

## VPLYV ISCHÉMIE A ISCHÉMIE-REPERFÚZIE NA IÓNOVÉ TRANSPORTNÉ SYSTÉMY

RAČAY P., MATEJOVIČOVÁ M., DRGOVÁ A., DOBROTA D., KAPLÁN P., LEHOTSÝ J., MÉZEŠOVÁ V.

### INFLUENCE OF ISCHAEMIA AND ISCHAEMIA-REPERFUSION ON ION TRANSPORT SYSTEMS

Interruption of cerebral blood flow leads to dissipation of ionic gradients as the consequence of ionic channel overstimulation and ionic pump failure. The aim of this work was to study the possible effects of ischaemia and ischaemia followed by reperfusion on biochemical properties of endoplasmic calcium pump and synaptosomal sodium pump and sodium/calcium exchanger. The results presented in this study showed that 15 minute ischaemia led to the inhibition of all three ionic transport systems, however in different degrees. 60 minute reperfusion following 15 minute ischaemia led to partial recovery of calcium pump and sodium/calcium exchanger. The activity of sodium pump was still significantly depressed. Ischaemia and ischaemia followed by reperfusion did not affect kinetic parameters of calcium pump. On the other side, both ischaemia and ischaemia-reperfusion led to an increase of sodium pump affinity to ATP and a decrease of the enzyme affinity to potassium. The possible causes of the changes, as the alteration of membrane structure or altered enzymes phosphorylation are discussed in the study. In addition to the inhibitory effect of ischaemia-reperfusion injury, intracellular water accumulation, as the possible consequence of altered ion homeostasis, is documented by nuclear magnetic resonance (imaging). (Tab. 3, Fig. 4, Ref. 43.)

**Key words:** ischaemia, ischaemia-reperfusion, ionic transport systems.

*Bratisl Lek Listy 1998; 99: 386–394*

Prerušenie prietoku krvi centrálnym nervovým systémom vedie po určitom čase k narušeniu iónových gradientov v dôsledku aktivácie iónových kanálov a poklesu aktivity iónových púmp. V tejto práci sme sledovali možný vplyv ischémie a ischémie-reperfúzie na biochemické vlastnosti vápnikovej pumpy endoplazmatického retikula a synaptozomálnej sodíkovej pumpy a sodíkovo-vápnikového výmenníka. Naše výsledky ukázali, že ischémia vedie k inhibícii všetkých troch iónových transportných systémov, no v rôznom rozsahu. Jednohodinová reperfúzia nasledujúca po 15-minútovej ischémii viedla k čiastočnému nárastu aktivity vápnikovej pumpy a sodíkovo-vápnikového výmenníka. Aktivita sodíkovej pumpy bola stále významne znížená. Ischémia a ischémia-reperfúzia nemali vplyv na kinetické parametre vápnikovej pumpy. Ischémia a ischémia-reperfúzia na druhej strane zvyšovali afinitu sodíkovej pumpy voči ATP a znižovali afinitu enzýmu voči draslíku. V práci sa diskutuje o možných príčinách, zmenách v zložení membrán, či zmenách na úrovni fosforylácie enzýmov, ktoré by mohli viesť k nameraným rozdielom vo vlastnostiach sledovaných transportných systémov. Akumuláciu vody v ischemickom tkanive, ako dôsledok porušenej iónovej homeostázy, dokumentuje metóda zobrazovania pomocou magnetickej rezonancie. (Tab. 3, obr. 4, lit. 43.)

**Kľúčové slová:** ischémia, ischémia-reperfúzia, iónové transportné systémy.

*Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s. 386–394*

Prerušenie prietoku krvi centrálnym nervovým systémom vedie po určitom čase k narušeniu iónových gradientov (Kristián a Siesjö, 1997). Tento jav sa obvykle vysvetľuje nadmernou aktiváciou iónových kanálov a rôznych receptorov, ako aj poklesom aktivity ATP-závislých iónových púmp v dôsledku výrazného spomalenia energetického metabolizmu. Medzi iónmi má centrálnu

postavenie vápnik, lebo prechodné zmeny jeho vnútrobunkovej koncentrácie spúšťajú a kontrolujú v nervovej bunke rad fyziologických procesov (Račay a Lehotský, 1996). Koncentráciu vápnika v nervovej bunke prísne kontroluje rad systémov líšiacich sa mechanizmom, biochemickou charakteristikou a vnútrobunkovou lokalizáciou (Račay a spol., 1996). Nadmerná vnútrobunková koncentrácia vápnika, pozorovaná počas ischémie a reperfúzie, sa spolu so zvýšenou aktiváciou glutamátových receptorov považuje za hlavnú príčinu selektívneho odumierania neurónov pozorovaného počas reperfúzie (White a spol., 1993; Sims a Zaidan, 1995).

V udržiavaní iónovej homeostázy v nervovej bunke majú významnú úlohu  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáza endoplazmatického retikula, synaptozomálna  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -výmenník.  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpa endoplazmatického retikula transportuje vápnik z cytoplazmy do endoplaz-

Ústav lekárskej biochémie Jeseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine

The Institute of Medical Biochemistry, Jessenius Medical Faculty, Comenius University, Martin

**Address for correspondence:** P. Račay, RND, Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovakia.

Phone: +421.842.315 65, Fax: +421.842.367 70, Internet: Racay@doktor.jfmed.uniba.sk

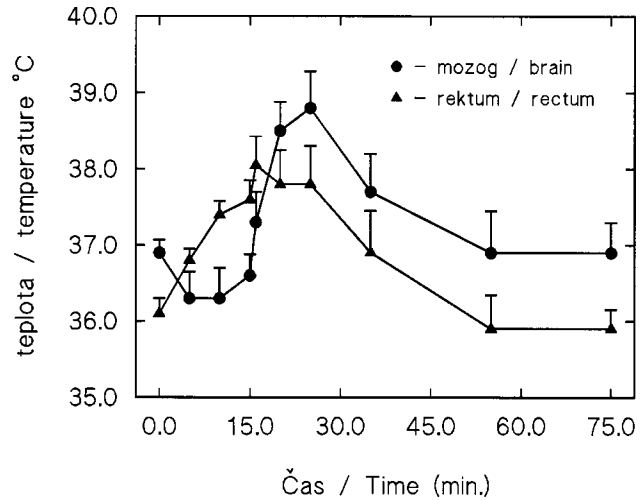
matického retikula, ktoré predstavuje významný vnútrobunkový zdroj vápnika schopný ho uvoľniť do vnútra bunky ako odpoveď na určité fyziologické podnety (Henzi a Mac Dermot, 1992). Táto pumpa spolu s transportnými systémami pre vápnik lokalizovanými na plazmatickej membráne znižuje koncentráciu vápnika v bunke, čo vedie k jej relaxácii, no uloženie vápnika v endoplazmatickom retikule je pre bunku výhodnejšie ako jeho transport do mimobunkového priestoru (Taylor, 1995). Fyziologický význam  $Ca^{2+}$ -pumpy endoplazmatického retikula dokumentujú aj neurotoxicke vlastnosti tapsigarginu jej selektívneho inhibítora (Silverstein a Nelson, 1992). Hlavnou úlohou  $Na^+/K^+$ -ATPázy je udržiavanie gradientu  $Na^+$  a  $K^+$  v nervových bunkách (Jorgensen, 1992). Aktivita tejto pumpy je esenciálna pre prenos akčných potenciálov a významnú úlohu má aj pri regulácii objemu nervovej bunky. Gradient  $Na^+$  je zase nevyhnutným predpokladom pre správnu funkciu sekundárnych aktívnych transportných systémov pre vápnik, neurotransmitery a aminokyseliny (Albers a spol., 1994).  $Na^+/Ca^{2+}$ -výmenník je vysoko-kapacitný a nízkoafinitný systém transportujúci vnútrobunkový  $Ca^{2+}$  do extracelulárneho priestoru na úkor energie  $Na^+$  gradientu (Misiaen a spol., 1991). Napriek tomu, že táto bielkovina môže pumpovať do extracelulárneho priestoru až desaťkrát viac  $Ca^{2+}$  ako  $Ca^{2+}$ -pumpa plazmatickej membrány, nepovažuje sa za hlavný mechanizmus zodpovedný za vypumpovanie vápnika z bunky. V prítomnosti ATP je jeho afinita voči vápniku príliš nízka ( $K_m \sim 1-3 \mu\text{mol/l}$ , čo zodpovedá vnútrobunkovej koncentrácii vápnika po excitácii bunky) na to, aby bol  $Na^+/Ca^{2+}$ -výmenník schopný znížiť hladinu vnútrobunkovej koncentrácie vápnika na hodnotu 50–200 nmol/l (Albers a spol., 1994). Biochemické vlastnosti a bunková lokalizácia  $Na^+/Ca^{2+}$ -výmenníka však naznačujú jeho možnú úlohu v procese vápnikom spúšťanej exocytózy (Reuter a Porzig, 1995) a pri nepriamej regulácii vnútrobunkových vápnikových zdrojov (Juhászová a spol., 1996).

