

JAN ALBRECHT, WOJCIECH HILGIER, MARIANNA SIKORSKA,
MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

WPLYW DOŚWIADCZALNEJ HIPOGLIKEMII NA ZAWARTOŚĆ GLIKOGENU I AKTYWNOŚĆ ENZYMOW METABOLIZUJĄCYCH GLIKOGEN W MÓZGU SZCZURA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Gromadzenie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym jest charakterystyczną i najpowszechniej występującą cechą reakcji tkanki nerwowej na działanie różnych czynników uszkodzających, a zwłaszcza na niedotlenienie i niedokrwienie. Wzrost poziomu glikogenu obserwowano między innymi w następstwie asfiksji okołoporodowej (Mossakowski i wsp. 1968), częściowego niedokrwienia (Śmiałek i wsp. 1971; Long i wsp. 1972), zatrucia tlenkiem węgla (Śmiałek i wsp. 1973; Sikorska i wsp. 1975). Wzrost poziomu glikogenu ma charakter przejściowy i daje się zaobserwować wyłącznie w tkankach nie wykazujących wyraźnych uszkodzeń morfologicznych. Zjawisko gromadzenia się glikogenu występuje ze znacznym opóźnieniem w stosunku do momentu zadziałania czynnika uszkodzającego i jest poprzedzone aktywacją syntezy glikogenu (Śmiałek i wsp. 1971; Sikorska, Śmiałek 1974). Zmianom w zawartości glikogenu towarzyszą również wahania w aktywności fosforylasy glikogenu, biorącej udział w jego rozkładzie. W przypadku częściowego niedokrwienia mózgu szczura zaobserwowano zbieżność pomiędzy wystąpieniem wzrostu aktywności tego enzymu, a maksymalnym nagromadzeniem glikogenu. Wysoka aktywność utrzymywała się w okresie ponownego obniżania się zawartości polisacharydu (Śmiałek i wsp. 1971).

Dotychczas nie udało się jednoznacznie określić, jakie zmiany w metabolizmie tkanki nerwowej decydują o aktywacji procesu syntezy glikogenu. Wzrost aktywności fosforylasy glikogenu wiązano z zaobserwowanym w tych samych modelach doświadczalnych wzrostem zawartości cAMP i związanej z tym wzmożonej aktywacji kinaz białkowych (Sikorska 1978). Interpretacja roli fosforylasy jest jednak utrudniona, bowiem kierunek katalizowanej przez nią reakcji zależy od stosunku zawartości

glukozy do glikogenu w tkance (Hutny 1970). Z kolei, wspólny dla za-
trucia tlenkiem węgla, niedotlenienia i niedokrwienia wzrost aktywności
dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (G-6-P DH) (Domańska-Janik 1972;
Sikorska i wsp. 1975) wskazywałyby na wzrost zawartości G-6-P, będą-
cego aktywatorem syntetazy glikogenu (Basu, Bachhawat 1961; Suzu-
mo, Vasuluto 1970). Jakkolwiek szczegóły mechanizmu aktywacji enzy-
mów biorących udział w syntezie glikogenu pozostały nadal niejasne,
znaczenie procesu wydaje się polegać na przejściowym magazynowaniu
glukozy, która nie uległa przemianie w warunkach niedoboru tlenu
i obniżonego poziomu związków wysokoenergetycznych. W związku
z tym powstało pytanie, czy i jakie zmiany w metabolizmie glikogenu
w mózgu towarzyszą hipoglikemii wywołanej podaniem insuliny. Hipo-
glikemia, chociaż zaliczana do grupy patologii niedotlenieniowych (Brier-
ley 1977), jest przypadkiem szczególnym: niedobór dotyczy wyłącznie
substratu, a zaburzenia mechanizmów utleniania na poziomie komórki
są wtórne w stosunku do niedoboru glukozy. W przeciwieństwie do zmian
towarzyszących innym formom niedotlenienia, umiarkowana hipoglike-
mia nie prowadzi do znacznego obniżenia poziomu związków wysoko-
energetycznych w mózgu (Tarr i wsp. 1962; Mayman, Tijerina 1971; Fe-
rendelli, Chang 1973), ani też do nadmiernego gromadzenia się pirogro-
nianów i mleczanów (Lewis i wsp. 1974a), a obniżony katabolizm glu-
kozy kompensowany jest wzrostem zużycia innych substratów (Feren-
delli 1974; Norberg, Siesjö 1976).

