

**GRZEGORZ SULKOWSKI**

**WRAŻLIWOŚĆ ZAKOŃCZEŃ NERWOWYCH MÓZGU  
SZCZURA NA CAŁKOWITE NIEDOKRWIENIE I  
PRZYWRÓCENIE KRAŻENIA**

Praca doktorska



LS 229

H3031

Promotor:

Prof. dr hab. Urszula Rafałowska

Pracownia Patobiochemii Ośrodkowego Układu Nerwowego,  
Zakład Neurochemii,  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2002



**Pani Profesor dr hab. Urszuli Rafałowskiej, promotorowi niniejszej pracy składam serdeczne podziękowania za wszechstronną opiekę, pomoc i życzliwość okazaną podczas przygotowywania i pisania pracy.**



**Panu Docentowi dr hab. Michałowi Walskiemu dziękuję za pomoc w trakcie wykonywania badań z zakresu mikroskopii elektronowej.**

**Serdecznie dziękuję Pani Aleksandrze Lenkiewicz i Panu Sławomirowi Januszewskiemu za niezwykle staranną, fachową pomoc i życzliwość okazaną w trakcie wykonywania części doświadczalnej pracy.**

**Gorące podziękowania składam Pani Doktor Lidii Strużyńskiej za pomoc okazaną podczas przygotowywania pracy.**



Badania eksperymentalne, na których opiera się rozprawa doktorska zostały przeprowadzone w Pracowni Patobiochemii Ośrodkowego Układu Nerwowego w Zakładzie Neurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań zostały opublikowane w następujących pracach:

1. Rafałowska U., Sulkowski G., Waśkiewicz J., Januszewski S., Kapuściński A. (2000) Alteration of dopamine transport and dopamine D2 receptor binding in the rat brain induced by early and late consequences of global ischaemia caused by cardiac arrest in the rat. *Resuscitation* 47: 195-201.
2. Sulkowski G., Waśkiewicz J., Januszewski S., Rafałowska U. (2001) Alteration of GABA transport and GABAB receptor in the brain induced by early and late consequences of global ischaemia caused by cardiac arrest in the rat. *Folia Neuropathol. Suppl. A*, pp 25-31.
3. Sulkowski G., Waśkiewicz J., Walski M., Januszewski S., Rafałowska U. (2002) Synaptosomal susceptibility on global ischaemia caused by cardiac arrest correlated with early and late times after recirculation in rats. *Resuscitation* 52: 203-213.



## STOSOWANE SKRÓTY I SYMBOLE

ADP - adenozyno-5'-difosforan

AOAA – kwas aminooksyoctowy

ATP – adenozyno-5'-trifosforan

cAMP –cykliczny adenozynomonofosforan

cGMP-cykliczny guanozynomonofosforan

CPK – kinaza fosfokreatynowa

Cr – kreatyna

CrP – fosfokreatyna

DA – dopamina

DOPA – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (prekursor DA)

EDTA – wersenian wapniowodisodowy

EEG – elektroencefalogram

EKG - elektrokardiogram

GABA- kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

GABA-T – aminotransferaza GABA

GAD – dehydrogenaza kwasu glutaminowego

G-6-P-DH – dehydrogenaza gluko-6 fosforanu

HEPES – kwas N-2- hydroksyetylopiuperazyno-N'-2-etanosulfonowy

HK – heksokinaza

HVA – kwas homowanilinowy

KP – kinaza pirogronianowa

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LH – kwas arachidonowy (AA)

LOOH – prostaglandyna G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)



NAD – utleniona forma dinukleotydu nikotynamidoadeninowego  
NADP, NADPH - utleniona i zredukowana forma fosforanu NAD  
NCS – solubilizator tkankowy  
NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy  
NMDA-R – receptor NMDA  
nNOS – neuronalna syntaza tlenku azotu  
o.u.n – ośrodkowy układ nerwowy  
PARS – poli(ADP-rybozo)syntetaza  
PLA<sub>2</sub> – fosfolipaza A<sub>2</sub>  
PEP - fosfoenolopirogronian  
P – poziom istotności  
SD – błąd standardowy średniej  
SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu  
SOD – dysmutaza ponadtlenkowa  
TCA – kwas trichlorooctowy  
TEA – trietanolamina  
TRIS – 2-amino-2-hydroksymetyloprepan-1,3-diol  
VSCC – kanały wapniowe zależne od potencjału



## SPIS TREŚCI

<b>1. Wstęp</b> .....	1
1.1 Niedokrwienie mózgu .....	1
1.2 Przywrócenie krążenia (reperfuzja, resuscytacja) .....	4
1.3 Modele doświadczalne niedokrwienia i reperfuzji .....	8
1.4 Neurotransmisja w warunkach fizjologicznych i w niedokrwieniu .....	10
<b>2. Założenia i cel pracy</b> .....	18
<b>3. Materiał i metody</b> .....	19
3.1 Zwierzęta doświadczalne .....	19
3.2 Model całkowitego niedokrwienia mózgu wywołanego zatrzymaniem akcji serca .....	19
3.3 Otrzymywanie frakcji synaptosomalnej .....	22
3.4 Otrzymywanie frakcji błonowych do oznaczeń kinetyki receptorów .....	24
3.5 Pobieranie i utrwalanie materiału do badań mikroskopowo-elektronowych .....	25
3.6 Przygotowanie wyizolowanej frakcji synaptosomalnej do badań w mikroskopowo-elektronowych .....	25
3.7 Analiza morfometryczna .....	26
3.8 Wychwyty neuroprzekaźników przez synaptosomy .....	26
3.9 Uwalnianie neuroprzekaźników z synaptosomów .....	27
3.10 Badanie kinetyki receptora dopaminowego D <sub>2</sub> .....	28
3.11 Badanie kinetyki receptora GABA <sub>B</sub> .....	28
3.12 Oznaczanie adenozyntrifosforanu (ATP) .....	29
3.13 Oznaczanie fosfokreatyny (CrP) .....	30
3.14 Oznaczanie adenozyndifosforanu (ADP) .....	31
3.15 Oznaczanie kreatyny (Cr) .....	31
3.16 Pomiar oddychania mitochondriów obecnych w izolowanych zakończeniach nerwowych.....	32
3.17 Oznaczanie białka .....	32
3.18 Statystyczne opracowanie danych .....	32



<b>4. Wyniki</b> .....	34
<b>4.1 Charakterystyka morfologiczna zakończeń nerwowych mózgu i frakcji synaptosomalnej w warunkach kontrolnych, 10 minutowego całkowitego niedokrwienia i różnych czasach po przywróceniu krążenia</b> .....	34
<b>4.1.1 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej izolowanej z mózgow szczerów kontrolnych</b> .....	34
<b>4.1.2 Morfologiczny obraz zakończeń nerwowych mózgu szczerów kontrolnych</b> .....	37
<b>4.1.3 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczerów poddanych 10 minutowemu niedokrwieniu</b> .....	38
<b>4.1.4 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczerów poddanych 10 minutowemu niedokrwieniu i trwającej 1 godzinę oraz 24 godziny reperfuzji po przywróceniu krążenia</b> .....	38
<b>4.1.5 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczerów poddanych 10 minutowemu niedokrwieniu i trwającej 7 dni reperfuzji po przywróceniu krążenia</b> .....	42
<b>4.1.6 Morfologiczne uszkodzenia neuronów w mózgu w obszarze hipokampa</b> .....	42
<b>4.2 Ocena morfometryczna obserwowanych uszkodzeń w zakończeniach nerwowych mózgu i frakcji synaptosomalnej w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych</b> .....	45
<b>4.3 Wpływ całkowitego niedokrwienia oraz warunków wczesnych i późnych okresów po przywróceniu krążenia na metabolizm energetyczny zakończeń nerwowych</b> .....	50
<b>4.3.1 Wpływ całkowitego niedokrwienia i warunków różnych okresów po przywróceniu krążenia na oddychanie synaptosomów</b> .....	50
<b>4.3.2 Wpływ całkowitego niedokrwienia i warunków wczesnych i późnych okresów po przywróceniu krążenia na poziom metabolitów energetycznych w synaptosomach</b> .....	52
<b>4.4 Neurotransmisja w całkowitym niedokrwieniu oraz wczesnych i późnych okresach po przywróceniu krążenia</b> .....	55
<b>4.4.1 Transport dopaminy w synaptosomach kontrolnych i otrzymanych ze zwierząt po 10 minutowym całkowitym niedokrwieniu oraz po niedokrwieniu i 1 godzinnym, 24 godzinnym i 7 dniowym okresie po przywróceniu krążenia</b> .....	55



4.4.1.1 Wychwył dopaminy przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych .....	56
4.4.1.2 Uwalnianie dopaminy przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych.....	59
4.4.1.3 Wpływ zatrzymania krążenia oraz warunków wczesnych i późnych okresów po jego przywróceniu na kinetykę receptora dopaminowego D <sub>2</sub> .....	63
4.4.2 Transport GABA w synaptosomach kontrolnych i otrzymanych ze szczurów po 10 minutowym całkowitym niedokrwieniu oraz po niedokrwieniu i 1 godzinnym, 24 godzinnym i 7 dniowym okresie po przywróceniu krążenia .....	66
4.4.2.1 Wychwył GABA przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych.....	66
4.4.2.2 Uwalnianie GABA przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych.....	69
4.4.2.3 Wpływ zatrzymania krążenia oraz warunków wczesnych i późnych okresów po jego przywróceniu na kinetykę receptora GABA <sub>B</sub> ergicznego .....	73
5. Dyskusja .....	76
6. Wnioski .....	84
7. Piśmiennictwo .....	85
8. Streszczenie .....	97



## 1. WSTĘP

### 1.1 Niedokrwienie mózgu

Niedokrwienie (ischemia) ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) jest groźnym następstwem często spotykanych zaburzeń takich jak: zatrzymanie akcji serca, chorób naczyniowo-mózgowych czy zatorów tętnicznych. Mianem niedokrwienia o.u.n. określa się stan, w którym krążenie mózgowe krwi zredukowane jest do poziomu niewystarczającego do utrzymania właściwego funkcjonowania mózgu. W zależności od stopnia niedokrwienia występują zaburzenia pracy mózgu o różnym natężeniu. Z niepełnym niedokrwieniem mózgu wg Siesjo [131] mamy do czynienia wówczas, gdy krążenie mózgowe jest zredukowane do poziomu poniżej 40% wartości kontrolnych, natomiast z ischemią całkowitą gdy krążenie zatrzymane jest w 100%. W przypadku wystąpienia zatorów tętnicznych dochodzi do niedokrwienia jedynie części mózgu – jest to zjawisko określane jako ischemia ogniskowa. W ognisku niedokrwienia dochodzi do śmierci wszystkich rodzajów komórek mózgowych i powstaje ognisko martwicze.

Zatrzymanie akcji serca powoduje nagle zatrzymanie dopływu krwi do całego mózgu (**ischemia całkowita**). Ten rodzaj niedokrwienia jest bardzo groźnym epizodem, prowadzącym w większości przypadków do śmierci organizmu lub ciężkiego inwalidztwa. Pacjenci, którzy przeżywają, wykazują różne zaburzenia w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Obserwowane są błyskawicznie rozwijające się zaburzenia czynnościowe, wyrażające się początkowo nadmiernym patologicznym pobudzeniem neuronów, szybko przechodzącym w całkowity zanik aktywności elektrycznej mózgu.

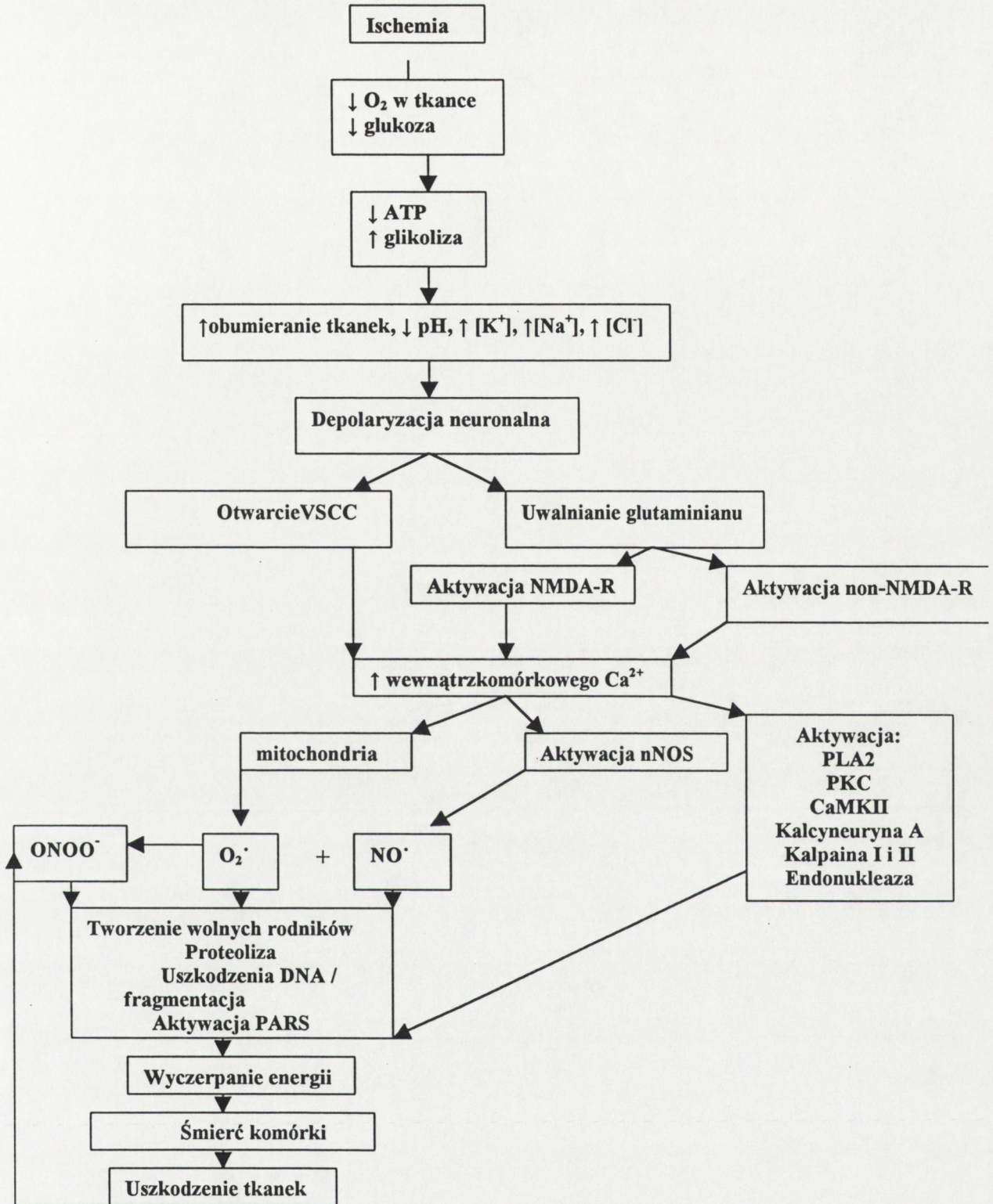
Całkowita ischemia mózgu wiąże się z przejściem metabolizmu od stanu równowagi, w którym podstawowe substraty jak glukoza i tlen są dostarczane do ośrodkowego układu



nerwowego w sposób ciągły a toksyczne produkty ich przemiany usuwane, do stanu w którym tkanka może uzyskać energię wyłącznie kosztem endogennych zasobów związków wysokoenergetycznych (ATP i fosfokreatyny) oraz z beztlenowych przemian komórkowych zasobów glikogenu i glukozy [68, 71]. Jednakże niska wydajność energetyczna beztlenowych przemian glukozy oraz bardzo duże zapotrzebowanie mózgu na związki wysokoenergetyczne, prowadzi do bardzo szybkiego wyczerpania się szczupłych zapasów glukozy i glikogenu i obniżenia ilości produkowanej energii [68, 121]. Wyczerpanie komórkowych zasobów glukozy, tlenu i związków wysokoenergetycznych (ATP, CrP) prowadzi do zaburzeń gospodarki jonowej ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), a w konsekwencji do depolaryzacji błon [28, 71, 77, 81, 87, 88, 121]. Obserwuje się także obniżenie wewnątrzkomórkowego pH i otwarcie kanałów wapniowych zależnych od potencjału (VSCC) oraz napływ aminokwasów pobudzających – glutaminianu i asparaginianu do wnętrza komórek [86]. Nadmierne uwalnianie glutaminianu powoduje stymulację receptorów NMDA, co prowadzi do wzrostu aktywności szeregu enzymów wapniowo - zależnych. Zapoczątkowane zostaje także uwalnianie z mitochondriów rodników ponadtlenkowych  $\text{O}_2^-$ , które aktywują tworzenie wolnych rodników i uszkodzenia DNA. Wyżej opisane procesy są zależne od energii, co powoduje bardzo szybkie wyczerpanie NAD i ATP, zanik przedziałów wewnątrzkomórkowych (kompartmentacji komórki), zahamowanie zależnych od energii szlaków syntezy związków makromolekularnych, aktywację proteaz i fosfataz [19, 29, 51, 79]. Wszystkie te zmiany przyczyniają się do ograniczenia przeżywalności komórek nerwowych [132].

Niedokrwienie mózgu wywołuje zatem całą kaskadę następujących po sobie zdarzeń metabolicznych, które zostały przedstawione w schematycznym uproszczeniu na Ryc. 1.





**Ryc. 1. Postulowany mechanizm zdarzeń wywołanych niedokrwieniem mózgu**

PARS - poli(ADP-rybozo)syntetaza; VSCC - kanały wapniowe zależne od napięcia (ang. Voltage-dependent calcium channels); NMDA-R - receptor NMDA; nNOS - neuronalna syntaza tlenku azotu; PLA<sub>2</sub> - fosfolipaza A<sub>2</sub>; PKC - kinaza białkowa C; ONOO<sup>-</sup> - anion peroksyazotawy; O<sub>2</sub><sup>-</sup> - anion nadtlenkowy. (schemat uproszczony wg P. Liptona, *Physiological Reviews*, 79: 4, 1999[80])



Specyfika uszkodzenia mózgu wywołanego przez niedokrwienie polega na selektywnej wrażliwości różnych okolic mózgu oraz na efekcie tzw. dojrzewania uszkodzeń. Niektóre obszary są w szczególny sposób wrażliwe na obniżenie krążenia mózgowego. Do tego rodzaju obszarów możemy zaliczyć komórki piramidowe kory mózgu, hipokamp, a szczególnie jego rejony CA1 i CA2, jak również prążkowie, wzgórze, czy komórki Purkiniego w mózdzku. Wiadomo, że poza wczesnymi zmianami komórkowymi o charakterze nekrotycznym, obserwowanymi bezpośrednio po niedokrwieniu, może następować stopniowy rozwój uszkodzeń poischemicznych pojawiających się ze znacznym opóźnieniem [69, 101, 131]. Jest to zjawisko opisane i nazwane efektem dojrzewania uszkodzeń ischemicznych (opóźniona śmierć neuronów).

## 1.2 Przywrócenie krążenia (reperfuzja, resuscytacja)

Podstawowym celem zabiegów resuscytacyjnych, zmierzających do przywrócenia krążenia i oddechu jest przywrócenie czynności ośrodkowego układu nerwowego czyli reanimacja. Mechanizmy zmian poreperfuzyjnych podobnie jak poniedokrwieniowych są złożone i obejmują kaskady procesów biochemicznych prowadzących do zmian funkcjonalnych i strukturalnych.

Bardzo ważnym czynnikiem wywołującym te zmiany jest tlen. W swej postaci cząsteczkowej nie stanowi on zagrożenia dla funkcjonowania mechanizmów komórkowych. O toksyczności tlenu decyduje powstawanie jego form reaktywnych, w tym wolnych rodników tlenowych takich jak:  $O_2^-$  rodnik anionu ponadtlenkowego,  $H_2O_2$  nadtlenek wodoru,  $\cdot OH$  rodnik hydroksylowy,  $HO_2$  rodnik wodoronadtlenkowy,  $^1O_2$  tlen atomowy (singleton),  $ROO^-$  rodnik ponadtlenkowy ( $R = \text{lipid}$ ) [16, 61, 102, 118, 125].



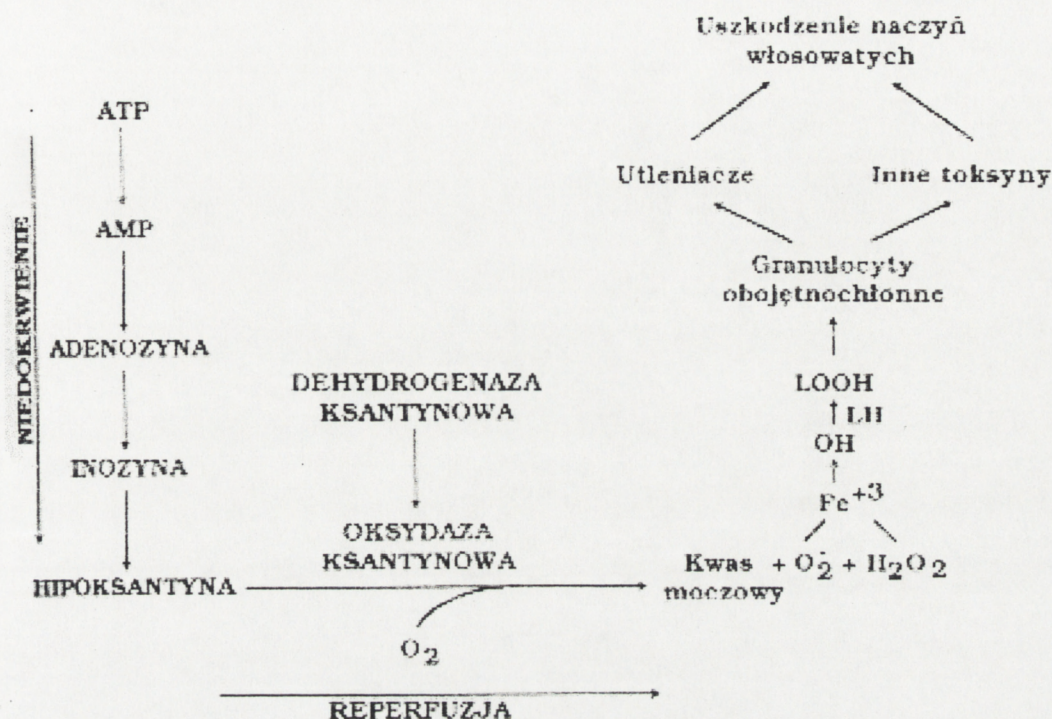
W warunkach fizjologicznych we wszystkich żywych komórkach w sposób ciągły wytwarzana jest niewielka ilość wolnych rodników tlenowych. Dla zabezpieczenia przed szkodliwymi następstwami działania wolnych rodników, organizmy tlenowe wykształciły szereg mechanizmów ochronnych obejmujących przeciwutleniacze niskocząsteczkowe, enzymy antyoksydacyjne, białka wiążące jony metali [102, 130, 153]. Przeciwutleniacze mogą być hydrofilowe, takie jak: witamina C, kwas moczowy, glutation, cysteina, kreatynina, karnozyna, flawonoidy, kwas foliowy lub hydrofobowe: witamina E, witamina A, bilirubina, ubichinon, kwas lipolinowy, estran, estradiol [18, 32, 62, 71, 143]. Do enzymów chroniących tkanki przed aktywnością reaktywnych form tlenu zalicza się dysmutazę ponadtlenkową (SOD), usuwającą aminorodnik ponadtlenkowy, oraz peroksydazę glutationową i katalazę, rozkładające nadtlenek wodoru [82, 102, 153]. Ponieważ wolne jony żelaza stanowią niezwykle wydajne katalizatory reakcji wolnorodnikowych [68, 113, 115], ważną rolę ochronną przypisuje się też białkom wiążącym te jony czyli transferynie i ferrytynie [48, 160].

Wymienione wyżej układy obronne są zdolne zapewnić skuteczną ochronę w warunkach prawidłowych. W sytuacji patologicznej, jaką jest reperfuzja po czasowym zatrzymaniu krążenia, kiedy dochodzi do znacznie większego niż fizjologiczne wytwarzania wolnych rodników tlenowych, mechanizmy obronne stają się niewystarczające i rozpoczyna się oddziaływanie toksycznych produktów przemiany tlenu na komórki. Tworzenie wolnych rodników osiąga szczyt w ciągu kilku minut po reperfuzji, ale trwa z mniejszą intensywnością jeszcze przez kilka godzin [26, 102].

Za wzmożoną produkcję wolnych rodników odpowiada kilka uruchamianych przez proces niedokrwienia i reperfuzji mechanizmów. Podstawowym jest kaskada reakcji związanej z oksydazą ksantynową. Proponowane zależności pomiędzy powstającymi z udziałem



oksydazy ksantynowej utleniaczami, a obserwowanymi w obszarze niedokrwienia i reperfuzji uszkodzeniami przedstawia rycina 2.



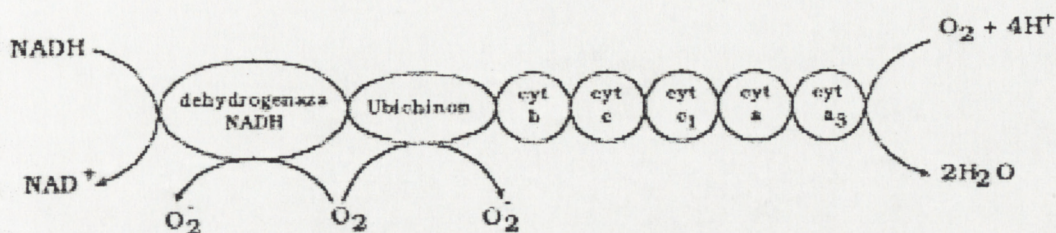
**Ryc. 2.** Udział metabolitów kwasu arachidonowego i granulocytów obojętnochłonnych w uszkodzeniu tkanek w przebiegu zjawiska niedokrwienia i reperfuzji. LH – kwas arachidonowy (AA), LOOH – prostaglandyna  $G_2$  ( $PGG_2$ ) (wg Grisham, Granger, 1989 [42]).

W trakcie niedokrwienia enzym dehydrogenaza ksantynowa przekształca się w oksydazę ksantynową, która po reperfuzji katalizuje reakcję przekazywania elektronów na cząsteczki tlenu wytwarzając aminorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru.

W czasie reperfuzji dochodzi też do wytwarzania wolnych rodników w łańcuchu oddechowym mitochondriów. Według Grishama i Grangera [42] jednym z nich jest wolny rodnik regionu ubichinon - cytochrom b powstający po przyłączeniu transportowanego w łańcuchu oddechowym elektronu tworząc ubisemichinon, który reaguje następnie z  $O_2$ , wytwarzając rodnik ponadtlenkowy. Drugim miejscem tworzenia rodnika ponadtlenkowego



w mitochondriach jest dehydrogenaza flawoproteinowa (NADH) wg Boveris i Cadenas [7]. Miejsce powstawania wolnych rodników tlenowych w łańcuchu oddechowym przedstawiono na rycinie 3.



**Ryc.3.** Miejsca powstawania wolnych rodników tlenowych w łańcuchu oddechowym.

Poza mitochondriami, czy kaskadą reakcji wywołaną przez oksydazę ksantynową istnieją jeszcze inne wewnątrzkomórkowe źródła aktywnych metabolitów tlenu, które uaktywniają się w procesach ischemii i reperfuzji. Można zaliczyć do nich: kompleks wielofunkcyjnej oksydazy mikrosomalnej [42], oksydazy NADPH komórek fagocytujących [144], czy peroksydazy zawierające hem. Źródłem wolnych rodników tlenowych takich jak: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i OH<sup>-</sup> może być syntaza prostaglandynowa [66].

W procesie ischemii-reperfuzji poza wzmożoną produkcją wolnych rodników dochodzi również do obniżenia stężeń przeciwutleniaczy, co jeszcze bardziej potęguje destrukcyjne działania wolnych form tlenu i jego metabolitów, uszkadzających w komórce generalnie wszystkie związki chemiczne, zarówno lipidy [157], białka jak i kwasy nukleinowe [85, 102]. W przypadku lipidów dochodzi do peroksydacji, w wyniku czego tworzone są w kwasach tłuszczowych podwójne sprzężone wiązania nie spotykane w warunkach fizjologicznych. Peroksydacja lipidów może prowadzić do wytwarzania nadtlenków [48, 100, 157]. Wyżej opisane procesy prowadzą do uszkodzenia błon biologicznych, zwiększenia ich



przepuszczalności, a więc zaburzenia równowagi elektrolitycznej. W cząsteczkach białek w wyniku reakcji wolnorodnikowych zachodzi modyfikacja aminokwasowych grup prostetycznych enzymów oraz fragmentacja łańcuchów polipeptydowych. Szczególnie wrażliwe na procesy oksydacyjne są reszty aminokwasowe cysteiny, metioniny, proliny, histydyny, tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny i argininy [100, 102]. Wolnorodnikowe modyfikacje białek prowadzą z reguły do utraty ich aktywności biologicznej. Kwasy nukleinowe są stosunkowo odporne na działanie reaktywnych form tlenu, jednakże ich uszkodzenie niesie ryzyko nieodwracalnych zaburzeń funkcjonowania komórki, a także zafałszowania informacji genetycznej [85, 100, 102].

Zjawisko wolnorodnikowego utleniania wielokrotnie wzmocnione w procesie niedokrwienia i powrotu krążenia jest zatem niebezpieczne dla wszystkich tkanek, komórek, struktur subkomórkowych i molekularnych.

Mózg jest szczególnie podatny na uszkodzenie oksydacyjne, co wiąże się prawdopodobnie z dużą ilością fosfolipidów bogatych w reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, łatwo ulegających peroksydacji [47,102]. Pewne rejony mózgu zawierają ponadto dużo żelaza, które katalizuje reakcje wolnorodnikowe [45, 47, 48, 102].

### **1.3 Modele doświadczalne niedokrwienia i reperfuzji**

Możliwość badań mechanizmów uszkodzeń niedokrwiennych mózgu i uszkodzeń powstających po przywróceniu krążenia u ludzi jest bardzo ograniczona i nie spełnia pokładanych w nich nadziei. Konieczne jest zatem prowadzenie tych badań na doświadczalnych modelach zwierzęcych, bądź na hodowlach komórkowych [20]. Metody wywoływania niedokrwienia mózgu zwierząt są różne. Polegają one na dekapitacji zwierzęcia, zaciskaniu mechanicznym [52] lub chemicznym obkurczaniu tętnic [60] albo na



wywoływaniu niedrożności naczyń krwionośnych np. przez zatory tętnicze. Często stosowanym modelem całkowitego niedokrwienia mózgu szczura *in vivo* jest okresowe zatrzymanie krążenia w tętnicach szyjnych wspólnych, po uprzedniej koagulacji tętnic kręgowych (tzw. model Pulsinelliego) [108, 136], bądź zatrzymanie akcji serca poprzez użycie prądu elektrycznego [53], czy też w badaniach *in vitro* tworzenie warunków całkowitego niedotlenienia hodowli komórkowych czy tkankowych poprzez odpowiedni dobór składu pożywki i warunków hodowli [140].

Wszystkie te modele niestety niedostatecznie odzwierciedlają warunki patologiczne spotykane w klinice, a wyniki eksperymentów prowadzonych na tych modelach znacznie odbiegają od danych charakterystycznych dla naturalnej patogenezы niedokrwienych schorzeń mózgu.

Bardziej wiarygodnym modelem, służącym do uzyskania całkowitej ischemii i przywrócenia krążenia jest zatrzymanie akcji serca przez mechaniczne zaciśnięcie naczyń krwionośnych wychodzących z serca wg Korpaczowa [67] czy Jacksona [55]. Model zaproponowany przez Korpaczowa został dokładnie scharakteryzowany przez Kawai i współ. [59] i Plutę i współ. [105, 106, 155] i wykorzystany w niniejszej pracy. W modelu tym zatrzymanie krążenia odbywa się wyłącznie metodą fizycznego ucisku naczyń krwionośnych wychodzących z serca, bez ingerencji jakichkolwiek środków farmakologicznych czy chemicznych, wynaczyniania krwi, czy też wytwarzania trwałych zmian anatomicznych np. koagulacja, przecinanie czy podwiązanie tętnic.

