

eq 2 v  
P.105

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH



# NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM X

1972

ZESZ. 1

---

WARSZAWA

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom X

Styczeń—Marzec 1972

Nr 1

## KOMITET REDAKCYJNY

*Maria Dąmbska* (Warszawa), *Jerzy Dymecki* (Pruszków), *Andrzej Głuszczyk* (Łódź),  
*Janusz Groniowski* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Miroslaw Mossakowski*  
(Warszawa), *Ewa Osetowska* (Warszawa), *Stanislaw Stefanko* (Kraków), *Mieczyslaw*  
*Wender* (Poznań), *Irmína Zelman* (Warszawa).

## Przy współpracy

*Iudo van Bogaert* (Antwerpia), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs),  
*William H. McMenemey* (Londyn), *Franz Seitelberger* (Wiedeń), *Istvan Tariska*  
(Budapeszt)

## REDAKCJA

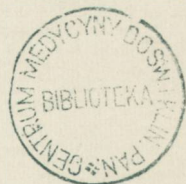
Redaktor Naczelny: *Miroslaw Mossakowski*  
Redaktor Działu Neuropatologii: *Ewa Osetowska*  
Redaktor Działu Ultrastruktury OUN: *Janusz Groniowski*  
Redaktor Działu Neuroonkologii: *Adam Kunicki*  
Redaktor Działu Neurochemii: *Mieczyslaw Wender*  
Sekretarz Redakcji: *Irmína Zelman*  
Sekretarz techniczny: *Władysława Smolińska*

## ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk  
Warszawa, ul. Dworkowa 3, tel. 45-56-76.

## Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



MIROSLAW KOZIK

## DOSWIADCZALNY OBRZEK NEURONU W SWIETLE BADAŃ HISTOENZYMATYCZNYCH

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów  
Zmysłów AM w Poznaniu  
Kierownik: doc. dr habil. M. Kozik

Zagadnienie patomechanizmu obrzęku komórki nerwowej stanowi od lat przedmiot intensywne badań. Doprowadziły one do ujawnienia różnorodnych opinii dotyczących mechanizmu prowadzącego do obrzęku komórki nerwowej, ale nie wyjaśniły ostatecznie istoty tego procesu.

W tym stanie rzeczy wydaje się celowe podjęcie badań doświadczalnych nad ostrym schorzeniem komórki nerwowej, zakładając, że szersze zastosowanie współczesnych metod histoenzymatycznych może przyczynić się do bliższego poznania mechanizmu patogenetycznego tych zmian.

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 78 szczurach szczepu Wistar, dojrzałych płciowo samicach i samcach, o ciężarze ciała od 150 do 170 g. Grupę kontrolną stanowiło 10 szczurów. W celu wytworzenia ostrego obrzęku komórki nerwowej 59 szczurów poddano jednorazowemu działaniu promieni jonizujących skierowanych prostopadle na czaszkę w dawce powierzchniowej wynoszącej 40.000 r. Do doświadczeń użyto aparat rentgenowski Medicor Thx produkcji węgierskiej, przy zastosowaniu filtra aluminiowego grubości 1,3 mm, napięcia 250 KV i natężenia 15 mA oraz odległości ogniskowej wynoszącej 18 cm. Moc dawki określano za pomocą komory jonizacyjnej firmy Siemens. W czasie napromieniania szczur znajdował się w pojemniku zbudowanym z rury metalowej zakończonej z jednej strony szklanym stożkiem, w którym znajdowała się głowa zwierzęcia. Cały pojemnik poza częścią, w której znajdowała się głowa, okładano podczas napromieniania ołowiem. Po upływie od 16 do 20 godzin od chwili napromieniania szczury uśmiercano i pobierano

mózgowie do badań mikroskopowych. Przez dekapitację uśmiercono 48 zwierząt, zaś 11 drogą perfuzji dosercowej płynu Bakera o temp. 37°C, po uprzednim przepłukaniu układu naczyniowego roztworem 0,85% chlorku sodu o temp. 37°C.

U 19 szczurów ostry obrzęk neuronu wytworzono przez dootrzewnowe wstrzyknięcie siarczanu trójetylku cyny (TET) w dawce 4 mg na 1 kg ciężaru ciała. Używano 0,1% roztwór TET w soli fizjologicznej. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację, część po upływie 6 godzin od chwili iniekcji dootrzewnej TET, pozostałe po upływie 12 godzin. Do badań histologicznych i histochemicznych pobierano mózgowie.

Aktywność dehydrogenaz badano na skrawkach nieutrwalonych grubości 10  $\mu$ , ciętych w kriostacie. Fosfatazy i esterazy badano na skrawkach mrożonych po utrwaleniu materiału w płynie Bakera (1944). Część materiału po utrwaleniu w płynie Carnoya (1948) zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe barwiono met. Nissla (1894) w modyfikacji własnej (1964), a ponadto wykonano reakcję PAS wg metody Hotsch-kissa (1948) i wykrywano glikogen przy pomocy reakcji dimedon-PAS (Zülch 1959).

Ocenę aktywności enzymatycznej przeprowadzono dla:

1. Dehydrogenazy  $\alpha$ -glicerofosforanowej (Oksyreduktaza L-glicero-3-fosforan: NAD — E.C. 1.1.1.9). Metoda Pearse'a (1961).
2. Dehydrogenazy mleczanowej (Oksyreduktaza L-mleczan: NAD — E.C. 1.1.1.27).
3. Dehydrogenazy  $\beta$ -hydroksymaślanowej (Oksyreduktaza D-3-hydroksymaślan: NAD — E.C. 1.1.1.30).
4. Dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej (Oksyreduktaza D-glikozo-6-fosforan: NAD — E.C. 1.1.1.49).
5. Dehydrogenazy bursztynianowej (Oksyreduktaza bursztynian: akceptor — E.C. 1.3.99.1).
6. Reduktazy tetrazolowej NADPH<sub>2</sub> (Oksyreduktaza zredukowany NADP: akceptor — E.C. 1.6.99.1).
7. Reduktazy tetrazolowej NADH<sub>2</sub> (Oksyreduktaza zredukowany NAD: akceptor — E.C. 1.6.99.3).

(Badania aktywności enzymatycznej pkt. 1 — 7 wg Pearse'a 1962).

8. Esteraz niespecyficznych (ns.E). (Hydrolaza estrów karboksylowych — E. C. 3.1.1.1.). Metoda Nachlasy i Seligmanna (1949).
9. Acetylocholinesterazy — AChE (Acetylohydrolaza acetylocholinowa — E.C. 3.1.1.7). Metoda Koelle w modyfikacji Gerebtzoffa (1953).
10. Cholinesteraz niespecyficznych — ns. ChE (Acylo-hydrolaza-acylocholinowa — E.C. 3.1.1.8). Metoda Koelle w modyfikacji Gerebtzoffa (1953).

11. Tiaminowej pyrofosfatazy — TPP-aza (Pyrofosforylaza tiaminofosforan — E.C. 2.5.1.3). Metoda Novikoffa i Goldfischera (1961).

12. Fosfatazy zasadowej — FZ (Fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych — E.C. 3.1.3.1). Metoda Gomoriego (1953).

13. Fosfatazy kwaśnej — FK (Fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych — E.C. 3.1.3.2). Metoda Gomoriego (1953).

14. Adenozynotrójfosfatazy — ATP-aza (Fosfohydrolaza ATP — E.C. 3.6.1.3). Metoda Wachsteina i Meisela (1957).

15. 5'-nukleotyduzy — 5'NDaza (Fosfohydrolaza 5'-rybonukleotyduwa — E.C. 3.1.3.5). Metoda Gomoriego (1953).

16. Dwufosfatazy nukleozyduowej — NDPaza (Fosfohydrolaza nukleozodwufosforanu — E.C. 3.6.1.6). Metoda Lazarusa i Bardena (1962).

17. Sulfatazy arylowej — ASS (Sulfohydrolaza arylosiarczanowa — E.C. 3.1.6.1.). Metoda Rutenberga, Cohena i Seligmanna (1952).

Ponadto przeprowadzono ocenę syntezy białek i kwasów nukleinowych w zmienionych doświadczalnie neurocytach, wstrzykując szczerom znakowane izotopami radioaktywnymi aminokwasy oraz zasady purynowe i pirymidynowe.

Inkorporację znakowanych izotopami związków badano metodą autoradiograficzną (Rogers 1967) posługując się emulsją płynną NTB-3 firmy Kodak. Do badań autoradiograficznych użyto następujące związki znakowane izotopami promieniotwórczymi, które wstrzykiwano zwierzętom dożylnie na 1 godz. przed ich uśmierceniem.

|  |                      |                          |
|--|----------------------|--------------------------|
| DL-fenylalanina $^{14}\text{C}$          | — $2\mu\text{Ci/g}$  | — czas ekspozycji 10 dni |
| Glicyna- $2\text{-C}^{14}$               | — $1\mu\text{Ci/g}$  | — czas ekspozycji 10 dni |
| DL-leucyna- $1\text{-}^{14}\text{C}$     | — $1\text{mCi}$      | — czas ekspozycji 14 dni |
| Adenina- $2,8\text{-}^3\text{H}$         | — $10\mu\text{Ci}$   | — czas ekspozycji 21 dni |
| Tymidyna- $6\text{-T}$ (u)- $^3\text{H}$ | — $10\mu\text{Ci/g}$ | — czas ekspozycji 21 dni |

## WYNIKI

### *Barwienie błękitem toluidyny*

Ostry obrzęk komórki nerwowej zarówno kory jak i jąder podkorowych charakteryzuje zaokrąglenie zarysów jej cytoplazmy, przy znacznym zredukowaniu substancji chromatofilnej, dzięki czemu przyjmuje ona bladoniebieskie zabarwienie (ryc. 1). Neurocyty te wykazują jednocześnie znaczny obrzęk dendrytów i wyraźne ujawnienie się cylindra osiowego w formie charakterystycznej dzidowatej wypustki. Również część jąder neurocytów ulega obrzękowi i przyjmuje kształt zaokrągły oraz niebiesko-matowe podbarwienie. W wielu miejscach widoczne

są przylegające do ciała neuronu drobne zasadochłonne substancje tzw. inkrustacje sieci Golgiego oraz podziały komórek glejowych. Tego rodzaju zmiany neuronalne uzyskano zarówno w wyniku napromieniania mózgowia promieniami X jak i w następstwie wstrzyknięcia TET.

**Reakcja PAS.** W przebiegu ostrego obrzęku wywołanego działaniem promieni jonizujących nie stwierdza się obecności ziaren PAS-dodatnich zarówno w cytoplazmie komórek nerwowych jak i glejowych. Silnie dodatnia reakcja PAS widoczna jest natomiast w neuropilu kory mózgu (ryc. 2). W obrzęku wywołanym zatruciem TET pojawiają się ziarna PAS-dodatnie jedynie w cytoplazmie oligodendrocytów istoty białej. Komórki nerwowe jak i pozostałe komórki glejowe po iniekcji dootrzewnowej TET są PAS-ujemne.

**Glikogen.** Zarówno przy użyciu karminu Besta jak i po zastosowaniu metody PAS-dimedon nie udało się wykazać obecności ziaren glikogenu w komórkach nerwowych ze zmianami typu ostrego schorzenia. Pojedyncze ziarna glikogenu stwierdzono tylko w oligodendrocytach w następstwie zatrucia TET.

**Dehydrogenaza  $\alpha$ -Glicerofosforanowa.** Aktywność tego enzymu u zwierząt kontrolnych występuje w neuropilu kory mózgowej i jąder podstawy mózgu. Neurocyty poza niektórymi jądrami podwzgórze nie przejawiają aktywności dehydrogenazy  $\alpha$ -glicerofosforanowej. Również włókna zmielinizowane nie wykazują aktywności enzymatycznej.

W przebiegu ostrego obrzęku mózgu obserwuje się spadek aktywności dehydrogenazy  $\alpha$ -glicerofosforanowej w neuropilu kory mózgu, podczas gdy w neuropilu jąder podstawy mózgu aktywność tej dehydrogenazy pozostaje niezmieniona. Ciało neuronu o cechach morfologicznych schorzenia ostrego, podobnie jak w warunkach prawidłowych, nie przejawia aktywności dehydrogenazy  $\alpha$ -glicerofosforanowej.

**Dehydrogenaza mleczanowa.** W warunkach prawidłowych obserwuje się średniego stopnia aktywność dehydrogenazy mleczanowej w neuropilu istoty szarej. Nie wykazują odczynu enzymatycznego neurocyty, komórki glejowe oraz włókna mielinowe.

W ostrym obrzęku mózgu spostrzega się uogólniony spadek aktywności dehydrogenazy mleczanowej w neuropilu kory mózgowej i w neuropilu jąder podstawy. Zmienione obrzękowo neurocyty nie wykazują odczynu enzymatycznego.

**Dehydrogenaza  $\beta$ -hydroksymaślanowa.** W grupie kontrolnej lokalizacja aktywności dehydrogenazy  $\beta$ -hydroksymaślanowej odpowiada rozmieszczeniu dehydrogenazy mleczanowej. Również nasilenie odczynu jest średnie.

Podczas ostrego obrzęku mózgu pojawia się nieznaczny stopień dyfuzyjny odczyn w ścianach niektórych naczyń krwionośnych istoty szarej. Neurocyty o cechach ostrego obrzęku nie wykazują aktywności dehydrogenazy  $\beta$ -hydroksymaślanowej.

**Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa.** Lokalizacja aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w grupie zwierząt kontrolnych jest nieco inna niż opisanych dotąd enzymów oddechowych. Poza silną aktywnością tego enzymu w neuropilu kory mózgowej i jąder podstawy, obserwuje się także drobnoziarniste produkty reakcji w cytoplazmie niektórych neurocytów kory mózgu. Pewna ilość naczyń krwionośnych wykazuje również dodatni odczyn.

W przebiegu ostrego obrzęku zwraca uwagę wzrost aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w korze mózgu. Wzrost aktywności enzymu obserwuje się zarówno w neurocytach dotkniętych schorzeniem ostrym jak i w ścianach naczyń krwionośnych (ryc. 3). W neuropilu prążkowiec prawdopodobnie dochodzi także do wzrostu aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej. Odczyn na ten enzym pojawia się także w wielu oligodendrocytach, szczególnie w obrębie spoidła wielkiego i spoidła przedniego mózgu.

**Dehydrogenaza bursztynianowa.** U szczurów kontrolnych umiarkowana aktywność tego enzymu występuje w obrębie neuropilu kory mózgowej oraz w pojedynczych neurocytach. W prążkowiec natomiast i wzgórzu wzrokowym aktywność dehydrogenazy bursztynianowej można wykazać tylko w neuropilu. Ponadto słaby dyfuzyjny odczyn obserwuje się we włóknach torebki wewnętrznej oraz w spoidle przednim, w przeciwieństwie do braku aktywności w spoidle wielkim.

W schorzeniu ostrym neurocytów obserwuje się wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Wzrost ten jest widoczny szczególnie w neurocytach II warstwy kory mózgowej. Również w niektórych obrzękniętych neurocytach prążkowiec uwidacznia się aktywność badanego enzymu.

**Reduktaza tetrazolowa  $\text{NADPH}_2$ .** W prawidłowych warunkach aktywność reduktazy tetrazolowej koenzymu II jest bardzo silna w neuropilu kory mózgowej, w neuropilu jąder podstawy i w splocie naczyniastym komór. Aktywność enzymatyczną przejawiają również niektóre neurocyty jąder podwzgórza. Komórki nerwowe kory mózgu, prążkowiec, gałki bladej i wzgórza wzrokowego nie wykazują aktywności reduktazy tetrazolowej  $\text{NADPH}_2$ .

W doświadczalnie wywołanym obrzęku mózgu widoczny jest wyraźny spadek aktywności enzymatycznej w neuropilu kory mózgu, prążkowiec i jąder podstawy. Pojawia się natomiast w tych warunkach dość znaczna

aktywność w komórkach piramidowych rogu Ammona i nieco mniejsza w komórkach opaski zębatej. Neurocyty kory mózgu i jąder podstawy nie wykazują aktywności enzymatycznej.

**Reduktaza tetrazolowa  $\text{NADH}_2$ .** W warunkach prawidłowych stopień aktywności i rozmieszczenie tego enzymu odpowiada na ogół zachowaniu się reduktazy tetrazolowej  $\text{NADPH}_2$ . Widoczne jest jednak występowanie średniej aktywności enzymatycznej w ścianach niektórych naczyń krwionośnych, głównie tętniczych.

W warunkach obrzęku obserwuje się wyraźny spadek aktywności reduktazy tetrazolowej  $\text{NADH}_2$  w neuropilu kory i niewielki spadek aktywności tego enzymu w neuropilu prądkowia i gałki bladej. Często w przebiegu ostrego schorzenia komórki nerwowej pojawia się aktywność enzymatyczna w wypustkach osiowych wielu neuronów kory mózgu, podczas gdy ciało neuronu nie wykazuje żadnej aktywności. Zjawisko to prowadzi do nieznacznego dyfuzyjnego odczynu w spoidle wielkim, torebce wewnętrznej i innych strukturach istoty białej.

**Esteraza nieswoista.** Zarówno po napromienianiu rtg, jak i po wstrzyknięciu TET obserwuje się wzrost aktywności esterazy nieswoistej (ryc. 4) w neurocytach warstwy ziarnistej zewnętrznej oraz w neurocytach części bocznej wężomózgowia. W pozostałych neurocytach kory mózgu oraz w komórkach nerwowych zwojów podstawy nie zaobserwowano zmian aktywności tego enzymu w porównaniu z grupą kontrolną.

**Acetylocholinesteraza (AChE).** W przebiegu ostrego obrzęku komórki nerwowej pojawia się w niektórych neurocytach lekki dyfuzyjny odczyn w cytoplazmie (ryc. 5). Zmiany te nie wykazują wybiórczej lokalizacji topicznej. Obserwuje się je w neurocytach wszystkich warstw kory mózgu i gałki bladej oraz wzgórza wzrokowego. Jedynie u części zwierząt po zastosowaniu promieni X udało się stwierdzić nieco większy wzrost aktywności AChE w części bocznej wężomózgowia.

**Cholinesteraza nieswoista. (ns. ChE).** W warunkach prawidłowych aktywność ChE występuje przede wszystkim w ścianach naczyń krwionośnych (ryc. 6). Spośród komórek nerwowych silną aktywność ChE przejawiają neurocyty przegrody przezroczystej oraz neurocyty niektórych jąder wzgórza wzrokowego. Pozostałe komórki nerwowe zwojów podstawy i kory mózgu nie wykazują aktywności tego enzymu. W badaniach niniejszych nie stwierdzono różnic w aktywności ChE pomiędzy grupą kontrolną a obydwoma grupami doświadczalnymi.

**Tiaminowa pyrofosfataza (TPP-aza).** W neurocytach ulegających ostremu obrzękowi pod wpływem działania promieni X obniża się wyraźnie aktywność TPPazy. Zupełnie inaczej zachowuje się odczyn na TPPazę w ostrym obrzęku komórek nerwowych spowodowanym



iniekcją TET. W tych warunkach doświadczalnych stwierdza się wzrost aktywności TPPazy w niektórych neurocytach, zwłaszcza w III i IV warstwie kory mózgu. Obserwuje się tu wyraźne obrzmienie struktur aparatu Golgiego, który zatracą swoją pęcherzykowo-blaszkowatą budowę, dając dyfuzyjne podbarwienie całej cytoplazmy. Wzrost aktywności TPPazy w obrzękniętych neurocytach widoczny jest także w rogu Ammona, szczególnie w blaszce końcowej pola  $H_3$  i w komórkach opaski zębatej.

**Fosfataza zasadowa (FZ).** Niektóre neurocyty wykazujące schorzenie ostre wykazują lekki dyfuzyjny odczyn w cytoplazmie (ryc. 7). Miejscami obserwuje się słabą aktywność w jądrach neurocytów. Czasami zarówno cytoplazma jak i jądra obrzękniętych neurocytów wykazują słabą aktywność enzymatyczną. Zmiany tego typu występują głównie w II warstwie kory mózgu oraz w części komórek rogu Ammona, głównie w polu  $H_2$ . Większość komórek nerwowych kory mózgu i jąder podstawy zwierząt doświadczalnych nie wykazuje aktywności fosfatazy zasadowej, podobnie jak w grupie kontrolnej.

**Fosfataza kwaśna (FK).** W ostrym obrzęku neurocytów wywołanym promieniami rtg wyraźnie spada aktywność fosfatazy kwaśnej w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 8, 9). Spadek ten jest szczególnie wyraźny w neurocytach głębszych warstw kory mózgu i neurocytach jąder podstawy. Natomiast w obrzmieniu neurocytów spowodowanym TET widoczny jest wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w komórkach nerwowych dolnych warstw kory, szczególnie w V i VI warstwie (ryc. 10). Wzrasta również w tych warunkach aktywność fosfatazy kwaśnej w obrzękniętych neurocytach prądkowia. W komórkach nerwowych górnych warstw kory mózgu po wstrzyknięciu TET spada aktywność FK, podobnie jak po napromienianiu rtg.

**Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza).** Po napromienieniu zwierząt pojawia się dyfuzyjny odczyn znamieny dla ATPazy w jądrach komórkowych II warstwy kory mózgu (ryc. 11) oraz w jądrach neurocytów zwojów podstawy. W głębszych natomiast warstwach kory pojawia się wyraźna aktywność w przynaczeniowych wypustkach astrogleju, a neurocyty tych warstw mimo wyraźnych cech morfologicznych ostrego obrzęku, nie przejawiają aktywności ATPazy. Aktywność ATPazy w przebiegu ostrego obrzęku neuronu wywołanego TET przedstawia nieco inny obraz: silna aktywność ATPazy pojawia się w jądrach neurocytów wszystkich warstw kory mózgu i jądrach neurocytów zwojów podstawy.

**5'-nukleotydaza (5'NDaza).** W przebiegu ostrego obrzęku tylko pojedyncze neurocyty wykazują lekką dyfuzyjną aktywność w cytoplaz-

mie. Większość zmienionych obrzękowo komórek nerwowych nie przejawia aktywności tego enzymu, zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym. Lekki odczyn widoczny jest natomiast w neuropilu i dość wyraźna aktywność we włóknach istoty białej.

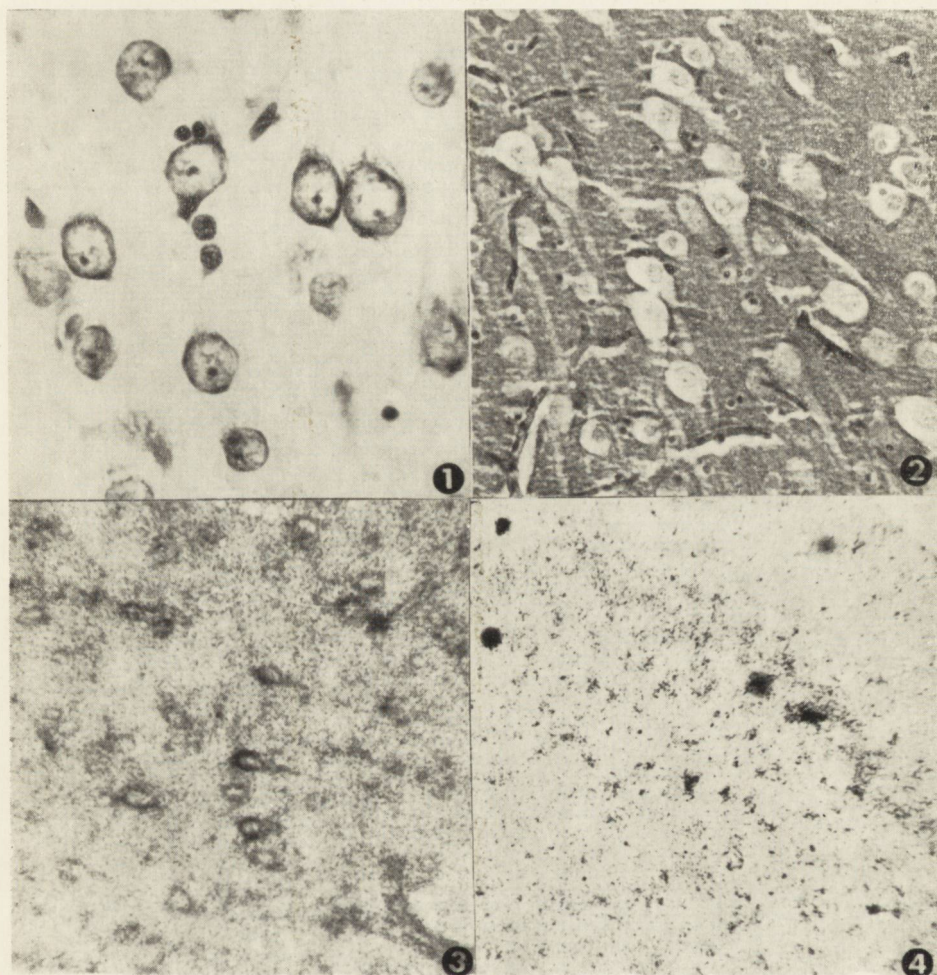
Dwufosfataza nukleozydowa (NDPaza). W przeważającej liczbie komórek o cechach ostrego obrzęku obserwuje się lekkie dyfuzyjne podbarwienie cytoplazmy i niekiedy jąder komórkowych. Często pojawia się także aktywność w przynaczeniowych wypustkach astrogliju w istocie szarej (ryc. 12). W spidle wielkim natomiast i w torebce wewnętrznej widoczna jest aktywność NDPazy w komórkach mikrogliaju. W niektórych zmienionych obrzękowo neurocytach stwierdza się wyraźną aktywność w postaci drobnych ziaren, głównie na obwodzie cytoplazmy, co może odpowiadać położeniu siateczki endoplazmatycznej (ryc. 12). W obrębie prążkowania niekiedy widoczna jest wspomniana siateczka również w obrzękniętych dendrytach. Na uwagę zasługuje tu brak aktywności NDPazy w części bocznej wężomózgowia.

Sulfataza arylowa (ASS). Zarówno w korze mózgu jak i w jądrach podstawy obrzęknięte neurocyty nie wykazują aktywności sulfohydrolazy siarczanów arylowych. Również w grupie zwierząt kontrolnych nie stwierdza się odczynu na ASS w prawidłowych komórkach nerwowych kory mózgu i zwojów podstawy.

Autoradiografia. W przebiegu ostrego obrzęku mózgu dochodzi do silnej inkorporacji znakowanych aminokwasów, zwłaszcza DL-fenylalaniny  $C^{14}$  i glicyny- $C^{14}$  w obrębie neuropilu, zarówno kory jak i jąder podstawy (ryc. 13). Wbudowywanie się DL-leucyny  $C^{14}$  do białek komórek nerwowych jest wyraźnie mniejsze. Niekiedy widać wyraźne nagromadzenie ziaren zredukowanego srebra nad cytoplazmą obrzękniętych komórek nerwowych (ryc. 13). Oba wymienione aminokwasy wbudowują się także do istoty białej, jednak zaczernienie emulsji jest tu wyraźnie mniejsze w porównaniu z istotą szarą. Zwraca również uwagę dość intensywna inkorporacja adeniny  $H^3$  do cytoplazmy obrzękniętych neurocytów (ryc. 14) oraz wielu komórek glijowych. Tymidyna  $H^3$  wbudowuje się tylko do komórek glijowych będących w stanie podziału mitotycznego.

#### OMÓWIENIE

W doświadczalnie wywołanym obrzęku komórki nerwowej występują zmiany aktywności fosfataz i w nieco mniejszym stopniu esteraz oraz niektórych dehydrogenaz. Zmiany aktywności fosfataz, a szczególnie fosfatazy kwaśnej polegają na wzroście względnie spadku aktywności tego



*Ryc. 1.* Ostry obrzęk komórek nerwowych w korze czołowej. Zaokrąglenie kształtu neurocytów, ubytek tigroidu, jednorodne blade podbarwienie cytoplazmy. Widoczny również umiarkowany rozplęm gleju. Barw. błękit toluidyny, pow. 500  $\times$ .  
*Fig. 1.* Acute swelling of nerve cells in frontal cortex. Neurocytes assume rounded shape, tigroid decreases. Cytoplasm has uniform pale colour. Moderate glial proliferation visible. Toluidine blue.  $\times$  500.

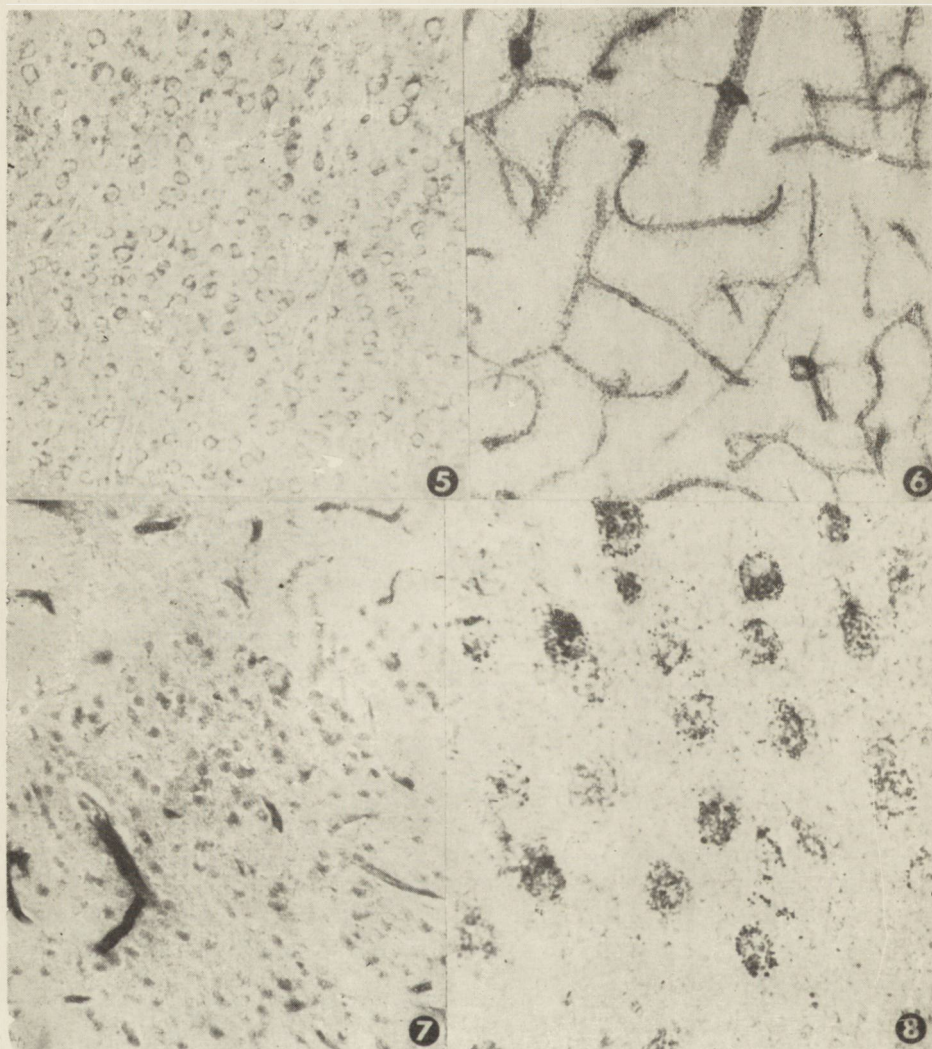
*Ryc. 2.* Reakcja PAS. Wyraźnie dodatni odczyn PAS w neuropilu. Obrzęknięte komórki nerwowe nie zawierają złogów PAS-dodatnich, pow. 200  $\times$ .  
*Fig. 2.* PAS reaction. Distinctly positive reaction in neuropil. Swollen nerve cells do not contain PAS-positive deposits.  $\times$  200.

