. W założeniach metody pominięto bowiem całkowicie istnienie aktywności enzymu defosforylującego 6PGA do kwasu glukonowego w mózgu /78/. Dane z piśmiennictwa wskazują, że stężenie kwasu glukonowego, minimalnie w warunkach prawidłowych, rośnie proporcjonalnie do stężenia 6PGA. W warunkach zahamowania DH-6PGA, powiększającego stężenie kwasu 6-fosfoglukonowego o dwa rzędy wielkości, znaczenie tej drugiej puli może znacznie wzrastać. Stąd też szybkość gromadzenia się 6PGA nie jest ściśle ilościowym oznaczeniem glukozy metabolizowanej w cyklu pentozowym, a tylko przybliżonym wykładnikiem aktywności tej przemiany.

Podobnie zresztą jak gromadzenie się kwasu mlekowego jest jedynie wykładnikiem aktywności przemiany glikolitycznej w tkance.

Pomimo tych zastrzeżeń wydaje się, że zastosowana metoda daje nowe możliwości badania udziału cyklu pentozowego w metabolizmie mózgu. Do tej pory nie dysponowano ilościową metodą oceny aktywności cyklu pentozowego w mózgu *in vivo*. Jedyna praca, opisująca metodę ilościowego oznaczenia aktywności cyklu pentozowego w mózgu /73/ pomimo słuszych założeń teoretycznych budzi zastrzeżenie co do praktycznych możliwości jej zastosowania. Metoda oparta jest na określeniu zmiany wielkości puli izotopu kwasu 5-fosfoglukonowego oznaczanego w mózgu w 2, 3 i 4 sek. po dotętnicznym podaniu znakowanego prekursora - kwasu glukonowego. Wątpliwości budzi możliwość dokładnego ilościowego badania w odstępach sekundowych metabolitów mózgu, szczególnie, że stosowana metoda zamrażania tkanki po dekapitacji wyklucza natychmiastową dezaktywację metabolizmu /157/. Poza tym oznaczenie aktywności C.P. opiera się na porównaniu szybkości gromadzenia się znacznika w tkance w 2 pulach metabolicznych, których radioaktywność różni się między sobą o 5 rzędów wielkości. Przy tak dużych różnicach radioaktywności możliwość artefaktycznego zanieczyszczenia puli o niższej aktywności jest bardzo duża. Wyniki otrzymane przez cytowanych autorów mogą również budzić wątpliwości. Aktywność C.P. w warunkach prawidłowych obliczono na 30% całej metabolizowanej przez mózg glukozy. Wydaje się to wartością bardzo zawyżoną w stosunku do wszystkich znanych z piśmiennictwa, szacunkowych obliczeń,

wykonywanych metodami pośrednimi /70, 81/. U zwierząt poddanych narkozie eterowej wartość ta, wg w/w autorów, ma przekraczać 90% zużywanej glukozy /72/, co trudno jest pogodzić z przyjętymi poglądami na procesy regulacji przemiany podstawowej mózgu.

Trudno jest rozstrzygnąć na podstawie własnych badań jakie mogą być bezpośrednie przyczyny zahamowania przemiany glukozy w cyklu pentozowym w niedotlenionym mózgu.

W świetle otrzymanych wyników, dotyczących regulacji aktywności kluczowych enzymów cyklu pentozowego *in vitro* /Rozdział III-7 b/, najbardziej prawdopodobnym byłoby przypisanie tego zahamowania zwiększonej redukcji układu  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  w niedotlenieniu. Z drugiej jednak strony badania stanu oksydo-redukcji nukleotydów pirydynowych w mózgu /88, 120/ podkreślają względną stabilność i niewrażliwość układu  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  w porównaniu z  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  na niedobór tlenu. Szybkość utleniania  $\text{NADH}$  jest bezpośrednio związana z potencjałem fosforanowym cytoplazmy z jednej strony, a łańcuchem fosforylacji mitochondrialnych z drugiej /165/. Dlatego też  $\text{NAD}$  występuje w komórce w przewodze formy utlenionej w stosunku 1000:1. Natomiast układ  $\text{NADP}^+/\text{H}$  nie uczestniczy bezpośrednio w metabolizmie energetycznym komórki. Sprzężony jest on natomiast z wieloma reakcjami anabolicznymi jako dawca aktywnego wodoru. Stosunek formy utlenionej do zredukowanej w mózgu w tym układzie wynosi 1:100 /120/. Ta przewaga formy zredukowanej w warunkach *in vivo* powoduje, że układ nukleotydowy  $\text{NADP}^+/\text{H}$  jest wielokrotnie mniej podatny na redukcję niż układ  $\text{NAD}^+/\text{H}$ . Stąd też wyznacznikiem aktywności cyklu pentozowego w niedo-

tlenu wydatkuje się w większym stopniu szybkość zużycia NADPH, niż bezpośrednia redukcja  $\text{NADP}^+$  w reakcjach powiązanych z podstawowym metabolizmem energetycznym.

Bezpośrednio po ustąpieniu niedotlenienia aktywność cyklu pentozowego znacznie wzrasta. Wskazują na to zarówno badania *in vivo* jak i *in vitro*. Również aktywności związanych z nim enzymów:  $\text{DH-66P}$  i  $\text{DH-6PGA}$ , wzrastają już w trakcie niedotlenienia /Rozdział III- 5 b/. Na rozbieżność pomiędzy aktualną, a potencjalną intensywnością przemiany pentozowej w mózgu wskazują zarówno własne badania, jak i dane innych autorów /7, 118/. Z badań własnych nad stymulacją tego procesu przez związki utleniające NADPH *in vitro* wynika możliwość wielokrotnego przyspieszenia utleniania 1- $^{14}\text{C}$ -glukozy w skrawkach tkankowych przez zastosowanie egzogennych akceptorów elektronów takich jak, PhMS czy glutation. Również maksymalna aktywność dehydrogenaz  $\text{G6P}$  i  $\text{6PGA}$ , enzymów regulujących C.P. w mózgu, jest wystarczająco duża, aby utłonić całą metabolizowaną przez mózg glukozę. Dlatego też wydolność układów enzymatycznych nie może być decydująca dla aktywności C.P., który w mózgu obejmuje jedynie niewielką frakcję glukozy spalanej w glikolizie /45, 104/. Jakikolwiek byłoby bezpośrednio przyczyną zmian aktywności C.P. w czasie niedotlenienia i po jego ustąpieniu, odzwierciedlają one zmianę zaopatrzenia tkanki w NADPH i pentozy, dwa podstawowe produkty powstające w tej przemianie. W niedotlenieniu obniżenie aktywności cyklu zbiega się z zahamowaniem procesów syntezy związków makromolekularnych, jak również ze zmniejszeniem obrotu metabolicznego niektórych amin katecholowych /130/. Oba te procesy



barierę krew-mózg. Posłużono się metodą izotopową opisaną przez Gaitonde i wsp. /62/. W porównaniu z pracą oryginalną pominięto korekcję równoważącą ilość radioaktywności straconej przy dekarboksylacji pirogronianu. Pomimo, iż we własnych oznaczeniach 30 do 50% radioaktywności znajdowano we frakcji aminokwasowej, to używając 6-[<sup>3</sup>H]- zamiast U-[<sup>14</sup>C]-glukozy, wykluczono straty powodowane dekarboksylacją węgli glukozy, nie tylko na poziomie pirogronianu ale i w innych reakcjach cyklu Krebsa.

