

Effetto dell'ipossia intermittente e del trattamento farmacologico sul metabolismo energetico cerebrale

Fiorenzo Dagani, Fulvio Marzatico, Daniela Curti, Federica Zanada, GianMartino Benzi

F. Dagani

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

F. Marzatico

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

D. Curti

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

F. Zanada

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

G. Benzi

*Direttore Fiduciario del
C. S. & R. F.I.D.A.L.*

Introduzione

Il corretto funzionamento delle cellule nervose è strettamente legato ad un appropriato apporto di ossigeno, dato che moderate diminuzioni di tale apporto determinano una serie di eventi fisiologici e biochimici che causano una rapida perdita della funzione neuronale (Massopust et al., 1969; Cohen, 1973; Mac Millan et al., 1976). Insulti ipossici acuti determinano profonde variazioni nei livelli di neurotrasmettitori cerebrali (Wood et al., 1968; Duffy et al., 1972; Bowen et al., 1976; Gibson et al., 1978): infatti alla PaO_2 di 35 torr la sintesi di catecolamine e di indolamine è inibita (Davis e Carlsson, 1973; Davis, 1976). Già in condizioni ipossiche blande possono intervenire variazioni nel metabolismo intermedio o in quello dei neurotrasmettitori, come nel caso dell'acetilcolina la cui sintesi subisce una diminuzione del 40-50% a valori PaO_2 di 42-57 torr (Gibson e Duffy, 1981) o come nel caso della glicolisi che viene stimolata già ad una PaO_2 di 50 torr (Norberg et al., 1975). Al contrario, alcuni metabolismi cerebrali sono meno sensibili alle variazioni della PaO_2 : infatti bisogna raggiungere valori di PaO_2

di circa 25 torr per registrare un accumulo degli intermedi del ciclo di Krebs (Bachelard et al., 1974). Pressioni parziali di O₂ ancora più basse (20 torr) determinano profonde variazioni nel contenuto di nucleotidi ciclici (Folbergrovà et al., 1981) e nella composizione fosfolipidica delle membrane delle cellule nervose con massiccia liberazione di acidi grassi liberi: tali modificazioni sono legate ad una sensibile compromissione del metabolismo energetico (Gardiner et al., 1981).

In condizioni di ipossia normobarica intermittente protratta nel tempo si registrano variazioni nel metabolismo cerebrale dei lipidi, con una diminuita incorporazione di fosfolipidi nella frazione mitocondriale (Alberghina e Giuffrida, 1981) e con un decremento nell'attività di alcuni enzimi legati alla sintesi dei lipidi presenti nella frazione microsomiale degli emisferi cerebrali (Alberghina et al., 1982). Nelle stesse condizioni di ipossia intermittente le sintesi delle proteine e degli acidi nucleici vengono notevolmente influenzate, con un decremento nell'incorporazione di precursori marcati nel DNA, nell'RNA e nelle proteine cerebrali. Ciò avviene allorché la noxa ipossica è presente ogni giorno, per la durata di circa una settimana (Serra et al., 1981). Pochi dati sono disponibili per l'ipossia normobarica intermittente per quanto riguarda gli enzimi connessi specificatamente con la trasduzione energetica (Hamberger e Hyden, 1963; Berlet et al., 1979). Pertanto lo scopo di questa ricerca è stato quello di evidenziare gli effetti dell'ipossia normobarica intermittente su molti enzimi connessi con il metabolismo energetico, valutandoli in differenti aree cerebrali di ratto ed a diversi livelli di subfrazionamento: nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda. Inoltre è stata valutata l'influenza sulla condizione ipossica del trattamento con tre diverse dosi di naftidrofuryl. Tale farmaco induce effetti vasodilatatori sia a livello muscolare che cerebrale, dove attua anche una moderata attivazione dell'EEG (Fontaine et al., 1968, 1969; Pourrias e Raynaud, 1972; Takagi et al.,

1972; Yanagita et al., 1972). Si è supposto che ciò sia in relazione con alcune modificazioni del metabolismo cerebrale, con particolare riferimento al catabolismo del glucosio (Meynaud et al., 1975).

Materiali e metodi

Animali e trattamenti

Tutti gli animali utilizzati furono mantenuti in condizioni ambientali costanti per temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), umidità relativa ($60 \pm 5\%$) e ciclo circadiano (12 ore luce e 12 ore buio), nutriti con normali diete di laboratorio ed acqua ad libitum. In totale furono utilizzati 5 lotti di ratti femmine di 16 settimane di età (Charles River; ceppo Sprague Dawley) del peso di 250 ± 20 gr. Le caratteristiche dei vari lotti erano le seguenti: Lotto 1 (controlli): animali a riposo respiranti aria ambiente e trattati quotidianamente con soluzione fisiologica i.m. per cinque giorni. Lotto 2 (ipossici): animali mantenuti in ipossia normobarica in camera stagna con atmosfera: 90% azoto e 10% ossigeno per 12 ore al giorno (dalle 8 alle 20) per cinque giorni consecutivi e trattati quotidianamente con soluzione fisiologica i.m.. Lotti 3, 4 e 5 (ipossici trattati): animali mantenuti in ipossia normobarica come il lotto 2, ma trattati quotidianamente con una dose di 10 oppure di 15 oppure di 22,5 mg/kg i.m. di naftidrofuryl. I trattamenti per gli animali dei lotti 2; 3; 4 e 5 sono stati effettuati 30 minuti prima dell'introduzione nella camera per l'ipossia.

Gli animali sono stati sacrificati 12 ore dopo il termine dell'ultimo periodo ipossico; il cervello è stato prelevato ed immerso in una soluzione fredda di saccarosio 0.32 M. Successivamente sono state isolate (Glowinski e Iversen, 1966) le singole aree cerebrali: corteccia cerebrale, ippocampo, corpo striato, ipotalamo, cervelletto e midollo allungato. Tutte le operazioni di prelevamento e di dissezione sono state compiute in box refrigerato a -5°C .

