

## ZMENY FOSFOLIPIDOV PO OPAKOVANOM NAVODENÍ SUBLETÁLNEJ ISCHÉMIE MIECHY KRÁLIKA

LUKÁČOVÁ N., JALČ P., MARŠALA J.

### CHANGES OF PHOSPHOLIPIDS INDUCED BY REPEATED SUBLETHAL ISCHAEMIA OF SPINAL CORD IN A RABBIT

**Background:** Degradation of membrane bound phospholipids in CNS during ischaemia begins with extreme rapidity. Sublethal ischaemia influences ischaemic tolerance in the affected neurons and is stressful enough to induce neuronal changes such as postischaemic hypoperfusion, transient suppression of protein synthesis and induction of stress (HSP) proteins. It seems, that the nature of factors responsible for ischaemic tolerance may involve the activation of multiple different systems.

**Main purpose:** The aim of this study was to investigate the changes of phospholipids in gray matter regions of spinal cord following sublethal ischaemia repeated in long intervals of reperfusion.

**Methods:** Male rabbits, weight range 2.5–3.5 kg were used in the experiment. They were divided in following groups: 1. control animals; 2. animals subjected to 25 min ischaemia; 3. animals subjected to 25 min ischaemia and 3 h of reperfusion; 4. animals subjected to sublethal (8–8–9 min) ischaemia repeated in long-lasting (8–8–24 h) intervals of reperfusion. Phospholipids were separated by thin layer chromatography, lipidic phosphorus was assessed spectrophotometrically.

**Results:** Sublethal ischaemia repeated in long-lasting intervals of reperfusion increased the concentration of phospholipids to control levels in all gray matter regions. The resynthesis of PC, PE, PS and SM significantly prevailed control values in the dorsal horns, of PC and PE in the ventral horns and of PC in the intermediate zone.

**Conclusions:** An excessive renewal of phospholipids after sublethal ischaemia repeated in longer intervals of reperfusion was most pronounced in the dorsal horns of the spinal cord and can be the result of many defensive cellular mechanisms. (Fig. 1, Tab. 2, Ref. 30.)

**Key words:** phospholipids, sublethal ischaemia, gray matter regions, spinal cord.

**Úvod do problematiky:** Degradácia membránovo viazaných fosfolipidov v CNS počas ischémie sa začína mimoriadne rýchlo. Subletálna ischémia vplýva na vývoj ischemickej tolerance a zároveň môže podmieňovať neurónové zmeny, ako sú postischemická hypoperfúzia, prechodné potlačenie syntézy proteínov a aktivácia stresových (HSP) proteínov. Zdá sa, že faktory podmieňujúce ischemickú toleranciu môžu zahŕňať aktiváciu mnohých rozdielnych systémov.

**Cieľ práce:** Cieľom tejto práce bolo sledovať zmeny fosfolipidov v regiónoch sivej hmoty miechy po navodení subletálnej ischémie opakovanej v dlhých intervaloch reperfúzie.

**Metódy:** V experimente sa použili králiky (samce) s hmotnosťou 2,5–3,5 kg. Zvieratá boli v experimente usporiadané do nasledujúcich skupín: 1. kontrola, 2. 25 min ischémia, 3. 25 min ischémia a 3 h recirkulácia, 4. subletálna (8–8–9 min) ischémia opakovaná v dlhých (8–8–24 h) intervaloch reperfúzie. Fosfolipidy boli separované tenkovrstvovou chromatografiou, lipidický fosfor sa meral spektrofotometricky.

**Výsledky:** Subletálna ischémia opakovaná v dlhých intervaloch reperfúzie zvýšila koncentráciu fosfolipidov na úroveň kontrolných hodnôt vo všetkých regiónoch sivej hmoty. Obnova PC, PE, PS a SM signifikantne prevýšila kontrolné hodnoty v zadných rohoch, PC a PE v predných rohoch a PC v zóna intermedia.

