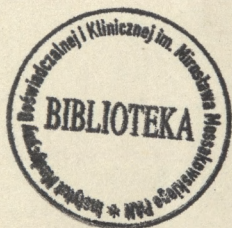






Lek. Krystyna Domańska-Janik  
Zespół Neurochemii  
Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

DOŚWIADCZALNE NIEDOTLENIENIE A NIKTORNE  
ZAGADNIENIA TĘTNOBITEGO METABOLIZMU GLUKOZY  
W OSRODKOWYM UKŁADZIE NEURONOWYM



25 282

H-4140

Praca na stopień doktora medycyny

Promotor: Dr. dr med.  
Mirosław Haaszkowski

WARSZAWA - 1970

Składam serdeczne podziękowanie mojemu  
Promotorowi, Docentowi dr med. Mirosławowi  
Mossekowskiemu, za życzliwą opiekę i cenne  
wskazówki w przygotowaniu pracy.

Równocześnie dziękuję dr.n.przr.Andrzejowi  
Gronkowi, Kierownikowi Zespołu Neurochemii  
za konsultacje i pomoc wprowadzenia doświad-  
czeń.

## Spis treści

### - WPROWADZENIE

- I Metabolizm energetyczny tkanki nerwowej a niedotlenienie
- II Biochemiczne aspekty pobudliwości tkanki nerwowej i ich związek z niedotlenieniem
- III Czynniki modyfikujące wrażliwość OUN na niedotlenienie i problem topograficznej wybiórczości uszkodzeń
- IV Wpływ niedotlenienia na niektóre funkcje metaboliczne tkanki nerwowej
- V Cykl heksosomonofosforanowy w mózgu i jego związek z niedotlenieniem

### - CEL PRACY I PLAN PROWADZONYCH BADAŃ

### - MATERIAŁY I METODY

- I Metodyka doświadczalna
  1. Ostre krótkotrwałe niedotlenienie proste/anoksja anoksyjna/
  2. Anoksja anoksyjno ischemiczna
- II Przygotowanie materiału doświadczalnego
- III Metody biochemiczne
- IV Metody badań histologicznych i histochemicznych
- V Odczynniki
- VI Stosowane skróty

### - WYNIKI BADAŃ

- I Grupa zwierząt kontrolnych
  1. Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego i oddychanie tkanekowego w różnych okolicach OUN u świnek morskich i szczurów
  2. Obraz histologiczny i histochemiczny ośrodkowego układu nerwowego u szczurów
  3. Omówienie

## II Niedotlenienie proste - Anokseje anoksyjne

1. Przebieg doświadczenia
2. Kontrola stopnia niedotlenienia
3. Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego i oddychania tkankowego w różnych okolicach OUN
4. Obraz histologiczny i histochemiczny OUN
5. Omówienie

## III Encefalopatia anoksyjno-izchemiczna

1. Przebieg doświadczenia
2. Kontrola doświadczenia
  - a/ zwierzęta zdrowe
  - b/ zwierzęta z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną wspólną
  - c/ podsumowanie
3. Charakterystyka oddychania tkankowego i aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego
4. Badanie histologiczne i histochemiczne
5. Omówienie

## IV Uzupełniające badania in vitro

1. Wpływ warunków inkubacji skrawków tkankowych OUN na oddychanie i pobudliwość metaboliczną pod wpływem zwiększonego stężenia jonów potasowych
2. Wpływ warunków inkubacji skrawków kory mózgu na aktywność dehydrogenaz związanych z cyklem pentozowym
3. Oddychanie i oksydacyjna fosforylacja frakcji mitochondrialnej mózgu w obecności egzogennej kwasu 6-fosfoglukonowego

- DYSKUSJA

- WNIOSKI KONCOWE

- STRESZCZENIE

- RYCINY

- PISMIENNICTWO

Wrażliwość komórek na niedobór tlenu różni się znacznie w zależności od rodzaju tkanki. Tkanke nerwowa jest najbardziej uzależniona w swoich podstawowych funkcjach od obecności tlenu, a tym samym najwrażliwsza na uszkodzenia związane z jego niedoborem.

Bezpośrednie skutki ostrego niedotlenienia mogą być powstające już po kilku minutach trwania, funkcjonalne uszkodzenia struktur mózgowych /42, 59, 60/. Znajdują one odbicie w charakterystycznym zespole klinicznym i swoistym obrazie elektroencefalograficznym /4,51/. Towarzyszą im zaburzenia metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej, z gwałtownym spadkiem poziomu wysokoenergetycznych związków fosforanowych oraz innych związków, które mogą być źródłem energii chemicznej w toku przesiany beztlenowej /4,85,87/. Występujące zaburzenia metaboliczne i funkcjonalne mogą spowodować śmierć organizmu lub cofnąć się przejściowo w momencie powrotu do warunków prawidłowych /15, 127/. Tkanke nerwowa nie wykazuje wtedy przez pewien okres czasu uchwytnych uszkodzeń morfologicznych i biochemicznych. Ujawniają się one dopiero później w określonym zespole patologicznym encefalopatii anoksyjnej, jako kontynuacja zmian, które snoksja tylko zapoczątkowane.

Występowanie trwałych zmian poanoksyjnych w tkance nerwowej zależy od stopnia niedotlenienia, czasu jego trwania oraz od występowania pewnych zaburzeń towarzyszących, głównie ze strony układu krążenia /81, 84/.

Według Hickse /61 / istnieje jedynie wąska granica pomiędzy stopniem encefali prowadzącym do niesdaruwalnych morfologi - cznych i biochemicznych uszkodzeń mózgu, a tym który powoduje śmierć organizmu. Obecnie, gdy zastosowanie nowoczesnej aparatury medycznej stwarza coraz większe możliwości odroczenia momentu biologicznej śmierci organizmu, problem tych "granicznych" uszkodzeń mózgu, zyskuje na aktualności.

Również częste występowanie schorzeń O.U.N., w których niedobór tlenu jest głównym czynnikiem patogenetycznym/encefalopatie encefalopatie bądź ischemiczne związane z chorobami naczyń mózgowych /jak również schorzeń, w których niedotlenienie tkanki jest ważnym składnikiem całościowego bardziej skomplikowanego obrazu patologicznego, wymaga prowadzenia dalszych, kompleksowych morfologicznych, biochemicznych i histochemicznych badań, które mogłyby się przyczynić do wyjaśnienia mechanizmów determinujących występowanie, rozwój i odwracalność zmian powodowanych niedotlenieniem.

Poznanie tych mechanizmów, na poziomie struktur submikroskopowych, posiada więc, poza aspektem czysto teoretycznym również duże znaczenie dla praktyki klinicznej.



## WPROWADZENIE

### I. Metabolizm energetyczny tkanki nerwowej, a niedotlenienie.

Szczególnością wrażliwość tkanki nerwowej na niedobór tlenu wydszają się determinować dwa podstawowe czynniki: wysokie zapotrzebowanie energetyczne tej tkanki, związane z jej podstawowymi funkcjami życiowymi, oraz brak endogennych zapasów energetycznych, kompensujących okresowe zakłócenia metabolizmu /35, 87, 91/.

Produkcje energii w tkance nerwowej łączy się bezpośrednio z metabolizmem glukozy. Łańcuch glikolitycznych enzymów w warunkach tlenowych katalizuje rozpad glukozy do kwasu pirogronowego, który następnie poprzez acetylo-CoA wchodzi w cykl Krebsa, gdzie ulega przemianie do  $\text{CO}_2$ ,<sup>a</sup> powstające zredukowane neukleotydy pirydynowe stają się substratami dla łańcucha oddechowego.

Glukoza w tym przypadku jest więc głównym substratem fizjologicznym /134/, zabezpieczającym produkcję wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych ATP i fosfokreatyny /CrP/.

W warunkach beztlenowych produkcje wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych zachodzi wyłącznie w procesie glikolizy /fosforylacje substratowe/. Jednakże zysk energetyczny przemiany glukozy ulega wtedy znacznemu obniżeniu i nie jest w stanie pokryć zapotrzebowania energetycznego tkanki przez dłuższy okres czasu /4, 33, 133/.

W warunkach beztlenowych utlenienie zred. NAD do NAD sprzężone jest z redukcją pirogronianu do mleczanu, którego poziom w tkance pozbawionej dopływu tlenu gwałtownie wzrasta. W stanach hypoksyjnych stwierdzono 4-krotny wzrost poziomu kwasu mlekowego /34 /, a w przypadku ostrej ischemii doświadczalnej wskaźniki wzrostu były jeszcze wyższe i wykazywały 4 - 7 krotne podwyższenie w stosunku do normy / 87 /. Wg. Lowrego, szybkość przebiegu glikolizy w warunkach zmniejszonego zaopatrzenia tkanki w tlen podlega mechanizmowi regulacyjnemu o typie efektu Pasteura /86 /.

## II. Biochemiczne aspekty pobudliwości tkanki nerwowej i ich związek z niedotlenieniem.

Czynność bioelektryczna komórek nerwowych jest związana z charakterystycznymi zmianami metabolicznymi, dotyczącymi głównie procesów produkcji i zużycowania energii /66 /. Ashford i Dixon /7/ oraz Dickens i Grenville /39/, pierwsi zaobserwowali wzrost metabolizmu tlenowego w tkance nerwowej "in vitro" pod wpływem zwiększonego stężenia jonów potasu w płynie inkubacyjnym. Wykazano również że /63, 93/<sup>ze</sup> /, o ile w warunkach niskich stężeń potasu /ok. 5 mM /, w inkubowanych skrawkach kory potencjał wewnątrzkomórkowy wynosił ok. - 60mV, to wzrost koncentracji  $K^+$  prowadził do całkowitego zaniku różnicy potencjału i stężenia 50-100 mM towarzyszył potencjał ok. -15mV do 0mV.

Opisanemu procesowi depolaryzacji towarzyszyły zmiany chemiczne polegające na zmniejszeniu poziomu wysokoenergetycznych związków fosforanowych /ATP, CrP/, zwiększeniu stężenia wewnątrzkomórkowego fosforanu nieorganicznego /Pi/ i znacznym przyśpieszeniu oddychania skrawków oraz produkcji kwasu mlekowego.

Zjawiska te uznano za metaboliczne odpowiedniki procesu pobudzenia, związane prawdopodobnie ze wzrostem zapotrzebowania energetycznego komórki znajdującej się w stadium repolaryzacji. Powstające w toku przemiany energia chemiczna jest zużywana w procesach aktywnego transportu jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  przez błony komórkowe, co prowadzi do odzyskania spoczynkowego potencjału elektrycznego.

Obserwowany *in vivo* wczesny zanik czynności bioelektrycznej mózgu w warunkach snoksji /34/, połączony z charakterystycznymi dla depolaryzacji przesunięciami jonowymi w przestrzeniach wewnątrz- i pozakomórkowych /37/, może być związany zarówno z występującym niedoborem energetycznym jak i z uszkodzeniem mechanizmów enzymatycznych odpowiedzialnych za utrzymanie gradientu stężeń jonowych i potencjałów elektrycznych.

McDougal i wsp. /91/, w badaniach nad dynamiką zmian metabolizmu energetycznego mózgu w ostrej ischemii, stwierdzili spadek zużycia wysokoenergetycznych związków fosforanowych w tkance wyprzedzający wyczerpanie energetycznych rezerw komórkowych ATP i CrP. Zjawisko to tłumaczą

autorzy wczesnym uszkodzeniem mechanizmów aktywnego transportu jonów, który w nieuszkodzonej tkance nerwowej pochłania większość rezerw energetycznych. Tym samym mechanizmem tłumaczyć można obniżenie zapotrzebowania energetycznego tkanki obserwowane *in vitro* w okresie poanoksyjnym /127/. Z drugiej strony wiadomo, że komórka nerwowa pobudzona, charakteryzuje się zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym i to nie tylko w związku z utrzymaniem potencjału błonowego ale również z powodu aktywizacji wielu procesów syntez, np. tworzenie kwasów nukleinowych /28/, przekształcanie glukozy do aminokwasów /75 / i t.p.

Zahamowanie pobudliwości neuronów w okresie niedoboru tlenu, może więc być procesem "ochroniającym" komórkowe rezerwy energetyczne i przy zachowanej odwracalności, tego procesu, zabezpieczającą tkankę nerwową przed uszkodzeniem.

### III. Czynniki modyfikujące wrażliwość OUN na niedotlenienie i problem topograficznej wybiórczości uszkodzeń.

Od dawna znane są fizjologom pewne stany organizmu, w których tolerancja tkanki nerwowej na anoksję ulega znacznemu zwiększeniu. Np. w niedojrzałym układzie nerwowym aktywna przemiana glikolityczna jest zdolna do utrzymania przez dłuższy okres czasu prawidłowej funkcji tkanki, a powstające w niej uszkodzenia anoksyjne charakteryzują się swoistą lokalnością.

lizacją zmian /18, 72 /. Wyniki to niewątpliwie z braku zróżnicowania fizjologicznej funkcji tkanki nerwowej w tym okresie i w związku z tym ze zmniejszeniem zapotrzebowania energetycznego niedojrzałego OUN w porównaniu z ustrojem dojrzałym /133/. Wraz z procesem kształtowania się struktur, tak w aspekcie morfologicznym, biochemicznym jak i funkcjonalnym rozwija się specyficzna aktywność bioelektryczna mózgu /16/ oraz wzrasta intensywność tlenowych procesów metabolicznych /55, 72/. Tym samym zwiększa się wrażliwość mózgu na enoksję. Na ścisły związek wrażliwości tkanki nerwowej na niedotlenienie z jej aktualnym zapotrzebowaniem energetycznym, wskazuje też zwiększona oporność na enoksję w warunkach hipotermii /99, 118, 132/.

Zależność reakcji tkanki na niedotlenienie od intensywności i charakteru jej przemiany metabolicznej stała się punktem wyjścia teorii tłumaczących wybiórczą wrażliwość pewnych okolic mózgu na enoksję różnicami biochemicznymi tych struktur /44, 114, 115, 120/. Jednakże liczne badania dowiodły, że w rozwoju uszkodzeń poanoksyjnych, znaczenie istotne ma także czynnik naczyniowo-krażeniowy, zależny tak od ogólnego stanu układu krążenia w momencie zmniejszonego wysycenia krwi tlenem /18, 20, 81, 84/, jak i od miejscowo rozwijających się, wtórnych w stosunku do niedostatku tlenowego uszkodzeń naczyniowych /6, 78/.

Znaczenie zaburzeń hemodynamicznych w powstawaniu uszkodzeń anoksyjnych, tłumaczą teorie oparte na porównaniu układu naczyniowego mózgu do kanałów nawadniających,

w których ogólne zmniejszenie dopływu odbija się przede wszystkim na uwodnieniu pola tzw. "ostatniej łąki". Krytyczne obszary unaczynienia znajdują się na granicy głównych pni tętniczych mózgu - tętnicy środkowej mózgu z tętnicą przednią i tylną mózgu oraz z tętnicą naczyniówkową, na granicy unaczynienia tętnicy górnej i dolnej tylnej mózdzka /2, 77, 84/, jak również w obszarze jąder wzgórze / 126 / i pograniczu głębokiego i powierzchownego układu naczyniowego kory mózgu /135/. Wg. Lindenberga /84/, uszkodzenie snoksyjne zlokalizowane w mózdzku, wzgórzu, gałce białej i rogu Amona, nie są bezpośrednio zależne od zaburzeń krążenia krwi w momencie niedotlenienia połączonego z ogólnym spadkiem ciśnienia.

Mają one charakter wtórny w stosunku do rozwijającego się obrzęku, który doprowadza do ucisku naczyń zaopatrujących te struktury.

Tak więc wydaje się, że przyczyny doprowadzające do wybiórczych uszkodzeń pewnych obszarów mózgu należy szukać w powiązaniu charakterystycznych cech biochemicznych tkanki, uzależniających w większym lub mniejszym stopniu jej metabolizm od przemiany tlenowej z ogólnymi lub miejscowymi zaburzeniami hemodynamicznymi, występującymi prawie w każdym przypadku anoksji o odpowiednio dużym nasileniu.

#### IV. Wpływ niedotlenienia na niektóre funkcje metaboliczne tkanki nerwowej.

Spośród rozwijających się w wyniku niedotlenienia uszkodzeń metabolicznych, bezpośrednio powiązane z charakterem czynnika uszkadzającego, a także pierwotne w stosunku do innych zaburzeń, wydaje się być uszkodzenie funkcji oddechowej mitochondriów.

Dane z piśmiennictwa wskazują na dużą wrażliwość na niedobór tlenu procesów fosforylacji oksydacyjnej nukleotydów adeninowych /30,31 /. Jednakże badania, te prowadzone w warunkach anoksji stosowanej "in vitro" jedynie częściowo wyjaśniają zachodzące w tkance "in vivo".

Badanie w mikroskopie elektronowym /10,64 / wykazały zmiany strukturalne mitochondriów pojawiające się we wczesnym okresie rozwoju encefalopatii anoksyjnej. Polegają one na pęcznieniu mitochondrii i fragmentaryzacji grzebieni mitochondrialnych.

W badaniach histochemicznych zaobserwowano spadek aktywności enzymów łańcucha oddechowego /NAD- i NADP-diaforazy, dehydrogenazy bursztynianowej, oksydazy cytochromowej /już w okresie 1-6 godz. po niedotlenieniu /12,92,122/. Wszystkie te obserwacje stanowią wykładnik morfologiczny bądź chemiczny uszkodzeń mitochondriów w pewnych wybranych stadiach rozwoju zmian poanoksyjnych, jednak nie informują o dynamice tych zmian ani o mechanizmie ich rozwoju.

Wielu autorów sugeruje wybiórcze działanie anoksji na błony biologiczne, szczególnie na ich komponenty odpowiedzialne za pobudliwość neuronów /91, 123 /.

Z hipotezą tą łączą autorzy zaobserwowany gwałtowny wzrost frekwiencji wolnych kwasów tłuszczowych, specyficzny dla tkanki nerwowej poddanej działaniu ostrej ischemii / 9/. Istnieją obserwacje /107/ sugerujące, że uwolnione ze struktur komórkowych kwasy tłuszczowe, mogą szkodliwie oddziaływać na podstawowe procesy energetyczne, związane bezpośrednio z funkcją mitochondriów, rozprzęgając procesy fosforylacji.

Wysunięto również hipotezę o zahamowaniu procesów syntezy białek /92, 124, 139 / jako pierwotnej przyczynie rozwoju zmian poanoksyjnych. Białka enzymatyczne nie ulegałyby bezpośredniej inaktywacji w czasie trwania anoksji, lecz spadek ich aktywności uwidoczniłby się stopniowo w miarę "starzenia się" istniejących, uprzednio zsyntetyzowanych enzymów.

Inne wyjaśnienie narastających w rozwoju encefalopatii anoksyjnej uszkodzeń enzymatycznych zaproponowali DeDuve i Nowikoff /104/. Sugerują oni możliwość pierwotnego uszkodzenia błon lisosomalnych, które stają się przepuszczalne dla zlokalizowanych w nich enzymów litycznych. Przechodzenie ich do cytoplazmy może powodować destrukcję białek enzymatycznych.

Ogólnie jednak przeważa pogląd o pierwotnym uszkodzeniu procesów związanych z pośrednim metabolizmem glukozy,



co staje się przyczyną wczesnych zaburzeń energetycznych, występujących pod wpływem anoksji.

Zaburzenie głównej, tlenowej drogi przeniesienia glukozy na skutek uszkodzenia funkcji mitochondriów, powoduje intensyfikację alternatywnych szlaków jej przeniesienia. Między innymi obserwowano w okresie poanoksyjnym wzrost formowania się aminokwasów, powstających drogą transaminacji z substratów cyklu Krebsa /8, 130/. Również jedną z wcześniejszych zmian metabolicznych, ujawniającą się w tkance nerwowej w wyniku niedotlenienia, jest wzrost aktywności enzymów cyklu Leloirsa, połączony z gromadzeniem się glikogenu w komórkach gleju /głównie astrocytach/. Jednocześnie następuje obniżenie aktywności enzymów oddechowych w okolicach najbardziej uszkodzonych /100/. Badania te mogą wskazywać na obniżoną zdolność zużycowania glukozy w toku metabolizmu tlenowego oraz na zaburzenie jej transportu w obszarach objętych uszkodzeniem, z okresową stymulacją alternatywnej drogi jej przeniesienia, prowadzącej do syntezy glikogenu /116/.

Niewiele jest obserwacji dotyczących aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym i możliwością ich zmian pod wpływem uszkodzenia anoksyjnego. Jedynie badania histochemiczne wskazują na senilność aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej /DHG6P/ i dehydrogenazy kwasu 6-fosfoglikonowego /DHG6GA w ogniskach wizyjnej się martwicy, co jest raczej odzwierciedleniem ogólnych, wieloenzymatycznych zmian wstecznych tkanki.

V. Cykl heksozomonofosforenowy /HMS/ w mózgu i jego związek z ogólną przemianą glukozy.

Ilościowe informacje o przemianie pentozowej w mózgu, otrzymane przy użyciu techniki izotopowej, wykazały procentowo niewielki jej udział / 1-3% / w ogólnym metabolizmie glukozy w warunkach przewidzianych /56, 79, 119 /. O znaczeniu cyklu pentozowego w metabolizmie tkanki można również wnioskować drogą określenia specyficznej aktywności enzymów, głównie aktywności DHG6P /29, 129 /. Reakcja ta katalizuje utlenienie glikozo 6-fosforenu /G6P/, limitując wejście heksozy w ten szlak przemian. Współzawodni - czy ona o substrat z enzymami ciągu glikolitycznego, enzymami prowadzącymi do syntezy glikogenu, jak również ze specyficzną fosfatazą rozkładającą G6P do wolnej glukozy/jak-  
kolwiek aktywność jej w mózgu jest niewielka/ /113/.

Aktywność DHG6P jest ściśle uzależniona od stężeń ATP, Pi, oraz stosunku NADP-red. NADP /53, 54, 90/. Szczególnie, w związku z niskim stężeniem NADP w mózgu /17/, czynniki wpływające na stosunki ilościowe pomiędzy formą utlenioną, a zredukowaną tego nukleotydu bezpośrednio determinują kinetykę reakcji utlenienia zarówno G6P jak i kwasu 6-fosfo-  
-glukonowego /6PGA/. Ten typ metabolicznego sprzężenia stwierdzono pomiędzy dwoma pierwszymi reakcjami cyklu pentozowego, a reduktazą glutationową / 70, 129/, jak i reakcjami syntezy kwasów tłuszczowych /95/.

Dane z piśmiennictwa wskazują, że aktywność cyklu pentozowego w mózgu może być modyfikowana przez czynniki upośledzające tlenowy metabolizm OUN. Należą do nich niektóre narkotyki np. morfina i barbituraty, środki analgetyczne, alkohol /62, 129/. Większość z tych związków powoduje upośledzenie metabolizmu tlenowego glukozy /111/, z jednoczesną aktywacją enzymów cyklu pentozowego /68, 69/.

Higgins /62/, dyskutując wpływ alkoholu na przemianę glukozy w O.U.N., podkreśla podobieństwo symptomatologii klinicznej zatrucia alkoholowego do obrazu hypoksji. Powodem zaburzeń metabolizmu energetycznego w tym zespole wydaje się być przesunięcie głównego szlaku przemiany glukozy ze szlaku Embdena-Meyerhofs do przemiany pentozowej. Jednakże mechanizm aktywacji cyklu pentozowego w warunkach tego rodzaju zaburzeń metabolicznych nie jest jasny. Możliwe, że istnieje konkurencyjność pomiędzy szlakami tlenowej przemiany glukozy w cyklu Krebsa i w cyklu pentozowym, która zależy od niezidentyfikowanych mechanizmów regulacyjnych. W dostępnym piśmiennictwie istnieją doniesienia o hamującym wpływie pośredniego produktu przemiany  $\rightleftharpoons$  cyklu pentozowego, kwasu 6-fosfoglikonowego, na aktywność oddechową i fosforylacyjną mitochondriów /37/. Weryfikacja tej obserwacji w stosunku do mitochondriów mózgu mogłaby rzucić światło na istniejące powiązanie pomiędzy przemianą glukozy w cyklu pentozowym, a procesami oddychania i fosforylacji.

## CEL PRACY I PLAN PROWADZONYCH BADAŃ.

Pomimo, że badanie lat ostatnich prowadzone przy zastosowaniu szeregu nowoczesnych technik poszerzyły w sposób istotny znajomość strukturalnych i metabolicznych następstw niedostatku tlenowego w tkance nerwowej, cały szereg istotnych mechanizmów jej reakcji na niedobór tlenu nie został wyjaśniony.

Przyczyn tego w znacznej mierze szukać należy w rozbieżności stosowanych metod i modeli doświadczalnych oraz braku korelacji między uzyskiwanymi obserwacjami. Nie bez znaczenia jest również fakt badania różnych faz procesu chorobowego przy pomocy różnych metod, np. biochemik i fizjolog badają głównie ostre fazy niedotlenienia, podczas gdy morfolog, z racji ograniczonego warsztatu, bada już tylko strukturalne następstwa procesu, zwykle zresztą późno.

Ograniczeniem precyzyjnych badań biochemicznych, prowadzonych w większości na homogenatach tkankowych, jest brak korelacji z morfologiczną strukturą procesu; dając globalny wgląd w zaburzenie metabolizmu tkanki nie określają one elementów tkankowych mniej lub bardziej uszkodzonych, ani wzajemnej zależności zmian występujących w różnych strukturach tkanki. Nie pozwalają również na ocenę topografii uszkodzeń.

W prowadzonych przez nas badaniach podjęliśmy próbę skorelowania obserwacji morfologicznych, histochemicznych i biochemicznych. Znaczna niejednorodność funkcjonalna i strukturalna układu nerwowego skłoniła nas do

równoległego badania różnych części ośrodkowego układu nerwowego. Z rozległego kręgu zagadnień związanych z wpływem niedostatecznego zaopatrzenia tkanki nerwowej w tlen na jej metabolizm i strukturę, ograniczyliśmy się zasadniczo do dwóch: zużycia tlenu przez skrawki tkan<sup>ki</sup> i aktywności enzymów cyklu pentozowego.

Bezpośrednim celem pracy było ustalenie zależności pomiędzy intensywnością oddychania tkankowego i aktywnością dehydrogenaz związanych z cyklem pentozowym, występujących w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego w normie oraz pod wpływem niedotlenienia w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

W ocenie zmian tkankowych powstających w następstwie niedotlenienia stereno się zwrócić uwagę na rolę dodatkowych czynników patogenetycznych, uwarunkowanych przede wszystkim współistnieniem z hypoksją zaburzeń o charakterze hemodynamicznym.

Tak sformułowany cel pracy determinował dobór modeli doświadczalnych i kontrolnych, wybór technik badawczych i metod, oraz zakładał przedstawiony poniżej szczegółowo określony plan badań.

### Plan prowadzonych badań.

#### I. Grupa zwierząt kontrolnych.

1. Charakterystyka oddychania tkanekowego i aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego w różnych okolicach O.U.N. świńek morskich i szczurów w warunkach prawidłowych.

a/ Aktywność DH-6GP i DH-6PGA w badanych okolicach mózgu świńek morskich i szczurów.

b/ Aktywność oddechowa skrawków pochodzących z różnych okolic O.U.N. szczurów i świńek morskich z uwzględnieniem gęstości komórkowej w badanych tkankach.

c/ Porównanie rozkładu aktywności oddechowej z aktywnością dehydrogenaz pentozowych w poszczególnych okolicach O.U.N. badanych zwierząt.

#### II. 2. Morfologia i histochemia badanych okolic mózgu.

Wpływ niedotlenienia /okresy anoksyjne/ na oddychanie i aktywność dehydrogenaz pentozowych O.U.N.

1. Kontrola niedotlenienia O.U.N. w wyniku zastosowanego ostrego niedotlenienia prostego u szczurów /EEG, EEG, krzywa oddechu oraz poziom kwesu mlekowego i glukozy jako wskaźnik niedotlenienia/.

2. Charakterystyka oddychania i aktywności dehydrogenaz pentozowych w okresie do 24 godzin po zastosowanym niedotlenieniu.

3. Morfologia i histochemia tkanki mózgowej po niedotlenieniu ostrym, prostym.

III. Wpływ niedotlenienia w modelu Levine/ anoksja anoksyjno-ischemiczna/ na oddychanie i aktywność dehydrogenaz pentozowych w okresie 24 godzin rozwoju encefalopatii anoksyjno-ischemicznej.

1. Oddychanie skrawków kory mózgu i ich pobudliwość metaboliczna pod wpływem jonów potasu.

a/ Kontrolne oznaczenie aktywności oddychowej w skrawkach kory, pochodzących z homologicznych półkul mózgu.

b/ Kontrolne oznaczenie aktywności oddychowej w skrawkach kory półkul mózgu po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej.

c/ Wpływ niedotlenienia na oddychanie skrawków kory u szczurów z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną w okresie 24 godzin rozwoju zmian poanoksyjnych.

2. Aktywność dehydrogenaz pentozowych w półkulach mózgu szczurów z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną przed i po niedotlenieniu.

3. Morfologia i histochemia zmian tkanki mózgowej w rozwoju encefalopatii anoksyjno-ischemicznej

IV. Doświadczenia prowadzone w układach "in vitro".

1. Wpływ warunków inkubacji skrawków tkankowych O.U.N./okresowy brak tlenu lub glukozy/ na

oddychanie i pobudliwość metaboliczną zwiększonymi stężeniami jonów potasowych.

2. Wpływ warunków inkubacji skrawków kory mózgu <sup>na</sup> aktywność dehydrogenaz związanych z cyklem pentozowym.
3. Oddychanie i oksydacyjna fosforylacja frakcji mitochondrialnej mózgu w obecności egzogenego kwasu 6-fosfoglikonowego.



## MATERIAŁY I METODY

### I. Metodyka doświadczalna

Grupę badań, których celem była ocena stosunków prawidłowych wykonano na szczurach białych, samcach 3-miesięcznych o wadze około 150 - 200 g i na świnkach morskich, również samcach o wieku 6 miesięcy i wadze około 300 g. Zwierzęta dekapitowano bez narkozy i pobierano tkankę nerwową z półkul mózgowych, śródmózgowia, mózdzku i rdzenia przedłużonego w sposób odpowiedni dla stosowanej techniki badań. Liczbę zwierząt zużytych do doświadczenia podano przy omawianiu wyników badań.

Badania nad wpływem niedostatku tlenowego na metabolizm ośrodkowego układu nerwowego przeprowadzono na szczurach, o charakterystyce jak wyżej, stosując dwa modele doświadczalnego niedotlenienia:

- 1/ Ostre krótkotrwałe niedotlenienie proste /anoksje anoksyjna/. - Zwierzęta przetrzymywano przez okres 3 minut w komorze o pojemności 10 l, przez którą przepuszczono azot techniczny, z zawartością tlenu poniżej 1% objętości. Po uzyskaniu pełnego bezdechu zwierzęta przenoszono do atmosfery powietrza, a następnie dekapitowano w różnych odstępach czasu od niedotlenienia, pobierając do badań tkankę z tych samych okolic, co w grupie zwierząt zdrowych.

Kontrolę stopnia niedotlenienia tkanki mózgowej w modelu anoksji prostej przeprowadzono na 12 szczurach. W celu zapewnienia możliwości przyżyciowej rejestracji parametrów fizjologicznych i wykluczenia zmian pośmiertnych, uwarunkowanych czasem trwania manipulacji niezbędnych dla uzyskania tkanki nerwowej, opisane powyżej doświadczenie zmodyfikowano następująco: Zwierzętom w narkozie pentobarbitalowej /25 mg/ kg wagi ciała/ wykonano trepanację czaszki, odsłaniając okolicę ciemieniową półkul mózgowych.

Po wykonaniu tracheotomii podłączono dotchawiczo zbiornik z powietrzem. Następnie powietrze w zbiornikach wymieniano na szot techniczny.

W czasie trwania niedotlenienia prowadzono rejestrację elektroencefalograficzną przy pomocy elektrod implantowanych w pokrywę czaszki w okolicy czołowo-ciemieniowej. Równocześnie prowadzono zapis EKG w typowym odprowadzeniu pierwszym, oraz krzywą oddechu rejestrowaną z mięśni międzyżebrowych, elektrodą koncentryczną, przy zastosowaniu filtrów niskiej częstotliwości. W okresie 30 sekund od momentu wystąpienia bezdechu zamrożono mózg, "in situ" przez otwór trepanacyjny, ciekłym freonem i pobierano próbki tkanki do oznaczeń kwasu mlekowego i glukozy. Do momentu obróbki biochemicznej utrzymywano zamrożoną tkankę w temperaturze  $-60^{\circ}\text{C}$ .