*Ryc. 3.* Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa. Aktywność w cytoplazmie neurocytów dotkniętych schorzeniem ostrym oraz w ścianie naczynia krwionośnego. Pow. 180  $\times$ .

*Fig. 3.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Activity in cytoplasm of acutely affected neurocytes and in vascular wall.  $\times$  180.

*Ryc. 4.* Wzrost aktywności nieswoistej esterazy w neurocytach bocznej części węchomózgowia. Pow. 70  $\times$ .

*Fig. 4.* Enhanced nonspecific esterase activity in neurocytes of lateral part of rhinencephalon.  $\times$  70.



*Ryc. 5.* Aktywność AChE w cytoplazmie neurocytów kory mózgu w przebiegu ostrego obrzęku wywołanego działaniem promieni jonizujących. Pow. 180  $\times$ .

*Fig. 5.* AChE activity in cytoplasm of cerebral cortex neurocytes in the course of acute swelling due to ionising radiation  $\times 180$ .

*Ryc. 6.* Kora mózgu. Aktywność ChE w ścianach naczyń krwionośnych. Komórki nerwowe i komórki glejowe nie przejawiają aktywności enzymatycznej. Pow. 180  $\times$ .

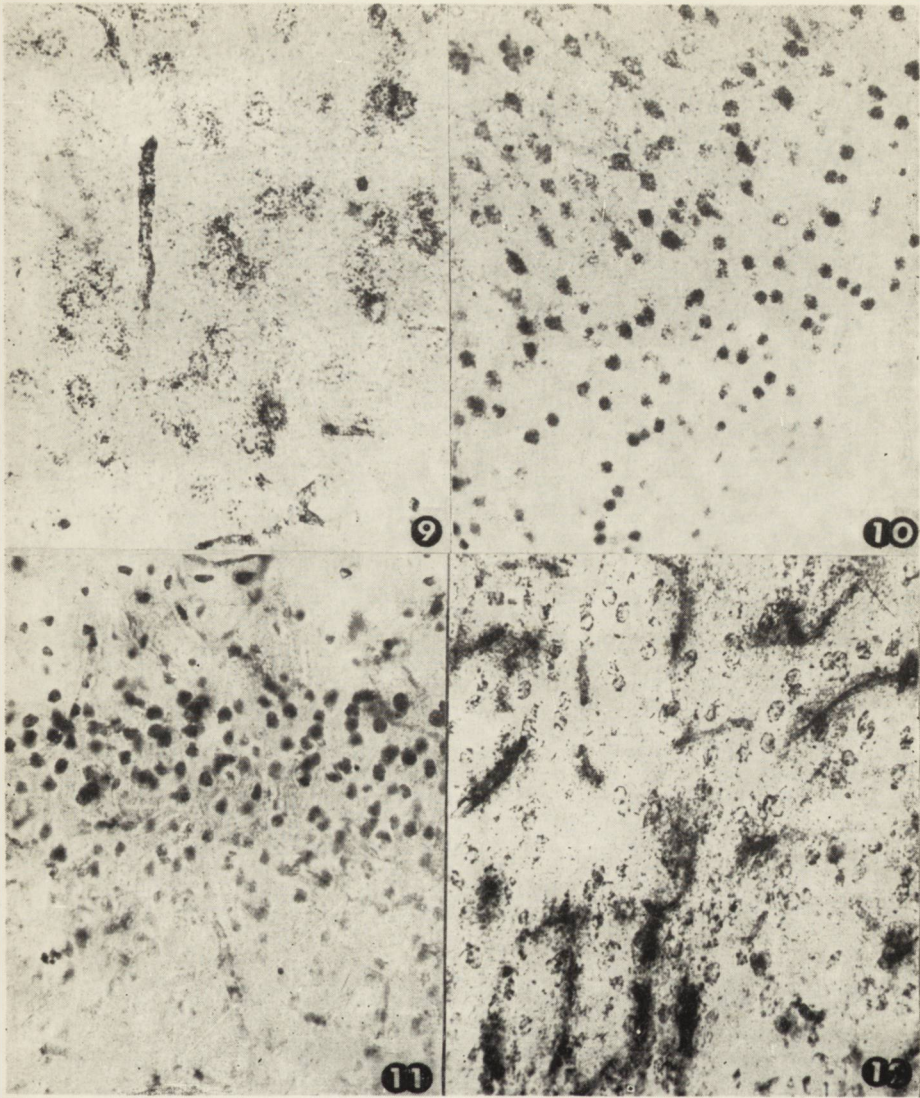
*Fig. 6.* Cerebral cortex. ChE activity in vascular walls. Nerve and glia cells do not show enzymatic activity.  $\times 180$ .

*Ryc. 7.* Neurocyty o typie ostrego schorzenia. Widoczny słaby dyfuzyjny odczyn dla FZ w obrębie ciała neuronu w górnych warstwach kory mózgu. Silna aktywność FZ w naczyniach krwionośnych. Pow. 170  $\times$ .

*Fig. 7.* Acutely affected neurocytes. Weak diffuse reaction for alkaline phosphatase within neurone body in upper layers of cerebral cortex. High alkaline phosphatase activity in blood vessels.  $\times 170$ .

*Ryc. 8.* Grupa kontrolna. Aktywność FK w komórkach nerwowych VI warstwy kory mózgu. Pow. 450  $\times$ .

*Fig. 8.* Control group. Acid phosphatase activity in nerve cells of 6th cerebral cortex layer.  $\times 450$ .



*Ryc. 9.* Spadek aktywności FK w neurocytach VI warstwy kory mózgu po napromienianiu rtg. Pow. 180 X.

*Fig. 9.* Decrease of acid phosphatase activity in neurocytes of 6th cerebral cortex layer after X-ray irradiation. X 180.

*Ryc. 10.* Silny wzrost aktywności FK w VI warstwie kory mózgu po wstrzyknięciu dootrzewnowym TET. Pow. 170 X.

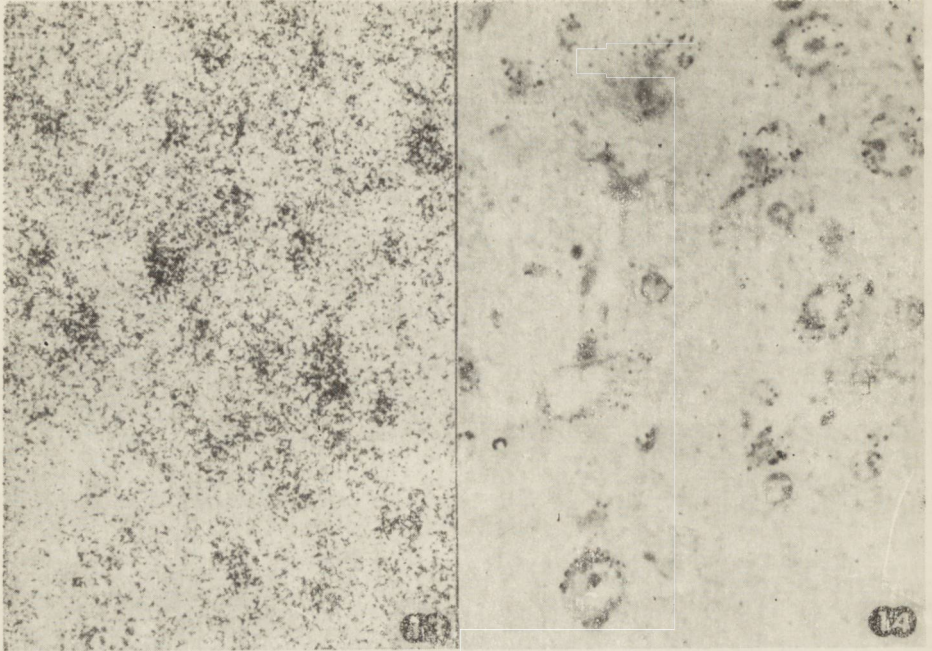
*Fig. 10.* Considerable increase of acid phosphatase activity in neurocytes of 6th cerebral cortex layer after intraperitoneal injection of triethyl tin sulphate. X 170.

*Ryc. 11.* ATPaza. Aktywność w jądrach neurocytów górnych warstw kory mózgu. Pow. 170 X.

*Fig. 11.* ATPase. Activity in neurocyte nuclei in upper cerebral cortex layers. X 170.

*Ryc. 12.* NDPaza. Silna aktywność w przynaczyniowych wypustkach astrogleju i wyraźny odczyn w cytoplazmie obrzękniętych komórek nerwowych. Pow. 170 X.

*Fig. 12.* NDP-ase. High activity in perivascular processes of astroglia and distinct reaction in cytoplasm of swollen nerve cells. X 170.



*Ryc. 13.* DL-feniloalanina C<sup>14</sup>. Silna inkorporacja w obrębie neuropilu kory mózgu z wyraźnym jednak zagęszczeniem ziaren zredukowanego srebra nad cytoplazmą obrzękniętych neurocytów. Autoradiografia, pow. 170 ×.

*Fig. 13.* <sup>14</sup>C-DL-phenylalanine. Intensive isotope incorporation in neuropile of cerebral cortex with distinctly greater accumulation of silver grains over swollen neurocyte cytoplasm. Autoradiography, × 170.

*Ryc. 14.* Adenina H<sup>3</sup>. Inkorporacja w cytoplazmie zmienionych obrzękowo neurocytów. Autoradiografia, pow. 440 ×.

*Fig. 14.* <sup>3</sup>H-adenine. Incorporation in cytoplasm of swollen neurocytes. Autoradiography, × 440.

enzymu. Na podkreślenie zasługuje zjawisko odmiennej reakcji enzymatycznej dla FK zależne od rodzaju czynnika prowadzącego do ostrego obrzmienia komórki nerwowej. W wyniku działania dużej dawki promieni jonizujących obserwowano uogólniony spadek aktywności FK, podczas gdy po podaniu siarczanu trójetylku cyny występowało zwiększenie odczynu dla FK w komórkach nerwowych dolnych warstw kory mózgu i w neurocytach prążkowie. Wyjaśnienie tego zjawiska nie jest łatwe. Może ono jedynie przemawiać za brakiem korelacji pomiędzy identycznymi obrazami morfologicznymi a zmianami cytochemicznymi w neuronie, na co wskazywał już wcześniej Omokorow (1913) i Zischka (1952). Być może spadek aktywności FK w ostrym obrzęku neurocytów wywołanym promieniami rtg spowodowany jest znacznym uszkodzeniem struktur lizosomalnych i nieodwracalnym uszkodzeniem komórek. Mimo pierwotnego poglądu dotyczącego odwracalności ostrego obrzęku komórki nerwowej (Goldscheider, Flatau 1898, Lugaro 1898, Marinesco 1909, 1910, Nissl 1895, 1896, Omokorow 1913) wielu badaczy uważa, że ostry obrzęk może również prowadzić do zagłady komórki nerwowej poprzez procesy lityczne (Jacob 1913, Nissl 1899, 1904, 1910, Ranke 1915, Spielmeier 1913, Zischka 1952).

Wzrost aktywności FK w obrzęku wywołanym TET może być związany z śródcytoplazmatycznym wnikaniem białek w wyniku zaburzeń przepuszczalności błony komórkowej. Za taką interpretacją mogą przemawiać badania Klatzo i Miquela (1960), Raimondi i wsp. (1962), Zollingera (1948, 1948), Fahra (1943) i innych (Klatzo i Miquel 1962, Fonnesu i Severi 1954, Pobjak 1948), którzy w obrzękniętych neurocytach obserwowali wzrost aktywności pinocytarnej i wtórne gromadzenie się białek w lizosomach.

Własne spostrzeżenia (Kozik 1968, 1969) wykazujące zwiększoną inkorporację znakowanych aminokwasów do obrzękniętych neurocytów, głównie DL-feniloalaniny  $C^{14}$  i glicyny- $C^{14}$  oraz w mniejszym stopniu DL-leucyny  $C^{14}$  mogą również przemawiać za taką możliwością.

Intensywniejsze wbudowywanie znakowanych aminokwasów w przebiegu ostrego obrzęku mózgu wydaje się być jednak spowodowane również uszkodzeniem bariery naczyniowo-mózgowej i łatwiejszym przenikaniem aminokwasów do mózgu a nie zwiększoną syntezą białek neuronalnych. Z badań Mase i wsp. (1962) nad wbudowywaniem glicyny  $C^{14}$  do mózgu świnek morskich wynika, że w normalnych warunkach bariera naczyniowo-mózgowa jest mało przepuszczalna dla znakowanych aminokwasów. Zwiększenie przepuszczalności bariery naczyniowo-mózgowej po zastosowaniu dużej dawki promieni jonizujących podwyższa wbudowywanie glicyny  $C^{14}$  w mózgu, zwłaszcza w obrębie istoty szarej.

Obserwacje dotyczące zachowania się aktywności ATPazy i większości dehydrogenaz mogą przemawiać za zakłóceniem procesów utleniania i fosforylacji w ostrym obrzęku komórek nerwowych. Wzrost aktywności ATPazy w wielu obrzękniętych neurocytach przy jednoczesnym spadku aktywności dehydrogenaz może być wykładnikiem zaburzeń w procesie tlenowej fosforylacji. Na zjawisko obniżenia intensywności procesów oddychania w przebiegu ostrego obrzęku komórki nerwowej zwracało już uwagę wielu autorów (Loomis i Lipmann 1948, Pobjak 1948, Simon 1953). Brano pod uwagę także zmiany w zawartości kwasu adenosynotrójfosforowego w tym typie zmian komórkowych (Fonnesu i Severi 1954). Spostrzeżenia te mogą również wskazywać, że w stanie ostrego obrzęku komórka nerwowa traci zdolność zużytkowania tlenu. Zjawisko to określane mianem „oxyachrezji” obserwowali niektórzy autorzy (Lawrence i wsp. 1942, Loomis i Lipmann 1948) podczas badań nad uszkodzeniem mózgu wskutek braku glukozy. Niewątpliwie sam czynnik etiologiczny w postaci siarczanu trójetylku cyny albo promieniowania jonizującego determinuje w pewnym stopniu odczyn histochemiczne. Rozległe badania biochemiczne Wendera i wsp. (1964, 1965, Wender i Waligóra 1962, 1964, Wender i Wenclewski 1964) nad wpływem działania promieni jonizujących na ośrodkowy układ nerwowy zwracają uwagę na złożony mechanizm zakłócenia w tych warunkach szeregu procesów enzymatycznych, gospodarki elektrolitowej, przemiany lipidów, aminokwasów i białek.

Obserwowany w niektórych neurocytach wzrost aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej i dehydrogenazy bursztynianowej może sugerować różny stopień uszkodzenia czynności poszczególnych komórek. Powszechnie przyjmuje się, że aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest związana wybiórczo z mitochondriami (Friede i Pax 1961, Pearse i Hess 1961, Rodriguez De Lores Arnaiz 1962, Scarpelli i Pearse 1958), przeto obserwowany wzrost aktywności tej dehydrogenazy może być następstwem częściowego uszkodzenia pewnej ilości mitochondriów, np. w postaci ich pęcznienia, pęknięcia lub rozerwania. W wyniku zwiększonej w tych warunkach powierzchni mitochondrialnej oraz ułatwionego kontaktu substratu z enzymem może pojawiać się większa aktywność enzymatyczna. Możliwość „pozornego” wzrostu aktywności dehydrogenazy w przebiegu niektórych schorzeń neuronalnych przyjęto we wcześniejszych pracach własnych (Kozik — prace w druku). Być może jednak omawiane zjawisko związane jest z właściwościami samych mitochondriów. Jak wynika bowiem z badań ultrastrukturalnych Söderholm'a (1965) mitochondria w cytoplazmie neuronów ruchowych są większe i mniej spiste niż mitochondria w neuropilu. Różnice zatem w budowie mitochondriów mogą również wa-



runkować, ich odmienne reakcje na działanie określonych czynników szkodliwych.

Niezależnie od interpretacji obserwowanych zmian cytoenzymatycznych można wysunąć przypuszczenie, że mechanizm patogenetyczny ostrego obrzęku komórki nerwowej w poszczególnych okolicach topograficznych mózgu nie jest jednolity. Mimo podobieństwa morfologicznego zmienionych komórek w obrazie Nissla, procesy prowadzące do tych zmian mogą być więc różne. Mechanizm patogenetyczny ostrego schorzenia komórki nerwowej poszczególnych obszarach topograficznych mózgu wydaje się być niezależny od typu obrzęku (Ambo 1961, Klatzo 1967, Reichardt 1904, Zülch 1943). Należy tu również podkreślić, że stosowane obecnie metody histoenzymatyczne mogą w tym przypadku potwierdzać teorię patoklizy Vogtów (1919) dotyczącą szczególnej wrażliwości niektórych obszarów układu nerwowego na działanie określonych czynników szkodliwych.

#### WNIOSKI

1. Stwierdzono wyraźne różnice w aktywności enzymatycznej rozmaitych ugrupowań neuronalnych w ostrym obrzęku komórek nerwowych, mimo podobieństwa morfologicznego zmienionych neurocytów w obrazie Nissla.

2. Po dootrzewnowej iniekcji siarczanu trójetylku cyny wykazano wzrost aktywności FK w dolnych warstwach kory mózgu i w jądrach podstawy oraz zwiększoną aktywność ATPazy i TPPazy.

3. W obrzęku neurocytów wywołanym działaniem promieni jonizujących występuje uogólniony spadek aktywności FK, TPPazy i dehydrogenaz oraz wzrost aktywności ATPazy w jądrach neurocytów górnych warst kory mózgu.

4. Mechanizm patogenetyczny ostrego obrzęku komórki nerwowej uzależniony jest w pewnym stopniu od czynnika etiologicznego, a także od poszczególnych okolic topograficznych mózgu.

5. W doświadczalnym obrzęku mózgu wywołanym działaniem promieni jonizujących występuje zwiększenie wbudowywania znakowanych aminokwasów, a szczególnie glicyny  $C^{14}$  i fenyloalaniny  $C^{14}$  do ciała neuronów.

6. Wbudowywanie znakowanych izotopami promieniotwórczymi aminokwasów jest większe w obrzęku komórki nerwowej spowodowanym TET, aniżeli w obrzęku wywołanym działaniem promieni X.

М. Козик

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОТЕК НЕЙРОНА В СВЕТЕ  
ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## Резюме

Исследования проводились на материале 64 крыс. Острый отек нервной клетки получали экспериментально двумя методами:

- а) облучением головного мозга крыс рентгеновскими лучами дозой 40 000 рентренов,
- в) внутривенным введением сульфата триэтилового (Triethyl Tin Sulfate) в количестве 4 мг/кг веса.

Как при одном так и при втором экспериментальном методе получали тот же сам тип цитологических изменений в виде острого заболевания нервной клетки.

На полученной этим способом экспериментальной модели острого отека нервной клетки проводились энзиматические реакции для обнаружения активности дегидрогеназ, фосфатаз и эстераз и кроме того срезы окрашивались обычно принятыми методами и проводили на них некоторые классические гистохимические реакции. Для оценки степени синтеза белков и нуклеиновых кислот проводились автордиографические исследования с употреблением меченных радиоактивными изотопами аминокислот и пуриновых и пиримидиновых оснований.

Проведенные исследования показали, что в экспериментальном отеке нервной клетки прежде всего имеют место изменения активности фосфатаз и в несколько меньшей степени — эстераз. Изменения активности фосфатаз заключаются в увеличении или падении активности этих энзимов. Наблюдались различия в энзиматической чувствительности отдельных нейрональных группировок в процессе острого отека нервной клетки, особенно по отношению к кислой фосфатазе, АТФ — азе и ТПФ — азе.

Этиологический фактор, ведущий к острому отеку нервной клетки, кажется имеет также влияние на энзиматическую активность отдельных нейроцитов. В экспериментальном отеке мозга, вызванном действием ионизирующих лучей, увеличивается проницаемость гемато-энцефалогического барьера и повышается инкорпорация меченных аминокислот и в особенности глицина  $C^{14}$  и фенилаланина  $C^{14}$  в сому нейронов. Инкорпорация меченными радиоактивными изотопами аминокислот большая в отеке нервной клетки, возникшем вследствие введения сульфататриэтилового, чем в отеке, вызванном действием лучей X.

Результаты, полученные в проведенных исследованиях, позволяют выдвинуть предположение, что патогенетический механизм острого набухания нервной клетки различен в отдельных топографических районах мозга и зависит также от этиологического фактора.

В обсуждении результатов обращается внимание, на степень и характер метаболических нарушений в процессе острого отека нейрона.

M. Kozik

EXPERIMENTAL NEURONE SWELLING IN THE LIGHT  
OF HISTOENZYMATIC STUDIES

## S u m m a r y

The experiments were made with 64 rats. Acute swelling of the nerve cell was obtained by two methods:

- a) by irradiation of the rat brains with X-rays in a 40.000 r dose,
- b) by intraperitoneal injection of triethyl tin sulphate in the amount of 4 mg/kg of body weight.

By both methods the same type of cytological changes was obtained in the form of acute injury to the nerve cell.

On the experimental model of acute nerve cell swelling obtained in this way enzymatic reactions were tested in order to demonstrate the activity of dehydrogenases, phosphatases and esterases. Sections were also stained by routine methods, some classical histochemical tests were made on them. For evaluation of the degree of protein and nucleic acids synthesis the autoradiographic method was used with the application of amino acids, purine and pyrimidine bases labelled with radioactive isotopes.

The studies demonstrated that in experimental swelling of the nerve cell the phosphatase activity is above all changed and that of esterases somewhat less. The changes in phosphatase activity consist in an increase or decrease of the activity of these enzymes. Differences were observed in the enzymatic sensitivity of the particular neuronal groups in the course of acute swelling of the nerve cells, particularly as regards acid phosphatase, ATP-ase and TPP-ase.

The etiological factor leading to acute nerve cell swelling seems also to affect the enzymatic activity of the particular neurocytes. In experimental brain oedema induced by exposure to ionising radiation the permeability of the blood-brain barrier increases and incorporation of labelled amino acids is enhanced, particularly that of  $^{14}\text{C}$ -glycine and  $^{14}\text{C}$ -phenylalanine, into the neurone body. Incorporation of labelled amino acids is higher in nerve cell swelling due to triethyl-tin sulphate injection than after exposure to X-rays.

The results obtained allow the suggestion that the pathogenetic mechanism of acute nerve cell swelling is different in the particular topographic regions of the brain and also dependent on the etiological factor.

In the discussion attention is called to the degree and character of the metabolic disturbances in the course of acute neuronal swelling.

## PIŚMIENNICTWO

1. Ambo H.: Kritische Bemerkungen über die Hirnschwellung. *Folia Psychiat. Neurol. Jap.*, 1961, 15, 42.
2. Fonnesu A., Severi C.: Phosphorylation mechanism in cloudy swelling. *Experientia (Basel)*, 1954, 10, 28.
3. Gerebtzoff M.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases. *Acta Anat.*, 1953, 19, 336.
4. Gomori G.: *Microscopic Histochemistry*. Univ. Press. Chicago, 1953.

5. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1 — 14.
6. Klatzo I., Miquel J.: Observations on pinocytosis in nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1960, 19, 475 — 487.
7. Klatzo I., Miquel J., Otenasek R.: The application of fluorescein labeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. *Acta Neuropath.*, 1962, 2, 144 — 160.
8. Kozik M.: Badania cytochemiczne i cytofotometryczne neuronu w krwotokach mózgowych. PTPN, Pr. Kom. Med. Doświad., 1964, 27, 77 — 116.
9. Kozik M.: Histochemical researches on acute disease of nerve cells. II National Symp. Neuropath., Bucharest, 1968, Reports and Abstracts of Communications, 96, 184.
10. Kozik M.: Niektóre aspekty cytochemiczne schorzeń neuronalnych. I Konfer. Neuropat., Warszawa 1969.
11. Kozik M.: Wpływ dużej dawki promieniowania jonizującego na aktywność dehydrogenaz w mózgu. *Folia Histochem. Cytochem.*, w druku.
12. Kozik M.: Histochemistry of Purkinje cells in a experimental homogenisation necrosis. *Pathol. Europ.*, w druku.
13. Kozik M.: Cytochemia schorzenia przewlekłego Nissla. *Acta Med. Pol.*, w druku.
14. Lazarus S. S., Barden H.: Demonstration of nucleoside diphosphatase in the Golgi apparatus at alkaline pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 1, 368 — 369.
15. Mase K., Takahashi Y., Ogata K.: The incorporation of ( $C^{14}$ ) glycine into the protein of guinea-pig brain cortex slices. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 282 — 288.
16. Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad., Sci.*, 1961, 47, 802 — 810.
17. Pearse A.G.E., Hess R.: The effect of menadione (Vitamin  $K_3$ ) on tetrazolium reductase activity of rat brain. *Biochem. J.*, 1961, 78, 35.
18. Raimondi A. J., Evans J. P., Mullen S.: Studies of cerebral edema. III. Alterations in the white matter. An electron microscopic study using Ferritin as a Labelling Compound. *Acta Neuropath.*, 1962, 2, 177 — 197.
19. Rodriguez De Lores Arnaiz G., De Robertis E. D. P.: Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in the rat brain. II. Subcellular localisation of monoamine oxidase and succinate dehydrogenase. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 503 — 508.
20. Rogers A. W.: Techniques of radioautography. Elsevier, Amsterdam—London—New York 1967.
21. Rutenburg A., Cohen E., Seligmann A.: Histochemical demonstration of aryl sulphatase. *Science*, 1952, 116, 539 — 544.
22. Scarpelli D. G., Pearse A. G. E.: Cytochemical localization of succinic dehydrogenase in mitochondria. *Anat. Rec.*, 1958, 132, 133 — 151.
23. Simon E. W.: Mechanism of dinitrophenol toxicity. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 1953, 28, 453.
24. Söderholm U.: Histochemical localization of esterases, phosphatases and Tetrazolium reductases in the motor neurones of the spinal cord of the rat and the effect of nerve division. *Acta Physiol. Scand.*, 1965, 65, Suppl. 256.
25. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of enle canaliculi. *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, 27, 13 — 23.

26. Wender M.: Wpływ promieniowania jonizującego w okresie ciąży na niektóre wykładniki biochemiczne rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. VI Zjazd Pol. Tow. Neurol. Neurochir., Pamiętnik, Łódź 1964, 258 — 259.
27. Wender M.: The effect of ionizing radiation on physiological changes in the content of mineral components in the brain during development. Bull. Soc. Amis. Sci., Poznań 1964, Série C, 133, 13 — 22.
28. Wender M.: Changes in the content of cerebral lipids during normal development of guinea pigs and after prenatal X-irradiation. Folia Biol., 1965, 13, 323 — 352.
29. Wender M., Waligóra Z.: The content of amino acids in the proteins of the developing nervous system of the guinea pig. II. J. Neurochem., 1962, 9, 115 — 118.
30. Wender M., Waligóra Z.: The content of amino acids in the proteins of the developing nervous system of guinea pig. IV. Long-term effects of prenatal X-irradiation. J. Neurochem., 1964, 11, 583—588.
31. Wender M., Wenclewski A.: Effects of the ionizing radiation on physiological changes in the activity of 3.1.6.1. arylsulphate sulphohydrolase in the brain during development. Radiobiol. Radiother., 1964, 5/6, 675 — 684.
32. Zischka W.: Zur Korrelation von morphologischem Bild und biochemischen Befunden im Gewebsstoffwechsel, untersucht am Beispiel der experimentellen Diphtherieintoxikation. Beitr. path. Anat., 1952, 112, 321.
23. Zülch K. J.: Störungen des Intrakraniellen Druckes. In: Handb. der Neurochirurgie, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, Springer Verl., Vol. 1, part 1, 208.

Pełne piśmiennictwo obejmuje 62 pozycje, i jest do wglądu w redakcji „Neuropatologii Polskiej” i u autora.

Adres autora: Samodz. Prac. Patol. Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

## K O M U N I K A T

Prezydium Polskiej Akademii Nauk uchwala z dnia 6 kwietnia 1971 roku powoloło KOMITET NAUK NEUROLOGICZNYCH PAN pod przewodnictwem prof. dr med. Adama Kunickiego Członka Korespondenta Polskiej Akademii Nauk.

Do zadań Komitetu Nauk Neurologicznych będzie należała integracja i koordynacja badań naukowych w zakresie układu nerwowego.

W ramach Komitetu powstały Komisje:

Komisja Obrzęku Mózgu

Komisja Neuroonkologii

Komisja Chorób Metabolicznych O.U.N.

Komisja Chorób i Wad Naczyniowych Mózgu

Komisja Neuroradiologii

Komisja dla Badań nad Padaczką

Komisja Neuroanestezjologii i Reanimacji

W trakcie organizowania się są ponadto Komisje:

Komisja Urazów Układu Nerwowego

Komisja Neurofarmakologii

Komisja Neurofizjologii Klinicznej

Komisja Elektroencefalografii.

Sekretarz Komitetu  
Nauk Neurologicznych PAN  
(—) doc. dr M. Dąbbska

KRYSTYNA DOMAŃSKA-JANIK

## DOSWIADCZALNE NIEDOTLENIENIE A NIEKTÓRE ZAGADNIENIA TLENOWEGO METABOLIZMU GLUKOZY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej  
I Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: dr n. przyr. A. Gromek

Badania ostatnich lat, prowadzone przy zastosowaniu różnych nowoczesnych technik poszerzyły w sposób istotny naszą znajomość strukturalnych i metabolicznych następstw niedostatku tlenowego w tkance nerwowej, jednak szereg istotnych mechanizmów reakcji mózgu na niedobór tlenu nie został wyjaśniony. Przyczyn tego w znacznej mierze należy szukać w rozbieżności stosowanych metod i modeli doświadczalnych i braku korelacji między obserwacjami uzyskiwanymi przy pomocy różnych technik badawczych.

W przeprowadzonych przez nas badaniach podjęliśmy próbę skorelowania obserwacji morfologicznych, histochemicznych i biochemicznych następstw niedotlenienia w ośrodkowym układzie nerwowym. Bezpośrednim celem pracy było ustalenie zależności pomiędzy intensywnością oddychania tkankowego i aktywnością enzymów związanych z cyklem pentozowym w ośrodkowym układzie nerwowym w normie i w wyniku niedotlenienia, oraz niedotlenienia skojarzonego z niedokrwieniem.

### MATERIAŁ I METODY

Metodyka doświadczalna. Badania, których celem była ocena stosunków prawidłowych, wykonano na białych szczurach, 3-miesięcznych samcach o wadze 150 — 200 g i na świnkach morskich, również samcach 6-miesięcznych o wadze około 300 g. Zwierzęta dekapiowano bez narkozy i pobierano tkankę mózgową z różnych okolic — kory, pnia mózgu i mózdzku, w sposób odpowiedni dla stosowanej techniki badań.