**Záver:** Nadmerná obnova fosfolipidov po subletálnej ischémii opakovanej v dlhých intervaloch reperfúzie bola najvýraznejšia v zadných rohoch miechy a môže byť výsledkom aktivácie mnohých obranných mechanizmov v bunke. (Obr. 1, tab. 2, lit. 30.)

**Kľúčové slová:** fosfolipidy, subletálna ischémia, štruktúry sivej hmoty, miecha.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s. 359–363

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 359–363

úlohu pri prenose nervových vzruchov. Pretože prenos informácií medzi bunkami zintenzívňuje rýchlosť metabolického obratu niektorých fosfolipidov, porušenie ich metabolizmu môže počas ischémie nepriaznivo ovplyvniť funkčnú aktivitu nervových buniek. Základnou podmienkou pre čiastočnú alebo úplnú funkčnú a metabolickú obnovu nervového tkaniva po ischémii je dostatočná úroveň prietoku krvi počas recirkulácie, no pod podmienkou, že ischémia bola primerane krátka. Nervové bunky závislé od nepretržitého a dostatočného prívodu kyslíka disponujú regulačnými mechanizmami, ktoré sa v podmienkach ohrozenia ich funkcie dokážu primerane aktivovať. Súčasné poznatky ukazujú, že kým štvorciová 3-minútová ischémia mozgu potkana je dostatočne dlhá na vyvolanie mechanizmov spôsobujúcich oneskorené, postupne sa šíriace odumieranie nervových buniek v selektívne vulnérabilných častiach mozgu, 2-minútová ischémia je pre nervové bunky v určitých oblastiach mozgu subletálna (Kitagawa a spol., 1990). Výsledky experimentov z posledného obdobia ukazujú, že opakované navodenie subletálnej, paraplégii nevyvolávajúcej ischémie v spojení s dlhšími intervalmi recirkulácie (Kato a spol., 1991), alebo predliečenie subletálnou ischémiou (Munayama a spol., 1998) aktivuje obranné mechanizmy a pozitívne vplyva na vývoj ischemickej tolerancie.

V súčasnosti existuje mnoho dôkazov o tom, že zastúpenie neurotransmiterov, aminokyselín a iných pre nervovú sústavu významných zložiek je priamo späté s výskytom určitých neuroónových hotovostí a ich pomerne presnou laminárnou reprezentáciou v mieche. Preto sme pre sledovanie zmien fosfolipidov po opakovanom navodení subletálnej ischémie použili miechu kráľika delenú na zadné rohy, zónu intermedia a predné rohy. Predpokladali sme, že takáto analýza miechy prihliadajúca na jej laminárnu architektóniku môže poslúžiť ako jemné rozlišovacie vodidlo umožňujúce charakterizovať biochemické a funkčné zvláštnosti jednotlivých neuroónových poolov.

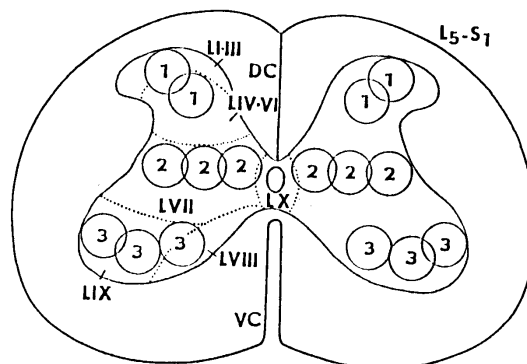
### Materiál a metódy

V pokusoch sme použili dospelé kráľiky kmeňa Činčila (samce) s hmotnosťou 3,0–3,5 kg. Parciálnu ischémiu miechy sme navodili oklúziou abdominálnej aorty pod odstupom ľavej renálnej artérie (Zivina a spol., 1982). Sledovaný model ischémie spôsobuje poškodenie dolných lumbosakrálnych segmentov miechy, manifestuje sa morfológickými zmenami na neuroónoch a funkčným poškodením až paraplégiiu zadných končatín.

