

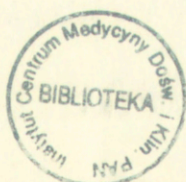
LS 240

H3021

Jan Albrecht

WPLYW NIEDOTLENIEŃ I NIEDOKRWIENIA  
NA METABOLIZM RNA W MÓZGU

Rozprawa habilitacyjna



YS 240  
H3021

CENTRUM MEDYCYN Y DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Warszawa, 1979 r.

Składam gorące podziękowanie Panu Profesorowi Mirosławowi J. Mossakowskiemu, Kierownikowi Zespołu Neuropatologii CMDiK PAN, za umożliwienie wykonania badań w kierowanym przez Niego Zespole oraz za krytyczne zapoznanie się z maszynopisem rozprawy. Ponadto serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Takehiko Yanagihara, Kierownikowi Pracowni Neurochemicznej Wydziału Neurologicznego Kliniki Mayo w Rochester, Minnesota /USA/, za udostępnienie warsztatu badawczego w Jego Pracowni.

Szczególne wyrazy uznania należą się Pani Ewie Ohde i Panu Sławomirowi Januszewskiemu z CMDiK PAN oraz Paniom Joan M. Brengman i Maryanne Edens z Kliniki Mayo za niezwykle staranną i sprawną pomoc techniczną przy wykonywaniu pracy.

## Spis treści

	str.
1. Wstęp .....	1
1.1. Niedokrwienie i niedotlenienie a biosynteza białka w mózgu .....	1
1.2. Związek zaburzeń biosyntezy białka z metabolizmem RNA .....	3
1.3. Wybór metody badania metabolizmu RNA w mózgu .....	5
1.4. Kryteria identyfikacji mRNA znakowanych radioaktywnymi prekursorami .....	7
2. Cel pracy .....	9
3. Materiał i metody .....	11
3.1. Model niedotlenienia .....	11
3.2. Model niedokrwienia .....	12
3.3. Włączanie radioaktywnych prekursorów do RNA .....	13
3.4. Otrzymywanie frakcji podkomórkowych .....	13
3.5. Izolacja RNA z jąder komórkowych, polirybosomów i cytoplazmy .....	15
3.6. Chromatografia kolumnowa na oligo/dT/ celulozie .....	17
3.7. Ultrawirowanie w gradiencie sacharozy .....	18
3.8. Oznaczanie zawartości RNA i DNA oraz pomiary radioaktywności .....	18
3.9. Oznaczanie radioaktywności fragmentu poliadenylowego w preparatach jądrowego RNA znakowego <sup>3</sup> H-adenozyną .....	19
3.10. Oznaczanie aktywności poli/A/ polimerazy /adenylilotransferazy ATP: polinukleotyd. E.C.2.7.7.19/ .....	20

3.11. Badanie aktywności rybonukleaz we frakcjach podkomórkowych .....	21
4. Charakterystyka syntezy RNA w układzie in vitro na skrawkach mózgu królika i chomika mongolskiego	23
4.1. Uwagi wstępne .....	23
4.2. Synteza RNA w warunkach kontrolnych .....	24
4.3. Wpływ aktynomycyny D na syntezę RNA .....	29
4.4. Omówienie i wnioski .....	33
5. Synteza poli(A) <sup>+</sup> RNA i poli(A) <sup>-</sup> RNA w warunkach całkowitego niedotlenienia in vitro .....	36
5.1. Uzasadnienie wyboru modelu i czasu niedotlenienia .....	36
5.2. Włączanie <sup>3</sup> H-urydyny do poli(A) <sup>+</sup> RNA i poli(A) <sup>-</sup> RNA w jądrach i cytoplazmie .....	38
5.3. Omówienie i wnioski .....	44
6. Poliadenylacja a synteza jądrowego RNA w warunkach niedotlenienia .....	49
6.1. Założenie badań i układ doświadczalny .....	49
6.2. Włączanie <sup>3</sup> H-adenozyny do poli(A) i RNA ....	50
6.3. Aktywność polimerazy poli(A) .....	51
6.4. Omówienie i wnioski .....	54
7. Wpływ niedotlenienia na syntezę RNA .....	58
7.1. Charakterystyka modelu i uzasadnienie wyboru czasu przeprowadzania niedokrwienia .....	58
7.2. Wyniki .....	61
7.3. Omówienie i wnioski .....	63
8. Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na aktywność rybonukleaz mózgu .....	67
8.1. Założenie badań .....	67
8.2. Aktywność rybonukleazy kwaśnej i zasadowej w warunkach kontrolnych .....	68
8.3. Aktywność rybonukleazy kwaśnej i zasadowej w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia ...	69

8.4. Omówienie i wnioski .....	71
9. Zaburzenia metabolizmu RNA a patomechanizm zmian towarzyszących niedotlenieniu i niedokrwie- niu .....	75
10. Podsumowanie i wnioski .....	88
Piśmiennictwo .....	90

## 1. W S T Ę P

### 1.1. Niedokrwienie i niedotlenienie a biosynteza białka w mózgu

Powszechnie wiadomo, że ośrodkowy układ nerwowy charakteryzuje się wyjątkową wrażliwością na towarzyszące niedotlenieniu bądź niedokrwieniu obniżenie stanu energetycznego jego tkanek. Fakt, że procesem o podstawowym znaczeniu dla zachowania struktury i funkcji, a jednocześnie wysoce zależnym od energii jest biosynteza białek, zwrócił uwagę szeregu badaczy na możliwość udziału jej zaburzeń w patomechanizmie uszkodzeń wywołanych niedotlenieniem i niedokrwieniem. Zgodnie z tym założeniem wykazano, że obniżenie aktywności biosyntezy białek jest cechą wspólną dla takich stanów mózgu jak: całkowite bądź częściowe niedotlenienie /Sanders i wsp. 1965, Albrecht 1972, Yanagihara 1972, 1973, 1975/, niedokrwienie /Kleihues i Hossman 1971, Albrecht 1972, Albrecht i wsp. 1972, Wasterlain 1974, Morrell 1977/, niedotlenienie skojarzone z niedokrwieniem /Yap i Spector 1965, Albrecht 1972, Albrecht i wsp. 1972/, zatrucie tlenkiem węgla /Albrecht 1973/, czy też asfiksja okołoporodowa /Holstein i Myers 1971/. To obniżenie obejmuje wszystkie typy komórek ośrodkowego układu nerwowego, chociaż obserwowano pewne różnice ilościowe w reakcji komórek nerwowych i glejowych oraz odrębności w dynamice powrotu zaburzonych procesów do normy

/Bloemstrand 1970, Albrecht i Smiałek 1975, Yanagihara 1976a/.

Zahamowanie biosyntezy białek w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia z reguły wiąże się ze spadkiem zawartości polirybosomów /Kleihues i Hossman 1971, Hartmann i Becker 1973, Albrecht 1973, 1974, Metter i Yanagihara 1974, Yanagihara 1976 a, Westerlain 1977/. Fakt ten wskazuje na szczególną wrażliwość któregoś z procesów związanych z tworzeniem się kompleksu inicjującego, większą niż samego procesu wydłużania /elongacji/ łańcucha polipeptydowego. Wnioskowanie takie jest zgodne z ustaleniami Nolla /1969/, który wykazał, że inicjacja biosyntezy białka wymaga wyższej energii aktywacji niż synteza wiązań peptydowych i elongacja łańcucha, przez co szybciej ulega zahamowaniu w warunkach niedoboru energetycznego. Bardziej bezpośrednio dowody rozprężenia inicjacji i elongacji w tych warunkach uzyskano dotychczas w kilku jedynie przypadkach. Doświadczenia własne wykazały, że ostre zatrucie tlenkiem węgla u szczura powoduje spadek zawartości polirybosomów w mózgu, natomiast pozostaje bez wpływu na zdolność zachowanych polirybosomów do włączenia aminokwasu do białek in vivo oraz in vitro /Albrecht 1973/. Cooper i wsp. /1977/ stwierdzili, że zdolność do syntezy białka preparatów polirybosomalnych z mózgu szczura poddanego całkowitemu niedokrwieniu nie ulega obniżeniu pod wpływem inhibitora inicjacji-kwasu poliinozylowego; inhibitor ten natomiast znacznie hamuje aktywność preparatów kontrolnych.



Podobną zależność zaobserwowali ostatnio Morimoto i wsp. /1976/ w stosunku do preparatów z mózgu królika poddanego krótkotrwałej anoksji, przy użyciu innego inhibitora inicjacji - kwasu aurynotrójkarboksylowego. Przytoczone powyżej wyniki wskazują na stosunkowo mniejszy wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na zdolność elongacyjną polirybosomów, niż na sam proces ich tworzenia. Warto nadmienić, że podobnie wybiórcze zahamowanie inicjacji zaobserwowali Cajone i wsp. /1971/ w niedokrwionej wątrobie.

## 1.2. Związek zaburzeń biosyntezy białka z metabolizmem RNA

O ile fakt względnie wysokiej wrażliwości inicjacji biosyntezy białka w mózgu na niedobór energetyczny można uznać za udowodniony, o tyle brak w piśmiennictwie danych na temat zachowania się w tych warunkach poszczególnych reakcji składających się na syntezę czynnego polirybosomu. Oczywista zależność aktywności łączenia się rybosomów z informacyjnym RNA /mRNA/ w polirybosomy od poziomu RNA w komórce, uzasadniła przyjęcie hipotezy roboczej, że w którymś stadium niedotlenienia lub niedokrwienia dochodzi do zaburzeń w syntezie RNA lub jego transporcie z jądra do cytoplazmy, a w efekcie do polirybosomów. Za słusnością takiego rozumowania przemawiała analiza wyników własnych badań w modelu ostrego zatrucia tlenkiem węgla. Jak przedstawiono w tabeli 1, dezagregacji polirybosomów towarzyszyło w tych warunkach znaczne obniżenie ich znakowania

in vivo radioaktywnym ortofosforanem, co interpretowano jako wyraz spadku włączania nowosyntetyzowanego RNA do frakcji polirybosomalnej. Inne badania w tym samym modelu wykazały obniżenie wbudowywania przyżyciowo podawanej <sup>3</sup>H-urydyny do RNA cytoplazmatycznego /Albrecht, 1976/.

Dla wyjaśnienia spadku zawartości polirybosomów w mózgu można było również przyjąć hipotezę alternatywną, zakładającą wzmożoną degradację mRNA-wolnego bądź związanego z polirybosomami. Mogło to być następstwem aktywacji rybonukleaz lub zwiększenia wrażliwości RNA na ich działanie. W dalszych badaniach wykazano, że w warunkach ostrego zatrucia tlenkiem węgla dochodzi do niewielkiego, przejściowego wzrostu aktywności rybonukleazy zasadowej w mózgu /Albrecht 1977a/, aczkolwiek brak jest danych świadczących o tym, że stan ten pociąga za sobą istotne zmiany w jakości RNA w cytoplazmie i polirybosomach. Morrell /1977/ zaobserwował, że polirybosomy mózgu chomika mongolskiego poddanego niedokrwieniu są 100-krotnie wrażliwsze na działanie podanej in vitro rybonukleazy z trzustki niż polirybosomy kontrolne. Jak dotychczas brak w piśmiennictwie bardziej szczegółowych danych na temat degradacji RNA w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia. Warto jednakże wspomnieć, że Roberts i Morelos /1976/ zwrócili uwagę na występowanie korelacji pomiędzy rozpadem polirybosomów a aktywacją rybonukleazy zasadowej w mózgu w warunkach doświadczalnej hiperfenyloalaninemi.

### 1.3. Wybór metody badania metabolizmu RNA w mózgu

Śledzenie syntezy i przemian RNA oparte jest na włączaniu doń promieniotwórczych prekursorów - głównie nukleozydów lub nieorganicznego ortofosforanu, co w przypadku mózgu wiąże się z problemem ich podawania. W dotychczas-

Tabela 1

Wpływ ostrego zatrucia tlenkiem węgla na włączanie in vivo <sup>75</sup>Se-selenometioniny oraz <sup>32</sup>P-nieorganicznego ortofosforanu do polirybosomów mózgu szczura oraz na stopień agregacji polirybosomów /Albrecht, 1973/

Grupa zwierząt	Radioaktywność polirybosomów /imp/min/A <sub>260 nm</sub> /		Procentowa zawartość polirybosomów w preparacie rybosomalnym
	<sup>75</sup> Se	<sup>32</sup> P	
Kontrolna	2731 <sup>±</sup> 330/5/*	422 <sup>±</sup> 97/5/	59,7 <sup>±</sup> 0,5/7/
Doświadczalna	2817 <sup>±</sup> 298/5/	190 <sup>±</sup> 67/5/	52,9 <sup>±</sup> 0,1/5/
	p > 0,05 **	p < 0,01	p < 0,001

Związki promieniotwórcze podawano domózgowo.

\*Wartości średnie<sup>±</sup> odchylenia standardowe. W nawiasach - liczba doświadczeń.

\*\*Oznaczano przy użyciu testu t Studenta.

sowych badaniach, włącznie ze wspomnianymi badaniami własnymi, stosowano podawanie przyżyciowe - bezpośrednio do mózgu, bądź poprzez układ krwionośny /Vesco i Guiditta 1967, Campagnoni i wsp. 1971, Oravec 1973, Kanig 1974, Yu i Gorbman 1978/. Przydatność metody przyżyciowej do bardziej

szczegółowych badań nad metabolizmem RNA w mózgu jest jednak z szeregu powodów ograniczona, a uzyskane przy jej użyciu wyniki wymagają ostrożnej interpretacji. Prekursory RNA charakteryzują się słabym przechodzeniem przy barierę krew-mózg, co utrudnia ich wydajne wbudowywanie do szybko metabolizującego się RNA, a zwłaszcza mRNA. W przypadku stosunkowo efektywnego podawania dokomorowego problemem jest nierównomierna dyfuzja prekursorów, co uniemożliwia równocenne ich włączenie do RNA w różnych strukturach czy też typach komórek /Altman i Chorover 1963, Berthold i Lim 1976 a,b, Yu i Gorbman 1978/.

W świetle powyższych zastrzeżeń wiele argumentów przemawia za stosowaniem metody włączenia radioaktywnych prekursorów in vitro do skrawków mózgu. Ominięcie bariery krew-mózg pozwala założyć wydajniejsze przechodzenie nukleozydów do tkanek mózgu, a ponadto, jak wykazał Yanagihara /1973/ w badaniach nad włączaniem radioaktywnych aminokwasów do białek mózgu, zastosowanie skrawków tkankowych o odpowiedniej grubości /300-400 $\mu$ / oraz starannie dobranych warunków inkubacji zapewni znaczną integralność tkanek oraz ich stosunkowo długą żywotność. W układzie opracowanym przez Yanagiharę /1974 b/ skrawki mózgu włączały <sup>3</sup>H-urydynę do RNA z niezmienną wydajnością przez okres 2 godz. Powyższe argumenty zdecydowały o zastosowaniu w niniejszej pracy metody włączenia radioaktywnych prekursorów do RNA w skrawkach mózgu jako podstawowego narzędzia badawczego.

#### 1.4. Kryteria identyfikacji mRNA znakowanych radioaktywnymi prekursorami

Z szeregu prac wiadomo, że w mózgu wbudowywanie radioaktywnych prekursorów do RNA frakcji cytoplazmatycznej lub polirybosomalnej przebiega w dwóch fazach. Krótco po ich podaniu /do około 60 min/, radioaktywność wykrywana jest przede wszystkim w nierybosomalnym RNA, podczas gdy włączenie do RNA rybosomalnego /rRNA/ o stałych sedymentacji 28S i 18S obserwuje się w okresie późniejszym. Prawidłowość ta występuje niezależnie od drogi podania prekursora /Vesco i Guiditta 1967, Campagnoni i wsp. 1971, Oravec 1973, De Guglielmone i Duvilansky 1977/, w związku z czym, wobec braku innych kryteriów, do niedawna na tej podstawie utożsamiano mRNA z klasą heterogennych, szybko znakujących się RNA.

W ostatnich latach wykazano, że większość eukariontycznych mRNA zawiera przyłączony kowalencyjnie do 3' końca fragment poliadenylowy /poli/A// o długości około 200 nukleotydów /Brewerman 1974, Perry 1976/. RNA zawierający poli/A/ /poli/A/<sup>+</sup> RNA/ występuje również w mózgu /De Larco i wsp. 1972, 1975 a,b, Bantle i Hahn 1976/ gdzie jego syntezę z udziałem radioaktywnych prekursorów udało się prześledzić w warunkach in vivo /De Larco i Guroff 1972, Bondy i wsp. 1977/ oraz in vitro /De Larco i Guroff 1972, Banks i Johnson 1973/. Polirybosomalny poli/A/<sup>+</sup> RNA charakteryzuje się dużą heterogennością, przy przewadze składni-

ków o stałej sedymentacji bliskiej 18S /Mahony i Brown 1975, Heikkilä i Brown 1977/, wśród których wyróżniono mRNA kodujący tubulinę /Gilmore-Hebert i Heywood 1976/. Obecność fragmentów poli/A/ znacznie ułatwia identyfikację poli/A/<sup>+</sup>mRNA, które można wyodrębnić metodą chromatografii powinowactwa /affinity chromatography/ na oligo/dT/-celulozie /Aviv i Leder 1972, Schechter, 1973/, poli/U/-Sephariozie /Molloy i wsp. 1974, Moore i wsp. 1977/, lub na sączkach miliporowych /Brawerman i wsp. 1971, Lee i wsp. 1971/. Te same metody stosuje się do rozdzielania heterogennego jądrowego RNA /hnRNA/ zawierającego fragmenty poli/A/.

Jak dotychczas nie opracowano jednoznacznego kryterium identyfikacji mRNA nie zawierających fragmentu poli/A/ /poliA/<sup>-</sup>RNA/, których występowanie w wielu tkankach udowodniono na podstawie badań ich aktywności matrycowej w syntezie białka /Milcarek i wsp. 1974, Nemer i wsp. 1974, Sierra i wsp. 1976, Sonenshein i wsp. 1976/. Jedynymi dobrze rozpoznanymi mRNA tej klasy są RNA kodujące histony /Adesnik i Darnell 1972/. Badań nad poli/A/<sup>-</sup>mRNA w mózgu dotychczas nie prowadzono.

## 2. CEL PRACY

Uwzględniając omówione we wstępie przesłanki, w niniejszej pracy podjęto próbę uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy i w jakim stopniu zmiany w biosyntezie białek w mózgu towarzyszące różnym okresom niedotlenienia i niedokrwienia związane są z zaburzeniami metabolizmu RNA, a zwłaszcza mRNA. Wśród elementów metabolizmu RNA uwzględniono jego syntezę w jądrach komórkowych, transport z jąder do cytoplazmy i polirybosomów oraz degradację w różnych frakcjach podkomórkowych. W badaniach posłużono się układem doświadczalnym, w którym wbudowywanie radioaktywnych prekursorów do RNA prowadzono *in vitro* na skrawkach mózgu. Ocenie przydatności tego układu do wybiórczej analizy metabolizmu mRNA poświęcono osobny rozdział pracy.

Z przyczyn przytoczonych poniżej, szczególną uwagę zwrócono na zachowanie się poli(A)<sup>+</sup> RNA oraz sam proces poliadenylacji RNA w jądrze. Jak podkreślono we wstępie, znaczna część dotychczas zidentyfikowanych mRNA posiada reszty poliadenylowe. W świetle najnowszych danych wydaje się, że dołączenie do prekursorów mRNA w jądrze fragmentów poli(A) o długości conajmniej 200 nukleotydów jest warunkiem koniecznym dla wytransportowania poli(A)<sup>+</sup>mRNA z jądra do cytoplazmy /Darnell i wsp. 1973, Jelinek i wsp. 1973, Sawicki i wsp. 1977/. Chociaż funkcja reszt poli(A) w mRNA w cytoplazmie nie jest jeszcze dokładnie znana, istnieją dane wskazujące na ich działanie stabilizujące mRNA i chroniące je

przed działaniem rybonukleaz /Huez i wsp., 1974, Marbaix i wsp. 1974, Williamson i wsp., 1974, Nudel i wsp. 1976/. Zaobserwowano również, że poli/A/<sup>+</sup>RNA łatwiej łączy się z rybosomami niż poli/A/<sup>-</sup>RNA /Numer i wsp. 1975/, co ma zapewne związek ze szczególnym powinowactwem reszt polia-denylowych do niektórych białek będących składnikami kompleksów mRNA-białko /mRNP/ w cytoplazmie i polirybosomach /Blobel 1973, Cardelli i Pitot 1977, Jeffery 1977/. Fakt, że jedno z tych białek posiada jednocześnie własności czynnika inicjującego przyłączającego F-met tRNA<sup>P</sup> /formylo-metionilo tRNA<sup>P</sup>/ do rybosomów /Hellerman i Shafritz 1975/ pozwala przypuszczać, że fragmenty poli/A/ mogą być zaangażowane pośrednio w proces inicjacji.

W końcowym fragmencie pracy, w oparciu o spostrzeżenia własne oraz wyniki badań przeprowadzonych przez innych autorów, poruszono zagadnienie udziału zaburzeń metabolizmu RNA w patomechanizmie uszkodzeń towarzyszących różnym fazom niedotlenienia i niedokrwienia. Postawiono hipotezę, że wystąpienie tych zaburzeń może być czynnikiem warunkującym nieodwracalność zmian metabolicznych w mózgu bądź też opóźnienie ich restytucji w stosunku do czasu działania czynnika uszkadzającego.



### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Model niedotlenienia

Niedotlenienie wywoływano in vitro na skrawkach mózgu królika metodą opisaną przez Yanagihare /1973/. Króliki białe o ciężarze ciała 2,5-3 kg poddawano lekkiej narkozie barbituranowej, a następnie perfundowano lodowatym płynem Ringera przez lewą komorę serca. Mózg natychmiast po wyjęciu z jamy czaszki umieszczano w łaźni lodowej. Po odparowaniu mózdzku, pnia i międzymózgowia, półkule mózgu skrawano osobno na aparacie do skrawania tkanek według McIlwaina ustawionym na grubość skrawków 0,35 mm. Skrawki o ciężarze około 4 g przenoszono do 125 ml kolbki Erlenmeyera z ujściem, zawierającej 15 ml roztworu inkubacyjnego o następującym składzie: 38 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM bufor sodowo-fosforanowy, pH 7,4, 5 mM KCl, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> oraz 10 mM glukoza. Kolbkę zamykano korkiem z rurką szklaną, stanowiącą wlot dla gazu i mieszaninę preinkubowano przez 15 min. w 37<sup>o</sup> C w łaźni obrotowej przy 140 obr./min. oraz przy stałym przepływie 100% O<sub>2</sub> /szybkość przepływu: 0,75 l/min/kolbkę/. Niedotlenienie wywoływano przepuszczając przez roztwór ze skrawkami 100% N<sub>2</sub> w sposób identyczny jak O<sub>2</sub>. Celem szybkiego wysycenia gazem, rurkę doprowadzającą zanurzano w roztworze na okres pierwszych 2 min. Skrawki poddawano niedotlenieniu przez różne okresy czasu - do 30 min. Celem ujednocze-

nia całkowitego czasu trwania inkubacji do 30 min., przyjęto następujący schemat przepuszczania gazów:

dla 10 min niedotlenienia - 20 min O<sub>2</sub> + 10 min N<sub>2</sub>  
dla 15 min niedotlenienia - 15 min O<sub>2</sub> + 15 min N<sub>2</sub>  
dla 20 min niedotlenienia - 10 min O<sub>2</sub> + 20 min N<sub>2</sub>  
dla 30 min niedotlenienia - 30 min N<sub>2</sub>  
dla kontroli - 30 min O<sub>2</sub>

Celem zminimalizowania wpływu błędów metody, każdej inkubacji w warunkach niedotlenienia towarzyszyła równoległa inkubacja kontrolna.

### 3.2. Model niedokrwienia

Badania nad niedokrwieniem przeprowadzano na chomikach mongolskich /*Meriones unguiculatus*/ o ciężarze ciała 60-70g. Jednostronne niedokrwienie mózgu wywoływano przez podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej prawej /Levine i Payan 1966, Yanagihara 1978/, na okres 3 lub 6 godzin.

Do badań nad metabolizmem RNA użyto wyłącznie mózgi tych zwierząt, które charakteryzowały się klinicznymi objawami szybko postępującego niedokrwienia mózgu, świadczącymi o występowaniu w nich anatomicznej anomalii pierścienia tętniczego mózgu upośledzającej krążenie oboczne /Levine i Spohn, 1975/. Wśród objawów zwracano uwagę na ruchy rotacyjne zwierząt, najczęściej w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, skręt szyi lub tułowia w tym samym kierunku, niepokój ruchowy, porażenie połowiczne lewostronne,

napady drgawkowe oraz obniżoną odpowiedź na bodźce zewnętrzne /Yanagihara 1978a/. Zwierzęta objawowe stanowiły ok. 35% całej przebadanej populacji. Doświadczenia na półkach niedokrwionych /prawych/ oraz kontrolnych /lewych/ przeprowadzano równolegle. Mózgów nie perfundowano. Tkanę skrawano identycznie jak u królika.

### 3.3. Włączanie radioaktywnych prekursorów do RNA

Skrawki półkul mózgu królika lub chomika o grubości 0,35 mm inkubowano w środowisku identycznym do tego, w którym wywoływano niedotlenienie /rozd. 3.1./, przy stałym przepływie tlenu w obecności 250  $\mu$ Ci 2-<sup>3</sup>H-urydyny /25 Ci/mmol/ lub 400  $\mu$ Ci 2-<sup>3</sup>H-adenozyny /21,5 Ci/mmol/, oba preparaty z firmy Amersham, Searle. W przypadku mózgu królika, skrawki pochodzące z jednej półkuli inkubowano w 15 ml roztworu, natomiast skrawki z czterech półkul mózgu chomika zawieszano w 10 ml roztworu. Skrawki mózgu królika po niedotlenieniu i/lub natlenieniu /rozd. 3.1./ odsączały na sitach nylonowych, a następnie zawieszano w świeżym roztworze inkubacyjnym z prekursorem. O ile w tekście nie zaznaczono inaczej, inkubację prowadzono przez okres 60 min.