Cieľom tejto práce bolo zistenie vplyvu ischemie a následnej reperfúzie na biochemické vlastnosti a aktivitu uvedených transportných systémov a na zastúpenie fosfolipidov v synaptosomalnej membráne. Keďže poruchy iónovej homeostázy vedú aj k akumulácii vody v postihnutom tkanive (Ordidge a spol., 1991; Kurki a spol., 1992), časť práce je zameraná na zobrazenie rozsahu ischemického ložiska metódou magnetickej rezonancie.

**Materiál a metódy**

Na sledovanie vplyvu ischemie-reperfúzie na vybrané iónové transportné systémy sme použili model globálnej ischemie bilaterálnou oklúziou arteria carotis communis u pieskomila mongolského (*Meriones unguiculatus*) (Crockard a spol., 1980). Keďže väčšina jedincov pieskomila mongolského nemá spojenie medzi arteria vertebralis a arteria carotis interna — circulus arteriosus Willisii, možno dosiahnuť kompletnú ischemiu predného mozgu po uzavretí arteria carotis communis (Mayevsky a Zipi, 1990), čo predstavuje pomerne jednoduchý chirurgický výkon.

Na operáciu sme použili dospelé pieskomily mongolské (Chovná stanica Dobrá voda, SR) oboch pohlaví. Zvieratá sme pred operáciou úplne anestetizovali intraperitoneálnym podaním 60 mg/kg pentobarbitalu (Pentobarbital inj., SPOFA Praha, ČR). Po uvedení do anestézie sme zvierata fixovali v polohe na chrbte a v oblasti krku po stredovej osi sme mu urobili rez. Potom sme postupne vypreparovali obe krčné tepny, ktoré sme podvliekli polyetylénou-



**Obr. 1.** Zmeny teploty mozgu a rektálnej teploty počas ischemie a reperfúzie. Výsledky sú uvedené ako priemer z piatich experimentov (štandardná odchýlka).

**Fig. 1.** Effect of ischemia and ischemia-reperfusion on rectal and brain temperature. The results are expressed as mean (standard deviation of 5 experiments).

vými páskami širokými 2–3 mm. Po oklúzii oboch artérií sme pomocou aneuryzmatických svoriek vizuálne skontrolovali nepriechodnosť artérie. Vo vybranom súbore zvierat sme počas operácie merali teplotu mozgu aj rektálnu teplotu. Rektálnu teplotu sme merali pomocou polovodičového kontaktného teplomera (KA-206, TESLA) zavedením polovodičovej sondy asi 1 cm do rekta zvierata. Teplotu mozgu sme merali zavedením polovodičovej ihlovej sondy do oblasti frontoparietálneho kortexu. Keďže sme v priebehu ischemie pozorovali tendenciu k znižovaniu teploty mozgu (obr. 1), zvierata sme počas celej operácie a ischemie temperovali umiestnením na elektricky vyhrievanú podložku tak, aby sa teplota mozgu v priebehu ischemie udržiavala v intervale  $36,5 \pm 0,8 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Pokusné zvieratá sme rozdelili do troch skupín.

1. Slepé operované zvieratá — po uvedení do celkovej anestézie sme im vypreparovali obe krčné artérie a po uplynutí doby ekvivalentnej dobe trvania ischemie sme zvieratá dekapitovali.
2. Ischemické zvieratá — sme operovali podľa uvedeného postupu. Po uplynutí príslušného času ischemie sme zvieratá dekapitovali bez uvoľnenia svoriek.
3. Reperfundované zvieratá — sme operovali podľa uvedeného postupu. Po uplynutí príslušného času ischemie sme im uvoľnili svorky a zvieratá sme dekapitovali v celkovej anestézii.

Po dekapitácii sme hlavy zvierat ihneď ochladili ponorením do tekutého dusíka na čas kratší ako 3 sekundy. Ochladený mozog zvierata sme v čase 2–3 minúty vypreparovali z lebky, na chladenej podložke sme oddelili obe hemisféry od ostatných štruktúr, očistili ich od mozgových blán a vaskulatury a spracované tkanivo sme hneď použili na izoláciu subcelulárnych organel.

Na prípravu homogenátov sme použili očistené tkanivo, ktoré bolo posekané na menšie časti pomocou skalpela a prenesené do vychladenej homogenizačnej skúmavky naplnenej homogenizačným roztokom (5 mmol/l HEPES-Tris, pH=7,4, 0,32 mol/l sacharóza) tak, aby na 1 g tkaniva pripadalo 10 ml roztoku. K homog-

nizačnému roztoku sme tesne pred homogenizáciou pridali roztok fenylmetylsulfonylfluoridu (PMSF) tak, aby výsledná koncentrácia bola 0,1 mmol/l a tkanivo sme homogenizovali pomocou Potterovho teflonového homogenizátora piatimi zdvismi pri 1200 otáčkach za minútu. Doba zdvihu bola 30 sekúnd.

Na izoláciu synaptozómov a mikrozomálnych vezikúl sme použili metódu diferenciálnej ultracentrifugácie podľa Edelmána a spol. (1985) s niektorými drobnými úpravami. Homogenát centrifugovaný pri 900g počas 10 minút a supernatant bol prefiltrovaný cez štyri vrstvy gázy. Sediment bol rehomogenizovaný v polovičnom objeme vychladeného homogenizačného roztoku s prídavkom PMSF a opäť centrifugovaný 10 minút pri 900g. Oba supernatanty sa spojili a hrubá mitochondriálna frakcia bola sedimentovaná centrifugáciou pri 17 000g počas 45 minút. Postmitochondriálny supernatant bol centrifugovaný pri 100 000g počas 60 minút. Získaný sediment sme rozsuspendovali v homogenizačnom roztoku a suspenziu sme centrifugovali pri 100 000g počas 60 minút a sediment sme rozsuspendovali v homogenizačnom roztoku, aby výsledná koncentrácia bielkovín bola približne 2 mg/ml. Ako ukázal Edelman a spol. (1985) pomocou markerových enzýmov, takto pripravená frakcia je výrazne obohatená o vezikuly tvorené membránami endoplazmatického retikula.

Synaptozómy boli izolované centrifugáciou vezikúl získaných rozsuspendovaním hrubej mitochondriálnej frakcie v minimálnom objeme homogenizačného roztoku, na štvorstupňovom gradiente sacharózy 2 hodiny pri 53 000g (Edelman a spol., 1985). Koncentráciu bielkovín sme určili metódou podľa Lowryho a spol. (1951).

