

CENTRUM MEDYCYNY DOSWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

10275

H3174



Urszula Rafałowska

Rozprawa habilitacyjna

METABOLIZM CYTRYNIANU W MÓZGU SZCZURA W WARUNKACH  
PRAWIDŁOWYCH I W NIEDOTLENIENIU

Warszawa, 1981

Składam serdeczne podziękowanie Panu Profesorowi  
dr hab. med. Mirosławowi J. MOSSAKOWSKIEMU  
za dyskusję i cenną pomoc w czasie przygotowywa-  
nia rozprawy.

Dziękuję Pani Teresie CZECHMANSKIEJ za sprawną  
pomoc techniczną.

Badania eksperymentalne na których opiera się rozprawa habilitacyjna zostały przeprowadzone w Zespole Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie i w Zakładzie Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Pennsylvania w Filadelfii.

Przedstawione w rozprawie habilitacyjnej wyniki badań zostały opublikowane w następujących pracach:

1. Gromek A., Rafałowska U., J.Neurochem. 19 /1972/ 2687-2695.
2. Rafałowska U., Pastuszko A., Gromek A., Bull. Acad. Pol. Sci. 22 /1974/ 453-459.
3. Rafałowska U., Pastuszko A., Gromek A., FEBS Letters /1974/ 20-22.
4. Rafałowska U., Gromek A., Neuropat. Pol. 13 /1975/ 229-239.
5. Rafałowska U., Erecińska M., Chance B., J.Neurochem. 25 /1975/ 497-501.
6. Rafałowska U., Księżak H., J.Neurochem. 27 /1976/ 813-815.
7. Rafałowska U., Bull. Acad. Pol. Sci. 26 /1978/ 589-597.
8. Rafałowska U., Księżak H., IRCS Medical Science Biochem. 7 /1979/ 7.
9. Rafałowska U., Neurochem. Research 4 /1979/ 355-364.
10. Rafałowska U., Pastuszko A., Neurochem. Research 4 /1979/ 241-247.
11. Deutsch C., Rafałowska U., FEBS Letters 108 /1979/ 274-278.
12. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D.F. J.Neurochem. 34 /1980/ 1160-1165.
13. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D.F., J.Neurochem. 34 /1980/ 1380-1386.
14. Rafałowska U., IRCS Medical Science, Biochem. 7, /1979/ 207.

Praca została wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4. Polskiej Akademii Nauk.

# NAZWY SYSTEMATYCZNE ENZYMÓW WYMIENIONYCH W TEKŚCIE

Akonitaza - Hydro - liaza cytrynianu /izocytrynianu / EC 4.2.1.3

Aminotransferaza asparaginianowa - Aminotransferaza L asparaginian: 2-oksoglutaran EC. 2.6.1.1

Dehydrogenaza glutaminianowa - Oksoreduktaza L glutaminian: NAD/P/ /dezaminująca/ EC. 1.4.1.3

Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna /IDHNADP/ - oksydoreduktaza treo-D<sub>s</sub>-izocytrynian: NADP /dekarboksylująca/ EC. 1.1.1.42

Dehydrogenaza izocytrynianowa NAD zależna /IDHNAD/ - Oksydoreduktaza treo-D<sub>s</sub>-izocytrynian: NAD /dekarboksylująca EC. 1.1.1.41

Dehydrogenaza mleczanowa /LDH/ - Oksydoreduktaza L-mleczan: NAD EC. 1.1.1.27

Dehydrogenaza jabłczanowa - Oksydoreduktaza L-Jabłczan: NAD EC. 1.1.1.37

Fosfofruktokinaza -1-Fosfotransferaza ATP:D-glukoza-6-fosforan EC. 2.7.1.11

Fumaraza - Hydro-liaza L-jabłczan EC. 4.2.1.2.

Karboksylaza acetylo-CoA - Ligaza acetylo - CoA: dwutlenek węgla /ADP/ EC. 6.4.1.2

Liaza ATP cytrynianowa - Szczawiooctowa - liaza ATP: cytrynian EC. 4.1.3.8

Syntaza cytrynianowa - Szczawiooctowo-liaza cytrynianu /acetylująca CoA/ EC. 4.1.3.7

## STOSOWANE SKRÓTY I SYMBOLE

Acetylo-CoA	- acetylo-koenzym A
ADP	- adenzyno-5' -dwufosforan
AMP	- adenzyno-5' -monofosforan
ATP	- adenzyno-5' -trójfosforan
CTP	- cytydynotrójfosforan
CBF	- mózgowy przepływ krwi
CoA	- koenzym A
Cr	- kreatyna
CrP	- fosfokreatyna
DTT	- ditiotreitol
EDTA	- kwas etylenodwuaminoczteroocowy
EEG	- elektroencefalogram
GABA	- kwas $\gamma$ aminomasłowy
Hepes	- kwas N-2-hydroksyetylopiperazyno-N' -2-etano-sulfonowy
Km	- stała Michaelisa
NAD, NADH	- utleniona i zredukowana forma dwunukleotydu nikotynoamido-adeninowego
NADP, NADPH	- utleniona i zredukowana forma fosforanu dwunukleotydu nikotynoamido-adeninowego
NBT	- błękit nitrotetrazolowy
NCS	- solubilizator tkankowy
o. u. n.	- ośrodkowy układ nerwowy
p	- prawdopodobieństwo
$\text{PaO}_2$	- prężność cząstkowa tlenu
$\text{PaCO}_2$	- prężność cząstkowa dwutlenku węgla
Pi	- fosforan nieorganiczny
SD	- odchylenie standardowe
SDS	- siarczan dodecyłu
SEM	- błąd średniej arytmetycznej
TCA	- kwas trójchlorooctowy

Tris	- 2-amino-2-hydroksymetylopropan-1, 3-diol
TPMP	- trójfenylo-metylofosfonian
TPB	- tetrafenyloboran
TN	- liczba obrotów /turnover number/

WSTĘP .....	1
1. Metabolizm cytrynianu w komórce .....	1
1.1. Synteza cytrynianu .....	1
1.2. Zużycie cytrynianu w mitochondriach .....	3
1.3. Transport cytrynianu z mitochondriów do cyto- plazmy .....	5
1.4. Zużycie cytrynianu w cytoplaźmie .....	8
1.4.1. Cytrynian jako prekursor pozamitochondrial- nego Acetylo-CoA .....	8
1.4.2. Metabolizm szczawiooctanu powstałego z cy- trynianu .....	10
1.5. Cytrynian jako regulator przemiany lipidowej i węglowodanowej .....	11
1.5.1. Cytrynian a regulacja syntezy kwasów tłuszczowych .....	11
1.5.2. Regulacja glikolizy przez cytrynian .....	14
1.6. Podstawowe współzależności w regulacji syntezy i zużycia cytrynianu .....	15
2. Niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego .....	17
2.1. Istota i rodzaje niedotlenienia o. u. n. ....	17
2.2. Zaburzenia wywołane niedoborem tlenu w mózgu oraz układy kompensacyjne .....	19
2.3. Czynniki modyfikujące reakcję mózgu na niedo- tlenienie .....	21
2.4. Niedotlenienie hipoksyjne .....	22
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	25
MATERIAŁ I METODY .....	28
1. Warunki doświadczeń .....	28
1.1. Niedotlenienie hipoksyjne .....	28

1.2. Anestezja pentobarbitalowa .....	29
1.3. Niedotlenienie w anestezji pentobarbitalowej .....	29
1.4. Kontrola - Norma .....	30
2. Otrzymywanie frakcji subkomórkowych .....	30
2.1. Jednoczesne otrzymywanie szeregu frakcji subkomórkowych .....	30
2.2. Otrzymywanie cytosolu .....	31
2.3. Otrzymywanie frakcji mitochondrialnej .....	31
2.4. Otrzymywanie frakcji synaptosomalnej .....	31
2.5. Otrzymywanie frakcji mitochondriów synaptosomalnych .....	32
3. Oczyszczanie dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej z cytosolu mózgu .....	32
4. Elektroforeza frakcji subkomórkowych na żelu poliakrylamidowym .....	34
5. Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego IDH NADP .....	34
6. Warunki enzymatycznej reakcji zużycia cytrynianu w cytosolu .....	34
7. Warunki transportu cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów perikarionów .....	35
8. Warunki inkubacji synaptosomów .....	36
9. Warunki transportu cytrynianu do synaptosomów .....	36
10. Warunki transportu cytrynianu do mitochondriów synaptosomalnych .....	36
11. Pomiary dekarboksylacji $^{14}\text{C}$ cytrynianu .....	37
12. Oznaczanie aktywności enzymów .....	37
12.1. Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna /IDH NADP/ .....	37

12.2.	Syntaza cytrynianowa .....	37
12.3.	Liaza ATP cytrynianowa .....	38
12.4.	Akonitaza .....	38
12.5.	Aminotransferaza asparaginianowa .....	38
12.6.	Fumaraza .....	38
12.7.	Dehydrogenaza mleczanowa .....	39
13.	Oznaczanie zawartości białka .....	39
14.	Spektrofotometryczne i kolorymetryczne oznaczanie stę- żeń substratów i metabolitów .....	39
14.1.	Cytrynian .....	39
14.2.	$\alpha$ ketoglutaran .....	40
14.3.	Glutaminian .....	40
14.4.	Asparaginian .....	40
14.5.	Mocznik .....	40
14.6.	Karbamylasparaginian .....	40
14.7.	Hydroksymaślan .....	40
14.8.	Acetylooctan .....	40
14.9.	Mleczan .....	41
14.10.	Pirogronian .....	41
14.11.	ATP .....	41
14.12.	Fosfokreatyna .....	41
14.13.	ADP i AMP .....	41
14.14.	Kreatyna .....	41
14.15.	Fosforan /Pi/ .....	41
14.16.	Wyliczanie wewnątrzkomórkowego stosunku NAD/NADH <sup>+</sup> .....	42
15.	Oznaczanie asparaginianu we krwi .....	42
16.	Izotopowe metody pomiaru stężeń cytrynianu i jabłczanu	42
17.	Spektrofluorymetryczne oznaczenia stężeń jabłczanu ....	43

18. Pomiary stężenia i stanu redukcji cytochromu c .....	43
19. Pomiary oddychania synaptosomów .....	43
20. Oznaczanie przestrzeni wewnątrzsynaptosomalnej .....	44
21. Oznaczanie potencjału błonowego synaptosomów .....	44
22. Analiza statystyczna wyników .....	45
WYNIKI .....	46
1. Metabolizm cytrynianu w mózgu w warunkach prawidłowych .....	46
1. 1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymów metabolizujących cytrynian .....	46
1. 2. Utlenianie cytrynianu w cytosolu mózgu przy udziale dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej /IDH NADP/ .....	50
1. 3. Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna w cytosolu mózgu. Oczyszczenie enzymu, oznaczanie ciężaru cząsteczkowego, charakterystyka .....	57
1. 4. Transport cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów .....	68
1. 5. Charakterystyka synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych .....	76
2. Zaburzenia metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego .....	87
2. 1. Utlenienie cytrynianu na drodze zależnej od cytoplazmatycznej IDH NADP w warunkach niedoboru tlenu .....	87
2. 2. Badanie przyczyn częściowej inhibicji utleniania cytrynianu w hipoksji w cytosolu mózgu na drodze zależnej od IDH NADP .....	88

2.3. Transport cytrynianu i jabłczanu przez błonę mitochondriów perikarionów mózgu w warunkach niedotlenienia .....	98
2.4. Wpływ hipoksji na własności synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych .....	106
OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	112
1. Metabolizm cytrynianu w mózgu w warunkach prawidłowych .....	112
2. Zaburzenia metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego .....	125
STRESZCZENIE .....	134
WNIOSKI .....	137
PIŚMIENNICTWO .....	139

## WSTĘP

Jednym z głównych produktów przemian biochemicznych komórki jest cytrynian. Metabolizm tego związku łączy się z wytwarzaniem energii, z dostarczaniem substratów do syntez, pośredniczy w powiązaniu przemian białek, cukrów i tłuszczów, spełnia rolę regulatora szeregu reakcji chemicznych zachodzących w ustroju. W niniejszym wstępie omówiono przemiany cytrynianu na poziomie subkomórkowym, powiązanie tych przemian z ogólnym metabolizmem komórki oraz mechanizmy odpowiedzialne za prawidłowy przebieg reakcji w których uczestniczy ten związek.

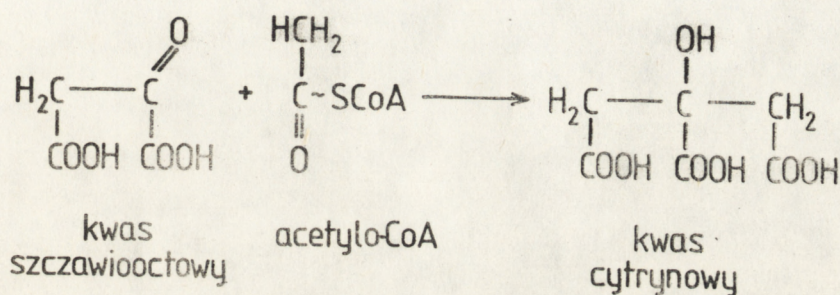
Dotychczasowe dane dotyczące metabolizmu cytrynianu w mózgu były nieliczne i fragmentaryczne. W omówieniu wykorzystano zatem informacje dostępne w literaturze pochodzące z badań prowadzonych na różnych organizmach i różnych tkankach, a w przeważającej części na wątrobie.

### 1. Metabolizm cytrynianu w komórce

#### 1.1. Synteza cytrynianu

Węglowodany, białka, tłuszcze po kolejnych etapach degradacji zachodzących w organizmie, przekształcane są do acetylo-CoA często określanego jako aktywny kwas octowy. Związek ten w wyniku kondensacji aldolowej z kwasem szczawiooctowym wytwarza trójkarboksylowy kwas cytrynowy /Schemat 1/.

Reakcja ta zachodzi w mitochondriach w obecności syntazy cytrynianowej i jest pierwszą z szeregu reakcji wchodzących w skład cyklu kwasu cytrynowego opracowanego w 1937 r. przez Krebsa /96, 97/.



Schemat 1. Synteza kwasu cytrynowego.

Syntaza cytrynianowa, katalizująca reakcję syntezy cytrynianu jest obecna we wszystkich badanych organizmach i tkankach /139/. Wysoka aktywność tego enzymu  $V_{\max} = 100-200 \text{ m}\mu\text{moli/mg białka/min/}$  pochodzącego z różnych źródeł /wątroba, serce, drożdże, bakterie, cytryna/ jest silnie hamowana przez nukleotydy adeninowe /80, 81, 95, 186, 187/.

Inhibicja ta jest kompetycyjna w stosunku do acetylo-CoA, a w przypadku enzymu z wątroby szczura również do szczawiooctanu. Z danych kinetycznych opracowanych przez Shephera wg Garlanda /64/ wynika, że aktywność syntazy cytrynianowej otrzymanej z wątroby jest najbardziej hamowana przez ATP podczas gdy ADP i AMP działają w mniejszym stopniu. Garland na podstawie wyników badań, w których hamowano aktywność syntazy cytrynianowej w obecności różnych stężeń ATP, ADP, AMP z zachowaniem stałego stężenia całej puli nukleotydów sugeruje, że na aktywność tego enzymu in vivo większy wpływ mają zmiany całkowitej puli energetycznej

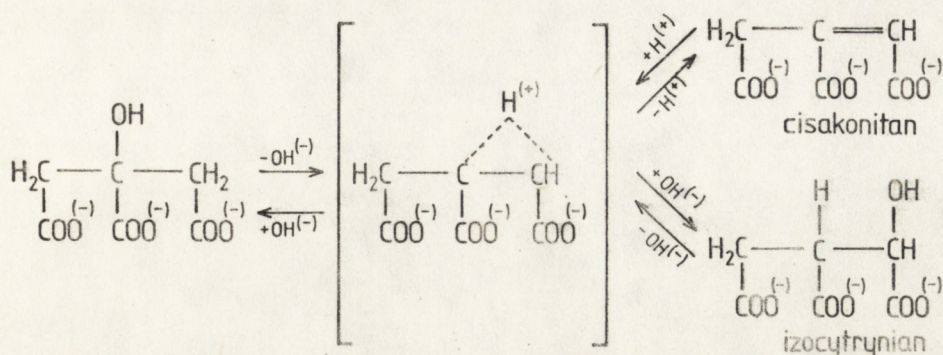
komórki niż poszczególnych nukleotydów adeninowych /64/. Zwiększenie poziomu tych nukleotydów zmniejsza powinowactwo syntazy cytrynianowej do acetylo-CoA.

Także wejście grup acetylowych do cyklu Krebsa może być regulowane odpowiednio do zapotrzebowania komórki na energię. Wiele danych doświadczalnych przemawia za tym, że inhibitorami syntazy cytrynianowej są długołańcuchowe estry acylo-CoA /115, 122, 233/ działające kompetycyjnie z acetylo-CoA.

W rozważaniach dotyczących syntezy cytrynianu w komórce nie wyklucza się możliwości powstawania cytrynianu pozamitochondrialnie na drodze karboksylacji  $\alpha$ -ketoglutaranu powstałego z glutaminianu do izocytrynianu w obecności dehydrogenazy izocytrynianowej współdziałającej z NADP, a następnie izomeryzacji do cytrynianu /45/. Wydaje się jednak, że ilość  $\alpha$ -ketoglutaranu powstałego pozamitochondrialnie na drodze transaminacji glutaminianu jest niewielka, ograniczona jedynie do puli metabolicznej aminokwasów będących prekursorami glutaminianu.

## 1.2. Zużycie cytrynianu w mitochondriach

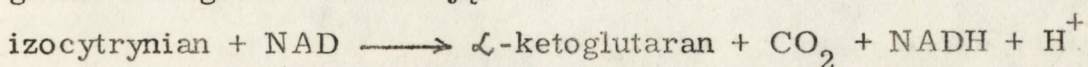
Powstały w mitochondriach cytrynian może ulegać końcowemu utlenieniu w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym co łączy się z produkcją energii niezbędnej dla funkcjonowania komórki. Szybkość, przy której działa cykl kwasu cytrynowego, zależy w dużej mierze od syntezy cytrynianu w mitochondriach /5/. W utlenianiu cytrynianu w mitochondriach biorą udział dwa enzymy: akonitaza i dehydrogenaza izocytrynianowa. Akonitaza katalizuje przekształcenie cytrynianu do akonitanu i izocytrynianu /Schemat 2/.



Schemat 2. Izomeryzacja cytrynianu.

Związki te pozostają w równowadze. W pH 7.4 w temp. 25°C występują w ilościach: cytrynian 90.9%, cisakonitan 2.9%, izocytrynian 6.2%. Aktywność akonitazy której kofaktorem są jony  $\text{Fe}^{++}$  jest silnie hamowana przez transakonitan.

Powstały z cytrynianu izocytrynian w obecności dehydrogenazy izocytrynianowej związanej z NAD zostaje przekształcony do  $\alpha$ -ketoglutaranu zgodnie z reakcją:



NADH utleniany jest w łańcuchu oddechowym. Utlenianie to sprzężone jest z właściwą przemianą energetyczną /oksydacyjna fosforylacja/ w wyniku której komórka uzyskuje energię zmagazynowaną w postaci ATP.

Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę izocytrynianową NAD zależną jest bardzo czuła na metaboliczne systemy kontrolujące. Aktywność tego enzymu regulowana jest przez nukleotydy adeninowe i pirydynowe. Stymulowana jest przez AMP i NAD, hamowana przez ATP i NADH. Istnieje zatem ścisły związek między zapotrzebowaniem komórki na energię i ostatecznym utlenianiem cytrynianu.

Dehydrogenaza izocytrynianowa występuje w mitochondriach również w formie związanej z NADP. Jednak rola tego enzymu w mitochondriach i mechanizmy jego regulacji nie są jeszcze dobrze poznane.

### 1. 3. Transport cytrynianu z mitochondriów do cytoplazmy.

Część wytworzonego w mitochondriach cytrynianu zużywana jest w cytoplazmie. W ustaleniu zależności metabolicznych między mitochondriami a cytoplazmą decydującą rolę odgrywają błony mitochondrialne, przez które zachodzi wymiana substratów i metabolitów. Zewnętrzna błona działa na zasadzie sita molekularnego, przepuszczając cząsteczki o masie do 5000 /149/. Błona wewnętrzna jest przepuszczalna jedynie dla cząsteczek o średnicy hydratacyjnej mniejszej od 0,6 nm, takich jak woda, dwutlenek węgla, tlen, które przechodzą na zasadzie dyfuzji. Pośredniki cyklu Krebsa a w tym i cytrynian nie dyfundują bezpośrednio przez błonę wewnętrzną mitochondriów /29/. Jest to uzasadnione z tego względu, że wszystkie enzymy cyklu Krebsa poza dehydrogenazą bursztynianową zlokalizowane są w mitochondrialnej matrix /59/ i cały cykl zachodzi w przestrzeni ograniczonej błoną wewnętrzną.

Łatwa przepuszczalność błony umożliwiłaby "wyciekanie" pośredników cyklu Krebsa do cytoplazmy i w rezultacie powodowała zwalnianie lub całkowite zatrzymanie przemian cyklu kwasu cytrynowego. Z drugiej strony wiadomo, że wymiana pośredników cyklu Krebsa między mitochondriami i cytoplazmą jest podstawą metabolizmu komórki. W błonie mitochondrialnej istnieją specyficzne systemy umożliwiające transport poszczególnych grup metabolitów.

Transport cytrynianu przez błonę mitochondrialną wątroby jest związany z transportem kwasów dwukarboksylowych i pośrednio z transportem nieograniczonego fosforanu /144, 151/.

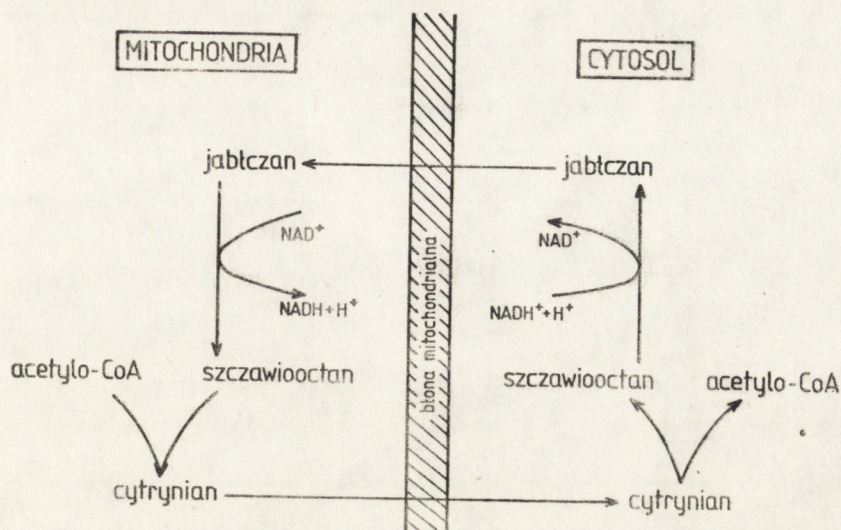
Pierwszą reakcją umożliwiającą przemieszczanie jonów przez błonę

mitochondrialną jest wytworzenie w wyniku oddychania mitochondriów, gradientu elektrochemicznego. Zgodnie z teorią Mitchella /129/ w czasie oddychania protony są wyrzucane na zewnętrzną stronę błony podczas gdy ujemny ładunek zostaje wewnątrz. W takich warunkach nieograniczony fosforan przechodzi przez błonę w wyniku wymiany z jonami  $\text{OH}^-$ , a następnie może być wymieniany z kwasami dwukarboksylowymi /jabłczanem/ przy udziale przenośnika kwasów dwukarboksylowych. Z kolei kwasy dwukarboksylowe są transportowane w wymianie z trójkarboksylowymi /cytrynian/. W wymianie tej uczestniczy przenośnik dla kwasów trójkarboksylowych. Palmieri i wsp. wydzielili z mitochondriów wątroby i częściowo oczyścili jeden z przenośników trójkarboksylowych /143/.

Są to jednak pionierskie badania i dotychczas w zasadzie budowa przenośników nie jest poznana. Wiadomo natomiast, że istnieją swoiste inhibitory pozwalające na wybiórcze hamowanie aktywności poszczególnych przenośników. I tak transport  $\text{P}_i$  w wymianie z  $\text{OH}^-$  hamowany jest przez ograniczne związki rtęci, przenośnik "dwukarboksylowy" katalizujący wymianę między kwasami dwukarboksylowymi i  $\text{P}_i$  hamowany jest przez butylomalonian i organiczne związki rtęci, przenośnik "trójkarboksylowy" przez 1, 2, 3 - benzeno-trójkarboksylan /144/.

Z przejściem cytrynianu przez błonę mitochondrialną łączy się przenoszenie równoważników redukcyjnych z cytosolu do mitochondriów.

Brunengaber i Lowenstein /24/ zaproponowali mechanizm przenoszenia równoważników redukcyjnych z udziałem cytrynianu/Schemat 3/.



Schemat 3. Transport cytrynianu przez błonę mitochondrialną.  
Wg. Brunengabera, Lowensteina /24/.

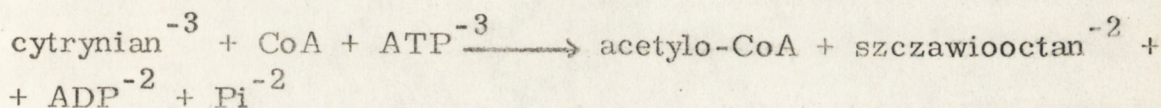
Według tych autorów, cytrynian transportowany z mitochondriów do cytosolu jest rozkładany w obecności ATP-zależnej liazy cytrynianowej do acetylo-CoA i szczawiooctanu. Szczawiooctan przyjmuje wodór z cytoplazmatycznego  $\text{NADH}_2$  i jako jabłczan wraca do mitochondriów na drodze wymiany z cytrynianem. Wewnątrz mitochondriów jabłczan jest utleniany do szczawiooctanu i przekształcany do cytrynianu po kondensacji z acetylo-CoA, a przeniesiony  $\text{H}_2$  redukuje wewnątrzmitochondrialny NAD. W ten sposób powstający w procesie cytoplazmatycznym  $\text{NADH}_2$  może być utleniany przez łańcuch oddechowy mitochondriów, mimo niemożliwości przejścia całej cząsteczki tego związku przez błonę mitochondrialną /99, 104, 105/.

Transport cytrynianu przez błonę mitochondrialną w wymianie z jabłczanem jest regulowany przez stężenie acetylo-CoA, co w konsekwencji ma duży wpływ regulujący na syntezę kwasów tłuszczowych i glukogenezę /69/.

#### 1. 4. Zużycie cytrynianu w cytoplazmie

##### 1. 4. 1. Cytrynian jako prekursor pozamitochondrialnego Acetylo-CoA.

Przetransportowany z mitochondriów do cytoplazmy cytrynian podlega przemianom w wyniku których jak to zaznaczono na schemacie 3 powstaje acetylo-CoA i szczawiooctan. Przemiany te zachodzą w obecności liazy cytrynianowej ATP zależnej /210/ zgodnie z następującą reakcją:



Szereg danych przemawia za tym, że we wszystkich badanych tkankach /wątroba, mózg, tkanka tłuszczowa/ liaza cytrynianowa ATP zależna jest zlokalizowana pozamitochondrialnie /225/.

Podstawowymi czynnikami regulującymi aktywność tego enzymu są: ADP i Pi. Hamują one bardzo silnie aktywność liazy, a inhibicja ta jest dodatkowo uzależniona od stężenia jonów  $\text{Mg}^{++}$  w środowisku /5, 218/. Aktywność tego enzymu hamowana jest również przez  $\alpha$ -ketoglutaran /218/ i glutaminian /216/.

Powstający z cytrynianu acetylo-CoA jest podstawowym substratem dla syntezy kwasów tłuszczowych zachodzącej w cytoplazmie /208/. Dotychczas postulowano kilka mechanizmów przenoszenia acetylo-CoA przez błony mitochondrialne. Początkowo sądzono, że związek ten może przechodzić na drodze dyfuzji bądź przenoszenia grup acetylowych /octanu/. Obydwa te procesy wydają się jednak być za wolne w stosunku do szybkości syntezy lipidów w cytoplazmie /111/. Inna hipoteza zakłada, że transport acetylo-CoA odbywa się za pośrednictwem karnityny i enzymów z nią współdziałających /10, 22/.

Przeważa jednak pogląd, że transport reszt acetylowych przy współudziale karnityny odbywa się raczej w kierunku do, a nie z mitochondriów /23/.

Wiele danych doświadczalnych przemawia za tym, że głównym, bezpośrednim prekursorem cytoplazmatycznego acetylo-CoA jest cytrynian przechodzący z mitochondriów /25, 111/ /Schemat 3/.

Badania Daikuhara i wsp. /46/ wykazały, że ponad 80% pozamitochondrialnego acetylo-CoA wychodzi z mitochondriów za pośrednictwem cytrynianu, który w cytoplazmie ulega następnie rozszczepieniu przez liazę cytrynianową ATP zależną.

W tkance nerwowej acetylo-CoA poza udziałem w syntezie kwasów tłuszczowych jest donorem grup acetylowych do syntezy acetylocholiny /206/, która spełnia rolę neurotransmitera w przekazywaniu impulsów nerwowych /43, 234/. Miejscem syntezy i wydzielania acetylocholiny są zakończenia nerwowe /226/. Zakończenia te w trakcie homogenizacji tkanki w izotonicznych roztworach sacharozy lub mannitolu ulegają oderwaniu od aksonu tworząc zamknięte błoną plazmatyczną twory zwane synaptosomami. Synaptosomy których średnica wynosi 0.5-5  $\mu$ m zawierają mitochondria, pęcherzyki synaptyczne i synaptoplazmę. Stanowią one dobry materiał doświadczalny do badań szeregu procesów metabolicznych.

Należy podkreślać jednak, że otrzymanie czystej frakcji synaptosomów, wolnej od zanieczyszczeń innymi subfrakcjami a jednocześnie metabolicznie niezmienionej jest wyjątkowo trudne.

Wyniki szeregu prac przemawiają za tym, że donorem grupy acetylowej do wytwarzania acetylo-CoA biorącego udział w syntezie acetylocholiny jest cytrynian /206, 219, 226/.

Są jednak dane z badań na narzędzie elektrycznym drętwn /Torpedo/ i nerwach homara wskazujące, że do syntezy acetylocholiny przede wszystkim zużywany jest octan /32, 61/.

Z badań Hebb oraz Tucek i Chung na świnkach morskich i szczurach wynika, że najbardziej prawdopodobnym prekursorem dla syntezy acetylocholiny jest pirogronian /82, 224/.

Przemiana pirogronianu do acetylo-CoA odbywa się w mitochondriach z udziałem dehydrogenazy pirogronianowej /33, 173, 174/.

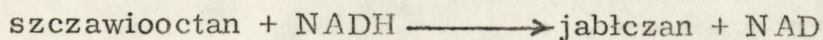
Jednakże sposób przenoszenia acetylo-CoA przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, nieprzepuszczalną dla tego związku /2, 82/ pozostaje nadal zagadnieniem nierozstrzygniętym.

Wg Hebb /82/ wykorzystanie głównie pirogronianu do syntezy acetylocholiny nie wyklucza możliwości, by wytworzony z niego w mitochondriach cytrynian /przy udziale syntazy cytrynianowej/ pośredniczył w tworzeniu cytoplazmatycznej puli acetylo-CoA /z udziałem liazy cytrynianowej/ wykorzystywanego do syntezy acetylocholiny. Za tą możliwością przemawiają również zbliżone aktywności liazy cytrynianowej /160/ i acetylotransferazy cholinowej /26, 223/.

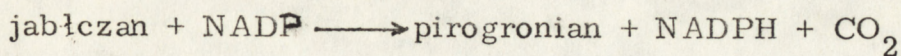
#### 1.4.2. Metabolizm szczawiooctanu powstałego z cytrynianu.

Poza acetylo-CoA drugim produktem degradacji cytrynianu w cytoplazmie jest szczawiooctan, którego przemiany mogą przebiegać w kilku kierunkach /74, 177/.

W obecności dehydrogenazy jabłczanowej i NADH w cytoplazmie ulega on redukcji do jabłczanu zgodnie z reakcją:

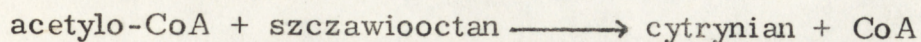
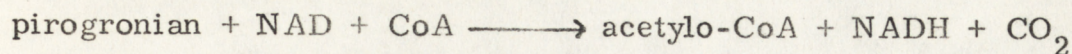


Jabłczan pod wpływem dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej i NADP wytwarza pirogronian i NADH:



Powstały NADPH wykorzystywany jest jako źródło wodoru w syntezie kwasów tłuszczowych.

Wytworzony pirogronian może wchodzić do mitochondriów i podlegać kolejnym reakcjom prowadzącym do wytworzenia cytrynianu:



Powstały cytrynian jak to już omówiono wcześniej może być utleniany w cyklu Krebsa, bądź też może przechodzić do cytoplazmy gdzie podlega opisanym reakcjom degradacji z wytworzeniem acetylo-CoA i szczawiooctanu.

Powstały ze szczawiooctanu pirogronian może również wchodzić w ciąg reakcji glikoneogenezy /74/.

Należy również zwrócić uwagę na powiązanie zużycia szczawiooctanu - produktu utleniania cytrynianu - z metabolizmem aminokwasów.

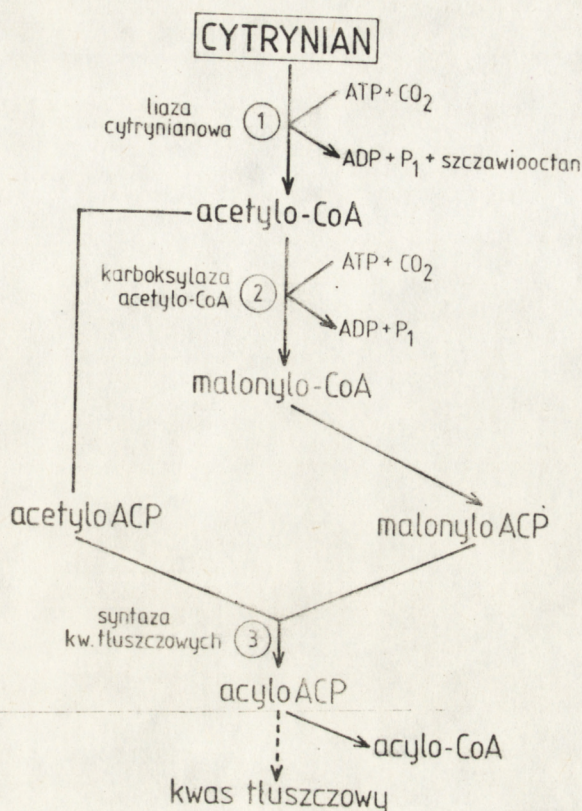
Związek ten może powstawać z  $\alpha$ -ketoglutaranu otrzymanego z cytrynianu /73/ bądź też może wytwarzać  $\alpha$ -ketoglutaran w reakcji transaminacji w obecności asparaginianu i glutaminianu /45/.

## 1.5. Cytrynian jako regulator przemiany lipidowej i węglowodanowej.

### 1.5.1. Cytrynian a regulacja syntezy kwasów tłuszczowych.

Synteza kwasów tłuszczowych z cytrynianu zachodzi zgodnie z reakcjami przedstawionymi na schemacie 4 /Lowenstein 111/.

Każdy etap w syntezie kwasów tłuszczowych podlega wielostronnej kontroli przez substraty i produkty reakcji a także przez efektory działające na enzym lub na reakcje odpowiedzialne za jego syntezę i degradację, względnie za proces transportu z miejsca ich wytwarzania do rejonu, w którym odbywa się synteza kwasów tłuszczowych. Regulacja aktywności pierwszego etapu syntezy kwasów tłuszczowych /1/ w przedstawionym na schemacie 4 ciągu reakcji



Schemat 4. Biosynteza kwasów tłuszczowych. ACP - acylowy przenośnik białkowy.

wiąże się z rolą liazy cytrynianowej i została omówiona w rozdziale 1.4.1.

W procesie regulacji syntezy kwasów tłuszczowych podnosi się rolę karboksylazy acetylo-CoA. Jest to enzym katalizujący reakcję przejścia acetylo-CoA do malonylo-CoA. Wielu autorów wykazało, że cytrynian jest dodatnim efekтором regulującym aktywność tego enzymu /124, 207, 230/. Aktywacja związana jest prawdopodobnie z tworzeniem się polimerów enzymu /131/. Zagadnienie to jest jednak bardziej skomplikowane w odniesieniu do warunków fizjologicznych. Wykazano bowiem, że karboksylaza acetylo-CoA osiąga

połowę maksymalnej aktywności w obecności cytrynianu w stężeniach wyższych od 7 mM. Stężenie zaś tego związku mierzone w wątrobie wynosi zaledwie 0.3  $\mu$ mole/g świeżej tkanki [209]. Wydaje się, że regulacja aktywności karboksylazy acetylo-CoA poprzez cytrynian może być uzależniona od intensywności transportu tego związku z mitochondriów do cytoplazmy, który jak już zaznaczono regulowany jest przez poziom acetylo-CoA.

Według Godridge' a [69] koordynacja kontroli syntezy kwasów tłuszczowych przez cytrynian i acetylo-CoA może zachodzić zgodnie z następującym mechanizmem.

Acetylo-CoA hamuje z jednej strony aktywność acetylo-CoA karboksylazy, a z drugiej - transport cytrynianu z mitochondriów do cytosolu, co w rezultacie obniża stężenie cytrynianu w tej frakcji i w konsekwencji obserwuje się zmniejszenie aktywności acetylo-CoA karboksylazy.

Inhibicja acetylo-CoA karboksylazy, spowodowana spadkiem stężenia cytrynianu w cytosolu wywołanym wzrostem poziomu acetylo-CoA jest kompetycyjna w stosunku do inhibicji aktywności tego enzymu przez acylo-CoA.

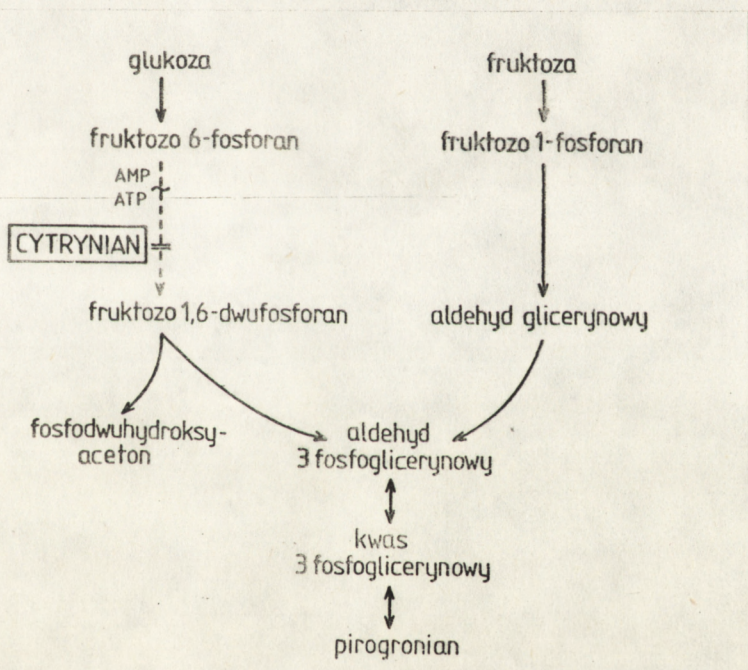
Ponieważ inhibicja transportu cytrynianu prowadzi do mniejszej produkcji cytosolowego acetylo-CoA - substratu dla acetylo-CoA karboksylazy, małe zmiany w stężeniach acylo-CoA mogą dawać duże efekty w natężeniu syntezy kwasów tłuszczowych.