### 3.4. Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Skrawki po inkubacji odwirowywano w wirówce wolnoobrotowej /500xg/. Frakcje polirybosomów wolnych oraz zwią-

nych z szorstką siatką śródplazmatyczną izolowano nieznacznie zmodyfikowaną metodą Cardelli'ego i wsp. /1976/. Skrawki homogenizowano w 5 objętościach 0,44 M sacharozy w buforze TKM /50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM KCl, 7,5 mM  $MgCl_2$ / w homogenizatorze szklanym z tłokiem teflonowym, a następnie homogenat wirowano przez 10 min. przy  $11400x_{gr}$  w wirówce Beckmana J-21. Uzyskaną frakcję postmitochondrialną doprowadzano 2,0 M sacharozą w buforze TKM do końcowego stężenia sacharozy 1,2 M i nakładano na 10 ml 2,0 M sacharozy także w buforze TKM. Probówkę wypełniano przez nałożenie warstwy 0,44 M sacharozy w buforze TKM i nieciągly gradient wirowano przez 3 godz. przy  $214000x_{gr}$  w ultrawirówce Beckmana przy użyciu głowicy 70 Ti. Błony szorstkiej siatki z polirybosomami związanymi izolowano z interfazy pomiędzy 1,2 a 2,0 M sacharozą, natomiast polirybosomy wolne znajdowały się na dnie probówki. Osad polirybosomalny zawieszano w 0,44 M sacharozie w buforze TKM, a do odsączonej frakcji błonowej dodawano 300  $\mu$ g albuminy krwi bydlęcej oraz równą objętość 10% kwasu trójchlorooctowego /TCA/.

Frakcję jądrową uzyskiwano z osadu po pierwszym wirowaniu homogenatu. Osad zawieszano w 20 ml 2,0 M sacharozy zawierającej 1 mM  $MgCl_2$ , pH 6,5. Zawiesinę nakładano na 10 ml tego samego roztworu sacharozy i gradient wirowano przez 75 min przy  $56000x_{gr}$  w głowicy SW 27 w wirówce Beckmana. Część osadu zachowywano do ekstrakcji RNA, a resztę zawieszano w 0,25 M sacharozie zawierającej 1 mM  $MgCl_2$  i traktowano równą objętością 10% TCA.

Całkowitą frakcję poliirybosomalną, zawierającą poli-  
rybosomy zarówno wolne jak i związane uprzednio z błonami,  
otrzymywano metodą opisaną przez Bantle'a i Hahna /1976/.  
Skrawki homogenizowano w 5 objętościach 5% sacharozy w bu-  
forze P /50mM Tris-HCl, pH 7,4, 250 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>/ za-  
wierającym 10ug/ml siarczanu poliwinylu oraz 0,1% Triton  
X-100. Homogenat wirowano przez 10 min przy 3000xg<sub>sr</sub>, a  
nadsącz wirowano powtórnie przez 10 min. przy 16000xg<sub>sr</sub>.  
Nadsącz po drugim wirowaniu /20 ml/ nakładano na 10 ml 20%  
sacharozy w buforze P nie zawierającym Tritonu X-100. Po-  
liirybosomy osadzano przy 90000xg<sub>sr</sub> przez 110 min.

### 3.5. Izolacja RNA z jąder komórkowych, poliirybosomów i cytoplazmy.

Jądrowy RNA izolowano metodą ekstrakcji gorącym fenol-  
em według Edmonds i Carameli /1969/. Jądra komórkowe za-  
wieszano w kwaśnym buforze do ekstrakcji KBE /50 mM  
CH<sub>3</sub>COONa pH 5,2, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA/ i zawiesinę uzupeł-  
niano 5% SDS do końcowego stężenia 0,5%. Do zawiesiny do-  
dawano następnie równą objętość fenolu nasyconego buforem  
KBE i mieszaninę wytrząsano przez 15 min. w temperaturze  
pokojowej oraz przez 6 min. w 65°C, a następnie chłodzono  
w lodzie i wirowano przez 10 min. w 3000xg<sub>sr</sub>. Po wirowaniu  
fazę wodną odpipetowywano do oddzielnych naczyń, a fazę fe-  
nolową i interfazę przemywano buforem KBE, wytrząsając  
przez 7 min. w temperaturze pokojowej. Połączone fazy wod-

ne z 2 wirowań ekstrahowano jeszcze dwukrotnie fenolem nasyconym buforem KBE, a następnie trzykrotnie pięcioma objętościami eteru. RNA wytrącano z ostatecznej fazy wodnej dwiema objętościami 96% etanolu w  $-20^{\circ}\text{C}$  przez noc i osad przemywano trzykrotnie zimnym 67% etanolem. Ostateczny osad rozpuszczano w 10 mM buforze Tris-HCl, pH 7,4, zawierającym 100 mM NaCl oraz 100ug/ml DN-azy wolnej od rybonukleaz /Worthington/ i roztwór inkubowano w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 30 min., a następnie ekstrahowano 1 objętością zimnego chloroformu. Oczyszczone RNA ponownie wytrącano z fazy wodnej 2 objętościami 96% etanolu.

Polirybosomalny RNA izolowano przy użyciu techniki chloroformowo-fenolowej opisanej przez Perry'ego i wsp. /1972/. Polirybosomy zawieszano w buforze NETS /10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS/i wytrząsano przez 10 min. w temperaturze pokojowej z 1,5 objętości mieszaniny fenolu z chloroformem /1:1/ nasyconej 0,01 M buforem octanowym, pH 6,0, zawierającym 100 mM NaCl i 1 mM EDTA. Dalsze etapy izolacji przebiegały podobnie jak w przypadku RNA jądrowego, z tym tylko że: 1-interfazy przemywano buforem NETS, 2-dalsze ekstrakcje przeprowadzano mieszaniną fenol:chloroform /1:1/ oraz 3-pominięto etap inkubacji z DN-azą.

Cytoplazmatyczny RNA ekstrahowano z frakcji postmitochondrialnej po wirowaniu homogenatu przez 20 min. przy  $11400 \times g_{gr}$  w sposób identyczny jak RNA polirybosomalny. Szkło używane do ekstrakcji RNA sterylizowano w autoklawie po uprzednim przemyciu 0,2% roztworem dwuetylopirowęgla.

### 3.6. Chromatografia kolumnowa na oligo/dT/ celulozie

Rozdział RNA na poli/A/<sup>+</sup>RNA i poli/A/<sup>-</sup>RNA na kolumnach z oligo/dT/celulozą prowadzono w sposób standardowy /Aviv i Leder 1972, De Larco i Guroff 1972/. RNA rozpuszczano w 0,01 M buforze Tris-HCl ,pH 7,2, zawierającym 0,5 M KCl /bufor K/ i próbki o zawartości RNA nie wyższej niż 3,0 jednostki  $A_{260nm}$  nakładano na kolumny, sporządzone z pipet Pasteura, zawierające 200 mg oligo/dT/celulozy uprzednio przemytej kilkunastoma objętościami tego samego buforu. Poli/A/<sup>-</sup>RNA wymywano z kolumny buforem K do momentu kiedy radioaktywność oraz gęstość optyczna eluatu przy 260nm stały się niemierzalne, a następnie wymywano poli/A/<sup>+</sup>RNA wodą. Rutynowo nie powtarzano przepuszczania poli/A/<sup>+</sup>RNA przez kolumnę, bowiem ilość radioaktywności nie adsorbującej się na oligo/dT/ celulozie w wyniku rechromatografii nie przekraczała 10%. W niektórych doświadczeniach do buforów stosowanych do chromatografii dodawano 0,5% SDS /sól sodowa siarczanu dodecyłu/, a w przypadku jądrowego RNA próbki denaturowano 25% amidem kwasu mrówkowego/formamidem/, co nie wpływało na rozdział. Poli/A/<sup>-</sup>RNA wytrącano bezpośrednio czystym 96% etanolem, natomiast poli/A/<sup>+</sup>RNA po uprzednim dodaniu doń nieradioaktywnego rybosomalnego RNA w charakterze nośnika.

### 3.7. Ultrawirowanie w gradiencie sacharozy

RNA rozpuszczano w 10 mM buforze Tris-HCl, pH 7,4, zawierającym 1 mM EDTA, 100 mM NaCl oraz 5% sacharozę. Na gradient nanoszono próbki o objętości 0,25 - 0,50 ml. Skład gradientu oraz warunki wirowania podano w podpisach pod rycinami. Gęstość optyczną poszczególnych frakcji po wirowaniu mierzono spektrofotometrycznie przy 260 nm, a ich radioaktywność oznaczano w liczniku scyntylicyjnym cieczowym po zmieszaniu z płynem scyntylicyjnym Instagel /Packard/, przy wydajności liczenia około 54%.

### 3.8. Oznaczanie zawartości RNA i DNA oraz pomiary radioaktywności

Osady frakcji błon szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz polirybosomów po wytrąceniu TCA /patrz 3.4./ przemywano czterokrotnie 5% TCA, a następnie ekstrahowano mieszaniną alkohol etylowy-eter /1:1/ oraz suszono eterem. RNA hydrolyzowano przez noc w 0,3 M KOH w temperaturze pokojowej, a następnie z hydrolizatorów usuwano DNA i białko przez wytrącanie kwasem nadchlorowym /Yanagihara 1976b/ RNA w hydrolyzacie oznaczano metodą orcynolową /Mejbaum 1939/. Osad frakcji jądrowej przemywano trzykrotnie 5% TCA, a następnie hydrolyzowano przez ogrzewanie w 80°C przez 20 min. Radioaktywność w hydrolizatach mierzono w sposób opisany w rozdziale 3.6., a DNA oznaczono metodą Burtona /1956/.



### 3.9. Oznaczanie radioaktywności fragmentu poliadenylowego w preparatach jądrowego RNA znakowego <sup>3</sup>H-adenozyną

Włączanie <sup>3</sup>H-adenozyny do RNA, izolowanie frakcji jądrowej oraz ekstrakcję RNA wykonano w sposób opisany w rozdziałach 3.3., 3.4. i 3.5. Radioaktywność fragmentu poli(A) oznaczono metodą Wilta /1973/ w modyfikacji Quinlana i wsp. /1977/. W metodzie tej wykorzystano zjawisko oporności poli(A) na większość rybonukleaz z wyjątkiem rybonukleazy T<sub>2</sub>. Szczegóły metody oraz przykład obliczenia procentowego udziału radioaktywności fragmentu poli(A) w całkowitej radioaktywności RNA przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Oznaczenie radioaktywności poli(A) w stosunku do radioaktywności całkowitej jądrowego RNA znakowanego <sup>3</sup>H-adenozyną

Warunki pomiaru	Radioaktywność /rozpady/min./próbe/
Inkubacja bez rybonukleazy	15619 15627    średnia: 15623
Inkubacja z rybonukleazą: A/5μg/ml/+T <sub>1</sub> /10 j./ml/	620 630    średnia: 625
A/5μg/ml/+T <sub>1</sub> /10 j./ml/+T <sub>2</sub> /2j./ml/	271 273    średnia: 272

$$\% \text{ radioaktywności całkowitej w poli(A) } = \frac{625 - 272}{15623} = 2,2$$

Jądrowy RNA preinkubowany z DN-azą /patrz 3.5./ rozpuszczono w 10 mM buforze cytrynianowym, pH 7,0, zawierającym 0,15 M NaCl, podzielono na porcje zawierające równe ilości /około 20μg/ RNA w 0,25 ml roztworu i inkubowano bez lub z dodatkiem rybonukleaz przez 30 min, w 37°C. RNA po inkubacji wytrącano równą objętością 10% TCA w obecności 200 μg albuminy krwi bydlęcej. Osady płukano trzykrotnie 5% TCA, a następnie ogrzewano w 5% TCA przez 20 min. w 80°C. Radioaktywność frakcji rozpuszczonej w gorącym TCA mierzono w sposób opisany w rozdziale 3.8.

3.10. Oznaczanie aktywności poli/A/ polimerazy /adenylilo-  
transferazy ATP : polinukleotyd. E.C.2.7.7.19/

W celu zapobieżenia ubytkom wolnej poli/A/polimerazy z jądra, co na ogół towarzyszy homogenizacji tkanek w izotonicznym roztworze sacharozy /Rose i wsp. 1976/, skrawki mózgu homogenizowano w 2,2 M sacharozie zawierającej 1mM  $MgCl_2$ /16 ml roztworu na półkulę mózgu królika/. Frakcję jądrową odwirowywano z homogenatu przy  $65000 \times g_{gr}$  przez 60 min. w głowicy SW 27.1 ultrawirówki Beckmana. Zastosowane warunki inkubacji były podobne do opisanych przez Rose i wsp. /1977/. O ile nie podano inaczej, standardowa mieszanina inkubacyjna zawierała: 40 mM bufor Tris-HCl, pH 8,0 mM KCl, 0,8 mM  $MnCl_2$ , 1,3 mg/ml fosfo-enolo-pirogronianu, 5  $\mu$ g/ml kinazy pirogronianowej, 2,5  $\mu$ Ci  $8-^3H$  ATP /29 Ci/mmol, Amersham/, 0,25 mM nieradioktywny ATP oraz frakcję jądrową w ilości odpowiadającej 80-120  $\mu$ g DNA, w końcowej objętości 0,5 ml. Inkubację prowadzono przez 45 min. w temp.  $37^\circ C$ , a reakcję zatrzymywano przez dodanie 500  $\mu$ g nieradioaktywnego ATP oraz równej objętości zimnego 10% TCA. Osady płukano pięciokrotnie 5% TCA oraz jeden raz mieszaniną etanol-eter /1:1/ i suszono eterem, a następnie rozpuszczano w rozpuszczalniku Soluene 350 /Packard/. Radioaktywność mierzono w płynie scyntylicyjnym toluenowym z 53% wydajnością. Pomiar aktywności enzymu w preparatach kontrolnych oraz po niedotlenieniu wykonywano równolegle, przy użyciu tej samej ilości frakcji jądrowej, a wyniki uzyskane w próbach po niedo-

tlenieniu wyrażano w procentach radioaktywności właściwej prób kontrolnych.

### 3.11. Badanie aktywności rybonukleaz we frakcjach podkomórkowych

Frakcję jądrową do oznaczania aktywności rybonukleaz wyodrębniano w sposób opisany w rozdziale 10., poczym zawierano ją w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7,5. Inne frakcje podkomórkowe otrzymywano z homogenatów przygotowanych w 10 mM buforze potasowo-fosforanowym, pH 7,5, zawierającym 10% sacharozę i 5 mM  $MgCl_2$ . Homogenaty odwirowywano przy  $800xg_{gr}$  przez 10 min., a następnie część nadsączu po frakcji jądrowej wirowano przez 20 min. przy  $11400xg$ . Po tym wirowaniu osad stanowił nieoczyszczoną frakcję mitochondrialno-lizosomalną, którą następnie homogenizowano ręcznie w 50 mM buforze potasowo-fosforanowym, pH 6,0. Nadsącz po ostatnim wirowaniu stanowił frakcję postmitochondrialną.

Substratem w reakcji rybonukleazowej był homologiczny jądrowy RNA znakowany  $^3H$ -urydyną, uzyskany w wyniku inkubacji skrawków mózgu królika lub chomika z prekursorem według schematu opisanego w rozdziale 3.3. i oczyszczony metodą przedstawioną w rozdziale 3.5. Warunki inkubacji były identyczne dla wszystkich frakcji podkomórkowych. Aktywność rybonukleazy kwaśnej oznaczano w 50 mM buforze fosforanowym, pH 6,0, a rybonukleazy zasadowej - w tym samym buforze,

pH 7,5. Pozostałe warunki oznaczenia były dla obu rybonukleaz identyczne. Mieszanki inkubacyjne o objętości 0,5 ml zawierały 0,8-1,4 mg białka frakcji oraz 0,1-0,2 jednostek  $A_{260nm}$  RNA, którego radioaktywność wahała się w granicach 3000-9000 imp/min. Inkubację prowadzono w 37°C, a reakcję zatrzymywano dodając równą objętość zimnego 10% TCA w obecności 100 µg albuminy krwi bydlęcej. Miara rozkładu RNA był przyrost radioaktywności we frakcji niewytrącającej się TCA. Oznaczenia prób kontrolnych i po niedotlenieniu lub niedokrwieniu wykonywano równolegle, przy użyciu identycznych ilości białka frakcji oraz substratu. Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. /1951/.

#### 4. CHARAKTERYSTYKA SYNTEZY RNA W UKŁADZIE IN VITRO NA SKRAWKACH MÓZGU KRÓLIKA I CHOMIKA MONGOLSKIEGO

##### 4.1. Uwagi wstępne

Z przesłanek omówionych we wstępie wynika, że układ in vitro na skrawkach może stwarzać dogodne warunki do badań nad syntezą RNA w mózgu. Wcześniejsze badania Yanagihary /1974/ wykazały, że włączanie radioaktywnych prekursorów do RNA w skrawkach mózgu królika przebiega z dużą wydajnością w warunkach długotrwałej inkubacji /do 3 godz./. Z wyników uzyskanych przez De Larco i Guoffa /1972/ w doświadczeniach z użyciem skrawków mózgu szczura można z kolei wnioskować, że część nowosyntetyzowanych RNA zawiera sekwencje poli/A/, a więc spełnia jedno z kryteriów identyfikacji mRNA. W części badań przedstawionych w niniejszym rozdziale, układ in vitro na skrawkach mózgu królika i chomika mongolskiego scharakteryzowano z punktu widzenia jego przydatności do śledzenia syntezy mRNA i jego transportu z jądra do polirybosomów. Prześladowano wbudowywanie <sup>3</sup>H-urydyny do RNA frakcji jądrowej i szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz polirybosomów. Zwrócono uwagę na wpływ obecności w mieszaninie inkubacyjnej aktynomycyny D - antybiotyku hamującego syntezę RNA, który w niskich stężeniach /0,08 µg/ml/ powinien oddziaływać przede wszystkim na syntezę rRNA /Penman i wsp. 1968, Simard i wsp. 1974, Spohr i wsp. 1974/. Szczegółowo zajęto się nowosyntetyzowanym RNA połączonym z polirybosomami jako końcowym produktem reakcji. Polirybo-

somalny RNA frakcjonowano na poli/A/<sup>+</sup>RNA i poli/A/<sup>-</sup>RNA oraz poddawano analizie sedimentacyjnej w gradiencie sacharozowym. Zbieżność własności RNA zsyntetyzowanego w warunkach in vitro z cechami natywnego mRNA mózgu oceniano w oparciu o kryteria omówione w rozdziale 1.4.

#### 4.2. Synteza RNA w warunkach kontrolnych.

W wyniku 60-minutowej inkubacji, skrawki mózgu królika i chomika mongolskiego wbudowywały <sup>3</sup>H-urydynę do RNA wszystkich badanych frakcji podkomórkowych /tabela 3/.

Układ z mózgu chomika charakteryzował się nieco wyższą aktywnością od układu mózgu królika, lecz stosunek radioaktywności włączonych do poszczególnych frakcji był prawie jednakowy. W obu przypadkach, radioaktywność właściwa RNA frakcji związanej z błonami siatki śródplazmatycznej była około dwukrotnie wyższa od radioaktywności RNA wolnych polirybosomów. Obserwacja ta w powiązaniu z faktem, że radioaktywność właściwa oczyszczonego preparatu polirybosomalnego RNA pochodzącego łącznie z polirybosomów wolnych i związanych nie różniła się zasadniczo od radioaktywności RNA w polirybosomach wolnych /porównaj kolumny 3 i 4 tabeli 3/ wskazuje na to, że część nowosyntetyzowanego RNA wiązała się z błonami siatki bezpośrednio, a nie poprzez polirybosomy. Jest to zjawisko występujące typowo w różnych tkankach w warunkach in vivo /Milcarek i Penman 1974, Lande i wsp. 1975, Adesnik i wsp. 1976, Cardelli i wsp. 1976/.

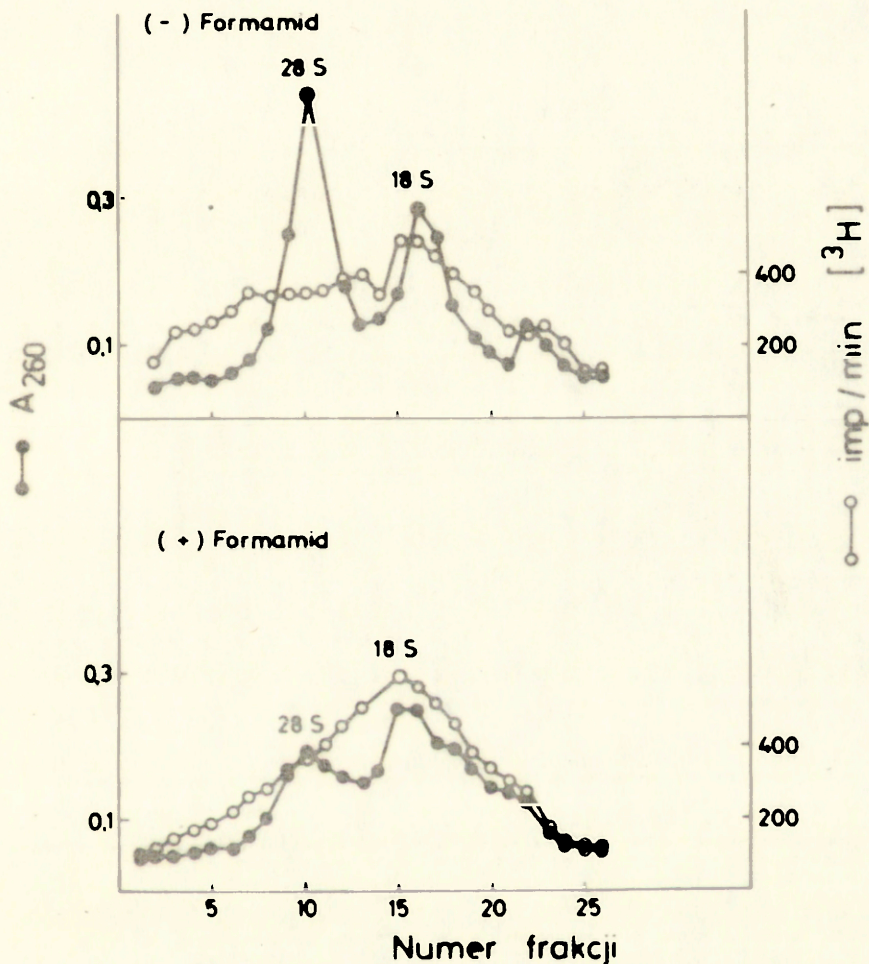
Tabela 3

Włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA frakcji podkomórkowych mózgu chomika mongolskiego i królika

Zwierzę	Radioaktywność właściwa /rozpady/min. / $\mu\text{g}$ RNA/			
	Jądra	Frakcja błonowa	Wolne polirybosomy	Oczyszczone RNA z polirybosomów wolnych + związanych
Chomik	4182 $\pm$ 510/9/	415 $\pm$ 85/9/	221 $\pm$ 37/9/	171 $\pm$ 27/8/
Królik	3213 $\pm$ 189/4/	245 $\pm$ 26/4/	111 $\pm$ 8/4/	93 $\pm$ 14/4/

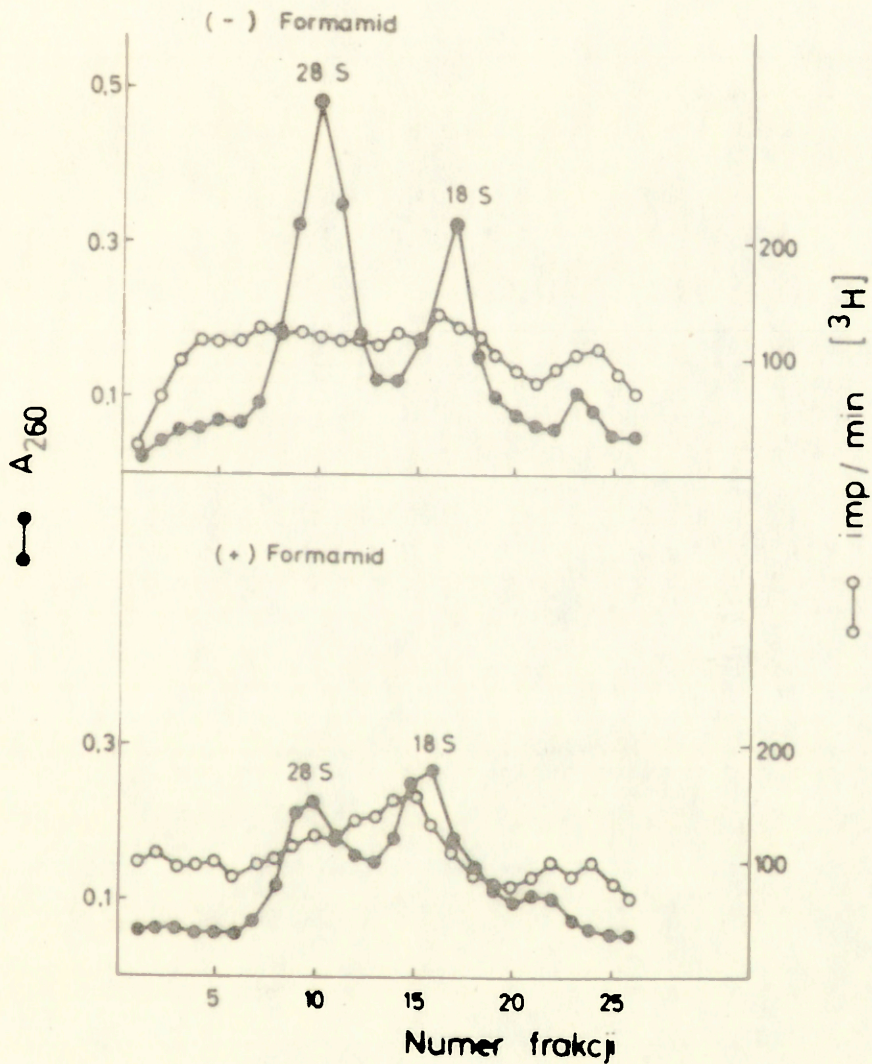
Radioaktywność oraz zawartość RNA w osadach po wytrąceniu frakcji TCA mierzono w sposób opisany w rozdziale "Materiał i Metody". Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe. W nawiasach - liczba doświadczeń.