U zvierat monitorovaných metódou magnetickej rezonancie sme použili model globálnej unilaterálnej ischemie predného mozgu u pieskomila mongolského (*Meriones unguiculatus*) podľa Kirina a spol. (1985). Zvieratá oboch pohlaví sme operovali v halotanovej anestézii (2 % halotan a zmes kyslíka s oxidom dusným v pomere 2:1). Po incízii v mediálnej čiare na ventrálnej strane krku sme vypreparovali pravostrannú arteria carotis communis a následne sme ju podviazali. Rozvoj ischemického ložiska sme monitorovali metódou zobrazovania pomocou magnetickej rezonancie (MRI). Základné technické podmienky získania  $T_2$ -vážených obrazov a difúzne vážených obrazov mozgu pieskomilov boli nasledovné:

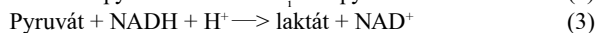
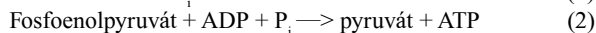
*Spektrometer*: zobrazovací spektrometer SISCO 200/330 (4,7 T) (Varian, USA)

- $T_2$ -vážené obrazy: opakovací čas=1,5 s (TR), čas echa=60 ms (TE), celkový čas merania=25 minút;
- difúzne vážené obrazy: opakovací čas=1,5 s (TR), čas echa=88 ms (TE), difúzny gradient=12 mT/m, časový interval medzi difúznymi gradientmi=40 ms, celkový čas merania=35 minút.

Rýchlosť ATP-závislej akumulácie vápnika vezikulami endoplazmatického retikula sme určili filtračnou metódou podľa Tada a spol. (1988) s drobnými úpravami. Izolované mikrozomálne vezikuly (50  $\mu$ g bielkovín/ml) boli predinkubované pri 37 °C po dobu 5 minút v 0,95 ml roztoku 10 mmol/l HEPES pH=7,0, 100 mmol/l KCl, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l oxalát draselný, 5 mmol/l NaN<sub>3</sub>, 0,2 mmol/l EDTA a 0,235 mmol/l <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (170 MBq/mmol, Amersham, Veľká Británia) tak, že výsledná koncentrácia ionizovaného vápnika bola 7  $\mu$ mol/l. Akumulácia vápnika bola naštartovaná pridaním 50  $\mu$ l 100 mmol/l ATP pH=7,0. Po 15, 30, 45 a 60

minútach inkubácie bolo 200  $\mu$ l reakčného roztoku prefiltrované cez membránový filter (Millipore HA, 0,45  $\mu$ m) a filter bol premytý 5 ml zastavovacieho roztoku (20 mmol/l imidazol-HCl pH=7,0, 100 mmol/l KCl, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l EGTA). Po vysušení sme filtre preniesli do scintilačnej flaštičky a zaliali 3 ml scintilačnej kvapaliny SLT 31 (Spolana Neratovice, ČR). Rádioaktivitu filtrov sme odmerali kvapalinovým scintilačným spektrometrom TriCarb 2200 CA (The Packard Instrument Co., Meriden, USA). Rýchlosť akumulácie vápnika sme vypočítali z lineárnej časti závislosti množstva vápnika zadržaného filtrom od času. Koncentráciu ionizovaného Ca<sup>2+</sup> sme vypočítali pomocou programu Cabuf, ktorý nám poskytol dr. G. Droogmans (K.U. Leuven, Belgicko).

Aktivita Ca<sup>2+</sup>-ATPázy bola meraním Ca<sup>2+</sup>-závislej hydrolyzy ATP enzymovou metódou (Chu a spol., 1988) s drobnými úpravami. Metóda je založená na spektrofotometrickom meraní rýchlosti oxidácie NADH spriahnutím troch enzymatických reakcií katalyzovaných Ca<sup>2+</sup>-ATPázou (1), pyruvátkinázou (2) a laktátdehydrogenázou (3).



Mikrozomálne vezikuly (20  $\mu$ g/ml) boli inkubované v 0,5 ml roztoku 20 mmol/l HEPES pH=7,0, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l EGTA, 5 mmol/l NaN<sub>3</sub>, 0,44 mmol/l fosfoenolpyruvát, 0,4 mmol/l NADH, 2 mmol/l ATP, 65  $\mu$ g/ml C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, pyruvátkináza (10 m.j.) a laktátdehydrogenáza (22 m.j.). Rýchlosť hydrolyzy ATP sme sledovali spektrofotometrickým meraním oxidácie NADH pri 340 nm (Ultrospec III, Pharmacia LKB, Uppsala, Švédsko). Po odmeraní bazálnej rýchlosti sme ku vzorkám pridali 2  $\mu$ l 250 mmol/l CaCl<sub>2</sub> tak, že výsledná koncentrácia ionizovaného vápnika bola 10  $\mu$ mol/l. Rýchlosť oxidácie NADH bola prepočítaná na rýchlosť hydrolyzy ATP použitím molárneho extinčného koeficienta epsilon (NADH)<sub>340</sub>=6220 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Aktivitu Ca<sup>2+</sup>-ATPázy sme vypočítali odčítaním bazálnej rýchlosti od rýchlosti odmeranej v prítomnosti vápnika.

Aktivitu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy a kinetické parametre sme určovali spektrofotometrickou metódou podľa Schonfelda a spol. (1986). Celkovú ATPázovú aktivitu sme určili inkubáciou izolovaných synaptozómov (10  $\mu$ g bielkovín) v 0,4 ml reakčného roztoku (25 mmol/l imidazol-HCl pH=7,4, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l KCl, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l NaN<sub>3</sub>, 3 mmol/l ATP, 1 mmol/l fosfoenolpyruvát, 0,5 mmol/l EGTA, 0,225 mmol/l NADH, 16 m.j. pyruvátkinázy, 16 m.j. laktátdehydrogenázy, 40  $\mu$ g/ml alamethicín) a spektrofotometrickým meraním oxidácie NADH pri 340 nm. Pri určovaní kinetických parametrov sa v reakčnom médiu postupne menili koncentrácie jednotlivých ligandov (ATP, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>). Nešpecifickosť ATPázovej aktivity sme určili spektrofotometrickým meraním oxidácie NADH po pridaní špecifického inhibítora Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy — ouabaínu s koncentráciou 0,5 mmol/l do reakčného média. Rýchlosť oxidácie NADH sme prepočítali na rýchlosť hydrolyzy ATP použitím molárneho extinčného koeficienta epsilon (NADH)<sub>340</sub>=6220 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Aktivitu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy sme potom určovali ako rozdiel celkovej a nešpecifickej aktivity a vyjadrovali v nmol uvoľneného anorganického fosforu za minútu na mg bielkovín.

Aktivitu Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka sme merali ako akumuláciu Ca<sup>2+</sup> do synaptozómov vopred naložených sodíkom metódou podľa Reevesa (1988). Čerstvo pripravené synaptozómy sme inkubovali 2 hodiny pri 0 °C v inkubačnom médiu (160 mmol/l NaCl, 10 mmol/l glukóza, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/l HEPES – Tris, pH=7,4). Koncentrácie suspenzie synaptozómov v médiu bola 3—10 mg bielkovín/ml. Naberania vápnika sme začali pridaním suspenzie synaptozómov naložených sodíkom (25 µg bielkovín) do 0,5 ml zriedovacieho média (160 mmol/l cholinchlorid, 10 mmol/l glukóza, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/l HEPES- Tris, pH=7,4, 0,03 mmol/l <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (1 GBq/mmol, Amersham, Veľká Británia)). Naberanie sme zastavili pridaním 5 ml ľadového zastavovacieho roztoku (200 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l EGTA, 5 mmol/l HEPES – Tris pH=7,4) a zmes sme okamžite filtrovali cez filtre GF-C (Whatman, Veľká Británia), ktoré sme premývali ešte 3,5 ml zastavovacieho média. Filtre sme po vysušení umiestnili do 5 ml scintilačnej kvapaliny SLT-31 (Spolana Neratovice, ČR) a rádioaktivitu sme merali na scintilačnom spektrometri TriCarb-300C. Aktivitu Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka sme vypočítali z lineárnej časti závislosti množstva vápnika zadržaného filtrom od času a vyjadrili sme ju v nmol Ca<sup>2+</sup> za minútu na mg bielkovín.