Le aree cerebrali sono state omogeneate in saccarosio 0.32 M (10 p/v) in un omogenizzatore Potter Braun S refrige-

rato (1 minuto, 3 passaggi, 800 r.p.m.); un'aliquota dell'omogenato così ottenuta fu utilizzata per le determinazioni delle attività enzimatiche connesse con la glicolisi: esochinasi, EC 2.7.1.1 (Knull et al., 1973); fosfofruttochinasi EC 2.7.1.11 (Sugden e Newsholme, 1975); piruvato chinasi EC 2.7.1.40 (Johnson, 1960); lattato deidrogenasi, EC 1.1.1.27 (Bergmeyer e Bernt, 1974); il restante omogenato è stato centrifugato una prima volta a 900 x g per 10 minuti in una centrifuga refrigerata Beckman J 21C con rotore JA20 per isolare la frazione nucleare. I nuclei sedimentati sono stati lavati con saccarosio 0.32 M, risospesi e ricentrifugati come sopra descritto.

I surnatanti della prima e della seconda centrifugazione sono stati unitamente centrifugati a 11.500 x g per 20 minuti per ottenere la frazione mitocondriale cruda che, dopo un solo lavaggio, è stata risospesa in 1 ml di saccarosio 0.32 M. La frazione mitocondriale è stata quindi stratificata su gradiente discontinuo di saccarosio di diverse molarità: 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 M (De Robertis et al., 1962) e centrifugato a 88.000 x g per 1 ora in un'ultracentrifuga refrigerata Beckman L5-50 (rotore Beckman SW 50.1) per ottenere la frazione mitocondriale purificata e la frazione sinaptosomale cruda. Quest'ultima è stata recuperata per aspirazione e quindi è stata sedimentata con una centrifugazione a 48.000 x g per 30 min. Sulla frazione mitocondriale purificata sono state valutate alcune attività enzimatiche: (a) del ciclo di Krebs: citrato sintetasi; EC 4.1.3.7. (Sugden e Newsholme, 1975); succinato deidrogenasi, EC 1.3.99.1 (Ackrell et al., 1978), malato deidrogenasi, EC 1.1.1.37 (Ochoa, 1955); (b) della catena di trasporto elettronico: NADH citocromo e reduttasi totale, EC 1.6.99.3. (Nason e Vasington, 1963); citocromo ossidasi, EC 1.9.3.1. (Smith, 1955); (c) per il metabolismo aminoacidico: glutamato deidrogenasi, EC 1.4.1.3. (Sugden e Newsholme, 1975). Inoltre è stata valutata l'attività dell'esochinasi, EC 2.7.1.1 (Knull et al., 1973). Sulla frazione sinaptosomale cruda sono state valutate alcune attività enzimatiche: (a) per il metabolismo dell'acetilcolina, acetilcoline-

sterasi, EC 3.1.1.7 (Ellman et al., 1961); (b) per la glicolisi: lattato deidrogenasi, EC 1.1.1.37 (Bergmeyer e Bernt, 1974); (c) per il metabolismo ossidativo sinaptosomale, malato deidrogenasi, EC 1.1.1.37 (Ochoa, 1955), citocromo ossidasi, EC 1.9.3.1 (Smith, 1955).

Nell'omogenato in toto e nelle varie frazioni subcellulari è stato valutato il contenuto proteico (Lowry et al. 1966). La valutazione statistica dei risultati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza (ANOVA).

Risultati

Nell'omogenato in toto di corteccia cerebrale (Tabella 1) tutte le attività enzimatiche valutate, per tutte le condizioni saggiate, non mostrano differenze significative, mentre nella frazione mitocondriale purificata l'attività dell'enzima malato deidrogenasi è significativamente decrementata: (a) negli ippocici trattati con 10 mg/kg di naftidrofuryl nei confronti dei controlli (< 0.05); (b) nei trattati con la dose di 15 mg/kg sia verso i controlli (< 0.01) che verso gli ippocici non trattati (< 0.05). Anche l'attività dell'enzima glutamato deidrogenasi negli ippocici trattati con 10 mg/kg di naftidrofuryl decrementa significativamente nei confronti dei controlli (< 0.05). Nella frazione sinaptosomale l'attività dell'acetilcolinesterasi decrementa di circa il 50% negli ippocici trattati con 10 mg/kg nei confronti sia dei controlli (< 0.05) che degli ippocici (< 0.01), mentre per le dosi di 15 mg/kg e di 22,5 mg/kg l'attività è significativamente più bassa rispetto agli ippocici (< 0.05).

Nell'omogenato in toto di ippocampo (Tabella 2) l'attività della piruvato chinasi decrementa negli ippocici trattati con la dose di 10 mg/kg di naftidrofuryl verso gli animali ippocici. Nella frazione mitocondriale purificata non si rilevano differenze significative per tutti gli enzimi saggiati, mentre nella frazione sinaptosomale cruda l'attività dell'enzima citocromo ossidasi è significativamente più bassa negli ippocici (< 0.01) e negli ippocici trattati sia con 10 mg/kg (< 0.01) che con 15 mg/kg di nafti-

TABELLA 1 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di corteccia cerebrale di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.min⁻¹.mg proteine⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli	Ipossici	Ipossici trattati con naftidrofuryl	
			10 mg.kg ⁻¹	22,5 mg.kg ⁻¹
Esochinasi	87 ± 6	90 ± 5	96 ± 14	76 ± 3
Fosfofruttochinasi	53 ± 7	53 ± 10	48 ± 7	45 ± 5
Piruvato chinasi	285 ± 56	244 ± 21	258 ± 54	194 ± 15
Lattato deidrogenasi	590 ± 39	599 ± 26	645 ± 70	588 ± 39
Citrato sintasi	199 ± 31	204 ± 22	175 ± 17	138 ± 16
Succinato deidrogenasi	134 ± 10	136 ± 19	148 ± 12	98 ± 13
Malato deidrogenasi	2450 ± 280	2224 ± 212	1745 ± 118*	1512 ± 84**◇
NADH-citocromo c reduttasi totale	238 ± 34	311 ± 44	278 ± 23	231 ± 29
Citocromo ossidasi	1807 ± 111	1578 ± 87	1593 ± 184	1359 ± 305
Glutamato deidrogenasi	327 ± 10	330 ± 26	232 ± 28*	258 ± 21
Esochinasi	190 ± 21	195 ± 9	200 ± 11	177 ± 8
Lattato deidrogenasi	296 ± 90	310 ± 62	179 ± 30	166 ± 16
Malato deidrogenasi	723 ± 110	685 ± 131	467 ± 45	516 ± 59
Citocromo ossidasi	122 ± 4	88 ± 4	80 ± 6	92 ± 9
Acetilcolinesterasi	107 ± 16	134 ± 26	64 ± 12*◇◇	73 ± 8◇

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali.
 Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: * P<0.05; ** P<0.01.
 Differenza significativa nei confronti degli animali ipossici: ◇ P<0.05; ◇◇ P<0.01.