W niniejszej pracy prześledzono wpływ hipoglikemii, wywołanej jed-
norazowym podaniem insuliny, na zawartość glikogenu oraz aktywność
enzymów metabolizujących glikogen: syntetazy i fosforylasy glikogenu,
w mózgu szczura. Aktywność syntetazy glikogenu mierzono w obecności
lub pod nieobecność glukozy-6-fosforanu (G-6-P), celem ujawnienia for-
my aktywnej (D) i nieaktywnej (I) enzymu (Suzumo, Vasuluto 1970).
Podobnie aktywność fosforylasy oznaczano przed i po aktywacji 5'AMP
(Merleveda i wsp. 1969). Równolegle mierzono zawartość glukozy we
krwi.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczury rasy Wistar o ciężarze ciała 190—210 g. Zwie-
rzęta przed doświadczeniem głodzono przez okres 18 godzin, a następ-
nie podawano im podskórnie krystaliczną insulinę w dawce 1 j./100 g
wagi ciała. Szczury dekapitowano w różnych czasach po podaniu hor-
monu (okres przeżycia zaznaczono w tabelach). Zwierzęta kontrolne
traktowano w sposób identyczny z wyjątkiem podawania insuliny.

Zawartość glukozy we krwi oznaczano spektrofotometrycznie, po od-
biłączeniu próbek krwi kwasem nadchlorowym, przy użyciu testów f-my

Boehringer. Metoda oparta jest na przeprowadzeniu glukozy w G-6-P przy użyciu heksokinazy, a następnie utlenieniu G-6-P do glukoniano-6-P oraz pomiarze ekstynkcji wytworzonego w reakcji NADPH przy długości fali 340 nm.

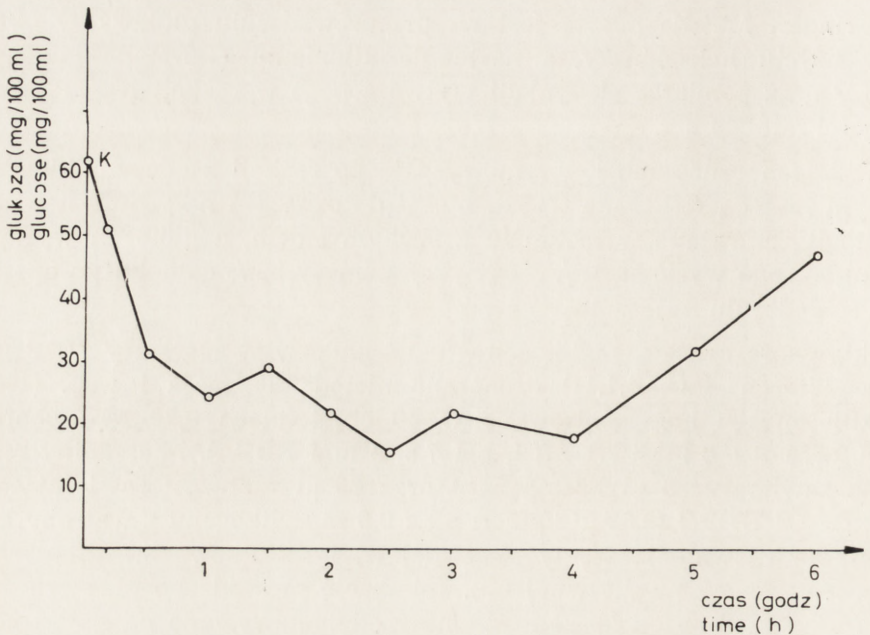
Glikogen oznaczano kolorymetrycznie po reakcji z odczynnikiem jodowym metodą Krismana (1962). Mózgi do oznaczeń natychmiast po dekapitacji zamrażano w metanolu z suchym lodem, a glikogen wytrącano z gorącego wyciągu 33% KOH przy pomocy 50% etanolu, po uprzednim schłodzeniu mieszaniny.