Oznaczona wartość transportu glukozy z krwi do mózgu wynosiła 0.44 mmola/kg masy/min w normoksji. Wynik ten można porównać z danymi z piśmiennictwa, które u różnych autorów kształtują się w granicach od 0,48 do 0,62 mmola/kg masy/min /6, 26, 74/. W umiarkowanym niedotlenieniu transport glukozy do mózgu ulegał przyspieszeniu do 0,73 mmola/kg masy/min. W jednej znanej mi pracy określającej wychwyt glukozy przez mózg w niedotlenianiu metodą autoradiograficzną z użyciem U-[<sup>14</sup>C]-2-dezoksy-glukozy wykazano uogólnioną stymulację wbudowania radioaktywności w czasie niedotlenienia /53/. Za ten wyraźny wzrost transportu glukozy w niedotlenieniu odpowiedzialny jest prawdopodobnie wzrost gradientu stężeń glukozy pomiędzy krwią, a przestrzenią mózgu do której odbywa się jej transport. Stężenie glukozy w tej przestrzeni spada z wartości 4,83 do 4,41 ml. We własnych badaniach wielkość tej przestrzeni w warunkach prawidłowych określono na 32% ogólnej masy tkanki. Była ona większa od przestrzeni pozakomórkowej mózgu szczura oznaczanej in vivo przy pomocy innych znaczników /3, 149/ jednakże odpowiadała ściśle wartościom otrzymanym

przy użyciu 3-O-metyloglukozy jako znacznika /130/.  
Opierając się na przesłankach podanych w rozdziale III-4, wydaje się, że wielkość przestrzeni mózgu do której odbywa się transport glukozy ulega w niedotlenieniu powiększeniu z 32% do 56% ogólnej masy tkanki. Współcześnie poglądy na kinetykę transportu i dystrybucję glukozy w mózgu są zróżnicowane. Przestrzeń między komórkami śródbłonna naczyń i okołokapilarnego gleju, przez którą odbywa się transport, jest na tyle mała, a w dodatku wypełniona gęstą mukopolisacharydową substancją, że stanowić może funkcjonalną barierę przepuszczalności /138/. Parametry kinetyki wybiórczego transportu i dyfuzji substancji przez ten kompleks błonowy wyznaczają charakter bariery krew-mózg.  
Typowy dla mózgu transport glukozy przez specyficzny układ przenośnikowy /carrier - mediated/ zachodzi pomiędzy krwią a przestrzenią międzykomórkową mózgu /27, 131/. Glej okołonaczyniowy wraz z płynem pozakomórkowym stanowi przestrzeń, przez którą glukoza dostaje się do pozostałych elementów komórkowych mózgu. Przejście przez inne, poza barierą, elementy błonowe komórek o.u.n. ograniczane jest jedynie szybkością dyfuzji /112/, bądź układem przenośnikowym wysokiego powinowactwa /51/, nierozróżnialnym od szybkości wewnątrzkomórkowej fosforylacji używanych do jego oznaczeń markerów /np.  $K_m$  2 dezoksy-glukozy dla heksokinazy wynosi 0,25 mM /3/, a  $K_m$  tzw. transportu wysokiego powinowactwa 2 dezoksy-glukozy do synaptosomów wynosi 0,24 mM /51/ /.

Tak więc przestrzeń pozakomórkowa wraz z glejem o funkcji

transportującej glukozę /astroglej/, wzrastałaby w niedotlenieniu. Znajduje to potwierdzenie w obserwacjach mikroskopowo-elektronowych, wskazujących na obrzmienie gleju gwiazdzistego w następstwie umiarkowanego nawet niedotlenienia. Może to stwarzać dodatkową przyczynę utrudniania dyfuzji substratów do komórek o.u.n. i w konsekwencji do pogłębienia zaburzeń funkcji transportującej błon komórkowych.

Błona komórkowa jest biologicznym układem metastabilnym i utrzymanie jej optymalnej funkcjonalnie struktury fizyko-chemicznej wymaga ciągłych nakładów energetycznych. "Awaryjne" ograniczenie zużycia energii we wszystkich procesach nie związanych bezpośrednio z transportem błonowym, korzystne jako krótkotrwały proces adaptacyjny, może stać się przyczyną narastających uszkodzeń struktury błon komórkowych przy przedłużającym się niedotlenieniu. Dodatkowym czynnikiem, zwiększającym wrażliwość błon komórkowych na procesy destrukcyjno, staje się niewątpliwie zmiana środowiska spowodowana niedotlenieniem. Znaczne nagromadzenie kwasu mlekowego, przewyższające spotykane w ostrych stanach niedokrwienych, a związane ze zwiększonym transportem glukozy do mózgu w niedotlenieniu, uaktywnia liczne procesy kataboliczne, które nie mogą być zrównoważone zwiększeniem syntez. Patogeny charakter laktoacidozy w uszkodzeniach hipoksyjnych mózgu ma obszerną dokumentację doświadczalną /124/.

Innym czynnikiem mogącym nasilać hipoksyjne uszkodzenia struktury błony jest opisano poprzednio, zahamowanie przemiany glukozy w cyklu pentozowym.

Zarówno z badań własnych, jak i danych z piśmiennictwa wynika, że metabolizm energetyczny komórki nie ulega uszkodzeniu w umiarkowanym niedotlenieniu. W badanym modelu oddychanie tkankowe było niezmienione, a glikoliza powracała do normy wraz z prawidłowym utlenowaniem tkanki. Wskazuje to, że po zakończeniu epizodu niedotlenienia komórki dysponują aparatem produkującym energię potrzebną do naprawy ewentualnych uszkodzeń polipoksyjnych. Dowodem, że po reoksygenacji rzeczywiście zachodzi efektywnie proces naprawczy może być wzrastająca w tym okresie szybkość zużycia związków wysokoenergetycznych /Rozdz. III-3/, oraz stymulacja C.P. /Rozdz. III-5/. Również zaobserwowane uprzednio zmiany funkcjonalne błon komórkowych, przejawiające się zanikiem wrażliwości układu cyklicznej adonylnowej na skrajne warunki niedokrwienia /Rozdz. III-3, Wykres 5/ jak i na stymulację noradrenaliną in vitro /100/, cofały się w przeciagu 6 godz. po niedotlenieniu.