V pokuse sme zvieratá rozdelili na nasledujúce skupiny: 1. kontrolné zvieratá ( $n=5$ ), 2. zvieratá, ktorým sme navodili 25-minútovú ischémiu ( $n=5$ ), 3. zvieratá s 25-minútovou ischémiiou a 3-hodinovou recirkuláciou ( $n=5$ ), 4. zvieratá, ktorým bola opakovaně navodená subletálna (8–8–9 min) ischémia v 8-hodinových intervaloch s 24 h prežívaním ( $n=5$ ).

Po jednotlivých experimentálnych zásahoch bola miecha z miechového kanála v oblasti  $L_5-S_1$  vytlačená pomocou injekčnej striekačky (20 ml) naplnenej ľadovým fyziologickým roztokom, opatrne zmrazená a pre ďalšie spracovanie uchovávaná v tekutom dusíku. Nasledujúci deň boli z rezov lumbosakrálnej miechy (600  $\mu\text{m}$ ) odobrané vzorky: zadné rohy, zóna intermedia a predné rohy (obr. 1).

Fosfolipidy (fosfatidylchólin — PC, fosfatidyletanolamín — PE, fosfatidylserín — PS, fosfatidylinozitol — PI a sfingomyelín



**Obr. 1.** Schematický náčrt predstavujúci spôsob odberu vzoriek miechy. 1 — zadné rohy (laminy LI—LVI), 2 — zóna intermedia (lamina VII a lamina LX), 3 — predné rohy (laminy LVIII—LIX), DC — zadné stĺpce, VC — predné stĺpce.

**Fig. 1.** Schematic drawing representing the mode of the spinal cord tissue sampling. 1 — dorsal horns (laminae LI—LVI), 2 — intermediate zone (lamina VII and lamina LX), 3 — ventral horns (laminae LVIII—LIX), DC — dorsal columns, VC — ventral columns.

— SM) boli separované do jednotlivých tried na TLC platniach, opakovane vyvíjaných (4x) v zmesi chloroform:metanol:izopropanol: 0,25 % KCl:octan etylatý (30:9:25:6:18) (Bradová a Šmid, 1990). Jednotlivé fosfolipidy boli stanovené metódou podľa Rousera a spol. (1970). Výsledky sme štatisticky vyhodnotili pomocou testu ANOVA.

Pre vyhodnotenie funkčnej aktivity kráľikov sme použili trojbodové hodnotenie podľa Zivina a spol. (1982): stupeň 0 — bez neurologického poškodenia; stupeň 1 — čiastočný neurologický deficit; stupeň 2 — úplná paraplégia zadných končatín.

### Výsledky

Pri porovnaní zastúpenia fosfolipidov v štruktúrach sivej hmoty miechy sme zistili, že napriek výraznej hydrolyze fosfolipidov počas 25 min ischémie, najmenej významný pokles sa zaznamenal v zadných rohoch. Hladina PI, ktorý sa počas ischémie degraduje už v priebehu niekoľkých sekúnd, nebola v zadných rohoch výrazne znížená; naopak, jeho hladina sa zvýšila o 12 %.

Obnova prívodu krvi do tkaniva spôsobila kontinuálny nárast hodnôt fosfolipidov vo všetkých regiónoch sivej hmoty miechy okrem nárastu hladiny PI v predných rohoch. PE, PS a PI v zadných rohoch a PC v zóna intermedia po 3 h recirkulácii zaznamenali úpravu poklesu ich hladín takmer na úroveň kontrolných hodnôt. U zvierat podrobených subletálnej ischémii (8–8–9 min) opakovanej v 8 h intervaloch s 24 h prežívaním sa zaznamenal nárast všetkých hodnôt fosfolipidov ku kontrolným hodnotám. Pri porovnaní obnovy fosfolipidov v regiónoch miechy aj po tomto experimentálnom zásahu sme opäť pozorovali najvýraznejšiu obnovu fosfolipidov (PC, PE, PS a SM) v zadných rohoch miechy. Kým obnova PC významne prevyšovala kontrolné hodnoty vo všetkých regiónoch miechy, nadmerná resyntéza PE sa zaznamenala len v predných a zadných rohoch (tab. 1).