TABELLA 2 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di ippocampo di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.mib⁻¹.mg proteine⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli	Ipossici	Ipossici trattati con naftidrofuryl		
			10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	22,5 mg.kg ⁻¹
Esochinasi	75 ± 10	77 ± 3	79 ± 11	68 ± 4	82 ± 3
Fosfofruttochinasi	52 ± 6	47 ± 6	40 ± 5	43 ± 5	47 ± 6
Piruvato chinasi	225 ± 7	254 ± 25	171 ± 28◇	196 ± 13	287 ± 23
Lattato deidrogenasi	658 ± 43	704 ± 54	634 ± 41	616 ± 48	725 ± 29
Citrato sintasi	171 ± 25	148 ± 19	141 ± 16	116 ± 6	125 ± 11
Succinato deidrogenasi	121 ± 19	117 ± 10	130 ± 5	80 ± 9	122 ± 17
Malato deidrogenasi	1837 ± 91	1743 ± 223	1765 ± 146	1412 ± 63	1610 ± 135
NADH-citocromo c reductasi totale	241 ± 33	298 ± 32	294 ± 32	240 ± 22	216 ± 20
Citocromo ossidasi	1416 ± 171	1155 ± 149	1370 ± 202	1201 ± 207	1047 ± 256
Glutamato deidrogenasi	289 ± 18	313 ± 17	261 ± 30	286 ± 26	306 ± 21
Esochinasi	166 ± 15	183 ± 13	172 ± 9	166 ± 10	184 ± 15
Lattato deidrogenasi	273 ± 40	239 ± 42	197 ± 29	193 ± 20	144 ± 52
Malato deidrogenasi	670 ± 78	467 ± 43	427 ± 30	444 ± 47	715 ± 156
Citocromo ossidasi	146 ± 14	79 ± 15**	76 ± 8**	87 ± 10*	134 ± 24
Acetilcolinesterasi	121 ± 19	90 ± 16	52 ± 10**◇	65 ± 8**	64 ± 5*

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali.

Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: * P<0.05; ** P<0.01.

Differenza significativa nei confronti degli animali ippocici: ◇ P<0.05; ◇◇ P<0.01.

drofuryl nei confronti dei controlli. L'attività dell'acetilcolinesterasi non viene influenzata dall'ipossia, mentre il trattamento farmacologico la decrementa significativamente negli animali ipossici trattati con 10 mg/kg sia nei confronti dei controlli (< 0.01) che degli ipossici (< 0.05); alle dosi superiori l'attività della acetilcolinesterasi è significativamente più bassa nei confronti dei controlli (< 0.01 e < 0.05 , rispettivamente).

Nel corpo striato (Tabella 3) le condizioni saggiate non determinano variazioni significative nelle attività enzimatiche valutate nell'omogenato, mentre nella frazione mitocondriale pura l'attività della succinato deidrogenasi incrementa significativamente in ipossia (< 0.05). Questo incremento nei confronti dei controlli si osserva anche negli ipossici trattati con le dosi di 10 mg/kg e di 22,5 mg/kg di naftidrofuryl: a quest'ultima dose l'incremento risulta essere significativo anche nei confronti degli animali ipossici (< 0.05) mentre alla dose di 15 mg/kg l'attività non differisce significativamente dai controlli, pur risultando significativamente più bassa rispetto agli ipossici. Nella frazione sinaptosomale cruda l'attività della citocromo ossidasi mostra un decremento significativo negli animali ipossici (< 0.01) nei confronti sia dei controlli che degli ipossici trattati con 10 e 15 mg/kg (< 0.01 e < 0.05 rispettivamente), mentre alla dose più alta l'attività enzimatica non differisce dai controlli.

Nell'omogenato in toto di ipotalamo (Tabella 4) negli animali ipossici trattati con 15 mg/kg di naftidrofuryl l'attività della piruvato chinasi decrementa significativamente nei confronti degli ipossici (< 0.05).

Nella frazione mitocondriale pura non si riscontrano differenze significative, mentre nei sinaptosomi l'attività dell'acetilcolinesterasi mostra un significativo decremento in seguito al trattamento farmacologico, alla dose di 10 mg/kg e 15 mg/kg di naftidrofuryl sia nei confronti dei controlli (< 0.01 e < 0.05 , rispettivamente) che degli ipossici (< 0.05 in entrambi i casi), mentre alla do-

se di 22,5 mg/kg l'attività differisce significativamente solo dai controlli (< 0.05).

Nel cervelletto (Tabella 5) i risultati ottenuti sull'omogenato in toto mostrano che negli ipossici trattati sia con 10 mg/kg sia con 15 mg/kg di naftidrofuryl l'attività della piruvato chinasi decrementa significativamente nei confronti sia dei controlli (< 0.05 e < 0.01 , rispettivamente) che degli ipossici (< 0.05 e < 0.01 , rispettivamente). Nella frazione mitocondriale purificata, le attività enzimatiche valutate non mostrano alcuna differenza significativa sia nei confronti dei controlli che nei confronti degli ipossici, mentre nella frazione sinaptosomale cruda l'attività della malato deidrogenasi decrementa in modo significativo negli ipossici (< 0.05); tale decremento nei confronti dei controlli risulta presente anche per gli ipossici trattati con 10 mg/kg e 15 mg/kg di naftidrofuryl mentre per gli animali ipossici trattati con la dose di 22,5 mg/kg l'attività non mostra differenze rispetto ai controlli. A livello della frazione sinaptosomale anche l'attività della citocromo ossidasi è significativamente più bassa negli ipossici rispetto ai controlli (< 0.05), mentre gli animali ipossici trattati con le tre diverse dosi di naftidrofuryl non mostrano differenze significative nei confronti dei controlli.