Analiza sedymentacyjna polirybosomalnego RNA przeprowadzona pod nieobecność czynnika denaturującego wykazała względnie równomierne rozmieszczenie radioaktywnego produktu syntezy w całym gradiencie, choć można było wyróżnić dwie grupy składników; jedną o stałej sedymentacji nieco wyższej niż 18S, która przeważała ilościowo w preparacie z mózgu chomika /Ryc.1 "-Formamid"/, oraz drugą zaznaczoną szczególnie wyraźnie w przypadku RNA króliczego /Ryc.2, "-Formamid"/, osadzającą się szybciej niż 28S rRNA. Na uwagę zasługuje niska radioaktywność frakcji odpowiadających 28S i 18S rRNA, przeważających pod względem masy. Spośród rybosomalnych RNA prekursor wbudowywał się jedynie do 5S RNA. Powyższe obserwacje znalazły potwierdzenie w doświadczeniach w których RNA wirowano po uprzedniej denaturacji formamidem /Ryc.1 i 2/, "+Formamid"/. Działanie czynnikiem denaturującym prowadziło do częściowej degradacji 28S rRNA, co mogło być wynikiem



Ryc. 1. Własności sedymentacyjne polirybosomalnego <sup>3</sup>H-RNA z mózgu cnomika mongolskiego i wpływ denaturacji amidem kwasu mrówkowego /formamidem/. RNA denaturowano inkubując je przez 10 min. w 3% roztworze dejonizowanego formamidu w 0,01 M buforze Tris-HCl /pH 7,4/ zawierającym 1 mM EDTA i 100 mM NaCl, w temp. 63°C /Heikkila, Brown, 1977/. Porcję RNA odpowiadającą 4,0 jednostkom A260 nakładano na liniowy gradient sacharozowy 10%-25% a następnie wirowano przez 7 godzin przy 39000 obr./min. w głowicy SW 41 wirówki Beckmanna, w temp. 40°C. Roztwory sacharozy w których wirowano zdenaturowany RNA zawierały 1% formamid.





Ryc. 2. Własności sedymentacyjne polirybosomalnego <sup>3</sup>H-RNA z mózgu krowki i wpływ denaturacji formamidem. Warunki doświadczenia identyczne do opisanych w legendzie ryciny 1.

już istniejącego "pęknięcia" w cząsteczce. Nie powodowało to jednak spadku radioaktywności w rejonie 28S. Radioaktywność odpowiadająca RNA o stałej sedymentacji wyższej niż 28S nie zniknęła pod wpływem formamidu, co świadczy o tym, że "ciężki" RNA, charakterystyczny zwłaszcza dla polirybosomów mózgu królika, nie był agregatem mniejszych cząstek. Nie obserwowano również w tych warunkach gromadzenia się produktów o niskim ciężarze cząsteczkowym.

W warunkach kontrolnych, około 52% radioaktywności związanej z polirybosomalnym RNA mózgu królika oraz 26% radioaktywnego RNA z polirybosomów mózgu królika adsorbowało się na oligo /dT/ celulozie, podczas gdy adsorpcja mierzona na masę /gęstość optyczna przy 260 nm/ wynosiła odpowiednio 5,6 oraz 6,2% /Tabela 4/. Wynik ten świadczy o aktywnym wbudowywaniu się prekursora do poli/A/<sup>+</sup>RNA.

Tabela 4

Adsorpcja na oligo/dT/celulozie polirybosomalnego RNA z mózgu chomika mongolskiego i królika, znakowanych <sup>3</sup>H-urydyną w wyniku inkubacji w obecności i pod nieobecność aktynomycyny D

Dawka akty- nomycyny D /μg/ml/	RNA związane z oligo/dT/celulozą			
	Radioaktywność		<sup>A</sup> 260nm	
	Chomik	Królik	Chomik	Królik
0	26 <sup>±</sup> 3/7/	52 ± 4/5/	6,2 <sup>±</sup> 2,0/10/	5,6 <sup>±</sup> 1,8/6/
0,04	26 ± 3/5/	44 ± 7/4/	6,0 <sup>±</sup> 2,8/7/	5,1 <sup>±</sup> 1,4/5/
0,08	26 ± 3/5/	38 ± 5/5/	6,0 <sup>±</sup> 1,6/6/	4,8 <sup>±</sup> 0,9/5/

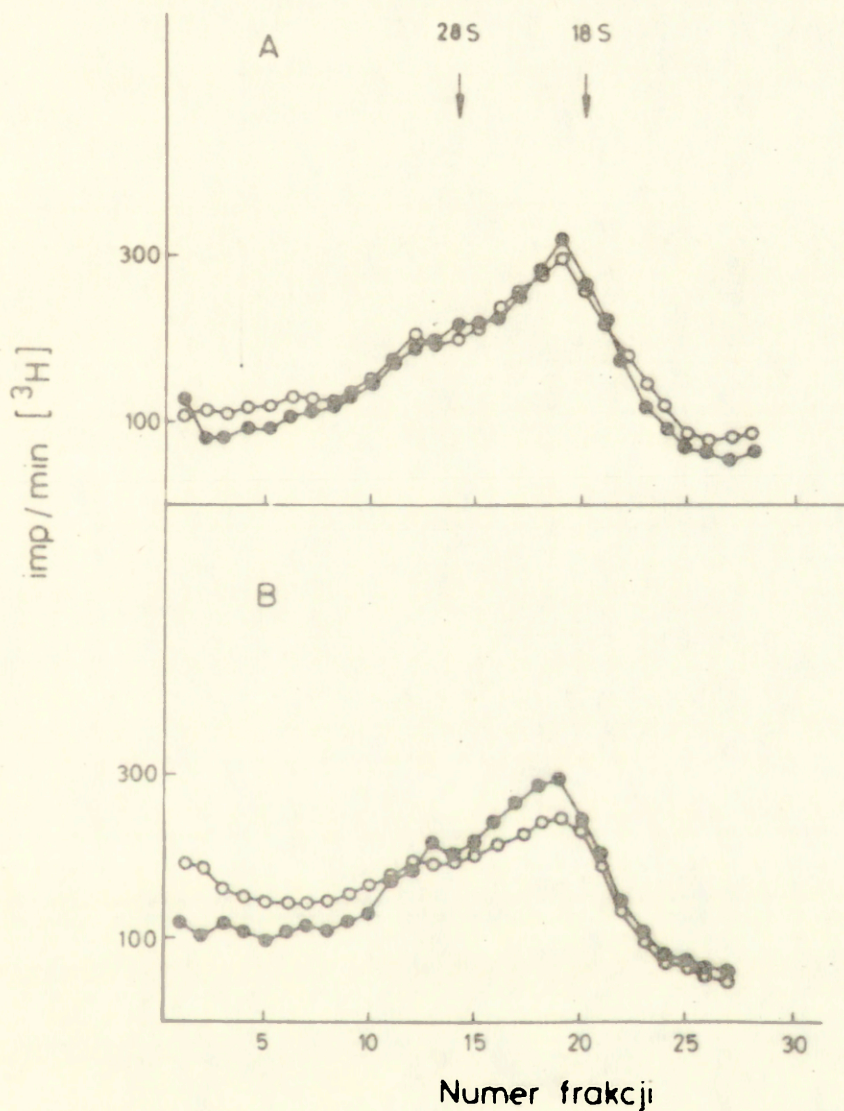
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenia standardowe. W nawiasie - liczba doświadczeń. Szczegóły izolacji polirybosomalnego RNA oraz chromatografii na oligo/dT/ celulozie opisano w rozdziale "Materiał i Metody".

Profile sedymentacyjne nowosyntetyzowanego polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA z mózgu chomika /ryc. 3A/ oraz królika /ryc. 3B/ były bardzo zbliżone i charakteryzowały się przewagą składników o stałej sedymentacji nieznacznie wyższej od 18S. Frakcja poli/A/<sup>-</sup>RNA, w której, jak wynika z profilu gęstości optycznej, pod względem masy dominowały 28S i 18S rRNA, była w stosunku do RNA niefrakcjonowanego wzbogacona w składniki radioaktywne "ciężkie" o stałej sedymentacji powyżej 28S /ryc. 4A i B/.

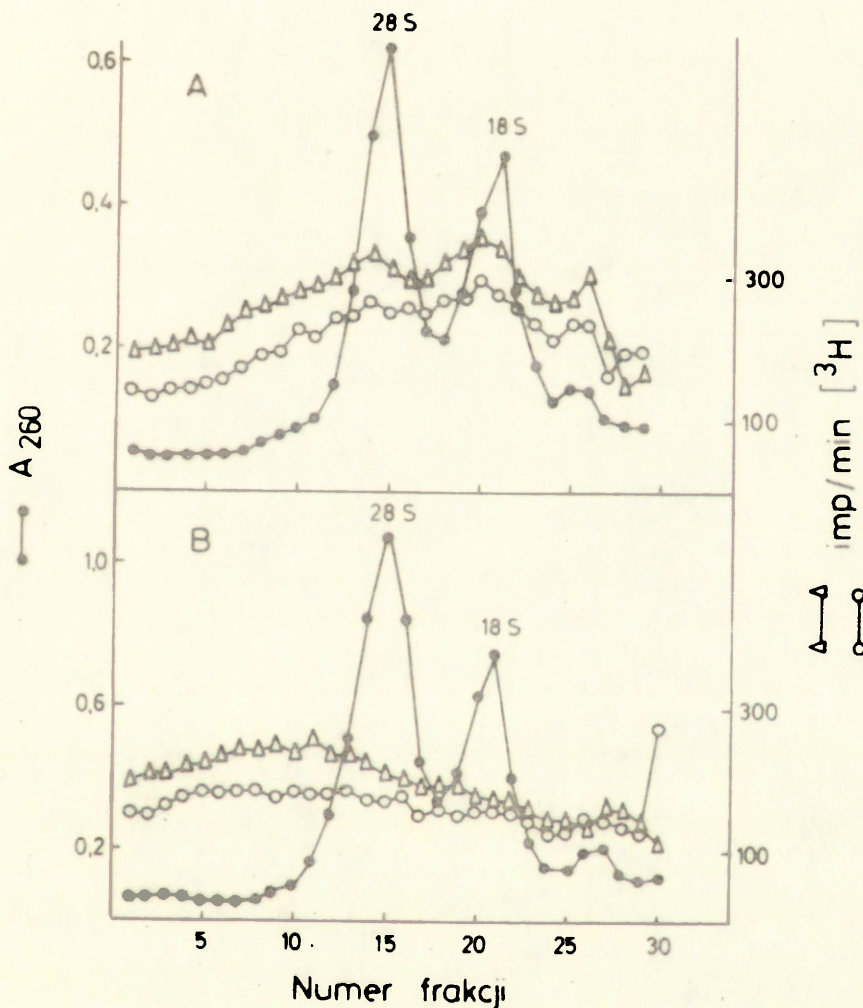
#### 4.3. Wpływ aktynomycyny D na syntezę RNA

Nieobecność wśród radioaktywnych produktów syntezy RNA składników odpowiadających 28S rRNA nie wykluczała możliwości występowania w preparacie poli/A/<sup>-</sup>RNA radioaktywnych fragmentów lub agregatów rybosomalnego RNA. Pierwotnym założeniem doświadczeń z aktynomycyną D było wyeliminowanie syntezy rRNA w oparciu o znane z piśmiennictwa zjawisko wybiórczego hamowania tej syntezy przez niskie stężenia antybiotyku /patrz rozdz. 4.11./.

Aktynomycyna D w stężeniach 0,04 oraz 0,08 µg/ml, hamowała wbudowywanie <sup>3</sup>H-urydyny do polirybosomalnego RNA w obu układach /tabela 5/. W innych doświadczeniach nie zilustrowanych tabelą wykazano, że spadek włączania prekursora do RNA innych frakcji podkomórkowych był w tym zakresie stężeń antybiotyku tego samego rzędu. Aktynomycyna D nie wpływała wybiórczo na wbudowywanie <sup>3</sup>H-urydyny do poli/A/<sup>+</sup>RNA czy poli/A/<sup>-</sup>RNA mózgu chomika, powodowała nato-



Ryc. 3. Własności sedymentacyjne polierybosomalnego  $^3\text{H}$ -poli(A) $^+$ RNA z mózgu chomika mongolskiego /A/ oraz królika /B/. Wbudowywanie  $^3\text{H}$ -urydyny przeprowadzono pod nieobecność /●-●/ lub w obecności /○-○/ 0,04µg/ml aktynomycyny D. Na każdy gradient nakładano próbkę RNA o identycznej radioaktywności /±5000 imp/min./ . RNA odwirowywano w 15%-30% liniowym gradiencie sacharozowym, przez 18 godzin przy 22500 obr/min. w głowicy SW 27.1. wirówki Beckmanna, w temp. 4°C. Jako nośnik użyto nieradioaktywny polierybosomalny RNA.



Ryc. 4. Własności sedymentacyjne polirybosomalnego <sup>3</sup>H-poli/▲/RNA z mózgu chomika mongolskiego /▲/ oraz królika /B/. Wbudowywanie <sup>3</sup>H-urydyny przeprowadzano pod nieobecność /△—△/ lub w obecności /○—○/ 0,04 μg/ml aktynomycyny D. Na każdy gradient nakładano 6,0 jednostek A<sub>260</sub> RNA. Warunki wirowania identyczne do opisanych w legendzie ryciny 3.

miast dość wyraźny spadek względnej radioaktywności związanej z poli/A/<sup>+</sup>RNA w mózgu królika /tabela 4, kolumny 2 i 3/. Antybiotyk nie wpływał na przebieg rozdziału RNA na oligo/dT/ celulozie, bowiem rozkład gęstości optycznej przy 260 nm pomiędzy poli/A/<sup>+</sup>RNA i poli/A/<sup>-</sup>RNA pozostał niezmienny /tabela 4, kolumny 4 i 5/.

Tabela 5

Wpływ aktynowycyny D na włączanie <sup>3</sup>H-urydyny do polirybosomalnego RNA mózgu chomika mongolskiego i królika

Dawka aktynowycyny D /μg/ml/	Radioaktywność właściwa /% wartości kontrolnych/	
	Chomik	Królik
0,04	77 <sup>±</sup> 19/10/	73 <sup>±</sup> 12/8/
0,08	56 <sup>±</sup> 13/6/	47 <sup>±</sup> 12/6/

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie <sup>±</sup> odchylenia standardowe. W nawiasie - liczba równoległych doświadczeń. Wyniki dotyczą RNA oczyszczonego z polirybosomów wolnych + związanych.

Profile sedymentacyjne polirybosomalnego RNA zsyntetyzowanego w obecności 0,04 μg/ml aktynowycyny D. były zbliżone do profilów preparatów kontrolnych. W przypadku RNA z mózgu chomika, rozmieszczenie radioaktywności w gradiencie było identyczne, zarówno w preparatach poli/A/<sup>-</sup>RNA /ryc. 3 B/ jak i poli/A/<sup>+</sup>RNA /ryc. 4 B/. W mózgu królika, synteza frakcji poli/A/<sup>+</sup>RNA osiadających w gradiencie szybciej niż 28S rRNA okazała się nieco mniej wrażliwa na aktynowycynę D od syntezy frakcji lżejszych /ryc. 4 A/. W preparacie poli/A/<sup>-</sup>RNA nie stwierdzono wyraźnego zróżnicowania wrażliwości poszczególnych składników /ryc. 3 A/.

#### 4.4. Omówienie i wnioski

Uzyskane wyniki skłaniają do wniosku, że w warunkach inkubacji zastosowanych w badaniach skrawki mózgu królika i chomika syntetyzują i/lub transportują do polirybosomów radioaktywny RNA o cechach RNA nierybosomalnego, którego znaczną część przypuszczalnie stanowią cząsteczki autentycznych mRNA. Rybosomalne RNA 28S i 18S osiągały w procesie znakowania prekursorem bardzo niską radioaktywność właściwą, na co wskazywała analiza zarówno niefrakcjonowanego RNA jak i poli/A/RNA. <sup>3</sup>H-urydyna wbudowywała się szczególnie intensywnie do poli/A/<sup>+</sup>RNA, stanowiącego w myśl najnowszych poglądów podstawową klasę mRNA /Perry, 1976/. W polirybosomach mózgu królika, względny udział radioaktywności poliadenylowanych RNA w całej puli polirybosomalnego RNA /ponad 52%/, był niemal tak wysoki, jak w przypadku hodowli komórkowych wbudowujących prekursor w warunkach zupełnego wyłączenia syntezy rRNA /Perry i wsp. 1972/. Względna radioaktywność poli/A/<sup>+</sup>RNA w preparacie z mózgu chomika, aczkolwiek dwukrotnie niższa, również kilkakrotnie przekraczała względną masę poli/A/<sup>+</sup>RNA ustaloną na podstawie pomiaru gęstości optycznej.

Uderza zbieżność własności sedymentacyjnych, a zwłaszcza średniej wartości S /ok. 18/, poli/A/<sup>+</sup>RNA syntetyzowanych w skrawkach, z parametrami natywnego polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA z mózgu królika znakowanego in situ, opisanymi przez Heikkilę i Browna /1977/. Podobny profil sedymentacji, z nieco niższą średnią wartością S, cechuje

poli/A/<sup>+</sup>RNA mózgu szczura /De Larco i wsp. 1975/ oraz myszy /Bantle i Hahn 1976/.

Wobec braku danych na temat występowania poli/A/<sup>-</sup>RNA w mózgu, trudno w chwili obecnej odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu syntetyzowany in vitro RNA nie posiadający reszt poliadenylowych odpowiada funkcjonalnemu mRNA. Można jedynie przypuszczać że wśród obecnych w preparacie niskocząsteczkowych radioaktywnych RNA znajdują się mRNA kodujące histony /Adesnik i Darnell 1972/. Bardziej szczegółowe badania powinny wyjaśnić, czy mózg zawiera poli/A/<sup>-</sup>mRNA odpowiadające tym, które występują np. w wirusach /Stoltzfus i wsp. 1973/, czy też w komórkach nowotworowych /Milcarek i wsp. 1974, Sonenshein i wsp. 1974/. Nie jest wykluczone, że część poli/A/<sup>-</sup>RNA zidentyfikowanych w preparacie stanowi produkty degradacji poli/A/<sup>+</sup>RNA, pojawiające się w trakcie inkubacji bądź ekstrakcji RNA; wydaje się to zwłaszcza prawdopodobne w przypadku RNA z mózgu chomika, gdzie zawartość radioaktywnego poli/A/<sup>+</sup>RNA okazała się niska w porównaniu z preparatem króliczym.

Doświadczenia z aktynomycyną D potwierdziły przypuszczenie, że skrawki mózgu w zastosowanych warunkach inkubacji nie wbudowują w znacznym stopniu prekursora do rybosomalnego RNA. Wiadomo, że 28S i 18S RNA należą do klasy poli/A/<sup>-</sup>RNA oraz, że ich synteza jest wybiórczo hamowana przez aktynomycynę D przy jej niskich stężeniach. Gdyby rRNA stanowił liczący się ilościowo składnik puli nowosyntetyzowanych poli/A/<sup>-</sup>RNA, antybiotyk powinien wówczas w znaczniejszym stopniu hamować syntezę poli/A/<sup>-</sup>RNA niż



poli/A/<sup>+</sup>RNA, a zatem powodować wzrost względnej radioaktywności poli/A/<sup>+</sup>RNA w preparacie. Uzyskane wyniki przeczą takiemu założeniu; aktynomycyna D nie wpływała na względną radioaktywność poli/A/<sup>+</sup>RNA w polirybosomach mózgu chomika, a w przypadku mózgu królika prowadziła nawet do jego obniżenia. W związku z tym ostatnim spostrzeżeniem warto nadmienić, że według opinii Kessler-Iceksona i Yaffe /1977/ i Palmitera i Schimke /1973/, aktynomycyna D może niejednakowo oddziaływać na syntezę różnych mRNA w tej samej tkance /patrz ryc. 4A/.

W podsumowaniu, zastosowany układ doświadczalny należy uznać za dogodny do badań nad syntezą mRNA w mózgu w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych, aczkolwiek przy interpretacji wyników uwzględniać należy niezupełną jasność co do autentyczności produktów syntezy in vitro.

## 5. SYNTEZA POLI/A/<sup>+</sup>RNA I POLI/A/<sup>-</sup>RNA W WARUNKACH CAŁKOWITEGO NIEDOTLENIENIA IN VITRO

### 5.1. Uzasadnienie wyboru modelu i czasu niedotlenienia

W badaniach posłużono się modelem bezpośredniego niedotlenienia skrawków mózgu czystym azotem. Model ten, zastosowany po raz pierwszy przez Cohena /1962/ oraz McIlwaina i Rodnights /1962/, doczekał się wielu modyfikacji, spośród których wybrano wersję opracowaną szczegółowo przez Yanagiharę /1972, 1973/. W przeciwieństwie do modelu przyżyciowego, w którym stopień zubożenia tkanek mózgu w tlen zależy w znacznej mierze od czynników ogólnoustrojowych, związanych z dynamiką krążenia i oddychania, zawartością hemoglobiny we krwi itp., efektywność niedotlenienia bezpośrednio in vitro jest prostą funkcją grubości skrawków tkanki, ciśnienia parcjalnego azotu i szybkości jego przepływu przez środowisko inkubacyjne oraz czasu niedotlenienia. Łatwość "wykalibrowania" parametrów niedotlenienia w modelu in vitro pozwoliła na dokładne oznaczenie zależności pomiędzy czasem trwania niedotlenienia a stopniem zahamowania biosyntezy białek, mierzonej włączaniem radioaktywnych aminokwasów /Yanagihara, 1975/. Ponadto, dzięki zastosowaniu przemiennej inkubacji skrawków w atmosferze azotu i tlenu, można było określić w przybliżeniu krytyczny okres niedotlenienia, po upływie którego nie udawało się przywrócić zahamowanej aktywności biosyntezy białka w tkance poprzez przeniesienie skrawków do atmosfery tlenowej,

nawet na dłuższy okres czasu /do 1 godz./. Okres ten wahał się w granicach 10-15 minut i był mniej więcej zbieżny z momentem ujawnienia się dezagregacji polirybosomów w skrawkach /Metter i Yanagihara, 1974 Yanagihara 1975, 1976 a/. Podczas gdy niedotlenianie przez okres do 10 min. prowadziło jedynie do niewielkiego /ok. 20%/ i odwracalnego spadku biosyntezy białka jej zahamowanie po inkubacji w atmosferze azotu przez okres 15 min. i dłuższy było bardzo znaczne i nieodwracalne. Po 30 min. niedotlenienia włączanie radioaktywnego aminokwasu do wszystkich frakcji podkomórkowych nie przekraczało 20% wartości kontrolnych /Yanagihara 1974 a/. Okres niedotleniania pomiędzy 10 a 30 minutą należało więc potraktować jako krytyczny dla rozwoju zaburzeń w biosyntezie białek. W związku z tym wydawało się prawdopodobne, że w tym przedziale czasu mogłyby ujawnić się zmiany w metabolizmie mRNA. W myśl tego założenia, syntezę RNA w tkance kontrolnej porównywano z syntezą w skrawkach poddanych niedotlenieniu przez okres od 10 do 30 minut. Przy wyborze czasu niedotleniania uwzględniono również dobrze udokumentowane spostrzeżenie Cohena /1973/, że okres 10-30 minutowej ekspozycji skrawków na azot jest krytyczny dla utrwalenia się spadku poziomu związków wysokoenergetycznych oraz dla nieodwracalnego zahamowania innych syntez makrocząsteczkowych, m.in. fosfolipidów.