**Tab. 1. Zastúpenie fosfolipidov v regiónoch lumbosakrálnej miechy.**  
**Tab. 1. Distribution of phospholipids in lumbo-sacral spinal cord regions.**

Regióny miechy		µmol P/mg protein			
		Kontrola	25'IS	25'IS/3h R	8'IS/8h R 8'IS/8h R 9'IS/24h R
Spinal cord regions		Control			
Zadné rohy	PC	3,919±0,150	<b>1,379±0,186</b>	<b>2,078±0,291</b>	<b>5,405±0,281</b>
	PE	3,715±0,270	<b>1,546±0,142</b>	3,166±0,356	<b>4,935±0,189</b>
	PS	1,677±0,167	<b>1,035±0,138</b>	1,491±0,282	<b>3,237±0,471</b>
Dorsal horns	PI	0,595±0,039	0,670±0,090	0,607±0,049	0,695±0,047
	SM	2,541±0,042	<b>0,899±0,089</b>	<b>1,452±0,093</b>	<b>4,735±0,241</b>
Zóna intermedia	PC	2,483±0,111	<b>1,204±0,060</b>	2,396±0,073	<b>3,658±0,206</b>
	PE	3,875±0,255	<b>1,544±0,135</b>	<b>3,128±0,167</b>	4,518±0,433
	PS	2,368±0,098	<b>0,759±0,069</b>	<b>1,413±0,128</b>	2,461±0,066
Intermediate zone	PI	0,711±0,042	<b>0,349±0,043</b>	<b>0,416±0,033</b>	0,753±0,021
	SM	1,965±0,203	<b>0,616±0,034</b>	<b>1,122±0,072</b>	2,248±0,159
Predné rohy	PC	2,308±0,124	<b>1,047±0,095</b>	<b>1,433±0,034</b>	<b>3,297±0,234</b>
	PE	3,050±0,177	<b>1,088±0,102</b>	<b>1,505±0,160</b>	<b>4,658±0,268</b>
	PS	1,485±0,091	<b>0,593±0,062</b>	<b>0,837±0,037</b>	1,331±0,020
Ventral horns	PI	0,720±0,065	<b>0,365±0,037</b>	<b>0,318±0,024</b>	0,572±0,029
	SM	1,251±0,014	<b>0,348±0,057</b>	<b>0,715±0,046</b>	1,078±0,103

Is — ischémia R — reperfúzia  
ischaemia reperfusion

Výsledky predstavujú aritmetický priemer (5)±SEM, p<0,05 v porovnaní s kontrolou.  
Data are given as means (5)±SEM, p<0.05 with respect to control.

**Tab. 2. Rozsah neurologického poškodenia po ischémii a recirkulácii**  
**Tab. 2. Patterns of neurological deficit after ischaemia and reperfusion.**

Experimentálne skupiny	Bez neurologického poškodenia (stupeň 0)	Čiastočné neurologické poškodenie (stupeň 1)	Úplné neurologické poškodenie (stupeň 2)
Experimental groups	No neurologic impairment (grade 0)	Partial neurologic impairment (grade 1)	Total neurologic impairment (grade 2)
	n	n	n
Ischémia 25 min	0	5	0
Reperfúzia 3h			
Ischaemia 25 min			
Reperfusion 3h			
Ischémia (8-8-9min)	2	2	1
Reperfúzia (8-8-24 h)			
Ischaemia (8-8-9 min)			
Reperfusion (8-8-24 h)			

Pre hodnotenie neurologického poškodenia po 25 min ischémii a 3 h recirkulácii a po navodení subletálnej ischémie opakovanej v 8 h intervaloch s 24 h prežívaním (tab. 2) sme pokusných králikov neurologicky vyšetrili. Zamerali sme sa na hodnotenie motorickej funkcie zadných končatín. U všetkých králikov podrobených 25 min ischémii a 3 h recirkulácii sa pozoroval čiastočný neurologický deficit, zvieratá mali spastické zadné končatiny a neboli schopné skákať. Dve zvieratá z piatich, podrobených opako-

vane navodenej subletálnej ischémii, boli bez neurologického poškodenia, kým u dvoch ďalších králikov sa zaznamenal čiastočný neurologický deficit. Úplná paraplégia zadných končatín sa v tejto experimentálnej skupine zaznamenala len u jedného králika.