Badania nad wpływem niedotlenienia na metabolizm ośrodkowego układu nerwowego przeprowadzono na szczurach, stosując modele doświadczalnego niedotlenienia:

a. Ostre krótkotrwałe niedotlenienie proste (anoksja anoksyjna). Zwierzęta przetrzymywano przez okres około 3,5 min. w komorze o pojemności 10 l, przez którą przepuszczano azot techniczny, z zawartością tlenu poniżej 1% objętości. Po uzyskaniu pełnego bezdechu zwierzęta przenoszono do atmosfery powietrza, a następnie dekapitowano w różnych odstępach czasu po niedotlenieniu, pobierając do badań tkanke z tych samych okolic, co w grupie zwierząt zdrowych.

b. Anoksja anoksyjno-ischemiczna. Grupę tę stanowiły szczury, u których niedotlenienie przeprowadzono wg modelu doświadczalnego opisanego przez Levina (1960). W narkozie eterowej podwiązywano zwierzętom tętnicę szyjną wspólną prawą, a następnie po upływie 18 — 24 godzin od zabiegu, szczury poddawano niedotlenieniu w warunkach opisanych w punkcie a), wydłużając jednak czas trwania niedotlenienia do 20 — 40 minut. Po zakończeniu niedotlenienia zwierzęta przenoszono do atmosfery powietrza, reanimowano, jeżeli zachodziła tego potrzeba, a następnie dekapitowano w grupach w różnych odstępach czasu od doświadczenia. W grupie tej obserwowano wysoką śmiertelność zwierząt, sięgającą 50% w okresie trwania niedotlenienia, jak również w okresie 24 godzin po niedotlenieniu.

We wszystkich grupach doświadczalnych i kontrolnej wykonywano równoległe badania biochemiczne, histologiczne i histoenzymatyczne.

#### Metody biochemiczne.

1. Badania oddychania skrawków tkankowych wykonano metodą manometryczną Warburga (opis metodyki doświadczalnej — Domańska-Janik, Broniszewska-Ardelt 1971).

2. Aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego oznaczano we frakcji cytoplazmatycznej, otrzymanej z 20% homogenatu tkanki. Homogenizowano w roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem 1mM EDTA w temp. 0°C przez 3 min. Wirowano w wirówce MSE przy 15 000 g w temp. 0°C przez 20 minut. Otrzymany nadsącz był bezpośrednio używany do oznaczeń enzymatycznych. Aktywność DH G6P i DH 6PGA oznaczano metodą spektrofotometryczną (Löhr, Walter 1963). Specyficzną aktywność enzymu wyrażano w jednostkach Wróblewskiego w przeliczeniu na stężenie białka w badanej próbce ( $OD_{340}/\text{min.}/\text{mg}$  białka  $\cdot 10^3$ ).

3. Białko oznaczano wg metody Lowry (Layne 1957).

4. Hydrolizę DNA przeprowadzano wg met. Schmidta-Tannhausera w modyfikacji Pasquini i wsp. (1967), dostosowanej do badania małych próbek tkanki mózgowej.

#### Metody histologiczne i histochemiczne.

Badania histologiczne tkanki przeprowadzono na materiale utrwalo-



nym w 10% formalinie obojętnej i zatopionym w parafinie. Bloczki parafinowe skrawano w płaszczyźnie czołowej na preparaty grubości 8  $\mu$ . Barwienia wykonywano wg met. Klüvera i Barrera (1953) oraz fioletem krezyłu. Tkanę do badań histochemicznych zamrażano w ciekłym azocie i skrawano na kriostacie typu „Pears” w temp. — 20°C na preparaty grubości 12  $\mu$ . Badano aktywności dehydrogenaz: bursztynianowej (SDH), glukozy-6-fosforanowej (DH G6P) oraz mleczanowej (LDH). Odczyny histochemiczne oparto na metodach podanych przez Hessa (1958) oraz Pearsa (1960).

## WYNIKI BADAŃ

*Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego i oddychania tkankowego w warunkach prawidłowych w mózgach szczurów i świnek morskich*

Aktywność specyficzną enzymów związanych z tlenową przemianą glukozy w cyklu pentozowym (DH G6P i DH 6PGA) przedstawiono w tabeli 1

*Tabela 1. Aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego w mózgu świnek morskich i szczurów w warunkach prawidłowych ( $\Delta OD_{340}$  min./mg białka  $\times 10^3 \pm SD$ )*

*Table 1. Pentose cycle dehydrogenase activity in brain of guinea pigs and rats in normal conditions ( $\Delta OD_{340}$  min./mg protein  $\times 10^3 \pm SD$ )*

| Enzym badany<br>Enzyme tested |               | świnka<br>morska | — Guinea pig  | szczur — Rat  |               |
|-------------------------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
|                               |               | DH — G6P         | DH — 6PGA     | DH — G6P      | DH — 6PGA     |
| Części<br>mózgu               | Kora          | 37 $\pm$ 5,65    | 14 $\pm$ 2,3  | 41 $\pm$ 3,39 | 10 $\pm$ 1,68 |
|                               | Cortex        |                  |               |               |               |
| Brain<br>parts                | Śródmózgowie  | 58 $\pm$ 6,67    | 22 $\pm$ 4,38 | 76 $\pm$ 4,28 | 18 $\pm$ 1,58 |
|                               | Mesencephalon |                  |               |               |               |
|                               | Pień mózgu*   | 64 $\pm$ 10,4    | 21 $\pm$ 4,12 | 77 $\pm$ 6,32 | 19 $\pm$ 1,68 |
|                               | Brain stem*   |                  |               |               |               |
|                               | Móżdżek       | 62 $\pm$ 6,4     | 25 $\pm$ 4,45 | 84 $\pm$ 4,71 | 12 $\pm$ 2,67 |
|                               | Cerebellum    |                  |               |               |               |

Średnie wyniki z 6 doświadczeń.

Mean results of six experiments.

\* Pod łącznym określeniem pnia mózgu rozumiano materiał pochodzący zarówno z mostu jak i rdzenia przedłużonego, w odróżnieniu od oddzielnie badanego śródmózgowia.

\* Under the notation „brain stem” is understood the material from the pons and medulla oblongata as distinguished from the separately investigated mesencephalon.

Rozkład aktywności w czterech wyodrębnionych okolicach ośrodkowego układu nerwowego jest podobny u świnki morskiej i u szczura. Najniższą aktywność stwierdza się w korze mózgu. W pozostałych okolicach wzrasta ona około dwukrotnie, przy czym różnice pomiędzy poszczególnymi okolicami mózgu, z wyjątkiem kory, nie wykazują znamienności statystycznej.

Aktywność specyficzna DH G6P jest w dodatniej korelacji z aktywnością DH 6PGA we wszystkich badanych częściach mózgu. Jedynie w mózdzku szczura, pomimo wysokiej aktywności pierwszego enzymu cyklu pentozowego, stwierdza się stosunkowo niską aktywność DH 6PGA. We wszystkich badanych okolicach aktywność DH G6P przewyższa aktywność DH 6PGA (3—4-krotnie u szczura i 2—3-krotnie u świnki morskiej).

Dodatkowo wykonano oznaczenia aktywności enzymatycznej w istocie białej półkul mózgowych świnek morskich. Średnie wartości uzyskane z 4 doświadczeń wynosiły: DH G6P —  $66,00 \pm 4,47$ ; DH 6PGA —  $31,00 \pm 3,96$ , co stanowi wartość dwukrotnie wyższą w porównaniu z korą mózgu.

Badanie oddychania skrawków przeprowadzono w dwóch różnych stężeniach jonów potasu i przeliczono na względną gęstość komórkową w danej okolicy. Charakterystyczną gradację aktywności oddechowej pomiędzy poszczególnymi okolicami mózgu przedstawiono w tabeli 2 i 3.

Po lewej stronie tabel przedstawiono oddychanie w odniesieniu do świeżej masy tkanki (Domańska-Janik, Broniszewska-Ardelt 1971), po prawej stronie oddychanie po uwzględnieniu różnic w zawartości DNA w danej okolicy. Wydaje się, że te ostatnie wartości lepiej charakteryzują średnią aktywność oddechową populacji komórkowej, odnosząc ją bezpośrednio do względnej gęstości komórek danej okolicy.

Oddychanie, zarówno w środowisku wysoko jak i nisko-potasowym, jest najaktywniejsze w korze mózgu, zmniejszając się stopniowo w kierunku pnia mózgu i mózdzku. Wzrost zużycia tlenu pod wpływem wysokich stężeń potasu nie idzie w parze z aktywnością oddechową i jest najwyższy w korze mózgu i mózdzku. W pniu mózgu nie obserwuje się pobudzenia oddychania pod wpływem wzrostu stężenia potasu.

Porównując aktywność oddechową skrawków z poszczególnych struktur mózgu z aktywnością enzymów związanych z cyklem pentozowym, zwraca uwagę ich ujemne skorelowanie we wszystkich badanych okolicach. Te stosunki przedstawiono graficznie na wykresach 1 i 2, na których wartości wyrażono jako procenty aktywności charakterystycznych dla kory mózgu.

Tablica 2. Oddychanie skrawków mózgu szczura w warunkach prawidłowych z uwzględnieniem różnych stężeń potasu (substrat — 10 mM glukoza)

Table 2. Respiration of rat brain section under normal conditions taking into account various potassium concentrations (substrate — 10 mM glucose)

| Części o.u.n.<br>Parts of CNS | Oddychanie*<br>Respiration*  |                      | %<br>stymulacji<br>oddychania<br>%<br>stimulation<br>of respiration | Względna**<br>gęstość komórek<br>Relative**<br>cell density | μl O <sub>2</sub> /godz/mg św. tkanki<br>μl O <sub>2</sub> /h/mg fresh tissue |                      |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|---|---|---|----------------------|
|                               | Ext <sub>2,63</sub> DNA × 10 |                      |   |   | 6 mM K <sup>+</sup>   | 98 mM K <sup>+</sup> |
|                               | 6 mM K <sup>+</sup>          | 98 mM K <sup>+</sup> | Ext <sub>2,63</sub> DNA × 10  | 6 mM K <sup>+</sup>   |   |                      |
| Kora<br>Cortex                | 1,26 ± 0,12                  | 1,69 ± 0,17          | 34  | 1,03 ± 0,1  | 1,22  | 1,64                 |
| Śródmózgowie<br>Mesencephalon | 1,11 ± 0,13                  | 1,24 ± 0,11          | 11  | 1,54 ± 0,4  | 0,72  | 0,80                 |
| Pień mózgu<br>Brain stem      | 0,74 ± 0,11                  | 0,76 ± 0,09          | 3   |   | 0,48  | 0,50                 |
| Mózdzek<br>Cerebellum         | 1,12 ± 0,11                  | 1,47 ± 0,06          | 31  | 5,4 ± 0,3   | 0,21  | 0,27                 |

\* Wartości średnie z 6 doświadczeń (z wyjątkiem kory — 10) ± SD.

\* Mean values from 6 experiments (with exception of cortex — 10) ± SD.

\*\* Wartości średnie z 5 doświadczeń ± SD.

\*\* Mean values from 5 experiments ± SD.

*Tabela 3.* Oddychanie skrawków mózgu świnki morskiej (substrat — 10 mM glukoza) w warunkach prawidłowych z uwzględnieniem różnych stężeń potasu

*Table 3.* Respiration of brain sections of guinea pig (substrate — 10 mM glucose) in normal conditions taking into account various potassium concentrations

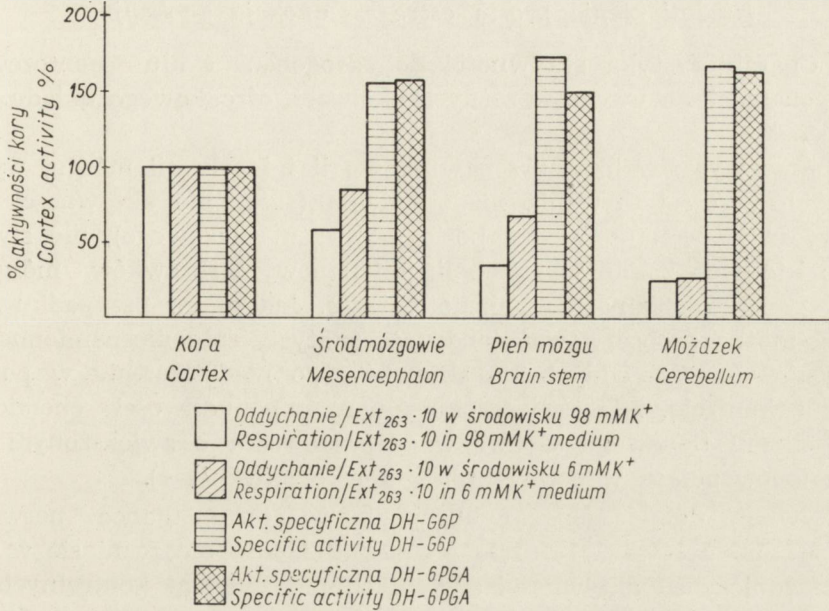
| Części o.u.n.<br>Parts of CNS | Oddychanie*<br>Respiration*   |                      | %<br>stymulacji<br>cddychania<br>%<br>stimulation<br>of respiration | Względna**<br>gęstość komórek<br>Relative**<br>cell density | μl O <sub>2</sub> /godz/mg św. tkanki<br>μl O <sub>2</sub> /h/mg fresh tissue |                      |
|-------------------------------|---|----------------------|---|---|---|----------------------|
|                               | μl O <sub>2</sub> /godz/mg św. tkanki<br>μl O <sub>2</sub> /h/mg fresh tissue |                      |   |   | Ext <sub>263</sub> DNA × 10   |                      |
|                               | 6 mM K <sup>+</sup>   | 98 mM K <sup>+</sup> |   |   | 6 mM K <sup>+</sup>   | 98 mM K <sup>+</sup> |
| Kora<br>Cortex                | 0,87 ± 0,05   | 1,33 ± 0,08          | 53  | 1,00 ± 0,2  | 0,87  | 1,33                 |
| Śródmózgowie<br>Mesencephalon | 0,90 ± 0,03   | 0,94 ± 0,06          | 4   | 1,22 ± 0,2  | 0,74  | 0,77                 |
| Pień mózgu<br>Brain stem      | 0,72 ± 0,04   | 0,59 ± 0,03          | 18  |   | 0,59  | 0,48                 |
| Móżdżek<br>Cerebellum         | 0,89 ± 0,03   | 1,26 ± 0,07          | 41  | 3,87 ± 0,2  | 0,23  | 0,33                 |

\* Wartości średnie z 8 doświadczeń ± SD.

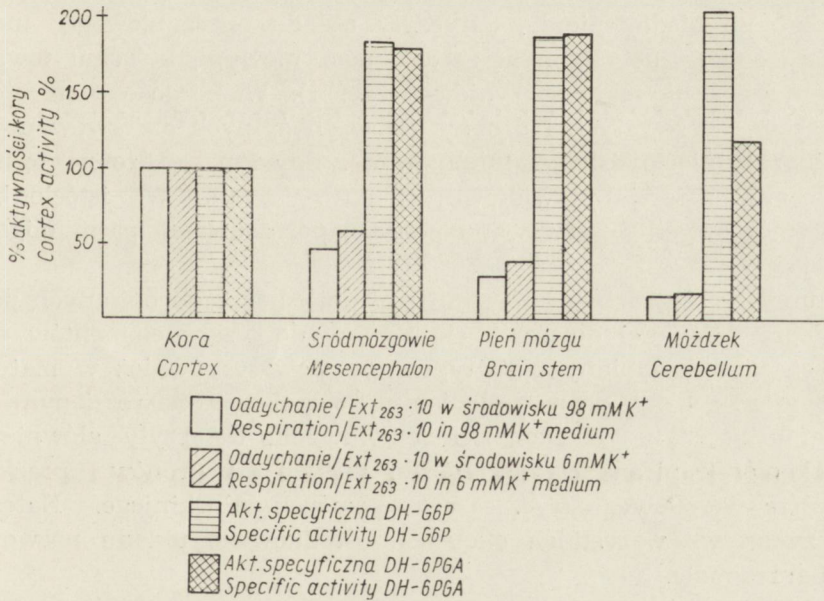
\* Mean values from 8 experiments ± SD.

\*\* Wartości średnie z 4 doświadczeń ± SD.

\*\* Mean values from 4 experiments ± SD.



Wykres 1. Oddychanie i aktywność specyficzna dehydrogenaz cyklu pentozowego w mózgu szczura, wyrażone jako % aktywności kory.  
 Diagram 1. Respiration and specific pentose cycle dehydrogenase activity in the rat brain expressed in terms of cortical activity per cent.



Wykres 2. Oddychanie i aktywność specyficzna dehydrogenaz cyklu pentozowego w mózgu świnki morskiej, wyrażone jako % aktywności kory.  
 Diagram 2. Respiration and specific pentose cycle dehydrogenase activity in brain of guinea pig expressed as per cent of cortical activity.

*Niedotlenienie proste ostre — anoksja anoksyjna*

a. Charakterystyka aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego i oddychania tkankowego w różnych okolicach ośrodkowego układu nerwowego.

Pomimo wyraźnych zaburzeń w fizjologii i biochemii mózgu, występujących w czasie trwania niedotlenienia (zniesienie aktywności bioelektrycznej, 4-krotny wzrost poziomu kwasu mlekowego), nie stwierdzono istotnych zmian w metabolizmie tlenowym skrawków mózgu w pierwszych 24 godzinach po niedotlenieniu. Jedynie w przypadku kory mózgu można zaobserwować tendencję (statystycznie nieznamienne) do obniżenia wartości oddychania skrawków po niedotlenieniu w porównaniu z kontrolą. Nie stwierdzono zmian w pobudliwości chemicznej metabolizmu tlenowego skrawków w środowisku o zwiększonym stężeniu jonów potasu w porównaniu z kontrolą (tabela 4).

Aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego w tkance nerwowej szczurów po upływie 24 godzin po niedotlenieniu nie różni się w sposób zasadniczy od aktywności stwierdzonej u zwierząt kontrolnych w tych samych okolicach ośrodkowego układu nerwowego (tabela 5).

b. Obraz histologiczny i histochemiczny ośrodkowego układu nerwowego.

Najwcześniejsze zmiany morfologiczne, obserwowane u zwierząt bezpośrednio po niedotlenieniu, dotyczyły układu naczyniowego mózgu. Polegały one na uogólnionym zastoju naczyniowym, któremu towarzyszyło przesiękanie okołonaczyniowe (ryc. 1). W bezpośrednim otoczeniu naczyń włosowatych i drobnych naczyń żylnych obserwowano niewielkie zblednięcie osłonek mielinowych. Pojedyncze, drobne tętniczki wykazywały zatarcie prawidłowej struktury ścian. W istocie białej półkul mózgowych obserwowano ponadto porozsuwanie pasm oligodendrogleju.

Po upływie 3 godzin od momentu niedotlenienia do opisanych powyżej nieprawidłowości dołączały się zmiany dotyczące elementów mięszszowych tkanki. Zmiany tego typu występowały również w materiale badanym 24 godziny po niedotlenieniu. Polegały one na rozszianym zwyrodnieniu pojedynczych komórek nerwowych; dotyczyły głównie dużych komórek piramidowych mózgu, dużych neuronów prądkowia i wzgórza wzrokowego (ryc. 2) oraz komórek Purkinjego. Natężenie tych zmian we wszystkich okolicach ośrodkowego układu nerwowego było bardzo małe.

Obraz histochemiczny, dotyczący aktywności SDH, LDH, DH G6P i DH 6PGA u zwierząt badanych w momencie zakończenia niedotlenienia nie odbiegał w sposób zasadniczy od obrazów obserwowanych

*Tabela 4.* Wpływ ostrego niedotlenienia prostego na oddychanie skrawków mózgu szczura (substrat — 10 mM glukoza)  
 $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{godz}/\text{mg}$  św. tkanki  $\pm$  SD

*Table 4.* Influence of acute simple hypoxia on respiration of rat brain section (substrate — 10 mM glucose)  
 $QO_2 = \mu\text{l } O_2/\text{h}/\text{mg}$  fresh tissue  $\pm$  SD

| Części mózgu<br>Brain part                               | Kora mózgu<br>Cerebral cortex |                 | Móżdżek<br>Cerebellum |                 | Śródmózgowie<br>Mesencephalon |                 | Pień mózgu<br>Brain stem |                 |                 |
|--|-------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
|  | 6 mM                          | 98 mM           | 6 mM                  | 98 mM           | 6 mM                          | 98 mM           | 6 mM                     | 98 mM           |                 |
| Stężenie $K^+$<br>Concentration $K^+$                    |                               |                 |                       |                 |                               |                 |                          |                 |                 |
| Czas po<br>niedotlenieniu<br>Time lapse after<br>hypoxia | 0                             | 1,14 $\pm$ 0,07 | 1,67 $\pm$ 0,12       | 1,22 $\pm$ 0,07 | 1,62 $\pm$ 0,12               | 1,12 $\pm$ 0,12 | 1,19 $\pm$ 0,17          | 0,85 $\pm$ 0,06 | 0,78 $\pm$ 0,06 |
|  | 3 godz.<br>3 h                | 1,18 $\pm$ 0,07 | 1,61 $\pm$ 0,07       | 1,10 $\pm$ 0,06 | 1,57 $\pm$ 0,13               | 1,11 $\pm$ 0,07 | 1,23 $\pm$ 0,10          | 0,78 $\pm$ 0,11 | 0,79 $\pm$ 0,11 |
|  | 24 godz.<br>24 h              | 1,17 $\pm$ 0,06 | 1,67 $\pm$ 0,11       | 1,15 $\pm$ 0,06 | 1,62 $\pm$ 0,18               | 1,12 $\pm$ 0,05 | 1,23 $\pm$ 0,07          | 0,91 $\pm$ 0,10 | 0,80 $\pm$ 0,03 |
|  | kontrola<br>control           | 1,26 $\pm$ 0,12 | 1,69 $\pm$ 0,17       | 1,12 $\pm$ 0,11 | 1,47 $\pm$ 0,06               | 1,11 $\pm$ 0,13 | 1,24 $\pm$ 0,11          | 0,74 $\pm$ 0,11 | 0,76 $\pm$ 0,09 |

Średnie wyniki z 6 doświadczeń.  
 Mean results from 6 experiments.

Tabela 5. Wpływ ostrego niedotlenienia prostego na aktywność dehydrogenaz cyklu pentozowego w mózgu szczura  
( $\Delta OD_{340}$  min/mg białka  $\times 10^3 \pm SD$ )

Table 5. Influence of acute simple hypoxia on pentose cycle dehydrogenase activity in rat brain  
( $\Delta OD_{340}$  min/mg protein  $\times 10^3 \pm SD$ )

| Część mózgu<br>Part of brain                             | Kora mózgu<br>Cerebral cortex |              | Móżdżek<br>Cerebellum |              | Śródmózgowie<br>Mesencephalon |              | Pień mózgu<br>Brain stem |              |               |
|--|-------------------------------|--------------|-----------------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------|
|  | Enzym badany<br>Enzyme tested | DH-G6P       | DH-6PGA               | DH-G6P       | DH-6PGA                       | DH-G6P       | DH-6PGA                  | DH-G6P       | DH-6PGA       |
| Czas po<br>niedotlenieniu<br>Time lapse after<br>hypoxia | O                             | 43 $\pm$ 3,7 | 11 $\pm$ 1,8          | 85 $\pm$ 4,8 | 15 $\pm$ 1,2                  | 74 $\pm$ 6,2 | 18 $\pm$ 2,1             | 81 $\pm$ 7,0 | 21 $\pm$ 0,63 |
|  | 3 godz.<br>3 h                | 43 $\pm$ 1,1 | 9 $\pm$ 0,84          | 88 $\pm$ 4,5 | 10 $\pm$ 1,3                  | 80 $\pm$ 4,3 | 13 $\pm$ 4,3             | 89 $\pm$ 5,0 | 16 $\pm$ 1,0  |
|  | 24 godz.<br>24 h              | 41 $\pm$ 1,6 | 12 $\pm$ 1,1          | 89 $\pm$ 4,6 | 15 $\pm$ 1,4                  | 73 $\pm$ 4,8 | 18 $\pm$ 1,3             | 84 $\pm$ 6,4 | 20 $\pm$ 1,6  |
|  | kontrola<br>control           | 41 $\pm$ 3,4 | 10 $\pm$ 1,7          | 84 $\pm$ 4,7 | 12 $\pm$ 2,7                  | 76 $\pm$ 4,3 | 18 $\pm$ 1,6             | 77 $\pm$ 6,3 | 19 $\pm$ 1,7  |

Średnie wyniki z 6 doświadczeń.  
Mean results from 6 experiment.



u zwierząt kontrolnych. Cechą charakterystyczną zwierząt badanych po upływie 3 i 24 godziny po niedotlenieniu, była wyraźna nierównomierność natężenia reakcji formazanowej w dużych komórkach piramidowych kory mózgu. Podobne zmiany dotyczyły również komórek Purkinjego. Równocześnie obserwowano zwiększenie intensywności reakcji formazanowej z glukozo-6-fosforanem (G6P) jako substratem w podkorowo położonych astrocytach istoty białej.

### *Encefalopatia anoksyjno-ischemiczna*

Otrzymane wyniki badań nad wpływem ostrego niedotlenienia prostego na ośrodkowy układ nerwowy skłoniły do wprowadzenia modelu, który przy zachowaniu typowego dla niedotlenienia charakteru zmian, cechowałby się większym ich nasileniem. Warunki te spełniał opisany przez Levina (1960) model jednostronnej encefalopatii anoksyjno-ischemicznej. Model ten ogranicza oczekiwane zmiany do półkuli mózgu i międzymózgowia po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej, w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. Zasadnicza jednostronność zmian w tym modelu ułatwia obserwację nawet dyskretnych odchyłań.

a. Badania kontrolne. Przed przystąpieniem do doświadczeń nad wpływem niedotlenienia w modelu anoksyjno-ischemicznym, określono porównawczo zachowanie się badanych parametrów w obu półkulach mózgu, zarówno w warunkach prawidłowych jak i po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej.

U zwierząt prawidłowych (bez podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej) wartości oddychania skrawków kory z przeciwległych półkul mózgu wykazują nieznaczne różnice. W związku z występowaniem dużych różnic osobniczych w wartościach zużycia tlenu, zrezygnowano z obliczania średnich dla poszczególnych grup, a ograniczono się do porównywania wartości oddychania pomiędzy przeciwległymi półkulami w każdym indywidualnym przypadku.

Spodziewając się lateralizacji zmian po niedotlenieniu, przyjęto określanie współczynnika oddechowego skrawków półkuli prawej (strona po której podwiązywano tętnicę szyjną), jako procentu współczynnika oddechowego homologicznej półkuli lewej.

Na podstawie analizy wyników badań kontrolnych przyjęto za znaczące te różnice, które przekraczały 10% wartości współczynnika oddechowego. W przypadku występowania jednokierunkowych zaburzeń oddychania w całej grupie badanej, bez cech lateralizacji, analizę wyników przeprowadzono porównując je ze średnią wartością oddychania skrawków kontrolnych, która wynosiła w środowisku 6 mM KCl —

— 1,22 ( $\pm 0,09^*$ ; w środowisku 98 mM KCl — 1,81  $\pm 0,14^*$  (wartości średnie na podstawie 10 oznaczeń).

Zwierzęta badane po upływie 3 godzin od podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej wykazywały niezbyt nasilone obniżenie oddychania skrawków w porównaniu z kontrolą. Zmiany te występowały obustronnie i dotyczyły głównie oddychania stymulowanego jonami potasu, przy czym obniżenie oddychania nie występowało w równym stopniu we wszystkich przypadkach. Średnie wartości oddychania skrawków w tej grupie wynosiły w środowisku 6 mM KCl — 1,15  $\pm 0,03^*$ ; w środowisku 98 mM KCl — 1,53  $\pm 0,20^*$  (wartości średnie na podstawie 10 oznaczeń). Zmiany tego typu mogą być związane z wpływem narkozy stosowanej przy preparowaniu tętnicy. Przedłużono więc czas badania od chwili zabiegu do 18 — 24 godzin. Średnie wartości oddychania skrawków w tej grupie były następujące w środowisku 6 mM KCl — 1,20  $\pm 0,09^*$  w środowisku 98 mM KCl — 1,71  $\pm 0,13^*$  (wartości średnie na podstawie 10 oznaczeń). Porównując wartości współczynników oddechowych homologicznych półkul, wykazano, że różnice (poza jednym przypadkiem oddychania stymulowanego KCl) nie przekraczają 10%.

Na podstawie powyższych wyników wydaje się, że okres 18 — 24 godz. po podwiązaniu tętnicy szyjnej jest optymalny do zastosowania niedotlenienia. Dalsze badania kontrolne przeprowadzono w tej właśnie grupie czasowej.

W badaniach aktywności DH G6P i DH 6PGA nie stwierdzono występowania zmian po 24 godzinach od jednostronnego podwiązania tętnicy, w stosunku do kontroli (tabela 7), ani różnic w aktywności w przeciwległych półkulach u poszczególnych zwierząt.

Kontrolne badania histologiczne i histochemiczne wykonano u zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej oraz po 48 godzinach, to jest w okresie odpowiadającym naszym obserwacjom nad rozwojem encefalopatii anoksyjno-ischemicznej. Obraz morfologiczny ośrodkowego układu nerwowego w obu tych grupach nie różnił się w sposób zasadniczy od obrazu występującego u zwierząt z prawidłowym krążeniem krwi w tętnicach szyjnych. Jedynym obserwowanym odchyleniem od normy były nieznaczne ubytki komórek nerwowych w korze prawej półkuli (ryc. 3) oraz pojedynczo występujące neurocyty z cechami tygrolizy, odpowiadające obrazowi tzw. schorzenia ischemicznego (ryc. 4).

Zmiany w obrazie histochemicznym dotyczyły w zasadzie wyłącznie aktywności SDH. Polegały one na pogłębieniu występującej już w wa-

\*  $\mu\text{l O}_2/\text{godz./mg}$  św. tkanki.

runkach prawidłowych nierównomierności odczynów enzymatycznych w dużych komórkach głębokich warstw kory mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej.

b. Charakterystyka oddychania tkankowego i aktywności dehydrogenaz cyklu pentozowego w encefalopatii anoksyjno-ischemicznej. Oddychanie tkankowe kory mózgu wykazało istotne różnice zarówno pomiędzy poszczególnymi grupami czasowymi zwierząt, jak i pomiędzy poszczególnymi zwierzętami w obrębie tej samej grupy.