## 5.2. Włączanie $^3\text{H}$ -urydyny do poli/A/ $^+$ RNA i poli/A/ $^-$ RNA w jądrach i cytoplazmie

Wpływ niedotlenienia skrawków przez różne okresy czasu na włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA poszczególnych frakcji podkomórkowych przedstawiono w tabeli 6. Najwcześniejsze zmiany pojawiły się po 15-20 min. niedotleniania. Cechą charakterystyczną tego okresu był 25--35% spadek włączania prekursora do RNA frakcji cytoplazmatycznych /polirybosomalnej oraz szorstkiej siatki śródplazmatycznej/, przy jednoczesnym braku zmian, a nawet nieznacznej tendencji do wzrostu wbudowywania do frakcji jądrowej. Na tym etapie niedotlenienia, znakowanie prekursorem nierozfrakcjonowanego homogenatu również nie odbiegało od wartości kontrolnych. Zjawisko to należy tłumaczyć tym, że na wynik oznaczenia w sposób dominujący rzutowała radioaktywność właściwa frakcji jądrowej, która w warunkach doświadczenia 10-krotnie przewyższała radioaktywność właściwą polirybosomów /tabela 3/. Niedotlenianie przez okres 30 min. powodowało znaczne /40-60%/ zahamowanie wbudowywania  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA wszystkich frakcji podkomórkowych. Zwraca uwagę fakt, że obie fazy - wybiórczy wpływ na wbudowywanie prekursora do RNA polirybosomalnego we wczesnym okresie niedotlenienia i brak takiej wybiórczości po 30 minutach - ujawniły się niezależnie od czasu trwania inkubacji z prekursorem, chociaż w przypadku niedotlenienia 30-minutowego zaobserwowano pogłębienie się efektu hamowania przy inkubacji 60-minutowej. Ze względu na niską

Tabela 6

Wpływ niedotlenienia na włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA frakcji podkomórkowych mózgu królika

Czas niedotlenienia /min/	Czas inkubacji z $^3\text{H}$ -urydyną /min./	Względna radioaktywność właściwa w % radioaktywności kontrolnej			
		Homogenat	Jądra	Fracja błonowa	Polirybosomy wolne
10	20	123 $\pm$ 28/6/	125 $\pm$ 23/6/	104 $\pm$ 13/6/	115 $\pm$ 31/6/
15	20	111 $\pm$ 21/6/	120 $\pm$ 24/6/	63 $\pm$ 10/6/	83 $\pm$ 10/6/
	60	121 $\pm$ 25/8/	116 $\pm$ 17/8/	69 $\pm$ 12/8/	76 $\pm$ 6/8/
20	20	133 $\pm$ 42/8/	115 $\pm$ 13/6/	60 $\pm$ 14/8/	78 $\pm$ 10/8/
	60	109 $\pm$ 24/6/	111 $\pm$ 20/6/	72 $\pm$ 17/6/	68 $\pm$ 15/6/
30	20	77 $\pm$ 11/7/	63 $\pm$ 25/6/	76 $\pm$ 19/6/	71 $\pm$ 15/8/
	60	56 $\pm$ 11/5/	36 $\pm$ 5/5/	63 $\pm$ 12/5/	59 $\pm$ 7/5/

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe. W nawiasach liczba równoległych doświadczeń. Termin "frakcja błonowa" odnosi się do szorstkiej siatki śródplazmatycznej.

wydajność reakcji, w późniejszych doświadczeniach zaniechano inkubacji krótkotrwałej.

Rozdział RNA frakcji jądrowej i polirybosomalnej na oligo/dT/celulozie potwierdził dwufazowe ujawnianie się wpływu niedotleniania /Tabela 7/. W wyniku 20-minutowej inkubacji w warunkach beztlenowych, nastąpił ok. 25% względny spadek włączania prekursora do poli/A/<sup>+</sup>RNA polirybosomalnego, podczas gdy udział radioaktywnego poli/A/<sup>+</sup>RNA w całkowitej radioaktywności jądrowego RNA nie uległ zmianie. Po 30 min. niedotleniania nie obserwowano wybiórczego spadku

Tabela 7

Adsorpcja na oligo/dT/celulozie jądrowego oraz polirybosomalnego RNA mózgu królika zsyntetyzowanego w warunkach kontrolnych i po niedotlenieniu

Czas niedotlenienia /min./	Radioaktywność związana z oligo/dT/celulozą/%/	
	Jądrowy RNA	Polirybosomalny RNA
0	23,2 <sup>±</sup> 3,0/7/	48,0 <sup>±</sup> 2,1/9/
20	24,4 <sup>±</sup> 4,7/6/	37,2 <sup>±</sup> 6,0/6/ <sup>x</sup>
30	19,5 <sup>±</sup> 2,3/4/	48,2 <sup>±</sup> 4,0/5/

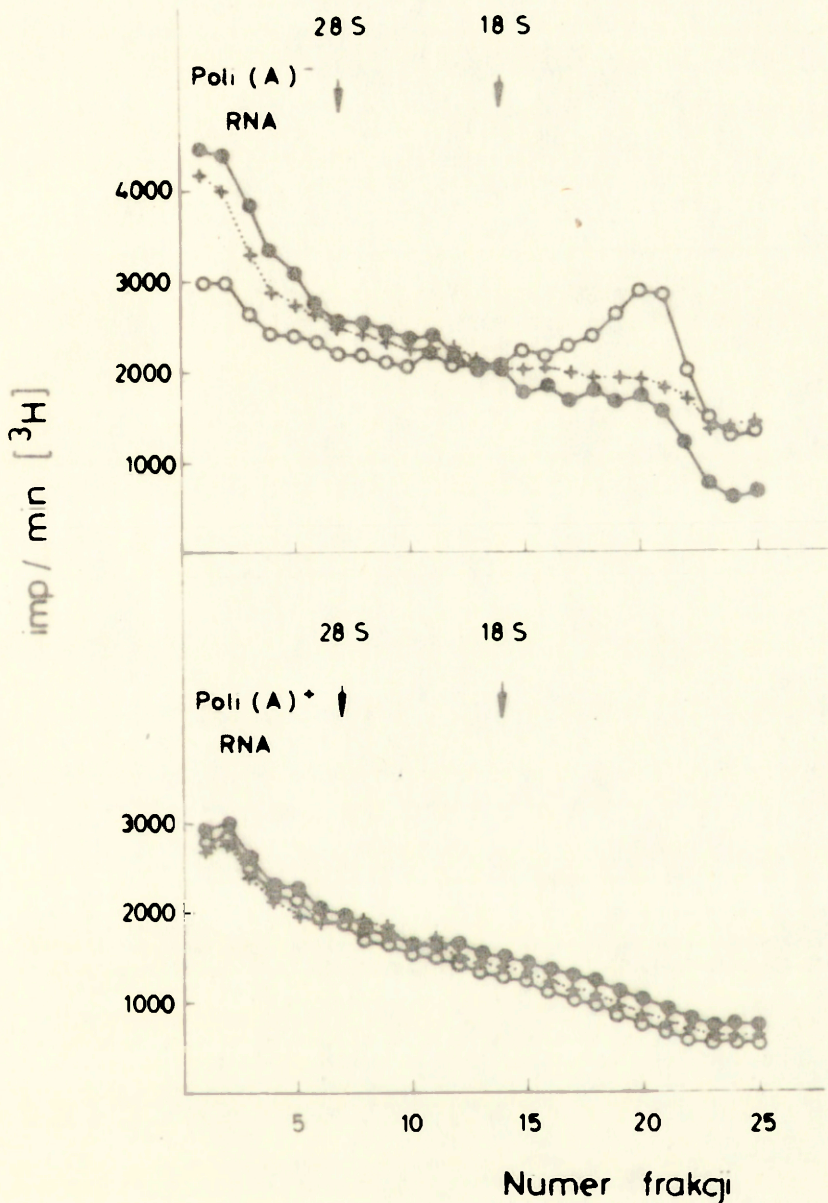
Wynik przedstawiono jako wartości średnie <sup>±</sup> odchylenia standardowe. W nawiasach liczba doświadczeń.

<sup>x</sup>Wynik różni się statystycznie znamienne od wartości kontrolnej przy  $p < 0,01$ .

radioaktywności poli/A/<sup>+</sup>RNA w polirybosomach, obniżyła się natomiast nieznacznie względna radioaktywność poli/A/<sup>+</sup>RNA we frakcji jądrowej. Spadek ten był jednak statystycznie nieznamienny.

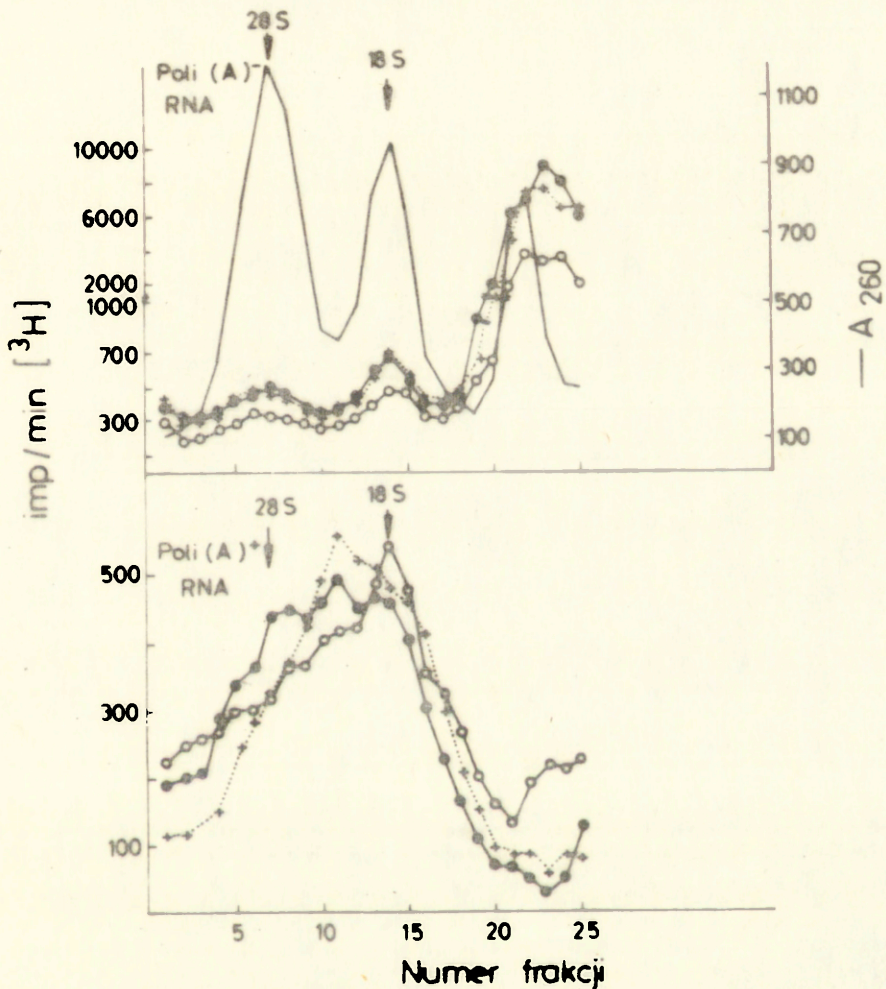
Jądrowy RNA, zarówno poli/A/<sup>+</sup> jak i poli/A/<sup>-</sup>, zsyntetyzowany w warunkach kontrolnych charakteryzował się przewagą składników ciężkich, o stałej sedymentacji wyższej niż 28S /ryc. 5/. Obraz ten odpowiada charakterystyce heterogennego jądrowego RNA/hnRNA/ wyodrębnionego z innych tkanek eukariontów /Choi i wsp. 1974, Georgiev 1974/. Profile sedymentacji poli/A/<sup>+</sup>RNA oraz poli/A/<sup>-</sup>RNA frakcji jądrowej, zsyntetyzowanych w następstwie 20-minutowego niedotlenienia nie różniły się od profilów kontrolnych. Poli/A/<sup>-</sup>RNA wyprodukowany w następstwie 30-minutowej inkubacji w atmosferze azotu był wzbogacony w składniki lekkie osadzające się w gradiencie w pobliżu 5S RNA /ryc. 5, górny wykres/, natomiast poli/A/<sup>+</sup>RNA zsyntetyzowany w tym czasie zachował niezmienione własności sedymentacyjne /ryc. 5. wykres dolny/.

W celu scharakteryzowania całej populacji nowosyntetyzowanych RNA wytransportowanych do cytoplazmy, RNA ekstrahowano bezpośrednio z nierozdzielonej frakcji postmitochondrialnej. Sedymentację cytoplazmatycznych poli/A/<sup>-</sup>RNA zsyntetyzowanych w warunkach kontrolnych i niedotlenienia porównywano nakładając na każdy gradient identyczną masę RNA /ryc. 6, wykres górny/, natomiast do analizy poli/A/<sup>+</sup>RNA stosowano próbki o mniej więcej identycznej radioaktywności /ryc. 6, wykres dolny/. W preparacie poli/A/<sup>-</sup>RNA, przeważająca część radioaktywności była związana z RNA niskocząsteczkowym, najprawdopodobniej z 4S RNA. Niedotlenienie przez 20 minut pozostało bez wpływu na syntezę poli/A/<sup>-</sup>RNA, natomiast 30-minutowa inkubacja w atmosferze azotu prowadziła



Ryc. 5. Wpływ niedotlenienia na własności sedymentacyjne nowosyntetyzowanego jądrowego poli(A)-RNA i poli(A)+RNA mózgu królika. Próbkę zawierającą odpowiednio 65000 imp/min. poli(A)-RNA oraz 39000 imp/min. poli(A)+RNA nakładano na liniowy gradient sacharozy 10%-25% i wirowano przez 8 godzin przy 39000 obr./min. w głowicy SW 41 wirówki Beckmana w temp. 4°C. Jako nośnik użyto nieradioaktywny polirybosomalny RNA. Profile sedymentacyjne charakteryzują RNA zsintetyzowane w warunkach kontrolnych /●-●/ oraz w następstwie 20 min./x----x/ i 30 min./○-○/ niedotlenienia.





Ryc. 6. Własności sedymentacyjne cytoplazmatycznego poli(A)<sup>+</sup>RNA i poli(A)<sup>-</sup>RNA mózgu królika zsyntetyzowanego w warunkach kontrolnych /●—●/ oraz w następstwie 20 min. /x---x/ i 30 min. /○—○/ niedotlenienia. Cytoplazmatyczny RNA izolowano z pełnej frakcji postmitochondrialnej /rozd. 3.5./. Na każdy gradient poli(A)<sup>-</sup>RNA w ilości odpowiadającej 14,0 jednostkom A<sub>260</sub> oraz poli(A)<sup>+</sup>RNA o radioaktywności ok. 10000 imp./min. Warunki wirowania identyczne do opisanych w legendzie ryciny 5.

do znacznego /ok. 50%/ spadku włączania prekursora do 4S i/lub 5S RNA /ryc. 6. wykres górny/. Nowosyntetyzowany poli/A/<sup>+</sup>RNA frakcji postmitochondrialnej osadzał się w gradiencie podobnie do poli/A/<sup>+</sup>RNA polirybosomalnego - przeważały składniki o stałej sedymentacji nieco powyżej 18S. Poli/A/<sup>+</sup>RNA zsyntetyzowany w następstwie 20-minutowego niedotlenienia nie różnił się od preparatu kontrolnego. Niedotlenienie 30-minutowe wpłynęło na profil sedymentacyjny radioaktywnego poli/A/<sup>+</sup>RNA bardzo wyraźnie - preparat odwirowywał się wolniej od kontrolnego i charakteryzował się średnią stałą sedymentacji równą 18S.

### 5.3. Omówienie i wnioski

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyróżnienie dwóch stadiów zaburzeń metabolizmu RNA pod wpływem niedotlenienia. Szczególnie interesującym wydaje się stadium wczesne, ujawniające się w następstwie niedotleniania tkanki przez okres 10-20 minut. Najbardziej charakterystyczną cechą tego okresu jest wybiórcze zahamowanie włączania prekursora do polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA. Z porównania danych przedstawionych w tabelach 6 i 7 wynika, że spadek radioaktywności właściwej całkowitego polirybosomalnego RNA oraz obniżenie względnej radioaktywności poli/A/<sup>+</sup>RNA w preparacie osiągały zbliżone do siebie wartości /25-35%/. Za wybiórczą wrażliwością poli/A/<sup>+</sup>RNA przemawiał również brak wpływu 20-minutowego niedotlenienia na znakowanie prekursorem poszczególnych frakcji cytoplazmatycznego poli/A/<sup>-</sup>RNA /ryc. 6., wy-

kres górny/. Powstało pytanie, czy zaobserwowane zjawisko wystąpiło na skutek zahamowania syntezy poli/A/<sup>+</sup> w jądrze, czy też obniżenia jego transportu z jądra do cytoplazmy. Fakt, że włączanie <sup>3</sup>H-urydyny do RNA frakcji jądrowej, a w tym również do jądrowego poli/A/<sup>+</sup>RNA nie ulegało zmianie pod wpływem 20-minutowego niedotlenienia /tabele 6 i 7/, wydaje się zaprzeczać pierwszej możliwości. Uzyskane na tym etapie wyniki skłaniały więc raczej do interpretacji, że krótkotrwałe niedotlenienie zaburza wybiórczo mechanizm przenoszenia nowosyntetyzowanego poli/A/<sup>+</sup>RNA z jądra do cytoplazmy. Nieujawnienie się w tych warunkach zjawiska gromadzenia nadmiaru radioaktywnego produktu w jądrze można tłumaczyć niską radioaktywnością RNA wiążącego się z polirybosomami w stosunku do RNA zsyntetyzowanego we frakcji jądrowej /tabela 3/. Powyższe spostrzeżenie potwierdza ogólnie znaną prawidłowość, że tylko nieznaczna część heterogenego jądrowego RNA /hnRNA/ ulega ostatecznie przekształceniu w mRNA i zostaje przetransportowana do polirybosomów /Scherer i Marcaud 1968, Darnell i wsp. 1971, Jelinek i wsp. 1973/.

Bezpośrednie prześledzenie dynamiki transportu nowosyntetyzowanego RNA z jądra do cytoplazmy w układzie skrawkowym okazało się technicznie niewykonalne. Bardzo intensywny pobór <sup>3</sup>H-urydyny przez tkankę i stosunkowo znacznie wolniejsze jej wbudowywanie do RNA /Yanagihara 1974b/ uniemożliwiło zastosowanie metody "pulse and chase" z użyciem nieznakowanej urydyny. Nie powiodła się również próba zablokowania włączania prekursora do jądrowego RNA przy użyciu wysokich

stężeń aktynomycyny D, a następnie śledzenie wzrostu radioaktywności w polirybosomalnym RNA, bowiem antybiotyk silnie hamował jego transport /Grouse i Schrier 1977/. Interpretację wiążącą powyższe zmiany z zaburzeniami transportu dodatkowo komplikuje brak jasności co do stopnia pokrewieństwa pomiędzy poli/A/<sup>+</sup>RNA występującym w jądrze a poli/A/<sup>+</sup>mRNA. Wykazano bowiem, że znaczna część jądrowego poli/A/<sup>+</sup>RNA nie jest prekursorem poli/A/<sup>+</sup>RNA wykrywanego w polirybosomach /Berger i Cooper 1978/, a same fragmenty poli/A/ w jądrowym RNA często przylegają do sekwencji RNA o charakterze nieinformacyjnym, nie spotykanych w mRNA /Herman i wsp. 1976, Mackedonsky i McConkey 1978, Minty i wsp. 1977/. Wydaje się ponadto, że większość jądrowego poli/A/ nigdy nie dociera do cytoplazmy /Edmonds i wsp. 1971, Perry i wsp. 1974/.

W świetle nowszych danych wskazujących, że transport RNA z jądra do cytoplazmy jest procesem czynnym i zużywającym energię /Spirin, 1969, Ishikawa i wsp. 1972, Schumm i wsp. 1973, Georgiev 1974, Schumm i Webb 1974, McNamara i wsp. 1975, Sato i wsp. 1977/, nietrudno zrozumieć jego zahamowanie w warunkach niedoboru energetycznego. Tak prosta zależność nie wyjaśnia jednak wybiórczo spadku transportu poli/A/<sup>+</sup>RNA. Ostatnio Sawicki i wsp. /1977/ wykazali, że w komórkach HeLa warunkiem wytransportowania poli/A/<sup>+</sup>RNA z jądra do cytoplazmy jest przyłączenie doń fragmentu poliadenylowego o długości conajmniej 200 nukleotydów. Przy założeniu, że zjawisko to odnosi się również do innych tkanek eukariontów, zahamowanie transportu poli/A/<sup>+</sup>RNA w warunkach

niedotlenienia można było hipotetycznie wiązać z zaburzeniem procesu poliadenylacji RNA w jądrze. Fakt, że tkanka niedotleniana przez 20 min. syntetyzowała niezmienną ilość jądrowego poli/A/<sup>+</sup>RNA /tabela 7/ nie przeczy tej hipotezie, bowiem dołączone do RNA fragmenty poli/A/ mogły mieć niedostateczną długość, nie zapewniającą wyjścia RNA z jądra. Hipotezę tę omówiono szerzej w rozdziale 6, poświęconym porównaniu syntezy jądrowego RNA i poli/A/ w analogicznych warunkach niedotlenienia.

Zmiany obserwowane w późniejszej fazie niedotlenienia, tzn. po 30 min., nie ograniczały się wybiórczo do poli/A/<sup>+</sup>RNA, a spadek włączania prekursora do RNA wszystkich frakcji podkomórkowych odzwierciedlał ogólne zahamowanie syntezy RNA. Wynik ten pokrywa się z wcześniejszym spostrzeżeniem Yanagihary /1974a/, który stwierdził znaczne obniżenie aktywności obu głównych polimeraz RNA I i II, w następstwie 30-minutowego niedotlenienia w tym samym modelu.

W przeciwieństwie do niedotlenienia 20-minutowego, inkubacja skrawków w atmosferze azotu przez okres 30 min. prowadziła do syntezy RNA o zmienionych własnościach sedymentacyjnych. Nowosyntetyzowany jądrowy poli/A/<sup>+</sup>RNA oraz cytoplazmatyczny poli/A/<sup>+</sup>RNA charakteryzowały się średnimi stałymi sedymentacji niższymi od preparatów kontrolnych /ryc. 5 i 6/. Trudno na podstawie obecnie dostępnych danych odpowiedzieć na pytanie, dlaczego 30-minutowe niedotlenienie nie wpłynęło na sedymentację poli/A/<sup>+</sup>RNA frakcji jądrowej. Niewykluczone, że w badanym układzie substratami poliadenylacji mogą być tylko pełne, "dojrzałe" cząstki RNA

/Perry i wsp. 1974/; hipoteza ta oczekuje na doświadczalne potwierdzenie. Dostępne dane nie pozwalają również na wyjaśnienie, dlaczego 30-minutowe niedotlenienie prowadzi do syntezy RNA o krótszym łańcuchu. Wydaje się, że przyczyna tego zjawiska nie leży we wzmożonej degradacji RNA, bowiem analiza sedymentacyjna nie wykazała gromadzenia się krótkich fragmentów RNA na szczycie gradientu. Uzyskany wynik prawdopodobnie odzwierciedla zahamowanie elongacji łańcuchów RNA. Dane świadczące o małej wrażliwości rybonukleaz mózgu na niedotlenienie przedstawiono w rozdziale 8.

## 6. POLIADENYLACJA A SYNTEZA JĄDROWEGO RNA W WARUNKACH NIEDOTLENIEŃ

### 6.1. Założenie badań i układ doświadczalny

Dla wytłumaczenia opisanego w poprzednim rozdziale wybiórczego zahamowanie przechodzenia /transportu?/ poli/A/<sup>+</sup> RNA z jąder do polirybosomów mózgu we wczesnej fazie niedotlenienia zaproponowano hipotezę, że zjawisko to jest skutkiem zaburzeń poliadenylacji RNA w jądrze /rozd. 5.3/. Choć jak dotychczas nie ma pełnej jasności co do mechanizmu transportu mRNA z jądra do cytoplazmy, a zwłaszcza co do roli fragmentów poli/A/ w tym transporcie, szereg danych wskazuje na sprzężenie transportu z poliadenylacją. Poza wspomnianą pracą Sawickiego i wsp./1977/, w której autorzy dowiedli, że warunkiem wyjścia poli/A/<sup>+</sup>RNA z jądra jest posiadanie przez ten fragment poli/A/ o długości conajmniej 200 nukleotydów, na uwagę zasługuje seria badań z użyciem kordycepiny /3'-dezoksyadenozyny/, która w niskich stężeniach swoiście hamuje syntezę poli/A/. Dodanie tego związku do hodowli komórek HeLa bądź mięsaka wysiękowego 180 hamowało pojawianie się nowosyntetyzowanego RNA w polirybosomach /Penman i wsp.1970, Darnell i wsp.1971, Adesnik i wsp.1972/, a jego podanie szczurom powodowało wybiórczy spadek uwalniania mRNA z jąder wątroby w układzie bezkomórkowym /Schumm i Webb, 1974/. Z zahamowaniem poliadenylacji przez kordycepinę wiązano również blokowanie przez ten związek indukcji syntetazy glutaminianowej w niedojrzałej siatkówce /Sarkar i wsp. 1973/.

W przedstawionym cyklu badań sprawdzono zasadność przyjętej hipotezy przez porównanie w tym samym układzie doświadczalnym syntezy jądrowego RNA i poli/A/ w dwóch stadiach niedotlenienia mózgu. W tym celu skrawki mózgu inkubowano z  $^3\text{H}$ -adenozyną w warunkach identycznych do inkubacji z  $^3\text{H}$ -urydyną /rozd. 3.4/, a następnie mierzono włączanie prekursora do RNA oraz do poli/A/. Metodę wyodrębniania fragmentu poli/A/, opartą na trawieniu RNA rybonukleazami oraz sposób obliczania radioaktywności zawartej w poli/A/ opisano szczegółowo w rozdz. 3.9. oraz w legendzie do tabeli 2. Określono ponadto wpływ niedotlenienia na aktywność polimerazy poli/A/ w izolowanych jądrach /rozd. 3.10/, poprzedzając je ustaleniem optymalnych warunków polimeryzacji w preparacie kontrolnym.