Model ten, w odróżnieniu od innych modeli przypomina w dużym stopniu sytuację nagłego zatrzymania krążenia i reanimację spotykaną w klinice.



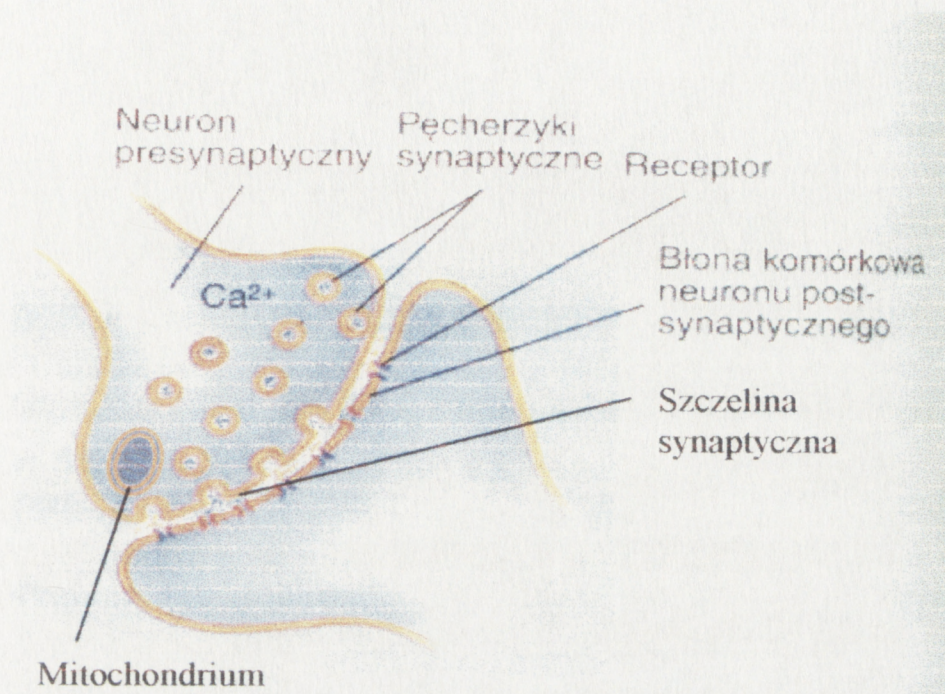
#### 1.4 Neurotransmisja w warunkach fizjologicznych i w niedokrwieniu

Przekazywanie informacji jest podstawową funkcją ośrodkowego układu nerwowego. Zachodzi ono dzięki bioelektrycznym właściwościom neuronów. W komórce nerwowej istnieje różnica potencjałów pomiędzy wnętrzem komórki a jej powierzchnią, wynosząca około 50 mV. Ta różnica potencjałów utrzymuje się wskutek ograniczenia przenikania poszczególnych jonów przez błonę komórkową oraz czynnego usuwania niektórych jonów z komórki. W środowisku zewnętrznym większe jest stężenie jonów sodu ( $\text{Na}^+$ ), we wnętrzu komórki przeważa stężenie jonów potasu ( $\text{K}^+$ ). Jony  $\text{K}^+$  mogą łatwo przenikać przez błony komórkowe jednakże przepuszczalność błon jest ograniczona dla jonów  $\text{Na}^+$ . Jony  $\text{K}^+$  z wnętrza komórki przenikają zgodnie z różnicą stężeń na zewnątrz, co jest zasadniczą przyczyną ujemnego ładunku elektrycznego wnętrza komórki, prowadzi bowiem do zwiększenia stężenia anionów wielkocząsteczkowych (białek), dla których błony komórkowe są nieprzepuszczalne. Jony  $\text{Na}^+$  mogą zgodnie z różnicą stężeń wnikać do wnętrza komórki, lecz są usuwane na zewnątrz wskutek działania pompy sodowo-potasowej. Jest to mechanizm energozależny, a energii dostarcza rozpad ATP w wyniku działania ATP-azy. Usuwaniu jonów  $\text{Na}^+$  z komórki towarzyszy transport  $\text{K}^+$  do jej wnętrza.

Przekazywanie informacji zapoczątkowuje pobudzenie neuronu, które związane jest z gwałtownym wniknięciem jonów  $\text{Na}^+$  do wnętrza komórki w wyniku wzrostu przepuszczalności błony dla tych jonów. Wskutek tego elektroujemny ładunek wnętrza komórki maleje, następuje wyrównanie ładunków wnętrza i powierzchni neuronu, po czym ładunek wnętrza komórki wzrasta w kierunku dodatnim. Zjawisko to znane jest jako potencjał czynnościowy [107]. Potencjał czynnościowy dociera wzdłuż aksonu do jego zakończeń, czyli do części presynaptycznej synapsy, w której nagromadzone są neuroprzekaźniki, czyli biologicznie czynne substancje przenoszące informacje przez szczelinę synaptyczną do części



postsynaptycznej synapsy – należącej do następnego neuronu [107, 127]. Schemat budowy synapsy przedstawiono na rycinie 4.



**Ryc. 4.** Uproszczony schemat budowy synapsy wg Salomon i współ. [123]

Potencjał czynnościowy docierający do zakończeń aksonu uwalnia neuroprzekaźniki z części presynaptycznej do szczeliny synaptycznej w procesie zależnym od stężenia jonów wapnia  $Ca^{2+}$  [99]. Mechanizm uwalniania może polegać na wyrzucie zawartości pęcherzyków synaptycznych do szczeliny synaptycznej (proces egzocytozy), lub czynnym usuwaniu neuroprzekaźników przez błonę synaptyczną. Uwalnianie neuroprzekaźników może być sterowane środkami farmakologicznymi [107, 124, 127].

Zasadniczym działaniem neuroprzekaźnika uwalnianego do szczeliny synaptycznej jest jego wpływ na specyficzne receptory w błonie części postsynaptycznej. W ten sposób neuroprzekaźniki uwalniane z części presynaptycznej przekazują informację, która przetwarzana jest w biochemicznych procesach wewnątrzkomórkowych części



postsynaptycznej. W procesach tych biorą udział związki energetyczne takie jak cykliczny AMP, czy cykliczny GMP [84, 99]. Dalszym etapem jest aktywacja kinaz białkowych. Zasadniczą funkcją tych enzymów jest fosforylacja białek błony komórkowej i fosforylacja białek histonowych jądra komórkowego, co prowadzi do zmian w przepuszczalności błon dla jonów, bądź zmian w metabolizmie transkrypcyjnym i translacyjnym [21, 80, 85].

Część uwalnianych do szczeliny synaptycznej neuroprzebieżników jest zwrótnie wychwytywana do części presynaptycznej, prawdopodobnie przy współdziałaniu receptorów błonowych, a następnie magazynowana w pęcherzykach synaptycznych, bądź katabolizowana przez neuron. Jest to proces czynny, wymagający energii pochodzącej z rozpadu ATP, zależny od jonów sodu [15, 39, 116, 119, 122].

Synteza neuroprzebieżników odbywa się głównie w ciałach komórkowych neuronów, lecz proces ten może również zachodzić w zakończeniach aksonu; w pęcherzykach synaptycznych [30], bądź w cytoplazmie. W pęcherzykach synaptycznych neuroprzebieżniki są związane z białkami i ATP co powoduje, że są bardziej odporne na działanie enzymów katabolizujących [22]. Oprócz puli związanej istnieje w cytoplazmie pula neuroprzebieżników w formie wolnej [22, 46, 119, 147, 148].

Za podstawowe neuroprzebieżniki uważa się: acetylocholinę, monoaminy (noradrenalinę, adrenalinę, dopaminę, serotoninę) oraz aminokwasy takie jak kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) czy kwas glutaminowy [54].

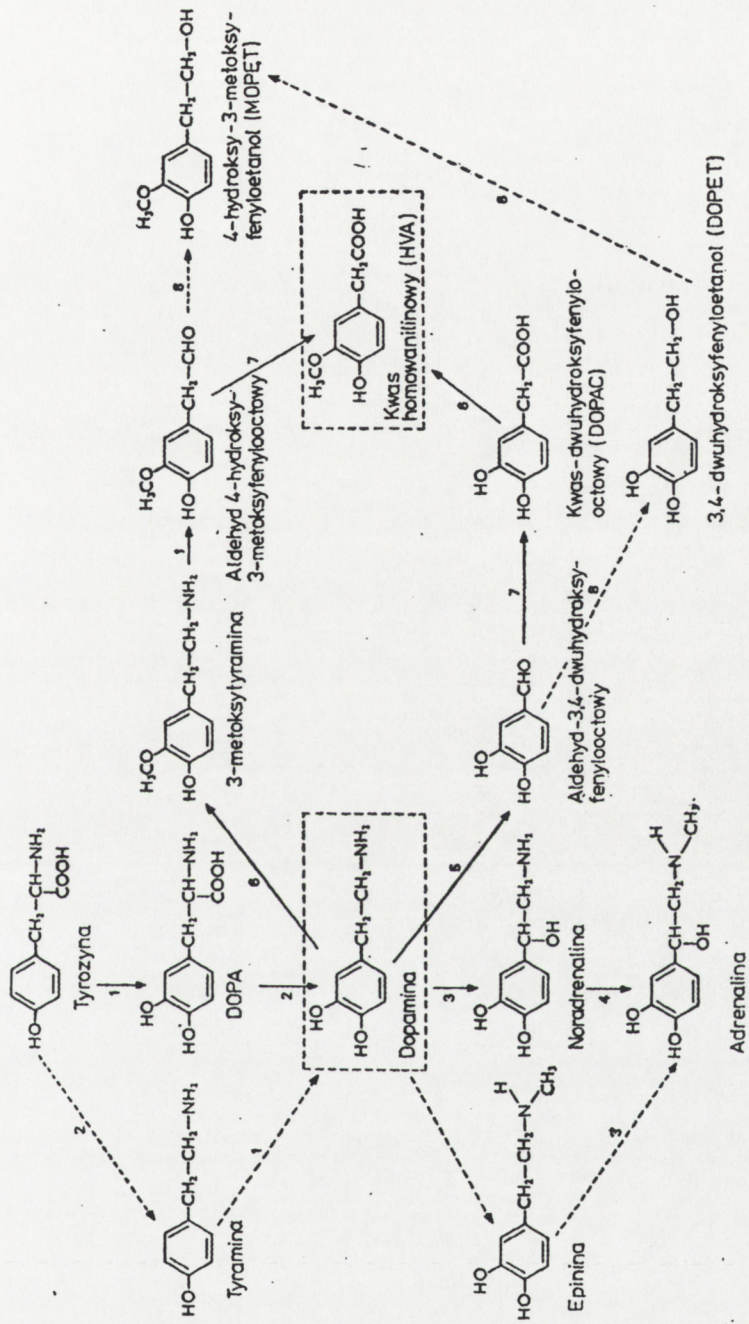
Omówienie działania wszystkich, bądź wyżej wymienionych neuroprzebieżników wykracza poza ramy tej pracy. Dlatego też scharakteryzowane zostaną tylko dopamina i GABA, albowiem one zostały wybrane do badań w niniejszej pracy, dotyczących neurotransmisji w synaptosomach (izolowanych zakończeniach nerwowych) w warunkach prawidłowych (kontrolnych), w patologii niedokrwiennej i reperfuzji.



**Dopamina (DA)** (3,4-dwuhydroksyfenyloetyloamina) wraz z noradrenaliną i adrenaliną należy do grupy amin katecholowych. Powstaje ona przede wszystkim w wyniku dekarboksylacji DOPA, chociaż może też w niewielkim stopniu powstawać przez hydroksylację tyrozyny. Głównym produktem enzymatycznego rozkładu DA jest kwas homowanilinowy (HVA). Niewielka ilość dopaminy może ulegać także innym przemianom, które uwidacznia **rycina 5**.

Biosynteza dopaminy, zachodzi głównie w części presynaptycznej neuronu. Magazynowana jest w pęcherzykach synaptycznych w presynaptycznej części synapsy, a podczas impulsu depolaryzacyjnego, kiedy zwiększa się stężenie wapnia, uwalniana jest do szczeliny synaptycznej i działa na specyficzne receptory w części postsynaptycznej synapsy. Część uwalnianej dopaminy, tak jak i innych neuroprzekaźników może być wychwycona zwrotnie przez receptory części presynaptycznej. Procesy uwalniania i wychwytu są regulowane metabolicznie, mogą być również korygowane w stanach nadczynności czy niedoczynności ośrodkowych struktur dopaminergicznych, poprzez leki będące w dużej części agonistami lub antagonistami receptorów dopaminergicznych [54, 107]. Rola dopaminy w o.u.n. badana jest od wielu lat. Początkowo przypisywano jej tylko rolę prekursora w biosyntezie noradrenaliny i adrenaliny. Punkt zwrotny w poglądach na rolę dopaminy nastąpił w roku 1960, kiedy zaobserwowano drastycznie małą zawartość dopaminy w prążkowie ludzi chorych na chorobę Parkinsona [1, 3, 10, 58, 75]. Aktualnie wiadomo, że zaburzenia w ośrodkowej transmisji dopaminergicznej leżą u podstaw wielu chorób psychicznych (np. schizofrenia oraz depresja) [65, 91] i neurologicznych (np. choroba Parkinsona) [37, 58, 65, 70, 75]. Wyniki intensywnych badań dostarczyły również dowodów na to, że dopamina odgrywa istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych w mózgu takich jak: regulacja aktywności lokomotorycznej, ośrodka pragnienia, działanie ośrodka wymiotnego, procesy emocjonalne (agresja) czy kontrolowanie ciepłoty ciała.



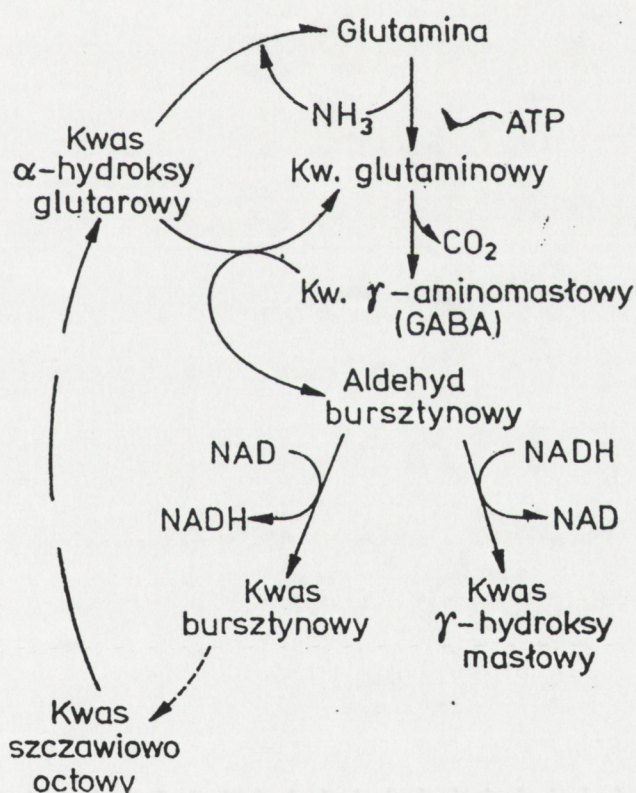


Biosynteza i metabolizm DA:  $\rightarrow$  główne drogi przemian,  $\dashrightarrow$  alternatywne drogi przemian, 1 — hydroksylaza tyrozyny, 2 — dekarboksylaza, 3 —  $\beta$ -hydroksylaza dopaminy, 4 — N-metylotransferaza, 5 — MAO, 6 — COMT, 7 — hydroksylaza aldehydowa, 8 — dehydrogenaza alkoholowa.

Ryc. 5. Synteza i metabolizm dopaminy.



(GABA) kwas  $\gamma$ -aminomasłowy jest powszechnie występującym w układzie nerwowym neuroprzebieźnikiem hamującym. Przyjmuje się że 1/3 synaps w mózgu jest GABA-ergiczna, a stężenie tego aminokwasu jest od 200 do 1000 razy większe niż innych neuroprzebieźników, takich jak np. dopamina, serotonina czy acetylocholina [39]. Synteza GABA odbywa się w neuronach GABAergicznycy. Bezpośrednim prekurorem GABA jest kwas glutaminowy, który ulega dekarboksylacji z udziałem enzymu – dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD). Procesy syntezy i metabolizmu GABA przedstawia ryc. 6.



Ryc.6. Synteza i metabolizm GABA.

Powstający GABA jest magazynowany w pęcherzykach presynaptycznych, a następnie pod wpływem impulsu depolaryzacyjnego uwalniany do szczeliny synaptycznej,



gdzie działa na specyficzne dla siebie receptory neuronu postsynaptycznego, który ulega hiperpolaryzacji i jego aktywność bioelektryczna zmniejsza się. Jest to tzw. hamowanie postsynaptyczne. GABA może również w stosunku do niektórych neuronów hamować przewodnictwo presynaptyczne. Proces inaktywacji GABA polega na jego wychwycie zwrótnym do zakończenia presynaptycznego neuronu i do komórek glejowych, gdzie ulega transaminacji z udziałem enzymu – aminotransferazy (GABA-T) [2, 5, 9, 36].

Układy dopaminergiczny i GABAergiczny w o.u.n. współpracują ze sobą i podlegają wzajemnym regulacjom. Zakłócenie równowagi pomiędzy DA a GABA prowadzi do poważnych zaburzeń przejawiających się między innymi zmianami typu parkinsonowskiego lub płasawiczego [30, 129]. W płasawicy Huntingtona stwierdzono niski poziom GABA w gałce bladej, co prowadzi do przewagi układu dopaminergicznego w tym obszarze [129], natomiast w prążkowie neurony GABA-ergiczne hamowane są przez neurony DA.

Jak podkreślono w poprzednich rozdziałach, ischemia mózgu prowadzi do ciężkich zaburzeń metabolicznych i fizjologicznych, których rezultatem jest uszkodzenie komórek nerwowych, a w konsekwencji ich śmierć. Szybka utrata aktywności elektrycznej mózgu i zmiany w jego obrazie morfologicznym po ischemii [43], a również spadek zasobów energetycznych w mózgu po ischemii [78, 94] i towarzyszące im masywne przemieszczenia jonów między wewnętrznymi a zewnętrznymi przedziałami tkanki o.u.n. [49], szybka hydroliza i uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych [4, 90, 139] muszą mieć istotny wpływ na neuroprzewodnictwo układu nerwowego. Wcześniejsze badania Johansena i współ. [57] sugerowały, że tylko postsynaptyczne (a nie presynaptyczne) zakończenia nerwowe są uszkodzane przez ischemię. Natomiast Weinberg i współ. [152] twierdzili, że również presynaptyczne zakończenia katecholaminergiczne wykazują dysfunkcję w 16 godzin po ischemii mózgu. Na etapie współczesnych badań nie ma już wątpliwości, że ischemia powoduje drastyczne zmiany w różnych strukturach mózgu, również w części pre- jak i



postsynaptycznej synapsy, które w konsekwencji mogą prowadzić do degradacji i śmierci komórek nerwowych [35, 86, 101, 132, 134, 135]. W poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za te zmiany autorzy prac podejmują szerokie badania w różnych kierunkach dotyczących energetyki i transportu jonowego [23, 31, 93, 132], aktywności kinaz białkowych i kalpain [38, 158], komponent lipidowych i związanych z nimi enzymów [13, 90, 95, 128, 157], badań nad receptorami, metabolizmem [84, 94, 97, 98, 161] i transportem neuroprzekaźników [17, 89, 92, 126, 145, 159] oraz neuroprotekcją w mechanizmie neurotransmisji [33, 35, 63, 138]. Należy zwrócić uwagę, że rodzaj i wielkość obserwowanych zmian ischemicznych zależy od rejonu mózgu a także od rodzaju stosowanego modelu doświadczalnego. Dotychczasowe prace dotyczące uwalniania, wychwytu i zmian receptorowych w ischemii były prowadzone przede wszystkim na chomikach mongolskich w modelu obustronnego podwiązania tętnic szyjnych, bądź na szczurach, u których ischemię uzyskiwano albo przez dekapitację, albo przez zamknięcie dwóch lub czterech tętnic szyjnych [17, 27, 126]. Generalnie autorzy uzyskiwali dane mówiące o obniżeniu wartości wychwytu i /lub uwalniania neuroprzekaźników. Dane te są jednak niepełne, czasem rozbieżne wykonane na różnych modelach, trudne do porównania, brak jest dokładnej kinetyki tych procesów. Badania ischemiczne na synaptosomach były nieliczne, prowadzone głównie w modelu „dekapitacyjnym” lub hipoksyjnym, gdzie nie zatrzymywano krążenia, a jedynie zmniejszono ilość tlenu w powietrzu dostarczanym zwierzętom do oddychania [112]. Dotychczas brak było jakichkolwiek danych dotyczących charakterystyki transportu neuroprzekaźników i zmian w aktywności specyficznych receptorów w całkowitej ischemii i po reperfuzji w modelu Korpaczowa, najbardziej przypominającym warunki kliniczne całkowitego zatrzymania krążenia podczas zatrzymania akcji serca.



## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Dotychczas w literaturze brak było informacji dotyczących wpływu zatrzymania akcji serca i przywrócenia krążenia na budowę, metabolizm energetyczny i funkcję synaptosomów i mitochondriów synaptycznych. Opublikowane dane dotyczące wpływu ischemii na synaptosomy w różnych modelach niedokrwienia były fragmentaryczne, trudne do porównania i znacznie odbiegające od sytuacji klinicznych. Biorąc to pod uwagę, podjęcie kompleksowych badań na modelu Korpaczowa, w dużym stopniu przypominającym warunki zawału serca i reanimacji ludzi, wydaje się w pełni uzasadnione. Badania miały na celu:

1. Ocenę morfologiczną zakończeń nerwowych w mózgu oraz w izolowanej frakcji synaptosomalnej w warunkach prawidłowych (kontrolnych), po 10-cio minutowym zatrzymaniu akcji serca oraz krótkim (1 i 24 godziny) i długim (7 dni) czasie po przywróceniu krążenia.
2. Wykazanie czy i na ile całkowite niedokrwienie i reperfuzja w modelu zatrzymania akcji serca mają wpływ na oddychanie mitochondriów synaptycznych i na poziom metabolitów energetycznych w synaptosomach.
3. Zbadanie wpływu całkowitego zatrzymania krążenia i reperfuzji na podstawową funkcję synaptosomów - neurotransmisję.
  - a) Charakterystykę wychwyty i uwalniania dwóch przeciwstawnie oddziałujących w o.u.n. neuroprzekaźników (GABA i dopaminy) w warunkach prawidłowych, po 10 minutowej całkowitej ischemii i w różnych czasach po przywróceniu krążenia w obecności i braku czynników depolaryzujących
  - b) Określenie parametrów kinetycznych receptorów dopaminergicznego  $D_2$  i GABAergicznego  $GABA_B$  w warunkach prawidłowych, po zatrzymaniu krążenia oraz we wczesnych i późnych czasach po reperfuzji.



### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1 Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia prowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach o masie ciała około 200 g, pochodzących z hodowli prowadzonej w I-CMDiK PAN w Warszawie. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety. Po okresowym niedokrwieniu mózgu zwierzęta przetrzymywano w takich samych warunkach przez okres podany w opisie doświadczeń. Doświadczenia na szczurach były prowadzone zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Komisji Etycznej i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie.

#### 3.2 Model całkowitego niedokrwienia mózgu wywołanego zatrzymaniem akcji serca

Całkowite niedokrwienie mózgu uzyskiwano w wyniku zatrzymania akcji serca szczura metodą zaproponowaną przez Korpaczowa [67], scharakteryzowaną dokładniej przez Kawai i wsp.[59] i Plutę i wsp. [105, 106]. Po podaniu eterowej narkozy i wprowadzeniu zwierzęcia w stan znieczulenia ogólnego, rozpoczynano pomiary ekg i eeg. Poprzez trzecią przestrzeń międzyżebrową po stronie prawej wprowadzano do wnętrza klatki piersiowej specjalne narzędzie przypominające zagięty pod kątem 90° hak, na którym podwieszano sercowy pęczek naczyniowy z aortą wstępującą, pniem płucnym i żyłą główną górną. Następnie zatrzymywano akcję serca poprzez dociśnięcie haka, jednocześnie przyciskając palcem na mostek (jak to schematycznie przedstawiono na rycinie 7) powodując całkowite zatrzymanie krążenia krwi i wystąpienie objawów śmierci klinicznej w postaci zatrzymania czynności serca i oddychania oraz zasinienia powłok ciała. Po upływie 3,5 minuty od momentu zaciśnięcia naczyń haczyk usuwano. Po 10-ciu minutach podejmowano akcję



reanimacyjną polegającą na sztucznej wentylacji płuc i masażu serca. Masaż serca wykonywano uderzając rytmicznie opuszkami palców w mostek na poziomie czwartego międzyżebra z częstotliwością 160-180 razy na minutę do momentu powrotu spontanicznej czynności serca, albo do zaprzestania reanimacji z powodu jej nieskuteczności. Sztuczne oddychanie prowadzono powietrzem atmosferycznym o objętości 2,5 ml 25-30 razy na minutę, przy pomocy respiratora firmy Ugo Basile typ 7025 przystosowanego do wentylacji małych zwierząt. Stosunek ilości oddechów do częstości masażu wynosił od 1:6 do 1:8. Przez cały czas doświadczenia monitorowano zapis EKG oraz efekt akustyczny pracy serca i oddechu, pochodzący z elektrod EKG, przy pomocy aparatu typu EEG 8S firmy Medicor. Resuscytację uważano za nieskuteczną jeżeli pomimo reanimacji po 5 minutach nie uzyskano powrotu czynności serca. Śmiertelność szczurów kształtowała się na poziomie około 45 % wszystkich zwierząt uczestniczących w badaniach. Szczury podzielono na 5 grup:

I grupa – kontrola,

II grupa – 10 minutowe całkowite niedokrwienie ,

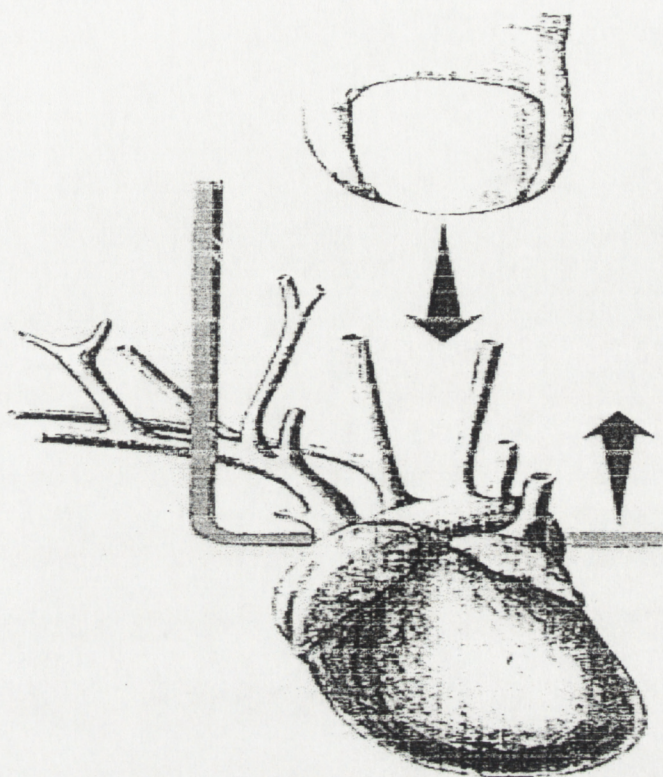
III grupa – 10 minutowe niedokrwienie + 1 godzina przeżycia od momentu przywrócenia krążenia,

IV grupa – 10 minutowe niedokrwienie + 24 godziny przeżycia od momentu przywrócenia krążenia,

V grupa – 10 minutowe niedokrwienie + 7 dni przeżycia od momentu przywrócenia krążenia.

Grupa I – kontrolna obejmowała zwierzęta bez jakiegokolwiek ingerencji. Sprawdzone, że zwierzęta poddane pozornemu zabiegowi polegającemu na podaniu narkozy, wprowadzeniu haczyka pod sercowy pęczek naczyniowy i usunięciu go po upływie 3,5 minuty bez zaciskania naczyń, nie wykazywały żadnych zmian morfologicznych, metabolicznych i funkcjonalnych w stosunku do kontroli, dlatego też w dalszych doświadczeniach jako grupę kontrolną traktowano zwierzęta nie poddane żadnej ingerencji.





**Ryc. 7.** Schemat wykonania zabiegu zatrzymania krążenia poprzez zatrzymanie akcji serca wg metody Korpczowa przedstawiony w pracy Kawai i wsp.[59].

We wszystkich grupach doświadczalnych zwierzęta dekapitowano. Błyskawicznie izolowano całe mózgi, lub w miarę potrzeb, różne jego części, które używano do izolacji frakcji komórkowych: synaptosomalnej i błonowej. Całość preparatyki wstępnej prowadzono w temperaturze 2-4°C. W konkretnych przypadkach (do oznaczeń kinetyki receptorów), materiał mrożono w -20°C. Materiałem wyjściowym do badań uszkodzeń niedokrwiennych była izolowana frakcja synaptosomalna, oraz frakcja błonowa P<sub>2</sub>. Do badań mikroskopowo-elektronowych, omówionych dokładniej w dalszej części metod, pobierano materiał bądź po

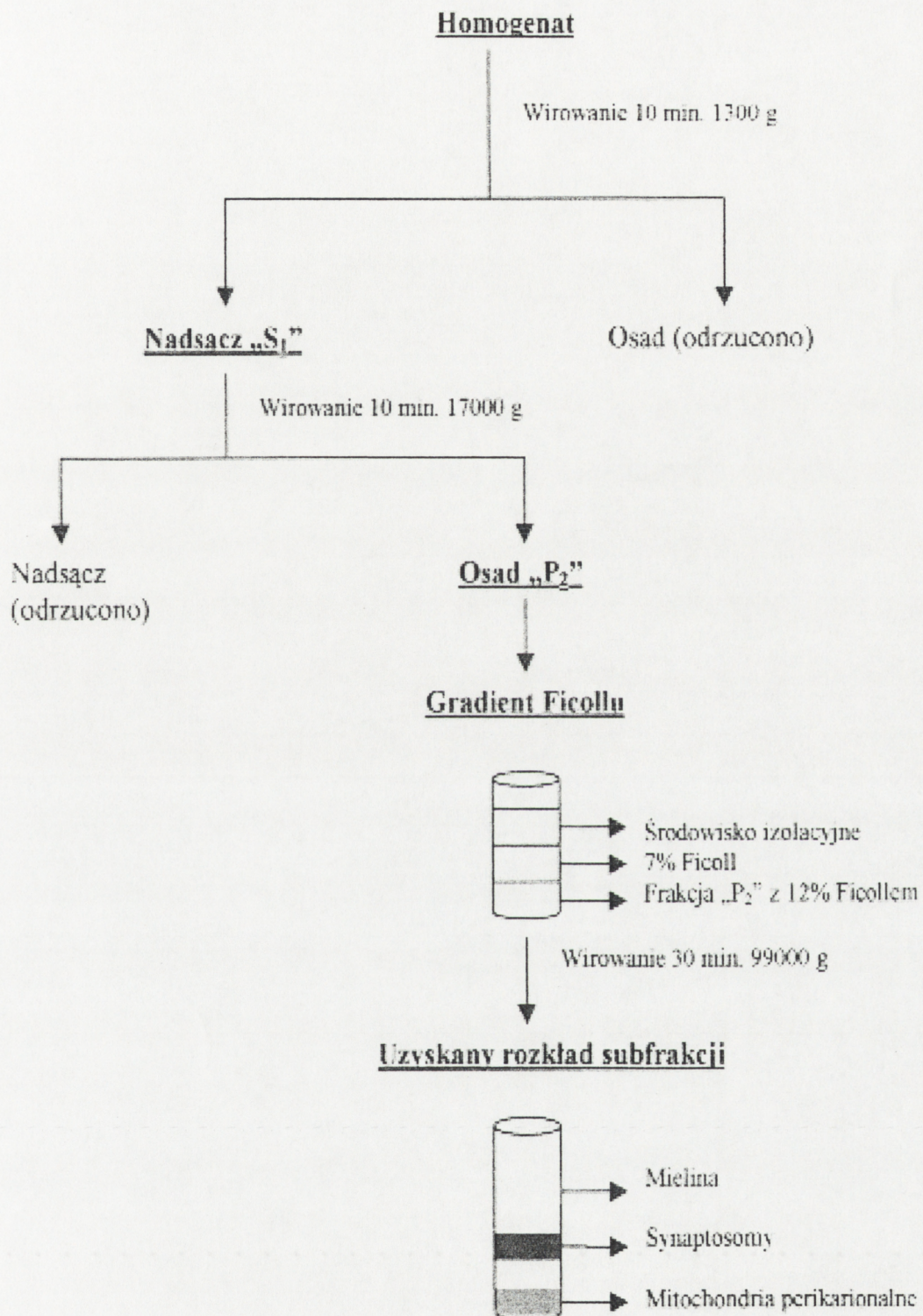


uprzedniej perfuzji przezsercowej zwierząt płynem utrwalającym, bądź poddawano utrwaleniu izolowaną uprzednio frakcję synaptosomalną.