Poza omówioną regulacją syntezy kwasów tłuszczowych, zależną od stężenia cytrynianu, wytwarzanie tych związków jest również kontrolowane przez czynniki hormonalne odpowiedzialne za procesy syntezy i degradacji enzymów uczestniczących w omówionych reakcjach oraz czynniki związane z dietą zwierząt. Dieta wysokowęglowodanowa podwyższa znacznie aktywność liazy cytrynianowej ATP zależnej, czego nie obserwuje się przy diecie nisko

lipidowej /110, 119, 202/.

### 1.5.2. Regulacja glikolizy przez cytrynian.

Metabolizm węglowodanów prowadzi do wytworzenia pirogronianu /schemat 5/ /111/, który może być transportowany do mitochondriów, przekształcany do cytrynianu via acetylo-CoA i utleniany w cyklu Krebsa.



Schemat 5. Przekształcenie glukozy i fruktozy do pirogronianu.

W regulacji przemiany węglowodanów podstawową rolę odgrywa fosfofruktokinaza biorąca udział w przekształcaniu fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-dwufosforanu. Aktywność tego enzymu modulowana jest przez nukleotydy adeninowe /113, 130, 145, 146/ oraz przez cytrynian, który jest silnym inhibitorem co zostało zaobserwowane w przypadku enzymu pochodzącego z różnych tkanek

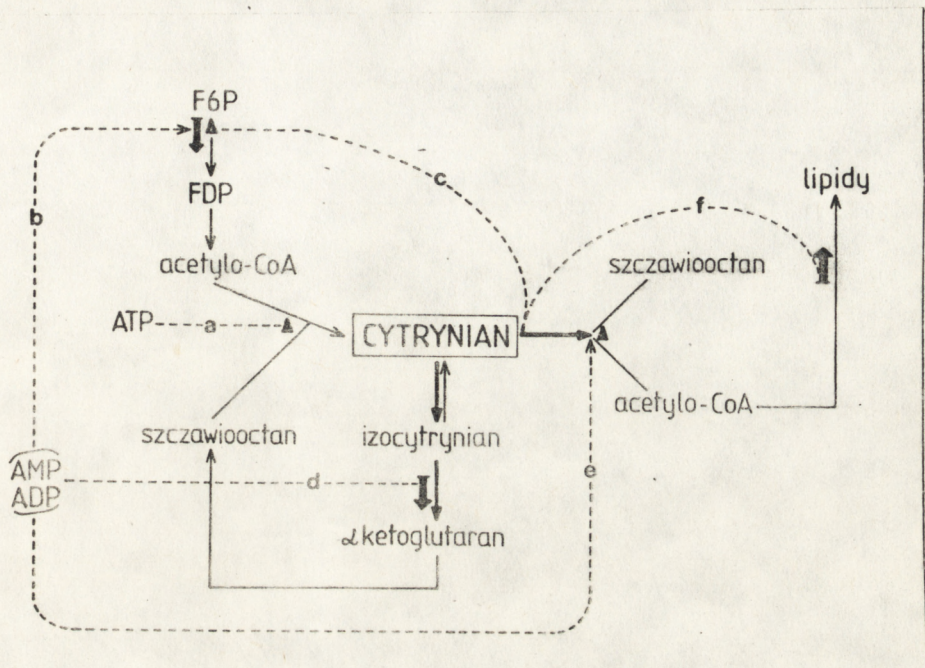
zwierzęcych /63, 145, 148, 171/.

Droga glikolityczna jest podstawowym źródłem pirogronianu i acetylo-CoA będącego z kolei substratem dla syntezy cytrynianu, który jest negatywnym efektem fosfofruktokinazy kluczowego enzymu glikolizy. Efekt ten jest analogiczny do klasycznego negatywnego sprzężenia zwrotnego, inhibicji metabolicznej drogi biosyntezy przez produkt /5/.

#### 1.6. Podstawowe współzależności w regulacji syntezy i zużycia cytrynianu.

W poprzednich rozdziałach opisano drogi regulacji syntezy i zużycia cytrynianu. W komórce obydwie te procesy zachodzą jednocześnie, a stan dynamicznej równowagi między wytwarzaniem i zużywaniem cytrynianu utrzymywany jest dzięki wzajemnym oddziaływaniom czynników regulujących obydwie te procesy. Przesunięcie równowagi w stronę syntezy czy zużycia cytrynianu, spowodowane czynnikami fizjologicznymi, patologicznymi czy zmianą diety, wywołuje wzrost lub spadek stężenia tego związku w komórce, co z kolei wpływa na intensywność szeregu reakcji, dla których czynnikiem regulującym jest sam cytrynian.

Główne drogi współdziałania regulacji związanej z syntezą i ze zużyciem cytrynianu w komórce przedstawiono na schemacie 6. Drogi oznaczone literami a, b, c dotyczą regulacji syntezy cytrynianu. Reakcja pierwsza /a/ hamowana jest przez ATP, z drugiej strony, ilość substratu reakcji, acetylo-CoA wyprodukowanego z heksoz jest regulowana przez fosfofruktokinazę, dla której pozytywnym efektem jest AMP /b/. Następnie sam cytrynian jest negatywnym efektem dla reakcji /c/.



Schemat 6. Współzależność regulacji syntezy i zużycia cytrynianu. Miejsce działania negatywnego efektora zaznaczono trójkątem. Grube strzałki wskazują miejsce działania efektora pozytywnego.

Tak więc synteza cytrynianu w mitochondriach przypuszczalnie jest uwarunkowana przez wzrost glikolizy w cytoplaźmie w momencie, kiedy stężenie cytrynianu spada poniżej normalnego poziomu. Następne trzy drogi współdziałania czynników regulujących:

d, e, f dotyczą zużycia cytrynianu w komórce.

AMP jest pozytywnym efektem dla izocytrynianowej dehydrogenazy NAD zależnej /d/, natomiast ADP jest negatywnym efektem dla liazy cytrynianowej ATP zależnej /e/. Zatem obydwie drogi /d/ i /e/ uzależnione są od stężeń poszczególnych nukleotydów adeninowych.

Współdziałanie dwu dróg regulacji odpowiedzialne jest za rozdzielanie cytrynianu na dwie pule. Jedną, podlegającą utlenianiu w cyklu

Krebsa w obecności IDH NAD /w rezultacie czego powstaje ATP/ i drugą, będącą materiałem wyjściowym do syntez i produkcji materiałów budulcowych komórki /co wiąże się ze zużyciem ATP/. Dodatkowo sam cytrynian jest pozytywnym efektem dla karboksylazy acetylo-CoA /f/, która katalizuje produkcję kwasów tłuszczowych.

Omówiony schemat zaproponowany przez Atkinsona /4/ nie obejmuje wszystkich możliwości regulacji przemian cytrynianu.

Atkinson /4/ zwraca uwagę na rolę pH we wpływie ATP na syntazę cytrynianową. Zaobserwowano również, że cytrynian jest inhibitorem dehydrogenazy pirogronianowej i  $\alpha$ -ketoglutazarowej /190/.

## 2. Niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego

### 2.1. Istota i rodzaje niedotlenienia o. u. n.

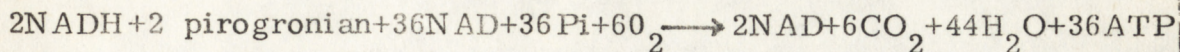
Podstawowa funkcja komórek ośrodkowego układu nerwowego polega na odbieraniu, nagromadzaniu, przetwarzaniu i przekazywaniu informacji. Związana jest ona z intensywnymi procesami: transportu jonów, aminokwasów, amin biogennych, przemianami aminokwasów i neurotransmiterów.

Wszystkie te procesy dla prawidłowego ich funkcjonowania wymagają dużej ilości energii /197, 199/.

Energetyczne zasoby mózgu są niewielkie a jedynym substratem u organizmów dorosłych mogącym służyć ich odbudowie jest glukoza /201/.

Zużycie glukozy zachodzi w mózgu podobnie jak w innych tkankach: w cytoplazmie w czasie glikolizy /w warunkach tlenowych z wytworzeniem pirogronianu, lub beztlenowych - mleczanu/ oraz w mitochondriach w reakcjach cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego, gdzie

w wyniku utleniania wytworzonego w glikolizie pirogronianu powstaje dwutlenek węgla, woda i energia zmagazynowana w wiązaniach ATP.



Intensywność tych reakcji zależna jest z jednej strony od transportu glukozy z krwi do komórek i od czynników regulujących wyżej przytoczone reakcje, z drugiej strony od ilości tlenu dostarczanego do komórek. Zapotrzebowanie komórek o.u.n. na tlen jest bardzo duże, znacznie wyższe niż w komórkach innych tkanek. Ośrodkowy układ nerwowy stanowiący zaledwie 2-3% ciężaru ciała zużywa w stanie spoczynku 20% całkowitej ilości tlenu pobranego przez ustrój a minutowy mózgowy przepływ krwi jest równy 15% pojemności wyrzutowej serca /8/.

Ilość dostępnego dla komórek tlenu w danym momencie zależy od całkowitej zawartości  $\text{O}_2$  we krwi tętniczej i od mózgowego przepływu krwi.

Warunki w których ilość dostępnego tlenu w tkance jest niewystarczająca dla utrzymania jej funkcji, intensywności przemian i prawidłowej struktury nazywamy hipoksją /201/.

Czynnikami determinującymi te warunki są: mózgowy przepływ krwi, procent wysycenia hemoglobiny tlenem i stężenie hemoglobiny.

Biorąc pod uwagę te czynniki, Siesjö /201/ wyodrębnił kilka typów niedotlenienia:

1. niedotlenienie ischemiczne będące następstwem ograniczonego dopływu krwi do całego lub do części narządu
2. niedotlenienie hipoksyjne wynikające z niedoboru tlenu we krwi tętniczej związane z obniżeniem jego ciśnienia parcjalnego
3. niedotlenienie anemiczne spowodowane obniżeniem stężenia lub zmianami właściwości hemoglobiny.

Poza tymi podstawowymi typami niedotlenienia Siesjö /201/ wyróżnia jeszcze: niedotlenienie histotoksyczne - związane z zaburzeniami czynności łańcucha oddechowego oraz niedotlenienie anoksyjne - występujące w przypadku całkowitej nieobecności tlenu.

## 2. 2. Zaburzenia wywołane niedoborem tlenu w mózgu oraz układy kompensacyjne.

Niedobór tlenowy prowadzi do zaburzeń funkcji mózgu, jak również do uszkodzeń struktury. Uszkodzenia te w większości przypadków mają charakter nieodwracalny.

Skutki niedotlenienia uzależnione są od jego rodzaju, czasu jego trwania, dojrzałości struktur komórkowych /51/ oraz wrażliwości na niedotlenienie komórkowych elementów mózgu. Wrażliwość ta jest tym większa im większe jest zapotrzebowanie danych elementów na tlen. Z całej populacji komórek o.u.n. najwrażliwsze są neurony stanowiące 20% tej populacji, a wykorzystujące 75% mózgowego zużycia  $O_2$  /8/.

Ośrodkowy układ nerwowy wyposażony jest w szereg układów kompensacyjnych od których wydolności zależy odwracalność lub nieodwracalność uszkodzeń.

W początkowym okresie ograniczenia dopływu tlenu do mózgu następuje zwiększenie mózgowego przepływu krwi /8/, oraz wzmożenie zużycia glukozy w glikozie beztlenowej /56, 114, 191, 194/. Fizjologiczne mechanizmy regulacji przepływu krwi przez mózg zabezpieczają prawidłową dostawę tlenu w szerokich granicach zmian  $PaO_2$  krwi tętniczej /194/. W warunkach krytycznych /20-25 mmHg/ kompensacyjny wzrost szybkości przepływu krwi przez mózg sięgać może nawet czterokrotnej wartości kontrolnej /38/.

Wzrost anaerobowej glikolizy połączony jest ze zwiększonym zużyciem glukozy i produkcją kwasu mlekowego /194/. Zjawisko to pojawia się przy wartościach  $\text{PaO}_2 = 50 \text{ mmHg}$ .

Mechanizm jego nie jest ostatecznie wyjaśniony. Nie wynika on z obniżenia potencjału energetycznego, gdyż zasoby energetyczne mózgu są względnie stałe aż do wartości krytycznej  $\text{PaO}_2$  krwi tętniczej /56, 194/.

Postępujące niedotlenienie prowadzi natomiast do zaburzeń metabolicznych wyrażających się: spadkiem zawartości ATP, fosfokreatyny, glukozy i glikogenu /56, 122, 193/ oraz hamowaniem transportu elektronów w łańcuchu oddechowym /201/ w wyniku czego obserwuje się nagromadzanie pośredników cyklu Krebsa i wyczerpanie ładunku energetycznego tkanki /195/.

W niedotlenieniu ischemicznym obserwowano zaburzenia w metabolizmie fosfolipidów błon mitochondrialnych i mikrosomalnych /121, 180/ oraz zaburzenia w gospodarce elektrolitowej /79, 116/.

Obniżenie  $\text{PaO}_2$  krwi tętniczej poniżej wartości krytycznej prowadzi do zaburzeń układu oddechowego, czynności serca i spadku ciśnienia krwi.

Obserwowane w tych drastycznych warunkach zmiany w potencjale energetycznym komórki wynikają więc z wtórnie rozwijającego się niedokrwienia /176, 194/.

W ostrym niedokrwieniu /np. zatrzymanie krążenia/ zanik bioelektrycznej aktywności mózgu /płaski przebieg EEG/ z równocześnie postępującym spadkiem potencjału energetycznego obserwuje się już po 15-20 sek. /38, 194, 214/.

Po przywróceniu krążenia stan energetyczny mózgu wraca do normy szybciej niż jego aktywność bioelektryczna wyrażona w zapisie EEG, lecz funkcje układu nerwowego mogą być w znacznym stopniu nieprawidłowe.

W resuscytacji po niedotlenieniu mózgu obok takich niekorzystnych

czynników jak obrzęk śródbłónka naczyń krwionośnych i astrogliu, agregacja krwinek i wzrost lepkości krwi istotną rolę odgrywają czynniki biochemiczne powodujące trwałe lub trudno odwracalne zaburzenia przemian aminokwasów, neurotransmiterów, syntezy białka /194/.

### 2.3. Czynniki modyfikujące reakcję mózgu na niedotlenienie

Jak już wspomniano w warunkach niedotlenienia znacznie wzrasta przepływ krwi, jednakże stopień tego wzrostu jest znacznie ograniczony przez hipokapnię /203/. Stan ten powodując skurcz naczyń mózgu może potęgować hipoksję tkanki. Zapobieganie hipokapnii można uzyskiwać poprzez zwiększanie w mieszaninie oddechowej zawartości dwutlenku węgla /196, 201/.

Doświadczalne zwiększenie ilości  $\text{CO}_2$  do 5-10% w mieszaninie oddechowej /hiperkapnia/ powoduje wzrost częstotliwości EEG /205/. Przy wyższych stężeniach dwutlenku węgla obserwuje się występowanie drgawek a następnie anestezji zwierzęcia /244/.

Hiperkapnia charakteryzuje się również wzrostem stężenia jonów wodorowych we krwi i w tkance /kwasica oddechowa/ oraz zwiększonym wydzielaniem katecholamin z rdzenia nadnerczy /132/ i hydroksylacji tryptofanu i tyrozyny /28/.

Badania wielu autorów wskazują, że wrażliwość tkanki nerwowej na niedobór tlenu można zmniejszyć przez podanie anestetyków /78, 203/. Zgodnie z aktualnymi teoriami działanie anestetyków może polegać na zwiększeniu ruchliwości cząsteczek lipidów w błonach komórkowych, które prowadząc do zmian przepuszczalności wpływają na tej drodze na metabolizm neuronów /134/.

Zaobserwowano, że podawanie zwierzętom barbituranów zmniejsza metaboliczne skutki niedotlenienia i niedokrwienia mózgu, zmniejszając równocześnie rozległość obrzęku mózgu /127, 128, 158, 211/.

Przypuszczalnie tzw. "ochrony" mechanizm działania barbituranów polega na obniżeniu przewodnictwa synaptycznego /128/ co z kolei wpływa na osłabienie przemian metabolicznych /198, 200/. Zmniejszenie tych przemian może wiązać się bezpośrednio z zahamowaniem szybkości obrotów szeregu metabolitów, amin biogenych i acetylocholiny /107, 138/. Mimo jednak licznych badań w zakresie wpływu anestetyków, mechanizm ich działania na skutki niedotlenienia nie jest wystarczająco poznany.

Dokładne omówienie wszystkich zaburzeń metabolicznych i funkcjonalnych wywołanych niedoborem tlenowym w różnych typach niedotlenienia wykracza poza zakres tego opracowania. W następnym rozdziale omówione zostaną dokładniej jedynie skutki niedotlenienia hipoksyjnego stosowanego w doświadczeniach niniejszej pracy.

#### 2.4. Niedotlenienie hipoksyjne

Ten typ niedotlenienia powstaje, jak zaznaczono powyżej w wyniku zmniejszenia zawartości tlenu w mieszaninie oddechowej. Charakteryzuje się on obniżeniem prężności cząstkowej tlenu w powietrzu pęcherzykowym płuc, a w konsekwencji spadkiem stężenia tlenu we krwi tętniczej. Objawy towarzyszące hipoksji od dawna były przedmiotem obserwacji wielu autorów i dotyczyły zarówno ludzi jak i zwierząt.

W oparciu o te obserwacje Siesjö /201/ przedstawił szereg zależności między stężeniami tlenu w mieszaninie oddechowej, wartością  $PaO_2$  i reakcjami fizjologicznymi u człowieka. Podkreślił on, że już nieznaczne obniżenie zawartości tlenu w mieszaninie oddechowej daje objawy zaburzeń funkcji ośrodkowego układu nerwowego.

Objawy niedotlenienia u ludzi narastające w miarę obniżania tlenu w mieszaninie gazowej to: bóle głowy, obniżona zdolność uczenia się /60/, wzrost wentylacji /55, 92/, wzrost przepływu krwi

/92, 39/, nudności, niepokój narastający aż do utraty przytomności co u ludzi zachodzi przy  $\text{PaO}_2$  około 30 mmHg odpowiadającym około 7%  $\text{O}_2$  w mieszaninie gazowej.

Zwierzęta takie jak szczury, myszy, charakteryzują się większą odpornością na niedotlenienie niż człowiek. W warunkach kiedy mieszanina oddechowa zawiera 5%  $\text{O}_2$  / $\text{PaO}_2$  = około 20 mmHg/ zachowują one wrażliwość na bodźce zewnętrzne a obniżenie czynności bioelektrycznej mózgu uchwytne w EEG zachodzi przy  $\text{PaO}_2$  - 25 mmHg /195/. Jednakże już przy znacznie mniejszej hipoksji obserwuje się zaburzenia w zachowaniu zwierząt /18, 94/.

Dane doświadczalne dostarczają szeregu informacji dotyczących zmian metabolicznych w o.u.n. w czasie niedotlenienia. Stwierdzono, że u szczura obniżenie wartości  $\text{PaO}_2$  poniżej 50 mmHg /10%  $\text{O}_2$  w mieszaninie oddechowej/ wywołuje nagromadzanie się mleczanu i pirogronianu w tkance oraz wzrost redukcji nukleotydów pirydynowych /70, 75, 184, 191, 193, 195/.

Wykazano również zmiany w poziomie pośredników cyklu kwasu cytrynowego i powiązanych z nimi metabolicznie aminokwasów.

W przypadku  $\text{PaO}_2$  równym około 25 mmHg obserwuje się wzrost w poziomie pirogronianu, fumaranu i jabłczanu. Poziom cytrynianu wzrasta nieznacznie, bursztynianu praktycznie nie ulega zmianie. Poziom  $\alpha$ -ketoglutaranu początkowo spada, a po 15 min niedotlenienia rośnie. Szczawiooctan również początkowo spada, aby powrócić do normy po 30 min hipoksji /137/. W sumie pośredniki cyklu Krebsa wzrastają w hipoksji od wartości około 1.6 do  $2.4 \mu\text{mole/g}^{-1}$  /201/.

W warunkach niedotlenienia hipoksyjnego obserwuje się wzrost w poziomie kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego w mózgu /221, 242, 243/.

Wood /241/ sugeruje, że zmiany w poziomie GABA w hipoksji odgrywają rolę w homeostatycznej kontroli metabolizmu mózgu.

Tews i wsp. stosując mieszaninę gazową o zawartości 4.5%  $\text{O}_2$

u morfinizowanych psów obserwowali wzrost stężeń alaniny, glutaminianu i GABA oraz spadek zawartości asparaginianu /221/.

Niedotlenienie hipoksyjne wywołuje również zmiany w poziomie wolnych kwasów tłuszczowych /212/ i neurostransmitterów /193, 194/.

Na uwagę zasługuje fakt, że w niedotlenieniu hipoksyjnym w granicach  $\text{PaO}_2$  50-20 mmHg nie obserwuje się zmian w poziomie związków wysokoenergetycznych takich jak ATP, ADP, AMP /6, 52, 56, 75, 118, 137, 170, 184, 191, 193, 195/, jak również zmian w stężeniu cyklicznego AMP /201/. Jedynym związkiem energetycznym którego poziom nieco spada jest fosfokreatyna /181, 191/.

Mechanizm pozwalający na utrzymanie w warunkach hipoksji stanu energetycznego komórki w granicach normy nie jest ostatecznie poznany. Wydaje się jednak, że za utrzymanie homeostazy energetycznej w tych warunkach odpowiedzialny jest przede wszystkim wzrost krążenia mózgowego /196, 201/.

Biochemiczne dane doświadczalne dotyczą głównie zmian w poziomach szeregu metabolitów w warunkach niedotlenienia oznaczanych w całym mózgu. Dają one zatem obraz globalnych zmian w tkance. Ilość prac zajmujących się zaburzeniami przemian metabolitów w hipoksji, z uwzględnieniem ich subkomórkowej lokalizacji oraz biochemicznych przyczyn nieprawidłowości wywołanych niedoborem tlenowym jest ciągle niewielka.

## ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Ścisłe powiązanie cytrynianu ze wszystkimi podstawowymi szlakami metabolicznymi w komórce oraz współzależność regulacji metabolicznej tego związku z przemianami nukleotydów adeninowych, glikolizą, cyklem Krebsa oraz reakcjami syntez stawiają go w centralnej pozycji ogólnego metabolizmu komórki.

Dotychczasowe badania przemian cytrynianu prowadzone były głównie na wątrobie. Obserwacje dotyczące mózgu były fragmentaryczne i ograniczały się głównie do badań nad liazą cytrynianową i jej rolę w syntezie acetylocholiny [219, 226]. Brak w literaturze jakichkolwiek danych z zakresu tak ważnych zagadnień jak: utlenianie cytrynianu przy udziale IDH NADP, transport tego związku przez błonę mitochondriów perikarionów i mitochondriów synaptosomalnych mózgu wiązał się być może z trudnościami w uzyskaniu czystych frakcji subkomórkowych mózgu, na których badania te można było przeprowadzać.

W niniejszej pracy szczegółowe badania metabolizmu cytrynianu w mózgu prowadzono na frakcjach: cytosolu i mitochondriów dobrze scharakteryzowanych w ostatnich latach oraz na frakcji synaptosomalnej uzyskanej i scharakteryzowanej dokładnie w niniejszej pracy.

Celem pracy było:

1. Zbadanie metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach normalnych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na następujące zagadnienia:
  1. 1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja aktywności enzymów metabolizujących cytrynian
  1. 2. Charakterystyka utleniania cytrynianu w cytosolu z udziałem dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej

1. 3. Wydzielenie, oczyszczenie i charakterystyka cytoplazmatycznej dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej.
1. 4. Określenie mechanizmu transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów.
1. 5. Uzyskanie czystej, metabolicznie "nieuszkodzonej" frakcji synaptosomalnej i jej charakterystyka.
1. 6. Określenie procesu transportu cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych.

Informacje uzyskane z doświadczeń prowadzonych w warunkach prawidłowych dotyczące metabolizmu cytrynianu w mózgu stały się punktem wyjścia dla dalszych badań mających na celu ocenę wpływu niedotlenienia hipoksyjnego na jego metabolizm i reakcje z nim związane.

Ośrodkowy układ nerwowy jest wyjątkowo wrażliwy na niedobór tlenowy, następstwem którego są zaburzenia metaboliczne i uszkodzenia struktury.

Niedotlenienie mózgu występuje zarówno w przypadku zmniejszenia ilości lub braku tlenu w środowisku jak też w różnych stanach patologicznych związanych z zaburzeniami jego wykorzystania w komórce. Zagadnienia te są jedynymi z podstawowych problemów współczesnej kliniki neurologicznej, reanimatologii klinicznej, medycyny pracy a ostatnio również astronautyki.

Aby skutecznie zapobiegać skutkom niedotlenienia lub je zmniejszać niezbędne jest dobre poznanie i zrozumienie mechanizmów uszkodzenia układu nerwowego w następstwie niedoboru tlenowego. Informacje na ten temat czerpie się z prac doświadczalnych. Ostatnio ilość badań poświęconych metabolicznym skutkom niedoboru tlenowego w ośrodkowym układzie nerwowym znacznie

wzrasta. Tym niemniej dotychczas brak było jakichkolwiek danych na temat wpływu niedotlenienia na przemiany tak podstawowego w ogólnym metabolizmie związku jak cytrynian.

Dlatego też kolejnym celem niniejszej pracy było:

2. Określenie zaburzeń w metabolizmie cytrynianu w mózgu w warunkach hipoksji oraz przeprowadzenie badań pozwalających na wykrycie biochemicznych przyczyn obserwowanych zmian.

## MATERIAŁ I METODY

### 1. Warunki doświadczeń

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach o ciężarze ciała 180-200 g. Od momentu dekapitacji wszystkie czynności związane z wyjęciem mózgu i przygotowaniem subfrakcji komórkowych przeprowadzano w temp. od 0 do  $+4^{\circ}\text{C}$ . We wszystkich doświadczeniach homogenat uzyskiwano z półkul mózgów 4-6 szczurów.

#### 1.1. Niedotlenienie hipoksyjne

W celu wywołania niedotlenienia zwierzęta umieszczano w komorze doświadczalnej przez którą przepływała mieszanina gazowa składająca się z 7% tlenu i 93% azotu. Czas niedotlenienia wynosił przeważnie 30 min, ale był również inny w zależności od doświadczenia, co zostało zaznaczone przy opisie poszczególnych doświadczeń.

Stosowany model niedotlenienia został szeroko scharakteryzowany przez Lewisa i wsp. [106] oraz Domańską-Janik i Zalewską [52]. Parametry charakterystyczne dla niedotlenienia zestawione poniżej określają stopień hipoksji w tym modelu.

	PaO <sub>2</sub>	PaCO <sub>2</sub>	pH	mleczan	piro- gronian	mleczan pirogro- nian
Warunki kontrolne	88.0 +3.54	39.9 +0.90	7.39 +0.04	0.86 +0.20	0.109 +0.022	7.9
Niedotlenie- nie hipo- ksyjne 1 godz.	26.2 +2.21	20.6 +1.19	7.50 +0.06	3.28 +0.56	0.151 +0.038	21.7

Zmiany w PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, pH oraz poziomach mleczanu i pirogronianu widoczne w tabeli są obserwowane już po pierwszych 30 min niedotlenienia i utrzymują się praktycznie na stałym poziomie do 2 godzin przetrzymywania zwierząt w mieszance gazowej z zawartością 7% O<sub>2</sub> i 93% N<sub>2</sub> /52/.

### 1.2. Anestezja pentobarbitalowa

Zwierzęta usypiano pentobarbitem sodu podając go dootrzewnowo w dawce 40 mg/kg wagi ciała. Szczury dekapitowano na ogół po 30 min od momentu uśpienia, bądź w innym czasie co zaznaczono w opisie poszczególnych doświadczeń.

### 1.3. Niedotlenienie w anestezji pentobarbitalowej

Szczurom podawano narkozę dootrzewnowo /40 mg/kg wagi ciała/. Po zaśnięciu zwierzęta przenoszono do komory z przepływem mieszanki gazowej /7% tlenu i 93% azotu/ na okres 30 min a następnie dekapitowano.

#### 1. 4. Norma

Dekapitowano zwierzęta przebywające w warunkach prawidłowych z atmosferyczną zawartością tlenu.

#### 2. Otrzymywanie frakcji subkomórkowych

##### 2. 1. Jednoczesne otrzymywanie szeregu frakcji subkomórkowych

Jednoczesne wydzielenie z tkanki szeregu frakcji subkomórkowych uzyskano stosując metodę różnicowego wirowania wg Whittakera i wsp. /232/. Półkule mózgu homogenizowano w 0.44 M sacharozie z 1 mM EDTA /5 ml/g tkanki/ i wirowano przez 5 min przy 900 x g. Osad zawieszano w 0.44 M sacharozie z 1 mM EDTA /2.5 ml/g świeżej tkanki/, homogenizowano i wirowano jak poprzednio, powtarzając tę procedurę dwukrotnie. Frakcję osadzającą się przy 900 x g traktowano jako frakcję jądrową /P<sub>1</sub>/. Połączone supernatanty wirowano przez 30 min przy 17 tys. x g. Osad stanowiła nieoczyszczona frakcja mitochondrialna /P<sub>2</sub>/, supernatant frakcja postmitochondrialna /S<sub>2</sub>/. Z nieoczyszczonej frakcji mitochondrialnej /P<sub>2</sub>/ w gradiencie sacharozy /gradient skokowy: /0.32 M, 0.8 M, 1.2 M/ wirując przez 2 godz. przy 58 tys. x g otrzymywano frakcję mitochondrialną /C/, frakcję synaptosomów /B/ i mielinę /A/. Frakcję synaptosomalną /B/ poddawano szokowi hipoosmotycznemu, a następnie w wyniku 30 minutowego wirowania przy 17 tys. x g otrzymywano frakcję osadu zawierającą mitochondria synaptosomalne /Wp/ i rozpuszczalną frakcję synaptosomów /Ws/. Z frakcji postmitochondrialnej S<sub>2</sub> otrzymano cytosol /S<sub>3</sub>/ oraz frakcję mikrosomalną /M/ w wyniku wirowania przy 105 tys. x g, 1 godzinę.

## 2.2. Otrzymywanie cytosolu

Frakcja postmitochondrialna /cytoplazmatyczna  $S_2$ / otrzymywana była w wyniku homogenizacji w 0.125 M KCl półkul mózgu /homogenat 20%/ oraz wirowania w ciągu 30 min przy 25 tys.x g. Cytosol / $S_3$ / uzyskiwano poprzez odwirowanie otrzymanego supernatantu przy 105 tys. x g w ciągu 1 godziny.

## 2.3. Otrzymywanie frakcji mitochondrialnej

Frakcja mitochondrialna mózgu była otrzymywana metodą Clarka i Niclasy /36/. Półkule mózgu homogenizowano w roztworze izolacyjnym: 0.25 M sacharoza, 10 mM Tris HCl pH 7.4; i 0.5 mM EDTA. Wirowano 2.000 x g w ciągu 3 min. Supernatant wirowano 12.500 x g przez 8 min. Osad zawieszano w 3% Ficollu z 0.24 M mannitolu, 0.06 M sacharozą i 0.05 mM EDTA i nanoszono na warstwę 6% Ficollu w mannitolu, sacharozie i EDTA. Wirowano przy 11.500 x g w ciągu 30 min. Osad płukano w roztworze izolacyjnym i w nim zawieszano uzyskaną frakcję.

## 2.4. Otrzymywanie frakcji synaptosomalnej

Stosowano zmodyfikowaną flotacyjną metodę Bootha i Clarka /20/ /Modyfikacja polegała na intensywniejszej homogenizacji, na zmianie objętości końcowej do 5 ml przy zawieszaniu synaptosomów przed nałożeniem na gradient oraz zwiększeniu przyspieszenia przy wirowaniu osadu synaptosomów w czasie płukania/, bądź sedymentacyjną metodę Lai i Clarka /100/. W przypadku obydwu tych metod tkankę homogenizowano w roztworze 0.32 M sacharozy z 1 mM EDTA i 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Osad  $P_2$  rozdzielano w gradientie stężeń Ficollu. Osad synaptosomów przemywano i zawieszano w buforze Krebsa-Henseleita o składzie: 144 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM Pi, 10 mM Hepas, pH 7.4.

### 2.5. Otrzymywanie frakcji mitochondriów synaptosomalnych

Mitochondria synaptosomalne były izolowane z synaptosomów zgodnie z metodą Lai i wsp. /101/.

Osad synaptosomów był poddawany szokowi hipoosmotycznemu w 6 mM Tris-HCl, pH 8.1 i wirowany przy 11.8 tys. x g 10 min, ponownie zawieszany w 6 mM Tris-HCl pH 8.1 i wirowany przy 8.3 tys. x g. Supernatant zawieszano w mieszaninie: 3% Ficoll, 0.12 M - mannitol, 30 mM sacharoza, 25  $\mu$ M - EDTA - K<sup>+</sup>, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 i nakładano w probówce na warstwę zawierającą 4.5% Ficoll, 0.24 M mannitol, 60 mM sacharozę, 50  $\mu$ M EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Na spodzie probówki znajdowała się mieszanina /6% Ficoll/, 0.24 M mannitol, 60 mM sacharoza, 50  $\mu$ M EDTA - K<sup>+</sup>, 10 mM Tris-HCl pH 7.4.

Probówki z opisaną wyżej zawartością wirowano przy 11.300 x g w ciągu 30 min.

Zbierano i łączono środkową warstwę odpowiadającą 4.5% Ficollu /frakcja SM wg Lai i wsp. /101/ i osad na dole probówki odpowiadający 6% ficollu /frakcja SM<sub>2</sub> wg Lai i wsp. 101/. Preparat zawieszano w mieszaninie izolacyjnej /0.32 sacharoza, 1 mM K<sup>+</sup> - EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4/ wirowano 17.000 x g 10 min. Osad przemywano roztworem mieszaniny izolacyjnej z dodatkiem albuminy i wirowano przy 9.800 x g 10 min. Osad zawieszano w mieszaninie izolacyjnej i taki używano do doświadczeń.

### 3. Otrzymywanie dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej z cytosolu mózgu.

Cytosol z którego oczyszczano IDH NADP był izolowany zmodyfikowaną metodą Illingwortha, Tiptona /86/. Półkule mózgu szczurów cięto na kawałki, zawieszano w 20% roztworze glicerolu

zawierającego 1 mM EDTA /pH 7.0/ i homogenizowano /20% homogenat/. Homogenat wirowano 30 min przy 25 tys. x g. Następnie supernatant wirowano 60 min przy 100 tys. x g uzyskując w ten sposób cytosol.

15 ml otrzymanego cytosolu nakładano na kolumnę z DE-32 celulozą o wymiarach 1 x 20 cm zrównoważoną 10 mM buforem sodowo-cytrynianowym o pH 6.2. Zbierano próby w 5 ml porcjach eluowanych z kolumny i w nich oznaczano zawartość białka i aktywność IDH NADP. Te próby w których znajdowano aktywność IDH NADP były łączone i nakładane na kolumnę z CM-celulozą o wymiarach /1 x 18 cm/ zrównoważone 10 mM buforem sodowo-cytrynianowym pH 6.2. Eluat był zbierany jak poprzednio, a frakcje zawierające aktywność IDH NADP były łączone i poddawane rozdzielowi na kolumnie wypełnionej DEAE Sephadeksem /1 x 16 cm/ zrównoważonej jak poprzednio.

Częściowo oczyszczony enzym po rozdziale na Sephadeksie oczyszczano dalej elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym w następujący sposób. Białko zawieszano w roztworze zawierającym: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5, 4 mM izocytrynian sodu, 10 mM  $MgCl_2$  i 0.01 M siarczan sodowy. Próby zawierające 100  $\mu$ g białka mieszano z glicerolem i błękitem bromofenolowym i наносzono na 7% żel. Przepuszczano prąd o natężeniu 4 mA przez żel o średnicy 5 mm. Białko wybarwiano w żelu 1% roztworem czerni amidowej w 7% kwasie octowym, a aktywność enzymatyczną wykazywano przy użyciu błękitu nitrotetrazolowego /NBT/ wg Hendersona /83/. Prążki odpowiadające IDH NADP wycinano z żelu i eluowano z nich enzym buforem Tris-HCl o pH 6.7. Eluaty łączono i zagęszczano w Ficollu. W celu sprawdzenia homogenności otrzymywanego białka zagęszczony roztwór powtórnie наносzono na żel poliakrylamidowy i wybarwiano czernią amidową i NBT.

#### 4. Elektroforeza frakcji subkomórkowych na żelu poliakrylamidowym.

Frakcje subkomórkowe były rozcieńczane w stosunku 1:1 z roztworem zawierającym: 0.02 M Tris HCl pH 7.75, 4 mM DL izocytrynian sodu, 10 mM  $MgCl_2$  i 0.01 M siarczan sodowy. Następnie tak przygotowane próby mieszano z glicerolem i błękitem bromofenolowym i наносono w ilości odpowiadającej 100  $\mu$ g białka na 7% żel poliakrylamidowy. Przepuszczano prąd = 4 mA na kolumnkę z żelem o średnicy 5 mm. Elektroforezę prowadzono 1.5 godziny. Aktywność IDH NADP ujawniano w reakcji z błękitem nitrotetrazolowym /NBT/ zgodnie z Hendersonem /83/.

#### 5. Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego IDH NADP

Oczyszczony enzym poddawany był elektroforezie z siarczanem dodecyłu zgodnie z metodą Webera i Osborna /231/.

Białko zawieszano w 10 mM buforze fosforanowym pH 7.0, 0.5 mM DTT, 1% SDS i pozostawiano w 37°C przez 2 godz., 5  $\mu$ l roztworu białka o stężeniu 1 mg/ml dodawano do 50  $\mu$ l 10 mM buforu fosforanowego pH 7.0, 5  $\mu$ l 0.05% błękitu bromofenolowego w wodzie, 5  $\mu$ l 10 mM DTT i kropli glicerolu. 100  $\mu$ g białka mieszaniny nakładano na żel. Przepuszczano prąd 8 mA/żel o średnicy 5 mm. Żele wybarwiano błękitem Coomassiego.

#### 6. Warunki enzymatycznej reakcji zużycia cytrynianu w cytosolu

Enzymatyczna reakcja była prowadzona w 37°C natychmiast po uzyskaniu cytosolu. Mieszanina inkubacyjna zawierała:

64  $\mu$ mol Tris-HCl, pH 7.3, 22.5  $\mu$ mol  $MnSO_4$  oraz cytrynian, NADP,  $\alpha$ -ketoglutaran i cytosol w ilościach różnych w zależności od doświadczenia, co zaznaczono pod tabelami i rysunkami.

Całkowita objętość wynosiła 1.3 ml. Reakcja była zatrzymywana przez dodanie TCA do końcowego stężenia 5%. W odbiałczonym ekstrakcie oznaczano cytrynian,  $\alpha$ -ketoglutaran i glutaminian. Uwalnianie  $\text{CO}_2$  w wyżej podanych warunkach było mierzone manometrycznie w aparacie Warburga zgodnie z metodą Umbreita [227]. Zachodzącą jednocześnie redukcję NADP mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 340 nm.

#### 7. Warunki transportu cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów perikarionów.

Transport badano w temp.  $25^\circ\text{C}$ . Mieszanina inkubacyjna zawierała w końcowej objętości 1 ml: 0.25 M sacharozę, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 2.4  $\mu\text{g}$  rotenonu, 1.25  $\mu\text{g}$  antymycyny oraz Pi, jabłczan, cytrynian, butylomalonian i mitochondria w ilościach zaznaczonych w opisach poszczególnych rycin i tabel. Czas inkubacji wynosił 1-20 min, co zaznaczono w opisie wyników.