Per il midollo allungato (Tabella 6) tutte le condizioni saggiate non hanno determinato variazioni significative per gli enzimi valutati sia nell'omogenato in toto che nella frazione mitocondriale pura. Invece, nella frazione sinaptosomale cruda, l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi decrementa significativamente negli ipossici trattati con 10 mg/kg di naftidrofuryl nei confronti degli ipossici non trattati (< 0.05); tale diminuzione si registra anche per gli ipossici trattati con la dose di 15 mg/kg nei confronti sia degli ipossici non trattati (< 0.01) che dei controlli (< 0.05). Infine per gli ipossici trattati con la dose di 22,5 mg/kg di naftidrofuryl, l'attività dell'enzima è significativamente più bassa nei confronti degli ipossici non trattati (< 0.05).

TABELLA 3 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di corpo striato di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.min⁻¹.mg proteine⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli	Ipossici	Ipossici trattati con naftidrofuryl		
			10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	22,5 mg.kg ⁻¹
Omogenato in toto					
Esochinasi	69 ± 7	58 ± 4	63 ± 7	59 ± 6	68 ± 5
Fosfofruttochinasi	43 ± 8	44 ± 7	32 ± 3	30 ± 3	37 ± 3
Piruvato chinasi	250 ± 15	259 ± 30	257 ± 26	200 ± 26	287 ± 13
Lattato deidrogenasi	660 ± 23	658 ± 47	771 ± 72	591 ± 57	740 ± 27
Citrato sintasi	154 ± 18	174 ± 25	155 ± 14	127 ± 8	172 ± 18
Succinato deidrogenasi	83 ± 15	130 ± 10*	143 ± 10**	85 ± 9◇	157 ± 21**◇
Malato deidrogenasi	1767 ± 154	2001 ± 304	1925 ± 160	1451 ± 69	1776 ± 154
NADH-citocromo c reductasi totale	262 ± 67	252 ± 30	341 ± 43	235 ± 15	281 ± 25
Citocromo ossidasi	1680 ± 233	1161 ± 237	1565 ± 280	1301 ± 266	1213 ± 217
Glutamato deidrogenasi	326 ± 32	308 ± 15	289 ± 27	247 ± 24	311 ± 42
Esochinasi	143 ± 16	169 ± 10	152 ± 21	149 ± 7	174 ± 15
Frazione mitocondriale purificata					
Lattato deidrogenasi	207 ± 40	215 ± 40	172 ± 24	184 ± 24	227 ± 28
Malato deidrogenasi	638 ± 125	624 ± 98	437 ± 73	462 ± 28	730 ± 152
Citocromo ossidasi	205 ± 59	77 ± 12**	86 ± 16**	97 ± 8*	135 ± 20
Frazione sinaptosomale cruda					
Acetilcolinesterasi	143 ± 17	163 ± 36	122 ± 24	118 ± 17	143 ± 17

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali.

Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: * P<0.05; ** P<0.01.

Differenza significativa nei confronti degli animali ipossici: ◇ P<0.05; ◇◇ P<0.01.

TABELLA 4 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di ipotalamo di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.min⁻¹.mg proteine⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli	Ipossici	Ipossici trattati con naftidrofuryl		
			10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	22,5 mg.kg ⁻¹
Omogenato in toto					
Esochinasi	72 ± 10	66 ± 7	76 ± 10	67 ± 6	74 ± 9
Fosfofruttochinasi	33 ± 3	38 ± 6	25 ± 2	28 ± 4	31 ± 5
Piruvato chinasi	245 ± 15	256 ± 28	205 ± 29	181 ± 19◇	268 ± 25
Lattato deidrogenasi	553 ± 32	594 ± 23	610 ± 47	570 ± 51	693 ± 44
Frazione mitocondriale purificata					
Citrato sintasi	126 ± 4	139 ± 18	137 ± 15	114 ± 11	127 ± 8
Succinato deidrogenasi	79 ± 7	79 ± 8	80 ± 9	65 ± 6	96 ± 14
Malato deidrogenasi	2011 ± 247	1704 ± 260	1628 ± 177	1426 ± 59	1807 ± 87
NADH-citocromo c reductasi totale	212 ± 50	209 ± 30	243 ± 28	196 ± 21	206 ± 15
Citocromo ossidasi	1026 ± 66	893 ± 192	1074 ± 195	1062 ± 261	932 ± 127
Glutamato deidrogenasi	413 ± 30	364 ± 16	343 ± 45	382 ± 17	418 ± 38
Esochinasi	122 ± 24	147 ± 18	167 ± 12	148 ± 11	176 ± 8
Frazione sinaptosomale cruda					
Lattato deidrogenasi	279 ± 35	261 ± 40	209 ± 43	243 ± 40	291 ± 59
Malato deidrogenasi	718 ± 68	749 ± 124	602 ± 170	629 ± 68	833 ± 75
Citocromo ossidasi	164 ± 30	122 ± 16	136 ± 53	124 ± 14	152 ± 47
Acetilcolinesterasi	78 ± 14	72 ± 11	39 ± 7◇	43 ± 4◇	46 ± 5*

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali. Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: *P<0.05; **P<0.01. Differenza significativa nei confronti degli animali ipossici: ◇P<0.05; ◇◇P<0.01.

TABELLA 5 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di cervelletto di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.min⁻¹.mg proteina⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli		Ipossici		Ipossici trattati con naftidrofuryl	
					10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹ 22,5 mg.kg ⁻¹
Omogenato in toto	Esochinasi	98 ± 14	66 ± 4	94 ± 20	69 ± 8	74 ± 8
	Fosfofruttochinasi	49 ± 5	48 ± 7	43 ± 6	43 ± 4	43 ± 7
	Piruvato chinasi	330 ± 32	329 ± 20	239 ± 35*	210 ± 25**	336 ± 31
	Lattato deidrogenasi	646 ± 74	632 ± 48	559 ± 60	503 ± 59	617 ± 51
Frazione mitocondriale purificata	Citrato sintasi	312 ± 47	250 ± 87	270 ± 27	245 ± 25	278 ± 26
	Succinato deidrogenasi	88 ± 9	129 ± 17	129 ± 6	113 ± 7	174 ± 39
	Malato deidrogenasi	2413 ± 173	2200 ± 232	2179 ± 256	1730 ± 102	1932 ± 296
	NADH-citocromo c reductasi totale	267 ± 30	351 ± 48	437 ± 62	354 ± 23	385 ± 38
	Citocromo ossidasi	2318 ± 349	1935 ± 292	2446 ± 600	2413 ± 214	1820 ± 182
	Glutamato deidrogenasi	408 ± 48	423 ± 32	360 ± 48	374 ± 53	445 ± 58
	Esochinasi	202 ± 17	174 ± 23	203 ± 35	194 ± 10	224 ± 13
	Lattato deidrogenasi	185 ± 19	122 ± 12	114 ± 12	169 ± 37	171 ± 43
	Malato deidrogenasi	847 ± 130	494 ± 44*	471 ± 64**	537 ± 35*	721 ± 141
	Citocromo ossidasi	217 ± 35	96 ± 20*	165 ± 29	164 ± 13	322 ± 72
Frazione sinaptosomale cruda	Acetilcolinesterasi	66 ± 17	54 ± 10	44 ± 13	36 ± 3	36 ± 9