Aktywność syntetazy glikogenu (α -1,4-glukozylotransferazy UDP glukoza-glikogen, E.C.2.4.1.11) oznaczano metodą Thomasa i wsp. (1968). Półkule mózgu homogenizowano w 10 objętościach 0,25 M sacharozy w buforze P (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mM EDTA). Mieszaniny reakcyjne zawierały 30 μ l homogenatu oraz 60 μ l roztworu zawierającego: 6,7 mM ^3H UDPG (0,03 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) oraz 0,6 mg glikogenu z wątroby króliczej dla ujawnienia formy aktywnej (I) i dodatkowo 6,7 mM G-6-P dla oceny formy nieaktywnej (D). Inkubację prowadzono przez 10 min. w 37°C. Po inkubacji 50 μ l mieszaniny odpipetowywano na sączki z bibuły Whatmana nr 3. Sączki płukano kolejno 70% etanolem, trzykrotnie 96% etanolem oraz acetonem. Radioaktywność na sączkach mierzono w toluenowym płynie scyntylacyjnym, z 10% wydajnością. Próbe ślepą stanowiła reakcja prowadzona w obecności zagotowanego homogenatu.

Do oznaczenia aktywności fosforylasy glikogenu (glukozylotransferazy α -1,4 glukan-ortofosforan, E.C.2.4.1.1), tkankę homogenizowano w roztworze zawierającym 0,1 M kwas maleinowy, 40 mM 2-merkapttoetanol, 12,5 mM NaF i 0,1% albuminę krwi bydlęcej o pH 6,5. Homogenaty wirowano przez 20 min. przy $10\,000 \times g$, a aktywność fosforylasy mierzono w nadsączkach w obecności lub pod nieobecność 5'AMP metodą opisaną przez Merlevedę i wsp. (1969). Uwolniony w reakcji fosfor oznaczano metodą Erlera i wsp. (1967). Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951).

WYNIKI

Na rycinie 1 przedstawiono zmiany zawartości glukozy we krwi po podaniu 1 j. insuliny/100 g wagi ciała. Już po 30 minutach następował około 50% spadek poziomu glukozy (z 62 mg% do 32 mg%). Najniższą zawartość glukozy zanotowano w okresie od 2,5 do 4 godz. po podaniu hormonu (15—22 mg%), po czym następował stopniowy jej wzrost. Po 6 godzinach od momentu wstrzyknięcia poziom glukozy wynosił nieznacznie poniżej 50 mg%.



Ryc. 1. Krzywa zawartości glukozy we krwi po jednorazowym podaniu insuliny.
Dawka: 1 j./100 g wagi ciała.

Fig. 1. Blood glucose content after single administration of insulin. Dose:
1 unit/100 g body weight.

Tabela 1 obrazuje przebieg zmian w zawartości glikogenu w mózgu. Po 3 godz. od momentu podania hormonu zaobserwowano spadek poziomu glikogenu do 60% wartości kontrolnej. Od tego momentu następował stopniowy jego wzrost, przy czym po 6 godz. zawartość glikogenu była nadal niższa od wartości kontrolnej, a po 9 godz. nieznacznie ją przewyższała. W 24 godziny po podaniu insuliny poziom glikogenu osiągał wartość prawie dwukrotnie wyższą od kontrolnej, natomiast w czasach późniejszych (48 i 72 godziny) ponownie spadał do poziomu normy.

Pierwsze zmiany w aktywności syntetazy glikogenu pojawiły się dopiero w 9 godzinie po wstrzyknięciu hormonu (tabela 2). W tym czasie stwierdzono około 50% wzrost aktywności zarówno formy I jak i D enzymu. Po 24 godzinach zaobserwowano utrzymanie się podwyższonej aktywności formy I, natomiast aktywność formy D była jedynie nieznacznie i statystycznie nieznamienne wyższa od wartości kontrolnej. Analiza przeprowadzona po 48 godzinach wykazała ponowny wzrost aktywności formy D ponad poziom kontrolny oraz statystycznie znamienne spadek aktywności formy I enzymu.