Reakcję zatrzymywano szybkim ochłodzeniem do temp.  $+2^\circ\text{C}$  i natychmiastowym wirowaniem /5 min przy 18.000 x g/. Osad przemycano dwukrotnie zimnym roztworem 0.25 M sacharozy, 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 i wirowano ponownie.

W kontrolnych doświadczeniach w supernatancie otrzymanym po trzecim przemyciu nie wykrywano już śladów jabłczanu i cytrynianu. W celu uniknięcia błędu spowodowanego absorpcją lub pochwyleniem /trapping/ radioaktywnego materiału równolegle robiono kontrolne doświadczenia w temp.  $0^\circ\text{C}$  i radioaktywność oznaczana w próbach kontrolnych była odejmowana od wartości badanej próby. Niewielka ilość  $^{14}\text{CO}_2$  powstająca w mitochondriach w obecności rotenonu i antymycyny również była brana pod uwagę przy wyliczaniu wyników.

#### 8. Warunki inkubacji synaptosomów

Synaptosomy /około 5 mg białka/ml/ były inkubowane w buforze Krebs-Henseleit-Hepes, pH 7.4 zawierającym 10 mM glukozę i 2 mM  $\text{CaCl}_2$  w ciągu 10 min w temp.  $22^\circ\text{C}$ . W przypadku pomiaru metabolitów synaptosomy po inkubacji były odbiałczone przez dodanie kwasu nadchlorowego do końcowego stężenia 3%. Następnie kwas usuwano z ekstraktu neutralizując go z 3 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  w 0.5 M trójetanoloaminie.

#### 9. Warunki transportu cytrynianu do synaptosomów

Synaptosomy inkubowano w roztworze Krebs-Tris /124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 26 mM Tris-HCl, pH 7.4/ zawierającym 1 mM 1,5  $^{14}\text{C}$  cytrynian i w części doświadczeń 1 mM jabłczan. Inkubację prowadzono od 0-30 min w  $37^\circ\text{C}$ . Równolegle prowadzono inkubację w temp.  $0^\circ\text{C}$ . Synaptosomy wydzielano przez wirowanie /1200 x g, 5 min  $0^\circ\text{C}$ / i przemywano dwukrotnie roztworem Krebs-Tris. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym analogicznie jak w przypadku pomiaru radioaktywności nagromadzonej w mitochondriach /Metody 16/.

#### 10. Warunki transportu cytrynianu do mitochondriów synaptosomalnych

Mitochondria synaptosomalne inkubowano w roztworze: 250 mM sacharozy, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM fosforan sodu, 0.5 mM EDTA, zawierającym 2.4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu i 1.25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny i 1 mM 1,5  $^{14}\text{C}$  cytrynian. Inkubację prowadzono od 0.25-5 min w temp.  $25^\circ\text{C}$  i dalej postępowano tak jak w przypadku synaptosomów.

## 11. Pomiary dekarboksylacji $^{14}\text{C}$ cytrynianu

Dekarboksylację  $^{14}\text{C}$  cytrynianu mierzono ilością  $^{14}\text{CO}_2$  produkowanego w czasie 10-30 min inkubacji w warunkach transportu cytrynianu. Inkubację prowadzono w naczynkach Warburga.  $^{14}\text{CO}_2$  absorbowano na bibule nasyczonej hiaminą, umieszczonej w studzienkach naczynek. Zawartość studzienek przenoszono do probówek ze scyntylatorem i liczono radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym.

## 12. Oznaczanie aktywności enzymów

### 12.1. Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna

Aktywność enzymu oznaczano metodą spektrofotometryczną wg Ochoa /140/ mierząc redukcję NADP przy  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Mieszanina inkubacyjna zawierała w 3 ml końcowej objętości 40  $\mu\text{moli}$  Tris-HCl, pH 6.7, 18  $\mu\text{moli}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.6  $\mu\text{moli}$  izocytrynianu sodu, 0.5  $\mu\text{mola}$  NADP, białko od 0.8 do 1.5 mg. Czas pomiaru 5 min.

### 12.2. Syntaza cytrynianowa

Aktywność enzymu oznaczano spektrofotometrycznie oznaczając redukcję NAD /  $\lambda = 340 \text{ nm}$  / związaną z wytwarzaniem szczawiooctanu w reakcji sprzężonej z dehydrogenazą jabłczanową /187/. Mieszanina reakcyjna zawierała: Tris-HCl bufor, 100 mM, pH 8.0; 7 mM jabłczan; 3 mM NAD, 0.25  $\mu\text{M}$  rotenon, 0.2 mM Acetylo-CoA, dehydrogenaza jabłczanowa /4 i.u. /ml/ i 50  $\mu\text{g}$  białka w objętości końcowej 0.4 ml. Aktywność oznaczono po uprzednim rozbiciu frakcji ultradźwiękami i dwukrotnym szybkim zamrożeniu i rozmrożeniu.

### 12.3. Liaza ATP cytrynianowa

Aktywność enzymu oznaczano spektrofotometrycznie w oparciu o metodę Szutowicza i wsp. /217/. Oznaczano utlenianie NADH /przy 340 nm/ związane ze zużyciem szczawiooctanu w reakcji sprzężonej z dehydrogenazą jabłczanową.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM ATP, 20 mM cytrynian potasu, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 2-merkaptoetanol, 100 mM KCl, 0.2 mM CoA, 0.15 mM NADH, 2 i.u./ml jabłczanowej dehydrogenazy oraz 0,2-0,4 mg białka badanej frakcji. Równolegle wykonywano próby kontrolne bez ATP lub CoA. Szybkość reakcji mierzono w ciągu 5 min w temp. 22°C.

### 12.4. Akonitaza

Aktywność mierzono w mieszaninie inkubacyjnej podanej przy opisie pomiarów aktywności IDH NADP z zastosowaniem izocytrynianu jako substratu poprzez pomiar wzrostu zawartości cytrynianu.

### 12.5. Aminotransferaza asparaginianowa

Aktywność enzymu oznaczano wg metody Bergmeyera i Bernta /13/. Mieszanina inkubacyjna zawierała w 3 ml końcowej objętości: 2.3 ml 0.1 M buforu fosforanowego, pH 7.6, zawierającego  $2.5 \times 10^{-1}$  M asparaginianu, 0.1 ml 0.2 M  $\alpha$ -ketoglutaranu, 0.05 ml  $1,2 \times 10^{-2}$  M NADH i 0.25 mg/ml mleczanowej dehydrogenazy. Czas inkubacji 5 min.

### 12.6. Fumaraza

Aktywność enzymu oznaczano spektrofotometrycznie wg meto-

dy Rackera /153/. Mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 3.0 ml zawierała: 50 mM bufor Na- fosforanowy / $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ / pH 7.4, 33 mM L jabłczan sodu oraz próbę rozcieńczoną w 0.32 M sacharozie z dodatkiem lub bez 0.2% Tritonu X-100. Wzrost ekstynkcji śledzono przy długości fali 250 nm przez 5 min.

#### 12.7. Dehydrogenaza mleczanowa

Aktywność enzymu oznaczano spektrofotometrycznie wg metody Johnsona /89/ mierząc utlenianie NADH. Mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 3 ml zawierała: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1 mM NADH, 0.4 pirogronian sodu oraz badaną próbę rozcieńczoną w 0.32 sacharozie z dodatkiem lub bez 0.2% Tritonu X-100. Spadek ekstynkcji śledzono przy długości fali 340 nm przez 5 min.

#### 13. Oznaczanie zawartości białka

Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. /112/ stosując jako standard albuminę surowiczą krwi bydlęcej /V frakcja/.

#### 14. Spektrofotometryczne i kolorymetryczne oznaczenia stężeń substratów i metabolitów

14.1. Cytrynian oznaczano metodą chemiczną zgodnie z Natelsonem i wsp. /133/ polegającą na wytworzeniu w odbiałczonym ekstrakcie pentabromoacetonu, który ekstrahowany jest heptanem i moczynikiem, i oznaczany kolorymetrycznie lub metodą Sieberta /189/ gdzie wykorzystano przejście cytrynianu w obecności NADP i akonitazy w  $\alpha$ -ketoglutaran,  $\text{CO}_2$  i NADPH. Wzrost ekstynkcji mierzono przy 340 nm.

14.2. L-ketoglutaran oznaczano metodą Bontinga /19/ polegającą na wytworzeniu dwunitrofenylohydrazyny otrzymanej w wyniku ekstrakcji octanem etylu lub metodą Bergmeyera i Bernta /12/ w której L-ketoglutaran w obecności NADH i glutaminianowej dehydrogenazy przechodzi w glutaminian i NAD. Spadek ekstynkcji mierzono przy 340 nm.

14.3. Glutaminian mierzono w odbiałczonej próbie zgodnie z metodą Bernta i Bergmeyer /14/.

14.4. Asparaginian oznaczano w odbiałczonej próbie metodą Pfleiderera /150/. W obecności glutaminianowo szczawiooctanowej transaminazy i mleczanowej dehydrogenazy otrzymano szczawiooctan, który z NADH dawał jabłczan i NAD. Spadek ekstynkcji mierzono przy 340 nm.

14.5. Mocznik - oznaczano metodą Fawcetta i Scotta /62/, w odbiałczonym supernatancie używając ureazy i odczynnika Nesslera. Oznaczano ekstynkcję przy  $\lambda = 436$  nm.

14.6. Karbamylasparaginian - metodą kolorymetryczną Gerharta i Pardeea /66/ z użyciem sulfonianu dwufenyloaminy. Optyczną gęstość oznaczano przy 560 nm po 20 min od wywołania barwy.

14.7. Hydroksymaślan - oznaczano metodą Williamsona i wsp. /236/. Mierzono ilość powstającego NADH przy  $\lambda = 340$  nm w obecności NAD i dehydrogenazy hydroksymaślanu.

14.8. Acetylooctan oznaczano wg Williamsona i wsp. /236/. Mierzono ilość powstającego NAD przy  $\lambda = 340$  nm w obecności

NADH i dehydrogenazy hydroksymaślanu.

14. 9. Mleczan oznaczano wg Gutmana i Wahlefelda /76/. Mierzono redukcję NAD przy  $\lambda = 340$  nm w obecności mleczanowej dehydrogenazy /LDH/.

14. 10. Pirogronian oznaczano zgodnie z metodą Czoka i Lamprechta /44/. Utlenianie NADH mierzono w obecności mleczanowej dehydrogenazy przy  $\lambda = 340$  nm.

14. 11. ATP oznaczano spektrofotometryczną metodą wg Lamprechta i Trautscholda używając heksokinazy i glukozy-6-fosforanu i mierząc wzrost ekstynkcji NADPH przy  $\lambda = 340$  nm /102/.

14. 12. Fosfokreatyna była oznaczona w tej samej mieszaninie inkubacyjnej co ATP po dodaniu 1 mM ADP zgodnie z metodą Lamprechta i wsp. /103/.

14. 13. ADP i AMP były mierzone spadkiem ekstynkcji przy 340 nm metodą Jaworka i wsp. /88/. W metodzie tej używano miokinazy, kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej.

14. 14. Kreatyna - oznaczano w tej samej mieszaninie inkubacyjnej co ADP wg metody Bernta i wsp. /15/.

14. 15. Nieorganiczny fosforan był oznaczony metodą Hessa i Derra /84/. Synaptosomy szybko były wydzielane z zawiesiny przez wirowanie jej przez warstwę oleju silikonowego. W warunkach oznaczeń Pi następowała hydroliza fosfokreatyny. Dlatego wartości Pi były korygowane z zawartością fosfokreatyny,

którą oznaczano enzymatycznie w tej samej co Pi mieszaninie inkubacyjnej.

14. 16. Wewnątrzmitochondrialny stosunek  $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$  w zawieszynie synaptosomów był wyliczony z pomiarów stężeń hydroksymaślanu i acetylooctanu zgodnie z Williamsonem i wsp. /237/.

#### 15. Oznaczanie asparaginianu we krwi

Do żyły szyjnej wprowadzano szczurom w narkozie nembutalowej kaniulę z heparyną. Po 2 godzinach od momentu obudzenia się zwierząt pobierano krew przez kaniulę dla oznaczania wartości kontrolnych asparaginianu. Następnie zwierzęta poddawano 30 min. hipoksji przetrzymując je w pomieszczeniu z ciągłym przepływem mieszanki 7% tlenu i 93% azotu i krew pobierano jak wyżej. Po 24 godz. przebywania zwierząt w warunkach prawidłowych wstrzykiwano im dootrzewnowo nembutal 40 mg/kg wagi ciała i po 30 min od zaśnięcia pobierano krew.

Surowicę krwi otrzymywano w wyniku wirowania 15.000 g, x15 min, odbiałczenia kwasem nadchlorowym /końcowe stężenie 2%/ i neutralizacji z  $\text{K}_3\text{PO}_4$ .

#### 16. Izotopowe metody pomiaru stężenia cytrynianu i jabłczanu

Do mieszaniny inkubacyjnej dodawano  $^{14}\text{C}$  cytrynian i  $^{14}\text{C}$  jabłczan /0.1  $\mu\text{Ci}$  w próbie/. Po inkubacji i dwukrotnym przemyciu mitochondriów dodawano do nich tkankowy rozpuszczalnik /NCS/. Próby do których dodawano NCS stały przez 12 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie w temp. 50-60°C przez 1 godz. Rozpuszczone próby przenoszono do naczynek zawierających scyntylator /spektrofluor + toluen/ z dodatkiem kwasu octowego i mierzono

radioaktywność licznikiem Nuclear Chicago Liquid Scintillation Counter.

#### 17. Spektrofluorymetryczne oznaczenia stężenia jabłczanu

Mitochondria odbiałczono za pomocą  $\text{HClO}_4$  do końcowego stężenia 6%. Następnie wirowano, supernatant neutralizowano  $3\text{N K}_2\text{CO}_3$  w 0.5 M trójetanoloaminie do pH 6.0, wirowano i oznaczano jabłczan w supernatacie.

Jabłczan oznaczano wg metody Williamsona i Corkeya /238/ w obecności dehydrogenazy jabłczanowej i NAD mierząc wzrost fluorescencji przy 340 nm używając standardu wewnętrznego. Taką samą procedurę stosowano dla prób zawierających standard.

#### 18. Pomiary stężenia i stanu redukcji cytochromu c

Poziom cytochromu c oraz stan jego redukcji mierzono w Johnson Foundation dual wavelength spectrophotometer przy 550 - 540 nm przy ciągłym mieszaniu. Po początkowym odczycie dodawano  $10\text{ }\mu\text{M}$  antymycynę A, co powodowało całkowite utlenienie cytochromu c. Pełny stan jego redukcji uzyskiwano po dodaniu 1 mM KCN. Stan redox dla cytochromu c był wyliczony zgodnie z Wilsonem i wsp. /239, 140/ używając jako  $\text{Em}_{7.2}$  wartość = 0.230 mV /Dutton and Wilson 57/.

#### 19. Pomiary oddychania synaptosomów

"Pobieranie" tlenu przez synaptosomy /nmole  $\text{O}_2$ / mg białka/min/ mierzono w buforze Krebs-Henseleita pH 7.4 zawierającym 10 mM glukozę i 2 mM  $\text{CaCl}_2$  po 10 min inkubacji w temp.  $22^\circ\text{C}$  za pomocą elektrody tlenowej Clarka. Oddychanie wyrażano jako

liczbę obrotów /TN/ dla cytochromu c/elektrony/sek/ wyliczając go ze wzoru:

$$TN = \frac{\text{ilość pobranego } O_2 \times 4}{60 \times \text{ilość cytochromu c}}$$

## 20. Oznaczenia przestrzeni wewnątrzsynaptosomalnej

Do zawiesiny synaptosomów dodawano trytowaną wodę i  $^{14}C$  glikol polyetylenowy /4000 daltonów/, a następnie wirowano przez warstwę oleju silikonowego. Całkowitą objętość wody w osadzie oznaczano z zawartości  $^3H$ , podczas gdy wewnątrzsynaptosomalną wodę oznaczano z ilości  $^{14}C$  zgodnie z Deutsch i Rafałowska /48/.

## 21. Oznaczanie potencjału błonowego synaptosomów

Synaptosomy /około 4 mg białka/ml/ zawieszano w roztworze Krebs-Henseleita /144 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $NaHCO_3$ , 1 mM Pi/ zawierającym 10 mM Tris-Hepes, pH 7.4, 10 mM glukozę i 2.5 mM  $CaCl_2$ . Inkubacja trwała 10 min. w temp. pokojowej.

Do mieszaniny dodawano tetrafenyloboran sodu /TPB/ i trytowany trójfenyłometylofosfonian /TPMP/. Próby /110  $\mu$ l/ były wirowane przez 10  $\mu$ l oleju silikonowego o gęstości 1.03 w ciągu 2 min przy 12.000 x g.

Jednakowe ilości supernatantu przenoszono do naczynek scyntylacyjnych, pozostałość usuwano pod próżnią i osuszano. Osad zawieszano w tej samej probówce w 0.1 ml 50% nasyconego chlorku amonu i probówkę wkładano do naczynka scyntylacyjnego. Naczynka scyntylacyjne zawierające supernatant i osad napełniano roztworem scyntylacyjnym /Searle Aqueous Counting Solution/ i liczone radioaktywność na Delta 300 Searle Two Channel Scintillation Counter.

Potencjał wyliczano z równania Nernsta

$$E = \frac{-RT}{nF} \ln \frac{C \text{ wewnętrzny}}{C \text{ zewnętrzny}}$$

C jest aktywnością jonu TPMP wewnątrz i na zewnątrz synaptosomów.

## 22. Analiza statystyczna wyników

W niektórych przypadkach przedstawiano przykładowo jedno typowe doświadczenie. W tych przypadkach ilość wszystkich eksperymentów podawano w opisie tabel i rycin. Większość wyników wyrażano jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SD lub  $\pm$  SEM. Ilość doświadczeń /n/ podano w nawiasach lub w legendach do tabel i rycin.

Znamienność statystyczną poszczególnych różnic obliczano na podstawie testu t Studenta /204/. Jako znamienne statystycznie przyjęto wartości  $p < 0.05$ .

## WYNIKI

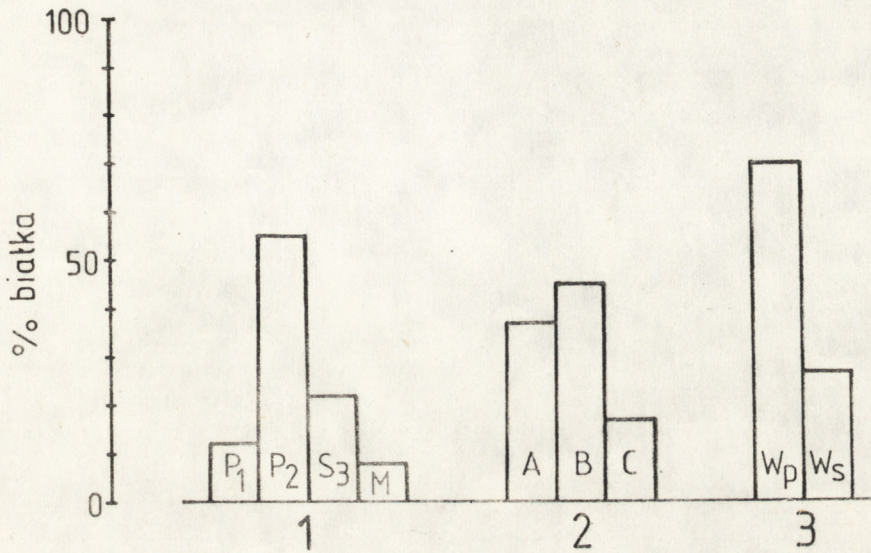
### 1. Metabolizm cytrynianu w mózgu w warunkach prawidłowych

#### 1.1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymów metabolizujących cytrynian

Ocena aktywności i rozmieszczenia w komórce dotyczyła trzech enzymów: dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej /IDH NADP/, liazy cytrynianowej ATP-zależnej i syntazy cytrynianowej.

Fracje subkomórkowe mózgu, izolowane równocześnie /wg metody 2.1/, w których oznaczano wyżej wymienione enzymy, posiadały zawartość białka równą około 100% początkowej wartości białka homogenatu. Rozkład białka w poszczególnych frakcjach obrazuje ryc. 1.

Uzyskane frakcje charakteryzowały się znaczną czystością na co wskazują wyniki przedstawione na ryc. 2A i B obrazujące rozkład aktywności w tych frakcjach markerów subkomórkowych: fumarazy charakterystycznej dla mitochondriów i LDH dla frakcji rozpuszczalnej. Na ryc. 2C, D, E, F przedstawiono aktywności całkowite i specyficzne IDH NADP oraz liazy cytrynianowej ATP-zależnej w poszczególnych frakcjach.



Ryc. 1. Rozkład białka we frakcjach subkomórkowych mózgu szczura.

Zawartość białka odnoszono do całkowitej ilości białka / $\approx 100\%$ / 1 - wyjściowego homogenatu, 2 - frakcji P<sub>2</sub>, 3 - frakcji B.

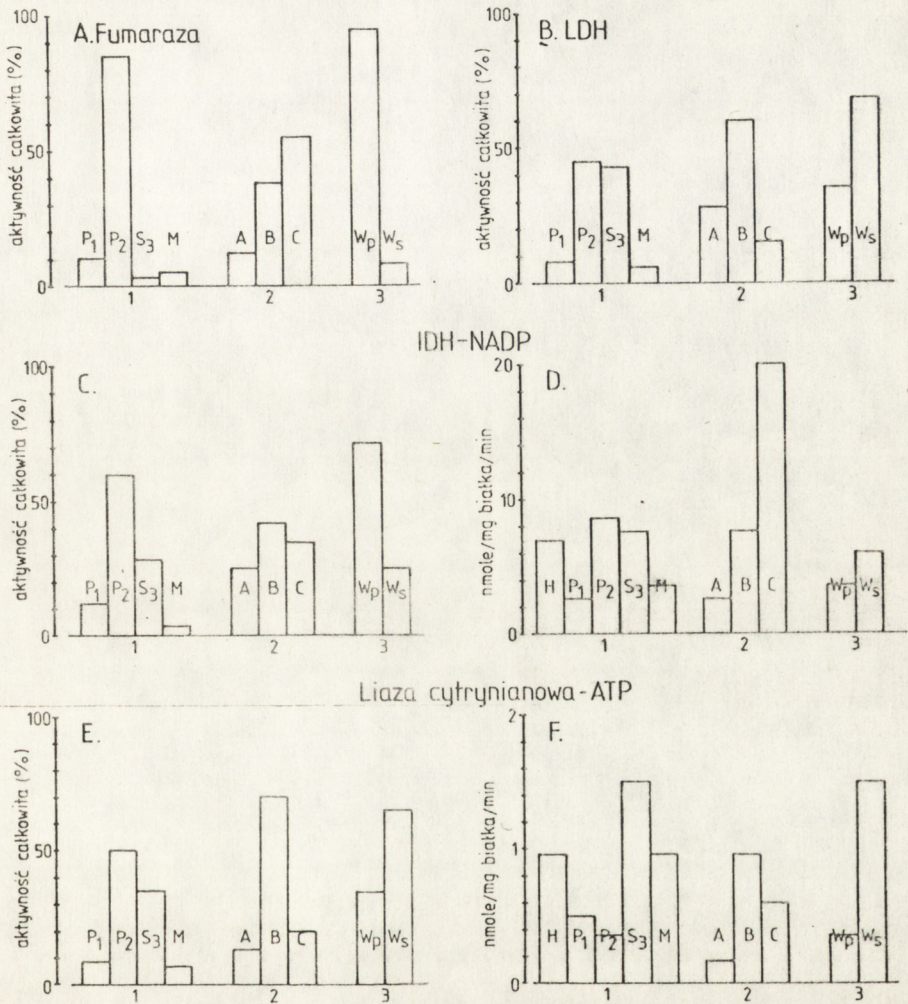
P<sub>1</sub> - jądra, resztki tkanki, P<sub>2</sub> - nieoczyszczona frakcja mitochondriów zawierająca ponadto mielinę i synaptosomy, S<sub>3</sub> - cytosol, M - mikrosomy, A - mielina, B - synaptosomy, C - mitochondria, W<sub>p</sub> - synaptosomalna frakcja osadu, W<sub>s</sub> - rozpuszczalna frakcja synaptosomów.

Przedstawione dane prezentują wyniki jednego z czterech doświadczeń.

Wg. Rafałowska, Księżak, wyniki niepublikowane.

Liaza cytrynianowa ATP - zależna występuje w rozpuszczalnych frakcjach tkanki mózgowej: S<sub>2</sub> i W<sub>s</sub>. Obecność małych ilości tego enzymu we frakcjach C, M i W<sub>p</sub> pochodzi z zanieczyszczeń frakcją rozpuszczalną. Rozkład aktywności w poszczególnych frakcjach liazy cytrynianowej jest zgodny z rozkładem LDH /ryc.2B/.

Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP - zależna jest obecna w obydwu rozpuszczalnych frakcjach S<sub>3</sub> i W<sub>s</sub>, jak również we



Ryc. 2. Rozkład całkowitej i specyficznej aktywności enzymów utleniających cytryniany w subkomórkowych frakcjach mózgu i całkowita aktywność markerów subkomórkowych.

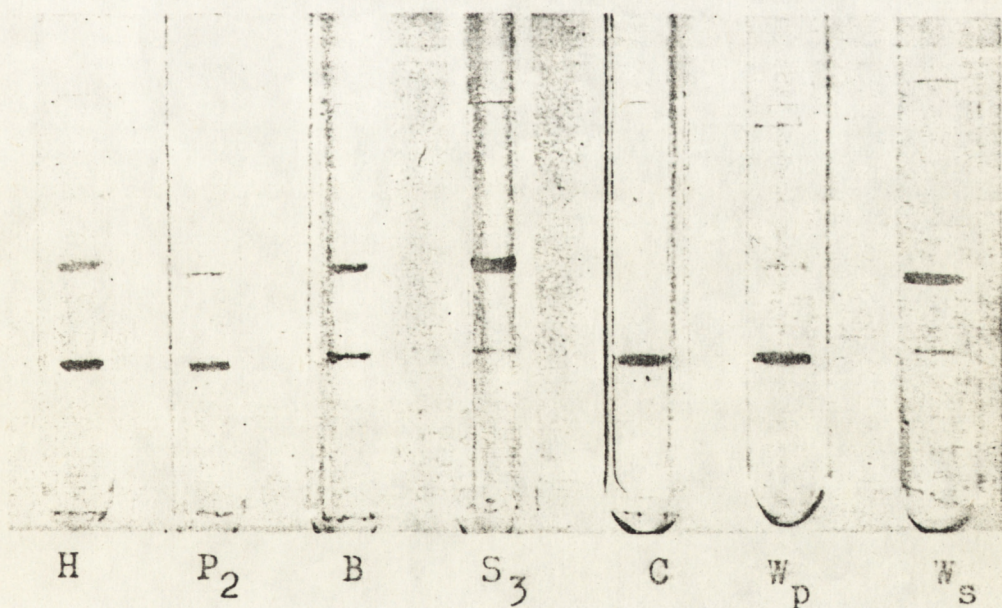
We frakcjach nierozpuszczalnych oznaczenia prowadzono po zadziałaniu 0.2% Tritonem X-100 w obecności 0.5  $\mu$ M rotenonu. Wartości przedstawione na ryc. 2 A, B, C, E odnoszono do całkowitej aktywności [=100%] 1 - homogenatu H, 2 - frakcji P<sub>2</sub>, 3 - frakcji B. Nazwy frakcji jak na ryc. 1. Przedstawione dane prezentują wyniki jednego z 4 doświadczeń.

Wg Rafałowska, Książak /160/.

frakcjach nierozpuszczalnych C i Wp. Jej aktywność specyficzna w mitochondriach /C/ jest około 3-krotnie wyższa od aktywności w cytosolu /S<sub>3</sub>/.

Aktywność enzymu syntetyzującego cytrynian - syntazy cytrynianowej jest wysoka i związana jedynie z frakcją mitochondrialną. Stwierdzono, że aktywność specyficzna tego enzymu we frakcji C mózgu wynosi  $220.0 \pm 20$  /5/ nmoli/mg b/min, a we frakcji Wp  $180.0 \pm 11$  /5/ nmoli/mg b/min.

Stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym omawianych frakcji subkomórkowych wykazano, że dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna występuje w dwu formach molekularnych: mitochondrialnej i cytoplazmatycznej, różniących się ruchliwością elektroforetyczną /ryc. 3/.



Ryc. 3. Elektroforeza IDH NADP w subkomórkowych frakcjach mózgu.

H-homogenat. Pozostałe oznaczenia jak pod ryc. 1.  
Przedstawione dane prezentują wyniki jednego z 4 dośw.  
Wg. Rafałowska, Księżak /160/.

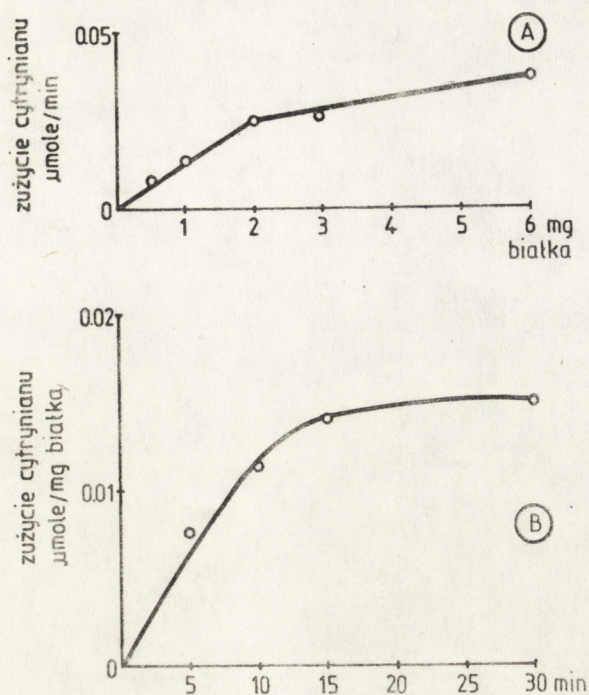
## 1.2. Utlenianie cytrynianu w cytosolu mózgu przy udziale dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej /IDH NADP/

Cytrynian syntetyzowany w mitochondriach mózgu w dużym stopniu utleniany jest w cytosolu, do którego przedostaje się w wyniku transportu przez błonę mitochondrialną przy udziale specjalnych układów przenoszących. Proces transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów mózgu został określony w tej pracy a wyniki przedstawiono w rozdziale 1.4.

Stwierdzona powyżej obecność w cytosolu  $/S_3/$  zarówno liazy cytrynianowej jak i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej wskazywała na możliwość utleniania cytrynianu w tej frakcji dwoma niezależnymi drogami przy udziale dwu różnych enzymów. Udział liazy cytrynianowej w utlenianiu cytrynianu w cytosolu mózgu był znany. W niniejszej pracy postanowiono zbadać jaką rolę w utlenianiu tego związku odgrywa cytoplazmatyczna IDH NADP.

Wykryto, że cytosol posiada zdolność utleniania cytrynianu w obecności NADP czego nie stwierdzono w obecności NAD.

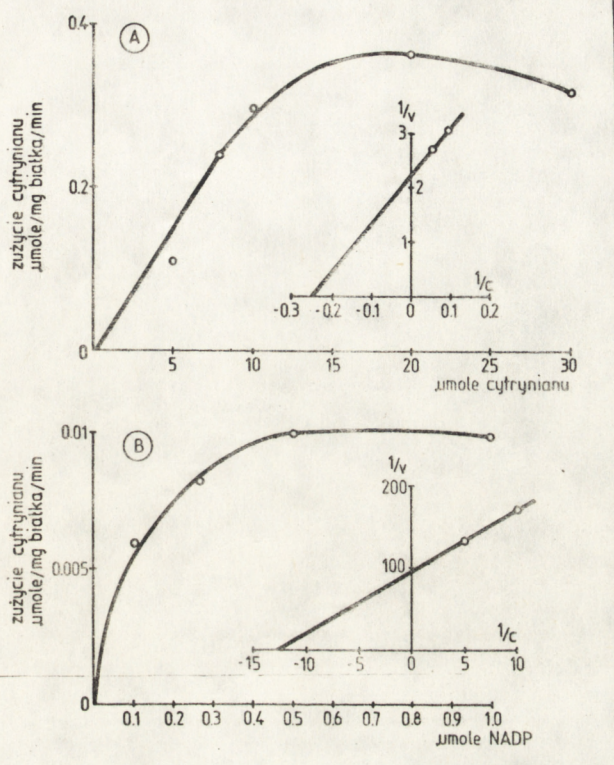
Zbadano zależności utleniania cytrynianu w obecności NADP od stężenia białka cytoplazmatycznego i czasu reakcji /ryc. 4 A, B/ oraz od stężeń cytrynianu i NADP /ryc. 5 A, B/.



Ryc. 4. Zależność zużycia cytrynianu od stężenia białka /A/ i czasu inkubacji /B/.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 64.0 μmoli;  $\text{MnSO}_4$ , 22.5 μmoli; cytrynian 1.0 μmol; NADP 0.5 μmol. W /A/ czas inkubacji 10 min. W /B/ 2 mg białka.

Dane prezentują wyniki jednego z 6-ciu doświadczeń. Wg Gromek, Rafałowska /73/.



Ryc. 5. Zależność zużycia cytrynianu od jego stężenia /A/ i od stężenia NADP /B/.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3; 64.0  $\mu\text{mole}$ ;  $\text{MnSO}_4$ , 22.5  $\mu\text{mole}$ ; białko 2 mg; czas inkubacji 10 min.

Dane prezentują wyniki jednego z 4-ech doświadczeń. Wg. Gromek, Rafałowska /73/.

Wartość  $K_m$  wyliczona metodą Lineweavera-Burka /49/ dla cytrynianu wynosiła:  $2.9 \times 10^{-3}$  mola/l dla NADP  $5.8 \times 10^{-5}$  mola/l.  $V_{\max}$  natomiast posiadała odpowiednie wartości równe 0.430  $\mu\text{mole/mg białka/min}$  i 0.0105  $\mu\text{mole/mg białka/min}$ .

Następne obserwacje wykazały, że zużycie cytrynianu przez frakcję cytoplazmatyczną mózgu w obecności NADP zależy od dwu enzymów: akonitazy, przekształcającej cytrynian do izocytrynianu i IDH NADP, katalizującej przejście izocytrynianu w  $\alpha$ -ketoglutaran i  $\text{CO}_2$ .

Dane doświadczalne charakteryzujące te dwie reakcje podano w Tabeli 1. Reakcja katalizowana przez akonitazę jest wolniejsza w związku z czym limituje szybkość procesu utleniania cytrynianu do  $\alpha$ -ketoglutaranu.

Tabela 1. Szybkość zużycia cytrynianu i szybkość powstawania cytrynianu w cytosolu mózgu.

Nr reakcji	Enzym katalizujący	Substraty	Cytrynian nmole/mg białka/min
1	IDH NADP	Cytrynian + NADP	13.5
2	Akonitaza	Izocytrynian	7.0

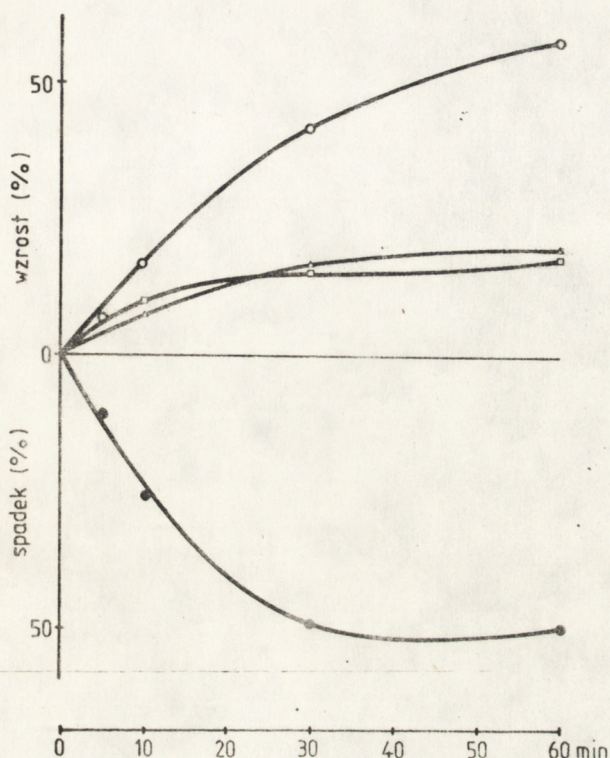
Szybkość reakcji 1 była oznaczana przez pomiar zużycia cytrynianu, reakcji 2 była oznaczana przez wzrost zawartości cytrynianu.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 64.0  $\mu$ mole; MnSO<sub>4</sub>, 22.5  $\mu$ moles, 2 mg białka. Czas inkubacji 10 min. Dane prezentują wyniki jednego z 3 doświadczeń.

Wg. Gromek, Rafałowska /73/.

Analiza zmian stężeń produktów utleniania cytrynianu oparta ma pomiarach stężeń NADPH,  $\alpha$ -ketoglutaranu i CO<sub>2</sub> wskazuje na brak stechiometrii między stężeniami tych produktów a ilością utlenionego cytrynianu /ryc. 6/.

Po 30 min inkubacji ilość NADPH i wytworzonego  $\alpha$ -ketoglutaranu wynosiła tylko 35% zużytego cytrynianu. Ilość CO<sub>2</sub> wytworzonego w czasie reakcji utleniania cytrynianu wynosiła 50%.



Ryc. 6. Porównanie stężeń produktów utleniania cytrynianu z ilością zużytego cytrynianu.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl pH 7.3, 64.0  $\mu$ mole,  $MnSO_4$  22.5  $\mu$ moli; NADP 0.5  $\mu$ mola, cytrynian 1.0  $\mu$ mol, 2 mg białka.

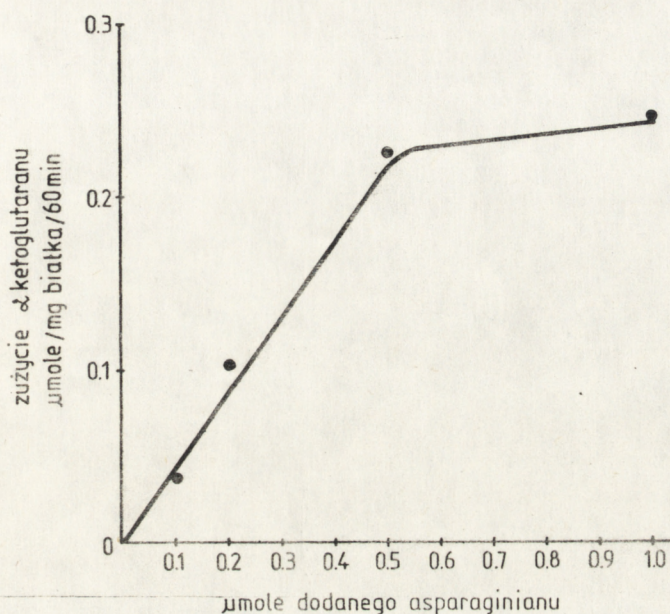
Wartości wyrażone są w procentach początkowego stężenia cytrynianu.

● - cytrynian;  $\Delta$  L - ketoglutaran;  $\square$  - NADH;  $\circ$  -  $CO_2$ . Dane prezentują wyniki jednego z 4 doświadczeń.

Wg. Gromek, Rafałowska /73/.

