

BIOENERGETICA CEREBRALE E PRESTAZIONE

1. I meccanismi bioenergetici cerebrali
2. I possia e condizioni energetiche cerebrali
3. Variazioni indotte da sostanze esogene sul flusso sanguigno e sul metabolismo cerebrale

Un problema che pone ampi interrogativi è quello della reale capacità degli eventi prestativi ad inserirsi effettivamente nelle sequenze metaboliche che sono preposte alla liberazione, all'utilizzo ed alla conservazione dell'energia a livello cerebrale. L'importanza delle implicazioni di un tale inserimento è d'altra parte assolutamente ovvia.

E' noto come la riduzione dell'apporto di ossigeno oppure la riduzione dell'apporto di sangue al distretto cerebrale siano considerate le cause più comuni di sofferenza cerebrale; infatti il cervello trae energia fondamentalmente dai processi ossidativi, per cui si pensa che le due evenienze su indicate turbino la funzionalità del tessuto nervoso per mezzo dello stesso meccanismo. Tuttavia, anche se una carenza di ossigeno può provocare variazioni biochimiche a livello del cervello, va rilevato che lo stesso può riprendersi perfettamente anche dopo una drastica anossia, qualora il tessuto continui ad essere irrorato con sufficiente pressione di perfusione durante il periodo di carenza di ossigeno. La sofferenza cerebrale sembra nel complesso essere dovuta all'acidosi ed all'insufficienza di irrorazione che si sovrappongono all'effetto dell'ipossia o dell'anossia. Va ricordato che, durante una condizione di ipossia spinta, piccoli decrementi nella pressione arteriosa possono provocare notevoli disturbi nella circolazione distrettuale cerebrale e quindi disturbi circolatori parcellari.

1. I meccanismi bioenergetici cerebrali

Quantunque le cellule del cervello siano dotate di una elevata capacità glicolitica, l'energia che possono liberare dalla degradazione del glucosio ad acido lattico non basta per sopperire al fabbisogno energetico, anche in condizioni di riposo (Jöbsis, 1965; McIlwain, 1966; Bachelard e McIlwain, 1969; Balàzs, 1970). Infatti la ΔG° della reazione « glucosio \rightarrow 2 lattato » è di — 47 kcal/mole, mentre la ΔG° della reazione « glucosio \rightarrow 6 CO₂ + 6 H₂O » è di ben — 686 kcal/mole. L'ossidazione completa del glucosio fornisce quindi una energia circa 15 volte maggiore rispetto a quella liberata dalla glicolisi: in condizioni di stimolazione massimale della via metabolica glicolitica, la velocità di reazione può aument-

tare di 5-7 volte (Lowry et al., 1964), ma, al massimo, può fornire solo il 30-40% dell'energia totale richiesta dal tessuto per: (a) attività funzionale; (b) lavoro interno cellulare; (c) mantenimento dell'integrità biochimica e strutturale degli elementi nervosi. Tuttavia, almeno transitoriamente, questo tasso di produzione di energia può consentire la funzionalità della cellula nervosa in condizioni di ipossia o di ischemia; tale liberazione anaerobica può comunque essere mantenuta solo finché il tessuto possiede un discreto deposito di substrato (glicogeno o glucosio) o non intervengono fenomeni feed-back a bloccare la glicolisi. L'entità del trasporto di glucosio dal sangue, che al massimo può aumentare fino a diventare il doppio (Fishman, 1964; Crone, 1965), limita quindi la liberazione di energia.

La dipendenza della funzione del cervello dall'ossigeno è dovuta alla sua forte richiesta energetica: è da tutti noto che il cervello rappresenta solo il 2-3% del peso corporeo totale, ma utilizza il 15% del sangue della gettata cardiaca e consuma il 20% dell'ossigeno totale (Sokoloff, 1960; Schmidt, 1964). Il cervello consuma ossigeno in quantità non proporzionale a quella fornитagli dal sangue: è quindi costantemente in stato di ipossia potenziale. Quasi a rendere più precaria la situazione energetica, il cervello possiede piccole riserve energetiche a causa della bassa concentrazione tissutale di glicogeno; inoltre il glucosio è rifornito da una capillarizzazione relativamente scarsa (Opitz e Schneider, 1950; Nair et al., 1960). Infine variazioni funzionali dell'organo, oppure gli stati di forte attivazione provocano, in genere, solo piccole variazioni nel rifornimento di ossigeno o di substrato; tutti questi fenomeni accentuano la sua vulnerabilità alla deficienza di ossigeno che può attuarsi in fase prestativa.

Le forti richieste di energia già presenti durante lo stato di riposo del cervello sono, in parte, correlabili con le due principali forme di lavoro delle cellule del sistema nervoso centrale: il lavoro di trasporto e di concentrazione (lavoro interno) ed il lavoro di biosintesi (lavoro per il mantenimento della integrità biochimica e strutturale). La funzionalità delle cellule gliali e dei nervi richiede una distribuzione specifica e non uniforme degli ioni a livello della membrana cellulare; per esempio, la distribuzione di Na^+ , K^+ e H^+ è statisticamente e termodinamicamente improbabile. Dal momento che c'è una tendenza spontanea da parte di ciascun ione a distribuirsi casualmente per diffusione passiva in base al gradiente eletrochimico, gli elementi nervosi devono svolgere costantemente un lavoro per conservare lo « status quo » (Woodbury, 1968).

La funzione del metabolismo energetico è anche quella di mantenere il potenziale di demarcazione a livello di membrana; essendo il rapporto « superficie/volume » dei neuroni molto grande, una notevole parte della liberazione di energia cerebrale viene impiegata in questa funzione. Inoltre, giacché nell'attività nervosa l'energia utilizzata durante la propagazione degli impulsi deriva da un gradiente ionico preesistente, è necessaria una cospicua spesa energetica per ristabilire il potenziale di demarcazione normale. Ciò perché, come prima detto, la distribuzione ionica normale è termodinamicamente non probabile.

Le cellule del sistema nervoso centrale esplicano inoltre due attività fonda-

mentali biosintetiche: (a) la continua risintesi di sostanze che fungono da trasmettitori, ininterrottamente liberate o captate durante la trasmissione nervosa; (b) la continua ricostruzione delle strutture cellulari.

E' stato calcolato che il minimo indispensabile di energia per il mantenimento dell'integrità biochimico-strutturale risulta essere intorno al 20% circa del normale livello di riposo; non è però ben definita la durata della capacità di tollerare la riduzione della liberazione dell'energia cerebrale. Va inoltre ricordato che una inibizione del trasporto attivo degli ioni può provocare un accumulo di acqua e Na^+ nella cellula (Woodbury, 1968; Leaf, 1970): il processo diventa molto dannoso se si attua una ostruzione dei capillari, conseguente al rigonfiamento della cellula nervosa ed in particolare dei processi gliali degli astrociti.

Da misure del metabolismo energetico del cervello in anestesia si è visto che una riduzione fino al 50% permette un completo recupero delle funzioni (Kety, 1950; Lassen, 1959; Sokoloff, 1960); i risultati sono, tuttavia, difficilmente interpretabili, visto che i meccanismi di base possono anche annullare il turnover delle strutture macromolecolari della cellula. Nel complesso, i dati a disposizione non forniscono sufficienti indicazioni circa il consumo minimo di O_2 necessario per la sopravvivenza delle cellule in stati prolungati di ipossia. Valutazioni nel sangue arterioso e venoso hanno evidenziato che il cervello estrae dal sangue circa il 6-8% (3 μ moli/ml) di O_2 , lasciando nel sangue venoso reflujo una concentrazione di O_2 di circa 12,5 volumi % (5,6 μ moli/ml) ed una saturazione di O_2 del 65-70%: è quindi molto grande la riserva di O_2 di cui il tessuto può disporre in caso di diminuita concentrazione di O_2 (Cross et al., 1963). Tuttavia, il passaggio dell' O_2 al tessuto cerebrale avviene per diffusione fisica e dipende dalla differenza di pressione parziale ($\Delta\text{P}_{\text{O}_2}$) tra plasma sanguigno e mitocondri; normalmente il sangue venoso del cervello ha una P_{O_2} di circa 35 mm Hg. Se ne può dedurre che: (a) le tensioni più basse di ossigeno possono essere osservate nelle aree di tessuti più lontani dalla sorgente dell' O_2 , vale a dire dai capillari; (b) la P_{O_2} in ogni punto del cervello dipende dalla P_{O_2} capillare, come pure dalla velocità di diffusione e dal consumo di O_2 .

Krogh ed Erlang (Krogh, 1919) hanno elaborato una equazione valida in riferimento ad « un modello di diffusione cilindrica » dell' O_2 , che consente il calcolo delle P_{O_2} tissutali, conoscendo le distanze intercapillari, la P_{O_2} dei capillari e il consumo di ossigeno. L'elaborazione di Krogh si basa sulla duplice assunzione di: (a) flusso unidirezionale nei capillari paralleli; (b) consumo uniforme di O_2 nel tempo e nello spazio. Opitz et al. (1950, 1963) avevano successivamente evidenziato che una P_{O_2} venosa di circa 19 mm Hg era il segnale di una ipossia del tessuto; Bänder e Kiese (1955) avevano poi mostrato che il consumo di O_2 dei mitocondri isolati scende solo per valori di P_{O_2} tissutali inferiori a circa 10 mm Hg (P_{O_2} critica del mitocondrio); sulla base di questi dati si potevano trarre le seguenti conclusioni (Schneider, 1963; Thews, 1963): (1) ad un valore normale di P_{O_2} venoso di circa 35 mm Hg, il valore più basso di P_{O_2} tissutale è di circa 17 mm Hg ed il tessuto presenta un piccolo « surplus » di O_2 in tutti i suoi punti;

(2) a valori di P_{O_2} venosi di 25-28 mm Hg, la P_{O_2} in certi punti del tessuto scende oltre il minimo richiesto per una completa funzionalità mitocondriale. Questo tuttavia non rende anossica alcuna parte del tessuto, ma la lieve locale anossia sollecita reazioni fisiologiche di compenso, quale la vasodilatazione; (3) ad un valore di P_{O_2} venoso di 17-19 mm di Hg, la P_{O_2} scende a circa 4 mm Hg nelle zone di tessuto malnutrito. L'anossia locale che si instaura porta alla perdita di conoscenza, alla comparsa delle onde delta nell'EEG, ed alla diminuzione del consumo di O_2 del cervello. Durante l'ipossia si instaura una perdita del gradiente di diffusione « longitudinale »: ciò facilita la diffusione dell' O_2 dall'estremità arteriosa a quella venosa del « cilindro » di tessuto cerebrale. Si era così giunti a concludere che la P_{O_2} venosa critica durante l'ipossia (19 mm Hg) è di poco più alta di quella durante ischemia (17 mm Hg); (4) ad una P_{O_2} venosa di 12 mm Hg, una grande parte del tessuto diviene anossica con gravi disturbi locali e generali.

Se valutiamo però le condizioni bio-fisiologiche sopportate dai soggetti in fase di prestazioni spinte, risulta che queste considerazioni vanno riviste criticamente, dato che l'uso del modello di Krogh per il calcolo delle tensioni di ossigeno non appare del tutto correlabile con i recenti dati sperimentali. Infatti, dal momento che le concentrazioni tissutali degli enzimi respiratori sono maggiori di quelle richieste per una respirazione massimale, la entità della fosforilazione « in vivo » può restare invariata anche se la P_{O_2} locale scende al di sotto di 1 mm Hg (Jöbsis, 1963). Chance et al. (1962, 1964) hanno mostrato anche che, per provocare una variazione di potenziale redox intracellulare durante l'ipossia, sono necessari valori di P_{O_2} inferiori a 1 mm Hg. I bassi valori di P_{O_2} richiesti per conservare l'efficienza della fosforilazione mitocondriale « in vivo » sono una ottima prova per visualizzare matematicamente l'ambito delle P_{O_2} durante ipossia. Grunewald (1968) pensa che un riadattamento dei capillari paralleli con inversione del flusso corrisponda meglio a quanto si verifica « in vivo »; per questo ha sottolineato l'opportunità di operare uno studio dei modelli con capillari asimmetrici, che permettono una ossigenazione migliore di quelli convenzionalmente considerati.

Le recenti conclusioni sulle tensioni di O_2 del cervello non ipossico e sulle basse tensioni richieste per la funzionalità mitocondriale tolgoano quindi molta sicurezza ai modelli teorici primitivi per l'ossigenazione cerebrale; ciò apre una ampia problematica quando si vogliono correlare tali risultanze con le condizioni di prestazione atletica ad alto livello agonistico. Infatti alcune limitazioni erano attribuite a transitori, ma efficaci, deficit di O_2 a livello cerebrale. Una tale interpretazione è quindi da rivedersi criticamente alla luce dei rapporti intercorrenti fra O_2 e funzioni tissutali cerebrali.

1.1. La glicolisi

La glicolisi costituisce il punto di partenza per la completa ossidazione del glucosio, ma da sola non può sopperire al fabbisogno energetico cerebrale. E' noto

che la glicolisi viene attivata quando l'utilizzo dell'O₂ non è correlato alle richieste energetiche. Questo meccanismo è in parte compensatorio da un punto di vista energetico; un aumento di acido lattico provoca un'acidosi nei tessuti che, anche se di lieve entità, scatena imponenti meccanismi di omeostasi, inducendo vasodilatazione ed aumentando conseguentemente l'apporto di O₂ e di substrato. Tuttavia il processo non può continuare indefinitamente dato che una eccessiva acidosi da acido lattico può essere dannosa, predisponendo le cellule cerebrali all'edema ed a disturbi flussimetrici nei capillari.

Si è già ricordato che il cervello utilizza il glucosio come unico substrato; questa selettività non significa che le cellule cerebrali non siano in grado di ossidare altri substrati carboidrati o non, ma dipende dal fatto che nel tessuto esiste un meccanismo di trasporto facilitato specifico per il glucosio (Fishman, 1964; Crone, 1965). In analogia con altri meccanismi di trasporto facilitato, anche questo del glucosio è soggetto a saturazione ad alte concentrazioni di glucosio plasmatico e ciò ne limita l'afflusso. E' stato prospettato che il glucosio venga fosforilato durante il suo ingresso nella cellula: in tal caso i liquidi endocellulari non conterrebbero glucosio libero (Bachelard, 1967; 1971). Alcuni studi sperimentali smentiscono però questo fatto: così in molte situazioni di « steady-state » la concentrazione del glucosio in tutto il tessuto può giungere fino a 3-5 µmoli/g (Thorn et al., 1959; Mayman et al., 1964; Gercken e Preuss, 1969) ed in certe condizioni, quali l'ipercapnia, le concentrazioni tissutali si avvicinano a 10 µmoli/g (Folbergrovà et al., 1974). Si è inoltre rilevato (Woodward et al., 1967; Rall e Fenstermacher, 1971) che la concentrazione intracellulare di glucosio libero può arrivare a 10 µmoli/g nell'acqua intracellulare; generalmente la concentrazione di glucosio del tessuto varia in concomitanza a quella del plasma (Mayman et al., 1964).