### 3.3 Otrzymywanie frakcji synaptosomalnej

Frakcję zakończeń nerwowych (frakcję synaptosomalną) otrzymywano metodą flotacyjną opisaną przez Bootha i Clarka [6] a dokładnie scharakteryzowaną przez Deutsch i współ. [24, 25] i Rafałowską i współ. [110, 111, 112, 113]. Mózgi szczurów, pozbawione pnia mózgu i mózdzku, homogenizowano ręcznie przy użyciu homogenizatora szklanego typu Dounce ze szklanym tłokiem, w roztworze izolacyjnym (0,32 M sacharoza, 1 mM EDTA i 10 mM Tris-HCl, pH 7,4). 10% homogenat wirowano przez 10 minut przy 1300 x g i następnie 10 min przy 17 000 x g. Uzyskiwano w ten sposób frakcję "P<sub>2</sub>", zawierającą oprócz synaptosomów również mitochondria perikarionalne i mielinę. W celu oczyszczenia, frakcję P<sub>2</sub> zawieszano w roztworze izolacyjnym, a następnie dodawano 12% Ficoll, mieszano, przenoszono do probówek wirowniczych i наносzono 7% Ficoll, a na wierzch roztwór izolacyjny. Gradient wirowano przez 30 minut przy 99 000 x g. Frakcję synaptosomalną zlokalizowaną pomiędzy 12% a 7% roztworem Ficollu, zbierano i przemywano dwukrotnie roztworem Krebsa-Ringera o składzie: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 10 mM TRIS-HCl pH 7,4. Za każdym razem po przemyciu wirowano 10 minut przy 17 000 x g, a następnie zawieszano w tym samym buforze i używano do dalszych oznaczeń. Schemat przedstawiający uzyskanie frakcji synaptosomalnej przedstawiono na rycinie 8.





Ryc. 8. Otrzymywanie frakcji synaptosomalnej.



### 3.4 Otrzymywanie frakcji błonowych do oznaczeń kinetyki receptorów:

#### a) do oznaczeń kinetyki receptora dopaminowego D<sub>2</sub>

Po dekapitacji zwierząt, z mózgu preparowano prążkowie i natychmiast zamrażano w suchym lodzie. Próbkę przechowywano w -20°C przez 7 dni w celu odłączenia fizjologicznie związanego z receptorem liganda. Następnie prążkowie ważono i homogenizowano w 10 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 przy użyciu elektrycznego homogenizatora Polytron i wirowano przez 20 minut przy 40 000 x g. Czynności te powtarzano dwukrotnie. Otrzymany osad zawieszono w 25 ml buforu fosforanowego z dodatkiem 40 µM ketanseryny. Tak otrzymaną frakcję błonową używano do oznaczeń kinetyki receptora D<sub>2</sub> dopaminowego.

#### b) do oznaczeń kinetyki receptorów GABA<sub>B</sub>

Nie oczyszczona frakcja błonowa (P<sub>2</sub>) otrzymana zgodnie z metodą Zukina i wsp. [161] była mrożona przez 16 godzin w -20°C a następnie pozostawała 20 minut w temperaturze pokojowej przed zawieszeniem jej w buforze Tris-HCl (50 mM pH 7,4) z 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. (materiał uzyskany z jednego szczura zawieszano w 10 ml Tris-HCl). Przed 10-cio minutowym wirowaniem przy 7 000 x g zawiesinę inkubowano 45 minut w 20°C. Ta procedura była powtarzana trzykrotnie. Końcowy osad był zawieszany w buforze Tris-HCl pH 7,4 z 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> w ilości 1 mg białka w 0,8 ml buforu z dodatkiem 40 µM isoguvacyny. Tak przygotowaną zawiesinę frakcji używano do dalszych badań.



### 3.5 Pobieranie i utrwalanie materiału do badań mikroskopowo-elektronowych

Do badań mikroskopowo-elektronowych użyto po trzy zwierzęta z każdej grupy doświadczalnej. Po podaniu narkozy eterowej zwierzętom, przeprowadzano perfuzję przezsercową, podając około 200 ml płynu utrwalającego o składzie (1,25 % aldehyd glutorowy i 1 % paraformaldehyd w 0,1 M buforze kakodylanowym pH 7,4 ). Następnie preparowano mózg i pobierano próbki z takich obszarów jak hipokamp i kora. Materiał utrwalano w płynie o wyżej podanym składzie przez 2 godziny, a następnie po przepłukaniu buforem kakodylanowym, inkubowano przez 40 minut w 1% roztworze czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ). Następnie materiał traktowano przez 30 minut 0,5 % roztworem octanu uranylu. Po dehydratacji w alkoholu etylowym i tlenku propylenu materiał zatapiano w żywicy Spurr, cięto na ultracienkie skrawki i oceniano w mikroskopie elektronowym typu JEM 1200 EX.

### 3.6 Przygotowanie wyizolowanej frakcji synaptosomalnej do badań mikroskopowo-elektronowych

Do zawiesiny synaptosomów uzyskanych z jednego zwierzęcia, zawieszonych w 1 ml buforu Krebsa-Ringera dodawano mieszaninę utrwalającą o składzie: 1,25 % aldehyd glutorowy i 1 % paraformaldehyd w 0,1 M buforze kakodylanowym pH 7,4 na czas 1 godziny. Nadsącz zlewano a osad zalewano na 15 minut buforem kakodylanowym. Po odwirowaniu osad inkubowano przez 40 minut w 1 % roztworze czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ), a następnie po dwóch płukaniach buforem kakodylanowym synaptosomy traktowano 0,5 % roztworem octanu uranylu przez 30 minut. Po dehydratacji w alkoholu etylowym i tlenku propylenu materiał zatapiano w żywicy Spurr. Preparaty oceniano w mikroskopie elektronowym typu JEM 1200 EX.



### 3.7 Analiza morfometryczna

Pomiary morfometryczne zmian mikroskopowo-elektronowych wykonano na 50 elektronogramach o powiększeniu 15 000 x (do oceny ilości pęcherzyków synaptycznych) lub 3 000 x (do oceny zmian morfologicznych w mitochondriach) w każdej z badanych grup doświadczalnych. Całkowita liczba przeanalizowanych elektronogramów wynosiła 250. W każdej z badanych grup, elektronogramy były wykonane z trzech niezależnie izolowanych frakcji synaptosomalnych (każda izolacja z 1 zwierzęcia), oraz trzech zwierząt w przypadku obserwacji zakończeń nerwowych (w próbkach tkanki pobieranych w kilku powtórzeniach bezpośrednio z obu półkul mózgowych). Morfometrycznej analizy zmian ultrastrukturalnych dokonano przy użyciu programu komputerowego Multiscan, a dane opracowano statystycznie przy użyciu programu komputerowego PRISM firmy GraphPad.

### 3.8 Wychwyty neuroprzekazników przez synaptosomy

Wychwyty neuroprzekazników przez synaptosomy badano metodą izotopową zgodnie z Troeger i współ. [146]. Frakcję synaptosomalną zawieszano w buforze Krebsa-Ringera (0,5 mg białka/ml) zawierającym 10 mM glukozę i 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  i preinkubowano w temperaturze pokojowej ciągle mieszając przez 5 min. Przy końcu preinkubacji do prób dodawano substancje hamujące metabolizm badanych neuroprzekazników. W przypadku GABA – 2 mM kwas aminooctowy (AOAA), w przypadku prób z dopaminą 0,1 mM pargylinę. Reakcję wychwyty rozpoczęto dodając znakowane neuroprzekazniki:

1. [ $^3\text{H}$ ]dopamina – o wyjściowej aktywności specyficznej 26,9 Ci/mmol i stężeniu końcowym w badanej próbce 0,4  $\mu\text{M}$ .



2. [ $^{14}\text{C}$ ]GABA – o wyjściowej aktywności specyficznej 226 mCi/mmol i stężeniu końcowym w badanej próbie 2  $\mu\text{M}$ .

W celu oznaczenia kinetyki pobierania neuroprzekaźników przez synaptosomy pobierano 200  $\mu\text{l}$  próby w czasach: 40 sekund, 2, 4, 6, 8 i 10 minut i szybko wirowano przez warstwę oleju silikonowego o gęstości 1,03; (General Electric, Waterford, NY) w mikrowirówce Beckman. Po wirowaniu nadsącz odrzucano, a osad rozpuszczano w rozpuszczalniku tkankowym NCS. Radioaktywność mierzono w osadzie i w mieszaninie inkubacyjnej w liczniku scyntylicyjnym używając mieszaniny scyntylicyjnej Bray'a.

### 3.9 Uwalnianie neuroprzekaźników z synaptosomów

Uwalnianie neuroprzekaźników w wyniku depolaryzacji błon plazmatycznych przez 50 mM KCl i równolegle przez weratrydynę przeprowadzano po uprzednim nagromadzeniu radioaktywnych związków. Zawiesinę synaptosomów (5 mg białka/ml) preinkubowano w roztworze Krebsa-Ringera z 10 mM glukozą, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  i 2 mM kwasem aminooksyoctowym i [ $^{14}\text{C}$ ]GABA o końcowym stężeniu 2,4  $\mu\text{M}$  (w przypadku GABA) oraz 0,1 mM pargeliną i [ $^3\text{H}$ ] dopaminą o końcowym stężeniu 0,1  $\mu\text{M}$  (w przypadku dopaminy). Następnie mieszaninę inkubacyjną rozcieńczano 10-ciokrotnie w celu zahamowania pobierania znakowanych izotopowo neuroprzekaźników, buforem Krebsa-Ringera zawierającym lub nie zawierającym 40  $\mu\text{M}$  weratrydynę lub 50 mM KCl. Pobierano 200  $\mu\text{l}$  próby (2 równoległe) w czasie 2, 5, 10 minut i natychmiast wirowano przez warstwę oleju silikonowego o gęstości 1,03 tak jak to opisano powyżej. Po odwirowaniu osad rozpuszczano w NCS. Radioaktywność uzyskanych osadów mierzono w obecności roztworu Bray'a w liczniku scyntylicyjnym i porównywano równoległe z wyjściową radioaktywnością mieszaniny inkubacyjnej.



### 3.10 Badanie kinetyki receptora dopaminowego D<sub>2</sub>

Badania mechanizmu wiązania liganda przez receptor D<sub>2</sub> dopaminowy przeprowadzono według metody Klimek i Nielson [64] używając jako liganda znakowanego [<sup>3</sup>H]spiperon. Do 250 µl zawiesiny frakcji błonowej, otrzymanej jak opisano powyżej, dodawano 200 µl 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,4 i 50 µl [<sup>3</sup>H]spiperonu o aktywności właściwej (15 Ci/nmol). Mieszaninę inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie próbki sączone pod ciśnieniem przez bibułę (Whatman GF/B) przy użyciu urządzenia do sączenia (Harvester) firmy Brandel. Sączki przemywano trzykrotnie 5 ml schłodzonego do 4°C buforu fosforanowego. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym w roztworze Bray'a. Niespecyficzne wiązanie ligandu do receptora wyznaczano po dodaniu 50 µl 50 µM butaclamol. Analizę wiązania [<sup>3</sup>H]spiperonu przez receptor dopaminowy D<sub>2</sub> przeprowadzono z szeregiem rozcieńczeń liganda od 0,01 nM do 6,0 nM. Ilość miejsc wiążących wrażliwych na butaclamol w prądkowiu szczura kształtowała się na poziomie 75 fmoli /mg tkanki [114]. Obliczenia parametrów kinetycznych receptora K<sub>D</sub> i B<sub>max</sub> były wykonywane indywidualnie dla każdego szczura przy użyciu programu komputerowego PRISM firmy GraphPad.

### 3.11 Badanie kinetyki receptora GABA<sub>B</sub>

Do każdej próby o objętości 0,8 ml zawiesiny błon, przygotowanej do badań jak opisano powyżej, dodawano 0,1 ml buforu Tris-HCl o pH 7,5 z 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> zawierającego różne stężenia nieznakowanego GABA, tak że uzyskiwano końcowo szereg rozcieńczeń od 1 nM do 100 µM. Następnie do tego szeregu rozcieńczeń dodawano 0,1 ml buforu Tris-HCl z różnymi stężeniami (1-3 nM) znakowanego [<sup>3</sup>H]GABA. Mieszaninę inkubowano 15 minut w

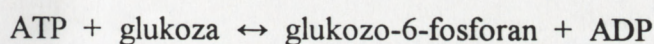


20°C. Inkubację przerywano poprzez filtrację próbek pod ciśnieniem przy użyciu urządzenia do sączenia (Harvester) firmy Brandel przez szklany filtr Whatman GF/B, który dwukrotnie przemywano 5 ml schłodzonej do 4°C wody destylowanej zgodnie z metodą opisaną przez Ohamori i współ.[99]. Radioaktywność każdego filtra mierzono w liczniku scyntylicyjnym, po dodaniu roztworu Bray'a. Niespecyficzne wiązanie ligandu do receptora było oznaczane po dodaniu 100 µM baclofenu. Specyficzne wiązanie do miejsc receptorowych GABA<sub>B</sub> było określane jako część znakowanego [<sup>3</sup>H]GABA zastąpionego przez baclofen i wynosiło 47 ± 10 % całkowitego wiązania znakowanego [<sup>3</sup>H]GABA. Kinetyczne parametry dla receptorów GABA<sub>B</sub> (K<sub>D</sub> i B<sub>max</sub>) były oznaczane w eksperymentach z wiązaniem kompetycyjnym dla użytych stężeń nieznakowanego GABA i znakowanego [<sup>3</sup>H]GABA. Obliczeń parametrów kinetycznych receptora dokonano przy pomocy programu komputerowego PRISM firmy GraphPad.

### 3.12 Oznaczanie adenozynotrifosforanu ATP

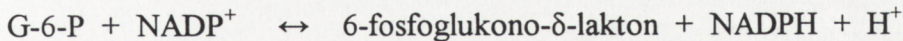
Zawiesinę synaptosomów, o stężeniu białka około 10 mg/ml, zawieszano i inkubowano w buforze Krebsa-Ringera z dodatkiem 10 mM glukozy i 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Następnie odbiałczano przez dodanie kwasu nadchlorowego (HClO<sub>4</sub>) do uzyskania końcowego stężenia 4%. Po odwirowaniu próbek przy 2 500 x g nadsącz neutralizowano dodając 3 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> w 0,5 M trietanolaminie (TEA). Nadsącz, po usunięciu wytrąconego w trakcie neutralizacji osadu KClO<sub>4</sub>, używano do oznaczeń. W uzyskanym zobojętnionym nadsączu mierzono zawartość ATP metodą enzymatyczno-spektrofotometryczną wg. Lamprechta i Trautscholda [74] przy użyciu heksokinazy zgodnie z następującą sekwencją reakcji:

HK(heksokinaza)





G-6-P-DH (dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu)

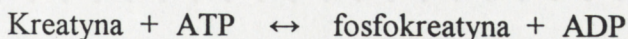


Produkt  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  określano przez pomiar wzrostu absorpcji przy długości fali  $\lambda = 340$  nm. Pomiar stężenia ATP przeprowadzano w buforze TEA o pH 7,5 z dodatkiem enzymów biorących udział w poszczególnych etapach reakcji i ich substratów. Ilość ATP obliczano na podstawie różnicy pomiędzy absorpcją wyjściową ( $E_0$ ), mierzona dla mieszaniny zawierającej bufor TEA, 6,66 mM  $\text{Mg Cl}_2$  i 0,33 mM NADP oraz materiał badany (przygotowany jak opisano wcześniej) a absorpcją końcową ( $E_k$ ), ustaloną po około 15 minutach od dodania G-6-P-DH, glukozy oraz heksokinazy. Odczyt absorpcji prób przeprowadzano wobec powietrza i odejmowano wartości odczytane dla próby ślepej. W obliczeniach uwzględniano współczynnik rozcieńczenia oraz molowy współczynnik absorpcji dla NADPH przy długości fali  $\lambda = 340$  nm. Wyniki w  $\mu\text{molach ATP/ml}$  próby przeliczano na mg białka.

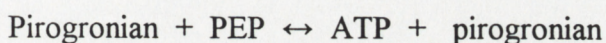
### 3.13 Oznaczanie fosfokreatyny (CrP)

Pomiar CrP przeprowadzano w tej samej mieszaninie inkubacyjnej co ATP, jako kontynuację reakcji enzymatycznych, po dodaniu 1 mM ADP i enzymu kinazy pirogronianowej zgodnie z metodą Lamprecht i współ. [73] uwzględniając poniższe reakcje.

CPK(kinaza fosfokreatynowa)

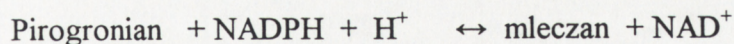


KP (kinaza pirogronianowa)





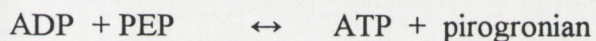
LDH (dehydrogenaza mleczanowa)



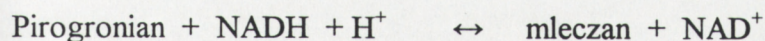
### 3.14 Oznaczanie adenozynodifosforanu (ADP)

Pomiar przeprowadzano wg metody Jaworek i współ. [56] w buforze TEA z dodatkiem PEP, NADH i dehydrogenazy mleczanowej, odczytując wartość absorpcji ( $E_1$ ) oraz po dodaniu kinazy pirogronianowej, odczytując wielkość absorpcji ( $E_2$ ). Ilość ADP oznaczano spadkiem absorpcji przy długości fali  $\lambda = 340$  nm i obliczano z różnicy pomiędzy wartościami  $E_1$  i  $E_2$ .

KP (kinaza pirogronianowa)



LDH (dehydrogenaza mleczanowa.)



### 3.15 Oznaczanie kreatyny (Cr)

Kreatynę oznaczano w tej samej mieszaninie inkubacyjnej co ADP według metody Brenta i współ. [12] po dodaniu 1 mM ATP i kinazy kreatynowej.



### **3.16 Pomiar oddychania mitochondriów obecnych w izolowanych zakończeniach nerwowych**

Pobieranie tlenu przez synaptosomy mierzono metodą polarograficzną przy użyciu elektrody tlenowej Clarka spolaryzowanej do 0,8 mV, w temperaturze 25°C. Zawiesinę synaptosomów o stężeniu białka około 5 mg/ml w buforze Krebsa-Ringera (pH 7,4) preinkubowano z 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> i 10 mM glukozą w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Egzogenne substraty (pirogonian i bursztynian) o stężeniu końcowym 10 mM dodawano po umieszczeniu mieszaniny inkubacyjnej synaptosomów w kamerze pomiarowej elektrody. Ilość pobranego przez mitochondria synaptyczne tlenu wyrażano w nmolach O<sub>2</sub> / mg białka / minutę.

### **3.17 Oznaczanie białka**

Białko oznaczano metodą enzymatyczno - spektrofotometryczną wg Lowry i współ. [83] stosując jako standard albuminę surowicy wołowej.

### **3.18 Statystyczne opracowanie danych**

Każde oznaczenie wykonywano w kilku powtórzeniach (od 3 do 10 w zależności od rodzaju eksperymentu). Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią ± odchylenie standardowe (SD) obliczane z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano jednoczynnikową analizą wariancji



(ANOVA) z powtarzanymi pomiarami, gdzie czynnikiem powtarzalnych pomiarów były warunki doświadczalne. W przypadku wystąpienia statystycznie istotnego efektu któregokolwiek z głównych czynników wykonywano analizę post-hoc przy użyciu testu Dunnetta. W doświadczeniach gdzie porównywano między sobą dwie grupy istotność statystyczną sprawdzano przy użyciu testu *t*-Student'a. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności *P* poniżej 0,05.



## 4. WYNIKI

### 4.1 Charakterystyka morfologiczna zakończeń nerwowych mózgu i frakcji synaptosomalnej w warunkach kontrolnych, 10-cio minutowego całkowitego niedokrwienia i różnych czasach po przywróceniu krążenia.

Badania zakończeń nerwowych mózgu określające zmiany morfologiczne wywołane całkowitym niedokrwieniem i warunkami po przywróceniu krążenia prowadzone były równolegle na:

- A) izolowanej frakcji zakończeń nerwowych (frakcja synaptosomalna),
- B) preparatach mózgowych.

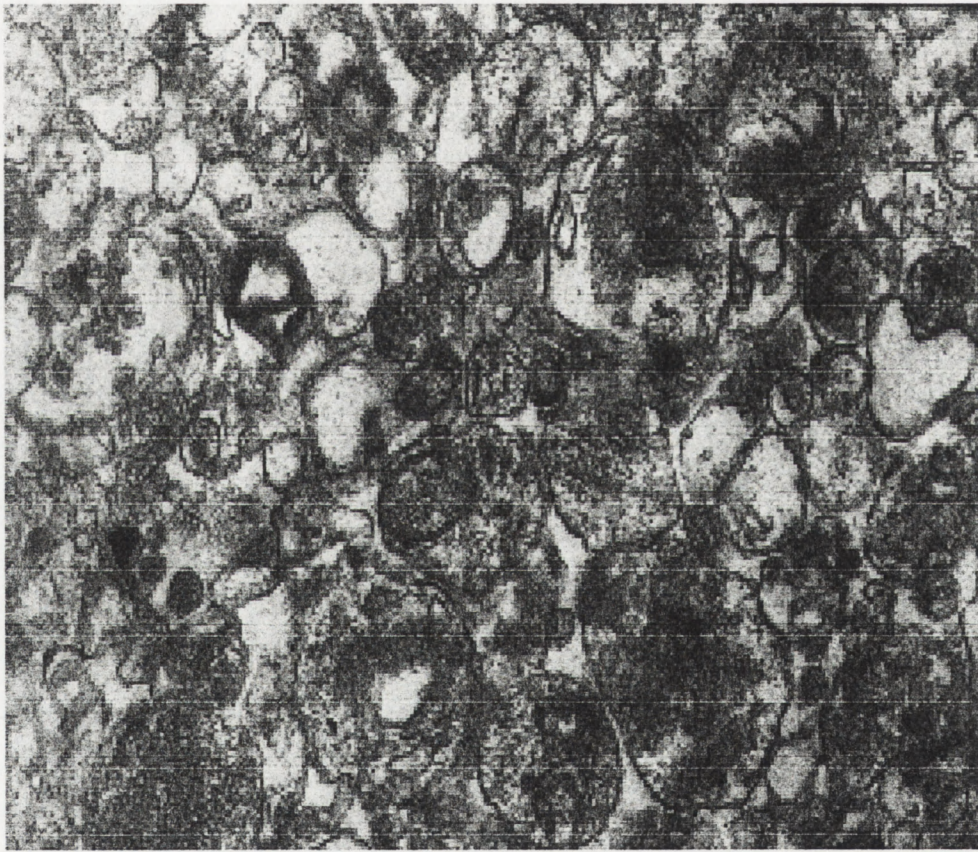
Starano się wykazać czy zakończenia nerwowe obecne w izolowanej frakcji synaptosomalnej, będące materiałem do badań metabolicznych i funkcjonalnych w dalszych etapach niniejszej pracy, zachowują w warunkach kontrolnych i patologicznych podobny bądź odmienny obraz morfologiczny jak zakończenia nerwowe obserwowane w próbkach pobranych bezpośrednio z mózgu.

#### 4.1.1 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej izolowanej z mózgow szczerów kontrolnych

Preparaty frakcji synaptosomalnej uzyskanej ze zwierząt kontrolnych nie różniły się od opisanych w literaturze. Ich czystość i integralność metaboliczna była taka jak określano wcześniej [25, 110, 111] (Ryc. 9). W preparatach mikroskopowo-elektronowych frakcji synaptosomalnej izolowanej z mózgow szczerów kontrolnych w powiększeniu 60 i 80 tys. (Ryc. 10 A, B) widoczne były dobrze uformowane synaptosomy z zachowaną ciągłością

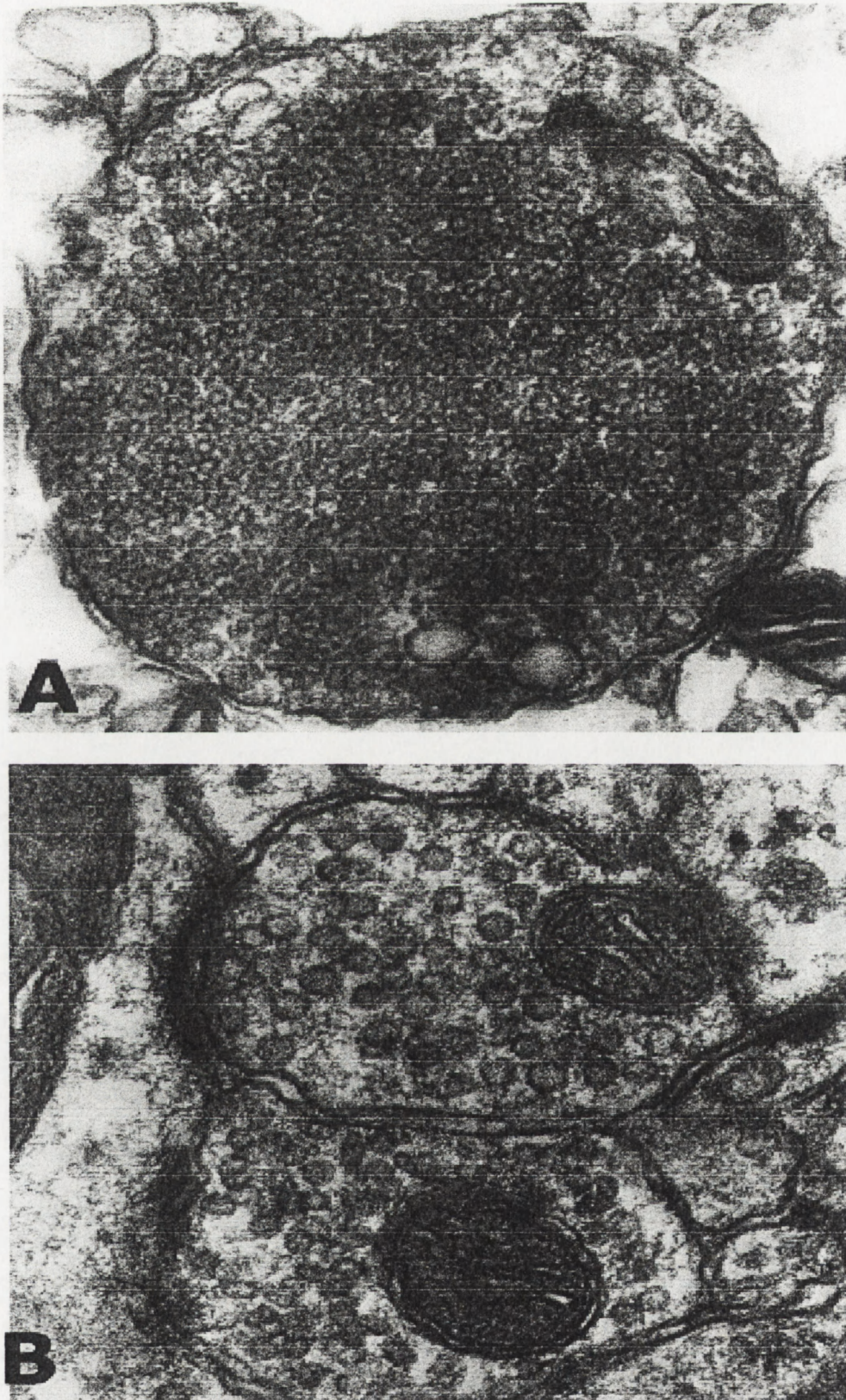


błony komórkowej, wypełnione licznymi pęcherzykami synaptycznymi, zawierające mitochondria z nieuszkodzonymi błonami zarówno wewnętrzną jak i zewnętrzną, posiadające prawidłowe grzebień mitochondrialne. Ilościowa analiza morfometryczna 50-ciu losowo wybranych obrazów obserwowanych w mikroskopie elektronowym wykazała 75 % zawartość nieuszkodzonych zakończeń nerwowych w preparatach synaptosomalnych oraz zanieczyszczenie frakcji fragmentami błon synaptycznych i wolnymi mitochondriami w około 5 %, co odpowiada wartościom opisanym w literaturze [24] i świadczy o dużej czystości i integralności otrzymanej frakcji



**Ryc. 9.** Obraz mikroskopowo-elektronowy frakcji synaptosomalnej izolowanej z mózgow szczerów kontrolnych. Pow. x 3 000.





Ryc 10. Obrazy mikroskopowo-elektronowe zakończeń nerwowych w izolowanej frakcji synaptosomalnej otrzymanej ze szczurów kontrolnych. (A) widoczna część presynaptyczna zakończenia nerwowego z bardzo licznymi pęcherzykami synaptycznymi, Pow. x 80 000; (B) widoczne dobrze zachowane mitochondria o prawidłowej morfologii we wnętrzu synaptosomów. Pow. x 60 000.



#### 4.1.2 Morfologiczny obraz zakończeń nerwowych mózgu szczurów kontrolnych

Obraz morfologiczny zakończeń nerwowych obserwowanych w mikroskopie elektronowym w mózgu (Ryc. 11) nie różnił się od obrazów mikroskopowo-elektronowych zakończeń nerwowych obecnych w izolowanej frakcji synaptosomalnej (Ryc. 10 A, B). Obrazy te są bardzo podobne, zakończenia nerwowe zawierają nieuszkodzone struktury błonowe, mitochondria o prawidłowej morfologii i dużą ilość pęcherzyków synaptycznych.



Ryc 11. Obraz mikroskopowo-elektronowy zakończeń nerwowych mózgu szczura kontrolnego, Pow. x 80 000.