Mniejsza niż wynika ze stechiometrii reakcji utleniania cytrynianu, ilość oznaczonego L -ketoglutaranu jest wynikiem natychmiastowego zużywania tego związku w reakcji transaminacji z asparaginianem w obecności transaminazy asparaginianowej.

Wskazują na to wyniki zamieszczone na ryc.7.



Ryc.7. Zużycie L-ketoglutaranu w zależności od stężenia asparaginanu.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7,3 64.0 μmole; MnSO<sub>4</sub> 22.5 μmoli; NADP, 0.5 μmola; L-ketoglutaran 1.0 μmol; białko 2 mg, asparaginan 0.1 - 1.0 μmola.

Zużycie L-ketoglutaranu wyrażono jak różnicę między całkowitym zużyciem w obecności dodanego asparaginanu i zużyciem w jego nieobecności.

Wyniki jednego z 3 doświadczeń.

Wg. Gromek, Rafałowska /73/.

Z pomiarów ilości cytrynianu, L-ketoglutaranu i glutaminianu wytworzonych z izocytrynianu w obecności cytosolu wynika, że suma L-ketoglutaranu i glutaminianu jest równą ilości izocytrynianu, ulegającego dehydratacji w reakcji z udziałem akonitazy. Wyniki doświadczeń są przedstawione w tabeli 2.



1. 3. Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna w cytosolu mózgu.

Oczyszczanie enzymu, ciężar cząsteczkowy, charakterystyka.

Jak wykazano w poprzednim rozdziale dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna /IDH NADP/ odgrywa podstawową rolę w utlenianiu cytrynianu w cytosolu mózgu. W piśmiennictwie brak było dotychczas danych dotyczących charakterystyki mózgowej IDH NADP. Podjęto zatem szczegółowe badania własności tego enzymu.

W wyniku oczyszczania białka cytosolu na DE<sub>32</sub> celulozie, CM celulozie i DEAE Sephadexie uzyskano preparat IDH NADP oczyszczony 15 krotnie.

Tabela 3. Oczyszczanie cytoplazmatycznej IDH NADP.

Etapy oczyszczania	Całkowite białko mg	Całkowita aktywność μmole NADPH/min	Specyficzna aktywność μmole NADPH/ mg białka/min	Stopień oczyszcze- nia
Cytosol	75.85	0.54	0.0072	1
DE <sub>32</sub> -celuloza	14.40	0.52	0.0360	2
CM-celuloza	7.35	0.52	0.0710	10
DEAE Sephadex	3.34	0.36	0.1080	15

Dane są wartościami jednego z 5-ciu doświadczeń.

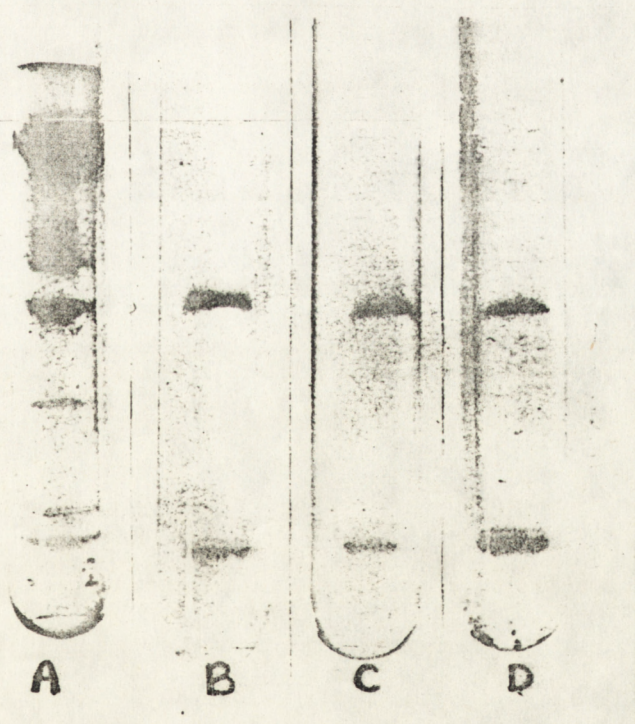
Wg Rafałowska i wsp. /156/.

15-krotnie oczyszczony preparat nie zmieniał aktywności w ciągu 1 miesiąca w temp. 0°C. Jednakże szybko tracił aktywność /o około 50%/ podczas 24 godzinnej dializy w 10 mM buforze sodowo-cytrynianowym, pH 6.2 z 1 mM EDTA i ulegał całkowitej inhibicji podczas 2 min. inkubacji w 50°C.

Dalsze oczyszczanie preparatu przy użyciu często stosowanej metody

wytrącania białka siarczanem amonu nie dało pozytywnych wyników, ponieważ usuwanie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  przez dializę lub Sephadexs G 10, G 25, G 50 prowadziło do zmniejszenia aktywności enzymu o około 50%.

Efektywną metodą w dalszym oczyszczaniu IDH NADP okazała się elektroforeza uzyskanego preparatu na żelu poliakrylamidowym. W wyniku tego rozdziłu otrzymywano 5 prążków białkowych z których tylko jeden posiadał aktywność IDH NADP. Podczas reelektroforezy białka eluowanego z tego prążka uzyskiwano tylko jedno pasmo zarówno w barwieniu na białko jak i w reakcji barwnej oznaczania aktywności IDH NADP /ryc. 8/.



Ryc. 8. Elektroforeza dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej na żelu polyakrylamidowym.

- A - 15-krotnie oczyszczony preparat barwiony na białko
- B - 15-krotnie oczyszczony preparat w reakcji barwnej oznaczania aktywności IDH NADP
- C - Reeлектроforeza enzymu eluowanego z prążka w B barwiona na białko
- D - Reeлектроforeza enzymu eluowanego z prążka w B w reakcji barwnej na aktywność IDH NADP.

Dane są wartościami jednego z 5-ciu doświadczeń.  
Wg Rafałowska, Pastuszko /167/.

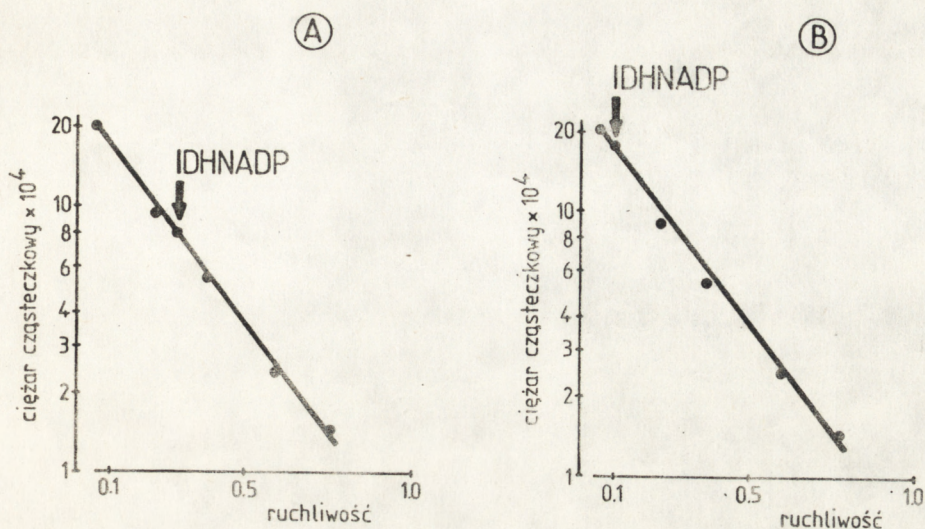
Czysty eluowany z poliakrylamidu enzym charakteryzował się aktywnością 36-krotnie wyższą w stosunku do aktywności w cytosolu. Ostateczny bilans białka i aktywności w czasie oczyszczania IDH NADP przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Bilans białka i aktywności IDH NADP.

Etapy oczyszczania	Całkowite białko /mg/	Całkowita aktywność /umole NADPH/min	Specyficzna aktywność /umole NADPH/ mg białka/min	Wydajność
Cytosol	76.20	0.57	0.0075	1
Po rozdziale na: DE32; CM celulo- zie, DEAE Sephadeksie	3.50	0.39	0.1100	15
Po elektrofo- rezie	0.88	0.24	0.2700	36

Dane są wartościami jednego z 5-ciu doświadczeń.  
Wg Rafałowska, Pastuszko /167/

Ciężar cząsteczkowy oczyszczonego preparatu enzymatycznego w warunkach niskiej siły jonowej wynosił 80.000 a w "fizjologicznych" stężeniach NaCl był równy  $165.000 \pm 2.000$  /n = 3/, /ryc. 9A, B/.



Ryc. 9. Ciężar cząsteczkowy dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej z cytosolu mózgu.

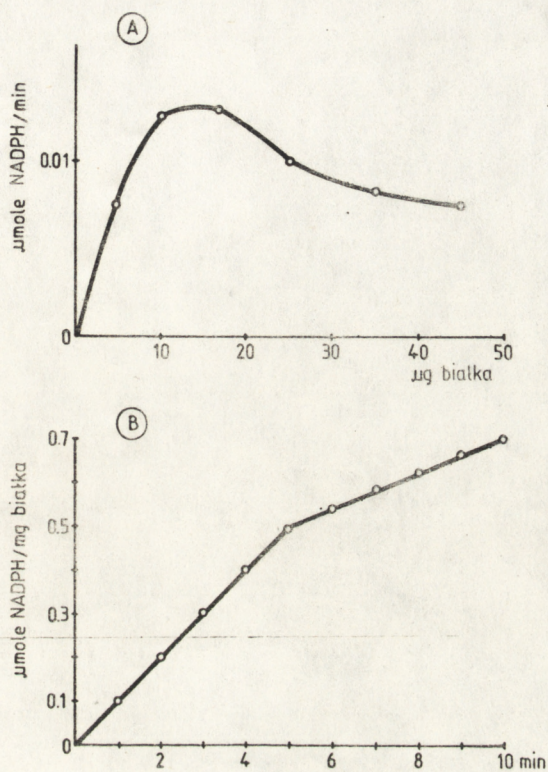
Warunki elektroforezy w metodach /4/ z wyjątkiem /B/, gdzie dodano 140 mM NaCl.

Jako standardy stosowano wg wzrastających ciężarów cząsteczkowych: cytochrom c, trypsynę, dehydrogenazę glutaminianową, fosforylazę i miozynę A.

Dane są wartościami jednego z 4 doświadczeń.

Wg Rafałowska, Pastuszko /167/.

Wykazano zależność aktywności IDH NADP od stężenia białka i czasu inkubacji /ryc. 10 A, B/. Jak widać optymalne warunki reakcji występują w obecności 9  $\mu$ g białka w próbce a reakcja zachodzi prostoliniowo do 5 min inkubacji.



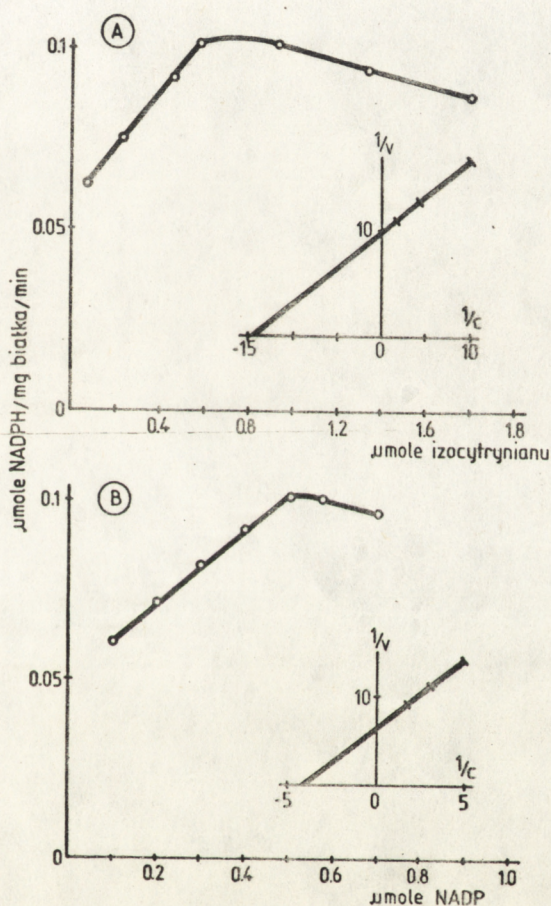
Ryc. 10. Zmiany aktywności IDH NADP zależne od stężenia białka /A/ i czasu inkubacji /B/.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl pH 7.6, 40 μmoli;  $MgCl_2$ , 18 μmoli, izocytrynian, 0.6 μmola; NADP, 0.5 μmola. /A/ czas inkubacji 5 min. /B/ 9 μg białka.

Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń.  
Wg Rafałowska i wsp. /156/.

Badania nad zależnością aktywności enzymu od stężenia substratu wykazały, że reakcja przebiega prostoliniowo od 0.1 do 0.6 μmola izocytrynianu a wyliczona metodą Lineweavera-Burka /49/ stała Michaelisa wynosi  $1.55 \times 10^{-6}$  M;  $V_{max}$  tej reakcji = 0.1 μmola/mg białka/min /ryc. 11 A/.

W przypadku różnych stężeń NADP reakcja jest prostoliniowa do 0.5  $\mu\text{mola}$ .  $K_m$  wynosi  $3.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $V_{\text{max}} = 0.16 \mu\text{moli/mg białka/min}$  /ryc. 11 B/.



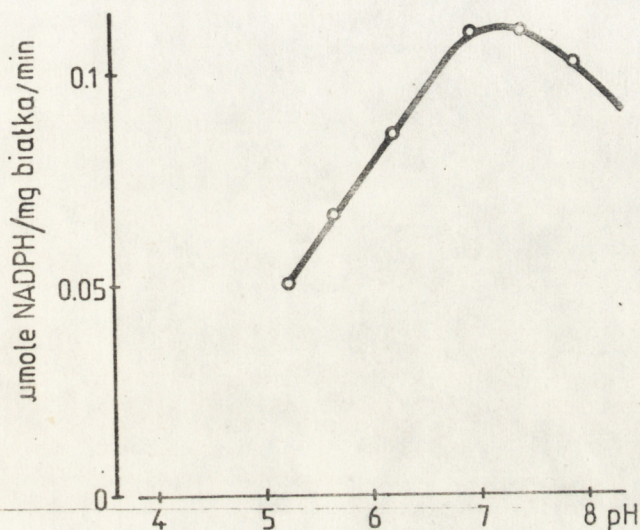
Ryc.11 A, B. Zależność aktywności IDH NADP od stężenia izocytrynianu /A/ i NADP /B/.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCL, pH 6.7, 40  $\mu\text{moli}$ ;  $\text{MgCl}_2$ , 18  $\mu\text{moli}$ ; 9  $\mu\text{g}$  białka. Czas inkubacji 5 min.

/A/ 0.5  $\mu\text{mola}$  NADP, /B/ 0.6  $\mu\text{mola}$  izocytrynianu. Dane są wartościami jednego z 4 doświadczeń.

Wg Rafałowska i wsp. /156/.

Optimum pH enzymu zawarte jest w granicach wartości 6.5 do 7.0 /ryc. 12/.



Ryc. 12. Wpływ pH na aktywność IDH NADP.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-maleinian /pH 5.2 - 8.0/ 40,  $\mu$ moli;  $MgCl_2$  18,  $\mu$ moli; izocytrynian 0.6,  $\mu$ mola; NADP - 0.5,  $\mu$ mola, 9,  $\mu$ g białka. Czas inkubacji 5 min. Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń.

Wg Rafałowska i wsp. /156/.

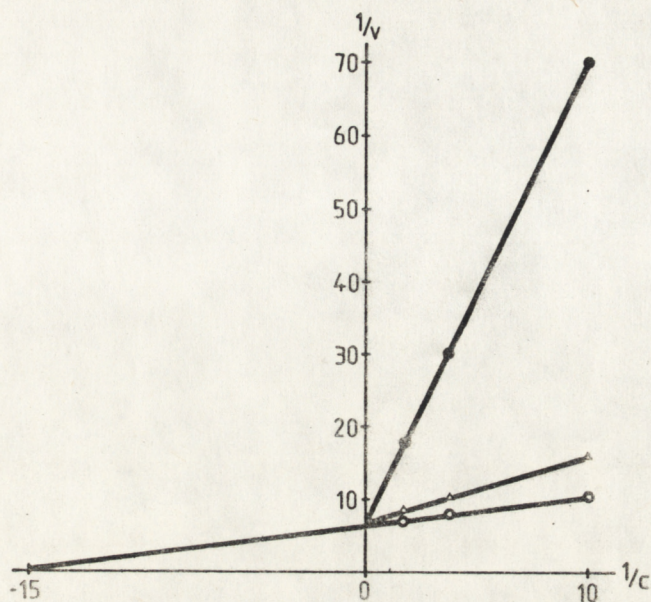
Aktywność IDH NADP z cytosolu mózgu regulowana jest przez nukleotydy adeninowe i pirydynowe. ATP i ADP w stężeniach  $2 \cdot 10^{-9}$  aktywują dehydrogenazę izocytrynianową; natomiast w stężeniach poniżej 100 nmoli hamują aktywność enzymu. W przypadku AMP nie zaobserwowano zmian w aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej /Tabela 5/.

Tabela 5. Wpływ nukleotydów adeninowych na aktywność IDH NADP.

Stężenia dodanych nukleotydów /M/	Aktywność enzymu /%/		
	ATP	ADP	AMP
0	100	100	100
2 • 10 <sup>-9</sup>	130	113	100
5 • 10 <sup>-9</sup>	114	106	100
10 <sup>-8</sup>	107	106	100
5 • 10 <sup>-8</sup>	107	106	100
10 <sup>-7</sup>	90	86	100
10 <sup>-6</sup>	90	80	100
10 <sup>-4</sup>	90	80	100
10 <sup>-3</sup>	90	73	100
3 • 10 <sup>-3</sup>	59	37	100

Dane są wartościami jednego z 4 doświadczeń.  
Wg Rafałowska i wsp. /156/.

Inhibicja aktywności IDH NADP przez ATP jest kompetycyjna w stosunku do izocytrynianu /ryc. 13/.



Ryc. 13. Charakter inhibicji aktywności IDH NADP przez ATP.

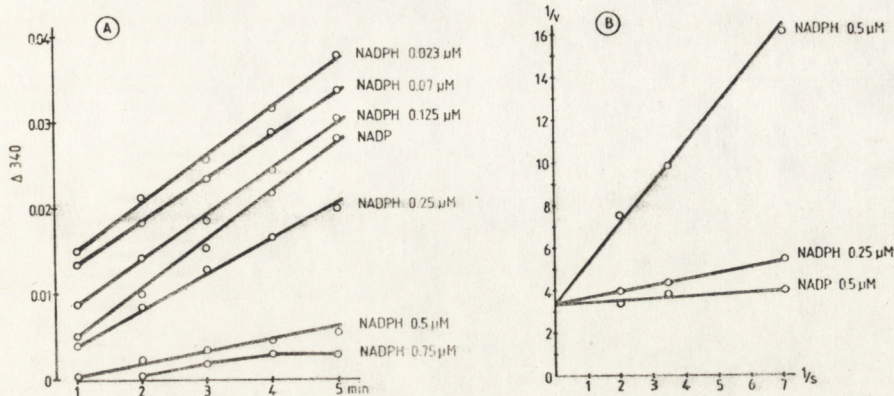
Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl pH 6.7, 40  $\mu$ moli;  $MgCl_2$ , 18  $\mu$ moli, 9  $\mu$ g białka, izocytrynian 0.1-0.6  $\mu$ mola; NADP, 0.5  $\mu$ mola. Czas inkubacji 5 min.

○ - kontrola,  $\Delta$  - 1 mM ATP, ● - 3 mM ATP.

Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń.

Wg Rafałowska i wsp. /156/.

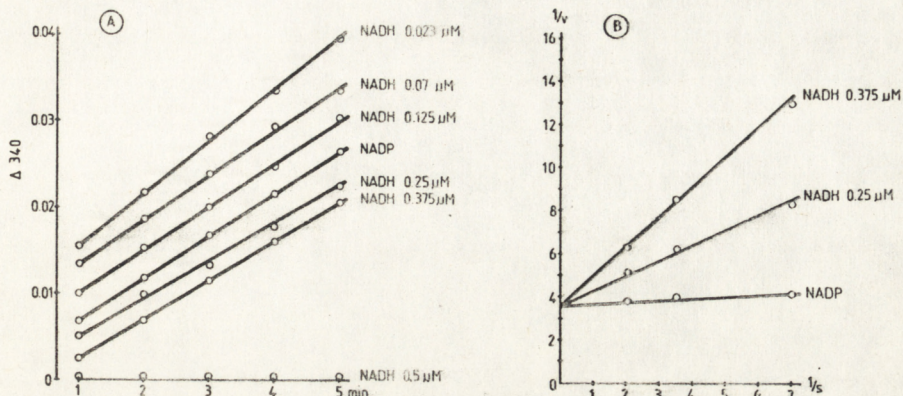
Stężenia NADPH niższe od 0.125  $\mu$ M powodują wzrost aktywności enzymu. Stężenia wyższe hamują jego aktywność a inhibicja ta jest kompetycyjna w stosunku do izocytrynianu /ryc. 14 A,B/.



Ryc. 14. Zależność aktywności IDH NADP od stężenia NADPH.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 40  $\mu\text{moli}$ , Tris-HCl, pH 6.7; 18  $\mu\text{moli}$   $\text{MgCl}_2$ ; 9  $\mu\text{g}$  białka; 0.5  $\mu\text{mola}$  NADP i zaznaczone na rycinie ilość NADPH. /A/ zawierało 0.6  $\mu\text{mole}$  izocytrynianu. /B/ zawierało 0.1-0.6  $\mu\text{mola}$  izocytrynianu. Objętość końcowa była 3.2 ml. Dane są wartościami jednego z 5-ciu doświadczeń.  
Wg Rafałowska i wsp. /155/.

Podobnie jak NADPH również NADH poniżej stężenia 0.125  $\mu\text{M}$  aktywuje aktywność enzymu a wyższe stężenia tego nukleotydu powodują kompetycyjną inhibicję /ryc. 15 A, B/.



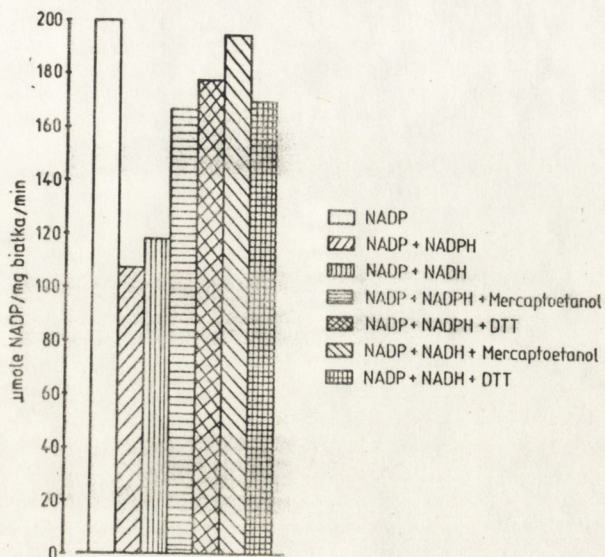
Ryc. 15. Wpływ NADH na aktywność IDH NADP.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 40  $\mu$ moli, Tris-HCl, pH 6.7; 1.8  $\mu$ mola  $MgCl_2$ , 9  $\mu$ g białka; 0.5  $\mu$ mola NADP i NADH w stężeniach zaznaczonych na rysunku, oraz 0.6  $\mu$ moli cytrynianu /A/ i 0.1 - 0.6  $\mu$ moli izocytrynianu /B/.

Objętość końcowa 3.2 ml. Dane są wartościami jednego z 4 doświadczeń.

Wg. Rafałowska i wsp. /155/.

Obecność w mieszaninie inkubacyjnej merkaptoetanolu lub DTT zmniejsza inhibicję aktywności IDH NADP wywołaną NADPH lub NADH /ryc. 16/.



Ryc. 16. Wpływ merkaptoetanolu i DTT na aktywność izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej w obecności zredukowanych nukleotydów pirydynowych.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 40, umoli Tris-HCl, pH 6.7; 1.8, umoli  $MgCl_2$ , 9, ug białka; 0.5, umola NADP; 0.6, umola izocytrynianu; 1 mmol DTT; 1 mmol merkaptoetanolu; 0.375, umoli NADPH; 0.375, umoli NADH, w końcowej objętości 3.2 ml. Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń. Wg Rafałowska i wsp. /155/.

#### 1.4. Transport cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów

Podstawowym czynnikiem regulującym poziom cytrynianu we frakcji cytoplazmatycznej jest transport tego związku przez błonę mitochondriów, w których jest on syntetyzowany. Kolejne badania

miały na celu wyjaśnienie mechanizmów tego transportu w tkance nerwowej.

Oczyszczona frakcja mitochondrialna mózgu /metody 2.3/ na której przeprowadzono doświadczenia charakteryzowała się niską aktywnością LDH i bardzo małą aktywnością fumarazy wzrastającej około 150-krotnie po dodaniu Trytonu X-100 /Tabela 6/.

Tabela 6. Aktywność fumarazy i LDH we frakcji mitochondrialnej.

Tryton X-100	Fumaraza μmole/mg białka/min	LDH
0	0.005 ± 0.0001 /3/	0.185 ± 0.002 /3/
0.2%	0.720 ± 0.0001 /3/	0.232 ± 0.002 /3/

Wartości są średnimi ± SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach.

Wg Rafałowska /163/.

Frakcja ta odznaczała się również dobrą zdolnością utleniania egzogenego  $^{14}\text{C}$  cytrynianu, produkując z niego 20 nmoli  $^{14}\text{CO}_2$ /mgr białka/min. W obecności rotenonu ilość  $^{14}\text{CO}_2$  była niewielka.

Biorąc pod uwagę znany z badań na tkance wątrobowej fakt, że w transporcie cytrynianu bierze udział jabłczan, zbadano wpływ szeregu związków na zawartość jabłczanu w mitochondriach mózgu i określono sposoby jego przechodzenia przez błonę mitochondrialną. Wyniki zestawione w tabeli 7 wskazują, że ilość endogennego jabłczanu maleje po dodaniu do mitochondriów fosforanu nieorganicznego, podczas gdy dodanie butylomalonianu z Pi nie obniża ilości jabłczanu

w mitochondriach. Obecność cytrynianu w mieszaninie inkubacyjnej prowadzi do spadku endogennego jabłczanu, bez wpływu butylomalonianu na ten proces. Dodanie egzogenego  $^{14}\text{C}$  jabłczanu powodowało niewielką jego akumulację w mitochondriach. Obecność Pi powodowała około 3-krotny wzrost pobrania jabłczanu przez mitochondria. Cytrynian dodany razem z  $^{14}\text{C}$  jabłczanem i z Pi zmniejszał transport jabłczanu do mitochondriów.

Tabela 7. Wpływ Pi, butylomalonianu i cytrynianu na wyjście wewnątrzmitochondrialnego jabłczanu z mitochondriów mózgu

Dodano	Wewnątrzmitochondrialny jabłczan nmole/mg białka/min					
	jabłczan			$^{14}\text{C}$ jabłczan		
Nr doświadczeń	1	2	3	1	1	3
Kontrola	1.80	1.55	2.10			
Pi	1.31	1.30	1.45			
Butylomalonian	1.82	1.50	2.02			
Pi+butylomalonian	1.82	1.58	2.20			
Cytrynian	1.00	0.80	1.00			
Cytrynian + butylomalonian	1.10	0.82	1.00			
$^{14}\text{C}$ jabłczan	2.20	1.80	2.40	1.90	1.75	2.00
Pi+ $^{14}\text{C}$ jabłczan	6.00	6.10	6.50	5.81	6.00	6.60
Pi+ $^{14}\text{C}$ jabłczan + cytrynian	3.20	3.85	4.50	3.05	3.25	4.72

Mitochondria /1 mg białka/ml/ były inkubowane 4 min. w mieszaninie: 0.25 M sacharoza; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 2.4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu; 1.25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny oraz 10 mM Pi; 1 mM jabłczan; 1 mM cytrynian i 3 mM butylomalonian. Przedstawiono dane trzech kolejnych doświadczeń.  
Wg. Rafałowska /163/.

Z powyżej przedstawionych danych wynika zatem, że jabłczan może przechodzić przez błonę mitochondrialną dwoma drogami: w wymianie z Pi i w wymianie z cytrynianem.

Mechanizm wyjścia jabłczanu z mitochondriów aktywującego wejście do wewnątrz dodanego cytrynianu obrazują dane doświadczalne przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8. Stechiometryczna wymiana między wewnątrzmitochondrialnym jabłczanem i zewnątrzmitochondrialnym cytrynianem w mitochondriach mózgu.

Nr dośw.	Dodano		Wewnątrzmitochondrialna zawartość nmole/mg białka/min	
	preinkubacja	inkubacja	jabłczan	<sup>14</sup> C cytrynian
1	jabłczan	-	5.9	-
	-	<sup>14</sup> C cytrynian	-	8.8
	jabłczan	<sup>14</sup> C cytrynian	2.8	12.2
			$\Delta = 3.1$	$\Delta = 3.4$
2	jabłczan	-	5.8	-
	-	<sup>14</sup> C cytrynian	-	8.4
	jabłczan	<sup>14</sup> C cytrynian	3.0	11.0
			$\Delta = 2.8$	$\Delta = 2.6$
3	jabłczan	-	5.2	-
	-	<sup>14</sup> C cytrynian	-	7.8
	jabłczan	<sup>14</sup> C cytrynian	2.9	10.1
			$\Delta = 2.3$	$\Delta = 2.3$

Mitochondria /1 mg białka/ml/ zawieszano w mieszaninie zawierającej: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.5 mM ADP, 20 mM glukoza; heksokinaza; 5 mM Pi i 1 mM arsenian.

Po 2 min dodawano 2.4 µg/ml rotenonu i 1.25 µg/ml antymycyny. 1 min później zaczynało preinkubację a następnie inkubację dodając 1 mM jabłczan lub 1 mM <sup>14</sup>C-cytrynian jak wykazano w tabeli. Czas inkubacji 4 min. Przedstawiono dane trzech kolejnych doświadczeń.

Wg. Rafałowska /163/.

Zawieszanie mitochondriów w zbuforowanej mieszaninie sacharozy, EDTA, ADP, glukozy, heksokinazy i Pi na 2 min przed rozpoczęciem doświadczenia prowadziło do usunięcia z mitochondriów endogennego cytrynianu.

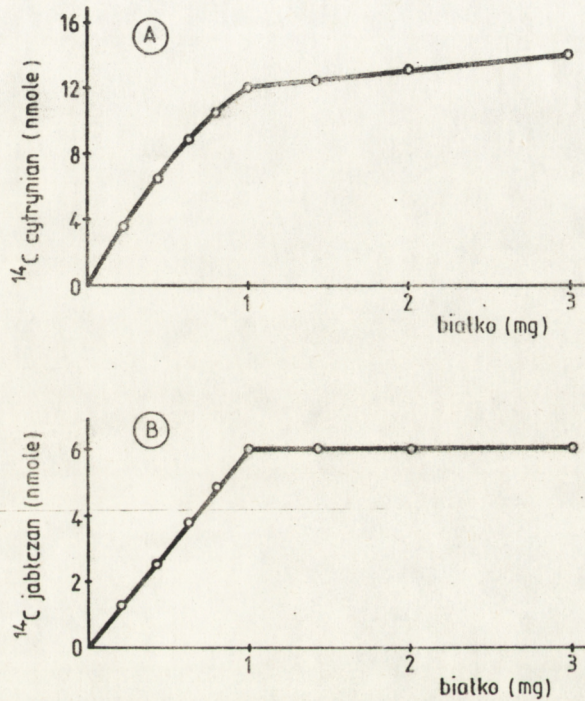
Stwierdzono, zgodnie z danymi w tabeli 8, że jeśli nie dodawano jabłczanu, cytrynian przechodził do mitochondriów w mniejszym stopniu niż w przypadku kiedy mitochondria wzbogacano w jabłczan w czasie preinkubacji.

Porównanie wejścia cytrynianu do mitochondriów z wewnątrzmitochondrialną zawartością jabłczanu wskazuje, że wejście cytrynianu jest związane z wyjściem równoważnych ilości jabłczanu. Zatem transport cytrynianu zachodzi w wyniku wymiany z jabłczanem w ilościach mol/mol.

Następne badania dotyczyły charakterystyki warunków transportu cytrynianu i jabłczanu przez błonę mitochondrialną.

Ryc. 17 A i B wskazuje, że optymalna ilość białka w badaniach tego transportu wynosi 1.0 mg.

Wejście do mitochondriów badanych substratów jest funkcją czasu /ryc. 18 A, B/. W przypadku cytrynianu maksymalne wejście obserwuje się w 4-tej minucie inkubacji. Jabłczan osiąga maksymalne wejście w 2-giej minucie i utrzymuje go do 4 min, a następnie spada.



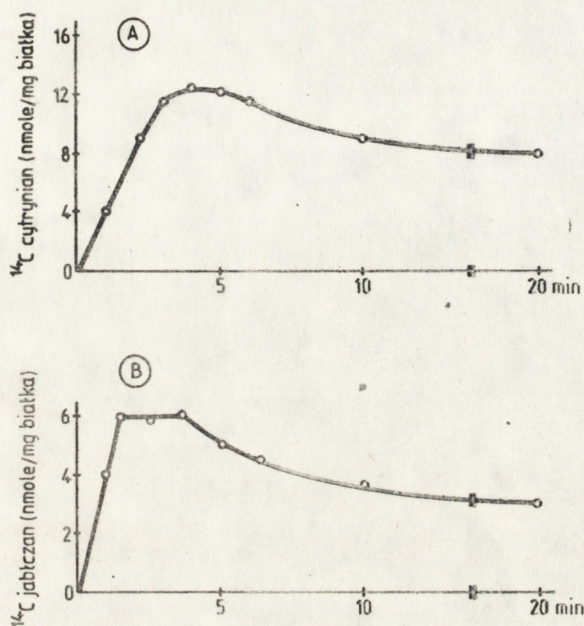
Ryc. 17. Zależność wejścia cytrynianu /A/ i jabłczanu /B/ do mitochondriów od stężenia białka.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH 7.4, 24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rotenonu; 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antymycyny; 10 mM Pi oraz 1 mM jabłczan i 1 mM  $^{14}\text{C}$  cytrynian /A/ i 1 mM  $^{14}\text{C}$  jabłczan /B/.

Czas inkubacji 4 min.

Dane przedstawiają wartości jednego z 3 doświadczeń.

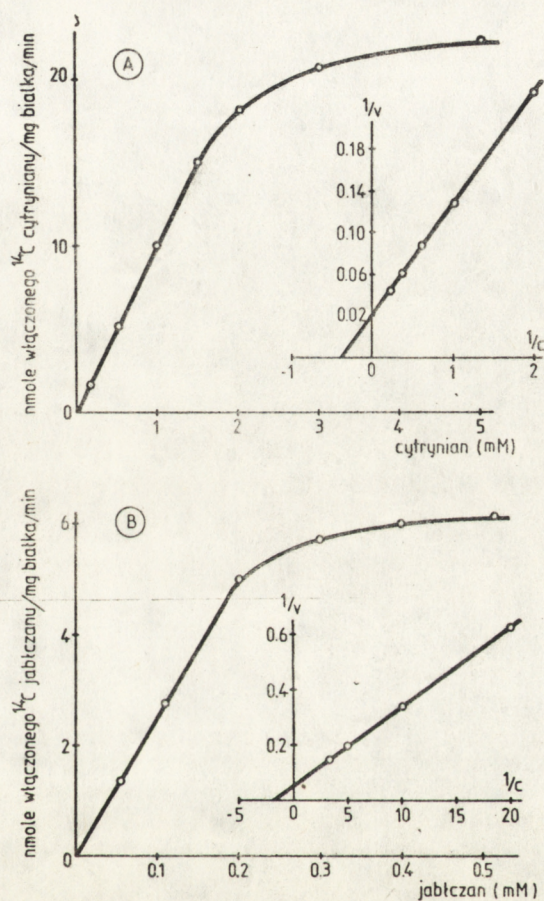
Wg. Rafałowska /163/.



Ryc. 18. Transport cytrynianu i jabłczanu jako funkcja czasu.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2.4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu; 1.25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny; 10 mM Pi; 1 mg białka, 1 mM jabłczan, 1 mM  $^{14}\text{C}$  cytrynian /A/ lub 1 mM  $^{14}\text{C}$  jabłczan /B/. Dane przedstawiają wartości jednego z 5-ciu doświadczeń.  
Wg. Rafałowska /163/.

Badany transport cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów mózgu jest w zgodzie z kinetyką Michaelisa-Mentena /ryc. 19 A, B/. Wyliczone zgodnie z Lineweaverem-Burkem /49/ wartości  $K_m$  wynoszą dla cytrynianu 4.55 mM a dla jabłczanu 0.42 mM.



Ryc. 19. Transport cytrynianu /A/ i jabłczanu /B/ jako funkcja egzogennych stężeń tych związków.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 2.4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu; 1.25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny; 10 mM Pi, 1 mg białka, 1 mM jabłczanu,  $^{14}\text{C}$  cytrynian /A/ i  $^{14}\text{C}$  jabłczan /B/ w stężeniach zaznaczonych na rycinach. Czas inkubacji 4 min. Dane przedstawiają wartości jednego z 5-ciu doświadczeń.

Wg. Rafałowska /163/.

1.5. Charakterystyka synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych.

Dotychczasowe badania na frakcji synaptosomalnej mózgu, otrzymywanej w gradiencie stężeń sacharozy i ich interpretacja były ograniczone z powodu dużej heterogenności tej frakcji. Nowsze metody Bootha i Clarka /20/ oraz Lai' a i Clarka /100/, w których stosowano rozdział w gradiencie stężeń Ficollu pozwalały na otrzymanie frakcji synaptosomalnej wolnej od zanieczyszczeń, metabolicznie aktywnej, lecz posiadającej bardzo niskie parametry energetyczne.