Dalla Fig. 1.1 si evidenzia che nella glicolisi una molecola di glucosio dà origine sia ad una molecola di 3-fosfogliceraldeide (GAP) che ad una molecola di diidrossiacetonfosfato (DAP), il quale a sua volta si trasforma in 3-fosfo-gliceraldeide (GAP); pertanto di quest'ultima se ne formano due molecole per ogni molecola di glucosio degradata. A questo punto la glicolisi prosegue mediante la trasformazione del GAP in 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG): l'accettore degli elettroni rimossi dalla 3-fosfo-gliceraldeide è rappresentato dal sistema trasportatore di elettroni NADH/NAD⁺.

La glicolisi prosegue (Fig. 1.1) in quanto il prodotto ad alta energia formato (l'1,3-difosfoglicerato o 1,3-DPG) si trasforma in 3-fosfoglicerato (3-PG) donando un gruppo fosforico all'ADP che si trasforma in ATP. Nelle reazioni citate, il comune intermedio è un prodotto ad alta energia, l'1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), che ha un ΔG° di idrolisi di — 11,8 kcal. A causa dell'alto potenziale di trasferimento, il fosfato-gruppo legato al radicale carbossilico dell'1,3 difosfoglicerato è donato all'ADP con la notevole spinta termodinamica dovuta alla differenza fra il ΔG° idrolitico dell'1,3-difosfoglicerato (— 11,8 kcal) ed il ΔG° idrolitico dell'ATP (— 7,2 kcal); differenza che è quindi di circa — 4,6 kcal.

Una volta formato il 3-fosfoglicerato (3-PG), questo si trasforma in 2-fosfo-

glicerato (2-PG), il quale dà origine a fosfoenolpiruvato (PEP) e quindi a piruvato. Il fosfoenolpiruvato è un composto ad alta energia (ΔG° idrolitico = — 14,8 kcal); dato che il ΔG° idrolitico dell'ATP è di — 7,2 kcal, il fosfato del fosfoenolpiruvato è donato all'ADP con una notevole spinta termodinamica.

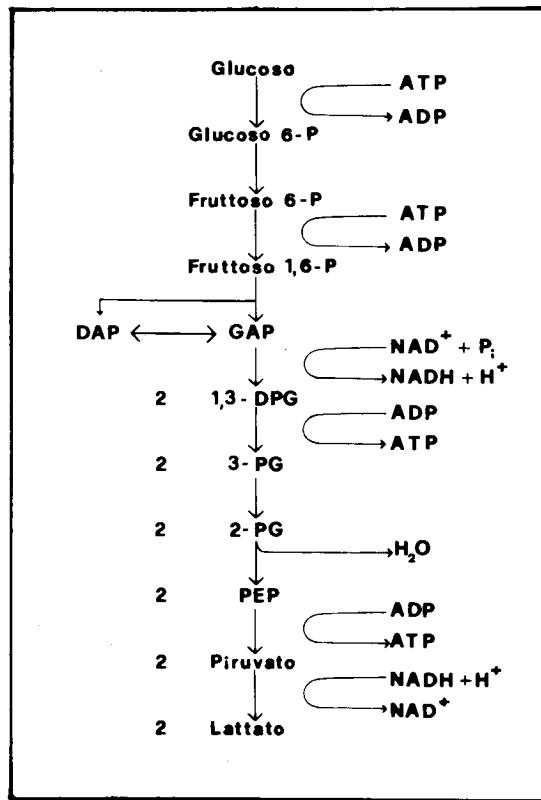


Figura 1.1

E' da rilevare che le prime tappe della glicolisi richiedono ATP: « glucosio → glucosio-6-fosfato » e « fruttosio-6-fosfato → fruttosio-1,6-difosfato »; quindi due molecole di ATP sono necessarie per innescare la reazione glicolitica (Fig. 1.1). Al contrario, nelle reazioni « 1,3-difosfoglicerato → 3-fosfoglicerato » e « fosfoenolpiruvato → piruvato » si ha la formazione di due molecole di ATP: considerato che da una molecola di glucosio prendono origine due molecole di 3-fosfogliceroaldeide, risultano quattro le molecole di ADP che vengono trasformate in ATP, per ogni molecola di glucosio metabolizzata. Sottraendo le due molecole di ATP necessarie per dare l'avvio alla glicolisi, il bilancio è positivo di due sole molecole di ATP.

La partecipazione del metabolismo cerebrale ai fenomeni prestativi è ben documentabile da esperienze crociate effettuate su animali, come indicato nella Fig. 1.2. Secondo questo schema (Benzi et al., 1970), un cane « donatore » è predisposto per compiere una prestazione controllata mediante la stimolazione dei monconi periferici dei nervi sciatici. Vascolarmente collegato con il cane « donatore » si predisponde anche un cane « ricevente »; a mezzo di un sistema di perfu-

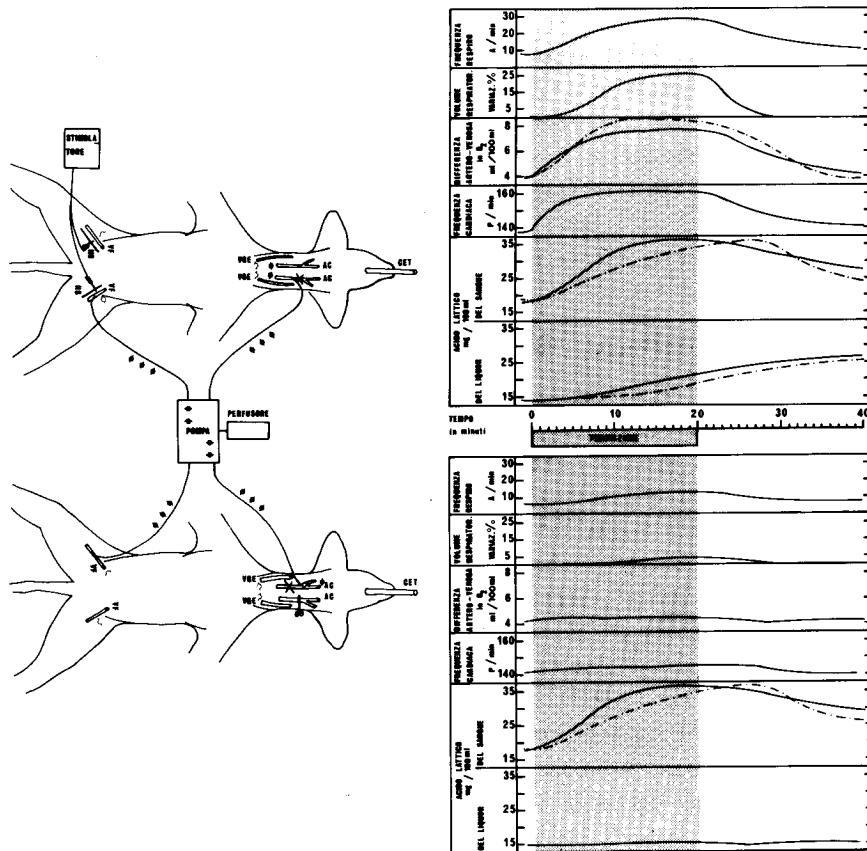


Figura 1.2

sione a pompa pulsatoria, il sangue arterioso proveniente da una delle arterie carotidi comuni del cane « donatore » viene immesso in una delle arterie carotidi comuni del cane « ricevente ». Dato che in questo sia l'altra arteria carotide comune che le arterie vertebrali sono chiuse artificialmente, il sangue affluente al cervello è in gran parte rappresentato dal sangue arterioso proveniente dal cane « donatore ». Da una delle vene femorali del cane « ricevente » (Fig. 1.2) il sangue venoso viene convogliato, sempre a mezzo della pompa trasfusionale, alle vene femorali del cane

« donatore »: in tal caso la capacità dei circuiti vascolari dei due cani non viene significativamente modificata.

Allorché il cane donatore compie una prestazione submassimale controllata a mezzo della stimolazione dello sciatico, si osservano immediatamente (Fig. 1.2) un incremento della frequenza respiratoria, un incremento del volume corrente respiratorio, un incremento della frequenza cardiaca ed un aumento della differenza artero-venosa in O₂. Assai interessante è il fatto che l'incremento abbastanza precoce dell'acido lattico ematico è seguito con un notevole ritardo da un incremento dell'acido lattico a livello del liquor cerebrale. Nel cane ricevente si osserva solo l'aumento passivo dell'acido lattico nel circolo sanguigno, mentre nel liquor non compare mai acido lattico. Questo implica che l'acido lattico che si ritrova nel liquor cerebrale del cane « donatore » è collegato alle modificazioni chimico-fisiche indotte a livello cerebrale dalla prestazione.

Una riprova di ciò è facilmente individuabile dal fatto che, inducendo artatamente un incremento nella lattacidemia mediante perfusione endovenosa di lattato in cane a riposo, non si ritrova mai acido lattico nel liquor cefalo-rachidiano.

1.2. Le attività mitocondriali

La disponibilità di ossigeno fa fermare la glicolisi alla tappa di formazione dell'ac. piruvico che viene trasferito nei mitocondri dove è inserito nel ciclo di Krebs mediante un'ossidazione enzimatica che lo trasforma in un derivato dell'acido acetico, ossia in acetil CoA; questo infatti deriva dalla condensazione di coenzima A (CoA-SH) con acido piruvico.

L'acido acetico è così prodotto nella forma « attivata » di acetil-coenzima A, nel quale il gruppo tiolico (-SH) lega in maniera covalente (ossia con una compartecipazione di elettroni) l'acido acetico a mezzo di un legame tioestere (-S-CO-), il quale è un legame ad alta energia. Infatti, la variazione di energia libera di idrolisi della reazione « acetil-CoA → ac. acetico + CoA » è di — 7,5 kcal; quindi il gruppo acetilico trasportato dal CoA si trova in uno stato di attivazione energetica e può essere enzimaticamente trasferito ai vari accettori metabolici, ed in particolare a quelli del ciclo di Krebs.

I sistemi mitocondriali connessi con la trasduzione di energia sono essenzialmente tre, e cioè: un sistema a catena per il trasporto di elettroni (catena respiratoria), un sistema capace di generare elettroni per la catena (ciclo di Krebs) ed un sistema idoneo a sintetizzare ATP dall'unione di ADP e fosfato inorganico (processo fosforilativo). Il sistema generatore di elettroni riceve primariamente l'ac. piruvico che è poi (Fig. 1.3) ossidato in cinque successivi passaggi: (1) da piruvato ad acetil-CoA (con riduzione del NAD⁺); (2) da isocitrato ad α -cheto-glutarato (con riduzione di NAD⁺ o NADP⁺); (3) da α -cheto-glutarato a succinato (con riduzione di NAD⁺); (4) da succinato a fumarato (con riduzione del FAD⁺); (5) da malato a ossalacetato (con riduzione di NAD⁺). In aggiunta a queste cinque ossido-riduzioni avvengono: una idratazione (fumarato → malato), un'isomerizza-

zione (citrato → isocitrato) ed una condensazione (ossalacetato + acetil-CoA → citrato). Alla fine di ogni ciclo, una molecola di piruvato viene completamente ossidata, ed una molecola di ossalacetato viene rigenerata, pronta per un nuovo ciclo che inizia dalla condensazione di ossalacetato con acetil-CoA. Va notato che le molecole mobili formate nel ciclo di Krebs, ed atte a trasferire gli elettronni alla catena respiratoria, sono due: il NADH ed il succinato. Ora il NADH è prodotto in quattro delle cinque ossidazioni del ciclo, mentre il succinato è generato in uno solo dei cinque passaggi ossidativi (ossidazione dell'α-chetoglutarato).

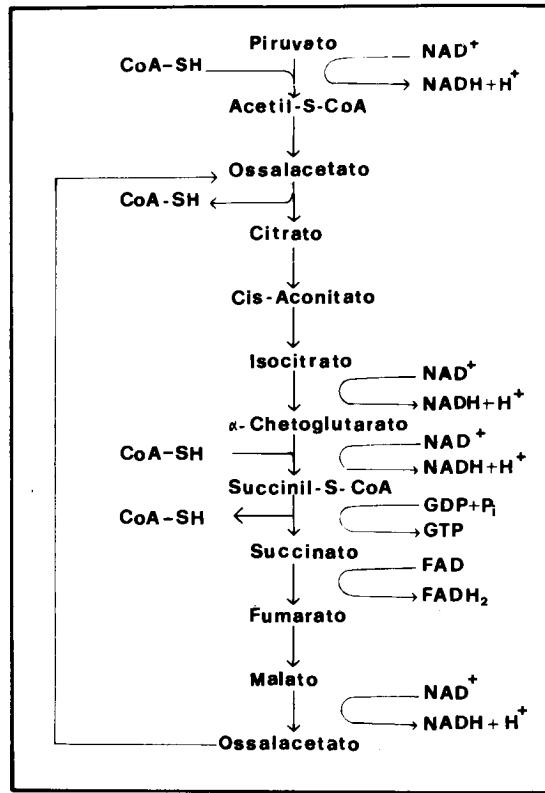


Figura 1.3

La catena di trasporto degli elettronni è un insieme ben strutturato di coenzimi e citocromi (Fig. 1.4) contenenti gruppi ossido-riducenti che rendono possibile il trasporto graduale, ma non continuo, di una coppia di elettronni dai donatori di elettronii (NADH e succinato) all'ossigeno molecolare. Il NADH ed il succinato, prodotti dal ciclo di Krebs, danno l'avvio ad una serie di ossido-riduzioni che trasporta gli elettronni all'ossigeno che la circolazione pone a disposizione delle miofibrille. Tra NADH ed ossigeno molecolare avvengono 12 ossido-riduzioni; anche tra il succinato e l'ossigeno avviene un uguale numero di ossido-riduzioni, ma la natura delle prime tre è diversa; ciò condiziona il fatto che, da un punto di

vista strettamente energetico, la caduta di potenziale tra NADH ed O₂ libera una quota di energia atta a rendere possibile la sintesi di tre molecole di ATP per ogni coppia di elettroni trasferita, mentre la caduta di potenziale tra succinato ed O₂ libera una quota di energia atta alla sintesi di sole due molecole di ATP per ogni coppia di elettroni trasferiti. In ogni caso, l'energia liberata dal trasferimento di elettroni nella catena respiratoria è usata per rendere possibile la sintesi di ATP dalla unione di ADP e fosfato: perché questo sia possibile è necessario che la liberazione di energia per mezzo del trasporto elettronico e la sintesi dell'ATP siano sincronizzate. Allorché l'ATP è stato sintetizzato all'interno dei mitocondri, sussiste la possibilità che i gruppi fosforici altamente energetici siano trasferiti a molecole di ADP ed AMP poste all'esterno dei mitocondri, dando così origine alla formazione di ATP extra-mitocondriale: questo ATP extra-mitocondriale deve essere considerato come una parte del sistema di immagazzinamento di energia.