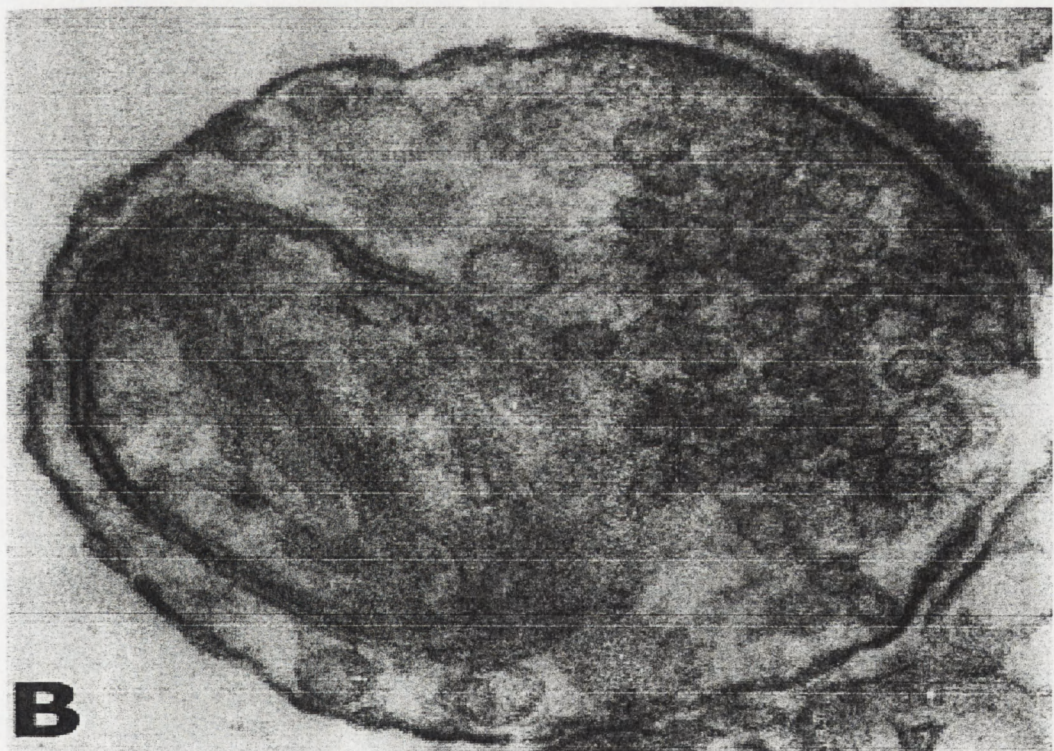
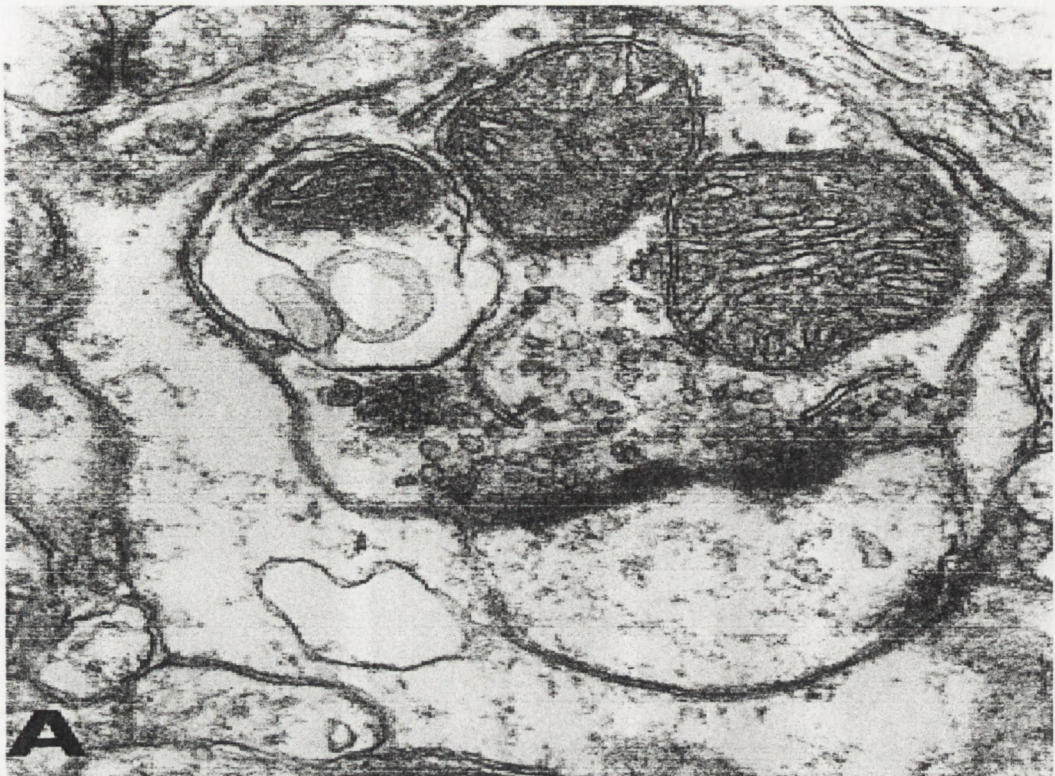
#### **4.1.3 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczurów poddanych 10-cio minutowemu niedokrwieniu**

Trwające 10 minut całkowite niedokrwienie wywołane zatrzymaniem akcji serca zmieniało w podobny sposób obraz morfologiczny zakończeń nerwowych zarówno w próbkach tkanki pobranej z mózgu (Ryc. 12 A), jak i w izolowanej frakcji synaptosomalnej (Ryc. 12 B). W warunkach całkowitego niedokrwienia w porównaniu do kontroli w drastyczny sposób zmniejszała się ilość pęcherzyków synaptycznych, następowało pęcznienie mitochondriów prowadzące do ich uszkodzeń. Zaobserwowano przerwanie ciągłości zarówno zewnętrznej jak i wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz rozdęcia grzebieni mitochondrialnych.

#### **4.1.4 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczurów poddanych 10-cio minutowemu niedokrwieniu i trwającej 1 godzinę oraz 24 godziny reperfuzji po przywróceniu krążenia**

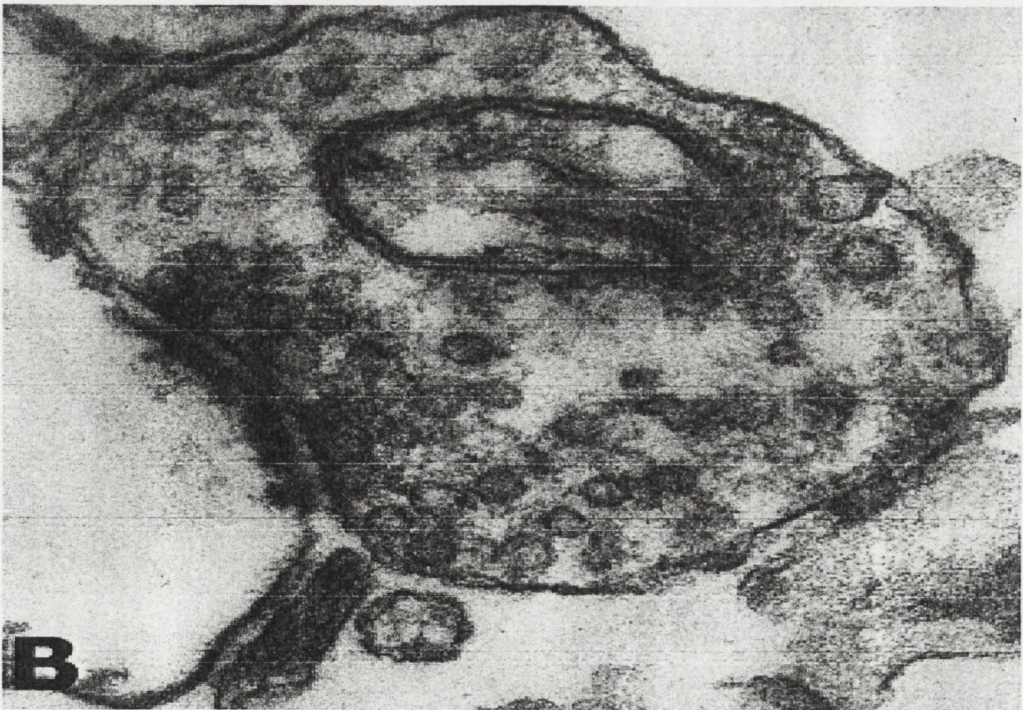
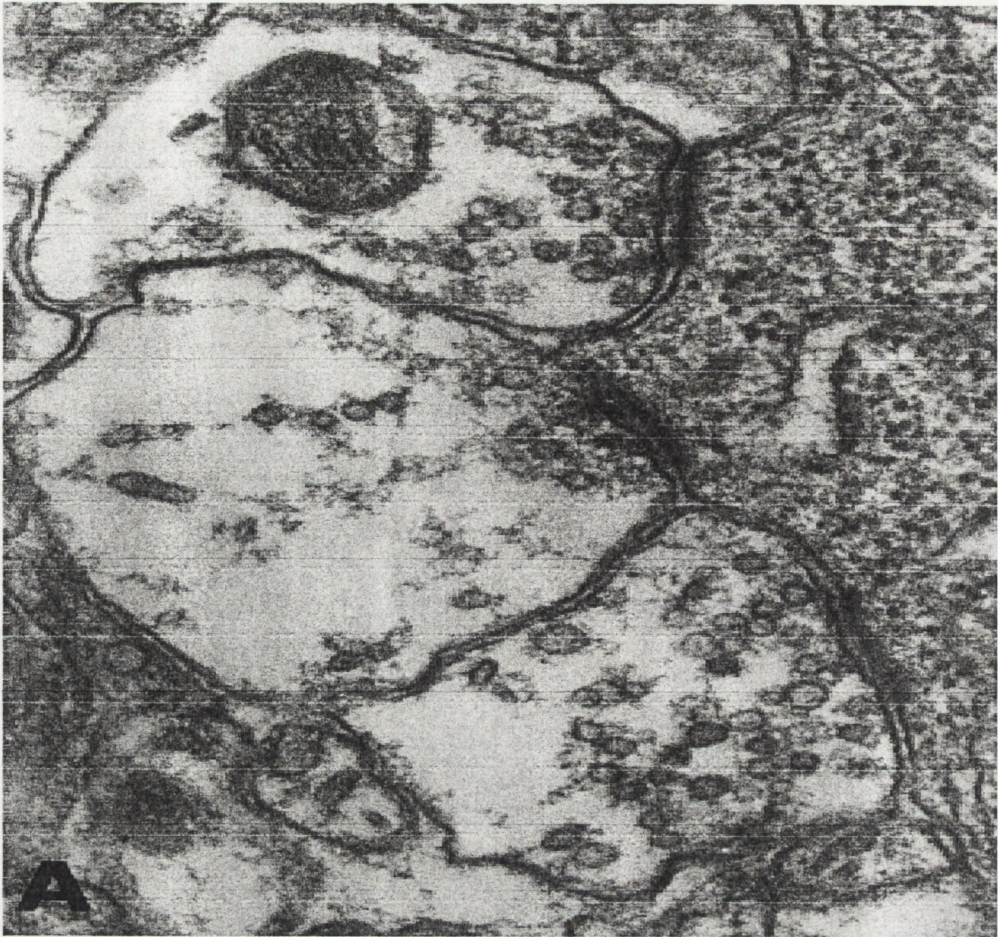
Zaobserwowane w mikroskopie elektronowym morfologiczne zmiany zakończeń nerwowych występujące po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu utrzymywały się w dalszym ciągu, a nawet w niewielkim stopniu pogłębiały po 1 godzinie (Ryc. 13 A, B) aby nieznacznie zmaleć po 24 godzinach (Ryc. 14 A, B) po przywróceniu krążenia.





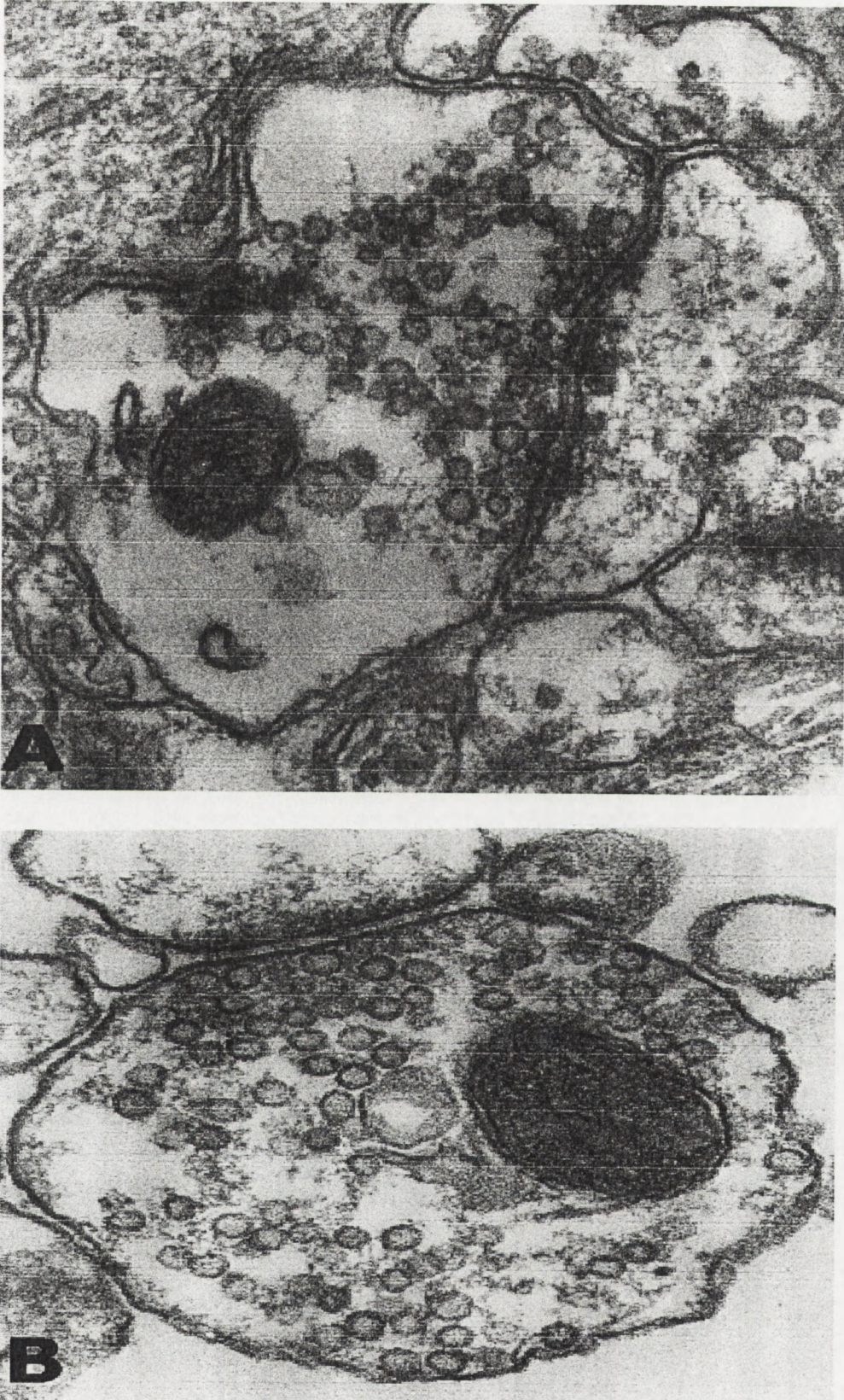
Ryc. 12. Obrazy mikroskopowo-elektronowe zakończeń nerwowych szczurów po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu. (A) - mózg, Pow. x 80 000; (B) - frakcja synaptosomalna, Pow. x 90 000.





Ryc. 13. Obrazy mikroskopowo-elektronowe zakończeń nerwowych otrzymanych ze szczurów przeżywających 1 godzinę po przywróceniu krążenia po przeżyciu 10-cio minutowego całkowitego niedokrwienia: (A) - mózg, Pow. x 80 000; (B) - frakcja synaptosomalna, Pow. x 80 000.





Ryc. 14. Obrazy mikroskopowo-elektronowe zakończeń nerwowych otrzymanych ze szczurów przeżywających 24 godziny po przywróceniu krążenia po przeżyciu 10-cio minutowego całkowitego niedokrwienia: (A) - mózg, Pow. x 80 000; (B) - frakcja synaptosomalna, Pow. x 80 000.



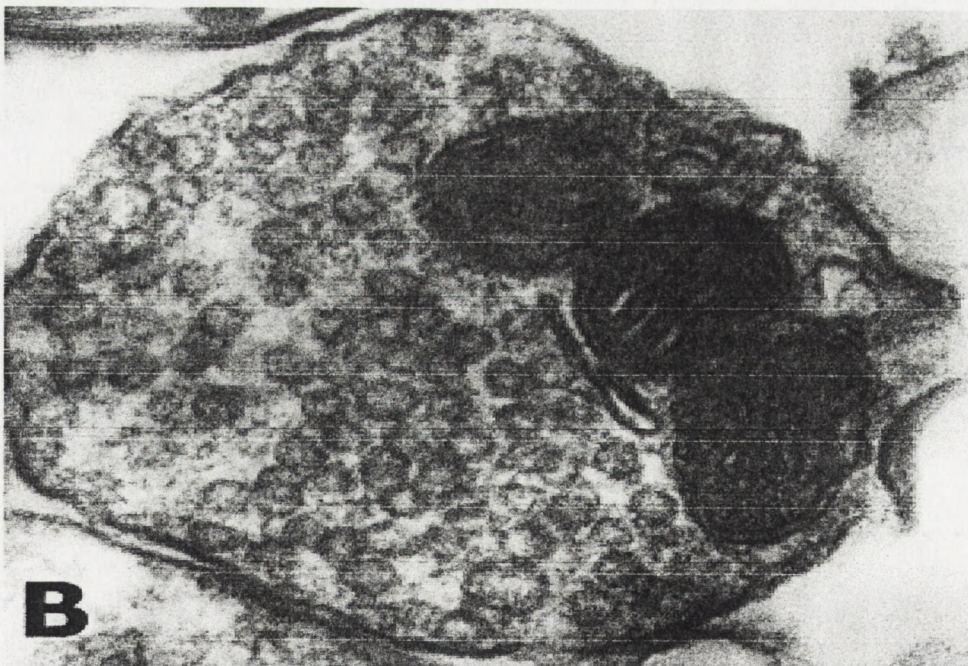
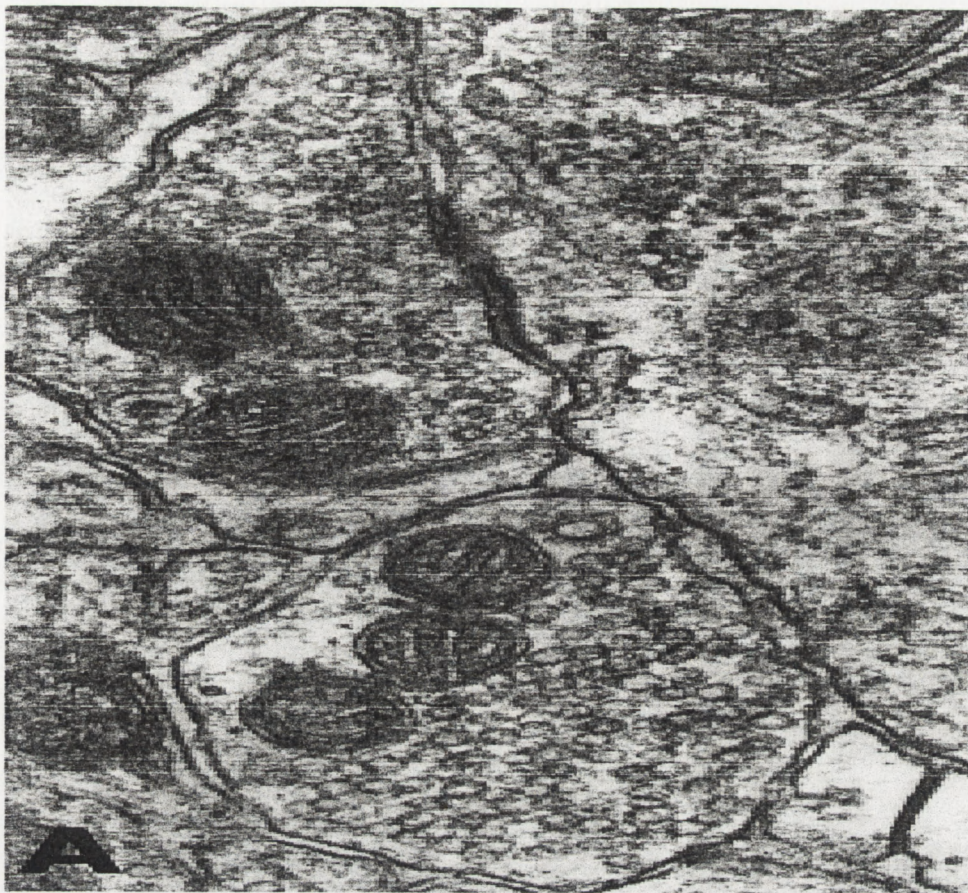
#### **4.1.5 Morfologiczny obraz frakcji synaptosomalnej i zakończeń nerwowych mózgu szczurów poddanych 10-cio minutowemu niedokrwieniu i trwającej 7 dni reperfuzji po przywróceniu krążenia**

Zmiany morfologiczne obserwowane po 10-cio minutowym niedokrwieniu oraz krótkich czasach po przywróceniu krążenia (1 godzina i 24 godziny) zanikały po 7 dniach od momentu przywrócenia krążenia, a obraz zakończeń nerwowych zarówno w mózgu (Ryc. 15 A), jak i we frakcji synaptosomalnej (Ryc. 15 B) przypominały obrazy kontrolne (Ryc. 10 A, B, Ryc. 11) i nie różniły się między sobą.

#### **4.1.6 Morfologiczne uszkodzenia neuronów w mózgu w obszarze hipokampa**

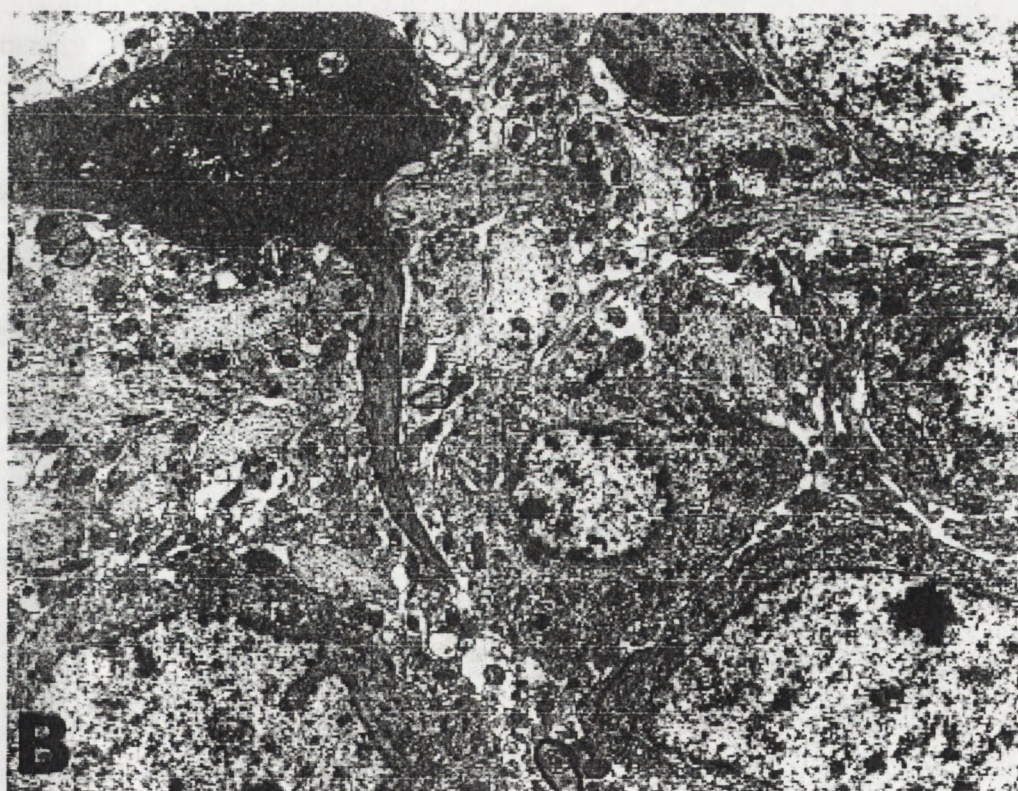
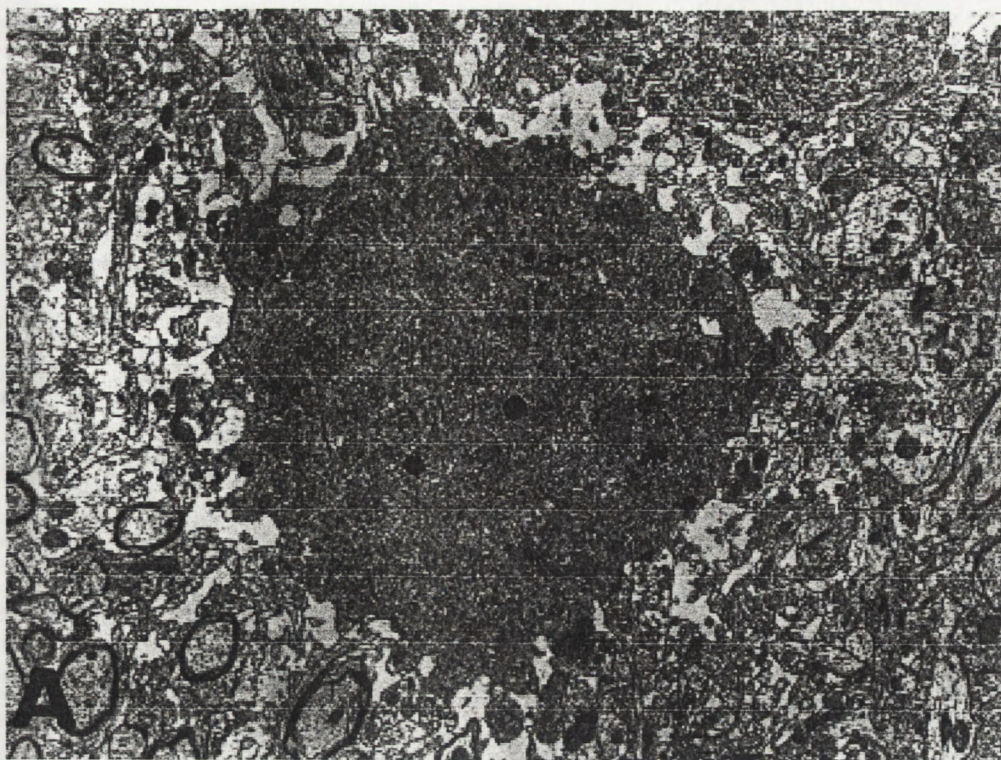
Prowadząc obserwacje zebranego materiału w mikroskopie elektronowym w grupach zwierząt z 24 godzinnym (Ryc. 16 A) i 7 dniowym czasem przeżycia (Ryc. 16 B) po 10 minutowej ischemii znaleziono w obszarze hipokampa uszkodzone neurony, które swym wyglądem przypominały tzw. "ciemne neurony". Komórki te posiadały jednorodną cytoplazmę, bez wyraźnie wyodrębnionego jądra komórkowego. Cytoplazma ta zawierała liczne, różnej wielkości lizosomy i wakuole. Obraz morfologiczny uszkodzonych komórek wskazywał na nekrotyczny typ śmierci. Ilość uszkodzonych neuronów w obszarze hipokampa wynosiła około  $2 \pm 0.4$  % wszystkich neuronów.





Ryc. 15. Obrazy mikroskopowo-elektronowe zakończeń nerwowych otrzymanych ze szczurów przeżywających 7 dni po przywróceniu krążenia po przeżyciu 10-cio minutowego całkowitego niedokrwienia: (A) - mózg, Pow. x 80 000; (B) - frakcja synaptosomalna, Pow. x 80 000.





Ryc. 16. Obrazy mikroskopowo-elektronowe uszkodzonych neuronów (tzw. ciemne neurony) w obszarze hipokampa mózgu szczurów przeżywających: (A) - 24 godziny po 10 minutowej ischemii, Pow. x 10 000; (B) - 7 dni po 10 minutowej ischemii, Pow. x 6 000.