## Diskusia

Pokles produkcie energetických fosfátov počas ischémie je primárnym faktorom, ktorý okrem iného nepriaznivo vplyva na priebeh transportných procesov na bunkových membránach (Solyakov a spol., 1995) a spôsobuje zmeny v štruktúre a fluidite membrán (Kaplán a spol., 1995). Nervové bunky majú na udržanie fosfolipidovej hladiny vyvinutý aktívny deacylačno-reacylačný mechanizmus, ktorý zabezpečuje či už metabolicky aktívny fosfatidylcholínový pool pre synaptickú aktivitu alebo fosfatidylserínový a fosfatidylinozitolový pool zahrnutý v prenose extracelulárnych signálov. Výsledky našej práce ukázali, že aktivácia Ca<sup>2+</sup>-závislých fosfolipáz počas 25 min ischémie spôsobila významnú degradáciu štruktúr sivej hmoty miechy okrem poklesu PI v zadných rohoch. Je známe, že fosforylovaná zložka fosfatidylinozitolu, PIP<sub>2</sub> ponúka dve signálne molekuly: DG, ktorý aktivuje proteinkinázu C a iP<sub>3</sub>, ktorý sa viaže na iP<sub>3</sub> receptory a uvoľňuje Ca<sup>2+</sup> z vnútrobunkových zásob (Berridge a spol., 1983). Väzbové miesta pre iP<sub>3</sub> sú v mozgu a mieche distribuované heterogénne a sú vysoko citlivé na zvýšenie koncentrácie vápnikových iónov. Kým selektívne vulnerabilné štruktúry mozgu (CA1 pole hipokampu) sú *de norma* bohato zastúpené iP<sub>3</sub> receptormi (Kato a spol., 1994), v štruktúrach CNS odolných voči ischémii (CA3, gyrus dentatus, zadné rohy miechy) tieto receptory takmer chýbajú (Worley a spol., 1987). Zvýšená hladina intracelulárneho vápnika počas ischémie

inhibuje interakciu  $iP_3$  s jeho receptormi, a tak spätnoväzbovým mechanizmom môže regulovať jeho uvoľnenie. Dá sa predpokladať, že zachovanie PI v zadných rohoch súvisí s lokalizáciou  $iP_3$  receptorov. Celkové mechanizmy prispievajúce k zmenám v koncentrácii fosfolipidov po obnovení cirkulácie nie sú dostatočne známe. Zdá sa, že transportné mechanizmy sú v dôsledku zníženej produkcie energetických fosfátov počas ischémie poškodené a nestačia na obnovu porušenej homeostázy. Produkty štiepenia fosfolipidov poškodzujú membrány priamo alebo sa metabolizujú na biologicky aktívne látky a spôsobujú zhoršenie primárneho poškodenia (Lukáčová a spol., 1997; Kozinková a spol., 1997; Kuračka a spol., 1997). Predpokladáme, že táto skutočnosť ovplyvňuje nedostatočnú obnovu niektorých fosfolipidov v regiónoch miechy aj v priebehu 3 h recirkulácie. Rôznorodosť syntézy PI môže byť ovplyvnená znížením aktivity tých receptorových systémov, ktoré stimulujú aktivitu fosfolipázy C. Aktivácia a degradácia cholínergického systému a PI obnovy závisí od intenzity ischémie a je regionálne závislá. Vyššia obnova fosfolipidov, obzvlášť vnútrmembránových v zadných rohoch sivej hmoty počas 3 h recirkulácie môže byť výsledkom vyššieho prietoku krvi v tejto štruktúre (Torre, 1984; Rubinstein a Arbit, 1990), a teda vyššej ponuky energie potrebnej na znovuzabudovanie odštiepených mastných kyselín do fosfolipidov. Rovnako sa dá predpokladať, že zachovanie membránových fosfolipidov v zadných rohoch súvisí s prítomnosťou NO syntetizujúcich a NO uvoľňujúcich neurónov, ktoré sú početne zastúpené v povrchových častiach zadných rohov (Maršala a spol., 1997; Maršala a spol., 1998) a ktoré ako potenciálny vazodilatátor (Blot a spol., 1994) značne prispievajú k nepretržitému, aj keď zníženému prietoku krvi. Odlišná hustota NO syntetizujúcich a NO uvoľňujúcich neurónov sa zaznamenala v predných rohoch a v laterálnej časti zona intermedia, kde sú tieto neuróny zastúpené v malom počte, alebo takmer chýbajú (Vizard a spol., 1994; Maršala a spol., 1997). Morfológické štúdie zároveň ukazujú, že v tomto regióne sú zachované niektoré neurónové populácie (Maršala spol., 1989; Maršala a spol., 1991). Ak je zachované endoplazmatické retikulum ktoré je miestom syntézy fosfolipidov, je zabezpečená aj ich obnova.