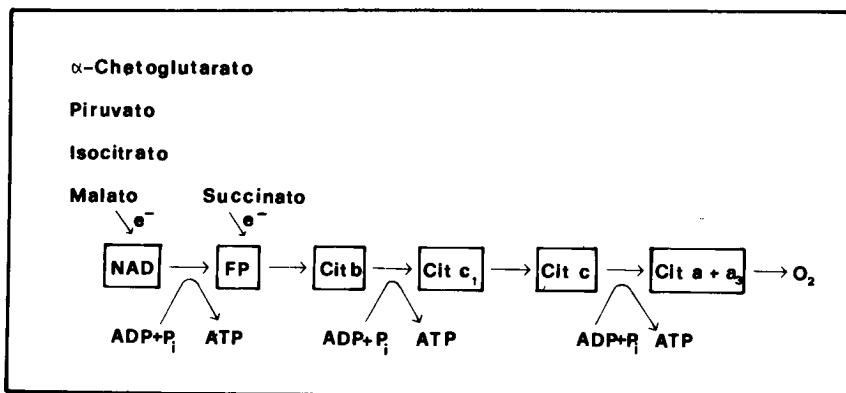


Figura 1.4

Per quanto riguarda il problema del bilancio energetico della fase energetica mitocondriale, va ricordato che mentre il NAD e le flavoproteine (FMN e FAD) trasportano due elettroni alla volta, i citocromi ne possono portare solo uno per volta, per cui nel trasporto elettronico sono implicate coppie di molecole di citocromi. Per ogni paio di elettroni prodotti dal ciclo di Krebs, alla fine del trasporto elettronico, si ha la riduzione di un atomo di ossigeno e la formazione di una molecola di acqua. Il trasporto elettronico stesso avviene in quanto il potenziale ossido-riduttivo (E'o) degli elementi della catena è posto nella serie ordinata: NAD → flavoproteine → coenzima Q → citocromi b, c, a → O₂: in questa serie, gli elettroni passano dall'E'o più negativo, ossia da quello del NAD (E'o = -0,32 V) al più positivo, ossia a quello dell'ossigeno (E'o = +0,82 V). La caduta di energia libera che si attua ad ogni trasferimento elettronico è direttamente correlata con la grandezza del decremento nel potenziale ossido-riduttivo standard E'o; nel complesso si ha una larga variazione di energia libera ($\Delta G^\circ = -52,6 \text{ kcal}$) per ogni coppia di elettroni trasportati. Per ogni molecola di piruvato che viene inserita nel ciclo di Krebs, si formano 4 molecole di NADH ed 1 molecola di FADH.

Quindi il trasporto elettronico rende disponibili 5 coppie di elettroni; va poi considerato che nel citoplasma fondamentale, per ogni molecola di glucosio vengono prodotte due molecole di ac. piruvico: pertanto, per ogni molecola di glucosio degradata ossidativamente, sono disponibili 10 coppie di elettroni. Inoltre durante la glicolisi, vengono formate 2 molecole di NADH per ogni molecola di glucosio degradata ad ac. piruvico.

Nel complesso quindi le coppie di elettroni disponibili sono: 10 mitocondriali + 2 citoplasmatiche = 12; dato che per ogni coppia di elettroni trasferita si ha $\Delta G^\circ = -52,6$ kcal, il processo di trasporto elettronico dal NADH e dal succinato all' O_2 comporta una variazione di energia libera ΔG° di oltre -630 kcal.

1.3. Il sistema di trasporto elettronico NADH/NAD⁺

Si è sempre considerato con attenzione lo stato redox del sistema NADH/NAD⁺ intracellulare citoplasmatico, perché in grado di fornire una misura sensibile della presenza di ipossia nel tessuto; ciò è dovuto agli stretti legami fra i componenti della lattico-deidrogenasi, secondo l'equazione (Bücher e Klingenberg, 1958; Huckabee, 1958; Hohorst, 1960; Williamson et al., 1967; Krebs e Veech, 1970; Bücher, 1970):

$$\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]} = \frac{[\text{lattato}]}{[\text{piruvato}]} \cdot \frac{K}{[\text{H}^+]}$$

dove: K = costante di Williamson = 1.10^{-11} .

Da tale equazione si può prevedere che aumenti del rapporto NADH/NAD⁺ saranno concomitanti ad aumenti del rapporto lattato/piruvato (L/P); pertanto le misure della concentrazione del lattato e del piruvato sono spesso valutate in relazione al grado dello stato di ipossia. Inoltre, data la possibilità di diffusione del lattato e del piruvato attraverso le membrane cellulari, si è ipotizzato che un aumento del rapporto L/P extracellulare (o lo sviluppo di una concentrazione eccessiva di lattato), denoti un'ipossia cellulare (Huckabee, 1958; Siesjö et al., 1968; Bücher, 1970). Tuttavia essendo l'equilibrio lattico-deidrogenasico pH-dipendente, il rapporto L/P può aumentare durante l'acidosi, pur mantenendosi costante il rapporto NADH/NAD⁺ (Messerer e Siesjö, 1971; Siesjö et al., 1974).

Da queste considerazioni si deduce che, per calcolare la dipendenza del rapporto NADH/NAD⁺ citoplasmatico da quello del L/P, sono assolutamente necessarie misure precise del pH intracellulare. Tuttavia, anche disponendo di questi parametri, il rapporto NADH/NAD⁺ deve essere interpretato con una certa cautela considerando il legame indiretto tra i sistemi NADH/NAD⁺ citoplasmatico e mitocondriale: infatti una modificazione negli scambiatori di elettroni fra tali sistemi (diidrossiacetonfosfato \rightarrow α -glicerofosfato; β -idrossibutirrato \rightarrow acetacetato; ecc.) può alterare la relazione tra i due sistemi redox. Inoltre, non si può parlare di ipossia tissutale solo basandosi su un aumento del rapporto NADH/NAD⁺, anche

se esistono casi sperimentali in cui tale rapporto, durante stati di ipossia cerebrale, tende ad aumentare per poi diminuire di nuovo spontaneamente con una certa rapidità, quando il sistema dei nucleotidi adenilici viene rifosforilato in fase di recupero (Kaasik et al., 1970; Nilsson e Siesjö, 1971).

Va infine notato che il sistema NADH/NAD⁺ è composto di molecole che non sono in grado di permeare la membrana mitocondriale, per cui il passaggio di elettroni dal NADH citoplasmatico al NAD⁺ mitocondriale avviene a mezzo di sistemi di trasporto indiretto, di cui un esempio è dato dalla Figura 1.5.

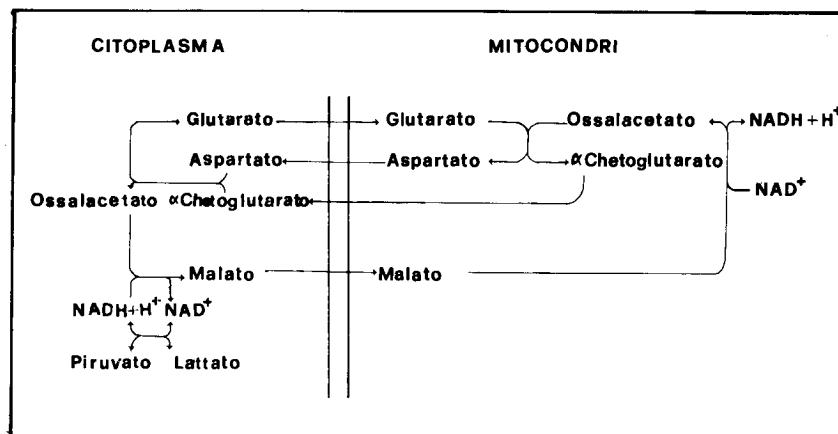


Figura 1.5

1.4. Il controllo delle sequenze glicolitiche e mitocondriali

La conversione di glucosio in lattato è una reazione energetica spontanea ed il cervello contiene tutti gli enzimi glicolitici, implicati nel processo, in eccesso rispetto alle normali esigenze (Lowry e Passonneau, 1964; Balàzs, 1970). L'esochinasi (HK) controlla il quantitativo di glucoso che entra nella sequenza di reazioni glicolitiche, mentre il complesso delle fosforilasi (PPasi) regola l'ingresso delle unità glicosidiche, provenienti dal metabolismo del glicogeno. L'esochinasi (HK) viene inibita dal suo stesso prodotto, ossia dal glucosio-6-fosfato (G-6-P); tuttavia un confronto fra la concentrazione di glucoso e la concentrazione dell'inibitore (G-6-P) non è sufficiente a spiegare il grado di inibizione osservato «in vivo». L'utilizzazione di glicogeno è influenzata dalle catecolamine, ormoni in grado di stimolare la formazione del 3'-5'-AMP ciclico, potente attivatore della fosforilasi del glicogeno; il cervello possiede l'enzima adenil-ciclasici che è il regolatore della produzione di AMP-ciclico, dal precursore ATP (Sutherland e Robinson, 1966; Breckinridge, 1970).

Appena si instaura una carenza di O_2 a livello cerebrale si ha una forte attivazione del sistema adenil-cicasico che incrementa la glicogenolisi; ciò avviene per $P_{O_2} > 20$ mmHg. Al di sotto di tale pressione parziale di ossigeno arterioso il sistema adenil-cicasico è fortemente depresso, ed altri sistemi enzimatici (ad esempio, le cinasi tissutali) entrano in funzione per mantenere attiva la glicogenolisi (Villa, 1975; Benzi e Villa, 1976).

Il principale controllo della glicolisi (Fig. 1.6) viene però esercitato dalla fosfofruttochinasi (PFK), enzima allosterico complesso, inibito dall'ATP e dal citrato, attivato sia da AMP, ADP, P_i , NH_4^+ , che da fruttoso-6-fosfato, substrato su cui agisce e dal suo prodotto fruttoso-1,6-difosfato (Passonneau e Lowry, 1963; Lowry e Passonneau, 1966). Inoltre, la fosfofruttochinasi è inibita da diminuzioni di pH ed attivata dalla alcalosi (Delcher e Shipp, 1966; Scheuer e Berry, 1967;

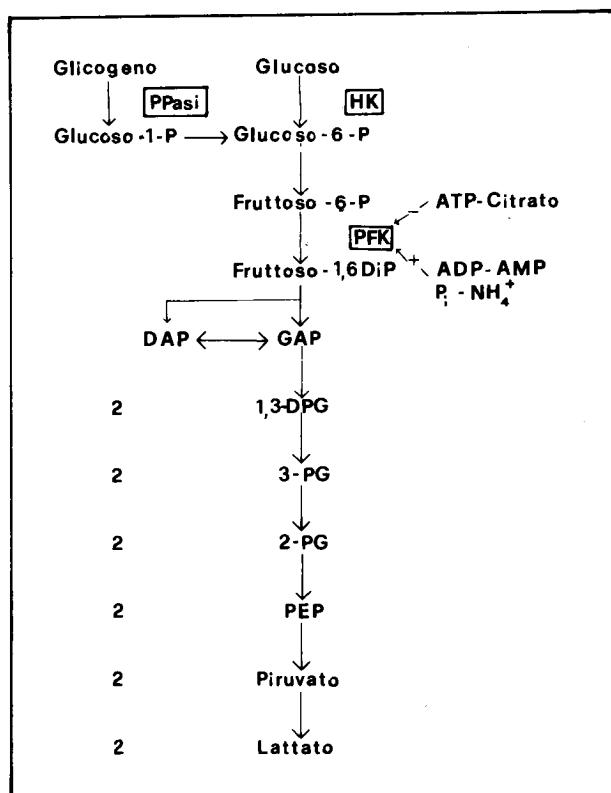


Figura 1.6

Danforth, 1968); a pH 7, è inibita anche dalla fosfocreatina, dalla fosfogliceraldeide, dal fosfoenolpiruvato e da numerosi altri prodotti intermedi della glicolisi (Krzanowski e Matchinsky, 1969). I fosfati hanno un effetto particolare sulla regolazione

della velocità delle reazioni glicolitiche, in modo da provvedere ad una maggiore attivazione della glicolisi stessa in caso di ipossia.

D'altronde il cervello, diversamente da altri tessuti, non è in grado di sintetizzare glicogeno da lattato tramite il « ciclo di Cori »: gli ostacoli sono dovuti a passaggi termodinamicamente irreversibili, rappresentati dalle reazioni controllate dalla esochinasi e dalla fosfofruttochinasi (Krebs e Kornberg, 1957). Nel fegato, per esempio, questi passaggi vengono attuati mediante reazioni idrolitiche, ma gli enzimi necessari mancano nel cervello (Balàzs, 1970): la glicolisi cerebrale, quindi, è una via metabolica unidirezionale a produzione terminale di piruvato (o di lattato) ed il lattato, accumulatesi durante il periodo ipossico, può effluire dal tessuto solo per diffusione o per ossidazione a piruvato.

Nel cervello si riscontrano anche alcuni enzimi della via del fosfogluconato (o shunt del pentoso-fosfato); questa via può essere responsabile del metabolismo di una parte di glucoso consumato (Balàzs, 1970), anche se solo una piccola frazione di esso entra in questo shunt (Hostetler et al., 1970). Lo scopo primario di questa via metabolica è quello di produrre NADPH, richiesto per la sintesi riduttiva di acidi grassi, steroidi e pentosi, come il D-riboso, necessari per la sintesi dei nucleotidi: le reazioni non danno ATP, a meno che il NADPH venga ossidato nei mitocondri. Questa via metabolica può giocare un ruolo più evidente nel cervello infantile e quindi in rapido sviluppo (O'Neill e Duffy, 1966), mentre nel cervello adulto sembra che il glucosio venga degradato quasi esclusivamente nelle reazioni producenti energia della glicolisi e della fosforilazione ossidativa.

Il principale controllo del trasporto elettronico, e perciò della fosforilazione ossidativa, è esercitato dalla concentrazione di ADP (Chance e Williams, 1956). Tuttavia, poiché tutte le fosforilazioni ossidative sono reversibili (Chance, 1961; Klingenberg e Schollmeyer, 1961), l'entità della fosforilazione ossidativa è regolata dal potenziale energetico dei fosfati, cioè dal rapporto ATP/(ADP . P_i). Ciò controlla la produzione di ATP in relazione alle necessità metaboliche del tessuto; ad es., se aumenta l'attività delle cellule, ci sarà diminuzione di ATP e aumento di ADP e P_i.