*Tabela 6.* Oddychanie skrawków kory mózgowej szczura w encefalopatii anoksyjno-ischemicznej w modelu Levina, z uwzględnieniem różnych stężeń jonów potasu

*Table 6.* Respiration of rat brain cortex section in anoxic-ischemic encephalopathy in Levine's model with reference to various potassium ions concentrations

| Okres czasu<br>po niedotlenieniu<br>Time lapse after hypoxia   | Stopień obniżenia<br>oddychania*<br>Degree of<br>depression of<br>respiration*) | Liczba zwierząt<br>Number of animals |                       |
|--|---|--------------------------------------|-----------------------|
|  |   | K <sup>+</sup> —6 mM                 | K <sup>+</sup> —98 mM |
| Bezpośrednio<br>po niedotlenieniu<br>Immediately after hypoxia | O   | 5                                    | 5                     |
|  | I   | 2                                    | 1                     |
|  | II  | 1                                    | 2                     |
|  | III   | 0                                    | 0                     |
| 3 godz. po niedotlenieniu<br>3 h after hypoxia                 | 0   | 1                                    | 1                     |
|  | I   | 1                                    | 1                     |
|  | II  | 0                                    | 0                     |
|  | III   | 4                                    | 4                     |
| 12 godz. po niedotlenieniu<br>12 h after hypoxia               | 0   | 3                                    | 3                     |
|  | I   | 1                                    | 1                     |
|  | II  | 1                                    | 1                     |
|  | III   | 0                                    | 0                     |
| 24 godz. po niedotlenieniu<br>24 h after hypoxia               | 0   | 2                                    | 1                     |
|  | I   | 2                                    | 2                     |
|  | II  | 2                                    | 3                     |
|  | III   | 2                                    | 2                     |

\* Stopień obniżenia oddychania tkankowego w porównaniu z homologiczną półkulą lewą;

Stopień I — 10—20%

II — 21—40%

III — 41%

\*) Degree of depression of tissue respiration as compared with homologus left hemisphere;

degree I — 10—20%

II — 21—40%

III — 41%

U zwierząt badanych bezpośrednio po niedotlenieniu, obniżenie zużycia tlenu przez skrawki kory mózgu pochodzące z półkuli po stronie podwiązania tętnicy szyjnej obserwowano jedynie w 3 przypadkach na 8 doświadczeń. Tylko w jednym przypadku obniżenie oddychania tkankowego przekraczało 20% oddychania półkuli przeciwległej, traktowanej jako kontrola (tabela 6).

Po upływie 3 godzin po niedotlenieniu u 4 zwierząt spośród 6 badanych występowało istotne obniżenie oddychania tkankowego skrawków pochodzących z półkuli poddanej działaniu czynnika ischemiczno-anoksyjnego, w porównaniu z półkulą przeciwległą. Obniżenie to wynosiło ponad 40% wartości oddychania półkuli kontrolnej. U dwóch pozostałych zwierząt odchylenia w oddychaniu, w porównaniu z półkulą przeciwległą, były nieznaczne (tabela 6).

Na ogólną liczbę 5 zwierząt badanych po upływie 12 godzin od niedotlenienia, jedynie u dwu wystąpiło wyraźne obniżenie zużycia tlenu przez skrawki pochodzące z półkuli uszkodzonej. Przekraczało ono 20% oddychania skrawków półkuli przeciwległej (tabela 6).

U zwierząt dekapitowanych po upływie 24 godzin od niedotlenienia wykazano największe zróżnicowanie zaburzeń oddychania tkankowego w poszczególnych przypadkach (tabela 6). Na 8 zwierząt badanych w tej grupie u 2 wystąpiło bardzo znaczne obniżenie zużycia tlenu w korze półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej. Zużycie tlenu wynosiło tu zaledwie 26% i 46% wartości oddychania homologicznej półkuli. U dalszych 3 zwierząt tej grupy oddychanie tkankowe skrawków półkuli uszkodzonej wynosiło około 70% oddychania półkuli kontrolnej, a u pozostałych 3 zwierząt różnice w oddychaniu homologicznych półkul były nieznaczne.

We wszystkich badanych przypadkach (z wyjątkiem 2 zwierząt w grupie 3-godzinnej) skrawki z półkuli uszkodzonej pomimo obniżenia wskaźnika oddechowego zachowywały zdolność do reagowania podwyższeniem metabolizmu tlenowego na zwiększone stężenia KCl w środowisku inkubacyjnym. Efekt pobudliwości metabolicznej był proporcjonalny do wyjściowej wartości oddychania spoczynkowego. Zniesienie stymulującego wpływu potasu na zużycie tlenu przez skrawki kory mózgu we wspomnianych 2 przypadkach dotyczyło zwierząt, u których zahamowanie oddychania tkankowego było najsilniejsze.

Badania aktywności cytoplazmatycznych enzymów związanych z przemianą glukozy w cyklu pentozowym (DH G6P, DH 6PGA), we wczesnym okresie po niedotlenieniu (bezpośrednio i po 3 godzinach) nie wykazały różnic pomiędzy homologicznymi półkulami mózgu. Wykazano

natomiast średni wzrost aktywności DH G6P w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Wynosił on + 21% w grupie badanej bezpośrednio po niedotlenieniu i + 33% w grupie 3-godzinnej (tabela 7). Aktywność DH 6PGA nie wykazywała znamienych różnic w porównaniu z kontrolą, aczkolwiek i tu obserwowano tendencję do wzrostu jej aktywności.

Tabela 7. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i dehydrogenazy kwasu 6-fosfogluconowego w mózgu szczura we wczesnych okresach rozwoju encefalopatii anoksyjno-ischemicznej ( $\Delta OD_{340}$  min/mg białka  $\times 10^3 \pm SD$ )

Table 7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase activity in rat brain in early period of developing anoxic-ischemic encephalopathy ( $\Delta OD_{340}$  min/mg protein  $\times 10^3 \pm SD$ )

| Okres badania — Period of investigation   | Aktywność<br>specyficzna<br>DH — G6P<br>Specific activity<br>G6P — DH | Aktywność<br>specyficzna<br>DH — 6PGA<br>Specific activity<br>6PGA — DH |
|---|---|---|
| Kontrola I<br>(szczury prawidłowe)<br>Control I<br>(normal rats)  | $43 \pm 4,34(10)$   | $14 \pm 1,87(10)$   |
| Kontrola II<br>(24 godziny po podwiązaniu tętnicy szyjnej<br>prawej)<br>Control II<br>(24 h after ligation of right common carotid<br>artery)   | $44 \pm 3,81(10)$   | $14 \pm 2,55(10)$   |
| 0 — 15 min. po niedotlenieniu<br>0 — 15 min. after hypoxia  | $52 \pm 6,48*(10)$  | $12 \pm 1,41(10)$   |
| 3 godz. po niedotlenieniu<br>3 h after hypoxia  | $57 \pm 6,16*(12)$  | $16 \pm 5(10)$  |
| 12—24 godz. po niedotlenieniu (półkula lewa —<br>działanie jedynie czynnika anoksyjnego)<br>12—24 h after anoxia (right hemisphere —<br>after action of anoxic — agent)                   | $43 \pm 6,1(13)$  | $14 \pm 2,21(11)$   |
| 12—24 godz. po niedotlenieniu (półkula<br>prawa — działanie czynnika anoksyjno-<br>ischemicznego)<br>12—24 h after anoxia (right hemisphere —<br>after action of anoxic — ischemic agent) | $36 \pm 4,9*(13)$   | $12 \pm 2,83(11)$   |

\*  $p < 0,01$  w porównaniu z kontrolą I (w nawiasach podano liczbę doświadczeń)  
 $p < 0,01$  as compared with control I (in parentheses number of experiments)

W okresie 12 — 24 godz. po niedotlenieniu obserwowano statystycznie znamienne obniżenie aktywności DH G6P w półkuli mózgu po stronie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej. Natomiast półkula przeciwna, poddana wyłącznie działaniu anoksji, bez udziału czynnika ischemicznego, w tym samym okresie czasu, nie wykazywała obniżenia aktywności DH G6P, w porównaniu do grupy kontrolnej. Należy podkreślić dużą rozpiętość wyników w poszczególnych doświadczeniach; obniżenie aktywności wahało się od wartości statystycznie nieznamiennych do około 25% u zwierząt z najcięższymi uszkodzeniami.

c. Badania histologiczne i histochemiczne. W grupie 5 zwierząt badanych w 3 godz. po niedotlenieniu, tylko u jednego obserwowano wyraźne, ogniskowe uszkodzenie półkuli po stronie podwiązania tętnicy szyjnej. W obrębie ogniska i w jego sąsiedztwie występowało bardzo znaczne poszerzenie światła naczyń krwionośnych oraz wywędrowanie przez ich ściany obojętnochłonnych leukocytów do tkanki otaczającej (ryc. 5).

U pozostałych zwierząt w tej grupie nie obserwowano wyraźnych uszkodzeń ogniskowych. Występowały natomiast zlateralizowane, rozsiane ubytki pojedynczych komórek nerwowych oraz cechy zwyrodnienia neuronów pod postacią chromatolizy typowej dla schorzenia ischemicznego i ciężkiego (ryc. 6).

Obraz histochemiczny półkul mózgu wykazywał wyraźne, w porównaniu z kontrolą, zmniejszenie liczby dużych komórek nerwowych, wykazujących dodatnią reakcję enzymatyczną. Neuropil głębokich warstw kory wykazywał również obniżenie aktywności enzymatycznej, szczególnie w przypadku SDH i LDH, przy czym natężenie zmian było nierównomierne (ryc. 7).

We wszystkich przypadkach obserwowano wyraźniejszy w porównaniu z kontrolą odczyn formazanowy z G6P jako substratem, występujący w astrocytach podkorowej istoty białej i w głębokich warstwach kory (ryc. 8). W przeciwieństwie do jednostronnych zmian w aktywności enzymatycznej, obserwowanych w komórkach nerwowych i neuropilu, zaakcentowanie glejowego odczynu DH G6P było zjawiskiem obustronnym.

W obrazie morfologicznym wszystkich zwierząt uśpionych po 12 godz. od niedotlenienia (4 doświadczenia) stwierdzono odchylenia od stanu prawidłowego w obu półkulach mózgu, z wyraźnym nasileniem zmian w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy. U dwu zwierząt były obecne rozlane, a u dwu rozsiane ubytki komórek nerwowych w korze mózgu po stronie podwiązania, obejmujące głębokie warstwy kory w obszarze rozgałęzień tętnicy środkowej mózgu. W jednym przypadku występo-

wał ponadto zanik neuronów wzgórza wzrokowego i formacji węchomózgowia. We wszystkich przypadkach zanikowi komórek nerwowych towarzyszyły zmiany zwyrodnieniowe zachowanych neuronów o cechach tigrolizy typu ischemicznego i ostrego.

W obrazie histochemicznym tej grupy czasowej, stwierdzono znaczną równoległość zmian w aktywności badanych enzymów do opisanego powyżej obrazu morfologicznego. Rozlanym ubytkom neuronów odpowiadał, obejmujący komórki nerwowe i neuropil, zanik aktywności enzymatycznej we wszystkich badanych odczynach, najsilniej wyrażony w reakcji z bursztynianem sodu. Obserwowane zmiany obejmowały warstwy kory, a w jednym przypadku stwierdzono dodatkowe ognisko we wzgórzu wzrokowym (ryc. 9).

Grupa zwierząt badanych po upływie 24 godz. od niedotlenienia (16 zwierząt) wykazywała największe bogactwo i zróżnicowanie zmian morfologicznych i histochemicznych w porównaniu z poprzednimi grupami. U tych zwierząt z wyjątkiem jednego, stwierdzono wyraźną lateralizację zmian od strony podwiązanej tętnicy szyjnej. W 10 przypadkach występowały większe lub mniejsze ogniska o charakterze martwicy niezupełnej, w której komórki nerwowe ulegały rozpadowi, przy zachowanym niezmiennym lub pobudzonym gleju i nieuszkodzonych naczyń (ryc. 10).

W przypadkach o znacznej rozległości uszkodzeń, ogniska martwicy obejmowały wszystkie warstwy kory (ryc. 11), przechodząc na jądra podkorowe, a w jednym przypadku sięgając nawet do śródmózgowia. U wszystkich zwierząt obecne były liczne komórki nerwowe z cechami zwyrodnienia o typie schorzenia ischemicznego bądź ciężkiego, ostrego, a rzadziej homogenizacyjnego. Uszkodzenie komórek było zwykle obustronne, z tym, że liczba komórek uszkodzonych była znacznie większa po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej. Zmiany były tu rozleglejsze i występowały zarówno w korze mózgu, jak i w obrębie węchomózgowia, prążkowie, gałki bladej, wzgórza, podczas gdy po stronie przeciwległej ograniczały się do III i IV warstwy kory mózgu i do kory zawoju hipokampa. W jednym tylko przypadku, przy wyjątkowej rozległości ogniska martwicy, stwierdzono rozlane zmiany zwyrodnieniowe neurocytów pnia mózgu i kory mózdzku (ryc. 12, 17).

Obraz histochemiczny wykazywał pełną równoległość z opisanymi zmianami morfologicznymi. Ogniskom martwicy niezupełnej towarzyszył z zasady całkowity brak reakcji histochemicznej SDH, LDH, DH G6P w neuronach i neuropilu, z utrzymanym odczynem w astrogleju (ryc. 13, 15), a niekiedy nawet z zaakcentowaną aktywnością DH G6P. Zjawiskiem stosunkowo częstym było utrzymanie się wysokiej aktyw-

ności enzymatycznej w otoczeniu ognisk pozbawionych odczynu (martwiczych), a także wokół naczyń (ryc. 14).

We wszystkich przypadkach, z wyjątkiem jednego, występowało wyraźne zaakcentowanie odczynu z G6P jako substratem w neurogleju podkorowej istoty białej po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej (ryc. 16). To samo zjawisko wystąpiło w 4 przypadkach w reakcji z substratem bursztynianowym i mleczanowym.

#### DYSKUSJA

Dobór modeli doświadczalnych w naszych obserwacjach pozwalał na ocenę następstw metabolicznych i strukturalnych krótkotrwałego (model anoksji prostej) i przedłużonego (model anoksyjno-ischemiczny, półkula przeciwległa do podwiązanej tętnicy szyjnej) niedotlenienia, oraz efektów przedłużonego niedotlenienia skojarzonego z upośledzeniem krążenia mózgowego (model anoksyjno-ischemiczny, strona podwiązanej tętnicy).

Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno krótkotrwała jak i przedłużona hypoksja, bez współistnienia dodatkowego czynnika niedokrwienego nie prowadzi do trwałych zaburzeń metabolicznych, ani do rozległych nieodwracalnych uszkodzeń morfologicznych. Otrzymane wyniki badań pokrywają się z obserwacjami Bernelli-Zazzera i wsp. (1959), którzy w mózgach szczurów poddanych hypoksji, również nie wykazali zaburzeń metabolicznych ciągu glikolitycznego, ani przemiany w cyklu Krebsa.

Znacznie większe zmiany poanoksyjne obserwowano w tkance nerwowej u zwierząt, u których niedotlenienie poprzedzono jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej. Zmiany te w okresie wczesnym wyrażały się rozlanymi zwyrodnieniami neuronów, a po upływie 24 godzin miały charakter rozległych ognisk martwicy całkowitej, a częściej selektywnej, występujących w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. Nieprawidłowościom histologicznym towarzyszyły zmiany w obrazie histochemicznym tkanki, wyraźne dopiero po upływie 12 godzin od niedotlenienia, choć uchwytnie już po 3 godzinach. Tu również występowały wczesne zaburzenia oddychania tkankowego, wyprzedzające w czasie pojawienia się zmian uchwytnych w obrazie morfologicznym tkanki. Jednocześnie prawie we wszystkich przypadkach, utrzymywała się większa lub mniejsza populacja komórek nerwowych o niezaburzonych procesach oddechowych. Jej wielkość określała stopień obniżenia oddychania tkankowego skrawków oraz decydowała o ich zdolności do reagowania na bodźce stymulujące (podwyższone stężenie



nie  $K^+$ ) charakterystyczne dla metabolizmu komórek nerwowych (Domańska-Janik, Broniszewska-Ardelt 1971). Stałym i wczesnym wykładnikiem zaburzeń biochemicznych, zachodzących w tkance nerwowej pod wpływem niedotlenienia, był wzrost specyficznej aktywności DH G6P, obserwowany już w badaniach przeprowadzonych bezpośrednio jak i w 3 godz. po niedotlenieniu w modelu Levina. Spadek aktywności tego enzymu w półkuli poddanej wyłącznie działaniu niedotlenienia do poziomu wartości kontrolnych po upływie 12 — 24 godzin, wskazuje na odwracalność tego zjawiska.

Spadek aktywności poniżej wartości kontrolnych w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy po upływie 12 — 24 godzin, należy wiązać z rozwojem zmian martwiczych w tkance.

Wczesny wzrost specyficznej aktywności DH G6P mógł być traktowany jako wyraz uaktywniania się w tkance o zaburzonym przez hypoksję metabolizmie tlenowym glukozy, jej przemiany drogą innych szlaków metabolicznych, jak również może on odzwierciedlać wybiórczy proces aktywacji metabolizmu komórek glejowych, jako odczyn na niedotlenienie.

Nasze badania dotyczące korelacji pomiędzy intensywnością oddychania tkankowego, pobudliwością metaboliczną i aktywnością enzymów cyklu pentozowego w warunkach prawidłowych, wydają się pośrednio potwierdzać hipotezę o specyficzności przemiany pentozowej w stosunku do komórek glejowych. Aktywność DH G6P i DH 6PGA pozostaje w ujemnej korelacji z aktywnością oddechową badanych okolic i jest wykładnikiem aktywnego metabolizmu tlenowego komórek nerwowych.

Najwyższą aktywność enzymów związanych z cyklem pentozowym wykazywał rdzeń przedłużony, a najniższą kora mózgu. Stwierdzenie maksymalnej ich aktywności w istocie białej podkorowej, a więc strukturze nie zawierającej komórek nerwowych wskazuje na związek aktywności enzymatycznej dehydrogenaz cyklu pentozowego przede wszystkim z populacją komórek glejowych. Nasze obserwacje histochemiczne również wykazują żywą aktywność DH•G6P w gleju istoty białej podkorowej, która w warunkach prawidłowych zlokalizowana jest głównie w oligodendrocytach. Odczyn z G6P jako substratem jest najżywszą glejową reakcją histochemiczną w tkance nieuszkodzonej. Lowry (1957) w badaniach cytoenzymatycznych wykazał również wyraźne zróżnicowanie pomiędzy neuronami i glejem, dotyczące enzymów cyklu Krebsa i pentozowego, przy braku różnic w aktywności enzymów glikolitycznych. Ten specyficzny rozkład aktywności enzymatycznej potwierdzają również badania Buella i wsp. (1958), którzy wykazali wyższą aktywność

DH G6P w mielinowych strukturach tkankowych nie zawierających komórek nerwowych, oraz badania Appela (1970) nad aktywnością przemiany pentozowej w synapsach nerwowych. Badania innych enzymów cyklu pentozowego (transketolaz) wykazały również ich wysoką aktywność w istocie białej półkul mózgowych (Dreyfus 1962).

W warunkach hypoksji, jednocześnie z zaburzeniami tlenowej przemiany w cyklu Krebsa, dochodzi do stymulacji zarówno glikolitycznego szlaku Embdena - Meyerhofa - Parnasa (Lowry 1964) jak i enzymów cyklu Leloir'a (Mossakowski i wsp. 1968). Ta ostatnia prowadzi do wzmożonej syntezy glikogenu we wczesnych okresach poanoksyjnych (Rivera i wsp. 1969). Możliwe, że podobne zjawisko dotyczy również przemiany glukozy w cyklu pentozowym, powodując wzrost aktywności DH G6P, enzymu warunkującego wejście glukozy do tego szlaku (Kauffman i wsp. 1969). Wiąże się z tym również komórkowa lokalizacja aktywności enzymu. Według przyjętych obecnie poglądów astrocyty w ośrodkowym układzie nerwowym spełniają istotne funkcje transportowe dla wody i elektrolitów. Oksche (1961) i Friede (1965) uważają również, że transport śródmózgowy glukozy odbywa się drogą astrogleju. Wydaje się przy tym, że glukoza może być deponowana głównie w komórkach o funkcjach transportowych to jest w astrogleju (Mossakowski i wsp. 1968).

Zarówno nasze obserwacje jak i dane z piśmiennictwa wskazują, że wzrost aktywności enzymatycznej DH G6P dotyczył właśnie astrocytów i to już w bardzo wczesnych okresach doświadczenia. Zjawisko miało charakter uogólniony, obustronny i występowało zarówno w istocie białej podkorowej jak i w głębokich warstwach kory. Nawet w okresach późniejszych przy globalnym spadku aktywności enzymu w związku z rozwojem ognisk martwicy, stwierdzano w ich otoczeniu przetrwały komórki glejowe ze wzmożonym odczynem formazanowym w reakcji zarówno z G6P jak również z innymi substratami.

Stanowiło to wyraz przeobrażenia astrocytów w postać reaktywną. Wczesny wzrost aktywności DH G6P w komórkach gleju, wyprzedzający pojawienie się histologicznych cech gleju odczynowego, może również odzwierciedlać aktywację procesów związanych z syntezą białek w tych komórkach. W świetle powszechnie przyjętych poglądów, cykl pentozowy związany jest z procesami podziału komórkowego i z syntezą białek w ośrodkowym układzie nerwowym (Burt, Wenger 1961). Być może uaktywnienie astrocytów, prowadzące w późniejszych okresach do ich rozplemu i przerostu, daje w pierwszym okresie zmian, obraz wzrostu aktywności DH G6P.

Nasze obserwacje przeprowadzone na modelu anoksyjno-ischemicznym przemawiają za tym, że uogólnione zmiany enzymatyczne polega-

jące na rozległym, histochemicznie stwierdzalnym po upływie 24 godzin po niedotlenieniu, obniżeniu lub zaniku aktywności enzymów takich jak SDH, LDH czy DH G6P, rozwijały się wtórnie jako wynik niewydolności układów związanych bezpośrednio z procesami oddychania, wytwarzającymi energię w komórce. Wydaje się przeto słuszne przyjęcie, że uszkodzenie oddychania tkankowego, rozwijające się w krótkim czasie po niedotlenieniu jest procesem pierwotnym, związanym bezpośrednio z działaniem anoksji na komórkę nerwową. Za poglądem tym przemawiają ponadto badania ultrastrukturalne, wskazujące na wczesne uszkodzenie struktury mitochondriów w hypoksji (Bakay, Lee 1967, Becker 1961, Brown, Brierley 1968).

Wczesne uszkodzenie oddychania komórek przy zachowanej lub zwiększonej aktywności glikolitycznej może mieć istotne znaczenie dla patomechanizmu powstawania zmian poanoksyjnych w tkance nerwowej. Glikoliza beztlenowa bowiem, stanowiąca czynnik zabezpieczający tkankę nerwową przed niewydolnością energetyczną w warunkach hypoksji może prowadzić w wyniku gromadzenia się kwasu mlekowego do zakwaszenia tkanki wraz ze wszystkimi jego ujemnymi skutkami: uaktywnieniem się wewnątrzkomórkowych procesów autolitycznych (Friede 1963) i wtórną destrukcją białek enzymatycznych. Aktywację lizosomów w komórkach nerwowych po niedotlenieniu wykazali Becker i Barron (1961). Zmniejszenie pH tkanki w wyniku jej niedotlenienia pogłębia pierwotne uszkodzenie związane z niedoborem tlenu, powodując wystąpienie dodatkowych zaburzeń hemodynamicznych (zastój naczyniowy) i związanych z nimi zakrzepów naczyniowych i mikrozawałów. Zmiany te w przypadku krótkotrwałego niedotlenienia i prawidłowego krążenia ogólnego i miejscowego ulegają wyrównaniu. Wskazują na to między innymi nasze własne obserwacje, uzyskane w modelu anoksji prostej. Dyskretne objawy zaburzeń hemodynamicznych, spostrzegane w okresie bezpośrednio poanoksyjnym, cofają się całkowicie w krótkim okresie czasu, nie prowadząc do obrzęku mózgu. Zupełnie inaczej przedstawia się sytuacja w warunkach istniejących zaburzeń w krążeniu, ograniczających możliwość usuwania z tkanek produktów ich przemiany materii. Może wówczas dochodzić do miejscowej akumulacji kwasu mlekowego i zakwaszenia tkanki, które wraz z niedostatkami tlenowymi prowadzą do głębokich, nieodwracalnych uszkodzeń mózgu. Wydaje się, że takie właśnie warunki stwarza stosowany w naszych badaniach model anoksyjno-ischemiczny Levina. Obraz zmian morfologicznych w tym modelu, ograniczony niemal wyłącznie do obszaru unaczynienia tętnicy środkowej mózgu, swoją strukturą i natężeniem przypomina zespoły encefalopatii związanej z gwałtownymi, ostrymi i ciężkimi zaburzeniami krążenia, głównie o typie „car-

diac arrest" (Dąbska, Kahl-Kunstetter 1964). Bardzo podobną lokalizację zmian opisał Korthals (1969) w modelu doświadczalnym, kojarzącym ogólne zaburzenia krążenia krwi (zatrzymanie akcji serca) z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej. Lokalizacja zmian, typ uszkodzeń i ich nasilenie są również typowe dla niewydolności krążenia mózgowego, w którym istotną rolę odgrywa czynnik hypotensyjny (Brierley, Excell 1966) i zmniejszony przepływ krwi (Adams i wsp. 1966).

Dodatkowym argumentem przemawiającym za istotnym udziałem tego właśnie czynnika w kształtowaniu obrazu patologicznego encefalopatii anoksyjno-ischemicznej jest występowanie najgłębszych uszkodzeń tkankowych w „obszarach granicznych” głównych pni tętniczych mózgu. Ten właśnie rozkład powtarzający się w naszym materiale, obserwowali w swoich badaniach na tym samym modelu Levine (1960), Yap i Spector (1965) oraz Zeman (1963).

Pozostaje niewyjaśnione zagadnienie różnic we wrażliwości poszczególnych zwierząt na te same warunki niedotlenienia. Stopień uszkodzenia tkanki nerwowej wahał się od dyskretnych odchyłeń, rozsianych zwyrodnień poszczególnych neuronów, do rozległych martwic tkanki półkul mózgowych w modelu Levine'a. W większości prac związanych z zagadnieniem wpływu hypoksji na ośrodkowy układ nerwowy podkreślana jest duża rozpiętość natężenia zmian poanoksyjnych, przy zastosowaniu nawet najbardziej precyzyjnych i wystandaryzowanych modeli doświadczalnych. Potwierdza to złożoność problemu działania niedotlenienia na organizm. Poza charakterystycznym miejscowym działaniem na tkankę nerwową, niedotlenienie powoduje również szereg reakcji ogólnoustrojowych z uruchomieniem mechanizmów adaptacyjnych i regulujących, wymykających się w większości spod kontroli doświadczalnej.

#### WNIOSKI

1. W mózgu istnieje zróżnicowanie tlenowych szlaków przemian glukozy pomiędzy poszczególnymi strukturami anatomicznymi. Wykazuje ono ujemną korelację między intensywnością oddychania tkankowego w obecności glukozy a aktywnością badanych enzymów cyklu pentozowego. Zjawisko to jest zależne od ilościowych stosunków między neuronami a komórkami glijowymi w danej okolicy mózgu.

2. Krótkotrwałe niedotlenienie wywołuje powstanie dyskretnych, rozsianych zmian w obrazie histologicznym i histochemicznym mózgu, które nie powodują istotnych zaburzeń w zużyciu tlenu przez skrawki tkankowe. Obserwuje się natomiast nieznamienne statystycznie, ale

wyraźną tendencję do wzrostu aktywności pierwszego enzymu cyklu pentozowego, DHG6P, znajdującą wyraz przede wszystkim w badaniach histochemicznych.

3. Niedotlenienie o przedłużonym działaniu (20 — 40 minut) prowadzi do pogłębienia zmian morfologicznych i histochemicznych bez wyraźnego wpływu na oddychanie tkankowe, przy równoczesnym wzroście aktywności enzymów cyklu pentozowego (głównie DHG6P) w okresie wczesnym. Te ostatnie zmiany, związane z pobudzeniem gleju, mają charakter odwracalny i cofają się po upływie 24 godzin od niedotlenienia.

4. Skojarzenie działania czynnika anoksyjnego i ischemicznego wywołuje w okresie wczesnym spadek zużycia tlenu przez tkankę nerwową i wzrost aktywności enzymów cyklu pentozowego, a w okresie późnym spadek zarówno oddychania tkankowego jak i aktywności badanych enzymów. Zjawisko to należy łączyć z powstaniem w tym czasie zmian martwiczych w tkance.

5. Obniżenie oddychania tkankowego w następstwie niedotlenienia odnieść należy przede wszystkim do uszkodzenia komórek nerwowych, a wzrost aktywności enzymów cyklu pentozowego do pobudzenia gleju, przede wszystkim astrocytarnego, przekształcającego się w tzw. glej odczynowy.

К. Доманьска-Яник

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ И НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ КИСЛОРОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

##### Резюме

В исследованиях, проведенных на 4 анатомических частях мозга (кора, средний мозг, ствол, мозжечок) морской свинки и крысы в нормальных условиях, была обнаружена противоположная дыхательной активности срезов локализация активности энзимов, входящих в цикл пентозного метаболизма: DH G6P и DH 6PGA.

В условиях краткосрочной гипоксии не наблюдались отчетливые метаболические нарушения (дыхания срезов, активность дегидрогеназ пентозного цикла), ани морфологические повреждения или изменения в гистохимической картине нервной ткани. В результате более глубокой гипоксии, длящейся около 20 мин, но с сохранением правильного кровообращения мозговых сосудов, наблюдались диффузные дегенерации нейронов, типичные для гипоксических мозгов и дающие при гистохимических исследованиях картину уменьшения активности дыхательных и гликолитических энзимов и энзимов пентозного цикла. Одновременно наблюдалось усиление энзиматической активности, главным образом DH G6P в глиальных клетках. Биохимические

определения показали рост активности этого энзима в ранних периодах гипоксии, но в этой модели не наблюдали нарушения дыхания мозговых срезов *in vitro*. При сопряженной с ишемией гипоксии (подвязка общей сонной артерии) postanоксические повреждения тканей подвергались значительному усилению. Это проявилось так в морфологической картине (наличие района полного или частичного некроза участков, снабжаемых средней артерией мозга), гистохимической (исчезновение энзиматической активности отдельных нейронов или районов, занятых некрозом как и в биохимических исследованиях (уменьшение дыхательной активности срезов мозга и активности дегидрогеназ пентозного цикла). Снижение дыхательной активности срезов предшествовало во времени появлению гистологических повреждений мозговой ткани. Одновременно, в ранних периодах, до 3 часов после гипоксии, имело место усиление энзиматической активности связанное с активацией глиальных клеток.