Inne zaburzenia funkcji błon komórkowych mogą trwać znacznie dłużej. Rafałowska /136/ obsorwowała zahamowanie transportu cytrynianu z cytoplazmy do mitochondriów jeszcze w 7 dniu po przebytych niedotlenieniu.

Przytoczone obserwacje, wskazujące na zaburzenia procesów, których podłoże stanowi błona plazmatyczna, sugerują istotne zmiany zachodzące w jej strukturze w czasie niedotlenienia. Liczne badania wskazują na lipidy błon komórkowych, jako miejscce szczególnie wrażliwe na uszkodzenia w warunkach zaburzonego metabolizmu podstawowego o.o.n. /niedotlenienie, niedocukrzonice, stany drgawkowe/ /148/.

Powstały dwie hipotezy dotyczące mechanizmu tych uszkodzeń. Pierwsza postulowała wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych /FFA/, uwalnianych z fosfolipidów na skutek ich hydrolyzy, jako pierwotnej przyczynę całego łańcucha wtórnych uszkodzeń metabolicznych i strukturalnych o.u.n. /8, 9, 129/. Drugą, zaproponowaną równoległe przez Majewską i wsp. /114/ i Demopoulou /35/, wskazywała na możliwość uaktywnienia procesów utleniania wolnorodnikowego lipidów i uwolnionych kwasów tłuszczowych w czasie trwania, bądź też po przebytym niedotlenieniu /61, 148/. Obie te hipotezy pierwotnie odnośzono do ostrych uszkodzeń anoksyjnych i niedokrwiennych. W ostatnich latach wykazano, że poziom wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu ulega zwiększeniu również w hypoglikemii /1/, obrzęku mózgu /169/ w stanach drgawkowych /8, 116/, jak również w wyniku łagodnego niedotlenienia /155/. We wszystkich tych warunkach istnieją potencjalne możliwości uaktywnienia procesów utleniania wolnorodnikowego uwolnianych kwasów tłuszczowych. Zaobserwowane w przedstawionej pracy zahamowanie aktywności C.P. w tych warunkach, nasilałoby ten proces, poprzez obniżenie potencjału antyoksydacyjnego tkanki. Toksyczność uwolnianych kwasów tłuszczowych nie musi być skierowana, jak sugerowano pierwotnie /8, 129/, na rozprzężenie metabolizmu energetycznego komórki. Wolne kwasy tłuszczowe /szczególnie wielonienasycone/, zmieniają płynność błony /29/ i zwiększają jej przepuszczalność dla wody i elektrolitów /19, 20/. Pod wpływem wolnych kwasów tłuszczowych ulegają również zaburzeniom procesy transportu błonowego w zakończeniach presynaptycznych /161/.

Uwolnieniu kwasów tłuszczowych i stymulacji procesów peroksydacji lipidów w stanach zaburzeń metabolicznych towarzyszą, aczkolwiek mniej drastyczne, zmiany składu i metabolizmu komponentu lipidowego błony cytoplazmatycznej /2, 35, 39/. W ostatnich latach pogląd na stabilność strukturalną i metaboliczną błony komórkowej uległ zasadniczej zmianie. Istnieje coraz więcej dowodów, że liczne jej składniki wykazują znaczną dynamikę przemian biochemicznych, których zakłócenie powoduje zasadniczą zmianę reakcji błony jako całości /oddziaływania kooperatywne/. Również powierzchnia błony cytoplazmatycznej może ulegać głębokim przekształceniom, zmieniając reakcję komórek na zmiany środowiska.

W przedstawionych badaniach wykazano, że frakcja lipidowa, główny składnik struktur błonowych komórki jest /w porównaniu z innymi frakcjami związków makromolekularnych/ szczególnie wrażliwa na niedotlenienie. Poza znaczącym spadkiem poziomu fosfolipidów i gangliozydów w mózgu szczurów niedotlenionych, obserwowano obniżenie wbudowania prekursora, U- $[^{14}\text{C}]$ -glukozy do frakcji lipidowej, utrzymujące się przez 24 godziny od zakończenia niedotlenienia. Podobny wpływ niedotlenienia na wbudowywanie szeregu prekursorów lipidowych wykazali inni autorzy /2, 101, 168/. W badaniach własnych najgłębsze i najdłużej trwające zaburzenia po niedotlenieniu wykazywała frakcja glicerofosfolipidów kwaśnych /w której przewagę stanowią glicerofosfolipidy inozytowe/. Również wbudowywanie glukozy w czasie trwania niedotlenienia obniżało się wyraźnie w tej właśnie frakcji lipidowej.

Interesujące jest, że uszkodzenie syntezy fosfolipidów kwaśnych wydaje się charakterystyczne jedynie dla umiarkowanego niedotlenienia i nie zostało stwierdzone w głębokich stanach hipoksyjnych i niedokrwienych /156/. Obniżenie poziomu gangliozydów w mózgu było również typowe dla przewlekłego, umiarkowanego niedotlenienia /40/. Glicerofosfolipidy inozytolowe, podobnie jak gangliozydy, stanowią związki o szczególnej aktywności i znaczeniu dla receptorowej funkcji błon komórkowych /29, 122/. Fosfolipidy inozytolowe są bezpośrednio związane z funkcją receptorową komórek nerwowych /76/, najprawdopodobniej poprzez układ aktywowanej przez dwuacylglicerol kinazy C /125/ lub cAMP zależnej kinazy A /146/. Zahamowanie energozależnego obrotu fosfatydylinozytoli w błonie komórkowej jest jednym z postulowanych mechanizmów hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń komórek nerwowych /148/. Gangliozydy, ze względu na swoją charakterystykę chemiczną /związki amfifiliczne o silnym, ujemnym ładunku jonowym/ oraz lokalizację /zewnątrzną warstwę błony komórkowej/, są cząsteczkami o dużym wpływie na powierzchniowe procesy komórkowe /29/. Zaobserwowany spadek poziomu gangliozydów, mierzony stężeniem kwasu sialowego w lipidach, może być wynikiem wzmożonej aktywności neuraminidazy w warunkach niedotlenienia. Enzym ten wykazuje ściłą zależność od pH, z optimum działania w środowisku kwaśnym. Jednocześnie obserwowany wzrost poziomu glikolipidów obojętnych w drugiej godzinie trwania niedotlenienia, sugerowałby dalszą degradację gangliozydów z udziałem enzymów lizosomalnych. W piśmiennictwie istnieją doniesienia o wzmożonej degradacji gangliozydów mózgu w stanach niedotlenienia

/109, 137/. Gangliozydy są potencjalnymi modulatorami procesów przekazywania synaptycznego /28/. Wychwyty zwrotny neuroprzekazników przez zakończenia presynaptyczne oraz zależny od potencjału transport wapnia, są regulowane przez minimalne nawet zmiany składu związanych z błonami gangliozydów /41/. Pierwotnie sugerowano, że gangliozydy funkcjonują jako receptory ligantów aktywujących cyklazę adenylanową, jednakże dalsze badania, za wyjątkiem użycia toksyn neurotropowych, nie potwierdziły tej hipotezy. Wykazano natomiast ich istotną rolę w modulowaniu aktywności cyklazy adenylanowej, szczególnie w procesach różnicowania komórek /30, 34, 132/. Jak już wspomniano, po niedotlenieniu obserwowano czasowe odwrócenie  $\beta$ -receptorów w skrawkach tkankowych mózgu na stymulację noradrenaliną /100/. Brak akumulacji cAMP u szczurów deaktywowanych po niedotlenieniu /Rozdz. III-3/ należy tłumaczyć zanikiem tej właśnie reakcji.