Predchádzajúce výsledky ukázali, že subletálna, paraplégia nevyvolávajúca ischémia miechy (10 min) spôsobí nesignifikantné zníženie fosfolipidov (Lukáčová a spol., 1996). Ponuka energetických substrátov po obnovení cirkulácie po subletálnej ischémii je schopná zabezpečiť reacyláciu uvoľnených mastných kyselín a úpravu hladín fosfolipidov. Výsledky mnohých experimentov ukazujú, že subletálna ischémia síce nevyvolá poškodenie buniek, ale ako stresový faktor môže podmieňovať postischemickú hypoperfúziu (Kato a spol., 1991), prechodné potlačenie syntézy proteínov (Araki a spol., 1991) a aktiváciu stresových (HSP) proteínov (Kirino a spol., 1991). Navyše pri vývoji ischemickej tolerancie má dôležitú úlohu aktivita enzýmových antioxidantov. Kato a spol. (1995) zistili, že subletálna ischémia uľahčuje postischemický návrat konštitutívnej (CuZnSOD) a indukovateľnej (MnSOD) superoxidodismutázy.

Keď sa v našich experimentoch použila subletálna ischémia opakovaná v 8 h intervaloch, hladiny všetkých fosfolipidov sa vrátili ku kontrolným hodnotám, mnohé dokonca prevyšovali kon-

trólné hodnoty. Hlavný zdroj syntézy fosfolipidov v tomto experimente môže pochádzať z nadmernej mitotickej a sekrečnej aktivity gliových a endotelových buniek. Bunky mikroglie, ktoré plnia funkciu makrofágov sa pri poškodení nervového tkaniva aktivujú, migrujú k miestu poškodenia a fagocytujú zvyšky poškodeného tkaniva. Zistilo sa, že 24 h po 20 min oklúzii abdominálnej aorty sa objavuje veľký počet reaktívnych mononukleárných fagocytov len v častiach poškodenej sivej hmoty na úrovni lumbo-sakrálnych segmentov (Giulian a Robertson, 1990). Okrem toho sa zaznamenal výskyt látok, ktoré pomáhajú fagocytujúcim bunkám aktívne prenikať cez steny kapilár (vazoaktívne peptidy, catecholamíny, biogénne amíny, histamíny), ktoré zvyšujú ich pohyblivosť (leukokiníny), spôsobujú inaktiváciu cudzorodých látok (voľné radikály) a tie, ktoré sa uplatňujú pri ich rozklade na nízkomolekulové látky (lyzozómy). Navyše dochádza počas ischémie a recirkulácie k tvorbe nových výbežkov endotelových buniek s charakteristickou dvojlaminárnou štruktúrou (Garcia a spol., 1971). Francescangeli a spol. (1977) zistili, že po intraventrikulárnom podaní [ $Me^3$ ] cholínu, metabolický obrat PC dosahoval maximum syntézy po 3 h v neurónoch a po 6–12 h v glii. Obnova PE bola pomalšia. Po intraventrikulárnom podaní [ $^{14}C$ ] etanolamínu bola obnova PE v neurónoch najvyššia po 7 h a v glii po 20–36 h (Goracci a spol., 1975). Kým hladiny PC boli v našom experimente signifikantne zvýšené vo všetkých regiónoch sivej hmoty, dá sa predpokladať, že nadmerná obnova PC pochádza zo syntézy v neurónoch a zároveň aj v gliových bunkách, kým obnova PE môže byť výraznejšia predovšetkým vďaka zvýšenej syntetickej aktivite neurónov. Dá sa predpokladať, že nadmerná syntéza fosfolipidov po subletálnej ischémii opakovanej v dlhých intervaloch je výsledkom obrannej reakcie, ktorou sa bunky nervového tkaniva snažia prekonať nápor vápnika.