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali. Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: *P<0.05; **P<0.01. Differenza significativa nei confronti degli animali ipossici: ◇P<0.05; ◇◇P<0.01.

TABELLA 6 - Attività enzimatiche valutate nell'omogenato in toto, nella frazione mitocondriale purificata e nella frazione sinaptosomale cruda di midollo allungato di ratto. Le attività enzimatiche sono espresse come nmoli.min⁻¹.mg proteine⁻¹.

Attività enzimatiche	Controlli	Ipossici	Ipossici trattati con naftidrofuryl		
			10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹	22,5 mg.kg ⁻¹
Omogenato in toto					
Esochinasi	53 ± 5	66 ± 7	53 ± 10	53 ± 9	55 ± 7
Fosfofruttochinasi	51 ± 9	39 ± 6	43 ± 6	43 ± 7	40 ± 4
Piruvato chinasi	210 ± 13	258 ± 16	226 ± 49	178 ± 28	263 ± 36
Lattato deidrogenasi	488 ± 31	623 ± 60	539 ± 82	503 ± 59	605 ± 43
Frazione mitocondriale purificata					
Citrato sintasi	269 ± 18	276 ± 36	312 ± 48	301 ± 21	289 ± 36
Succinato deidrogenasi	124 ± 29	138 ± 14	169 ± 27	123 ± 11	177 ± 36
Malato deidrogenasi	2158 ± 243	2229 ± 188	2393 ± 219	1974 ± 37	2310 ± 302
NADH-citocromo c reductasi totale	334 ± 52	321 ± 50	422 ± 53	371 ± 27	385 ± 40
Citocromo ossidasi	2399 ± 186	1891 ± 402	2939 ± 465	2855 ± 378	1980 ± 206
Glutamato deidrogenasi	589 ± 93	720 ± 56	762 ± 73	758 ± 54	827 ± 113
Esochinasi	160 ± 17	182 ± 35	158 ± 31	184 ± 7	180 ± 14
Frazione sinaptosomale cruda					
Lattato deidrogenasi	177 ± 30	201 ± 38	124 ± 23	158 ± 24	176 ± 41
Malato deidrogenasi	810 ± 156	684 ± 113	765 ± 128	594 ± 35	949 ± 156
Citocromo ossidasi	247 ± 27	138 ± 41	215 ± 50	176 ± 43	290 ± 73
Acetilcolinesterasi	53 ± 13	61 ± 12	29 ± 7◇	28 ± 2*◇	29 ± 3◇

I risultati sono espressi come media ± E.S. di gruppi composti da 4-7 animali. Differenza significativa nei confronti degli animali di controllo: *P<0.05; **P<0.01. Differenza significativa nei confronti degli animali ipossici: ◇P<0.05; ◇◇P<0.01.

Discussione

Gli effetti dell'ipossia normobarica intermittente di grado moderato sono particolarmente evidenti a livello della frazione sinaptosomale cruda dove l'attività della citocromo ossidasi decrementa significativamente in tre distinte aree cerebrali (ippocampo, striato e cervelletto) e l'attività della malato deidrogenasi diminuisce significativamente nel cervelletto. A livello della frazione mitocondriale purificata, solo la succinato deidrogenasi incrementa significativamente nello striato per effetto dell'ipossia intermittente. Al contrario, nell'ipossia acuta di breve durata, la citocromo ossidasi dei mitocondri risulta essere notevolmente aumentata (Hamberger e Hydein, 1963; Smialek e Hamberger, 1970).

A livello sinaptosomale nelle condizioni ipossiche si verificano alterazioni sia a carico del metabolismo energetico (Rafalowska et al., 1980; Benzi et al., 1981), sia a carico del metabolismo ossidativo del glucosio o del piruvato (Gibson et al., 1975), sia a carico dei flussi ionici transmembrana (Pastuszko et al., 1981), sia a carico di alcune glicoproteine di membrana che sono modificate nella loro porzione glicosidica con interessamento dei meccanismi molecolari intrasinaptici (Rossowska, 1982), sia a carico della sintesi di acetilcolina (Harvey et al., 1982; Ksiezak e Gibson, 1981; Gibson et al., 1975; Gibson et al., 1978). Inoltre anche il metabolismo del GABA varia in diversa misura, sia con un aumento delle concentrazioni tissutali durante l'ipossia acuta (Wood et al., '68), sia con la diminuzione di questi in seguito ad ipossia cronica prolungata di media intensità (Arregui e Barer, 1980). Questa diminuzione di GABA sarebbe da imputare ad una diminuita attività dell'enzima sintetizzante glutamato decarbossilasi che, insieme alla tirosina idrossilasi, è presente essenzialmente nel sinaptoplasma. D'altra parte la tirosina idrossilasi risulta particolarmente sensibile alle concentrazioni di O_2 essendo modulata da quest'ultimo (Davis e Carlsson, 1973). Infine in condizioni ipossiche anche le concentrazioni di aminoacidi con significato neurotrasmet-

titivo decrementano significativamente (Gibson et al., 1981).