Zmiany w aktywności fosforylazy glikogenu obserwowano wyłącznie w okresie hipoglikemicznym, tzn. w 1 i 3 godzinie po podaniu hormonu

Tabela 1. Zawartość glikogenu w mózgu szczura po podaniu insuliny
 Table 1. Glycogen content in rat brain after administration of insulin

Czas po zabiegu (godz.) Time after treatment (h)	Zawartość glikogenu (mg glukozy/100 mg świeżej tkanki) Glycogen content (mg glucose/100 mg fresh tissue)	Znamiennosc statys- tyczna Statistical significance p
Grupa kontrolna Control group	141.5 ± 39.8* (20)	—
3	84.3 ± 11.8 (10)	< 0.001
6	110.1 ± 24.8 (10)	< 0.001
9	171.3 ± 43.4 (10)	> 0.05
24	267.8 ± 78.1 (12)	< 0.001
48	142.3 ± 40.3 (7)	> 0.05
72	162.8 ± 24.5 (4)	> 0.05

* Wartości średnie ± odchylenie standardowe

Mean ± S.D.

W nawiasach — liczba doświadczeń

In parentheses — number of experiments

(tabela 3). W obu przypadkach stwierdzono znaczny (około 40%) wzrost aktywności formy aktywnej enzymu, mierzonej pod nieobecność 5'AMP. Aktywność formy zależnej od 5'AMP nie uległa w tym czasie żadnym zmianom.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki pozwalają na wyróżnienie dwóch etapów zmian w metabolizmie glikogenu po podaniu insuliny. Etap pierwszy towarzyszący okresowi hipoglikemicznemu (do 3 godzin) charakteryzuje się spadkiem zawartości glikogenu. Wzmoczony rozkład glikogenu wiąże się zapewne z obserwowanym w tym samym czasie wzrostem aktywności fosforylasy mierzonej pod nieobecność 5'AMP (fosforylasy a). Aktywacja tego enzymu w warunkach hipoglikemii może wynikać z kilku przyczyn. Wiadomo, że glukoza uczynnia fosfatę III — enzym katalizujący przechodzenie aktywnej fosforylasy a w nieaktywną formę b (Kwiatkowska 1978). Stąd też można wnosić, że niedobór glukozy, poprzez unieczynnienie fosfaty III, jest czynnikiem wzmagającym aktywność fosforylasy a. Jednocześnie z badań Lewisa i wsp. (1974a, b), przeprowadzonych w modelu doświadczalnym o parametrach identycznych do zastosowanych w niniejszej pracy wynika, że umiarkowana hipoglikemia prowadzi do zahamowania glikolizy, co m.in. wyraża się spadkiem stężenia ufosforylowanych produktów pośrednich, a zwłaszcza G-6-P, przy jednocześnie niezmiennym poziomie związków wysokoenergetycz-

Tabela 2. Aktywność formy aktywnej (I) i nieaktywnej (D) syntetazy glikogenowej (E.C. 2.4.1.11) w mózgu szczura po podaniu insuliny
Table 2. Activity of the active (I) and inactive (D) form of glycogen synthetase (E.C. 2.4.1.11) in rat brain after administration of insulin

Czas po zabiegu (godz.)	Aktywność właściwa (imp./min ³ H UDPG/mg białka/min)									
	Forma I					Forma D				
Time after treat- ment (h)	Zwierzęta kontrol- ne Control animals	Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Znamienność statystyczna Statistical signi- ficance p	Zwierzęta kontrolne Control animals	Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Znamienność statystyczna Statistical significance p	Zwierzęta kontrolne Control animals	Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Znamienność statystyczna Statistical significance p	Zwierzęta doświadczalne Experimental animals
1	319 ± 69*	(5)	331 ± 66	(5)	> 0.05	1223 ± 88	(5)	1269 ± 188	(5)	> 0.05
6	196 ± 41	(4)	249 ± 102	(5)	> 0.05	832 ± 82	(4)	769 ± 178	(6)	> 0.05
9	172 ± 42	(5)	258 ± 61	(4)	< 0.05	666 ± 124	(5)	893 ± 44	(4)	< 0.05
24	157 ± 31	(4)	216 ± 41	(6)	< 0.05	813 ± 64	(5)	900 ± 194	(6)	> 0.05
48	278 ± 12	(4)	195 ± 51	(4)	< 0.05	681 ± 45	(5)	845 ± 82	(5)	< 0.01

* Wartości średnie ± odchylenie standardowe

Mean ± S.D.