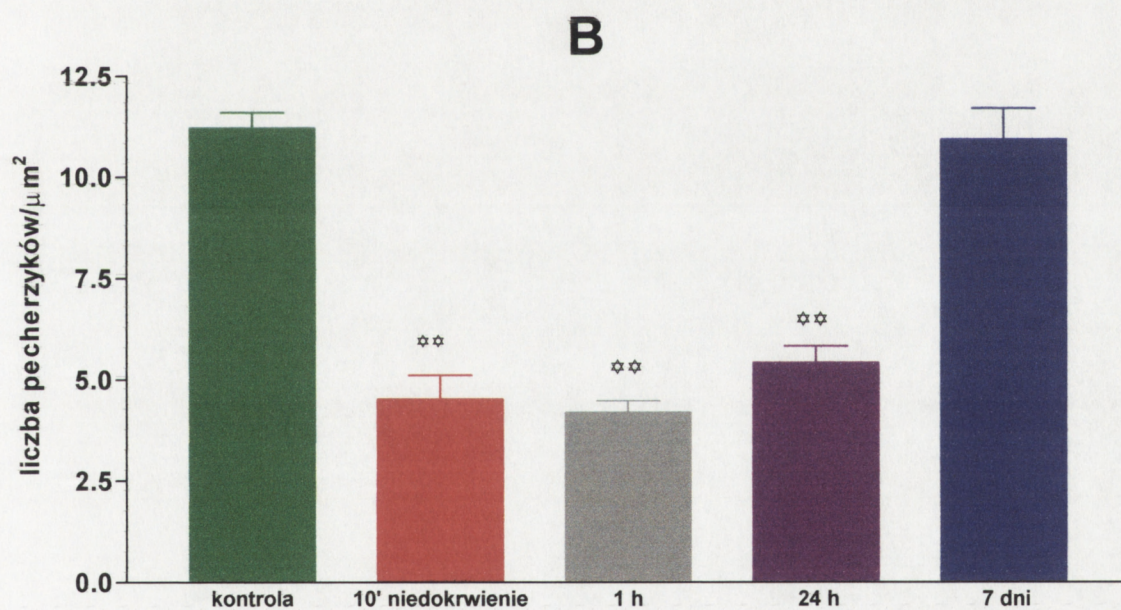
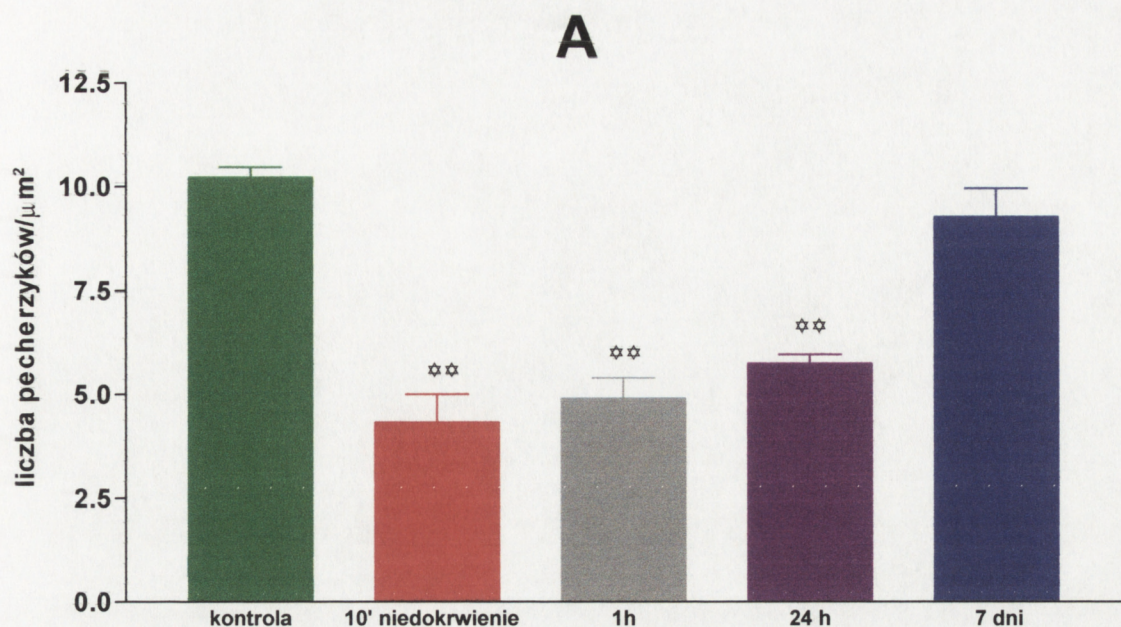
#### **4.2 Ocena morfometryczna obserwowanych uszkodzeń w zakończeniach nerwowych mózgu i frakcji synaptosomalnej w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych**

Zmiany morfologiczne uwidocznione na zdjęciach mikroskopowo-elektronowych poddano ilościowej analizie morfometrycznej. Przeanalizowano zarówno obrazy izolowanej frakcji synaptosomalnej, jak i obrazy zakończeń nerwowych w utrwalonym przez perfuzję mózgu. Morfometrycznej analizie poddano pęcherzyki synaptyczne i mitochondria znajdujące się we wnętrzu synaptosomów, struktury najbardziej wrażliwe na warunki niedokrwienia i warunki stresu oksydacyjnego po przywróceniu krążenia, a jednocześnie odpowiedzialne za utrzymanie równowagi energetycznej oraz metaboliczną i funkcjonalną integrację zakończeń nerwowych. Analiza morfometryczna nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy obrazami uzyskanymi z zakończeń nerwowych obserwowanych w mózgu (Ryc. 17 B i 18 B) i w izolowanych frakcjach synaptosomalnych (Ryc. 17 A i 18 A), w obrębie tej samej grupy doświadczalnej. Natomiast pomiar morfometryczny potwierdził drastyczną redukcję liczby pęcherzyków synaptycznych o około 60 % w synaptosomach w grupach po 10-cio minutowym niedokrwieniu i grupach z krótkimi czasami przeżycia po przywróceniu krążenia (1 godzina) w porównaniu do kontroli i to zarówno w synaptosomach w izolowanej frakcji (Ryc. 17 B), jak i w zakończeniach nerwowych obserwowanych w mózgu (Ryc. 17 A). Analiza morfometryczna uszkodzeń mitochondriów synaptycznych obserwowanych w mózgu (Ryc. 18 A), jak i w izolowanej frakcji synaptosomalnej (Ryc. 18 B) po 10-cio minutowym niedokrwieniu nie wykazała statystycznie znamienych różnic w stosunku do kontroli. Natomiast po 1 godzinie i po 24 godzinach po przywróceniu krążenia zaobserwowano w synaptosomach około 50% wzrost uszkodzonych mitochondriów przy jednoczesnym około 50% obniżeniu liczby nieuszkodzonych mitochondriów w badanych synaptosomach. Po 7



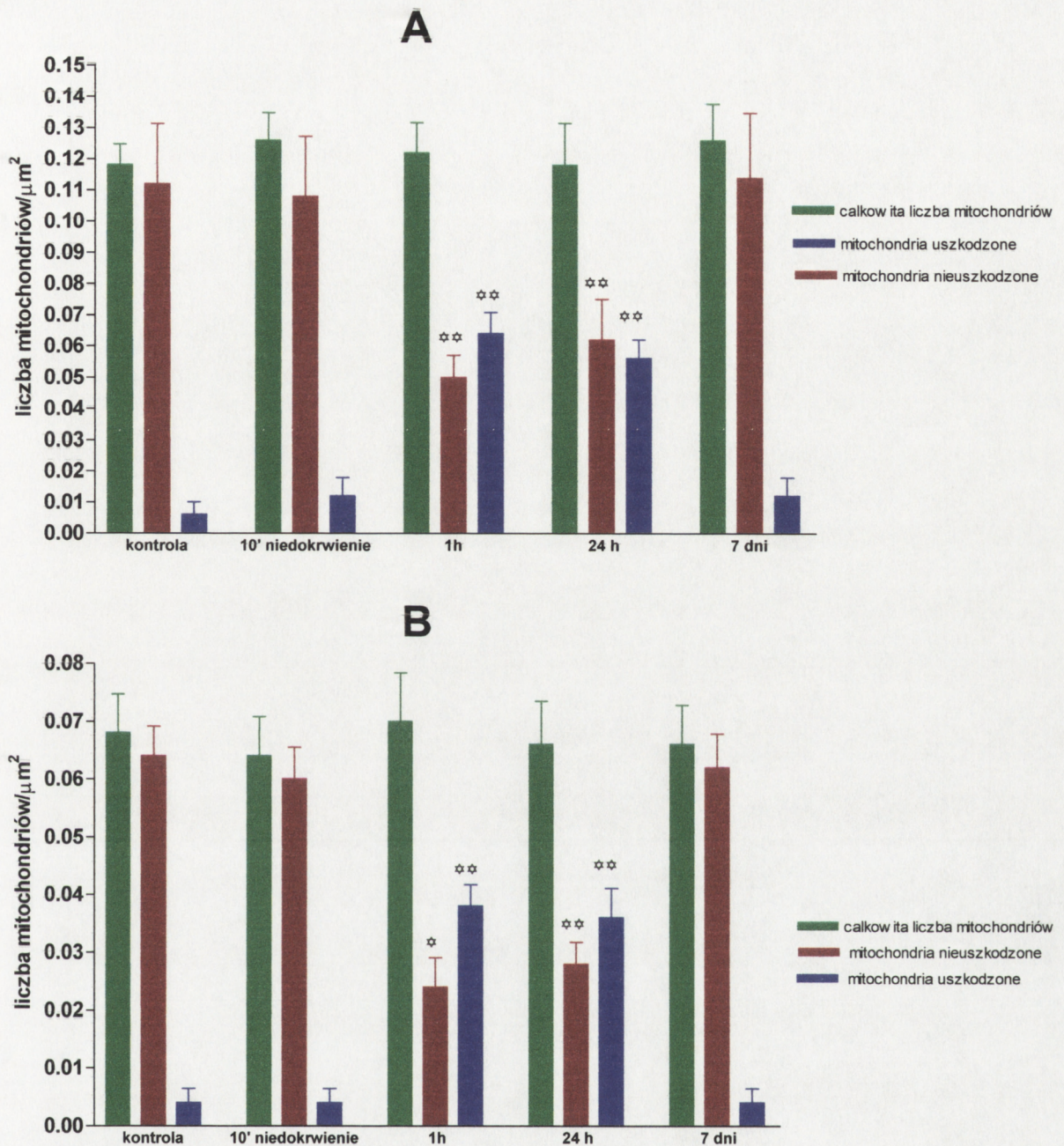
dniach przeżycia po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu stosunek uszkodzonych mitochondriów do mitochondriów o prawidłowej morfologii był zbliżony do obserwowanego w grupie zwierząt kontrolnych. Nie wykazywał statystycznie znamiennych różnic w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 18).





**Ryc. 17.** Analiza morfometryczna liczby pęcherzyków synaptycznych obserwowanych w zakończeniach nerwowych w mózgu (A) i w izolowanej frakcji synaptosomalnej (B). Dane są przedstawione jako średnie  $\pm$  SD dla 50-ciu losowo wybranych elektronogramów. \*\*  $P < 0,01$ . [(1h, 24h, 7 dni) - reperfuzji po przywróceniu krążenia]





**Ryc. 18.** Analiza morfometryczna zmian morfologicznych obserwowanych w mitochondriach w zakończeniach nerwowych w mózgu (A) i w izolowanej frakcji synaptosomalnej (B). Wartości przedstawiają średnie  $\pm$  SD dla 50-ciu losowo wybranych elektronogramów. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . [(1h, 24h, 7 dni) - reperfuzji po przywróceniu krążenia]



**PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej zmian morfologicznych**

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano:

1. Izolowana frakcja synaptosomalna charakteryzuje się dużą czystością i integralnością, a struktura synaptosomów nie odbiega od obrazu zakończeń nerwowych obserwowanych w mózgu. Również zmiany morfologiczne w zakończeniach nerwowych wywołane niedokrwieniem i warunkami panującymi we wczesnych i późnych okresach po przywróceniu krążenia we frakcji synaptosomalnej i porównawczo w mózgu nie wykazują różnic w obrębie tych samych grup doświadczalnych.
2. Całkowite 10-cio minutowe niedokrwienie oraz warunki panujące we wczesnych (1 godzina i 24 godziny) okresach po przywróceniu krążenia powodują drastyczne zmniejszenie liczby pęcherzyków synaptycznych. W grupach doświadczalnych z 1 i 24 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia obserwuje się także znaczne uszkodzenia w mitochondriach synaptycznych.
3. Zmiany wywołane niedokrwieniem i warunkami panującymi we wczesnych okresach po przywróceniu krążenia zarówno dotyczące liczby pęcherzyków synaptycznych jak i uszkodzeń mitochondriów zawartych w synaptosomach normalizują się po 7 dniach reperfuzji po przywróceniu krążenia.



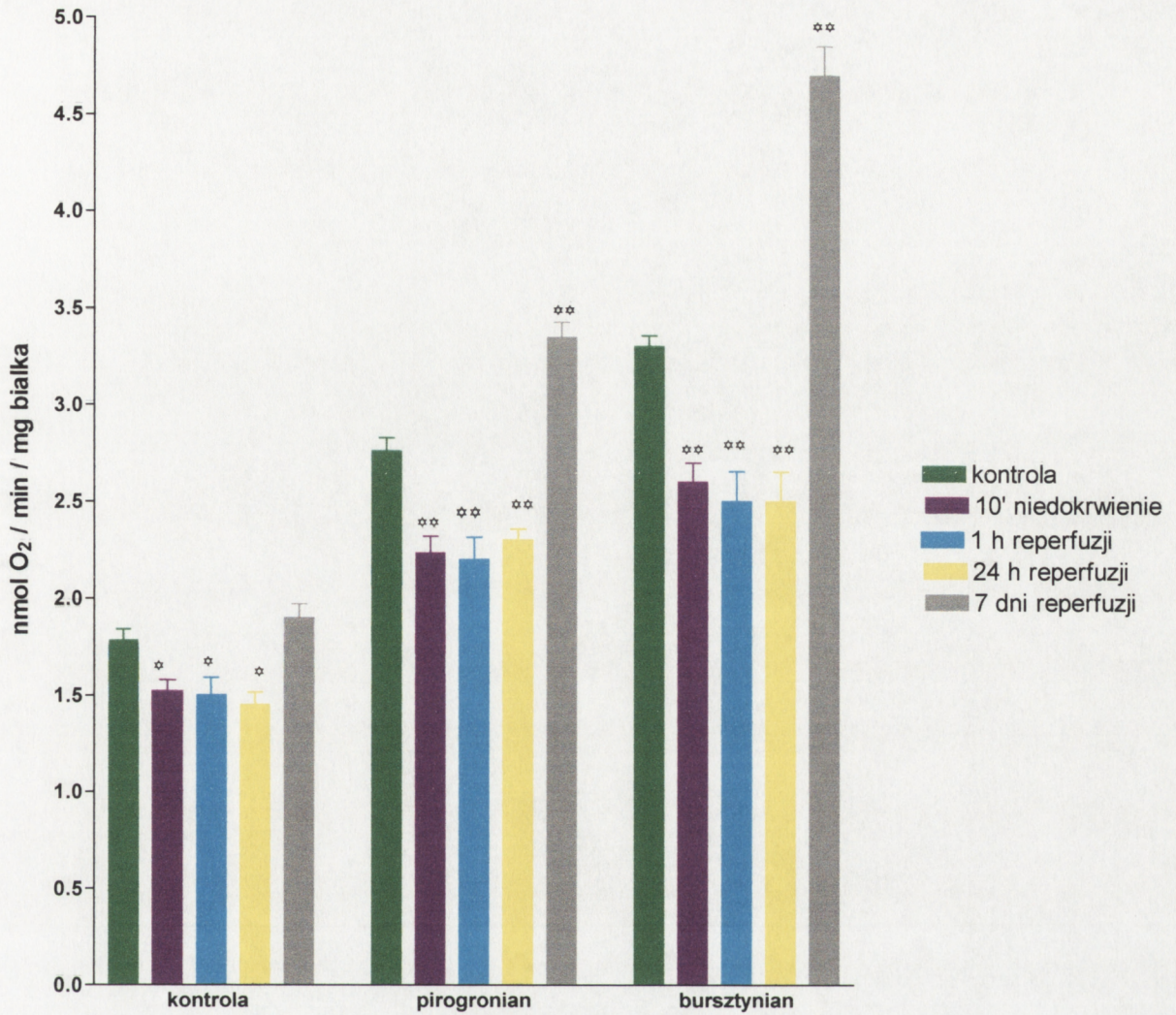
#### **4.3 Wpływ całkowitego niedokrwienia oraz warunków wczesnych i późnych okresów po przywróceniu krążenia na metabolizm energetyczny zakończeń nerwowych**

Zmiany morfologiczne w synaptosomach i zawartych w nich mitochondriach otrzymanych ze szczurów po 10-cio minutowym niedokrwieniu i różnych czasach po przywróceniu krążenia sugerowały możliwość zaburzeń prawidłowego funkcjonowania mitochondriów synaptycznych a więc możliwość zmian w oddychaniu tkankowym i związanym z nim metabolizmie energetycznym zakończeń nerwowych.

##### **4.3.1 Wpływ całkowitego niedokrwienia i warunków różnych okresów po przywróceniu krążenia na oddychanie synaptosomów**

Postanowiono sprawdzić czy badane warunki patologiczne wpływają na oddychanie tkankowe zawartych w zakończeniach nerwowych mitochondriów synaptycznych. Wykazano, że pobieranie tlenu przez synaptosomy izolowane z mózgow zwierząt po przebytych 10-cio minutowym niedokrwieniu było o około 20 % niższe niż w przypadku synaptosomów kontrolnych. Podobny efekt był obserwowany po 1 godzinie i po 24 godzinach po przywróceniu krążenia. Natomiast pobieranie tlenu przez synaptosomy po 7 dniach od przebytej śmierci klinicznej powracało całkowicie do wartości kontrolnych a ponadto w przypadku dodania egzogennych substratów oddechowych przewyższało nawet wartości kontrolne zarówno w przypadku pirogronianu jak i bursztynianu (Ryc.19).





**Ryc. 19.** Zużycie tlenu przez synaptosomy izolowane z mózgow zwierząt kontrolnych, po 10-cio minutowym niedokrwieniu i różnym czasie po przywróceniu krążenia w obecności egzogennych substratów (pirogronianu i bursztynianu). Wartości przedstawiają średnie  $\pm$  SD z siedmiu niezależnych doświadczeń. Różnice pomiędzy wartościami kontrolnymi i badanymi statystycznie znamienne, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . [(1h, 24h, 7 dni) - reperfuzji po przywróceniu krążenia]



#### **4.3.2 Wpływ całkowitego niedokrwienia i warunków panujących we wczesnych i późnych okresach po przywróceniu krążenia na poziom metabolitów energetycznych w synaptosomach**

Z uzyskanych danych ( Tabela 1) wynika, że po 10-cio minutowym niedokrwieniu oraz we wczesnych okresach (1 godzina i 24 godziny) po przywróceniu krążenia po przebytej śmierci klinicznej występuje statystycznie znaczne obniżenie poziomu ATP. Największe obniżenie poziomu ATP obserwuje się w II grupie zwierząt doświadczalnych, zaraz po 10-cio minutowym niedokrwieniu (około 30 %) w stosunku do kontroli. Po 1 godzinie i po 24 godzinach po przywróceniu krążenia poziom ATP jest nadal obniżony w stosunku do wartości kontrolnych, jednakże są to mniejsze różnice. Również poziom CrP obniża się po 10-cio minutowym zatrzymaniu krążenia i po okresie 1 godziny po przywróceniu krążenia. Obniżenie poziomu CrP po 24 godzinach po przywróceniu krążenia jest już statystycznie nieistotne.

Obniżeniu poziomów ATP i CrP po 10-cio minutowym niedokrwieniu i we wczesnych czasach po przywróceniu krążenia towarzyszy wzrost poziomów ADP i Cr. Natomiast po 7 dniach od momentu przywrócenia krążenia po 10-cio minutowym niedokrwieniu poziomy wszystkich badanych metabolitów energetycznych powracają do wartości kontrolnych.



Tabela 1

Poziom związków energetycznych w synaptosomach izolowanych z mózgow szczurów kontrolnych, po 10 min ischemii i w różnym czasie po przywróceniu krążenia.

(nmol / mg białka)					
	Kontrola (4)	10 min niedokrwienie (3)	1 h reperfuzji (4)	24 h reperfuzji (4)	7 dni reperfuzji (4)
ATP	14.78 ± 2.20	10.34 ± 0.90 **	11.73 ± 1.02 **	13.49 ± 1.17 *	14.41 ± 1.19
CrP	11.67 ± 1.63	8.88 ± 1.51 **	9.51 ± 1.90 *	10.07 ± 2.07	11.57 ± 2.08
ADP	1.33 ± 0.12	1.53 ± 0.21 *	1.53 ± 0.19 *	1.44 ± 0.18	1.33 ± 0.18
Cr	8.90 ± 0.98	12.40 ± 1.48 **	11.16 ± 2.34 **	9.63 ± 1.83	9.00 ± 1.17
<b>ATP/ADP</b>	<b>11.11</b>	<b>6.76 **</b>	<b>7.67 **</b>	<b>9.37 *</b>	<b>10.83</b>
<b>CrP/Cr</b>	<b>1.31</b>	<b>0.72 **</b>	<b>0.85 **</b>	<b>1.05</b>	<b>1.29</b>

Dane prezentują średnie wartości ± SD liczone z liczby doświadczeń podanej w nawiasach,

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



## **PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej zmian w metabolizmie energetycznym synaptosomów**

Zmiany morfologiczne synaptosomów i zawartych w nich mitochondriów synaptycznych opisane w poprzednim rozdziale mają swoje odzwierciedlenie w ich metabolizmie energetycznym.

1. Trwające 10 minut całkowite niedokrwienie oraz warunki panujące we wczesnych okresach po przywróceniu krążenia (1 godzina i 24 godziny) zmniejszają pobieranie tlenu przez synaptosomy
2. Zatrzymanie krążenia i warunki panujące we wczesnych okresach po jego przywróceniu (1 godzina, 24 godziny) obniżają poziomy ATP CrP z jednocześnie towarzyszącym podwyższeniem poziomów ADP i Cr.
3. Obserwowane zmniejszenie pobierania tlenu przez synaptosomy i związane z tym obniżenie poziomów ATP i CrP w niedokrwieniu i wczesnych okresach po przywróceniu krążenia powracają do wartości kontrolnych po 7 dniach od momentu reperfuzji.



#### **4.4 Neurotransmisja w całkowitym niedokrwieniu oraz wczesnych i późnych okresach po przywróceniu krążenia**

Opisane we wcześniejszych rozdziałach wyniki dotyczące zmian morfologicznych w synaptosomach i mitochondriach synaptycznych z jednoczesnym zaburzeniem energetyki synaptosomów nasuwały pytanie: czy i w jaki sposób całkowite niedokrwienie oraz pojawiający się po przywróceniu krążenia stres oksydacyjny wpływają na podstawową energozależną funkcję zakończeń nerwowych – neurotransmisję.

Aby wykazać czy i na ile niedokrwienie i przywrócenie krążenia może wpływać na transmisję synaptyczną, zbadano procesy wychwytu i uwalniania dopaminy i GABA oraz kinetykę specyficznych dla nich receptorów, dopaminowego  $D_2$  i GABAergicznego  $GABA_B$ .

##### **4.4.1 Transport dopaminy w synaptosomach kontrolnych i otrzymanych ze zwierząt po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu oraz po niedokrwieniu i 1 godzinnym, 24 godzinnym i 7 dniowym okresie po przywróceniu krążenia**

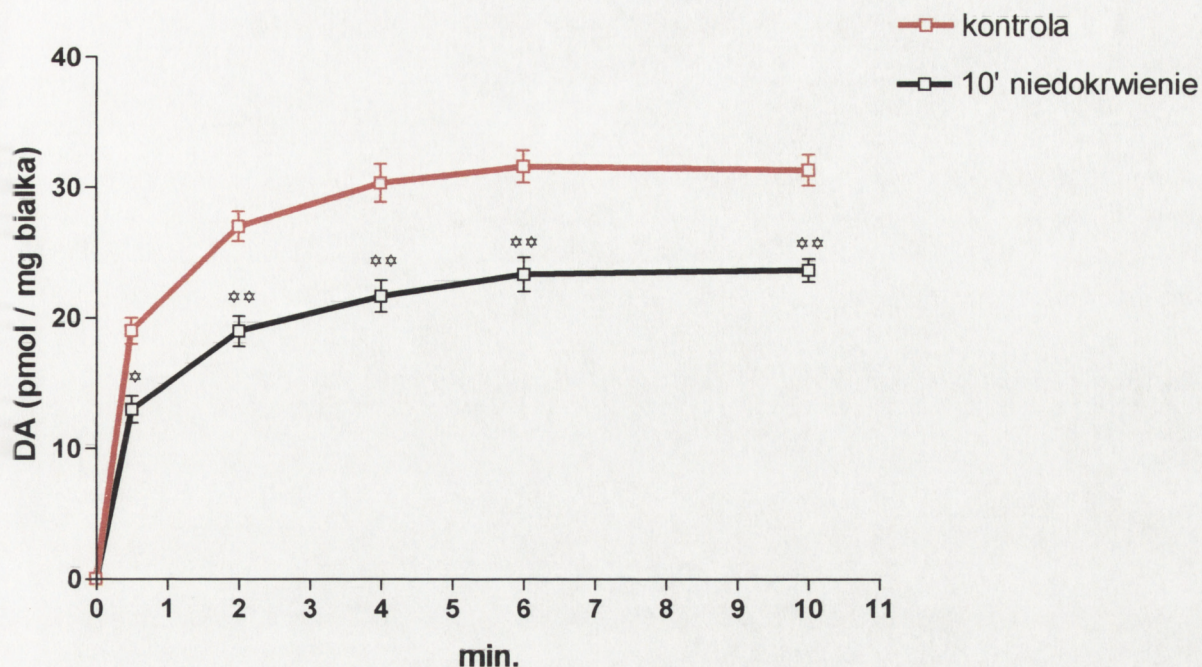
W celu oceny transportu dopaminy w warunkach kontrolnych i patologicznych badano wychwyty (uptake) i uwalnianie (release) tego neuroprzekaźnika przez synaptosomy oraz wrażliwość receptora dopaminowego  $D_2$ .



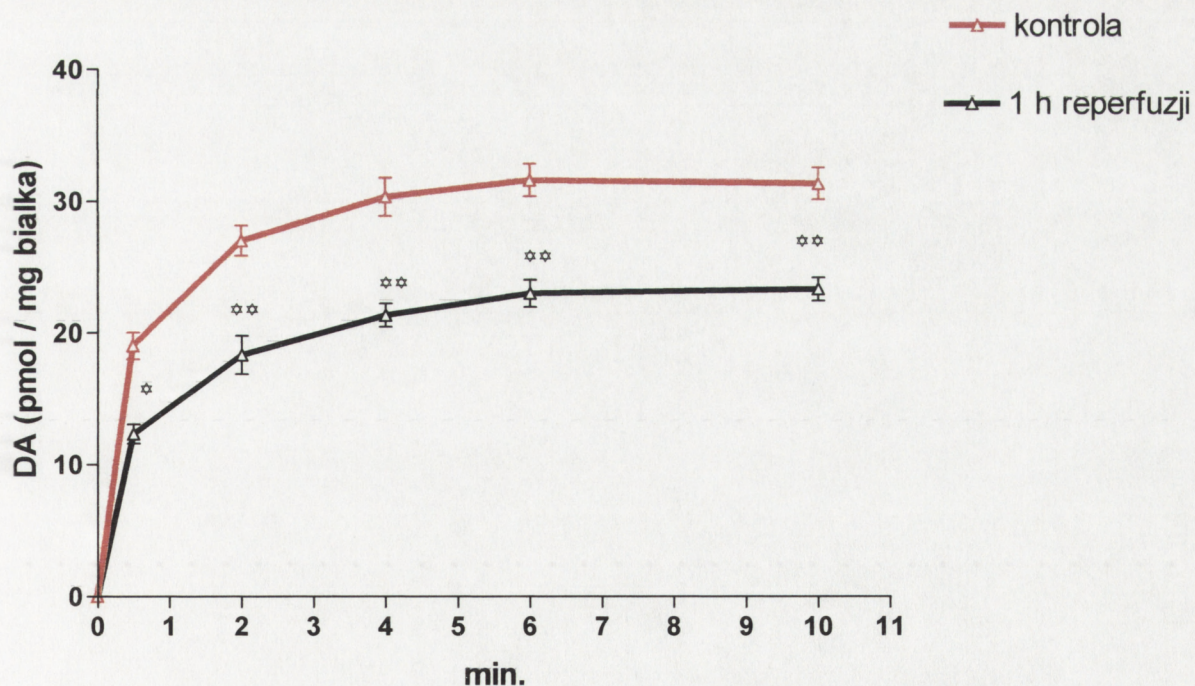
#### 4.4.1.1 Wychwyt dopaminy przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych

Pobieranie dopaminy przez synaptosomy otrzymane ze zwierząt kontrolnych narastało w miarę wydłużania czasu inkubacji osiągając wartość maksymalną 30 pmoli DA / mg białka w 6 minucie pomiaru (Ryc. 20). Podobną, narastającą w czasie, tendencję akumulacji dopaminy obserwowano również w pozostałych grupach doświadczalnych. Ilość neuroprzekaznika wychwytywanego przez synaptosomy uzyskane ze zwierząt po przeżyciu 10-cio minutowego niedokrwienia była o około 25 % niższa w stosunku do grupy kontrolnej (Ryc. 20). Synaptosomy otrzymane ze zwierząt po 1 godzinie (Ryc. 21) i 24 godzinach po przywróceniu krążenia (Ryc. 22) po 10-cio minutowym niedokrwieniu wykazywały również około 27 % obniżenie wartości pobieranej dopaminy w stosunku do kontroli. Jednakże po 7 dniach przeżycia po przywróceniu krążenia po epizodzie niedokrwieniowym ilość pobieranej przez synaptosomy dopaminy była zbliżona do wartości kontrolnych (Ryc. 23).



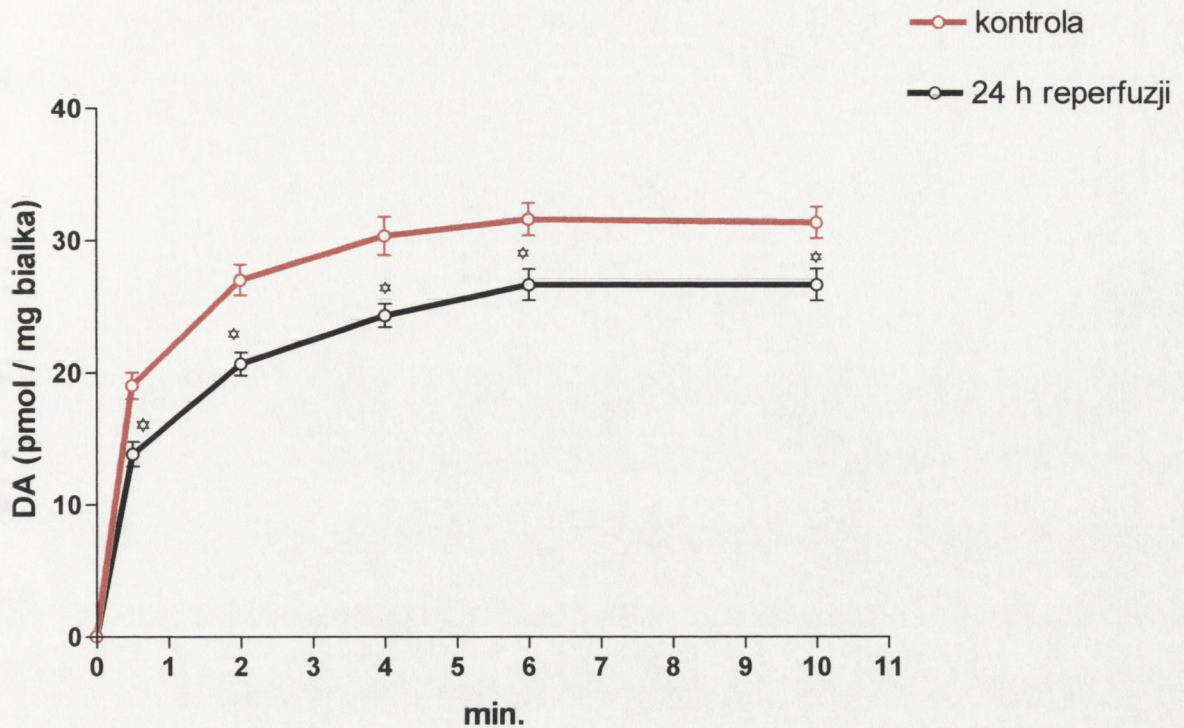


Ryc. 20. Wychwyt dopaminy przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych i po 10-cio minutowym niedokrwieniu. Wartości są średnimi  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

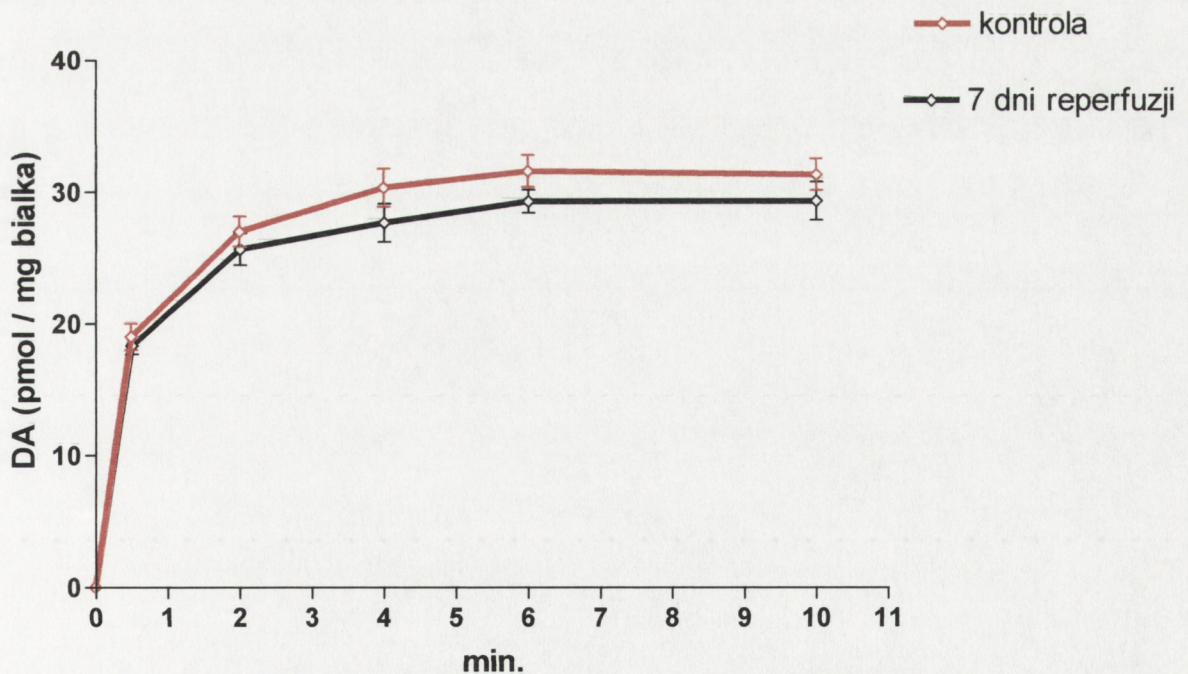


Ryc. 21. Wychwyt dopaminy przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 1 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia. Wartości są średnimi  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .





**Ryc. 22.** Wychwyt dopaminy przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 24 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia. Wartości są średnimi  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \* $P < 0,05$ .