In accordo con tutti questi dati della letteratura, i nostri risultati evidenziano come il compartimento sinaptosomale sia particolarmente sensibile alle condizioni ipossiche. Il decremento dell'attività della citocromo ossidasi sinaptosomale probabilmente riflette un adattamento dell'attività dell'enzima alle condizioni di bassa tensione di ossigeno, dimostrando una diversa sensibilità dell'enzima presente nei mitocondri sinaptici, rispetto a quello presente nei mitocondri non sinaptici. Ciò confermerebbe anche in condizioni di fisiopatologia come siano rilevabili differenti comportamenti metabolici fra mitocondri sinaptici e non sinaptici, in accordo con quanto già descritto in condizioni normali (Lai e Clark, 1976; Lai et al., 1977). Un analogo fenomeno di adattamento può spiegare l'incremento dell'attività della succinato deidrogenasi nei mitocondri puri di corpo striato, in accordo con quanto già osservato nel tessuto cardiaco sottoposto ad ipossia cronica sperimentale (Mela et al., 1976) ed in seguito ad esposizione a basse tensioni di O_2 da alta quota (Shertzer e Cascarano, 1972; Tappan et al., 1957). Poiché sia la citocromo ossidasi che la succinato deidrogenasi sono enzimi legati alla membrana interna mitocondriale, le variazioni nelle loro attività potrebbero anche essere dovute alle alterazioni della sintesi fosfolipidica evidenziate con un modello sperimentale analogo a quello da noi utilizzato (Alberghina e Giuffrida, 1981). Il complesso di queste osservazioni indica come la ripetitività della condizione ipossica possa portare in breve tempo a delle profonde variazioni nelle condizioni biochimiche cerebrali, che sembrerebbero essere diversificate per quanto riguarda specificatamente alcune aree, alcuni livelli di subfrazionamento ed alcune attività enzimatiche.

La somministrazione cronica di naftidrofuryl determina variazioni in varie attività enzimatiche valutate sia nell'omogenato in toto che nei mitocondri puri e nei sinaptosomi crudi. A livello dell'omogenato in toto il trattamento farmacologico decrementa significativa-

mente l'attività della piruvato chinasi nell'ipocampo, nell'ipotalamo e soprattutto nel cervelletto. E' noto che la piruvato chinasi è una tappa modulante la velocità della glicolisi (Siesjö, 1978) per cui una azione farmacologica a livello di questo enzima può essere importante per variare tale velocità glicolitica che in condizioni di ipossia acuta viene notoriamente incrementata, portando ad un aumento del lattato cerebrale (Norberg e Siesjö, 1974; Norberg et al., 1975). Poiché la somministrazione di naftidrofuryl diminuisce il lattato in condizioni di normalità e contrasta il suo forte aumento in condizioni ischemiche (Meynaud et al., 1975), il meccanismo attraverso il quale si esplica questo fenomeno potrebbe essere spiegato con lo specifico decremento dell'attività dell'enzima piruvato chinasi. Il decremento indotto dal farmaco sulle attività enzimatiche malato deidrogenasi e glutamato deidrogenasi sulla frazione mitocondriale purificata e la diminuzione (limitatamente alla dose di 10 mg/kg) dell'attività della succinato deidrogenasi potrebbe essere espressione di un'azione metabolica « frenante » a carico del ciclo di Krebs. Ciò potrebbe evidenziare una sparing action (azione di risparmio) caratteristica di altri farmaci dimostratisi in grado di proteggere il cervello in condizioni ipossiche (Benzi et al., 1982).

A livello sinaptosomale il trattamento con naftidrofuryl interferisce con alcuni enzimi del metabolismo energetico (citocromo ossidasi e malato deidrogenasi) determinando un loro ritorno ai valori di controllo. Un altro interessante effetto del trattamento farmacologico si rileva a carico dell'enzima acetilcolinesterasi, la cui attività viene decrementata sensibilmente in molte aree cerebrali. Ora è noto che somministrazione di un tipico anticolinesterasico (quale la fisostigmina) è in grado di incrementare la resistenza all'ipossia (Scremin e Scremin, 1979) inducendo una vasodilatazione colinergica concomitante ad una diminuzione del consumo cerebrale di O₂ (Scremin et al., 1978). Nel complesso quindi il trattamento con naftidrofuryl interferisce selettivamente in alcune aree cerebrali con le attività enzimatiche connesse con meccanismi bioenergetici e trasmettitivi: tale azione a livello enzimatico è probabilmente alla base delle caratteristiche farmacodinamiche sperimentalmente attribuite alla molecola.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Sig.ra G. Garlaschi, il Sig. L. Maggi e il Sig. G. Arioli per l'assistenza tecnica.

Indirizzo degli Autori:

Prof. GianMartino Benzi
Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia
Piazza Botta, 11
27100 Pavia

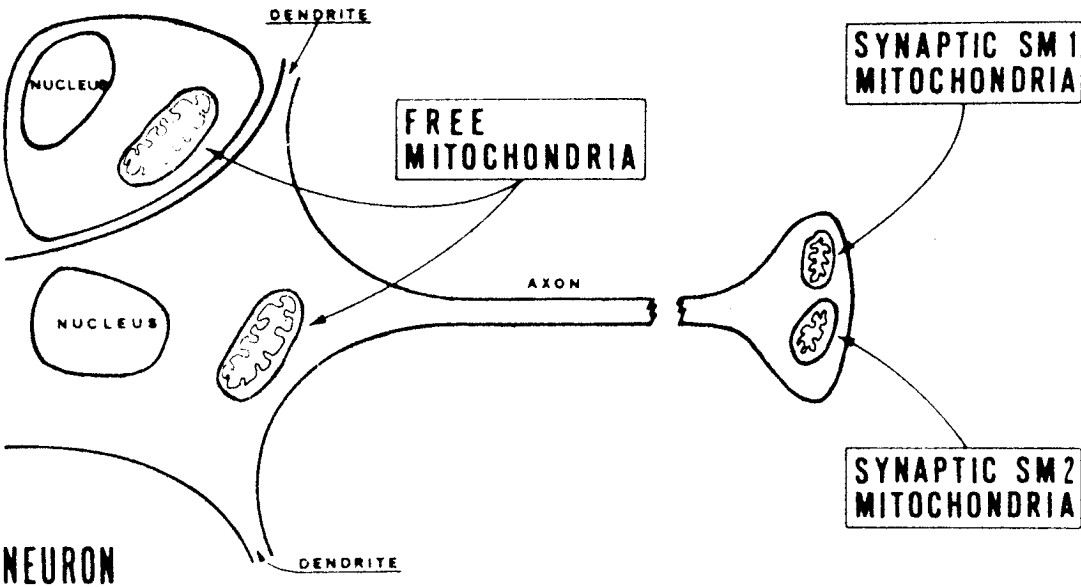
BIBLIOGRAFIA

- Ackrell B.A.C., Kearney E.B., Singer T.P.: Mammalian succinate dehydrogenase. In: *Methods in Enzymology* vol. 53. Fleischer S., Packer L. (Eds.), New York and London, Academic Press, pp. 466-483, 1978.
- Alberghina M., Giuffrida A.M.: Effect of hypoxia on the incorporation of [²⁻³H] glycerol and [¹⁻¹⁴C] palmitate into lipids of various brain regions. *J. Neurosc. Res.* 6: 403-419, 1981.