2/ Anoksja anoksyjno-ischemiczna - Grupę tą stanowiły szczury, u których wykonano niedotlenienie wg modelu doświadczalnego, opisanego przez Levina w 1960 r./82/. W narkozie eterowej podwiązywano zwierzętom tętnicę szyjną wspólną prawą, a następnie, po upływie 18 - 24 godzin od zabiegu, szczury poddawano niedotlenieniu w warunkach opisanych w punkcie 1, wydłużając jednak czas trwania niedotlenienia do 20 - 40 minut. Po zakończeniu niedotlenienia zwierzęta przenoszono do atmosfery powietrza, reanimowano jeżeli zachodziła tego potrzeba, a następnie dekapitowano w grupach, w różnych odstępach czasu od doświadczenia. W grupie tej obserwowano wysoką śmiertelność zwierząt sięgającą 50 %, w okresie trwania niedotlenienia, jak również w okresie do 24 godzin po niedotlenieniu.

We wszystkich grupach doświadczalnych i kontrolnych wykonywano równoległe badania biochemiczne, histologiczne i histoenzymatyczne.

Uzupełniające badania *in vitro* prowadzono na tkance mózgowej szczurów, dekapitowanych bez znieczulenia. Zwierzęta użyte do badań w tej grupie charakteryzowały te same cechy biologiczne, co w grupach doświadczalnych *in vivo*. Tkanekę mózgową do badań pobierano i preparowano w sposób uwarunkowany potrzebami metody.

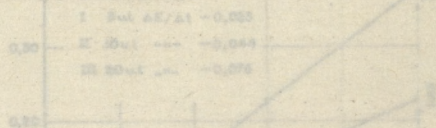
## II. Przygotowanie materiału doświadczalnego.

- 1/ Zwierzęta zabijano przez dekapitację. Po wyjęciu mózgu z jamy czaszkowej przenywano go szklanym roztworem soli fizjologicznej i wykonywano podział anatomiczny na badane okolice.
- 2/ Skrawki tkankowe do badania oddychania sporządzano ręcznie i umieszczano w naczynkach inkubacyjnych Warburga trzymanych na lodzie, z zawierających odpowiednie roztwory. W każdym naczynku znajdowało się około 100 mg świeżej masy tkanki.
- 3/ Frakcje subkorynkowe otrzymywano drogą frakcyjowanego wirowania.
  - a/ Frakcję cytoplazmatyczną otrzymywano z 20% homogenatu tkanki w roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem 1 mM-EDTA, homogenizowanej przez okres 3 minut homogenizatorem szklanym w temperaturze  $0^{\circ} + 4^{\circ}\text{C}$ . Homogenat wirowano w wirówce MSE przy 15000 g., w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut. Otrzymany Niedersatz był bezpośrednio używany do oznaczeń enzymatycznych.
  - b/ Frakcję mitochondrialną otrzymywano z półkul mózgowych szczure stosując metodę Stehle i Smitha /125/. Homogenizację i wirowanie przeprowadzono w 0,4-M sacharozie z 0,2 mM-EDTA i 0,01 M-buf. TRIS/HCl o pH 7,4, w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$ . Homogenat 10% wirowano w 1 500 g przez 15 minut. Otrzymany Niedersatz wirowano

w 12 000 g przez 15 minut.

Osed przepłukiwano kilkakrotnie w ujętej podanyu mediu i dodatkowo wirowano w 8% fikolu.

Wirowanie prowadzono przez 30 minut w 12 000 g, a otrzymany osed kilkakrotnie płukano. Otrzymano około ilości frakcji mitochondrialnej używanej bezpośrednio do doświadczeń.



### III. Metody biochemiczne

1. Aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego: DHG6P i DHGPGA, oznaczano metodą spektrofotometryczną /90/. Pomiar przeprowadzano w kiewetach kwarcowych o objętości 3 ml w temp. pokojowej przy długości fali światła 340 nm. Reakcję rozpoczynano przez dodanie substratu i pomiar prowadzono przez 5 min.

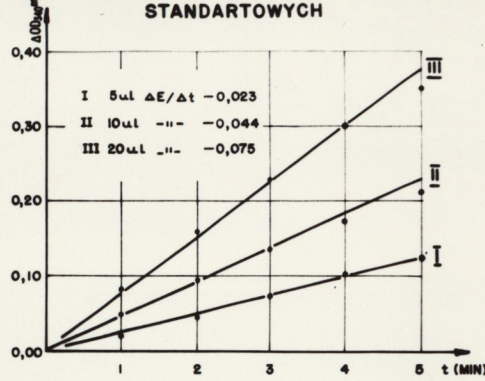
Skład środowiska stosowanego do pomiaru był następujący: 0,4 M-TRIS/HCl /pH 7,6/ ; 1,0 mM-EDTA; 0,33 mM-NADP; 0,133 mM-6GP lub - 6PGA, 0,016-M-H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oraz badana próbka w objętości 0,2 - 0,5 ml. Objętość końcowa wynosiła 3 ml.

Wstępnie określono kinetykę reakcji redukcji NADP w warunkach standardowych, stosując oczyszczony preparat enzymatyczny DHG6P - / f-ay Boehringer/ jak i badaną frakcję homogenatu wątrogi. Optymalna szybkość przebiegu reakcji, /kinetyka 0 rzędu/ w stosowanych warunkach

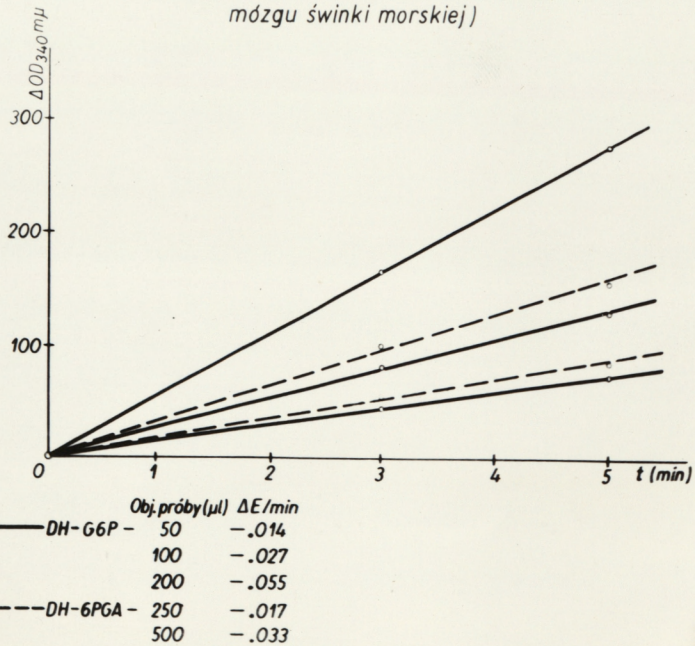
stężenie substratu i koenzymu, wynosiła około 0,05  
OD<sub>340</sub>/min.

Wykres Nr.1

KINETYKA REAKCJI DHG6P W WARUNKACH  
STANDARTOWYCH



KINETYKA REAKCJI DEHYDROGENAZ CYKLU PENTOZOWEGO  
(frakcja cytoplazmatyczna z 20 % homogenatu  
mózgu świnki morskiej)



Specyficzną aktywność enzymu wyrażano w jednostkach Wróblewskiego /80/ w przeliczeniu na stężenie białka w badanej próbce /  $\Delta OD_{340}/\text{min}/\text{mg}$  białka  $10^3$ /.

2/ Białko oznaczano wg. metody Lowry /89/ używając jako standardu albuminy cielęcej prod. Lighte.

3/ Pomiary zużycia tlenu przez skrawki mózgu wykonano metodą manometryczną w aparacie Warburga, określając współczynnik oddechowy  $Q_{O_2}$  jako ilość  $\mu\text{l}/O_2/\text{godz}/\text{mg}$ . wilgotnej masy tkanki.

Inkubację prowadzono w medium Krebsa-Ringera /32/, w którym bufor fosforanowy zastąpiono 0,32 M-buforem TRIS/HCl, pH 7,4, otrzymując w ten sposób stężenie jonów potasu 6 mM.

Do ramienia bocznego naczynka Warburga dodawano 0,1 ml 1,9 M-KCl. Przez pierwsze 30 min. inkubację skrawków prowadzono w medium o stężeniu  $K^+$  - 6 mM. Następnie przelewano zawartość ramienia bocznego do głównego zbiornika, otrzymując stężenie  $K^+$  - 98 mM. W tym wysokopotasowym medium prowadzono inkubację skrawków przez dalsze 30 min.. W badaniach kontrolnych stwierdzono stałą szybkość zużycia tlenu przez inkubowane w obecności glukozy skrawki mózgu, przez okres ok. 1,5 godz. W przypadku pomiarów oddychania po okresowej preinkubacji, oznaczenia dla dwu różnych stężeń potasu prowadzono równolegle w osobnych naczynkach.

W przeprowadzonych oznaczeniach oddychania skrawków mózgu, stałym substratem oddechowym była 10 mM glukoza. Fazę gazową pomiarów stanowiło powietrze, temperatura wynosiła 37°C.

4/ Oznaczenie aktywności glikolitycznej homogenatów półkul mózgu przeprowadzono przez pomiar przyrostu stężenia kwasu mlekowego w środowisku inkubacyjnym wg. La Paga<sup>e</sup> /110/, w czasie godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Otrzymane wartości wyrażono jako ilość wytworzonych  $\mu$ mol/l kwasu mlekowego /godzinę/ 100 mg wilgotnej masy tkanki. Kwas mlekowy oznaczono wg. metody Horne i Brunse /pn.5a/.

5/ Oznaczenie poziomu kwasu mlekowego i glukozy w tkance mózgowej.

100-200 mg świeżej masy tkanki homogenizowano w 1,0 ml 6% kw.nadchlorowego w temp. 0°C. Homogenat wirowano w 3 000 g w temp. 0°C przez 5 minut i otrzymany nadsącz używano do oznaczeń:

a/ Kwas mlekowy wg metody Horne i Brunse / 67/.

Do 2,0 ml buforu glicynowego z dodatkiem 0,4-M hydrozyny o pH 9,0 dodawano 0,1 ml nadsączu. Po dodaniu 0,05 ml LDH [ 2 mg białka/ml ] oraz 0,2 ml 0,027 M-NAD, prowadzono godziną inkubację w temp. 37°C. Pomiar stopnia redukcji NAD przeprowadzono



spektrofotometrycznie przy długości fali światła 340 m $\mu$ , względem próby kontrolnej /bez dodanie LDH/.

b/ Glukozę oznaczono metodą enzymatyczną Huggeta i Nixona /71/. Badaną próbę w objętości 0,1 ml inkubowano w obecności 2,5 ml roztworu zawierającego 0,12 M-bufor fosforanowy o pH 7,0; oksydazę glukozy w stężeniu 250 ug/ml ; peroksydazę o stężeniu 40 ug/ml oraz chromogen /o-dianizidine HCl / w stężeniu 66 ug/ml. Extynkcję mierzono kolorymetrycznie przy długości fali światła 430 m $\mu$ .

6/ Hydrolizę DNA przeprowadzono wg. metody Schmidta-Tennehausersa w mod. Pasquini i wsp. /108/ dostosowanej do badania małych próbek tkanki mózgowej. Do hydrolizy używano 10% homogenatu badanych okolic mózgu. W celu stwierdzenia wydajności hydrolizy określono spektrofotometrycznie stosunek ekstynkcji przy maksimum i minimum widna charakterystycznego dla otrzymanych zasad azotowych /maksimum - 263 m $\mu$  , minime - 230 m $\mu$  i 280 m $\mu$  /.

Część mózgu	Długość fali/m $\mu$ / 230/263	Długość fali/m $\mu$ / 263/280
Kora	0,72	1,64
Móźdżek	0,51	1,83
Pień mózgu	0,64	1,70

- W dalszych oznaczeniach względnej gęstości komórkowej struktur mózgu stosowano pomiar ekstynkcji 10% hydrolizatu DNA przy  $\lambda = 263$  nm.

7/ Oddychanie frakcji mitochondrialnej oznaczono metodą manometryczną w aparacie Warburga w środowisku o składzie: 0,25 M-sacharoze, 0,2 mM-EDTA; 0,01 M-TRIS ; 0,01 M-KCl; 0,01 M- $K_2PO_4$  ; substrat oddechowy 10-20-mM; 2,5 mM-ADP w ramieniu bocznym naczyńka Warburga, oraz 5-10 mg białka mitochondrialnego. Inkubację /z 10 min. okresem preinkubacji/ przeprowadzono przez 15 min. bez obecności ADP w medium i przez dalsze 15 min. po przeniesieniu ADP z ramienia bocznego naczyńka. Oddychanie oznaczano przez pomiar szybkości zużycia tlenu przez mitochondria w czasie inkubacji w temp.  $25^{\circ}C$  i przeliczono na białko mitochondrialne. Kontrolę oddechową określano przez obliczenie stosunku szybkości zużycia tlenu przez mitochondria fosforylujące /po dodaniu ADP/ do szybkości zużycia tlenu przez mitochondria pozbawione ADP. Zdolność fosforylacyjną mitochondriów badano przez określenie stosunku ATP/O, /ilości umoli wytworzonego ATP, odpowiadającą zużyciu 1 uatomu tlenu przez mitochondria/.

Przyrost ATP w środowisku inkubacyjnym oznaczono metodą enzymatyczną. Kontrolne oznaczenia wykazały brak przyrostu ATP w środowisku pozbawionym egzogennego ADP, a obecność śladowych ilości endogennego ATP mogła być pominięta.

8. Oznaczanie ATP metodą enzymatyczną przy użyciu kinazy-fosfotriozy /1/.

Po strąceniu białka w badanej próbce 6% kwasem nadchlorowym w stosunku 1:1 i odwirowaniu osadu w temp. 0°C, nadosącz używano do oznaczeń stężenia ATP.

W kiuwecie kwarcowej o objętości 3 ml znajdowało się: 1,2 ml roztworu 0,1 M-TRIS/pH-7,6/ ; 0,004 M-MgSO<sub>4</sub> ; 0,006 M-3-fosfo-D-glicerynianu; oraz 0,02 ml 0,012 M-NADH i badana próbka. Po odczytaniu wartości ekstynkcji początkowej, rozpoczynano reakcję enzymatyczną utlenienia zredukowanego NAD, przez dodanie 0,02 ml mieszaniny enzymów zawierającej: 4 mg GAPDH /dehydrogenaza fosfotriozy/ i 1 mg PKK /kinaza fosfo-glicerynianowa/ w 1 ml. Z odczytanej różnicy ekstynkcji, określonej przy długości fali światła 340 nm, obliczano stężenie ATP w próbce.

IV. Metody badań histologicznych i histochemicznych

1. Badanie histologiczne tkanki przeprowadzono na materiale utrwalonym w 10% formalinie obojętnej i zatopionym w parafinie.

Blocki parafinowe skrawano w płaszczyźnie czołowej otrzymując preparaty grubości 8 u, na poziomie półkul mózgowych śródmózgowia i mózdzku. Barwienie preparatów wykonano wg metody Klüver-Barrera /76/, oraz fioletem krezylu.

2. Tkankę do badań histochemicznych zamrożono w ciekłym azocie i skrawano na kriostacie typu "Pears", w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  na preparaty grubości 12  $\mu$ . Badano aktywność następujących enzymów, reprezentujących poszczególne tory metaboliczne glukozy: dehydrogenazy glukozy-6-fosforenowej /DHG6P/, dehydrogenazy 6-fosfoglukonowej /DHG6GA/, dehydrogenazy mleczanowej /LDH/ i dehydrogenazy bursztynianowej /SDH/.

Odczyny histochemiczne oparto na metodach podanych przez Hesse i Scarpelli /58/ oraz Pearsea /109/. Roztwory inkubacyjne dla dehydrogenaz związanych z nukleotydami pirydynowymi zawierały: 0,25 ml bufor-TRIS/HCl o pH 7,4 - /0,1 M/; 0,25 ml NBT - [mg/ml] 0,1 ml  $\text{MgCl}_2$  - /0,05 M/; 0,1 ml azydku sodu - /0,1 M/; 0,1 ml wodnego roztworu koenzymu [10 mg/ml] oraz substratu w roztworze wodnym /0,5 M/. Płyn inkubacyjny dla odczynu na dehydrogenazę bursztynianową zawierał: 0,25 ml buf. TRIS/HCl, pH 7,4 /0,1 M/; 0,25 ml NBT [1 mg/ml]; 0,5 ml bursztynianu sodu /1M/ oraz menadion w ilości 0,02 mg/ml. x/

Inkubację prowadzono w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 30 minut dla odczynu z mleczanem i bursztynianem jako substratem, oraz godzinę dla odczynu z gliko-6-fosforenem i 6-fosfoglikonem jako substratem.

---

x/ W nawiasach podano stężenia roztworów podstawowych.

W części preparatów po otrzymaniu specyficznego odczynu histochemicznego wykonywano dodatkowe barwienie w 3% roztworze wodnym eozyiny. Po odwodnieniu preparatów zamykano je w żywicy syntetycznej "Permount".

#### V. Odczynniki

Zestawy do oznaczeń glukozy, kwasu mlekowego, ATP; oraz DH-G6P, DHGPGA, NAD, bursztynian-Na, kwas glutaminowy - pochodziły z firmy Boehringer.

ADP, NADP, TRIS - produkcji Sigma.

G6P - Na - firmy BDH.

GPGA-Na - firmy Lights.

Pozostałe odczynniki organiczne pochodziły z PPH-Gliwice.

#### VI. Stosowane skróty

DH-G6P - dehydrogenaza glikozo 6 fosforanowa - /EC 1.1.1.

49. /

DH-GPGA - dehydrogenaza kw.6-fosfo-glikonowego

/EC 1.1.1.44 /.

SDH - dehydrogenaza bursztynianowa /EC 1.3.99.1. /.

LDH - dehydrogenaza mleczanowa /EC.1.1.1.26 /.

NAD - dwunukleotyd nikotynemido-adeninowy

NADP - fosforan dwunukleotydu nikotynemido-adeninowego.

NBP - chlorek - 2,2 dwu-p-nitrofenylo-5,5 dwufenylo  
3,3 dwutetrazolowy

ADP - Adenozyno-5<sup>2</sup>-dwufosforan.

ATP - Adenozyno-5<sup>2</sup>trójfosforan.

WYNIKI BADAŃ

I. Grupa zwierząt kontrolnych

1. Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pento-  
zowego i oddychania tlenkowego w różnych okolicach  
C. U. N. u świńek morskich i szczurów.

Tabela 1

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ CYKLU PENTOZOWEGO  
W MÓZGU ŚWINEK MORSKICH I SZCZURÓW  
W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH

$\Delta OD_{340} \text{ m}\mu/\text{min}/\text{mg białka} \cdot 10^3 \pm SD$

Enzym badany		Świnka morska		Szczur	
		DH-G6P	DH-6PGA	DH-G6P	DH-6PGA
Części mózgu	Kora	37 ± 5,65	14 ± 2,3	41 ± 3,39	10 ± 1,68
	Śródmózgowie	58 ± 6,67	22 ± 4,38	76 ± 4,28	18 ± 1,58
	Pień mózgu	64 ± 10,4	21 ± 4,12	77 ± 6,32	19 ± 1,68
	Móżdzek	62 ± 6,4	25 ± 4,45	84 ± 4,71	12 ± 2,67

Średnie wyniki z 6 doświadczeń

Aktywność dehydrogenaz cyklu pento-  
zowego DH-G6P i  
DH-6PGA w ośrodkowym układzie nerwowym w warunkach

przewidywanych przedstawia tabela 1. Rozkład aktywności w czterech wyodrębnionych okolicach jest podobny u świńek morskich i szczurów. Najniższą aktywność DH-za związanych z cyklem pentozowym stwierdza się w komorze mózgowej. W innych okolicach mózgu aktywność tych enzymów jest około dwukrotnie wyższa, przy czym różnice pomiędzy poszczególnymi okolicami mózgu, ze wyjątkiem kory, nie wykazują zmienności statystycznej. Aktywność specyficzna DH-66P jest w dodatniej korelacji z aktywnością DH-6PGA w badanych częściach mózgu. Jedynie w mózdku szczura, pomimo wysokiej aktywności pierwszego enzymu cyklu pentozowego stwierdzono stosunkowo niską aktywność DH-6PGA. We wszystkich przebadanych okolicach ośrodkowego układu nerwowego aktywność DH-66P przewyższa aktywność DH-6PGA 3-4 krotnie u szczura i 2-3 krotnie u świnki morskiej.

W uzupełnieniu powyżej przedstawionych badań przeprowadzono dodatkowe oznaczenie aktywności DH-66P i DH-6PGA w listocie białej półkuli mózgowych u świńek morskich. Średnie wartości uzyskane z czterech doświadczeń wyniosły odpowiednio dla DH-66P -  $66,00 \pm 4,97$ , a dla DH-6PGA -  $31,00 \pm 3,96$  jednostek aktywności specyficznej. Stanowi to wartości około dwukrotnie wyższe w porównaniu z korą mózgu /tabela 1/.

Wartości oddychania tkankowego w czterech badanych okolicach ośrodkowego układu nerwowego świnki morskiej i szczura w warunkach przewidzianych, z uwzględnieniem różnych stężeń jonów potasu w mediu inkubacyjnym, przedstawiają tabele i wykresy 2 i 3 /str. 33 i 34 /.

Jak wynika z tabel, stymulacyjny efekt jonów potasu, zarówno w przypadku świnek morskich jak i szczurów, obserwuje się w korze mózgu i móżdżku. Dla świnki morskiej stymulacje oddychania w korze wynosi 52%, w móżdżku 41%, dla szczura odpowiednio 34% i 31%.

Wyraźny stymulacyjny efekt jonów potasu na oddychanie skrawków mózgu świnek morskich i szczurów, ogranicza się w zasadzie tylko do tych dwóch okolic. Stopień zużycia tlenu w śródmózgowiu nie różni się zasadniczo w obu badanych stężeniach potasu. U świnek morskich, w pniu mózgu obserwowano nawet nieznaczne obniżenie oddychania w wysokich stężeniach jonów potasowych /13 %/. Porównanie wartości zużycia tlenu przez poszczególne okolice ośrodkowego układu nerwowego wskazuje, że zróżnicowanie oddychania zarysowuje się wyraźniej w wysokich stężeniach jonów  $K^+$ . Najwyższe zużycie tlenu /w przeliczeniu na wilgotną masę tkanki/ obserwuje się w korze i móżdżku, najniższe w pniu mózgu.<sup>z/</sup>

---

z/ Pod łącznym określeniem pnie mózgu rozumiano materię pochodzący zarówno z mostu jak i rdzenia przedłużonego, w odróżnieniu od odrębnie badanego śródmózgowia.



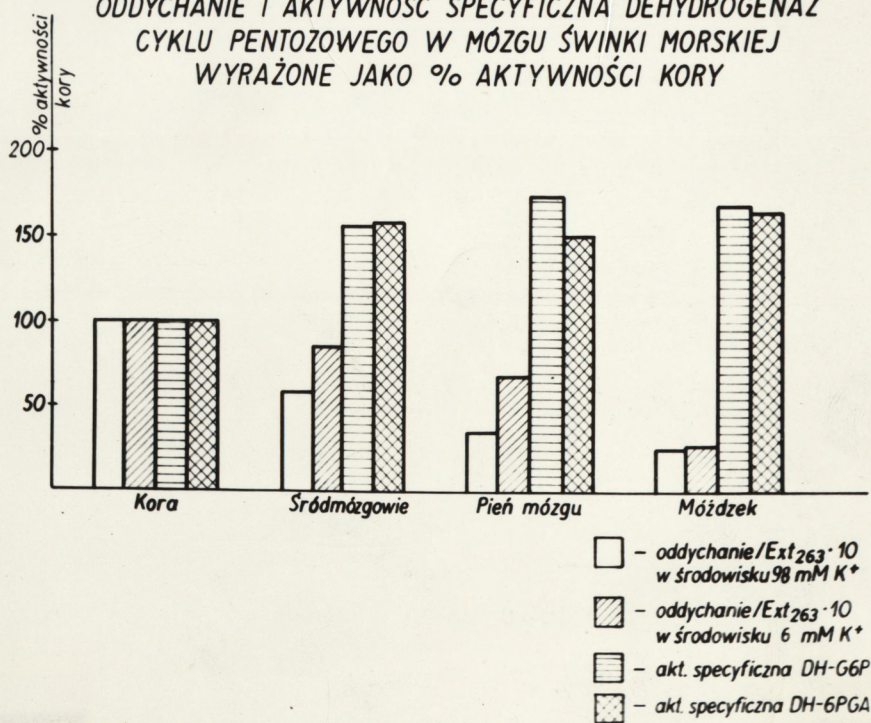
**ODDYCHANIE SKRAWKÓW MÓZGU ŚWINKI MORSKIEJ**  
 (substrat - 10 mM glukoza)  
**W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH**  
**Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU**

Części OUN	Oddychanie *		% stymulacji oddychania	Względna ** gęstość komórek Ext <sub>263</sub> DNA·10	μl O <sub>2</sub> /godz./mg św. tkanki Ext <sub>263</sub> DNA·10	
	6 mM K <sup>+</sup>	98 mM K <sup>+</sup>			6 mM K <sup>+</sup>	98 mM K <sup>+</sup>
Kora	0,87 ± 0,05	1,33 ± 0,08	53	1,00 ± 0,2	0,87	1,33
Śródmózgowie	0,90 ± 0,03	0,94 ± 0,06	4	1,22 ± 0,2	0,74	0,77
Pień mózgu	0,72 ± 0,04	0,59 ± 0,03	-18		0,59	0,48
Móżdżek	0,89 ± 0,03	1,26 ± 0,07	41	3,87 ± 0,2	0,23	0,33

\* Wartości średnie z 8 doświadczeń ± SD

\*\* Wartości średnie z 4 doświadczeń ± SD

**ODDYCHANIE I AKTYWNOŚĆ SPECYFICZNA DEHYDROGENAZ**  
**CYKLU PENTOZOWEGO W MÓZGU ŚWINKI MORSKIEJ**  
**WYRAŻONE JAKO % AKTYWNOŚCI KORY**



Wykres 2

Tabela 3

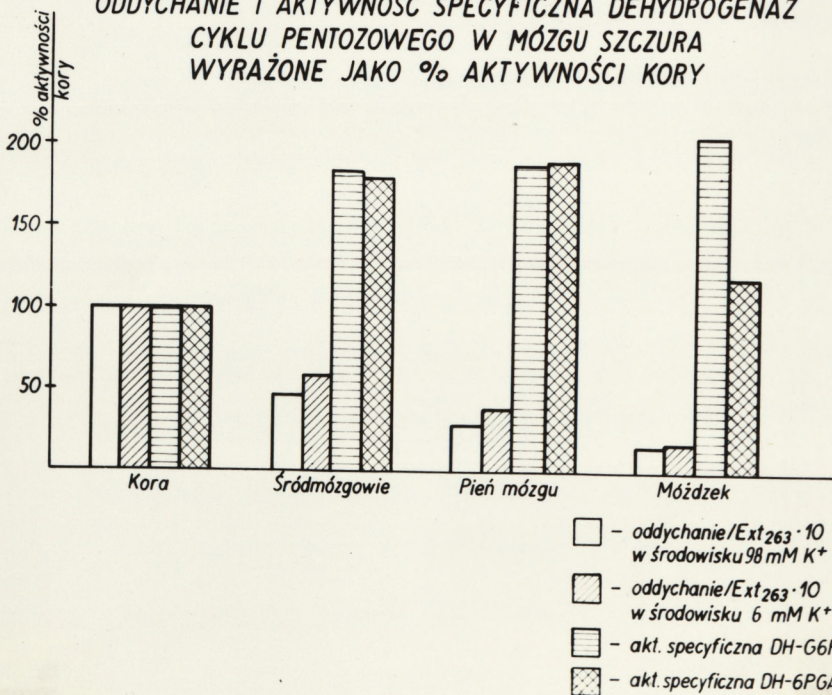
ODDYCHANIE SKRAWKÓW MÓZGU SZCZURA  
(substrat - 10 mM glukoza)  
W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU

Części OUN	Oddychanie * μl O <sub>2</sub> /godz./mg św. tkanki		% stymulacji oddychania	Względna ** gęstość komórek Ext <sub>263</sub> DNA·10	μl O <sub>2</sub> /godz./mg św. tkanki Ext <sub>263</sub> DNA·10	
	6 mM K <sup>+</sup>	98 mM K <sup>+</sup>			6 mM K <sup>+</sup>	98 mM K <sup>±</sup>
Kora	1,26 ± 0,12	1,69 ± 0,17	34	1,03 ± 0,1	1,22	1,64
Śródmózgowie	1,11 ± 0,13	1,24 ± 0,11	11	1,54 ± 0,4	0,72	0,80
Pień mózgu	0,74 ± 0,11	0,76 ± 0,09	3		0,48	0,50
Mózdzek	1,12 ± 0,11	1,47 ± 0,06	31	5,4 ± 0,3	0,21	0,27

\* Wartości średnie z 6 doświadczeń z wyjątkiem kory - 10 ± SD

\*\* Wartości średnie z 5 doświadczeń ± SD

ODDYCHANIE I AKTYWNOŚĆ SPECYFICZNA DEHYDROGENAZ  
CYKLU PENTOZOWEGO W MÓZGU SZCZURA  
WYRAŻONE JAKO % AKTYWNOŚCI KORY



Wykres 3

Z uwagi na niejednorodną budowę morfologiczną tkanki nerwowej do badań oddychania tkankowego wprowadzono dodatkowo wskaźnik gęstości komórkowej w poszczególnych okolicach mózgowia.

Przyjmując, że większość komórek posiada stałą, diploidalną zawartość DNA, przeprowadzono pomiar absorpcji UV hydrolizatu DNA, uzyskanego z 10% homogenatu tkanki. Odnosząc aktywność oddechową określonej masy skrawków tkankowych do otrzymanych wartości ekstynkcyjnego hydrolizatu, otrzymano wskaźnik wartości oddychania, uwzględniający różnice liczby komórek w badanej masie tkanki. Wartość oddychania poszczególnych okolic mózgu w odniesieniu do ich względnej gęstości komórkowej, przedstawiono z prawej strony tabeli 2 i 3. Po uwzględnieniu różnic gęstości komórek, otrzymujemy analogiczny jak poprzednio, obraz działania wysokich stężeń jonów  $K^+$  oraz charakterystyczną gradację aktywności oddechowej pomiędzy poszczególnymi częściami ośrodkowego układu nerwowego. Stosunki te ilustrują wykresy 2 i 3, uwzględniające jednocześnie specyficzną aktywność DH-az pentozowych w danej strukturze. Na przedstawionych wykresach badane parametry przedstawiono jako odsetki wartości charakterystycznych dla kory mózgu.

Charakter rozkładu obu badanych parametrów /oddychania i aktywności DH-az pentozowych/ w ośrodkowym układzie nerwowym jest podobny u świnek morskich i u szczurów.

Oddychanie skrawków w środowisku zarówno niskopotasowym, jak i wysokopotasowym jest najaktywniejsze w korze mózgu, zmniejszając się stopniowo w kierunku śródmózgowia, pnia mózgu i mózdzku. Wzrost zużycia tlenu pod wpływem wysokich stężeń jonów potasu nie idzie w parze z aktywnością oddechową, charakterystyczną dla skrawków z określonych okolic i jest najwyższy w korze mózgu i mózdzku. Natomiast aktywność enzymów DHG6P i DH6PGA wydaje się przeciwna średniej aktywności oddechowej badanych okolic. Najniższą specyficzną aktywność tych enzymów stwierdzono w korze mózgu ze wzrostem o około 50 - 100 % w innych okolicach ośrodkowego układu nerwowego.

## 2./ Obraz histologiczny i histochemiczny ośrodkowego układu nerwowego u szczurów.

Badanie morfologiczne ośrodkowego układu nerwowego u zwierząt kontrolnych wykazało typowy obraz nieuszkodzonej tkanki nerwowej. Jedynie w korze mózgu pomiędzy prawidłowymi komórkami nerwowymi warstw piramidowych, występowały pojedyncze ciemne neurony / dark neurons/, które zwykle spotyka się w preparatach mikroskopowych nieperfundowanej tkanki. Komórki nerwowe o podobnych cechach, występujące zarówno w materiale kontrolnym jak i doświadczalnym traktowano jako artefakty.

Obraz histochemiczny tkanki nerwowej zwierząt kontrolnych wykazywał charakterystyczny rozkład aktywności

badanych enzymów /SDH, LDH, DH-G6P DH-<sup>76PGA</sup>/ pomiędzy formacjami szarymi i istotą białą. Aktywność enzymatyczna istoty szarej była znacznie wyższa niż istoty białej. W korze mózgu oraz w jądrach podkorowych odczyn histochemiczny miał charakter rozlanego zabarwienia tych struktur, bez wyraźnego odcinania się komórek nerwowych od tkli otaczającego je neuropilu. W korze mózgu zaznaczały się natomiast wyraźne warstwowe różnice aktywności, szczególnie w reakcji z bursztynianem sodu i mleczanem sodu, jako substratem. Najwyższy odczyn występował w warstwach III i V kory mózgu.