W nawiasach — liczba doświadczeń

In parentheses — number of experiments

Tabela 3. Aktywność fosforylasy glikogenu (E.C. 2.4.1.1) w mózgu szczura po podaniu insuliny mierzona w obecności i pod nieobecność 5'AMP
Table 3. Activity of glycogen phosphorylase (E.C. 2.4.1.1.) in rat brain after administration of insulin measured in the presence or absence of 5'AMP

Czas po zabiegu (godz.)	Aktywność właściwa (nmole P/mg białka/godz.) Specific activity (nmoles P/mg protein/h)					
	Zwierzęta kontrolne Control animals	+5'AMP Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Znamiennosc statystyczna Statistical significance p	Zwierzęta kontrolne Control animals	-5'AMP Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Znamiennosc statystyczna Statistical significance p
1	3.0±0.4* (8)	3.0±0.4 (6)	> 0.05	2.0±0.3 (8)	2.8±0.1 (6)	< 0.001
3	3.2±0.2 (5)	3.6±0.3 (7)	> 0.05	2.7±0.1 (7)	3.2±0.3 (5)	< 0.05
6	4.0±0.3 (5)	3.8±0.3 (7)	> 0.05	2.4±0.4 (5)	2.7±0.4 (7)	> 0.05
24	3.0±0.1 (5)	3.2±0.4 (8)	> 0.05	2.3±0.4 (5)	2.3±0.3 (8)	> 0.05
48	2.5±0.3 (4)	2.7±0.2 (4)	> 0.05	2.1±0.2 (4)	2.1±0.1 (4)	> 0.05

* Wartości średnie ± odchylenie standardowe

Mean ± S.D.

W nawiasach — liczba doświadczeń

In parentheses — number of experiments

nych (Ferendelli, Chang 1973); warunki takie sprzyjają fosforylacji enzymu i jego przechodzeniu w formę aktywną. W efekcie w okresie hipoglikemicznym dochodzi do uwalniania glukozy z glikogenu, co częściowo kompensuje jej niedostateczny dopływ z krwiobiegu. Warto nadmienić, że Lewis i wsp. (1974a) stwierdzali podobny spadek glikogenu we wczesnym okresie hipoglikemii.

W etapie pohipoglikemicznym zaobserwowano wzrost zawartości glikogenu po 24 godzinach poprzedzony zwiększeniem aktywności obu form syntetazy glikogenu (po 9 godzinach). Uprzednio wykazano w różnych modelach doświadczalnych, że zjawisko to z reguły towarzyszy okresowi powrotu do normy po niedotlenieniu lub niedokrwieniu (Ibrahim i wsp. 1970; Śmiałek i wsp. 1971, 1973; Sikorska, Śmiałek 1974), a jego mechanizm próbowano tłumaczyć między innymi aktywacją syntetazy przez G-6-P, nagromadzający się przy prawidłowym poziomie glukozy i ATP, oraz kompensacyjnym wzrostem syntezy enzymu (Sikorska i wsp. 1975). Wydaje się jednak, że w przypadku modelu hipoglikemicznego, mechanizm gromadzenia się glikogenu może mieć nieco inne podłoże. Cały szereg przesłanek wskazuje na możliwość bezpośredniego udziału insuliny w tym procesie. Już w dawniejszych badaniach wykazano, że insulina zwiększa pobór glukozy i syntezę glikogenu w różnych tkankach (Winegrad, Renold 1958; Goldman, Cahill 1964), a nowsze dane potwierdziły tę prawidłowość w odniesieniu do mózgu. Prasannan (1972) wykazał, że dodanie insuliny do skrawków mózgu inkubowanych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, zwiększa przechodzenie glukozy do tkanki oraz syntezę glikogenu. Na szczególną uwagę zasługują doświadczenia wykonane przez Mellerupa i Rafaelse-na (1969); autorzy ci zaobserwowali, że podanie insuliny dokomorowo powoduje znaczny wzrost zawartości glikogenu w mózgu, jednakże dopiero po upływie 4 godzin, podczas gdy dożylnie podanie hormonu, powodujące hipoglikemię, nie prowadzi do żadnych zmian w poziomie polisacharydu. Wyniki te świadczą, że wpływ insuliny może się ujawniać tylko w przypadku nieobniżonego poziomu glukozy, a wzrost aktywności syntetazy glikogenu wiąże się raczej z syntezą enzymu *de novo* niż jego aktywacją. Tłumaczy to 4-godzinne opóźnienie w uwidocznieniu się wzrostu poziomu glikogenu.