K. Domańska-Janik

#### EXPERIMENTAL HYPOXIA AND SOME PROBLEMS OF OXYGENIC GLUCOSE METABOLISM IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

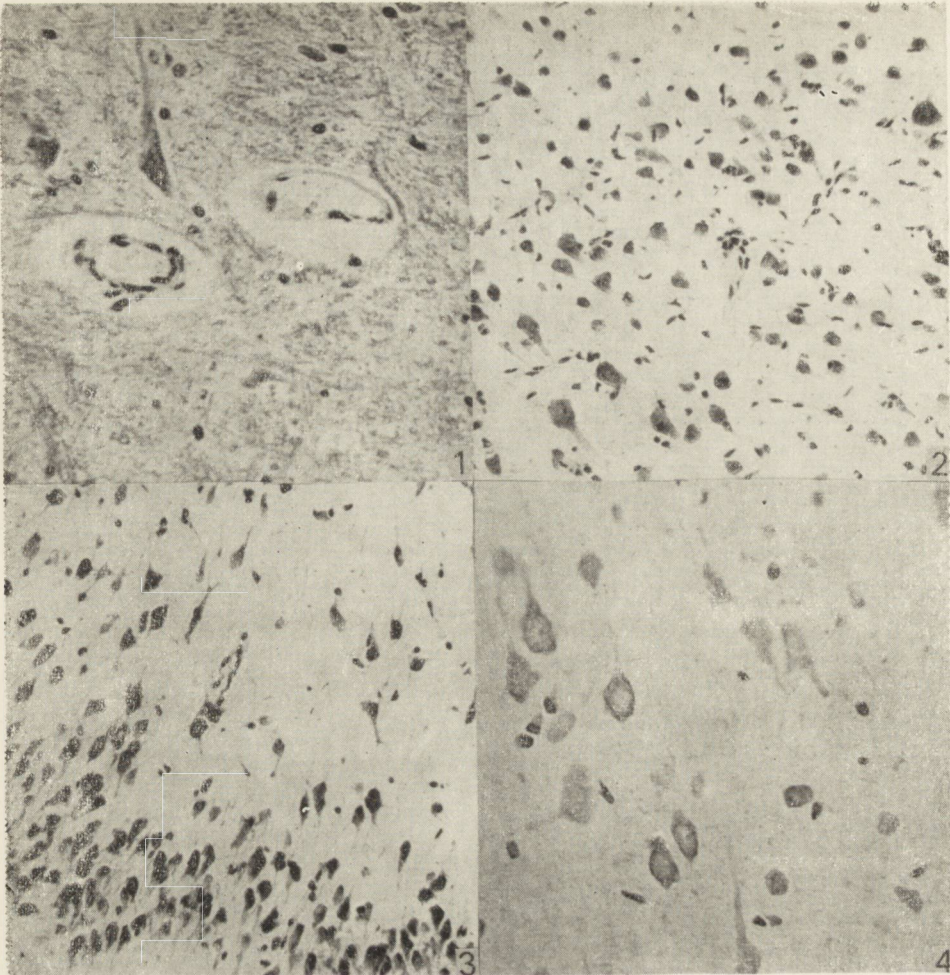
##### S u m m a r y

In the investigations performed on the four anatomical parts of the brain (cortex, mesencephalon, brain stem, cerebellum) of the guinea pig and rat under normal conditions, the distribution of the activity of the enzymes belonging to the pentose cycle — G6P DH and 6PGA DH was found to be opposed to the respiratory activity of the slices.

Under conditions of 3 min of acute hypoxia, no significant metabolic disturbances were observed (slice respiration, pentose cycle DH-ase activity), neither morphological lesions nor changes in the histochemical picture of the nervous tissue were found.

Following 20 min of simple acute hypoxia disseminated degeneration of neurones was noted typical for brain subjected to hypoxia and giving in histochemical investigations a picture of reduced activity of the respiratory (SDH), glycolytic (LDH) and pentose cycle enzymes (G6P DH). At the same time an enhanced activity mainly of G6P DH was observed in the glial cells. Biochemical determinations demonstrated an increased activity of the latter enzyme in early periods of hypoxia. No respiratory disturbances, however, were observed in this model in brain slices *in vitro*.

When hypoxia was combined with ischemia (ligation of the common carotid artery), the postanoxic lesions of the tissue were much more pronounced. This was visible both in the morphological picture (complete and incomplete necrosis in areas supplied by the cerebral middle artery) and in the histochemical results (fall or decrease of enzymatic activity of the particular neurones in areas undergoing necrosis) and in biochemical studies (decrease of respiratory activity of brain slices and of the DH-ases of the pentose cycle). The depression of the respiratory activity of the brain slices preceded in time the appearance of histological lesions in the brain tissue. At the same time, up to three hours of hypoxia an enhanced G6P DH activity was noted associated with activation of the glial cells.



*Ryc. 1.* Poszerzenie światła drobnych tętniczek, zatarcie rysunku ściany naczynia, poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej. Niedotlenienie proste ostre. Preparat wykonany bezpośrednio po niedotlenieniu. Barw. fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

*Fif. 1.* Widened lumen of small arterioles, obliterated pattern of vascular wall, widened perivascular space. Simple acute hypoxia. Section made immediately after hypoxia. Cresyl violet, X 200.

*Ryc. 2.* Chromatoliza komórek nerwowych wzgórza wzrokowego z towarzyszącym odczynem gleju. Niedotlenienie proste, ostre; 3 godziny po niedotlenieniu. Barw. fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

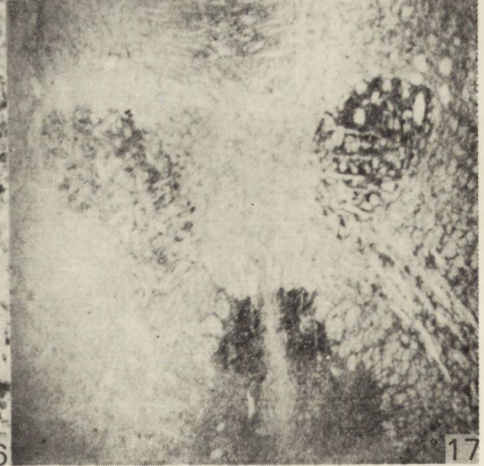
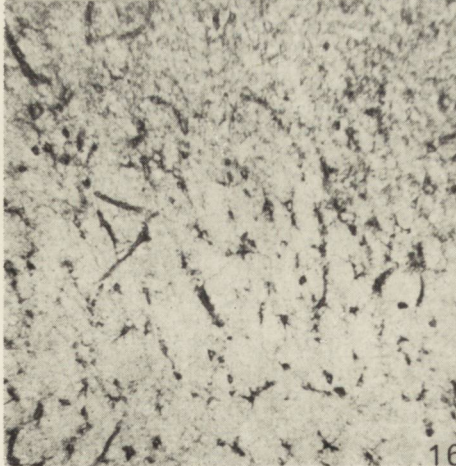
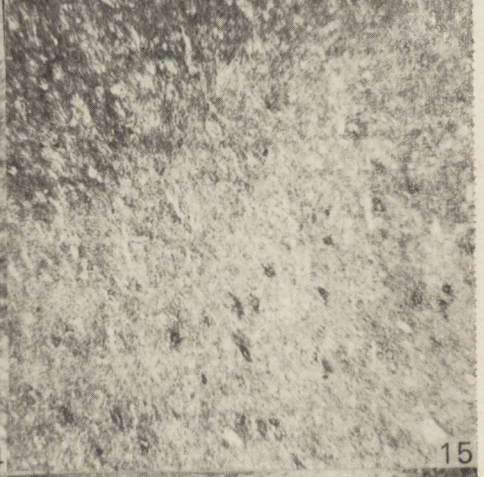
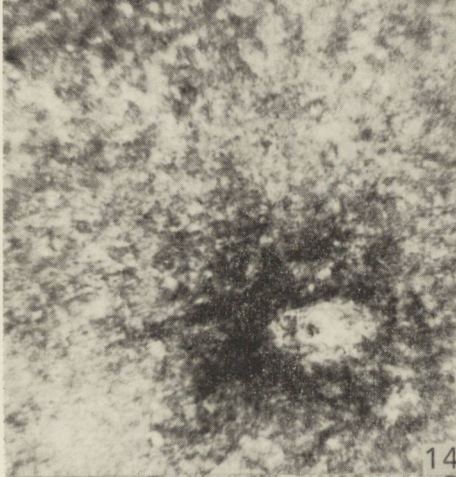
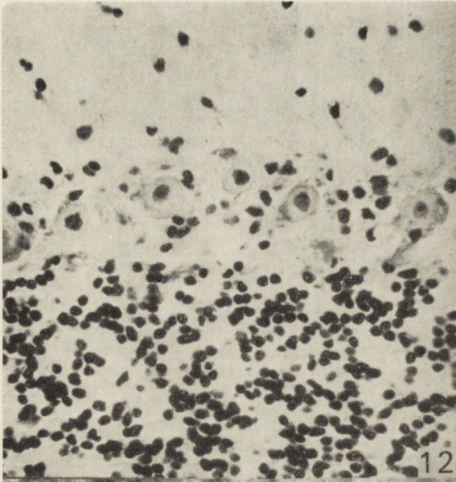
*Fig. 2.* Chromatolysis of nerve cells of the thalamus associated with glial reaction. Simple acute hypoxia, 3 h after hypoxia. Cresyl violet, X 200.

*Ryc. 3.* Ogniskowy ubytek neuronów w korze mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej 48 godzin po podwiązaniu. Barw. fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

*Fig. 3.* Focal neuronal loss in cerebral cortex on the side of the ligated common carotid artery 48 h after ligation. Cresyl violet, X 200.

*Ryc. 4.* Tigroliza komórek piramidowych w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej 24 godziny po podwiązaniu. Barw. met. Klüver-Barrera. Pow. 400 X.

*Fig. 4.* Tigrolysis of pyramidal cells in brain hemisphere on the side of the ligated common carotid artery 24 h after ligation. Klüver-Barrera staining, X 400.





## PIŚMIENICTWO

1. Appel S. H., Parrot B. L.: Hexose monophosphate pathway in synapses. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 1619 — 1626.
2. Adams J. H., Brierley J. B., Connor R. C. R., Treip C. S.: The effects of systemic hypotension upon the human brain. Clinical and neuropathological observation in 11 cases. *Brain*, 1966, 89, 235—268.
3. Bakay L., Lee J. C.: Electron microscopy of cat brain after hypoventilation. *J. Neuropath.*, 1967, 26, 169 — 170.
4. Brierley J. B., Excell B. J.: The effects of profound systemic hypotension upon the brain of M. Rhesus: Physiological and pathological observations. *Brain*, 1966, 89, 269 — 298.
5. Becker N. H.: The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in rats. II. Alternation in neuronal mitochondria identified by DPN and TPN-diaphorases. *J. Am. Path.*, 1961, 38, 587 — 597.

---

*Ryc. 12.* Schorzenie ischemiczne komórek Purkinjego w mózdku. Model Levine'a. 24 godziny po niedotlenieniu. Barw. fiolet krezyłu. Pow. 400 X.

*Fig. 12.* Ischaemic lesions of Purkinje cells in cerebellum. Levine's model, 24 h after hypoxia. Cresyl violet, X 400.

*Ryc. 13.* Ostra granica zaniku aktywności SDH w korze mózgu po stronie podwiązanej tętnicy. W polu pozbawionego aktywności enzymatycznej neuropilu widoczne astrocyty z utrzymanym odczynem na SDH. Model Levine'a, 24 godziny po niedotlenieniu. Pow. 100 X.

*Fig. 13.* Sharply delineated border of disappearance of SDH activity in cerebral cortex on the side of the ligated artery. In the neuropile area depleted of this enzymatic activity, astrocytes are visible with preserved SDH reaction. Levine's model, 24 h after hypoxia, X 100.

*Ryc. 14.* Rozlane obniżenie aktywności SDH we wzgórzu wzrokowym po stronie podwiązanej tętnicy. Wysoka aktywność w neuropilu w otoczeniu naczynia. Model Levine'a. 24 godziny po niedotlenieniu. Pow. 400 X.

*Fig. 14.* Diffuse reduction of SDH activity in optic thalamus on the side of the ligated artery. High activity preserved in neuropil surrounding vessel. Levine's model, 24 h after hypoxia, X 400.

*Ryc. 15.* Rozlane obniżenie aktywności SDH w neuropilu głębokich warstw kory mózgu. Neurocyty wykazują nierównomierne natężenie reakcji enzymatycznej. Model Levine'a, 24 godziny po niedotlenieniu. Pow. 100 X.

*Fig. 15.* Diffuse reduction of SDH activity in neuropil of deep cortical layers. In the background neurocytes are visible exhibiting a nonuniform intensity of enzymatic reaction. Levine's model, 24 h after hypoxia, X 100.

*Ryc. 16.* Wybitne wzmocnienie aktywności DH G6P w gleju istoty białej w obrębie ogniska i pod ogniskiem uszkodzenia kory. Model Levine'a, 24 godziny po niedotlenieniu. Pow. 200 X.

*Fig. 16.* G6P DH activity markedly enhanced in glia of white matter within and under focus of cortical lesion. Levine's model, 24 h after hypoxia, X 200.

*Ryc. 17.* Jednostronny zanik aktywności SDH w śródmózgowiu (jądro n. III i V). Model Levine'a, 24 godziny po niedotlenieniu. Pow. 30 X.

*Fig. 17.* Unilateral disappearance of SDH activity in mesencephalon (nuclei of nerves III and V). Levine's model, 24 h after hypoxia, X 30.

6. Becker N. H., Barron K. D.: The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in rats. I. Alternation of neuronal lysosomes identified by acid phosphatase activity. *Am. J. Path.*, 1961, 38, 161 — 175.
7. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature distribution an earliest stage of anoxic-ischaemic nerve cell damage in rat brain as defined by optical microscopy. *Brit. J. exp. Path.*, 1968, 49, 87—98.
8. Bernelli-Zazzera A., Bassi M., Cassi E.: Metabolism of isolated cortex from hypoxic rats. *Exp. Cell Res.*, 1959, 18, 554 — 559.
9. Buell M. V., Lowry O. H., Roberts N. R., Chang K. L., Kapplahn J. J.: The quantitative histochemistry of the brain. V. Enzymes of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1958, 232, 979 — 993.
10. Burt A. M., Wenger B. S.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the brain of the developing chick. *Devel. Biol.*, 1961, 3, 84 — 95.
11. Dąmbska M., Kahl-Kunstetter J.: Topografia uszkodzeń komórek nerwowych w przypadku „cardiac arrest”. *Neuropat. Pol.*, 1964, 2, 225 — 235.
12. Domańska-Janik K., Bróniszewska-Ardelt B.: Effect of potassium on glucose metabolism of guinea-pig and rat brain slices „in vitro”. *Neuropat. Pol.*, 1971, 3, 239 — 256.
13. Dreyfus P. M., Moniz R.: The quantitative histochemical estimation of transketolase in the nervous system of rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 65, 181 — 189.
14. Friede R. L.: Cerebellar edema. A metabolic and cell statistical analysis. *Arch. Neurol.*, 1963, 8, 67 — 81.
15. Friede R. L.: Enzyme histochemistry of neuroglia. In: *Biology of Neuroglia*. Ed. by De Robertis E., Carrea R., Elsevier Publ. Comp., 1965, 35 — 47.
16. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753 — 760.
17. Kauffman F. C. Brown J. G., Passonneau J. B. Lowry O. B.: Effects of changes in brain metabolism on levels of pentose phosphate pathway intermediates. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 3647 — 3653.
18. Klüver H., Barrera E.: A method for combined staining of cells and fibers in nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1953, 12, 400 — 404.
19. Korthals J.: Doświadczalne niedotlenienie mózgu u królika. *Klinika i morfologia. Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 113 — 160.
20. Levine S.: Anoxic-ischaemic encephalopathy in brain. *Am. J. Path.*, 1960, 36, 1 — 18.
21. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X., Schulz D. W.: Effect of ischaemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 18 — 30.
22. Lowry O. H.: Enzyme concentration in individual nerve cell bodies. In: *Metabolism of the nervous system.*, Ed. Richter, 1957, 323 — 328.
23. Layne E.: Protein estimation with Folin-Ciocalteu-Reagent. In: *Methods in Enzymology*. Ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Acad. Press N. York 1957, 3, 448 — 450.
24. Löhr G. W., Walter H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Ed. H. U. Bergmeyer. Acad. Press, N. York 1963, 744 — 751.

25. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., De Curet R. H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 500 — 523.
26. Oksche A.: Der histochemische nachweisbare Glykogenaufbau und — abbau in den Astrocyten und Ependymzellen. *Z. Zellforsch.*, 1961, 54, 307 — 361.
27. Pasquini J. M., Kaplun B., Garcia Argiz C. A., Gomez C. J.: Hormonal regulation of brain development. *Brain Res.* 1967, 6, 621 — 634.
28. Pearse A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*. 2 Ed. Little, Brown and Comp., Boston 1960, 911.
29. Rivera A., Jr., Brann A. W. Jr., Miller J. R., Myers R. E.: Brain glycogen content of monkey newborns and juveniles recovering from asphyxia and circulatory arrest respectively. In: *IIInd Internat. Meet. Internat. Soc. Neurochem.* Ed. R. Paoletti, R. Fumagalli, C. Galli, Milano 1969, 342 — 343.
30. Zeman W.: Histochemical and metabolic changes in brain tissue after hypoxaemia. In: *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Ed. J. P. Schade, Oxford 1963, 327 — 348.
31. Yap S. L., Spector R., G.: Intracellular enzyme changes in postanoxic rat brain. *Brit. J. exp. Path.*, 1965, 46, 422 — 433.

Adres autorki: Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

KOMUNIKAT

Komisja Nagród Zarządu Głównego Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich w składzie:

Doc. dr med. Maria Dąbska — Przewodnicząca  
Doc. dr med. Hanna Jędrzejowska — Członek  
Dr med. Lech Iwanowski — Członek  
Prof. dr med. Mirosław Mossakowski — Redaktor Naczelny „Neuropatologii Polskiej”  
Doc. dr med. Jerzy Dymecki — Sekretarz SNP

na posiedzeniu w dniu 18 grudnia 1971 r. przyznała następujące nagrody za rok akademicki 1970/1971:

Nagrodę za najlepszą publikację postanowiono wyjątkowo za ten okres przekształcić w nagrodę za cykl prac i przyznać ją kol. Tadeuszowi Majdeckiemu (Zespół Neuropatologii CMD i K, PAN) za prace poświęcone ultrastrukturze chorób zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego opublikowane w Neuropatologii Polskiej w roku 1971, a mianowicie:

GM<sub>1</sub>-generalized gangliosidosis with unusual involment of the white matter — nr 2/1971

Zagadnienie ultrastruktury przejściowej postaci idiotia amaurotica — nr 2/1971

The problem of coexistence of neuronal lipid storage diseases and various forms of leucodystrophies — 3/1971

Obraz elektronowo-mikroskopowy dziecięcej encefalopatii gąbczastej — 4/1971

Prace były wykonane przy współudziale innych pracowników naukowych, w tym również samodzielnych, jednakże Komisja stanęła na stanowisku, że bezspornym autorem opracowania mikroskopowo-elektronowego jest kol. Majdecki, w związku z czym nie stanowi to przeszkody w przyznaniu mu nagrody — w wysokości 3.000 zł.

Nagrodę za najlepsze doniesienie przedstawione na posiedzeniach naukowych SNP w roku 1970/1971 przyznano kol. Wiesławowi Bleszyńskiemu (Zakład Biochemii Uniwersytetu im. M. Kopernika w Toruniu), za pracę pt. „Biochemiczne podstawy leukodystrofii metachromatycznej” wygłoszoną w dniu 24.IV.1971 r. — w wysokości 2.000 zł.

Nagrodę za najlepszą dokumentację doniesienia, przedstawionego na posiedzeniach SNP przyznano kol. Annie Fidziańskiej (Klinika Neurologiczna AM w Warszawie za dokumentację do pracy pt. „Struktury wiruso-podobne w komórce mięśniowej w przypadku zapalenia wielomięśniowego”, przedstawioną w dniu 23.X.1971 r. — w wysokości 1.000 zł.

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI, MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, JAN ALBRECHT,  
SŁAWOMIR JANUSZEWSKI

## WPLYW NIEDOKRWIENIA I NIEDOTLENIENIA NA BARIERE KREW-MÓZG U SZCZURÓW\*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: prof. dr med. M. J. Mossakowski

Pomimo licznych prac doświadczalnych poświęconych zagadnieniu wpływu różnych typów niedostatku tlenowego na ośrodkowy układ nerwowy, informacje dotyczące uszkodzenia bariery krew-mózg w niedotlenieniu są skąpe i kontrowersyjne.

Crone (1963) wykazał, że nawet ciężka hypoksja prowadząca do strukturalnych uszkodzeń oun nie powoduje zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla inuliny i cukrozy. Gunn i wsp. (1962) na modelu niedokrwienia mózgu, a Spector (1962) oraz Hill i Spector (1963) na modelu encefalopatii ischemiczno-anoksyjnej stwierdzili występowanie obrzęku mózgu, mierzonego zawartością wody w tkance. Mossakowski i wsp. (1968) w okołoporodowej asfiksji noworodków małych, a Long i wsp. (1971) w częściowym niedokrwieniu rdzenia kręgowego u kotów wykazali tylko nieznaczne i krótkotrwałe uszkodzenie naczyniowo-mózgowych mechanizmów barierowych. Bakay i Bendixen (1964) oraz Bakay (1967) stwierdzili, że samo niedotlenienie nie wywołuje zaburzeń przepuszczalności bariery krew-mózg, wykazali natomiast masywne zmiany w przepuszczalności przy skojarzeniu niedotlenienia i hyperkapnii i to dopiero w warunkach określonego obniżenia ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi tętniczej i spadku pH tkanki nerwowej poniżej 6,75.

Celem przeprowadzonych badań była ocena transportu do mózgu związków chemicznych, znakowanych pierwiastkami promieniotwórczymi, w warunkach niedotlenienia i umiarkowanego niedokrwienia oraz w modelu Levina (1960), kojarzącym działanie obu czynników i porównanie stanu barierowych układów naczyniowo-mózgowych z obrazem histologicznym tkanki nerwowej. Uzupełnienie badań histochemicznym oznaczaniem glikogenu w mózgu podyktowane było faktem, że szereg autorów uważa jego pojawienie się za subhistologiczny wykładnik uszkodzenia oun (Mossakowski i wsp. 1968, Klatzo i wsp. 1970, Mossakowski i Zelman 1971).

\* Praca częściowo subsydiowana z umowy polsko-amerykańskiej PL 480, Grant Public Health Service USA. Agreement 05-004-1.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 300 szczurów rasy Wistar, obu płci, wagi 150 — 250 g, odżywianych dietą standardową. Doświadczenia przeprowadzono w 4 następujących grupach:

- 1) grupa zwierząt kontrolnych nie poddanych żadnym zabiegom
- 2) grupa zwierząt z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej
- 3) grupa zwierząt z obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych
- 4) grupa zwierząt z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej przetrzymywanych dodatkowo w atmosferze z obniżoną zawartością tlenu (według metody opisaną przez Levina — 1960).

Zwierzętom grupy 2 i 3 podwiązywano w narkozie eterowej jednostronnie lub obustronnie tętnicę szyjną wspólną. Zwierzęta grupy 4 po zabiegu operacyjnym jak w grupie 2, umieszczano w komorze ze stałym przepływem mieszaniny gazów o składzie 96% azotu i 4% tlenu. Skład mieszaniny gazowej ustalono drogą pomiarów objętościowych z kontrolą ciśnienia cząstkowego tlenu elektrodą Clarka. W momencie wystąpienia bezdechu zwierzęta przenoszono do atmosfery normalnego powietrza do chwili powrotu spontanicznego oddychania (tylko w kilku przypadkach zachodziła konieczność zastosowania sztucznego oddychania metodą zewnętrzną), następnie umieszczano ponownie w komorze niskotlenowej, w której przetrzymywano je przez standardowy łączny okres 30 minut.

Dla oceny wpływu ostrej krótkotrwałej hypoksji część zwierząt przetrzymywano przez 5 minut w komorze zawierającej mieszaninę gazów, składającą się z 99% azotu i 1% tlenu.

W wybranych przedziałach czasowych wszystkie zwierzęta usypiano eterem, ważono i zabijano przez przecięcie serca (po uprzednim otwarciu klatki piersiowej). Przed zabiciem zwierząt pobierano 1,2 ml krwi z lewej komory serca.

Zwierzęta zabijano w następujących grupach czasowych: 10, 30 i 60 minut, 2, 3, 4, 5, 24, 48 i 72 godziny od momentu wywołania stanu patologicznego.

Zastosowano następujące związki znakowane:  $^{99m}\text{TcO}_4$  otrzymywany z kolumn molibdenowych, produkcji fmy Amersham, Anglia;  $^{75}\text{SE-l-selenometioninę}$  produkcji Centralnego Instytutu Badań Jądrowych, NRD;  $\text{Na}^{131}\text{J}$ ,  $^{131}\text{J}$ -albuminę ludzką,  $^{131}\text{J-4-J-antypirynę}$  oraz  $\text{Na}^{82}\text{Br}$ , produkcji Instytutu Badań Jądrowych w Świerku.

Związki promieniotwórcze o radioaktywności 4—40  $\mu\text{Ci}$  wstrzykiwano do żyły udowej w objętości 0,3 — 0,7 ml. W większości doświadczeń

prowadzonych do 5 godzin czas krążenia izotopu w ustroju zwierzęcia był równy czasowi trwania stanu patologicznego. U zwierząt z dłuższym przeżyciem i w niektórych doświadczeniach do 5 godzin przy użyciu  $\text{Na}^{131}\text{J}$ , czas krążenia izotopu wynosił 2 godziny, niezależnie od czasu trwania stanu patologicznego.

Do pomiarów radioaktywności pobierano 1 ml krwi oraz mózg wraz z pniem i mózdzkiem. Mózg dzielono wzdłuż spoidła wielkiego na 2 półkule i określano ciężar każdej z nich. Radioaktywność krwi, oddzielnie radioaktywność prawej i lewej półkuli mózgu mierzono w scyntylicyjnym liczniku studzienkowym z konwencjonalnym zestawem aparatów w czasie zapewniającym 3% dokładność statystyczną. Uzyskane wyniki wyrażono w formie następujących wskaźników: radioaktywności właściwej krwi i obu półkul mózgowych, odsetka podanej dawki przypadającej na 1 g tkanki każdej półkuli mózgu, stosunku radioaktywności właściwej każdej półkuli mózgu do radioaktywności właściwej krwi, odsetka podanej dawki w całkowitej krwi zwierzęcia i odsetka podanej dawki przypadającej na 1 g tkanki każdej półkuli mózgu z uwzględnieniem ciężaru ciała zwierzęcia. Oznaczano także stosunki ciężaru, radioaktywności mierzonej i radioaktywności właściwej lewej półkuli mózgu do prawej.

W dodatkowej grupie zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym określono całkowitą objętość krwi w stosunku do wagi ciała oraz objętość krwi zalegającej w mózgu po śmierci zwierzęcia. Oznaczenia te przeprowadzono u 5 szczurów wagi 200—250 g przy użyciu  $^{131}\text{J}$ -albuminy, która w warunkach prawidłowych nie przechodzi poza układ naczyniowy. Zwierzęta tej grupy uśmiercano w 15 minut po podaniu albuminy przez zmiażdżenie szyi, aby nie dopuścić do odpływu krwi z mózgu.

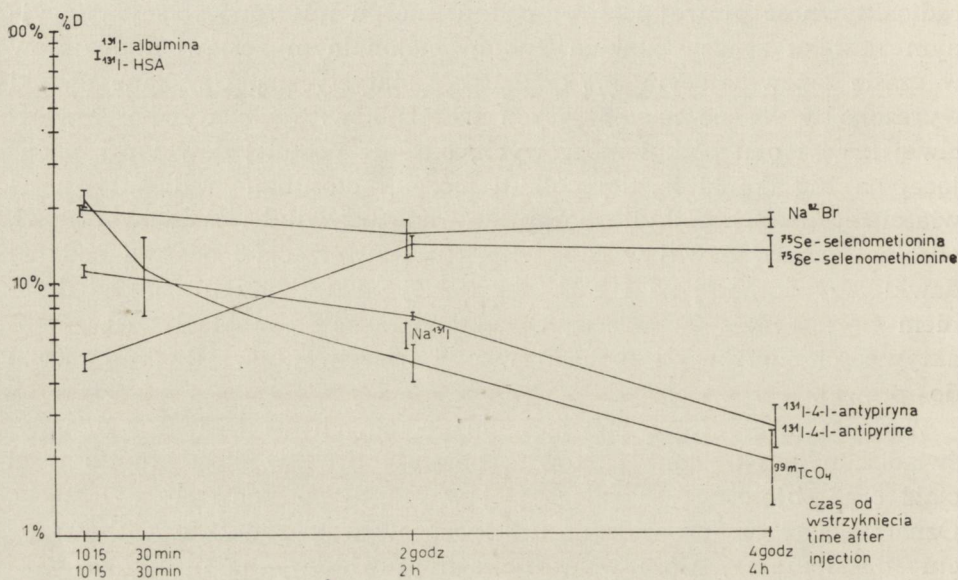
Badanie histologiczne mózgow oraz histochemiczne oznaczanie złogów glikogenowych przeprowadzono u 50 zwierząt w czasie 1—24 godziny w grupach czasowych analogicznych do stosowanych w badaniach izotopowych. Mózgi do badań histologicznych utrwalano *in situ* drogą przezsercowej perfuzji 10% zobojętnioną formaliną w roztworze soli fizjologicznej. Pobrane skrawki przeprowadzono w sposób standardowy do parafiny, preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyli i wg metody Heidenhaina. Glikogen oznaczano na skrawkach parafinowych pochodzących z mózgow utrwalonych w płynie Rossmana, wg metody opisanej przez Bulmera (1959).

#### WYNIKI

Wstępna analiza objętości całej krwi w stosunku do wagi ciała zwierzęcia wykazała, że stanowi ona 7% tej wagi. Objętość krwi zalegają-

cej w mózgu jest bardzo mała i wynosi średnio 0,02 ml/g tkanki, przy zakresach 0,016 — 0,026 ml/g. Uzyskane dane posłużyły w dalszej części pracy do określenia udziału radioaktywności krwi zalegającej w mózgu w jego ogólnej radioaktywności.

Ryc. 1 przedstawia odsetek podanej dawki we krwi całkowitej zdrowych szczurów po podaniu poszczególnych związków radioaktywnych w różnym czasie po wstrzyknięciu izotopu.



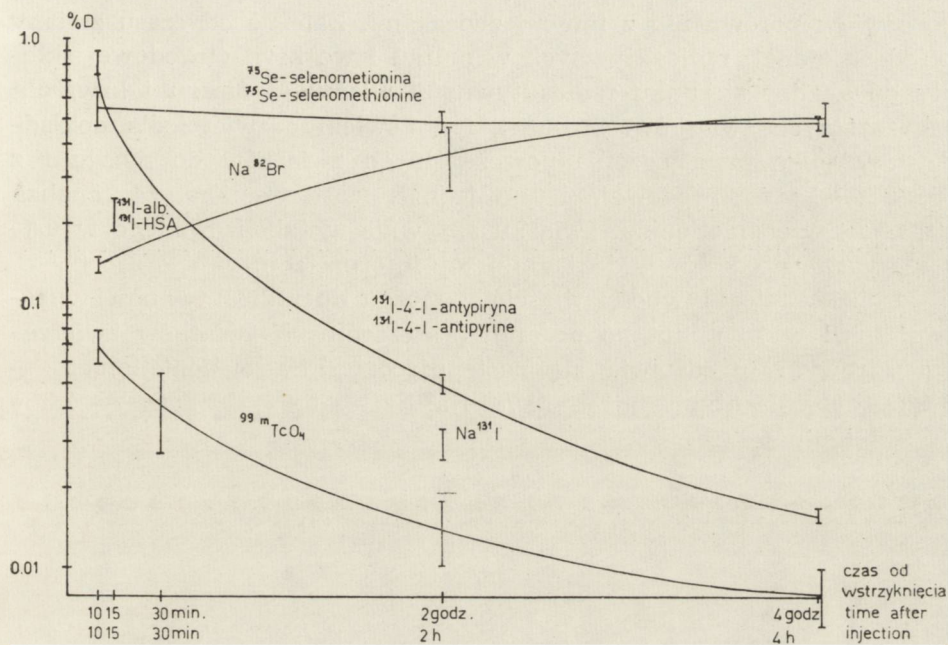
Ryc. 1. Odsetek dawki związków znakowanych w całej krwi jako funkcja czasu, u zdrowych szczurów po ich dożylnym wstrzyknięciu. Wartości średnie i odchylenia standardowe. Objętość całej krwi przyjęto jako 7% ciężaru ciała.