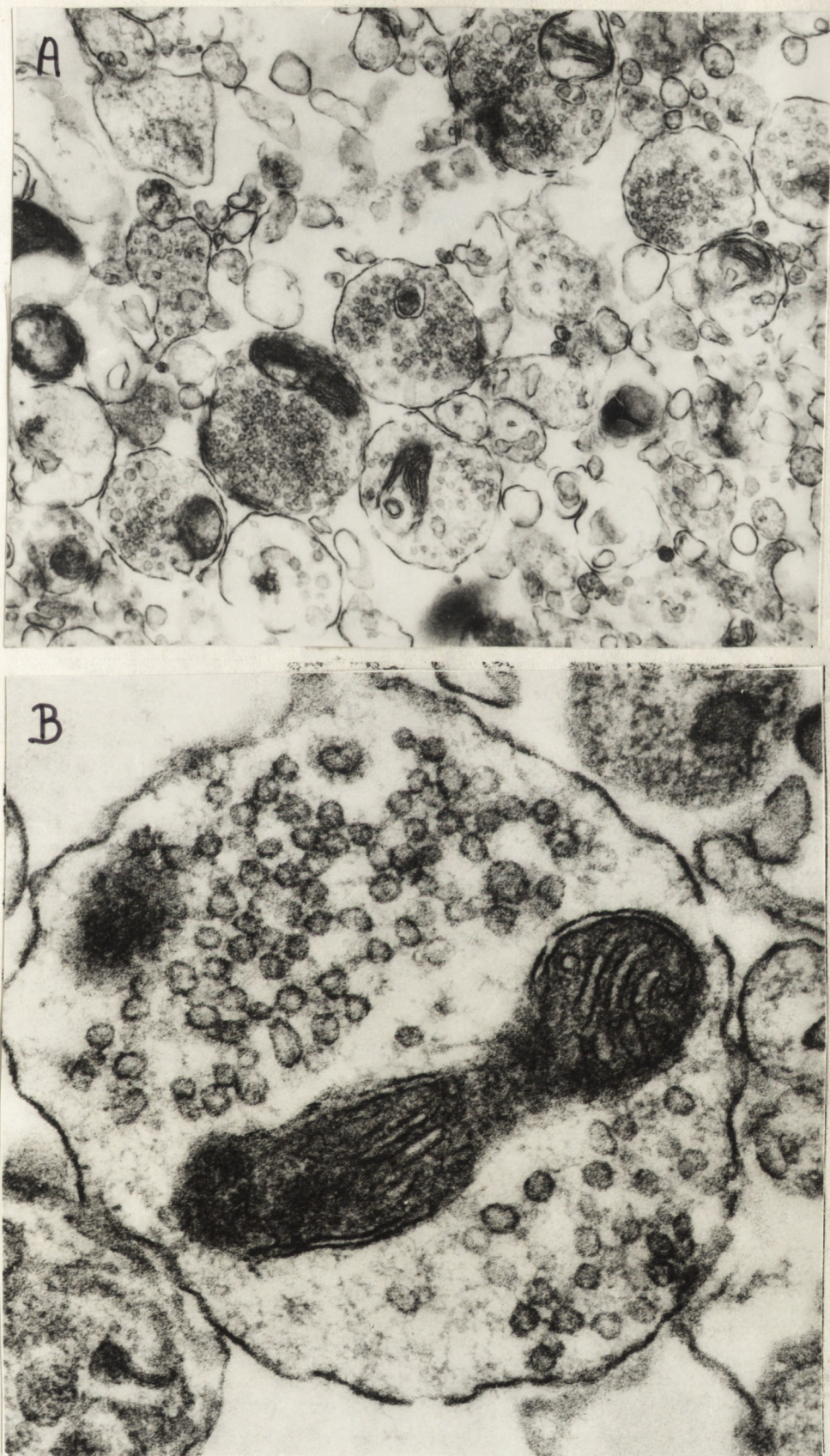
W niniejszej pracy stosując narkozę pentobarbitalową zwierząt, z których następnie otrzymywano synaptosomy w gradiencie stężeń Ficollu, uzyskano frakcję praktycznie pozbawioną zanieczyszczeń, a jednocześnie zachowującą parametry energetyczne bardzo podobne do znajdujących w całym nienaruszonym mózgu. Czystość frakcji oceniano badając aktywność markerów subkomórkowych /Tabela 9/ oraz sprawdzając jej obraz w mikroskopie elektronowym /Zdjęcie 1A, B/.

Tabela 9. Aktywność LDH i fumarazy we frakcji synaptosomalnej mózgu.

umole/mg białka/min			
LDH		Fumaraza	
+ Triton X-100		+ Triton X-100	
82 $\pm$ 7	934 $\pm$ 27	0	305 $\pm$ 34
/5/	/5/	/5/	/4/

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach.

Wg. Rafałowska, wyniki niepublikowane.



Zdjęcie 1. Obraz frakcji synaptosomalnej w mikroskopie elektronowym.

Synaptosomy utrwalano w glutaraldehydzie, odwadniano i zatapiano w Eponie. Skrawki grubości 50 - 60 nm były badane w mikroskopie elektronowym Philips 300. A. Powiększenie 49 000.x, B. Powiększenie 72 000 x. Wg. Rafałowska, Silver, wyniki niepublikowane.

Bardzo czułym testem na "nienaruszalność" metaboliczną komórek, a w tym przypadku synaptosomów, jest ich stan energetyczny. Stan ten może być określony przez poziom redukcji wewnątrzmitochondrialnego NAD, cytoplazmatyczny stosunek  $\frac{ATP}{ADP \text{ Pi}}$  i wartość oddychania mitochondriów.

W tabelach 10 i 11 przedstawiono uzyskane dane niezbędne do wyliczenia mitochondrialnego i cytoplazmatycznego stanu redukcji i fosforylacji systemu nukleotydów adeninowych w synaptosomach izolowanych z mózgów szczurów anestetyzowanych nembutalem i nieanestetyzowanych.

Tabela 10. Stężenia metabolitów w synaptosomach otrzymywanych z mózgów zwierząt anestetyzowanych i niepoddawanych narkozie.

umole/ml wewnątrzsynaptosomalnej $H_2O$	Nieanestetyzowane zwierzęta	Anestetyzowane zwierzęta
ATP	1.28 $\pm$ 0.20 /16/	4.03 $\pm$ 0.62 /5/
ADP	0.46 $\pm$ 0.12 /29/	0.42 $\pm$ 0.04 /7/
AMP	0.13 $\pm$ 0.06 /18/	0.05 $\pm$ 0.01 /4/
Pi	3.31 $\pm$ 0.40 /10/	2.50 $\pm$ 0.01 /4/
CrP	1.28 $\pm$ 0.17 /18/	3.00 $\pm$ 0.42 /4/
Cr	3.25 $\pm$ 0.91 /20/	3.81 $\pm$ 0.44 /6/
nmole/ml mieszaniny inkubacyjnej		
3-hydroksymaślan	25.61 $\pm$ 0.63 /7/	18.70 $\pm$ 1.23 /6/
Acetylooctan	12.62 $\pm$ 3.20 /7/	3.37 $\pm$ 0.91 /6/
Pirogronian	31.33 $\pm$ 3.62 /6/	8.48 $\pm$ 1.06 /6/
Mleczan	117.99 $\pm$ 6.98 /6/	92.64 $\pm$ 2.15 /6/

Synaptosomy były zawieszane /około 5 mg białka/ml/ i inkubowane zgodnie z opisem podanym w metodach. Objętość wewnątrzsynaptosomalnej  $H_2O$  wynosiła  $4.0 \pm 0.2$  /ul/mg białka. Zewnątrzsynaptosomalna  $H_2O$  towarzysząca białku przechodzącemu przez warstwę oleju silikonowego wynosiła około 4 /ul/mg białka. Stężenia Pi podane w tabeli przedstawiają wartości w których wprowadzono poprawkę na Pi zewnątrzsynaptosomalne. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach,  $p < 0.05$ .

Wg Rafałowska i wsp. /169/.

Jak wynika z powyższych wyników poziomy ATP i CrP są znacznie wyższe w synaptosomach z mózgów zwierząt anestetyzowanych. Poziom ADP i AMP jest lekko obniżony. Stosunek 3-hydroksymaślanu do acetylooctanu i stosunek mleczanu do pirogronianu jest znacznie wyższy u zwierząt poddanych anestezji.

Zużycie tlenu zarówno w przypadku zwierząt anestetyzowanych jak i nie poddanych anestezji było takie samo. W przypadku anestezji obserwowano jednak niższą zawartość cytochromu c, co dawało w tych warunkach wyższą liczbę obrotów /turnover/ dla cytochromu c /Tabela 11/. Ilość zredukowanego cytochromu c w preparatach synaptosomalnych wynosiła od 13 do 16% całkowitej ilości cytochromu.

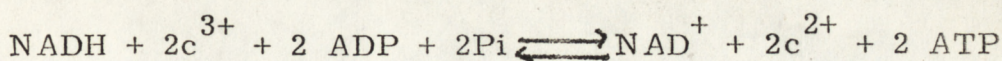
Tabela 11. Zużycie tlenu, poziom cytochromu c i ilość obrotów /TN/ dla cytochromu c w synaptosomach izolowanych z mózgów zwierząt anestetyzowanych i nie poddanych narkozie.

	Anestetyzowane zwierzęta	Nieanestetyzowane zwierzęta
Zużycie tlenu nmole/mg białka/min	2.58 $\pm$ 0.32 /6/	2.65 $\pm$ 0.30 /6/
Cytochrom c nmole/mg białka	0.05 $\pm$ 0.01 /7/*	0.11 $\pm$ 0.03 /6/*
TN e <sup>-</sup> /s/cyt. c	3.30 $\pm$ 0.11 /6/	1.70 $\pm$ 0.25 /6/

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach, \* p < 0.05

Wg. Rafałowska i wsp. /169/.

Wyniki zestawione w tabelach 10 i 11 pozwoliły na wyliczenie wolnej energii / $\Delta G$  utl-red/ dla reakcji:



wynosi ona - 26,01 kcal/2 elektrony dla synaptosomów z mózgów zwierząt anestetyzowanych i - 25,60 kcal/2 elektrony dla "nie-anestetyzowanych" synaptosomów.  $\Delta G$  dla syntezy ATP w powyższej reakcji wynosi - 25,75 kcal/2 ATP i - 23,95 kcal/2 ATP dla obydwu typów podanych preparatów synaptosomów. Także  $\Delta\Delta G$  dla synaptosomów z mózgów anestetyzowanych szczurów wynosi - 0,26 a dla synaptosomów ze zwierząt nienarkotyzowanych - 1,65 /Tabela 12/.

Zatem  $\Delta\Delta G$  dla łańcucha oddechowego mitochondriów synaptosomalnych i dla cytoplazmatycznego stosunku  $\frac{ATP}{ADP Pi}$  w synaptosomach izolowanych z mózgów anestetyzowanych nembutalem szczurów jest bliska równowagi. Dowodzi to, że uzyskane w gradiencie stężeń Ficollu synaptosomy z mózgów zwierząt narkotyzowanych są metabolicznie nietknięte, nienaruszone, w przeciwieństwie do preparatów synaptycznych otrzymywanych ze zwierząt nienarkotyzowanych.

Uzyskane czyste, nienaruszone metabolicznie synaptosomy posiadają potencjał błonowy równy -  $86.8 \pm 7.8$  mV/n = 11/. Pod wpływem jonów  $K^+$ , ouabainy i weratryny następuje depolaryzacja błony synaptycznej ze spadkiem potencjału. Tet rodotoksyna /TTX/ całkowicie znosi wpływ weratryny /ryc. 20 i 21/.

Tabela 12. Współzależność wolnej energii między reakcjami utleniania i redukcji łańcucha oddechowego i stanu fosforylacji nukleotydów adeninowych w synaptosomach z mózgów zwierząt anestetyzowanych i nieanestetyzowanych.

	Anestetyzowane	Nieanestetyzowane
$\frac{ATP}{ADP}$	9.6	2.78
$\frac{ATP}{ADP / Pi} M^{-1}$	3838	840
$\frac{ATP}{ADP} \frac{AMP}{ADP^{-2}}$	1.05	0.77
$\frac{ATP + 1/2 ADP}{AN}$	0.95	0.81
<u>3-hydroksymaślan</u> acetylooctan	5.55	2.03
$\frac{cytochrom\ c^{3+}}{cytochrom\ c^{2+}}$	5.86	6.70
Współzależność wolnej energii		
Eh cyt. c, V	0,276	0,280
Eh NAD, V	-0,288	-0,275
Eh, V	0,564	0,555
$\Delta G$ utl-red, kcal/2 $\bar{e}$	-26,01	-25,60
$\Delta G$ ATP, kcal/2 ATP	-25,75	-23,95
$\Delta \Delta G$	-0,26	-1,65

Wolna energia była wyliczona dla dwu miejsc fosforylacji.

$$\Delta E = E_h NAD^+ / NADH - E_h [cyt. c^{3+}] / [cyt. c^{2+}]$$

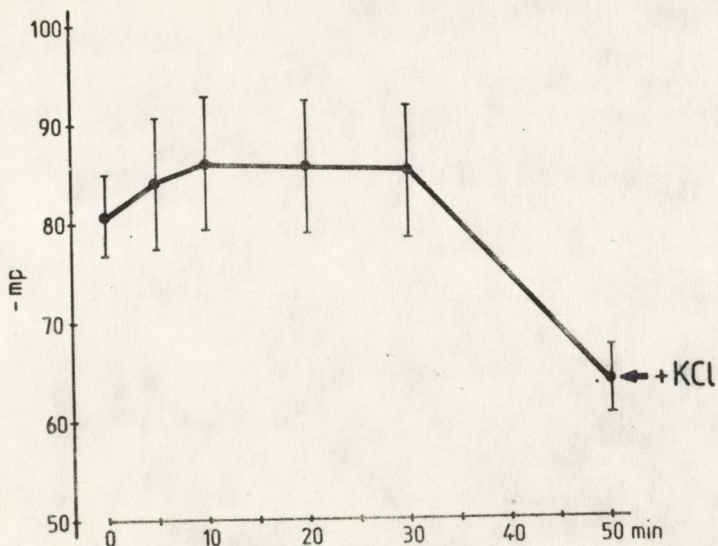
gdzie  $E_h = E_m + 2.3 RT/nF \log utl/red$ ,  $\Delta G utl-red. = -nF \Delta E$ ;  $\Delta G ATP = \Delta G_o + 1.36 \log \frac{ADP Pi}{ATP}$

Za wartość  $E_m$  dla cytochromu c przyjmowano 0.230 V zgodnie z Dutton i Wilson /57/ 3-hydroksymaślan /acetylooctan jako - 0.266 V /Krebs i wsp. /98/ i  $\Delta G ATP$  dla pH 7.4 = 8.0  $\frac{kcal}{mol}$

zgodnie z Rosing i Slater /179/ oraz Gnyun i Veech /77/.

$$\Delta \Delta G = \Delta G utl-red - \Delta G ATP \text{ kcal/2 ATP.}$$

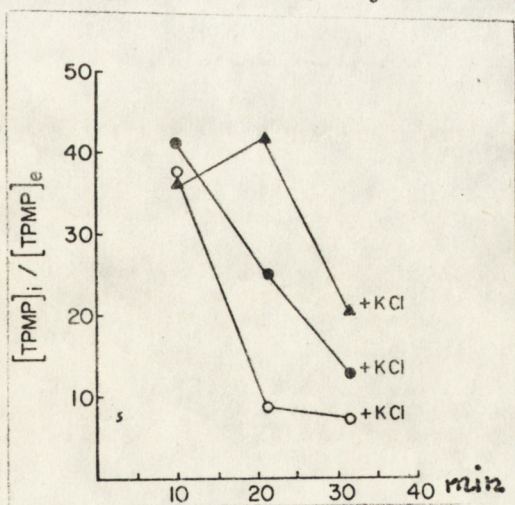
Wg Rafałowska i wsp. /169/.



Ryc. 20. Potencjał błonowy synaptosomów, Zależność od czasu inkubacji z TPMP i wpływ KCl.

Inkubację prowadzono i potencjał wyliczano zgodnie z opisem podanym w metodach. Używano 25  $\mu$ M TPMP, 2  $\mu$ M TPB oraz 50 mM KCl. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla 11 doświadczeń.

Wg. Deutsch, Rafałowska, wyniki niepublikowane.



Ryc. 21. Wpływ ouabainy, weratryny i tetrodotoksyny /TTX/ na wejście TPMP do synaptosomów.

Inkubację prowadzono zgodnie z opisem podanym w metodach. Używano 25  $\mu$ M TPMP, 2  $\mu$ M TPB. Po 10 min inkubacji dodawano ouabainę  $10^{-4}$ M /●/, weratrynę  $10^{-4}$ M /○/ i weratrynę + TTX /▲/. Po 10 min inkubacji dodawano KCl 50 mM. Każdy z punktów reprezentuje podwójne oznaczenie.

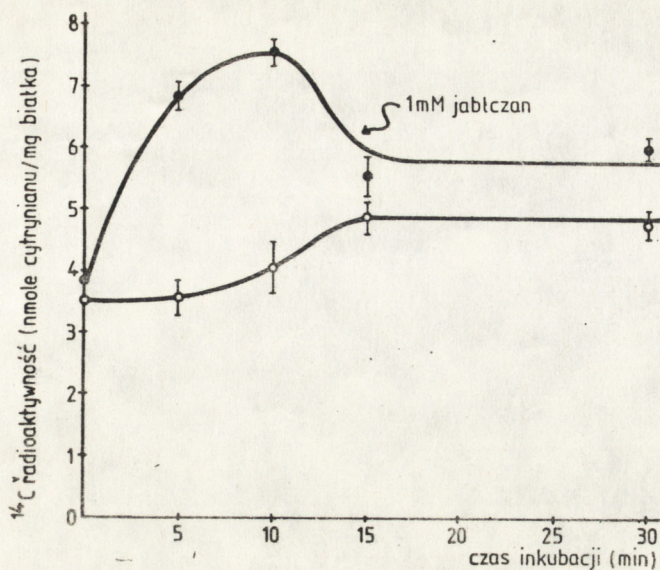
Wg Deutsch, Rafałowska /48/.

Jednym z ważnych aspektów metabolizmu zakończeń nerwowych jest, niezbadany dotychczas, transport cytrynianu do synaptosomów i nienaruszonych mitochondriów synaptosomalnych izolowanych w wyniku szoku osmotycznego synaptosomów.

W podjętych badaniach starano się uchwycić podobieństwa i różnice między akumulacją cytrynianu w mitochondriach synaptosomalnych i mitochondriach perikarionów, w przypadku których zagadnienie transportu tego pośrednika cyklu Krebsa zostało przedstawione w rozdziale 1.4.

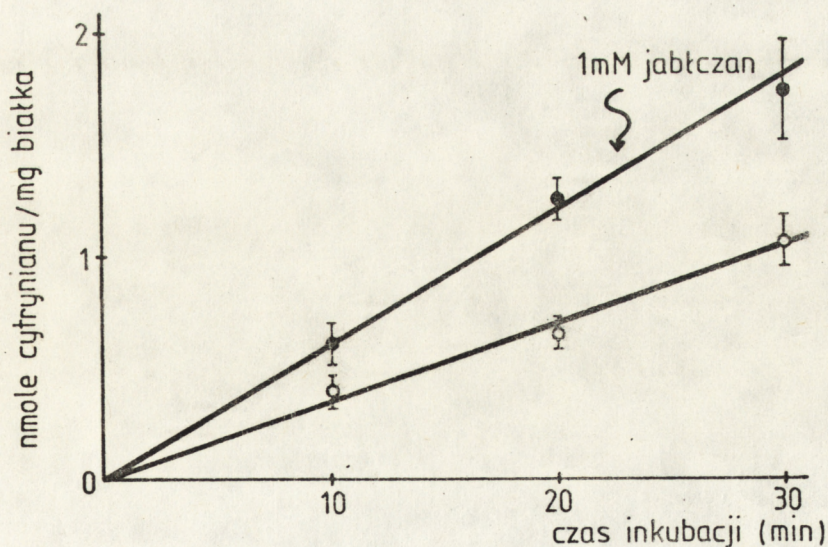
Wejście cytrynianu do synaptosomów oznaczano poprzez pomiar radioaktywności tego związku w synaptosomach po inkubacji z  $^{14}\text{C}$  cytrynianem oraz poprzez pomiar ilości  $^{14}\text{CO}_2$  powstającego w mitochondriach synaptosomalnych w wyniku dekarboksylacji  $^{14}\text{C}$  cytrynianu przenikającego do ich wnętrza.

Wykazano, że akumulacja radioaktywności w synaptosomach otrzymanych zarówno ze zwierząt anestetyzowanych jak i nieanestetyzowanych pochodzący z dodanego  $^{14}\text{C}$  cytrynianu /w nieobecności egzogennej jabłczanu/ była maksymalna po 15 minutach inkubacji. W próbach do których dodawano również jabłczan, akumulacja radioaktywności pochodząca z  $^{14}\text{C}$  cytrynianu była szybsza, z maksimum w 10 min inkubacji, i prawie 2-krotnie wyższa /ryc. 22/. Dekarboksylacja  $^{14}\text{C}$  cytrynianu pobranego przez synaptosomy z mieszaniny inkubacyjnej miała charakter liniowy w czasie 30 min. W nieobecności dodanego jabłczanu wynosiła ona w przeliczeniu na ilość  $^{14}\text{C}$  cytrynianu 1.2 nmole/mg białka/30 min. Dodatek 1 mM jabłczanu powodował wzrost tej wartości do 1.8 nmole/mg białka/30 min /ryc. 23/.



Ryc. 22.  $^{14}\text{C}$  - radioaktywność w synaptosomach po inkubacji z 1,5  $^{14}\text{C}$  - cytrynianem w obecności i nieobecności jabłczanu.

Średnie  $\pm$  SEM z 5-ciu doświadczeń,  $p < 0.05$ .  
Wg Rafałowska, Księżak /166/.



Ryc. 23. Dekarboksylacja 1,5  $^{14}\text{C}$  cytrynianu w synaptosomach mózgu szczura.

Średnie  $\pm$  SEM są wyliczone z 5-ciu doświadczeń,  $p < 0.05$ .  
Wg. Rafałowska, Księżak /166/.

Wyniki powyższych doświadczeń wskazują, że zarówno akumulacja cytrynianu w synaptosomach jak i stopień jego dekarboksylacji zależne są od obecności jabłczanu. Sugeruje to, że transport cytrynianu do mitochondriów synaptosomalnych może zachodzić na drodze wymiany z jabłczanem podobnie jak w mitochondriach perikarionów /rozdział 1.4/.

W następnym etapie pracy wyizolowano mitochondria z synaptosomów. Uzyskane mitochondria synaptosomalne posiadały nieuszkodzoną błonę mitochondrialną oraz tylko niewielkie zanieczyszczenia całymi synaptosomami o czym świadczą wyniki pomiarów aktywności markerów subkomórkowych /tabela 13/.

Tabela 13. Aktywność LDH i fumarazy w izolowanych mitochondriach synaptosomalnych.

nmole/mg białka/min			
LDH		Fumaraza	
+ Triton X-100		+ Triton X-100	
10 $\pm$ 1 /5/	68 $\pm$ 25 /5/	76 $\pm$ 6 /5/	992 $\pm$ 29 /4/

Wartości są średnimi  $\pm$  SEM dla liczby doświadczeń podanych w nawiasach.

Wg Rafałowska, Księżak /166/.

W tabeli 14 podano wartości określające dekarboksylację, maksymalną akumulację i maksymalny czas wejścia  $^{14}\text{C}$  cytrynianu do wyizolowanych mitochondriów synaptosomalnych i mitochondriów perikarionów.

Tabela 14. Porównanie dekarboksylacji, maksymalnej akumulacji i czasu dla maksymalnej akumulacji  $^{14}\text{C}$  cytrynianu w mitochondriach izolowanych z synaptosomów i perikarionów.

Rodzaj mitochondriów	Dekarboksylacja $^{14}\text{C}$ cytrynianu nmole/mg białka/10 min	Maksymalna akumulacja $^{14}\text{C}$ cytrynianu nmole/mg białka/min	Czas maksymalnej akumulacji min
Synaptosomalne	$12.3 \pm 2.7$ /5/	$10.8 \pm 2.9$ /5/	1.0
Perikarialne	$193 \pm 8.0$ /4/	$44.4 \pm 2.4$ /5/	4.0

Wartości są średnimi  $\pm$  SEM dla liczby doświadczeń podanych w nawiasach.

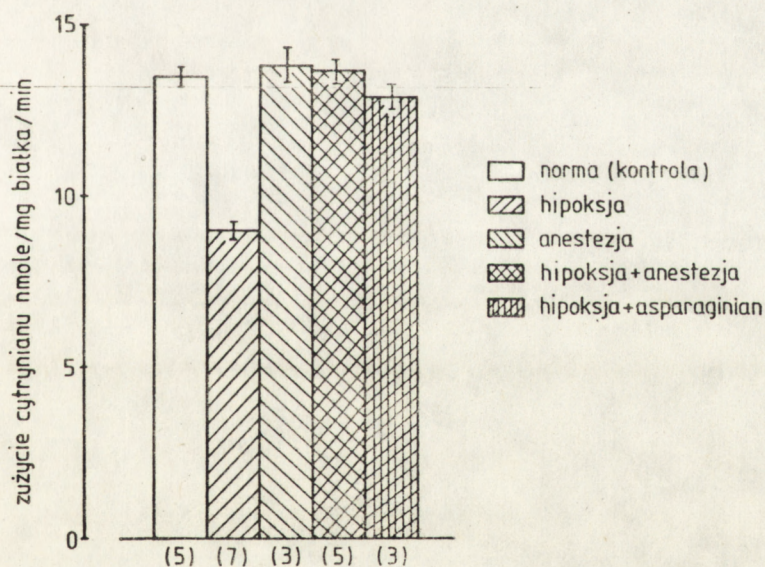
Wg Rafałowska, Księżak /166/.

Tak krótki czas maksymalnej akumulacji  $^{14}\text{C}$  cytrynianu w mitochondriach synaptosomalnych /1.0 min/ w porównaniu do akumulacji tego związku przez całe synaptosomy /10 min, ryc. 22/ wskazuje, że transport tego związku do mitochondriów in situ może być limitowany przez błonę synaptosomalną. Utlenianie cytrynianu mierzone dekarboksylacją jak również całkowita maksymalna jego akumulacja w mitochondriach synaptosomalnych są znacznie niższe od odpowiednich wartości dla mitochondriów perikarionów.

## 2. Zaburzenia metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego.

### 2.1. Utlenianie cytrynianu na drodze zależnej od cytoplazmatycznej IDH NADP w warunkach niedoboru tlenowego.

Zużycie cytrynianu w cytosolu mózgu w wyniku działania ciągu reakcji zależnego od IDH NADP oraz akonitazy i transaminazy asparaginianowej /Schemat 7, rozdział 1.2./ zależy od warunków w jakich znajduje się zwierzę.



Ryc. 24. Wpływ hipoksji i anestezji oraz egzogenego asparaginianu na zużycie cytrynianu w cytosolu mózgu na drodze zależnej od IDH NADP.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl pH 7.3, 64  $\mu$ mole;  $MnSO_4$ , 22.5  $\mu$ moli; cytrynian 1.0  $\mu$ mol; NADP, 0.5  $\mu$ mola; 2 mg białka. Objętość końcowa 1.3 ml. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.05$ . Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Dane przedstawione na ryc. 24 wskazują, że hipoksja zmniejsza zużycie cytrynianu o około 30%. Narkoza nie ma wpływu na ten proces. Kiedy anestetyzowane zwierzęta były jednocześnie przechowywane w niskiej zawartości tlenu /hipoksja + narkoza/ nie obserwowano efektu inhibicji zużycia cytrynianu charakterystycznego dla hipoksji.

0.4 mM asparaginian dodany do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej frakcję cytosolu otrzymaną z mózgów niedotlenionych zwierząt powodował, że utlenianie cytrynianu było takie jak w normie.

## 2.2. Badanie przyczyn częściowej inhibicji utleniania cytrynianu w hipoksji w cytosolu mózgu na drodze zależnej od IDH NADP.

Nasuwało się przypuszczenie, że za zmniejszenie utleniania cytrynianu w omawianym ciągu reakcji mogą być odpowiedzialne enzymy katalizujące proces zużycia cytrynianu.

Z pomiarów aktywności IDH NADP, akonitazy i transaminazy asparaginianowej oznaczanych w warunkach kontrolnych, w hipoksji i narkozie wynika jednak, że aktywności tych enzymów nie maleją w warunkach patologicznych. Aktywność akonitazy i transaminazy asparaginianowej w warunkach patologicznych jest taka jak w normie. Aktywność IDH NADP nieznacznie natomiast wzrasta. /Tabela 15/.

Wzrost aktywności IDH NADP w cytosolu w warunkach hipoksji jest związany z jednoczesnym zmniejszeniem aktywności tego enzymu w mitochondriach w czasie niedotlenienia. /Tabela 16/.

Tabela 15. Aktywność akonitazy, transaminazy asparaginianowej i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej w cytosolu mózgu zwierząt w warunkach normy, hipoksji i narkozy.

Enzym	Kontrola	Hipoksja	Anestezja
	/Norma/		
	nmole/mg białka/min		
A Akonitaza	7.3 <sub>±</sub> 0.04 /3/	7.6 <sub>±</sub> 0.46 /3/	7.4 <sub>±</sub> 0.95 /3/
B Aminotransferaza asparaginianowa	24.0 <sub>±</sub> 0 /3/	23.0 <sub>±</sub> 0,76 /3/	23.0 <sub>±</sub> 0.90 /3/
C Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna	10.1 <sub>±</sub> 0,72 /6/	15.1 <sub>±</sub> 1.62 /4/*	14.2 <sub>±</sub> 0.87 /9/

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla liczby doświadczeń podanych w nawiasach,  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$

Wg Rafałowska, Gromek /157/.

W tabeli 16 podano wartości obrazujące zmniejszenie aktywności IDH NADP w hipoksji w świeżych mitochondriach i w mitochondriach po sonifikacji.

Tabela 16. Wpływ hipoksji na aktywność IDH NADP w mitochondriach mózgu.

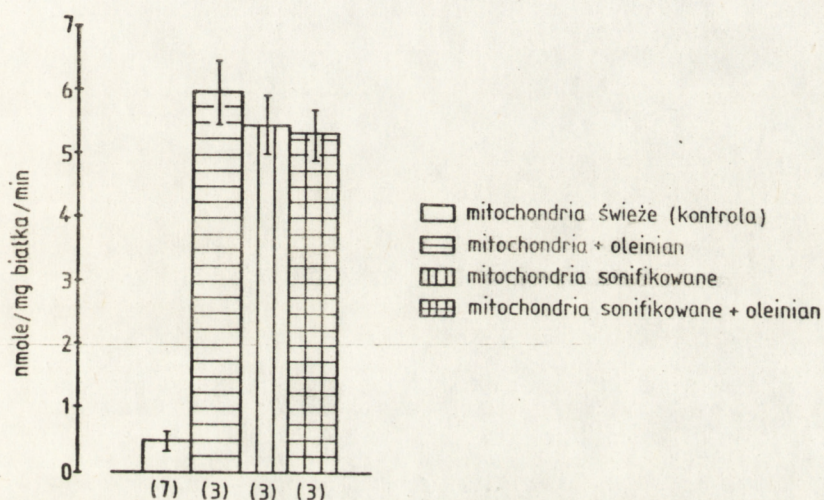
	nmole NADPH/mg białka/min	
	Świeża frakcja mitochondrialna	Frakcja mitochondrialna po sonifikacji
Norma /kontrolna/	0.52 $\pm$ 0.12 /6/	5.50 $\pm$ 0.69 /3/
Hipoksja	0 /3/	3.30 $\pm$ 0.76 /3/

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 40  $\mu$ moli; MgCl<sub>2</sub>, 18  $\mu$ moli, izocytrynian, 0.6  $\mu$ moli, NADP, 0.5  $\mu$ mola, białko, 1.5 mg; KCN, 1 mM.

Wartości są średnimi  $\pm$  SD z liczby doświadczeń podanych w nawiasach.

Wg Rafałowska, Gromek /157/.

Stwierdzono również, że dodatek oleinianu do świeżych mitochondriów powoduje ujawnianie się większej aktywności IDH NADP w świeżej frakcji mitochondrialnej nie dając już dodatkowego wzrostu aktywności w mitochondriach po ich sonifikacji /ryc. 25/.



Ryc. 25. Wpływ oleinianu i sonifikacji na aktywność IDH NADP we frakcji mitochondrialnej mózgu.

Skład mieszaniny inkubacyjnej był taki jak w opisie pod tabelą 16. Stężenie oleinianu wynosiło 200  $\mu$ moles/mg białka mitochondriów. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla liczby doświadczeń podanych w nawiasach.

Wg Rafałowska, Gromek /157/.

Można zatem sądzić, że obserwowany wzrost aktywności IDH NADP w cytosolu w warunkach hipoksji z jednoczesnym spadkiem jej aktywności we frakcji mitochondrialnej może być spowodowany częściowym przejściem enzymu z mitochondriów do cytoplazmy. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane ze zmianami strukturalnymi w błonie mitochondrialnej pod wpływem wolnych kwasów tłuszczowych gromadzących się w czasie niedotlenienia. Dodatkowym

dowodem przejścia części enzymu mitochondrialnego do cytosolu jest pojawienie się drugiego prążka z aktywnością IDH NADP w elektroforezie częściowo oczyszczonych preparatów enzymu otrzymanego ze zwierząt poddanych niedotlenieniu /ryc. 26/. Ruchliwość tego prążka odpowiada ruchliwości mitochondrialnej IDH NADP /porównanie z ryc. 3, S<sub>3</sub>, C/.



Ryc. 26. Elektroforeza dehydrogenazy izocytrynianowej na żelu poliakrylamidowym.

A - enzym otrzymany z mózgu zwierząt poddanych niedotlenieniu

B - enzym otrzymany z mózgu zwierząt przebywających w normalnych warunkach.

Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń.

Wg Rafałowska, wyniki niepublikowane.

Oczyszczona elektroforetycznie cytoplazmatyczna IDH NADP pochodząca z mózgów zwierząt poddanych hipoksji wykazuje taką samą aktywność jak enzym wydzielony i oczyszczony z mózgu szczurów kontrolnych /normalne warunki/. Również ciężar cząsteczkowy "hipoksyjnej" IDH NADP pozostaje taki sam jak w normie /80.000 w niskiej sile jonowej i  $165.000 \pm 3.000$  / $n = 3$ / odpowiadającej "fizjologicznym" stężeniom soli. Wg Rafałowska, Pastuszko /167/.

Pomimo, że aktywność enzymów utleniających cytrynian w cytosolu do  $\alpha$  ketoglutaranu a następnie glutaminianu i szczawiooctanu /schemat 7/ nie malały w hipoksji, to zaobserwowano w tych warunkach spadek poziomu końcowego produktu badanego ciągu reakcji - glutaminianu. W warunkach narkozy poziom glutaminianu nie zmieniał się w stosunku do normy /Tabela 17/.

Tabela 17. Wpływ hipoksji i anestezji na poziom glutaminianu w cytosolu mózgu.

	umole glutaminianu w całej próbce	
	endogenny	po reakcji utleniania cytrynianu
Kontrola /norma/	$0.262 \pm 0.009$ /3/	$0.890 \pm 0.004$ /3/
Hipoksja	$0.221 \pm 0.007$ /3/ <sup>x</sup>	$0.760 \pm 0.001$ /3/ <sup>x</sup>
Anestezja	$0.257 \pm 0.009$ /3/	$0.891 \pm 0.001$ /3/

Reakcja enzymatycznego utleniania cytrynianu prowadzona była w mieszaninie zawierającej Tris-HCl, pH 7.3, 64,umole; MnSO<sub>4</sub>, 22.5,umola; NADP, 0.5,umola; izocytrynian 1.0,umol; białko<sup>4</sup> frakcji cytosolu 2 mg. Czas inkubacji 60 min. Stężenie glutaminianu po reakcji było oznaczane jako różnica między uzyskaną wartością a ilością endogennego glutaminianu. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla liczby doświadczeń podanej w nawiasach. W stosunku do normy  $p < 0.05$ , pozostałe statystycznie nieznamiennie.

Wg Rafałowska, Gromek /157/.

Powyższe dane i fakt, że ilość dostarczanego do reakcji cytrynianu była optymalna oraz to, że po dodaniu asparaginianu do cytosolu otrzymanego ze zwierząt "hipoksyjnych" zużycie cytrynianu było takie jak w normie /ryc. 24/ pozwalały sądzić, że zasadniczą przyczyną zmian obserwowanych w hipoksji może być spadek stężenia asparaginianu w cytosolu.

Przypuszczenia te zostały potwierdzone przez wyniki kolejnych doświadczeń. Wykazano w nich, że przetrzymywanie zwierząt w ciągu 30 min w warunkach niskiej zawartości tlenu powoduje spadek poziomu asparaginianu we frakcji cytosolu mózgu o około 60% wartości kontrolnej. W warunkach narkozy jak również w przypadku kiedy stosowano hipoksję i narkozę jednocześnie poziom asparaginianu nie ulegał zmianie. Hipoksja i narkoza nie wpływały na zmianę poziomu cytrynianu. Poziom  $\alpha$  ketoglutaranu nieznacznie wzrastał w warunkach niedotlenienia /Tabela 18/.

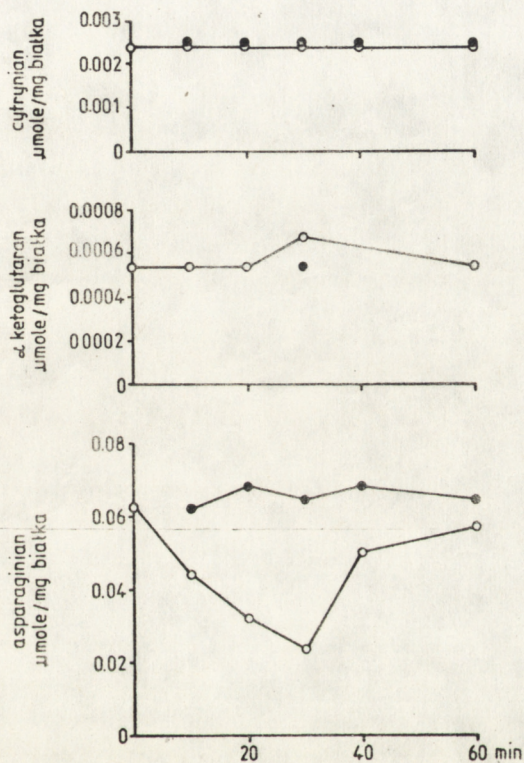
Tabela 18. Poziom asparaginianu, cytrynianu i  $\alpha$  ketoglutaranu w cytosolu mózgu w warunkach normy, hipoksji i narkozy.

Warunki	nmole/mg białka					
	Asparaginian		Cytrynian		$\alpha$ ketoglutaran	
Norma	62.00 $\pm$ 0.00	/4/	2.27 $\pm$ 0.00	/4/	0.51 $\pm$ 0.01	/4/
Hipoksja	24.96 $\pm$ 3.16 <sup>x</sup>	/5/	2.27 $\pm$ 0.00	/4/	0.62 $\pm$ 0.00 <sup>x</sup>	/4/
Anestezja	61.96 $\pm$ 0.00	/5/	2.22 $\pm$ 0.00	/4/	0.52 $\pm$ 0.00	/4/
Hipoksja + Anestezja	58.85 $\pm$ 0.00 <sup>x</sup>	/4/	2.22 $\pm$ 0.00	/4/	0.51 $\pm$ 0.01	/4/

Wartości średnie  $\pm$  SD dla liczby doświadczeń podanej w nawiasach. W stosunku do normy <sup>x</sup>  $p < 0.05$ , pozostałe statystycznie nieznamiennie.

Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Obserwowany spadek ilości asparaginianu zależny był od czasu hipoksji, której poddawano zwierzęta /ryc. 27/.



Ryc. 27. Wpływ czasu hipoksji oraz powrotu z hipoksji do normy /recovery/ na poziom cytrynianu,  $\alpha$  ketoglutaranu i asparaginianu w cytosolu mózgu.

Przykład jednego z 4-ch doświadczeń.

Powrót hipoksji do normy osiągnęto przenosząc zwierzęta z warunków niedotlenienia do warunków normalnego stężenia tlenu na 10 min.

○ - hipoksja; ● - normalne warunki

Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Największy spadek poziomu asparaginianu obserwowano po 30 min hipoksji. Po tym czasie poziom związku wzrastał osiągając po 60 min wartość kontrolną. Kiedy zwierzęta po niedotlenieniu przenoszono do warunków prawidłowych poziom asparaginianu nieznacznie wzrastał ponad wartości kontrolne.

Kolejne badania prowadzono w kierunku wyjaśnienia przyczyn tak istotnego zmniejszenia poziomu asparaginanu w cytosolu mózgu w warunkach niedotlenienia.

Wykazano, że zmiany zawartości asparaginanu w cytosolu nie wiążą się z jego przemieszczaniem do mitochondriów. Poziom asparaginanu we frakcji mitochondrialnej mózgu nie zmieniał się w warunkach hipoksji. Obniżenie poziomu tego związku w supernatancie /po 600 x g/ w warunkach hipoksji odpowiada zmniejszeniu cytosolowej puli tego substratu /Tabela 19/.

Tabela 19. Rozmieszczenie asparaginanu w subkomórkowych frakcjach mózgu w normie i hipoksji.