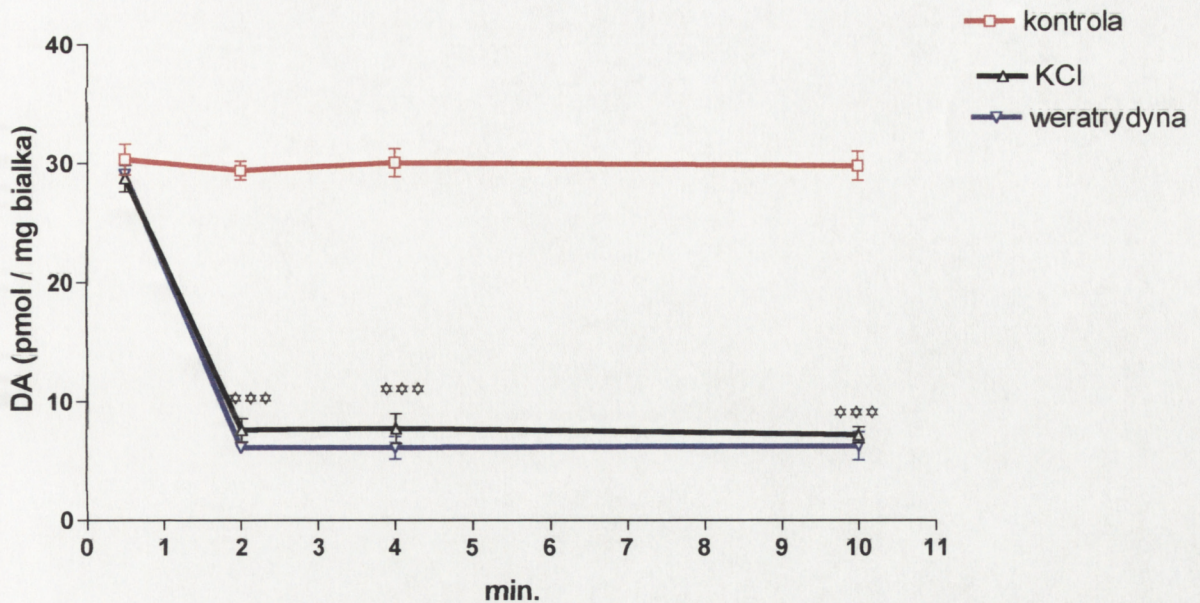
**Ryc. 23.** Wychwyt dopaminy przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 7 dniowym czasem reperfuzji po 10-cio minutowym niedokrwieniu. Wartości są średnimi  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach.



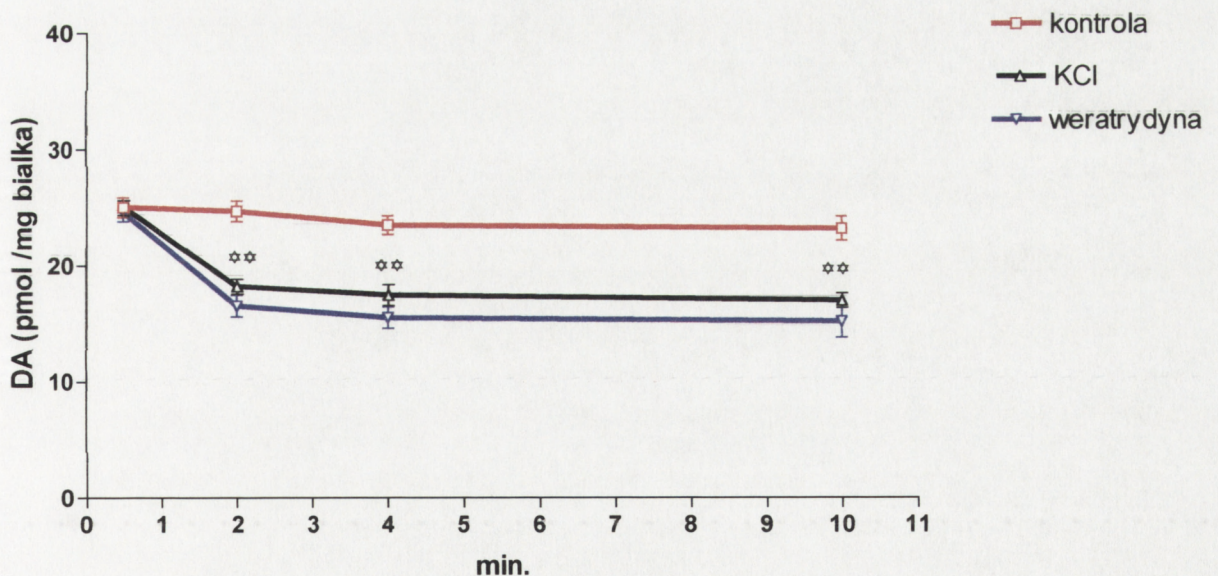
#### 4.4.1.2 Uwalnianie dopaminy przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych

W badaniach nie zaobserwowano statystycznie znamiennego samoistnego uwalniania dopaminy z synaptosomów w warunkach braku czynników depolaryzujących we wszystkich grupach doświadczalnych (Ryc. 24, 25, 26, 27, 28). W przypadku synaptosomów otrzymanych ze zwierząt kontrolnych depolaryzacja błon przy użyciu zarówno 50 mM KCl jak i 40 $\mu$ M weratrydyny powodowała uwalnianie zakumulowanej w synoptosomach dopaminy w około 75% w przypadku synaptosomów kontrolnych (Ryc. 24). Synaptosomy otrzymane ze zwierząt po 10-cio minutowym niedokrwieniu wykazywały zmniejszenie uwalniania dopaminy w stosunku do synaptosomów kontrolnych o około 70 % zarówno w przypadku depolaryzacji 50 mM KCl jak i przy użyciu weratrydyny (Ryc.25). Ta znacznie zmniejszona możliwość uwalniania dopaminy utrzymywała się również po 1 godzinie (Ryc.26), po 24 godzinach (Ryc. 27) i po 7 dniach (Ryc. 28) po przywróceniu krążenia **bez tendencji powrotu do wartości kontrolnych.**



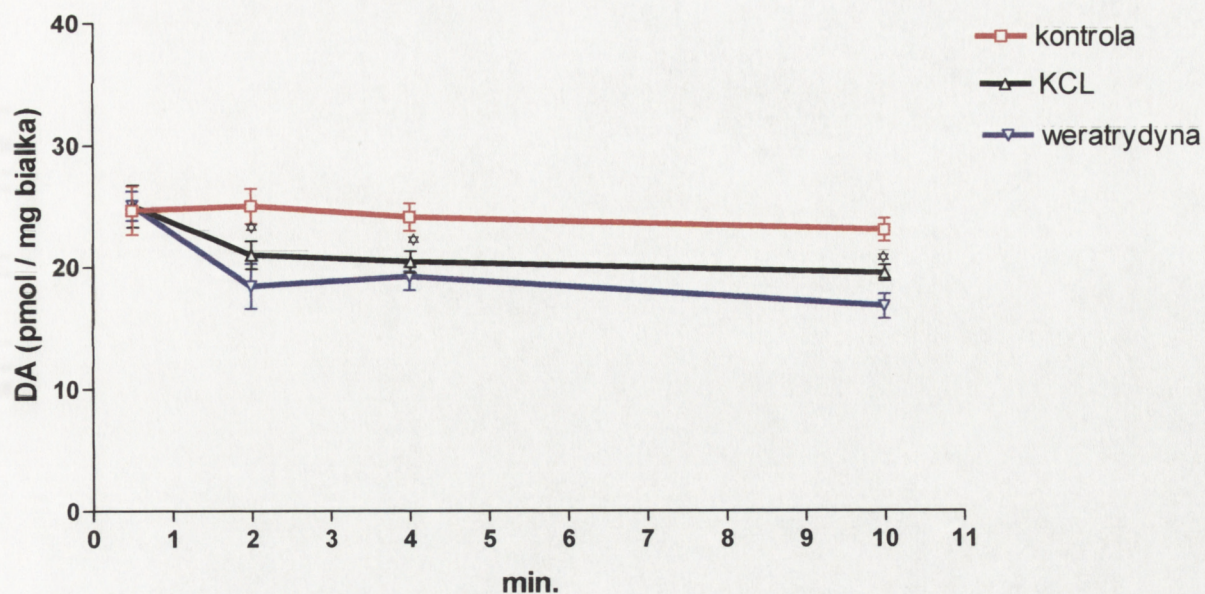


**Ryc. 24.** Uwalnianie dopaminy z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów kontrolnych bez czynników depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*\*\* $P < 0,001$ .

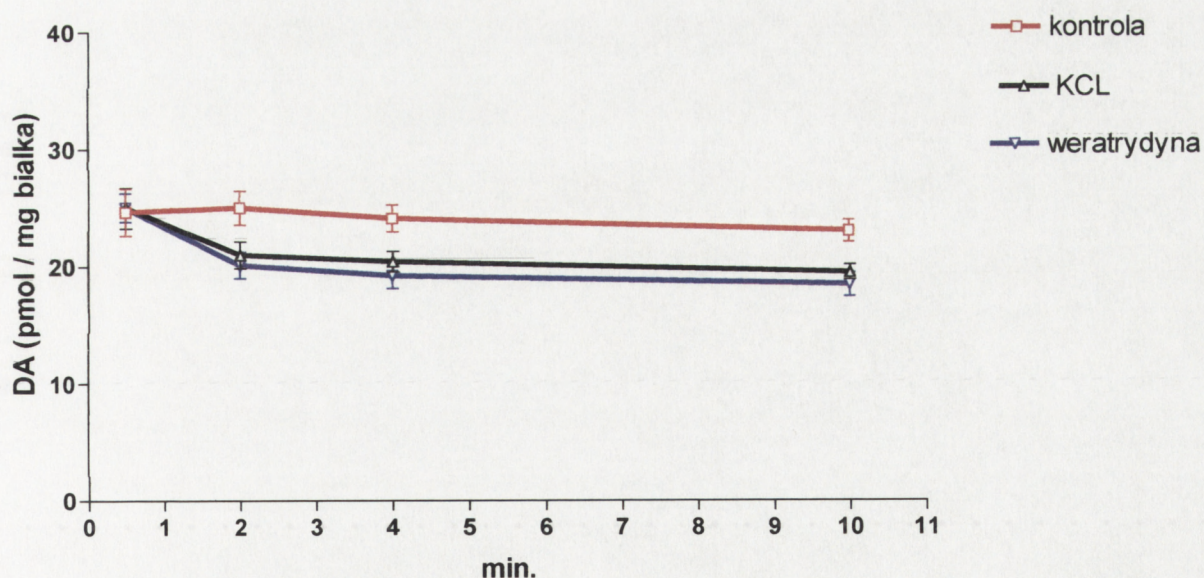


**Ryc. 25.** Uwalnianie dopaminy z synaptosomów otrzymanych ze szczurów po 10-cio minutowym niedokrwieniu bez czynników depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*\* $P < 0,01$ .



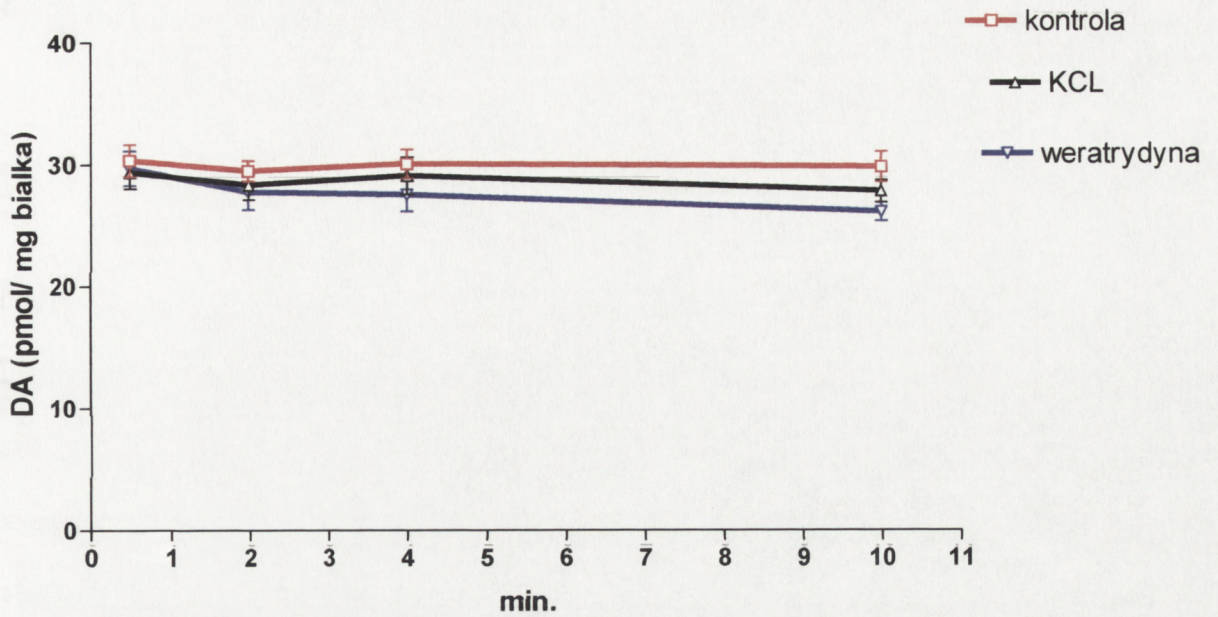


**Ryc. 26.** Uwalnianie dopaminy z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 1 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia bez czynników depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*,  $P < 0,05$ .



**Ryc. 27.** Uwalnianie dopaminy z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 24 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia bez czynników depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach.





**Ryc. 28.** Uwalnianie dopaminy z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 7 dniowym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia bez czynników depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach.



#### 4.4.1.3 Wpływ zatrzymania krążenia oraz warunków wczesnych i późnych okresów po jego przywróceniu na kinetykę receptora dopaminowego D<sub>2</sub>

Nie zaobserwowano zmian w kinetyce receptora dopaminowego D<sub>2</sub> zaraz po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu. Parametry kinetyczne receptora K<sub>D</sub> (powinowactwo ligandu do receptora) i B<sub>max</sub> (ilość receptorowych miejsc wiążących) w tym czasie nie różniły się od wartości kontrolnych. Dopiero w warunkach po przywróceniu krążenia (1 godzina ) wartości K<sub>D</sub> i B<sub>max</sub> zmniejszyły się, jednakże nie były to różnice statystycznie znamienne w stosunku do kontroli. Natomiast 24 godziny po przywróceniu krążenia zaobserwowano obniżenie wartości K<sub>D</sub> o około 40 %, a B<sub>max</sub> o około 50 % w stosunku do kontroli, które utrzymywało się po 7 dniach od przywrócenia krążenia **bez żadnych tendencji powrotu do wartości kontrolnych**. Szczegółowe wartości parametrów kinetycznych receptora dopaminowego D<sub>2</sub> dla kontroli i badanych warunków patologicznych przedstawiono w tabeli 2.



Tabela 2

Kinetyczne parametry wiązania [<sup>3</sup>H]spiperonu do receptora dopaminowego D<sub>2</sub> w prążkowie mózgu szczura po 10 minutowym niedokrwieniu i w różnych okresach po przywróceniu krążenia.

Próba	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (fmole/ mg tkanki)
Kontrola	1,08 ± 0,1	74,3 ± 12,0
10 min niedokrwienie	1,24 ± 0,2	76,5 ± 9,7
10 min niedokrwienie + 1 h reperfuzji	0,95 ± 0,2	60,2 ± 6,5
10 min niedokrwienie + 24 h reperfuzji	0,67 ± 0,2*	37,0 ± 5,6*
10 min niedokrwienie + 7 dni reperfuzji	0,64 ± 0,1*	31,5 ± 5,3*

Dane reprezentują średnie ± SD z 6 niezależnych doświadczeń; różnice znamienne statystycznie \*P < 0,05.



**PODSUMOWANIE** części pracy dotyczącej neurotransmisji dopaminergicznej w warunkach kontrolnych, całkowitym niedokrwieniu i w różnych czasach po przywróceniu krążenia.

1. Wykazano, że całkowite 10-cio minutowe niedokrwienie oraz warunki wczesnych okresów po przywróceniu krążenia (1godzina, 24 godziny) zmniejszają wychwyt dopaminy przez synaptosomy, natomiast po dłuższym czasie od momentu przywrócenia krążenia (7dni) ilość wychwytywanej dopaminy powracała do poziomów kontrolnych.
2. W warunkach niedokrwieniowych oraz po przywróceniu krążenia zmniejsza się istotnie uwalnianie dopaminy z synaptosomów i nie obserwuje się powrotu do wartości kontrolnych po 7 dniach po przywróceniu krążenia.
3. Bezpośrednio po 10-cio minutowym niedokrwieniu nie obserwowano zmian parametrów kinetycznych receptora dopaminowego  $D_2$ . Przywrócenie krążenia (po 1 godzinie) zmniejsza wartość  $K_D$  (świadczy to o wzroście powinowactwa ligandu do receptora), oraz zmniejsza wartość  $B_{max}$  (zmniejsza się liczba miejsc wiążących). Zmiany te pogłębiają się znacznie po 24 godzinach i po 7 dniach bez jakichkolwiek tendencji powrotu do wartości kontrolnych.



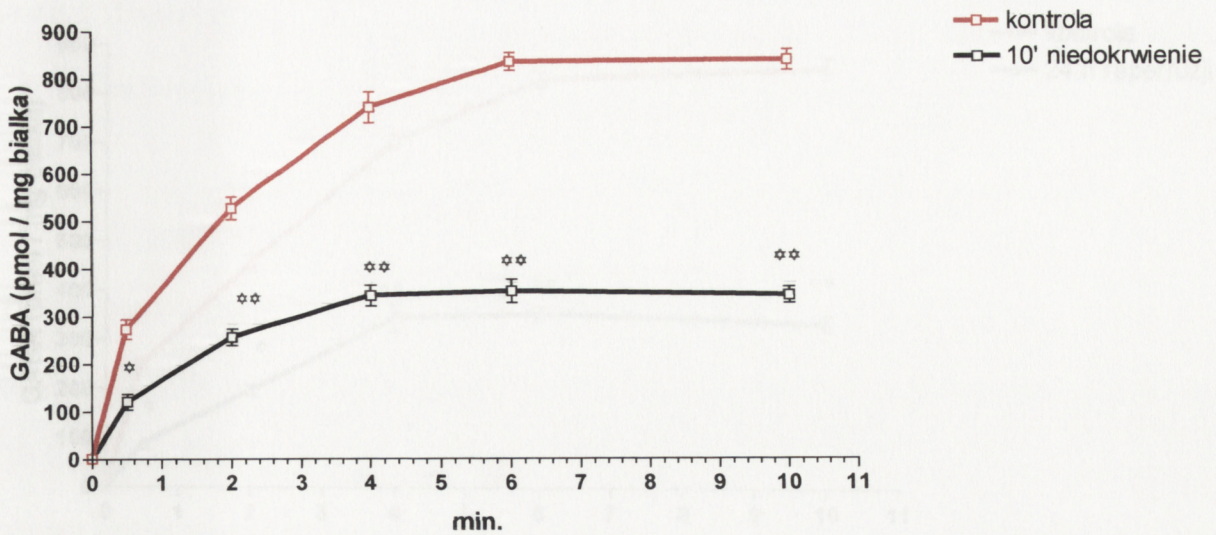
#### **4.4.2 Transport GABA w synaptosomach kontrolnych i otrzymanych ze zwierząt po 10-cio minutowym całkowitym niedokrwieniu oraz po niedokrwieniu i 1 godzinnym, 24 godzinnym i 7 dniowym okresie po przywróceniu krążenia**

Podobnie jak w przypadku dopaminy starano się ocenić transport GABA w synaptosomach w warunkach kontrolnych i patologicznych badając wychwyty i uwalnianie tego neuroprzekaźnika oraz parametry kinetyczne receptora GABA<sub>B</sub>-ergicznego.

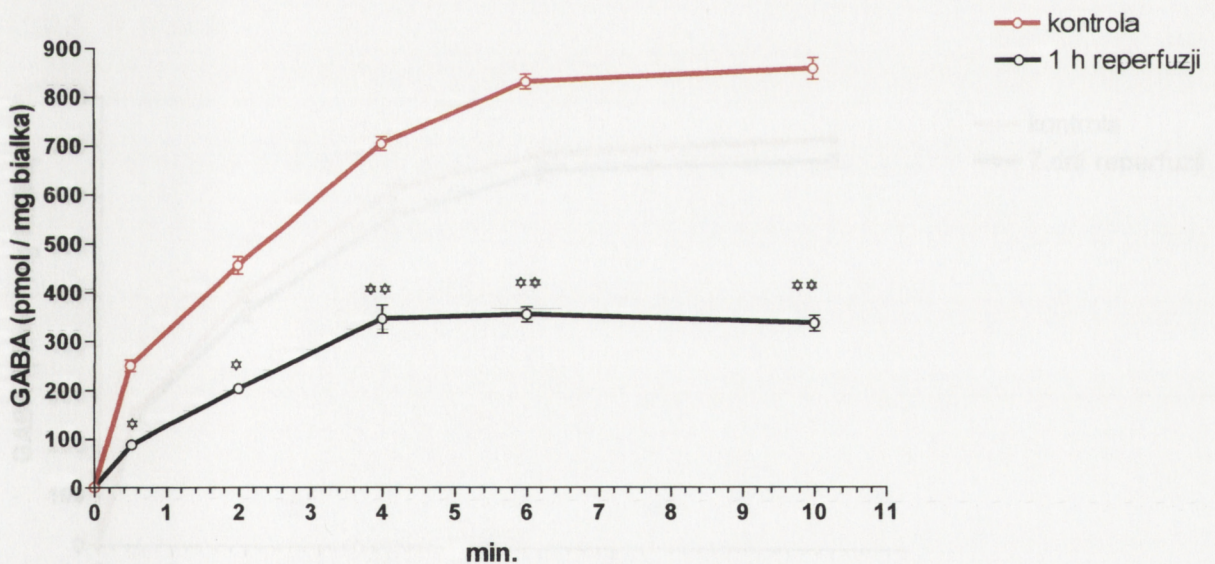
##### **4.4.2.1 Wychwyty GABA przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych**

Wychwyty GABA przez synaptosomy kontrolne zwiększały się w czasie osiągając wartość maksymalną około 850 pmoli / mg białka w 6 minucie inkubacji (Ryc. 29). Narastanie w czasie inkubacji akumulacji GABA w synaptosomach obserwowano również w pozostałych grupach doświadczalnych, ale na znacznie niższym poziomie. W synaptosomach otrzymanych ze zwierząt po 10-cio minutowym niedokrwieniu obserwowano około 65 % obniżenie wartości zakumulowanego GABA w stosunku do synaptosomów kontrolnych (Ryc. 29). W grupach doświadczalnych z krótkimi czasami przeżycia po przywróceniu krążenia (1 godzina i 24 godziny) pobieranie GABA było również znacznie obniżone. Utrzymywało się na poziomie około 60 % niższym niż w grupie kontrolnej (Ryc. 30 i Ryc. 31). Jednakże w czasie przeżycia po 10-cio minutowym niedokrwieniu wydłużonym do 7 dni wartości pobieranego przez synaptosomy GABA powracały do poziomu kontrolnego (Ryc. 32).



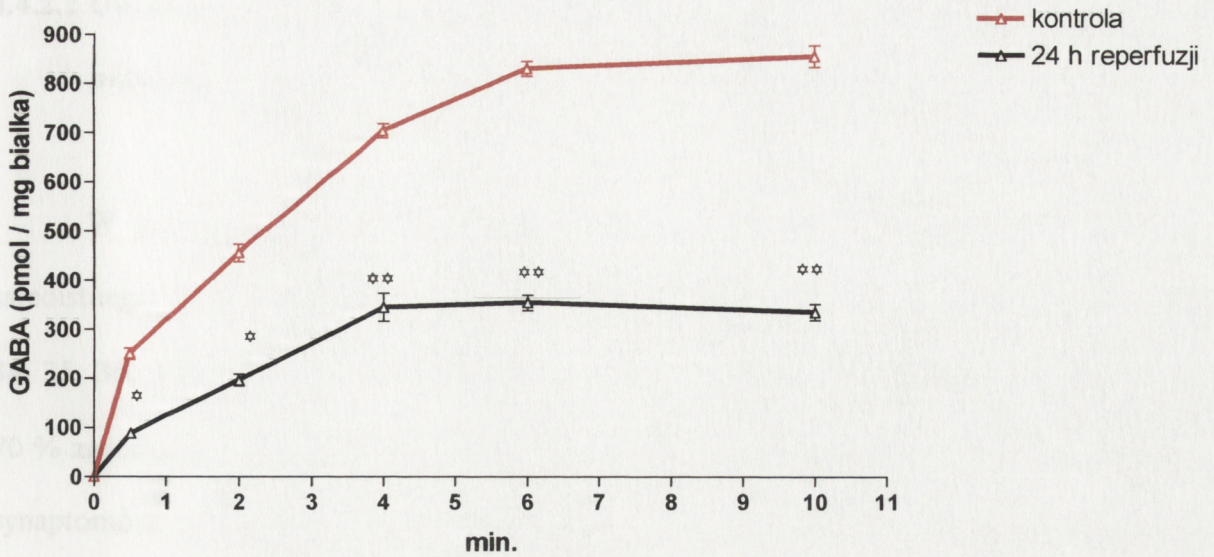


**Ryc. 29.** Wychwył GABA przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych i po 10-cio minutowym niedokrwieniu. Punkty odpowiadają średnim  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

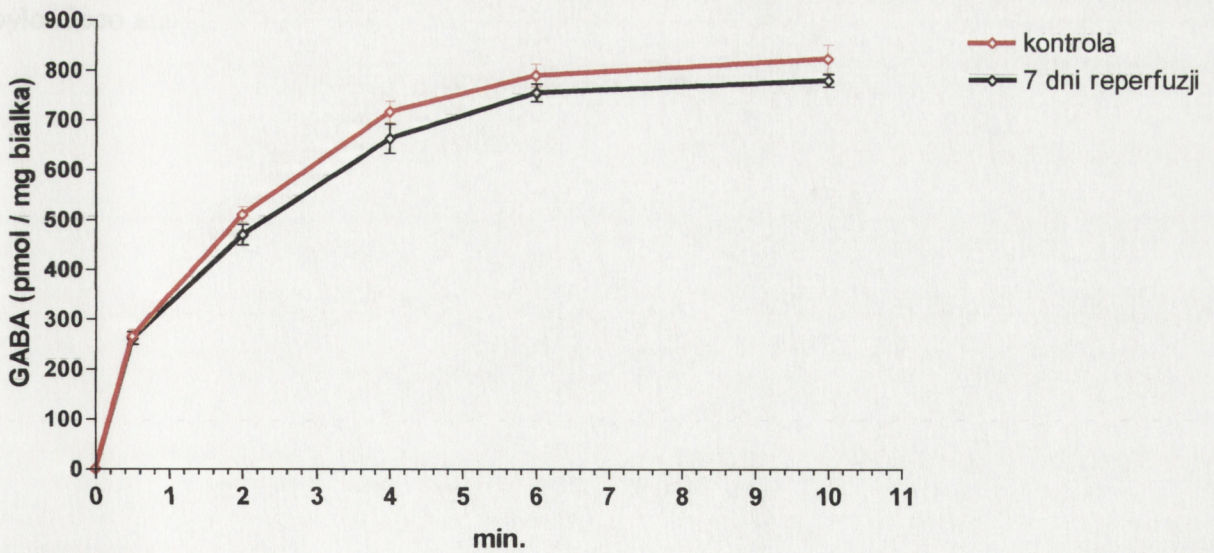


**Ryc. 30.** Wychwył GABA przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 1 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia. Punkty odpowiadają średnim  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .





**Ryc. 31.** Wychwył GABA przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 24 godzinnym czasem reperfuzyj po przywróceniu krążenia. Punkty odpowiadają średnim  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy punktami badanymi i kontrolnymi oznaczono \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



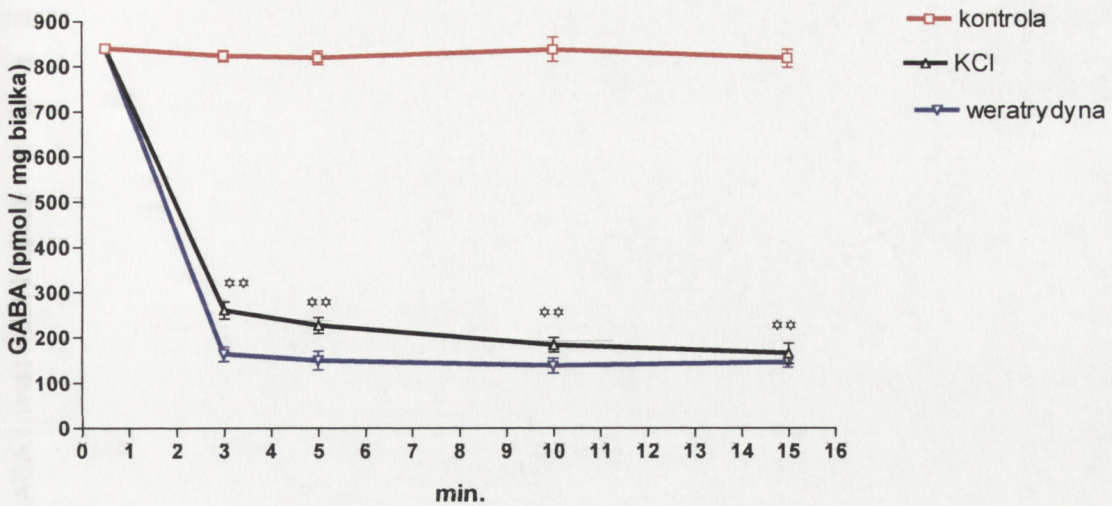
**Ryc. 32.** Wychwył GABA przez synaptosomy otrzymane z mózgow szczurów kontrolnych oraz z 7 dniowym czasem reperfuzyj po przywróceniu krążenia. Punkty odpowiadają średnim  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach.



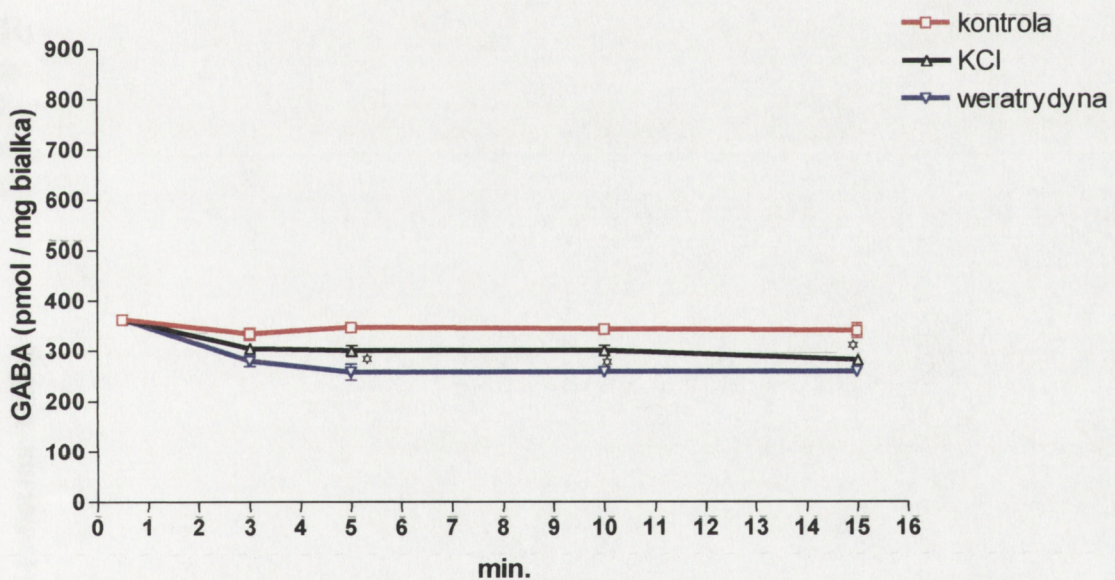
#### 4.4.2.2 Uwalnianie GABA przez synaptosomy w warunkach kontrolnych i patologicznych

W przypadku braku oddziaływania czynników depolaryzujących nie zaobserwowano samoistnego uwalniania GABA z synaptosomów w żadnej z grup doświadczalnych (Ryc. 33, 34, 35, 36, 37). Natomiast 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyna powodowały uwolnienie około 70 % zgromadzonego w synaptosomach kontrolnych GABA (Ryc. 33 ). Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych ze zwierząt po 10 minutowym niedokrwieniu było zahamowane w 85 % (Ryc. 34). Natomiast po 1 godzinie i po 24 godzinach od przywrócenia krążenia uwalnianie GABA zarówno po depolaryzacji błon przez KCl jak i weratrydynę było całkowicie zahamowane. Niewielkie różnice widoczne na wykresach nie są statystycznie istotne (Ryc. 35, 36). Po dłuższym czasie po przywróceniu krążenia (7 dni) uwalnianie GABA w obecności czynników depolaryzujących zostało przywrócone (Ryc. 37), jednakże było nieco niższe niż w przypadku synaptosomów otrzymanych ze zwierząt kontrolnych.