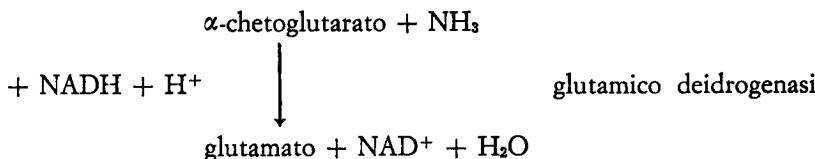
Considerando la disponibilità del ciclo di Krebs a liberare elettroni e la capacità della catena respiratoria a trasferirli all'O₂ con liberazione di energia, le variazioni nelle concentrazioni dei componenti il pool degli adenilati provocheranno un aumento della fosforilazione ossidativa, fino al ritorno alla normalità del potenziale energetico dei fosfati. Per ragioni simili, un rallentamento nella attività cellulare provoca, di conseguenza, una minor produzione di ATP.

Inoltre, il contenuto tissutale di ATP, ADP, AMP e P_i non solo controlla l'entità della fosforilazione ossidativa, ma esercita anche un controllo di controregolazione (feed-back) sui passaggi precedenti del metabolismo del glucosio. Le reazioni del ciclo di Krebs sono strettamente controllate dallo stato di fosforilazione dei nucleotidi adenilici e dallo stato redox dei mitocondri. Fondamentale importanza assumono gli enzimi citrico sintetasi e succinico deidrogenasi, in quanto controllano le reazioni che portano all'ossidazione del piruvato, dell'isocitrato e del

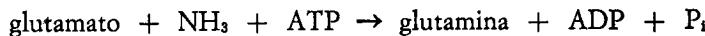
succinato. La reazione limitante più attiva è quella catalizzata dalla isocitrato-deidrogenasi; è interessante notare come questo enzima allosterico sia attivato dall'ADP, mentre l'ATP e il NADH assumano il ruolo di moderatori allosterici negativi (Goldberg et al., 1966).

1.5. Correlazioni con il metabolismo protidico

Ci sono parecchi punti in cui gli intermedi del ciclo di Krebs possono entrare oppure abbandonare il ciclo. Da un punto di vista energetico c'è un'importante relazione tra il ciclo di Krebs e l'acido glutamico (Jöbsis, 1965; Van Den Berg, 1970; Baxter, 1970).



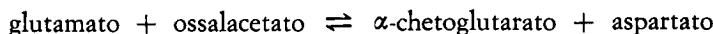
La reazione è essenzialmente irreversibile perché una qualsivoglia piccola quantità di NH_4^+ si oppone alla reazione in senso contrario. Con aumentate concentrazioni di NH_4^+ e NADH (come si verifica ad es. nello stato ipossico), l' α -chetoglutarato risulta diminuito. Tale diminuzione può diventare anche maggiore, per un'ulteriore amidazione del glutamato a glutamina, catalizzata dalla glutamina-sintetasi.



reazione che anch'essa sfrutta l'energia fornita da ATP.

Questa necessità di metabolizzare gli ioni ammonio è particolarmente accentuata dalle prestazioni intense di lunga durata; infatti è stato sperimentalmente rilevato un incremento dell' NH_4^+ cerebrale in tali condizioni, con conseguente attivazione della funzionalità del sistema del glutamato (Benzi et al., 1975). Non è stato però ancora definito se tale aumento sia primitivo cerebrale oppure secondario ad una eventuale liberazione di NH_4^+ a livello muscolare (Benzi, 1975).

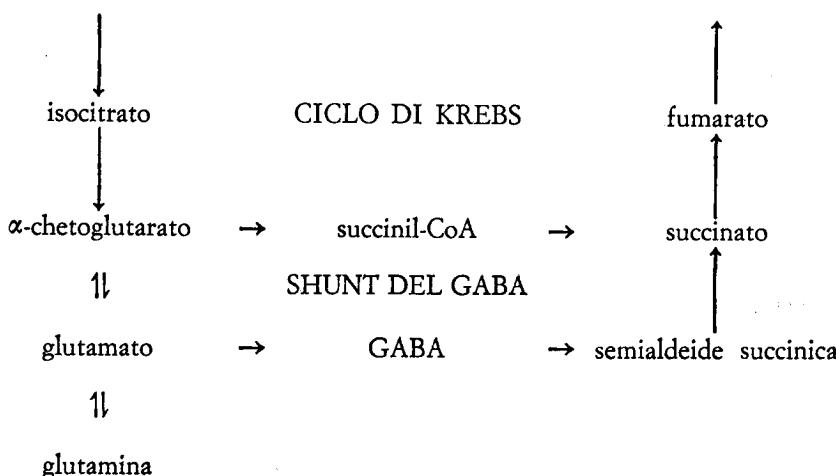
Dal momento che l' α -chetoglutarato può essere facilmente utilizzato nel ciclo di Krebs, sembra fondamentale che ci siano reazioni che « rimpiazzino » l'acido. Esiste almeno una tale reazione in cui il glutamato viene convertito in α -chetoglutarato, con una transaminazione liberamente reversibile:



Tuttavia tale transaminazione avviene a spese del prodotto finale del ciclo (l'ossalacetato) e del glutamato.

Anche in assenza di formazione di glutamina, la reazione catalizzata dalla glutamico deidrogenasi può privare il ciclo di Krebs dell' α -chetoglutarato se risulta accoppiata all'ulteriore decarbossilazione irreversibile del glutamato a GABA (acido γ -aminobutirrico), catalizzata dalla glutamico-decarbossilasi (Baxter, 1970).

La complessiva sequenza delle reazioni che portano alla formazione del GABA costituisce uno shunt tra α -chetoglutarato e succinato (Roberts, 1956) che richiede molecole di α -chetoglutarato e che comporta per il ciclo di Krebs la perdita sia di un NADH (tappa: α -chetoglutarato \rightarrow succinil-CoA) sia di un ATP (a livello della trasformazione succinil-CoA \rightarrow succinato). Nel complesso la serie di trasformazioni è riassumibile nello schema seguente.

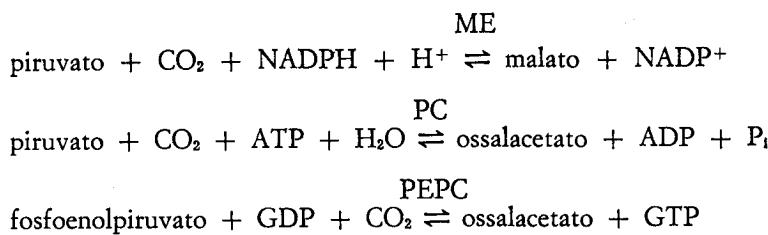


Solo una percentuale relativamente piccola (circa il 10%) di α -chetoglutarato viene metabolizzata attraverso lo shunt del GABA (Balàzs et al., 1967). E' stata avanzata l'ipotesi che lo shunt intervenga nel controllo dell'eccitabilità del tessuto nervoso (Curtis e Johnston, 1970); si pensa infatti che il GABA funzioni come trasmettitore inibitorio (Baxter, 1970). E' probabile che durante la ipossia le variazioni del contenuto di GABA nel tessuto cerebrale possano modificare l'attività e quindi le richieste energetiche tissutali.

1.6. Processi di carbossilazione

Si è già considerato come gli intermedi del ciclo di Krebs possano venire impiegati in reazioni di sintesi, in particolare con ammoniaca. Si può quindi prendere in esame la fissazione di CO₂ riferendosi alle reazioni che seguono (Berl et al., 1962; Waelsch et al., 1964). Come minimo esistono tre reazioni di carbossilazione che, in teoria, possono portare alla formazione di intermedi del ciclo degli acidi

tricarbossilici, catalizzate dagli enzimi: enzima malico (ME), piruvico carbossilasi (PC) e fosfoenolpiruvato-carbossicinasi (PEPC).



E' ben documentato che la somministrazione di $^{14}\text{C-CO}_2$ o $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ marca rapidamente malato, ossalacetato, aspartato, glutamato e glutamina; i risultati indicano che il $^{14}\text{CO}_2$ entra nei siti malato ed ossalacetato (Berl et al., 1964).

Sebbene la carbossilazione giochi un ruolo fisiologico importante, i dati radioattivi non offrono prove dirette per la netta fissazione di CO_2 in situazioni associate ad esaurimento di acidi del ciclo di Krebs e non ci sono neppure informazioni sull'importanza delle tensioni di CO_2 esistenti o delle concentrazioni di HCO_3^- .

I risultati sperimentali relativi al comportamento delle attività enzimatiche tendono tuttavia ad evidenziare come lo smaltimento del piruvato trovi una serie di vie di sbocco carbossilative o transaminative allorché il ciclo di Krebs funzioni in maniera non adeguata alle richieste prestative (Benzi, 1972; Villa e Benzi, 1975). Questa serie di eventi vicari costituisce la *terza via* di metabolizzazione del piruvato, accanto cioè alla riduzione a lattato ed alla immissione nel ciclo di Krebs, mediante la formazione di acetil-CoA.

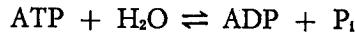
2. Ipossia e condizioni energetiche cerebrali

Per « ipossia » si intende un insufficiente apporto di ossigeno, tale da alterare le funzioni fisiologiche ed il metabolismo dei tessuti. Tuttavia, né le osservazioni sulle funzioni cerebrali, né le misure del consumo di O_2 da parte del cervello ci offrono una spiegazione esauriente del modo in cui un calo di O_2 possa portare ad un danno funzionale cerebrale. Così durante l'ipotensione arteriosa si possono verificate disturbi mentali ed anche perdita di coscienza prima che il consumo dell'ossigeno cerebrale scenda in modo evidente al di sotto dei valori normali. Il consumo di O_2 , che, in genere, significa flusso energetico, può essere interpretato esattamente solo se si conoscono le esigenze energetiche del tessuto. Pertanto l'entità dell'ipossia viene focalizzata meglio dallo stato energetico tissutale, cioè dal bilancio tra produzione e richiesta di energia.

Dato che la funzione essenziale dell'ossigeno molecolare è quella di comportarsi da accettore degli elettroni ceduti dall'ultimo trasportatore della catena respiratoria, la citocromo-ossidasi, l'effetto primario della carenza di O_2 è un rallentamento del trasporto elettronico e quindi della fosforilazione ossidativa. Questo fenomeno

aumenta il grado di riduzione del sistema redox mitocondriale a monte della citocromo-ossidasi e diminuisce le concentrazioni di ATP, aumentando quelle di ADP e di P_i .

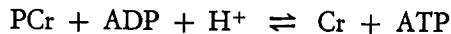
La seguente reazione:



indica il bilancio tra produzione e utilizzazione di energia, senza considerare le variazioni quantitative degli scambi nei fosfati. Infatti, con una modesta ipossia, si possono verificare variazioni talmente piccole da passare inosservate; ciò è in parte dovuto al fatto che le alterazioni del potenziale energetico dei fosfati provocano un riarrangiamento metabolico secondario, che aiuta a mantenere l'omeostasi energetica.

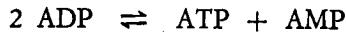
Queste reazioni comprendono:

- a) L'azione di controllo specifico della fosfofruttochinasi (PFK) nella via metabolica glicolitica, la quale favorisce un aumento della entità della glicolisi, che, a sua volta, contribuisce alla produzione di ATP e provoca una acidosi intracellulari. L'acidosi, poi, determina vasodilatazione e, aumentando il flusso ematico, esalta l'apporto di ossigeno al tessuto.
- b) Il contenuto di fosfocreatina (PCr), che rappresenta una riserva energetica cerebrale facilmente utilizzabile con l'intervento della creatinfosfochinasi (CPK) (Kuby e Noltman, 1962):



Ogni diminuzione di ATP ed aumento di ADP, come pure ogni aumento di H^+ dovuto ad acidosi lattica o ipercapnia, sposta la reazione verso destra.

- c) Una seconda equazione di equilibrio, quella relativa alla adenilato-chinasi, che può essere spostata a destra per diminuzione di ATP o aumento di ADP secondo la reazione:



A causa di questi meccanismi di compenso durante una ipossia prestantiva protratta ma di lieve entità o durante la fase iniziale di una ipossia drastica, le concentrazioni di ATP e ADP variano solo limitatamente nel cervello, mentre si avrebbero più marcati aumenti in quelle di lattato, P_i e AMP, in concomitanza a una diminuzione del contenuto in PCr.

Inoltre, poiché l'ipossia determina una riduzione dei sistemi redox, mitocon-

driali e citoplasmatici, i rapporti NADH/NAD⁺ e L/P aumentano. Tutti questi parametri sono valutati come indici rivelatori di ipossia nei tessuti.

Considerando però che molti di essi sono sensibili alle variazioni di pH è opportuno distinguere tra metabolismo acido/base ed energia metabolica del tessuto.

Il pH intracellulare (pH'_i), allo stato normale, è all'equilibrio tra l'espulsione attiva di ioni H⁺ e il loro afflusso passivo per il gradiente elettrochimico. In condizioni di iper- o ipocapnia (ossia aumento o diminuzione del CO₂), il pH'_i può essere ristabilito mediante tre meccanismi:

- a) sistema tampone fisico-chimico;
- b) consumo o produzione di acidi non volatili;
- c) flussi transmembrana di H⁺ o HCO₃⁻.

I primi due meccanismi sono veloci, mentre il terzo avviene più lentamente (Messerter e Siesjö, 1971).

In stato di ipercapnia acuta si notano diminuzioni dello « steady-state » degli anioni dell'acido lattico, piruvico, α -chetoglutarico, glutamico; variazioni opposte si verificano in condizioni di ipocapnia acuta (Folbergrovà et al., 1974; Siesjö et al., 1974). Queste modificazioni riflettono, con ogni probabilità, la dipendenza dal pH delle reazioni catalizzate dalla fosfofruttochinasi e hanno funzione di importante meccanismo di omeostasi nella regolazione del pH'_i. Tuttavia, esse implicano che un aumento del lattato può essere dovuto tanto a ipossia che a ipocapnia; inoltre la marcata sensibilità alle variazioni di pH intracellulare (Folbergrovà et al., 1974) da parte delle concentrazioni degli acidi del ciclo di Krebs, rende difficile la interpretazione delle variazioni dei suoi intermedi solo in termini di ipossia cellulare.

Quando interviene una acidosi lattica intracellulare a livello cerebrale durante ipossia, la diminuzione del pH'_i è limitata anzitutto dal sistema tampone fisico-chimico; quando la acidosi lattica indotta è marcata, il pH'_i diminuisce in misura maggiore che non durante una tensione doppia di CO₂; inoltre, in tali condizioni, modeste variazioni di pCO₂ non modificano considerevolmente il pH'_i. Gli equilibri della lattico deidrogenasi e della creatina fosfochinasi sono pH-dipendenti: questa dipendenza, durante ipercapnia drastica e blanda (Granholm e Siesjö, 1969; Messeter e Siesjö, 1971; Siesjö et al., 1974; Folbergrovà et al., 1974), si manifesta con variazioni di pH che influenzano i rapporti fosfocreatina/creatina e lattato/piruvato, come indicato nella Figura 2.1.