Lipidické extrakty zo synaptozomálnych frakcií mozgového tkaniva sme pripravovali podľa Jungalwalu a Dawsona (1971). Vzorku suspenzie synaptozómov v roztoku 0,32 mol/l sacharózy a 5 mmol/l HEPES-Tris, pH=7,4 s objemom 1 ml (1,5—8 mg bielkovín) sme extrahovali zmesou chloroform—metanol (1:1) v pomere 1:10. Zmes sme 15 min zahrievali na 45 °C a potom 30 minút centrifugovali pri 2000 ot./min. Extrakt sme prefiltrovali a k sedimentu pridali polovičné množstvo chloroformu. Po zhomogenizovaní a filtrácii sme filtráty spojili a k extraktu pridali 1/5 objemu fyziologického roztoku a vzorku sme centrifugovali 10 min pri 2000 ot./min. Vrchnú vrstvu sme 6-krát zbavovali anorganických prímies zmesou chloroform—metanol—voda (3:45:47). Potom sme vzorku odparili do sucha a rozsuspendovali v zmesi chloroform—metanol (2:1). Lipidické extrakty sme uchovávali pod dusíkovou atmosférou.

Na frakcionáciu fosfolipidov pomocou dvojrozmernej chromatografie sme použili postup podľa Rousera a spol. (1970). Vzorky lipidických extraktov obsahujúcich 10 µg lipidického fosforu sme nanášali na silikagélové chromatografické platne (Merck, SRN) a vyvíjali v systéme rozpúšťadiel I chloroform—metanol—NH<sub>3</sub> a po vysušení v systéme II chloroform—metanol—aceton—kyselina octová—voda v pomere 100:20:40:26:10. Vysušené platne sme vyvolávali parami jódu a jednotlivé fosfolipidy sme identifikovali pomocou štandardov. Potom sme škrvny kvantitatívne eluovali 3-krát zmesou chloroform—metanol—voda (7:7:1) a v eluátoch sme určovali anorganický fosfor metódou Lowryho a Lopeza (1946). Celkový obsah fosfolipidov sme vyjadrovali v nmol/mg bielkovín. Ako strednú molekulovú hmotnosť fosfolipidov sme použili 750 g/mol.

Výsledky kinetických meraní sme spracovali metódami lineárnej (priamkové závislosti) a nelineárnej regresie využitím štandardne dostupného software NFIT (Texas University, Galveston, USA), Fig. P (Fig. P Software Corporation, Durham USA) a personálneho počítača. Výsledky sú uvedené ako priemer (štandardná odchýlka) alebo štandardná chyba priemeru (SEM). Na zistenie štatisticky významných rozdielov v rámci celého súboru sme analyzovali premenné (ANOVA), potom nasledoval Studentov t-

test na zistenie rozdielov medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami. Štatistickú analýzu sme urobili pomocou software In-Stat (GraphPad Software Co., USA) za použitia personálneho počítača.

## Výsledky

Vplyv ischémie a reperfúzie na biochemické vlastnosti iónových transportných systémov sme sledovali meraním rýchlosti ATP-závislej akumulácie vápnika mikrozomálnymi vezikulami, aktivity Ca<sup>2+</sup>-pumpy endoplazmatického retikula, aktivity Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy a rýchlosti Na<sup>+</sup>-závislej akumulácie vápnika synaptozomálnymi vezikulami. Ischémia v trvaní 5 minút viedla k významnému zníženiu rýchlosti akumulácie vápnika na 57,1 % v porovnaní so slepo operovanou kontrolou. Aj ischémia v trvaní 15 minút viedla k štatisticky významnému zníženiu rýchlosti akumulácie vápnika vezikulami endoplazmatického retikula. Toto zníženie je v rozsahu 37,3 % v porovnaní so slepo operovanou kontrolou. Reperfúzia v trvaní 1 hodiny nasledujúca po 15 minútach ischémie viedla k čiastočnému obnoveniu schopnosti vezikúl nabrať vápnik, dosahovala však len 68,1 % z hodnoty nameranej pre skupinu slepo operovaných zvierat. V kinetických parametroch vápnikovej pumpy sa však nepozorovali žiadne štatisticky významné zmeny (tab. 1).

Ischémia a reperfúzia výrazne vplyva na kinetické parametre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy (tab. 2). Ischémia v trvaní 15 minút viedla k štatisticky významnému zníženiu maximálnej rýchlosti hydrolyzy ATP a afinity pumpy voči draslíku. Na druhej strane afinita enzýmu voči ATP významne stúpa a afinita voči sodíku nie je zmenená v dôsledku ischémie. Na rozdiel od rýchlosti akumulácie vápnika, maximálna rýchlosť hydrolyzy ATP ostáva znížená aj po 1-hodinovej reperfúzii pri súčasnom zvýšení afinity voči ATP. Re-

**Tab. 1. Vplyv ischémie a reperfúzie na rýchlose akumulácie vápnika a kinetické parametre Ca<sup>2+</sup>-ATPázy.**

**Tab. 1. Effect of ischaemia and reperfusion on Ca<sup>2+</sup>-uptake velocity and kinetic parameters of Ca<sup>2+</sup>-ATPase.**

	Rýchlosť akumulácie Ca <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> -uptake (nmolCa <sup>2+</sup> /min.mg)	Kinetické parametre Ca <sup>2+</sup> -ATPázy Kinetic parameters of Ca <sup>2+</sup> -ATPase	
		K <sub>m</sub> (Ca <sup>2+</sup> ) (µmol/l)	V <sub>max</sub> (nmol P/min.mg)
Slepá operácia Sham operated	5,04±0,30	0,82±0,03	215,4±20,1
Ischémia 5 min 5 min ischaemia	2,88±0,72 <sup>a</sup>	0,94±0,09	172,1±12,4
Ischémia 15 min 15 min ischaemia	1,88±0,22 <sup>b</sup>	0,75±0,05	195,3±10,8
Reperfúzia 60 min 60 min reperfusion	3,43±0,32 <sup>a</sup>	0,72±0,12	181,8±13,4

Hodnoty su uvedené ako priemer±SEM zo 4—7 experimentov.

<sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,001, štatisticky významné rozdiely v porovnaní so slepou operáciou.

**Tab. 2. Vplyv ischémie a reperfúzie na kinetické parametre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy.****Tab. 2. Effect of ischaemia and reperfusion on kinetic parameters of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.**

	Kinetické parametre Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPázy Kinetic parameters of Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase			
	K <sub>m</sub> (Na <sup>+</sup> ) (mmol/l)	K <sub>m</sub> (K <sup>+</sup> ) (mmol/l)	K <sub>m</sub> (ATP) (μmol/l)	V <sub>max</sub> (nmol P <sub>i</sub> /min.mg)
Slepá operácia Sham operated	13,8±0,5	1,3±0,2	435±59	2536±232
Ischémia 15 min 15 min ischaemia	12,8±0,9	2,0±0,2 <sup>a</sup>	211±20 <sup>b</sup>	1439±78 <sup>c</sup>
Reperfúzia 60 min 60 min reperfusion	11,6±0,4 <sup>a</sup>	3,1±0,5 <sup>b</sup>	221±34 <sup>b</sup>	1474±58 <sup>c</sup>

Hodnoty su uvedené ako priemer±SEM zo 7–10 experimentov.