Również w reakcji z bursztynianem sodu jako substratem, na tle aktywności neuropilu, uwidoczniła się wysoka aktywność w poszczególnych komórkach nerwowych głębokich warstw kory mózgu. Dehydrogenazy bursztynianowa i mleczanowa wykazywały bardzo niską aktywność w istocie białej mózgu. Zwłaszcza aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w elementach glejowych istoty białej miał charakter śladowy. W przeciwieństwie do tego stwierdziło się stosunkowo wysoką aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w gleju i to zarówno skąpowypustkowym, jak i astrocytarnym istoty białej.

Komórkową aktywność DH-G6P stwierdzaną w głębokich warstwach kory mózgu, wydaje się również należy odnieść do występujących tu obficie komórek glejowych. Wysoką aktywność DH-G6P wykazywały ponadto komórki Purkiniego i glej Bergmana w korze mózdzku.

### 3./ Omówienie

Podsumowując wyniki badań nad wartościami oddychania skrawków i aktywnością specyficzną DH-es, związanych z cyklem pentozowym w mózgu szczurów i świnek morskich, wydaje się, że otrzymany charakterystyczny rozkład ich aktywności /wykres 2 i 3/, odpowiada zróżnicowaniu szlaków przemian glukozy w poszczególnych okolicach ośrodkowego układu nerwowego. Porównując otrzymane w oznaczeniach spektrofotometrycznych wartości aktywności specyficznej DHG6P i DHGPGA z ich obrezem histochemicznym w poszczególnych formacjach mózgu, można przyjąć, że są one reprezentatywne dla rodzaju komórek przeważających w danej strukturze OUN. Okolice z przewagą komórek glejowych i stosunkowo mniejszą komponentą neuronów, wykazują na ogół wysoką aktywność enzymów związanych z cyklem pentozowym. Zaznacza się to wyraźnie w badaniach biochemicznych prowadzonych na frakcji cytoplazmatycznej, gdzie zostają odrzucone niesktywne składniki, takie jak mielina i lipoproteidy strukturalne. Wysoką aktywność enzymów związanych z cyklem pentozowym w komórkach glejowych potwierdzają przeprowadzone dodatkowe oznaczenia DHG6P i DHGPGA w istocie białej podkorowej świnek morskich, w której głównym składnikiem komórkowym jest glej. Otrzymane tu wartości są około dwukrotnie większe w porównaniu z korą mózgu. Komórki nerwowe determinują natomiast, zarówno zużycie tlenu przez korę mózgu i pień, jak i ich wrażliwość na stymulację jonami potasu.

Odmienne pod tym względem zachowuje się mózdzek, który pomimo wyraźnie zaznaczonych cech pobudliwości metabolicznej charakterystycznej dla formacji zawierających neurony, wykazuje stosunkowo niskie zużycie tlenu, w przeliczeniu na względną gęstość komórek. Zjawisko to należy tłumaczyć zapewne specyficzną strukturą cytochemiczną mózdzku.

## II. Niedotlenienie proste - anoksja anoksyjna.

### 1./ Przebieg doświadczenia.

Zwierzęta umieszczone w komorze gazowej, przez którą przepuszczano azot techniczny, o zawartości poniżej 1% tlenu, w pierwszym okresie doświadczenia wykazywały znaczne pobudzenie ruchowe oraz przyspieszenie oddechu. Po upływie około 3 minut dochodziło do pełnego bezdechu. Zwierzęta utrzymywano w tym stanie przez 30 sek., a następnie przenoszono do atmosfery powietrza. U większości zwierząt oddech powracał samoistnie, u nielicznych tylko istniała potrzeba stosowania sztucznego oddychania.

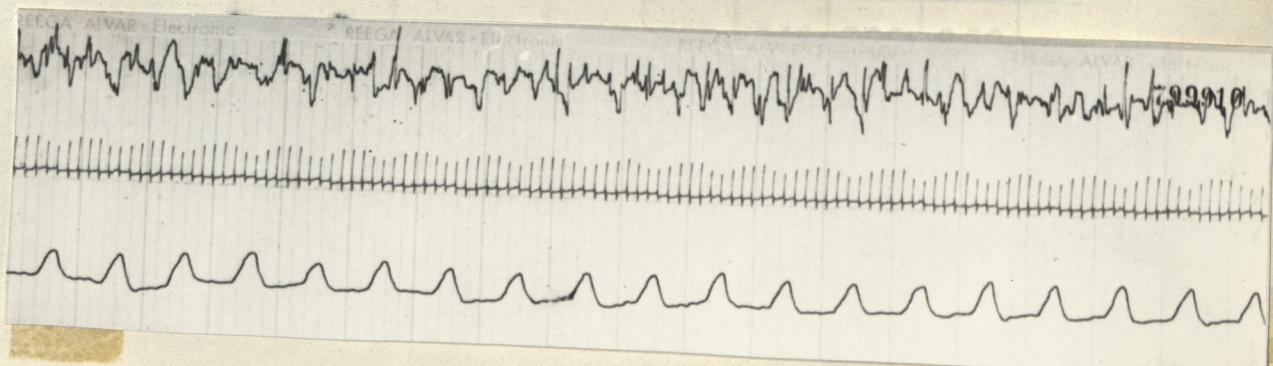
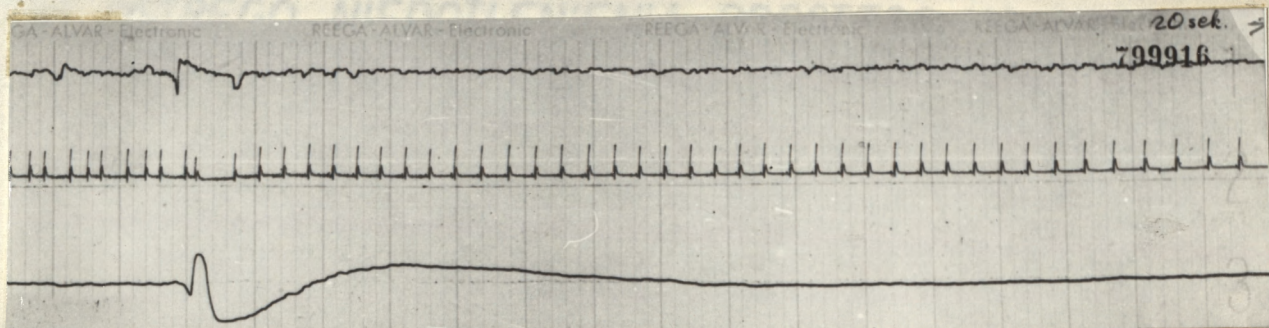
Stan kliniczny zwierząt po niedotlenieniu, przez cały okres obserwacji nie wykazywał odchyłań od stanu prawidłowego.

Zwierzęta dekapitowano w 3 grupach - bezpośrednio po niedotlenieniu oraz po upływie 3 i 24 godzin od niedotlenienia.

## 2./ Kontrola stopnia niedotlenienia.

Kontrolę stopnia niedotlenienia przeprowadzono przy pomocy przyżyciowej rejestracji parametrów elektrofizjologicznych, oraz biochemicznych oznaczeń zawartości kwasu mlekowego i glukozy w tkance mózgowej /vide metodyka doświadczalny punkt 2b/.

Wykres 4 i 5 przedstawiają porównawczo zapisy elektroencefalograficzne, elektrokardiograficzne oraz krzywą oddechu u zwierzęcia przed niedotlenieniem i w czasie końcowej fazy niedotlenienia, bezpośrednio przed pobraniem tkanki nerwowej do badań biochemicznych.



Wykres 5.



Porównanie elektrofizjologicznych zapisów kontrolnych z zapisami otrzymanymi w okresie zaniku czynności oddechowej /ścieżka 3/ - wykazało zniesienie czynności bioelektrycznej mózgu /ścieżka 1/ oraz znaczne zaburzenie czynności serca /ścieżka 2/, polegające na zwolnieniu akcji serca oraz pojawieniu się zaburzeń rytmu.

Tabela 4

### WPŁYW OSTREGO NIEDOTLENIEŃ PROSTEGO NA STĘŻENIE GLUKOZY I KWASU MLEKOWEGO W MÓZGU SZCZURA

		$\mu\text{mol/g}$ św.tkanki $\pm$ SD		Wyniki doświadczeń						
				1	2	3	4	5	6	7
Kontrola	Glukoza	1,52	0,61	1,06	1,60	2,30	0,66	2,08	—	—
	K.mlekowy	1,64	0,62	0,98	1,61	2,16	0,96	2,50	—	—
Niedotlenienie	Glukoza	4,96 *	2,86	6,90	2,06	5,70	1,27	2,16	9,0	7,60
	K.mlekowy	6,33 **	1,28	6,72	5,21	5,42	7,51	4,88	6,0	8,60

\*  $0,02 < p < 0,05$

\*\*  $p < 0,001$

Tłuszcze nerwowe pobrane od zwierząt w okresie niedotlenienia /moment zaniku czynności bioelektrycznej mózgu/ we wszystkich przypadkach wykazywały wzrost poziomu kwasu mlekowego. Średnio stężenie kwasu mlekowego wynosiło 6,55  $\mu\text{mol/g}$  tkanki, t.j. czterokrotnie więcej niż w mózgu zwierząt kontrolnych.

W równocześnie prowadzonych oznaczeniach zawartości glukozy, u 4 spośród 7 badanych zwierząt, stwierdzono znaczny wzrost jej stężenia w tkance mózgowej w porównaniu z kontrolą, a tylko w jednym przypadku wystąpiło nieznaczne obniżenie w stosunku do średniej wartości kontrolnej. Wyniki doświadczeń podano w tabeli 4.

### 3./ Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego i oddychania tkankowego w różnych okolicach OUN.

Pomimo wyrażonych zaburzeń w fizjologii i biochemii mózgu, występujących w czasie trwania niedotlenienia/zniesienie aktywności bioelektrycznej, wzrost poziomu kwasu mlekowego/, nie stwierdzono istotnych zmian w metabolizmie tlenowym skrawków mózgu w okresie pierwszych 24 godzin po niedotlenieniu. Jedynie w przypadku skrawków kory mózgu zaobserwować można tendencję /statystycznie nieznamienną/ do obniżenia się wartości oddychania skrawków po niedotlenieniu w porównaniu z kontrolą. Nie stwierdzono również zmian w pobudliwości chemicznej metabolizmu tlenowego

skrawków w środowisku o zwiększonym stężeniu jonów potasu w porównaniu z kontrolą /tabela 5/.

Tabela 5 i 6

**WPLYW OSTREGO NIEDOTLENIEŃ PROSTEGO NA ODDYCHANIE SKRAWKÓW MÓZGU SZCZURA (substrat - 10 mM glukoza)**  
( $QO_2 = \mu l O_2 / \text{godz.} / \text{mg św. tkanki} \pm SD$ )

Części mózgu	Kora mózgu		Móżdek		Śródmózgowie		Pień mózgu		
	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM	
Czas po niedotlenieniu	0	1,14 ± 0,07	1,67 ± 0,12	1,22 ± 0,07	1,62 ± 0,12	1,12 ± 0,12	1,19 ± 0,17	0,85 ± 0,06	0,78 ± 0,06
	3 godz.	1,18 ± 0,07	1,61 ± 0,07	1,10 ± 0,06	1,57 ± 0,13	1,11 ± 0,07	1,23 ± 0,10	0,78 ± 0,11	0,79 ± 0,11
	24 godz.	1,17 ± 0,06	1,67 ± 0,11	1,15 ± 0,06	1,62 ± 0,18	1,12 ± 0,05	1,23 ± 0,07	0,91 ± 0,10	0,80 ± 0,03
	kontrola	1,26 ± 0,12	1,69 ± 0,17	1,12 ± 0,11	1,47 ± 0,06	1,11 ± 0,13	1,24 ± 0,11	0,74 ± 0,11	0,76 ± 0,09

Śr. wyniki z 6 doświadczeń

**WPLYW OSTREGO NIEDOTLENIEŃ PROSTEGO NA AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ CYKLU PENTOZOWEGO W MÓZGU SZCZURA**  
 $\Delta OD_{340} \text{ m}\mu / \text{min} / \text{mg białka} \cdot 10^3 \pm SD$

Części mózgu	Kora mózgu		Móżdek		Śródmózgowie		Pień mózgu		
	DH-G6P	DH-6PGA	DH-G6P	DH-6PGA	DH-G6P	DH-6PGA	DH-G6P	DH-6PGA	
Czas po niedotlenieniu	0	43 ± 5	12 ± 1,6	86 ± 7,4	16 ± 1,6	74 ± 8,5	19 ± 2,0	81 ± 11	21 ± 1,0
	3 godz.	43 ± 1,6	8 ± 1,7	89 ± 2,7	10 ± 1	81 ± 5,0	12 ± 2	93 ± 3,6	15 ± 2
	24 godz.	41 ± 2,6	13 ± 1,6	89 ± 7,5	16 ± 2	74 ± 8,2	19 ± 1,7	83 ± 10,8	21 ± 2,1
	kontrola	41 ± 3,4	10 ± 1,7	84 ± 4,7	12 ± 2,7	76 ± 4,3	18 ± 1,6	77 ± 6,3	19 ± 1,7

Średnie wyniki z 3 doświadczeń

Aktywność DH-az cyklu pentożowego w tkance nerwowej szczurów po upływie 24 godzin po niedotlenieniu nie różni się w sposób zasadniczy od aktywności stwierdzonej u zwierząt kontrolnych, w tych samych okolicach OUN /tabela 6/. Można jedynie zauważyć nieostro wyróżzoną tendencję

wzrostu aktywności DH GGP w grupie zwierząt badanych w 3 godziny po niedotlenieniu. W tym czasie we wszystkich częściach OUN przyjął one wartości nieznacznie wyższe niż w kontroli. Jedynie w pniu mózgu wzrost ten jest statystycznie istotny i wynosi  $93 \pm 3,6$  jedn. aktywności w porównaniu z  $77 \pm 6,3$  jedn. w warunkach kontrolnych. W tej grupie czasowej stwierdzono również nieznaczne obniżenie się aktywności DHGPCA w porównaniu z wartościami występującymi tak w kontroli, jak i w innych grupach czasowych po niedotlenieniu.

#### 4./ Obraz histologiczny i histochemiczny OUN

Najwcześniejsze zmiany morfologiczne, obserwowane u zwierząt bezpośrednio po zakończeniu niedotlenienia, dotyczyły układu naczyńowego mózgu. Polegały one na ogólnym zastoju naczyńowym, któremu towarzyszyło nieznaczne przesłonięcie okołoszczyniowe /rys.1, 2/. W bezpośrednim otoczeniu naczyń włosowatych i drobnych naczyń żylnych obserwowano niewielkiego stopnia zblednięcie osłonek ściennej /rys.3/. Pojedyncze drobne tętniczki wykazywały zanętarce normalnej struktury ścien. W istocie białej półkul mózgowych obserwowano się ponadto lekko zaznaczone porażanie pasm oligodendroglu.

Po upływie 3 godzin od momentu niedotlenienia do opisanych powyżej nieprzewidywalności dołączały się zmiany

dotyczące elementów mięsaszowych tkanki. Polegały one na rozsiennym zwyrodnieniu pojedynczych komórek nerwowych. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim dużych komórek piramidowych kory mózgu, dużych neuronów prądkowia i wzgórze wzrokowego /ryc.4/ oraz komórek Purkinjego mózdzku. Komórki kory mózgu i jąder podstawy wykazywały delikatną tigrilizę o typie tzw. schorzenia ischemicznego i ostrego Nissla, podczas gdy uszkodzone komórki Purkinjego miały cechy tzw. schorzenia homogenizacyjnego.

Natężenie opisanych zmian we wszystkich okolicach OUN było bardzo małe. Uszkodzone komórki nerwowe występowały pojedynczo w poszczególnych polach widzenia z różnych okolic OUN. Zmianom neuronalnym rzadko towarzyszyło dyskretnie pobudzenie mikrogleju.

Obraz histologiczny OUN zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin od momentu niedotlenienia różnił się od poprzedniego brakiem morfologicznych wykładników obrzęku mózgu. Typ zmian komórek nerwowych i glejowych nie odbiegał zasadniczo od obrazu opisanego poprzednio. W jednym przypadku obserwowano ponadto wyraźne cechy tzw. ostrego obrzęku oligodendrogleju w istocie białej podkorowej.

Obraz histochemiczny dotyczący aktywności SDH, LDH, DH-66P i DH-6PGA u zwierząt badanych w momencie zakończenia niedotlenienia nie odbiegał w sposób zasadniczy od obrazu obserwowanych u zwierząt kontrolnych.

Cechą charakterystyczną obrazu histochemicznego u zwierząt badanych po upływie 3 godzin od momentu niedotlenienia, była wyraźna nierównomierność natężenia reakcji formazanowej w dużych komórkach piramidowych kory mózgu. Obok komórek wykazujących znaczne nagromadzenie typowych produktów reakcji enzymatycznej, obserwowano się nieliczne komórki jasne oraz komórki zupełnie nie zawierające ziaren formazenu. Podobne zmiany dotyczyły również komórek Purkinjego mózdzku. W jednym przypadku zmianom komórkowym towarzyszyło wyraźne, obustronne choć nie symetryczne obniżenie reakcji enzymatycznej w neuropilu głębokich warstw kory mózgu. Równocześnie obserwowano się zwiększenie intensywności reakcji formazanowej z 6-fosforenem glukozy, jako substratem w podkorowo położonych astrocytach istoty białej.

Obraz odczynu histochemicznego u zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin od niedotlenienia nie różnił się od opisanego powyżej, z tym tylko, że zmiany w komórkach dotyczące zarówno neurocytów jak i astrocytów były nieco wyraźniejsze. Oprócz poprzednio opisanych zmian obserwowanych w korze mózgu i mózdzku, występowało wyraźne obniżenie odczynu histochemicznego w poszczególnych neuronach kory amonalnej komórkach Purkinjego w mózdzku oraz w komórkach gleju Bergmana /ryc.5 /.

## 5./ Omówienie

Na podstawie otrzymanych wyników wydaje się, że ostre krótkotrwałe niedotlenienie, wywołane brakiem tlenu w mieszaninie gazowej i trwające do momentu wystąpienia objawów preagonalnych u zwierząt doświadczalnych, pomimo wyraźnych zaburzeń czynności OUN /zanik aktywności bioelektrycznej mózgu/ oraz zaburzeń metabolizmu tlenowego tkanki /4-krotny wzrost poziomu kwasu mlekowego/, nie prowadzi do masowych uszkodzeń tkanki nerwowej. Świadczą o tym zarówno obserwacje kliniczne zwierząt, jak i wyniki badań biochemicznych i morfologicznych. Stosunkowo nie-liczne neurony wykazują cechy uszkodzenia. Obserwowane zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych są rozsiane i bardzo mało nasilone. Towarzyszy im we wczesnym okresie po niedotlenieniu, obrzęk mózgu. Nie wywierają one, jak wynika z naszych obserwacji, istotnego wpływu na intensywność zużycia tlenu przez skrawki pochodzące z badanych okolic mózgowia, zarówno w warunkach niskiego jak i wysokiego stężenia jonów potasu w środowisku inkubacyjnym.

Badania histochemiczne wskazują jednak na nie-równomierność odczynu enzymatycznego w komórkach nerwowych, z tendencją do obniżenia aktywności SDH, głównie w głębszych warstwach kory mózgu. Może to odpowiadać zarysowującemu się obniżeniu średniej wartości zużycia tlenu przez skrawki kory mózgu po niedotlenieniu. Zmniejszenie zużycia tlenu nie jest jednak znamienne statystycznie, co jest za-

pewne uzależnione od dyskretnego charakteru zmian oraz różnic osobniczych, występujących w oddychaniu skrawków pochodzących od różnych zwierząt.

W badaniach aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym nie stwierdzono również wyraźnych odchyleń od stanu prawidłowego. Porównanie wyników badań histologicznych, histochemicznych i biochemicznych pozwala jednak przypuszczać, że tendencja wzrostu aktywności DHG6P, zaobserwowana w 3 godziny po niedotlenieniu, szczególnie wyraźna w pniu mózgu, nie jest przypadkowa i może być związana z wczesną aktywacją gleju po zadziałaniu czynnika szkodliwego. Świadczą o tym wyniki badań histochemicznych, które wykazują, że komórki gleju charakteryzujące się wysoką aktywnością tego enzymu, reagują wzrostem aktywności enzymatycznej DHG6P w odpowiedzi na niedotlenienie tkanki nerwowej.

### III. Encefalopatia anoksyjno-ischemiczna

Otrzymane wyniki badań nad wpływem ostrego niedotlenienia anoksyjnego na ośrodkowy układ nerwowy skłoniły do wprowadzenia modelu, który przy zachowaniu typowego dla niedotlenienia charakteru zmian, cechowałoby się ich większym nasileniem, a jednocześnie, przez wprowadzenie jednostronności zmian, ułatwił obserwację nawet dyskretnych odchyleń. Warunki te spełnił opisany przez Levins /1960/ model jednostronnej encefalopatii anoksyjno-ischemicznej.



Model ten ogranicza oczekiwane zmiany do półkuli mózgu i międzyczołgowia po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej w obszarze unaczynienia tętnicy mózgu środkowej.

#### 1./ Przebieg doświadczenia

Zwierzętom doświadczalnym /szczury/ podwiązano tętnicę szyjną wspólną prawą. Zabieg ten nie wywoływał uchwytanych zmian klinicznych, poza występowaniem jednostronnego zespołu Hornera, związanego z uszkodzeniem przebiegających w przydatce tętnicy włókien nerwowych, pochodzących ze своju szyjnego górnego.

Po upływie 18 - 24 godzin od podwiązania tętnicy zwierzęta poddano ogólnemu niedotlenieniu, w warunkach jak opisano w poprzedniej grupie doświadczalnej, wykluczając jedynie czas trwania niedotlenienia do 20 - 40 minut. Wykłednikiem stopnia niedotlenienia był tor oddechowy zwierzęcia. Po okresie przyśpieszenia oddechu, któremu towarzyszyło pobudzenie ruchowe następował okres zwolnienia oddychania i stan śpiączkowy. W tym czasie u znacznego odsetka zwierząt występowały uogólnione nspedy drgawkowe lub jednostronne drgawki obejmujące lewe kończyny. W momencie wystąpienia bezdechu przerywano okresowo dopływ azotu i stosowano sztuczne oddychanie do chwili powrotu spontanicznego oddychania.

Zwierzęta poddane wymienionym zabiegom w okresie po zakończeniu doświadczenia w większości przypadków wyka-

zywały lewostronny niedowład lub porażenie kończyn. W grupie tej obserwowano bardzo wysoką śmiertelność zwierząt, zarówno w czasie trwania niedotlenienia, jak i w okresie 24 godzin po niedotlenieniu, zwłaszcza w przedziale czasu między 12 a 24 godziną obserwacji. Zwierzęta dekapitowano w grupach, bezpośrednio po niedotlenieniu, po upływie 3, 12 i 24 godzin.

## 2./ Kontrola doświadczalna

Przed przystąpieniem do zasadniczych badań nad wpływem niedotlenienia w modelu ischemiczno-onoksyjnym określano porównawczo zachowanie się badanych parametrów w obu półkulach mózgu, zarówno w warunkach przewidzianych, jak i po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej.

### a. Zwierzęta zdrowe

U zwierząt przewidzianych /bez podwiązanej tętnicy szyjnej/ wartości oddychania skrawków kory z przeciwległych półkul mózgu wykazują nieznaczne różnice /tabela 7/.

W związku z występowaniem dużych różnic osobniczych w wartościach zużycia tlenu zrezygnowano z wprowadzenia wartości średnich dla badanych grup, a ograniczono się w zasadzie do porównywania wartości oddychania pomiędzy przeciwległymi półkulami w każdym indywidualnym przypadku.

**ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA  
W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU  
( $QO_2 = \mu l O_2 / \text{godz.} / \text{mg św. tkanki}$ )**

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$
1	1,13	1,10	103	1,72	1,68	103
2	1,19	1,23	97	1,75	1,71	102
3	1,21	1,18	102	2,05	1,87	109
4	1,26	1,22	103	1,69	1,70	99
5	1,37	1,39	98	1,96	2,01	97

*$QO_2$  półkuli prawej wyrażono w procentach  
 $QO_2$  półkuli lewej*

Spodziewając się lateralizacji zmian po niedotlenieniu przyjęto określenie współczynnika oddechowego skrawków półkuli prawej /strona po której podwiązano tętnicę szyjną/, jako procentu współczynnika oddechowego homologicznej półkuli lewej. Na podstawie analizy badań kontrolnych uznawano za znaczące te różnice w oddychaniu pomiędzy półkulami, które przekroczyły 10% wartości współczynnika oddechowego. Przeważały wartości wprowadzonego współczynnika/podawanego w tabelach po prawej stronie wartości oddychania/ od 90 do 110 traktowano jako naturalny rozrzut wokół wartości średniej, wynikający z ograniczeń metody. W przypadku występowania jednokierunkowych

zaburzeń oddychania skrawków w całej grupie badanej bez cech lateralizacji, analizę wyników przeprowadzono porównując ze średnią wartością oddychania skrawków kontrolnych.

	$\bar{x}$	$\bar{y}$	$\pm$ SD
W środowisku 6 mM-KCl	1,22	1,21	0,09 /10 oznaczeń/
W środowisku 90mM-KCl	1,51	1,73	0,14 /10 oznaczeń/

Wartości średnie obliczono na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 7/.

b. Zwierzęte z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną wspólną.

Wyniki zamieszczone w tabeli 8 przedstawiają oddychanie skrawków z obu półkul mózgu szczurów po upływie 3 godzin po podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej prawej.

Tabela 8

**ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA  
W 3 GODZ. PO PODWIĄZANIU TĘTNICY SZYJNEJ PRAWIEJ  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU**  
( $QO_2 = \mu l O_2 / \text{godz.} / \text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$		Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	
1	1,08	1,12	96	1,64	1,38	118
2	1,06	1,01	105	1,79	1,58	113
3	1,17	1,14	102	1,29	1,30	99
4	1,17	1,17	100	1,42	1,86	79
5	1,33	1,32	101	1,33	1,72	77

$QO_2$  półkuli prawej wyrażono w procentach  
 $QO_2$  półkuli lewej

W badanej grupie zwierząt zaobserwowano niezbyt nasilone obniżenie oddychania skrawków w porównaniu z kontrolą. Zmiany te występują obustronnie i dotyczą głównie oddychania stymulowanego zwiększonym stężeniem jonów potasu w środowisku, przy czym obniżeniu pobudliwości skrawków nie jest identyczne w obu półkulach i nie występuje w równym stopniu we wszystkich przypadkach.

Srednie wartości oddychania skrawków w tej grupie przedstawiają się następująco:

	$\bar{x}$	$\bar{m}$	$\pm$ SD
W środowisku 6 mM KCl	1,15	1,15	0,03 /10 oznaczeń/
W środowisku 98 mM KCl	1,53	1,50	0,20 /10 oznaczeń/

Zmiany w oddychaniu skrawków półkul mózgowych, występujące w 3 godziny po podwiązaniu tętnicy szyjnej stwierdzone zarówno w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy, jak i po stronie przeciwległej.

Przyпускаjąc, że nie są one związane bezpośrednio ze zmianami w krążeniu na skutek zabiegu, a raczej z wpływem narkozy stosowanej przy przeprowadzeniu i podwiązaniu tętnicy, postanowiono wydłużyć czas przeżycie zwierząt od zabiegu do niedotlenienia. Przeprowadzone badanie kontrolne w czasie 18 - 24 godziny po podwiązaniu tętnicy /tabela 9/ nie wykazały w tym okresie znaczących zaburzeń w oddychaniu skrawków.

ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA  
18-24 GODZ. PO PODWIĄZANIU TĘTNICY SZYJNEJ PRAWIEJ  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU

( $QO_2 = \mu l O_2 / \text{godz.} / \text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$
1	1,26	1,20	105	1,82	1,66	109
2	1,36	1,36	100	1,82	1,94	93
3	1,17	1,07	109	1,72	1,58	108
4	1,12	1,09	103	1,74	1,51	115
5	1,18	1,17	101	1,72	1,56	110

Średnie wartości oddychania skrawków w tej grupie są następujące:

	$\bar{x}$	$\bar{m}$	$\pm SD$
W środowisku 6 mM KCl	1,20	1,18	0,09 /10 oznaczeń/
w środowisku 98 mM KCl	1,71	1,72	0,13 /10 oznaczeń/

Porównując wartości współczynników oddychowych homologicznych półkul stwierdzono, że różnice pomiędzy nimi /poza 1 przypadkiem oddychania stymulowanego KCl/ nie przekraczają 10%.

Na podstawie wyników oddychania skrawków po upływie 24 godzin od podwiązania tętnicy przyjęto, że okres ten jest optymalnym dla zastosowania niedotlenienia. Dalsze badania kontrolne przeprowadzono więc w tej grupie czasowej.

W badaniach aktywności DHG6P i DHG6GA we frakcji cytoplazmatycznej półkul mózgowych nie stwierdzono występowania zmian po 24 godzinach od jednostronnego podwiązania -

nie tętnicy w stosunku do kontroli /tabela 14/, ani też różnicy w aktywności przeciwległych półkul u poszczególnych zwierząt.

Kontrolne badania histologiczne i histochemiczne wykonano u zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin od podwiązania tętnicy szyjnej. Dodatkowo przebadano mózgi zwierząt dekapitowanych po 48 godzinach, tj. w okresie odpowiadającym naszym obserwacjom nad rozwojem encefalopatii anoksyjno-ischemicznej.

Obraz morfologiczny OUN w obu grupach czasowych nie różnił się w sposób zasadniczy od obrazu występującego u zwierząt z przewidywanym krążeniem krwi w tętnicach szyjnych. Jedynym obserwowanym odchyleniem od normy kontrolnej były nieznaczne ubytki komórek nerwowych w korze prawej półkuli /ryc. 6/ oraz pojedynczo występujące neurocyty z cechami tigrolizy /ryc. 7/, odpowiadającej obrzeżowi tzw. schorzenia ischemicznego. Zarówno ubytki, jak i zwyrodnienia komórek nerwowych ograniczone były do III, IV, V warstwy kory mózgowej w półkuli po stronie podwiązania tętnicy szyjnej. W jednym przypadku po 24 godzinach od podwiązania tętnicy, zmiany o tym samym charakterze występowały jedynie w prążkowie i wzgórzu wzrokowym; w przypadku tym nie obserwowano żadnych zmian w obrębie kory mózgu.

Zmiany w obszarze histochemicznym dotyczyły w zasadzie wyłącznie aktywności SDH. Polegały one na pogłębieniu występującej już w warunkach prawidłowych nierównomierności odczynów enzymatycznych w dużych komórkach głębokich warstw kory mózgu po stronie podwiązania. Zmiana neuronolingu w czterech przypadkach towarzyszyła dość wyraźne, jednostronne obniżenie reakcji enzymatycznej z barazyniną - naś w niedosygu w neuropilu głębokich warstw kory mózgu.

U jednego zwierzęcia dekapitowanego po upływie 24 godzin od podwiązania tętnicy szyjnej, obserwowano się nieznaczne podwyższenie odczynu oksydo-redukcyjnego z glikozą 6-fosforanem jako substratem, występujące w gleju podkorowej istoty białej po stronie podwiązania tętnicy szyjnej.

### c. Podsumowanie

Otrzymane wyniki badań biochemicznych, histologicznych i histochemicznych po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnie wskazują, że obserwowane dyskretne zmiany morfologiczne w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy, związane są najprawdopodobniej z ograniczonym ukrwieniem tkanki. Zmiany histologiczne nie znajdują odzwierciedlenia w badaniach nad aktywnością oddechową aksonów, oraz aktywnością dehydrogenaz cyklu pentozowego półkul kory mózgowej. Spostrzeżenia te odnoszą się szcze-



gólnie do wyników otrzymanych po upływie 24 godzin od momentu podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej.

W związku z otrzymanymi wynikami badań biochemicznych, czas ten uznano dla dalszych doświadczeń za optymalny.

### 3./ Charakterystyka oddychania tkankowego i aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego.

#### ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA BEZPOŚREDNIO PO NIEDOTLENIENIU W MODELU LEVINA Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU

( $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{godz.}/\text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$
1	1,11	1,26	88	1,57	1,73	91
2	1,07	1,09	99	1,53	1,45	105
3	1,28	1,27	101	1,77	1,71	104
4	1,26	1,17	108	1,63	1,59	102
5	0,94	1,13	83	1,15	1,54	75
6	0,77	1,27	61	1,20	1,55	77
7	1,40	1,45	96	1,96	1,99	98
8	1,34	1,35	99	1,71	1,90	90

Tabela 10

$QO_2$  półkuli prawej wyrażono w procentach  $QO_2$  półkuli lewej

#### ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA 3 GODZ. PO NIEDOTLENIENIU W MODELU LEVINA Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU

( $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{godz.}/\text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$	$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$
1	0,25	1,36	18	0	2,03	-
2	0,53	1,17	45	0,47	1,77	26
3	0,67	1,36	49	0,86	1,97	44
4	0,76	1,40	54	0,98	1,74	56
5	1,19	1,40	85	1,53	1,78	86
6	1,12	1,18	95	1,66	1,80	92

Tabela 11

Oddychanie tkankowe kory mózgowej wykazywało istotne różnice zarówno między poszczególnymi grupami czasowymi zwierząt, jak i między poszczególnymi zwierzętami w obrębie tej samej grupy.