2.1. La carica energetica potenziale

Visto che molti parametri usati convenzionalmente come indici dell'ipossia tissutale sono pH-dipendenti, è meglio ricercarne altri che riflettano più rigorosamente il bilancio energetico della cellula.

Atkinson (1965, 1968) ha paragonato il sistema dei nucleotidi adenilici del tessuto ad una cella di riserva elettrochimica. Se si valuta la ricchezza dei legami fosforici altamente energetici nel sistema ATP - ADP - AMP, la carica del sistema dei nucleotidi adenilici (carica energetica potenziale: CEP) può essere espressa con la seguente formula:

$$CEP = \frac{[(ATP) + 0,5 (ADP)]}{[(ATP) + (ADP) + (AMP)]}$$

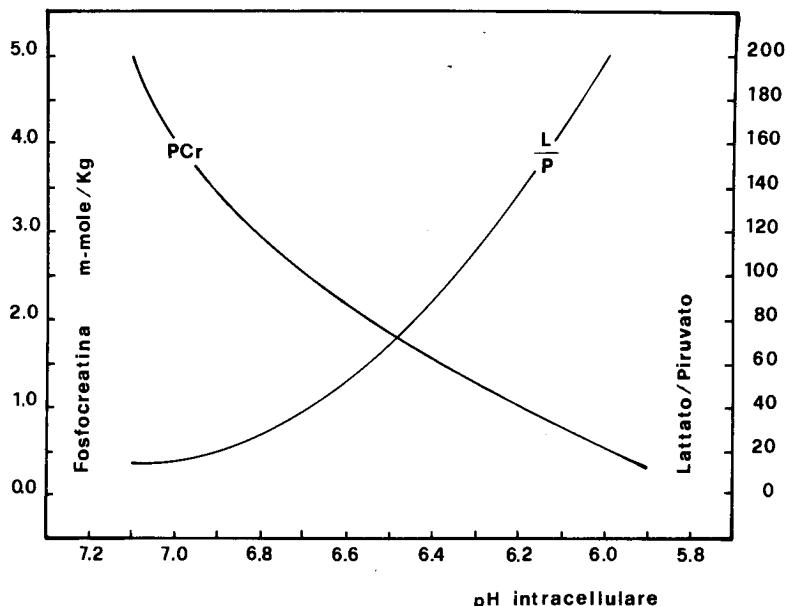


Figura 2.1

Atkinson (1968) sottolinea il fatto che la CEP di un sistema ben regolato con un adeguato rifornimento di substrato è fortemente bilanciata. Infatti, giacché molte reazioni che comportano sia una richiesta che un consumo di ATP sono sensibili a variazioni di carica energetica, l'entità della sintesi di ATP è normalmente correlata al consumo dello stesso e il sistema tende a contrapporsi a modificazioni della carica energetica. Se viene limitato l'apporto di O₂ o di substrato, si stabilisce uno squilibrio tra grado di utilizzo e di rigenerazione di ATP e la CEP subisce una diminuzione. In una simile evenienza si ha un nuovo « steady-state » a una CEP più bassa solo se i processi di biosintesi e di trasporto attivo subiscono un rallentamento.

La CEP, come è stata definita, può costituire un parametro valido per valutare il bilancio energetico della cellula in condizioni ipossiche. Essa è particolarmente sensibile alle variazioni di concentrazione di AMP, e dato che questo si trova in concentrazioni molto basse nel tessuto cerebrale (circa 0,04 μmoli/g), le sue va-

riazioni rappresentano un'unità di misura molto sensibile dell'alterazione del bilancio energetico (Minard e Davis, 1962; Benzi et al., 1972; 1973).

La concentrazione di ATP da sola, normalmente abbastanza alta (circa 2-3 μ moli/g) rappresenta un parametro meno valido perché una prolungata ipossia porta ad una diminuzione della somma dei nucleotidi adenilici, forse dovuta a deaminazione di AMP a IMP (Maker e Lehrer, 1970). Si comprende, così, come il recupero post-ipossico possa essere caratterizzato da una bassa concentrazione di ATP, malgrado una CEP pressoché normale (Benzi et al., 1973).

Visto che un gran numero di vie metaboliche e di reazioni di equilibrio sono pH-dipendenti, si può concludere che lo stato energetico del tessuto viene valutato con più attendibilità calcolando sia lo stato energetico del sistema dei nucleotidi adenilici, che misurando la concentrazione di AMP. Inoltre, conoscendo il valore del pH_i , il calcolo del rapporto NADH/NAD⁺ citoplasmatico fornisce utili informazioni sullo stato redox del tessuto; la misura del pH_i permette anche una miglior valutazione della significatività delle variazioni della concentrazione dei lattati e della fosfocreatina.

2.2. Iporessia ed anossia cerebrale

L'ipossia generalizzata nel cervello insorge in seguito a difficoltà nel rifornimento di ossigeno, sia per caduta della P_o_2 , sia per una anormale distribuzione di questo gas ai tessuti.

Si distinguono (Barcroft, 1934) vari tipi di anossia: 1) *anossica*, provocata da una ridotta P_o_2 arteriosa; 2) *anemica*, dovuta a una ridotta capacità di trasporto di O_2 da parte del sangue; 3) *ischemica*, conseguente ad una diminuzione circolatoria nei tessuti. Anche se provocati da alterate condizioni funzionali di diversa natura, tutti i tipi di ipossia agiscono privando il cervello dell'apporto indispensabile di O_2 . Nella ipossiemia, la bassa tensione di O_2 del sangue stimola la ventilazione e l'assunzione di O_2 da parte dei polmoni e, provocando un'alcalosi respiratoria, determina un ritardo di liberazione dell' O_2 nei tessuti.

Anche il cuore e l'albero circolatorio vengono interessati, come il cervello, da anossia o acidosi. Una moderata ipossia con PaO_2 di circa 80 mm Hg evoca un riflesso compensatorio che fa aumentare la frequenza e la gettata cardiaca, e mantiene o aumenta la pressione arteriosa del circolo (Kontos et al., 1967). Il cuore mal sopporta gradi elevati di anossia (Scheuer, 1967) che stimola il metabolismo anaerobico del muscolo, mentre la acidemia lattica conseguente acutizza l'instabilità del sistema cardiovascolare (Downing et al., 1966). L'insufficiente apporto di sangue al cervello (ischemia) diminuisce la disponibilità di O_2 per le cellule nervose ed ostacola anche la rimozione di sostanze come CO_2 ed acido lattico: si hanno così variazioni negative che non si riscontrano durante ipossia da diminuita tensione di O_2 a livello sanguigno (ipossiemia). Normalmente il flusso complessivo nel cervello umano è di circa 55 ml/100 g/min (Kety e Schmidt, 1948; Kety, 1950), ma varia notevolmente nei singoli distretti cerebrali (Landau et al.,

1955; Reivich et al., 1969): così il flusso nella sostanza bianca si aggira intorno ai 25 ml/100 g/min, mentre in alcune aree corticali o altri centri di sostanza grigia supera i 100 ml/100 g/min. Il flusso ematico cerebrale (CBF) è condizionato dalla differenza di pressione artero-venosa e dalla resistenza vascolare; quest'ultima è regolata da meccanismi metabolici, miogenetici e neurogenetici che tendono ad opporsi alle variazioni della pressione del sangue perfondente, adattando così il flusso secondo le necessità metaboliche del tessuto (Kety, 1950; 1960; Sokoloff, 1959).

Quando la pressione sanguigna sistemica è ridotta, i vasi cerebrali si adattano per autoregolazione in modo che il flusso rimanga costante; tali meccanismi sono molto attivi fino a che la pressione arteriosa sistemica media è superiore a 60-70 mm Hg. Tuttavia, in condizioni che predispongono il tessuto all'acidosi od a danni metabolici (come nell'ipercapnia e nell'acidosi lattica), la capacità di autoregolazione va perduta ed il flusso quindi varia passivamente con la pressione di perfusione. Ciò implica che, mentre una moderata diminuzione di questa è tollerata dal cervello normale, può essere invece altamente dannosa per un cervello ipossico. Una diminuzione del flusso cerebrale non significa necessariamente ipossia cerebrale; infatti, durante una forte iperventilazione il flusso sanguigno cerebrale può scendere anche al 50% del normale senza che si manifestino segni di ipossia (Kety e Schmidt, 1948; Alexander et al., 1965; Alexander et al., 1968; Granholm e Siesjö, 1971).

Una riduzione della concentrazione dell'ossigeno arterioso, con circolo cerebrale intatto, può essere il risultato di una serie svariata di fattori, ma la causa più comune dell'ipossia cerebrale è una diminuzione della tensione dell'O₂ arterioso (ipossiemia). Tuttavia è abbastanza insolito indurre stati di ipossiemia semplice durante gli eventi prestativi; infatti, nella maggior parte dei casi, per indurre una ipossia cerebrale, acquista un significato determinante la riduzione della ventilazione. Quello che è interessante rilevare è che pur essendoci nel tessuto cerebrale ancora O₂ sufficiente ad una buona funzionalità mitocondriale, e pur essendo ancora integre alcune riserve iniziali di energia, l'ipossia provoca la scomparsa della funzione entro tempi molto brevi. Una così veloce perdita di funzionalità è davvero sorprendente, anche in considerazione delle riserve energetiche del tessuto. Pertanto, mentre le condizioni locali cerebrali consentono una certa produzione di ATP aerobicamente ed anaerobicamente, la perdita di funzione avviene molto prima dell'esaurimento delle riserve energetiche. Il che, in altre parole, vuole sottolineare che i disturbi della funzione cerebrale possono insorgere anche quando il metabolismo energetico cerebrale è ancora largamente efficiente (Benzi et al., 1968; 1969; 1971; 1973).

Una serie di ricerche hanno esaminato le variazioni dell'energia cerebrale e del metabolismo acido-base in condizioni di ipossiemia, ossia quando si abbassa la pressione parziale di O₂ nel sangue arterioso circolante (PaO₂). Queste ricerche (Kaasik et al., 1970) mostrano che, anche quando si annulla quasi completamente la PCr del tessuto cerebrale, permangono ancora quantità apprezzabili di ATP, e

la CEP si abbassa solo limitatamente. Queste condizioni ipossiche provocano ovviamente una rapida diminuzione della PaO_2 , ma anche un altrettanto rapido aumento della pCO_2 arteriosa portandola da 40 mm Hg fino ad 80 mm Hg. La acidosi cerebrale intracellulare conseguente viene così provocata sia da ipercapnia che da accumulo di acido lattico; le concentrazioni di lattato intracellulare aumentano fino a 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ di acqua intracellulare, mentre il pH scende da 7,1 a 6,5 e il rapporto citoplasmatico NADH/NAD^+ aumenta di 3 o 4 volte.

I risultati ottenuti in ipossia portano alle seguenti conclusioni (Nilsson e Siesjö, 1971): a) inizialmente la causa preponderante della caduta di pH (acidosi) è dovuta alla ipercapnia, ma quando si instaura una forte acidosi lattica l'apporto dato dall'aumento della tensione di CO_2 diminuisce di importanza; b) l'instaurarsi dell'ipossia induce un rapido aumento del rapporto citoplasmatico NADH/NAD^+ : tale rapporto sembra seguire le variazioni ossidoriduttive mitocondriali solo con uno scarto piccolissimo; c) successivamente vi è limitato incremento nella produzione di lattato vi è anche in seguito ad ipossia protratta per 4 minuti. Ciò è stato inizialmente attribuito alla inibizione della glicolisi da parte del pH acido, ma alla luce dei dati relativi alla massima capacità glicolitica ed al trasporto del glucosio dal sangue al tessuto, è possibile imputare tali fenomeni anche alla deplezione di substrato nel cervello.

Rimesso lo stato ipossiemicco, si stabilisce un recupero biochimico completo dopo circa 3-8 minuti; in tale periodo, l'ATP e la CEP ritornano ai valori normali entro 2-6 minuti, mentre per revertire l'acidosi cerebrale lattica sono necessari 5-30 minuti (Thorn et al., 1955; Müller et al., 1970; Benzi et al., 1972; 1973). La prolungata acidosi cerebrale lattica spiega perché la fosfocreatina torni alla normalità meno velocemente dell'ATP, e perché, mediante la sua azione sull'equilibrio della lattico deidrogenasi, il rapporto L/P resti elevato per molti minuti (Nilsson e Siesjö, 1971).

Dato che nel cervello la glicolisi non può seguire la via inversa della glicogenosintesi (ciclo di Cori), e dato che si possono escludere notevoli deflussi di lattato dal tessuto al torrente sanguigno, si deduce che il lattato viene ossidato nella fase di recupero; inoltre, dal momento che l'ossidazione citoplasmatica del lattato produce NADH a partire da NAD^+ , le prove sperimentali confermano l'efficienza del sistema *a spola* (shuttle system) per la riossalazione del NADH citoplasmatico.

Allo scopo di chiarire l'influenza della PaO_2 sul bilancio energetico del tessuto cerebrale, sono stati fatti studi abbassando la PaO_2 dai valori normali di 100 ed oltre mm Hg fino a soli 15 mm Hg per 30 minuti (Siesjö e Nilsson, 1971; MacMillan e Siesjö, 1971; Benzi et al., 1973); allorché la PaO_2 è ridotta a valori inferiori a 50 mm Hg si assiste ad un progressivo aumento delle concentrazioni di lattato intra- ed extracellulari (Siesjö e Nilsson, 1971), che concorda esattamente con lo aumento di flusso sanguigno e di acidità osservato sperimentalmente a questi valori di PaO_2 (Kogure et al., 1970; Benzi et al., 1973). Quando la PaO_2 viene ridotta sotto i 35 mm Hg, si provoca un più

veloce aumento del lattato ed una progressiva diminuzione di fosfocreatina cerebrali. A valori di P_{O_2} ancora più bassi, malgrado una forte acidosi lattica ed una riduzione del 50% di PCr rispetto al normale, le concentrazioni cerebrali di ATP, ADP e AMP si mantengono essenzialmente normali (Benzi et al., 1972; 1973). Tuttavia, a così bassi valori di PaO_2 , anche piccole diminuzioni di pressione sanguigna provocano notevoli perturbazioni nello stato energetico. Da ciò si deduce che la pressione di perfusione sanguigna gioca un ruolo determinante nei casi di ipossia. Se la pressione sistematica rimane elevata lo stato energetico cerebrale è tetragono alla carenza di O_2 ; se però si hanno delle cadute nella pressione sanguigna sistematica, si instaurano facilmente dei deficit energetici cerebrali (Siesjö e Nilsson, 1971; Benzi et al., 1972; 1973; 1975).