Warunki	Frakcja	Białko	%	Asparagi- nian nmole/mg białka	Asparagi- nian nmole/cał- kowite białko	%
Norma	Supernatant /po 600xg/	46.0	100	36.00	1656.00	100
	Cytosol	22.0	48.0	62.00	1364.00	83.0
	Mitochond- rialna frakcja	15.2	33.0	23.50	356.00	21.6
	Mikrosomalna frakcja	8.2	17.8	0.0	0.0	0.0
	Odzysk		98.8			104.6
Hipoksja	Supernatant /po 600xg/	44.0	100	20.60	908.00	100
	Cytosol	23.1	52.6	25.20	579.00	62.8
	Mitochondrial- na frakcja	15.1	34.4	23.70	359.00	39.5
	Mikrosomalna frakcja	8.1	18.4	0.0	0.0	0.0
	Odzysk		105.4			102.3

Dane są wartościami jednego z 3 doświadczeń.  
Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Spadek poziomu asparaginianu w cytosolu w czasie hipoksji mógł być konsekwencją wzrostu jego zużycia w innych szlakach metabolicznych. Produktami metabolizmu asparaginianu poza glutaminianem i szczawiooctanem /Schemat 7/ są mocznik i karbamyloasparaginian. Stężenie karbamyloasparaginianu w cytosolu pozostaje w warunkach hipoksji i narkozy praktycznie niezmienione. Poziom mocznika wzrasta w niedotlenieniu o około 25% w porównaniu do wartości kontrolnych, w anestezji zmieniając się jedynie nieznacznie /Tabela 20/.

Tabela 20. Poziom mocznika i karbamyloasparaginianu w cytosolu w warunkach normy, hipoksji i narkozy.

Warunki	nmole/mg białka	
	Mocznik	Karbamylo- asparaginian
Norma	111.22 $\pm$ 3.16 /5/	2.56 $\pm$ 0.00 /6/
Hipoksja	137.33 $\pm$ 8.36 /6/ <sup>x</sup>	2.46 $\pm$ 0.01 /6/
Narkoza	102.60 $\pm$ 3.16 /5/ <sup>x</sup>	2.61 $\pm$ 0.00 /6/

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanej w nawiasach. W stosunku do normy <sup>x</sup> $p < 0.05$ , pozostałe statystycznie nieznamiennie.

Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Poziom asparaginianu we krwi wypływającej z mózgów zwierząt poddanych hipoksji był o około 25% wyższy od wartości kontrolnych. Efektu tego nie obserwowano w warunkach anestezji /Tabela 21/.

Tabela 21. Poziom asparaginianu we krwi wypływającej z mózgu w warunkach normy, hipoksji i anestezji.

Nr doświadczenia /zwierzęcia/	nmole asparaginianu/ml odbiałzonej surowicy		
	Norma	Hipoksja	Anestezja
1	23,20	30,40	20,88
2	24,40	30,40	26,84
3	21,60	26,00	21,60
Srednio	23,10	28,90	23,10

Oznaczenia asparaginianu we wszystkich warunkach były prowadzone na tym samym zwierzęciu zgodnie z opisem podanym w metodach.

Wg Rafałowska i wsp. /158/.

Powyższe badania przemawiają za tym, że zmniejszenie utleniania cytrynianu we frakcji cytosolu mózgu szczura w warunkach hipoksyjnej hipoksji jest spowodowane spadkiem poziomu endogenego asparaginianu. Obniżona zawartość asparaginianu wiąże się ze zwiększonym jego pobieraniem do syntezy mocznika, jak również wzmożonym przechodzeniem do krwioobiegu.

Narkoza, jak wykazano, zapobiega zmianom wywołanym w niedotlenieniu.

### 2.3. Transport cytrynianu i jabłczanu przez błonę mitochondriów perikarionów mózgu w warunkach niedotlenienia.

Brak zmian w ilości cytrynianu w cytosolu w warunkach hipoksji /Tabela 18/ z jednoczesnym zmniejszeniem jego zużycia w ciągu reakcji zależnych od IDH NADP /Ryc. 24/ nasuwał przypuszczenie, że w niedotlenieniu uruchamiają się dodatkowe mechanizmy pozwalające na utrzymanie ilości cytrynianu na stałym poziomie. Mogły nimi być: zwiększone w warunkach niedotlenienia zużycie cytrynianu przy udziale liazy cytrynianowej ATP-zależnej, zmniejszona synteza cytrynianu w mitochondriach zależna od syntazy cytrynianowej, zahamowanie transportu cytrynianu z mitochondriów do cytosolu. Jak widać z tabeli 22 aktywności liazy cytrynianowej ATP zależnej i syntazy cytrynianowej w subfrakcjach mózgowych nie zmieniają się w warunkach hipoksji w porównaniu do warunków normalnych /tabela 22/.

Duże zmiany natomiast zaobserwowano w niedotlenieniu w transporcie cytrynianu przez błonę mitochondrialną i temu zagadnieniu poświęcono więcej uwagi.

W pierwszej kolejności sprawdzono czy stosowane warunki hipoksji jak również narkozy nie zmieniają integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej i czy mitochondria otrzymywane ze zwierząt niedotlenionych lub anestetyzowanych nie są bardziej od kontrolnych zanieczyszczone innymi frakcjami subkomórkowymi. Nie stwierdzono zmian w aktywnościach fumarazy i LDH w mitochondriach po hipoksji i narkozie w stosunku do kontroli. Również aktywność fumarazy w nieobecności Tritonu X-100 była bardzo niska we wszystkich warunkach doświadczalnych /tabela 23/.

Tabela 22. Aktywność enzymów metabolizujących cytrynian w subkomórkowych frakcjach mózgu w warunkach normy, hipoksji i narkozy /nmole/mg białka/min/.

Rodzaj enzymu	Norma				Hipoksja				Narkoza			
	C	S <sub>3</sub>	W <sub>p</sub>	W <sub>s</sub>	C	S <sub>3</sub>	W <sub>p</sub>	W <sub>s</sub>	C	S <sub>3</sub>	W <sub>p</sub>	W <sub>s</sub>
Syntaza cytrynianowa	220,0 +20,0 /5/	0  /5/	180,0 +11,0 /5/	0  /5/	218,0 +25,0 /5/	0  /5/	180,0 +15,0 /5/	0  /5/	217,2 +24,0 /5/	0  /5/	185,9 +10,0 /5/	0  /5/
Liaza cytrynianowa ATP-zależna	0.45 +0.01 /5/	1.52 +0.01 /5/	0.30 +0.01 /5/	1.50 +0.01 /5/	0.48 +0.009 /5/	1.50 +0.010 /5/	0.32 +0.01 /5/	1.55 +0.00 /5/	0.38 +0.015 /5/x	1.49 +0.010 /5/	0.30 +0.000 /5/	1.55 +0.00 /5/

Nazwy frakcji zgodnie z opisem Ryc.1 oznaczają:

C - frakcja mitochondrialna, S<sub>3</sub> - cytosol, W<sub>p</sub> - cząstkowa frakcja synaptosomów, W<sub>s</sub> - rozpuszczalna frakcja synaptosomów.

Wartości są średnimi  $\pm$  SD z ilości doświadczeń podanych w nawiasach. W stosunku do normy jedynie  $x_p < 0.05$ , w pozostałych  $p > 0.05$ .

Wg Rafałowska /168/.

Tabela 23. Porównanie aktywności fumarazy i LDH we frakcjach mitochondrialnych otrzymanych ze zwierząt kontrolnych, poddanych hipoksji i narkozie.

	umole/mg białka/ min					
	Norma		Hipoksja		Narkoza	
	+ Triton X-100		+ Triton X-100		+ Triton X-100	
Fumaraza	$0.005 \pm 0.00$ /4/	$0.720 \pm 0.001$ /4/	$0.006 \pm 0.010$ /3/	$0.718 \pm 0.001$ /3/	$0.005 \pm 0.001$ /3/	$0.720 \pm 0.006$ /3/
LDH	$0.185 \pm 0.002$ /3/	$0.232 \pm 0.002$ /3/	$0.191 \pm 0.006$ /3/	$0.235 \pm 0.003$ /3/	$0.178 \pm 0.006$ /3/	$0.238 \pm 0.06$ /3/

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach,  $p > 0.05$ .

Wg Rafałowska /165/.

Transport jabłczanu i cytrynianu przez błonę mitochondriów uzyskanych ze zwierząt po hipoksji i narkozie zachodził liniowo do 2 min inkubacji /jabłczan/ i do 4 min inkubacji /cytrynian/ zgodnie z kinetyką charakterystyczną dla transportu tych związków w warunkach normy /ryc. 18 A, B/. Jednakże ilość pobranego przez mitochondria cytrynianu lub jabłczanu spadała o około 60% w warunkach hipoksji i około 40% w narkozie. Kiedy poddano hipoksji zwierzęta anestetyzowane /hipoksja + anestezja/ zmiany były podobne do uzyskanych w niedotlenieniu /tabela 24/.

Tabela 24. Wpływ hipoksji, narkozy i hipoksji skojarzonej z barbituranem na transport jabłczanu i cytrynianu do mitochondriów.

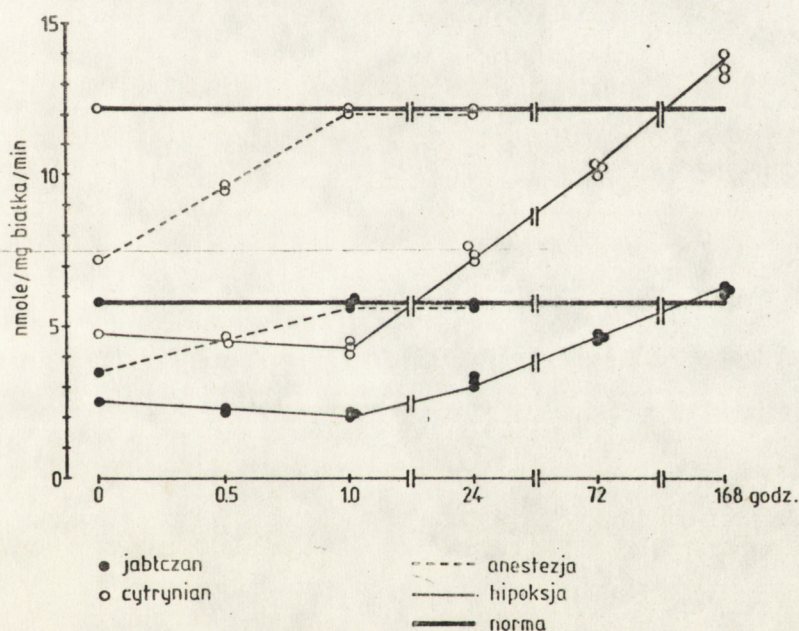
		nmole/mg białka/min			
		Norma	Hipoksja	Narkoza	Hipoksja w narkozie
A.	$^{14}\text{C}$ jabłczan	5.81+0.12 /8/	2.25+0.17 /6/	3.49+0.13 /4/	2.15+0.10 /3/
B.	$^{14}\text{C}$ cytrynian	12.15+0.16 /8/	4.86+0.18 /6/	7.27+0.05 /4/	4.79+0.09 /4/

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M scharozę, 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 24  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu; 1,25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny; 10 mM Pi; 1 mg białka, 1 mM jabłczanu i 1 mM  $^{14}\text{C}$  cytrynian /A/ lub 1 mM  $^{14}\text{C}$  jabłczan /B/.

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach, w stosunku do normy  $p < 0.05$ .

Wg Rafałowska /165/.

Wywołane warunkami hipoksji i narkozy obniżenie transportu jabłczanu i cytrynianu przez błonę mitochondrialną powracało do normy kiedy zwierzęta po doświadczeniu przenoszono do normalnego stężenia tlenu. Transport do mitochondriów pochodzących z anestetyzowanych zwierząt powracał do normy już po jednej godzinie przebywania zwierząt w warunkach prawidłowych. W przypadku hipoksji powrót do normy wymagał kilku dni /ryc. 28/.



Ryc. 28. Wpływ powrotu z hipoksji i narkozy do warunków prawidłowych /recovery/ na transport cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów.

Warunki inkubacji jak w opisie dla tabeli 24. Wartości dla normy są średnimi z doświadczeń przedstawionych w tabeli 24. Wartości dla powrotu do normy prezentują poszczególne doświadczenia.

Wg Rafałowska /165/.

Wydawało się prawdopodobne, że za zaburzenia w transporcie badanych pośredników cyklu Krebsa mogą być odpowiedzialne kwasy tłuszczowe, które nagromadzają się w czasie niedotlenienia,

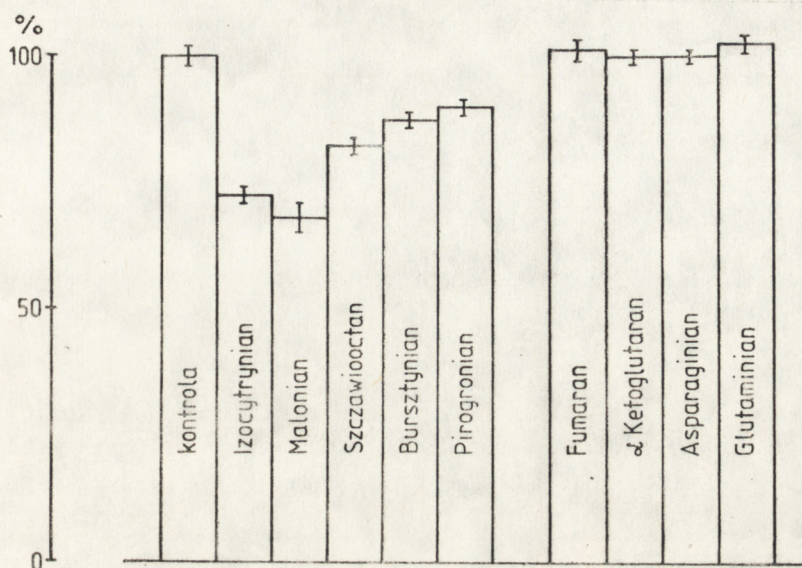
zmieniając być może przepuszczalność błony. Jednakże dodatek oleinianu do frakcji mitochondrialnej nie wywierał wpływu na badany transport. Podobnie dodatek albuminy w czasie preparatyki mitochondriów nie zapobiegał obniżeniu akumulacji jabłczanu i cytrynianu w mitochondriach /tabela 25/.

Tabela 25. Wpływ oleinianu i albuminy na transport jabłczanu i cytrynianu do mitochondriów.

		Jabłczan %	Cytrynian %
Norma	Mitochondria	100,0	100,0
	Mitoch.+oleinian 50 nmoli/mg b	99,9	100,0
	Mitoch.+oleinian 100 nmoli/mg b	100,0	101,0
	Mitoch.+oleinian 200 nmoli/mg b	95,8	96,0
Hipok- sja	Mitochondria	100,0	100,0
	Mitochondria preparowane z albuminą /0,5%/	101,1	99,2

Warunki inkubacji są zgodne z danymi dla tabeli 24.  
Wartości są średnimi z 3 doświadczeń. SD we wszystkich przypadkach był niższy od 1%.  
Wg Rafałowska /165/.

Wykazano, że transport cytrynianu jest hamowany przez szereg metabolitów takich jak: izocytrynian, malonian, szczawiooctan, bursztynian i pirogronian. Asparaginian,  $\alpha$ -ketoglutaran, fumaran i glutaminian nie mają wpływu na transport cytrynianu /ryc. 29/.



Ryc. 29. Wpływ dwu i trójkarboksylanów na transport cytrynianu do mitochondriów.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 24  $\mu$ g/ml rotenonu; 1.25  $\mu$ g/ml antymycyny; 10 mM Pi, 1 mM jabłczan, 1 mM  $^{14}$ C cytrynian, 1 mg białka oraz dodawane metabolity, wszystkie w stężeniach 1 mM. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla 3 doświadczeń. W stosunku do kontroli - 1-sza grupa związków  $p < 0.05$ , pozostałe  $p > 0.05$ .  
Wg Rafałowska /165/.

Transport jabłczanu przez błonę mitochondrialną jest zależny od dostępności grup -SH.

Wynika to z badań, w których obserwowano wpływ mersalyłu na transport tego związku w warunkach normalnych i w hipoksji /tabela 26/. W mitochondriach izolowanych ze zwierząt kontrolnych /normalne warunki/ i poddanych anestezji mersalyl obniżał transport jabłczanu o około 50%, podczas gdy w mitochondriach otrzymanych ze zwierząt poddanych hipoksji jedynie o około 14%.

Tabela 26. Wpływ mersalyłu na pobranie jabłczanu przez mitochondria

	Norma		Hipoksja Jabłczan		Anestezja	
	nmole/mg białka/min	%	nmole/mg białka/min	%	nmole/mg białka/min	%
A - mersalyl	$5.92 \pm 0.03$ /4/	100,0	$2.30 \pm 0.08$ /4/	100,0	$3.95 \pm 0.05$ /4/	101,0
B + mersalyl	$3.00 \pm 0.08$ /4/	50,7	$1.98 \pm 0.05$ /4/	86,1	$1.88 \pm 0.03$ /4/	47,6

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0.25 M sacharozę; 0.5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 24 µg/ml rotenonu; 1,25 µg/ml antymycyny; 10 mM Pi, 1 mM  $^{14}\text{C}$  jabłczan oraz w B - 1 mM mersalyl.

Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach.  
W stosunku do normy  $p < 0.05$ .

Wg Rafałowska /165/.

## 2. 4. Wpływ hipoksji na właściwości synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych

Starano się wyjaśnić czy hipoksja zmienia podstawowe parametry synaptosomów; stężenia związków energetycznych, pirogronianu, mleczanu, 3 hydroksymaślanu i acetylooctanu, i czy wpływa na pobranie tlenu przez synaptosomy /oddychanie synaptosomów/.

W tabeli 27 zestawiono wartości stężeń metabolitów w synaptosomach izolowanych z mózgów zwierząt anestetyzowanych i nieanestetyzowanych poddanych 30 min hipoksji.

Podane wartości można porównać z odpowiednimi danymi dla synaptosomów uzyskanych ze zwierząt anestetyzowanych i nieanestetyzowanych.

Tabela 27. Stężenia metabolitów w synaptosomach izolowanych z mózgów narkotyzowanych i nienarkotyzowanych szczurów poddanych hipoksji

umole/ml wewnątrz-synaptosomalnej H <sub>2</sub> O	Hipoksja	
	Nieanestetyzowane	Anestetyzowane
ATP	1.16 ± 0.66 /3/ <sup>x</sup>	2.76 ± 0.24 /3/
ADP	0.45 ± 0.15 /5/ <sup>x</sup>	0.37 ± 0.05 /3/
Pi	4.14 ± 0.26 /3/ <sup>x</sup>	2.71 ± 0.09 /3/
CrP	1.06 ± 0.40 /3/ <sup>x</sup>	1.95 ± 0.48 /3/
Cr	4.03 ± 0.48 /3/ <sup>x</sup>	3.14 ± 1.25 /3/
umole/ml mieszaniny inkubacyjnej		
3 hydroksymaślan	29.06 ± 6.73 /3/	6.26 ± 1.73 /3/
acetylooctan	16.07 ± 4.99 /3/	2.24 ± 1.39 /3/
Pirogronian	38.66 ± 5.92 /3/	11.25 ± 4.78 /3/
Mleczan	175.76 ± 4.09 /3/	62.60 ± 12.32 /3/

Warunki oznaczeń były takie same jak w tabeli 10-tej. Wartości są średnimi ±SD dla ilości doświadczeń podanej w nawiasach.

<sup>x</sup>różnice statystycznie nieznamiennie w stosunku do wartości kontrolnych /zwierzęta w warunkach normalnych, tab.10/ p > 0.05.

Wg Rafałowska i wsp. /170/.

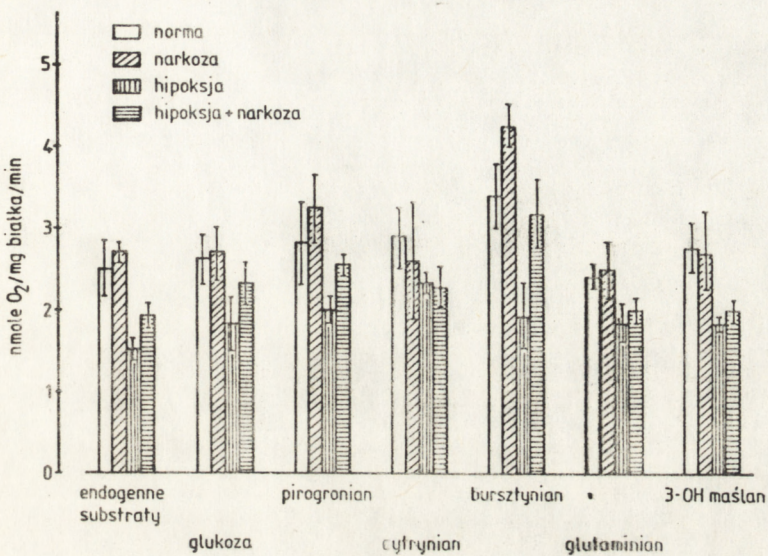
wanych przebywających w warunkach normalnych /nie poddanych hipoksji/. Dane powyższe przedstawiono wcześniej w tabeli 10-tej. Porównanie odpowiednich wartości w tabeli 27 i w tabeli 10-tej wskazuje, że w hipoksji stężenie ATP nieznacznie obniża się, a stężenie Pi nieznacznie rośnie w przypadku zwierząt anestetyzowanych. W grupie zwierząt nieanestetyzowanych obserwowane różnice<sup>\*</sup> były statystycznie nieznamiennie. Podobne zmiany obserwowano w przypadku fosfokreatyny i kreatyny. Stężenia 3 hydroksymaślanu, acetylooctanu, mleczanu i pirogronianu były wyższe w synaptosomach z mózgów "hipoksyjnych" zwierząt od stężeń w preparatach otrzymanych ze zwierząt normalnych.

Na ryc. 30 zobrazowano oddychanie synaptosomów w obecności różnych substratów w warunkach normy, anestezji, hipoksji i hipoksji skojarzonej z anestezją.

W przypadku takich substratów jak glukoza, pirogronian, cytrynian, glutaminian czy hydroksymaślan oddychanie w warunkach narkozy było takie jak w normie. Jedynie bursztynian utleniał się w tych warunkach nieco szybciej.

Hipoksja obniżała statystycznie znamienne / $p < 0.05$ / utlenianie wszystkich badanych substratów, największy efekt obserwowano w przypadku bursztynianu /50% inhibicji/, a najmniejszy w przypadku cytrynianu. Narkoza stosowana razem z niedotlenieniem odwracała częściowo zmiany występujące w hipoksji, jednakże zmiany obserwowane w stosunku do zaburzeń w hipoksji dla takich substratów jak glukoza, pirogronian, cytrynian, glutaminian i hydroksymaślan były statystycznie nieznamiennie / $p > 0.05$ /.

Stan redukcji cytochromu c w hipoksji wyrażony w procentach całej zawartości cytochromu wynosił około 10.



Ryc. 30. Oddychanie synaptosomów w obecności różnych substratów w warunkach normy, hipoksji, narkozy i hipoksji skojarzonej z narkozą.

Wyniki są średnimi wartościami  $\pm$  SD z 3 eksperymentów. Hipoksja oraz hipoksja + narkoza w obecności bursztynianu  $p < 0.05$ , hipoksja + narkoza dla pozostałych substratów  $p > 0.05$ .

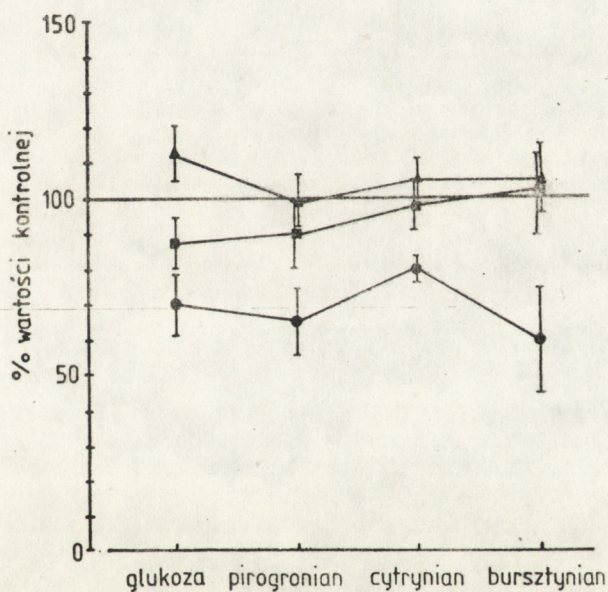
Wg Rafałowska i wsp. /170/.

Obserwowane w hipoksji obniżenie oddychania synaptosomów jest zależne od czasu niedotleniania zwierząt.

Na ryc. 31 przedstawiono aktywność oddychania /wyrażona jako procent wartości kontrolnej/ synaptosomów otrzymanych ze zwierząt poddanych 30 minutowej i 60 minutowej hipoksji oraz ze zwierząt po 30 min hipoksji przeniesionych do warunków prawidłowych na okres 1 godziny.

Inhibicja oddychania w synaptosomach w przypadku 30 min hipoksji jest większa niż po godzinie niedotlenienia, kiedy to praktycznie oddychanie powraca do normy. Również przeniesienie zwierząt do

normalnych warunków po 30 min hipoksji powoduje powrót oddychania do wartości równych normie.



Ryc. 31. Wpływ czasu hipoksji i powrotu do warunków normalnych /recovery/ na oddychanie synaptosomów izolowanych z mózgów nieanestetyzowanych głodzonych szczurów.

Wyniki są średnimi wartościami  $\pm$  z 3 doświadczeń.

● - 30 min hipoksja;

■ - 60 min hipoksja;

▲ - 30 min hipoksja i 60 min powrót do warunków normalnych.

Wg Rafałowska i wsp. /170/.

Intensywność oddychania synaptosomów zależna jest także od tego czy zwierzęta są głodzone /jak to miało miejsce w powyższych doświadczeniach/ czy też są normalnie odżywiane przed rozpoczęciem doświadczenia.

U zwierząt niegłodzonych 24 godz. przed rozpoczęciem doświadczenia w ogóle nie obserwowano zmian w oddychaniu synaptosomów w warunkach hipoksji i narkozy w stosunku do normy.

Na podstawie powyższych danych można sądzić, że zmiany wywołane warunkami hipoksji w podstawowych parametrach charakterystycznych dla synaptosomów są niewielkie i szybko powracające do normy. Transport cytrynianu do synaptosomów po hipoksji zwierząt i do izolowanych z nich mitochondriów synaptosomalnych obrazują dane w tabeli 28.

Hipoksja zmniejsza transport cytrynianu do synaptosomów i mitochondriów synaptycznych o około 20% w stosunku do warunków kontrolnych. Są to zmiany o 40% mniejsze od obserwowanych w przypadku mitochondriów perikarionów /Tabela 24/.

Narkoza nie miała wpływu na transport w porównaniu z normą. Zastosowanie hipoksji w narkozie dawało zmiany zbliżone do obserwowanych w niedotlenieniu.

Tabela 28. Maksymalna akumulacja i czas maksymalnej akumulacji  $^{14}\text{C}$  cytrynianu w synaptosomach i izolowanych mitochondriach synaptosomalnych w warunkach normy, hipoksji, narkozy i w hipoksji skojarzonej z narkozą.

	Czas maksymalnej akumulacji min	Maksymalna akumulacja $^{14}\text{C}$ cytrynianu nmole/mg białka			
		Norma	Hipoksja	Narkoza	Hipoksja + narkoza
A. Synaptosomy	10	$7,6 \pm 0,21$ /3/	$6,0 \pm 0,08$ /3/	$7,8 \pm 0,08^x$ /3/	$6,3 \pm 0,09$ /3/
B. Mitochondria synaptosomalne	1	$10,0 \pm 0,09$ /3/	$8,1 \pm 0,91$ /3/	$10,9 \pm 0,05^x$ /3/	$8,3 \pm 1,01$ /3/

Mieszanina inkubacyjna zawierała /A/: Krebs-Tris/124 mM NaCl; 5 mM HCl; 1,2 mM  $\text{KHPO}_4$ ; 0,75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 26 mM Tris-HCl pH 7.4/ oraz 1 mM jabłczan, 1 mM  $^{14}\text{C}$  cytrynian, 2,4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu; 1,25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny. /B/ 250 mM sacharozę, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM fosforan sodu; 0.5 mM EDTA oraz 2,4  $\mu\text{g/ml}$  rotenonu, 1.25  $\mu\text{g/ml}$  antymycyny, 1 mM jabłczan i 1 mM  $^{14}\text{C}$  cytrynian. Wartości są średnimi  $\pm$  SD dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach. W stosunku do normy  $x_p > 0.05$ , w pozostałych  $p < 0.05$ .

Wg Rafałowska, wyniki niepublikowane.



W mózgu podobnie jak w wątrobie /159/ cytrynian zajmuje centralną pozycję w ogólnym metabolizmie komórki. Podstawowe szlaki metaboliczne cytrynianu w mózgu, choć zbliżone do poznanych wcześniej w przypadku wątroby, posiadają szereg cech specyficznych, swoistych jedynie dla centralnego układu nerwowego.

Jak zaznaczone we wstępie cytrynian syntetyzowany jest przede wszystkim w mitochondriach, gdzie jest tylko częściowo metabolizowany w cyklu Krebsa. Duża pula tego związku utleniana jest w cytosolu gdzie staje się on prekursorem procesów syntezy /schemat 8/. Transport cytrynianu z mitochondriów do cytoplazmy jest zatem niezwykle ważnym czynnikiem regulującym metabolizm cytrynianu w całej komórce a zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do poważnych zmian metabolicznych.

Frakcja mitochondrialna mózgu, na której prowadzono badania dotyczące transportu cytrynianu przez błonę mitochondrialną była jedynie nieznacznie zanieczyszczona innymi subfrakcjami komórkowymi, o czym świadczy niska aktywność LDH. Bardzo niska aktywność fumarazy, wzrastająca znacznie po dodaniu Tritonu X-100 jest dowodem, że wewnętrzna błona mitochondrialna nie ulega uszkodzeniu podczas preparatyki /Tabela 6/. Wysoka zdolność mitochondriów do utleniania egzogenego cytrynianu dowodzi także, że została zachowana funkcjonalna integralność mitochondriów.

Z przedstawionych danych wynika, że "dobre" mózgowe mitochondria posiadają zdolność szybkiej akumulacji cytrynianu i jabłczanu /161, 162, 163/.

Wyniki zebrane w tabeli 7 wykazały, że jabłczan może przechodzić przez błonę mitochondrialną w wyniku wymiany zarówno z Pi jak i z cytrynianem. Fakt, że transport jabłczanu w wymianie z Pi jest hamowany przez butylomalonian, który nie wpływa na wymianę jabłczan/cytrynian, sugeruje obecność dwóch niezależnych przenośników, w mitochondriach mózgu, swoistych dla kwasów dwukarbo-

ksylowych i trójkarboksylowych podobnie jak w mitochondriach wątroby /144/. Podobnie jak w wątrobie wymiana zewnątrzmitochondrialnego cytrynianu z wewnątrzmitochondrialnym jabłczanem zachodzi w mózgu w stosunku 1:1 /tabela 8/.

Jednakże akumulacja /wejście/ cytrynianu do mitochondriów mózgu zachodzi znacznie szybciej /4 min/ /ryc. 18/ niż w mitochondriach wątroby, kiedy uzyskiwano maksymalne nagromadzenie po 20 min inkubacji. Wydaje się, że różnice te mogą wynikać z szybszego uszkodzenia mózgowych mitochondriów, podczas inkubacji w temp. 25°C. Po 20 min inkubacji w mitochondriach mózgu aktywność fumarazy wzrasta o około 20% w porównaniu do mitochondriów kontrolnych i do mitochondriów po 4 min inkubacji.

Optymalny czas wejścia do mitochondriów dodanego jabłczanu jest krótszy niż cytrynianu. Już po 2 min osiąga on maksymalne wartości, które utrzymują się do 4 min inkubacji. Także jednoczesne dodanie do mieszaniny inkubacyjnej mitochondriów jabłczanu i cytrynianu w środowisku Pi powoduje szybsze wejście jabłczanu a następnie jego wyjście w wymianie z cytrynianem. Akumulacja obydwu badanych pośredników cyklu Krebsa jest funkcją egzogennych stężeń tych związków.

System transportujący jest wysycony przez cytrynian przy wartości stałej Michaelisa  $K_m = 4.55$  /ryc. 19/. Wartość ta jest zbliżona do podawanej przez Patel'a /147/ dla utleniania dodanego cytrynianu w mitochondriach mózgu, ale jest znacznie wyższa od wartości  $K_m$  dla mitochondriów wątroby [ $K_m = 1.3$  mM /228/,  $K_m = 0.12$  mM /142/].

Biorąc pod uwagę tak wysoką wartość  $K_m$  dla transportu cytrynianu do mitochondriów mózgu i jednocześnie niską zawartość tego związku w całym mózgu /około 0.3  $\mu$ mole/g/ /68/ można sądzić, że in vivo transport cytrynianu do mitochondriów mózgu jest raczej

niewielki. Nie jest wykluczone, że transport tego związku z mitochondriów do cytoplazmy może być większy. Wg Maxa i wsp. /125/, którzy prowadzili badania na wątrobie aktywność przenośników transportujących pośredniki cyklu Krebsa może być różna, w zależności od tego, czy jest to transport do czy z mitochondriów.

Omówione wyżej dane dotyczyły mechanizmu transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów. Wiadomo jednak, co podkreślano na wstępie tego opracowania, że w synaptosomach związek ten syntetyzowany w mitochondriach synaptosomalnych poza dostarczeniem reszt acetylowych do syntezy kwasów tłuszczowych, może być również prekursorem acetyloCoA dla syntezy acetylocholine w synaptoplazmie. Powstało zatem pytanie czy transport cytrynianu przez błonę mitochondriów synaptosomalnych zachodzi w taki sam sposób jak w mitochondriach perikarionów.

Przeprowadzenie analizy porównawczej wymagało uzyskania możliwie najczystszej i metabolicznie niezmienionej frakcji synaptosomalnej.

Frakcja synaptosomalna na której prowadzono badania /164, 169/ przewyższa homogennością i zachowaniem integralności metabolicznej frakcje synaptosomalne uzyskiwane dotychczas przez innych autorów /20. 232/.

Wysoki stopień oczyszczenia tej frakcji potwierdzają wartości markerów subkomórkowych /tabela 9/ oraz obrazy mikroskopowo-elektronowe. /zdjęcie 1 A, B/. Z wyliczeń statystycznych z obrazów w mikroskopie elektronowym wynika, że ponad 75% wszystkich widocznych struktur to całe, nienaruszone synaptosomy.

Wprowadzenie narkozy nembutalem przed zabiciem zwierząt pozwala na utrzymanie stanu energetycznego synaptosomów na poziomie odpowiadającym wartościom *in vivo*. Parametry energetyczne frakcji synaptosomalnej uzyskanej ze zwierząt poddanych działaniu barbi-

turanów są wyższe niż we frakcji uzyskanej ze zwierząt przebywających w warunkach normalnych. Są one zbliżone do wartości znajdowanych w całym zamrożonym mózgu w warunkach normy /6, 16, 195, 229/.

Wyliczona wolna energia dla przeniesienia 2 elektronów z NAD na cytochrom c i syntezy 2 moli ATP /tabela 12/ w synaptosomach izolowanych z anestetyzowanych szczurów jest bliska równowagi / $\Delta \Delta G = -0.26$ /, podobnie jak w innych "nienaruszonych" komórkach /58, 135, 239, 240/.

Bliska równowadze wartość  $\Delta \Delta G$  wskazuje, że uzyskane synaptosomy są metabolicznie niezmienione w stosunku do stanu in vivo. Są one zatem prawidłowym i dogodnym modelem do wszelkich badań nad metabolizmem neuronów i praktycznie jak do tej pory jedynym modelem do badań potencjału błonowego zakończeń nerwowych /ryc. 20, 21/ /48/ odgrywającego decydującą rolę w transmisji synaptycznej.

Niższy poziom w  $\frac{ATP}{ADP}$  i  $\frac{CrP}{Cr}$  w przypadku synaptosomów z mózgów szczurów nieanestetyzowanych spowodowany jest prawdopodobnie występowaniem u nich szoku podczas dekapitacji, bądź metabolicznymi konsekwencjami tego szoku /123/. Zmiany w synaptosomach otrzymywanych ze zwierząt nieanestetyzowanych w przeciwieństwie do anestetyzowanych mogą zachodzić również podczas ich izolacji. Istnieje bowiem możliwość, że barbiturany niezależnie od przeciwdziałania szokowi stabilizują błonę plazmatyczną, która staje się odporniejsza na obróbkę w czasie preparatyki. Wzrost stabilności błony plazmatycznej może być również wynikiem obniżenia temperatury ciała zwierząt podczas anestezji.

W przeciwieństwie do danych pochodzących z pracy Koeppena i wsp. /93/, w których nie wykazano transportu cytrynianu przez błonę synaptosomalną, synaptosomy otrzymane w badaniach własnych

posiadają zdolność pobierania egzogenego cytrynianu. Ilość pobranego z mieszaniny inkubacyjnej  $^{14}\text{C}$  cytrynianu, mierzona zarówno ilością radioaktywności  $^{14}\text{C}$ -cytrynianu w synaptosomach /ryc. 22/ jak i ilością  $^{14}\text{CO}_2$  powstałego w wyniku dekarboksylacji tego związku w mitochondriach synaptosomalnych in situ /ryc. 23/, do których został przetransportowany z synaptoplazmy, jest zależna od obecności jabłczanu. Przemawia to za możliwością, że transport cytrynianu przez błonę mitochondriów synaptosomalnych zachodzi w wyniku wymiany z jabłczanem w sposób charakterystyczny dla mitochondriów otrzymywanych z perikarionów /147, 163/. Z porównania czasów optymalnego pobrania egzogenego  $^{14}\text{C}$  cytrynianu przez synaptosomy /10 min/ oraz izolowane mitochondria synaptosomalne /1 min/ wynika, że transport  $^{14}\text{C}$  cytrynianu przez błony mitochondriów synaptosomalnych zachodzi szybciej niż przez błonę synaptosomalną, która in vivo może być czynnikiem ograniczającym transport tego związku z cytoplazmy do mitochondriów synaptosomalnych. Fakt, że maksymalne nagromadzanie  $^{14}\text{C}$  cytrynianu w izolowanych mitochondriach synaptosomalnych jest szybsze /1 min/ niż w mitochondriach perikarionów /4 min/ /tabela 14/ może przemawiać za tym, że transport reszt acetylowych przenoszonych przez błonę mitochondriów synaptosomalnych w postaci cytrynianu jest intensywniejszy od transportu przez błonę mitochondriów perikarionów, co popierałoby hipotezę przemawiającą za pierwszoplanową rolę cytrynianu w syntezie acetylocholino w zakończeniach nerwowych /219/.

Jednakże ilość maksymalnego nagromadzania /akumulacji/  $^{14}\text{C}$  cytrynianu jest znacznie niższa w mitochondriach synaptosomalnych niż w mitochondriach perikarionów. Wskazuje to, że transport cytrynianu przez błonę mitochondriów synaptosomalnych mimo szybszego czasu maksymalnej akumulacji tego związku jest znacznie

mniej niż w mitochondriach perikarionów. Nie musi to naturalnie wpływać na obniżenie udziału cytrynianu w przenoszeniu reszt acetylowych do syntezy acetylocholiny. Prawdopodobnie ilość transportowanego cytrynianu jest wystarczająca do syntezy neurotransmitera. Faktem jest jednak to, że w badaniach własnych nie stwierdzono wyższej aktywności liazy cytrynianowej ATP zależnej we frakcji rozpuszczalnej synaptosomów  $/W_s/$  od aktywności enzymu we frakcji  $S_3$ , jak to obserwowali Szutowicz i wsp. /219/.