<sup>a</sup> p<0,05, <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001, štatisticky významné rozdiely v porovnaní so slepou operáciou.

perfúzia vedie k poklesu afinity enzýmu voči sodíku a k ďalšiemu poklesu afinity enzýmu voči draslíku.

Rýchlosť Na<sup>+</sup>-závislej akumulácie vápníka v synaptosomálnych vezikulách bola ischémio-reperfúziou ovplyvnená podobne ako akumulácia vápníka v mikrozomálnych vezikulách (tab. 3). Ischémia v trvaní 15 minút viedla k významnému zníženiu rýchlosti Na<sup>+</sup>-závislej akumulácie vápníka na 50,3 % v porovnaní so slepo operovanou kontrolou. Reperfúzia v trvaní 1 hodiny nasledujúca po 15 minútach ischémie viedla k čiastočnému zvýšeniu rýchlosti Na<sup>+</sup>-závislej akumulácie vápníka v synaptosomálnych vezikulách, jej hodnota však dosahovala 77,3 % z hodnoty nameranej pre skupinu slepo operovaných zvierat.

Keďže aktivita mnohých membránových bielkovín závisí od zloženia membrány, sledovali sme vplyv ischémie a reperfúzie aj na zastúpenie jednotlivých fosfolipidov v synaptosomoch. Žiadny druh fosfolipidov nie je ischémio ovplyvnený, pretože sme nepozorovali žiadne štatisticky významné zmeny obsahu fosfolipidov v synaptosomoch izolovaných z ischemických zvierat. Reperfúzia v trvaní 60 minút vedie k štatisticky významnému poklesu obsahu fosfatidylserínu v synaptosomálnej membráne (obr. 2).

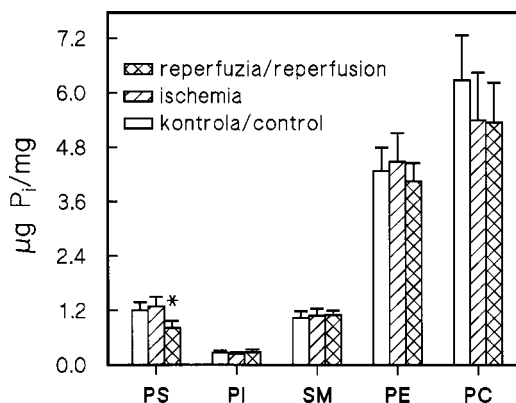
V podmienkach ischémie pravej hemisféry u pieskomila mongolského poskytovali difúzne vážené obrazy lepšie zobrazenie tkaniva postihnutého ischémio ako T2-vážené obrazy (obr. 3). V T2-vážených obrazoch sa zvýšenie intenzity vyskytovalo v ľavej hemisfére mozgu pieskomila mongolského, ktorá nebola postihnutá ischémio (obr. 3). Výrazné zvýšenie intenzity difúzne váženého obrazu je dôsledkom hromadenia vody v ischémio postihnutom tkanive (Mintorovitch a spol., 1994). V ďalšej časti našej práce sme preto sledovali vývoj ischemických zmien v závislosti od času v pravej hemisfére u pieskomila mongolského (podviazanie pravostrannej arteria carotis communis). Zistili sme, že k akumulácii vody dochádza predovšetkým v kôrovej a podkôrovej časti hemisféry a v bazálnej časti temporálneho laloka. S dĺžkou trvania ischémie dochádza k akumulácii vody aj v bielej hmote hemisféry, čo je dôkazom postupujúceho postihnutia hlbších štruktúr mozgu patologickým procesom (obr. 4).

**Tab. 3. Vplyv ischémie a reperfúzie na rýchlosť Na<sup>+</sup>-závislej akumulácie vápníka.****Tab. 3. Effect of ischaemia and reperfusion on Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup>-uptake velocity.**

	Rýchlosť akumulácie Ca <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> -uptake (nmolCa <sup>2+</sup> /min.mg)
Slepá operácia Sham operated	1,63±0,28
Ischémia 15 min 15 min ischaemia	0,82±0,07 <sup>a</sup>
Reperfúzia 60 min 60 min reperfusion	1,26±0,21

Hodnoty su uvedené ako priemer±SEM zo 4–7 experimentov.

<sup>a</sup> p<0,01, štatisticky významné rozdiely v porovnaní so slepou operáciou.

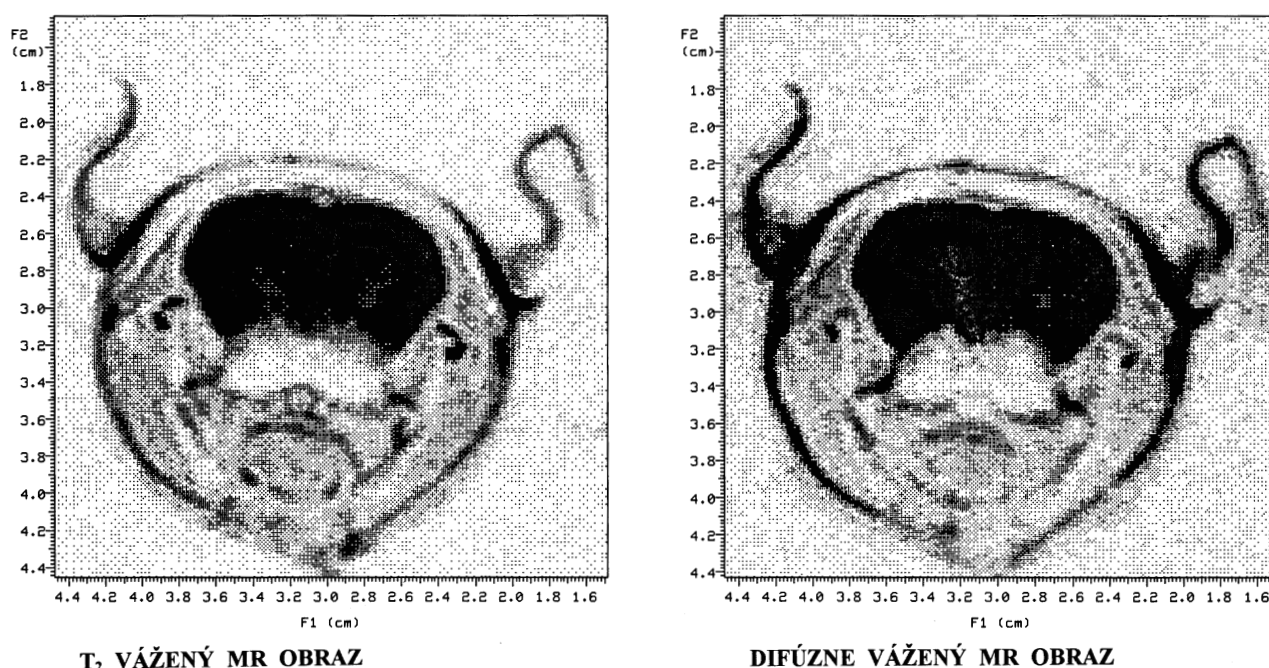


**Obr. 2. Vplyv 15-minútovej ischémie a 60-minútovej reperfúzie po 15-minútovej ischémii na obsah vybraných fosfolipidov v synaptosomálnej membráne. Výsledky sú uvedené ako priemer z piatich experimentov (štandardná odchýlka). PE — fosfatidyletanolamín, SM — sfingomyelín, PS — fosfatidylserín, PI — fosfatidylinozitol, PC — fosfatidylcholin. \* p<0,05.**