Così in esperimenti di ipossia condotti con misure di P_{O_2} venosa cerebrale, e con rilevazione del pH' intracellulare (Mac-Millan e Siesjö, 1971), si è visto che, per tutto il tempo che si mantiene normale la pressione di perfusione sanguigna, la P_{O_2} venosa cerebrale può essere ridotta a meno di 10 mm Hg, senza osservare rilevanti variazioni di CEP. Inoltre i risultati indicano che la diminuzione del pH' dovuta all'acidosi lattica, può essere la causa dell'osservato calo nel contenuto di PCr, mentre si hanno piccolissime variazioni del rapporto NADH / NAD⁺ citoplasmatico. Per spiegare il meccanismo che sta alla base della acidosi lattica, sono stati programmati esperimenti che prevedevano riduzioni della PaO_2 a 27-28 mm Hg per 30 min (MacMillan e Siesjö, 1972): i risultati dimostrano che in tale situazione i lattati del tessuto cerebrale sono notevolmente aumentati, pur rimanendo invariate le concentrazioni di ATP, ADP, AMP e la CEP, nonostante un aumento di citrato.

La stimolazione della glicolisi nel cervello, con una CEP normale, in presenza di una maggiore concentrazione di citrato ed una diminuzione di pH' (che hanno un effetto inibente sulla glicolisi), fanno ritener che esista un altro potente attivatore in grado di determinare l'acidosi lattica e la vasodilatazione (Kogure et al., 1970), prima che sia interessato lo stato energetico tissutale legato al pool degli adenilati. Il piccolo aumento di NH₄⁺ che si viene a determinare in queste condizioni nel tessuto cerebrale è insufficiente a spiegare la stimolazione della glicolisi (Nindfelt e Siesjö, 1971): e si può invece ragionevolmente pensare che ne sia responsabile l'attivazione dell'adenil-ciclasa del cervello con formazione di 3'-5'-AMP ciclico (MacMillan e Siesjö, 1972; Villa, 1975; Benzi e Villa, 1976). In ogni caso, qualunque sia il fattore stimolante, esso induce un unico meccanismo omeostatico per il mantenimento di uno stato energetico normale nel cervello in condizioni di ipossia.

I risultati precedenti autorizzano infine una rivalutazione delle teorie sulla diffusione di ossigeno nel cervello. Pare, infatti, difficile conservare il concetto di « soglia » al di sotto dei 12 mm Hg, dato che la P_{O_2} venosa può essere abbassata fino a meno di 10 mm Hg, senza alterazioni evidenziabili della carica energetica. Infatti per saturare i mitocondri « in vivo » (Chance et al., 1962; Lübbbers e Kessler, 1968), bastano bassissime tensioni di ossigeno; inoltre è possibile un

riadattamento dei capillari più favorevole alla microcircolazione distrettuale cerebrale (Grunewald, 1968). Va, però, sottolineato che, anche se nell'ipossia lo stato energetico del tessuto è molto più elevato di quanto si supponesse prima, i più recenti risultati mostrano un rapido esaurimento della funzionalità cerebrale. Ossia, anche quando sussistono condizioni energetiche cerebrali non turbate dallo stato di ipossia è possibile evidenziare disturbi alla sfera funzionale cerebrale: è appena il caso di rilevare l'estrema importanza pratica di questi rilievi in campo prestativo.

Tutte le prove sperimentali indicano inoltre che, fino a quando il cervello è perfuso ad una pressione sanguigna adeguata, l'ipossia tissutale che interviene durante una ipossia di breve durata è ampiamente reversibile e non provoca un danno alla cellula. Questa conclusione è confermata da meticolose valutazioni al microscopio su cervelli di animali fortemente ipossiemici, che non mostrano alcun danno cellulare (Salford et al., 1972). Tuttavia, poiché una piccolissima diminuzione della pressione di perfusione durante l'ipossia ha effetti imponenti sullo stato energetico del tessuto (Siesjö e Nilsson, 1971), è logico il dover imputare il danno cellulare a sindromi da ischemia. Tuttavia sembra altrettanto ovvio che la prestazione porta, di per sé, ad effetti opposti, tendendo cioè ad aumentare la pressione di perfusione cerebrale. Quanto si dirà quindi sullo stato ischemico riguarda solo problemi di patologia sportiva, potendosi al più rilevare il quadro ischemico in soggetti che mostrano durante o dopo prestazione sindromi da caduta brusca della pressione di perfusione cerebrale (ad es., da collasso cardio-circolatorio con ipotensione di grado elevato).

2.3. Modificazioni cerebrali durante l'ischemia

Allorché si interrompe completamente la circolazione nel cervello, questo si trasforma in un sistema chiuso, con produzione di energia limitata alle possibilità di utilizzo dei substrati endogeni. Dato che il contenuto di ossigeno endogeno è molto basso e permette un'ossidazione continua solo per alcuni secondi, la produzione anaerobica di acido lattico da glucosio endogeno o da glicogeno diventa l'unica fonte di nuova energia. Con un consumo normale di glucosio di 0,3 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ (McIlwain, 1966) e supponendo una produzione di ATP di 36 $\mu\text{moli}/\text{mole}$ di glucosio ossidata, si può calcolare un normale utilizzo di ATP di 11 $\mu\text{moli}/\text{g}/\text{min}$. Poiché il cervello contiene circa 5 $\mu\text{moli}/\text{g}$ di PCr e circa 3 $\mu\text{moli}/\text{g}$ di ATP, le riserve endogene di fosfati altamente energetici sono sufficienti solo per meno di un minuto, mantenendo normale il consumo; il quantitativo extra di ATP che il cervello può formare dipende dalle riserve di glucosio e di glicogeno (Lowry et al., 1964).

Ogni mole di glucosio metabolizzata in anaerobiosi fornisce 2 moli di ATP ed il glicogeno circa 3; con una concentrazione di glucosio e di glicogeno (espresso come residui di glucosio) di 3 $\mu\text{moli}/\text{g}$ rispettivamente, si può perciò formare un quantitativo extra di 15 $\mu\text{moli}/\text{g}$ di ATP. Teoricamente quindi, il cervello

potrebbe sopportare due o tre minuti di completa ischemia, prima di esaurire completamente le riserve energetiche; in realtà, il periodo si riduce a meno di 2 minuti, dato che una parte di ATP risulta inutilizzabile per il lavoro cellulare. Tale periodo potrebbe venire allungato aumentando le riserve tissutali di glucosio, oppure abbreviato inducendo uno stato ipoglicemico. Alcuni lavori sperimentali (Lowry et al., 1964; Goldberg et al., 1966; Gatfield et al., 1966; Folbergrova et al., 1970) forniscono dettagliate informazioni sulle variazioni dei metaboliti cerebrali in rapporto al tempo: la glicolisi è stimolata a livello della fosfofruttocinasi, della esocinasi e delle fosforilasi (Lowry e Passonneau, 1964; 1966). Anche se le variazioni dell'ATP e dell'ADP, durante un'ischemia completa, tendono a sollecitare alcune delle reazioni del ciclo di Krebs, un aumento generico delle concentrazioni dei metaboliti intermedi di tale sequenza è, probabilmente, preventata da una inibizione da NADH e da un calo di NAD⁺.

Sempre a proposito delle variazioni che si verificano durante ischemia, mentre i tassi di glutamato e glutamina restano invariati (Theews et al., 1963; Young e Lowry, 1966), il γ-amino butirrato (Lowell e Elliott, 1963) e l'NH₄⁺ (Thorn e Heimann, 1958) aumentano. L'aumento di NH₄⁺ è stato attribuito ad una deaminazione di AMP ad IMP (Maker e Lehrer, 1970). E', però, opportuno notare (Siesjö e Nilsson, 1971) che le concentrazioni di NH₄⁺ nel tessuto possono aumentare prima di qualsiasi variazione nel contenuto dei nucleotidi adenilici e pare molto più probabile che questi ioni provengano da altre fonti, come il glutamato. Con la deaminazione di AMP, si ha una diminuzione della somma degli adenilati (ATP + ADP + AMP) e questo è già rilevabile 2 min dopo ischemia completa. Tale diminuzione può provocare l'abbassamento della concentrazione di ATP, a CEP normale, durante il recupero dopo ischemia.

Da studi sui cambiamenti metabolici locali, si è dedotto che i centri vegetativi del cervello sono più resistenti all'anossia di quelli corticali (Sugar e Gerard, 1938; Weinberger et al., 1940; Gänshirt et al., 1952) e che le attività dei centri respiratorio, cardioregolatore e vasomotore possono essere ripristinate dopo un arresto della circolazione anche di 30 minuti (Heymans et al., 1937). Le diversità tra i tempi di sopravvivenza e di ricupero sono state attribuite a differenze basilari, riscontrate anche « in vitro », nel grado di metabolismo delle varie regioni cerebrali (Himwich e Fazekas, 1941; Himwich et al., 1941). Così si è sperimentalmente (Müller et al., 1970) dimostrato che, dopo 4 minuti di ischemia, la PCr e il glucosio risultano diminuiti in tutte le strutture cerebrali; tuttavia la diminuzione delle concentrazioni di ATP e di glicogeno, oltre a quella della CEP, è meno pronunciata nella materia bianca e nelle parti basali cerebrali che non nella corteccia. Questi dati possono fornire alcune spiegazioni biochimiche della minore vulnerabilità all'anossia di parti del cervello filogeneticamente più antiche. Anche i cambiamenti intracellulari di pH, durante ischemia, possono avere influenza notevole sul metabolismo del tessuto e sui fattori che determinano il ricupero dopo ischemia.

Il cervello normale mostra un notevole grado di autoregolazione e, prima che possa manifestarsi una anossia cerebrale, la pressione di perfusione deve cadere a valori bassi. Esperimenti hanno dimostrato che la pressione media arteriosa può essere ridotta a circa 60-40 mm Hg prima che compaiano segni di squilibrio nel metabolismo energetico (Siesjö et al., 1972; Benzi et al., 1972). In altri esperimenti, in cui la pressione di perfusione cerebrale venga ridotta aumentando la pressione intracranica, non si evidenzia nessun cambiamento nello stato energetico del tessuto fino a che la pressione di perfusione scende a 30-35 mm Hg (Siesjö e Zwetnow, 1970). Quando si raggiunge una pressione di perfusione "critica", lo stato energetico del tessuto decresce più o meno rapidamente. Un tale fenomeno soglia rende difficoltoso definire la perfusione cerebrale minima compatibile con uno stato energetico immutato.

3. Variazioni indotte da sostanze esogene sul flusso sanguigno e sul metabolismo cerebrale

Appare evidente come il quadro generale da ipossia e da ischemia sia molto vasto e caratterizzato da fluttuazioni energetiche dovute a variazioni della CEP e del potenziale ossidoriduttivo. Non sono, peraltro, da sottovalutare altri parametri, il pH intracellulare (pH'_i), la P_{CO_2} , la P_{O_2} , i cambiamenti metabolici locali, i quali rappresentano fattori che interferiscono sul metabolismo energetico. Proprio per questo si ritiene importante e di grande interesse la valutazione di tali fenomeni in base alle risposte ottenute in seguito alla introduzione di sostanze che, per le loro caratteristiche particolari, si possono inserire in modo opportuno in tali sistemi. Naturalmente la prima esigenza cui devono rispondere tali sostanze è quella di permeare la barriera emato-encefalica per giungere a contatto con le cellule nervose.

3.1. Permeabilità alle sostanze esogene della barriera emato-encefalica

La condizione essenziale per la quale una sostanza agisce a livello del sistema nervoso centrale (SNC) è la sua presenza nei liquidi extracellulari (LEC) del SNC stesso. Ovviamente la disponibilità cerebrale di ogni sostanza è condizionata a monte da un gran numero di fattori quali: l'assorbimento esterno, i passaggi transmembrana, la distribuzione intercompartmentale, l'assorbimento interno, le trasformazioni metaboliche (ossidazioni, riduzioni, coniugazioni, idrolisi, ciclizzazioni), il grado di dissociazione e di ionizzazione; infine entra in gioco la specifica caratteristica di permeazione della barriera emato-encefalica (BEE).

Risulta quindi evidente che la possibilità di agire a livello cerebrale sui vari momenti dell'allenamento o della performance a mezzo di interventi esogeni (so-

stanze alimentari, fisiologiche, medicamentose, ecc.) è condizionata dalla effettiva capacità di permeazione della BEE.

La permeabilità di tale barriera è legata a molti fattori anatomici e funzionali (Rall e Zubrod, 1962; Schanker, 1965; Barlow e Lorenzo, 1971) tra cui si evidenzia che: (a) la parete dei capillari cerebrali è il sito morfologico caratterizzante la BEE; (b) il cervello ha un notevole spazio extracellulare; (c) la permeabilità della BEE è mediata da trasportatori transmembrana (carriers); (d) la facilitazione del passaggio attraverso la BEE è attuata da parte dei derivati lipofilici dei farmaci; (e) la modificazione del citoplasma cellulare dei capillari endoteliali è possibile da parte di alcune sostanze che penetrano nel tessuto cerebrale.

3.1.1. Interrelazioni fra liquidi extracellulari organismici e cerebrali

E' chiaro che esistono numerosi compartimenti non-cerebrali in cui sono presenti dei liquidi extracellulari: tali compartimenti sono globalmente riassumibili nel compartimento dei LEC generali. Fra questi, il plasma è un sottocompartimento mobile che serve, per mezzo del suo notevole flusso attraverso la microcircolazione, a raccorciare la effettiva distanza di perfusione tra le varie cellule costituenti la compagine organismica; ciò è facilitato dalla permeabilità della parete dei capillari a tutte le molecole di piccole dimensioni (Landis e Pappenheimer, 1963; Renkin, 1964). Se iniettate per via venosa, tutte le molecole polari con peso molecolare inferiore a 20.000-30.000 si distribuiscono nel compartimento generale dei liquidi extracellulari in un volume quattro volte maggiore di quello del plasma; la distribuzione ha un $t_{50\%}$ di equilibrio di meno di un minuto ($t_{50\%}$ = tempo per il quale la massima concentrazione iniziale si riduce del 50%). Le molecole polari con un peso molecolare superiore a 30.000 rimangono per un certo periodo di tempo confinate nel compartimento plasmatico, distribuendosi poi in un compartimento molto largo (non definibile anatomicamente) con un $t_{50\%}$ di alcune ore (Gitlin, 1957). Le molecole non polari di tutte le dimensioni si distribuiscono in tempi molto brevi (inferiori al minuto) in uno spazio compartimentale che è 10-15 volte più grande del volume plasmatico (Oldendorf, 1972).

Va ricordato che, ai fini della distribuzione intercompartimentale organismica delle molecole esogene, ha una notevole importanza lo stato chimico-fisico dei costituenti organismici stessi: così il plasma sanguigno ha caratteristiche polari idrofiliche, mentre i costituenti lipoproteici delle membrane cellulari hanno caratteristiche non polari lipofiliche.