Fig. 1. Percent dose of the labelled compounds in the whole blood as a function of time in normal rats after i.v. injection. Mean values and standard deviations. Whole blood volume as a 7% body weight.

Radioaktywność krwi po 10 minutach od podania związku odzwierciedla głównie prędkość jego przechodzenia poza łożysko naczyniowe. Najszybciej opuszcza układ naczyniowy selenometionina, wolniej antypiryna, a jeszcze wolniej nadtechnetan i bromek. Najszybszy spadek radioaktywności krwi w funkcji czasu występuje po podaniu nadtechnetanu, nieco wolniejszy po podaniu antypiryny. Radioaktywność krwi po podaniu bromu utrzymuje się do 4 godzin w przybliżeniu na tym samym poziomie. Po podaniu selenometioniny radioaktywność krwi w przedziałach czasu 10 minut — 2 godziny wzrasta w przybliżeniu trzykrotnie, w dalszych czasach utrzymuje się na niezmiennym poziomie.



Ryc. 2 przedstawia stężenie poszczególnych związków w mózgu zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym w różnym czasie po ich podaniu.



Ryc. 2. Radioaktywność mózgu zdrowych szczurów jako funkcja czasu po dożylnym wstrzyknięciu związków znakowanych.

$\frac{\% D/g \times \text{ciężar ciała}}{100}$

Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 2. Radioactivity of the normal rat brain as a function of time after i.v. injection of the labelled compounds.

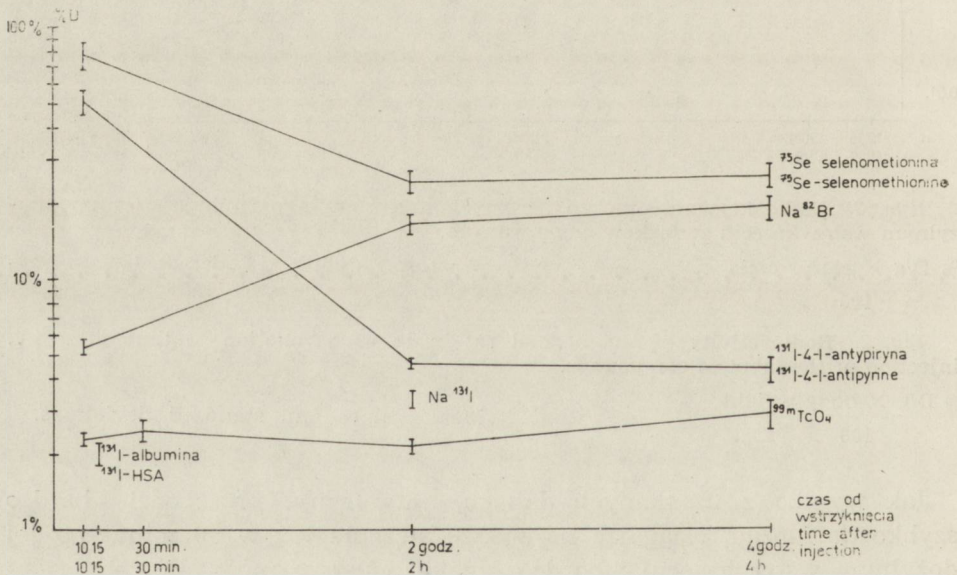
$\frac{\% D/g \times \text{body weight}}{100}$

Mean values and standard deviations.

Jak wynika z uzyskanych danych, antypiryna przechodzi bardzo szybko do mózgu, osiągając najwyższe stężenie już w 10 minut po jej dożylnym wstrzyknięciu i bardzo szybko opuszcza mózg. Również selenometionina przechodzi szybko do mózgu, jej stężenie w 10 minut od wstrzyknięcia jest jednak niższe niż antypiryny a radioaktywność mózgu w dalszych czasach utrzymuje się w przybliżeniu na stałym poziomie. Nadtechnetan przechodzi w minimalnych ilościach do mózgu. Jego stężenie jest niskie, a stwierdzana radioaktywność mózgu jest przede wszystkim wykładnikiem radioaktywności zawartej w nim krwi. Przechodzenie bromku jest znacznie wolniejsze i wzrasta do 4 godzin po

jego podaniu. Radioaktywność mózgu w 2 godziny po wstrzyknięciu  $\text{Na}^{131}\text{J}$  jest w przybliżeniu dwa razy wyższa w porównaniu z jego aktywnością po podaniu nadtechnetanu. Stosunkowo wysoka radioaktywność  $^{131}\text{J}$ -albuminy zależna jest od jej wysokiej radioaktywności we krwi w porównaniu z innymi związkami. Zależne od czasu zmiany stężeń substancji radioaktywnych w mózgu i we krwi obwodowej skłoniły do analizy stosunku radioaktywności właściwej mózgu i krwi dla poszczególnych związków. Stosunek ten bowiem odzwierciedla dokładniej dynamikę przechodzenia poszczególnych związków do mózgu i z mózgu do krwi obwodowej, z tym jednak zastrzeżeniem, że analiza krzywych selenometioniny, związku aktywnie metabolizowanego w ustroju, wymaga odrębnej, dokładniejszej interpretacji.

Stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi w 10 minut po podaniu poszczególnych związków zwierzętom zdrowym przedstawia się następująco:  $^{75}\text{Se}$ -selenometionina — 78,8%,  $^{131}\text{J}$ -4-J-antypiryna — 51%,  $\text{Na}^{82}\text{Br}$  — 5,4%,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  — 2,3% i  $^{131}\text{J}$ -albumina — 2%.



Ryc. 3. Stosunki radioaktywności właściwej mózg/krew jako funkcja czasu u zdrowych szczurów, po dożylnym wstrzyknięciu związków znakowanych.

$$\frac{\text{akt. własc. mózgu}}{\text{akt. własc. krwi}} \times 100$$

Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 3. Ratios of the specific radioactivity of brain blood as a function of time in normal rats, after i.v. injection of labelled compounds.

$$\frac{\text{spec. activity of brain}}{\text{spec. activity of blood}} \times 100$$

Mean values and standard deviations.

Analiza krzywych przedstawionych na ryc. 3 przemawia za nieznacznym przechodzeniem nadtechnetanu do mózgu, większym, lecz powolnym przechodzeniem bromku, oraz szybkiej dyfuzji antypiryny i jej redyfuzji z mózgu do krwi obwodowej. Charakter przebiegu krzywej selenometioniny w przedziale czasu 10 — 120 minut uwarunkowany jest znacznym przyrostem radioaktywności krwi obwodowej a nie spadkiem radioaktywności mózgu.

Stężenie związków znakowanych w mózgach szczurów po jednostronnym i obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych przedstawia ryc. 4.\* Jak wynika z przedstawionych danych, nie stwierdza się statystycznie znamiennych różnic w stężeniu związków promieniotwórczych w mózgach szczurów zarówno po jednostronnym jak i obustronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej w porównaniu do grup kontrolnych. Różnice występujące w 2 podgrupach — 4 godziny po podwiązaniu obu tętnic dla nadtechnetanu i 24 godziny dla selenometioniny w tych samych warunkach doświadczalnych uwarunkowane są, jak się wydaje, podaniem wyższej dawki. Przemawia za tym brak statystycznie znamiennych różnic stosunku radioaktywności właściwej mózgu do krwi w porównaniu z grupą kontrolną.

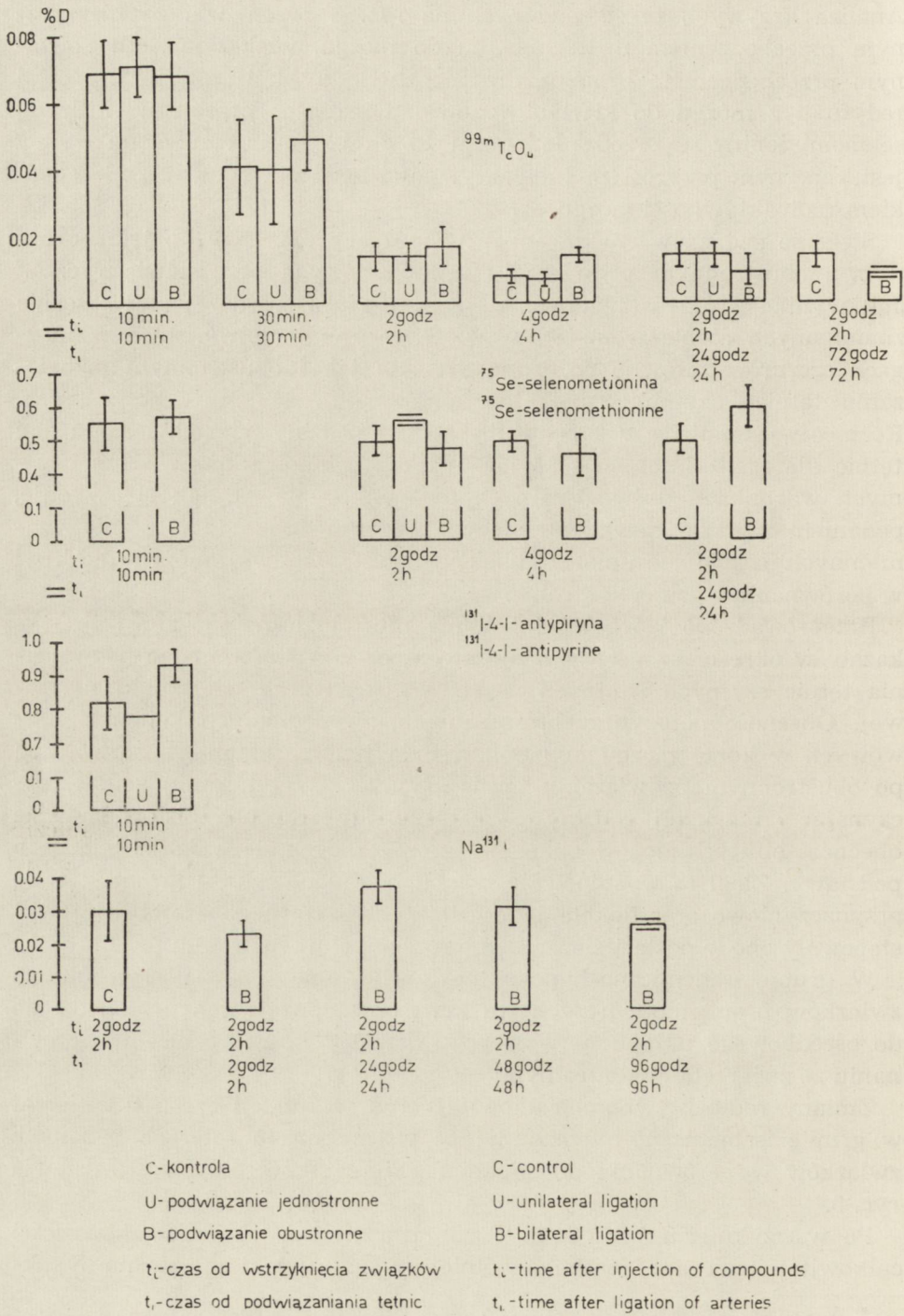
Przeprowadzone równoległe badania morfologiczne mózgow nie wykazały w okresie 1 — 24 godziny od jedno- lub obustronnego podwiązania tętnic szyjnych istotnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej. Obecność pojedynczych, rozsianych, zwyrodniałych komórek nerwowych w korze mózgu obu półkul była jedyną zmianą, obserwowaną po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych. W tej samej grupie, poczynając od drugiej godziny po zabiegu, stwierdzono histochemicznie obecność obfitych złogów glikogenu gromadzących się w korze i jądrach podstawy. Złogi te występowały w obu półkulach mózgu gromadząc się przynajmniej w postaci ziaren luźno rozsianych w neuropilu.

W grupie ischemiczno-hypoksyjnej zachowanie się poszczególnych związków promieniotwórczych we krwi obwodowej i ich przechodzenie do ośrodkowego układu nerwowego wykazały istotne różnice w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.

Zmiany radioaktywności całkowitej krwi w funkcji czasu u zwierząt w grupie ischemiczno-hypoksyjnej po wstrzyknięciu czterech badanych związków w porównaniu do zmian u zwierząt kontrolnych przedstawia ryc. 5.

Po wstrzyknięciu  $^{99m}\text{TcO}_4$  i  $^{131}\text{J}$ -antypiryny spadek radioaktywności całkowitej krwi jest znacznie wolniejszy w grupie ischemiczno-hypok-

\* W grupie tej badanie ograniczono do 4 substancji radioaktywnych, a mianowicie  $^{99m}\text{TcO}_4$ ,  $^{75}\text{Se}$ -selenometioniny,  $^{131}\text{J}$ -4-J-antypiryny i  $\text{Na}^{131}\text{J}$ .



Ryc. 4.

syjnej niż u zdrowych szczurow. U zwierząt, którym podano  $^{75}\text{Se}$ -selenometioninę widoczny jest znacznie wolniejszy wzrost radioaktywności całkowitej krwi w czasie między 10 min. a 2 godz. od wstrzyknięcia związku w porównaniu z jej wzrostem w warunkach prawidłowych. Jedynie u zwierząt badanych z użyciem  $\text{Na}^{82}\text{Br}$  nie obserwuje się istotnych różnic w radioaktywności całkowitej krwi w porównaniu z warunkami prawidłowymi. W tej grupie doświadczalnej ulegają również najczęściej istotnym zmianom stosunki radioaktywności właściwej lewej półkuli mózgu (poddanej skojarzonemu działaniu czynników ischemicznych i hypoksyjnych) do radioaktywności właściwej krwi w funkcji czasu (ryc. 6), podczas gdy wartości dla półkuli prawej poddanej wyłącznie działaniu niedotlenienia nie wykazywały statystycznie znamienych różnic w porównaniu z grupą kontrolną.

U zwierząt badanych przy użyciu  $^{99m}\text{TcO}_4$  obserwuje się po 2 godzinach znaczny, postępujący w czasie, wzrost radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych w porównaniu z poziomem radioaktywności w grupach kontrolnych. U zwierząt badanych  $^{131}\text{I}$ -4-J-antypiryną w przedziale czasu 45 minut — 2 godziny od ekspozycji na warunki niskotlenowe obserwuje się wolniejszy spadek radioaktywności półkuli lewej w porównaniu ze spadkiem radioaktywności mózgow zwierząt kontrolnych. Zwierzęta badane z użyciem  $^{75}\text{Se}$ -selenometioniny wykazały po 10 minutach niższy poziom radioaktywności półkuli lewej, wzrastający po 1 godzinie powyżej poziomu radioaktywności mózgow w grupach kontrolnych. Dalszy przebieg krzywej zależny jest głównie od wolniejszego wzrostu radioaktywności krwi obwodowej w tych czasach.

U zwierząt badanych z użyciem  $\text{Na}^{82}\text{Br}$  różnice radioaktywności nie są tak wyraźne, jednakże w czasie 2 i 4 godziny po ekspozycji obserwuje się niższy poziom radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych.

Porównanie stężeń związków promieniotwórczych oraz ciężarów obu półkul w modelu ischemiczno-hypoksyjnym przedstawiono na ryc. 7

Ryc. 4. Stężenie związków znakowanych w mózgu szczura po jednostronnym i obustronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej i wstrzyknięciu dożylnym.

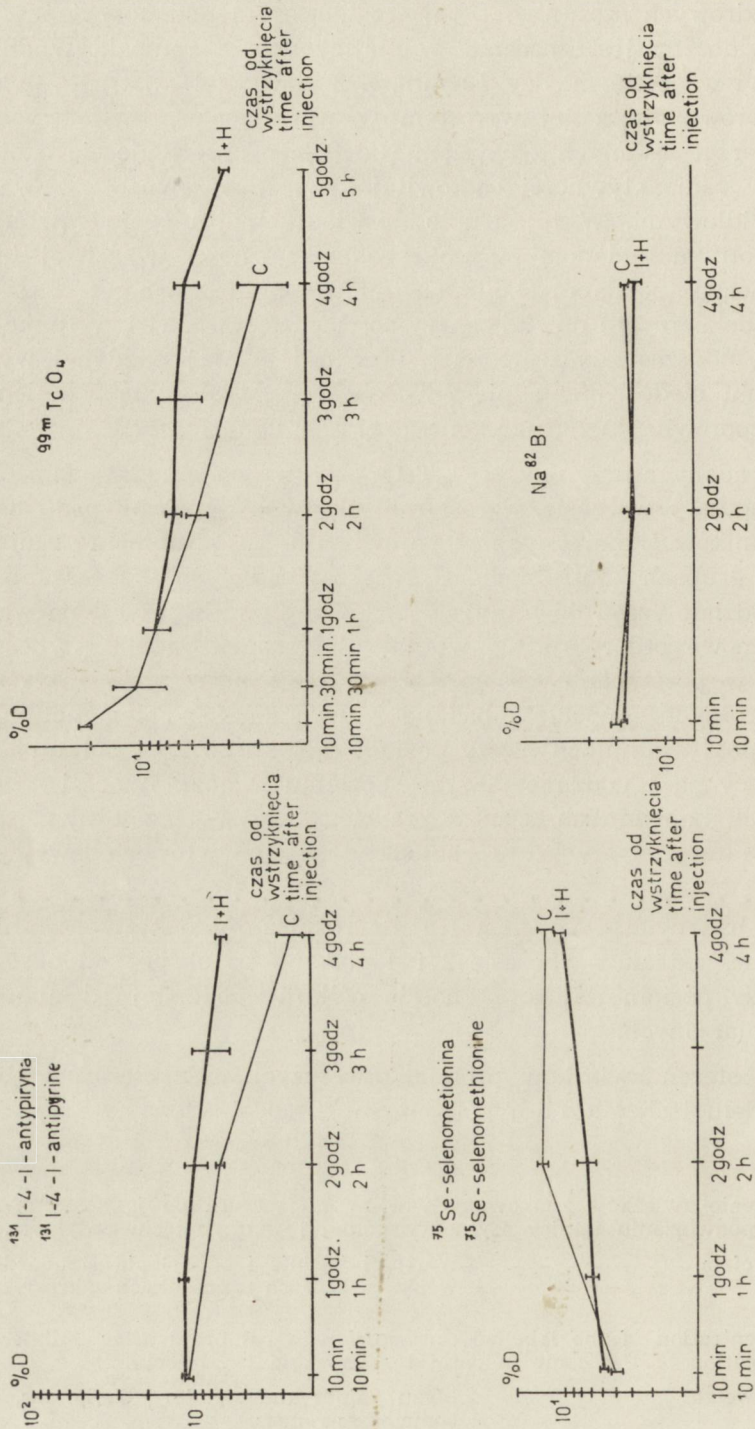
$\frac{\% \text{ D/g} \times \text{ciężar ciała}}{100}$

Wartości średnie i odchylenia standardowe, w niektórych przypadkach zakresy.

Fig. 4. Concentration of the labelled compounds in rat brain after unilateral and bilateral ligation of the common carotid artery and i.v. injection.

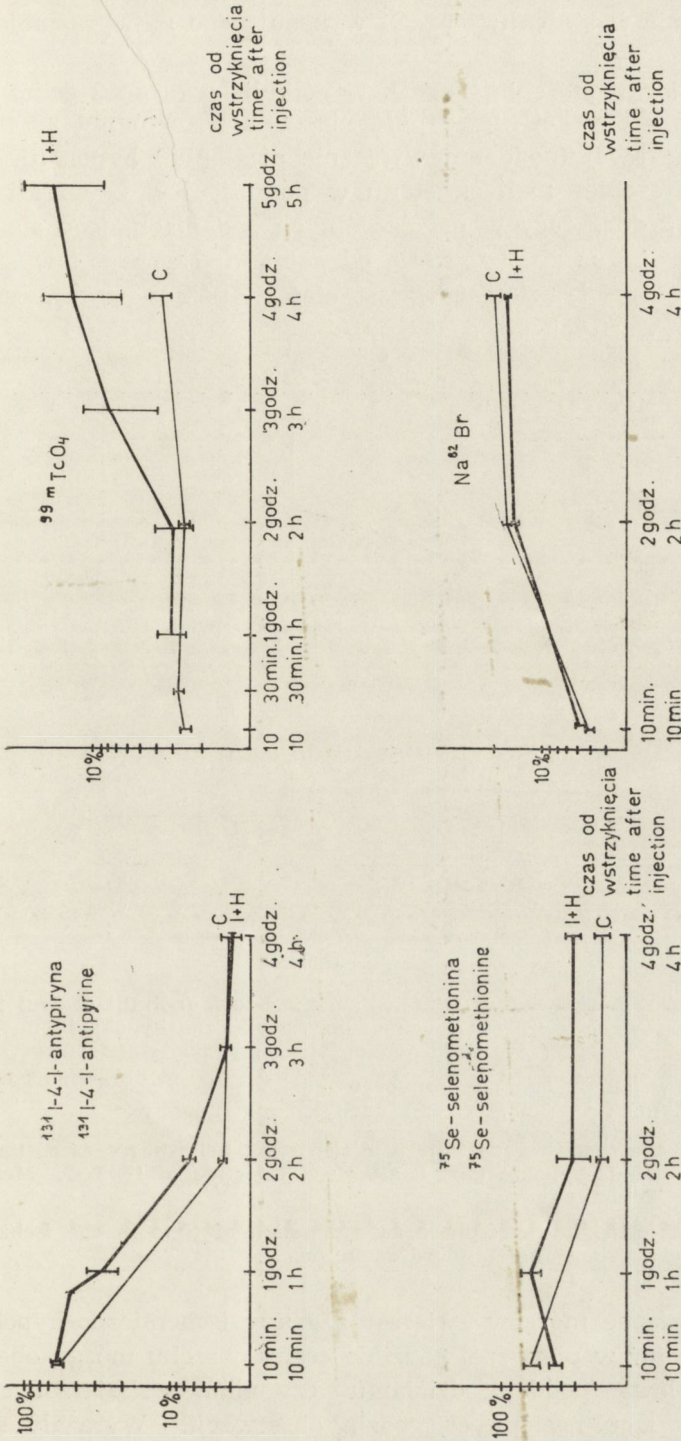
$\frac{\% \text{ D/g} \times \text{body weight}}{100}$

Mean values and standard deviations, in some cases ranges.



C - kontrola  
I+H - ischaemia i hipoksja

Ryc. 5. Odsetek dawki związków znakowanych w całej krwi jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po ich dożylnym wstrzyknięciu. Wartości średnie i odchylenia standardowe.  
Fig. 5. Percent dose of the radioactive compounds in the whole blood as a function of time in normal rats and in the ischaemic-hypoxic model, after i.v. injection. Mean values and standard deviations.

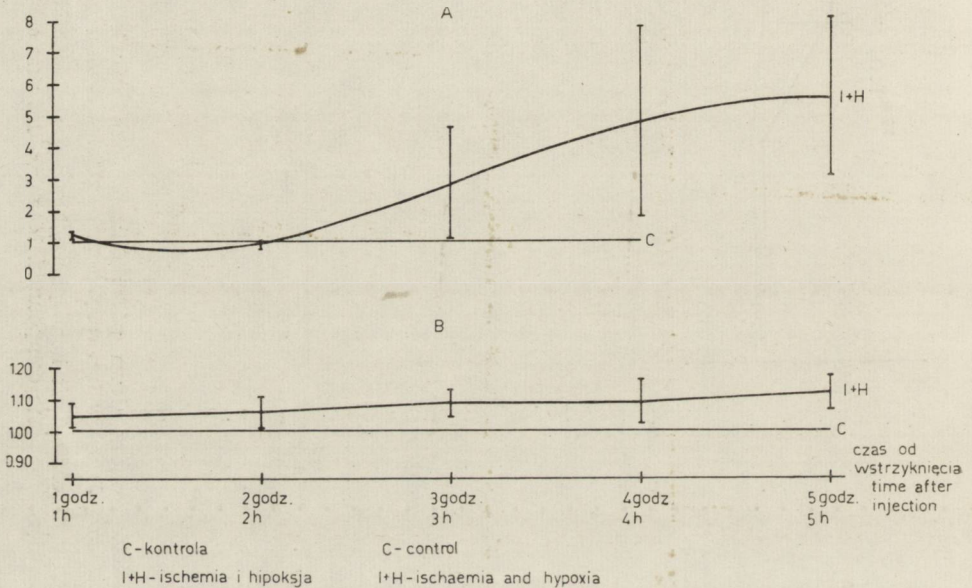


C - kontrola  
I+H - ischaemia i hipoksja

Fig. 6. Stosunki radioaktywności właściwej mózg (lewa półkula)/krew jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po dożylnym wstrzyknięciu związków. Wartości średnie i odchylenia standardowe. Fig. 6. Ratios of the specific radioactivity of brain (left hemisphere)/blood as a function of time in normal rats and in the ischaemic-hypoxic model, after i.v. injection of the compounds. Mean values and standard deviations.

na przykładzie różnic w stężeniu  $^{99m}\text{TcO}_4$  wykazującego najwyraźniejsze zmiany.

U większości zwierząt stężenie  $^{99m}\text{TcO}_4$  w półkuli lewej do 2 godz. od ekspozycji na warunki niskotlenowe było niższe w porównaniu ze stężeniem w półkuli prawej (poddanej wyłącznie działaniu hypoksji). W dalszych czasach stężenie nadtechnetanu w półkuli lewej wzrastało i przewyższało od 3 do 9 razy w poszczególnych badaniach, jego stężenie w półkuli prawej. Już po 1 godzinie od początku ekspozycji występował także u większości zwierząt wzrost ciężaru półkuli lewej, osiągający największe wartości po 5 godzinach.



Ryc. 7. A. Stosunki radioaktywności właściwej półkuli lewej/półkuli prawej jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po dożylnym wstrzyknięciu  $^{99m}\text{TcO}_4$ . Wartości średnie i odchylenia standardowe.

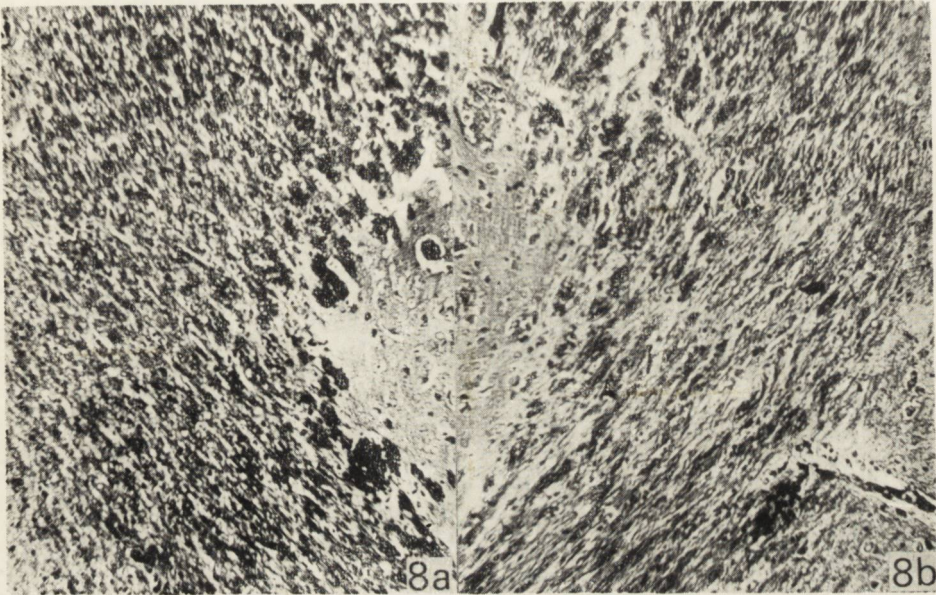
B. Stosunki ciężarów półkuli lewej/półkuli prawej jako funkcja czasu w modelu ischemiczno-hypoksyjnym. Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 7. A. Ratios of the specific radioactivity of left/right hemisphere as a function of time in the ischemic-hypoxic model, after i.v. injection of  $^{99m}\text{TcO}_4$ . Mean values and standard deviations.

B. Weight ratios of left/right hemisphere as a function of time in the ischaemic-hypoxic model. Mean values and standard deviations.

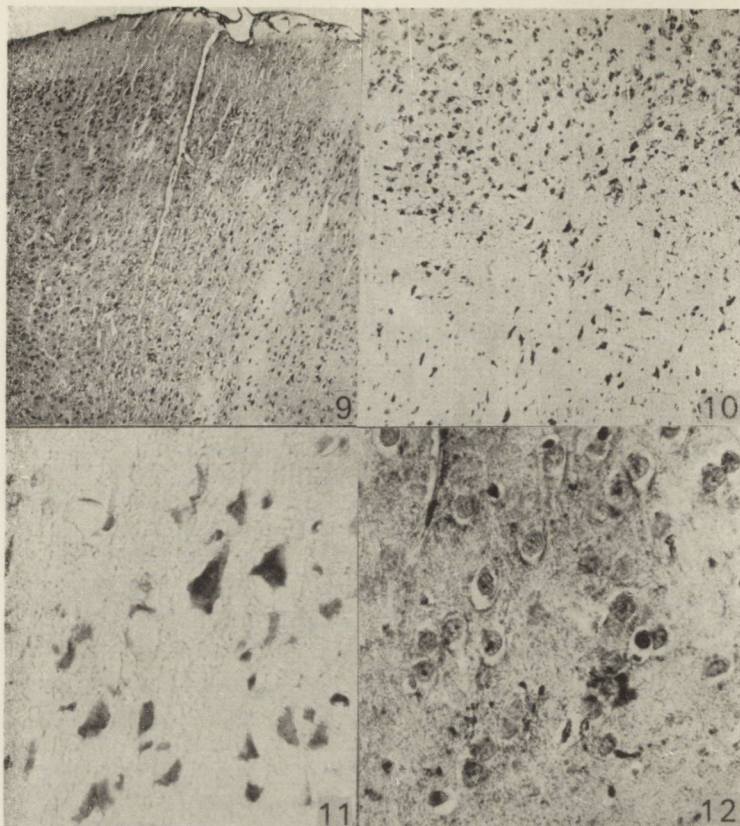
Badania morfologiczne mózgów zwierząt z grupy ischemiczno-hypoksyjnej wykazywały już w pierwszej godzinie cechy obrzęku mózgu obejmującego półkulę lewą (poddaną działaniu czynników skojarzonych) i narastającego w ciągu następnych godzin obserwacji. Wyrażały się





Ryc. 8a, Prawidłowy obraz istoty białej płata czołowego mózgu szczura kontrolnego.  
 b. Istota biała płata czołowego mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej  
 w 3 godziny po ekspozycji w warunki niedotlenienia. Zwraca uwagę zblednięcie  
 osłonek mielinowych i porozsuwanie pasm włókien nerwowych. Heidenhain. Pow.  
 60  $\times$ .

*Fig. 8a.* Normal white matter of the frontal lobe of the brain in control rat.  
*b.* The white matter of the frontal lobe of the brain in a rat from ischemic-  
 hypoxic group, 3 hours following exposure to the hypoxic conditions. Myelin  
 sheaths are pale, nerve fibre bundles parted. Heidenhain,  $\times$  60.