## 6.2. Włączanie $^3\text{H}$ -adenozyny do poli/A/ i RNA.

Radioaktywność właściwa jądrowego RNA po inkubacji skrawków w warunkach kontrolnych wahała się w granicach 400-900 rozpadów/min/ $\mu\text{g}$  RNA, przy odzysku RNA wynoszącym 110-150  $\mu\text{g}$ /półkulę mózgu. W tych warunkach na fragmenty poli/A/ przypadało średnio 2,4% radioaktywności całkowitej włączonej do RNA /tabela 8, kolumna 2/. Niedotlenienie skrawków przez okres 20 min. nie miało wpływu na włączanie adenozyny do RNA /tabela 8, kolumna 1/, prowadziło natomiast do spadku udziału radioaktywnego poli/A/ w nowosyntetyzowanym RNA do wartości średnio 1,8%, tzn. do około 75% wartości kontrolnej. Spadek ten był wysoce znamieny



Tabela 8

Wpływ niedotlenienia na włączanie  $^3\text{H}$ -adenozyny do jądrowego RNA i poli/A/ oraz na aktywność polimerazy poli/A/

Czas niedotlenienia /min/	Włączanie $^3\text{H}$ -adenozyny		Aktywność polimerazy poli/A/*
	RNA**	Poli/A/***	
0	100	$2,4 \pm 0,3/14/$	100
20	$91 \pm 16/6/$	$1,8 \pm 0,3/7/$ $p < 0,01$	$104 \pm 10/6/$
30	$56 \pm 16/5/$	$2,6 \pm 0,4/6/$ $p > 0,05$	$97 \pm 13/6/$

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe. W nawiasach - liczba doświadczeń. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta.

\* % kontroli,

\*\* % całkowitej radioaktywności RNA.

statystycznie /Tabela 8 kolumna 2/. W wyniku niedotleniania trwającego 30 min., dochodziło do prawie 50% obniżenia wbudowywania prekursora do RNA, przy czym na poli/A/ przypadało średnio 2,6% radioaktywności całkowitej, a więc ułamek równy wartości kontrolnej /różnica była statystycznie nieznamienna/.

### 6.3. Aktywność polimerazy poli/A/.

Synteza poli/A/ w jądrach komórkowych przebiegała optymalnie w obecności jonów  $\text{Mn}^{+2}$  w stężeniu 0,8 mM /ryc.7/. Reakcja nie ulegała zahamowaniu pod wpływem aktynomycyny D

w wysokim stężeniu /5  $\mu\text{g/ml}$ /, natomiast była wrażliwa na kordycepino-5 trójfosforan /tabela 9/. W innych doświadczeniach, których nie zilustrowano, wykazano następujące cechy

Tabela 9

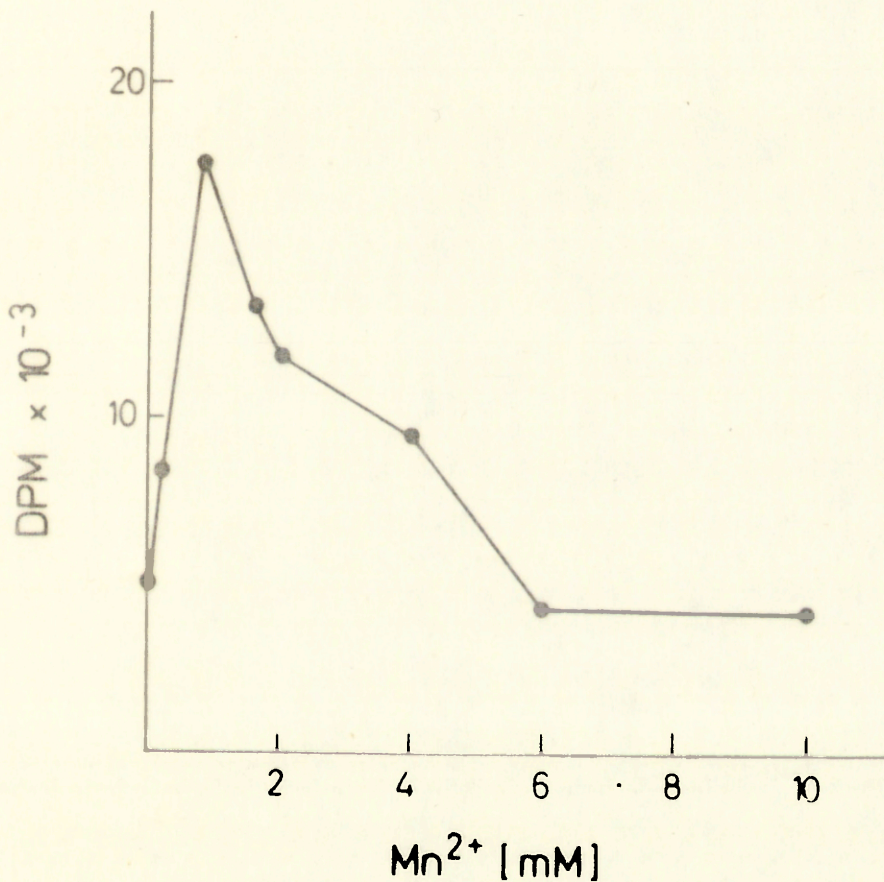
Wpływ aktynomycyny D i kordycepino-5-trójfosforanu na aktywność polimerazy poli/A/.

Związek dodany i jego dawka	Aktywność polimerazy poli/A/ /% kontroli/
Aktynomycyna D /5 $\mu\text{g/ml}$ /	108
Kordycepino-5-trójfosforan /50 $\mu\text{g/ml}$ /	32
/300 $\mu\text{g/ml}$ /	18

Wyniki stanowią średnią z 3 oznaczeń, przy odchyleniu nieprzekraczającym 3%.

reakcji w tym układzie: brak wpływu jonów  $\text{Mg}^{+2}$  w zakresie stężeń 0,02-2mM oraz egzogenego poli/A/ w stężeniu do 400  $\mu\text{g/ml}$ , liniowy przebieg reakcji przez okres 60 minut, oraz liniową zależność od ilości dodanej frakcji jądrowej w zakresie 20-150  $\mu\text{g}$  jądrowego DNA. Włączanie prekursora do DNA stanowiło nie więcej niż 2% radioaktywności całkowitej włączonej do kwasów nukleinowych /por. tabela 2, radioaktywność frakcji strącającej się TCA w obecności kompletu rybonukleaz/.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 8 /kolumna 3/ jądra izolowane ze skrawków po niedotlenieniu zarówno 20- jak i 30-minutowym posiadały niezmienną aktywność polimerazy poli/A/.



Ryc.7 Wpływ stężenia jonów  $Mn^{2+}$  na aktywność polimerazy poli/A/ w mózgu królika. Oznaczenia aktywności przeprowadzono w warunkach standardowych /rozd. 3.10/. Próbkę frakcji jądrowej użyta w każdym teście odpowiadała 100  $\mu g$  DNA. DPM = rozpad/min.

#### 6.4. Omówienie i wnioski

Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, że we wczesnej fazie niedotlenienia dochodzi do zahamowania poliadenylacji jądrowego RNA. Zjawisko to poprzedza spadek syntezy RNA. Jeżeli sprzężenie syntezy poli/A/ z transportem poli/A/<sup>+</sup>RNA z jądra do cytoplazmy uznać za udowodnione, to występujący we wczesnym okresie niedotlenienia wybiórczy spadek wbudowywania prekursora do poli/A/<sup>+</sup>RNA związanego z polirybosomami można tłumaczyć zahamowaniem jego transportu. Na uwagę zasługuje fakt, że zahamowanie poliadenylacji oraz spadek radioaktywności polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA osiągały po 20 min. niedotlenienia prawie identyczną wartość /odpowiednio 25% i 23%/. Ta zbieżność dodatkowo przemawia za słusznością przyjętej interpretacji, chociaż jej ostateczne zweryfikowanie będzie możliwe dopiero wówczas, gdy w pełni wyjaśnią się wątpliwości co do relacji prekursor-produkt pomiędzy jądrowym a polirybosomalnym poli/A/<sup>+</sup>RNA /Berger i Cooper 1978/, oraz rola procesu wydłużania łańcucha poli/A/ w cytoplazmie o kilka reszt poliadenylowych /Slater i wsp. 1973, Diez i Brawerman 1974/. Teoretycznie, zaburzenie poliadenylacji mogło mieć dwojakie następstwa: 1- zupełne ominięcie w procesie poliadenylacji niektórych potencjalnych prekursorów jądrowych poli/A/<sup>+</sup>mRNA oraz 2- dołączenie sekwencji poli/A/ zbyt krótkich, nie zapewniających transportu /Sawicki i wsp. 1977/. Wydaje się że sytuacja zaistniała w wyniku niedotlenienia bardziej odpowiada możliwości drugiej. Przeprowadzona uprzednio analiza jądrowego

RNA zsyntetyzowanego z udziałem  $^3\text{H}$ -urydyny nie wykazała bowiem spadku ilości cząstek RNA zawierających reszty poliadenylowe pod wpływem 20-minutowego niedotlenienia /tabela 7/. Najlepszym sposobem udokumentowania słuszności tego wniosku byłoby dokonanie analizy długości fragmentów poli/A/ dołączonych do jądrowego RNA, np. metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym /Darnell i wsp. 1971/, co w tym układzie okazało się niemożliwe ze względu na zbyt niską radioaktywność poli/A/. Warto jednak podkreślić podobieństwo niektórych parametrów syntezy jądrowego RNA w kontrolnych skrawkach mózgu /26% stanowił poli/A/<sup>+</sup>RNA, a do sekwencji poli/A/ włączało się 2,4%  $^3\text{H}$ -adenozyny/ do danych opisanych przez Jelinka i wsp. /1973/ dla radioaktywnego hnRNA komórek HeLa /odpowiednio 20-40% oraz 2,1-2,3% w wyniku 45-sekundowej inkubacji/, co w ich przypadku odpowiadało dołączeniu do RNA sekwencji poli/A/ o długości 200 nukleotydów. W świetle tych danych, towarzyszący 20-minutowemu niedotlenieniu spadek względnej radioaktywności poli/A/ z 2,4% do 1,8% przy niezmięnionej syntezie oraz własnościach sedymentacyjnych radioaktywnego RNA, najprawdopodobniej odzwierciedla syntezę łańcuchów poli/A/ o długości mniejszej niż 200 nukleotydów.

W następstwie 30-minutowego niedotlenienia nie zaobserwowano wybiórczego zahamowania poliadenylacji, bowiem tej fazie towarzyszył ogólny spadek syntezy RNA. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszym spostrzeżeniem /tabela 7/, że na tym etapie niedotlenienia spadek wbudowywania prekursora do polirybosomalnego RNA obejmuje w równej mierze poli/A/<sup>+</sup>RNA i poli/A/<sup>-</sup>RNA.

Według nowszych danych, jądrowa polimeraza poli/A/ stanowi grupę enzymów występujących pod różnymi postaciami i w różnych przedziałach jądra oraz charakteryzujących się niejednakową zależnością od jonów  $Mn^{+2}$  lub  $Mg^{+2}$ , jak również od obecności oligo/A/ jako primera /Haft i Keller, 1973, Niessing 1975, Pellicer i wsp. 1975, Jacob i wsp. 1976, Rose i wsp. 1977, Louis i wsp. 1978/. Większość cech reakcji w opisanym powyżej układzie doświadczalnym, takich jak: wyraźnie zaznaczone optimum dla jonów  $Mn^{+2}$ , zupełny brak wpływu  $Mg^{+2}$  oraz niezupełne hamowanie przez kordycepino-3' trójfosforan w stężeniu 50 ug/ml, przypominały własności polimerazy poli/A/ niezwiązanej z chromatyną, występującej i przeważającej ilościowo w wątrobie /Rose i wsp. 1977/. Inne postaci polimerazy mózgowej, choć prawdopodobnie istnieją /Kato i Kurokawa 1970/, nie ujawniły się w zastosowanych warunkach inkubacji. Z tym zastrzeżeniem, aktywność polimerazy poli/A/ mózgu można uznać za niewrażliwą na niedotlenienie. Pod tym względem enzym ten różni się więc od polimeraz RNA, których aktywność w następstwie 30-minutowego niedotlenienia w tych samych warunkach wyraźnie spadała /Yanagihara, 1974a/. Warto przy tym zaznaczyć, że zmiany aktywności polimerazy poli/A/ pod wpływem czynników egzogennych spostrzegano dotychczas w niewielu tylko warunkach i tak: jej wzrost towarzyszył stymulacji limfocytów fitohemaglutyniną /Coleman i wsp. 1974/, natomiast spadek następował w wątrobie szczura w wyniku głodzenia /Jacob i wsp. 1976b/ oraz w niewielkim stopniu w mózgu szczura po zatruciu tlenkiem węgla /Albrecht 1977b/.

Łączna analiza wyników badań nad poliadenylacją RNA przy użyciu  $^3\text{H}$ -adenozyny, aktywności polimerazy poli/A/ oraz syntezy jądrowego RNA skłania do przypuszczenia, że niedotlenienie we wczesnej fazie prowadzi do kompartmentacji ATP w obrębie jądra; zahamowanie poliadenylacji mogło wynikać z obniżonej dostępności ATP dla tej reakcji w okresie, gdy jego poziom nadal zabezpieczał prawidłową syntezę RNA. Zjawisko to można interpretować jeszcze prościej przyjmując, że proces poliadenylacji, zużywający wyłącznie ATP, jest bardziej wrażliwy na jego niedobór niż synteza RNA. Winters i Edmonds /1973/, a następnie Jelinek /1974/ zaobserwowali, że polimeraza poli/A/ wymaga dla osiągnięcia maksymalnej aktywności kilkudziesięcio-, a nawet kilkusetkrotnie wyższych stężeń ATP niż polimeraza RNA. Wybiórcza wrażliwość procesu poliadenylacji na niedotlenienie przypomina więc równie wybiórcze hamowanie przez analogi ATP - takie jak omawiana powyżej kordycepina oraz widarabina /9- D-arabinofuranozyloadenina/ /Rose i Jacob 1978/.

## 7. WPŁYW NIEDOKRWIENIA NA SYNTEZĘ RNA

### 7.1. Charakterystyka modelu i uzasadnienie wyboru czasu przeprowadzania niedokrwienia

W badaniach posłużono się powszechnie stosowanym modelem jednostronnego niedokrwienia mózgu chomika mongolskiego przez uniedrożnienie jednej z tętnic szyjnych wspólnych. Model ten jest szczególnie przydatny ze względu na dużą, ocenianą na 30%-60% osobników w populacji, częstość występowania u tego gatunku anomalii pierścienia tętniczego podstawy mózgu /Kahn 1972, Harrison i wsp. 1973, Ito i wsp. 1975, Levine i Sohn 1975/. Związane z tą nieprawidłowością upośledzenie krążenia obocznego powoduje wystąpienie objawów ciężkiego niedokrwienia półkuli mózgu po stronie nie-drożnej tętnicy charakteryzujących się typowym zespołem neurologicznym /Kahn 1972, Yanagihara 1978a/, które stanowią podstawę selekcji materiału doświadczalnego do badań. Dogodność modelu dla badań biochemicznych polega na tym, że u zwierząt "objawowych" skutki metaboliczne niedokrwienia uwidaczniają się prawie wyłącznie w półkuli niedokrwionej, a tylko w bardzo nieznacznym stopniu w półkuli przeciwle-głej, która w związku z tym może służyć jako kontrolny układ odniesienia /Levy i Duffy 1977/. Zmiany metaboliczne towarzyszące niedokrwieniu mózgu w tym modelu zostały scharakteryzowane dość szczegółowo. Już w kilkanaście minut po zamknięciu tętnicy obserwuje się spadek zawartości związków wysokoenergetycznych /fosfokreatyny, ATP/, glukozy i gliko-



geny oraz wzrost poziomu mleczanów w półkuli niedokrwionej. Zmiany te pogłębiają się wraz z przedłużeniem okresu niedokrwienia do 1,3 lub 6 godzin /Lust i wsp. 1975, Mrsulja i wsp. 1976a, Levy i Duffy 1977/. Niedokrwieniu towarzyszy również postępujące obniżanie się poziomu norepinefryny i dopaminy oraz wzrost zawartości serotoniny i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego /Mrsulja i wsp. 1976b/. Wznowienie krążenia po okresie niedokrwienia wpływa na zawartość różnych metabolitów w mózgu w zróżnicowany sposób. Poziom związków wysokoenergetycznych oraz glukozy stosunkowo szybko powraca do normy lub wartości bliskich normie, natomiast podwyższone stężenie mleczanu utrzymuje się przez dłuższy okres czasu, a szybkość ponownego ustalenia się poziomu kontrolnego tego związku jest odwrotnie proporcjonalna do czasu trwania niedokrwienia /Mrsulja i wsp. 1976a/. Zmiany w poziomie glikogenu oraz dopaminy i norepinefryny są z kolei dość wierną ilustracją teorii Klatzo o "dojrzewaniu" zmian poniedokrwieniowych: zawartość tych związków w mózgu po wznowieniu krążenia wzrasta, a szybkość osiągnięcia poziomu "szczytowego" jest wprost proporcjonalna do czasu trwania niedokrwienia /Klatzo 1975/. Do zmian pojawiających się lub potęgujących w okresie recykulacji zalicza się również krótkotrwały wzrost poziomu cAMP /Lust i wsp. 1975, Mrsulja i wsp. 1976a/, a następnie spadek aktywności cykazy adenylowej i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -zależnej ATPazy /Schwartz i wsp. 1976/. Wyniki te wskazują wyraźnie, że proces powracania stanu metabolicznego mózgu do normy po wznowieniu krążenia nie jest prostym odwróceniem zmian zaistniałych w okresie niedokrwienia. W związku z tym nasunęło

się pytanie, w jakim stopniu zjawisko "dojrzewania" oraz opóźnienia powrotu do normy niektórych parametrów metabolicznych wiąże się z przejściowym zaburzeniem funkcji enzymów, a w jakim z uszkodzeniem białek enzymatycznych bądź strukturalnych a następnie ich niedostatecznie wydajną re-syntezą. Pytanie to skierowuje uwagę na zagadnienie roli syntez makromolekularnych w patomechanizmie uszkodzeń wywołanych niedokrwieniem, a w tym na problem syntezy RNA i jej powiązań z syntezą białek.

Z badań opisanych w poprzednich rozdziałach wynika, że niedotlenienie tkanek mózgu hamuje dopływ nowosyntetyzowanego RNA do polirybosomów i że zahamowanie to przebiega w dwóch fazach: w fazie wczesnej dochodzi do wybiórczego obniżenia przechodzenia poli/A/<sup>+</sup>RNA na skutek zaburzonej poliadenylacji, natomiast efekt późniejszy nie jest wybiórczy i wiąże się z zahamowaniem syntezy RNA. Doświadczenia opisane w niniejszym rozdziale miały na celu ustalenie, w jakim stopniu niedokrwienie wpływa na procesy decydujące o poziomie mRNA w cytoplazmie i polirybosomach oraz, czy sekwencja zmian w metabolizmie RNA jest podobna do stwierdzonej w modelu niedotlenienia pozaustrojowego.

W celu uchwycenia wczesnych zmian w metabolizmie RNA, zdecydowano się na prowadzenie niedokrwienia przez okres 3 godzin. Podstawę wyboru czasu trwania niedokrwienia stanowiło spostrzeżenie Yanagihary /1976, 1978a/, że zachodzącemu w tym czasie znacznemu spadkowi syntezy białka towarzyszy jedynie niewielkie obniżenie aktywności polimeraz RNA w izolowanych jądrach. Scharakteryzowano ponadto wpływ niedo-

krwienia 6-godzinne, w wyniku którego dochodzi do niemal 90-procentowego zahamowania syntezy białka /Yanagihara 1978b/.

Skrawki mózgu inkubowano w warunkach standardowych z  $^3\text{H}$ -urydyną /rozd. 3.3/, a następnie mierzono radioaktywność właściwą RNA frakcji jądrowej, błon szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz wolnych polirybosomów. Oczyszczony cytoplazmatyczny RNA /rozd. 3.5/ rozdzielano na oligo/dT/ celulozie na poli/A/<sup>+</sup>RNA i poli/A/<sup>-</sup>RNA /rozd. 3.6/. Jądrowy oraz cytoplazmatyczny RNA poddawano analizie sedymentacyjnej /rozd. 3.7/.

## 7.2. Wyniki

Tabela 10 ilustruje włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do frakcji podkomórkowych niedokrwionej półkuli mózgu w stosunku do półkuli przeciwległej.\*

Niedokrwienie 3-godzinne powodowało spadek zdolności skrawków mózgu do włączania prekursora do RNA frakcji błonowej i polirybosomalnej, przy niezmiennym włączaniu do homogenatu oraz frakcji jądrowej. W wyniku niedokrwienia 6-godzinne zanotowano spadek radioaktywności właściwej

---

\* Doświadczenia pilotowe wykazały, że półkule przeciwległe do półkuli niedokrwionej nie różnią się pod względem parametrów badanych od mózgow zwierząt nie poddanych żadnemu zabiegowi. Obserwacja ta odnosi się zarówno do wczesnego jak i późnego stadium niedokrwienia.

Tabela 10

Wpływ niedokrwienia na włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA frakcji podkomórkowych mózgu chomika mongolskiego

Czas trwania niedokrwienia /godz./	Względna radioaktywność właściwa RNA			
	Homogenat	Jądra	Siatka śródplazmatyczna szorstka	Polirybosomy wolne
3	120 $\pm$ 18	101 $\pm$ 15	72 $\pm$ 13	63 $\pm$ 11
6	80 $\pm$ 12	70 $\pm$ 13	63 $\pm$ 16	54 $\pm$ 12

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe uzyskane w 6-ciu równoległych doświadczeniach i wyrażono w procentach wartości kontrolnych. Kontrolny układ odniesienia stanowiły półkule mózgu po stronie niepodwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej.

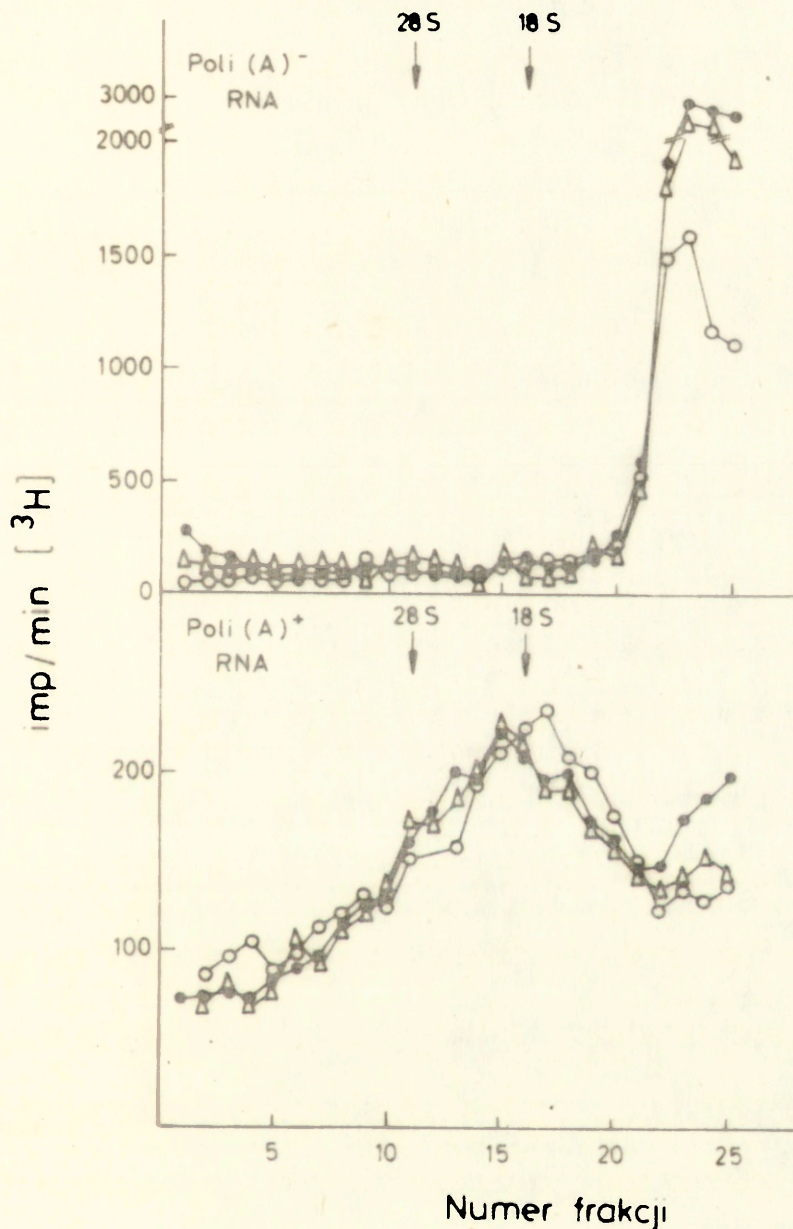
nowosyntetyzowanego RNA we wszystkich frakcjach podkomórkowych, przy czym największemu zahamowaniu ulegało wbudowywanie prekursora do polirybosomalnego RNA.

Wpływ niedokrwienia na własności sedymentacyjne nowosyntetyzowanego poli/A/ $^+$ RNA oraz poli/A/ $^-$ RNA frakcji cytoplazmatycznej przedstawiono na ryc.8. Doświadczenia z poli/A/ $^-$ RNA, w których na gradienty nakładano równą masę RNA, wykazały bardzo nieznaczny wpływ 3-godzinnego niedokrwienia na jego syntezę, podczas gdy niedokrwienie 6-godzinnie powodowało ponad 40% obniżenie włączania  $^3\text{H}$ -urydyny do przeważających w preparacie frakcji niskocząsteczkowych, reprezentujących 4S i/lub 5S RNA. Profil sedymentacyjny poli/A/ $^+$ RNA zsyntetyzowanego po 3-godzinnym niedokrwieniu nie różnił się od profilu preparatu kontrolnego, natomiast radioaktywny RNA z półkuli po 6-godzinnym niedokrwieniu osadzał się w gradiencie sacharozowym wolniej niż RNA kontrolny.