Zależność układu cyklazy adenylanowej od fizykochemicznego stanu komponenty lipidowej błon, ma coraz bogatszą dokumentację eksperymentalną /84, 85/. Do aktywacji tego enzymu błonowego potrzebne są co najmniej dwa momenty ścisłego oddziaływania pomiędzy funkcjonalnymi podjednostkami białkowymi, zlokalizowanymi w błonie cytoplazmatycznej.

W chwili związania ligantu przez receptor, musi on wejść w ścisły związek z GTP-zależnym białkiem regulacyjnym. Dopiero ten kompleks jest przyłączany do cząsteczki właściwego enzymu, cyklazy adenylanowej, który w wyniku tego przechodzi w formę aktywną.



Zmiana stanu płynności błony komórkowej, zależna m.in. od składu lipidowego oraz obecności związków o właściwościach fuzogennych /FFA, gangliozydy/ będzie ułatwiać, bądź utrudniać, zachodzenie tego procesu, zależnego od ruchliwości enzymatycznych podjednostek białkowych.

Szczególne wrażliwość komponentu lipidowego mózgu na zmiany środowiska towarzyszące niedotlenieniu /laktoacidoza, aktywacja fosfolipaz, neuraminidazy, peroksydacja lipidów oraz obniżenie potencjału antyoksydacyjnego tkanki związane z zahamowaniem cyklu pentozowego/ może stać się podłożem obserwowanych zaburzeń prawidłowej czynności błony. Odwrażliwienie układu cyklazy adenylanowej na stymulację norepinefryną jest jednym z przykładów takich właśnie zaburzeń funkcjonalnych. Dynamiczny rozwój wiedzy o układach receptorowych błon cytoplazmatycznych, przenoszących informację do wnętrza komórek i sterujących ich odpowiedzią metaboliczną, rokuje nadzieję szybkiego postępu w dalszym, głębszym zrozumieniu znaczenia tych procesów w patologii niedotlenienia.

## V. W N I O S K I

1. W umiarkowanym niedotlenieniu, w którym nie dochodzi do spadku poziomu związków wysokoenergetycznych w mózgu, przyczyną występujących zaburzeń są uszkodzenia komponentu lipidowego błon cytoplazmatycznych z wtórnym upośledzeniem ich funkcji receptorowej.
2. Do istotnych czynników przyczynowych uszkodzenia błon cytoplazmatycznych w umiarkowanym niedotlenieniu należy zaliczyć:
  - a/ Wczesne wystąpienie kwasicy metabolicznej, pogłębione wzrostem transportu glukozy z krwi do mózgu,
  - b/ Uogólnione ograniczenie syntez związków makromolekularnych w czasie trwania niedotlenienia, a w przypadku frakcji lipidowej również w okresie 24 godz. po ustąpieniu hipoksji,
  - c/ Zahamowanie przemiany glukozy w cyklu pentozowym, a tym samym obniżenie potencjału antyoksydacyjnego tkanki.

VI. P I Ś M I E N N I C T W O

1. Agardh C.D., Westerberg E., Siesjö B.K.: Severe hypoglycemia leads to accumulation of arachidonic acid in brain tissue. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 109, 115-116.
2. Alberghina M., Giuffrida A.M.: Effect of hypoxia on the incorporation of 2-<sup>3</sup>H glycerol and 1-<sup>14</sup>C palmitate into lipids of various brain regions. *J. Neuroscience Res.*, 1981, 6, 403-419.
3. Bachelard H.S.: Glucose transport and phosphorylation in the control of carbohydrate metabolism in the brain. In: *Hypoglycemia*, 1972, 25, 251-260.
4. Bachelard H.S.: Oxygen and brain metabolism. *Biochem. Soc. Transactions*, 1978, 6, 368-372.
5. Bachelard H.S., Cox D.W.G.: Cerebral energy metabolism and neurophysiological function in hypoglycemia and hypoxia in vitro. Abstracts of 9<sup>th</sup> Meeting Int. Soc. for Neurochem., Vancouver 1983, p. S144 A.
6. Bachelard H.S., Daniel P.M., Love E.R.: The transport of glucose into the brain of the rat in vivo. *Proc. R. Soc. Lond. /Biol./*, 1973, 183, 71-82.
7. Baquet N.Z., McLean P., Greenbaum A.L.: Systems relationships and the control of metabolism pathways in developing brain. W: *Normal and Pathological Development and Energy Metabolism*. Pod redakcją: Hommes F.A., Van den Berg C.J., Academic Press, London, 1975, 109-132.
8. Bazan N.G.: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 218, 1-10.

9. Bazan N.G.: Phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> in brain subcellular fraction. *Acta Physiol. Latinoam.*, 1971, 21, 101-106.
10. Benzi G., Villa R.F.: Adenyl cyclase system and cerebral energy state. *J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 1976, 34, 77-83.
11. Berntman L., Carlsson C., Siesjö B.K.: Cerebral oxygen consumption and blood flow in hypoxia: Influence of sympatho-adrenal activation. *Stroke*, 1979, 10, 20-25.
12. Blass J.P., Gibson G.E.: Consequences of mild, graded hypoxia. *Advances in Neurology*, 1979, 26, 229-251.
13. Bodscho W., Hossmann K.-A.: A quantitative regional analysis of amino acids involved in rat brain protein synthesis by HPLC. *J. Neurochem.*, 1983, 40, 371-382.
14. Bodscho W., Mies G., Hossmann K.-A.: Local rates of protein synthesis and analysis of specific hippocampal proteins in the gerbil brain following ischemia. *J. Neurochem.*, 1983, 41, suppl. p. S138 D.
15. Borgström L., Johansson H., Siesjö B.K.: The relationship between arterial PO<sub>2</sub> and cerebral blood flow in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.*, 1975, 93, 423-432.
16. Brierley J.B.: Pathology of cerebral ischemia. W: *Cerebral Vascular Diseases*. Pod redakcją McDowell F.B., Brennan R.W. N. York, Grune and Stratton, 1973, pp. 59-75.
17. Brown R.M., Kehr W., Carlsson A.: Functional and biochemical aspects of catecholamine metabolism in brain under hypoxia. *Brain Res.*, 1975, 85, 491.
18. Burlington R.F., Maher T.J., Sidel C.M.: Effect of hypoxia on blood gases, acid-base balance and in vitro myocardial function in a hibernator and a non-hibernator. *Fed. Proc.*, 1969, 28, 1042-1046.