U zwierząt badanych bezpośrednio po niedotlenieniu obniżenie zużycia tlenu przez skrawki kory mózgu, pochodzące z półkuli po stronie podwiązania tętnicy szyjnej obserwowano jedynie w trzech przypadkach na 8 doświadczeń. Tylko w jednym przypadku obniżenie oddychania tkankowego przekraczało 30 % oddychania półkuli przeciwległej, traktowanej za kontrolę /tabela 10/.

Po upływie trzech godzin od niedotlenienia u 4 zwierząt spośród 6 badanych stwierdzało się istotne obniżenie oddychania tkankowego skrawków pochodzących z półkuli poddanej działaniu czynnika ischemiczno-anoksyjnego, w porównaniu z półkulą przeciwległą. Obniżenie to wynosiło ponad 40 % wartości oddychania półkuli kontrolnej. U 2 pozostałych zwierząt zmiany oddychania w porównaniu z kontrolą były nieznaczne /tabela 11/.

Na ogólną liczbę 5 zwierząt badanych po upływie 12 godzin od niedotlenienia, jedynie u dwu wystąpiło wyraźne obniżenie zużycia tlenu przez skrawki pochodzące z półkuli uszkodzonej; przekraczało ono 20 % oddychania półkuli przeciwległej /tabela 12/. Badanie zużycia tlenu przez skrawki z półkul mózgowych u zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin od niedotlenienia wykazało największe zróżnicowanie zaburzeń oddychania tkankowego w poszczegól-

nych przypadkach. Na 8 zwierząt badanych w tej grupie u 2 wystąpiło bardzo znaczne obniżenie zużycia tlenu w kory pólkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej. Zużycie tlenu wynosiło tu zaledwie 26 % i 46 % wartości oddychania homologicznej pólkuli. U dalszych 3 zwierząt tej grupy oddychanie tkankowe skrawków z pólkuli uszkodzonej wynosiło około 70 % oddychania pólkuli kontrolnej, a u pozostałych 3 zwierząt różnice w oddychaniu homologicznych pólkul były nieznaczne /tabela 13 /.

We wszystkich przypadkach, badanych w różnym czasie po niedotlenieniu, z wyjątkiem 2 zwierząt w grupie 3-godzinnej, skrawki z pólkuli uszkodzonej zachowały zdolność do reagowania podwyższeniem metabolizmu tlenowego na zwiększone stężenie KCl w środowisku inkubacyjnym. Efekt pobudliwości metabolicznej był proporcjonalny do wyjściowej wartości oddychania spoczynkowego. Zniesienie stymulującego wpływ potasu na zużycie tlenu przez skrawki kory mózgowej we wspomnianych 2 przypadkach w grupie 3-godzinnej, dotyczyło zwierząt, u których zahamowanie oddychania tkankowego było najsilniejsze /tabela 10 - 13 /.

**ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA  
12 GODZ. PO NIEDOTLENIENIU W MODELU LEVINA  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU**

( $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{godz.}/\text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$		$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	
1	1,03	1,30	79	1,27	1,58	80
2	1,08	1,34	80	1,13	1,47	77
3	1,24	1,28	97	1,91	1,78	107
4	1,28	1,38	92	1,63	1,74	93
5	1,39	1,37	102	1,55	1,53	102

Tabela 12

$QO_2$  półkuli prawej wyrażono w procentach  
 $QO_2$  półkuli lewej

**ODDYCHANIE SKRAWKÓW KORY MÓZGOWEJ SZCZURA  
18-24 GODZ. PO NIEDOTLENIENIU W MODELU LEVINA  
Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH STĘŻEŃ POTASU**

( $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{godz.}/\text{mg św. tkanki}$ )

Lp	$K^+ = 6 \text{ mM}$		%	$K^+ = 98 \text{ mM}$		%
	Kora pr. $QO_2$	Kora l. $QO_2$		$\frac{QO_2 \text{ pr.}}{QO_2 \text{ l.}} \cdot 100$	Kora pr. $QO_2$	
1	0,35	1,35	26	0,40	1,54	26
2	0,59	1,27	46	0,77	1,80	43
3	0,92	1,27	73	1,23	1,66	74
4	0,97	1,34	73	1,17	1,69	70
5	1,09	1,27	86	1,48	1,94	76
6	1,30	1,46	89	1,74	1,96	89
7	1,36	1,46	93	1,87	2,15	87
8	1,39	1,35	103	2,08	2,00	104

Tabela 13

Badanie wtywności cytoplazmatycznych enzymów  
związanych z przemianą w cyklu pentozowym - DHG6P i  
DHGPGA we wczesnym okresie po niedotlenieniu/bezpośrednio

i po 3 godzinach/ nie wykazało różnic pomiędzy nimi w homologicznych półkulkach mózgu. Wykazano natomiast średni wzrost aktywności DHG6P w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Wynosił on +21 % w grupie badanej bezpośrednio po niedotlenieniu i + 33 % w grupie 3-godzinnej /tabela 14/. Aktywność DH6PGA nie wykazywała znaczących różnic w porównaniu z kontrolą, chociaż i tu obserwowano tendencję wzrostu jej aktywności.

Tabela 14

**AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY GLIKOZO-6-FOSFORANOWEJ I DEHYDROGENAZY KWASU 6-FOSFOGLIKONOWEGO W MÓZGU SZCZURA WE Wczesnych OKRESACH ROZWOJU ENCEFALOPATII ANOKSYJNO-ISCHEMICZNEJ**  
( $\Delta OD_{340} \text{ m}\mu/\text{min}/\text{mg białka} \cdot 10^3 \pm SD$ )

Okres badania	Enzym	Aktywność specyficzna	Wyniki doświadczeń **												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Kontrola I (szczury prawidłowe)	DH-G6P	43 ± 4,34	39	38	47	47	41	46	37	35	44	44			
	DH-6PGA	14 ± 1,87	12	13	18	16	15	14	12	12	13	14			
Kontrola II (24 godz. po podwiązaniu tętnicy szyjnej prawej)	DH-G6P	44 ± 3,81	51	50	39	40	44	43	41	42	46	45			
	DH-6PGA	14 ± 2,55	19	18	14	14	14	13	11	11	13	12			
0-15 min po niedotlenieniu	DH-G6P	52 ± 6,48 *	48	42	46	46	54	47	57	62	60	56			
	DH-6PGA	12 ± 1,41	10	11	11	12	14	13	13	12	14	14			
3 godz. po niedotlenieniu	DH-G6P	57 ± 6,16 *	57	55	56	48	62	55	65	61	56	71	53	50	
	DH-6PGA	16 ± 5,0	13	12	12	9	13	12	24	23	19	20			
12-24 g. po niedotlenieniu (półkula lewa - działanie jedynie czynnika anoksyjnego)	DH-G6P	43 ± 6,1	37	52	39	45	36	42	41	57	42	39	45	36	38
	DH-6PGA	14 ± 2,21	15	18	13	15	14	13	16	16	14	9	13		
12-24 g. po niedotlenieniu (półkula prawa - działanie czynnika anoksyjno-ischemiczn.)	DH-G6P	36 ± 4,9 *	28	42	34	36	36	37	32	43	41	37	44	29	38
	DH-6PGA	12 ± 2,83	13	18	10	13	7	12	13	14	15	9	12		

\*  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą I

\*\* wyniki odpowiadają aktywności w półkuli mózgu badanego szczura

W okresie 12 - 24 godziny po niedotlenieniu obserwowano się statystycznie znaczne obniżenie aktywności DHG6P, w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Natomiast półkule przeciwległa, poddana wyłącznie działaniu enoksyji, bez udziału czynnika ischemicznego, w tym samym okresie czasu nie wykazywała obniżenia aktywności DHG6P, w porównaniu do grupy kontrolnej. Należy podkreślić dużą rozpiętość wyników w poszczególnych doświadczeniach. Stopień obniżenia aktywności DHG6P w stosunku do półkuli kontrolnej, przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej, wahał się od wartości statystycznie niezmiennych do około 25 % u zwierząt z najcięższym uszkodzeniem enoksyjno-ischemicznym. Natomiast w porównaniu do średniej aktywności DHG6P w półkuli po stronie niepodwiązanej tętnicy jak i wartości w grupie kontrolnej, średnia aktywność DHG6P w półkuli poddanej działaniu czynnika enoksyjno-ischemicznego, po upływie 24 godzin po niedotlenieniu była niższa o około - 16 %. Wynik ten wykazuje cechy zmienności statystycznej /  $p < 0,01$  / /tabela 14/. W tym samym czasie aktywność DHG6PA pozostawała niezmienną w korze obu półkul mózgu.

Brak uszkodzenia, a nawet aktywacje cytoplazmatycznych enzymów przeliczony pentozowej we wczesnym okresie po-enoksyjnym, przy równoczesnym obniżeniu oddychania tkanekowego, scharakteryzował wykonanie dodatkowych oznaczeń aktywności ciągu glikolitycznego w homogenatach tkanekowych mózgu u

zwierząt wykazujących znaczne obniżenie wartości zużycia tlenu.

Glikoliza homogenatów /umole kwasu mlekowego /godz/100 mg świeżej tkanki/

Czas po niedotlenieniu	Półkula lewa	Półkula prawa
Bezpośrednio po niedotlenieniu	39 ± 3,81 /3/	35 ± 2,12 /3/
3 godziny	43 ± 2,12 /4/	44 ± 5 /4/
Kontrola	49 ± 3,8 /4/	41 ± 3,74 /4/

Zarówno w 3 przypadkach badanych bezpośrednio po niedotlenieniu, jak i u 4 zwierząt w grupie 3-godzinnej, ponownie stwierdzono znaczne obniżenie zużycia tlenu przez skrawki kory półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej, przy użyciu glukozy jako substratu oddychowego, glikoliza homogenatów nie wykazywała zmian różnicowo w porównaniu z normą, jak i z przeciwległą nieuszkodzoną półkulą mózgu. Nieznaczne obniżenie produkcji kwasu mlekowego w grupie badanej bezpośrednio po niedotlenieniu jest statystycznie nieznaczne w stosunku do kontroli.

#### 4./ Badanie histologiczne i histochemiczne

W grupie 5 zwierząt badanych 3 godziny po niedotlenieniu, tylko u jednego obserwowano wyraźne ogniskowe usz-

kodzenie półkuli mózgu po stronie podwiązanie tętnicy szyj-  
nej wspólnej. Zmiany polegały tu na rozległym ubytku komó-  
rek nerwowych, obejmującym wszystkie warstwy kory, z wyjąt-  
kiem warstw I i II, oraz korę sawoju hipokampa, w obszarze  
unaczynionym przez tętnicę środkową mózgu. Zanikowi komórek  
nerwowych nie towarzyszył odczyn ze strony gleju. W otocze-  
niu rozległego ogniska ubytku komórek nerwowych obserwow-  
ało się szerokie pole z wyraźnymi cechami zwyrodnienia neu-  
ronów o typie tzw. schorzenia ischemicznego, ciężkiego, o  
rzadziej ostrego. W obrębie ogniska i w jego sąsiedztwie  
występowało bardzo znaczne poszerzenie światła naczyń  
krwionośnych oraz wyędrowywanie przez ich ściany obojętno-  
chłonnych leukocytów do tkanki otaczającej /ryc. 8/.

U pozostałych zwierząt w tej grupie nie obserwowano  
wyraźnych uszkodzeń ogniskowych. Występowały natomiast  
wyraźne klasteralizowane, rozsiane ubytki pojedynczych ko-  
mórek nerwowych oraz cechy zwyrodnienia neuronów pod poste-  
cią chromatolizy typowej dla schorzenia ischemicznego i  
ciężkiego /ryc. 9/. Zarówno chromatoliza, jak i ubytki  
komórkowe dotyczyły przede wszystkim komórek nerwowych  
III, V i VI warstwy, kory mózgu oraz dużych neuronów  
jąder podstwy. W żadnym przypadku zmianom dotyczącym neu-  
ronów nie towarzyszył odczyn ze strony <sup>2</sup>stro- czy mikrogle-  
ju. We wszystkich natomiast obserwowano pojedyncze komórki  
nerwowe z cechami tigrolizy w korze mózgu i w jądrach  
podstwy półkuli przeciagłej /ryc. 10/, przy czym natę-  
żenie zmian w tej półkuli było wyraźnie mniejsze.



Obraz histochemiczny półkuli mózgu u zwierzęcie z najbardziej osłabionymi zmianami morfologicznymi odbiegał w sposób istotny od pozostałych przypadków. Obserwowano tu rozległe, warstwowe obniżenie natężenia reakcji enzymatycznej, obejmujące III - VI warstwy kory mózgu oraz warstwę komórek dwupiętrowych zwoju hipokampa, występujące wyłącznie po stronie podwiązania tętnicy szyjnej. Obniżenie reakcji enzymatycznej dotyczyło wszystkich badanych enzymów /SDH, LDH i DHGCP/ i obejmowało zarówno neuropil, jak i większość rozrzuconych pośród niego neuronów /zyc. 11/. W pozostałych przypadkach obserwowano wyraźne w porównaniu z kontrolą, zmniejszenie liczby dużych komórek nerwowych, w głębszych warstwach kory, wykazujących dodatnią reakcję enzymatyczną. Neuropil głębszych warstw kory wykazywał również obniżenie aktywności reakcji enzymatycznej, szczególnie w przypadku SDH i LDH, przy czym natężenie zmian wahało się w szerokich granicach w poszczególnych przypadkach.

We wszystkich przypadkach obserwowano wyraźne wyższe w porównaniu z kontrolą, odsetki formazynowy przy użyciu substratu glukozo-6-fosforanowego, występujący w astrocytach podkorowej istoty białej i głębszych warstwach kory /zyc. 12 /. W przeciwieństwie do jednostronnych w zespole zmian w aktywności enzymatycznej, obserwowanych w komórkach nerwowych i w neuropilu, zaskakowanie glicyowego odsetka DHGCP było zjawiskiem obustronnym. Po stronie przeciwległej do podwiązania tętnicy szyjnej, widoczny wzrost aktywności DHGCP dotyczył jednak wyłącznie astrocytów istoty białej.

Nie obserwowano zmian tego typu w korze mózgu. Zmiany te były obecne w 4 przypadkach na 5 badanych w tej grupie.

Ponadto w 2 przypadkach, w korze półkuli mózgu przeciwległej do podwiązania, stwierdzono wyraźne zmniejszenie liczby komórek nerwowych wykazujących dodatni odczyn enzymatyczny w bursztynianem jako substratem.

W obrazie morfologicznym wszystkich zwierząt/4 doświadczania/ uspionych po 12 godzinach od niedotlenienia, stwierdzono odchylenia od stanu prawidłowego w obu półkulach mózgu, z wyraźnym nasileniem zmian do półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. U 2 zwierząt obecne były rozlane, a u 2 rozsiane ubytki komórek nerwowych w korze mózgu po stronie podwiązania, obejmujące głębokie warstwy kory mózgu w obszarze rozgałęzień tętnicy mózgu środkowej. W 1 przypadku ponadto występował zanik neuronów wzgórza wzrokowego i formacji węchomózgowia. We wszystkich przypadkach zanikowi komórek nerwowych towarzyszyły zmiany zwyrodnieniowe zachowanych neuronów, o cechach tigrolizy typu ischemicznego i ostrego /ryc. 13/. Zmiany te występowały we wszystkich obszarach kory mózgu i jąder podstawy po stronie uszkodzonej, w sposób rozsia-ny, z wyraźną predylekcją do sąsiedztwa okolic, w których znajdowały się ubytki komórek nerwowych. Były one również obecne po stronie przeciwległej do podwiązania, choć miały tu charakter zmian znacznie mniej nasilonych.

W półkach po stronie podwiązania tętnicy szyjnej, uszkodzenia komórek nerwowych towarzyszyły w 3 przypadkach żywy odczyn mikroglejowy, przyjąwszy niekiedy postać typowych guzków neuronoflegicznych. W 1 przypadku obecne były rozlane zmiany o cechach znacznie nasilonego ostrego obrzęku oligodendrogleju /zyc. 14/. Również w 1 przypadku najbardziej nasilonym uszkodzeniem świądnym w tkance nerwowej towarzyszyły zmiany w obrębie naczyń, polegające na znacznych poszerzeniach światła włóknicek i drobnych żył, zaburzeniu struktury śródkomków, przenikania leukocytów obojętnochłonnych przez ściany włóknicek i ich gromadzenie się w tkance.

W obrębie histochemicznych tej grupy czasowej, stwierdzono znaczną równoległość zmian w aktywności badanych enzymów do opisanego powyżej obszaru morfologicznego. W 2 przypadkach z morfologicznie stwierdzonymi rozległymi ubytkami neuronów, w odpowiadających im obszarach kory mózgu, występował rozplony, obejmujący komórki nerwowe i neuropil, zanik aktywności enzymatycznej we wszystkich badanych odczynach, najbardziej wyrażony w reakcji z bursztynianem sodu. Obserwowane zmiany obejmowały głębokie warstwy kory, a w jednym przypadku stwierdzono dodatkowe ognisko ubytkowe we wnętrzu warstwowym /zyc. 15/.

W 2 pozostałych przypadkach zmiany histochemiczne polegały na pogłębieniu obserwowanej i u zwierząt kontro-

lnych, nierównomierności reakcji formazanowej w komórkach piramidowych kory mózgu i w dużych neurocytach prążkowie, gałki bladej i wzgórza.

Zmiany tego samego typu, lecz mniej wyraźne występowały również u wszystkich zwierząt po stronie przeciwległej do podwiązania.

Zwracało uwagę we wszystkich przypadkach, ze skoncetowanie aktywności DHG6P w gleju, przede wszystkim astrogliju, w istocie białej podkorowej po stronie podwiązania tętnicy szyjnej. W tych również przypadkach na tle zanikłej lub obniżonej aktywności enzymatycznej w neuropilu kory mózgu, widoczne były liczne astrocyty wyłożone ziarnami formazanu, jako końcowego produktu reakcji enzymatycznej z G6P jako substratem.

Grupa zwierząt badanych po upływie 24 godzin od niedotlenienia /16 zwierząt/ wykazywała największe bogactwo i zróżnicowanie zmian morfologicznych i histochemicznych w porównaniu z poprzednimi grupami czasowymi. U tych zwierząt, z wyjątkiem jednego, stwierdzono wyraźną lateralizację zmian do strony podwiązanej tętnicy szyjnej.

W 10 przypadkach występowały większe lub mniejsze ogniska o charakterze martwicy niezupełnej, tzn. takiej w której rozpadowi uległy komórki nerwowe, przy zachowanym niezmienionym lub pobudzonym gleju i nieuszkodzonych neoczyniach /rys. 18 /. Stwierdzało się znaczne różnice w rozmiarze ognisk martwicy niezupełnej, chociaż zawsze dotyczyły one obszaru unaczynienia tętnicy środkowej mózgu.

W przypadkach znacznej rozległości, ogniska martwicy obejmowały wszystkie warstwy kory /ryc. 17/, przechodząc na jądra podkorowe, a w jednym przypadku sięgały nawet do śródmózgowia. W innych ograniczały się swoim zasięgiem do głębokich warstw kory, lub warstw III i IV, albo tylko do kory amonowej. Schemat lokalizacji zmian w encefalopatii anoksyjno-ischemicznej po upływie 24 godzin od niedotlenienia przedstawia ryc. 18.

W 3 przypadkach drobne ogniska martwicy niezupełnej występowały również w półkuli przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej.

W większości przypadków w obrębie ognisk martwicy niezupełnej występował żywy odczyn glejowy, przede wszystkim ze strony astrocytów, a w mniejszym stopniu mikrogleju. Jedynie w dwóch przypadkach równoległe z nimi obserwowano zmiany w istocie białej o cechach ostrego obrzęku oligodendrogleju.

W pozostałych 6 przypadkach ubytki komórek nerwowych miały charakter rozsiany z tym, że tu również zmiany o największym natężeniu występowały w obrębie unaczynienie tętnicy mózgu środkowej po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej.

U wszystkich zwierząt, zarówno tych, u których stwierdzono ogniska martwicy niezupełnej, jak i tych, u których występowały rozsiane zlateralizowane ubytki neuro-

nów, jak wreszcie i u jednego bez cech lateralizacji uszkodzenia, obecne były liczne komórki nerwowo z cechami zwyrodnienia o typie schorzenia ischemicznego, ciężkiego, ostrego, a rzadziej homogenizacyjnego. Uszkodzenia komórek były zwykle obustronne, z tym, że liczba komórek uszkodzonych była zawsze większa po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej. Zmiany były tu zazwyczaj rozleglejsze, występowały zarówno w korze mózgu /ryc. 19 /, jak i w obrębie węchemózgowia /ryc. 20/, prążkowie, gałki błędej i wzgórze, podczas gdy po stronie przeciwległej ograniczały się najczęściej do III i IV warstwy kory mózgu i do kory zawoju hipokampa. w jednym tylko przypadku, przy wyjątkowej rozległości ogniska martwicy, stwierdzono rozlane zmiany zwyrodnieniowe neurocytów pnia mózgu i kory móżdżku /ryc. 21/.

Obraz histochemiczny wykazywał pełną równoległość z opisanymi zmianami morfologicznymi. Ogniskom martwicy niepełnej towarzyszył z zaskakującym brakiem reakcji histochemicznej SDH, LDH i DHG6P w neuronach i w neuropilu, z utrzymaną reakcją enzymatyczną w astrogleju /ryc. 22/, a niekiedy nawet /nie we wszystkich przypadkach/ z zaakcentowaną astrocytarną aktywnością DHG6P. Zjawiskiem stosunkowo częstym było utrzymanie się wysokiej aktywności enzymatycznej lub nawet jej nasilenie w otoczeniu ognisk pozabwionych odczynu lub w ich obrębie dookoła naczyń /ryc. 23/. Rzadziej natomiast spotkano obszary rozlanego obniżenia lub całkowitego braku aktywności enzymatycznej w neuropilu,

na którego tle występowały neurocyty z zachowaną aktywnością. Cechą uderzającą w tych przypadkach była nierówno-  
mierność natężenia reakcji histochemicznej w neuronach,  
pogłębiona w stosunku do zwierząt kontrolnych /ryc. 24 i  
25/. To samo zjawisko towarzyszyło rozsianym zwyrodnie-  
niom neurocytów, występującym zarówno w półkuli po stronie  
podwiązanej tętnicy szyjnej, jak i w półkuli przeciwległej  
/ryc. 26/.

We wszystkich przypadkach z wyjątkiem jednego, wy-  
stępowało wyraźne zaakcentowanie odczynu z glukozy-6-fos-  
foranem jako substratem w astrogliu podkorowej istoty  
białej, po stronie podwiązania tętnicy szyjnej /ryc. 27/.  
To samo zresztą zjawisko wystąpiło w 4 przypadkach w reak-  
cji z substratem bursztynianowym i mleczenowym. W nielicz-  
nych natomiast tylko przypadkach wzrost astrocytarnej ak-  
tywności DHGP spostrzegano w istocie białej półkuli móz-  
gu przeciwległej do podwiązania /ryc. 28/.

Umiejscowienie zmian histochemicznych odpowiada-  
ło z zasady lokalizacji uszkodzeń stwierdzonych w bada-  
niach morfologicznych. Równoległość tę najlepiej ilustru-  
je przypadek szczura, u którego zmianom zwyrodnieniowym  
neurocytów, przekraczającym znacznie obszar unaczynienie  
tętnicy środkowej mózgu, a obejmującym również formacje  
pniowe i mózdzek, towarzyszyły głębokie zmiany histochemi-  
czne, występujące w tych strukturach /ryc. 29 i 30 /.

Niewielkie różnice lokalizacyjne w pojedynczych przypadkach odnoszone do różnic bloków tkankowych, pobieranych do jednego i drugiego badania.

### 5./ Omówienie

Zestawienie obserwowanych zmian biochemicznych, histologicznych i histochemicznych pozwala na wyodrębnienie w rozwoju encefalopatii ischemiczno-anoksyjnej dwóch okresów: wczesnego, reprezentowanego w naszym materiale przez zwierzęta badane do 3 godzin po niedotlenieniu i późnego, obejmującego zmiany występujące u zwierząt w 12 i 24 godziny po niedotlenieniu.

Okres wczesny charakteryzują zaburzenia oddychania tkankowego, dotyczące wyłącznie półkuli po stronie podwiązania tętnicy szyjnej. Zmniejszeniu zużycia tlenu przez skrewki kory mózgowej z półkuli poddanej działaniu czynnika ischemiczno-anoksyjnego nie towarzyszą jednak zmiany w aktywności glikolitycznej homogenatów, a aktywność dehydrogenaz związanych z cyklem pentozowym, głównie DHG6P, ulega obustronnie, statystycznie znaczącemu podwyższeniu w porównaniu z kontrolą.

Zerówno wyniki badań aktywności enzymów cyklu pentozowego, jak i badanie ciągu glikolitycznego wskazują, że we wczesnym okresie rozwoju zmian ischemiczno-anoksyjnych, w modelu Levina, wybiórczemu uszkodzeniu ulega oddychanie



tkankowe na poziomie cyklu Krebsa lub łańcucha oddechowego, bez współistniejącego obniżenia aktywności badanych enzymów cytoplazmatycznych.

Zmianom biochemicznym towarzyszą dyskretne nieprawidłowości histologiczne i histochemiczne tkanki nerwowej, występujące niemal wyłącznie w postaci rozsianych ubytków i zwyrodnień komórek nerwowych. Mimo wyraźnych cech lateralizacji zmian do strony półkuli poddanej działaniu czynnika ischemiczno-anoksyjnego, podobne nieprawidłowości są mniej nasilone występują w półkuli przeciwległej, znajdującej się wyłącznie pod wpływem niedotlenienia. Obraz histochemiczny sugeruje, że za aktywację DHG6P, odpowiedzialne są w głównej mierze komórki glejowe, wykazujące bardzo znaczny wzrost odczynu formezenowego z gluko-6-fosforem jako substratem.

Okres późny charakteryzuje się pełnym rozwojem zmian wstecznych w półkuli poddanej łącznemu działaniu niedotlenienia i niedokrwienia, wyrażających się morfologicznie obecnością ognisk martwicy zupełnej, lub niezupełnej z przetrwałymi elementami glejowymi i łącznotkankowymi, którym towarzyszy zwyrodnienie komórek nerwowych w obszarach sąsiadujących.

W związku ze zmienną gradacją występujących uszkodzeń, w grupie tej obserwowano różnorodny obraz morfologiczny i histochemiczny, typowy dla encefalopatii anoksyjno-ischemicznej.

Zmiany morfologiczne i histochemiczne w półkuli przeciwległej do podwiązania tętnicy szyjnej, obserwowano już w okresie wcześniejszym, w grupie późnej są znacznie bardziej wyrażone.

Obraz zmian biochemicznych odpowiada uszkodzeniom tkankowym, obserwowanym w badaniach mikroskopowych. Duża różnorodność nasilenia zaburzeń tlenowego metabolizmu tkanki, odpowiada wahaniom w rozległości zmian morfologicznych u poszczególnych zwierząt. Istotną zmianą biochemiczną w porównaniu z okresem wczesnym jest wyraźne, statystycznie znaczne obniżenie aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy. Obniżenie to niewątpliwie związane jest z rozwojem ognisk martwiczych w tkance, któremu towarzyszy zanik aktywności enzymycznej. Z uwagi na fakt, że aktywność dehydrogenaz pentozowych związana jest przede wszystkim z populacją komórek glejowych, na co wskazują badania przeprowadzone we wstępnej części pracy, oraz ze względu na znaną większą oporność gleju na niedostatek tlenu - obniżenie aktywności DHG6P pod wpływem niedotlenienia nie przybiera dużych rozmiarów jednakże osiąga wartości statystycznie znaczne.

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że w obu okresach rozwoju encefalopatii anoksyjno-ischemicznej mimo bardzo znacznego niekiedy spadku zużycia tlenu przez skrawki kory, pochodzące z półkuli po stronie podwiązanej

tętnicy szyjnej /z wyjątkiem dwóch przypadków/ utrzymena była pobudliwość metaboliczna tkanki na zwiększone stężenie jonów potasu.

Mniejszą stosunkowo liczbę przypadków z głębokimi zaburzeniami oddychania tkankowego w grupie 12 - 24 godzinnej, w porównaniu z grupą badaną po upływie 3 godzin od niedotlenienia, tłumaczyć należy zapewne faktem, że w okresie między 3 - 12 godziną po niedotlenieniu padały zwierzęta z cięższymi uszkodzeniami mózgu. Można by przyjąć, że okres krytyczny, przypadający na wyżej wymieniony przedział czasowy, przeżywały głównie zwierzęta z lżejszymi uszkodzeniami układu nerwowego.

#### IV. Uzupełniające badanie in vitro

- 1./ Wpływ warunków inkubacji skrawków tkankowych OUN na oddychanie i pobudliwość metaboliczną pod wpływem zwiększonego stężenia jonów potasowych.

Biorąc pod uwagę fakt, że w encefalopatii anoksyjno-ischemicznej na rozwój obserwowanych zmian w tlenowym metabolizmie glukozy, mogły rzutować jednocześnie niedostatek tlenu i brak substratu /glukozy/, przebadano, w doświadczeniach in vitro, wpływ podobnych warunków na oddychanie skrawków tkankowych pochodzących z różnych okolic mózgu szczura.

Tabela 15

WPLYW OKRESOWEGO BRAKU TLENU I GLUKOZY  
NA ODDYCHANIE SKRAWKÓW MÓZGU SZCZURA  
( $Q_{O_2} = \mu l O_2 / \text{godz} / \text{mg} \text{ św. tkanki} \pm SD$ )

Części OUN	Kora		Mózdzek		Śródmózgowie		Pień mózgu	
	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM	6 mM	98 mM
Kontrola substrat-10mM gluk atmosfera powietrza	1,26±0,12 (10)	1,69±0,17 (10)	1,12±0,11 (6)	1,47±0,06 (6)	1,11±0,13 (6)	1,24±0,11 (6)	0,74±0,11 (6)	0,76±0,09 (6)
Brak substratu egzogenego	1,18±0,08 (5)	1,11±0,11 (5)	0,95±0,07 (5)	0,85±0,09 (5)	0,93±0,10 (5)	0,91±0,09 (5)	0,75±0,06 (5)	0,71±0,07 (5)
Warunki kontrolne po 30' preinkubacji bez substratu	1,08±0,07 (4)	0,97±0,14 (5)	0,89±0,05 (4)	0,95±0,19 (4)	0,84±0,06 (4)	0,81±0,09 (4)	0,66±0,03 (4)	0,62±0,06 (4)
Warunki kontrolne po 30' preinkubacji w atm. N <sub>2</sub>	0,95±0,07 (8)	0,96±0,07 (8)	0,88±0,14 (7)	0,69±0,09 (7)	0,76±0,06 (7)	0,70±0,04 (7)	0,41±0,05 (7)	0,39±0,07 (7)

W nawiasach podano liczbę doświadczeń.  
Zużycie tlenu oznaczono przez okres 30 min.

W układzie kontrolnym skrawki tkankowe inkubowano w zmodyfikowanym medium Krebsa-Ringera /vide metodyka/ w obecności 10 mM glukozy w atmosferze powietrze, uwzględ-  
niając wysokie i niskie stężenie jonów potasu. Obserwowa-  
no wzrost zużycia tlenu przez skrawki kory mózgu i mózdz-  
ka w obecności wysokich stężeń jonów potasu, a więc efekt  
opisany dokładnie w rozdziale 1.

W następnych doświadczeniach skrawki mózgu inkubowano w środowisku nie zawierającym glukozy przez okres 30 minut. W tych warunkach nie obserwowano stymulującego wpływu wysokich stężeń potasu na oddychanie. Dodanie po 30 minutach do powyższego układu doświadczalnego glukozy /20 mM nie zmieniło zasadniczo wartości zużycia tlenu przez skrawki tkankowe, zarówno w wysokich jak i niskich stężeniach jonów potasu.