In generale la permeabilità dei capillari alle molecole polari non è specifica, al di là ovviamente della funzione selettiva nei confronti della grandezza molecolare, il cui limite superiore di passaggio transmembrana è fissabile intorno ai 70-90 Å. Tuttavia, a livello dei capillari del SNC, non si riscontra una così non-specifica permeabilità capillare: infatti molte molecole polari presenti nel plasma hanno uno scambio molto lento con i liquidi extracellulari cerebrali. In

ogni caso, la barriera ematoencefalica è permeabile ai substrati metabolici ed ai prodotti del metabolismo; inoltre, la immediata risposta delle cellule cerebrali ad alcuni farmaci deve essere ragionevolmente attribuita ad una elettiva permeabilità della BEE a detti farmaci. Pertanto la barriera stessa deve essere concepita come selettivamente permeabile, con criteri discriminativi non così semplicistici, come la dimensione molecolare.

Nel SNC, accanto ai problemi di diffusione attraverso la barriera ematoencefalica, esistono i problemi della diffusione attraverso la barriera cerebrospinale, tramite la quale le sostanze diffondono al liquor cerebrospinale (LCS). Questo è concepito come una aggregazione di liquidi nei ventricoli e nello spazio subaracnideo, che è una estensione del compartimento interstiziale extracellulare del SNC (Brightman, 1968; Brightman et al., 1970). Pertanto il termine di barriera ematoliquorale indica molto empiricamente che esistono delle disomogenee barriere anatomiche le quali modulano lo scambio « sangue → liquor » a mezzo: della barriera emato-encefalica (fra sangue e tessuto cerebrale), della barriera cerebro-spinale (fra tessuto cerebrale e liquor), dei plessi coroidei, delle membrane aracnoidee, delle membrane ependimali, ecc. Nel complesso, tuttavia, la BEE rappresenta il fattore modulante di maggiore importanza.

Dato quindi che molti farmaci non sono in grado di valicare la barriera ematoencefalica, risulta evidente la ragione della loro mancanza di effetti per somministrazione sistemica (orale, intramuscolare, endovenosa, ecc.) in contrapposto a possibili notevoli effetti da iniezione intraventricolare. Il liquor cerebrospinale agisce come un collettore (« sink ») per le molecole disciolte nei liquidi extracellulari del SNC, dato che queste si muovono da una regione cerebrale ad un'altra per diffusione da gradiente di concentrazione. Questo è mantenuto dalla costante diluizione del liquor operata dalla continua secrezione coroidea che è virtualmente priva di tutti quei soluti che sarebbero osmoticamente necessari per renderla isotonica con il tessuto cerebrale (De Rougemont et al., 1960; Ames et al., 1964; 1965); tuttavia non tutto il liquor è di stretta origine coroidale (Welch, 1965; 1966; Milhorat, 1971).

L'effetto « sink » rimuove non selettivamente ogni soluto che nel liquido interstiziale extracellulare sia in concentrazione più alta che nel liquor cerebrospinale, attuandosi un movimento diffusivo attraverso le membrane ependimali o piali; il soluto, miscelato nel liquor, è poi trasportato nel sangue per mezzo del notevole flusso attraverso i villi aracnoidei (Davson, 1967). In aggiunta a questo meccanismo passivo di diffusione, gli ioduri (Welch, 1962) ed i tiocianati (Pollay e Davson, 1963), così come il diodrasto e la fenolsulfonftaleina (Pappenheimer et al., 1961), la serotonina e l'adrenalina (Tochino e Schanker, 1965) sono attivamente trasportati dai ventricoli cerebrali al torrente circolatorio a mezzo del plesso coroideo; lo iodio (Ahmed e Van Harreveld, 1969) ed il potassio (Bradbury et al., 1971) sono probabilmente escreti dai liquidi extracellulari cerebrali nel sangue contro un gradiente di concentrazione a livello della barriera ematoencefalica.

3.1.2. La barriera ematoencefalica

Alcuni studi morfologici e di distribuzione compartmentale (Van Harreveld et al., 1965; 1970; Levin et al., 1970) hanno evidenziato che il tessuto cerebrale ha uno spazio extracellulare del 10-20%, ossia dello stesso ordine di grandezza dei tessuti dell'intiero organismo. La virtuale assenza di liquidi extracellulari, descritta durante le routinarie osservazioni di microscopia elettronica, è il risultato di una trasmigrazione postmortem dei liquidi stessi entro le cellule nervose, in risposta al fatto che l'alto gradiente di Na^+ , tra l'esterno e l'interno delle cellule, non può essere mantenuto allorché sono deplete le riserve energetiche a livello della membrana cellulare. Per quanto riguarda specificamente la costituzione anatomica della barriera ematoencefalica, si pensa che questa sia realizzata dallo strato continuo delle cellule endoteliali (strettamente congiunte fra di loro) dei capillari cerebrali. Nei capillari cerebrali è tipica l'assenza di strette fessure fisicamente aperte fra le cellule endoteliali; in altri tessuti, quali la cute ed i muscoli, è proprio a queste fessure esistenti fra le cellule endoteliali dei capillari che si deve il facile passaggio di piccole molecole polari. Infatti queste molecole lipofobiche sono incapaci di penetrare le strutture lipidiche delle cellule: pertanto il loro trasferimento dai capillari ai tessuti sopradetti va inteso più come un passaggio fra le fessure intercellulari che come un passaggio transcellulare.

La membrana ematoencefalica è quasi completamente impermeabile alle macromolecole (Sisson e Oldendorf, 1971) e ciò può essere ascritto all'assenza, nel citoplasma delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali, di vescicole pinocitotiche capaci di inglobare le macromolecole stesse per trasferirle dal sangue capillare alle cellule nervose. Queste vescicole pinocitotiche citoplasmatiche sono invece una peculiare caratteristica delle cellule dei capillari di altri tessuti (Palade, 1953) e spiegano la modesta, ma effettiva, permeabilità di tali capillari alle macromolecole (Renkin, 1964). Le due sunnominate caratteristiche strutturali dei capillari del SNC (mancanza di fessure intercellulari e mancanza di vescicole pinocitotiche citoplasmatiche) rendono conto della loro impermeabilità alla maggior parte delle molecole idrofiliche. La causa di queste caratteristiche morfologiche sarebbe da ricercarsi in un agente umorale secreto dalle membrane delle cellule astrocitiche, con i cui processi gliali prendono appunto contatto i capillari cerebrali; tale agente umorale indurrebbe sia la formazione di strette giunzioni intercellulari, sia il blocco delle pinocitosi (Davson e Oldendorf, 1967). Né la membrana basale dei capillari cerebrali, né la circostante membrana degli astrociti contribuisce alla costituzione della barriera ematoencefalica; infatti introducendo negli spazi pericapillari delle sostanze impermeabili alla barriera ematoencefalica, si può notare il loro facile passaggio nel liquido ematoencefalico, e viceversa. Pertanto la barriera ematoencefalica deve intendersi costituita da: a) membrana interna delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali; b) membrana esterna delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali; c) citoplasma cellulare interposto fra queste due membrane.

La permeabilità ad un soluto della barriera ematoencefalica è definita normal-

mente come un fenomeno primariamente quantale (del tutto o del nulla), nel senso che la sostanza o passa o non passa; nel primo caso la quantizzazione successiva descrive poi un fenomeno graduale, in funzione del tempo. Per molti farmaci la permeabilità della BEE può essere determinata mediante la introduzione simultanea nelle arterie carotidee della sostanza in esame e di una sostanza di riferimento altamente diffusibile (Oldendorf et al., 1972). La quantità di farmaco passata nel cervello in un singolo passaggio attraverso la microcircolazione deve essere determinata entro 15 secondi dalla introduzione nella carotide. Va rilevato che un numero molto elevato di farmaci e di metaboliti è captato dal cervello in un singolo passaggio; citiamo, ad esempio, la nicotina, la caffea, l'imipramina, la procaina, l'antpirina, l'alcool etilico, ecc. Naturalmente questo metodo di somministrazione endocarotidea del farmaco è lontana dalla normale prassi clinica; in alternativa, per attuare uno studio corretto, si ricorre alla introduzione endovenosa del farmaco, dato che per le altre vie (ad es. quella orale) la concentrazione della sostanza nel cervello darebbe più un indice del suo assorbimento esterno, della sua distribuzione intraorganismica, della sua metabolizzazione, ecc., piuttosto che della sua effettiva velocità di passaggio attraverso la barriera ematoencefalica.

Per passare la BEE una molecola deve evadere dallo stato polare idrofilico del plasma sanguigno per entrare nello stato non-polare lipofilico dei costituenti lipoproteici della membrana cellulare interna della cellula dei capillari; successivamente deve lasciare questo stato non-polare di membrana per entrare in quello polare dell'acqua citoplasmatica, e così via per la membrana esterna delle cellule endoteliali dei capillari. La transizione dal plasma sanguigno alla membrana cellulare interna dei capillari è largamente predicibile sulla base della affinità del farmaco per le proteine plasmatiche e per le membrane lipidiche; se il farmaco è fortemente legato alle proteine plasmatiche, il complesso macromolecolare non può passare nella membrana cellulare perché è difficile che possieda il livello energetico richiesto per la transizione nel sistema acqua-grassi. I legami con le proteine plasmatiche sono importanti per stabilire la quota di sostanza libera plasmatica, dato che solo questa può attraversare la BEE. Così la tiroxina libera rappresenta solo l'1% della quantità totale di tiroxina plasmatica ma, essendo in equilibrio dinamico con la quota coniugata, permette un costante passaggio dalla microcircolazione ai tessuti cerebrali. Va rilevato che la somministrazione di farmaci può competere con alcune sostanze fisiologiche per il possesso dei siti di legame con le proteine plasmatiche; in tal caso si può avere una maggior quota libera plasmatica e, quindi, un maggior trasporto verso il tessuto cerebrale. Un esempio è quello della bilirubina che è molto tossica per il SNC; tuttavia, anche in caso di ittero grave, la concentrazione cerebrale di bilirubina è molto bassa a causa dei notevoli legami che essa contrae con le proteine plasmatiche, che la confinano nel torrente circolatorio (Nasralla et al., 1958). Se però viene somministrato un sulfamidico, questo sposta la bilirubina dalle proteine plasmatiche e condiziona, specie nel neonato, l'insorgenza di una evidente manifestazione neurotossica (Odell, 1959).

L'altra situazione che condiziona il passaggio della barriera ematoencefalica

è definita dal coefficiente di ripartizione olio/acqua; ovviamente l'alta liposolubilità facilita la diffusione negli strati lipoidei del reticolo tridimensionale lipoproteico delle membrane. Naturalmente il grado di ionizzazione influenza il fenomeno in quanto rende la molecola proporzionalmente idrofila e lipofobica, favorendo così la sua ritenzione nella fase acquosa. Infatti uno ione è circondato da un alone di molecole di acqua cui è collegato da legami elettrostatici; ogni molecola di acqua, a mezzo di legami idrogeno, è poi ancorata alla fase acquosa (Stein, 1967). D'altra parte, la ionizzazione di un farmaco può anche modificarne l'affinità per i siti di legame alle proteine plasmatiche; se un farmaco è largamente non-ionizzato a pH 7,4, la sua penetrazione nel SNC è favorita, dato che solo la frazione non-ionizzata permea la barriera ematoencefalica. Ora il pH del sangue è relativamente stabile e può variare al massimo di $\pm 0,3$; pertanto questi cambiamenti nel potere acido-basico non hanno la possibilità di determinare così notevoli variazioni nei legami farmacoproteici di molte sostanze. Tuttavia alcuni farmaci che hanno un pK vicino a 7,4 possono risentire in un modo notevole anche delle piccole variazioni di pH che possono essere indotte dagli eventi prestativi, con i conseguenti cambiamenti nell'equilibrio acido-basico.

Il carattere idrofilico delle molecole ionizzate è dominato dalla loro carica elettrica, mentre l'affinità delle molecole non-ionizzate verso i lipidi, nei confronti dell'acqua, è largamente determinata dalla loro capacità a contrarre legami idrogeno. Il coefficiente di ripartizione olio/acqua di una sostanza può essere stimato esaminando la sua struttura e valutando il numero totale e la relativa forza dei legami idrogeno dei gruppi polari. Per definire l'apparente forza dei legami idrogeno dei gruppi organici, si assegna un valore ponderale numerico (N). Così si attribuisce: a) N = 2, al gruppo -OH di alcooli, zuccheri, glicoli, acidi carbossilici, ed al gruppo -NH₂ delle amine primarie; b) N = 1, al gruppo -NH-R delle amine seconde, ed al gruppo -CO- di acidi carbossilici, amidi ed aldeidi; c) N = 0,5, al gruppo -CO- degli esteri; d) N = 0, al gruppo -O- degli eteri. Si pensa che ogni addizionale legame idrogeno ad alta forza decrementa del fattore 6-10 la barriera protettiva di transizione di una membrana.

La barriera ematoencefalica è responsabile di una notevolmente ristretta distribuzione al cervello di molti farmaci lipido-insolubili. La penetrazione della BEE può essere grandemente incrementata proteggendo i siti dove si formano i legami ad idrogeno, mediante la sostituzione di gruppi relativamente lipofilici; se il cervello ha la capacità enzimatica di rimuovere questi addizionali gruppi lipofilici, il composto originale viene rigenerato: questo procedimento si chiama « latentiation » (Harper, 1959) ed è un metodo abbastanza diffuso per portare i farmaci a livello cerebrale. Il primo esempio, sebbene non mirato, di latentiation è rappresentato dalla sintesi dell'eroina mediante l'acetilazione dei due gruppi ossidrilici della morfina; ciò incrementa molto l'entità del farmaco che entra nel cervello, dove l'eroina viene poi deacetilata in morfina, sotto la quale forma è farmacologicamente attiva (Way, 1968; Oldendorf et al., 1972).

La barriera ematoencefalica è praticamente impermeabile a tutti i neurotra-

smettitori (Oldendorf, 1971), mentre è permeabile ad alcuni substrati metabolici quali il glucosio (Fishman, 1964; Crone, 1965), malgrado questi abbia un carattere spiccatamente polare e quindi lipofobico. Ciò è reso possibile da alcuni specifici sistemi trasportatori (carriers) che possono competere efficacemente anche contro i forti legami idrogeno che tali substrati contraggono con l'acqua. Sebbene si possa presupporre l'esistenza di molti sistemi di trasporto nella barriera ematoencefalica, allo stato attuale delle nostre conoscenze sono stati ben definiti quattro carriers indipendenti; questi sono: a) un sistema di trasporto per il D-glucosio ed esosi correlati (Oldendorf, 1971); b) un sistema di trasporto per aminoacidi neutri; c) un sistema di trasporto per gli aminoacidi basici (Oldendorf, 1971; Richter e Wainer, 1971); d) un sistema di trasporto per gli acidi monocarbossilici a catena corta. Questi specifici sistemi di trasporto sono allocati nelle membrane delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali, dove creano delle affinità di membrana non prevedibili in base al semplice coefficiente di ripartizione olio/acqua. Questi carriers hanno una ben definita capacità, per cui il trasporto è saturabile; inoltre essi riconoscono una specifica stereospecificità (Oldendorf, 1973). In ogni caso, questi carriers intervengono anche verso molecole che possiedono caratteristiche fisico-chimiche idonee ad un passaggio transmembrana; in questo caso, una parte del trasporto attraverso la barriera ematoencefalica è, come nel caso dell'amfetamina, parzialmente saturabile (Pardridge e Connor, 1973).