19. Chan P.H., Fishman R.A.: Brain edema: Induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science*, 1978, 201, 358-360.
20. Chan P.H., Fishman R.A.: Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid - induced brain swelling. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 1004-1007.
21. Cohen P.J.: The metabolic function of oxygen and biochemical lesions of hypoxia. *Anesthesiology /Rev./*, 1972, 37, 148-177.
22. Cohen P.J., Alexander F.C., Reivich M., Wollman H.: Effects of hypoxia and normoocbarbia on cerebral blood flow and metabolism in conscious men. *J. Appl. Physiol.*, 1967, 23, 183-189.
23. Cox D.W.G., Morris P.G., Feeney J., Bachelard H.S.: <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies on cerebral energy metabolism under conditions of hypoglycaemia and hypoxia in vitro. *Biochem. J.*, 1983, 212, 365-370.
24. Cox D.W.G.: The relationship between brain energy state and neuronal function? W: Regulation of transmitter function. *Proc. 5th Meeting Europ. Soc. Neurochem. Pod redakcją: Vizi F.S. and Magyar K.*, 1984, 11-23.
25. Cox D.W.G., Bachelard H.S.: Attenuation of evoked field potentials from dentate granule cells by low glucose, pyruvate + malate and sodium fluoride. *Brain Res.*, 1982, 239, 527-534.
26. Cremer J.E.: Selective inhibition of glucose oxidation by triethyltin in rat brain in vivo. *Biochem. J.*, 1970, 119, 95-102.

27. Crone C.: Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. *J. Physiol. /London/*, 1965, 181, 103-113.
28. Cumar F.A., Maggio B., Caputto R.: Dopamine release from nerve endings induced by polysialogangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 84, 65-69.
29. Cumar F.A., Maggio B., Caputto R.: Neurotransmitter movement in nerve endings. Influence of substances that modify the interfacial potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 597, 174-182.
30. Davis C.W., Daly J.W.: Activation of rat cerebral cortical 3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase activity by gangliosides. *Molec. Pharmacol.*, 1979, 17, 206-211.
31. Davis J.N., Carlsson A.: Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanesthetized rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 913-915.
32. Davis J.N., Carlsson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis, levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 783-790.
33. Davies P.W., Bronk D.W.: Oxygen tension in mammalian brain. *Fed. Proc.*, 1975, 16, 685-692.
34. Davson G., Berry-Kravis E.: Gangliosides as modulators of the coupling of neurotransmitters to adenylylate cyclase. *Plenum Publ. Corporat.*, N. York, 1983, 1-12.
35. Demopoulos H., Flamm E., Seligmann M., Power R., Prato-nigro D., Ransohoff J.: Molecular pathology of lipids in CNS membranes. *W: Oxygen and Physiological Function. Pod redakcją Jobsis F.F.*, Dallas, Texas, Professional Inform. Library, 1977, 491-508.

36. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 2-43.
37. Domańska-Janik K., Biesold D.: Brain hexokinase. Effect of ATP and localization in mitochondria. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 485-497.
38. Domańska-Janik K., Dąbrowiecki Z., Gordon-Majszak W., Strosznajder J.: Effect of short-term hyperthermia on phospholipid and ganglioside in rabbit brain. *Neurochemical Pathology*, praca przygotowana do druku.
39. Domańska-Janik K., Lazarewicz J., Noremborg K., Strosznajder J., Zalewska T.: Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischaemic gerbil brain. *Neurochem. Res.*, 1985, 10, 573-589.
40. Domańska-Janik K., Strosznajder J., Zalewska T.: Effect of isohemia and hypoxia on rat brain glycolipids. *J. Neurosci. Res.*, 1982, 7, 363-370.
41. Domańska-Janik K., Noremborg K., Lazarewicz J.: The effect of  $G_{M1}$  ganglioside on synaptosomal calcium uptake. *Acta Neurologica Scandinavica*, praca przygotowana do druku.
42. Domańska-Janik K., Wideman J.: Regulation of thiols in the brain. 2. Effect of hypoxia on the activities of cytoplasmic NADPH-producing enzymes in different parts of the rat brain. *Resuscitation*, 1974, 3, 37-41.
43. Domańska-Janik K., Wideman J.: Regulation of thiols in the brain. 3. Glucose metabolism in the cytoplasmic fraction of rat brain during stimulation of the hexose monophosphate shunt in vitro. *Resuscitation*, 1974, 3, 43-50.

44. Domańska-Janik K., Wróblewski J., Broniszewska-Ardeit B.: Effect of fatty acids on rat brain particulate hexokinase. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 1157-1161.
45. Domańska-Janik K., Zaleska M.: Regulation of pentose phosphate cycle in the brain by NADPH inhibition of DH-ase system. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1977, XXV, 119-124.
46. Domańska-Janik K., Zaleska M.: The effect of norepinephrine and depolarizing agents on  $^{14}C$  - glucose metabolism in rat brain. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1980, 32, 1-9.
47. Domańska-Janik K., Zaleska M., Zalewska T., Witter B.: Glucose metabolism in isohemic brain of young and adult rats. *Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension. Pol. Med. Pub., Warsaw*, 1978, 87-95.
48. Domańska-Janik K., Zalewska T.: Arterial acid-base changes and brain energy metabolism in unanesthetized rats in mild hypoxia. *Resuscitation*, 1980, 7, 207-214.
49. Domańska-Janik K., Zalewska T.: Effects of anoxia and depolarization on the movement of carbon atoms derived from glucose into macromolecular fractions in rat brain slices. *J. Neurosci. Res.*, 1979, 4, 247-260.
50. Domańska-Janik K., Zalewska T.: The effect of hypoxia on the metabolism of labeled glucose and acetate in the rat brain. *Resuscitation*, 1981, 9, 243-253.
51. Diamond I., Fishman R.A.: High-affinity transport and phosphorylation of 2-Deoxy-D-Glucose in synaptosomes. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 1533-1542.
52. Duffy T.E., Nelson S.R., Lowry O.H.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 959-977.



53. Duffy T.E., Pulsinelli W.A.: Regional cerebral glucose metabolism during hypoxia. *Adv. in Neurol.*, 1979, 26, 287-292.
54. Ellman G.L.: Tissue sulfhydryl groups. *Aroh. Biochem. Biophys.*, 1959, 82, 70-77.
55. Fein J.M., Eastman R., Moore C.: Oxidative metabolism in cerebral ischemia. Part I. Measurement of oxygen extraction slopes of gray and white matter in vivo. *Stroke*, 1977, 8, 472-479.
56. Flatt J.P., Ball E.G.: Studies on the metabolism of adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 675-685.
57. Folbergrova J., Macmillan V., Siesjö B.K.: The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD<sup>+</sup> ratio of the rat brain. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2498-2505.
58. Folbergrova J., Rehnörna S., Siesjö B.K.: Oxidized and reduced glutathione in the rat brain under normoxic and hypoxic conditions. *J. Neurochem.*, 1979, 32, 1621-1627.
59. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497-509.
60. Fiske-Subarrow, Bartlett G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466-468.
61. Fridovich J.: Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv. Neurol.*, 1979, 26, 255-259.
62. Gaitonde M.K.: Rate of utilization of glucose and compartmentation of  $\alpha$ -oxoglutarate and glutamate in brain. *Biochem. J.*, 1965, 95, 803-810.