W następnym układzie doświadczeń, skrawki mózgu preinkubowano w warunkach beztlenowych przez okres 30 minut w typowym medium inkubacyjnym, w obecności 10 mM glukozy oraz wysokich i niskich stężeń jonów potasowych. Po wymianie fazy gazowej naczynka Warburga z szotu na powietrze, badano zużycie tlenu przez skrawki tkankowe przez następnych 30 minut. Obserwowano nieznacznie obniżenie wartości zużycia tlenu przez skrawki w środowisku zawierającym niskie stężenie jonów potasu w porównaniu z odpowiednimi wartościami w oznaczeniach kontrolnych. Wartości zużycia tlenu w środowisku zawierającym wysokie stężenie jonów potasowych były znacznie bardziej obniżone w stosunku do wartości kontrolnych i nie różniły się zasadniczo od oddychania skrawków tkankowych badanych w niskich stężeniach jonów potasu /tabela 15/.

2./ Wpływ warunków inkubacji skrawków kory mózgowej na aktywność dehydrogenaz związanych z cyklem pentozowym.

W tej serii doświadczeń, przebadano wpływ określonych warunków inkubacji na aktywność DH-az związanych z cyklem pentozowym.

Inkubacja skrawków kory mózgu w środowisku Krebsa-Ringera w obecności 10 mM glukozy przez okres 1 godziny w 37°C, spowodowała wzrost aktywności DHG6P średnio o 25 % w porównaniu z kontrolą. W tym układzie doświadczalnym kontrolą była aktywność enzymatyczna w skrawkach kory świńsko pobranych od zwierzęcia, zawieszonych w płynie inkubacyjnym i następnie, po przepłukaniu, przygotowanych do oznaczeń enzymatycznych zgodnie z podaną metodyką.

Tabela 16

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ CYKLU PENTOZOWEGO W SKRAWKACH KORY MÓZGOWEJ SZCZURA POD WPŁYWEM RÓŻNYCH WARUNKÓW INKUBACJI ( 60 min w temp. 37°C )

Warunki doświadczenia	Kontrola skrawki nieinkubowane	Medium Krebsa - Ringera		Medium Krebsa - Ringera z 10 mM glukozą			Medium Krebsa - Ringera	
		—	+2,5 mM ATP	—	w atmosf. N <sub>2</sub>	+2,5 mM ATP	+10 mM fruktoza	+10 mM bursztynian
Aktywność specyficzna DH-G6P dOD <sub>340</sub> /min/mg b. tga ±SD	36 ± 2,41 (5)	35 ± 0,81 (6)	32 ± 0,0 (3)	44 ± 2,72 (5)*	45 ± 1,73 (5)*	42 ± 2,37 (3)*	30 ± 5,96 (6)	30 ± 4,8 (5)
DH-6PGA	11 ± 1,71 (12)	10 ± 1,61 (12)		11 ± 3,1 (12)				

\* p < 0,01 w stosunku do kontroli  
w nawiasach podano liczbę doświadczeń

Dalsze doświadczenie wykazały, że zarówno godzinna inkubacja skrawków tkankowych w roztworze Krebsa-Ringera bez glukozy, jak i inkubacje w obecności fruktozy i bursztynianu /stężenie 10 mM/, nie wywierały wpływu na aktywność DHG6P w inkubowanych skrawkach. Inkubacje skrawków w warunkach beztlenowych, jak i obecność w środowisku inkubacyjnym egzogennej ATP w stężeniu 2,5 mM, nie wywierały zmian w aktywności DHG6P, jak również nie modyfikowały wpływu glukozy na aktywność tego enzymu. Obecność glukozy w środowisku inkubacyjnym /w stężeniu 10 mM / pozostawała bez wpływu na aktywność dehydrogenazy kwasu 6-fosfo-glikonowego, której wartości, po 1 godzinie inkubacji skrawków, nie różniły się od kontroli /tabela 16/.

### 3./ Oddychanie i oksydacyjne fosforylacje frakcji mitochondrialnej mózgu w obecności egzogennej kwasu 6-fosfoglukonowego.

Obserwowany wzrost aktywności pierwszego enzymu cyklu pentozowego, przy braku znamiennych różnic w aktywności następnego enzymu tego cyklu, występujący w wyniku preinkubacji tkanki w środowisku zawierającym glukozę, sugerował możliwość akumulacji pośredniego produktu tej przemiany, kwasu 6-fosfoglukonowego. Opierając się na danych z piśmiennictwa postanowiono przebadać wpływ tego związku na oddychanie i fosforylacje frakcji mitochondrialnej mózgu, z bursztynianem i glutaminianem jako substratami oddechowymi.

Tabela 17

WPLYW KWASU 6-FOSFOGLIKONOWEGO  
NA FOSFORYLACJĘ I ODDYCHANIE  
FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ Z MÓZGU SZCZURA

Substrat oddechowy	Lp.	- 6PGA		+ 6PGA (3mM)	
		RCI *	ATP/O **	RCI *	ATP/O **
Bursztynian 10 mM	1	2,2	1,62	2,1	1,74
	2	2,1	1,60	2,2	1,63
Glutaminian 20 mM	1	2,4	2,6	2,4	2,5
	2	1,6	2,7	2,8	2,34
	3	1,9	2,54	2,4	2,3
	4	2,2	—	2,6	—

RCI \*      index kontroli oddechowej

$$ATP/O^{**} = \frac{\mu \text{ molc ATP}}{\mu \text{ atomów } O_2}$$

Określono wskaźnik kontroli oddechowej /stosunek szybkości zużycia tlenu przez mitochondria fosforylujące, do szybkości zużycia tlenu w warunkach braku egzogenego ADP w meium / oraz stopień sprzężenia fosforylacji nukleotydów adeninowych ze zużyciem tlenu czyli tzw. stosunek ATP/O. W obu oznaczeniach nie wykazano istotnych różnic



między kontrolną grupą doświadczeń /mitochondria inkubowane w środowisku nie zawierającym kwasu 6-fosfoglikonowego/, a grupą doświadczelną w której dodano ten związek do środowiska w stężeniu 3 mM.

## DYSBALISJA

Różnorodność obrazu zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w następstwie niedotlenienia, różnice topografii i struktury uszkodzeń w zależności od typu niedoboru tlenu /24, 83, 94 /, stopnie zróżnicowania i dojrzałości tkanki nerwowej /13, 72, 116 /, wręcz istnienie zjawiska tzw. wybiórczej wrażliwości pewnych struktur ośrodkowego układu nerwowego na niedotlenienie wskazują, że o ostatecznym charakterze zmian pośmiertnych, poza podstawowym czynnikiem, jakim jest zmniejszenie dopływu tlenu do tkanki nerwowej, decyduje szereg charakterystycznych dla niej, dodatkowych cech strukturalnych, czynnościowych i metabolicznych.

Nasze badania dotyczące oddychania tkankowego, jego stymulacji pod wpływem podwyższonych stężeń jonów potasu i aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym, wykazały znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi strukturami ośrodkowego układu nerwowego.

Zużycie tlenu przez poszczególne okolice mózgowia świnki morskiej i szczura, odniesione do względnej gęstości komórkowej w danej okolicy ośrodkowego układu nerwowego, wykazały wysoki metabolizm tlenu glukozy w korze mózgu, przewyższający znacznie oddychanie skrawków pochodzących ze śródmózgowia, pnia mózgowego i mózdzka.

Na podstawie omówionych poniżej badań pobudliwości metabolicznej tkanki-, można przyjąć, że za oddychanie tkankowe pnia mózgowego w przeciwieństwie do kory mózgu i mózdzku odpowiedzialne są w znacznej mierze elementy nie-neuronalne /brak cech pobudliwości chemicznej/. Wobec niższych wartości zużycia tlenu przez mózdzek niż przez pień mózgowy /w przeliczeniu na względną gęstość komórkową/wy- daje się, że neurony mózdzku cechują się niższym metaboliz- mem tlenowym od elementów komórkowych, odpowiedzialnych za stopień zużycia tlenu przez skrewki pnia mózgowego.

Podobny do przedstawionego powyżej rozkład aktywności od- dechowej pomiędzy korą mózgu i mózdzkiem oraz istotą białą u psa, kota, królika i człowieka otrzymano w swoich ba- daniach Elliot i Heller /44/ oraz Ridge /115/. Wartości zu- życia tlenu przez poszczególne okolice mózgu informują po- średnio o ich metabolicznie energetycznym, prowadzącym przez szlak Krebsa-Meyerhofa, cykl Krebsa i łańcuch odde- chowy. Wskazują one na znacznie żywszy metabolizm tlenowy struktur szarych niż białych i tzw. formacji nieszonych, takich np. jak pień mózgu.

Równolegle przeprowadzono ocenę wartości zużycia tlenu przez zektywizowaną metabolicznie tkankę nerwową, pochodzącą z tych szarych okolic mózgu dla których uprzed- nie określano oddychanie spoczynkowe.

Zwiększenie stężenia jonów potasu, prowadzące do zmian polaryzacji błon komórek nerwowych /63 /, wywiera stymulu-

jący wpływ na tlenowy metabolizm glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym /7, 39, 57 /. Tym właśnie modelem posłużono się do oceny czynnościowego wzrostu zużycia tlenu przez tkankę nerwową.

Stwierdzony przez nas efekt stymulacji oddychania tkanekowego pod wpływem podwyższonego stężenia jonów potasu wykazywał charakterystyczny rozkład topograficzny w mózgu, uwarunkowany bogactwem komórek nerwowych w strukturze morfologicznej danej okolicy. Najwyższą pobudliwość metaboliczną wykazywały skrawki tkanekowe kory mózgu i mózdzku, znacznie niższy efekt stymulacyjny obserwowano w śródmózgowiu, a jego całkowity brak występował w móżdżku i rdzeniu przedłużonym.

Stymulujące działanie potasu należy wiązać bezpośrednio z pobudzeniem metabolizmu tlenowego glukozy w komórkach nerwowych. Mechanizm tej stymulacji, związany ze zjawiskami przepuszczalności błon komórkowych, ma charakter regulacyjny i nie występuje w przypadku izolowanej frakcji mitochondrialnej /21, 93 /<sup>x/</sup> Stymulującego oddychanie efektu podwyższonych stężeń potasu nie wykazują niepobudliwe elementy tkanki nerwowej - osłonki mielinowe, glej, naczynia /57, 115 /. Stąd wydaje się, że brak stymulacji metabolicznej oddychania w pniu mózgu wskazuje na przesagę w

---

<sup>x/</sup> Zgodnienie związku pomiędzy regulującym metabolizmem glukozy efektem jonów potasu, funkcją neuronów, strukturą błon komórek pobudliwych, jako niezwiązane bezpośrednio z tematem pracy zostało w dyskusji pominięte.

jego utkaniu elementów niepobudliwych - włókien nerwowych, osłonek mielinowych, gleju, než komórkami nerwowymi.

Aktywność DHG6P i DHGPGA, enzymów determinujących wejście glukozy do przemian w cyklu heksosomonofosforanowym, wykazuje również charakterystyczne różnice rozkładu pomiędzy badanymi okolicami ośrodkowego układu nerwowego. Zerówno u szczurów jak i u świńek morskich pozostaje ona w ujemnej korelacji z aktywnością oddechową danej okolicy. Spośród badanych struktur najwyższą aktywność stwierdzono w rdzeniu przedłużonym i mózdku, a najniższą w korze mózgu. Stwierdzenie maksymalnej aktywności DHG6P w istocie białej podkorowej, a więc strukturze nie zawierającej komórek nerwowych, wskazuje na związek aktywności enzymatycznej dehydrogenaz cyklu pentozowego przede wszystkim z populacją komórek glejowych. Popierają to również nasze obserwacje histochemiczne, wykazujące żywą aktywność DHG6P w gleju istoty białej podkorowej, które w warunkach przewidzianych zlokalizowane jest przede wszystkim w oligodendrocytach. Odczyn z G6P jako substratem jest najwyższą glejową reakcją histochemiczną w warunkach tkanki nieuszkodzonej. Lowry /68/ w badaniach cytoenzymatycznych, prowadzonych na izolowanych neuronach i komórkach glejowych, wykazał również wyraźne zróżnicowanie pomiędzy nimi, dotyczące enzymów cyklu Krebsa i pentozowego, przy braku różnic w specyficznej aktywności enzymów glikolitycznych. Stwierdził on, że komórki glejowe i włókna nerwowe charakteryzuje wyższe niż neurony aktywność DHG6P i DHGPGA.

Podobnie Friede /48, 49 / wykazał istotne różnice w aktywności enzymów oddechowych /SDH/ i enzymów cyklu pentozowego /DHG6P/ pomiędzy istotą białą i szarą mózgu. Obserwował on wprowadzając 3-krotnie większe różnice w aktywności SDH niż w aktywności enzymów cyklu pentozowego, jednakże w przypadku wszystkich enzymów aktywność kory przewyższała aktywność istoty białej. Wyniki Friedego /49/ są sprzeczne z naszymi spostrzeżeniami, wg. których aktywność enzymatyczna DHG6P w istocie białej jest dwukrotnie wyższa niż w korze mózgu. Wydaje się, że różnice te wynikają z odmiennych przeliczeń wyników. W naszych badaniach aktywność enzymatyczną określaliśmy w odniesieniu do stężenia białka w badanej frakcji, natomiast Friede wyraził ją w przeliczeniu na wilgotną masę tkanki. Różnice w sposobie wyrażenia aktywności enzymatycznej są szczególnie ważne w badaniu istoty białej, gdzie znaczna ilość nieaktywnych enzymatycznie elementów tkankowych, takich jak osłonki mielinoce, obniża znacznie wartości otrzymanych wyników. Potwierdzeniem tego są między innymi badania Buella i wsp. /25/, który wyrażając aktywność enzymatyczną w badanych frakcjach w przeliczeniu na suchą wagę tkanki, poprzednim usunięciem komponenty lipidowej, wykazał najwyższą aktywność DHG6P w mielinizowanych strukturach tkanki nerwowej nie zawierających komórek nerwowych. Badania innych enzymów cyklu pentozowego /transketolase/ wykazały również ich dwukrotnie wyższą aktywność w istocie białej niż w korze mózgu /40-41/.

Przebieg pentozowy jest prawdopodobnie procesem, nieodgrywającym większej roli w metabolizmie energetycznym komórki /119/. Natomiast wytworzony w reakcji utlenienia G6P, zredukowany fosforan nukleotydu dwasfosfopirydynowego, służy jako główny dawca elektronów w procesach wielu syntez wewnątrzkomórkowych, w tym w syntezie kwasów tłuszczowych i cholesterolu /75, 79, 151/. W związku ze znaną wieloletnią funkcją komórek oligodendroglu, zrozumiałe jest zachodzący w nich aktywny proces produkcji zredu. NADP, którego podstawowym źródłem w mózgu, w związku z reakcją transdehydrogenaz zredu.NAD/NADP /111/, wydaje się być dwie pierwsze reakcje utlenienia fosforanów heksoz w cyklu pentozowym.

W tym świetle staje się jasne przebieg aktywności enzymów cyklu pentozowego w formacjach białych i jej związek z populacją komórek glialnych.

Porównując uzyskane przez nas dane, ze znanymi różnicami wrażliwości poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego na niedostatek tlenu /98/, stwierdza się wyraźną różnicę wrażliwości tej wrażliwości z intensywnością oddychania tkanekowego, które z kolei związane jest przede wszystkim z obecnością komórek nerwowych. Struktury mało wrażliwe na niedostatek tlenu charakteryzuje niskie oddychanie tkanekowe, niski efekt stymulujący metabolizm tlenowy, wysierany przez jony potasu, oraz wysoka aktywność

enzymów cyklu pentozowego, przede wszystkim dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.

Przyjmując w uproszczeniu, na podstawie naszych badań i spostrzeżeń innych autorów, że za intensywne oddychanie tlenkowe ośrodkowego układu nerwowego odpowiedzialne są komórki nerwowe, a za aktywność enzymów cyklu pentozowego przede wszystkim komórki gwałtowne, o stopniu wrażliwości danej struktury OUN, jako całości decydują proporcje populacji neuronów i gwałtownych. Nie rozstrzyga to oczywiście zagadnienia na poziomie histologicznym. Wiadomo jest bowiem, że pewne części kory mózgu, jak np. sektor Somera kory smocznej, lub nawet jej warstwy - np. warstwa III, wykazują większą wrażliwość na niedotlenienie niż jej pozostałe obszary i części. Nawet w naszych doświadczeniach stwierdziliśmy dość istotne odstępstwa od tej prawidłowości występujące w mózgu, którego skrawki wykazywały niskie zużycie tlenu /w przeliczeniu na względną gęstość komórek / oraz wysoką aktywność enzymów cyklu pentozowego, a więc cechy tkanki niewrażliwej na niedobór tlenu.

Składnią zaś znana jest wysoka, wybiórcza wrażliwość kory mózgu na niedotlenienie. Stwierdziliśmy tu jednak bardzo znaczny efekt stymulujący metabolizm tlenowy pod wpływem wzrostu stężenia jonów potasu.

Odczytano wyniki można, jak się wydaje wiązać ze zróżnicowaniem komórek nerwowych kory mózgu. Dominujące ilościowo komórki warstwy ziarnistej stanowią jeden z najstarszych filogenetycznie elementów ośrodkowego układu nerwowego /46/ i wykazują histochemiczne cechy, smionujące ko-



ności o niskim metabolizmie tlenowym, podczas gdy komórki Purkiniego, najwrażliwsze na niedotlenienie, o zwłaszcza ich dendryty - charakteryzuje wysoki metabolizm tlenowy. Globalne wartości oddychania tkanki są wypadkową metabolizmu jej różnych składników komórkowych, w danych przypadku komórek Purkiniego i komórek ziarnistych, oraz innych elementów strukturalnych mózdku. Na podstawie naszych spostrzeżeń, dotyczących właśnie mózdku, wydaje się, że o wrażliwości tkanki na niedotlenienie świadczy bardziej stymulowane niż spoczynkowe zużycie tlenu. Stanowi ono bowiem wykładnik czynnościowego zapotrzebowania na tlen. Liczne obserwacje, głównie patomorfologiczne, wskazują, że istotnym czynnikiem decydującym o wrażliwości komórek nerwowych na niedotlenienie jest ich stan czynnościowy, prowadzący zarówno do wzrostu ich zapotrzebowania na tlen, jak i na substraty oddechowe. W ośrodkowym układzie nerwowym istnieje szereg mechanizmów, stwarzających możliwość zaspokojenia czynnościowo zwiększonego zapotrzebowania tkanki. Związane są one przede wszystkim z charakterem sieci naczyńowej [81] oraz czynnikami regulującymi przepływ krwi [74, 111]. Dopiero przy ich zakłóceniu dochodzi do onkocytowych uszkodzeń, na zewnątrz tzw. zjawisko anoksji konsumpcyjnej, opisanej przez Scholze [120]. Czynnościowo pobudzone komórki nerwowe mogą ulec wybiórczemu uszkodzeniu w warunkach obniżonej podaży tlenu, wskutek szybszego wyczerpania energetycznego.

Zastosowany przez nas dobór modeli doświadczalnych pozwolił na ocenę następstw metabolicznych i strukturalnych zarówno krótkotrwałego /model anoksji prostej/ jak i przedłużonego /model anoksyjno-ischemiczny- półkula przeciwnie do podwiązania tętnicy szyjnej/ niedotlenienia oraz efektów przedłużonego niedotlenienia, skojarzonego z upośledzonym krążeniem mózgowym /model anoksyjno-ischemiczny - strona podwiązanej tętnicy/.

Obserwacje nasze wskazują, że zarówno krótkotrwałe jak i przedłużone hypoksje, bez współistnienia dodatkowego niedokrwienia nie prowadzi do trwałych zaburzeń metabolicznych, ani rozległych, nieodwracalnych <sup>uszkodzeń</sup> morfologicznych, ponieważ, że już po upływie 3 minutowej anoksji, stwierdzono głębokie zaburzenie bioelektryczne, oraz 4-krotny wzrost zawartości kwasu mlekowego w tkance nerwowej. U zwierząt tych, po reanimacji nie występowały jednak żadne zmiany kliniczne, a biochemicznie nie stwierdziło się ani zaburzeń w oddychaniu tkanekowym skrawków, ani też upośledzenia stymulacji metabolicznej pod wpływem podwyższonego stężenia jonów potasu, zarówno we wczesnym jak i w późniejszym okresie po niedotlenieniu. W obrębie morfologicznym tych przypadków spostrzeżono jedynie rozsiane wyrodnienie komórek nerwowych, wykazujące znaczoną postępującą topograficzną, zgodną z ogólnie przyjętymi danymi o wybiórczej wrażliwości neuronów. Zniony to, wyrażone w przypadkach przedłu-

łonego niedotlenienia, znajdowały swój wyraz histochemiczny w obniżeniu aktywności enzymatycznej dehydrogenas, przede wszystkim bursztynianowej, w komórkach nerwowych neuropilu. Nie miały one jednak odbicia w biochemicznej analizie tlenowego metabolizmu glikozy. Podobnie zresztą jak w przypadku badań Bernelli-Sessera i wsp. /45/, który nie stwierdził w mózgu szczurów poddanych hypoksji, zaburzeń glikolitycznej przemiany tkankowej, ani też przemiany w cyklu Krebsa.

Znacznie większe zmiany patologiczne obserwowano w tkance nerwowej u zwierząt, u których niedotlenienie poprzedzono jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej. W większości przypadków tej grupy obserwowano rozległe uszkodzenie tkanki nerwowej po stronie podwiązanej tętnicy, których charakter i natężenie wykazywały znaczne różnice osobnicze i zależność od czasu badania po niedotlenieniu. Zmiany te w okresie wczesnym wyrażały się wyrodnieniem neuronów, po upływie 24 godzin miały charakter rozległych ognisk martwicy selektywnej, rzadziej martwicy zupełnej, obejmujących obszary unaczynienia tętnicy mózgu środkowej. Nieprzewidywalność histologicznych towarzyszących zmian w obrębie histochemicznej tkanki, wyraźne jednak dopiero po upływie 12 godzin od niedotlenienia, choć uchwytne już po 3 godzinach. Występowały tu również wyraźne i wczesne zaburzenie oddychania tkankowego, wyprzedzające w czasie różny uchwytne zmian w obrębie morfologicznej tkanki. Nasilenie zaburzeń oddychania tkankowego struktur było różne i sele-

śało prawdopodobnie od rozległości i natężenia uszkodzenia tkanki. Należy przy tym podkreślić, że zarówno w okresie wczesnym, jak i w późniejszym, utrzymena była zawsze, charakterystyczne dla komórek nerwowych, zdolność do metabolicznego reagowania na stymulujące działanie jonów potasu. Charakterystyczne była pełna równoległość wielkości efektu stymulującego jonów potasu do wartości spoczynkowego oddychania skrawków. Wyraziła się ona tym, że w przypadkach obniżonego oddychania tkankowego, /w półkuli mózgu uszkodzonej przez skojarzone działanie czynnika snoksyjno-ischemicznego/, bezwzględne wartości zużycia tlenu w medium bogotopotasowym były niższe niż w kontroli, ale procentowy przyrost zużycia tlenu w stosunku do oddychania spoczynkowego był identyczny. Zmieszenie stymulującego efektu jonów potasu obserwowano się jedynie w dwóch przypadkach o największym w całym materiale uszkodzeniu oddychania.

Obserwacje nasze wskazują, że w zastosowanych warunkach doświadczalnych, mimo obniżenia oddychania tkankowego, pobudliwość metaboliczna neuronów zostaje zachowana. Przemawia za tym procentowo identyczny przyrost zużycia tlenu przez skrawki kory mózgu, wykazujące zarówno przewidziane jak i obniżone spoczynkowe oddychanie tkankowe. Globalne wartości, zarówno oddychania tkankowego kory /niższe u zwierząt niedotlenionych w modelu snoksyjno-ischemicznego/, jak i stymulacji metabolicznej - są wypadko-

wą metabolizmu zachowanych przewidzianych i uszkodzonych w różnym stopniu neuronów; na jego poziom w sposób zasadniczy rzutuje proporcje zanikłych i przetrwałych komórek nerwowych.

W związku z powyższym nosowa się przypuszczenie, że w uszkodzonych obszarach kory mózgu zachowana zostaje zawsze pewna, mniejsza lub większa, populacja niezalicyonowanych komórek nerwowych. Potwierdzą to spostrzeżenia histologiczne i histochemiczne, zwłaszcza w późnych okresach poenokajjnych, z rozwiniętymi już ogniskami selektywnej martelicy.

W dwóch wspomnianych powyżej przypadkach najcięższego uszkodzenia metabolizmu tlennego tkanki we wczesnym okresie poenokajjnym, kiedy na podstawie obrazu histologicznego i histochemicznego trudno jest mówić o zaniku komórek nerwowych, mogą zapewne do czynienia z ciągłym, wybiórczym uszkodzeniem procesów oddychania całej populacji neuronalnej z jednoczesnym zmniejszeniem zjawiska pobudliwości metabolicznej.

Zbyt mały materiał oraz nie zastosowanie właściwych metod badawczych nie pozwala jednak na wykluczenie zaniku efektu stymulacyjnego przy zachowanym oddychaniu spoczynkowym części neuronów. Możliwość taką sugerują badania Quastela /111/, Nakazawy /101/, Swensona /128/, którzy podkreślają większą wrażliwość zjawiska pobudliwości na działanie czynników szkodliwych.

Zupełnie inny obraz zniszczenia obserwowano w tkance poddanej niedotlenieniu w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że zarówno inkubacja skrawków w środowisku beztlenowym, jak również pozbowiona egzogennej glukozy, prowadzi do całkowitego zniesienia efektu stymulującego jonów potasu przy zachowanych, nieszmienionych lub tylko nieznacznie obniżonych w stosunku do kontroli wartościach oddychania spożyczkowego.

Wydaje się, że zmiany w błonie komórkowej, leżące u podłoża obserwowanego zaniku pobudliwości metabolicznej skrawków inkubowanych *in vitro*, mogą być wywołane niedoborem ATP i CrP, niezbędnych do utrzymania prawidłowej struktury błony. Zaburzenie tych procesów energetycznych występuje zapewne w okresie beztlenowej lub bezzubstratowej inkubacji, przy czym mogą one mieć charakter zarówno odwracalny jak i nieodwracalny. Podstawowa czynnikowa decydująca o odwracalności lub nieodwracalności zjawiska jest czas działania czynnika uszkadzającego.

Cohen /30, 31 / obserwował nieodwracalne zaburzenie energetycznego metabolizmu skrawków inkubowanych przez 40 minut w warunkach beztlenowych i wykazał równocześnie uszkodzenie struktury mitochondriów oraz spadek poziomu ATP i CrP w okresie niedotlenienia. Po reoksygencji skrawki charakteryzowały się nadal obniżeniem poziomu ATP do 50-50% wartości kontrolnej oraz wybitnie zmniejszonymi ułożonymi się nieorganicznego fosforu do ATP.

Podobne zmiany w mitochondriach<sup>d</sup> komórek nerwowych siatkówki /5, 138 /, inkubowanych w warunkach beztlenowych in vitro, obserwowali inni autorzy, podkreślając ich względną odwracalność, uzależnioną czasem trwania inkubacji w warunkach szkodliwych.

Interesujące w tym zakresie są obserwacje Svenssona /128/, który prowadząc beztlenową inkubację skrawków tkanki nerwowej przez 30 minut, w warunkach zbliżonych do stosowanych przez nas, nie stwierdził jednak trwałego uszkodzenia zarówno produkcji związków wysokoenergetycznych, jak również procesów aktywnego transportu jonów sodu i potasu przez błony komórkowe. Obserwował on natomiast zjawisko zmniejszenia pobudliwości elektrycznej skrawków. W badaniach tych<sup>n</sup> bardziej interesujące jest oddzielenie efektu utraty pobudliwości elektrycznej przez skrawki poddane działaniu hypoksji "in vitro", od zjawisk związanych z energetyką komórki i z transportem jonowym; te ostatnie wykazywały większą odporność na niedotlenienie.

W obserwacjach naszych stwierdzono niewielkie różnice w zachowaniu się tkanki inkubowanej w warunkach niedotlenienia i przy nieobecności egzogennej glukozy. W wyniku 30 min. inkubacji skrawków w warunkach beztlenowych obserwowano współistnienie zmniejszenia pobudliwości metabolicznej skrawków z nieznaczny*m* zaburzeniem oddychania spoczynkowego. Uszkodzenie oddychania spoczynkowego w środowisku

niskopotasowy / najwyraźniej zmniejszało się w opuszce, gdzie uległo obniżeniu o około 50%. Pozostałe części układu nerwowego nie wykazywały tak znacznego spadku oddychania spoczynkowego. W doświadczeniach prowadzonych przy okresowym braku glukozy w medium szybko zanik pobudliwości metabolicznej skrawków bez towarzyszącego obniżenia oddychania spoczynkowego, wydaje się wskazywać na pewną niezależność procesów produkcji energii i pobudliwości komórek. Ases /5/ opisał podobny wpływ braku glukozy w środowisku inkubacyjnym na pobudliwość elektryczną izolowanej siatkówki oka.

Wybiórczość efektu zmniejszenia pobudliwości metabolicznej skrawków mózgu w przypadku zastosowania bodźców sakodliwych "in vitro" /nieodtlenienie i brak substratu oddechowego/, bez równoległych zmian oddychania, obserwowanych w <sup>a</sup> reakcji stosowanej "in vivo", sugeruje jeszcze jedną możliwość interpretacyjną. Wydaje się, że same warunki inkubacji skrawków poza ustrojem sprzyjają, przy współistnieniu okresowych zaburzeń energetycznych, wystąpieniu nieodwracalnych zmian w strukturze błony komórkowej. Prowadzi to do utraty reaktywności tkanki na bodźce stymulujące, w warunkach, które "in vivo" działanie takiego nie wykazują, bądź wywołując zmiany, zachowują ich odwracalność.

Stażym i wczesnym wykładnikiem zaburzeń biochemicznych zachodzących w tkance nerwowej pod wpływem niedo-



tlenie i to zarówno w przypadkach z rozszerzonymi uogólnionymi zwyrodnieniami komórek nerwowych, jak i z rozległymi ogniskowymi uszkodzeniami tkanki, był wzrost specyficznej aktywności dehydrogenazy glukozy 6-fosforanu we frakcji cytoplazmatycznej homogenatów z półkul mózgowych. Ze względu na powiązanie tego enzymu jak i pozostałych enzymów reprezentujących cykl pentozowy z tkanką gliową, zmiany w jego aktywności są przede wszystkim wyrazem procesów dotyczących gliu.

Nieznaczne narastanie aktywności DHG6P, statystycznie nieznamienne, obserwowano już w przypadkach krótkotrwałego niedotlenienia prostego, w grupie zwierząt badanych po upływie 3 godzin od ograniczenia dopływu tlenu. Znaczenie wyraźniejszy wzrost aktywności tego enzymu występował po przedłużonym niedotlenieniu i po działaniu przedłużonego niedotlenienia skojarzonego z zaburzeniami krążenia mózgowego. Osiągnął on w tym przypadku odpowiednio wartości 21% bezpośrednio po niedotlenieniu i 34% po upływie 3 godzin, wykazując pełną zmienność statystyczną. Powrót aktywności enzymatycznej w półkuli poddanej wyłącznemu działaniu niedotlenienia, do poziomu wartości kontrolnych po upływie 12 - 24 godzin wskazuje na odwracalność zjawiska. Jej spadek poniżej wartości kontrolnych w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy, po upływie 12 - 24 godzin, należy wiązać z rozwojem zmian martwiczych w tkance. Wypadkowe aktywności,

nijsze o 16% od wartości kontrolnych stosowianą aktywność tkanki o różnych stopniach uszkodzenia. Potwierdzenie powyżej przedstawionych obserwacji biochemicznych są spostrzeżenia histochemiczne wykazujące w mózgu zwierząt w odpowiednich grupach czasowych, wyraźne wzmożenie odczynu formozenowego z G6P jako substratem. Zwroca uwagę fakt, że w grupach 12 i 24 godzinnych - przy rozwiniętych ogniskach martwiczych ze zmniejszoną lub wybitnie obniżoną aktywnością enzymu, obserwowano się równocześnie wzrost jego aktywności w tkance otaczającej, przy czym lokalizowało się ono, w przeciwieństwie do warunków prawidłowych, przede wszystkim w gleju astrocytarym.

Wzrost aktywności specyficznej DHG6P mógłby być traktowany jako wyraz uaktywnienia się w tkance, o zaburzonej przez hypoksję metabolizmie tlenowym glukozy, jej przemiany drogą innych szlaków metabolicznych. Może on również odzwierciedlać wybiórczy proces aktywacji metabolizmu komórek gljowych, jako wczesny odczyn na niedotlenienie.