- Alberghina M., Viola M., Giuffrida A.M.: Changes in enzyme activities of glycerolipid metabolism of guinea-pig cerebral hemispheres during experimental hypoxia. *J. Neurosc. Res.* 7: 147-154, 1982.
- Arregui A., Barer G.: Chronic hypoxia in rats: alteration of striato-nigral angiotensin converting enzyme, GABA and glutamic acid decarboxylase. *J. Neurochem.* 34: 740-743, 1980.
- Bachelard H.S., Lewis L.D., Panten U., Siesjö B.K.: Mechanism activating glycolysis in the

NOTA DI REDAZIONE

GLIAL CELL



NEURON

I sinaptosomi rappresentano una frazione dell'omogenato cerebrale arricchita in terminazioni nervose (area di contatto sinaptico); come tali sono da considerare artefatti tecnici in quanto non esistono « in vivo » terminazioni isolate di questo tipo. Durante il processo di omogeneizzazione del tessuto cerebrale le terminazioni vengono disgiunte dagli assoni; quindi le membrane si rinsaldano per formare delle particelle completamente chiuse: i sinaptosomi.

I sinaptosomi (isolati secondo le più comuni tecniche di centrifugazione in gradiente di densità) possono avere una annessa componente postsinaptica (agglomerato glicoproteico opaco alla microscopia elettronica) o anche il terminale post-sinaptico rinsaldato. Morfologicamente essi corrispondono molto da vicino alle terminazioni nervose (bottone presinaptico, fessura intersinaptica, densità postsinaptica) viste al microscopio elettronico in sezioni di tessuto intero.

I sinaptosomi contengono vescicole di neurotrasmettitori, mitocondri, lisosomi, ribosomi e numerose strutture filamentose del citoscheletro. I sinaptosomi sono funzionalmente autonomi, sintetizzano ATP se adeguatamente ossigenati e, attraverso le loro membrane, possono mantenere gradienti di K^+ e Na^+ corrispondenti a quelli osservati nella cellula intatta. Sono in grado di accumulare attivamente anche composti quali il glucosio, amminoacidi, vari neurotrasmettitori e precursori.

brain in arterial hypoxia. *J. Neurochem.* 22: 395-401, 1974.

Benzi G., Arrigoni E., Pastoris O., Raimondo S., Fulle D., Curti D., Villa R.F.: Metabolic changes induced by acute hypoxia on the synaptosomes from dog brain. *Europ. Neurol.* 20: 235-244, 1981.

Benzi G., Arrigoni E., Pastoris O., Villa R.F., Dossena M., Agnoli A., Giuffrida A.M.: Drug action on the metabolic changes induced by acute hypoxia on synaptosomes from the cere-

bral cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metabol* 2: 229-239, 1982.

Bergmeyer H.U., Bernt E.: Lactate dehydrogenase: UV-Assay with pyruvate and NADH. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Bergmeyer H.U. (Ed.), New York and London, Academic Press Inc., pp. 574-579, 1974.

Berlet H.H., Stefanovich V., Volk B., Lehnert T., Franz M.: Chronic normobaric hypoxia and subcellular isoenzyme patterns of rat brain lactate dehydrogenase. In: *Animal models and*