**Fig. 2. Effect of 15 min ischemia and 60 min reperfusion following 15 min ischemia on phospholipid composition of synaptosomal membrane. The results are expressed as mean (standard deviation of 5 experiments). PE — phosphatidylethanolamine, SM — sphingomyelin, PS — phosphatidylserine, PI — phosphatidylinositol, PC — phosphatidylcholine. \* p<0.05.**

## Diskusia

Aktívne iónové transportné systémy majú dôležitú úlohu pri udržiavaní iónovej homeostázy nervovej bunky a ischémio indukovaný pokles ich aktivity sa považuje za jeden z faktorov vedúci k narušeniu iónových gradientov počas ischémie (Kristián a Siesjö, 1997). V tejto práci sme sledovali vplyv ischémie a reperfúzie na biochemické vlastnosti troch transportných systémov, Ca<sup>2+</sup>-ATPázy endoplazmatického retikula a synaptosomálnych Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka. Získané výsledky ukázali, že ischémia v trvaní 15 minút vedie k štatisticky významnému zníženiu rýchlosti akumulácie vápníka mikrozomálnymi vezikulami. Reperfúzia v trvaní 1 hodiny po 15 minútach ischémie viedla k čiast-



T<sub>2</sub> VÁŽENÝ MR OBRAZ

DIFÚZNE VÁŽENÝ MR OBRAZ

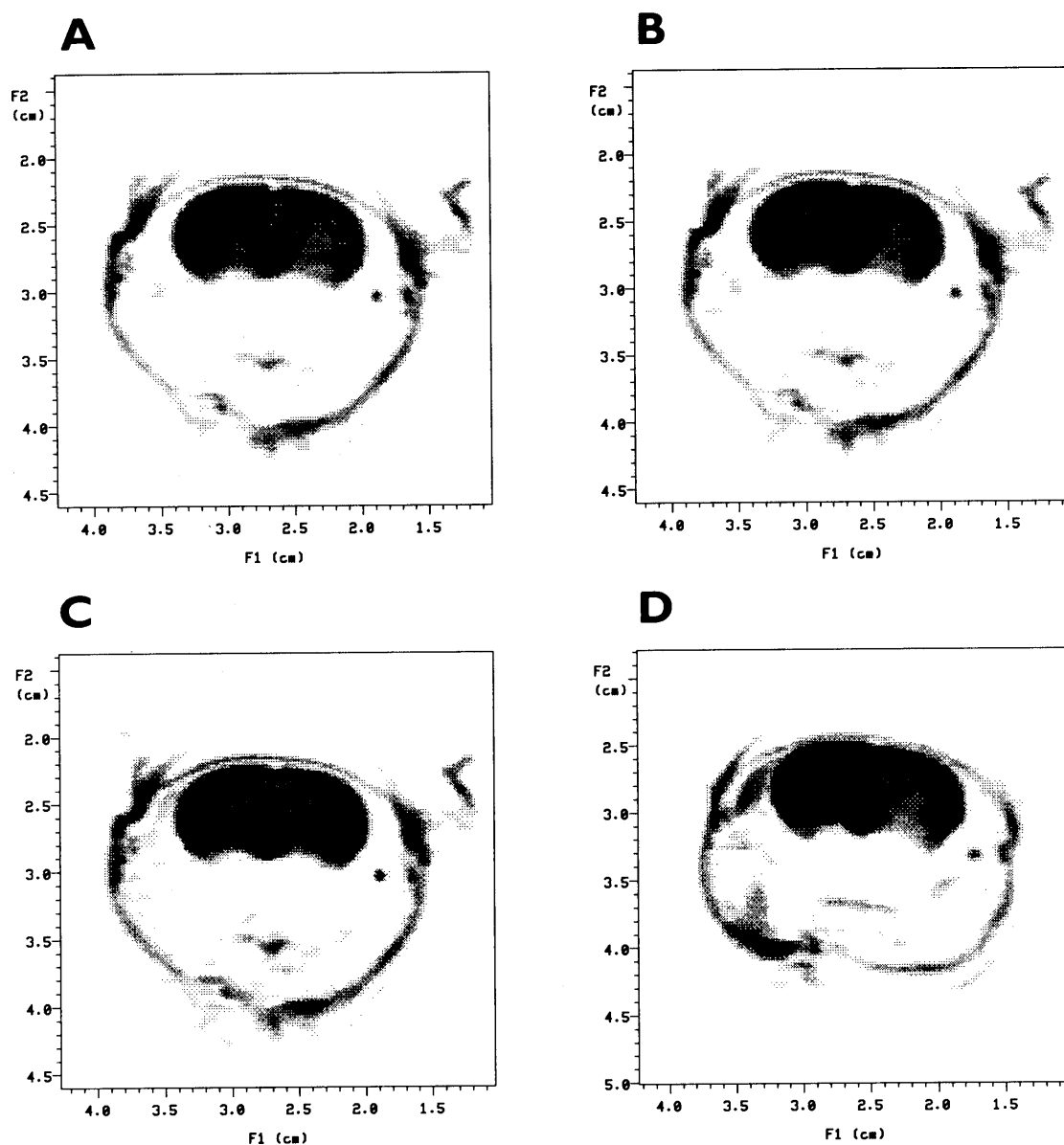
Obr. 3. Porovnanie T<sub>2</sub>-váženého a difúzne váženého MR obrazu mozgu pieskomila mongolského (koronálne rezy). A — T<sub>2</sub>-vážený obraz 155 minút po podvaze pravej a. carotis communis, B — difúzne vážený obraz 170 minút po podvaze pravej a. carotis communis.

Fig. 3. Comparison of T<sub>2</sub>-weighted and diffusion-weighted mongolian gerbil brain MR images (coronal section). A — T<sub>2</sub>-weighted MRI 155 minutes after right common carotid artery occlusion. B — diffusion-weighted MRI 170 minutes after right common carotid artery occlusion.

točnému obnoveniu schopnosti vezikúl naberat vápnik. Pri danom experimentálnom usporiadaní je výsledná rýchlosť naberania vápnika vezikulami daná rozdielom rýchlostí pumpovania vápnika do vezikúl vápnikovou pumpou a rýchlostí pasívneho úniku vápnika z mikrozomálnych vezikúl. Preto sme sledovali aj vplyv ischemie a reperfúzie na Ca<sup>2+</sup>-závislú hydrolyzu ATP zodpovedajúcu aktivite Ca<sup>2+</sup>-pumpy. V kinetických parametroch vápnikovej pumpy sa však nepozorovali žiadne štatisticky významné zmeny. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že ischemia vedie k zmenám membrán endoplazmatického retikula, ktoré sa prejavujú buď zvýšeným pasívnym únikom Ca<sup>2+</sup>, alebo odpojením hydrolyzy ATP od transportu vápnika cez retikulárnu membránu. Existuje niekoľko možností, ako podporiť túto hypotézu. V našej predchádzajúcej práci sme dokumentovali, že inkubácia mikrozómov s rôznymi oxidačnými činidlami schopnými produkovať voľné radikály vedie k zníženiu schopnosti mikrozomálnych vezikúl naberat vápnik, zvýšeniu pasívneho úniku vápnika a odpojeniu hydrolyzy ATP od Ca<sup>2+</sup>-transportu (Račay a spol., 1997). Hoci bola produkcia voľných radikálov počas ischemie a reperfúzie experimentálne dokumentovaná (Oliver a spol., 1990; Zini a spol., 1992), je potrebné v procese degradácie membrán prihliadnuť aj na iné možnosti spočívajúce najmä v aktivácii fosfolipáz. Aktivácia fosfolipázy A<sub>2</sub> špecifickej pre membrány endoplazmatického retikula bola počas ischemie experimentálne dokumentovaná (Rodorf a spol., 1991). Na druhej strane sa pri použití modelu dekapitačnej ischemie zistil pokles rýchlosti akumulácie vápnika mikrozomálnymi vezikulami v dôsledku vplyvu ischemie na Ca<sup>2+</sup>-pumpu a štatis-

ticky nevýznamné zmeny hodnôt rýchlosti pasívneho úniku vápnika (Parsons a spol., 1997).