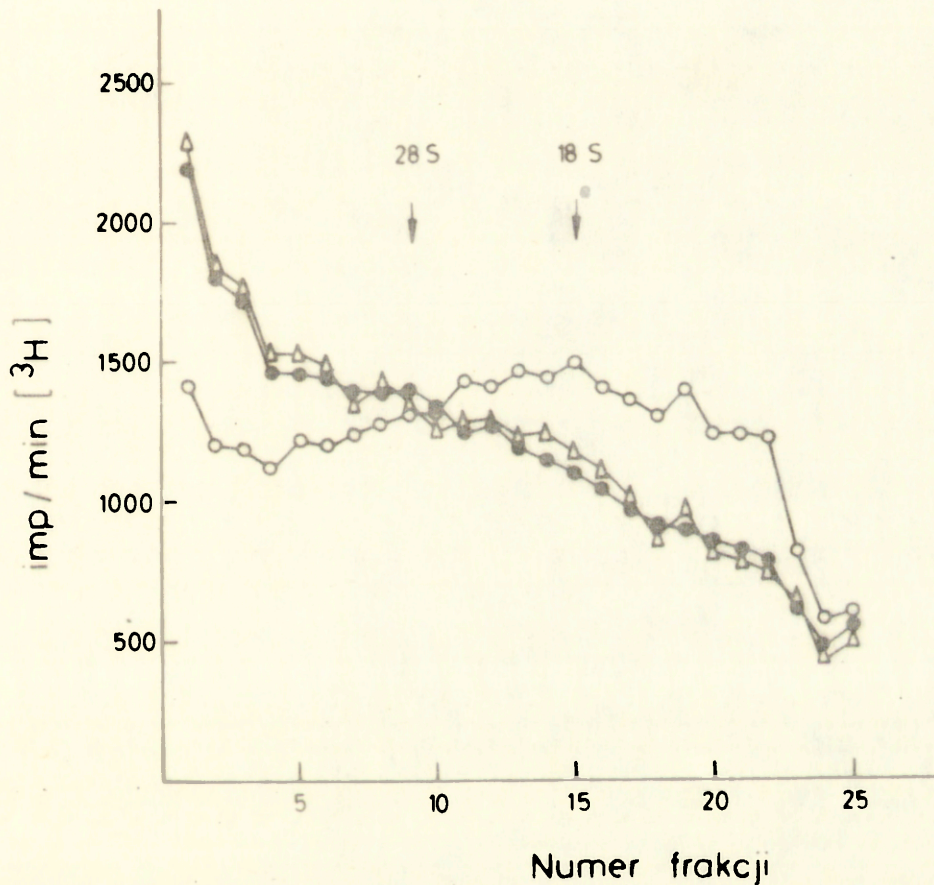
Własności sedymentacyjne jądrowego RNA zsyntetyzowanego po 3 godz. niedokrwienia nie różniły się w widoczny sposób od własności preparatu kontrolnego. Oba preparaty charakteryzowały się przewagą składników wysokocząsteczkowych /ryc. 9/. W radioaktywnym RNA uzyskanym po 6 godzinach niedokrwienia występowała obfitość produktów niskocząsteczkowych, w większości o stałej sedymentacji poniżej 28S.

### 7.3. Omówienie i wnioski

Uzyskane wyniki potwierdziły założenie, że niedokrwieniu towarzyszą zmiany prowadzące w efekcie do obniżenia poziomu nowosyntetyzowanego mRNA w cytoplazmie i/lub w polirybosomach oraz że podobnie jak w modelu niedotlenienia, charakter tych zmian jest różny w dwu fazach niedokrwienia. Zahamowanie włączania urydyny do RNA po 3 godz. niedokrwienia objęło tylko frakcje cytoplazmatyczne, co wskazuje, że w tym stadium - podobnie jak to miało miejsce w wyniku 20-minutowego niedotlenienia - zaburzeniu uległ proces przechodzenia RNA z jądra do cytoplazmy i polirybosomów, a nie jego synteza. Bardzo niski odzysk radioaktywnego RNA, zwłaszcza polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA, ograniczony dodatkowo ilością uzyskiwanego materiału patologicznego /tylko 30% operowanych zwierząt charakteryzowało się klinicznymi objawami udaru mózgu, a wśród nich 30% nie przeżywało 3 godzin, a ok. 60% - 6 godzin/, uniemożliwił przeprowadzenie statystycznie znaczącej oceny zmian ilościowych w syntezie poli/A/<sup>+</sup>RNA na podstawie badań bezpośrednich, jak to uczyniono w



Ryc.8 Własności sedymentacyjne cytoplazmatycznego poli(A)<sup>-</sup> RNA oraz poli(A)<sup>+</sup> RNA z mózgu chomika mongolskiego, zsyntetyzowanego w skrawkach kontrolnych /●-●/ oraz uzyskanych z mózgu po 3 godz. /△-△/ lub 6 godz. /○-○/ niedokrwienia. Na każdy gradient nakładano odpowiednio poli(A)<sup>-</sup> RNA w ilości odpowiadającej ok. 10,0 jednostkom A<sub>260</sub> iub poli(A)<sup>+</sup> RNA o radioaktywności ok. 4000 imp./min. Cytoplazmatyczny RNA izolowano z pełnej frakcji postmitochondrialnej. Warunki wirowania identyczne do opisanych w legendzie ryc. 1.



Ryc. 9 Wpływ niedokrwienia na własności sedymentacyjne nowosyntetyzowanego jądrowego RNA mózgu chomika mongolskiego. Profile sedymentacyjne charakteryzują RNA zsyntetyzowane w skrawkach kontrolnych /●—●/ oraz izolowanych po 3 /△—△/ 16 /○—○/ godzinach niedokrwienia. Na każdy gradient nakładano RNA o radioaktywności ok. 30000 imp/min. Warunki wirowania identyczne do opisanych w legendzie do ryc. 5. Jako nośnik użyto nieradioaktywny RNA poli-rybosomalny.

modelu niedotlenienia. Niemniej fakt, że radioaktywność właściwa poszczególnych frakcji cytoplazmatycznego poli/A/RNA zsyntetyzowanych po 3-godzinnym niedokrwieniu nie różniła się od wartości kontrolnych /ryc. 8, wykres górny/, świadczył pośrednio, że w tym czasie zmiany dotyczyły głównie poli/A/<sup>+</sup>mRNA. Warto nadmienić, że w pojedynczym doświadczeniu z 3-godzinnym niedokrwieniem zanotowano spadek względnej radioaktywności polirybosomalnego poli/A/<sup>+</sup>RNA o ok. 20%. Zbieżność własności sedymentacyjnych poszczególnych klas RNA zsyntetyzowanych po 20-minutowym niedotlenieniu i 3-godzinnym niedokrwieniu /por. ryc.5 z ryc.9 oraz ryc.6 z ryc.8/ dodatkowo przemawiała za podobieństwem wczesnych zmian w obu modelach. Przez analogię można więc przypuszczać, że 3-godzinne niedokrwienie zaburza przede wszystkim proces poliadenylacji RNA w jądrze, co prowadzi do zahamowania transportu poli/A/<sup>+</sup>RNA.

Niedokrwienie trwające przez okres 6 godzin prowadziło do znacznego zahamowania syntezy RNA i powodowało znaczne zmiany we własnościach sedymentacyjnych nowosyntetyzowanego RNA. Podobnie jak w przypadku 30-minutowego niedotlenienia, zmiany nie ograniczały się do poli/A/<sup>+</sup>RNA. Nasunęło się przypuszczenie, że obok spadku rezerw energetycznych i substratowych do poziomu nie zabezpieczającego prawidłowego przebiegu syntezy, poliadenylacji i transportu RNA z jądra do cytoplazmy, na zaobserwowany obraz zmian mogła rzutować wzmożona degradacja RNA.



## 8. WPŁYW NIEDOTLENIENIA I NIEDOKRWIENIA NA AKTYWNOŚĆ RYBONUKLEAZ MÓZGU

### 8.1. Założenie badań

W poprzednich rozdziałach przedstawiono dane wskazujące, że towarzyszące niedotlenieniu lub niedokrwieniu zaburzenie polirybosomów mózgu w nowosyntetyzowane RNA/mRNA/ wiąże się we wczesnej fazie z wybiórczym zahamowaniem transportu poli/A/<sup>+</sup>mRNA z jądra do cytoplazmy na skutek zaburzonej poliadenylacji, a w fazie późniejszej ze spadkiem syntezy RNA. Uzyskane w tych badaniach wyniki nie pozwalały jednakże wykluczyć, że zmiany te mogły w jakimś stopniu wynikać również ze wzmożonej degradacji RNA w jądrach lub cytoplazmie. Aktywacja i inaktywacja rybonukleaz jest częstym zjawiskiem, towarzyszącym fizjologicznym i patologicznym procesom zachodzącym w różnych tkankach /Kraft i Shortman 1970, Liu i wsp. 1975/. Zjawisko to występuje również w mózgu, gdzie - jak wspomniano w rozdz. 1.2 - wzrost aktywności rybonukleazy zasadowej jest jednym z następstw hiperfenyloalaninemii /Roberts i Morelos 1976/ oraz zatrucia tlenkiem węgla /Albrecht 1977a/. W związku z tym, postanowiono scharakteryzować aktywność rybonukleaz kwaśnej i zasadowej we frakcjach podkomórkowych wyodrębnionych z mózgow kontrolnych, oraz niedokrwionych lub niedotlenianych przez okresy czasu odpowiadające wystąpieniu wczesnej i późnej fazy zmian w metabolizmie RNA. Substratem w reakcji był homologiczny jądrowy RNA z mózgu królika bądź chomika, a

aktywność oznaczano w pH 6,0 /rybonukleaza kwaśna/ i 7,5 /zasadowa/, a więc w warunkach ustalonych od dawna jako optymalne dla rybonukleaz cytoplazmatycznych różnych tkanek /DeLamirande i wsp. 1954, Roth i wsp. 1954/. Ostatnio wykazano, że analogiczne optima pH charakteryzują rybonukleazę kwaśną i zasadową frakcji jądrowej mózgu /Ittel i wsp. 1974, Niedergang i wsp. 1974/.

## 8.2. Aktywność rybonukleazy kwaśnej i zasadowej w warunkach kontrolnych

Kinetykę degradacji RNA w środowisku kwaśnym i zasadowym przez różne frakcje podkomórkowe mózgu królika przedstawiono na ryc. 10. We wszystkich frakcjach podkomórkowych, aktywność rybonukleazy zasadowej była wyższa niż rybonukleazy kwaśnej, a różnica ta zaznaczyła się najwyraźniej w przypadku frakcji jądrowej. Najwyższą aktywność właściwą /hydroliza RNA/mg białka/ obu rybonukleaz wykazywała frakcja postmitochondrialna, a frakcja jądrowa charakteryzowała się aktywnością wielokrotnie niższą od pozostałych. Hydroliza RNA przebiegała w sposób liniowy przez okres ok. 15 min. we frakcji postmitochondrialnej i postnuklearnej oraz przez okres 30 min. we frakcji jądrowej. Powyższe okresy inkubacji zastosowano w doświadczeniach z frakcjami izolowanymi z tkanki niedotlenionej. Trzydziesto-minutowa preinkubacja skrawków mózgu w warunkach tlenowych prowadziła do 10% zaledwie wzrostu aktywności obu rybonukleaz we frakcji postmitochondrialnej, w stosunku do frakcji wyodrębnionych ze

skrawków nieinkubowanych bądź z bezpośrednio przyrządzonych homogenatów mózgu, co uznano za efekt nie mający znaczenia dla interpretacji wyników uzyskanych w warunkach niedotlenienia. Nie odnotowano mierzalnej degradacji RNA inkubowanego w tych samych warunkach pod nieobecność frakcji tkankowych względnie z frakcjami preinkubowanymi z proteinazą K.

Charakterystyka degradacji RNA przez frakcje podkomórkowe mózgu chomika mongolskiego nie różniła się od parametrów reakcji opisanych dla mózgu królika, przy czym rybonukleaza kwaśna frakcji lizosomalno-mitochondrialnej mózgu chomika /rozd. 5.11/ zachowywała się identycznie jak enzym frakcji postnuklearnej mózgu królika. Wyjątek stanowiły rybonukleazy jądrowe, których zbyt niska aktywność w połączeniu z niewielkim odzyskiem frakcji jądrowej z mózgu chomika, uniemożliwiły przeprowadzenie statystycznie znaczących oznaczeń.

### 8.3. Aktywność rybonukleazy kwaśnej i zasadowej w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia

Niedotlenienie skrawków mózgu królika przez okres 15 i 30 min. nie wpłynęło na aktywność żadnej z rybonukleaz w badanych frakcjach podkomórkowych./tabela 11/. Niedokrwienie nie wywołało zmian aktywności rybonukleazy zasadowej we frakcji postmitochondrialnej, natomiast aktywność rybonukleazy kwaśnej wykazywała nieznaczną tendencję wzrostową po 3 godz. niedokrwienia i przeszło 1,5-krotny wzrost w wyniku

Tabela 11

Wpływ niedotlenienia na aktywność rybonukleazy kwaśnej /pH 6,0/ i zasadowej /pH 7,5/ we frakcjach podkomórkowych mózgu królika.

Czas trwania niedotlenie- nia /min./	Aktywność enzymu /% wartości kontrolnych/					
	J ą d r a		Fracja postnukle- arna		Fracja postmitochon- drialna	
	pH 6,0	pH 7,5	pH 6,0	pH 7,5	pH 6,0	pH 7,5
15	nm		98 <sup>±</sup> 12/6/	105 <sup>±</sup> 6/6/	102 <sup>±</sup> 7/5/	100 <sup>±</sup> 12/5/
30	99 <sup>±</sup> 13/4/	96 <sup>±</sup> 17/4/	95 <sup>±</sup> 8/6/	105 <sup>±</sup> 9/6/	97 <sup>±</sup> 3/6/	104 <sup>±</sup> 8/5/

Wyniki wyrażono w % radioaktywności uwolnionej w wyniku inkubacji RNA z odpowiednimi frakcjami z kontrolnych skrawków mózgu, przy użyciu identycznych ilości białka i stężeń substratu. Tabela przedstawia wartości średnie ± odchylenia standardowe. W nawiasach - liczba równoległych doświadczeń. nm = nie mierzono.

6-godzinnego niedokrwienia /tabela 12/. Wzmoczeniu aktywności tego enzymu we frakcji postmitochondrialnej towarzyszył po 6 godz. jej niewielki spadek we frakcji zawierającej lizosomy /tabela 12/.

Tabela 12

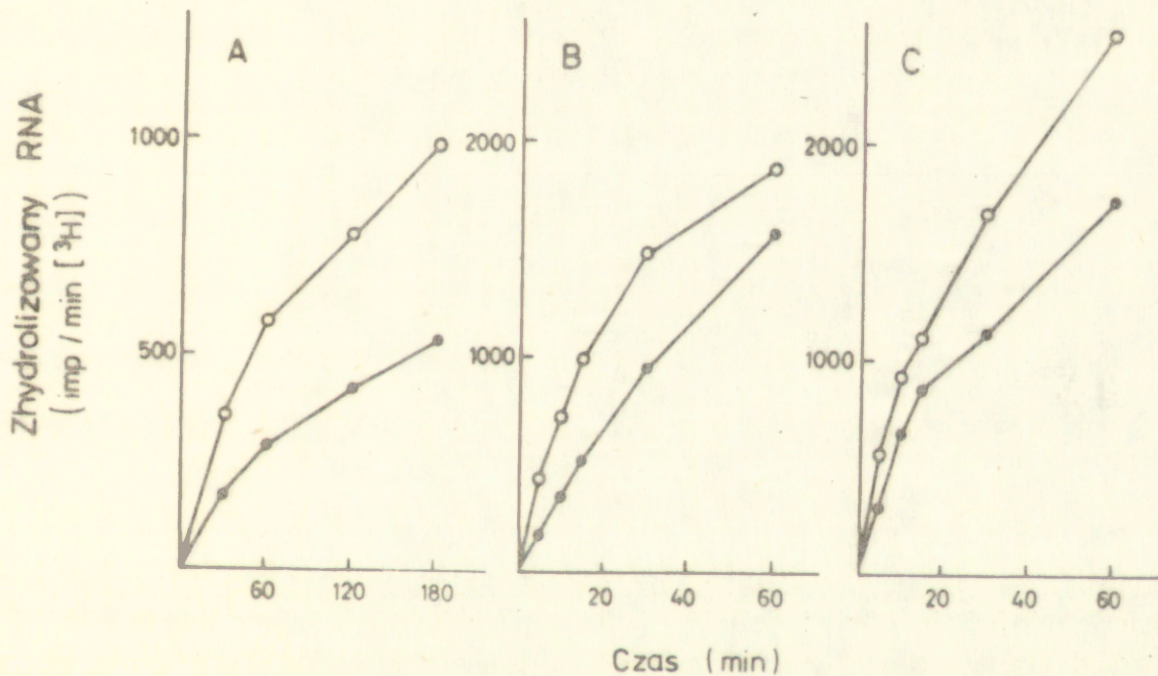
Wpływ niedokrwienia na aktywność rybonukleazy kwaśnej /pH 6,0/ i zasadowej /pH 7,5/ we frakcjach podkomórkowych mózgu chomika mongolskiego.

Czas trwania niedokrwienia /godz./	Aktywność enzymu /% wartości kontrolnych/			
	Fracja postmitochondrialna		Mitochondria + lizosomy	
	pH 6,0	pH 7,5	pH 6,0	pH 7,5
3	112 <sup>±</sup> 12/3/	104 <sup>±</sup> 5/3/	nm	nm
6	174 <sup>±</sup> 48/4/	103 <sup>±</sup> 9/4/	80 <sup>±</sup> 15/4/	nm

Wyniki przedstawiono w sposób opisany w legendzie tab.11. Układ odniesienia /materiał kontrolny/ stanowiły półkule mózgu po stronie niepodwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej.

#### 8.4. Omówienie i wnioski

W dotychczas publikowanych badaniach nad aktywnością rybonukleaz mózgu jako substrat reakcji stosowano radioaktywny RNA pochodzenia bakteryjnego bądź syntetyczne polinukleotydy. Substratami w przedstawionych powyżej badaniach były homologiczne RNA jądrowe mózgu. Ich zastosowanie wydawało się słuszniejsze z uwagi na to, że homologiczne preparaty RNA zawierają nie tylko komplet nukleotydów, ale również większość sekwencji nukleotydowych występujących w natywnym mRNA. Substratem z wyboru dla rybonu-



Ryc.10 Kinetyka reakcji hydrolizy RNA przez frakcję jądrową /A/, postnuklearną /B/ i postmitochondrialną /C/ mózgu królika. Oznaczenia wykonano w sposób standardowy w warunkach ujawniających rybonukleazę kwaśną /●—●/ i zasadową /○—○/. Mieszanki reakcyjne zawierały po około 1,0 mg białka odpowiedniej frakcji oraz 4000 imp/min. <sup>3</sup>H-RNA.

kleaz cytoplazmatycznych były radioaktywny polirybosomalny RNA, jednakże uzyskanie takiego preparatu w wystarczających ilościach i o dostatecznym stopniu wyznakowania prekursorem okazało się niemożliwe.

Niewystąpienie zmian w aktywności rybonukleaz we frakcjach cytoplazmatycznych pod wpływem niedotlenienia wskazuje, że zaobserwowany uprzednio w tych warunkach spadek zawartości nowosyntetyzowanego RNA w polirybosomach, jak również towarzyszący jeszcze wcześniejszej fazie niedotlenienia rozpad polirybosomów /Yanagihara 1976a/, nie były spowodowane wzmożoną degradacją RNA. Na uwagę zasługuje brak wrażliwości rybonukleaz jądrowych, a zwłaszcza rybonukleazy kwaśnej, która według opinii niektórych autorów posiada zdolność hydrolizowania sekwencji poli/A/ /Kwan i wsp. 1974, Ittel i wsp. 1975/. Świadczy to dodatkowo, że towarzyszący niedotlenieniu spadek radioaktywności sekwencji poli/A/ w jądrowym RNA zsyntetyzowanym z udziałem  $^3\text{H}$ -adenozyny /tabela 10/ był wynikiem zahamowania poliadenylacji, a nie wzmożonego rozkładu kwasu poliadenylowego.

Wzrost aktywności rybonukleazy kwaśnej we frakcji postmitochondrialnej po 6-godzinnym niedokrwieniu był prawdopodobnie związany z uwalnianiem się enzymu z lizosomów, bowiem towarzyszył mu spadek aktywności enzymu we frakcji wzbogaczonej w lizosomy. Wniosek ten pokrywa się ze spostrzeżeniami innych autorów, że w tej fazie niedokrwienia ujawnia się znaczny obrzęk i uogólniona wakuolizacja półkuli niedokrwionej /Fujimoto i wsp. 1976, Dodson i wsp. 1977, Yanagihara 1978a/. Wydaje się więc, że spadek zawartości RNA w polirybo-

somach w zaawansowanym stadium niedokrwienia jest po części wynikiem jego rozkładu przez rybonukleazę lizosomalną, natomiast udział tego procesu w stadiach wcześniejszych jest raczej znikomy.

Uzyskane wyniki należy interpretować z zastrzeżeniem ze względu na fakt, że czułość zastosowanej metody oznaczania aktywności rybonukleaz, opartej na pomiarze radioaktywności uwalnianych w reakcji wolnych nukleotydów, nie zapewnia wykrycia bardziej subtelnych uszkodzeń RNA, prowadzących do pojawienia się cząsteczek o niższym ciężarze cząsteczkowym. Wyniki analiz sedymentacyjnych nowosyntetyzowanych RNA /por. ryc. 5,6,9,10/ nie wskazywały jednak na wystąpienie takich uszkodzeń, zwłaszcza we wczesnych stadiach niedotlenienia i niedokrwienia.



9. ZABURZENIA METABOLIZMU RNA A PATOMECHANIZM  
ZMIAN TOWARZYSZĄCYCH NIEDOTLENIENIU  
I NIEDOKRWIENIU

W świetle oczywistej współzależności pomiędzy poziomem i jakością RNA w komórce a prawidłowym funkcjonowaniem aparatu syntezy białek, udział zaburzeń metabolizmu RNA w kształtowaniu się nieprawidłowości czynnościowych i zmian strukturalnych w tkance można a priori uznać za niewątpliwy. W poprzednich rozdziałach pracy wykazano, że jednym z następstw metabolicznych niedotlenienia i niedokrwienia mózgu jest włączanie się mniejszych niż w warunkach prawidłowych ilości nowosyntetyzowanych mRNA w cykl polirybosomalny. Efekt ten w stadium wczesnym obejmuje głównie poli/A/<sup>+</sup>RNA i wynika z zaburzenia procesów poliadenylacji i związanego z tym transportu z jądra do polirybosomów, natomiast w fazie późniejszej jest konsekwencją ogólnego zahamowania syntezy RNA. Nasuwa się pytanie, na jakim etapie niedotlenienia bądź niedokrwienia, powstający niedobór mRNA zaczyna rzutować na aktywność biosyntezy białka, a w konsekwencji współuczestniczyć w pojawianiu się innych zmian metabolicznych i strukturalnych? Z tym pytaniem wiąże się zagadnienie zależności czasowej pomiędzy występowaniem zaburzeń w biosyntezie RNA i białek.

Z dostępnych danych piśmiennictwa wynika, że zahamowanie biosyntezy białka i towarzysząca temu dezagregacja polirybosomów ujawniają się wcześniej niż zaburzenia w syntezie i transporcie mRNA. W modelu niedotlenienia, spadek włącza-

nia radioaktywnych aminokwasów do białek w skrawkach obserwuje się już po 5 min. inkubacji w warunkach beztlenowych /Yanagihara 1973, 1974b/, a dezagregację polirybosomów po 10 minutach /Yanagihara 1976a/. Tę samą prawidłowość zanotowano w przypadku niedokrwienia: znaczne /ok. 30%/ zahamowanie mikrosomalnej biosyntezy białka w półkuli niedokrwionej występuje już w 30 min. po zamknięciu tętnicy /Yanagihara 1978b/. Badania mikroskopowo elektronowe wykazały wystąpienie w tym samym okresie niedokrwienia dezagregacji polirybosomów w dużych neuronach /Hartman i Becker 1973/. Stąd wniosek, że w bardzo wczesnym stadium niedotlenienia i niedokrwienia, upośledzenie aktywności układu biosyntezy białka, polegające jak się wydaje na zahamowaniu inicjacji /rozdz. 1.1/, wynika z przyczyn niezależnych od dostępności mRNA. Sekwencja zmian prowadzących do zahamowania inicjacji nie jest jeszcze dokładnie znana. W świetle danych wskazujących na bezpośredni udział ATP w tworzeniu się kompleksu inicjującego /Staehlin i wsp. 1975/, można przypuszczać, że znaczenie ma w tym przypadku spadek poziomu ATP, obserwowany w krótkim czasie po rozpoczęciu niedotleniania /Cohen 1973/ oraz po uniedrożnieniu tętnicy /Levy i Duffy 1977/. Brak jest podstaw do oceny, w jakim stosunku do zahamowania inicjacji pozostają inne wczesne zmiany metaboliczne nie rzutujące w sposób bezpośredni na stan energetyczny tkanek mózgu, jak np. zmiany w poziomie neurotransmiterów, którym przypisuje się rolę regulacyjną w biosyntezie białka /Munro i wsp. 1977/. Interpretację w tym przypadku zaciemnia fakt, że niedokrwieniu towarzyszy wzrost poziomu

kwasy  $\gamma$ -aminomasłowe oraz spadek stężenia dopaminy /Mrsulja i wsp. 1976b/: taki stan powinien powodować raczej wzrost niż zahamowanie biosyntezy białka /Tewari i Baxter 1969, Roel i wsp. 1974, Sandoval i wsp. 1976/. Obserwowany w wyniku niedokrwienia wzrost poziomu serotoniny jest do pogodzenia z wystąpieniem spadku biosyntezy białek /Weiss i wsp. 1973/. Dalsze badania powinny przynieść wyjaśnienie, czy neurotransmitter ten różnicuje w swoim oddziaływaniu procesy inicjacji i elongacji biosyntezy białka. Niezależnie od niejasności wokół reakcji prowadzących do zahamowania inicjacji oraz do dezagregacji polirybosomów wydaje się jednak pewne, że we wczesnym stadium niedotlenienia bądź niedokrwienia nie wiążą się one w sposób znaczący ze zmianami w metabolizmie RNA. Zbyt niska czułość zastosowanych metod nie pozwoliła wykluczyć występowania we wczesnej fazie niedokrwienia zmian w syntezie lub transporcie RNA o charakterze lokalnym, ograniczonych do okolic mózgu szczególnie wrażliwych na niedokrwienie, np. do sektora H<sub>2</sub> kory amonalnej /Klatzo 1975/. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, ażeby globalny spadek biosyntezy białek w niedokrwionej półkuli mózgu mógł być wynikiem lokalnych zmian w syntezie RNA. Wpływa stąd wniosek, że skutków zaburzeń w metabolizmie RNA należy się doszukiwać wśród zmian późniejszych. Poniżej rozważono hipotezę, że następstwa zaburzeń w syntezie i transporcie mRNA mogą się kształtować w sposób potwierdzający słuszność teorii "dojrzewania uszkodzeń" zaproponowanej przez Klatzo /1975/. Teorię tę rozszerzono o elementy związane swoiście z metabolizmem RNA, a następnie przytoczono dane doświadczalne zgodne z jej założeniami.