63. Gatfield P.D., Lowry O.H., Schulz D.W., Passonnesu J.V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with isohaemia and anaesthesia. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 185-195
64. Glazer R.I., Weber G.: Incorporation of 6-<sup>3</sup>H-glucose into lipid, protein, DNA, RNA, of slices of differentiating rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 1569-1576.
65. Głowiński J., Iversen L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of <sup>3</sup>H-nor-epinephrine, <sup>3</sup>H-dopamine and <sup>3</sup>H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 655-669.
66. Gibson G.E., Blass J.P.: Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying hypoglycaemia and mild hypoxia. *J. Neurochem.*, 1976, 27, 37-42.
67. Ginsberg M.D.: Delayed neurological deterioration following hypoxia. *Advances in Neurology*, 1979, 26, 21-44.
68. Gross R.A., Ferrendelli J.A.: Mechanisms of cyclic AMP in cerebral anoxia and their relationship to glycogenolysis. *J. Neurochem.*, 1980, 34 /5/, 1309-1318.
69. Grote J., Krenscher H., Schubert R., Russ H.J.: W: 6<sup>th</sup> Europ. Cong. Microcirculation. Pod redakcją Karger Basel 1970, 294-297.
70. Guerras R.M., Melgar E., Villavicencio H.: Alternative pathways of glucose metabolism in fetal rat brain. *Biochim, Biophys. Acta*, 1967, 148, 2, 356-361.
71. Gurdjian E.S., Stone W.E., Webster J.P.: Cerebral metabolism in hypoxia. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 1944, 51, 472-484.
72. Hakim A.M., Moss G.: The effect of ether anesthesia on cerebral glucose metabolism. The pentose phosphate pathway. *Anesthesiology*, 1974, 40, 261-267.

73. Hakim A.M., Moss G.: Direct in vivo quantitation of the pentose phosphate pathway in brain. *Trans N.Y. Acad. Sci.*, 1972, 34, 473-484.
74. Hawkins R.A., Miller A.L., Cremer J.E., Weech R.L.: Measurement of the rate of glucose utilization by rat brain in vivo. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 917-924.
75. Hawkins R.A., Williamson D.H., Krebs H.A.: Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem. J.*, 1971, 122, 13-18.
76. Hawthorne J.N., Pickard M.R.: Phospholipids in synaptic function. *J. Neurochem.*, 1979, 32, 5-14.
77. Herken H.: Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminonicotinamide on membrane transport processes. *Arzneimittel-Forsch*, 1968, 18, 1235-1245.
78. Herken H., Lange K., Kolbe H., Keller K.: Antimetabolic action of the pentose phosphate pathway in the central nervous system induced by 6-aminonicotinamide. *W: Central Nervous System. Pod redakcją E. Genazzani, H. Herken, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. York 1974, 41-54.*
79. Hossmann K.A., Sato K.: Effect of ischaemia on the function of the sensorymotor cortex in cat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 1971, 30, nr 6, 535-545.
80. Hostetler K.Y., Landau B.R.: Estimation of the pentose cycle contribution to glucose metabolism in tissue in vivo. *Biochemistry*, 1967, 6, nr 10, 2961-2964.
81. Hostetler K.Y., Landau B.R., White R.J., Albin M.S., Yashon D.: Contribution of the pentose cycle to the metabolism of glucose in the isolated, perfused brain of the monkey. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 33-39.

82. Hothersall J.S., Greenbaum A.L., McLean P.: The functional significance of the pentose pathway in synaptosomes: Protection against peroxidative damage by catecholamines and oxidants. *J. Neurochem.*, 1982, 5, 39, 1325-1332.
83. Hothersall J.S., Zubairu S., McLean P., Greenbaum A.L.: Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain resulting from treatment of rats with 6-aminonicotinamide. *J. Neurochem.*, 1981, 37, 1484-1496.
84. Housley M.D.: Regulation of adenylate cyclase by the nature of its membrane environment. W: 25<sup>th</sup> Internat. Confer. on the Biochem. of Lipids, Antwerp 1984, Abstr. 31-32.
85. Housley M.D., Gordon L.M.: In Current Topics in Membranes and Transport. Pod redakcją Martin B.R., Kleinzeller A., Acad. Press N.Y., 1983, 18, 179-231.
86. Horn D.H., Bruns F.M.: Quantitative Bestimmung von L/+/- Milchsäure mit Milchsäure Dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 376-380.
87. Hotta S.S.: Glucose metabolism in brain tissue: the hexosemonophosphate shunt and its role in glutathione reduction. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 43-51.
88. Howse D., Duffy T.E.: Control of the redox state of the pyridine nucleotides in the rat cerebral cortex. Effect of electroshock - induced seizures. *J. Neurochem.*, 1975, 24, 935-940.
89. Huokabee W.E.: Relationship of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. III. Effect of breathing low oxygen gases. *J. Clin. Invest.*, 1958, 37, 264-271.

90. Ivanov K.P., Kialayokow Yu.Ya., Samoilov M.O.: Microcirculation and transport of oxygen to neurons of the brain. *Microvasoular Res.*, 1979, 18, 434-441.
91. Ivanov K.P., Derry A.N., Vovenko E.P., Samoilov M.O., Semenov D.G.: Direct measurements of oxygen tension at the surface of arterioles, capillaries and venules of cerebral cortex. *Pflugers Arch.*, 1982, 393, 118-120.
92. Jübsis F.F.: Oxidative metabolic effects of cerebral hypoxia. *Adv. Neurol.*, 1979, 26, 299-318.
93. Jübsis F.F., Rosenthal M., LaManna J., Lothman E., Cordingley G., Somjen G.: Metabolic activity in epileptic seizures. Pod redakcją: Ingvar D., Lassen N. W: Benson Symp. on Working Brain. Copenhagen, 1975, 185-196.
94. Johannsson H., Siesjö B.K.: Cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.*, 1975, 93, 269-276.
95. Kaplan N.O., Goldin A., Humphreys S.R., Ciotti M.M., Wenditt J.M.: Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in chemotherapy. *Science*, 1954, 120, nr 3116, 437-440.
96. Karnushina I., Suzuki R., Padgett W., Daly J.W.: Degeneration of CA1 neurons in hippocampus after isohemia in Mongolian gerbils: Cyclic AMP - systems. *Brain Res.*, 1983, 268, 87.
97. Kates M.: Isolation, analysis and identification of lipids. W: *Techniques of Lipidology*. Pod red: Work T.S., Work E., North Holland, Amor. Elsevier, Amsterdam 1972, 361.