La impermeabilità della barriera ematoencefalica ai neurotrasmettitori impedisce l'innalzamento dei livelli cerebrali di dopamina in seguito alla somministrazione sistemica della stessa; il suo percorso, la L - dopa, malgrado l'alta capacità a contrarre legami idrogeno, penetra facilmente attraverso la BEE in virtù della sua affinità per il sistema di trasporto per gli aminoacidi neutri. Il sistema dopaminergico cerebrale decarbossila poi la L - dopa a dopamina. Analogamente, alcuni derivati lipofilici della dopamina possono facilmente permeare la BEE e quindi, dopo rimozione nel cervello dei gruppi lipofili, danno origine a dopamina mediante i processi di deacilazione che sono ubiquitariamente presenti. L'introduzione di precursori (come la L - dopa) tende a determinare una distribuzione selettiva di dopamina nelle usuali aree cerebrali (gangli della base) dove è presente il sistema dopaminergico. Di converso, la latentiation della dopamanina (mediante aciderivati lipofilici) tende a determinare una ubiquitaria distribuzione cerebrale della dopamina; la latentiation sarà utile nei casi in cui il sistema dopaminergico ha perso le sue capacità decarbossilative, per cui non sarebbe possibile la conversione di L - dopa in dopamina.

3.2. Farmaci e condizioni vascolo-metaboliche cerebrali

Tra i farmaci capaci di agire sulla circolazione cerebrale sono da considerare le *xantine*; esistono, tuttavia, alcuni dubbi se le xantine debbano essere incluse tra le sostanze che influenzano la circolazione cerebrale attraverso meccanismi miotropi. Il ben noto effetto stimolante delle xantine (teofillina e caffea) sul sistema

nervoso centrale potrebbe in parte spiegare la loro azione cerebro-vascolare nell'uomo, mentre i cambiamenti dell'emonidinamica cerebrale, osservati in animali da esperimento, sono chiaramente correlati all'azione miotropica di queste sostanze. I dati sperimentali, ottenuti con ricerche su differenti specie *animali* e con differenti tecniche, mostrano che teofillina e caffeaina causano una vasodilatazione cerebrale. Perciò, la somministrazione intravenosa (3-30 mg/kg) o intraarteriosa (0,5-5 mg/kg) di caffeaina porta ad un aumento del volume cerebrale (Roy e Sherrington, 1890; Bouckaert e Jourdan, 1936; Koopmans, 1939), della pressione del liquido cerebrospinale (Finesinger, 1932; Norcross, 1938), del flusso ematico delle arterie carotidi interne e vertebrali (Keller, 1930; Finesinger e Putnam, 1933; Dumke e Schmidt, 1943), del diametro delle principali arterie intracraniali (Van Den Bergh, 1956), del flusso corticale (Norcross, 1938; Lubsen, 1941). L'ipotensione arteriosa sistemica indotta dalla iniezione endovenosa di caffeaina riduce gli effetti della vasodilatazione del cervello; in alcuni casi, solo la somministrazione intraarteriosa di caffeaina aumenta il flusso sanguigno cerebrale (Gottstein, 1962). Solo in pochi casi è stato riportato che le xantine riducono il flusso cerebrale ma, dal momento che inducono una caduta della pressione sanguigna, non vi è alcuna evidenza definita di una costrizione dei vasi del cervello da parte di queste sostanze.

I rilievi nell'*uomo* evidenziano che le xantine hanno una chiara azione vasocostrittrice (Shenkin, 1951; Moyer et al., 1952; Wechsler et al., 1950; Gottstein, 1962), contrariamente a quanto prima descritto per gli animali da esperimento a livello cerebrale. Comunque, l'effetto più importante indotto dalle xantine nell'uomo, è la riduzione del flusso cerebrale, mentre la pressione sanguigna, tranne che nell'ipertensione arteriosa, rimane inalterata (Wechsler et al., 1950).

Si ritiene in genere che le xantine possano causare nell'uomo anche una vasocostrizione periferica stimolando i centri vasomotori simpatici: bisogna osservare che le ricerche effettuate sull'azione cerebrovascolare delle xantine suscitano numerosi problemi per la considerevole differenza tra dati clinici e quelli sperimentali, anche se paragoniamo risultati ottenuti con lo stesso metodo. E' probabile, quindi, che, oltre a possibili differenze specifiche, l'uso dell'anestesia negli studi sugli animali sia responsabile di queste differenze nelle azioni: ciò suggerisce una possibile partecipazione dei meccanismi centrali nelle risposte cerebrovascolari a queste sostanze.

In ogni caso, la mancanza di una dimostrata influenza dei centri vasomotori sulla circolazione cerebrale porta a considerare poco probabile che essi siano coinvolti nell'induzione della vasocostrizione cerebrale nell'uomo: è quindi più realistico pensare ad una azione diretta delle xantine sui vasi cerebrali. Tale azione ha la caratteristica di essere selettiva a livello cerebrale e di essere più costante di quella dei mediatori simpatici.

Per quanto riguarda l'*acido nicotinico*, studi angiografici nel cane (Van Den Bergh, 1956) hanno dimostrato un incremento del diametro dei vasi cerebrali,

a seguito di somministrazione intracarotidea (2 mg/kg): un simile effetto è stato descritto nell'uomo (Pratesi et al., 1959). Tuttavia tali effetti vasodilatatori non sembrano associati a variazioni del flusso cerebrale (Scheinberg, 1950) o del consumo cerebrale di O₂ (Loman et al., 1941; Roseman et al., 1946).

Alcuni effetti di un'altra nota sostanza, la *papaverina*, sono generalmente considerati come mediati dai recettori muscolari: l'effetto dilatatore della papaverina sui vasi cerebrali è dei più durevoli che si possano ottenere con farmaci ed è sostenuto da un gran numero di dati sperimentali. Un aumento del flusso cerebrale dopo iniezione intravenosa (1-10 mg/kg) o intraarteriosa (0,05-0,5 mg/kg) di papaverina è stato dimostrato da esperimenti di perfusione (Bouckaert e Jourdan, 1936; Karlsberg et al., 1963); un aumento di calibro dei vasi del cervello è stato osservato per mezzo di angiografia cerebrale (Van Den Bergh, 1956). Alcune ricerche (Betz e Schmahal, 1966) hanno studiato gli effetti della papaverina sulla circolazione in aree corticali simmetriche, con occlusione di un'arteria carotide; se l'occlusione non causa alcun cambiamento permanente nel flusso sanguigno corticale omolaterale, l'aumento del flusso sanguigno indotto dalla papaverina è identico nelle due aree; se invece l'occlusione causa una diminuzione flussimetrica persistente, l'effetto della papaverina è ridotto su questo lato proporzionalmente alla riduzione di flusso.

Studi condotti sull'azione vascolare periferica del *dipiridamolo* hanno mostrato un intenso effetto vasodilatatorio nei confronti della circolazione miocardica, ma non di quella cerebrale (Betz et al., 1961). La vasodilatazione coronarica causata dal dipiridamolo è stata spiegata col fatto che la sostanza inibisce la degradazione enzimatica dell'ATP, di cui è ben nota l'azione vasodilatatoria nei confronti dei vasi miocardici (Miura et al., 1967; Afonso e O'Brien, 1967). Non è chiaro, invece, l'effetto dei derivati fosforilati della adenosina sui vasi sanguigni cerebrali, e se ne sono dedotte conclusioni contrastanti.

Per quanto riguarda gli effetti delle *catecolamine* (adrenalina, nor-adrenalin) a livello cerebrale, esse sono il risultato di due opposte azioni (Bouckaert e Jourdan, 1936): una, legata all'effetto vasocostrittorio, tende a ridurre il flusso cerebrale; l'altra, legata agli effetti ipertensivi, tende ad aumentare passivamente il flusso. Infatti, una riduzione di flusso è stata osservata dopo somministrazione intraarteriosa delle due amine, somministrazione che comporta piccole alterazioni pressorie; molto più frequentemente si è ottenuto un aumento di flusso dopo iniezione endovenosa, che innalza molto la pressione arteriosa sistemica media.

I mediatori adrenergici possono anche influenzare la circolazione cerebrale indirettamente, attraverso una azione primaria sulla funzionalità e sulla attività metabolica del S.N.C. L'acidosi, l'iperkapnia e l'ipossia attenuano o anche sopprimono interamente il meccanismo dell'autoregolazione cerebrale, come pure gli effetti vasocostrittori e cardiostimolanti delle catecolamine (Bendixen et al., 1963; Wood et al., 1963; Bygeman, 1966). Ciò potrebbe confermare la teoria che le risposte vasocostrittorie cerebrali alle catecolamine non siano dovute ad una azione diretta sui vasi da parte di queste, ma siano la conseguenza di una reazione autoregolatoria,

che tende a compensare l'ipertensione arteriosa indotta da tali mediatori (Fog, 1939). Tale interpretazione è avvalorata da recenti studi (Rosenblum et al., 1966; Greenfield e Tindall, 1968; Bienmüller e Betz, 1970) che hanno mostrato come l'aumento passivo di flusso, indotto da nor-adrenalina, sia accompagnato, e quindi limitato, da un aumento della resistenza cerebrovascolare; tale aumento è correlato ad un aumento del pH corticale. Quindi l'incremento della resistenza cerebrovascolare, indotto dalla nor-adrenalina, sarebbe la conseguenza di una reazione auto-regolatoria attivata dall'alcalosi corticale. Le catecolamine intervengono inoltre nel metabolismo glucidico mediante l'attivazione dell'enzima fosforilasi che, passando da una forma b (dimero inattivo) alla forma a (tetramero attivo) consente la fosforilazione del glucosio, partendo da glicogeno e da ATP, e quindi il suo utilizzo. Questa attivazione è mediata da un altro enzima, la fosforilasi-b-cinasi, che si trova anch'esso in forma inattiva e che, per passare alla forma attivata, richiede la presenza di AMP-3'-5'-ciclico, la cui sintesi è appunto catalizzata dalle catecolamine e dall'adenilico-ciclasi.

Per quanto riguarda le interferenze tra l'azione farmacologica sul metabolismo energetico cerebrale e l'azione vasodilatatrice cerebrale di diverse sostanze, generalmente chiamate « agenti vasoattivi centrali o periferici », va osservato che non esistono relazioni dirette fra l'azione dei farmaci sui vasi cerebrali e le loro azioni sul metabolismo cerebrale. Possiamo considerare, per esempio, la papaverina: l'aumento di flusso sanguigno cerebrale indotto da questa sostanza è fra i più efficaci che si possano ottenere con farmaci vasodilatatori (Meyer et al., 1964; Handa et al., 1966; Betz et al., 1966; Carpi e Giardini, 1972); tuttavia la papaverina non tende a modificare il metabolismo energetico cerebrale, sia nello stato di controllo, sia nell'ipossia, sia nel recupero post-ipossiatico (Benzi, 1974). Ancora più interessanti sono i dati riguardanti la *bemegride*, analettico bulbo-mesencefalico di cui è ben nota l'azione vasodilatatrice cerebrale (Meyer et al., 1967); malgrado ciò la bemegride peggiora lo stato energetico cerebrale in tutte le condizioni sperimentali sopracitate (Benzi et al., 1972; 1973). La *nicergolina* al contrario facilita significativamente il recupero post-ipossico (Benzi et al., 1972; 1973) ed il recupero post-ischemico (Suchowski e Pegassi, 1974), pur esercitando solo una moderata attività vasodilatatrice cerebrale (Maiolo et al., 1972); d'altra parte il dipiridamolo, pur essendo favorente il recupero dello stato energetico cerebrale in condizioni post-ipossiche (Benzi et al., 1973), in realtà non ha alcuna azione sul flusso sanguigno cerebrale (Betz et al., 1961).

Si può pertanto concludere che l'effetto farmacologico sui vasi cerebrali e quello sul metabolismo cerebrale non debbono essere considerati necessariamente interdipendenti; ne consegue che le caratteristiche di « vaso-attivo » o di « vasodilatatore » di un farmaco non implicano affatto una sua capacità ad interferire positivamente con il metabolismo energetico cerebrale.

Relativamente alla capacità dei farmaci di influenzare positivamente il metabolismo energetico cerebrale modificato da condizioni fisio-patologiche (quale è la ipossia cerebrale spinta), si può rilevare che tranne la bemegride (che esercita

però sempre un'azione negativa) il campo d'azione dei farmaci non è per la verità molto vasto; in particolare essi difficilmente riescono ad esercitare un'azione favorevole durante l'ipossia. In compenso sembra esserci una prospettiva più favorevole relativamente alla capacità di questi farmaci di favorire il recupero energetico durante il periodo post-ipossico. Non si può dimenticare però che quando questa azione è presente essa è glucosio- ed ossigeno-dipendente (Benzi et al., 1973).

Nel complesso delle varie situazioni biochimiche, fisiologiche e farmacologiche esposte si evidenzia come i fenomeni bioenergetici cerebrali abbiano delle caratteristiche assai definite che, pur dipendendo dallo stato organismico generale, si articolano su fenomeni autoregolativi ben specifici. Si è rilevato dal contesto dei dati esposti che la condizione prestativa modifica alcuni parametri generali (pO_2 , pCO_2 , pH, metaboliti, ecc.) che influenzano indirettamente la funzione cerebrale; d'altra parte la condizione prestativa sembra agire anche direttamente sul metabolismo cerebrale.

Si deve pertanto concludere che lo studio di tale metabolismo cerebrale deve essere considerato estremamente importante nell'ambito della prestazione atletica: d'altra parte già da tempo tecnici ed allenatori hanno considerato il metabolismo e la funzionalità cerebrali come uno dei fattori limitanti la prestazione stessa. Va infine rilevato che la funzionalità cerebrale è modificata in via indiretta dalle variazioni che l'evento prestativo induce sullo stato bioenergetico, biofisico e biochimico del compartimento muscolare; le varie specialità atletiche fanno tuttavia riferimento a meccanismi differenziati ed interdipendenti che inducono variazioni muscolari diverse per qualità e quantità. Ciò determina una notevole varietà di influenze indirette sul tessuto cerebrale, di cui verrà fatta trattazione in un successivo volume dei presenti *Progressi in Biologia dello Sport* dove, d'altra parte, verrà dato anche rilievo all'altra faccia degli interventi nervosi in fase prestativa, ossia a quelli legati alla *psicologia* ed alla condizione psico-fisica, di cui qui non si è volutamente fatto alcun cenno.