Zahamowanie odnowy puli mRNA zdolnych do łączenia się z rybosomami w poliirybosomy, niezależnie od tego czy wynika ono ze spadku syntezy czy też transportu RNA, może być przyczyną ujawnienia się trzech najbardziej charakterystycznych cech dojrzewania zmian:

1/ opóźnienia ich wystąpienia w stosunku do okresu działania czynnika patogennego,

2/ ich stopniowego narastania w okresie po wyeliminowaniu tego czynnika oraz

3/ opóźnionej lub niepełnej odwracalności tych zmian. W myśl tej koncepcji, istota opóźnienia polegałaby na tym, że niedobór nowosyntetyzowanych mRNA w cytoplazmie spowoduje upośledzenie czynności poliirybosomów dopiero z chwilą, gdy zasoby mRNA zsyntetyzowanego w okresie poprzedzającym niedotlenienie bądź niedokrwienie okażą się niewystarczające. Stopniowemu wyczerpywaniu się starszych mRNA, przy niedostatecznie wydajnym uzupełnianiu niedoboru, towarzyszyć będzie narastanie zaburzeń w biosyntezie białka i ich dalszych konsekwencji. Jednym z czynników określających czas, po upływie którego uwidoczną się skutki spadku transportu danego mRNA jest jego trwałość. Okres półtrwania cząsteczek mRNA w mózgu waha się od 1 godz. do znacznie powyżej 24 godz. przy czym udało się wyróżnić 3 zasadnicze grupy RNA o okresach półtrwania odpowiednio 1-4 godz. 10-12 godz. oraz bardzo trwałych /Appel 1967/. Wyniki nowszych badań dotyczących poli/A/<sup>t</sup>mRNA w różnych tkankach /wątroba, komórki HeLa/ wskazują, że okres półtrwania mRNA tej klasy waha się od kilku godzin do kilku dni /Murphy i Attardi 1973, Moore

i wsp. 1977/. Dotychczas nie opublikowano danych odnośnie trwałości mRNA kodujących poszczególne białka, co w konkretnych przypadkach uniemożliwia dowodzenie zależności zmiany poniedokrwiennnej od metabolizmu mRNA. Ogólnie można założyć, że skutki zaburzenia metabolizmu mRNA będą się pojawiać po upływie czasu obejmującym pełny zakres okresów półtrwania różnych mRNA. W myśl przyjętej hipotezy, szybkość pojawiania się zmian będzie również zależeć od głębokości deficytu RNA, który z kolei jest uwarunkowany czasem oddziaływania czynnika patogennego. Innymi słowy, zmiany pojawią się tym szybciej, im dłużej mózg znajdował się w warunkach niedokrwienia lub niedotlenienia.

Współzależność pomiędzy głębokością i czasem trwania niedoboru mRNA a stopniem nieodwracalności następczych zmian metabolicznych charakteryzowałaby się prostą proporcjonalnością, co również pokrywałoby się z teorią Klatzo /1975/. Skrajnym przejawem tej zależności byłaby sytuacja, w której nieodwracalne uszkodzenie aparatu syntezy RNA wywołuje trwałe zaburzenie biosyntezy białka i w konsekwencji nieodwracalne zmiany w strukturze i funkcji komórek. Odwracalność zmian które pojawiły się z przyczyn niezwiązanych z syntezą bądź transportem mRNA, również może zależeć od poziomu mRNA; dotyczyć to będzie sytuacji, w których warunkiem powrotu do normy jest resynteza enzymu bądź białka strukturalnego. Można również założyć występowanie zmian o charakterze łańcuchowym, z natury rzeczy nieodwracalnych, a przebiegających wg schematu: niedobór mRNA  $\longrightarrow$  spadek syntezy enzymu  $\longrightarrow$  spadek aktywności enzymatycznej  $\longrightarrow$

uszkodzenie strukturalne —► zaburzenie syntezy mRNA —► niedobór mRNA, z możliwym pominięciem niektórych ogniw łańcucha.

Wykazanie w sposób bezsporny, że konkretna zmiana bądź łańcuch zmian występujących w następstwie niedotlenienia lub niedokrwienia wiąże się z niedoborem mRNA, jest bardzo trudne. Trudności wynikają przede wszystkim ze wspomnianego już braku danych na temat własności fizykochemicznych, trwałości i aktywności matrycowej poszczególnych mRNA, które pozwoliłyby na bezpośrednią ocenę ich zachowania w warunkach patologicznych. Ponadto niedoskonałość dotychczas stosowanych metod uniemożliwia dokładne prześledzenie lokalnych zmian w metabolizmie RNA, dotyczących struktur szczególnie wrażliwych, nie mówiąc już o poszczególnych typach komórek występujących w obrębie tych struktur. Interpretację dodatkowo komplikuje złożoność towarzyszących niedokrwieniu i niedotlenieniu różnych zjawisk wywołujących uszkodzenie tkanek bądź będących ich skutkiem, których wzajemne powiązania z metabolizmem RNA są bardzo trudne do ustalenia. Do zjawisk takich można zaliczyć pojawiające się już we wczesnym stadium niedokrwienia zaburzenia bariery krew-mózg dla różnych związków /Spatz i Klatzo 1976/, oraz obrzęk niedokrwionej półkuli /Fujimoto i wsp. 1976/, ze wszystkimi wpływającymi stąd konsekwencjami dla środowiska zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego w ośrodkowym układzie nerwowym. Stąd też podane poniżej przykłady, mające ilustrować powiązanie typowych dla niedokrwienia oraz niedotlenienia zmian metabolicznych z zaburzeniami w syntezie lub tran-

sporcie mRNA, będą wymagały bezpośredniego potwierdzenia doświadczalnego. Przy wyborze przykładów kierowano się dwoma zasadniczymi kryteriami: następności pojawienia się tych zmian w stosunku do wystąpienia spadku transportu i syntezy mRNA oraz zgodnością ich przebiegu z przedstawioną powyżej koncepcją dojrzewania zaburzeń zależnych od niedoboru mRNA, przewidującą w szczególności wprost proporcjonalną zależność pomiędzy głębokością deficytu nowosyntetyzowanego mRNA a szybkością narastania względnie opóźnionym cofaniem się innych zmian metabolicznych. Kryteriom tym odpowiadają następujące przykłady:

- Spadek biosyntezy białka w modelu niedotlenienia jest odwracalny w okresie poprzedzającym zahamowanie transportu mRNA do 15 minuty /patrz rozdziały 5 i 6/, natomiast staje się nieodwracalny z chwilą pojawienia się niedoboru nowosyntetyzowanego RNA w cytoplazmie. Yanagihara /1975/ wykazał, że w następstwie niedotleniania in vitro trwającego dłużej niż 15 min., skrawki mózgu przeniesione do warunków aerobowych nie odzyskują pełnej zdolności włączania radioaktywnego aminokwasu do białek. Wydaje się że ta sama prawidłowość dotyczy również i innych zmian w tym modelu. Cohen /1973/ zaobserwował niepełną odwracalność obniżenia poziomu fosfokreatyny i ATP po 20 min. niedotleniania, podczas gdy zmiany te były całkowicie odwracalne jeżeli niedotlenianie przerwano po 10 min. Webster i Ames /1965/ zwrócili uwagę, że obrzęk mitochondriów i siatki śródplazmatycznej, pojawiający się już w 3 min. po rozpoczęciu niedotlenienia, może się cofnąć jeżeli okres niedotlenia-

nia nie przekroczy 20 min. Powyższe wyniki ilustrują zbieżność czasową i sugerują istnienie związku przyczynowego pomiędzy pełną odwracalnością skutków niedotlenienia a prawidłowym funkcjonowaniem mechanizmów syntezy i transportu mRNA.

- Jednym z następstw niedokrwienia jest wzrost zawartości mleczanów w tkance /Mršulja i wsp. 1976a/. W niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich, wzrost ten w półkuli po stronie niedrożnej tętnicy osiąga bardzo wysoką wartość już po 1 godz. niedokrwienia /800% wartości kontrolnej/ i nieco wyższą /ok. 900%/ po 3 godz. Przerwanie niedokrwienia po 1 godz. powoduje prawie zupełny powrót poziomu mleczanów do normy już po upływie następnej godziny, natomiast udrożnienie tętnicy po 3 godz. jest znacznie mniej efektywne: zawartość mleczanów przewyższającą poziom kontrolny notuje się jeszcze po upływie 20 godz. Zjawisko opóźnionego powracania poziomu mleczanów do normy można hipotetycznie wiązać z pojawieniem się w 3-ciej godzinie niedokrwienia niedoboru nowosyntetyzowanego mRNA /patrz rozdział 7/. Przyczyną tak opóźnionego odwrócenia efektu niedokrwienia mogłoby być uszkodzenie jednego z kluczowych układów enzymatycznych związanych z utlenianiem, a następnie jego niewydajna resynteza. Niska wydajność resyntezy białka/ek/ enzymatycznego/ych/ wiąże się z kolei z niedoborem mRNA. Warto nadmienić, że cały szereg następstw metabolicznych niedokrwienia, takich jak np. spadek poziomu glukozy czy też glutaminianu, ulega odwróceniu bez znacznego opóźnienia niezależnie od czasu



trwania stanu patologicznego /Mrsulja i wsp. 1976a/.

Można uznać, że w tych przypadkach proces powrotu do normy albo był niezależny od resyntezy białek, albo resynteza odbywała się z udziałem trwałych mRNA.

- Zmiany w zawartości serotoniny w następstwie niedokrwienia w tym samym modelu charakteryzują się dynamiką zgodną z założeniami przyjętymi dla zmian związanych z narastającym deficytem mRNA. Szybkość obniżania się poziomu serotoniny w mózgu jest wprost proporcjonalna do czasu trwania niedokrwienia. W następstwie 15-minutowego niedokrwienia, poziom serotoniny osiąga minimum dopiero po 20 godz., podczas gdy przy niedokrwieniu 6-godzinnym najniższą zawartość tego związku notuje się w momencie wznowienia krążenia /Mrsulja i wsp. 1976b/. Z innego źródła wiadomo, że obniżenie się zawartości serotoniny w przebiegu niedokrwienia trwającego przez okres 3 i 6 godz. jest procesem stosunkowo powolnym i związanym z zahamowaniem aktywności hydroksylazy tryptofanu /Welch i wsp. 1977/. Można przyjąć, że obserwowane zaburzenia są związane z niedostateczną syntezą enzymu, bowiem zmiany uwarunkowane prostą aktywacją i inaktywacją hydroksylazy przebiegałyby szybciej i nie narastałyby po przerwaniu niedokrwienia. Z kolei, bardzo długi okres narastania zmian pozwala przypuszczać, że przyczyną spadku syntezy enzymu jest powiększający się niedobór mRNA. W celu udowodnienia słuszności tej hipotezy konieczne będzie określenie trwałości metabolicznej hydroksylazy tryptofanowej i jej mRNA, jak również innych enzymów warunkujących poziom serotoniny.

Stawianie hipotez co do zależności występowania zmian towarzyszących niedokrwieniu w innych jego modelach doświadczalnych od nieprawidłowości w metabolizmie RNA jest utrudnione przez brak danych na temat syntezy i transportu RNA w tych warunkach. Być może z obniżeniem zawartości RNA zdolnego do łączenia się z rybosomami wiążą się w jakiejś mierze zmiany towarzyszące całkowitemu niedokrwieniu mózgu kota /Kleihues i Hossman 1971/ i małpy /Kleihues i wsp. 1975/, bądź niedokrwieniu mózgu szczura spowodowanemu wzrostem ciśnienia śródczaszkowego /Cooper i wsp. 1977/. W wymienionych przypadkach, zahamowanie inicjacji biosyntezy białka oraz degradacja polirybosomów nie występowały w trakcie niedokrwienia, natomiast pojawiały się w różnych czasach po wznowieniu krążenia.

Współwystępowanie zmian w metabolizmie RNA i spadku biosyntezy białka zostało wcześniej spostrzeżone w mózгах szczurów poddanych ostremu zatruciu tlenkiem węgla. W warunkach doświadczenia, opisanych szczegółowo przez Śmiałka i wsp. /1973/, niedotlenienie było przede wszystkim wynikiem upośledzenia transportu tlenu, na skutek przekształcenia 75% hemoglobiny w karboksyhemoglobinę. Brak jest zgodności poglądów co do znaczenia bezpośredniego oddziaływania CO na łańcuch oddechowy komórek mózgu, bowiem nie wyjaśniono ostatecznie, czy związek ten przechodzi przez barierę krew-mózg /Weinreich i wsp. 1975/. Wg najnowszych klasyfikacji ten model doświadczalny określa się mianem "hipoksji anemicznej" /Brierley, 1977/.

Wyniki badań własnych na tym właśnie modelu stały się punktem wyjścia dla poszukiwania powiązań pomiędzy zaburzeniami transkrypcji i translacji. Dezagregacji polirybosomów obserwowanej w następstwie 1-godzinnej zatrucia CO towarzyszył jeszcze poważniejszy spadek włączania prekursora do polirybosomalnego RNA /tabela 1/, co wskazywało, że w tym okresie wystąpiły niezależnie od siebie zahamowanie tworzenia się polirybosomów i spadek udziału w tym procesie nowosyntetyzowanego RNA. Ponadto zanotowano, że jedno-godzinna ekspozycja na tlenek węgla powoduje spadek włączania przyżyciowo podanej  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA frakcji cytoplazmatycznej, przy jednoczesnym nieznacznym wzroście radioaktywności właściwej RNA we frakcjach jądrowych /tabela 13/. W świetle obserwacji, że w tym czasie nie dochodziło do istotnych

Tabela 13

Wpływ zatrucia tlenkiem węgla na włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny in vivo do RNA frakcji jądrowych oraz cytoplazmy mózgu szczura

Czas po zatruciu CO	Względna radioaktywność RNA		
	Jądra duże	Jądra małe	Cytoplazma
0 godz.	124,9 $\pm$ 15,2/8/	123,7 $\pm$ 19,0/8/	61,2 $\pm$ 5,5/8/
24 godz.	103,4 $\pm$ 24,6/6/	105,5 $\pm$ 26,4/6/	76,1 $\pm$ 12,9/6/

Wyniki wyrażono w % wartości kontrolnych i przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe. W nawiasach - liczba równoległych doświadczeń /Albrecht 1976/.

zmian w aktywności mózgowych polimeraz RNA /Albrecht 1976/  
- efekt ten należy uznać za typowy dla wczesnej fazy niedotlenienia, a niedobór nowosyntetyzowanego RNA w cytoplazmie można wiązać z zahamowaniem jego transportu. Najistotniej-

szym dla oceny powiązania zaburzeń metabolizmu RNA i syntezy białek jest spostrzeżenie, że zarówno obniżona zdolność do wbudowywania prekursora do cytoplazmatycznego RNA /tabela 13/, jak i niższy od kontrolnego poziom biosyntezy białka, zwłaszcza w neuronach /tabela 14/ - utrzymują się przez

Tabela 14

Wpływ zatrucia tlenkiem węgla na włączanie<sup>75</sup> Se-selenometioniny do frakcji białkowych neuronów i gleju

Czas po zatruciu CO	Względna radioaktywność białek	
	Neurony	Glej
0 godz.	68,7 ± 6,0/5/	83,2 ± 6,7/5/
2 godz.	62,4 ± 2,7/5/	86,3 ± 3,5/4/
24 godz.	71,7 ± 3,5/5/	113,7 ± 9,4/4/

Sposób przedstawienia wyników identyczny jak w tab. 13 /Albrecht i Smiałek 1975/.

okres co najmniej 24 godzin po zakończeniu ekspozycji na tlenek węgla. W myśl przyjętej hipotezy byłby to przykład upośledzenia odwracalności efektu metabolicznego /w tym przypadku - bezpośrednio zahamowania biosyntezy białka/, na skutek niedoboru mRNA.

Liczebność danych pośrednio świadczących o udziale zaburzeń metabolizmu RNA w rozwoju zmian towarzyszących różnym formom niedotlenienia i niedokrwienia mózgu, bądź będących ich odległymi skutkami, wskazuje na zasadność podjęcia bardziej szczegółowych badań na ten temat. Wraz z postępem technik badawczych należy się spodziewać uzyskania odpowiedzi na dwa zasadnicze pytania:

1/ jak w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia zachowują się poszczególne mRNA kodujące określone białka enzymatyczne i strukturalne?

2/ jakim zmianom ulega poziom i jakość mRNA w różnych okolicach mózgu i różnych typach komórek ośrodkowego układu narwowego?

## 10. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Skrawki mózgu inkubowane *in vitro* w obecności radioaktywnych nukleozydów syntetyzują i/lub transportują do cytoplazmy i polirybosomów radioaktywny RNA o cechach RNA nie-rybosomalnego, wzbogaconego we frakcje posiadające reszty poliadenylowe /poli/A/<sup>+</sup>RNA/. Zastosowany układ doświadczalny należy uznać za przydatny do oceny metabolizmu mRNA w mózgu.

2. Zarówno niedotlenienie jak i niedokrwienie prowadzą do zmniejszenia dopływu nowosyntetyzowanego mRNA do cytoplazmy i polirybosomów mózgu, co wydaje się jedną z istotnych przyczyn zahamowania biosyntezy białka w następstwie działania czynnika uszkadzającego.

3. Wpływ niedotlenienia mózgu na metabolizm mRNA ujawnia się w dwóch fazach. Faza wczesna charakteryzuje się zahamowaniem transportu RNA z jądra do cytoplazmy i polirybosomów. Efekt ten obejmuje głównie poli/A/<sup>+</sup>RNA, a wiąże się z wybiórczą wrażliwością na niedotlenienie procesu poliadenylacji RNA w jądrze. Fazę późną cechuje ogólny spadek syntezy RNA, nie obserwowany w fazie wczesnej. Żadnemu z etapów niedotlenienia nie towarzyszy aktywizacja rybonukleaz, co wyklucza udział wzmożonej degradacji RNA w ustalaniu się niedoboru mRNA w tych warunkach.

4. Zmiany w metabolizmie RNA w niedokrwieniu przypominają zaburzenia spowodowane niedotlenieniem, z tym, że w zaawansowanym stadium niedokrwienia ujawnia się wzrost aktywności rybonukleazy kwaśnej, związany z uszkodzeniem lizosomów. Zjawisko to przypuszczalnie stanowi dodatkowy czynnik

wpływający na obniżenie poziomu RNA.

5. Porównanie wyników badań własnych z danymi pochodzącymi z innych prac wykonanych na tych samych modelach doświadczalnych skłania do przypuszczenia, że występowanie zaburzeń w metabolizmie mRNA jest czynnikiem mogącym warunkować nieodwracalność, opóźnienie odwrócenia, bądź pogłębianie się innych zmian metabolicznych, których istota związana jest z funkcjonowaniem aparatu syntezy białek.

PIŚMIENNICTWO

1. Adesnik M., Darnell J.E. /1972/ Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in Hela cells. J. Mol. Biol. 67, 397-406.
2. Adesnik M., Lande M., Martin T., Sabatini D.D. /1976/. Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum membranes after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation. J. Cell Biol. 71, 307-313.
3. Adesnik M., Salditt M., Thomas W., Darnell J.E. /1972/ Evidence that all messenger RNA molecules /except histone messenger RNA /contain poly/A/ sequences and that the poly/A/ has a nuclear function. J. Mol. Biol. 71, 21-30
4. Albrecht J. /1972/ Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białka w mózgu szczura. Neuropat. Pol. X, 457-469, 1972.
5. Albrecht J. /1973/ Effect of carbon monoxide hypoxia on individual steps of protein synthesis in rat brain. J. Neurochem. 21, 1563-1566.
6. Albrecht J. /1974/ Polyribosomes of the rabbit brain in circulatory hypoxia. Neuropat. Pol. XII, 665-669, 1974.
7. Albrecht J. /1976/ Effect of carbon monoxide intoxication on RNA synthesis in two nuclear classes of the rat brain. Bull. Acad. Pol. Sci. XXIII, 121-126.
8. Albrecht J. /1977a/ Effect of carbon monoxide intoxication on the ribonuclease and ribonuclease inhibitor activity in the rat brain. Medikon /Gent/ 6, 17-19.
9. Albrecht J. /1977b/ Effect of carbon monoxide intoxication on the poly/A/ polymerase activity in the rat brain nuclei. Bull. Acad. Pol. Sci. XXV, 269-273.



10. Albrecht J., Kapuściński A., Januszewski S. /1972/ Effect of partial ischemia and ischemic hypoxia on the activity of a cell-free protein synthesizing system from rat brain. Bull. Acad. Pol. Sci. XX, 269-272.
11. Albrecht J., Śmiałek M. /1975/ Effect of hypoxia, ischemia and carbon monoxide intoxication on in vivo protein synthesis in neuron and glia cell -enriched fractions from rat brain. Acta. Neuropath. /Berl/ 31, 257-262.
12. Altman J., Chorover S.L. /1963/ Autoradiographic investigation of the distribution and utilization of intraventricularly injected adenine-<sup>3</sup>H, uracil-<sup>3</sup>H and thymidine-<sup>3</sup>H in the brain of cat. J. Physiol. 169, 770-779.
13. Appel S. /1967/ Turnover of brain messenger RNA. Nature /London/ 213, 1253-1254.
14. Aviv H., Leder P. /1972/ Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid - cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412.
15. Banks S.P., Johnson T.C. /1973/ Synthesis of RNA-polyadenylic acid by isolated brain nuclei. Science 181, 1064-1065.
16. Bantle J.A., Hann W.E. /1976/ Complexity and characterization of polyadenylated RNA in the mouse brain. Cell 8, 139-150.
17. Berger S.L., Cooper H.L. /1978/ The relationship between hnRNA<sup>+</sup>-poly/A/ and mRNA<sup>+</sup>-poly/A/ in non-dividing human lymphocytes. Evidence for distinct synthetic pathways for mRNA precursor and nonprecursor hnRNA. Biochim.biophys. Acta 517, 84-98.
18. Berthold W., Lim L. /1976a/ The metabolism of high molecular weight ribonucleic acid including polyadenylated species in the developing rat brain. Biochem. J. 154, 517-527.

19. Berthold W., Lim L. /1976 b/ Nucleo- cytoplasmic relationship of high-molecular-weight ribonucleic acid including polyadenylated species in the developing rat brain. *Biochem. J.* 154, 529-539.
20. Blobel G. /1973/ A protein of molecular weight 78000 bound to the polyadenylate region of eukariotic messenger RNA. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 70, 924-928
21. Blomstrand Ch. /1970/ Effect of hypoxia on protein metabolism in neuron and neuroglia cell-enriched fractions from rabbit brain. *Exp. Neurol.* 29, 175-188.
22. Bondy S., Purdy J.L. Babitch J.A. /1977/. Axoplasmic transport of RNA containing a polyadenylic acid segment. *Neurochem. Res.* 2, 407-415.
23. Brawerman G. /1974/ Eukaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 623-641.
24. Brawerman G., Mendecki J., Lee S-Y. /1972/ A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 637-641.
25. Brierley J.B. /1977/ Experimental hypoxic brain damage. *J. Clin. Path.* 11, suppl. 30, 181-187.
26. Burton K. /1956/ A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 67, 315-323.
27. Cajone F., Ragnotti G., Bernelli-Zezzer A., Bassi M. /1971/ State and function of liver polysomes during recovery from ischemia. *Exp. Mol. Pathol.* 14, 392-403.
28. Campagnoni A.T., Dutton G.R., Mahler H.R., Moore V.J. /1971/. Fractionation of the RNA components of rat brain polysomes. *J. Neurochem.* 18, 601-611.
29. Cardelli J., Long B., Pitot H.C. /1976/ Direct association of messenger RNA labeled in the presence of fluororotase with membranes of the endoplasmic reticulum in rat liver. *J. Cell. Biol.* 70, 47-58.