W warunkach hypoksji, jednocześnie z zaburzeniem tlenowej przemiany w cyklu Krebsa, dochodzi do stymulacji zarówno glikolitycznego szlaku Embden-Meyerhofs /87/ jak i enzymów cyklu Leloir /100/. To ostatnie prowadzi do wzmożonej syntezy glikogenu we wczesnych okresach po-  
nocyjnych /100, 116/. Możliwe jest, że podobne zjawisko

dotyczy również przeniesienia glukozy w cyklu pentozowym, powodując wzrost aktywności DHG6P, enzymu warunkującego wejście glukozy do tego szlaku. Hipotezę tę popierają obserwacje innych autorów [62, 68, 69, 70, 129], wykazujące wzrost aktywności przeniesienia pentozowej mózgu w warunkach, których wspólną cechą jest upośledzenie tlenowego metabolizmu glukozy. Aktywacja DHG6P może być również storna w stosunku do występującego w następstwie niedotlenienia przesunięcia aktywności heksokinazy, związanej z frakcją mitochondrialną do frakcji cytoplazmatycznej, stwierdzonego w naszej Pracowni przez Broniszewską-Ardelt [dane nie publikowane]. Istnienie wzajemnej zależności pomiędzy zmianami w aktywności tych dwóch enzymów cytoplazmatycznych [heksokinazy i DHG6P] stwierdzono w szeregu badań nad mechanizmami regulującymi metabolizm glukozy w innych tkankach [23, 96, 103, 117].

Mechanizm aktywacji DHG6P w mózgu nie jest znany. Istnieją jednak dane uzyskane na innych niż układ nerwowy tkankach, wskazujące na możliwość bezpośredniej aktywacji cyklu heksozocjanofosforanowego przez wzrost stężenia glukozy w środowisku [27, 95, 112]. W badaniach naszych stwierdziliśmy również, że w skrawkach mózgu, inkubowanych *in vitro*, glukoza powoduje aktywację pierwszego enzymu cyklu pentozowego. Zjawisko tego nie obserwowaliśmy natomiast przy zastąpieniu glukozy w medium innymi substratami oddechowymi. Niedotlenienia ustroju towarzyszą zazwyczaj

hyperglykemia, proporcjonalna do czasu trwania i głębokości niedotlenienia /137/. Może ona prowadzić do miejscowego wzrostu stężenia glukozy w tkankach o zaburzonym metabolizmie tlenowym, pod warunkiem zachowanego jej transportu drogą krwi. Tylko w przypadkach znacznego upośledzenia krążenia krwi, ogólnego lub miejscowego, dochodzi pod wpływem anoksji do gwałtownego zmniejszenia poziomu glukozy zarówno w mózgu jak i w innych tkankach. Pogłębienie to oczywiście uszkodzenia związane z samym niedoborem tlenu. Badania nasze wykazały wzrost stężenia glukozy w tkance nerwowej w następstwie niedotlenienia prostego. Wydejce się przeto, że ten właśnie wzrost glukozy w czasie anoksji bez towarzyszących zaburzeń w krążeniu, jak i w okresie poanoksyjnym, może odgrywać rolę czynnika stymulującego aktywność DHG6P. Z tym również wiąże się sprawa lokalizacji aktywności enzymu. Wg przyjętych obecnie poglądów /38, 48/ astrocyty w ośrodkowym układzie nerwowym spełniają istotne funkcje transportowe dla wody i elektrolitów. Oksche /105/ i Friedl /48/ uważają, że transport śródmózgowy glukozy odbywa się również drogą astrogleju. Wydejce się przy tym, że glukoza może być deponowana głównie w komórkach o funkcjach transportowych /100/, tj. w astrocytach. Zarówno nasze obserwacje jak i dane z piśmiennictwa /48/ wskazują, że wzrost aktywności enzymatycznej DHG6P dotyczył właśnie astrocytów i to już w bardzo wczesnych okresach doświadczenia.

Zjawisko miało charakter uogólniony, obustronny i występowało zarówno w istocie białej podkorowej jak i w głębokich warstwach kory. Nawet w okresach późniejszych, przy globalnym spadku aktywności enzymu w związku z rozwojem ognisk martwiczych, stwierdzało się w ich otoczeniu przetrwałe komórki glejowe, przedewszystkim astrocyty, ze wzmożonym odczynem formazonowym w reakcji zarówno z G6P, jak również z innymi substratami. Stanowiło to wyraz przeobrażenia astrocytów w postać reaktywną.

Wczesny wzrost aktywności DHG6P w komórkach gleju, wyprzedzający pojawienie się histologicznych cech gleju odczynowego, może odzwierciedlać aktywację procesów związanych z syntezą białek w tych komórkach. W świetle powszechnie przyjętych poglądów cykl pentozowy związany jest z procesami podziału komórkowego i z syntezą białek w ośrodkowym układzie nerwowym /26/. Być może usaktywnienie astrocytów, prowadzące w późniejszych okresach do ich rozplemu i przerostu, daje w pierwszym okresie zmian, obraz wzrostu aktywności DHG6P.

Odrębnym zagadnieniem jest sprawa wzajemnych relacji między stwierdzanymi zaburzeniami oddychania tkankowego, a nieprzewidliwościami enzymatycznymi. Wczesny wzrost specyficznej aktywności DHG6P sugeruje możliwość zwiększonego stężenia w tkance nerwowej kwasu 6-fosfoglukonowego, jako bezpośredniego produktu metabolicznego aktywności DHG6P. Devlin i wsp. /37/ wykazali inhibujące właściwości kwasu 6-fosfoglukonowego w stosunku do procesów oddychania

izolowanych mitochondriów wątroby. Stwierdzili oni, że w stężeniu 1 mM prowadziło on do obniżenia o około 40% zarówno oddychania jak i fosforylacji frakcji mitochondrialnej, niezależnie od użytego substratu oddechowego. W stężeniu 3 mM występowało prawie całkowite zahamowanie oddychania i fosforylacji przy użyciu substratu oddechowego, którego utlenienie połączone było z redukcją NAD /glutaminian, -hydroksymaślan /. Teoretycznie należało więc brać również w rachubę możliwość nagromadzenia się kwasu 6-fosfoglukonowego w tkance nerwowej i jego ewentualnego wpływu na oddychanie tkanek. Przeciwnie tej możliwości przemawiają wyniki naszych badań nad wpływem egzogenego kwasu 6-fosfo-glukonowego na oddychanie frakcji mitochondrialnej z mózgu szczurze. Stwierdziliśmy bowiem brak hamującego wpływu kwasu 6PGA zarówno na oddychanie jak i na fosforylację mitochondriów mózgu, niezależnie od użytych substratów oddechowych. Rozbieżność naszych wyników ze spostrzeżeniami Devlina i wsp./37/ może wskazywać na różnice reakcji mitochondriów wątroby i mózgu w stosunku do kwasu 6PGA. Nie można jednak wykluczyć wpływu czynników dodatkowych, takich choćby jak czystość preparatów kwasu 6PGA, lub bezpośredniego związku pomiędzy stężeniem kwasu 6PGA i stosowanym przez cytowanych autorów jako "pułapka fosforenów" układem heksokinazowym itp.

W piśmiennictwie neuropatologicznym i neurochemicznym istnieją znaczne rozbieżności, co do pierwotności uszkodzeń poszczególnych białek enzymatycznych, czy zmian w aktywności szlaków metabolicznych w niedotlenieniu tkanki nerwowej. Rozbieżności te wynikają w znacznej mierze z różnic

metodycznych i różnie oceny dynamiki rozwojowej encefalopatii pośnokcyjnej. Spector /124/ postuluje pierwotne uszkodzenie białek enzymatycznych w komórcie nerwowej, z wtórnym zahamowaniem procesów metabolicznych. Hipotezę tę opiera na spostrzeżeniu, że zaburzenie oddychania tkanki nerwowej pojawiają się dopiero po upływie 12 - 24 godzin od niedotlenienia /123, 136/, podczas gdy obniżenie aktywności enzymatycznej w badaniach histochemicznych obserwuje się już w 1 - 6 godzin po niedotlenieniu /32, 122, 124/. Z drugiej jednak strony biochemiczne oznaczenie aktywności takich enzymów jak SDH, MAO, /monooksydazy/, CyO, /oksydazy cytochromowej/, wykonane przez tych samych autorów wykazały spadek ich aktywności dopiero w okresie 20-24 godzin po niedotlenieniu /121/. Obserwacje nasze przeprowadzone na modelu snokcyjno-ischemicznym przesiewają się z tym, że uogólnione zmiany enzymatyczne, polegające na rozległym, histochemicznie stwierdzalnym obniżeniu lub zaniku aktywności enzymów takich, jak SDH, LDH, czy DKG6P komórek nerwowych i neuropila kory mózgu i innych formacji szarych, rozwinęły się stórnie jako wynik niewydolności układów energetycznych komórki.

W doświadczeniach prowadzonych na modelu Levine u większości zwierząt badanych w 3 godziny po niedotlenieniu obserwowano się jedynie dyskretne objawy obniżenia aktywności enzymów w neuropilu i komórkach nerwowych, z wyraźną ich lateralizacją po stronie podwiązania tętnicy

szyjnej. Zmiany te miały charakter rozsiany i nigdy nie wykazywały natężenia takiego, jak po upływie 24 godzin. Natomiast upośledzenie oddychania tkankowego w grupie zwierząt badanych po 3 godzinach było równie wyraźne i masywne, jak w okresach późniejszych kiedy istniały już rozległe ogniska uszkodzeń histologicznych i histochemicznych.

Wydaje się przeto słuszne przyjęcie, że uszkodzenie oddychania tkankowego, rozwijającego się w krótkim czasie po niedotlenieniu - jest procesem pierwotnym w stosunku do uszkodzenia aktywności enzymów. Za poglądem tym przemawiają również badania ultrastrukturalne /10,12,22,64/, wskazujące na wczesne uszkodzenie struktury mitochondriów komórek nerwowych w hypeksji.

Wczesne upośledzenie oddychania komórek nerwowych przy zachowanej lub zwiększonej aktywności glikolitycznej może mieć istotne znaczenie dla patomechanizmu powstawania zmian poanoksyjnych w tkance /3,50,100/. Glikoliza beztlenowa stanowiąca czynnik zabezpieczający tkankę nerwową przed niewydolnością energetyczną, w warunkach hypeksji, przewodzić może w wyniku gromadzenia się kwasu mlekowego do zakwaszenia tkanki wraz z wszystkimi jego ujemnymi skutkami. Zwiększona produkcja kwasu mlekowego może powodować między innymi uaktywnienie się wewnątrzkomórkowych procesów autolitycznych /45,50/ i wtórną destrukcję białek enzymatycznych. Aktywizację lizosomów w komórkach



nerwowych po niedotlenieniu wykazali Becker i Barron /13, 14/. Zanieżenie pH tkanki w wyniku niedotlenienia pogłębia pierwotne uszkodzenie związane z niedoborem tlenu, powodując wystąpienie dodatkowych zaburzeń hemodynamicznych /zostój naczyńowy/ oraz związanych z nimi skrzepów naczyńowych lub mikroembolów /35/. Zmiany te w przypadkach krótkotrwałego niedotlenienia i/lub przewlekłego krążenia ogólnego i miejscowego ulegają wyrównaniu. Wskazują na to między innymi własne obserwacje, uzyskane w modelu prostej snokcji. Dyskretne objawy zaburzeń hemodynamicznych - zostój naczyńowy i przesiąkanie okołosnocyjne, obserwowane w okresie bezpośrednio po snokcji, cofają się całkowicie w krótkim czasie, nie prowadząc do powstania obrzęku obrzęku mózgu. Podobne obserwacje poczynili również i inni autorzy /43, 65/. Zapewnie inaczej przedstawia się sytuacja w warunkach istniejących zaburzeń w krążeniu, ograniczających możliwość usunięcia z tkanki produktów jej przemiany materii /20, 52, 81, 102/. Dochodzi może wówczas do miejscowej akumulacji kwasu mlekowego, zakwaszenie tkanki, które wraz z niedostatkami tlenu prowadzi do głębokich nieodwracalnych uszkodzeń mózgu. Wydaje się, że takie właśnie warunki stworzył model snokcyjno-ischemiczny Levine. Samo jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej nie prowadzi u szczurów do jakiegokolwiek uszkodzenia układu nerwowego /poza subtelny i zmienny wyrodnieniowy i pojedynczych neuronów /. Zaburzenia hemodynamiczne zostają wyrów-

nane dzięki sprawnemu krążeniu oboczemu, zapewniającemu pełne zaspokojenie potrzeb tkanki w warunkach przewidzianego utlenienia ustroju i układu nerwowego. Jak dolega jest to wyróżnienie chwiejne świadczą naszywe uszkodzenia tkanki nerwowej, obserwowane w półkuli mózgu po stronie podwiązania tętnicy szyjnej, rozwijające się w następstwie ograniczenia dopływu tlenu, które w półkuli przeciwległej wywołuje jedynie podwyższenie aktywności DHG6P oraz dyskretne, rozsiane zwyrodnienia komórkowe.

Obszar zmian morfologicznych tkanki nerwowej, ograniczonych w tym modelu niemal wyłącznie do obszaru unaczynienia tętnicy mózgu środkowej, swoją strukturą i natężeniem przypominają zespoły encefalopatii związanej z gwałtownymi i ciężkimi zaburzeniami krążenia, głównie o typie "cardiac arrest" /36, 106 /.

Bardzo podobną lokalizację zmian opisał Korthals /77/ w modelu doświadczalnym, kojarzącym ogólne zaburzenie krążenia krwi /zatrzymanie obiegi serca/ z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej. Lokalizacje zmian, typ uszkodzeń i ich nasilenie - są również znamienne dla niewydolności krążenia mózgowego, w której istotną rolę odgrywa czynnik hipotensyjny /11 / i zmniejszony przepływ krwi przez żołądki naczyńne /2/. Argumentem przemawiającym za istotnym udziałem patogenetycznym tego właśnie czynnika w kształtowaniu obszaru patologicznego encefalopatii enoksygno-ischemicznej jest występowanie najgłębszych uszkodzeń

tkenkowych w "obszarach granicznych" głównych pni tętni-  
czych mózgu. Ten właśnie rozkład zmian powtarzający się  
w naszym materiale obserwowali w swoich badaniach na tym  
samym modelu Levine /82/, Yap i Spector /140/, Zeman/139/,  
Brierly i Brown /19,22/. Pracyca znaczenie częstsze wystę-  
powanie głębokich uszkodzeń w polu granicznym między tętni-  
czą mózgu przednią i środkową, niż między środkową a tyl-  
ną, tłumaczyć należy zapewne większą zmiennością i mniej  
ostrą granicą unaczynienia obszarów zapętryw<sup>ych</sup> przez  
tętnicę środkową i tylną mózgu /82/.

Brak tego typu rozkładu i charakteru uszkodzeń  
tkenkowych w krótkotrwałym niedotlenieniu prostym, jak  
i w półkuli mózgu przeciwległej do podwiązania tętnicy  
szyjnej w modelu Levine, świadczy o nie występowaniu w tych  
przypadkach ogólnego niedociśnienia krwi, które może się  
rozwinąć w ciężkich postaciach enoksjii na skutek niedotle-  
nienie i wtórnej niewydolności mięśnia sercowego /20, 22/.

Nie wyjaśnione jest zagażenie różnic we wrażli-  
wości poszczególnych zwierząt na te same warunki niedotle-  
nienie. Stopień uszkodzenia tkanki nerwowej wahał się od  
dyskretnych, rozległych zwyrodnień poszczególnych neuro-  
nów, do rozległych martwic głównie selektywnych tkanki  
półkul mózgowych w modelu Levine. W większości prac zwią-  
zanych z zagażeniem wpływu hypoksjii na OUN podkreślone  
jest to duże rozpiętość natężenia zmian pconoksyjnych,  
przy zastosowaniu nawet najbardziej precyzyjnych i wystan-  
daryzowanych modeli doświadczalnych /11,22,77,82/. Wydoje

się, że w tym przypadku dochodzi do uwidocznienia złożoności problemu działania niedotlenienia na organizm, które po charakterystycznym, miejscowym działaniem na tkankę nerwową, obejmuje również całościową reakcję ustroju z wszystkimi jego możliwościami adaptacyjnymi i regulującymi, które w większości wynykają się z pod kontroli doświadczenia.

### WNIOSKI

Obserwacje nasze można podsumować w sposób następujący:

- 1/ W mózgu istnieje zróżnicowanie tlenowych szlaków przemian glukozy pomiędzy poszczególnymi strukturami anatomicznymi, wykazujące ujemną korelację między intensywnością oddychania tkankowego w obecności glukozy, a aktywnością badanych enzymów cyklu pentozowego. Zjawisko to zależne jest od ilościowych stosunków między neuronami, a komórkami glejowymi w danej okolicy mózgu.
- 2/ Krótkotrwałe niedotlenienie proste wywołuje powstanie dyskretnych, rozrzuconych zmian w obrazie histologicznym i histochemicznym mózgu, które nie powodują istotnych zaburzeń w zużyciu tlenu przez skrawki tkankowe. Obserwuje się natomiast niezmienną statystycznie, choć już wyraźną tendencję do wzrostu aktywności pierwszego enzymu cyklu pentozowego, DHG6P, znajdującą swój wyraz przede wszystkim w badaniach histochemicznych.

- 3/ Niedotlenienie o przedłużonym działaniu /20 - 40 min./ prowadzi do pogłębienia obserwowanych zmian morfologicznych i histochemicznych bez wyraźnego wpływu na oddychanie tkankowe, przy równoczesnym zmniejszeniu wzrostu aktywności enzymów cyklu pentozowego /głównie DDCGP/ w okresie wczesnym. Te ostatnie zmiany, związane z pobudzeniem gleju, mają charakter odwracalny i cofają się po upływie 24 godzin od niedotlenienia.
- 4/ Skojarzenie działania czynnika snoksyjnego i behawioralnego wywołuje w okresie wczesnym spadek natężenia tlenu przez tkankę nerwową i wzrost aktywności enzymów cyklu pentozowego, a w okresie późnym spadek zarówno oddychania tkankowego, jak i aktywności badanych enzymów. Te ostatnie zjawisko należy łączyć z powstaniem w tym okresie zmian martwiczych w tkance.
- 5/ Obniżenie oddychania tkankowego w następstwie niedotlenienia odnieść należy przede wszystkim do uszkodzenia komórek nerwowych, a wzrost aktywności enzymów cyklu pentozowego, do pobudzenia gleju, przede wszystkim astrocytarnego, przekształcającego się w biologicznie czynny tzw. gładz odczynowy.
- 6/ Na podstawie przeprowadzonych badań uzupełniających wydaje się, że wzrost aktywności DDCGP może być między innymi warunkowany wzrostem stężenia glukozy w środowisku, której podwyższenie w tkance nerwowej stwierdzono w okresie bezpośrednim po niedotlenieniu.

7/ Pod wpływem niedotlenienia *in vivo*, mimo uszkodzenia oddychania tkanekowego, efekt pobudliwości metabolicznej badanych skrawków jonami potasu zostaje zachowany i jest proporcjonalny do wartości oddychania spoczynkowego. Wskazuje to, że niedotlenienie nie działa wybiórczo na mechanizmy odpowiedzialne za pobudzenie metaboliczne skrawków, a przetrwało w tych przypadkach populacje nieuszkodzonych komórek nerwowych, zachowuje charakterystyczną dla niej zdolność do zwiększonego zużycia tlenu pod wpływem wzrostu stężenia potasu w środowisku.

8/ Preinkubacja skrawków mózgu w warunkach beztlenowych *in vitro* jak również brak glukozy w środowisku inkubacyjnym, znosi całkowicie reakcję metaboliczną skrawków tkanekowych na zwiększone stężenie jonów potasu, z niezmiennym tylko wpływem tych warunków na wartości oddychania spoczynkowego.

9/ Wydaje się, że mechanizmy uszkodzenia oddychania tkanekowego skrawków pod wpływem okresowego ich niedotlenienia *in vitro*, różnią się od uszkodzenia rozwijającego się pod wpływem anoksji działającej *in vivo*.

10/ W/przeciwieństwie do badań przeprowadzonych przez Devlina i wsp./57/ na mitochondriach wątroby szczura, nie stwierdzono zależności pomiędzy oddychaniem i fosforylacją frakcji mitochondrialnej mózgu, a obecnością egzogennego kwasu 6-fosfoglukonowego w środowisku.

## STRESZCZENIE

Celem pracy było ocena wpływu niedotlenienia mózgu zarówno prostego jak i skojarzonego z niedokrwieniem, na oddychanie skrawków tkanekowych, ich zdolność do reakcji metabolicznej na zwiększone stężenia jonów potasu w środowisku i na aktywność DH-az związanych z pracującą glukozy w cyklu pentozowym.

Wstępem do oceny wpływu niedotlenienia było określenie prawidłowego zróżnicowanie wymienionych wykładników tlenowej przemiany glukozy w poszczególnych okolicach mózgu oraz ustalenie ich zależności od składu komórkowego i funkcji danej struktury.

Porównanie otrzymanych w oznaczeniach biochemicznych wartości specyficznej aktywności DHG6P i DHGPA z jej obresem histochemicznym w poszczególnych formacjach mózgu wskazuje na to, że są one przede wszystkim uzależnione od obecności komórek glejowych. Okolice o dużej gęstości komórek gleju i stosunkowo mniejszej liczbie neuronów, charakteryzują się na ogół wyższą aktywnością enzymów związanych z cyklem pentozowym.

Komórki nerwowe determinują natomiast zarówno wysokie zużycie tlenu, jak i zdolność do jego stymulacji pod wpływem wysokich stężeń jonów potasu /tzw. efekt metaboliczny  $K^+$ /. Jedynie w mózdku, posiada wyraźnie zaznaczoną pobudliwość metaboliczną, charakterystyczną dla

struktur z przeważającą ilością komórek nerwowych, stwierdzono stosunkowo niskie natężenie tlenu i wysoką aktywność DH-az związanych z cyklem pentozowym. Wydaje się, że zjawisko to należy tłumaczyć jego specyficzną strukturą cytochemiczną, odmienną do innych okolic mózgu.

Badanie biochemiczne i histologiczne przeprowadzone na modelu niedotlenienia prostego /czas trwania około 3 minut / wykazały, że pomimo wyraźnie występujących zaburzeń metabolizmu tlennego w mózgu /4-krotny wzrost poziomu kwasu mlekowego /, jak i jego funkcji /senk aktywności bioelektrycznej/ w końcowej fazie niedotlenienia, nie dochodzi do rozwoju nasywnych utrudzonych uszkodzeń mózgu. Powstające zmiany zwyrodnieniowe w komórkach nerwowych mają charakter rozlany i nie wywierają istotnego wpływu na intensywność natężenia tlenu przez skrośki tkankowe po 24 godzinach od niedotlenienia. W badaniach nad aktywnością enzymów związanych z cyklem pentozowym nie stwierdzono statystycznie znaczących różnic w porównaniu z wartościami w grupie zwierząt kontrolnych. Jedynie w obszarze histochemicznym zaobserwowano wzrost aktywności DHG6P w komórkach gleju. Być może zjawisko to należy łączyć ze zwiększonym stężeniem glukozy w tkance mózgu, które stwierdzono u większości zwierząt w przedgonadnym okresie niedotlenienia prostego.

Dalsze badanie przeprowadzone na modelu anokcyjno-ischemicznym, w którym wydłużono czas niedotlenienia w pe-



równaniu z anoksją prostą i wprowadzono uprzednio jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej. Ze względu na specyfikę tego modelu badania ograniczono do półkul mózgowych.

W przeprowadzonych badaniach kontrolnych wykazano, że jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, bez współistniejącego zmniejszenie wysycenia krwi tlenem, nie prowadzi do zaburzeń w zużyciu tlenu przez skrawki tkankowe, ani do zmian aktywności enzymów cyklu pentozowego, zapewne w wyniku skompensowania zapotrzebowania tkanki w tlen drogą krążenia obocznego.

W modelu anoksyjno-ischemicznym w półkuli mózgu przeciwległej od strony podwiązania tętnicy szyjnej, czyli poddanej wyłącznie działaniu niedotlenienia, nie stwierdzono wyraźnego uszkodzenia oddychania skrawków tkankowych. Natomiast w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wykazano w większości przypadków zmniejszenie zużycia tlenu, we wszystkich grupach czasowych, począwszy od badanych bezpośrednio po niedotlenieniu. Wykazano równocześnie, że w tych samych warunkach występuje obustronny wzrost aktywności DHG6P we wczesnym okresie poanoksyjnym. Wynosi on odpowiednio 21% w stosunku do wartości kontrolnych bezpośrednio po niedotlenieniu i 34% po upływie 3 godzin. Na podstawie obrazu histochemicznego można sądzić, że za zjawisko to odpowiedzialne są komórki neurogleju, w których dochodzi do wzmożenia odczynu formazanowego z G6P jako sub-

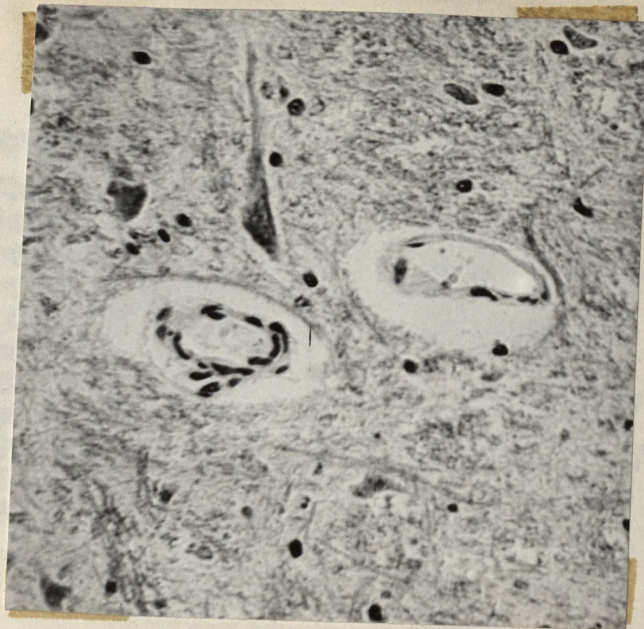
stratem, już w wczesnym okresie po niedotlenieniu. W dalszym rozwoju zmian patologicznych, pojawieniu się ognisk martwicy w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy /12 - 24 godziny po niedotlenieniu/, towarzyszy nieznaczne obniżenie aktywności DHG6P, o średnio 16% w porównaniu z grupą kontrolną. Wydaje się, że wartości uzyskane w oznaczeniach biochemicznych stanowią wypadkową aktywności DHG6P tkanki z całkowitym zanikiem aktywności enzymu /martwica zupełna/ lub jej obniżeniem /martwica wybiórcza/ i tkanki w której aktywność tego enzymu jest zachowana, a nawet wzmożona. Obserwowana zmiana aktywności DHG6P nie towarzyszyła znacząco statystycznie różnicom w aktywności DHG6CA.

Zmiany histologiczne cechowały się różnym stopniem ciężkości uszkodzeń w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy, głównie w obszarze nieopatrzonej przez tętnicę środkową mózgu. W grupie zwierząt badanych w czasie 12-24 godzin po niedotlenieniu występowały zmiany usteczne pod postacią ognisk martwicy zupełnej bądź niezupełnej z zachowanymi komórkami glejowymi. Ogniskom towarzyszyło zwyrodnienie komórek nerwowych w obszarach sąsiadujących z martwicą. Pomimo wyraźnej lateralizacji uszkodzeń również i w półkuli mózgu przeciwległej do podwiązanej tętnicy szczytnej stwierdzano rozsiane i znacznie mniej nasilone zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych.

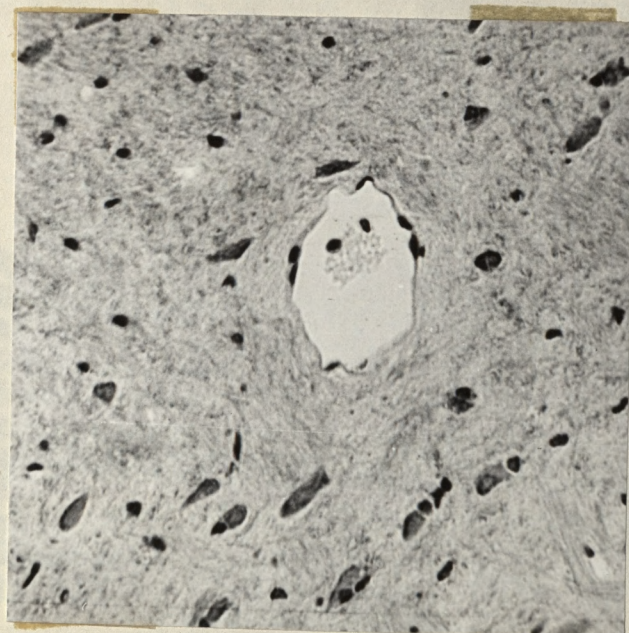
W uzupełnieniu poprzednio wymienionych badań przebadano *in vitro* wpływ okresowego braku tlenu i glukozy na oddychanie skrawków tkankowych mózgu. Stwierdzono, że pod wpływem tych czynników dochodzi do zniesienia stymulującego wpływu jonów potasu na satysfakcję tlenu przez skrawki tkankowe, z równoczesnym nieznacznym obniżeniem oddychania w niskich stężeniach tych jonów. Brak podobnych zmian w metabolizmie tkanki w wyniku stosowania niedotlenienia *in vivo*, przesądza o odmiennym mechanizmie uszkodzeń w obu układach doświadczalnych.

W szczególnej uwadze zasługuje zaobserwowany *in vitro* wzrost aktywności DRG6P o około 25% pod wpływem godzinnej inkubacji skrawków tkankowych w obecności 10 mM glukozy. Wydaje się, że obserwacja ta może rzucić pewne światło na mechanizmy występujących pod wpływem niedotlenienia zmian w aktywności tego enzymu.

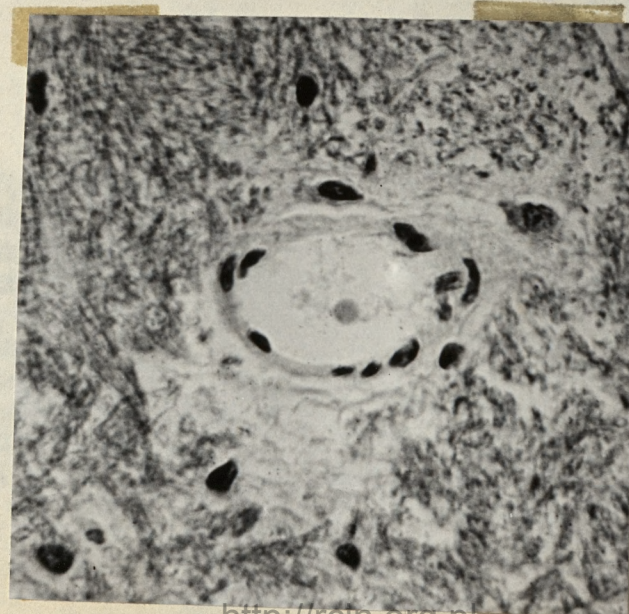
Nie wykazano natomiast, w przeciwieństwie do obserwacji Devlina i wsp. /57 / prowadzonych na mitochondriach wątrobowych, wpływu kwasu 6-fosfoglukonowego na funkcję frakcji mitochondrialnej mózgu.



Ryc.1  
 Poszerzenie  
 światła drobnych  
 tętniczek, zatar-  
 cie rysunku ścis-  
 ny naczyń, po-  
 szerzenie prze-  
 strzeni okołons-  
 czyniowej. Niedot-  
 lenienie proste,  
 ostre. Czas 0.  
 Fiolet kryzylu  
 Pow. 200 x



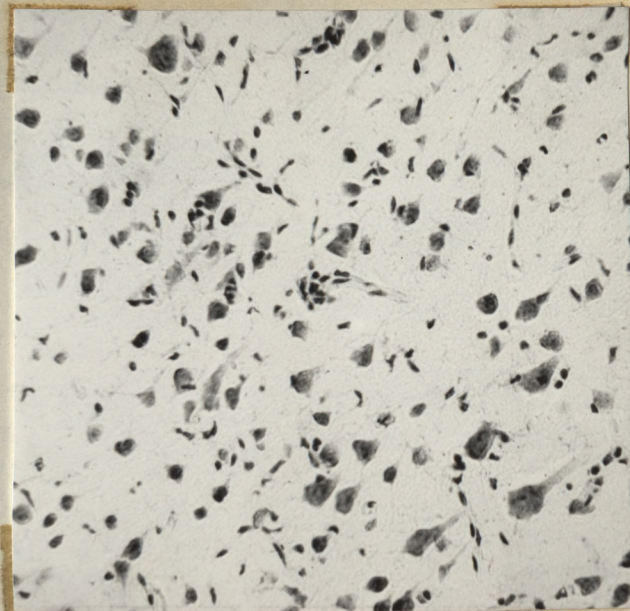
Ryc.2  
 Naczynie żylnie  
 z widocznym zna-  
 cznym poszerze-  
 niem światła. Nie-  
 dotlenienie pro-  
 stre, ostre.  
 Czas 0. Fiol.  
 krez. Pow. 200 x.