Wydaje się, że zmiany w modelu hipoglikemicznym zastosowanym w niniejszej pracy przebiegały zgodnie z powyższymi prawidłowościami. Wpływ insuliny na aktywność syntetazy mógł się nie ujawnić w okresie hipoglikemicznym ze względu na niedobór glukozy. Za syntezą enzymu *de novo* w późniejszym okresie świadczyły natomiast fakt, że po 9 godzinach stwierdzono wzrost aktywności obu form enzymu — zarówno nieaktywnej D jak i aktywnej I. Interpretacja ta

wymaga dalszych potwierdzeń doświadczalnych w układzie, który pozwoli na oddzielną ocenę wpływu hipoglikemii i hormonu.

PIŚMIENNICTWO

1. Basu D. K., Bachhawat B. K.: Purification of uridine diphosphoglucose-glycogen transglucosylase from sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1961, 50, 123-128.
2. Brierley J. B.: Experimental hypoxic brain damage. *J. Clin. Path.* 1977, 11, Suppl. 30, 181-187.
3. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 17-43.
4. Erler W., Egger E., Schwarze H., Göthe W.: Bestimmung des anorganisch gebundenen Phosphors in Serum. *Arzneimittel Standardisierung. Leipzig* 1967, 5, 180-182.
5. Ferendelli J. A.: Cerebral utilization of non-glucose substrates and their effect in hypoglycemia. W: *Brain Dysfunction in Metabolic Disorders*. Red. F. Plum, Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis. 1974, 53, 113-123.
6. Ferendelli J. A., Chang M. M.: Brain metabolism during hypoglycemia. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 173-177.
7. Goldman J. K., Cahill G. F.: Insulin effect on glucose-C¹⁴ incorporation into rat liver and adipose tissue in vivo. *Metabolism*, 1964, 13, 572-578.
8. Hutny J.: Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji. *Post. Bioch.* 1970, 16, 431-448.
9. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam E., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.* 1970, 40, 403-415.
10. Krisman C. R.: A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* 1962, 4, 17-23.
11. Kwiatkowska J.: Rozwój poglądów na mechanizmy regulacji metabolicznych. *Post. Bioch.* 1978, 24, 131-149.
12. Lewis L. D., Ljunggren B., Norberg K., Siesjo B. K.: Changes in carbohydrate substrates amino acids and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 1974 a, 23, 659-671.
13. Lewis L. D., Ljunggren B., Ratcheson K. A., Siesjo B. K.: Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia, related to blood glucose and EEG. *J. Neurochem.* 1974 b, 23, 673-679.
14. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335-347.
15. Lowry O. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-270.
16. Mayman C. I., Tijerina M. L.: The effect of hypoglycemia on energy reserves in adult and newborn brain. W: *Brain Hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum, D. E. Polari. Lippincott, Philadelphia 1971, 242-249.
17. Mellerup E. T., Rafaelsen O. J.: Brain glycogen after intracisternal insulin injection. *J. Neurochem.* 1969, 16, 777-781.
18. Merleveda W., Goris J., De Brandt C.: Interconversion in vitro of two forms of liver phosphorylase. *Eur. J. Biochem.* 1969, 11, 499-502.

19. Mossakowski M. J., Long D. N., Meyers E., Rodriguez de Curt H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500-516.
20. Norberg K., Siesjö B. K.: Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 1976, 26, 345-352.
21. Prasannan K. G.: Effect of insulin on glucose metabolism in cerebral cortex slices under aerobic and anaerobic conditions. *J. Neurochem.* 1972, 19, 1825-1828.
22. Sikorska M.: Metabolizm cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu w mózgu szczura w warunkach niedotlenienia. Praca doktorska, CMD i K, PAN, Warszawa 1978.
23. Sikorska M., Śmiałek M.: Glycogen level and UDP glucose : glycogen α -4-glucosyltransferase (E.C.2.4.1.11) activity in the brains of rabbits after experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 655-664.
24. Sikorska M., Gorzkowski B., Szumańska G., Śmiałek M.: Incorporation of ^{14}C glucose into glycogen and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain following carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 397-404.
25. Suzumo H., Vasuluto T.: Activation of the D to I form conversion of glycogen synthetase by glucose-6-phosphate in bovine spleen. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, 212, 179-184.
26. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDP glucose : glycogen glucosyltransferase (E. C. 2.4.1.11) and α -1,4-glucan : orthophosphate glucosyltransferase activity (E.C. 2.4.1.1) in rat brain in experimental ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 19, 242-248.
27. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDP glucose : glycogen glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222-231.
28. Tarr M., Brada D., Sampson F. G. Jr.: Cerebral high energy phosphates during insulin hypoglycemia. *Amer J. Physiol.* 1962, 203, 690-692.
29. Thomas J. A., Schlender K. K., Lerner J.: A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyl transferase, including an improved biosynthesis of UDP- ^{14}C glucose. *Anal. Biochem.* 1968, 25, 486-499.
30. Winegrad A. I., Renold A. E.: Studies on rat adipose tissue in vitro. 1. Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate and acetate. *J. Biol. Chem.* 1958, 233, 267-271.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