30. Cardelli J., Pitot H.C. /1977/ Isolation and characterization of rat liver free- and membrane-bound poly-somal messenger ribonucleoprotein particles. *Biochemistry* 16, 5127-5134
31. Choi C.Y., Nazar R.N., Busch H. /1972/ Nuclear high-molecular-weight RNA. in: *The Cell Nucleus* /Busch H.ed./ vol.III, pp.110-143, Academic Press, New York.
32. Cohen M.M. /1962/ The effect of anoxia on the chemistry and morphology of cerebral cortex slices in vitro. *J. Neurochem.* 9, 337-344.
33. Cohen M.M. /1973/ Biochemistry of cerebral anoxia, hypoxia and ischemia in: *Biochemistry, Ultrastructure and Physiology of Cerebral Anoxia, Hypoxia and Ischemia* /Cohen M.M. ed./. Monographs of Neural Sciences vol. 1, pp. 2-43, S. Karger.
34. Coleman M.S., Hutton J.J., Bollum F.J. /1974/ Terminal riboadenylate transferase in human lymphocytes. *Nature* 248, 407-409
35. Cooper H.K., Zalewska T., Kawakami S., Hossman K.-A., Kleihues P. /1977/ The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 28, 929-934.
36. Darnell J.E., Jelinek W.R., Molloy G.W. /1973/ Biogenesis of mRNA. Genetic regulation in mammalian cells. *Science* 181, 1215-1221.
37. Darnell J.E., Philipson L., Wall R., Adesnik M. /1971/. Polyadenylic acid sequences. Role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. *Science* 174, 507-510.
38. De Guglielmone A.E.R., Duvilansky B.H. /1977/ RNA release from isolated brain cell nuclei: Influence of the postnatal cerebral development 3, 11-20.
39. De Lamirande G., Allard C., Da Costa H.C., Cantero A. /1954/ Intracellular distribution of acid and alkaline ribonuclease in normal rat liver 119, 351-353.

40. De Larco J., Guroff G. /1972/ The synthesis of RNA which binds to oligo /dT/ celulose by brain in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1240-1243.
41. De Larco J., Abramowitz A., Bromwell K., Guroff G. /1975a/. Polyadenylic acid-containing RNA from rat brain. *J. Neurochem.* 24, 215-222.
42. De Larco J., Nakagawa S., Abramowitz A., Bromwell K., Guroff G. /1975b/. Polyadenylic acid-containing RNA from rat brain synaptosomes. 25, 131-137.
43. Diez L., Brawerman G. /1974/. Elongation of the polyadenylate segment of messenger RNA in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. USA* 71, 4091-4095.
44. Dodson R.F., Chu L.W.-F., Welch K.M.A., Achar V.S. /1977/. Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil. An ultrastructural study. *J. Neurol. Sci.* 33, 161-170.
45. Edmonds M., Caramela M.G. /1969/. The isolation and characterization of adenosine and monophosphate-rich polynucleotides synthesized by Erlich ascites cell. *J. biol. Chem.* 244, 1314-1424.
46. Edmonds M., Vaughan M.H., Nakazato M. /1971/. Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA in HeLa cells: Possible evidence of a precursor relationship. *Proc. Natl. Acad. USA* 68, 1336-1340.
47. Fujimoto T., Walker J.T.Jr., Spatz M., Klatzo I. /1976/ Pathophysiologic aspects of ischemic edema in: *Dynamics of brain edema* /Pappius H.M., Fiendel W. ed./ pp. 171-180. Springer, Berlin.
48. Georgiev G.P. /1974/. Precursor of mRNA /pre-mRNA/ and ribonucleoprotein particles containing pre-mRNA. in: *The Cell Nucleus* /Busch H., ed./ vol.III, pp. 67-109, Academic Press, New York.

49. Gilmore-Hebert M.A., Heywood S.M. /1976/ Translation of tubulin messenger ribonucleic acid. *Biochim. biophys. Acta* 454, 55-66.
50. Greenberg J.R., Perry R.P. /1972/ Relative occurrence of polyadenylic acid sequences in messenger and heterogeneous nuclear RNA of L cells as determined by polyuridylic acid-hydroxylapatite chromatography. *J. Mol. Biol.* 72, 91-98.
51. Grouse L.D., Schrier B.K. /1977/ The use of glucosamine and actinomycin D in radioactive labeling of RNA in cells in culture. *Prep. Biochem.* 7, 427-439.
52. Haft L.A., Keller E.B. /1973/ Two distinct poly /A/ polymerases in yeast nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 704-710.
53. Harrison M.J.G., Brownbill D., Lewis P.D., Russel R.W.R. /1973/ Cerebral edema following carotid artery ligation in the gerbil. *Arch. Neurol. /Chic./* 28, 389-391.
54. Hartmann J.F., Becker R.A. /1973/ Disaggregation of polyribosomes in intact gerbils following ischemia. An ultrastructural study. *Stroke* 4, 964-968.
55. Heikkila J.J., Brown I.R. /1977/. Analysis of rabbit brain polysomal poly /A/<sup>+</sup> mRNA by DNA excess hybridization. *Biochim. biophys. Acta* 474, 141-153.
56. Hellerman J.G., Shafritz D.A. /1975/. Interaction of poly/A/ and mRNA with eukaryotic initiator met-tRNA<sub>i</sub> binding factor: identification of this activity on reticulocyte ribonucleic acid-protein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1021-1025.
57. Herman R.C., Williams J.G., Penman S. /1976/. Message and non-message sequences adjacent to poly/A/ in steady state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells. *Cell* 7, 429-437.
58. Holstein S.B., Myers R.E. /1971/. Protein synthesis by

- cerebral ribosomes in Tenu monkey fetuses after prolonged partial asphyxia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 30, 141.
59. Huez G., Marbaix G., Hubert E., Leclercq M., Nudel U., Soreq H., Salomon R., Lebleu B., Revel M., Littauer U.Z. /1974/ Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3143-3146.
60. Ishikawa K., Ueki M., Nagai K., Ogata K. /1972/ Transportation of messenger RNA from nuclei to polysomes in rat liver cells. *Biochim. biophys. Acta* 259, 138-154.
61. Ito U., Spatz M., Walker J.T. Jr., Klatzo I. /1975/ Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I Light microscopic observations. *Acta neuropath. /Berl./* 32, 209-223.
62. Ittel M.E., Niedergang C., Munoz D., Petek F., Okazaki H., Mandel P. /1975/ Partial purification and characterization of an acid ribonuclease in beef brain nuclei. *J. Neurochem.* 25, 171-176.
63. Jacob S.T., Roe F.J., Rose K.M. /1976a/ Chromatin bound and free forms of poly/adenylic acid/ polymerase in rat hepatic nuclei. *Biochem. J.* 153, 733-735.
64. Jacob S.T., Rose K.M., Munro H.N. /1976b/ Response of poly/adenylic acid/ polymerase in rat liver nuclei and mitochondria to starvation and refeeding with amino acids. *Biochem. J.* 158, 161-167.
65. Jeffery W.R. /1977/ Characterization of polypeptides associated with messenger RNA and its polyadenylate segment in Ehrlich ascites messenger ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 252, 3525-3532.
66. Jelinek W. /1974/ Polyadenylic acid synthesis in vitro in isolated HeLa cell nuclei and whole cell homogenates. *Cell* 2, 197-204.

67. Jelinek W., Adesnik M., Salditt M., Sheiness D., Wall R., Molloy G., Philipson L., Darnell J.E. /1973/ Further evidence on the nuclear origin and transfer to the cytoplasm of polyadenylic acid sequences in mammalian cell RNA. 75, 515-532.
68. Kann K. /1972/ The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. Neurology /Minneap./ 22, 510-515.
69. Kanig K. /1973/ Encephalotropic drugs and cerebral RNA metabolism. in: Memory and Transfer of Information /Zippel H.P. ed./ pp. 571-582, Plenum, New York.
70. Kato T., Kurokawa M. /1979/ Studies on ribonucleic acid and homopolyribonucleotides formation in neuronal, glial and liver nuclei. Biochem. J. 116, 599-609.
71. Kessler-Icekson G., Yaffe D. /1977/ Increased translatability in a cell-free system of RNA extracted from actinomycin D-treated cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 62-68.
72. Klatzo I. /1975/ Pathophysiologic aspects of cerebral ischemia in: The Nervous System /D.B. Tower Ed.-in-Chief/ vol. 1: The Basic Neurosciences pp. 313-322, Raven Press, New York.
73. Kleihues P., Hossman K. A. /1971/ Protein synthesis in the rat brain after prolonged cerebral ischemia. Brain Res. 35, 409-419.
74. Kleihues P., Hossman K. A., Pegg A.E., Kobayashi K., Zimmermann V. /1975/ Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia III. Indication of metabolic recovery. Brain Res. 95, 61-73.
75. Kraft N., Shortman K. /1969/ A suggested role for the animal tissue ribonuclease-ribonuclease inhibitor system based on studies on isolated cells and phytohaemagglutinin-transformed lymphocytes. Biochim. biophys. Acta 217, 164-174.

76. Kwan C.N., Gotoh S., Schlesinger D. /1974/ Nucleases in HeLa cell nucleoplasm and nucleoli. *Biochim. biophys. Acta* 349, 428-441.
77. Lande M.A., Adesnik M., Sumida M., Tashiro Y., Sabatini D.D. /1975/ Direct association of messenger RNA with microsomal membranes in human diploid fibroblasts. *J. Cell Biol.* 65, 513-528.
78. Lee S.Y., Mendecki J., Brawerman G. /1971/ A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly-labeled polyribosomal RNA components of mouse sarcoma 180 ascites cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1331-1335.
79. Levine S., Payan H. /1966/ Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil /*Meriones unguiculatus*/. *Exp. Neurol.* 16, 255-262.
80. Levine S., Spohn D. /1975/ Cerebral ischemia in infant and adult gerbils—relation to incomplete circle of Willis. *Arch. Path.* 87, 315.
81. Levy D.E., Duffy T.E. /1977/ Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J. Neurochem.* 28, 63-70.
82. Liu D.K., Williams G.H., Fritz P.J. /1975/ Alkaline ribonuclease and ribonuclease inhibitor in mammary gland during lactation cycle and in the R 3230 AC mammary tumour. *Biochem. J.* 148, 67-76.
83. Louis Ch., Zimmermann H-P., Sekeris C.E. /1978/ Poly/A/ synthetases in rat liver nuclei and their localization. *Cytobiologie* 16, 171-184.
84. Lowry O.H., Rosenbrough N.J. Farr A.L., Randall R.J. /1951/ Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
85. Lust W.D., Mrsulja B.B., Mršulja B.J., Passonneau J.V., Klatzo I. /1975/ Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of the cerebral cortex. *Brain Res.* 98, 394-399.



86. Mackedonski V.V., Mc Conkey E.H. /1978/ Message sequences are not adjacent to poly/A/ in heterogeneous nuclear RNA of Friend leukemic cells. *Eur. J. Biochem.* 90, 397-404.
87. Mahony J.B., Brown I.R. /1975/ Characterization of poly/A/ sequences in brain RNA. *J. Neurochem.* 25, 503-507.
88. Marbaix C., Huez G., Burny A., Cleuter Y., Hubert E., Leclercq M., Chantrenne H., Soreq H., Nudel U., Littauer U.Z. /1975/ Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 72, 3065-3067.
89. Mc Ilwain H., Rodnight R. /1962/ *Practical Neurochemistry*, Churchill, London.
90. Mc Namara D.J., Racevskis J., Schumm D.E., Webb T.E. /1975/ Ribonucleic acid synthesis in isolated rat liver nuclei under conditions of ribonucleic acid processing and transport. *Biochem. J.* 147, 193-197.
91. Mejsbaum W. /1939/ Über die Bestimmung Kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 258, 117-120.
92. Metter E.J., Yanagihara T. /1975/ The effect of hypoxia and hypoglycemia on cerebral polysomes in rats. *Neurology /Minneapolis/* 25, 392.
93. Milcarek Ch., Penman S. /1974/ Membrane-bound polyribosomes in HeLa cells: association of polyadenylic acid with membranes. *J. Mol. Biol.* 89, 327-338.
94. Milcarek Ch., Price R., Penman S. /1974/. The metabolism of a poly/A/ minus mRNA fraction in HeLa cells. *Cell.* 3, 1-10.
95. Minty A., Kleiman L., Birnie G., Paul J. /1977/ Nucleus-restricted polyadenylated ribonucleic acid species in mouse Friend cells. *Biochem. Soc. Trans.* 5, 679-681.

96. Molloy G.R., Jelinek W., Salditt M., Darnell J.E. /1974/. Arrangement of specific oligonucleotides within poly(A) terminated hnRNA molecules. *Cell*. 1, 43-53.
97. Moore R.E., Cardelli J.A., Pitot H.C. /1977/. Decay of cytoplasmic polyadenylated RNAs labeled with  $^3\text{H}$ -orotate in rat liver and the effect of the reutilization of labeled precursor on such a decay. *Biochemistry* 16, 3037-3044.
98. Morimoto K., Gintz J., Yanagihara T. /1978/ Re-evaluation of protein synthesis in cerebral anoxia, hypoxia and ischemia. *Trans. Amer. Soc. Neurochem.* 9, 148.
99. Morrell R.M. /1977/ Defective protein metabolism in the ischemic gerbil brain. *Acta Neurol. Scand.* 56, supp. 64, 368-369.
100. Mršulja B.B., Lust W.D., Mrsulja B.J., Passonneau J.V., Klatzo I. /1976 a/. Postischemic changes in certain metabolites following prolonged ischemia in the gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.* 26, 1099-1103.
101. Mrsulja B.B., Mrsulja B.J., Spatz M., Ito U., Walker J. T.Jr., Klatzo I. /1976 b/. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. IV. Behaviour of biogenic amines. *Acta neuropath /Berl./* 36, 1-8.
102. Mrsulja B.B., Mršulja B.J., Ito W., Walker J.T.Jr., Spatz M., Klatzo I. /1975/ Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta neuropath. /Berl./* 33, 91-103.
103. Munro H.N., Baliga B.S., Nowak T.S., Moskowitz M.A., Wurtman R.J., /1977/ Action of biogenic amines and related compounds on brain protein synthesis. in: Mechanisms, regulation and specific function of protein synthesis in the brain /Roberts S., Lajtha A., Gispen W. H. eds./ *Development in Neurosciences*. vol. 2, pp.345-354, Elsevier, Amsterdam.

104. Murphy W., Attardi G. /1973/ Stability of cytoplasmic messenger RNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 115-119.
105. Nemer M., Dubroff L.M., Graham M. /1975/. Properties of sea urchin embryos containing and lacking poly/A/. Cell. 6, 171-178.
106. Nemer M., Graham M., Dubroff L.M. /1974/ Coexistence of non-histone messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid in sea urchin embryos. J.Mol. Biol. 89, 435-454.
107. Niedergang Cl, Okazaki H., Ittel M.E., Munoz D., Pettek F., Mandel P. /1974/ Ribonucleases of beef brain nuclei. Purification and characterization of an alkaline RNase. Biochim. biophys. Acta 358, 91-104.
108. Niessing J. /1975/ Three distinct forms of nuclear poly/A/ polymerase. Eur. J. Biochem. 59, 127-135.
109. Noll H. /1969/ Polysomes: analysis of structure and function. in: Techniques in protein biosynthesis. /Campbell P.N., Sargent J.R. eds./ vol.2, pp. 101-179, Academic Press, London.
110. Nudel U., Soreq H., Littauer U.Z., Marbaix G., Lecerq M., Hubert E., Chantrenne H. /1976/ Globin mRNA species containing poly/A/segments of different length. Eur. J.Biochem. 64, 115-121.
111. Oravec M. /1973/ Studies on rapidly labelled nuclear RNA of rat brain. J. Neurochem. 21, 1457-1467.
112. Palmiter R.D., Schimke R.T. /1973/. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. III. Mechanism of ovalbumin "superinduction" by actinomycin D. J. Biol. Chem. 248, 1502-1512.
113. Pellicer A., Salas J., Salas M.L. /1975/ Poly/A/polymerases in normal and virus-transformed cells. Biochim. Biophys. Res. Commun. 378, 107-118.

114. Penman S., Vesco C., Penman M. /1968/ Localization and kinetics of formation of nuclear heterodisperse RNA, cytoplasmic heterodisperse RNA and polyribosome-associated messenger RNA in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 34, 49-69.
115. Penman S., Rosbach M., Penman M. /1970/. Messenger and heterogeneous nuclear RNA in HeLa cells: Differential inhibition by cordycepin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1878-1885.
116. Perry R.P. /1976/ Processing of RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 605-629.
117. Perry R.P., La Torre J., Kelley D.E., Greenberg J.R. /1972/ On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochim. biophys. Acta.* 262, 220-226.
118. Perry R.P., Kelley D.E., La Torre J. /1974/ Synthesis and turnover of nuclear and cytoplasmic polyadenylic acid in mouse L cells. *J. molec. Biol.* 82, 315-331.
119. Quinlan T.J., Kinniburgh A.J., Martin T.E. /1977/. Properties of a nuclear polyadenylate-protein complex from mouse ascites cells. *J. biol. Chem.* 252, 1156-1161.
120. Roberts S., Morelos B.S. /1976/ Role of ribonuclease action in phenylalanine induced disaggregation of rat cerebral polyribosomes. *J. Neurochem.* 26, 387-400.
121. Roel L.E., Schwartz S.A., Weiss B.F., Munro H.N., Wurtman R.J. /1974/ In vivo inhibition of rat brain protein synthesis by L-DOPA. *J. Neurochem.* 23, 233-239.
122. Rose K.M., Jacob S.T. /1978/ Selective inhibition of RNA polyadenylation by Ara-ATP in vitro. A possible mechanism for antiviral action of Ara-A. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 81, 1418-1424.
123. Rose K.M., Lin Y-C., Jacob S.T. /1976/ Poly/adenylic acid/ polymerase: Loss of enzyme from rat liver nuclei isolated under isotonic conditions. *FEBS Letters* 67, 193-197.

124. Rose K.M., Roe F.J., Jacob S.T. /1977/ Two functional states of poly /adenylic acid/ polymerase in isolated nuclei. *Biochim. biophys. Acta* 478, 180-191.
125. Roth J.S. /1954/ Ribonuclease. III. Ribonuclease activity in rat liver and kidney. *J. biol. Chem.* 208, 181-194.
126. Sanders A.P., Hale D.M., Miller A.T.Jr. /1965/. Some effects of hypoxia on respiratory metabolism and protein synthesis in rat tissue. *Amer. J. Physiol.* 209, 443-446.
127. Sandoval M.-E., Palacios R., Tapia R. /1977/ Studies on the relationships between GABA synthesis and protein synthesis in brain. *J. Neurochem.* 27, 667-672.
128. Sarker P.H., Goldman B., Moscona A.A. /1973/. Involvement of poly/A/ in selective gene expression: Suppression of enzyme induction in neural retina by inhibitors of poly/A/ synthesis. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 50, 308-315.
129. Sawicki S.G., Jelinek W., Darnell J.E. /1977/ 3-terminal addition on HeLa cell nuclear and cytoplasmic poly/A/. *J.Mol.Biol.* 113, 219-235.
130. Sato T., Ishikawa K., Ogata K. /1976/ Characterization of ribonucleoprotein particles released from isolated nuclei of regenerating rat liver in two different in vitro systems. *Biochim. biophys. Acta.* 474, 536-548.
131. Schechter I. /1973/ Biologically and chemically pure mRNA coding for a mouse immunoglobulin  $\gamma$ -chain prepared with aid of antibodies and oligothymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 2256-2260.
132. Scherrer K., Marcaud L. /1968/ Messenger RNA in avian erythroblasts at the transcriptional and translational levels and the problem of regulation in animal cells. *J. Cell Physiol.* 72 suppl. 1, 181-212.

133. Schumm D.E., Webb T.E. /1974/ Modified messenger ribonucleic acid release from isolated hepatic nuclei after inhibition of polyadenylation. *Biochem. J.* 139, 191-196.
134. Schumm D.E., Morris H.P., Webb T.E. /1973/ Cytosol-modulated transport of messenger RNA from nuclei. *Cancer Research* 33, 1821-1828.
135. Schwartz J.P., Mrsulja B.B., Mrsulja B.J., Passonneau J.V., Klatzo I. /1976/. Alterations of cyclic nucleotide-related enzymes and ATPase during unilateral ischemia and recirculation in gerbil cerebral cortex *J. Neurochem.* 27, 101-107.
136. Shiokawa K., Pogo A.O. /1974/ The role of cytoplasmic membranes in controlling the transport of nuclear messenger RNA and initiation of protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2658-2662.
137. Sierra J.M., Filipowicz W., Ochoa S. /1976/. Messenger RNA in underdeveloped and developed *Artemia salina* embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 181-189.
138. Simard R., Langelier Y., Mandeville R., Maestracci N., Royal A. /1974/ Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus. in: *The Cell Nucleus* /Busch H., ed./ vol. III, pp. 447-488, Academic Press, New York.
139. Slater I., Gillespie D., Slater D.W. /1973/ Cytoplasmic adenylation and processing of maternal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 406-411.
140. Sonenshein G.E., Geoghegan T.E., Brawerman G. /1976/ A major species of mammalian messenger RNA lacking a polyadenylate segment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 3088-3091.
141. Spatz M., Klatzo I. /1976/ Pathological aspects of brain transport phenomena. in: *Transport Phenomena in*

- the Nervous System /Levi G., Battistin L., Lajtha A. eds./ pp. 479-495 Plenum, New York.
142. Spirin A. S. /1969/ Informosomes. *Eur.J. Biochem.* 10, 20-35.
143. Spohr F., Imaizumi T., Scherrer K. /1974/. Synthesis and processing of nuclear precursor-messenger RNA in avian erythroblasts and HeLa cells. *Proc.Nat..Acad. Sci. USA.* 71, 5009-5013.
144. Staehelin T., Trachsel H., Erni B., Boschetti A., Schreier M.H. /1975/ Initiation of mammalian protein synthesis. *Proc. 10th FEBS Meeting* pp. 309-323. North Holland, Amsterdam.
145. Stoltzfus C.M., Shatkin A.J., Banerjee A.K. /1973/ Absence of polyadenylic acid acid from reovirus messenger ribonucleic acid. *J.biol. Chem.* 248, 7993-7998.
146. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M.J. /1973/ The glycogen content and its topography and UDP glucose: glycogen  $\alpha$ -1-4-glucosyltransferase activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. /Berl./*. 24, 222-231.
147. Tewari S., Baxter C.F. /1969/. Stimulatory effect of -aminobutyric acid upon amino acid incorporation into protein by a ribosomal system from immature rat brain. *J. Neurochem.* 16, 171-180.
148. Vesco C., Guiditta A. /1977/ Pattern of RNA synthesis in rabbit brain. *Biochim. biophys. Acta* 142, 385-402,
149. Wasterlain C.G. /1974/. Brain ribosomes in intracranial hypertension. *J. Neurochem.* 23, 253-259.
150. Wasterlain C.G. /1977/ Effects of epileptic seizures on brain ribosomes: mechanism and relationship to cerebral energy metabolism. *J. Neurochem.* 29, 707-716.

151. Webster H de F., Ames A. /1965/ Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. *J.Cell. Biol.* 26, 885-909.
152. Weinreich R., Ritzl F., Feinendegen L.E., Schnippering H. G., Stöcklin G. /1975/ Fixation, retention and exhalation of carrier-free  $^{11}\text{C}$ -labeled carbon monoxide by man. *Rad. Environm. Biophys.* 12, 271-280.
153. Weiss B.F., Wurtman R.J., Munro H.V. /1973/. Disaggregation of brain polysomes by L-5-hydroxytryptophan: Mediation by serotonin. *Life Sci.* 13, 411-416.
154. Welch K.M.A., Chabi E., Buckingham J., Bergin B., Achar V.S., Meyer J.S. /1977/ Catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in brain. Influence of p-chlorophenylamine. *Stroke* 8, 341-346.
155. Williamson R., Crossley J., Humphries S. /1974/ Translation of mouse globin messenger ribonucleic acid from which the poly/adenylic/ acid sequence has been removed. *Biochemistry* 13, 703-707.
156. Wilt F.H. /1973/ Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin after fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 2345-2349.
157. Winters M.A., Edmonds M. /1973/ A poly/A/ polymerase from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 248, 4756-4762.
158. Yanagihara T. /1972/ Cerebral anoxia: Protein metabolism during recovery in in vitro model. *Stroke* 3, 733-738.
159. Yanagihara T. /1973/ Cerebral anoxia: An improved in vitro model for biochemical study. *Stroke* 4, 409-411.
160. Yanagihara T. /1974a/ Cerebral anoxia: Effect on transcription and translation. *J. Neurochem.* 22, 113-117.



161. Yanagihara T. /1974b/ RNA metabolism in rabbit brain: Study with neuron-glia and subcellular fractions. J. Neurochem. 23, 833-837.
162. Yanagihara T. /1975/ Effect of reduction of energy state: Protein and ribonucleic acid metabolism. in: Cerebral Vascular Disease /Whisnant J.P. Sandok B.A., eds./ pp. 279-285. Grune and Stratton, New York.
163. Yanagihara T. /1976 a/ Cerebral anoxia: Effect on neuron-glia fractions and polysomal protein synthesis. J. Neurochem. 27, 539-549.
164. Yanagihara T. /1976 b/ Cerebral ischemia in gerbils: Differential vulnerability of RNA, protein and lipid syntheses. Stroke 7, 260-263.
165. Yanagihara T. /1978 a/ Experimental stroke in gerbils. Correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. Stroke 9, 155-159.
166. Yanagihara T. /1978 b/ Experimental stroke in gerbils: Effect on transcription and translation. Brain Res. 158, 435-444.
167. Yap S.L., Spector R.G. /1965/ Cerebral protein synthesis in anoxic-ischemic brain injury in the rat. J.Path. Bact. 90, 543-549.
168. Yu J.Y-L., Gorbman A. /1976/ Comparative patterns of Synthesis of polyadenylated and nonpolyadenylated RNA in various brain regions following intraventricular administration of <sup>3</sup>H-uridine into adult rats. Life Sciences 19, 1615-1622.