*Ryc. 9.* Kora mózgu na pograniczu unaczynienia tętnicy przedniej i środkowej mózgu u szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 12 godzin po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. Znaczny ubytek komórek nerwowych w prawej części ryciny, obejmujący obszar unaczyniony przez tętnicę środkową mózgu. Hematoksylina-eozyna. Pow. 60 X.

*Fig. 9.* Brain cortex of the boarder of vascularization by the anterior and middle cerebral artery from the rat of the ischemic-hypoxic group, 12 hours after exposure to hypoxic conditions. Significant loss of nerve cells on the right side of the figure comprises the area vascularized by the middle cerebral artery. H — E, X 60.

*Ryc. 10.* Kora mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 24 godziny po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. Półkula mózgu lewa. Rozległy zanik neuronów warstwy III. Nieliczne zachowane komórki nerwowe zdeformowane, obkurczone i nadbarwliwe. Hematoksylina-eozyna. Pow. 100 X.

*Fig. 10.* Brain cortex of a rat from the ischemic-hypoxic group 24 hours after exposure to hypoxic conditions, left hemisphere. Extensive loss of neurons of the 3rd cortical layer. Few neurons preserved are deformed, shrunked and hyperchromatic. H — E. X 100.

*Ryc. 11.* Kora półkuli lewej mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 5 godzin po ekspozycji na niedotlenienie. Zwyródnienie i zanik komórek nerwowych warstwy V w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. Hematoksylina-eozyna. Pow. 400 X.

*Fig. 11.* Brain cortex of the left hemisphere of a rat from the ischemic-hypoxic group 5 hours after exposure to hypoxia. Degeneration of nerve cells and neuronal loss of the Vth layer in the area vascularized by the middle cerebral artery. H — E. X 400.

*Ryc. 12.* Obfite złogi glikogenowe w neuropilu kory prawej półkuli mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 24 godziny po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. PAS — dimedon. Pow. 400 X.

*Fig. 12.* Abundant glycogen deposits in neuropil of the right hemisphere cortex of a rat from the ischemic-hypoxic group 24 hours after exposure to hypoxic conditions. PAS — dimedone. X 400.

one powiększeniem półkuli uszkodzonej, któremu towarzyszyło rozlane zblednięcie osłonek mielinowych, porozsuwanie pasm włókien nerwowych, w istocie białej (ryc. 8a i b) oraz ostry obrzęk oligodendrogleju. Od trzeciej godziny doświadczenia obserwowano ponadto uszkodzenie neuronów w korze mózgu i jądrach podstawy w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy. Zmiany te o charakterze chromatolizy lub obkurczenia i nadmiernej barwliwości neurocytów (ryc. 11) umiejscowione były w formacjach szarych położonych w obszarze unaczynienia tętnicy mózgu środkowej. Najwcześniejsze i najsilniej wyrażone uszkodzenia występowały w polach pogranicza unaczynienia tętnicy środkowej i przedniej mózgu. W okresach późniejszych stwierdzono w tych obszarach zmiany o charakterze martwicy selektywnej (ryc. 9 i 10) z tworzeniem pól stanu sitowatego. W półkuli prawej spostrzegano tylko pojedyncze rozsiane wyrodnijące neurony w korze mózgu, poza tym jej obraz nie odbiegał od obrazu grupy kontrolnej. Złogi glikogenu pojawiające się od drugiej godziny po ekspozycji zwierzęcia na warunki atmosfery niskotlenowej, gromadziły się w neuropilu kory i jąder podstawy niemal wyłącznie w półkuli prawej, przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej (ryc. 12), a w wyjątkowych tylko przypadkach w otoczeniu ognisk uszkodzenia po stronie lewej.

Na podkreślenie zasługuje fakt znacznego zróżnicowania natężenia uszkodzeń morfologicznych w półkuli lewej, od ciężkich i rozległych, obserwowanych w niektórych przypadkach już w okresach wczesnych do stosunkowo niewielkich i mało zaawansowanych nawet w okresach późniejszych.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zastosowane w badaniach związki chemiczne, znakowane pierwiastkami radioaktywnymi wykazują istotne różnice w zachowaniu się w ustroju zwierzęcia, wynikające z ich struktury chemicznej, powinowactwa do różnych tkanek i narządów, drogi, szybkości i mechanizmu ich wydalania z ustroju lub włączania w jego procesy metaboliczne. Niektóre z nich nie podlegają w ogóle metabolizmowi w ustroju i stosunkowo szybko są z niego wydalane przez nerki np. antypiryna, lub gromadzone i wydzielane w różnych narządach i tkankach np. technet, który jest wydzielany w żołądku i błonach śluzowych innych narządów oraz gromadzony w tarczycy. Inne związki, np. selenometionina ulegają złożonym procesom metabolicznym i wbudowują się do białek całego organizmu.  $^{131}\text{J}$  ulega metabolizmowi w tarczycy, a  $^{82}\text{Br}$  wymienia się z chlorkami tkanek.  $^{131}\text{J}$ -albumina krąży przez dłuższy okres czasu we krwi obwodowej.

Przechodzenie poszczególnych związków chemicznych z łożyska naczyniowego do mózgu zależy od zespołu czynników chemicznych, fizykochemicznych i metabolicznych, warunkujących mechanizm ich transportu do tkanki nerwowej oraz od ich stężenia we krwi obwodowej. Wszystkie z zastosowanych związków wykazują w warunkach prawidłowych charakterystyczną dla każdego z nich dynamikę gromadzenia się w ośrodkowym układzie nerwowym. Nadtechnetan, podobnie jak  $^{131}\text{J}$ -albumina w warunkach nieuszkodzonej bariery naczyniowo-mózgowej praktycznie nie przechodzi do tkanki nerwowej. Jego radioaktywność w mózgu stanowi jedynie wykładnik radioaktywności krwi zalegającej w naczyniach. Pozostałe związki przechodzą do tkanki, przy czym swobodnie dyfundująca antypiryna stanowi wskaźnik przechodzenia wody, podczas gdy szybko gromadząca się w tkance nerwowej i utrzymująca wysokie stężenie selenometionina zostaje wbudowana do jej białek (Zalewska 1971, Albrecht i wsp. 1971). Przechodzenie  $^{82}\text{Br}$ , stanowiącego wymiennik chlorków tkanki nerwowej, jest procesem powolnym i długotrwałym.

Stosunki charakterystyczne dla warunków prawidłowych nie ulegają zaburzeniu w przypadku jednostronnego i obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, jak również przy zastosowaniu przedłużonego umiarkowanego niedotlenienia oraz krótkotrwałego ostrego niedotlenienia (model Levina — półkula po stronie niepodwiązanej tętnicy szyjnej).

Brak zaburzeń barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych w warunkach jednostronnego podwiązania tętnicy szyjnej, traktowanego zresztą jako kontrola w stosunku do ischemiczno-hypoksyjnego modelu Levina, jest sprawą oczywistą. Nie spotykano w tej grupie żadnych zmian histologicznych ani odkładania się glikogenu w mózgu, co potwierdza morfologiczne i histochemiczne obserwacje innych autorów (Levin 1960, Brown i Brierley 1968, Ibrahim i wsp. 1970). Wyniki przeprowadzonych badań izotopowych wskazują ponadto na brak w tej grupie doświadczalnej objawów niedokrwienia mózgu w związku z możliwością wyrównania krążenia mózgowego poprzez połączenia z odgałęzieniami drugostronnej tętnicy szyjnej i mózgowymi rozgałęzieniami tętnic kręgowych.

Możliwości wyrównania krążenia mózgowego istnieją również u zwierząt w przypadku dwustronnego zamknięcia tętnic szyjnych. Temu zapewne należy przypisać fakt, że u zwierząt 3 grupy nie stwierdzaliśmy w badanych przedziałach czasu izotopowo uchwytne objawów niedokrwienia mózgu. Wydaje się jednak, że w tym przypadku należy liczyć się z krótkotrwałym, przejściowym niedokrwieniem, być może przypadającym na okres wcześniejszy przed pomiarami radioaktywności mó-

zgu, wykonanymi w 10 min. po założeniu podwiązki na tętnice szyjne. Za taką interpretacją przemawiają spostrzegane przez nas dyskretne, rozsiane zmiany zwyrodnieniowe neuronów kory mózgu oraz obecność złogów glikogenowych w formacjach szarych półkul mózgowych w obszarach, odpowiadających zakresowi unaczynienia tętnic mózgu środkowych. Wskazują na to również histochemiczne i biochemiczne badania innych autorów, dotyczące przede wszystkim gromadzenia się glikogenu w mózgu w następstwie obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych (Ibrahim i wsp. 1970, Pronaszko i wsp. 1971) oraz zmian w aktywności enzymów metabolizujących glikogen i niektórych dehydrogenaz (Ibrahim i wsp. 1970, Domańska-Janik 1972, Śmiałek i wsp. 1971). Wydaje się, że krótkotrwałe i przemijające niedokrwienie, dostateczne dla wywołania zaburzeń metabolicznych w tkance nerwowej, jest zbyt małe dla spowodowania istotnych nieprawidłowości strukturalnych i zaburzeń bariery krew-mózg.

Na odrębną uwagę zasługuje brak zaburzeń w barierowym mechanizmie naczyniowo-mózgowym w przypadku prostego niedotlenienia. W naszych badaniach tę grupę uszkodzeń reprezentują półkule mózgu przeciwległe do podwiązanej tętnicy szyjnej w modelu Levina w przypadku zastosowania mieszaniny gazowej o obniżonej zarówno do 4% jak i do 10% objętości tlenu. W półkulach tych stwierdzono dyskretne, rozsiane objawy uszkodzeń strukturalnych tkanki oraz obfite złogi glikogenu w korze i jądrach podstawy. Zastosowany czynnik uszkadzający w postaci niedotlenienia prostego o różnym czasie trwania, pogłębionego ogólnym spadkiem ciśnienia krwi, którego wykładnikiem są zmiany w radioaktywności krwi całkowitej, prowadząc do zaburzeń metabolicznych i powtarzalnych, choć dyskretnych uszkodzeń strukturalnych, nie wywoływał zmian przepuszczalności bariery krew-mózg dla zastosowanych związków chemicznych. Wskazuje to na fakt, że samo niedotlenienie, niezależnie od jego stopnia, w zastosowanych warunkach doświadczalnych, nie prowadzi do zaburzeń w barierowych mechanizmach naczyniowo-mózgowych. Potwierdza to zarówno poglądy Crone'a (1963), który nie znajdował zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla inuliny i cukrozy nawet w przypadkach ciężkiego niedotlenienia prowadzącego do strukturalnych uszkodzeń tkanki nerwowej, jak i Bakaya i Bendixena (1963) oraz Bakaya (1967), którzy nie obserwowali zaburzeń mechanizmów barierowych w niedotlenieniu przy zabezpieczonym dostatecznym odpływie dwutlenku węgla.

Istotne zmiany w przepuszczalności bariery krew-mózg spostrzegano w przypadku skojarzonego działania niedokrwienia i niedotlenienia w modelu Levina w półkuli mózgu po stronie podwiązania tętnicy szyjnej

wspólnej. Zmiany te, wyrażające się gromadzeniem nadtechnetanu w tkance nerwowej i wzroście stężenia  $^{75}\text{Se}$ -selenometioniny, wskazują na głębokie uszkodzenie mechanizmów barierowych. Zwiększona retencja antypiryny w tkance mózgowej jest wykładnikiem narastającego obrzęku mózgu, na którego obecność wskazują zarówno spostrzeżenia histologiczne jak i różnice stosunków wagowych między półkulą mózgu prawą i lewą. Niewyjaśnione pozostaje zachowanie się  $\text{Na}^{82}\text{Br}$  w tej grupie doświadczalnej, jakkolwiek uzyskane wyniki wskazują również na zaburzenie jego transportu. Obniżony poziom radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych przy zastosowaniu  $\text{Na}^{82}\text{Br}$  może być związany z zakłóconą wymianą jonów  $\text{Cl}^-$  z jonami  $\text{Br}^-$  w przypadku narastającego obrzęku mózgu, prowadzącego do gromadzenia się chlorków w tkance nerwowej. Zmianom w przepuszczalności bariery krew-mózg towarzyszą tu ciężkie uszkodzenia strukturalne tkanki nerwowej w postaci rozlanego zwyrodnienia komórek nerwowych przechodzącego do martwicy selektywnej rozległych obszarów formacji szarych półkul mózgu położonych w zakresie unaczynienia tętnicy mózgu środkowej oraz wspomniane poprzednio objawy obrzęku. Rozkład i charakter zmian morfologicznych wskazują na niedokrwienyny mechanizm uszkodzenia. Podstawową rolę tego czynnika uszkadzającego ośrodkowy układ nerwowy w omawianej grupie doświadczalnej wykazują również nasze spostrzeżenia izotopowe. Niższe stężenie  $^{75}\text{Se}$ -selenometioniny w półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych w czasie 10 minut od ekspozycji zwierząt na niedotlenienie w porównaniu ze stężeniem w mózgach zwierząt kontrolnych oraz niższe stężenie  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  w tejże półkuli w porównaniu z jego stężeniem w półkuli przeciwległej w okresie do 2 godzin od początku ekspozycji wskazują, że uszkodzenie barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych poprzedzone jest okresem znacznego niedokrwienia lewej półkuli mózgu. Wydaje się przy tym, że niedokrwienie stanowi wynik sumowania się miejscowych zaburzeń hemodynamicznych, związanych z podwiązaniem tętnicy szyjnej oraz zaburzeń ogólnoustrojowych, prowadzących do ostrego upośledzenia krążenia i spadku ciśnienia krwi. Wskazuje na to odmiennie zachowanie się poziomu radioaktywności całkowitej krwi w grupie doświadczeń przeprowadzonych na modelu Levina w porównaniu z grupą kontrolną. Wolniejszy spadek radioaktywności krwi u zwierząt badanych przy użyciu nadtechnetanu i antypiryny przemawia w sposób przekonujący za niedokrwieniem narządów i tkanek. Wolniejszy wzrost radioaktywności krwi między 10 minutą a 2 godziną u zwierząt badanych  $^{75}\text{Se}$ -selenometioniną w porównaniu do przebiegu krzywej w grupach kontrolnych wskazywać może również nie tylko na znaczne zaburzenia hemodynamiczne lecz także na towarzyszące im nie-

prawidłowości w metabolizmie tego aminokwasu pod wpływem niedotlenienia. Wydaje się zatem, że dopiero skojarzenie ogólnoustrojowych i miejscowych zaburzeń hemodynamicznych stanowi czynnik uszkadzający zarówno strukturę tkanki nerwowej jak i stan przepuszczalności bariery krew-mózg, podczas gdy każdy z tych czynników zastosowany oddzielnie, nie wywiera wpływu uszkadzającego. Zmiany strukturalne tkanki w tym przypadku stanowią prawdopodobnie czynnik krytyczny, sprzyjający rozwojowi zaburzeń w przepuszczalności bariery krew-mózg. Można założyć bowiem, że procesy autolityczne tkanki nerwowej, ulegającej martwicy prowadzą do znacznego zakwaszenia środowiska tkankowego, odgrywającego w stosunku do mechanizmów barierowych analogiczną rolę jak hyperkapnia skojarzona z hypoksją u Bakaya i Bendixena (1963) czy van Harrevelda i Schade (1960) oraz van Harrevelda (1962). Analogiczne wnioski wypływają również z doświadczeń Gunna i wsp. (1962), Spectora (1961), Hillsa i Spectora (1963) oraz Mosakowskiego i wsp. (1968).

Dodatkowego wyjaśnienia wymagają stosunkowo znaczne rozrzuty wyników pomiarów radioaktywności mózgu u zwierząt grupy ischemiczno-hypoksyjnej mimo zwrócenia szczególnej uwagi na zachowanie jednakowych warunków prowadzenia doświadczeń. Spotykany w tym modelu doświadczalnym brak powtarzalności zmian i występujący częściej różny stopień ich nasilenia w jednakowych przedziałach czasowych, omawiane również w pracach innych autorów (Levin 1960, Brown-Brierley 1968, Domańska-Janik 1972) uwarunkowane są prawdopodobnie indywidualnymi różnicami możliwości wyrównania miejscowych zaburzeń hemodynamicznych, rozwijających się w następstwie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przy poddaniu zwierzęcia niedotlenieniu. Różnice te wynikają zapewne z osobniczych różnic w ukształtowaniu połączeń obecnych między poszczególnymi dorzecznymi tętnic mózgowych.

#### WNIOSKI

1. Jedno- i obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u dorosłych szczurów nie prowadzi do uszkodzenia barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych, mimo, że zmiany morfologiczne i histochemiczne stwierdzone w przypadku obustronnego ich podwiązania wykazują objawy zaburzeń metabolicznych i dyskretnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej. Równocześnie w badanych przedziałach czasu nie stwierdza się uchwytanych metodami izotopowymi objawów niedokrwienia mózgu. Gromadzenie się glikogenu w tkance oraz obecność nieznacznych zwyrodnień neuronalnych w przypadkach obustron-

nego podwiązania tętnic szyjnych wskazują jednak na możliwość krótkotrwałego, przejściowego niedokrwienia, być może w okresie poprzedzającym najwcześniejsze pomiary radioaktywności.

2. Zastosowanie zarówno przedłużonego umiarkowanego niedotlenienia jak i krótkotrwałego głębokiego niedotlenienia nie prowadzi również do uszkodzenia bariery krew-mózg, mimo że towarzyszy mu ogólnoustrojowy spadek ciśnienia krwi, a stwierdzone zmiany morfologiczne i histochemiczne w tkance nerwowej świadczą o jej uszkodzeniu.

3. Skojarzone działanie czynników ischemiczno-hypoksyjnych prowadzi do masywnych uszkodzeń przepuszczalności bariery krew-mózg, którym towarzyszy narastający obrzęk mózgu i pogłębiające się uszkodzenia strukturalne tkanki.

4. Podstawową rolę w uszkodzeniu mechanizmów barierowych w encefalopatii ischemiczno-anoksyjnej odgrywa niedokrwienie tkanki nerwowej rozwijające się w następstwie skojarzenia miejscowych zaburzeń hemodynamicznych związanych z podwiązaniem tętnicy szyjnej i ogólnoustrojowym spadkiem ciśnienia krwi w wyniku hypoksji.

A. Капусьтиньски, М. Я. Моссаковски, Е. Альбрехт, С. Янушевски

#### ВЛИЯНИЕ ИСХЕМИИ И ГИПОКСИИ НА БАРЬЕР КРОВЬ-МОЗГ У КРЫС

##### Резюме

Исследовали влияние разных форм гипоксии на проницаемость гемато-энцефалического барьера и накопление в мозгу крысы ряда введенных внутривенно низко и высокомолекулярных химических соединений, меченных радиоактивными изотопами, такими как:  $^{99m}\text{TeO}_4$ ,  $^{75}\text{Se}$  — селенметионин,  $\text{Na}^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  — человеческий альбумин,  $^{131}\text{I}$ -4-J — антипирин, а также  $\text{Na}^{82}\text{Br}$ . В исследованиях, которые проводились на крысах расы Вистар обоего пола и веса 150—250 г, применялись следующие модели гипоксии: а) модель односторонней ишемии, заключающаяся в односторонней подвязке левой общей сонной артерии, в) модель обесторонней ишемии с подвязкой обеих сонных артерий, с) комбинированная гипоксическая ишемическая модель, заключающаяся в экспозиции животных с односторонней подвязкой общей сонной артерии в атмосфере со сниженным содержанием кислорода ( $4\% \text{O}_2$ ,  $96\% \text{N}_2$ ) в течение 30 мин.

Прослеживались изменения, имеющие место спустя разное время после операции и подачи изотопа. Параллельно проводилось наблюдение морфологических повреждений нервной ткани, появляющихся в аналогичных экспериментальных условиях.

Было обнаружено, что массивные повреждения проницаемости гемато-энцефалического барьера обнаруживаются только в эффекте сопряженного действия гипоксическо-ишемических факторов и им сопутствуют глубокие морфологические изменения и прогрессирующий отек мозга. Простая гипоксия или



ишемия не влияют на свойства барьера кровь-мозг по отношению во всем исследованным соединениям. Было обнаружено, что ишемия нервной ткани, развивающаяся в результате сопряженного эффекта локальных гемодинамических нарушений с общеорганическим падением кровяного давления, является основным фактором, повреждающим гемато-энцефалический барьер.

A. Kapuściński, M. J. Mossakowski, J. Albrecht, S. Januszewski

EFFECT OF ISCHEMIA AND HYPOXIA ON THE PERMEABILITY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN RAT

S u m m a r y

The effect of various forms of hypoxia on the permeability of the blood-brain barrier and accumulation in brain of a number of high and low molecular weight compounds labelled with radioactive isotopes was investigated. The radioactive compounds like  $^{99m}\text{TcO}_4$ ,  $^{75}\text{Se}$ -selenomethionine,  $\text{Na}^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ -human serum albumin,  $\text{Na}^{82}\text{Br}$ ,  $^{131}\text{I}$ -4-I-antipyrine, were injected intravenously into albino „Wistar” rats of both sexes, weighing 150–250 g.

The following hypoxic models were employed: a) Unilateral ischemia consisting on unilateral ligation of the common carotid artery, b) bilateral ischemia with the ligation of both common carotid arteries, c) Ischemic-hypoxic hypoxia, consisting on the exposure of the animals with unilaterally ligated common carotid artery to the atmosphere with a low oxygen tension (4%  $\text{O}_2$  and 96%  $\text{N}_2$ ) for 30 minutes.

The changes occurring at various times after operation and isotope injection were followed. Paralelly, the observations were made of morphological lesions which appeared under identical experimental conditions.

Considerable disorders in the permeability of the blood-brain barrier, accompanied by intensive morphological changes and developing brain edema were noticed exclusively in consequence of the simultaneous application of the hypoxic and the ischemic factor. Simple hypoxia or ischemia remained without influence on the blood-brain barrier. Ischemia of the brain tissue, resulting from the association of local hemodynamic disorders with the general decrease of body blood tension was concluded to be the main factor impairing the blood-brain barrier.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J., Kapuściński A., Januszewski S.: Effect of partial ischemia and ischemic-hypoxic hypoxia on the activity of a cell-free protein synthesizing system from rat brain. Bull. Acad. Sci. Pol. w druku.
2. Bakay L., Bendixen H. H.: Central nervous system vulnerability in hypoxic states. Isotope uptake studies. In Selective Vulnerability of the Central Nervous System in Hypoxia. Ed. W. H. McMenemey and J. F. Schadé. Oxford. Blackwell Scient. Publ., 1963, 63–78.
3. Bakay L.: Radio-isotopic studies in brain edema. In Brain Edema. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger, Springer Verl., Wien. New York 1967, 517–529.
4. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. Brit. J. Exp. Pathol., 1968, 49, 87–106.

5. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
6. Crone C.: The permeability of capillaries in various organs determined by use of the indicator diffusion method. *Acta Physiol. Scand.* 1963, 58, 292—305.
7. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropatologia Polska*, 1972, 10, 17—43.
8. Gunn C. G., Williams G. R., Parker J. T.: Edema of brain following circulatory arrest. *J. Surg. Res.*, 1962, 2, 141—143.
9. Hills C. P., Spector R. G.: Anoxia and cerebral water content in the adult rat. *Nature (London)*, 1963, 199, 393.
10. Ibrahim M.Z.M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity from several forms of hypoxia. *Amer. J. Pathol.*, 1970, 60, 403—420.
11. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation. *Proc. VI Intern. Congress of Neuropathology*. Ed. Masson et Cie, Paryż 1970, 351—365.
12. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Pathol.*, 1960, 36, 1—17.
13. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in the central nervous system ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, w druku.
14. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Rodriguez de Curret H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1968, 27, 500—516.
15. Mossakowski M. J., Zelman I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedostatku tlenowego w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki*, suplement 1, 1971, 37—50.
16. Pronaszko A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 281—296.
17. Spector R. C.: Water content of the brain in anoxic-ischemic encephalopathy in adult rats. *Brit. J. Exp. Path.* 1961, 10, 604—616.
18. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDP-glucose: alfa-4-glucoziltransferase and alfa-1,4-glucoziltransferase activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1971, 19, 242—248.
19. Van Harreveld A., Schade P. J.: On the distribution and movements of water and electrolyte in the cerebral cortex. In: *Structure and Function of the Cerebral Cortex*. Elsevier Publ. Co. Amsterdam 1960, 253—256.
20. Van Harreveld A.: Water and electrolyte distribution in central nervous tissue. *Fed. Proc.*, 1962, 21, 659—664.
21. Zalewska T.: Badania nad wbudowywaniem <sup>75</sup>-Se-selenometioniny do białek ośrodkowego układu nerwowego królika. W przygotowaniu do druku.

Adres autorów: Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Warszawa, Dworkowa 3.

HANNA SZYDŁOWSKA, HENRYK WIŚNIEWSKI, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK,  
ZBIGNIEW RAP, TERESA ZALEWSKA

## BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD ZMIANĄ ZAWARTOŚCI WODY W MÓZGU KOTA POD WPŁYWEM ROZMIĘKANIA, ZAMRAŻANIA I KRWOTOKU \*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Przy badaniu zawartości miedzi w mózgach kotów z uszkodzoną barierą krew-mózg rozmiękaniem, zamrażaniem i krwotokiem (Wiśniewski i wsp. 1966) zwrócono uwagę na fakt, że średnie ilości miedzi w półkulach nieuszkodzonych różnią się między sobą, zależnie od rodzaju uszkodzenia półkuli poddanej zabiegowi. Statystyczna znamienność różnic występowała jednak wyłącznie w przypadku obliczeń miedzi w stosunku do wagi świeżej tkanki, co może wskazywać na związek z przemieszczeniem płynu obrzękowego.

W nawiązaniu do powyższych doświadczeń przebadano zawartość wody w prawidłowych mózgach kotów i porównano ją z zawartością wody w mózgach z uszkodzoną barierą krew-mózg w obrębie jednej półkuli. Zwrócono uwagę na półkulę nie poddaną zabiegowi, ponieważ tę właśnie półkulę traktuje się czasami jako kontrolę dla zmian powstających pod wpływem uszkodzenia w sąsiedniej półkuli (Klatzo i wsp. 1958, 1962, 1965, Wiśniewski 1965, Wiśniewski i wsp. 1966).

### MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na 23 dorosłych kotach, obu płci, wagi 3,0 — 3,5 kg. Zwierzęta podzielono na 4 grupy:

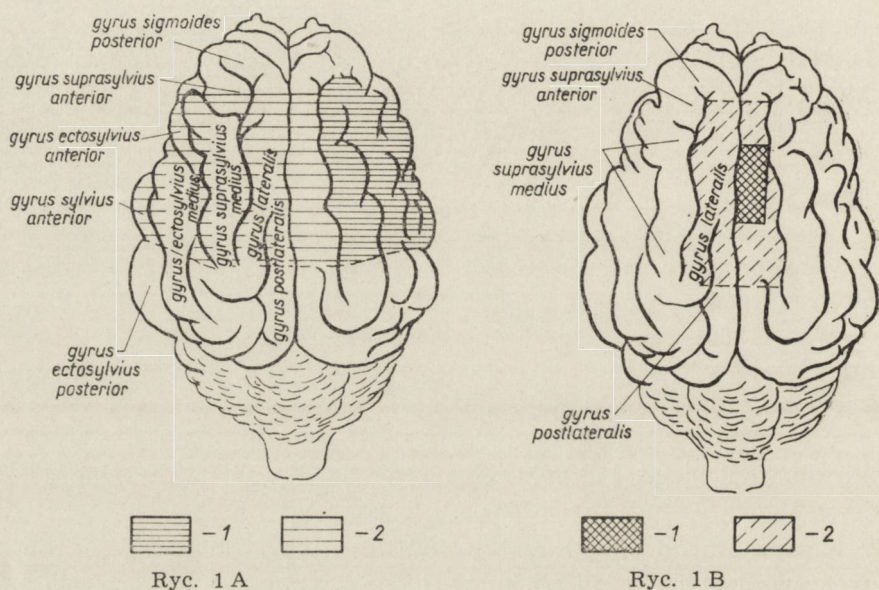
Grupa 1. Kontrola (5 kotów): Zwierzęta nie były poddane żadnemu zabiegowi.

Grupa 2. Rozmiękanie mózgu (8 kotów): Zwierzętom tej grupy zamykano klipsem tętnicę środkową mózgu prawą.

\* Praca wykonana częściowo w byłym Zakładzie Neuropatologii PAN w latach 1966/1967.

**Grupa 3.** Zamrażanie (5 kotów): Mózgi zwierząt uszkodzono przez zamrażanie, metodą podaną przez Klatzo i wsp. (1958), używając aplikatora opisanego przez Laskowskiego (1960). Zamrażano środkową część zawoju bocznego półkuli prawej.

**Grupa 4.** Krwotok mózgowy (5 kotów): Przez otwór trepanacyjny wstrzykiwano 2 ml heparynizowanej krwi do istoty białej zawoju bocznego półkuli mózgu prawej, w okolicy odpowiadającej zamrożeniu.



**Ryc. 1A.** Schemat półkuli mózgu kota z ogniskiem rozmiękania po stronie prawej. Okolica uszkodzenia — 1. Otaczająca tkanka pobrana do badania — 2.

**Fig. 1A.** Diagram of brain hemisphere of cat with focus of encephalomalacia on right side. Region of lesion — 1, surrounding tissue taken for investigation — 2.

**Ryc. 1B.** Schemat półkuli mózgu kota z ogniskiem zamrażania po stronie prawej. Okolica uszkodzenia — 1. Otaczająca tkanka pobrana do badania — 2.

**Fig. 1B.** Diagram of brain hemisphere of cat with focus of frozen tissue of right side. Region of lesion — 1, surrounding tissue taken for investigation — 2.

Zwierzęta usypiano nembutalem w 24 godziny po zabiegu. Do badań biochemicznych w grupie 2 pobierano z półkuli prawej ognisko rozmiękania w zakresie unaczynienia tętnicy mózgu środkowej oraz z otoczenia ogniska zakręt tylno-boczny z ośrodkiem półowalnym (ryc. 1A). W grupie 3 i 4 pobierano ognisko uszkodzenia i oddzielnie otaczającą tkankę (zakręt boczny wraz z przednią częścią zakrętu tylnobocznego i zwojami podstawy (ryc. 1 B).

Z półkul lewych badano tkankę z okolic odpowiadających skrawkom półkuli uszkodzonej zabiegiem oraz w grupie 1 wycinki kontrolne

z wszystkich badanych okolic mózgu grup 2, i 3 i 4. Wycinki tkanki wagi 1,5 — 10 g suszono do stałej wagi w temp. 60°C.

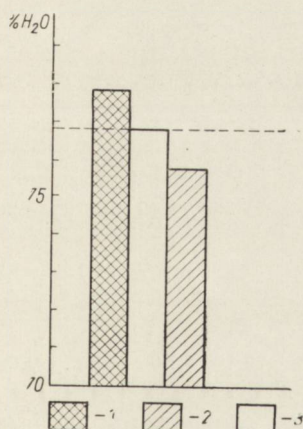
## WYNIKI

Grupa 1. Badane przez nas prawidłowe mózgi kotów zawierają od 76,25% do 77,05% wody, przy czym średnia ilości wody wynosi 76,76% (tabela 1).