Ryc.3  
 Poszerzenie świa-  
 tła tętniczki, za-  
 tarcie rysunku  
 ściany, zblednie-  
 cie mieliny w je-  
 go otoczeniu. Nie-  
 dotlenienie pro-  
 stre, ostre.  
 Czas 0. Klüver-  
 Berrera. Pow. 400 x

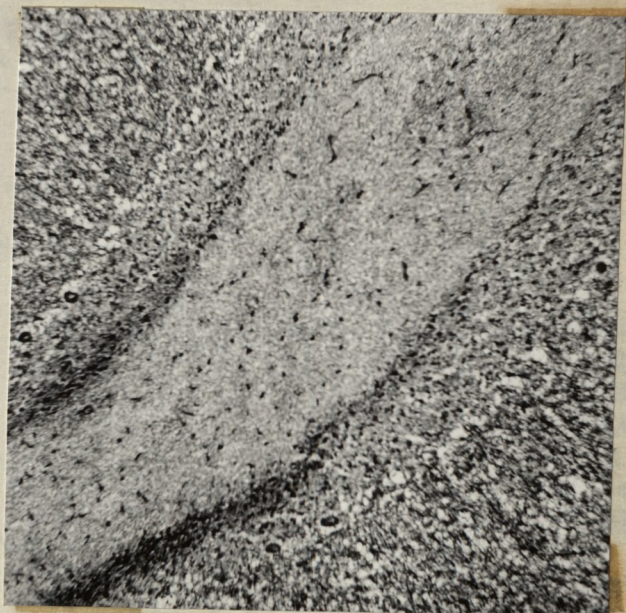
Ryc.4

Chromatoliza pojedynczych komórek nerwowych wzgórza wzrokowego z towarzyszącym odczynem gleju. Niedotlenienie proste, ostre. Czas 3 godz. Fiolet Krezylu. Pow. 200 x.



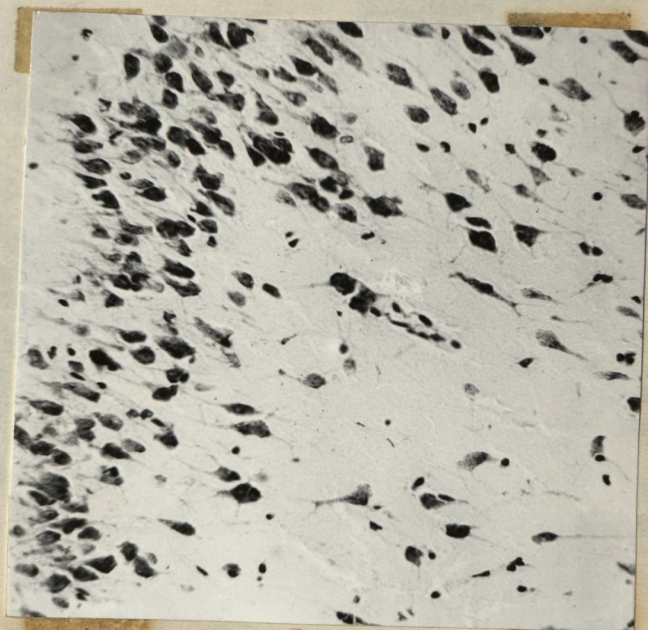
Ryc.5

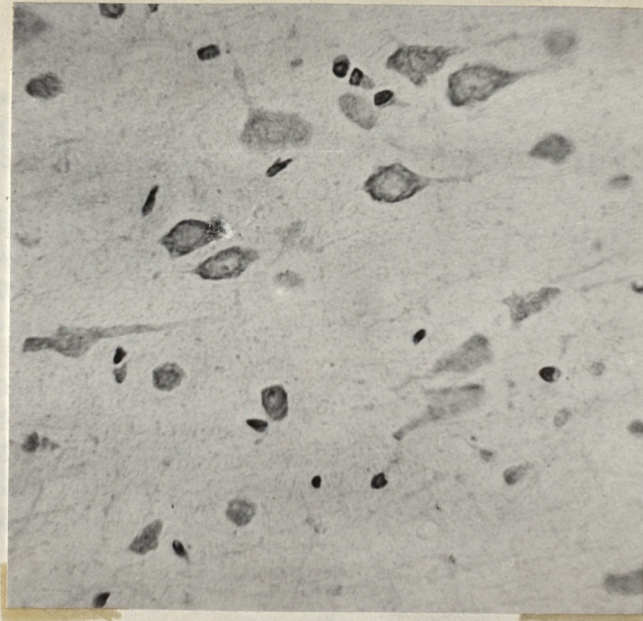
Miejscowe obniżenie aktywności DHG6P w gleju Bergmanna i komórkach Purkinjego w mózdzku. Niedotlenienie proste, ostre. Czas 24 godz. Fiolet krezylu. Pow. 100 x.



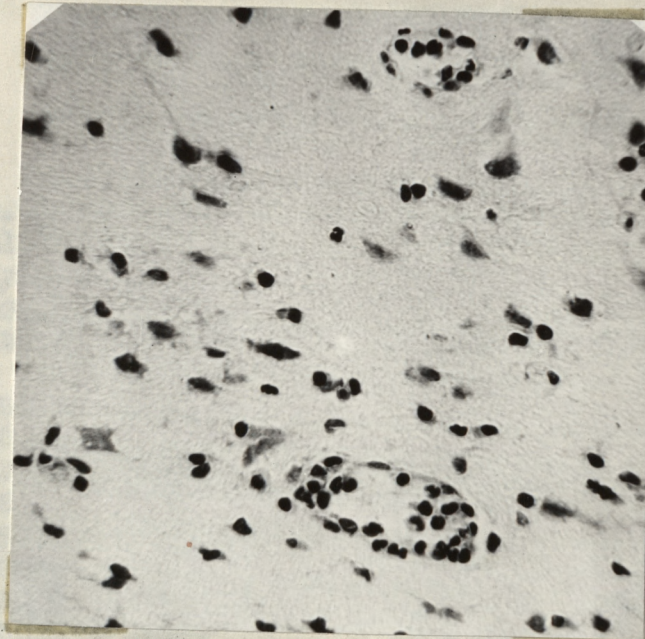
Ryc.6

Ogniskowy ubytek neuronów w korze mózgu, w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej /48 godz. po podwiązaniu./ Fiolet Krezylu. Pow. 200 x

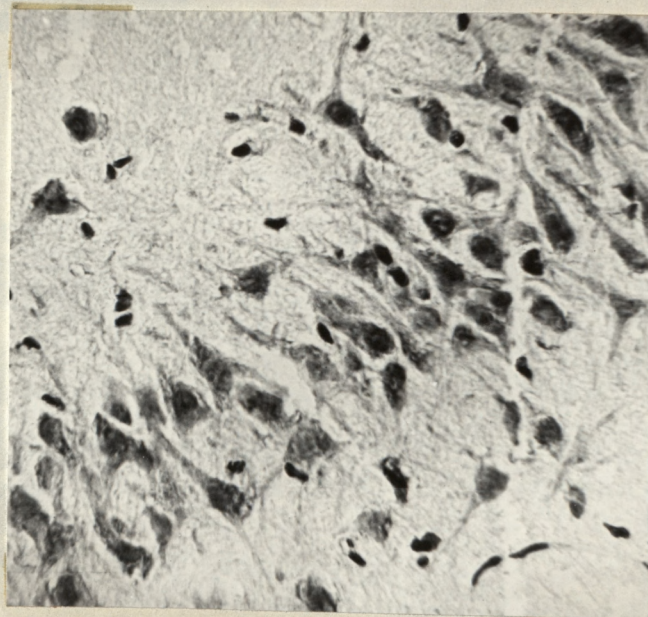




Ryc.7  
Tigroliza komórek  
piramidowych w pół-  
kuli mózgu po stro-  
nie podwiązanej  
tętnicy szyjnej  
wspólnej /24 godz.  
po podwiązaniu/.  
Klüver-Barrera.  
Pow. 400 x.

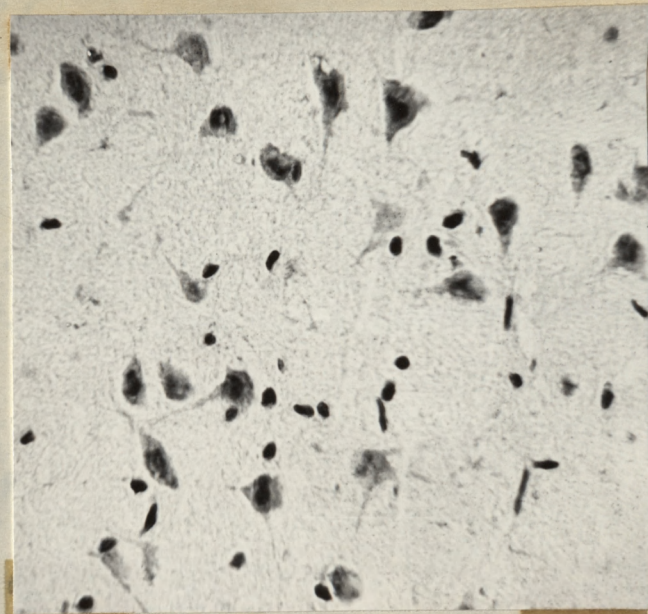


Ryc.8  
Diapedeza leukocy-  
tów przez ściany  
zastoinowo poszerzo-  
nych naczyń. Widocz-  
ne w otoczeniu neu-  
rony wskazują cechy  
schorzenia ischemi-  
cznego. Model  
Levine'a - 3 godz.  
po niedotlenieniu.  
Fiolet krezyłu.  
Pow. 400 x.

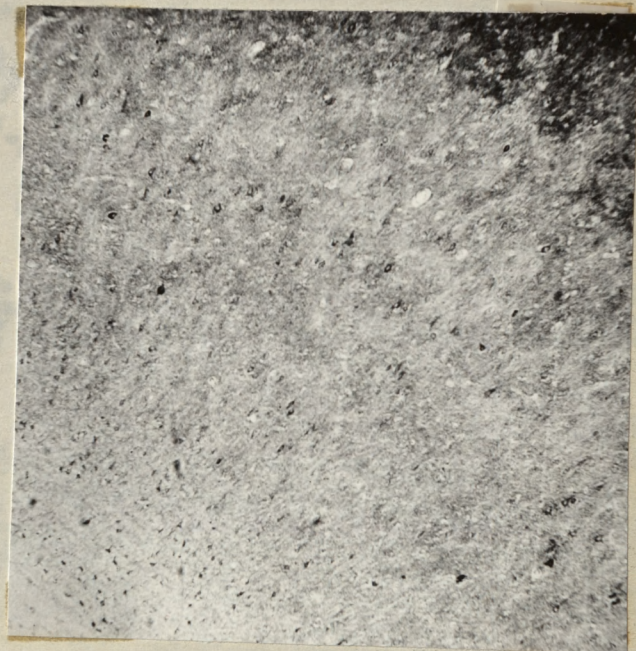


Ryc.9  
Zwyrodnienie komó-  
rek dwupiramido-  
wych zwoju Hippo-  
kampa w półkuli  
mózgu po stronie  
podwiązanej tętnicy  
szyjnej wspól. Mo-  
del Levine'a 3 godz  
po niedotlenieniu.  
Fiolet krezyłu.  
Pow. 400 x.

Ryc. 10  
Zwyrodnienie  
neuronów wzgó-  
rza wzrokowego  
w półkuli mózgu  
przeciwległej  
do str. podwiąza-  
nej. Brak odczynu  
glejowego.  
Model Levine'a  
3 godz. po niedo-  
tlenieniu.  
Fiolet Krezylu.  
Pow. 400 x.



Ryc. 11  
Rozlany zanik  
aktywności SDH  
w neuropilu ko-  
ry mózgu postro-  
nie podwiązanej  
tętnicy szyjnej  
wspólnej. Część  
neuronów wskazu-  
je zachowaną  
aktywność enzyma-  
tyczną.  
Model Levine'a  
3 godz. po nie-  
dotlenieniu.  
Pow. 60 x.

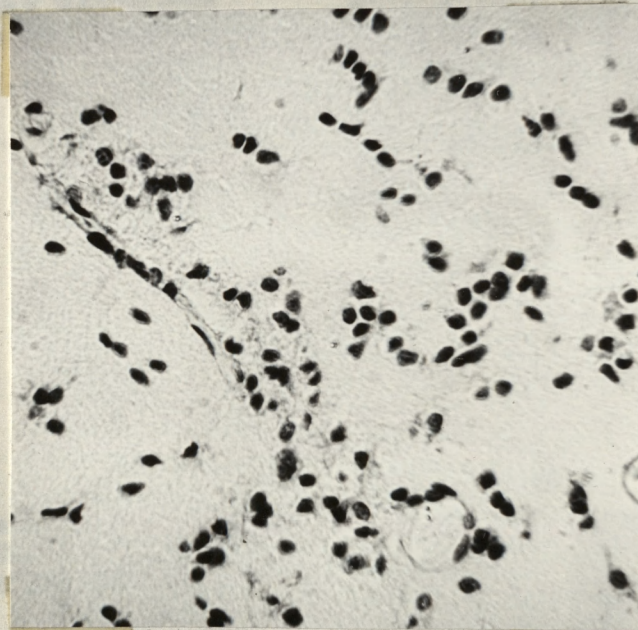


Ryc. 12  
Wzmocniona aktywność  
DHG6P w gleju isto-  
ty białej podkoro-  
wej po stronie pod-  
wiązanej tętnicy  
szyjnej wspólnej.  
Model Levine'a,  
3 godz. po niedo-  
tlenieniu.  
Pow. 200 x.

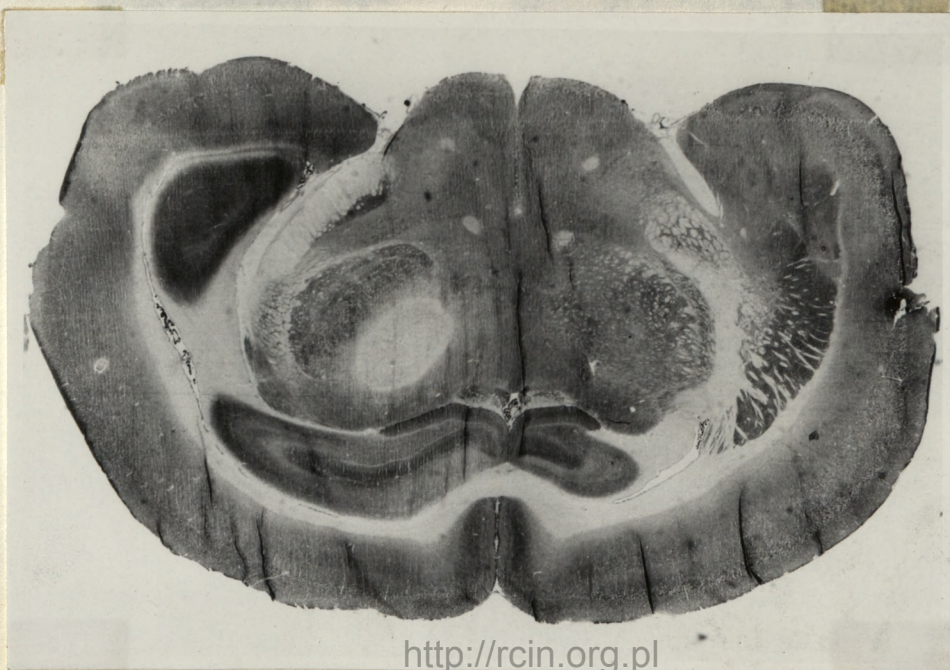




Ryc. 13  
 Zwyródnienie neurocytów w warstwie piramidowej wewnętrznej kory w półkuli przeciwległej od strony podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a, 12 godz. po niedotlenieniu. Fiolet krezylu. Pow. 200 x.



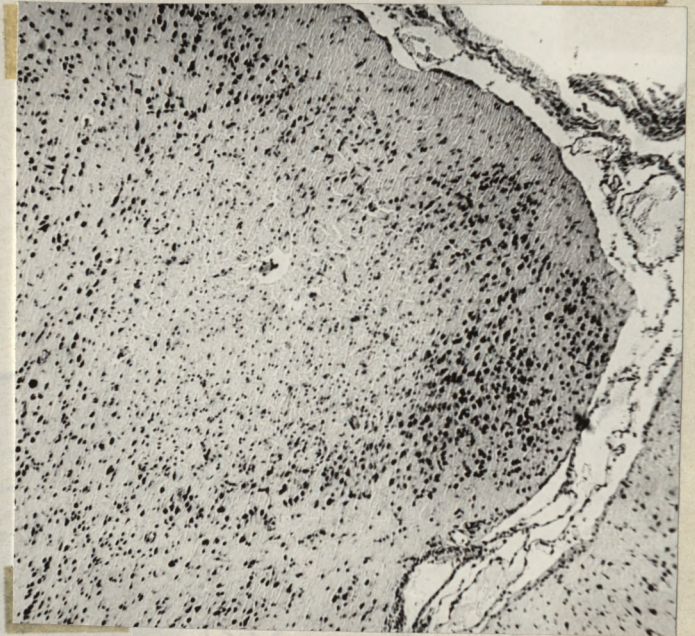
Ryc. 14  
 Obrzęk oligodendrogleju w istocie białej podkorowej, po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a, 12 godz. po niedotlenieniu. Fiolet krezylu. Pow. 400 x.



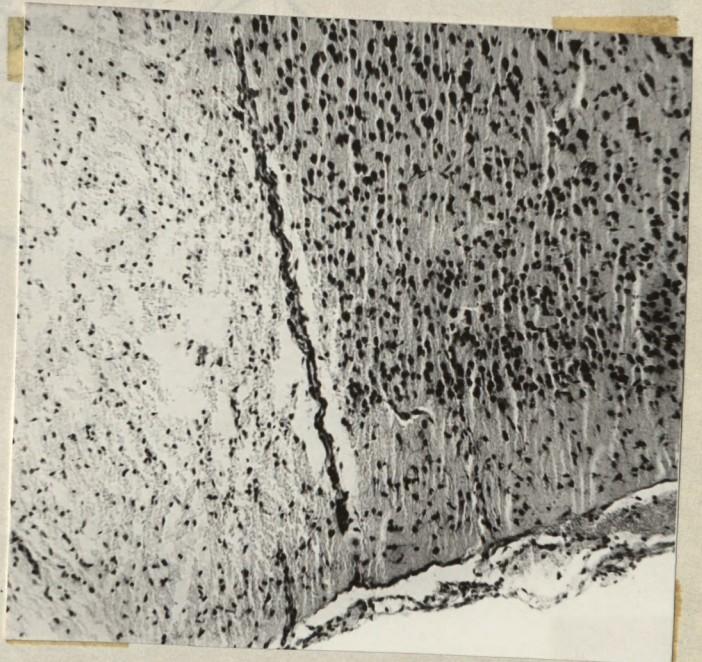
Ryc. 15  
 Ogniskowy ubytek aktywności SDH we wzgórzu, po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a 12 godz. po niedotlenieniu. Pow. 10 x.



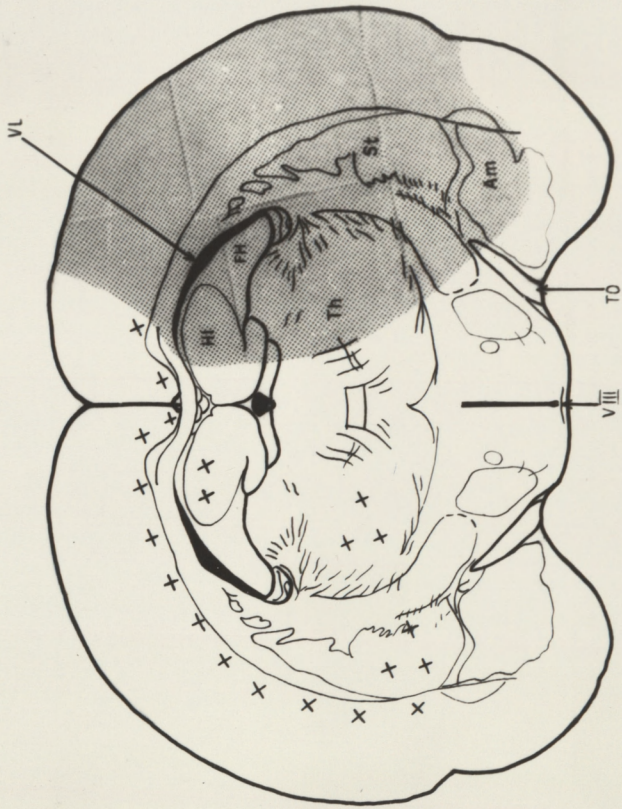
Ryc. 16  
Ogniskowy, rozlany  
ubytek komórek  
nerwowych w korze  
mózgu na powierz-  
chni podstawowej  
półkuli po stronie  
podwiązanej tętni-  
cy szyjnej wspól-  
nej.  
Model Levine'a,  
24 godz. po niedo-  
tlenieniu.  
Fiolet krezylu.  
Pow. 60 x.



Ryc. 17  
Ostro ograniczone  
pole zaniku komórek  
nerwowych w korze  
po stronie  
podwiązanej tętni-  
nicy wspólnej, na  
obszarze unaczyni-  
nienia tętnicy  
mózgu środkowej.  
Komórki glejowe  
zachowane podob-  
nie jak neurony  
warstwy drobnowej.  
Model Levine'a  
24 godz. po niedo-  
tlenieniu.  
Fiolet krezylu.  
Pow. 100 x.



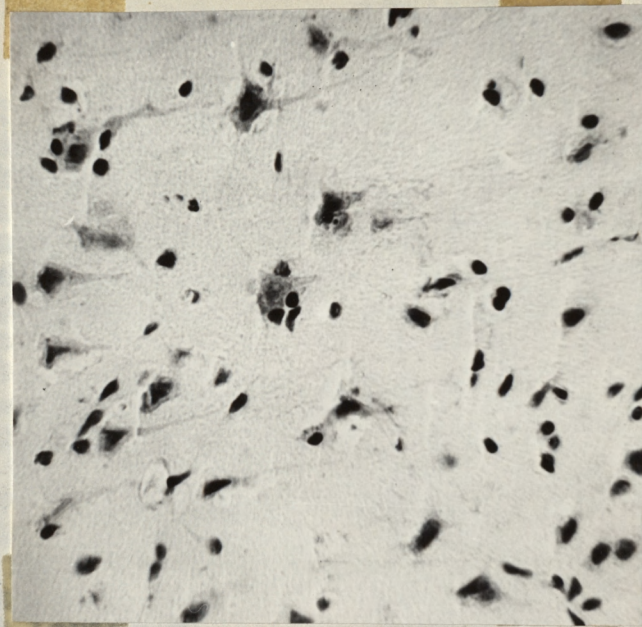
Lokalizacja uszkodzeń w encefalopatii anoksyjno - ischemicznej prawostronnej



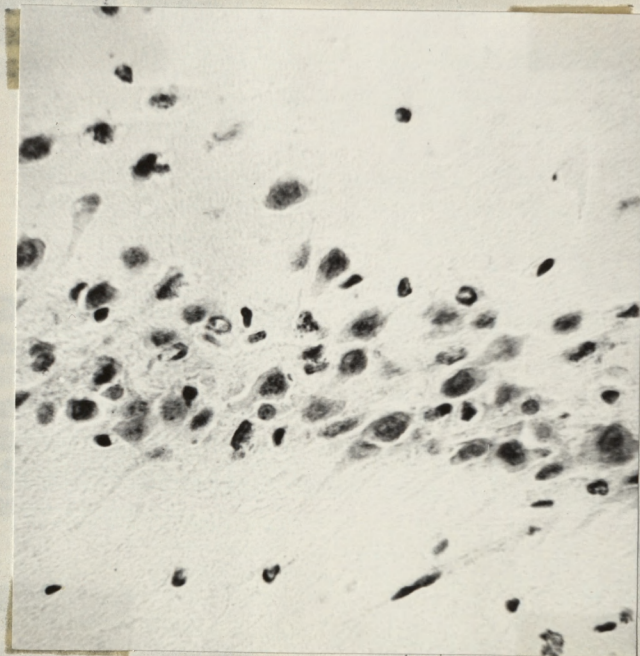
1. Am - Nucleus amygdaloideus
2. FH - Fimbria hippocampi
3. HI - Hippocampus
4. St - striatum
5. Th - thalamus
6. TO - tractus opticus
7. V I - ventriculus lateralis
8. V III - ventriculus tertius

■ - obszar występowania zmian martwiczych ogniskowych lub rozlanych

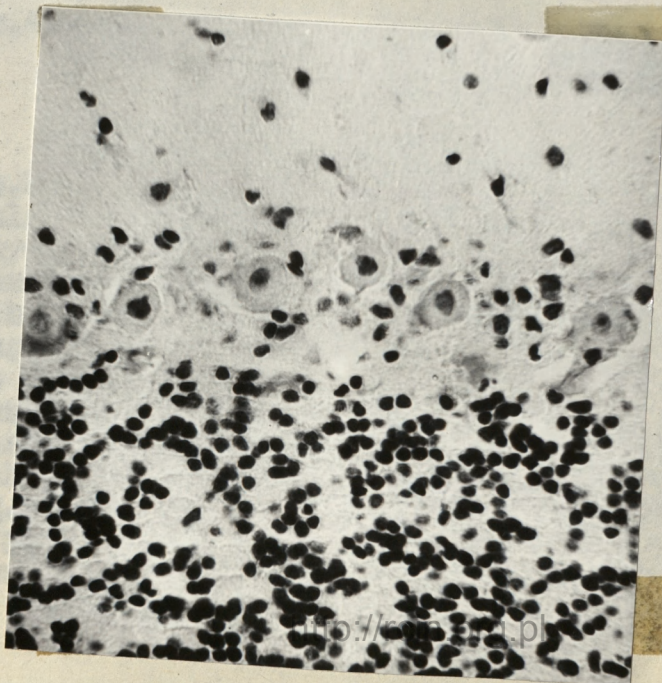
+ + - lokalizacja zmian zwyrodnieniowych - rozlanych



Ryc.19  
Zwyrodnienie komórek nerwowych /schorzenie typu ciężkiego i ischemicznego Nissla/ w korze mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Widoczny odczyn glejowy w okolicy uszkodzonych neurocytów. Model Levine a, 24 godz. po niedotlenieniu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 x.

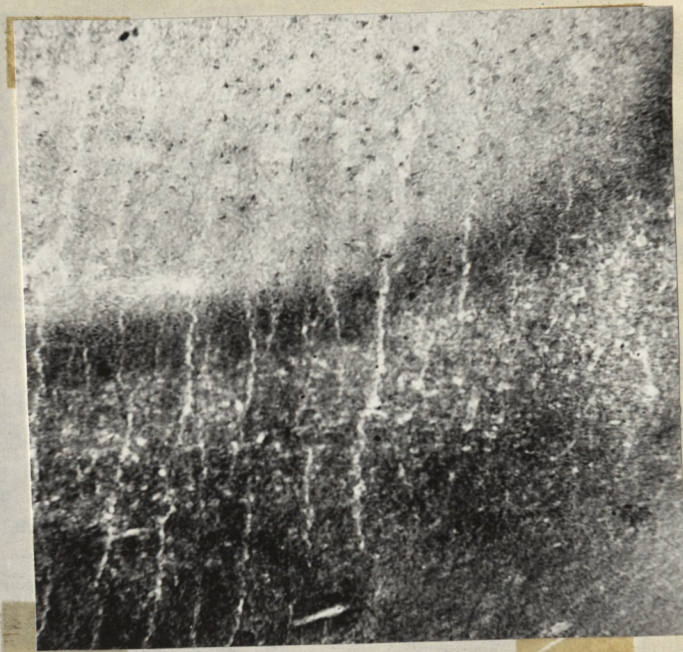


Ryc.20  
Zwyrodnienie komórek dwupiramidowych zwoju Hippokampa w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Widoczne pojedyncze leukocyty, leżące luźno w tkance. Model Levine a, 24 godz. po niedotlenieniu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 x.

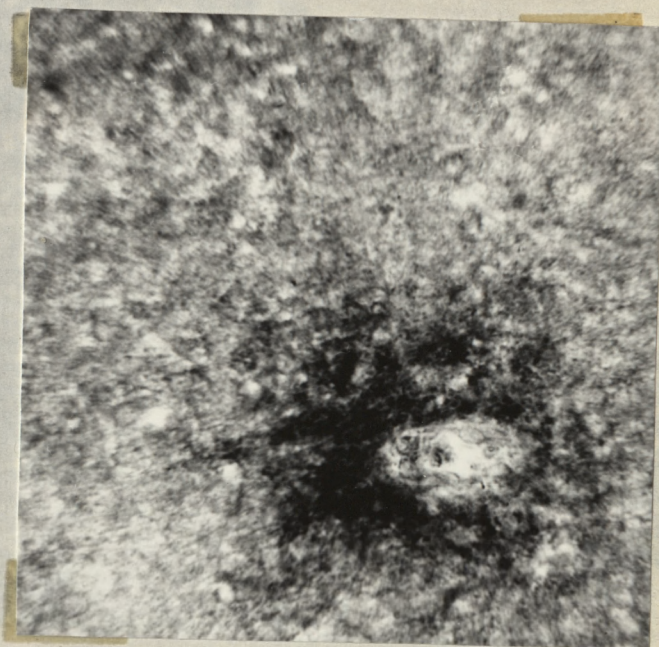


Ryc.21  
Schorzenie ischemiczne komórek Purkinjego mózdzku Model Levine a 24 godz. po niedotlenieniu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 x.

Ryc.22.  
 Ostra granica  
 zeniku aktyw-  
 ności SDH w ko-  
 rze mózgu po  
 stronie podwią-  
 zanej tętnicy  
 szyjnej wspólnej.  
 Na tle zanikłej  
 aktywności enzy-  
 matycznej w neuro-  
 pilu widoczne as-  
 trocyty wykazują-  
 ce utrzymeny od-  
 czyn na DH-azę  
 bursztynianową.  
 Model Levine a  
 24 godz.po niedo-  
 tlenieniu.Pow.  
 100 x.

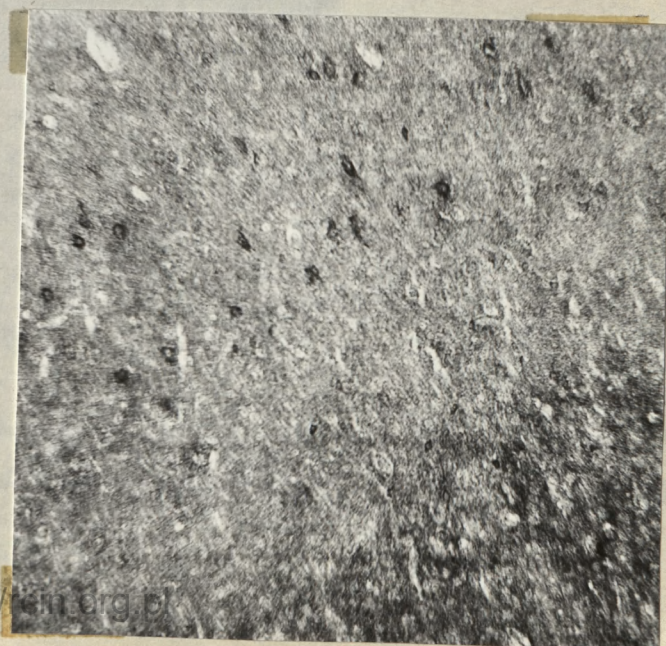


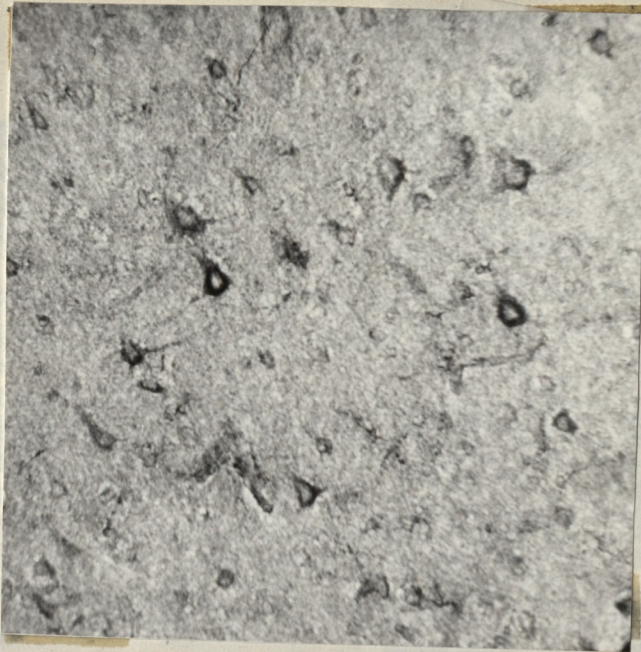
Ryc.23  
 Rozlane obniżenie  
 aktywności SDH we  
 wzgórzu wzrokowym,  
 po stronie podwią-  
 zanej tętnicy szyj-  
 nej wspólnej.Zacho-  
 wana wysoka aktyw-  
 ność neuropilu w  
 otoczeniu haczyka.  
 Model Levine a  
 24 godz.po niedo-  
 tlenieniu.