Ocena aktywności i rozmieszczenia enzymów biorących udział w utlenianiu cytrynianu w jednocześnie uzyskanych frakcjach subkomórkowych pozwala sądzić, że w mózgu istnieją prawdopodobnie dwie odrębne drogi pozamitochondrialnego utleniania cytrynianu. Jedna z nich opisana wcześniej przez wielu autorów zależna od ATP cytrynianowej liazy /219, 223, 226/ oraz druga niescharakteryzowana uprzednio, związana z aktywnością dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej /IDH NADP/ /schemat 8/.

Przedstawione uprzednio spostrzeżenia własne /ryc. 2/ potwierdzają wyniki Tucka /223/ wskazujące na to, że ATP zależna cytrynianowa liaza zlokalizowana jest w mózgu pozamitochondrialnie i znajduje się we frakcjach rozpuszczalnych: w cytosolu i w rozpuszczalnej frakcji synaptosomów.

Izocytrynianowa dehydrogenaza NADP zależna jest obecna zarówno we frakcjach rozpuszczalnych jak i w mitochondriach perikarionów i mitochondriach synaptosomalnych.

Specyficzna aktywność tego enzymu jest 3-krotnie wyższa w mitochondriach niż w cytosolu /ryc. 2/. Podobne wyniki uzyskali Baker i Newburgh w przypadku wątroby i mózgu kurcząt. W sercu znajdowali oni odwrotne zależności /7/.

Jak wynika z przedstawionych badań /ryc. 3/ mózgowa dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna składa się z dwu różnych form molekularnych: mitochondrialnej i cytoplazmatycznej, różniących

się ruchliwością elektroforetyczną. Dane przedstawione przez Lowensteina i Smitha /109/ oraz Hendersona /83/ sugerują, że w wątrobie mitochondrialna i cytoplazmatyczna IDH NADP występują również jako dwie formy molekularne.

Zgodnie z przedstawionymi danymi utlenianie cytrynianu przy udziale cytoplazmatycznej IDH NADP związane jest z aktywnością akonitazy w tej frakcji /185/.

Akonitaza powoduje przekształcenie cytrynianu do izocytrynianu a następnie izocytrynianowa dehydrogenaza NADP-zależna przekształca go do  $\alpha$ -ketoglutaranu i  $\text{CO}_2$  z wytworzeniem NADPH. Szybkość przebiegu tego procesu limitowana jest przez reakcję wolniejszą zachodzącą przy udziale akonitazy /tabela 1/.

Podobnie jak w wątrobie /83, 109/ również w cytosolu mózgu nie stwierdzono obecności dehydrogenazy izocytrynianowej NAD zależnej, która znajduje się jedynie w mitochondriach i nie może mieć bezpośredniego wpływu na cytoplazmatyczne utlenianie cytrynianu. Widoczny na ryc. 6 brak stechiometrii pomiędzy ilością zużytego /utlenionego/ cytrynianu a ilością powstających w wyniku reakcji produktów: NADPH i  $\alpha$ -ketoglutaranu można tłumaczyć natychmiastowym metabolizowaniem tych związków.

Powstający NADPH nie mógł być zużywany w reakcji z dehydrogenazą glutaminianową, której aktywność w badanej frakcji była bardzo niska  $/18 \times 10^{-7} \text{ } \mu\text{mola/mg b/min}/$ , a w warunkach prowadzonych doświadczeń w ogóle się nie ujawniała /73/. Również dodatek asparagianu do mieszaniny inkubacyjnej nie powodował zmian w ilości NADPH oznaczanego w czasie utleniania cytrynianu.

Wydaje się, że w warunkach zastosowanych doświadczeń wytworzony w wyniku utleniania cytrynianu NADPH mógł być zużywany w reakcji przekształcania szczawiooctanu do jabłczanu w obec-

ności dehydrogenazy jabłczanowej, która obecna jest zarówno w mitochondriach jak i frakcji rozpuszczalnej /178/. Mimo, że głównym kofaktorem tego enzymu jest NADH, są dane wskazujące, że przekształcenie szczawiooctanu do jabłczanu może zachodzić również z udziałem NADPH /72/. NADPH może być ponadto zużywane do syntezy kwasów tłuszczowych, jak również w mikrosomalnym łańcuchu oddechowym jeśli mikrosomy nie zostały usunięte z frakcji cytoplazmatycznej /11/.

Brak stechiometrycznych zależności między ilością utlenionego cytrynianu a ilością powstającego NADPH pośrednio mógł być związany również z aktywnością liazy cytrynianowej ATP zależnej /2/, jednakże bardzo małe aktywności tego enzymu oznaczone w cytosolu w warunkach przeprowadzonych doświadczeń przemawiają przeciwko takiej możliwości.

$\alpha$ -ketoglutaran, powstający w czasie utleniania cytrynianu przy udziale IDH NADP, jest zużywany głównie w reakcji transaminacji do szczawiooctanu, w której donorem grup aminowych jest asparaginian /ryc. 7/ /220/. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej w mózgu jest wysoka /126/. Może on być również transportowany do mitochondriów.

Enzymatyczny ciąg reakcji zachodzący w cytosolu mózgu /Schemat 7/ prowadzący do utleniania cytrynianu do izocytrynianu w obecności akonitazy, następnie izocytrynianu do  $\alpha$ -ketoglutaranu przy udziale IDH NADP oraz  $\alpha$ -ketoglutaranu do szczawiooctanu i glutaminianu w obecności transaminazy asparaginianowej jest zbliżony do reakcji zachodzących w *Acetobacter suboxydans*, gdzie cytrynian zostaje przekształcony do glutaminianu. Proces ten zachodzi jednakże w obecności dehydrogenazy izocytrynianowej NAD zależnej /71/. Istnienie przedstawionego wyżej ciągu reakcji w mózgu potwierdza dodatkowo fakt, że ilość  $\alpha$ -ketoglutaranu, cytrynianu i glutaminianu

powstającego w reakcji jest równa wyjściowej ilości izocytrynianu /tabela 2/.

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że utlenianie cytrynianu w cytosolu mózgu zachodzi nie tylko dzięki udziałowi liazy cytrynianowej ATP zależnej, lecz że istnieje drugi ciąg reakcji enzymatycznych w którym kluczową rolę odgrywa dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna /schemat 8/. Każda z dwu omawianych dróg utleniania cytrynianu dostarcza komórce różnych substratów. Acetylo-CoA produkowany przy udziale liazy cytrynianowej ATP zależnej i NADP - produkt utleniania cytrynianu w obecności dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej mogą uczestniczyć w syntezie kwasów tłuszczowych.  $\alpha$ -ketoglutaran powstający w reakcji katalizowanej przez IDH NADP może ulegać transaminacji łącząc się w ten sposób z metabolizmem aminokwasów lub może penetrować do mitochondriów i metabolizować się w cyklu Krebsa. Szczawiooctan - drugi produkt utleniania cytrynianu w omawianym ciągu reakcji - łączy przemiany cytrynianu z metabolizmem węglowodanów.

Aktywność obydwu enzymów /liazy cytrynianowej ATP zależnej i cytoplazmatycznej IDH NADP/ regulowane są przez nukleotydy adeninowe i pirydynowe oraz przez szereg aminokwasów /tabela 5, ryc. 14, 15/ /216, 218/.

Uzyskane wyniki łącznie z danymi z piśmiennictwa wskazują, że stężenia ATP, które aktywują liazę cytrynianową ATP zależną, hamują aktywność IDH NADP i że  $\alpha$ -ketoglutaran i glutaminian produkowane w czasie utleniania cytrynianu na drodze zależnej od IDH NADP są inhibitorami liazy cytrynianowej ATP zależnej.

Wydaje się, że dwie omawiane tu drogi metaboliczne mogą uzupełniać się nawzajem i podlegać wzajemnej regulacji. Może

to mieć duże znaczenie, głównie w pewnych stanach patologicznych np. w niedotlenieniu, kiedy mimo zmiany poziomu wielu czynników regulujących aktywności tych dwu dróg utleniania cytrynianu /56, 65/ zawartość jego praktycznie zostaje niezmieniona /137, 158/.

W odróżnieniu od liazy cytrynianowej ATP zależnej, której wydzielanie, oczyszczanie i własności były dokładnie opisane w piśmiennictwie /217, 218/, dehydrogenaza izocytrynianowa mózgu - drugi kluczowy enzym utleniania cytrynianu w cytosolu praktycznie nie był scharakteryzowany.

Dotychczasowe badania dotyczące rozkładu aktywności IDH NADP w subfrakcjach komórkowych, jej izolacji i charakterystyki były prowadzone głównie na wątrobie, mięśniu sercowym i mikroorganizmach. Poza tym większość autorów izolowała ten enzym z całej niefrakcjonowanej tkanki wg metody Sieberta i wsp. /188/.

Jedynie Islan i wsp. /87/ rozdzielili IDH NADP na dwa izoenzymy, a Illingworth i Tipton oczyścili cytoplazmatyczną IDH NADP z wątroby /86/.

Oczyszczanie enzymów pochodzących z tkanki nerwowej jest trudniejsze niż w przypadku innych tkanek. Wymaga niejednokrotnie stosowania dodatkowych, niestandardowych metod, zapewniających utrzymanie stabilności aktywności enzymu w czasie jego obróbki. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach przy oczyszczaniu mózgowej cytoplazmatycznej IDH NADP, zastosowano jako czynnik stabilizujący glicerol /41/ oraz bufor cytrynianowy /175/. Używanie trójetanoloaminy lub merkaptioetanolu było niemożliwe, ponieważ interferowały one w oznaczaniu białka metodą Lowry i wsp. /112/. Spadek aktywności enzymu w próbach oczyszczania go z udziałem  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$  wywołany był prawdopodobnie odłączeniem i zatrzymywaniem na kolumnie z Sephadeksu w czasie odsolenia jakiegoś niskocząsteczkowego czynnika odpowiedzialnego za stabilność

enzymu. Również takie metody jak rozdział na DEAE celulozie, absorpcja na żelu wapniowo fosforanowym, które normalnie używano z dobrym wynikiem w izolacji IDH NADP z wątroby, serca /87/ i mikroorganizmów /172, 175/, w przypadku mózgu nie dawały pozytywnych wyników. Jedynie w wyniku oczyszczania enzymu na kolumnach z  $DE_{32}$  celulozy, CM celulozy i DEAE Sephadeksu uzyskiwano preparat 15-krotnie oczyszczony /tabela 3/. Tylko elektroforeza na żelu poliakrylamidowym dawała dalsze oczyszczenie 15-krotnie oczyszczonego preparatu, powodując rozdział frakcji białkowej na 5 pasm, z których jedno miało aktywność enzymu. Fakt, że podczas reelektroforezy /ryc.8/ oraz podczas elektroforezy w SDS pojawiało się tylko jedno pasmo dowodzi, że uzyskano czysty preparat dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej cytosolu mózgu. 36-krotny wzrost aktywności specyficznej enzymu po jego oczyszczeniu /tabela 4/ jest zbliżony lub wyższy od danych uzyskiwanych w czasie oczyszczenia IDH NADP z *E. coli* /30-krotnie oczyszczenie/ /175/, *Halobacterium salinarium* /31 razy/ /1/ i *Thiobacillus novellus* /11.5 razy/ /30/ i jest niższy niż uzyskany dla IDH NADP izolowanej z serca /98 razy/ i z wątroby /103 razy/ /87/.

Ciężar cząsteczkowy otrzymanego enzymu zależy od stężenia soli w mieszaninie inkubacyjnej. Oznaczono, że w stężeniach "fizjologicznych" wynosi on 165.000. W niskich stężeniach soli wartość jego wynosi 80.000 /ryc.9/. Wydaje się, że IDH NADP z mózgu występuje jak dimer składający się z dwu podjednostek o c.c. 80 000 każdy. Zgodne to jest z wynikami otrzymanymi dla IDH NADP izolowanej z wątroby wołu, *Bacillus Stearothermophilis* i *Rhodopseudomonas spheroides* /27, 35, 85/ w przeciwieństwie do enzymów z *Azotobacter vinelandi* /34/. W przypadku IDH NADP z serca wołu zdania są kontrowersyjne. Colman /41/ postuluje, że

enzym ten składa się tylko z jednego łańcucha polipeptydowego, podczas gdy Macfarlane i wsp. /117/ udowodnili, że składa się on z dwu podjednostek.

Badając własności cytoplazmatycznej, aktywowanej jonami  $Mg^{++}$  dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej mózgu zaobserwowano, że różni się ona od odpowiedniego enzymu z wątroby, serca /87/ i bakterii /175/ wartościami optimum pH, które w jej przypadku wynosi 6.5 - 7.0.

Aktywność IDH NADP pochodzącej z różnych tkanek i organizmów /30, 215/ jest regulowana przez nukleotydy adeninowe ATP, ADP, AMP. W przedstawionych badaniach na 15-krotnie oczyszczonym preparacie nie stwierdzono wpływu AMP na aktywność enzymu z mózgu. ATP i ADP w stężeniach wyższych od 100 nmoli powodowały spadek aktywności IDH NADP /tabela 5/. Biorąc pod uwagę wysoką aktywność miokinazy we frakcji częściowo oczyszczonego enzymu można sądzić, że inhibicja obserwowana w obecności ADP faktycznie może reprezentować inhibicję z udziałem ATP.

Inhibicja mózgowej IDH NADP przez ATP jest kompetycyjna w stosunku do substratu - izocytrynianu /ryc. 13/. Możliwe, że inhibicja ta jest wynikiem usuwania jonów  $Mg^{++}$  przez ATP, tak jak wykazano to w przypadku NAD IDH /67/. Inhibicja dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej mózgu przez wyższe stężenia ATP, a aktywacja w przypadku niższych stężeń /tabela 5/ wskazują na rolę regulującą ATP w metabolizmie cytrynianu w cytoplaźmie mózgu. Zaobserwowano /155/, że podobnie jak ATP również NADPH i NADH mogą mieć własności regulujące aktywność mózgowej IDH NADP. NADPH hamuje aktywność tego enzymu /ryc. 14/. Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Chen i Planta /31/. Autorzy ci wykazali również, że inhibicja aktywności enzymu jest kompetycyjna w stosunku do izocytrynianu.

Aktywność transhydrogenazy nukleotydów pirydynowych jak wykazał Kaplan /91/ w mózgu jest nieznacząca. Także obserwowane inhibicje IDH NADP przez NADPH oraz przez NADH /ryc. 15/ wynikają z udziału tych właśnie komponent.

W oparciu o analizę wyników badań nad rozpuszczalną IDH NADP z wątroby Illingworth i Tipton /86/ sugerują, że z jedną cząsteczką enzymu łączą się dwie cząsteczki NADPH. Wydaje się, że podobny mechanizm może zachodzić dla IDH NADP mózgowej. Fakt, że inhibicje przez NADPH, NADH i ATP są kompetycyjne w stosunku do izocytrynianu, sugeruje że wszystkie te komponenty reagują z tym samym miejscem enzymu. Zarówno merkaptoetanol jak i DTT zmniejszają inhibicję aktywności mózgowej IDH NADP przez zredukowane nukleotydy pirydynowe /ryc. 16/ co sugeruje, że aktywne centrum enzymu jest związane z aktywnością grup -SH. Jest to zgodne z wynikami Colmana i Chu postulującymi katalityczną rolę grup -SH w aktywności IDH NADP /42/.

## 2. Zaburzenia metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego

We wszystkich badaniach stosowano model doświadczalny niedotlenienia hipoksyjnego dobrze scharakteryzowany w piśmiennictwie i opisany w części metodycznej i we wstępie pracy.

Obserwacje wynikające z własnych badań w warunkach niedoboru tlenowego pozwalają na stwierdzenie szeregu istotnych zaburzeń w metabolizmie cytrynianu w stosunku do warunków normy.

Największe zmiany wywołuje hipoksja w transporcie cytrynianu przez błony mitochondriów perikarionów. Zmiany te nie wynikają z ewentualnych uszkodzeń struktury błony mitochondrialnej, które

mogłyby powstawać w warunkach niedotlenienia lub w warunkach preparatyki mitochondriów z niedotlenionych mózgów. Świadczą o tym niezmiennie w porównaniu z warunkami prawidłowymi aktywności LDH i fumarazy /tabela 23/.

Obniżenie w hipoksji wejścia cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów aż o około 60% wskazuje na powstanie ostrych zaburzeń w transporcie tego związku. Poszukując przyczyn zmniejszenia w niedotlenieniu transportu przez błonę mitochondriów pośredników cyklu Krebsa /cytrynian, jabłczan/ wykluczono udział w tym procesie nagromadzających się wolnych kwasów tłuszczowych /9/ które w konsekwencji mogłyby zmieniać przepuszczalność błony. Jak wykazano dodanie do mitochondriów pochodzących ze zwierząt przebywających w warunkach normalnych oleinianu oraz albuminy do frakcji mitochondriów "hipoksyjnych" nie miało wpływu na transport /tabela 25/.

Dodatkowym potwierdzeniem braku udziału wolnych kwasów tłuszczowych w zaburzeniach transportu jest fakt, że narkoza nembutalowa, która hamuje aktywność fosfolipazy /183/ nie wykazuje w tym przypadku "ochronnego" wpływu na zmiany wywoływane hipoksją /tabela 24/ przeciwnie niż to obserwowano w utlenianiu cytrynianu w cytosolu /ryc. 24, tabela 18/ /157, 158/.

Jak wykazano transport jabłczanu do mitochondriów mózgu zachodzi przy udziale przenośnika powodującego wymianę jabłczan/Pi /tabela 7/. Wymiana ta jest hamowana przez czynniki blokujące grupy -SH /tabela 26/ podobnie jak to obserwowano w mitochondriach wątroby /151/. Jabłczan zaś wymienia się z cytrynianem przez błonę mitochondriów w stosunku 1:1 /tabela 8/ /163/.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt, że w warunkach normalnych mersalyl hamuje transport jabłczanu o około 50%, a w hipoksji jedynie o około 14% należy sądzić, że hipoksja hamuje transport jabłczanu poprzez obniżenie poziomu dostępnych grup -SH prze-

nośnika /235/. Wydaje się przeto, że zmniejszenie transportu cytrynianu może wynikać z niedoboru wewnątrzmitochondrialnego jabłczanu niezbędnego do wymiany cytrynian/jabłczan.

Trudno jest wyjaśnić, na podstawie dotychczasowych danych, inhibicję transportu cytrynianu w warunkach stosowania nembutalu, w których obserwuje się inhibicję transportu jabłczanu w obecności mersalylu o około 50% tak jak w warunkach normy. Zagadnienie to wymaga dodatkowych badań. Wydaje się jednak, że zarówno w hipoksji jak i w anestezji pewną rolę w zmniejszeniu transportu mogą odgrywać zmiany w stężeniach szeregu metabolitów wywołane tymi czynnikami /50, 56, 68/.

Metabolity, których wpływ przedstawiono na ryc. 29, mogą prawdopodobnie działać kompetycyjnie w stosunku do cytrynianu podobnie jak występuje to w przypadku mitochondriów wątroby /142/. Szybkość powrotu do normy po zastosowaniu hipoksji lub narkozy jest różna dla poszczególnych procesów metabolicznych. Transport cytrynianu po narkozie jak i utlenianie cytrynianu w cytosolu po hipoksji, związane ze zmianą stężeń asparaginianu, wyrównują się szybko /ryc. 27, 28/. Natomiast zmiany wywołane niedotlenieniem w transporcie cytrynianu przez błonę mitochondrialną, powracają do normy bardzo wolno - w czasie kilku dni /ryc. 28/. Wskazuje to na głębsze zaburzenia metaboliczne związane prawdopodobnie ze zmianami konformacyjnymi białek przenośników oraz zmianami w syntezie białka.

Wydaje się, że synaptosomy, jak również izolowane z nich mitochondria, choć wykazują zaburzenia wywołane hipoksją, są bardziej odporne na niedobór tlenowy niż mitochondria perikarionów. W doświadczeniach przedstawionych w niniejszej pracy uzyskano szereg informacji dotyczących wrażliwości izolowanych zakończeń nerwowych na niedobór tlenowy, jak również czynników

mogących zmniejszać lub zapobiegać wpływowi hipoksji na synaptosomy. Parametry energetyczne synaptosomów praktycznie nie zmieniają się w wyniku stosowanego niedotlenienia /tabela 10 i 27/ podobnie jak w całym mózgu. Obserwowano natomiast w hipoksji obniżenie oddychania synaptosomów w obecności różnych substratów /ryc. 30/. W narkozie oddychanie było podobne jak w warunkach prawidłowych. Jednocześnie z obniżeniem oddychania synaptosomów w hipoksji obserwowano spadek stanu redukcji cytochromu c. W warunkach normy wynosił on 14-16% /169/, a w hipoksji około 10% w stosunku do całkowitej ilości cytochromu /170/. Fakt ten również wskazuje na obniżenie aktywności oddechowej izolowanych zakończeń synaptycznych, oraz sugeruje zmiany w błonach synaptosomalnej albo mitochondrialnej w czasie niedotlenienia, modyfikujące utlenianie substratów w mitochondriach i zmniejszające dostępność równoważników redukcyjnych dla łańcucha oddechowego.

Przedłużenie czasu hipoksji od 30 do 60 min powodowało spontaniczny wzrost oddychania synaptosomów do wartości równej w warunkach prawidłowych /ryc. 31/. Sugeruje to pewien rodzaj adaptacji fizjologicznej do niskiej zawartości tlenu w mieszaninie oddechowej, wynikający prawdopodobnie ze zwiększenia przepływu krwi w mózgu, a w konsekwencji z dostarczenia większej ilości tlenu i glukozy do komórek.

Na uwagę zasługuje fakt, że zwierzęta odżywiane nie wykazują w ogóle w warunkach stosowanego niedotlenienia zmian w oddychaniu komórkowym. Obserwacje te są zgodne z danymi innych autorów /201/, którzy sugerują że zwierzęta nakarmione są mniej wrażliwe na wpływ hipoksji. Prawdopodobnie jest to związane z wystarczająco wysokim poziomem glukozy we krwi, która jako substrat glikolizy zabezpiecza w pewnym stopniu utrzymanie normalnego metabolizmu komórki.

Szybki powrót do normy po przeniesieniu zwierząt z warunków hipoksyjnych do normalnych /ryc. 31/, przystosowywanie się zwierząt przy przedłużającym się niedotlenieniu oraz brak wpływu hipoksji na oddychanie synaptosomów u zwierząt odżywianych przemawiają za tym, że struktury te są dość odporne na wpływ niedotlenienia hipoksyjnego.

Transport cytrynianu do synaptosomów "hipoksyjnych" i do izolowanych z nich mitochondriów jest zmniejszony o około 20% w stosunku do warunków prawidłowych /tabela 28/. Anestezja stosowana razem z niedotlenieniem nie wykazuje "ochronnego" wpływu na skutki hipoksji, podobnie jak obserwowano to w przypadku transportu cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów otrzymywanych z perikarionów. Jednakże w porównaniu ze zmianami transportu cytrynianu w mitochondriach perikarionów w niedotlenieniu inhibicja ta w przypadku mitochondriów synaptosomalnych jest o 40% mniejsza /tabela 24 i 28/. Wydaje się zatem, że chociaż transport cytrynianu do mitochondriów synaptosomalnych jest mniejszy niż do mitochondriów perikarionów /tabela 14/, to w mitochondriach synaptosomalnych jest on o wiele bardziej odporny na wpływ badanych czynników patogenetycznych.

Zakładając zgodnie z uzyskanymi wynikami badań, że mechanizm transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów i mitochondriów synaptosomalnych jest taki sam, nie jest łatwo odpowiedzieć na pytanie, czym spowodowane są różnice we wrażliwości dwu typów mitochondriów na niedotlenienie w aspekcie ich transportu? Być może wiąże się to z dodatkową rolą błony synaptosomalnej lub z nieco odmienną funkcją w komórce tych dwu typów mitochondriów. Lai i wsp. /101/ znajdowali różnice między mitochondriami perikarionów a mitochondriami synaptosomalnymi w aktywnościach szeregu enzymów oraz w oddychaniu komórkowym

w obecności różnych substratów oddechowych. Być może mitochondria perikarionów ukierunkowane są przede wszystkim na utlenianie substratów i produkcję energii dla komórki. Ilość  $\text{CO}_2$  pochodzącego z dekarboksylacji egzogenego cytrynianu w przypadku mitochondriów otrzymywanych z perikarionów jest znacznie wyższa niż w przypadku mitochondriów synaptosomalnych /tabela 14/. Może to wskazywać na większe utlenianie tego związku w mitochondriach perikarionów niż synaptosomalnych. Mitochondria synaptosomalne obarczone są dodatkową funkcją dotyczącą dostarczania substratów /cytrynianu/ do syntezy acetylocholiny. Znacznie łagodniejsze zaburzenia niż w transporcie cytrynianu występują w hipoksji w jego utlenianiu z udziałem cytoplazmatycznej IDH NADP. Niedotlenienie zmniejsza utlenianie cytrynianu w ciągu reakcji zależnym od IDH NADP tylko o około 30% /ryc.24/ /158/. Wykazano, że za obniżenie utleniania cytrynianu w cytosolu nie mogą być odpowiedzialne enzymy: IDH NADP, akonitaza, transaminaza asparaginianowa - ponieważ ich aktywności nie zmniejszają się w niedotlenieniu. Niedotlenienie hipoksyjne na ogół nie wpływa na zmianę aktywności enzymów, a jak wykazano w niniejszej pracy na przykładzie cytoplazmatycznej IDH NADP, również nie wpływa na zmianę jej ciężaru cząsteczkowego. /167/. Na podstawie uzyskanych danych należy sądzić jednak, że w czasie niedotlenienia pewne enzymy mogą zmieniać lokalizację w komórce przechodząc np. z mitochondriów do cytosolu jak to wykazano na przykładzie IDH NADP /tabela 15 i 16 / . /181/. Wiąże się to prawdopodobnie ze zmianami strukturalnymi w błonie mitochondrialnej pod wpływem nagromadzających się w czasie niedotlenienia wolnych kwasów tłuszczowych /212/. Za zmniejszenie utleniania cytrynianu w cytosolu w badanym ciągu reakcji, a jednocześnie za zmniejszenie ilości produktu tej reakcji - gluta-

minianu /tabela 17/ odpowiedzialny zapewne jest endogenny asparaginian, stanowiący substrat transaminazy asparaginianowej, którego poziom spada w hipoksji o około 60% /tabela 18/ /158/. Spadek poziomu asparaginianu w cytosolu nie wiąże się ze zmianami jego poziomu w innych subfrakcjach komórkowych - nie polega więc na jego przemieszczeniu w obrębie komórki /tabela 19/. Tews i wsp. /221/ oraz Duffy i wsp. /56/ obserwowali w hipoksji spadek poziomu asparaginianu w całym mrożonym mózgu. Możliwe, że wiązał się on ze spadkiem poziomu tego związku właśnie w puli cytosolowej. W narkozie nie obserwowano zmian w poziomie asparaginianu w cytosolu /tabela 18/, choć Dobkin stwierdzał niewielki jego wzrost w całej tkance /50/. Zastosowanie hipoksji jednocześnie z narkozą nie zmniejszało ani utleniania cytrynianu ani poziomu asparaginianu w cytosolu. Jest to w zgodzie z obserwowanym niejednokrotnie "ochronnym" działaniem narkozy na zmiany wywołane niedotlenieniem /120, 127, 128, 158, 181, 198, 200, 213/. Równolegle ze zmniejszaniem poziomu asparaginianu obserwowano wzrost  $\alpha$ -ketoglutaranu, jednakże wzrost ten był znacznie niższy od spadku asparaginianu. Wynika to prawdopodobnie z szybkiej transaminacji części  $\alpha$ -ketoglutaranu w obecności transaminazy alaninowej do pirogronianu, którego poziom w hipoksji wzrasta /56/. Spadek poziomu asparaginianu nie jest wynikiem zwiększenia jego zużycia w syntezie cytydynotrójfosforanu /CTP/, bowiem ilość karbamylasparaginianu - pośrednika w syntezie CTP powstającego z asparaginianu nie zmienia się w hipoksji /tabela 20/, jak również nie obserwowano wzrostu CTP w tych warunkach /108/. Istnieje natomiast pewna zależność między spadkiem poziomu tego związku w hipoksji a syntezą mocznika, którego poziom wzrasta w niedotlenieniu o około 25% /tabela 20/. Zgodnie z przedstawionymi danymi, w niedotlenieniu, jednocześnie ze spadkiem poziomu

asparaginianu w cytoplaźmie obserwuje się wzrost jego ilości we krwi wypływającej z mózgu /tabela 21/, co może być wynikiem przechodzenia tego związku przez zmienioną w tych warunkach barierę krew-mózg /158/.

W warunkach niedotlenienia wzrasta przepuszczalność naczyń krwionośnych i pojawiają się zmiany w ciśnieniu krwi czego konsekwencją mogą być zaburzenia w wymianie między krwią i tkanką. Anestetyki są znane jako czynniki stabilizujące błony biologiczne w wyniku inhibicji hydrolitycznej aktywności fosfolipazy A /183/. Może to zapobiegać przechodzeniu asparaginianu do naczyń krwionośnych w warunkach jednoczesnej narkozy i hipoksji i pozwalać na utrzymanie jego stężenia na poziomie normy. Zaburzenia w utlenianiu cytrynianu powracają do normy jeśli zwierzęta przetrzymywane są w warunkach niedotlenienia dłużej /60 min/ /ryc. 27/. Świadczy to o dużej zdolności przystosowania się zwierząt do badanych warunków patologicznych. Również powrót do normy zachodzi bardzo szybko po przeniesieniu zwierząt z warunków niedotlenienia do normalnych. Poziom asparaginianu w warunkach powrotu do normy wzrasta nieco ponad wartość kontrolną. Jest to zjawisko często spotykane. Collins i wsp. /40/ obserwowali podobne zależności w przypadku fosfokreatyny, Duffy /56/ zaś w przypadku fosfokreatyny i glukozy.

Reasumując, można stwierdzić, że niedotlenienie hipoksyjne z zawartością 7%  $O_2$  w mieszaninie oddechowej powoduje szereg istotnych zaburzeń w metabolizmie cytrynianu w mózgu.

Wielkość zmian, wywołanych niedotlenieniem hipoksyjnym, jest różna w zależności od układów metabolicznych. Zmiany te np. nie uwidoczniają się w przypadku aktywności enzymów metabolizujących cytrynian, występują ale szybko powracają do normy w reakcji utleniania cytrynianu w cytosolu, prowadzą do silnych trudno odwracal-

ných zaburzeń w transporcie cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarionów i mitochondriów synaptosomalnych. Biorąc pod uwagę, że cytrynian zajmuje cenalne miejsce w metabolizmie komórki nerwowej /schemat 8/ obserwowane zmiany prowadzą do zakłócenia ogólnego metabolizmu komórki, dając niewątpliwie niekorzystne biologicznie efekty mogące w konsekwencji prowadzić do upośledzenia czynności tkanki nerwowej, a przy większym nasileniu do jej nieodwracalnego uszkodzenia.

## STRESZCZENIE

1. Równolegle z utlenianiem cytrynianu w obecności ATP zależnej liazy cytrynianowej związek ten jest zużywany w mózgu w wyniku sekwencji przemian, których kluczowym enzymem jest dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna. W warunkach hipoksji utlenianie cytrynianu w obecności IDH NADP zostaje zmniejszone. Spowodowane jest to obniżeniem się poziomu endogenego asparaginianu, który w niedotlenieniu częściowo przechodzi do krwioobiegu a ponadto jest intensywniej zużywany w syntezie mocznika. Obserwowane zaburzenia w utlenianiu cytrynianu w hipoksji są przykładem łagodnych zmian, charakteryzujących się szybkim powrotem do normy i "ochronnym" wpływem anestezji.

2. Dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna mózgu występuje w dwu formach molekularnych: mitochondrialnej i cytoplazmatycznej. IDH NADP z cytosolu pod względem ciężaru cząsteczkowego, aktywnego centrum z grupami -SH, czynników regulujących jego aktywność jest podobna do odpowiedniego enzymu opisanego w wątrobie. Różni się ona jednak optimum pH i jest trudniejsza do oczyszczenia. Niedotlenienie hipoksyjne nie zmienia aktywności, ciężaru cząsteczkowego i własności dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej. Powoduje jedynie niewielkie przemieszczenie mitochondrialnej IDH NADP do cytosolu co stanowi zapewne następstwo zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej. Aktywność innych enzymów związanych z przemianami cytrynianu: syntazy cytrynianowej, akonitazy, transaminazy asparaginianowej i ATP zależnej liazy cytrynianowej również nie ulega zmianie w warunkach hipoksji.

3. Podstawowy mechanizm transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów mózgu jest podobny do mechanizmu jego transportu w mitochondriach wątroby. Zachodzi on w wyniku wymiany z jabłczanem w stosunku mol/mol. Swoiste dla mózgu cechy tego transportu wiążą się głównie z różnicami w jego kinetyce. Niedotlenienie hipoksyjne wywołuje bardzo głębokie zmiany, zmniejszając transport cytrynianu aż o 60% w mitochondriach perikarionów i o 40% w mitochondriach synaptosomalnych. Zaburzenia te są przykładem zmian drastycznych charakteryzujących się brakiem "ochronnego" działania narkozy oraz bardzo długim czasem powrotu do normy. Bezpośrednią przyczyną tych zaburzeń może być zablokowanie w warunkach niedotlenienia części wolnych grup -SH przenośnika katalizującego wymianę jabłczan/Pi. Pociąga to za sobą mniejsze nagromadzanie jabłczanu i w konsekwencji zmniejsza jego wymianę z cytrynianem. Zmiany wywołane hipoksją w transporcie cytrynianu są o wiele głębsze od tych, które dotyczą jego utleniania w cytosolu.

4. Otrzymana frakcja synaptosomalna z mózgów anestetyzowanych szczurów odznacza się wyższą od uzyskiwanych dotychczas frakcji, homogennością. Synaptosomy charakteryzują się wartością wolnej energii, między reakcjami utleniania i redukcji łańcucha oddechowego i stanu fosforylacji nukleotydów adeninowych, bliską równowagi jak w przypadku całych nienaruszonych komórek i charakteryzują się wysokim potencjałem błonowym zmieniającym się w obecności jonów  $K^+$ , ouabainy i weratryny. Jest zatem frakcją zawierającą synaptosomy niezmienione metabolicznie w stosunku do stanu in vivo. Hipoksja praktycznie nie zmienia stanu energetycznego synaptosomów, obniżając jednakże w niewielkim stopniu ich oddychanie w obecności substratów oddechowych. Zmiany te jednak

szybko powracają do normy i występują jedynie u zwierząt głodzonych, bez efektu w przypadku zwierząt normalnie odżywianych. Wydaje się, że synaptosomy są dość odporne na wpływ niedotlenienia.

W mitochondriach izolowanych z synaptosomów transport cytrynianu mimo szybszego czasu maksymalnej akumulacji jest znacznie mniejszy niż w mitochondriach perikarionów i mniej wrażliwy na wpływ niedotlenienia hipoksyjnego.

## WNIOSKI

1. Podstawowe układy enzymatyczne i procesy metabolizujące cytrynian w mózgu są podobne do poznanych wcześniej w wątrobie, posiadają jednak szereg cech swoistych dla centralnego układu nerwowego.

2. Wykrycie nieznanej dotychczas drogi utleniania cytrynianu w cytosolu mózgu z udziałem dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej daje nowy pogląd na powiązanie cytrynianu z metabolizmem aminokwasów i węglowodanów oraz regulację zużycie tego związku w neuronach.

3. Oczyszczona i scharakteryzowana dehydrogenaza izocytrynianowa NADP zależna mózgu może być stosowana jako preparat w badaniach metabolizmu centralnego układu nerwowego.

4. Różnice w transporcie cytrynianu przez błony mitochondriów izolowanych z perikarionów i synaptosomów oraz różna w obu przypadkach wrażliwość transportu na niedotlenienie wskazują na różnice w budowie i /lub/ w metabolizmie tych dwu rodzajów mózgowych mitochondriów.

5. Frakcja synaptosomalna otrzymana z mózgów anestetyzowanych zwierząt jest prawidłowym i wygodnym modelem do badań metabolizmu zakończeń nerwowych.

6. Niedotlenienie hipoksyjne wywołuje zmiany w metabolizmie cytrynianu w neuronach. Poszczególne reakcje i procesy metabolizujące cytrynian różnią się stopniem wrażliwości na niedobór tlenu.

7. Zaburzenia przemian cytrynianu w hipoksji nie są związane ze zmianami w aktywności enzymów metabolizujących go w mózgu.

8. Bezpośrednie przyczyny zaburzeń metabolizmu cytrynianu w hipoksji mają dwojaki charakter:

Zmiany łagodne, szybko powracające do normy wywołane są zaburzeniami w poziomie substratów i metabolitów regulujących przemiany cytrynianu.

Zmiany głębokie, powracające do normy dopiero po kilku dniach zależne są od zmian w poziomie wolnych grup -SH, wiążą się prawdopodobnie z zaburzeniami w konformacji i /lub/ syntezie białka.

PISMIENNICTWO

1. Aitken D.M., Brown A.D.: Properties of halophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - specific isocitrate dehydrogenase. *Biochem.J.*, 130 /1972/ 645-662.
2. Angielski S.: Współdziałanie mitochondriów i cytoplazmy w biosyntezie kwasów tłuszczowych. *Monogr.Bioch. W: Utlenianie biologiczne*, 24 /1971/ 29-45.
3. Atkinson D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7 /1968/ 4030-4034.
4. Atkinson D.E.: Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. W: *Metabolic roles of citrate*, biochemical society, Symposium No 27, red. T.W. Goodwin, Academic Press, London and New York, 1968, 23-39.
5. Atkinson D.E.: The control of citrate synthesis and breakdown. W: *Citric Acid Cycle Control and Compartmentation*, red. J.M. Lowenstein, Marcel Dekker, New York and London 1969, 137-161.
6. Bachelard H.S., Lewis L.D., Pantevi U., Siesjö B.K.: Mechanisms activating glycolysis in the brain in arterial hypoxia. *J.Neurochem.* 22 /1974/ 395-401.
7. Baker W.W., Newburgh R.W.: Intracellular distribution of isocitrate - nicotinamide - adenine dinucleotide phosphate - oxidoreductase activity during development of the chick embryo. *Biochem.J.*, 89 /1963/ 510-515.
8. Bartko O.: *Experimental brain hypoxia*. University Park Press Baltimore, London, Tokyo, 1971.

9. Bazan N. G., Jr: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 218 /1970/ 1-10.
10. Beenackers A. M. T., Hendersen P. T.: The localization and function of carnitine acetyltransferase in the flight muscles of the locust, *European J. Biochem.*, 1 /1967/ 187-192.
11. Berezney R., Funk L. K., Crane F. L. Nuclear electron transport I electron transport enzymes in bovine liver nuclei and nuclear membrane. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 38 /1970/ 93-98.
12. Bergmeyer H. U., Bernt E.:  $\alpha$ -oxoglutarate. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer H. U., Academic Press New York, 1963, 324-327.
13. Bergmeyer H. U., Bernt E.: Glutamate - Oxaloacetate Transaminase. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer H. U. Academic Press, New York, 1963, 834-845.
14. Bernt E., Bergmeyer H. U.: Glutamate determination with glutamic dehydrogenase. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer H. U., Academic Press, New York, 1963, 384-388.
15. Bernt E., Bergmeyer H. U., Möllering H.: Creatine. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer H. U., Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, vol. 4, 1974, 1772-1776.
16. Berntman L., Siesjö B. K.: Cerebral metabolic and circulatory changes induced by hypoxia in starved rats. *J. Neurochem.* 31 /1978/ 1265-1276.