Podobnú tendenciu sme zistili aj pri sledovaní vplyvu ischemie na rýchlosť synaptozomálneho Na<sup>+</sup>-závislého naberania vápnika. Aj v tomto prípade vedie ischemia k výraznému zníženiu rýchlosti naberania vápnika, pričom počas reperfúzie v trvaní 60 minút dochádza k čiastočnému nárastu tejto rýchlosti. Ischemiou indukovaný pokles aktivity Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka v srdcovom svaly bol zdôvodnený produkciou voľných radikálov a ich inhibičným vplyvom na tento systém (Dixon a spol., 1990). Napriek tomu, že železom indukovaná inhibícia synaptozomálneho Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka sa pozorovala v našom laboratóriu (Kaplán a spol., 1997), toto vysvetlenie predstavuje len jednu z možností. Aktivita synaptozomálneho Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka výrazne vzrastá po jeho fosforylácii proteínkinázou C (Blaustein, 1996). Keďže koncentrácia ATP slúžiaceho ako donor fosfátu pri reakciách katalyzovaných proteínkinázami v dôsledku ischemie veľmi rýchlo klesá (Sims a Zaidan, 1995), je defosforylácia výmenníka, a tým pokles jeho aktivity po dlhodobejšej ischemii, veľmi pravdepodobná. Reperfúzia vedie k nárastu koncentrácie ATP, čo umožňuje opätovnú fosforyláciu výmenníka, a tým zvýšenie jeho aktivity. Aj čiastočný pokles aktivity výmenníka pozorovaný po reperfúzii možno vysvetliť zmenou zloženia synaptozomálnej membrány. Reperfúzia vedie k zníženiu obsahu fosfatidylserínu v synaptozomálnej membráne (obr. 2). Je známe, že aktivita Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenníka srdcového svaly závisí od obsahu kyslých fosfolipidov, vrátane fosfatidylserínu (Vemuri a Philipson, 1990). Vplyv fosfolipidov na ak-



Obr. 4. Difúzne vážené MR obrázky mozgu pieskomila mongolského v rôznych časových intervaloch po podvaze pravej a. carotis communis (koronálne rezy). A — 130 minút, B — 195 minút, C — 315 minút, D — 26 hodín.

Fig. 4. Diffusion-weighted mongolian gerbil brain MRI after different time period of the right common carotid artery occlusion (coronal section). A — 130 minutes, B — 195 minutes, C — 315 minutes, D — 26 hours.

tivitu mozgovej izoformy  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -výmenníka nie je síce doteraz známy, na základe experimentálnych zistení sa však predpokladá výrazná podobnosť v štruktúre a biochemických vlastnostiach mozgovej a srdcovej izoformy  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -výmenníka (Blaustein, 1996).

Vplyv ischémie a reperfúzie na kinetické parametre  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy je oveľa výraznejší. Ischémia vedie k poklesu hodnoty maximálnej rýchlosti, k poklesu afinity enzýmu voči draslíku a nárastu afinity enzýmu voči ATP. Na rozdiel od predchádzajúcich trans-

portných systémov, nedochádza počas reperfúzie k čiastočnému návratu k východiskovým hodnotám a afinita enzýmu voči draslíku klesá aj po reperfúzii v trvaní 60 minút. Pokles aktivity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy v dôsledku ischémie mozgu bol už dokumentovaný (Bertoni a Sprenkle, 1988) a podobná tendencia spolu so zmenou afinity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy sa pozorovala počas ischémie srdcového svalu (Vrbjar a spol., 1991). Regulácia aktivity enzýmu je oveľa komplexnejšia ako regulácia aktivity  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -výmenníka, a tak aj vysvetlenie nameraných výsledkov je komplikovanejšie. Predpokladá

sa, že v skorých štádiách ischémie, keď ešte nedošlo k vyčerpaniu ATP, je aktivita  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy inhibovaná fosforyláciou katalyzovanou proteínkinázou C (Domaňska-Janik a Zablocka, 1993). Aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy výrazne inhibuje faktor aktivujúci trombocyty (Catalán a spol., 1994), ktorého koncentrácia počas ischémie narastá (Nishida a Markey, 1996). Tento mechanizmus by sa mohol uplatniť po dlhodobějších ischémiiach. Počas reperfúzie sa môže na inhibícii  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy zúčastňovať fosforylácia enzýmu najmä proteínkinázou závislou od kalmodulínu, či pokles obsahu kyslých fosfolipidov v synaptozomálnej membráne.

### Záver

Skutočnosť, že  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza je inhibovaná aj počas krátkodobej reperfúzie, by sa mohla zahrnúť v patofyziologických mechanizmoch rozvíjajúcich sa počas reperfúzie. Hlavnou úlohou sodíkovej pumpy je vyčerpanie sodíka z cytoplazmy a udržiavanie sodíkoveho gradientu. Predpokladá sa, že ischémiiou indukované zvýšenie vnútrobunkovej koncentrácie sodíka v dôsledku inhibície  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy je príčinou akumulácie vody v bunke, a teda edému tkaniva, ktorý možno monitorovať snímaním difúzne vážených obrazov magnetickej rezonancie (Mintorovich a spol., 1994). Keďže väčšina bielkovín transportujúcich neurotransmitery zo synaptickej štrbiny do neurónov a gliálnych buniek je poháňaná gradientom sodíka, jeho narušený gradient podporuje akumuláciu neurotransmiterov, najmä excitotoxického glutamátu v synaptickej štrbine, a tým predlžuje ich excitotoxické pôsobenie (Szatkowski a Attwell, 1994). Nízky gradient sodíka má vplyv aj na spomalenie toku vápnika cez  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -výmenník. Keďže tento systém sa uplatňuje najmä pri odčerpávaní vápnika z bunky počas jej preťaženia vápnikom, jeho inhibícia spolu s inhibíciou vápnikovej pumpy môže spôsobiť dlhodobější zvýšené hodnoty koncentrácie vápnika v cytoplazme, čo môže viesť k naštartovaniu rôznych degradačných procesov, ako je proteolýza a aktivácia endonukleáz (Sims a Zaidan, 1995). Naša práca teda poukazuje na možný príspevok zmien biochemických vlastností vybraných transportných systémov indukovaných ischémiiou a reperfúziou k poruche vnútrobunkovej iónovej homeostázy a k procesom vedúcim k poškodeniu CNS pozorovaného po ischémii mozgu.\*