- hypoxia. Stefanovich V. (Ed.), Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, Pergamon Press, pp. 75-85, 1979.
- Bowen D.M., Goodhardt M.J., Strong A.J., Smith C.B., White P., Brauston N.M., Symon L., Davison A.N.: Biochemical indices of brain structure, function and « hypoxia » in cortex from baboons with middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 117: 503-507, 1976.
- Cohen M.M.: Biochemistry of cerebral anoxia, hypoxia and ischemia. *Monog. Neural. Sci.* 1: 1-49, 1973.
- Davis J.N.: Brain tyrosine hydroxylation: alteration of oxygen affinity « in vivo » by immobilization or electroshock in the rat. *J. Neurochem.* 27: 211-215, 1976.
- Davis J.N., Carlsson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis, levels and metabolism in brain. *J. Neurochem.* 21: 783-790, 1973.
- De Robertis E., Pellegrino De Iraldi A., Rodriguez De Lores Arnaiz G., Salganicoff L.: Cholinergic and non cholinergic nerve endings in rat brain. *J. Neurochem.* 9: 23-35, 1962.
- Duffy T.E., Nelson S.R., Lowry O.H.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J. Neurochem.* 19: 959-977, 1972.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95, 1961.
- Folbergrova J., Nilsson B., Sakabe T., Siesjö B.K.: The influence of hypoxia on the concentration of cyclic nucleotides in the rat brain. *J. Neurochem.* 36: 1670-1674, 1981.
- Fontaine L., Grand M., Chabert E., Szarvasi E., Bayssat M.: Pharmacologie generale d'une substance nouvelle vasodilatatrice: le naftidrofuryl. *Bull. Chim. Ter.* 6: 463-469, 1968.
- Fontaine L., Grand M., Chabert E., Szarvasi E., Bayssat M.: Etude de l'activité vasodilatatrice du naftidrofuryl. *Bull. Chim. Ther.* 1: 39-43, 1969.
- Gardiner M., Nilsson B., Rehnroona S., Siesjö B.K.: Free fatty acids in the rat brain in the moderate and severe hypoxia. *J. Neurochem.* 36: 1500-1505, 1981.
- Gibson G.E., Jope R., Blass J.P.: Decreased synthesis of acetylcholine accompanying impaired oxidation of pyruvic acid in rat brain slices. *Biochem. J.* 148: 17-23, 1975.
- Gibson G.E., Shimada M., Blass J.P.: Alterations in acetylcholine synthesis and cyclic nucleotides in mild cerebral hypoxia. *J. Neurochem.* 31: 757-760, 1978.
- Gibson G.E., Duffy T.E.: Impaired synthesis of acetylcholine by mild hypoxic hypoxia or nitrous oxide. *J. Neurochem.* 36: 28-33, 1981.
- Gibson G.E., Peterson C., Sanson J.: Decreases in aminoacids and acetylcholine metabolism during hypoxia. *J. Neurochem.* 37: 192-201, 1981.
- Glowinski J., Iversen L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. *J. Neurochem.* 13: 655-669, 1966.
- Hamberger A., Hyden H.: Inverse enzyme changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell. Biol.* 16: 521-525, 1963.
- Harvey S.A.K., Booth R.F.G., Clark J.B.: The effects « in vitro » of hypoglycaemia and recovery from anoxia on synaptosomal metabolism. *Biochem. J.* 206: 433-439, 1982.
- Johnson M.K.: The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.* 77: 610-618, 1960.
- Knull H.R., Taylor W.F., Wells W.W.: Effects of energy metabolism in vivo distribution of hexokinase in brain. *J. Biol. Chem.* 248: 5414-5417, 1973.
- Ksiezak H.J., Gibson G.E.: Oxygen dependence of glucose and acetylcholine metabolism in slices and synaptosomes from rat brain. *J. Neurochem.* 37: 305-314, 1981.
- Lai J.C.K., Clark J.B.: Preparation and properties of mitochondria from synaptosomes. *Biochem. J.* 154: 423-432, 1976.
- Lai J.C.K., Walsh J.M., Dennis S.C., Clark J.B.: Synaptic and non synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.* 28: 625-631, 1977.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Mac Millan V., Salford L.G., Siesjö B.K.: Metabolic state and blood flow in rat cerebral cortex, cerebellum and brain stem in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 92: 103-113, 1976.
- Massopust L.C. jr., Wohin R.R., Kadoya S., White R.J.: The effect of hypoxia on electrocortical activity in the cebur monkey. *Exp. Neurol.* 25: 116-128, 1969.
- Mela L., Goodwin C.W., Miller L.D.: In vivo control of mitochondrial enzyme concentration and activity by oxigen. *Am. J. Physiol.* 231: 1811-1816, 1976.
- Meynaud A., Grand M., Fontaine L.: Effect of naftidrofuryl upon energy metabolism of the brain. *Arzneim-Forsch (Drug Res.)* 23: 1431-1436, 1973.
- Meynaud A., Grand M., Belleville M., Fontaine L.: Effet du naftidrofuryl sur le metabolisme energetique cerebral chez la sauris. *Therapie* 30: 777-778, 1975.
- Nason A., Vasington F.D.: Lipid dependent DPNH-cytochrome c from mammalian skeletal and heart muscle. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 6. Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), New York, Academic Press, pp. 409-415, 1963.
- Norberg K., Siesjö B.K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. I. Pattern of activations of glycolysis a re-evaluation. *Brain Res.* 86: 31-44, 1974.
- Norberg K., Quistroff B., Siesjö B.K.: Effects of hypoxia of 10-45 seconds duration on energy metabolism in the cerebral cortex of unaestetized and anesthetized rats. *Acta Physiol. Scand.* 95: 301-310, 1975.
- Ochoa S.: Malic dehydrogenase from pig heart. In: *Methods in Enzymology vol. 1*. Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), New York and London, Academic Press Inc. pp. 735-739, 1955.
- Pastuszko A., Wilson D., Erecinska M., Silver I.: Effects of « in vitro » hypoxia and lowered pH on potassium fluxes and energy metabolism in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 36: 116-123, 1981.

- Rossowska M.: Effect of hypoxia on the superficially exposed carbohydrates of subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex. *J. Neurosc. Res.* 7: 81-88, 1982.
- Scremin A.M.E., Scremin O.U.: Physostigmine-induced cerebral protection against hypoxia. *Stroke* 10: 142-143, 1979.
- Scremin O.U., Rubinstein E.H., Sonnenschein R.R.: Effects of atropine and eserine on cerebral blood flow and oxygen consumption in the rabbit. *Fed. Proc.* 37: 874, 1978.
- Serra I., Alberghina M., Viola M., Giuffrida A.M.: Effect of hypoxia on nucleic acids and protein synthesis in different brain regions. *Neurochem. Res.* 6: 595-605, 1981.
- Shrtzer H.G., Cascarano J.: Mitochondrial alterations in heart, liver and kidney of altitude-acclimated rats. *Am. J. Physiol.* 223: 632-636, 1972.
- Siesjö B.K.: *Brain Energy Metabolism*, John Wiley e Sons, New York, pp. 398-452, 1978.
- Smialek M., Hamberger A.: The effect of hypoxia and ischemia on cytochrome oxidase activity and protein synthesis in brain mitochondria. *Brain Res.* 17: 369-371, 1970.
- Smith L.: Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. In: *Methods of Biochemical Analysis* vol. 2. Glick DG (Ed.) New York, Wiley-Interscience, pp. 427-434, 1955.
- Sugden P.H., Newsholme E.A.: The effects of ammonium inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinase from muscle and nervous tissue of vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 150: 122-133, 1975.
- Sugden P.H., Newsholme E.A.: Activities of citrate synthase, NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in nervous tissue from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 150: 105-111, 1975.
- Tagagi T., Wakabayashi S., Shibata T., Morikawa K., Sato K., Furata V., Ozawa M., Tsuchiya T., Mizawa F.: Effect of naftidrofuryl on the cerebral circulation. *Nagoya Med. J.* 17: 249-265, 1972.
- Tappan D.V., Reynafarje B., Potter V.R., Hurtado A.: Alteration in enzyme and metabolite resulting from adaptation to low oxygen tension. *Am. J. Physiol.* 190: 93-98, 1957.
- Wood J.D., Watson W.J., Ducker A.J.: The effect of hypoxia on brain γ -aminobutyric acid levels. *J. Neurochem.* 15: 603-608, 1968.
- Yanagita T., Lizuka H., Takeda K.: Effets generaux pharmacologiques du naftidrofuryl oxalate. *Pharmacometiques*, 6: 509-521, 1972.