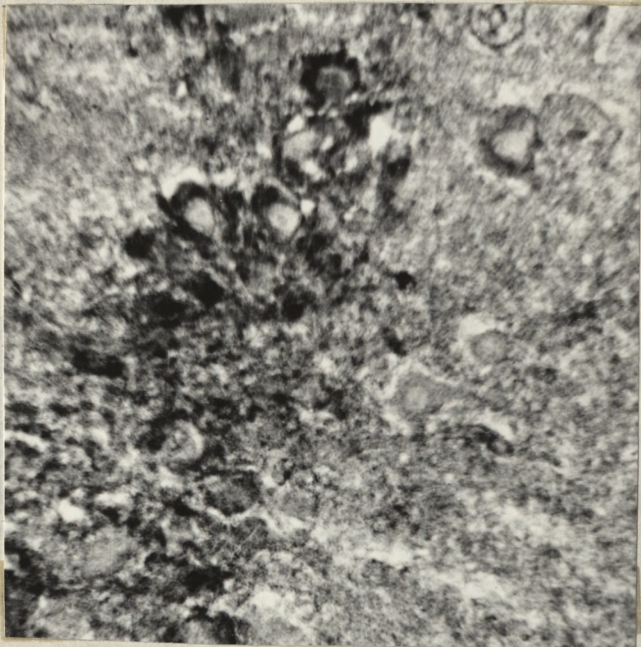
Pow.400 x.

Ryc.24  
 Rozlane obniżenie  
 aktywności SDH w  
 neuropilu głębo-  
 kich warstw kory  
 mózgu.Widoczne w  
 tle neurocyty wy-  
 kazują nierówno-  
 mierne natężenie  
 reakcji enzymatycz-  
 nej.Model Levine a  
 24 godz.po niedo-  
 tlenieniu.Pow.100x.

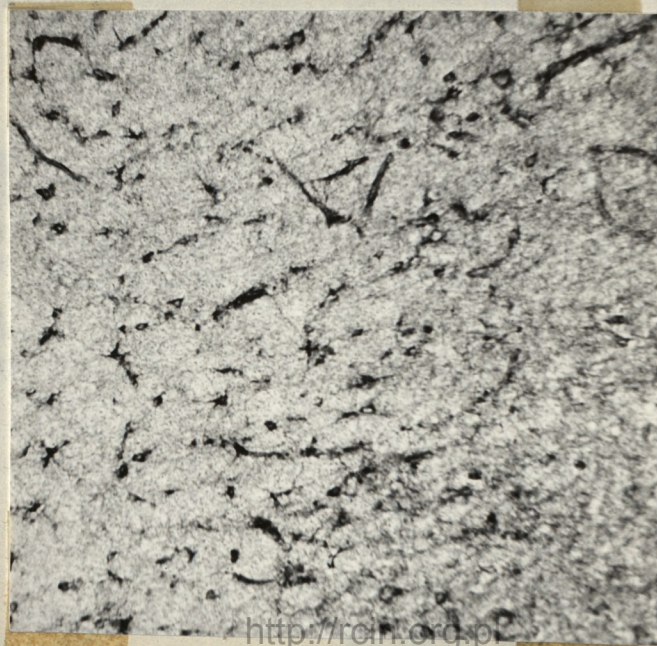




Ryc.25  
Nierównomierne obniżenie aktywności DHG6P w komórkach nerwowych warstwy V kory mózgu na tle zniesionej aktywności neuropilu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a 24 godz. po niedotlenieniu. Pow.200x



Ryc.26  
Nierównomierny rozkład aktywności DHG6P w komórkach dwupiramidowych zwoju Hippokampa po stronie przeciwległej do podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a, 24 godz. po niedotlenieniu. Pow.400 x.

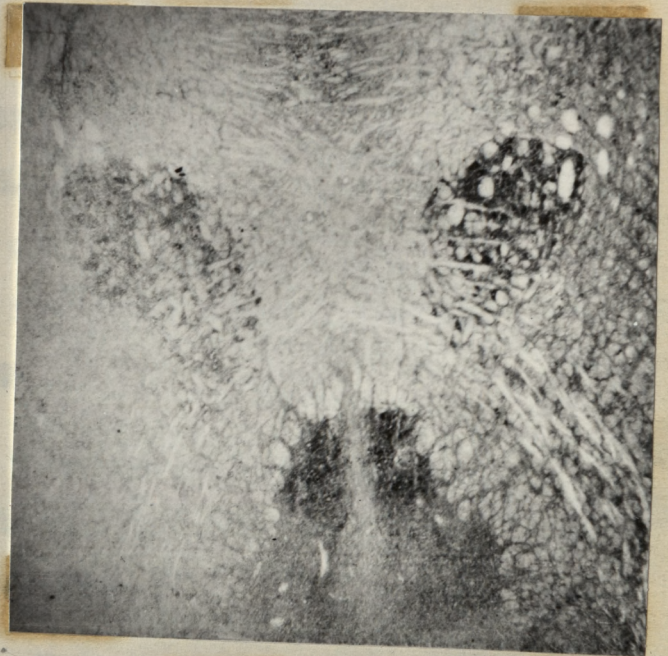


Ryc.27  
Wybitne wzmożenie aktywności DHG6P w gleju istoty białej położonej pod ogniskiem uszkodzenia kory oraz w jego obrębie na półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Model Levine'a, 24 godz. po niedotlenieniu. Pow. 200 x.

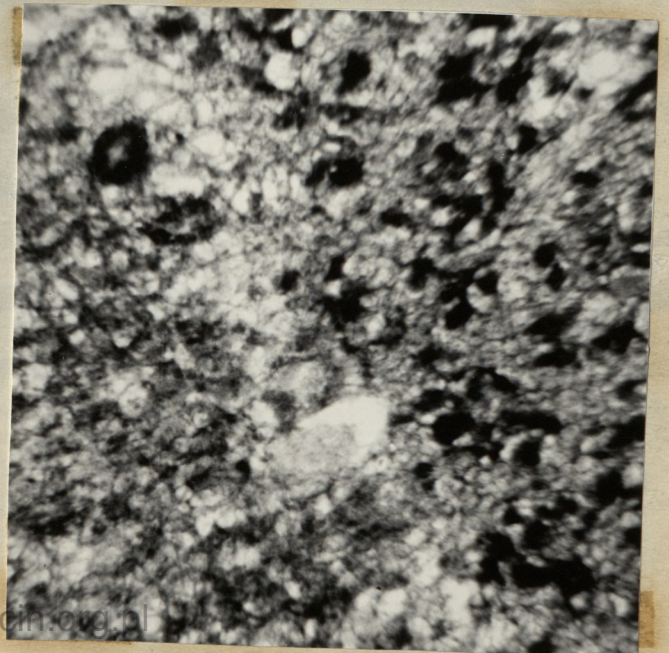
Ryc.28  
Obniżenie aktywności enzymatycznej DHG6P w neuropilu głębokich warstw kory z równoczesnym wzmożeniem aktywności w astrocytach kory i istoty białej, występujące po stronie przeciwległej do podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej.  
Model Levine'a, 24 godz.po niedotlenieniu.  
Pow. 200 x.



Ryc.29  
Jednostronny zanik aktywności SDH w śródmózgowiu/jądro nerwu III i V/.  
Model Levine'a 24 godz.po niedotlenieniu.  
Pow. 30 x.



Ryc.30  
Nierównomierny zanik aktywności SDH w komórkach Purkiniego w mózdzku.  
Model Levine'a, 24 godz.po niedotlenieniu.  
Pow. 400 x.



P I S M I E N N I C T W O

1. Adam H. - Adenosine 5<sup>o</sup> - triphosphate determination with Phosphoglycerate Kinase. In: Methods of Enzymatic Analysis. Ed. by H.U. Bergmeyer, Acad. Press 1963, 539-543.
2. Adams J.H., Brierley J.B., Connor R.C.R., Treip C.S. - The Effects of systemic hypotension upon the human brain. Clinical and neuropathological observation in 11 cases. Brain 1966, 89, 255-268.
3. Adamsons K.Jr., Behrman R., Dawes G.S., Dewkins M.J., James L.S., Ross B.B. - The treatment of acidosis with alkali and glucose during asphyxia in fetal Rhesus Monkeys. J. Physiol. /Lond./ 1963, 169, 679-686.
4. Albaum H.G., Noell W.K., Chinn H.J., - Chemical changes in rabbit brain during anoxia. Am. J. Physiol. 1953, 174, 408-416.
5. Ames A.III., Gurian B.S. - Effects of glucose and oxygen deprivation on function of isolated mammalian retina. J. Neurophysiol. 1963, 26, 617-634.
6. Ames A.III., Wright R.L., Kowada M., Thurston J.M., Mojno G., Cerebral ischaemia /II. The no-reflow phenomenon/ Am. J. Path. 1968, 52, 437-447.

7. Aschford G.A., Dixon K.C. - The effect of potassium on glucolysis of brain tissue with reference to the Pasteur effect. *Biochem.J.* 1935, 29, 157.
8. Atkinson J.N.C., Spector R.C. - Metabolism of glucose in anoxic-ischaemic rat brain. *Brit.J.Exp. Pathol.* 1964, 45, 393-397.
9. Bezen N.C., Cummings M. - The turnover of brain fatty acids following decapitation or convulsions. In: *Second International Meeting of the Society for Neurochemistry*. Ed.: R.Paoletti, R.Fumegalli C.Galli. Milano 1969, 83-84.
10. Bekey L., Lee J.C. - Electron microscopy of cat brain after hypoventilation. *J.Neuropathology* 1967, 26, 169-170
11. Brierley J.B., Excell B.J. - The effects of profound systemic hypotension upon the brain of rhesus monkey. - Physiological and pathological observations. *Brain* 1966, 89, 269-298.
12. Becker N.H. - The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in rats. II. Alternation in neuronal mitochondria identified by DPN and TPN-diphosphorases. *J.An.Pathol.* 1961, 38, 587-597.
13. Becker N.H. - The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in neuronal Golgi Apparatus identified by nucleosidediphosphatase activity. *Am.J.Pathol.* 1962, 40, 243-252.



14. Becker N.H., Barron K.D. - The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephelopathy in rats. I. Alternation of neuronal lysosomes identified by acid phosphatase activity. *Am. J. Pathol.* 1961, 38, 161-175.
15. Bernelli-Zazzera A., Bassi M., Cassi E. - Metabolism of isolated cortex from hypoxic rats. *Experimental Cell Res.* 1959, 18, 554-559.
16. Bradley P.B., Eysrs J.T., Schmelbach K. - EEG of normal and hypothyroid rats. *Electroencephalogram Clin. Neurophysiol.* 1960, 12, 467-477.
17. Brady R.O. - Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids. Ed: R.O. Brady, D.B. Tower; N. York, 1960, p.113.
18. Brierley J.B. - The influence of brain swelling, age and hypotension upon the pattern of cerebral damage in hypoxia. In: *Proc. Fifth Internat. Congress of Neuropathology.* Ed: F. Lathy, A. Bishoff. *Excerpta Med. Fand., Amsterdam* 1966, p.2.
19. Brierley J.B., Brown A.W. - Evidence for early anoxic-ischaemic cell damage in rats brain. *Experientia* 1966, 22, 546-547.
20. Brockman S.K., Jude J.R. - Tolerance of dog brain to total arrest of circulation. *Bull. John Hopkins Hosp.* 1960, 106, 74-80.

21. Broniszewska-Ardelt B., Domańska-Jenik K. - Wpływ jonów potasu na przemianę glukozy w mózgu. Prace w przygotowaniu do druku.
22. Brown A.W., Brierley J.B. - The nature, distribution and earliest stage of anoxic-ischaemic nerve cell damage in rat brain as defined by optical microscopy. *Brit. J. Exp. Pathol.* 1968, 49, 87-98.
23. Brown J., McLean P., Greenbaum A.L. - Influence of thyroxine and luteinizing hormone on some enzyme concerned with lipogenesis in adipose tissue, testis and adrenal gland. *Biochem. J.* 1966, 101, 197-203.
24. Brucher J.M. - Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. In: Carbon monoxide poisonings. Progress in Brain Res., Ed: H. Bour, J. McA. Ledingham., Elsevier, Amsterdam 1967, 24, 96-100.
25. Buell M.V., Lowry O.H., Roberts N.R., Cheng L.L., Kapplahn J.J. - The quantitative histochemistry of the brain. V. Enzymes of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 1958, 232, 979-992.
26. Burt A.M., Wenger B.S. - Glucose-6-phosphate Dehydrogenase activity in the brain the developin chick. *Devel. Biol.* 1961, 3, 84-95.

27. Cahill G.F.Jr., Hastings A.B., Ashmore J., Zottu S. - Studies of carbohydrate metabolism in rat liver slices. X. Factors in the regulation of pathways of glucose metabolism. *J.Biol.Chem.* 1958, 230, 125-135.
28. Cain D.F. - Biosynthesis of RNA in slices of guinea pig cerebral cortex. *J.Neurochem.* 1967, 14, 1175-1178.
29. Chaczetrian G.S. - Biochemia głównowo mozga pri normalnych fiziologiczeskich usłowisch. *Gieksosomon fosfatnyj sznut w mozgu.* Jerewan, 1967, 138-152
30. Cohen M.M. - The effect of anoxia on the chemistry and morfology cerebral cortex slices "in vitro". *J.Neurochem.* 1962, 9, 337-340.
31. Cohen M.M., Hartman J.F. - In: *Morfological and biochemical correlates of neural activity.* Ed.: M.M.Cohen, R.S.Snider, N.York 1964, chapt.4
32. Cohen P.P. - Suspending media for animal tissues. In: *Monometric Techniques.* Ed.: W.W.Umbreit. Burgess Pub.Co.1957, 147-150.
33. Cohen J.P. - The effects of decreased oxygen tension on cerebral circulation, metabolism and function. In: *International Symposium on the Cardiovascular and Respiratory Effects of Hypoxia.* Ed.: J.D. Hatcher, D.B. Jennings. Pub.by S.Karger: Basel, N.York, 1966, 81-104.

34. Cohen J.P., Wollman H., Alexander S.C., Chase P.E., Smith T.C., Melman E., Behar M.G., Procesi H.L. - Cerebral circulation, carbohydrate utilization and the electroencephalogram of conscious man during hypoxia. *Federation Proc.* 1964, 23, 521.
35. Crowell J.W., Smith E.E. - Effects of fibrinolytic activation on survival and cerebral damage following periods of circulatory arrest. *Am.J.Physiol.* 1956, 186, 283-285.
36. Dąbbska M., Kahl-Kunstetter J. - Topografia uszkodzeń komórek nerwowych w przypadku "cardiac arrest". *Neuropatologia Polska* 1964, 2, 225-235.
37. Devlin T.M., Baznes N.S., Pruss M.P. - Inhibition of mitochondrial respiration and phosphorylation by 6-phosphogluconic acid. *Biochim.Biophys. Res.Comm.* 1964, 17, 4-12.
38. De Robertis E. - Some new microscopical contributions to the biology of neuroglia. In: *Biology of Neuroglia*. Ed. by E. de Robertis, R. Carrea; Elsevier Pub. Comp. 1965, 1-11.
39. Dickens F., Greville G.D. - The metabolism of normal and tumor tissue. XIII. Neutral salt effects. *Biochem. J.* 1935, 29, 1468.

40. Dreyfus P.M. - Microchemical enzyme studies of rat nervous system in experimental thiamine deficiency. *Acta Neurol.Scand.*1962, 38, 69-70.
41. Dreyfus P.M., Moniz R. - The quantitative histochemical estimation of transketolase in the nervous system of rat. *Biochim.Biophys. Acta* 1962, 65, 181-189.
42. Drinker C.K. - Carbon monoxide asphyxia. *Pub.:Un. Press; N.York-Oxford*, 1938, 133-135/. Cyt. wg.Van Lieré E.J. Stickney J.C. - Hypoxia-*Un.Chicago Press* - 1963, p.278.
43. Edstrom R.F.S., Essex H.F. - Swelling of brain induced by anoxia. *Neurology* 1956, 6, 118-124.
44. Elliot K.A.C., Heller J.H. - Metabolism of neurons and glia. In: *Metabolism of the nervous system*. Ed.: D.Richter.Pergamon Press,London 1957, p.286.
45. Friede R.L. - Cerebellar Edema - A metabolic and cell statistical analysis. *Arch.Neurol.*1963, 8, 67-81.
46. Friede R.L. - *Topographic brains chemistry*.Acad.Press, N.York-London, 1966.
47. Friede R.L. - The cytochemistry of normal and reactive astrocytes. *J.Neuropath.Exp.Neurol.*1962, 21, 471-478.

48. Friede R.L. - Enzyme histochemistry of neuroglia.  
In: Biology of Neuroglia.  
Ed. by E. De Robertis, R. Carrea; Elsevier  
Pub. Comp. 1965, 35-47.
49. Friede R.L., Fleming L.M., Knoller M. - A comparative  
mapping of enzyme involved in HMS and  
Citric Acid Cycle in the brain.  
J. Neurochem. 1963, 10, 263-277.
50. Friede R.L., Van Houten W.H. - Relations between post-  
mortem alternation and glycolytic metabo-  
lism. Exp. Neurol. 1964, 4, 197.
51. Gastaut H., Fischgold H., Meyer J.S. - Conclusions  
of the International Colloquium on Anoxia  
and EEG. In: Cerebral anoxia and the  
electroencephelogram.  
Ed: J.S. Meyer, H. Gastaut. Springfield,  
1961, 599-617.
52. Geiger A. - Correlation of brain metabolism and  
function by use of a brain perfusion  
method in situ.  
Physiol. Rev. 1958, 38, 1-20.
53. Glock G.E., McLean P. - Properties and assay of  
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and  
6-Phosphogluconate Dehydrogenase of rat  
liver. Biochem. J. 1953, 55, 400.

54. Glock G.E., McLean P. - Further Studies on the properties and assay of GGP-DH and GPGA-DH of rat liver.  
Biochem.J. 1953, 55-59.
55. Gomez C.J., Guglielmo A.E.R. - Influence of neonatal thyroidectomy on glucose-amino acid interrelation in developing rat cerebral cortex. J.Neurochem.1967, 14, 1119-1123.
56. Guerra R.M., Melgar E., Villavicencio M. - Alternative pathways of glucose metabolism in fetal rat brain.  
Biochim.Biophys.Acta 1967, 148, 356-361.
57. Hertz L., Clausen T. - Effect of potassium and sodium on respiration. Biochem.J.1963, 89, 526-533.
58. Hess R., Scarpelli D.G., Pease A.G.E. - The cytochemical localization of oxidative enzymes.II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenase. J.Biophys.Biochem.Cytol.1958,4, 753-760.
59. Heymans C. - Wytrzymałość, przeżycie i zdolność powrotu do życia ośrodków nerwowych po zatrzymaniu krążenia. Acta Physiol.Pol.1961 12, 1-9.
60. Heymans C. - Arch.Neurol.Psychiat.1937, 38, 304.  
Cyt.wg.: Van Liere E.J. Hypoxia. Univ. Chicago Press, 1963.

61. Hicks S.P. - Brain metabolism "in vivo". The distribution of lesions caused by cyanide poisoning in rats.  
Arch. Pathol. 1950, 49, 111-137.
62. Higgins E.S. - Stimulation of phosphogluconate pathway in rat brain mince by ethanol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963, 114, 591-595.
63. Hillman H.H., Mellweing H. - Membrane potentials in mammalian cerebral tissues in vitro: dependence on ionic environment.  
J. Physiol. 1961, 157, 263-278.
64. Hills C.P. - The ultrastructure of anoxic-ischaemic lesions in the cerebral cortex of the adult rat brain. Guy's Hosp. Rep. 1964, 113, 333-348.
65. Hills C.P., Spector R.C. - Anoxia and cerebral water content in the adult rat. Nature 1963, 199, 393.
66. Hodgkin A.L. - The conduction of the nervous impulse  
Liverpool Univ. Press, 1964, 36-46.
67. Horn H.D., Bruns F.H. - Quantitative Bestimmung von L/+/- Milchsäure mit Milchsäure dehydrogenase. Biochim., Biophys. Acta 1956, 21, 378-380.
68. Hoskin F.C.G. - Effect of inhibitors on the metabolism of specifically labelled glucose by brain. Biochim. Biophys. Acta 1960, 40,



69. Heskin F.G.G. - Chemical stimulation and modification of glucose metabolism by brain. Arch. Biochem. Biophys. 1960, 91, 43-46.
70. Hotts S.S. - Glucose metabolism by brain tissue: The hexosemonophosphate shunt and its role in glutathione reduction. J. Neurochem. 1962, 9, 43-51.
71. Hugget A.G., Nixon D.A. - Enzymatic Determination of Blood Glucose. Biochem. J. 1957, 66, 12 p.
72. Jilek I., Fischer J., Krulich L., Trojan S. - The reaction of the brain to stagnant hypoxia and anoxia during ontogeny. Prog. Brain Res. 1964, 9, 113-131.
73. Kennedy R.P. - Biosynthesis of phospholipides. Fed. Proc. 1957, 16, 847.
74. Kety S.S. - Regional circulation of the brain under physiological condition. Possible relationship to selective vulnerability. In: Selective vulnerability of the brain to hypoxaemia. Ed.: J.P. Schade; Oxford 1963, 21-26.
75. Kini M.M., Quastel J.H. - Effects of veratrine and cocaine on cerebral carbohydrate-amino acids interrelation. Science 1960, 131, 412-414.

76. Klüver H., Berrere E. - A method for combined staining of cells and fibers in nervous system. J.Neuropathol.Exp.Neurol.1953, 12,400-404.
77. Korzhals J. - Doświadczalne niedokrwienie mózgu u królika. Klinika i morfologia. Neuropet. Pol.1969, 7, 113-160.
78. Kowada M., Ames A.III., Majno G., Wright R.L. -Cerebral ischaemia. I. An improved experimental method for study cardiovascular effects and demonstration of early vascular lesion in the rabbit. J.Neurosurg. 1968, 28, 150-157.
79. Kress M.E., Labella F.S. - Hexosemonophosphate shunt in endocrine tissues. Quantitative estimation of the pathway in bovine pineal body, anterior pituitary, posterior pituitary and brain. Biochim.Biophys.Acta, 1967, 148, 384-391.
80. La Due J.S., Wróblewski P., Karvon A. - Serum glutamic-oxaloacetic transaminase. Science 1954, 120 497-499.
81. Leupert P. - The selective vulnerability of the brain to anoxia. Canad.Med.Assoc.J., 1961, 84, 1172-1176.
82. Levine S. - Anoxic-ischaemic encephalopathy in brain. Am.J.Pathol.1960, 36, 1-18.

83. Levine S., Hirano A., Zimmerman H.M., - Experimental cyanide encephalopathy. E.M. observation of early lesions in white matter.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1967, 26, 172-174.
84. Lindenberg R. - The pathology of the arterial border zones of the brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1959, 18, 348-349.
85. Lolley R.N., Samson F.E., Jr. - Cerebral high-energy compounds: Changes in anoxia. Am. J. Physiol. 1962, 202, 77-79.
86. Lowry O.H., Passonneau J.V. - The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain.  
J. Biol. Chem. 1964, 239, 31-42.
87. Lowry O.H., Passonneau J.V., Hasselberger F.X., Schulz D.W. - Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. Biol. Chem. 1964, 239, 18-20.
88. Lowry O.H. - Enzyme concentration in individual nerve cell bodies. In: Metabolism of the Nervous System.  
Ed.: Richter 1957, 323-328.

89. Layne E. - Protein estimation with Folin-Ciocalteu Reagent.  
In: Methods in Enzymology. Eds: S.P. Colowick  
N.O. Kaplan; Acad. Press. N. York, 1957, 3,  
448-450.
90. Lohr G.W., Walter H.D. - Glucose 6-phosphate Dehydrogenase.  
In: Methods of enzymatic Analysis. Ed.: H.U.  
Bergmeyer; Ac. Press, N. York, 1963, 744-754.
91. McDougal D.B., Jr., Holowach J., Howe M.C. - The effects of anoxia upon energy sources and selected metabolic intermediates in the brains of frog, fish and turtle. *J. Neurochem* 1968, 15, 577-588.
92. McDonald M., Spector R.G. - The influence of anoxia on respiratory enzymes in rat brain. *Brit. J. Exp. Pathol.* 1963, 44, 1-15.
93. McIlwain H. - Chemical exploration of the brain. - A study of cerebral excitability and ion movement. Elsevier; Amsterdam, N. York, London, 1963, 64-80.
94. McIlwain H. - Biochemistry and the Central Nervous System.  
Pub.: J. & A. Churchill L.t.d., London 1959

95. McLean P. - Carbohydrate metabolism of mammary tissue. III. Factors in the regulation of pathway of glucose metabolism in the mammary gland of the rat. *Biochem.J.* 1960, 37, 296-309.
96. McLean P., Brown J. - Activities of some enzymes concerned with citrate and glucose metabolism in transplanted rat hepatomas. *Biochem.J.* 1966, 98, 874-880.
97. Meyer J.S., Gotoh F., Tazaki Y., Hamaguchi K., Ishikawa S., Houeilhet F., Syanon L. - Regional cerebral blood flow and metabolism in vivo. *Arch.Neurol.Psych.* 1962, 7, 560-581.
98. Meyer A. - Anoxic poisons and the problems of anoxia and selective vulnerability. In: Greenfield's *Neuropathology*. Ed: by W.Blackwood, W.H. McMenemey, A.Meyer, R.M.Normen, D.S.Russell; London Publ.LTD, 1965/Sec.edytion/, p.257.
99. Miller J.A., Jr. - Hypothermia and anoxic survival of neonates. In: *International Symposium on Cardiovascular and Respiratory Effects of Hypoxia*. Ed: J.D.Hatcher, D.B. Jenniegs. Pub: S.Karger, 1966, 273-286.

100. Mossakowski M.J., Long D.M., Meyers R.E., DeCuret R.H., Klatzo I. - Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1968, 27, 500-523.
101. Nakazawa S. - RNA and protein synthesis in brain tissue during experimentally induced edema. *Brain Res.*, 1968, 7, 444-446.
102. Neely W.A., Ycumans J.R. - Anoxia of canine brain without damage. *J.A.M.A.*, 1963, 183, 1085-1087.
103. Newsholme E.A., Rolleston F.S., Taylor K. - Glucose 6-phosphate inhibition of heksokinase. *Biochem. J.* 1968, 106, 193-201.
104. Nowikoff A.B. - Lysosomes in nerve cells. In: *The Neuron*. Ed: Hyden H; Elsevier, 1967, 343-353.
105. Oksehe A. - Der histochemische nachweisbare Glykogenaufbau und -abbau in den Astrocyten und Ependymzellen. *Z. Zellforsch* 1961, 54, 307-361.
106. Osetowska E., Kusé H., Kawocki K. - L'image cerebrale du cardiac arrest chez le porcelet. *Acta Neurol. Psych. Belg.* 1968, 68, 85-94.

107. Ozawa K., Seto K., Takeda H., Ando K., Handa H.,  
Araki C. - On the isolation of mito -  
chondria with respiratory control from  
rat brain. *J. Biochem.* 1966, 59, 504-510.
108. Pasquini J.M., Kaplan B., Garcia Argiz C.A., Gomez C.J.  
- Hormonal regulation of brain develop -  
ment. *Brain Res.*, 1967, 6, 621-634.
109. Pearse A.G.E. - *Histochemistry Theoretical and Applied.*  
2 Ed: - Little, Brown and Comp., Boston  
1960, 911.
110. Potter V.R. - The homogenate techniques. In: *Manometric  
Techniques.* Ed: W.W. Umbreit; Burgess  
Pub. Co., 1957, 182-183.
111. Quastel J.H. Quastel D.M.J.: *Chemistry of the brain  
metabolism in health and disease.* Ed:  
J.N. Kugelmass, 1961, 104-112.
112. Racker E. - Carbohydrate metabolism in ascites tumor  
cells.  
*Ann. N. York Acad. Sci.*, 1956, 63,  
1017-1021.
113. Reggi F., Eronfeld D.S., Kleiber M. - Glucose  
6-phosphatase activity in various  
sheep tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*,  
1960, 105, 485-486.

114. Ridge J.W. - The Distribution of Cytochrome Oxidase Activity in Brain of Rabbit. *Biochem.J.* 1967, 102, 612-617.
115. Ridge J.W. - Resting and stimulated respiration in vitro in the CNS. *Biochem.J.* 1967, 105, 831-836.
116. Rivers A., Jr. Bramm A.W., Jr. Miller J.R., Myers R.E. - Brain glycogen content of monkey new-borns and juveniles recovering from asphyxia and circulatory arrest respectively. In: Second International Meeting of the Interst. Soc. for Neurochem. Eds: R. Paoletti, R. Fumagalli, C. Celli, Milano, 1969, 342-343.
117. Rolleston F.S., Newsholme E.A. - Control of glycolysis in cerebral cortex slices. *Biochem.J.* 1967, 104, 524-533.
118. Rosomoff H.L., Meladay D.A. - Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypotermia. *Am.J.Physiol.* 1954, 179, 85-88.
119. Sacks W. - Cerebral metabolism of isotopic glucose in normal human subjects. *A.Appl. Physiol.* 1957, 10, 37-40.



120. Scholz W. - Topistic lesions, In: Selective vulnerability of the brain to hypoxemia. Ed: J.P.Schade. Oxford, 1963, 257-267.
121. Spector R.G. - Cerebral SDH, Cytochrome Oxidase and MAO activity in experimental anoxic brain damage. Brit.J.Exp.Pathol.1963, 44, 251-254.
122. Spector R.G. - Selective changes in DH-system and pyridine nucleotides in rat brain in anoxic-ischaemic encephalopathy. Brit. J.Exp.Pathol.1963, 44, 312-316.
123. Spector R.G. - In vitro respiration of anoxic-ischaemic rat brain. Guy's Hosp.Rep.1964, 115, 305-309.
124. Spector R.G. - Enzyme chemistry of anoxic brain injury. In: Neurochemistry. Ed: C.W.M. Adams; Elsevier, 1965, 551-553.
125. Stahl W.L., Smith J.C., Napolitano L.M., Besford R.E.- Isolation of bovine brain mitochondria. J.Cell Biol.1963, 19, 293-307.
126. Stefanko S., Iwanowski L., Rafelowska J., Sobkiewicz I. W sprawie zaburzeń krążenia w obszarze "ostatniej ręki" w obrębie wzgórza. Neurol. Neurochir.Psych.Pol., 1965, 15, 25-30.

127. Stewart M.A., Moonsemy G.J. - Substrate changes in peripheral nerve recovering from anoxia. *J. Neurochem.* 1966, 12, 1433-1439.
128. Swenson P.D. - The effects of oxygen deprivation on electrically stimulated cerebral cortex slices. *J. Neurochem.* 1969, 16, 35-45.
129. Takemori A.E. - Effects of cerebral depressant agents on cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of rats. *J. Neurochem.* 1965, 12, 407-415.
130. Tews J.K., Carter S.H., Roe P.D., Stone W.P. - Free aminoacids 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 pentylenetetrazol. *J. Neurochem.* 1963, 10, 641-653
131. Then T.T., Bloch K. - On mechanism of enzymatic cyclization of squalene. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 941.
132. Thorn W., Scholl H., Pfleiderer G., Muehdener B. - Metabolic processes in the brain at normal and reduced temperatures and under anoxic and ischaemic condition. *J. Neurochem.*, 1958, 2, 150-165.

- 4
133. Thurston J.H., McDougal D.B., Jr. - Effect of ischaemia on metabolism of the brain of the newborn mouse. *Am.J.Pathol.* 1969, 216-218.
134. Tschirgi R.D., - Glucose and brain function. In: *Handb. of Physiol.* Ed: J.Field, Washington, 1960, 1881-1884.
135. Van den Bergh R. - La vascularisation arterielle intracérébrale. *Acta Neurol.Belgica*, 1961, 11 1013-1023.
136. Van Herreveld A., Tyler D.B. - Metabolism of asphyxiated spinal cord. *Am.J.Physiol.* 1942, 138, 140-148.
137. Van Liere E.J., Stickney J.C. - Chemical changes in the blood during hypoxia. In: *Hypoxia.* Ed: Van Liere E.J., Stickney J.C.; Univ. Chicago Press, 1963, 61-75.
138. Webster H.F., Ames A.III. - Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. *J.Cell Biol.*, 1965, 26, 885-909.
139. Zeman W. - Histochemical and metabolic changes in brain tissue after hypoxaemia. In: *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia.* Ed: J.P.Schade, Oxford, 1963, 327-348.

140. Yap S.L., Spector R.G. - Intracellular enzyme changes  
in post-anoxic rat brain. Brit.J.Exp.  
Pathol.1965, 46, 422-433.