### Literatúra

- Albers R.W., Siegel G.J., Stahl W.L.:** Membrane transport. S. 49—73. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. New York, Raven Press 1994.
- Bertoni J.M., Sprengle P.M.:** Inhibitors of cation pump enzyme equally present in normal and ischemic gerbil brain. *Life Sci.*, 42, 1988, s. 1955—1962.
- Blaustein M.P., Fontana G., Rogowski R.S.:** The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in rat brain synaptosomes. Kinetics and regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 779, 1996, s. 300—317.
- Catalán R.E., Martínez A.M., Arogonés M.D., Fernández I., Miguel B.G., Calcerrada M.C., Pérez M.J.:** Platelet-activating factor inhibits  $(\text{Na},\text{K})\text{ATPase}$  activity in rat brain. *Neurosci. Res.*, 19, 1994, s. 241—244.
- Chu A., Dixon M.C., Saito A., Seiler S., Fleischer S.:** Isolation of sarcoplasmic reticulum fractions referable to longitudinal tubules and junctional terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. S. 36—45. In: Fleischer S., Fleischer B. (Eds.): *Methods in enzymology*. San Diego, Academic Press Inc., 1988.
- Crockard A., Iannotti F., Hunstock A.T., Smith R.D., Harris D., Symon L.:** Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke*, 11, 1980, s. 494—498.
- Dixon I.M.C., Kaneko M., Hata T., Panagia V., Dhalla N. S.:** Alteration in cardiac membrane  $\text{Ca}^{2+}$  transport during oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.*, 99, 1990, s. 125—133.
- Domaňska-Janik K., Zablocka B.:** Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 20, 1993, s. 111—123.
- Edelman A.M., Hunter D.D., Hendrikson A.E., Krebs E.G.:** Subcellular distribution of calcium- and calmodulin-dependent myosin light chain phosphorylating activity in rat cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 5, 1985, s. 2609—2617.
- Henzi V., MacDermott A.B.:** Characteristics and function of  $\text{Ca}^{2+}$ - and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of  $\text{Ca}^{2+}$  in neurons. *Neuroscience*, 46, 1992, s. 251—273.
- Jorgensen P.L.:**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, structure and transport mechanism. S. 1—26. In: De Pont J.H.M. (Ed.): *Molecular aspects of transport proteins*, Elsevier Science Publishers B.V., 1992.
- Juhaszova M., Shimidzu H., Borin M.L., Yip R.K., Santiago E.M., Lindenmayer G.E., Blaustein M.P.:** Localization of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 779, 1996, s. 318—335.
- Jungawalla F.B., Dawson R.M.C.:** The turnover of myelin phospholipids in adult and developing rat brain. *Biochem. J.*, 123, 1971, s. 683—693.
- Kaplán P., Matejovičová M., Mézešová V.:** Iron-induced inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger in synaptosomes: Protection by the pyridoinole stobadine. *Neurochem. Res.*, 22, 1997, s. 1523—1529.
- Kirino T., Tamura A., Sano K.:** Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. S. 39—58. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjo B.K., Welsh F.A. (Eds.): *Progress in Brain Research*, 63, Molecular mechanism of ischemic brain damage. New York—Oxford—Amsterdam, Elsevier 1985.
- Kristián T., Siesjö B.K.:** Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia. S. 27—45. In: *Neuroprotective agents and cerebral ischaemia*. Academic Press Ltd., 1997.
- Kurki T.J.I., Niemi P.T., Lundbom N.:** Gadolinium-enhanced magnetization transfer contrast imaging of intracranial tumors. *J. Magn. Resonance Imaging*, 2, 1992, 401—406.
- Lowry O.H., Lopez J.A.:** The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 162, 1946, s. 421—428.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:** Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, s. 952—958.
- Mayevsky A., Zupi B.:** The mongolian gerbil as a model for cerebral ischemia. S. 27—46. In: Schurr A., Rigor B.M. (Eds.): *Cerebral Ischemia and Resuscitation*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, CRC Press, 1990.

\* Táto práca bola financovaná z grantu VEGA M' SR 1/4176/97.



- Mintorovich J., Yang G.Y., Shimizu H., Kucharczyk J., Chan P.H., Weinstein P.R.:** Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of acute focal cerebral ischemia: Comparison of signal intensity with changes in brain water and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14, 1994, s. 332–336.
- Missiaen L., Wuytack F., Raeymaekers L., DeSmedt H., Droogmans G., Declercq I., Casteels R.:** Ca<sup>2+</sup> extrusion across plasma membrane and Ca<sup>2+</sup> uptake by intracellular stores. *Pharmac. Ther.*, 50, 1991, s. 191–232.
- Nishida K., Markey, S.P.:** Nicardipine and MK-801 attenuate platelet-activating factor increases following cerebral ischemia-reperfusion in gerbils. *Brain Res.*, 733, 1996, s. 203–210.
- Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J., Carney J.M., Floyd R.A.:** Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 5144–5147.
- Ordidge R.J., Helpert J.A., Knight R.A., Qing Z., Welch K.M.A.:** Investigation of cerebral ischemia using magnetization transfer contrast (MTC) MR imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 9, 1991, 895–902.
- Parsons J.T., Churn S.B., DeLorenzo R.J.:** Ischemia-induced inhibition of calcium uptake into rat brain microsomes mediated by Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Neurochem.*, 68, 1997, s. 1124–1134.
- Račay P., Kaplán P., Lehotský J.:** Control of Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Neuronal Cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 15, 1996, s. 193–210.
- Račay P., Lehotský J.:** Intracellular and molecular aspects of Ca<sup>2+</sup>-mediated signal transduction in neuronal cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 15, 1996, s. 273–289.
- Račay P., Kaplán P., Mézešová V., Lehotský J.:** Lipid peroxidation both inhibits Ca<sup>2+</sup>-ATPase and increases Ca<sup>2+</sup> permeability of endoplasmic reticulum membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41, 1997, s. 647–655.
- Reeves J.P.:** Measurement of sodium-calcium exchange activity in plasma membrane. *Methods Enzymol.*, 157, 1988, s. 505–510.
- Reuter H., Porzig H.:** Localization and functional significance of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in presynaptic boutons of hippocampal cells in culture. *Neuron*, 15, 1995, s. 1077–1084.
- Rodorf G., Uemura Y., Bonventre J.V.:** Characterization of phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: enhanced activities of cytosolic, mitochondrial, and microsomal forms after ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.*, 11, 1991, s. 1829–1836.
- Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.:** Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipid and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5, 1970, s. 494–496.
- Schonfeld W., Schonfeld R., Menke K.-H., Weiland J., Repke K.R.H.:** Origin of differences of inhibitory potency of cardiac glycosides in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-transporting ATPase from human cardiac muscle, human brain cortex and guinea-pig cardiac muscle. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1986, s. 3221–3231.
- Sims N.R., Zaidan E.:** Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 1995, s. 531–550.
- Silverstein F.S., Nelson C.:** The microsomal calcium-ATPase inhibitor thapsigargin is a neurotoxin in perinatal rodent brain. *Neurosci. Lett.*, 145, 1992, s. 157–160.
- Szatkowski M., Attwell D.:** Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phase of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci.*, 17, 1994, s. 359–365.
- Tada M., Kadoma M., Inui M., Fujii J.I.:** Regulation of Ca<sup>2+</sup> pump from cardiac sarcoplasmic reticulum. S. 107–154. In: Fleischer S., Fleischer B. (Eds.): *Methods in enzymology*. San Diego, Academic Press Inc. 1988.
- Taylor C.W.:** Why do hormones stimulate Ca<sup>2+</sup> mobilization? *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 1995, s. 637–642.
- Vemuri R., Philipson K.D.:** Influence of phospholipid fatty acyl composition on sarcolemmal and sarcoplasmic reticular cation transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 1990, s. 917–922.
- Vrbjar N., Slezák J., Ziegelhoffer A., Tribulova N.:** Features of the (Na,K)-ATPase of cardiac sarcolemma with particular reference to myocardial ischaemia. *Europ. Heart J.*, 12, 1991, s. 149–152.
- White B.C., Grossman L.I., Krause G.S.:** Brain injury by global ischemia and reperfusion: A theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*, 43, 1993, s. 1656–1665.
- Zini I., Tomasi A., Grimaldi R., Vannini V., Agnati L.F.:** Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci. Lett.*, 138, 1992, s. 279–282.