Я. Альбрехт, В. Хильгер, М. Сикорска, М. Я. Моссаковский

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА И АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИХ ГЛИКОГЕН В МОЗГЕ КРЫСЫ

Резюме

Исследовали изменения содержания гликогена и активности фосфорилазы и гликогеновой синтетазы в мозге крысы имеющие место под влиянием однократного подкожного введения инсулина в дозе ие/100 г веса тела. Процедура

эта вызывала снижение уровня глюкозы в крови длящееся в течение 6 часов, при чем самое большое падение (до около 35% контрольной величины) наблюдали спустя 2—3 часа после подачи гормона. Периодови гипогликемии сопутствовало снижение содержания гликогена в мозге, накладывающееся во времени с увеличением активности активной формы фосфорилазы гликогена, не зависящей от экзогенной 5'-АМФ. Спустя 6 часов от подачи инсулина наблюдали возвращение уровня гликогена к норме, и затем — в после постгипогликемического периода — его постепенный и проходящий рост достигающий до 200% контрольной величины после 24 часов. Очередную стабилизацию контрольного уровня гликогена наблюдали после 48 часов. Повышению уровня гликогена предшествовало усиление активности синтетазы гликогена, наиболее отчетливое в 9 часов после подачи гормона. Полученные результаты указывают, что влияние инсулина на метаболизм гликогена обнаруживается в двух фазах. Разложение гликогена во время гипогликемического периода является результатом недостатка глюкозы составляющего фактор усиливающий активацию фосфорилазы. Усиленный же синтез полисахарида в постгипогликемический период может вытекать из активации или синтеза де ново синтетазы гликогена, что предположительно составляет поздний эффект непосредственного действия инсулина на ткани мозга.

J. Albrecht, W. Hilgier, M. Sikorska, M. J. Mossakowski

EFFECT OF EXPERIMENTAL HYPOGLYCEMIA ON THE GLYCOGEN CONTENT AND THE ACTIVITY OF GLYCOGEN-METABOLIZING ENZYMES IN THE RAT BRAIN

Summary

The study deals with the changes in the glycogen content and the glycogen phosphorylase activities in the rat brain following single subcutaneous administration of insulin in a 1u/100 g body weight dose. The treatment caused a decrease of blood glucose level persisting for 6 hrs, with a maximum drop (to ca. 35% of the control level) observed 2-3 hrs after the hormone administration. The hypoglycemic period was accompanied by a decrease of the brain glycogen content coinciding with a rise in the activity of the active, 5'-AMP-independent form of glycogen phosphorylase. The glycogen content was observed to return to the control level 6 hrs after insulin administration, whereafter it showed a gradual transient increase, reaching 200% of control after 24 hrs. The control level was re-established 48 hrs after the treatment. The rise in glycogen content was preceded by a transient increase of the glycogen synthetase activity, most pronounced 9 hrs after hormone administration. The results indicate that the effect of insulin on the glycogen metabolism becomes expressed in two phases. Glycogen degradation during hypoglycemia results from glucose deficiency, which is a factor enhancing the activation of phosphorylases, whereas the increased synthesis of the polysaccharide in the posthypoglycemic period may have resulted from the activation and/or *de novo* synthesis of the glycogen synthetase, possibly manifesting the late effect of direct insulin influence on the brain.