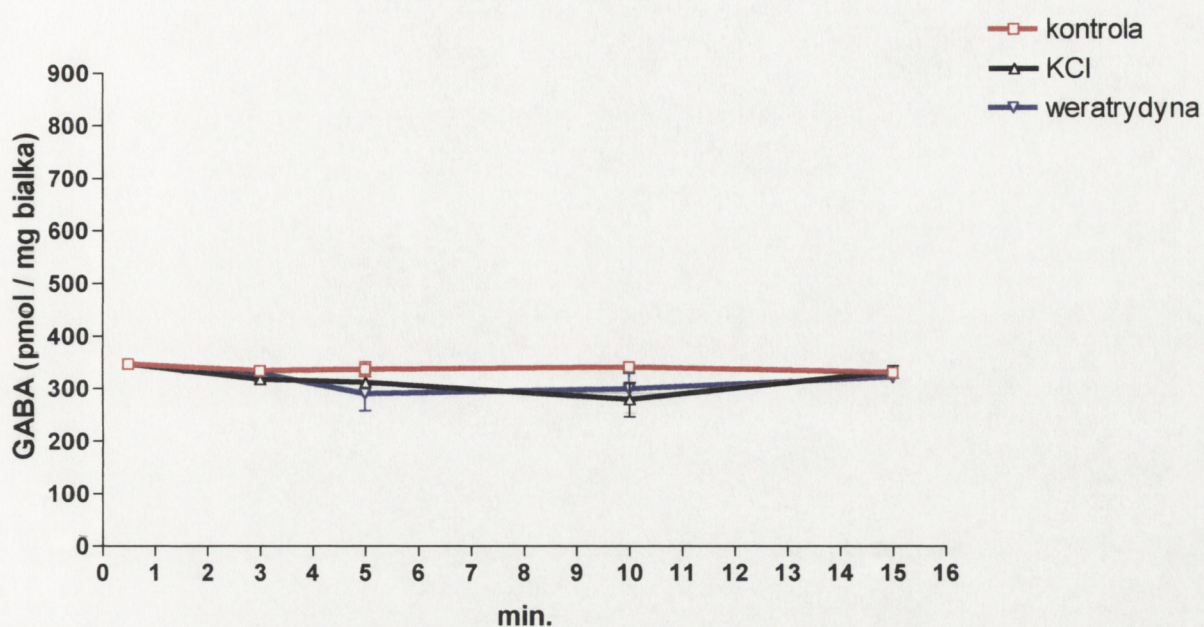


**Ryc. 33.** Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów kontrolnych bez środków depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*\* $P < 0,01$ .

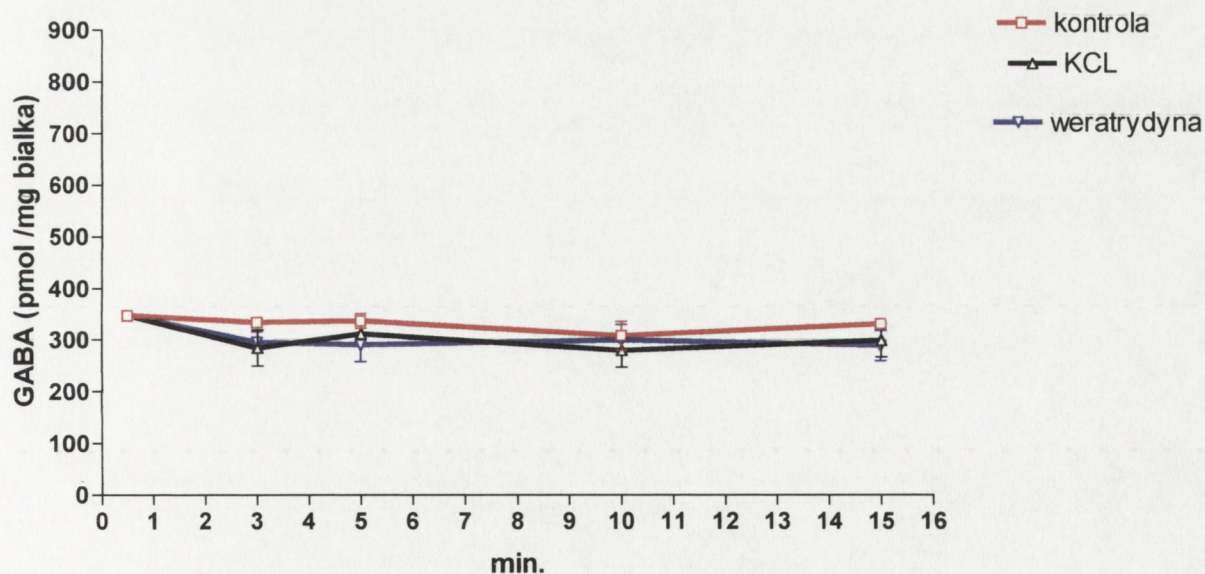


**Ryc. 34.** Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów po 10-cio minutowym niedokrwieniu bez środków depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*,  $P < 0,05$ .



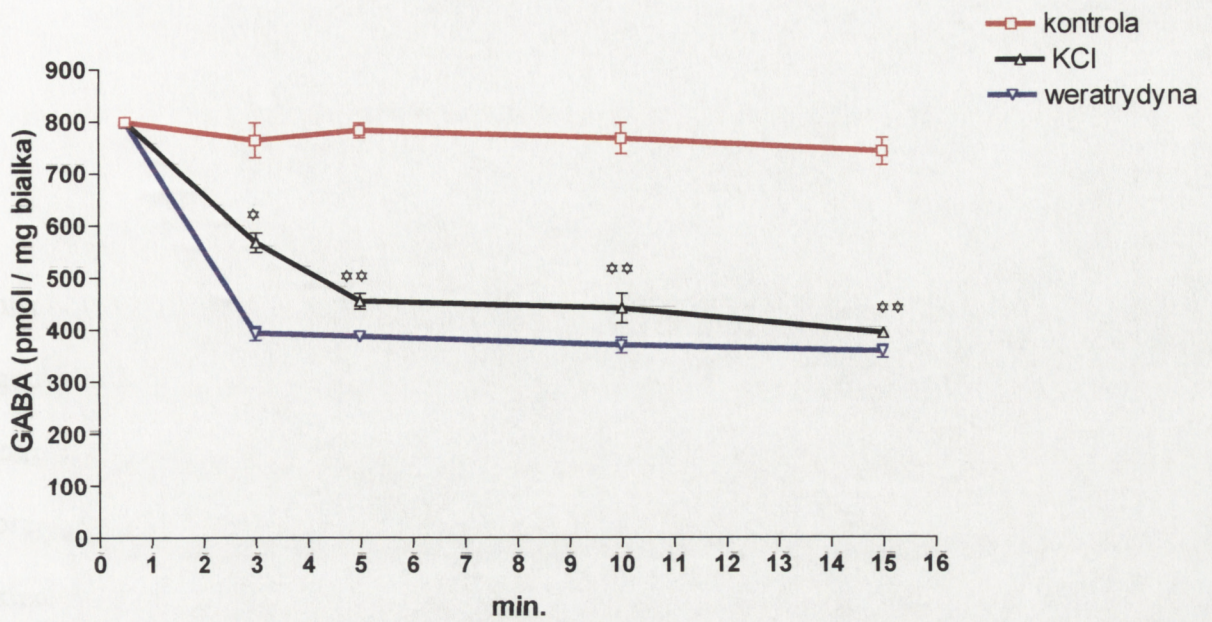


**Ryc. 35.** Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 1 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia bez środków depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach.



**Ryc. 36.** Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 24 godzinnym czasem reperfuzji po przywróceniu krążenia bez środków depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach.





Ryc. 37. Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych z mózgow szczurów z 7 dniowym czasem reperfuzyj po przywróceniu krążenia bez środków depolaryzujących błony komórkowe (kontrola), oraz w obecności 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyny. Każdy punkt reprezentuje wartości średnie  $\pm$   $\bar{S}D$  z pięciu niezależnych doświadczeń wykonanych w dwóch powtórzeniach. Różnice istotne statystycznie oznaczono \*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



#### 4.4.2.3 Wpływ zatrzymania krążenia oraz warunków panujących we wczesnych i późnych okresach po przywróceniu krążenia na kinetykę receptora GABA<sub>B</sub>ergicznego

Badania kinetyki receptora GABA<sub>B</sub> w grupie przeżywającej po 10-cio minutowym niedokrwieniu oraz 10-cio minutowym niedokrwieniu i wczesnych czasach reperfuzy, do 24 godzin po przywróceniu krążenia, wykazały zmniejszenie wartości parametrów kinetycznych, zarówno powinowactwa ligandu do receptora ( $K_D$ ) jak i gęstości receptora ( $B_{max}$ ). W grupie przeżywającej 24 godziny po 10-cio minutowym niedokrwieniu wartości parametrów kinetycznych receptora GABA<sub>B</sub> były najniższe. Zaobserwowano około 28 % obniżenie wartości  $K_D$  (wzrost powinowactwa ligandu do receptora) i o około 20 % obniżenie ilości miejsc wiążących (redukcja wartości  $B_{max}$ ). Po 7 dniach przeżycia po 10-cio minutowym niedokrwieniu oba badane parametry powracały do wartości kontrolnych. Szczegółowe wartości bezwzględne tych parametrów dla poszczególnych grup doświadczalnych zebrano i przedstawiono w tabeli 3.



Tabela 3

Kinetyczne parametry wiązania [<sup>3</sup>H]GABA do receptora GABA<sub>B</sub> w mózgu szczura po 10 minutowym całkowitym niedokrwieniu i w różnych czasach po przywróceniu krążenia.

Próba	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (fmole/ mg tkanki)
Kontrola	122 ± 11,6	1,10 ± 0,30
10 min niedokrwienie	107 ± 10,1*	1,01 ± 0,04*
10 min niedokrwienie + 1 h reperfuzji	105 ± 9,8*	0,92 ± 0,02*
10 min niedokrwienie + 24 h reperfuzji	88 ± 8,9**	0,80 ± 0,02**
10 min niedokrwienie + 7 dni reperfuzji	114 ± 11,1	1,12 ± 0,03

Dane reprezentują średnie ± SD z 6 niezależnych doświadczeń, każde wykonane w trzech powtórzeniach; różnice znamienne statystycznie(\*P < 0,05, \*\*P < 0,01).



**PODSUMOWANIE** części pracy dotyczącej neurotransmisji GABAergicznej w warunkach kontrolnych, całkowitym niedokrwieniu i w różnych czasach po przywróceniu krążenia.

1. Stwierdzono, że całkowite 10-cio minutowe niedokrwienie powoduje znaczne obniżenie ilości pobieranego przez synaptosomy GABA. Tendencja ta utrzymywała się w krótkich czasach po przywróceniu krążenia (1godzina i 24 godziny). Natomiast po 7 dniach transport GABA do synaptosomów powracał do wartości kontrolnych.
2. Niedokrwienie oraz warunki panujące we wczesnych okresach po przywróceniu krążenia (1 godzina, 24 godziny) zmniejszają drastycznie uwalnianie GABA. Jednakże po dłuższym okresie po przywróceniu krążenia (7 dni) uwalnianie GABA w obecności czynników depolaryzujących zostaje przywrócone i jest zbliżone do obserwowanego w przypadku synaptosomów otrzymanych ze zwierząt kontrolnych. Jest to zasadnicza różnica w porównaniu do opisanego wcześniej uwalniania dopaminy.
3. Wartości  $K_D$  i  $B_{max}$  zmniejszają się znacznie (są to różnice znamienne statystycznie) zaraz po niedokrwieniu i w krótkich czasach po przywróceniu krążenia (1 godzina i 24 godziny). W przeciwieństwie do receptora dopaminowego  $D_2$  po 7 dniach od przywrócenia krążenia wartości parametrów kinetycznych receptora  $GABA_B$  powracają do wartości kontrolnych.



## 5. Dyskusja

Skutki niedokrwienia, a w szczególności ischemii całkowitej i reperfuzji są w centrum zainteresowań współczesnych badań. Mimo to wiele mechanizmów dotyczących tych zagadnień pozostaje nieznanymi. Dane doświadczalne przedstawione w niniejszej pracy dostarczają nowych informacji, dotyczących wrażliwości zakończeń nerwowych mózgu szczura i odpowiadającej im izolowanej z mózgu frakcji synaptosomalnej na całkowite niedokrwienie wywołane okresowym zatrzymaniem akcji serca oraz wczesnymi i później na reperfuzję.

Użyty w badaniach model doświadczalny opracowany przez Korpaczowa [67] pozwolił na czasowe całkowite zatrzymanie krążenia, a następnie jego przywrócenie w wyniku reanimacji. Przy wyborze modelu opierano się na danych z literatury wykazujących, że model ten, w porównaniu z innymi dotychczas stosowanymi modelami ischemii, najpełniej odzwierciedla warunki całkowitego niedokrwienia mózgu i reperfuzji, pozwalając na porównanie z klinicznymi przypadkami udaru mózgu na skutek zawału serca u ludzi [55, 59, 105]. Niedokrwienie wywołane tą metodą uzyskane jest wyłącznie poprzez mechaniczny ucisk naczyń krwionośnych wychodzących z serca, bez ingerencji jakichkolwiek środków farmakologicznych czy powodowania trwałych zmian anatomicznych jak np. zaciskanie, przecinanie czy koagulacja tętnic. Reanimacja polegająca na masażu serca i sztucznej wentylacji płuc powietrzem atmosferycznym wyklucza wpływ innych czynników, nie spotykanych podczas epizodów zatrzymania krążenia, które mogą wpływać na ostateczny wynik badań eksperymentalnych. Obserwowane uszkodzenia są więc wynikiem niedokrwienia i zmian występujących w organizmie po przywróceniu krążenia. Model ten pozwala również na badanie następstw niedokrwienia mózgu pojawiających się w dłuższym czasie po wystąpieniu epizodu niedokrwieniowego, gdyż po skutecznej reanimacji zwierzęta mogą być, w zależności od potrzeb eksperymentu, odpowiednio długo hodowane i



obserwowane. Niedogodnością w badaniach na modelu Korpaczowa jest duża śmiertelność zwierząt w czasie eksperymentu oraz duże różnice w osobniczej reakcji na niedokrwienie mózgu. W prezentowanych badaniach przeżywalność wynosiła około 55%. Reanimację szczura uznawano za skuteczną gdy akcja serca została przywrócona w trzeciej minucie i tylko takie zwierzęta wykorzystywano do dalszych badań. Biorąc pod uwagę różną reakcję poszczególnych szczurów dodatkowo każdy rodzaj doświadczenia przeprowadzano minimum na 5 zwierzętach, co najmniej w dwóch lub trzech powtórzeniach. Pozwoliło to na przeprowadzenie analiz morfometrycznej i statystycznej uzyskanych wyników.

Wyboru frakcji synaptosomów jako modelu doświadczalnego do badań biochemicznych i funkcjonalnych o.u.n. w warunkach całkowitej ischemii wywołanej zatrzymaniem akcji serca i reperfuzji dokonano z jednej strony ze względu na brak tego typu badań, z drugiej zaś dlatego, że właściwości izolowanych zakończeń nerwowych (synaptosomów) są bardzo zbliżone do właściwości zakończeń komórek nerwowych *in vivo*. Wcześniejsze badania wykazały, że około 80 % synaptosomów w izolowanej frakcji synaptosomalnej zawiera pęcherzyki synaptyczne magazynujące i uwalniające neuroprzekaźniki. Również wartości parametrów energetycznych i potencjału błonowego są podobne do tych, które spotyka się w mózgu [25, 110, 111]. Mikroskopowo-elektronowa ocena czystości frakcji synaptosomalnej użytej do potrzeb badawczych tej pracy wykazała wysoką, porównywalną z wartościami literaturowymi [6, 24] zawartość synaptosomów zawierających w swym wnętrzu pęcherzyki synaptyczne i niską zawartość zanieczyszczeń w postaci wolnych mitochondriów czy fragmentów błon komórkowych [6, 24]. Dodatkowo ostatnio opublikowane wyniki niniejszej pracy [142] wykazały podobieństwo obrazów mikroskopowo-elektronowych zakończeń nerwowych w próbkach pobranych z mózgu oraz izolowanej frakcji synaptosomalnej. Podobieństwo dotyczy nie tylko warunków prawidłowych (kontrolnych), ale również ischemii oraz wczesnych (1 i 24 godziny) i późnych



(7 dni) okresów po przywróceniu krążenia. Świadczy to o podobnej wrażliwości izolowanych metodą Bootha i Clarka [6] synaptosomów i zakończeń nerwowych mózgu.

Wyniki pomiarów parametrów energetycznych synaptosomów kontrolnych wykazują wysoką korelację z danymi z wcześniejszych badań [6, 111, 113, 115, 146, 149]. Izolowana frakcja synaptosomalna posiada wysoką aktywność metaboliczną, wykazuje zdolność depolaryzacji, wychwytu i uwalniania neuroporządkowników. Dlatego synaptosomy uznano za wyjątkowo dogodny model do badań metabolicznych i funkcjonalnych zakończeń nerwowych mózgu [24, 25].

Założenia i cel pracy zmierzające do wykazania na ile zakończenia nerwowe mózgu są wrażliwe na całkowitą ischemię spowodowaną zatrzymaniem akcji serca oraz na patologiczne warunki wczesnych i późnych okresów po przywróceniu krążenia były realizowane w niniejszej pracy poprzez obserwację:

- zmian morfologicznych,
- zmian w podstawowym metabolizmie energetycznym,
- zaburzeń podstawowej funkcji zakończeń nerwowych – neurotransmisji.

Zmiany morfologiczne, jak już zaznaczono wyżej, badano równolegle w zakończeniach nerwowych mózgu i w izolowanej frakcji zakończeń nerwowych – frakcji synaptosomalnej, w celu porównania ich jakości i nasilenia w obydwu tych rodzajach materiału badanego.

W przypadku badań metabolizmu energetycznego oraz określania kinetyki pobierania i uwalniania neuroprzekaźników do badań wykorzystano oczyszczoną frakcję synaptosomalną. Opisane w niniejszej pracy i opublikowane [142] zmiany morfologiczne obserwowane po 10 minutowej całkowitej ischemii oraz w krótkim czasie po przywróceniu krążenia (1 i 24 godziny), polegały m. in. na drastycznej redukcji liczby pęcherzyków synaptycznych w synaptosomach i w zakończeniach nerwowych obserwowanych w próbkach tkanki pobranej z mózgu. Podobne zmiany były wcześniej opisane przez Yamamoto [156] w modelu całkowitej



ischemii wywołanej obustronnym zaciśnięciem tętnic szyjnych chomika mongolskiego oraz przez Walskiego [150] w modelu śmierci klinicznej szczura. Zmiany w morfologii mitochondriów synaptycznych uwidocznione w niniejszej pracy, polegające na pęcznieniu mitochondriów, przerwaniu ciągłości błon, rozdęciach grzebieni mitochondrialnych, czy zmiany gęstości macierzy mitochondrialnej, zbliżone były do zaburzeń struktury mitochondriów perikarionalnych opisanych przez innych autorów w różnych modelach ischemii ogniskowej i całkowitej [25, 53, 72, 76, 96, 120, 137, 156]. Obserwowane w niniejszej pracy zmiany w strukturze synaptosomów i zawartych w nich mitochondriów synaptycznych korelowały z wynikami eksperymentalnymi pomiaru zużycia tlenu przez synaptosomy. Uzyskane wyniki pomiaru zużycia tlenu przez synaptosomy kontrolne były tego samego rzędu co opisane w literaturze w izolowanych synaptosomach [72, 76, 112]. W ischemii oraz wczesnych okresach po reperfuzji utlenianie badanych substratów w mitochondriach synaptycznych zmniejszało się istotnie. Sugeruje to uszkodzenie synaptycznych i (albo) mitochondrialnych błon wywołane przez ischemię. We wczesnych okresach po reperfuzji (1 i 24 godziny) wykazano zaburzenia w utlenianiu substratów w mitochondriach synaptosomalnych, co może prowadzić do zmniejszenia dostępności ekwiwalentów redukcyjnych w łańcuchu oddechowym. Możliwość uszkodzenia błon mitochondrialnych potwierdza również fakt, że utlenianie bursztynianu, katalizowane przez ściśle związaną z wewnętrzną błoną mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową, jest bardziej hamowane niż utlenianie pirogronianu. Zgodne z powyższymi sugestiami, dotyczącymi uszkodzeń błon mitochondriów synaptycznych i zaburzeń w oddychaniu tkankowym po ischemii i wczesnych czasach po reperfuzji obserwuje się obniżone poziomy związków energetycznych: ATP i fosfokreatyny, połączone ze wzrostem poziomów ADP i kreatyny. Obserwowane obniżenie poziomów ATP i CrP w synaptosomach jest zbliżone do uzyskiwanych wcześniej przez Rafałowską i współ. [110, 111] w warunkach hipoksji czy



Domańską i współ. [27] w modelu obustronnego zaciskania tętnic szyjnych chomika mongolskiego. Uszkodzenia struktury mitochondriów synaptycznych i związane z nimi zaburzenia w oddychaniu i obniżenie poziomów parametrów energetycznych po 10-minutowym całkowitym zatrzymaniu krążenia i wczesnych czasach reperfuzji, wiążą się niewątpliwie ze stresem oksydacyjnym, który jest konsekwencją uszkodzeń ischemiczno-reperfuzyjnych [14, 44, 47, 151, 152, 154]. Zmiany w pobieraniu tlenu i w poziomie parametrów energetycznych synaptosomów, obserwowane w niniejszej pracy, są największe podczas pierwszych godzin po reperfuzji, co jest zgodne z wynikami prac innych autorów [41, 133, 139, 153, 154]. Stres oksydacyjny po zatrzymaniu akcji serca i reperfuzji jest największy podczas pierwszych godzin [46].

Obserwowane zmiany dotyczące morfologii, oddychania i poziomów związków energetycznych w synaptosomach i mitochondriach synaptycznych uwidaczniały się po zatrzymaniu akcji serca i w krótkich czasach po reperfuzji (1 godzina , 24 godziny). W późniejszych okresach po reperfuzji (7 dni) zaburzenia te powracały do wartości kontrolnych. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem powrotu do wartości wyjściowych jest kompensacyjna regulacja systemu naczyniowo-sercowego, co pozwala na przepompowanie i dostarczenie większej ilości krwi, a więc i większych ilości tlenu i glukozy do mózgu.

Z punktu widzenia reanimacji odwracalność wyżej omawianych zmian w systemie energetycznym synaptosomów i ich morfologii po 7 dniach od reperfuzji jest niewątpliwie czynnikiem korzystnym. Jednakże w tym samym czasie obserwowano w próbkach pobranych z mózgu znaczną ilość uszkodzonych neuronów około  $2 \pm 0,4$  % wszystkich neuronów. Te uszkodzone komórki zawierały liczne, różnej wielkości lizosomy i ciemną elektronowo gęstą cytoplazmę. Zniszczone neurony przypominały wyglądem tzw. „ciemne neurony” i podobne były do uszkodzonych neuronów obserwowanych u szczurów po 6 tygodniach przeżycia po epizodzie śmierci klinicznej [150]. Wydaje się, że procesy destrukcyjne uwidaczniające się w



przebiegu całkowitej ischemii spowodowanej zatrzymaniem akcji serca i w krótkich czasach po reperfuzji (kiedy zakończenia nerwowe są eksponowane na wysoki poziom wolnych rodników tlenowych) mogą zostać zatrzymane w dłuższych czasach (7 dni), ale mogą też selektywnie uszkadzać neurony i synapsy [40, 50, 101] prowadząc do ich śmierci i to prawdopodobnie zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy [8, 11, 34, 69, 80, 117].

Wyniki badań niniejszej pracy wykazały, że zmiany w budowie oraz metabolizmie energetycznym synaptosomów i mitochondriów synaptycznych wywołane całkowitym zatrzymaniem krążenia i reperfuzją mają swoje odbicie w podstawowej energozależnej funkcji zakończeń nerwowych – neurotransmisji [145]. Niewątpliwie wiąże się to z obniżeniem poziomu metabolizmu energetycznego synaptosomów, co prowadzi do usunięcia potasu z zakończeń nerwowych i napływu do ich wnętrza sodu i wapnia [25, 99, 116]. Taka zmiana stężeń wyżej wymienionych jonów indukuje jak wiadomo depolaryzację błony i zaburza transport neuroprzekaźników w synaptosomach, co w konsekwencji destabilizuje pracę neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym [25].

Prezentowane w tej pracy badania neurotransmisji skupiają się na dwóch przeciwstawnie działających neuroprzekaźnikach GABA i DA. Wyniki wskazują, że zarówno transport obydwu neuroprzekaźników (wychwyt i uwalnianie) jak i kinetyka odpowiednich układów receptorowych, ulegają dużym zaburzeniom, zarówno w czasie zatrzymania krążenia jak i po reperfuzji. Najistotniejszy jest jednak fakt, że chociaż zaburzenia te w przypadku GABA i dopaminy są podobne w całkowitej ischemii i wczesnych okresach po reperfuzji (1 godzina i 24 godziny), to po 7 dniach po reperfuzji obydwa układy reagują inaczej [114, 141]. W przypadku GABA wartości charakterystyczne dla transportu oraz parametry charakteryzujące kinetykę receptorów ( $K_D$  i  $B_{max}$ ) po 7 dniach powracają do wartości kontrolnych, natomiast nie obserwuje się tego zjawiska w przypadku dopaminy.



Wyniki pracy wykazały, że na skutek całkowitej ischemii oraz we wczesnych okresach po przywróceniu krążenia następuje zdecydowana redukcja wychwytu GABA i dopaminy. Rezultaty te są podobne do uzyskanych wcześniej na modelu ischemii poprzez obustronne podwiązanie tętnic u chomika mongolskiego przez Domańską i współ. [27] czy w warunkach ograniczonego dostępu tlenu (Pastuszko i współ. [103, 104]).

Spontaniczne uwalnianie GABA i dopaminy z synaptosomów otrzymanych z kontrolnej grupy szczurów było typowe dla tej frakcji, zgodne z danymi Pastuszko i współ [103] i Troeger i współ. [146]. Uwalnianie tych neuroprzekaźników w warunkach kontrolnych, w stanie spolaryzowania synaptosomów, było minimalne, praktycznie nie istniało, natomiast drastycznie wzrastało w obecności czynników depolaryzujących takich jak 50 mM KCl i 40  $\mu$ M weratrydyna, które powodują wzrost przepuszczalności błon dla sodu i indukują napływ wapnia do wnętrza komórki. Uwalnianie GABA i dopaminy znacząco zmniejszało się po 10 minutowej całkowitej ischemii oraz po 1 i 24 godzinnych okresach po reperfuzji. Te zmiany w transporcie badanych neuroprzekaźników (wychwyt i uwalnianie) w synaptosomach obserwowane po 10 minutowej ischemii i krótkich czasach po reperfuzji są prawdopodobnie wynikiem zaburzeń w przepuszczalności błon, częściowej inhibicji receptorów [17], wzrostu stresu oksydacyjnego [44, 109] czy też zmian w stężeniach Se, Cd i Zn [113]. Obserwowane zmiany w pobieraniu i uwalnianiu GABA i dopaminy w całkowitej ischemii i wczesnych czasach reperfuzji mogą prowadzić do niestabilności ośrodkowego układu nerwowego.

W przypadku GABA powyżej omówione zmiany po dłuższej reperfuzji (7 dni) powracają do warunków kontrolnych, podobnie jak powstałe w całkowitej ischemii i wczesnych okresach reperfuzji zmiany w kinetyce receptora GABA<sub>B</sub>, co z pewnością jest elementem korzystnym w zaburzeniach powstałych po incydencie niedokrwiennym. Obserwowane obniżenie wartości  $K_D$  – czyli wzrost powinowactwa ligandu do receptora - wydaje się być odpowiedzią przystosowawczą (mechanizmem kompensacyjnym) w stosunku do obniżenia



liczby miejsc wiążących  $B_{max}$  we wczesnych okresach reperfuzji. Parametry kinetyczne receptora  $GABA_B$  podobnie jak wychwyty i uwalnianie GABA wracają do wartości kontrolnych po 7 dniach od początku reperfuzji. Zupełnie inaczej reaguje układ dopaminergiczny. Mimo, że wychwyty, uwalnianie oraz parametry kinetyczne receptora  $D_2$  są zaburzone w ischemii i wczesnych czasach reperfuzji podobnie jak w przypadku GABA, to nie mają one zdolności powrotu do

poziomu kontrolnego w dłuższych okresach po śmierci klinicznej. Po 7 dniach od początku reperfuzji, mimo poprawy obrazu morfologicznego zakończeń nerwowych, mitochondriów synaptycznych, ich parametrów energetycznych oraz funkcji układu GABAergicznego, uwalnianie dopaminy z synaptosomów oraz kinetyka receptora dopaminowego  $D_2$  ciągle pozostaje znacznie upośledzona, co może być związane z narastającą wybiórczą śmiercią neuronów (nekrozą czy apoptozą).

Uzyskane dane doświadczalne w istotny sposób wskazują na znaczne różnice wrażliwości systemów neurotransmiterowych (GABAergicznego i dopaminergicznego) na całkowite niedokrwienie mózgu wywołane zatrzymaniem krążenia i reperfuzją. Odwracalność zmian obserwowana w systemie GABAergicznym jest niewątpliwie korzystna. Jednakże brak powrotu do wartości kontrolnych w uwalnianiu dopaminy i wartości parametrów kinetycznych receptora  $D_2$  dopaminowego może istotnie zaburzać procesy fizjologiczne mózgu, zależne od transmisji dopaminergicznej oraz od wzajemnej równowagi układów dopaminergicznego (pobudzającego) i GABAergicznego (hamującego) i może prowadzić do istotnych zaburzeń neurologicznych i psychicznych.