98. Katz J., Wood H.G.: The use of  $^{14}\text{CO}_2$  yields from glucose-1 and 6- $^{14}\text{C}$  for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 517-523.
99. Kety S.S., Schmidt C.F.: The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption in normal young men. *J. Clin. Invest.*, 1948, 27, 484-491.
100. Khsobatrian L., Domańska-Janik K.: Regulation of cyolic AMP level in the brain cortex during hypoxia and isohemia. *Bull. Ac. Pol. Sci.*, 1980, XXVIII, 667-673.
101. Kosow D.P., Scharz H.P., Marmolejo A.: Lipid biosynthesis in anoxio-isochaemic rat brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 1139-1142.
102. Laborit H., Brue F., Jouany J.M., Gerard G., Weber B.: Mécanisme d'orientation des voies métaboliques en fonction de l'environnement. *Presse méd.*, 1961, 69, 717-720.
103. Lange K., Keller K., Kolbe H.: Studies of Flux rates at the glucose-6-phosphate crossroad. W: Central Nervous System - Studies on Metabolic Regulation and Function. Pod redakcją: Genazzani E., Herken H., Pub. Springer-Verlag, 1974, 55-62.
104. Leonard V., Eggleston V., Krebs H.A.: Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem. J.*, 1974, 138, 425-435.
105. Lewis L.D., Ponton U., Siesjö B.K.: Arterial acid-base changes in unanesthetized rats in acute hypoxia. *Respiration Physiology*, 1973, 19, 312-321.

106. Lin M.R., Henteleff H.B., Nemoto E.M.: Noradrenalin - inducible cyclic-AMP accumulation in rat cerebral cortex: Changes during complete global ischemia. *J. Neurochem.* 1983, 40, 595-598.
107. Logan J.E., Mannel W.A., Rossiter R.J.: *W: Biochemia kwasów nukleinowych. Pod redakcją: Dawidaon J.N.P. Warszawa PWRiL, 1969, 92.*
108. Lohr G.W., Waller G.D.: *W: Methods of enzymatic analysis. Pod redakcją: Bergmeyer H.V., Verlag Chemie, Ac. Press, N. York 1963, 744.*
109. Lowden J.A., Wolfe L.S.: Effect of hypoxia on brain gangliosides. *Nature /Lond/, 1963, 23, 771-772.*
110. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
111. Lowry O.H., Passonneau J.V., Hasselberger F.X., Schulz D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 18-30.
112. Lund-Andersen H., Kjeldsen C.S.: Uptake of glucose analogues by rat brain cortex slices. Membrane transport vs metabolism of 2-deoxy-D-glucose. *J. Neurochem.*, 1977, 29, 205-211.
113. Macmillan V., Siesjö B.K.: Brain energy metabolism in hypoxemia. *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 1972, 30, 127-136.
114. Majewska M.D., Strosznajder J., Lazarewicz J.: Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.*, 1978, 158, 423-434.

115. Mandel L.J., Moffett D.F., Jöbsis F.F.: Redox state of respiratory chain enzymes and potassium transport in silkworm midgut. *Biochim. Biophys. Acta /Amst./* 1975, 408, 123-134.
116. Marion J., Wolfe L.S.: Increase in vivo of unesterified fatty acids, prostaglandin  $F_2$  but not thromboxane  $B_2$  in rat brain during drug induced convulsions. *Prostaglandins*, 1978, 16, 99-110.
117. McFarland R.A., Halperin M.H., Niven J.I.: Visual thresholds as an index of the modification of the effects of anoxia by glucose. *Am. J. Physiol.*, 1945, 144, 378-388.
118. McGuire J., Pesh L.: Control of glucose oxidation in anterior pituitary by hormonally sensitive pyridine nucleotide transhydrogenase. *Proc. Nat. Ac. Sci., USA*, 1962, 48, 2154-2163.
119. Mela L.: Mitochondrial function in cerebral isohemia and hypoxia: Comparison of inhibitory and adaptive responses. *Neurolog. Res.*, 1972, 1, 51-62.
120. Merrill D.K., Guynn R.W.: The calculation of the cytoplasmic free NADP / NADPH ratio in brain: Effect of electroconvulsive seizure. *Brain Res.*, 1981, 221, 2, 307-318.
121. Mia A.S., Philips R.W.: Simplified method for radioassay of blood glucose. *Nature*, 1965, 206, 100-101.
122. Michell R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 81-147.



123. Morimoto K., Brengman J., Yanagihara T.: Further evaluation of polypeptide synthesis in cerebral anoxia, hypoxia and ischemia. *J. Neurochem.*, 1978, 31, 1277-1282.
124. Myers R.F.: A unitary theory of causation of anoxic and hypoxic brain pathology. *Adv. Neurol.*, 1979, 26, 195-213.
125. Nishizuka Y.: Protein kinases in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.*, 1984, 9, 163-166.
126. Norberg K., Siesjö B.K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. I. Pattern of activation of glycolysis: A re-evaluation. *Brain Res.*, 1975, 86, 31-44.
127. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Drzuskiewicz H.: *Zarys chromatografii cienkowarstwowej*. Warszawa, 1971, PWRiL, 167-168.
128. Oshino N., Sugano T., Oshino R., Chance B.: Mitochondrial function under hypoxic conditions: The steady states of cytochrome  $a + a_3$  and their relation to mitochondrial energy states. *Biochim. Biophys. Acta /Amst./*, 1974, 368, 298-310.
129. Ozawa K., Seta K., Araki H., Handa H.: Effect of ischemia on mitochondrial metabolism. *J. Biochem.*, 1967, 61, 512-514.
130. Pappenheimer J.R., Setchell B.P.: Cerebral glucose transport and oxygen consumption in sheep and rabbits. *J. Physiol.*, 1973, 233, 529-551.
131. Pardridge W.M., Oldendorf W.H.: Kinetics of blood-brain barrier transport of hexoses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 382, 377-392.