Prezentované výsledky ukazujú, že rozdiely v regionálnej distribúcii sledovaných parametrov existujú a sú demonštrateľné pomocou podrobnej analýzy sivej hmoty delenej na tri rozdielne regióny. Regionálne, resp. laminárne rozdielnosti v zastúpení fosfolipidov zdôrazňujú potrebu analyzovať tieto membránové zložky za rôznych experimentálnych podmienok s prihliadnutím na detailnejšiu parceláciu miechy.\*

## Literatúra

- Araki T., Kato H., Inone T., Kogure K.: Impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol.*, 79, 1991, s. 501–505.
- Berridge M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P., Heslop J.P., Irvine R.F.: Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.*, 212, 1983, s. 473–482.
- Blot S., Arnal J. F., Xu Y., Gray F., Michel J.B.: Spinal cord infarcts during long-term inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Stroke*, 25, 1994, s. 1666–1673.
- Bradová V., Šmid F.: Improved one-dimensional thin-layer chromatography for the separation of phospholipids in biological material. *J. Chromatography*, 533, 1990, s. 297–299.

\* Podporené grantom SAV (2/4180/97).

- Francescangeli E., Goracci G., Piccinin G. L., Mozzi R., Woelk H., Porcellati G.:** The metabolism of labelled choline in neuronal and glial cells of the rabbit in vivo. *J. Neurochem.*, 28, 1977, s. 171—176.
- Garcia J.H., Cox J.V., Hudgins W.R.:** Ultrastructure of the microvasculature in experimental cerebral infarction. *Acta Neuropathol.*, 18, 1971, s. 273—285.
- Giulian D., Robertson C.:** Inhibition of mononuclear phagocytes improves functional recovery after damage to the spinal cord of rabbit. *Ann. Neurol.*, 27, 1990, s. 33—42.
- Goracci G., Francescangeli E., Piccinin G. L., Binaglia L., Woelk H., Porcellati G.:** The metabolism of labelled ethanolamine in neuronal and glial cells of the rabbit in vivo. *J. Neurochem.*, 24, 1975, s. 1181—1186.
- Kaplán P., Račay P., Lehotský J., Mézešová V.:** Change in fluidity of brain endoplasmic reticulum membranes by oxygen free radicals: A protective effect of stobadine,  $\alpha$ -tocopherol acetate and butylated hydroxytoluene. *Neurochem. Res.*, 20, 1995, s. 815—820.
- Kato H., Araki T., Hara H., Kogure K.:** Regional changes in [<sup>3</sup>H] inositol 1,4,5-triphosphate binding in the gerbil brain following repeated sublethal ischemia. *Brain Res. Bull.*, 33, 1994, s. 465—468.
- Kato H., Liu Y., Araki T., Kogure K.:** Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischaemic insult in the gerbil: Cumulative damage and protective effects. *Brain Res.*, 553, 1991, s. 238—242.
- Kato H., Kogure K., Araki T., Liu X.-H., Kato K., Itoyama Y.:** Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischaemia in a gerbil model of ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 1995, s. 60—70.
- Kirino T., Tsujita Y., Tamura A.:** Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11, 1991, s. 299—307.
- Kitagawa K., Matsumoto M., Tagayra M., Hata R., Ueda H., Niinobe M., Handa N., Fukunaga R., Kimura K., Mikoshiba K., Kamada T.:** „Ischemic tolerance“ phenomenon found in the brain. *Brain Res.*, 528, 1990, s. 21—24.