## 6. WNIOSKI

1. Całkowite 10-cio minutowe niedokrwienie mózgu wywołane zatrzymaniem akcji serca oraz warunki wczesnych okresów reperfuzji powodujące duże zmiany morfologiczne w synaptosomach i w mitochondriach synaptycznych, oraz obniżające ich stan energetyczny w wyniku częściowej inhibicji oddychania i spadku poziomów związków wysokoenergetycznych są źródłem destabilizacji procesów metabolicznych i funkcjonalnych zakończeń nerwowych o.u.n.
2. Normalizacja powyższych zmian po 7 dniach od przywrócenia krążenia jest zjawiskiem korzystnym. Jednakże jednoczesny wzrost liczby zmienionych „ciemnych” neuronów może wskazywać, że mimo powrotu do normy wyżej opisanych zaburzeń w dalszym ciągu zachodzą procesy prowadzące do uszkodzeń komórek nerwowych.
3. Czasowe zatrzymanie akcji serca oraz wczesne okresy po reperfuzji zaburzają podstawową funkcję zakończeń nerwowych – neurotransmisję, poprzez znaczne upośledzenie wychwytu i uwalniania GABA i dopaminy oraz zmianę kinetyki specyficznych dla nich receptorów ( $GABA_B$  i  $D_2$ ), mimo uruchomienia procesów kompensacyjnych polegających na wzroście powinowactwa specyficznych agonistów do receptorów przy jednoczesnym obniżeniu liczby receptorowych miejsc wiążących.
4. Obserwowana po 7 dniach od przywrócenia krążenia normalizacja transportu GABA i kinetyki receptora  $GABA_B$  z jednoczesnym brakiem normalizacji uwalniania dopaminy i „aktywności” receptora dopaminowego  $D_2$  świadczy o różnej, specyficznej dla poszczególnych zakończeń nerwowych, wrażliwości na warunki całkowitego zatrzymania krążenia i reperfuzji. Brak normalizacji w neurotransmisji dopaminy (która jest odpowiedzialna za wiele procesów neurologicznych i psychicznych) po dłuższym czasie reperfuzji (7 dni), może być jedną z przyczyn trudności w przywróceniu całkowitej sprawności po zatrzymaniu krążenia i reperfuzji.



## 7. PIŚMIENICTWO

1. Andringa G., Vermeulen R. J., Drukarch B., Stoof J. C., Cools A. R. (1998) Dopamine receptors subtypes as target for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Adv. Pharmacol.* 42: 792-795.
2. Arias C., Tapia R. (1986) Differential calcium dependence of  $\gamma$ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 47: 396-404.
3. Bateman D. E. (1995) A simple model to explain the motor fluctuations seen in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 59: 555-61.
4. Bazan N. G. (1970) Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 218: 1-10.
5. Blaustein M. P. (1975) Effect of potassium, veratridine and scorpio venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vivo. *J. Physiol. (Lond.)*, 247: 617-655.
6. Booth R. F. A., Clark J.B. (1978) A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* 176: 365-370.
7. Boveris A., Cadenas E. (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. W Oberly L.W. (ed): *Superoxide dismutase*, vol 2. Boca Raton, CRC Press, 15.
8. Boveris A., Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134: 707-716.
9. Bowery N. G. (1993) GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 109-147.
10. Braak H., Braak E., Yilmazer D., Schultz C., de Vos R. A., Jansen E. N. (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 46: 15-31.
11. Brenner C., Kroemer G. (2000) Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 289: 1150-1151.
12. Brent E., Bergmeyer H. U., Mollering H. (1974) Creatine. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, N.Y., London, vol. 4, 1772-1776.
13. Bromont C., Mariec C., Bralet J. (1989) Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20: 918-924.
14. Brown G. C. (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* 284: 1-13.
15. Burgoyne R. D. Morgan A. (1993) Regulated exocytosis. *Biochem. J.* 293: 305-316.



16. Chan P. H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 2-14.
17. Chang C. J., Ishii H., Yamamoto H., Yamamoto T., Spatz M. (1993) Effects of cerebral ischemia on regional dopamine release and D1 and D2 receptors. *J. Neurochem.* 60: 1483-90.
18. Cardoso S. M., Pereira C., Oliveira C. R. (1998) The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 246: 703-710.
19. Choi D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23: 1261-1276.
20. Coulbourne F., Sutherland G., Corbett D. (1997) Postischemic hypothermia, a critical appraisal with implications for clinical treatment. *Molecular Neurobiology* 14: 171-201.
21. Cvejic V., Micic D. V., Mrsulja B. B. (1981) Catecholamine turnover in cerebral cortex and caudate during long-term reflow following transient ischemia in gerbils, in *Cerebral Vascular Disease 3*, (Meyer J. S. Lechner H. Reivich M., Ott E. O., Aranibar A., eds) pp 261-265. *Experta Medica*, Amsterdam.
22. Damsma G., Boisvert D. P., Mudrick L. A., Wenkstern D., Fibiger H. C. (1990) Effect of transient cerebral ischemia and pargiline on extracellular concentrations of dopamine, serotonin, and their metabolites in the rat striatum as determined by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 54: 801-808.
23. Deshpande J. K., Siesjo B. K., Wieloch T. (1987) Calcium accumulation and neuronal damage in the hippocampus following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7: 89-95.
24. Deutsch C., Drown C., Rafałowska U., Silver I. A. (1981) Synaptosomes from rat brain: morphology, compartmentation and transmembrane pH and electrical gradients. *J. Neurochem.* 36: 2063-2072.
25. Deutsch C., Rafałowska U. (1979) Transmembrane electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Letters*, 108: 274-278.
26. Dirnagl U., Lindauer U., Them A., Schreiber S., Pfister H., Koedel U., Reszka R., Freyer D., Villringer A. (1995) Global cerebral ischemia in the rat: on line monitoring of oxygen free radical production using chemoluminescence in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 929-940.
27. Domańska-Janik K., Łazarewicz J., Noremborg K., Strosznajder J., Zalewska T. (1985) Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochemical Research* 10: 649-665.
28. Dugan L. L., Choi D. W. (1994) Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann. Neurol.* 35(Suppl:) 17-21.



29. Dugan L. L., Gabrielson J. K., Yu S. P., Lin T. S., Choi D. W. (1996) Buckminster fullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* 3: 129-135.
30. Emilien G., Maloteaux J. M., Geurts M., Hoogenberg K., Cragg S., (1999) Dopamine receptors – physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacology and Therapeutics* 84: 133-156.
31. Erecińska M., Dagani F. (1990) Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. *J. Gen. Physiol.*, 95: 591-616.
32. Ernster L., Dallner G. (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1271:195-204.
33. Fischer M., Jones S., Sacco R. L. (1994) Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia. *Stroke* 25: 1075-1080.
34. Fiskum G., Murphy A. N., Beal M. F (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 351-369.
35. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Murakami K., Kawase M., Chan P. H. (1998) Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 1239-1247.
36. Gage P. W. (1992) Activation and modulation of neuronal K<sup>+</sup> channels by GABA. *Trends Neurosci.* 15: 46-51.
37. Garcia-Lopez M. (1999) Axolemmal transporters for neurotransmitter uptake. *Rev. Neurol.* 29: 1056-63.
38. Goldenring J. R., McGuire J. S., DeLorenzo R. L. (1984) Identification of the major postsynaptic density protein as homologous with the major calmodulin binding subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 42: 1077-1084.
39. Gray J., Geen A. R. (1987) GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of potassium-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine from mouse frontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* 91: 517-22.
40. Greem D. R., Reed J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 28: 1309-1312.
41. Grieb P., Ryba M. S., Dębicki G. S., Gordon-Krajcer W., Januszewski S., Chrapusta S. J. (1998) Changes in oxidative stress in the rat brain during post-cardiac arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone. *Resuscitation* 39: 107-113.
42. Grisham M. B., Granger D. N. (1989) Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin. Chest Med.* 10: 71-81.
43. Grossman R. G., Williams V. F. (1971) Electrical activity and ultrastructure of cortical neurons and synapses in ischemia. pp 61-75, in Brierley, J. B. Meldrum, B. S. Eds. *Brain hypoxia*. Heinemann, London.



44. Gulayeva N. K., Stepanichev M. Y., Onutriv M. V., Lazariyeva N. A., Zarzhetsky Y. K., Guritch A. M., Volkov A. V. (1996) Cardiac arrest induces decrease in nitric oxide synthase activity and increase of free radical generation in rat brain regions. *Neurosci. Lett.* 220: 147-150.
45. Haba K., Ogawa N., Asanuma M., Hirata H., Mori A. (1992) Comparison of the effects of bifemelane hydrochloride, idebenone and indeloxazine hydrochloride on ischemia-induced changes in brain monoamines and their metabolites in gerbils. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 88: 187-198.
46. Hall E. (1993) The role of oxygen radicals in traumatic injury: clinical implications. *J. Emerg. Med.* 11: 31-36.
47. Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the cerebral nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623.
48. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1997) Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J. Neurochem.* 69: 1330-1331.
49. Harris R. J., Symon L., Bronston N. M., Bayhan M. (1981) Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1: 203-209.
50. Hirsch T., Susin S. A., Dallaporta B., Zamzami N., Marzo I., et al. (1997) The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the model of cell death. *Oncogene* 15: 1573-1581.
51. Hossmann K. A. (1993) Ischemia mediated neuronal injury. *Resuscitation* 26: 225-235.
52. Hossmann K. A. (1998) Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc. Res.* 39: 106-120.
53. Hossmann K. A., Oschlies U., Schwindt W., Krep H. (2001) Electron microscopic investigation of rat brain after brief cardiac arrest. *Acta Neuropathol.* 101: 101-113
54. Ilwain U. M. (1971) *Biochemistry and the Central Nervous System.* ed. H. S. Bachelard, Edinburg and London.
55. Jackson D. L., Dole W. P. (1979) Total cerebral ischemia: A new model system for the study of post-cardiac arrest brain damage. *Stroke* 10: 38-43.
56. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. U. (1974) Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, N.Y., London, vol. 4, 2127-2131.
57. Johansen F. F., Jorgensen M. B., Ekstrom von Lubitz D. K. J., Diemer N. H. (1984) Selective dendrite damage in hippocampal CA1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 291: 373-377.
58. Kaufman M. J., Madras B. K. (1991) Severe depletion of cocaine recognition sites associated with the dop-amine transporter in Parkinson's disease striatum. *Synapse* 9: 43-49.



59. Kawai K., Nitecka L., Ruetzler C.A., Nagashima G., Joo F., Mies G., et al. (1992) Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat. I: dynamick of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 12: 238-249.
60. Kazuki S., Ohta T., Ogara R., Tsuji M., Tamura Y., Takosa T. (1997) Effects of intraluminal or extraluminal endotelinon perfused rabbit basilar arteries. *J. Neurosug.* 86: 859-865.
61. Kehrer J. P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Tox.* 23: 21
62. Kevelaitis E., Nyborg N. C., Menasche P. (1997) Protective effect of reduced glutathione on endothelial function of coronary arteries subjected to prolonged cold storage. *Transplantation* 64: 660-663.
63. Kieta H., Lepouse C., Henzel D., Desmonts J. M., Mantz J. (1997) Riluzole blocks dopamine release evoked by N-methyl-D-aspartate, kainate, and veratridine in the rat striatum. *Anesthesiology* 87: 1164-71.
64. Klimek V., Nielson M. (1987) Chronic treatment with antidepressants decreases the number [<sup>3</sup>H] SCH 23390 binding sites in the rat striatum and limbic system. *European J. Pharmacology*, 139: 163-169.
65. Knable M. B., Egan M. F., Heinz A., Lee K. S., Coppola R., Weinberger D. R. (1997) Altered dopaminergic funktion and negative symptoms in drug-free patients with schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 171; 574-577.
66. Kontos H. A., Wie E. P., Ellis E. F., et al. (1989) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* 23: 142-149.
67. Korpachev W.G., Lysenkov S.P., Tel L.Z (1982) Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats. *Patolog. Fizjolog. Eksp. Ter.* (w języku rosyjskim), 3: 78-80.
68. Kozuka M. (1995) Changes in brain energy metabolism, neurotransmitters, and choline during and after incomplete ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem. Res.* 20: 23-30.
69. Kroemer G., Dallaporta B., Rescher-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60: 619-642.
70. Kuno S., Mizuta E., Yamasaki S. (1997) Neuroleptic malignant syndrome in parkinsonian patients: risk factors. *Eur. Neurol* 38: 56-59.
71. Kurokawa T., Kobayashi H., Nonami T., Harada A., Nakao A., Takagi H. (1996) Mitochondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 66: 1-5.
72. Lai J. C. K., Walsh J. M., Dennis S. C., Clark J. B. (1977) Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.*, 28: 625-631.



73. Lamprecht W., Stein P., Heinz P., Weisser H. (1974) Creatine phosphate. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmayer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, N.Y., London, vol. 4, 1777-1781.
74. Lamprecht W., Trautschold I. (1974) ATP; determination with hexokinase and glucose-6 phosphate dehydrogenase. W: *Methods in Enzymatic Analysis*, red. Bergmayer H.U., Verlag Chemie/Academic Press, N.Y., London, vol. 4, 2101-2110.
75. Land A. E., Lozano A. M. (1998) Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 339: 1130-1143.
76. Lee J. M., Zippfel G. J., Choi D. W. (1999) The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature* 399: 7-14.
77. Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G. (1996) Regulacja stopnia oksydoregulacji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Postępy Biochemii* 42: 154-161.
78. Levy D. E., Duffy T. E. (1977) Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J. Neurochem.* 28: 63-70.
79. Lim L., Hall C., Leung T., Mahadevan L., Whatley S. (1983) Neurone specific enolase and creatine phosphokinase are protein components of rat brain synaptic plasma membranes. *J. Neurochem.*, 41: 1177-1182.
80. Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79: 1431-1568.
81. Liu L. X., Monsma F. J., Sibley D. R., Chiodo L. A. (1996) D2L, D2S and D3 dopamine receptors stably transfected into NG108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse* 24: 156-164.
82. Lovell M. A., Ehmman W.D., Butler S.M., Markesbery W. R. (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 1594-1601.
83. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
84. Lust D. W., Mrsulja B. B., Mrsulja 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.
85. Lyras L., Cairns N. J., Jenner P., Halliwell B. (1997) An assessment of oxidative damage to protein, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68: 2061-2069.
86. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T. (1978) Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red. Mossakowski M. J., Zelman I. B., Kroh H. *Pol. Med. Publ.*, Warszawa str. 79-86.



87. Martin D. L., Smith A. A. (1972) Ions and the transport of  $\gamma$ -aminobutyric acid by synaptosomes. *J. Neurochem.*, 19: 841-855.
88. Martins E., Inamura K., Themner K., Malmqvist K. G., Siesjo B. K. (1988) Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: apporition microprobe study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 531-538.
89. Matsumoto T., Obrenovitch T. P., Sarna G. S., Symon L. (1989) Extracellular concentration of dopamine and dopamine metabolites in the rat striatum during cerebral ischemia and reperfusion. *No.To. Shinkei.* 41: 1013-1029.
90. McMurchie E. J., Raison J. K. (1979) Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 554: 364-374.
91. Meltzer H., Sommers A., Luchins D. (1986) The effect of neuroleptics and other psychotropic drugs on negative symptoms in schizophrenia. *J. Clin. Pharmacol.* 6: 329-338.
92. Mileson B. E., Ehrmann M. L., Schwartz R. D. (1992) Alterations in the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel following transient forebrain ischemia in the gerbil. *J. Neurochem.* 58: 600- 607.
93. Morrisett R. A., Mott D. D., Lewis W. A. (1991) GABA<sub>B</sub>-receptor-mediated inhibition of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 11:203-209.
94. Mrsulja B. B., Lust W. D., Mrsulja B. J., Passonneau J. V., Klatzo I. (1971) Post-ischemic changes in certain metabolites following prolonged ischemia in the gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.* 26: 1099-1103.
95. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I. (1976) Catecholamines in brain ischemia-effects on methyl-p-tyrosine and pargyline. *Brain Res.* 104: 373-378.
96. Murphy A. N., Fiskum G., Beal M. F. (1999) Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 231-245.
97. Nelson-Krauze D. C., Howard B. D. (1978) Energy utilization in the induced release of  $\gamma$ -aminobutyric acid from synaptosomes. *Brain Research.* 147: 91-105.
98. Niznik H. B. (1987) Dopamine receptors: molecular structure and function. *Mol. Cell Endocrinol.* 54: 1-22.
99. Ohamori Y., Hirouchi M., Taguchi J., Kuriyama K. (1990) Functional coupling of the gamma-aminobutyric-acid B receptor with calcium ion channel and GTP-binding protein and its alteration of the gamma-amino-butyric-acid B receptor. *J. Neurochem.* 54: 80-85.
100. Organic peroxides. Edited W. Ando. John Wiley and Sons (1992), London.
101. Ouyang Y. B., Tan Y., Liu C. L., Martone M. E., Siesjo B. K., Hu B. R. (1999) Survival-and-death- promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of



- cytochrome c, and activation of caspase-like proteases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 1126-1135.
102. Packer L., Prilipko L., Christen Y. (1992) Free radicals in the brain. Springer-Verlag.
103. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M. (1981) Net uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid by a high-affinity system of rat brain synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1242-1244.
104. Pastuszko A., Wilson D.F., Erecińska M. (1982) Neurotransmitter metabolism in rat brain synaptosomes: effect of anoxia and pH. *J. Neurochem.* 38: 1657-1667.
105. Pluta R., Lossinsky A. S., Mossakowski M. J., Faso L., Wisniewski H. M. (1991) Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death pathophysiology and cerebrovasenlor pathology. *Acta Neuropathol.*, 83: 1-11.
106. Pluta R., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Mossakowski M. J. (1994) Early blood-brain barrier changes in rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Research*, 663: 41-52.
107. *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna.* pod red. W. Kostowskiego i W. Pużyńskiego, PZWL (1980), Warszawa.
108. Pulsinelli W. A., Brierley J. B. (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272.
109. Raiteri M., Bonnano G., Gemignani A., Pende M., Vallebuona F., Lanza M. (1992) Pharmacologically distinct GABA<sub>B</sub> receptor subtypes modulate neurotransmitter release in the rat brain cortex. *W GABAergic Synaptic Transmission.* Ed G. Biggio. A. Concas, E. Costapstr 205-216. New York: Reven. 469.
110. Rafałowska U. (1979) Rat brain synaptosomes: A preparation with high [ATP]/[ADP]. *Fed. Proc.* 38: 1514.
111. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F. (1980) Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembutal-anesthetized and nonanesthetized animals. *J. Neurochem.*, 94: 1380- 1386.
112. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F. (1980) The effect of acute hypoxia on synaptosomes from rat brain. *J. Neurochem.* 94: 1160-1165.
113. Rafałowska U., Liu G. J., Floyd R. A. (1989) Peroxidation induced changes in synaptosomal transport of dopamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Free Radical Biology & Medicine* 6: 485-492.
114. Rafałowska U., Sulkowski G., Waśkiewicz J., Januszewski S., Kapuściński A. (2000) Alteration of dopamine transport and dopamine D<sub>2</sub> receptor binding in the brain induced by early and late consequences of global ischaemia caused by cardiac arrest in the rat. *Resuscitation* 47: 195-201.



115. Rafałowska U., Wałajtys-Rode E. (1991) Peroxidation-induced changes of histamine metabolism and transport of its receptor histidine in rat brain synaptosomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 10: 23-28.
116. Rafałowska U., Zitting A., Savolainen H. (1986) Metabolic changes in rat brain synaptosomes after exposure to sulfide in vivo. *Toxicology Letters* 34: 193-200.
117. Ratan R. R., Murphy T. M., Baraban M. J. (1994) Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* 62: 376-379.
118. Reiter R. J. (1994) Free radicals, melatonin, and cellular antioxidative defence mechanisms. *Path. Immun. Neuroendocrin. Comm. Cir.* 35: 135-160.
119. Rosenstein R. E., Chuluyan H. E., Cardinali D. P. (1990) Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J. Neural Transm.* 82: 131-40.
120. Safar P. (1993) Cerebral resuscitation after cardiac arrest: research initiatives and future directions. *Ann. Emerg. Med.* 22: 324-349.
121. Safar P., Bircher N. G. (1980) *Cardiopulmonary-cerebral resuscitation*. W.B. Saunders and Co Ltd.
122. Saint D. A., Thomas T., Gage P. W. (1991) GABA<sub>B</sub> agonist modulate a transient potassium current in cultured mammalian hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 118: 9-12.
123. Salomon E. P., Berg L. R., Martin D. W., Ville C. A. (1996) *Biologia Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa*.
124. Santiago M., Machado A., Cano J. (1996) Dopamine release and its regulation in the CNS. *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators*. 41- 63. Ed. by Trevor W. Stone
125. Schmidley J. W. (1990) Free radical in central nervous system ischemia. *Stroke* 21: 1086-1090.
126. Schwartz-Bloom R. D., Sah R. (2001) Gamma-aminobutyric acid (A) neurotransmission and cerebral ischemia. 77: 353-71.
127. Schwartz J., Grió B., Martres M. P., Sokoloff P. (1992) The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology. *Neuroscience* 4: 99-108.
128. Schwartz R. D., Yu X. (1992) Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res.* 585: 405-10
129. Seeman P., Niznik H. B., Guan H. C., Booth. G., Ulpain C. (1989) Link between D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Prac. Natl. Acad. Sci.* 86: 10156-10160



130. Shohami E., Beit-Yannai E., Horowitz M., Koher R. (1997) Oxidative stress in closed-head injury: Brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 1007-1019.
131. Siesjo B. K. (1981) Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 155-185.
132. Siesjo B. K. (1993) A new perspective on ischemic brain damage? *W Progress in Brain Research: Neurobiology of ischemic brain damage.* (Eds. Kogure K., Hossman K. A. And Siesjo B. K.) Elsevier, Amsterdam, 96, 1-13.1991
133. Siesjo B. K., Bengtson F. (1989a) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1: 165-211.
134. Siesjo B. K., Bengtson F. (1989b) Calcium fluxes, calcium antagonist and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. A unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 127-140.
135. Siesjo B. K., Wieloch T. (1985) Cerebral metabolism in brain ischemia: neurochemical basis for therapy. *Br. J. Anaesth.* 57: 47-62.
136. Smith M. L., Bendek G., Dahlgren N., Rosen I., Wieloch T., Siesjo B. K. (1984) Models for studying long term recovery following forebrain ischemia in the rat. II. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol. Scand.* 69:385-401.
137. Solenski N. J., Di Pierro C. G., Trimmer P. A., Kwan A. L., Helms G. A. (2002) Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke* 33: 816-824.
138. Stamford J. A., Isaac D., Hicks C. A., Ward M. A., Osborn D. J., O'Neill M. J. (1999) Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. *835: 229-40*
139. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J. W. (1972) Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropat. Pol.* 10: 447-455.
140. Stoppini L., Buchs P. A., Muller D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37: 173-182.
141. Sulkowski G., Waśkiewicz J., Januszewski S., Rafałowska U. (2001) Alteration of GABA transport and GABA<sub>B</sub> receptor in the brain induced by early and late consequences of global ischaemia caused by cardiac arrest in the rat. *Folia Neuropathol. Suppl. A* 25-31.
142. Sulkowski G., Waśkiewicz J., Walski M., Januszewski S., Rafałowska U. (2002) Synaptosomal susceptibility on global ischaemia caused by cardiac arrest correlated with early and late times after recirculation in rats. *Resuscitation* 52: 203 –213.
143. Tang X. L., Kaur H., Sun J. Z., Qiu Y., Park S. W., Scheleman M., Halliwell B. (1995) Effect of the hydrophilic alpha-tocopherol analog MDL 74, 405 on detection of hydroxyl radicals in stunned myocardium in dogs. *Amer. Heart J.* 130: 940- 948.



144. Thomas E. L., Fishman M. (1986) Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. *J. Biol. Chem.* 261: 9694-9702.
145. Toner C. C., Stamford J. A. (1996) Real time measurement of dopamine release in an in vitro model of neurostriatal ischaemia. *J. Neurosci. Methods* 67: 133-40
146. Troeger M. B., Rafałowska U., Erecińska M. (1984) Effect of oleate on neurotransmitter transport and other plasma membrane functions in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 6: 1735-1742.
147. Waldmeier P. C., Baumann P. A. (1990) GABA<sub>B</sub> receptors and transmitter release. 29: 63-80.
148. Waldmeier P. C., Wicki P., Feldtrauer J. J., Baumann P. D. (1988) Potential involvement of a baclofen-sensitive autoreceptor in the modulation of the release of endogenous GABA from rat brain slices in vitro. *Arch. Pharmacol.* 337: 289-95.
149. Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H. M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatin kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostatic. *Biochem. J.*, 281: 151-170.
150. Walski M., Celary-Walska R., Borowicz J., (1991) Studies of the hypothalamus and secretory nuclei of rat in the remote period following clinical death. *J. Hirnf.* 32; 687-698.
151. Watson B. D., Busto R., Goldberg W. J., Santiso M., Yoshida S., Ginsberg M. D. (1984) Lipid peroxidation in vivo induced by reversible global ischemia in rat brain. *J. Neurochem.*, 42: 268-274.
152. Weinberger J., Cohen G., Nieves-Rosa J. (1983) Nerve terminal damage in cerebral ischemia: greater susceptibility of catecholamine nerve terminals relative to serotonin nerve terminals. *Stroke*, 14: 986-989.
153. Wilson J. X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role of astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1149-1163.
154. Wilson D. F., Erecińska M., Drown C., Silver I. A. (1979) The oxygen dependence of cellular energy metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 465-493.
155. Wisniewski H. M., Pluta R., Lossinsky A. S., Mossakowski M. J. (1995) Ultrastructural studies of cerebral vascular spasm after cardiac arrest-related global cerebral ischemia in rats. *Acta Neuropathol.* 90: 432-440.
156. Yamamoto K., Hayakawa T., Mogami H., Akai F., Yanagihara T. (1990) Ultrastructural investigations of the CA1 region of the hippocampus after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 80: 487-492.
157. Yoshida S., Inoh S., Asano T., Sano K., Kubota M., Shomazaki H. (1980) Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. *J. Neurosurg.* 53: 323-331.



158. Zalewska T., Domańska-Janik K. (1996) Autophosphorylation as a possible mechanism of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibition during ischemia. *Neuroche. Int.* 28: 175-181.
159. Zervas N. T., Hori H., Negora M., Wurtman R., Larin F, Lavyne M. (1974) Reduction in brain dopamine following experimental ischemia. *Nature* 247: 283-284.
160. Zucarello M., Anderson D. K. (1993) Interaction between free radicals and excitatory aminoacids in the blood-brain barrier disruption after iron injury in the rat. *J. Neurotrauma* 10: 397-403.
161. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S.H. (1974) Gama-amino-butyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4802-4807.



## 8. STRESZCZENIE

Niedokrwienie o.u.n. jest zjawiskiem bardzo groźnym dla organizmu. W zależności od przyczyny i stopnia niedokrwienia występują zaburzenia pracy mózgu o różnym natężeniu. W dotychczasowej literaturze brak było spójnych danych dotyczących wpływu zatrzymania akcji serca i warunków po przywróceniu krążenia na budowę, metabolizm energetyczny i funkcję synaptosomów oraz zawartych w nich mitochondriów. Biorąc to pod uwagę, jak również fakt, że dotychczasowe wyniki były fragmentaryczne i trudne do porównania ze względu na używanie różnych modeli niedokrwienia, podjęto kompleksowe badania na modelu wprowadzonym przez Korpaczowa. Ten model doświadczalny wiernie odzwierciedla warunki niedokrwienia jakie spotyka się podczas zawału serca i w trakcie reanimacji ludzi. W oparciu o ten model w niniejszej pracy starano się ocenić zmiany morfologiczne, metaboliczne i funkcjonalne wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgu oraz warunkami wczesnych i późnych okresów po resuscytacji w zakończeniach nerwowych mózgu (synaptosomach) i obecnych w nich mitochondriach synaptycznych.

Stosując 10 minutową ischemię zaobserwowano zmiany morfologiczne w zakończeniach nerwowych mózgu. Polegały one głównie na drastycznej redukcji ilości pęcherzyków synaptycznych oraz zmianach morfologii mitochondriów objawiających się zmianami gęstości macierzy mitochondrialnej, rozdęciami i pęcznieniem grzebieni mitochondrialnych oraz przerwaniem ciągłości zarówno wewnętrznej jak i zewnętrznej błony mitochondrialnej. Po 7 dniach od resuscytacji obraz morfologiczny zakończeń nerwowych był taki jak obraz kontrolny. Wyżej opisane zmiany obserwowano w próbkach tkanki pobranej bezpośrednio z mózgu, jak i w izolowanych frakcjach synaptosomalnych a obrazy morfologiczne zakończeń nerwowych nie różniły się między sobą w obrębie tej samej grupy doświadczalnej. W próbkach tkanki pobranej z obszaru CA1 hipokampa w grupach



przeżywających 24 godziny i 7 dni po przywróceniu krążenia po 10 min ischemii znajdowano tzw. „ciemne neurony” co wskazuje na ciągłe występowanie procesów obumierania komórek nerwowych.

Zmianom morfologicznym odpowiadały zmiany metaboliczne. Po 10 min ischemii oraz we wczesnych okresach po przywróceniu krążenia (1 godzina) obserwowano statystycznie znamienne spadki poziomów ATP i CrP oraz wzrost poziomów ADP i Cr. Po 24 godzinach od momentu przywrócenia krążenia poziomy związków energetycznych były zbliżone do wartości kontrolnych, a po 7 dniowej resuscytacji osiągały wartości kontrolne. Podobne tendencje w poszczególnych grupach doświadczalnych obserwowano w pobieraniu tlenu przez mitochondria obecne w synaptosomach.

Warunki całkowitego niedotlenienia i resuscytacji zaburzały również podstawową funkcję zakończeń nerwowych - neurotransmisję. Zaobserwowano około 25% spadek w wychwycie neuroprzekazników (GABA i dopaminy) przez synaptosomy uzyskane ze szczurów po 10 minutowej ischemii w stosunku do kontroli. W miarę wydłużania czasu po reperfuzji wartości te wykazywały tendencje powrotu do wartości kontrolnych, osiągając je po 7 dniach po przywróceniu krążenia. Niedokrwienie oraz warunki wczesnych okresów po przywróceniu krążenia (1 godzina, 24 godziny) zmniejszały drastycznie uwalnianie z synaptosomów zarówno GABA jak i dopaminy. W dłuższych czasach po przywróceniu krążenia (7 dni) uwalnianie GABA powracało do wartości kontrolnych, natomiast uwalnianie dopaminy nadal pozostawało w znacznym stopniu zmniejszone. Badania kinetyki receptora dopaminowego  $D_2$  wykazały, że bezpośrednio po 10 minutowej ischemii nie obserwowano zmian parametrów kinetycznych receptora  $D_2$ . Przywrócenie krążenia (1 godzina) zmniejszało wartość  $K_D$ , co świadczy o wzroście powinowactwa ligandu do receptora, oraz zmniejszało liczbę miejsc wiążących  $B_{max}$ . Zmiany te pogłębiały się znacznie po 24 godzinach i po 7 dniach bez tendencji powrotu do wartości kontrolnych. W przypadku



receptora GABAergicznego  $GABA_B$  wartości  $K_D$  i  $B_{max}$  zmniejszały się znacznie zaraz po niedokrwieniu i w krótkich czasach po przywróceniu krążenia (1 godzina i 24 godziny). W przeciwieństwie do receptora dopaminowego  $D_2$ , po 7 dniach od przywrócenia krążenia wartości parametrów kinetycznych receptora  $GABA_B$  powracały do wartości kontrolnych.

Wyniki badań wykazały, że całkowite czasowe niedokrwienie wywołane zatrzymaniem akcji serca oraz warunki panujące po resuscytacji prowadzą do zmian morfologicznych, metabolicznych i funkcjonalnych w zakończeniach nerwowych ośrodkowego układu nerwowego szczura. Pierwotną przyczyną tych zaburzeń jest prawdopodobnie obniżony stan energetyczny i uszkodzenia mitochondriów synaptycznych.

Obserwowany po 7 dniowej reperfuzji powrót do wartości kontrolnych parametrów kinetycznych receptora  $GABA_B$  i normalizacja transportu GABA z jednocześnie utrzymującymi się zaburzeniami w uwalnianiu dopaminy i kinetyce receptora dopaminowego  $D_2$  świadczy o różnej, specyficznej dla poszczególnych zakończeń nerwowych wrażliwości na warunki całkowitego zatrzymania krążenia i reperfuzji. Utrzymujące się po 7 dniach od reperfuzji zaburzenia w neurotransmisji dopaminergicznej mogą być przyczyną trudności w przywróceniu całkowitej sprawności ośrodkowego układu nerwowego.