132. Partington C.R., Daly J.W.: Effect of gangliosides on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes. *Molec. Pharmacol.*, 1979, 15, 484-491.
133. Passouant P., Pternitis C.: Activation de l'hypocoampe par des hypoxie oxyprives repetées. *Acta Physiol Ac. Scient. Hungaricae*, 1965, XXVI, 123-130.
134. Pásztor A., Sarkade A., Tomka I., Okrutay K.: EEG and evoked potentials in haemorrhagic shock. *Acta Physiologica Acad. Scient. Hungaricae*, 1972, 42, 411-418.
135. Przybylski A.: Reakcja mózgu na niedotlenienie. *Acta Physiol. Po.*, 1975, XXVI, 3, suppl. 10, 1-21.
136. Rafałowska U., Erecińska M., Chance B.: The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anaesthesia. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 487-501.
137. Rastogi R.N.: Elevation of phosphorus level in serum and decreased brain content of gangliosides in rats following neonatal asphyxia. *Pediat. Res.*, 1968, 2, 125-130.
138. Reese T.S., Karnovsky M.J.: Fine structural localization of the blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.*, 1967, 34, 207-217.
139. Rehnorona S., Chance B., Austin G.: Microheterogeneity of redox states in cerebral cortical tissue during hypoxia and isohemia. *Adv. in Neurology*, 1979, 26, 325-331.
140. Rehnorona S., Smith D.S., Akesson B., Westerberg E., Siesjö B.K.: Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during  $Fe^{2+}$  and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J. Neurochem.*, 1980, 24, 1630-1638.

141. Rehnorona S., Siesjö B.K., Westerberg E.: Adenosine and cyolic AMP in cerebral cortex of rata in hypoxia, status epilepticus and hypercapnia. *Acta physiol. scand.*, 1978, 104, 453-463.
142. Rosenthal M., Lamanna J.C., Jøbsis F.F., Levasseur J.E., Kontos H.A., Petterson L.: Effects of respiratory gases on cytochrome a in intact cerebral cortex. Is there critical  $PO_2$ ? *Brain Res.*, 1976, 108, 143-154.
143. Roy D., Pathak D., Singh R.: Effects of chlorpromazine on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the various regions of aging rat brain. *J. Neurochem.*, 1984, 42, 628-633.
144. Sacks W.: Cerebral metabolism in vivo. *Handbook of Neurochem.* Pod redakcją: Lajtha A., New York, Plenum Press 1962, vol. 1, 304.
145. Schmidt F.H.: Die Enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Klin. Wschr.*, 1961, 39, 1244-1247.
146. Scott W.A. et al.: Identification of membrane lipid components essential to AC function. *Fed. Proc.*, 1978, 37, 6, 1724.
147. Sharp F.R.: Activity related increases of glucose utilization associated with reduced incorporation of glucose into its derivatives. *Brain Res.*, 1976, 107, 663-666.
148. Siesjö B.K.: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J. Cerebral Blood Flow and Metabol.*, 1981, 1, 155-185 /Review/.

149. Siesjö B.K.: Hypoxia. W: Brain Energy Metabolism.  
Pod redakcją: Siesjö B.K., Pub. Wiley and Sons,  
Chichester, N. York, Toronto, 1978.
150. Siesjö B.K.: Regulation of cerebral metabolism during  
hypoxia. Proc. ISN Meeting, Tokyo 1973, 84-85.
151. Siesjö B.K., Johannsson H., Norberg K., Salford L.:  
Brain function, metabolism and blood flow in moderate  
and severe arterial hypoxia. Alfred Benzon Symp., 1975,  
8, 101, 125.
152. Siggaard-Anderson O.: Blood acid-base alignment normogram.  
Scand. J. Clin. Lab. Inves., 1933, 15, 211-217.
153. Silver I.A., Erciońska M., Pastuszko A., Wilson D.F.:  
The effects of in vivo anoxia and ischaemia on neurotransmitter  
metabolism in isolated rat brain synaptosomes.  
Brit. J. Path., 1983.
154. Strosznajder J.: Role of phospholipids in calcium accumulation  
in brain mitochondria from adult rat after is-  
chemic anoxia and hypoxic hypoxia. Proc. Europ. Soc.  
Neurochem. Pod redakcją Neuhoff V., Verlag Chemie  
Weinheim N.Y., 1978, 313.
155. Strosznajder J.: The effect of hypoxic hypoxia on brain  
phospholipids and free fatty acids during development.  
W: Abstracts of International Meeting on a Multidisciplinary  
Approach to Brain Development, Selva di Fasano,  
Brindisi, Italy, 1979, 94.
156. Strosznajder J., Domańska-Janik K.: Effect of anoxia  
and hypoxia on brain lipid metabolism. Neurochem. Res.,  
1980, 5, 585-591.

157. Swaab D.F.: Pitfalls in the use of rapid freezing for stopping brain and spinal cord metabolism in rat and mouse. *J. Neurochem.*, 1971, 8, 2085-2092.
158. Svennerholm L.: Quantitative estimation of sialic acid. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24, 604-612.
159. Svennerholm L.: The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue. *J. Neurochem.*, 1956, 1, 42-53.
160. Tower D.B.: Effect of isohemia or tissue hypoxia on the neuron. W: *Cerebrovascular Disorders and Stroke*. Pod redakcją: Goldstein M., Bolis L., Fieschi C., Gorini S., Millikan C.H. Raven Press N. York, 1979, 39-63.
161. Troeger M., Rafałowska U., Ercolińska M.: The effect of oleate on neurotransmitter transport and other membrane function in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 1984, 6, 42.
162. Trząski M.: Oznaczenie azotu  $\alpha$ -aminowego metodą ninhydrynową. W: *Laboratoryjne metody diagnostyczne*. Pod redakcją: Krawczyńskiego J. i Osieńskiego T., PZWL Warszawa, 1967, 247-251.
163. Turner A.J., Ponzio F., Algeri S.: Dihydropteridine reductase in rat brain: regional distribution and the effect of catecholamine-depleting drugs. *Brain Res.*, 1974, 70, 553-558.
164. Wideman J., Domańska-Janik K.: Regulation of thiols in the brain. 1. Concentration of thiols and glutathione reductase activity in different parts of the rat brain during hypoxia. *Resuscitation*, 1974, 3, 27-36.

165. Wilson D.F., Stubbs M., Veech R.L., Erecińska M., Krebs H.A.: Equilibrium relations between the oxidation-reduction reactions and the adenosine triphosphate synthesis in suspensions of isolated liver cells. *Biochem. J.* 1974, 140, 57-64.
166. Wróblewski J.: Regulacja aktywności i wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia heksokinazy mózgu. Praca doktorska. 1979.
167. Vrba R., Gaitonde M.K., Richter D.: The conversion of glucose carbon into protein in the brain and other organs of the rat. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 465-475.
168. Yatsu F.M., Moss S.A.: Brain lipid changes following hypoxia. *Stroke*, 1971, 2, 587-593.
169. Yoshida S., Inoh S., Asano T., Sano K., Shimasaki H., Ueta N.: Brain free fatty acids, edema and mortality in gerbils subjected to transient, bilateral isohamia, and effect of barbiturate anesthesia. *J. Neurochem.*, 1983, 1278-1286.
170. Zaleska M.: Effect of mild hypoxia on catecholamine metabolism in different areas of the rat brain. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1979, 3, 237-243.
171. Zalewska T., Domańska-Janik K.: Energy utilization and changes in some intermediates of glucose metabolism in normal and hypoxic rat brain after decapitation. *Resuscitation*, 1980, 7, 197-205.