- Kozinková M., Brechtlová M., Liška B.:** Možný vplyv lipoperoxidácie na kalcium-kalmodulínovú aktiváciu sledovanú stanovením aktivity fosfodiesterázy 3,5-cAMP. S. 117—119. In: Houdek L. (Ed.): *Biologické podklady psychických porúch*. Praha, Galén 1997.
- Kuračka L., Kozinková M., Regendová M., Brechtlová M., Liška B.:** Vplyv lipoperoxidácie in vitro na aktivity ATPáz. S. 126—129. In: Houdek L. (Ed.): *Biologické podklady psychických porúch*. Praha, Galén 1997.
- Lukáčová N., Gottlieb M., Maršala J.:** Lipid peroxidation and phospholipid composition in rat brain regions after ischemia and in early reperfusion periods. *Arch. Ital. Biol.*, 1997, in press.
- Lukáčová N., Halát G., Chavko M., Maršala J.:** Ischemia reperfusion injury in the spinal cord of rabbits strongly enhances lipid peroxidation and modifies phospholipids profiles. *Neurochem. Res.*, 21, 1996, s. 869—873.
- Marsala J., Kluchova D., Marsala M.:** Spinal cord gray matter layers rich in NADPH diaphorase-positive neurons are refractory to ischemia-reperfusion-induced injury: a histochemical and silver impregnation study in rabbit. *Exp. Neurol.*, 145, 1997, s. 165—179.
- Maršala J., Šulla I., Šanta M., Maršala M., Mechírová E., Jalč P.:** Early neurohistopathological changes of canine lumbosacral spinal cord segments in ischemia-reperfusion-induced paraplegia. *Neurosci. Lett.*, 106, 1989, s. 83—88.
- Marsala J., Sulla I., Santa M., Marsala M., Zacharias L., Radonak J.:** Mapping of the canine lumbosacral spinal cord neurons by Nauta method at the end of the early phase of paraplegia induced by ischemia and reperfusion. *Neuroscience*, 45, 1991, s. 479—494.
- Marsala J., Vanický I., Marsala M., Jalc P., Orendacova J., Taira Y.:** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the spinal cord of dogs. *Neuroscience*, 85, 1998, s. 847—862.
- Munyamo N., Kaste M., Lindsberg P.:** Tolerization against loss of neuronal function after ischemia-reperfusion injury. *NeuroReport*, 9, 1998, s. 321—325.
- Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.:** Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5, 1970, s. 494—496.
- Rubinstein A., Arbit E.:** Spinal blood flow in the rat under normal physiological conditions. *Neurosurgery*, 27, 1990, s. 882—886.
- Solyakov L., Dobrota D., Drany O., Váchová M., Macháč S., Mézešová V., Bachurin S., Lombardi V.:** Transport mechanism of L-[<sup>14</sup>C] glutamate in cortical slices and synaptosomes of rabbits exposed to brain ischemia and reperfusion. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 25, 1995, s. 123—134.
- Torre J.C.:** Spinal cord injury models. *Prog. Neurobiol.*, 22, 1984, s. 289—344.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., Erickson V.L., Stewart R.J., Roppolo J.R., de Groat W.C.:** Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat. *J. comp. Neurol.*, 339, 1994, s. 62—75.
- Worley P.F., Baraban J.M., Colvin J.S., Snyder S.H.:** Inositol trisphosphate receptor localization in brain: variable stoichiometry with protein kinase C. *Nature*, 325, 1987, s. 159—161.
- Zivin J.A., DeGirolami U., Hurwitz E.L.:** Spectrum of neurological deficits in experimental CNS ischemia. A quantitative study. *Arch. Neurol.*, 39, 1982, s. 408—412.

Do redakcie došlo 24.3.1998.