17. Bogin E., Wallace A.: The inhibition of lemon citrate -  
condensing enzyme by ATP. *Biochim. Biophys. Acta*, 128  
/1966/ 190-192.
18. Boismare F., Le Poncin M., Lefrancois J., Marchand J.C.  
Biochemical and behavioral disturbances induced by hypoxic hypoxia in rats. *Acta Neurol. Scand.* 1977, 56 suppl.  
64, 354-355.
19. Bonting S.L.: Colorimetric determination of pyruvic acid  
and other keto acids in submicrogram quantities. *Archs. Biochem. Biophys.* 58 /1955/ 100-108.
20. Booth R.F., Clark J.B.: A rapid method for the preparation  
of relatively pure, metabolically competent synaptosomes  
from rat brain. *Biochem. J.* 176 /1978/ 365-370.
21. Borgström L., Norberg K., Siesjö B.K.: Glucose consumption  
in rat cerebral cortex in normoxia, hypoxia and hypercapnia. *Acta Physiol. Scand.* 96 /1976/ 569-574.
22. Brdiczka D., Gubitz K., Pette D., Localization and function  
of external and internal carnitine acetyltransferases in  
mitochondria of rat liver and pig kidney, *European J. Biochem.* 11 /1969/ 234-240.
23. Bressler R., Brendek R.: The role of carnitine and carnitine  
acyltransferase in biological acetylations and  
fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 241 /1966/ 4092-4097.
24. Brunengaber H., Lowenstein J.M., Effect of /-/-Hydroxycitrate  
on ethanol metabolism, *FEBS Letters*, 36 /1973/  
130-132.
25. Brunner G., Bucher Th.: Determination of the quantitative  
relationship of outer and inner membrane proteins in  
rat liver mitochondria by means of enzymology and  
electron microscopy. *FEBS Letters*, 6 /1970/ 105-108.

26. Bull G.G., Oderfeld-Nowak N.: Standardization of a radiochemical assay of choline acetyltransferase and a study of the activation of the enzyme in rabbit brain. *J. Neurochem.*, 18 /1971/ 935-941.
27. Carlier M.F., Pantaloni D.: NADP-linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 37 /1973/, 341-354.
28. Carlsson A., Holmin T., Lindqvist M., Siesjö B.K.: Effect of hypercapnia and hypocapnia on tryptophan and tyrosine hydroxylation in rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 99 /1977/ 503-509.
29. Chappell J. B., Haarhoff K.N., The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. W: *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, PWN Warszawa Acad. Press London 1967, 75-91.
30. Charles A.M.: Properties of a  $\text{NADP}^+$  - specific isocitrate dehydrogenase from *Tiobacillus novellus*. *Can. J. Biochem.* 48 /1970/ 95-103.
31. Chen R.F., Plant W.E.: Activation and inhibition of DPN-linked dehydrogenase of heart by certain nucleotides isocitrate. *Biochemistry* 2 /1963/ 1023-1032.
32. Cheng S. C., Nakanura R.: A study on the tricarboxylic acid cycle and the synthesis of acetylcholine in the lobster nerve. *Biochem. J.*, 118 /1970/ 451-455.
33. Cheng S. C.: The tricarboxylic acid cycle. W: *Handbook of neurochemistry*, ed. Lajtha A., Plenum Press, New York and London, vol.5, part A /1971/ 283-315.

34. Chung A.D., Franzen J.S.: Oxidized triphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase from *Azotobacter vinelandi*. Isolation and characterization. *Biochemistry* 8 /1969/ 3175-3184.
35. Chung A.E., Barginski J.E.: Isocitrate dehydrogenase from *Rhodespiromonas spheroides*. Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 153 /1972/ 357-367.
36. Clark J.B., Niclas W.J.: The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J. Biol. Chem.*, 245 /1970/ 4724-4731.
37. Cohen R., Lajtha A.: Amino acid transport. W: *Handbook of Neurochemistry*, ed. Lajtha A., Plenum Press, New York, 1972, 543-572.
38. Cohen P.J.: The effects of decreased oxygen tension on cerebral circulation, metabolism and function. *Proceedings of International Symposium on the cardiovascular and Respiratory Effects of Hypoxia*, ed. Basel, Karger, 1966, 81-104.
39. Cohen P.J., Aleksander S.C., Smith F.C., Reivick M., Wollman H. Effects of hypoxia and normocabia on cerebral blood flow and metabolism in conscious man. *J. Appl. Physiol.* 23 /1967/ 183-189.
40. Collins R.C., Posner J.B., Plum F.: Cerebral energy metabolism during electroshock seizures in mice. *Am. J. Physiol.* 218 /1970/ 943-950.
41. Colman R.F.: Effect of modification of methionyl residue on the kinetic and molecular properties of isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 243 /1968/ 2454-2464.

42. Colman R.F., Chu R.: The role of sulfhydryl groups in the catalytic function of isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 245 /1970/ 601-607.
43. Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H.: *Acetylcholine. W: The biochemical basis of neuropharmacology.* New York, Oxford University Press, London, Toronto, 1970, 60-79.
44. Czok R., Lamprecht W.: Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. *W: Methods in Enzymatic Analysis* ed. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, vol. 3, 1974, 1446-1451.
45. D'Adamo A.F., Haft D.E.: An alternate pathway of *L*-ketoglutarate catabolism in the isolated, perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, 240 /1965/ 613-617.
46. Daikuhara Y., Tsunemi T., Takeda Y.: The role of ATP citrate lyase in the transfer of Acetyl groups in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 158 /1968/ 51-61.
47. Dennis D.T., Coultate T.P.: Phosphofructokinase, a regulatory enzyme in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25 /1966/ 187-191.
48. Deutsch C., Rafałowska U.: Transmembrane electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Letters.*, 108 /1979/ 274-278.
49. Dixon M., Webb E.C.: *Enzymes.* Academic Press, New York. 1957, 21-36.
50. Dobkin J.: Effects of excitation and anesthesia on the glutamate content of the rat brain with a reference to the administration of glutamate *J. Neurochem.* 19 /1972/ 1195-1202.

51. Domańska-Janik K., Zaleska M., Zalewska T., Witter B.:  
Glucose metabolism in ischemic brain of young and adult rats. Proc.Int.Symp. "Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension" ed. Mossakowski M.J., Zelman J.B., Kroh H. Pol. Med. Publ. Warsaw, 1978, 87-95.
52. Domańska-Janik K., Zalewska T.: Arterial acid-base changes and brain energy metabolism in unanesthetized rats in mild hypoxia. Resuscitation, 1979 /w druku/.
53. Drewes L.R., Gilboe D., Daud Betz A.L.: Metabolic alterations in brain during anoxic-anoxia and subsequent recovery. Arch.Neurol. 29 /1973/ 385-390.
54. Drewes L.R., Gilboe D.D.: Glycolysis and the permeation of glucose and lactate in the isolated, perfused dog brain during anoxia and postanoxic recovery. J. Biol. Chem. 218 /1973/ 2489-2496.
55. Dripps R.D., Comroe J.H., Jr: The effect of the inhalation of high and low oxygen concentrations on respiration, pulse rate, ballistocardiogram and arterial oxygen saturation /o ximeter/ of normal individuals. Amer. J. Physiol. 149 /1947/ 277-291.
56. Duffy T.E., Nelson S.R., Lowry O.H.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. J. Neurochem. 19 /1972/ 959-977.
57. Dutton P.L., Wilson D.F.: Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. Biochim. Biophys. Acta, 346 /1974/ 165-212.

58. Erecińska M., Wilson D.F., Nishiki K.: Homeostatic regulation of cellular energy metabolism: experimental characterization and fit to a model. *Amer. J. Physiol.* 234 /1978/ C82-C89.
59. Ernster L., Knylenstierna B.: Structure, composition and function of mitochondrial membranes. W: *Mitochondria-Structure and Function*, red. L. Ernster. Z. Drahota, Acad. Press, London, New York, 1969, 5-31.
60. Ernstring J.: The effects of hypoxia upon human performance and the electroencephalogram. W: *Oxygen Measurements in Blood and Tissues and their Significance*, ed. Payne J.P., Hill D.W., Churchill Ltd., London 1966, 245-259.
61. Fonnum F.: Recent developments in biochemical investigations of cholinergic transmission. *Brain Res.* 62 /1973/, 497-507.
62. Fawcett J.K., Scott J.E.: A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13 /1960/ 156-159.
63. Garland P.B., Randle P.J., Newsholme E.A.: Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes as starvation. *Nature*, 200 /1963/ 169-170.
64. Garland P.B.: Control of citrate synthesis in mitochondria. W: *The Metabolic Roles of Citrate*, Biochemical Society Symposium No 27, red. T.W. Goodwin, Academic Press, London and New York, 1968, 41-60.
65. Garfield P.D., Lowry O.H., Schulz D., Passonneau J.V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischemia and anesthesia. *J. Neurochem.* 13 /1966/ 185-195.

66. Gerhart J.C., Pardee A.B.: The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* 237 /1962/ 891-896.
67. Goebell H., Klingenberg M.: DPN- spezifische isocitrat dehydrogenase der mitochondrion. *Biochem Z.*, 340 /1964/ 441-464.
68. Goldberg N.D., Passonneau J.V., Lowry O.H.: Effect of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 241 /1966/ 3997-4003.
69. Goodridge A.G.: Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 248 /1973/ 4318-4326.
70. Gotesfeld Z., Miller A.T.: Metabolic response of rat brain to acute hypoxia: influence of polycythemia and hypercapnia. *Amer. J. Physiol.*, 216 /1969/ 1374-1379.
71. Greenfield S., Claus G.W.: Isocitrate dehydrogenase and glutamate synthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bact.*, 100 /1969/ 1264-1270.
72. Greville C.D.: Intracellular compartmentation and the citric acid cycle. W: *Citric Acid Cycle - Control and Compartmentation*, red. Lowenstein J.M., 1969, 1-136.
73. Gromek A., Rafałowska U.: Citrate oxidation in the cytoplasmic fraction of rat brain. *J. Neurochem.* 19 /1972/ 2687-2695.
74. Gumińska M.: Regulacja glikolitycznej drogi wytwarzania energii. *Monogr. bioch. W: Tlenianie biologiczne*, 24 /1971/ 47-69.
75. Gurdjian E.S., Stone W.E., Webster J.E.: Cerebral metabolism in hypoxia. *Arch. Neurol. and Psychiat.* 54 /1944/ 472-477.

76. Gutmann I., Wahlefeld A.W.: L-/±-Lactate: determination with lactate dehydrogenase and NAD. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, vol. 3, 1974, 1464-1468.
77. Guynn R.W., Veech R.L.; The equilibrium constants of the adenosine triphosphate hydrolysis and the adenosine triphosphate-citrate lyase reactions. *J. Biol. Chem.*, 248 /1973/ 6966-6972.
78. Hagerdal M., Keykhah M., Perez E., Harp J.R.: Additive effects of hypothermia and phenobarbital upon cerebral oxygen consumption in the rat. *Acta Anesth. Scand.* 23 /1979/ 89-92.
79. Hansen A.J.: Extracellular potassium activity in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta Physiol. Scand.*, 96 /1976/ 42 A.
80. Harford S., Weitzman P.D., Evidence for isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies. *Biochem. J.*, 151 /1975/ 455-458.
81. Hathaway I.A., Atkinson D.E.: Kinetics of regulatory enzymes: Effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20 /1965/ 661-665.
82. Hebb C.O.: Biosynthesis of acetylcholine in nervous tissue. *Physiol. Rev.*, 52 /1972/ 918-957.
83. Henderson N.S.: Isoenzymes of isocitrate dehydrogenase: Subunit structure and intracellular location. *J. Exp. Zool.* 158 /1965/ 263-273.
84. Hess H.H., Derr J.E.: Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. *Anal. Biochem.*, 63 /1975/ 607-613.

85. Howard B.L., Becker R.R.: Isolation and some properties of the triphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.*, 245 /1970/ 3186-3194.
86. Illingworth J.A., Tipton K.F.: Purification and properties of the phosphate - dependent isocitrate dehydrogenase from pig liver cytoplasm. *Biochem. J.*, 118 /1970/ 253-258.
87. Islam M. Bell, Joyce L., Bazan D.N.: Purification and comparative properties of isoenzymes of nicotinamide - adenine dinucleotide phosphate - isocitrate dehydrogenase from rat heart and liver. *Biochem. J.*, 129 /1972/ 1003-1011.
88. Jawork D., Gruber W., Bergmeyer H.U.: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, vol.4, 1974, 2127-2131.
89. Johnson M.K.: The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.*, 77 /1960/ 610-618.
90. Johansson H., Siesjö B.K.: Cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 93 /1975/ 269-276.
91. Kaplan N.O.: *W Methods in Enzymology II*. red. Colowick S.P., Kaplan N.O., 1955, 681-687.
92. 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 of normal young men. *J. Clin. Invest.*, 27 /1948/ 484-491.

93. Koeppen A.M., Barron K.D., Mitzen E.J.: Fatty acid chain elongation in rat brain synaptosomes. *Biochemistry*, 12 /1973/ 276-281.
94. Koob G.F., Annau Z.: Effect of hypoxia on hypothalamic mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 224 /1973/ 1403-1408.
95. Kosicki G.W., Lee L.P.K.: Effect of divalent metal ions on Nucleotide inhibition of pig heart citrate synthase. *J. Biol. Chem.*, 241 /1966/ 3571-3574.
96. Krebs H.A., Johnson W.A.: The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4 /1937/ 148-155.
97. Krebs H.A.: The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate. *Advan. Enzymol.*, 3 /1943/ 191-252.
98. Krebs H.A., Mellanby J., Williamson D.H.: The equilibrium constant of the 3-hydroxybutyric dehydrogenase system. *Biochem. J.* 82 /1962/ 96-98.
99. Krebs H.A.: Mitochondrial generation of reducing power. W: *Biochemistry of Mitochondria*, red. Slater E.C., Kaniuga Z., Wojtczak L., PWN Warszawa, Acad. Press, London 1967, 105-113.
100. Lai J.C.K., Clark J.B.: Preparation and properties of mitochondria derived from synaptosomes. *Biochem. J.*, 154 /1976/ 423-432.
101. Lai J.C.K., Walsh J.M., Dennis S.C., Clark J.B.: Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.*, 28 /1977/ 625-631.

102. Lamprecht W., Trantschold I.: ATP; determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. W: Methods in Enzymatic Analysis, red. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie Academic Press, New York, London, vol. 4, 1974, 2101-2110.
103. Lamprecht W., Stein P., Heinz F., Weisser : Creatine phosphate. W: Methods in Enzymatic Analysis, red. Bergmeyer H.U. Verlag Chemie/Academic Press, New York, London, vol. 4, 1974, 1777-1781.
104. Lehninger A.L.: Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem., 190 /1951/ 345-359.
105. Lehninger A.L., Sudduth H.C., Wire I.B., D-hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria. J. Biol. Chem., 235 /1960/ 2450-2475.
106. Lewis L.D., Pouten U., Siesjö B.K.: Arterial acid base changes in unanaesthetized rats in acute hypoxia. Respiration Physiol. 19 /1973/ 312-321.
107. Lidbrink P., Corrodi H., Fuxe K., Olson L.: Barbiturates and meprobamate: decreases in catecholamine turnover of central dopamine and noradrenaline neuronal systems and the influence of immobilization stress. Brain Res. 42 /1972/ 507-524.
108. Lolley R.N., Sampson F.E.: Cerebral high-energy compounds: changes in anoxia. Am. J. Physiol. 202 /1962/ 77-79.
109. Lowenstein J.M., Smith S.R.: Intra and extramitochondrial isocitrate dehydrogenases. Biochim. Biophys. Acta, 56 /1962/ 385-387.

110. Lowenstein J.M.: Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. W: The metabolic Roles of Citrate Biochemical Society Symposium No 27, red. Goodwin T.W., Acad. Press London and New York, 1968, 61-86.
111. Lowenstein J.M.: Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. W: The Metabolic roles of citrate biochemical society. Symposium No 27, red. Goodwin T.W., Acad. Press London and New York, 1968, 61-86.
112. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 /1951/ 265-275.
113. Lowry O.H., Passonneau J.V.: The relationship between substrates and enzymes of glycolysis in brain. J. Biol. Chem. 239 /1964/ 34-41.
114. Lowry O.H., Passonneau J.V., Hasselberger F.H., Schulz D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. Biol. Chem., 239 /1964/ 18-30.
115. Lynen F., Matsubashi M., Numa S., Schweizer E.: The cellular control of fatty acid synthesis at the enzymatic level. Biochem. Soc. Symp. 24 /1963/ 43-56.
116. Łazarewicz J.W., Majewska M.D., Wróblewski J.T.: Possible participation of calcium in the mechanism of ischemic brain damage. Proc. Int. Symp. "Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension", red. Mossakowski M.J., Zelman I.B., Kroh H., Pol. Med. Publ., Warsaw 1978, 79-86.

117. Macfarlane N., Mathews B., Daiziel K.: The purification and properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from ox-heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 74 /1977/ 553-559.
118. MacMillan V., Siesjö B.K.: Brain energy metabolism in hypoxemia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 30 /1972/ 126-136.
119. Majerus P.W., Kilburn E.: Acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Biol. Chem.* 244 /1969/ 6254-6262.
120. Majewska D., Gromek A., Strosznajder J.: Properties of brain mitochondria in conditions of ischemia and nembutal anesthesia in guinea pigs. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 22 /1974/ 267-273.
121. Majewska M.D., Khatchatrian L., Strosznajder J., Łazarewicz J.: Mechanism of damage of mitochondrial lipid chemical structure after ischemic anoxia. *Proc. Europ. Soc. Neurochem.*, red. Neuhoff V., Verlag Chemie Weinheim, N. Y., 1978, 308.
122. Mayewsky A.: Ischemia in the brain, the effect of carotid artery ligation and decapitation on the energy state of the awake and anesthetized rat. *Brain Res.* 140 /1978/ 217-230.
123. Masserano J., Weiner N.: Similarities between the in vivo activation of adrenal tyrosine hydroxylase and the in vitro activation of the enzyme by an adenosine 3'-5'-monophosphate dependent protein phosphorylating system in catecholamins: *Frontiers in Basic and Clinical Research*, red. Usdin E., Kopin I.J., Barchas J., Pergamon Press, in press.

124. Matsuhashi M., Matsuhashi S., Lynen F.: Zur Biosynthese der Fettsäuren. V. Die Acetyl-CoA Carboxylase aus Rattenleber und ihre Aktivierung durch Citronensäure. *Biochem. Z.* 340 /1964/ 263-289.
125. Max S. R., Scorpio R. M., Purvis J.: Citric and isocitric transport in isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245 /1970/ 4807-4813.
126. May L., Migazaki M., Grenell R. G.: The distribution of glutamic-oxaloacetic acid transaminase in rat brain. *J. Neurochem.*, 4 /1959/ 269-274.
127. Michenfelder J. D., Theye R. A.: Cerebral protection by thiopental during hypoxia. *Anesthesiology*, 39 /1973/ 510-517.
128. Michenfelder J. D.: Cerebral protection by barbiturate anesthesia. Use after middle artery occlusion in Java Monkeys. *Arch. Neurol.* 33 /1976/ 345-350.
129. Mitchell P.: Translocations through natural membranes. *Advances in Enzymology*, 29 /1967/ 33-87.
130. Monsour T. E., Monsour I. M.: Effects of serotonin /5-Hydroxytryptamina/ and adenosine 3'-5'-phosphate on phosphofructokinase from the liver fluke *fasciola, hepatica*. *J. Biol. Chem.*, 237 /1962/ 629-635.
131. Moss J., Jamagishi M., Kleinschmidt A. H., Lane M. D.: Acetyl coenzyme A carboxylase. Purification and properties of the bovine adipose tissue enzyme. *Biochemistry*, 11 /1972/ 3779-3786.
132. Nahas G. G., Steinsland O. S.: Increased rate of catecholamine synthesis during respiratory acidosis. *Respir. Physiol.* 5 /1968/ 108-117.

133. Natelson S., Pincus J.B., Lugovoy I.K.: Microestimation of citric acid a new colorimetric reaction for penta-bromoacetone. *J. Biol. Chem.* 175 /1948/ 745-750.
134. Nicoll R.A.: Sedative-hypnotics: Animal pharmacology. W: *Handbook of Pharmacology I.*, red. Iversen L.L., Iversen S.P., Snyder S.H., Plenum Publishing Co., 1978, 187-234.
135. Nishiki K., Erecińska M., Wilson D.F.: Energy relationships between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in rat heart. *Amer. J. Physiol.*, 234 /1978/ C73-C81.
136. Norberg K., Siesjö B.K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. I. Pattern of activation of glycolysis a reevaluation. *Brain Res.* 86 /1975/ 31-44.
137. Norberg K., Siesjö B.K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. II. Citric acid cycle intermediates and associated amino acids. *Brain Res.*, 86 /1975/, 45-54.
138. Nordberg A., Sundwall A.: Effect of sodium pentobarbital on apparent turnover of acetylcholine in different brain regions. *Acta Physiol. Scand.*, 99 /1977/ 336-344.
139. Ochoa S., Stern I.R., Schneider M.C.: Enzymatic synthesis of citric acid. *J. Biol. Chem.*, 193 /1951/ 691-702.
140. Ochoa S.: Isocitric dehydrogenase system /TPN/ from pig heart. W: *Methods in Enzymology*, red. Colowick S.P., Kaplan N.O., Academic Press Inc. New York, 1955, vol. 1, 699-704.
141. Ozawa K., Seta K., Takeda H., Ando K., Hanada H., Araki C.: On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem.*, 59 /1966/ 501-510.

142. Palmieri F., Stipani I., Quagliariello E., Klingenberg M.: Kinetic study of the tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Europ. J. Biochem.*, 26 /1972/ 587-594.
143. Palmieri F., Genchi G., Stipani I., Riccio P., Quagliariello E.: The tricarboxylate carrier of the mitochondrial membrane: Solubilization and partial purification of citrate - binding protein from submitochondrial particles. *Biochem. Soc., Trans.*, 5 /1977/ 527-531.
144. Palmieri F., Quagliariello E.: The mitochondrial transport system for inorganic phosphate and Krebs cycle intermediates. W: *Bioenergetics at mitochondria and cellular levels*, red. Wojtczak L., Lenartowicz E., Zborowski J., Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, 1978, 5-38.
145. Passonneau J. V., Lowry O. H.: Phosphofructokinase and the control of the citric acid cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13 /1963/ 372-379.
146. Passonneau J. V., Lowry O. H.: The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Adv. Enzyme Regulation*, 2 /1964/ 265-274.
147. Patel M. S.: Citrate transport and oxidation by isolated rat brain mitochondria. *Brain Res.*, 98 /1975/, 607-611.
148. Permegiani A., Bowman R. H.: Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12 /1963/ 268-273.
149. Pfaff E., Klingenberg M., Ritt E., Vogell W.: Korrelation des unspezifisch permeablen mitochondrialen Raumes mit dem "Inter-membran-Raum", *European. J. Biochem.*, 5 /1968/ 222-232.

150. Pfeleiderer G.: Determination with glutamate-Oxaloacetate transaminase and malic dehydrogenase. W: Methods of Enzymatic Analysis, red. Bergmeyer H.U., Academic Press, New York, 1963, 381-383.
151. Quagliariello E., Papa S., Meijer A.J., Tager J.M.: Substrate transport in mitochondria and control of metabolism. W: Mitochondria - Structure and Function, red. Ernster L., Drahota Z., Academic Press, London, New York, 1969, 335-346.
152. Rabinowitz M.: Protein synthesis and turnover in normal and hypertrophied heart. Amer. J. Cardiol., 31 /1973/ 202-210.
153. Racker E.: Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochim. Biophys. Acta, 4 /1950/ 211-214.
154. Rafałowska U., Gromek A.: Utlenianie cytrynianu we frakcji cytoplazmatycznej mózgu szczura w warunkach normy i niedotlenienia. Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań, 1972, Abstrakt, str. 247.
155. Rafałowska U., Pastuszko A., Gromek A.: The effect of pyridine nucleotides on the activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from brain cytosol. FEBS Letters, 42, No 1, 1974, 20-22.
156. Rafałowska U., Pastuszko A., Gromek A.: NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from rat brain cytosol. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol. XXII, No 7-8 /1974/ 453-459.
157. Rafałowska U., Gromek A.: Effect of oxygen deficiency and barbiturate anesthesia on citrate oxidation in brain cytoplasm. Neuropat. Pol., XIII, 2 /1975/ 229-239.

158. 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.*, 25 /1975/ 497-501.
159. Rafałowska U.: Wewnątrzkomórkowa regulacja metabolizmu cytrynianu. *Postępy Biologii Komórki*, 3 No 4 /1976/ 325-342.
160. Rafałowska U., Książak H.: Subcellular localization of enzymes oxidizing citrate in the rat brain. *J. Neurochem.*, 27 /1976/ 813-815.
161. Rafałowska U.: Malate and citrate transport in brain mitochondria under conditions of normoxia, hypoxia and anesthesia. *FEBS Meeting, Abstracts, Kopenhaga, 1977, B1-3, 307.*
162. Rafałowska U.: Transport jabłczanu i cytrynianu do mitochondriów mózgu. *XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 1977, Abstract, Pc-9.*
163. Rafałowska U.: Citrate transport to isolated rat brain mitochondria. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* vol. XXVI, No 9, 1978, 589-597.
164. Rafałowska U.: Rat brain synaptosomes: a preparation with high ATP/ADP. *Fed. Proc. Dallas*, 38 /1979/ 1514.
165. Rafałowska U.: Transport of malate and citrate into rat brain mitochondria under hypoxia and anesthesia. *Neurochem. Research* 4, No 3 /1979/ 355-364.
166. Rafałowska U., Książak H.: Uptake of citrate by synaptosomes and synaptosomal mitochondria from rat brain. *IRCS Medical Science, Biochem.* 7 /1979/ 7.

167. Rafałowska U., Pastuszko A.: Molecular weight of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from rat brain cytosol under normoxia and hypoxia. *Neurochem. Research*, 4, No 2 /1979/ 241-247.
168. Rafałowska U.: Activities of citrate metabolising enzymes in subcellular fractions from rat brain in normoxia, hypoxia and anesthesia. *IRCS Medical Science, Biochem.* 7 /1979/ 207.
169. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D.F.: Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembutal anesthetized and nonanesthetized animals. *J. Neurochem.* 34 /6/ /1980/ 1380-1386.
170. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D.F.: The effect of acute hypoxia on synaptosomes from rat brain. *J. Neurochem.* 34 /5/ /1980/ 1160-1165.
171. Ramaiah A., Hathaway J.A.: Atkinson D.E.: Adenylate as a metabolic regulator - effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239 /1964/ 3619-3622.
172. Ramaley R.F., Hudock M.: Purification and properties of isocitrate dehydrogenase /NADP/ from *thermus aqualieus* XT-1, *Bacillus-subtilis* 168 and *Chlamydomonas reinhardtii*- X-2. *Biochim. Biophys. Acta* 315 /1973/ 22-36.
173. Randle P.J.: Pyruvate dehydrogenase complex - meticulous regulator of glucose disposal in animals. *TIBS*, 3 /1978/ 217-219.

174. Reed L.J., Linn T.C., Hucho F., Namihira G., Barrera C.R., Roche T.E., Pelly I.W., Randall D.D.: Molecular aspects of the regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. W: Metabolic interconversion of enzymes: red. Wieland O.H., Halmreich E., Holzer H., Springer Verlag, Berlin, 1972, 281-291.
175. Reeves H.C., Doumy G.O., Lin Ch.Ch., Houston: NADP-specific isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 258 /1972/ 27-39.
176. Ridge I.: Hypoxia and the energy charge of cerebral adenylate pool. *Biochem. J.*, 127 /1972/ 351-355.
177. Rognstad R.: The pyruvate cycle in adipose tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 129 /1969/ 13.
178. Roodyn D.B., Sutlie J.W., Work T.S.: Protein synthesis in mitochondria. *Biochem. J.*, 83 /1962/ 29-40.
179. Rosing J., Slater E.C.: The value of  $G^0$  for the hydrolysis of ATP. *Biochim. Biophys. Acta*, 267 /1972/ 275-290.
180. Rossowska M., Lewandowski W., Dąbrowiecki Z.: Effect of ischemia on the activity of  $Na^+ - K^+ - ATPase$  in the microsomal fraction of guinea pig brain. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 24 /1976/ 691-696.
181. Rossowska M., Rafałowska U.: Zmiany w lokalizacji aminotransferazy alaniny i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w subfrakcjach komórkowych mózgu w warunkach niedoboru tlenowego i anestezji. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 1973, Abstrakt A1-19.

182. Salas M.L., Vinuela E., Salas M., Sols A.: Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19 /1965/ 371-376.
183. Schephof G.L., Scarpa A., von Toorenbergen A.: The effect of local anesthetics on hydrolysis of free and membrane bound phospholipides by various phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta* 270 /1972/ 226-240.
184. Schmahl F.W., Betz E., Dettinger E., Hohorst J.: Energie-stoffwechsel der Grosshirnrinde und Elektroencephalogramm bei Sauerstoffmangel. *Pflügers, Arch. ges. Physiol.* 292 /1966/ 46-59.
185. Shepherd J.A., Kalnitsky G.: Intracellular distribution of fumarase aconitase and isocitric dehydrogenase in rabbit cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 207 /1954/ 605-611.
186. Shephard D., Garland P.B.: ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidising palmitoylcarnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 /1966/ 89-93.
187. Shephard D., Garland P.B.: The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, 114 /1969/ 597-610.
188. Siebert G., Dubne J., Waener R.C., Plant G.W.: The preparation of isocitric dehydrogenase from mammalian heart. *J. Biol. Chem.*, 226 /1957/ 965-975.
189. Siebert G.: Citrate and isocitrate determination with aconitase and isocitric dehydrogenase. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer H.U., Academic Press, New York, 1963, 318-323.

190. Silbert C.K., Martin D.B.: Inhibition by citrate of pyruvate dehydrogenase in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31 /1968/ 818-824.
191. Siesjö B.K., Nilsson L.: The influence of arterial hypoxemia upon labile phosphates and upon extracellular and intracellular lactate and pyruvate concentrations in the rat brain. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27 /1971/ 83-96.
192. Siesjö B.K., Folbergova J., Mac Millan V.: Effect of hypercapnia upon intracellular pH in the brain, evaluated by the bicarbonate - carbonic acid method and from the creatine phosphokinase equilibrium. *J. Neurochem.* 19 /1972/ 2483-2495.
193. Siesjö B.K.: Regulation of cerebral metabolism during hypoxia. *Proc. ISN, Tokyo-Meeting 1973*, 84-85.
194. Siesjö B.K., Johannsson H., Ljunggren B., Norberg K.: Brain dysfunction in hypoxia and ischemia. W: *Brain dysfunction and metabolic disorders*, red. Plum F., Raven Press, No 4, vol. 53, 1974, 75-112.
195. Siesjö B.K., Nordstrom C.H., Rehnerowa S.: Metabolic aspects of cerebral hypoxia-ischemia. W: *Tissue hypoxia and ischemia*, red. Reivich M., Coburn R., Plenum Press, No 4 /1977/ 261-269.
196. Siesjö B.K.: The influence of respiratory disturbances on acid-base and energy metabolism of the brain. *Intens. Care. Med.* 3 /1977/ 245-249.
197. Siesjö B.K.: Metabolism, free energy and work-on overview. W: *Brain energy metabolism*, red. Wiley J. and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1978, 1-28.

198. Siesjö B.K.: Brain metabolism and anesthesia. *Acta Anesth. Scand.*, suppl. 70 /1978/ 56-59.
199. Siesjö B.K.: Cellular work in the brain. W: Brain energy metabolism, red. Wiley J. and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1978, 29-55.
200. Siesjö B.K.: Anaesthesia, Analgesia and Sedation. W: Brain energy metabolism, red. Wiley J., and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto 1978, 233-265.
201. Siesjö B.K.: Hypoxia. W: Brain energy metabolism, red. Wiley J. and Sons, Chichester-New York, Brisbane, Toronto, 1978, 398-452.
202. Smith S., Abraham S.: Fatty acid synthesis in developing mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 136 /1970/ 112-121.
203. Smith A.L., Wollman H.: Cerebral blood flow and metabolism: Effect of anesthetic drugs and techniques. *Anesthesiology*, 36 /1972/ 378-400.
204. Sokal R.R., Rohlf F.J.: Introduction to biostatistics. Freeman and Co., San Francisco, 1973.
205. Sokoloff L., Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J. Neurochem.*, 29 /1977/ 13-26.
206. Sörbo B.: On the origin of the acetyl group of acetylcholine W: Drugs and cholinergic mechanism in the CNS, red. Heilbrunn E., Winter A., 1970, 133-141.
207. Spencer A.F., Lowenstein J.M.: The supply of precursors for the synthesis of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 237 /1962/ 3640-3648.

208. Spencer A., Corman L., Lowenstein J.M.: Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. A comparison of citrate and acetate incorporation into fatty acids. *Biochem.J.*, 93 /1964/ 378-388.
209. Spencer A.F., Lowenstein J.M.: Citrate content of liver and kidney of rat in various metabolic states and in fluoroacetate poisoning. *Biochem.J.*, 103 /1967/, 342-348.
210. Srere P.A.: Studies on purified citrate - enzymes metabolic interpretations, W: *The Metabolic Roles of Citrate*, Biochemical Society, Symposium No 27, red. Goodwin T.W. Academic Press, London and New York 1968, 11-21.
211. Steen P.A., Michenfelder J.D.: Cerebral protection with barbiturates. *Stroke*, 9 /1978/ 140-142.
212. Strosznajder J.: The effect of hypoxic-hypoxia on brain phospholipids and free fatty acids during development. W: *Proceedings of International Meeting on a Multidisciplinary approach to brain development*. Selva di Fasano, Italy, 1979,
213. Stubbs M., Veech R.L., Krebs H.A.: Control of the redox state of the nicotinamide adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm. *Biochem. J.*, 126 /1972/ 59-65.
214. Swaab D.F., Baer K.: The presence of biologically labile compounds during ischemia and their relationship to the EEG in the cerebral cortex and hypothalamus. *J. Neurochem.*, 19 /1972/ 2843-2853.
215. Sze-Chuk-Cheng: The tricarboxylic acid cycle. W: *Handbook of neurochemistry*. red. Lajtha A., Plenum Press, New York, vol.15, Part A., 1971, 238.

216. Szutowicz A., Stępień M., Angielski S.: The inhibition of rat brain ATP: citrate oxaloacetate - lyase by - glutamate. *J. Neurochem.*, 22 /1974/ 85-91.
217. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S.: The activity of ATP citrate lyase in rat brain and liver under various physiological conditions. *Acta Biochim. Polon.* 21 /1974/ 331-338.
218. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S.: Purification and kinetic properties of ATP: citrate oxaloacetate lyase from rat brain., *J. Neurochem.*, 25 /1975/ 11-20.
219. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S.: Udział liazy ATP-cytrynianowej w biosyntezie acetylocholino w mózgu. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 8, /1978/ 11-25.
220. Tager J.M., De Haan E.J., Slater E.C.: The metabolism of  $\alpha$  ketoglutarate. W: *Citric Acid Cycle - Control and Compartmentation*, red. Lowenstein J.M., 1969, 213-247.
221. Tews J.K., Carter S.H., Roa P.D., Stone W.E.: Free amino acids and related compounds in dog brain: post-mortem and anoxic changes, effects of ammonium chloride infusion, and levels during seizures induced by picrotoxin and by pentylenetetrazols. *J. Neurochem.*, 10 /1963/ 641-653.
222. Tubs P.K.; Inhibition of citrate formation by long-chain acyl thioesters of coenzyme A as a possible control mechanism in fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 70 /1963/ 608-609.

223. Tuček S.: Subcellular distribution of acetylcoenzyme A synthetase, ATP citrate lyase, citrate synthase, choline acetyltransferase, fumarate hydratase and lactate dehydrogenase in mammalian brain tissue. *J. Neurochem.*, 14 /1967/ 531-545.
224. Tuček S., Cheng S. C.: Provenance of the acetyl group of acetylcholine and compartmentation of acetyl-CoA and Krebs cycle intermediates in the brain in vivo. *J. Neurochem.*, 22 /1974/ 893-914.
225. Tuček S.: Supply of acetyl groups for the synthesis of acetylcholine. W: *Acetylcholine synthesis in neurons*. A Halsted Press Book, ed. Wiley J. and Sons, New York, London Chapman and Hall, 1978, 62-97.
226. Tuček S.: *Acetylcholine Synthesis in Neurons*. W: *Acetylcholine synthesis in neurons*. A Halsted Press Book John Wiley and Sons, New York, London Chapman and Hall, 1978, 33-61.
227. Umbreit W.W., Burris R. H., Stanffer I. F.: Direct and indirect methods for carbon dioxide. W: *Monometric Techniques*, ed. Burgess, Minneapolis, 1957, 28-45.
228. Van Dam K., Tson C. S.: Accumulation of substrates by mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 162 /1968/ 301-309.
229. Veech R. L., Harris R. L., Veloso D. - Veech E. H.: Freeze-blowing: a new technique for the study of brain in vivo. *J. Neurochem.*, 20 /1973/ 183-188.
230. Waite M., Wakil S. J.: Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XII. Acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 237 /1962/ 2750-2757.

231. Weber K., Osborn M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 /1969/ 4406-4412.
232. Whittaker V. P., Barker L. A.: The subcellular fraction of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. W: *Methods of neurochemistry*, red. Fried R., Marcel Dekker, New York 1972, vol. 2, 1-52.
233. Wieland O., Weiss L.: Inhibition of citrate - synthase by palmityl - coenzyme A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13 /1963/ 26-31.
234. Wieraszko A.: Regulacja biosyntezy acetylocholiny. *Postępy Biochem.*, 21 /1975/ 57-73.
235. Wideman J., Domańska-Janik K.: Regulation of thiols in the brain. 1. Concentrations of thiols and glutathione reductase activity in different parts of the rat brain during hypoxia. *Resuscitation*, 3 /1974/ 27-36.
236. Williamson D. H., Mellanby J., Krebs H. A.: Enzymatic determination of D/-/-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem. J.*, 82 /1962/ 90-96.
237. Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A.: The redox state of the free nicotinamide - adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.*, 103 /1967/ 514-527.
238. Williamson I. R., Corkey B. E.: Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. W: *Methods in enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. E., Acad. Press, New York-London, vol. 13 1969, 434-513.

239. 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 suspension of isolated liver cells. *Biochem.J.*, 140 /1974/ 57-64.
240. Wilson D.E., Stubbs M., Oshino N., Erecińska M.: Thermodynamic relationships between the mitochondrial oxidation-reduction reactions and cellular ATP-levels in ascites tumor cells and perfused rat liver. *Biochemistry* 13 /1974/ 5305-5311.
241. Wood J.D.: A possible role of gamma-aminobutyric acid in the homeostatic control of brain metabolism under conditions of brain hypoxia. *Exp. Brain Res.*, 4 /1967/ 81-84.
242. Wood J.D., Watson W.J., Ducker A.J.: The effect of hypoxia on brain aminobutyric acid levels. *J. Neurochem.*, 15 /1968/ 603.
243. Wood J.D., Watson W.J.: The effect of hyperoxia and hypoxia on free and bound -aminobutyric acid in mammalian brain. *Canad. J. Biochem.* 47 /1969/ 994-997.
244. Woodbury D.M., Karler R.: The role of carbon dioxide in the nervous system. *Anesthesiology*, 21 /1960/ 686-703.