Tabela 1. Średnie zawartości wody (%) w prawidłowym mózgu kota

Table 1. Mean water content (%) in normal cat brain

| Umiejscowienie<br>Localisation  | Nr kota No. of cat |                 |                 |                 |                 | $\bar{x} \pm m$ |
|---|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | 1                  | 2               | 3               | 4               | 5               |                 |
| Zakręty boczne<br>Lateral gyri  | 78.30              | 77.55           | 77.45           | 77.90           | 77.60           | 77.76 ± 0.12    |
| Zwoje podstawy<br>Basal ganglia   | 75.65              | 75.75           | 76.35           | 76.10           | 74.65           | 75.10 ± 0.20    |
| Pole unaczynienia<br>tętnicy środkowej<br>Area of vascularisation<br>of middle cerebral<br>artery | 77.15              | 76.75           | 76.60           | 77.15           | 76.50           | 76.83 ± 0.12    |
| $\bar{x} \pm m$   | 77.03<br>± 0.48    | 76.68<br>± 0.34 | 76.80<br>± 0.21 | 77.05<br>± 0.34 | 76.25<br>± 0.56 | 76.76 ± 0.18    |

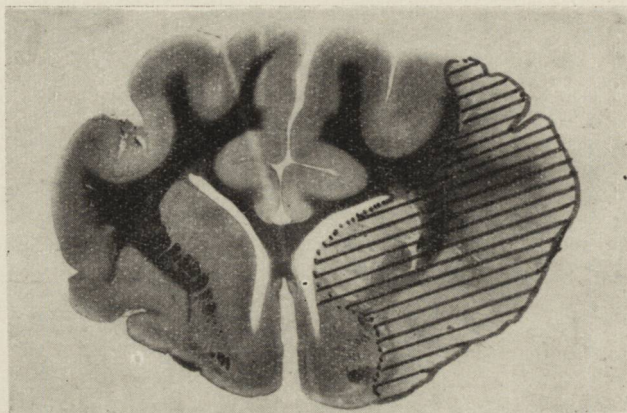


Ryc. 2. Średnie zawartości wody w poszczególnych okolicach prawidłowego mózgu kota. 1 — zakręty boczne, 2 — zwoje podstawy. Linia przerywana oznacza średnią zawartości wody w całym mózgu, 3 — obszar unaczynienia tętnicy mózgu środkowej (pole odpowiadające rozmiękaniu).

Fig. 2. Mean water content in particular region of normal cat brain. 1 — lateral gyri, 2 — basal ganglia. Interrupted line denotes mean value of water content in the brain as a whole, 3 — area of vascularisation of middle cerebral artery (area corresponding to malacia).

Poszczególne okolice mózgu różnią się między sobą pod względem średniej zawartości wody; najwięcej wody zawierają zakręty boczne wraz z ośrodkiem półowalnym (77,45% — 78,30%), najmniej — zwoje podstawy (74,65 — 76,35%) (ryc. 2).

Różnice te są statystycznie znamienne. Zakręty boczne z ośrodkiem półowalnym zawierają więcej wody niż średnia jej zawartości w całym mózgu, zwoje podstawy — mniej. Stwierdza się statystyczną znamienność różnicy między średnią zawartości wody w zakrętach bocznych z ośrodkiem półowalnym oraz w zwojach podstawy, a średnią zawartości wody w całym mózgu.



Ryc. 3. Przekrój czołowy przez półkule mózgu kota z ogniskiem rozmiękania po zamknięciu tętnicy mózgu środkowej prawej. Zakreślone pole — ognisko rozmiękania (Rap i wsp. 1968).

Fig. 3. Frontal section through cat brain hemispheres with focus of encephalomalacia after closing of right cerebral middle artery. Hatched area — focus of malacia (Rap et al. 1968).

Tabela 2. Średnie zawartości wody (%) w mózgu kota z rozmiękaniem

Table 2. Mean water content (%) in cat brain with encephalomalacia

| Umiejscowienie<br>Localisation                   | Nr kota<br>No. of cat |                       |                       |                       |                       |       |       |       | $\bar{x} \pm m$  |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-------|-------|------------------|
|  | 1                     | 2                     | 3                     | 4                     | 5                     | 6     | 7     | 8     |                  |
| Zakręty boczne<br>Lateral gyri                   | 76.61                 | 78.04                 | 78.56                 | 76.46                 | 77.70                 | 78.09 | 78.38 | 78.49 | $77.79 \pm 0.30$ |
| Zwoje podstawy<br>Basal ganglia                  | 75.34                 | 76.29                 | 71.97                 | 76.09                 | 75.85                 | —     | —     | —     | $75.10 \pm 0.83$ |
| Pozostałe pole<br>rozmiękania<br>Area of malacia | 79.82                 | 80.93                 | 79.09                 | 79.49                 | 79.25                 | 79.01 | 79.10 | 80.00 | $79.52 \pm 0.68$ |
| $\bar{x} \pm m$                                  | $77.26$<br>$\pm 1.19$ | $78.42$<br>$\pm 1.24$ | $76.54$<br>$\pm 1.93$ | $77.34$<br>$\pm 1.04$ | $77.60$<br>$\pm 0.98$ | —     | —     | —     | $77.83 \pm 0.43$ |

Grupa 2. Ognisko rozmiękania obejmuje zakres unaczynienia tętnicy mózgu środkowej prawej: korę, ośrodek półowalny i zwoje podstawy (ryc. 3).

Mózgi z ogniskiem rozmiękania zawierają od 76,54% do 78,42% wody, przy czym średnia ilości wody w 5 mózgzach wynosi 77,83% i nie wykazuje statystycznej znamienności różnicy w stosunku do średniej zawartości wody w mózgu prawidłowym (tabela 2).

Tabela 3. Średnie zawartości wody (%) w półkulach mózgu kota z rozmiękaniem  
Table 3. Mean water content (%) in cat brain hemispheres with malacia

| Półkula uszkodzona<br>Injured hemisphere         | Nr kota No. of cat |                 |                 |                 |                 |       |       |       | $\bar{x} \pm m$ |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-------|-----------------|
|  | 1                  | 2               | 3               | 4               | 5               | 6     | 7     | 8     |                 |
| Umiejscowienie<br>Localisation                   |                    |                 |                 |                 |                 |       |       |       |                 |
| Zakręty boczne<br>Lateral gyri                   | 77.52              | 78.88           | 79.32           | 76.81           | 77.80           | 78.84 | 79.45 | 79.99 | 78.58 ± 0.42    |
| Zwoje podstawy<br>Basal ganglia                  | 76.22              | 77.57           | 75.20           | 76.57           | 78.10           | —     | —     | —     | 76.73 ± 0.51    |
| Pozostałe pole<br>rozmiękania<br>Area of malacia | 82.88              | 84.06           | 81.91           | 82.48           | 81.20           | 80.67 | 80.90 | 83.00 | 82.14 ± 0.42    |
| $\bar{x} \pm m$                                  | 78.87<br>± 2.03    | 80.17<br>± 1.98 | 78.81<br>± 1.95 | 78.62<br>± 1.79 | 79.03<br>± 1.06 | —     | —     | —     | 79.40 ± 0.54    |
| Półkula nieuszkodzona<br>Intact hemisphere       |                    |                 |                 |                 |                 |       |       |       |                 |
| Zakręty boczne<br>Lateral gyri                   | 75.70              | 77.20           | 77.79           | 76.10           | 77.60           | 77.34 | 77.30 | 77.00 | 77.00 ± 0.68    |
| Zwoje podstawy<br>Basal ganglia                  | 74.45              | 75.00           | 68.73           | 75.60           | 73.60           | —     | —     | —     | 73.48 ± 0.97    |
| Pozostałe pole<br>rozmiękania<br>Area of malacia | 76.76              | 77.80           | 76.26           | 76.50           | 77.30           | 77.34 | 77.30 | 77.00 | 77.03 ± 0.56    |
| $\bar{x} \pm m$                                  | 75.74<br>± 0.67    | 76.67<br>± 0.85 | 74.26<br>± 1.60 | 76.07<br>± 0.26 | 76.17<br>± 1.28 | —     | —     | —     | 76.18 ± 0.44    |

Analizując średnie zawartości wody w półkulach mózgowych z ogniskiem rozmiękania (79,49% ± 0,54) i w półkulach nieoperowanych (76,18 ± 0,44), stwierdzono, że średnia zawartości wody w półkuli operowanej jest wyższa od średniej zawartości wody w mózgu prawidłowym (tabela 3). Jest to różnica statystycznie znamienna.

Znamienność statystyczna wzrostu wody w stosunku do normy występuje w polu rozmiękania. W półkuli nie poddanej zabiegowi stwier-

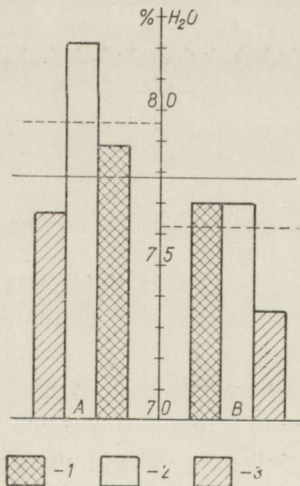
dza się statystycznie znamienne, w porównaniu z normą, spadek zawartości wody w zakrętach bocznych (tabela 4).

W stosunku do średniej zawartości wody w całym mózgu poddanym zabiegowi, pole rozmiękania zawiera więcej wody, a zwoje podstawy półkuli nieuszkodzonej — mniej i tylko te różnice wskazują znamienność statystyczną (ryc. 4).

Tabela 4. Znamienność różnic między średnimi zawartości wody prawidłowego mózgu kota i mózgu z rozmiękaniem

Table 4. Significance of differences in mean water content in normal cat brain and in encephalomalacia

| Okolica mózgu<br>Brain region           | Półkula uszkodzona<br>Injured hemisphere | t       | Mózg prawidłowy<br>Normal brain | t       | Półkula kontrolna<br>Control hemisphere |
|---|--|---------|---------------------------------|---------|---|
| Zakręty boczne<br>Lateral gyri          | $78.58 \pm 0.38$                         | $t < 3$ | $77.76 \pm 0.12$                | $t > 3$ | $77.00 \pm 0.21$                        |
| Zwoje podstawy<br>Basal ganglia         | $76.73 \pm 0.51$                         | $t < 3$ | $75.70 \pm 0.20$                | $t < 3$ | $73.48 \pm 1.23$                        |
| Pole rozmiękania<br>Area of malacia     | $82.14 \pm 0.54$                         | $t > 3$ | $76.83 \pm 0.12$                | $t < 3$ | $77.03 \pm 0.18$                        |
| Całość półkul<br>Hemispheres as a whole | $79.49 \pm 0.54$                         | $t > 3$ | $76.76 \pm 0.18$                | $t < 3$ | $76.18 \pm 0.44$                        |



Ryc. 4. Średnie zawartości wody w poszczególnych okolicach mózgu kota z ogniskiem rozmiękania. A — półkula uszkodzona, B — półkula nieuszkodzona, 1 — zakręty boczne i ośrodek półowalny, 2 — pole rozmiękania, 3 — zwoje podstawy. Linie przerywane oznaczają średnie zawartości wody w poszczególnych półkulach. Linia ciągła — średnią zawartości wody w całym mózgu.

Fig. 4. Mean values of water content in particular brain regions of cat with focus of encephalomalacia. A — injured hemisphere, B — intact hemisphere, 1 — lateral gyri, 2 — area of malacia, 3 — basal ganglia. Interrupted line denote mean values of water content in particular hemispheres. Continuous line — mean water content in whole brain.

G r u p a 3. Uszkodzenie wywołane zamrażaniem obejmuje zakręt boczny wraz z istotą białą podkorową tego zakrętu, a obrzęk rozprzestrzenia się na ośrodek półowalny.



Zakręty boczne z ośrodkiem półowalnym w mózgach uszkodzonych zamrażaniem zawierają od 76,40% do 77,80% wody, przy czym średnia jej zawartości wynosi 78,7%, jest więc niższa niż średnia zawartości wody zakrętów bocznych mózgu prawidłowego. Różnica ta jednak nie jest statystycznie znamienna. Zakręty boczne w półkulach uszkodzonych zamrażaniem zawierają średnio  $78,28\% \pm 0,21$  wody t.j. więcej niż zakręty boczne mózgu prawidłowego, jednakże nie jest to różnica statystycznie znamienna. Natomiast zakręty boczne z ośrodkiem półowalnym półkuli nie poddanej zabiegowi zawierają  $75,26\% \pm 0,16$  wody, a różnica w porównaniu z ilością wody tych samych okolic mózgu prawidłowego, daje znamienny statystycznie spadek wody w półkuli nie poddanej zamrażaniu.

Grupa 4. Uszkodzenie wywołane krwotokiem obejmuje istotę białą ośrodka półowalnego i nieznacznie korę zakrętów bocznych. Średnia zawartości wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym mózgu uszkodzonego krwotokiem jest niższa ( $76,11\% \pm 0,52$ ) niż średnia jej zawartości w tych samych okolicach mózgu prawidłowego i ta różnica jest statystycznie znamienna. Obniżenie średniej zawartości wody w zakrętach bocznych, w porównaniu z mózgiem prawidłowym, cechuje zarówno półkulę nieuszkodzoną ( $74,58\% \pm 0,11$ ) jak i półkulę uszkodzoną krwotokiem doświadczalnym ( $77,64\% - 0,19$ ), co nie występuje przy pozostałych uszkodzeniach mózgu.

Tabela 5. Statystyczne znamienności różnic średnich zawartości wody mózgu prawidłowego półkul uszkodzonych i kontrolnych

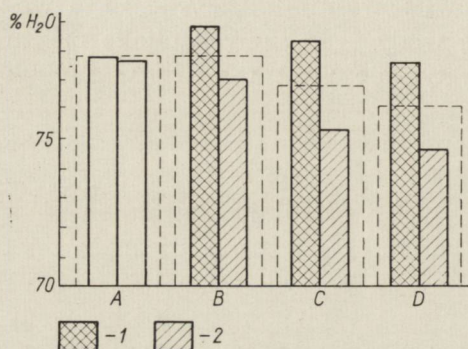
Table 5. Statistical significance of differences in mean water content between normal brain lesioned hemispheres and control ones

| Uszkodzenie<br>Lesion  | Półkule<br>uszkodzone<br>Injured<br>hemispheres | t       | Mózg<br>prawidłowy<br>Normal brain | t       | Półkule<br>kontrolne<br>Control<br>hemispheres |
|------------------------|---|---------|------------------------------------|---------|--|
| Rozmiękanie<br>Malacia | $78.58 \pm 0.42$                                | $t < 3$ | $77.76 \pm 0.38$                   | $t > 3$ | $77.00 \pm 0.68$                               |
| Zamrażanie<br>Freezing | $78.28 \pm 0.21$                                | $t < 3$ | $77.76 \pm 0.38$                   | $t > 3$ | $75.26 \pm 0.16$                               |
| Krwotok<br>Haemorrhage | $77.64 \pm 0.19$                                | $t < 3$ | $77.76 \pm 0.38$                   | $t > 3$ | $74.58 \pm 0.11$                               |

Podobnie jak i w poprzednich grupach doświadczalnych statystyczna znamienność różnicy występuje jedynie między średnimi zawartości wody zakrętów bocznych i ośrodka półowalnego mózgu prawidłowego i półkuli nie poddanej zabiegowi u zwierząt operowanych (tabela 5).

## Porównanie grup doświadczalnych

Uzyskane wyniki pozwoliły porównać średnie zawartości wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym mózgu prawidłowego ze średnimi jej zawartości w podobnych okolicach mózgow uszkodzonych zamrażaniem i krwotokiem oraz mózgow z rozmiękaniem (ryc. 5).



Ryc. 5. Średnie zawartości wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym. A — mózg prawidłowy, B — mózg z rozmiękaniem, C — mózg uszkodzony zamrażaniem, D — mózg z krwotokiem, 1 — półkula uszkodzona, 2 — półkula nieuszkodzona. Średnie zawartości wody w całości zakrętów bocznych i ośrodku półowalnego oznaczono linią przerywaną.

Fig. 5. Mean water content in lateral gyri and centrum semiovale. A — normal brain, B — encephalomalacia, C — brain injured by freezing, D — brain with haemorrhage, 1 — injured hemisphere, 2 — intact hemisphere. Mean water content in lateral gyri and centrum semiovale as a whole marked by interrupted line.

Statystyczna znamienność różnicy występuje w półkulach uszkodzonych jedynie między średnimi zawartości wody zakrętów bocznych mózgow z rozmiękaniem i krwotokiem. Między średnimi zawartości wo-

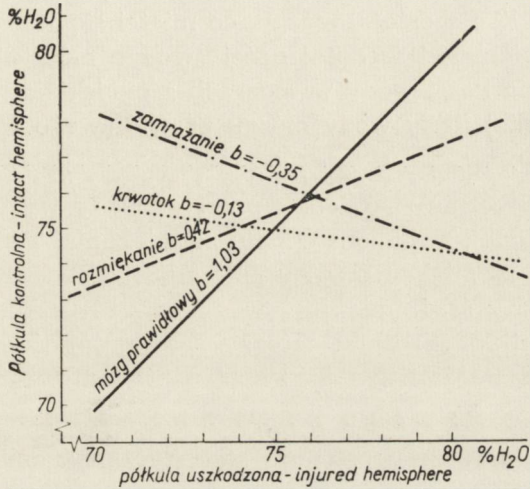
Tabela 6. Korelacja między zawartością wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym obu półkul w mózgu prawidłowym i w mózgow uszkodzonych różnymi sposobami

Table 6. Correlation between water content in lateral gyri of both hemispheres in normal and injured brains, established by various methods

|                          | Mózg prawidłowy<br>Normal brain | Mózg z rozmiękaniem<br>Encephalomalacia | Mózg uszkodzony zamrażaniem<br>Brain injured by freezing | Mózg z krwotokiem<br>Brain with haemorrhage |
|--------------------------|---------------------------------|---|--|---|
| Regresja<br>Regression   | dotatnia<br>positive            | dotatnia<br>positive                    | ujemna<br>negative                                       | ujemna<br>negative                          |
| Korelacja<br>Correlation | 0.57<br>umiarkowana<br>moderate | 0.63<br>umiarkowana<br>moderate         | -0.46<br>umiarkowana<br>moderate                         | -0.54<br>umiarkowana<br>moderate            |
| Zależność<br>Relation    | istotna<br>significant<br>++    | istotna<br>significant<br>++            | istotna<br>significant<br>++                             | istotna<br>significant<br>++                |

dy w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym półkul nieuszkodzonych wszystkie różnice są statystycznie znamienne.

Między zawartością wody w zakrętach bocznych obu półkul istnieje korelacja umiarkowana i to zarówno w mózgu prawidłowym, jak i w mózgowiach uszkodzonych różnymi sposobami. Jednakże w mózgu z rozmię-



Ryc. 6. Linie regresji oznaczające przyrost wody w półkuli nie poddanej zabiegowi, w stosunku do przyrostu wody w półkuli operowanej. ———— — mózgu prawidłowy, - - - - - mózgu z rozmiękaniem, ······ — mózgu uszkodzonego zamrażaniem, - · - · - — mózgu z krwotokiem.

Fig. 6. Lines of regression denoting increase of water content in intact hemisphere as compared with that in operated hemisphere.

——— — normal brain, - - - - - encephalomalacia, ······ — brain injured by freezing, - · - · - — brain with haemorrhage.

kaniem wartość współczynnika korelacji jest dodatnia, podobnie jak w mózgu prawidłowym, natomiast w mózgowiach z krwotokiem lub uszkodzonych zamrażaniem — ujemna (tabela 6).

Świadczy to o ubytku wody w zakrętach bocznych półkul nieuszkodzonych tych mózgow, pod wpływem uszkodzenia półkul sąsiednich. Linie regresji, wykreślone w układzie współrzędnych, w którym na osi odciętych oznaczono ilość wody w półkulach uszkodzonych, a na osi rzędnych ilość wody w półkulach nieuszkodzonych, wykazują odmienny charakter przesunięć w półkulach nie poddanych zabiegom, w zależności od rodzaju uszkodzenia półkul sąsiednich (ryc. 6).

#### DYSKUSJA

Oznaczona przez nas średnia ilości wody prawidłowego mózgu kota jest nieco wyższa niż średnie uzyskane w badaniach innych autorów, co

może być związane z odmiennym sposobem pobierania i suszenia materiału lub ze sposobem zabijania zwierzęcia (Kałuża, w druku). Nasze wyniki są zbliżone do wyników Bakaya (1964), jednakże ze względu na pobieranie przez nas łącznie istoty białej i szarej nie mogą być porównywane w dalszych rozważaniach.

Średni przyrost wody w mózgach kotów z ogniskiem rozmiękania wynosi zaledwie 1,07% dla całości mózgu, co mieści się jeszcze w granicach współczynnika zmienności średniej ilości wody mózgu prawidłowego. Dlatego też średnia ilości wody w mózgach z ogniskiem rozmiękania nie różni się od średniej ilości wody mózgu prawidłowego w sposób statystycznie znamienne.

Wyraźny, statystycznie znamienne przyrost wody występował jedynie w półkuli uszkodzonej, zwłaszcza w polu rozmiękania. Ten znaczny przyrost wody w polu rozmiękania warunkuje właśnie statystyczną znamienność różnicy między średnimi ilości wody półkuli uszkodzonej i mózgu prawidłowego, ponieważ różnice między średnimi ilości wody pozostałych okolic mózgu z rozmiękaniem i mózgu prawidłowego nie są statystycznie znamienne.

W mózgu prawidłowym występuje statystyczna znamienność różnicy między średnimi ilości wody zakrętów bocznych, ośrodka półowalnego i zwojów podstawy. W mózgu z ogniskiem rozmiękania wzajemne stosunki ilościowe wody odbiegają od stosunków w mózgu prawidłowym i między średnimi ilości wody niektórych okolic znika statystyczna znamienność różnicy zarówno w półkuli uszkodzonej, jak i w półkuli przeciwnej. Świadczy to o powstających pod wpływem urazu przemieszczeniach wody wewnątrz całego mózgu, co potwierdzają również, odmienne od prawidłowego, obrazy graficzne, ilustrujące rozmieszczenie wody w obu półkulach.

Odmienność zaburzeń wody w każdej z półkul można tłumaczyć niejednakowym stopniem wzajemnej zależności między zawartością wody w poszczególnych okolicach obu półkul.

Średnia zawartości wody w półkuli nieuszkodzonej mózgu z ogniskiem rozmiękania nie odbiega od średniej jej zawartości w mózgu prawidłowym. Jednakże ze względu na zmienione wzajemne stosunki ilościowe wody półkula ta nie odpowiada półkulom mózgu prawidłowego. Półkulom mózgu prawidłowego nie odpowiadają również półkule nie uszkodzone mózgow z krwotokiem i mózgow uszkodzonych zamrażaniem, o czym świadczy, występujący podobnie jak w mózgach z ogniskiem rozmiękania, statystycznie znamienne, w porównaniu z mózgiem prawidłowym, ubytek wody w zakrętach bocznych tych mózgow.

W poprzednich badaniach nad zmianą zawartości miedzi w doświadczalnym obrzęku mózgu, półkulę nieuszkodzoną traktowano jako kontrolną, wyłącznie w oparciu o przeliczenia miedzi na wagę suchej tkanki (Wiśniewski i wsp. 1966).

Rodzaj czynnika uszkadzającego ma niewątpliwy wpływ zarówno na zmianę kierunku przemieszczeń wody jak i na wysokość i umiejscowienie jej przyrostów w operowanym mózgu, czego dowodem są różnice w korelacji między zawartością wody w zakrętach bocznych i w ośrodku półowalnym obu półkul przy różnych sposobach uszkodzenia. Wprawdzie stopień zależności nie ulega zmianie, zmienia się jednak kierunek przemieszczenia wody. Ubytek wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym półkul nieuszkodzonych mózgu jest kilkakrotnie wyższy niż jej przyrost w zakrętach półkul uszkodzonych zamrażaniem lub krwotokiem. W mózgu z krwotokiem w zakrętach bocznych półkul uszkodzonych średnia zawartości wody jest nawet nieco niższa niż średnia jej zawartości w mózgu prawidłowym.

Przemieszczenie wody ubywającej z zakrętów bocznych półkul nieuszkodzonych nie następuje zatem całkowicie do zakrętów bocznych półkul uszkodzonych.

W poprzednich badaniach nad zawartością miedzi, byliśmy ograniczeni jedynie do badań niewielkiego obszaru mózgu i nie mieliśmy możliwości stwierdzenia gdzie przemieszcza się większość wody ubywającej z zakrętów bocznych półkul nieuszkodzonych. Na podstawie wyników badań innych autorów z zastosowaniem fluoresceiny i znakowanych albumin można wnioskować, że gromadzi się ona w ośrodku półowalnym półkuli uszkodzonej (Bakay, Hague 1964, Kałuża w druku, Klatzo i wsp. 1958, 1962, 1965, Wiśniewski i wsp. 1966).

Na podstawie przeprowadzonych badań nasuwa się przypuszczenie, że zaburzenia zawartości wody będące następstwem wywołanych uszkodzeń, polegają nie tylko na jej przesunięciach i związanych z nimi miejscowymi przyrostami lub ubytkami, lecz także i na kierunku tych przemieszczeń, nie spotykanym w mózgu prawidłowym, a odmiennym dla każdej z półkul uszkodzonego mózgu. Pozwala to przypuszczać, że przy różnych uszkodzeniach mózgu prowadzących do obrzęku, bardzo istotną rolę odgrywają te właśnie odmiennie niż w prawidłowym mózgu ukierunkowane przemieszczenia wody i związane z nimi zmiany jej stosunków ilościowych w poszczególnych okolicach obu półkul, nie zaś bezwzględny przyrost ilości wody w całym mózgu (Burrows 1783). Przypuszczalnie dlatego właśnie makroskopowe stwierdzenie obrzęku nie wiązało się w naszych badaniach ze wzrostem ilości wody w całym mózgu, zgodnie z teorią Monro (1783) i Kellie'go (1824).

## WNIOSKI

Badania doświadczalne nad zawartością wody w mózгах kotów z ogniskiem rozmiękania, krwotokiem i uszkodzonych zamrażaniem wykazały po 24 godzinach:

1. Brak różnicy między średnimi zawartości wody mózgu prawidłowego a średnią zawartości wody w mózгах uszkodzonych, mimo widocznych makroskopowo objawów obrzęku.

2. W obu półkulach mózгów uszkodzonych miejscowe przyrosty, lub ubytki wody, związane z jej przemieszczeniami od półkuli nieuszkodzonej do półkuli uszkodzonej.

3. Zależność wartości przyrostu wody w obu półkulach uszkodzonych mózгów oraz szybkości i kierunku jej przemieszczenia od rodzaju czynnika uszkadzającego.

4. Zmiany średnich zawartości wody w zakrętach bocznych i ośrodku półowalnym półkul nieuszkodzonych, statystycznie znamienne w porównaniu ze średnią zawartości wody w tych samych okolicach mózgu prawidłowego, które wykluczają możliwość traktowania półkuli nieuszkodzonej jako półkuli kontrolnej.

Г. Шидловска, Г. Висьневски, М. Съмялек, З. М. Рап, Т. Залевска

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ  
ВОДЫ В МОЗГУ КОШКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗМЯГЧЕНИЯ,  
ЗАМОРАЖИВАНИЯ И КРОВОТЕЧЕНИЯ

## Резюме

Авторы исследовали содержание воды в мозгах кошек с очагом размягчения, с кровотечением и повреждением замораживанием. Исследования показали, что макроскопическим признакам отека не сопутствует увеличение содержания воды в целом мозгу по сравнению с нормальным мозгом. Зато в поврежденных мозгах имеет место перемещение воды, характер, локализация и направление которого зависят от повреждающего фактора. Перемещение воды наблюдается так в поврежденном полушарии, как и в неповрежденном, что исключает возможность принятия этого полушария в качестве контрольного.

H. SZYDŁOWSKA, H. WIŚNIEWSKI, M. ŚMIAŁEK, Z. M. RAP, T. ZALEWSKA

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON CHANGES IN THE BRAIN WATER  
CONTENT IN CAT UNDER THE INFLUENCE OF SOFTENING, FREEZING  
AND HAEMORRHAGE

## S u m m a r y

The authors investigated the water content in cat brains with foci of malacia, haemorrhage and when injured by freezing. The investigations demonstrated that the macroscopic symptoms of edema are not associated with an increased water

content in the brain as a whole as compared with a normal brain. In the injured brains water is only translocated. The character, site and direction of this translocation depends on the injuring factor. These changes occur both in the injured and intact hemisphere so that the latter cannot be treated as control in the experiments.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L., Hague I. U.: Morphological and chemical studies in cerebral edema. I. Cold. Induced Edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1964, 23, 393 — 418.
2. Burrows A.: On disorders of the structure and function of the nervous system. W. Creech, Edinburgh 1783, X, 176.
3. Kałuża J.: Badania doświadczalne nad obrzękiem mózgu w następstwie rany chirurgicznej i martwicy kriogennej. *Acta Med. Pol.*, w druku.
4. Kellie.: Death from Cold and Congestion of the Brain. *Trans. med. chir. Soc., Edinb.* 1824, 84 — 169.
5. Klatzo I. Piraux A, Laskowski E.: The relationship between edema, blood brain barrier and tissue elements in local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1958, 17, 548 — 564.
6. Klatzo I., Miquel J., Otenasek R.: The application of fluorescein inlabeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. *Acta Neuropath.*, 1962, 2, 144 — 160.
7. Klatzo I., Wiśniewski H., Smith D. E.: Observations on penetration of serum proteins into the central nervous system. *Progr. in Brain Res.*, 1965, 15, 73 — 88.
8. Laskowski N. J., Klatzo I., Baldwin M.: Experimental study of the effects of hypothermia on local brain injury. *Neurology*, 1960, 10, 499 — 505.
9. Monro A.: Observations on the structure and function of the nervous system. W. Creech, Edinburgh 1783, X, 176.
10. Pappius H. M.: The distribution of water in brain tissues swollen in vitro and in vivo. *Progr. in Brain Res.*, 1965, 15, 135 — 154.
11. Rap Z. M., Wiśniewski H., Wermiński K., Korthals J.: Elektrolityczne wywołanie zakrzepu w tętnicy środkowej mózgu u kotów przy pomocy stereotaksji. *Neuropat. Pol.*, 1968, 6, 219 — 226.
12. Wiśniewski H.: Studies on the permeability of the blood-brain, blood-cerebro-spinal fluid and cerebro-spinal fluid barrier for albumin in cerebral edema. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 1 — 32.
13. Wiśniewski H., Śmiałek M., Zalewska T., Szydłowska H., Rap Z.: Copper contents in brains with blood-brain barrier damaged by freezing, haemorrhage and encephalomalacia (Experimental work). *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 33 — 51.

Adres: doc. dr Hanna Szydłowska, Pracownia Patologii Neurochirurgicznej PAN, Kraków, ul. Botaniczna 3.

TEMATYKA POSIEDZEŃ NAUKOWYCH  
STOWARZYSZENIA NEUROPATOLOGÓW POLSKICH  
w roku 1971

Styczeń

Mikroanaliza laserowa skrawków histologicznych — M. Kozik (Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań).

Przypadek gwiazdziaka rozlanego do przestrzeni podoponowej u 3-letniego dziecka — J. Kałuża, E. Gruszka (Pracownia Patologii Neurochirurgicznej Zakładu Farmakologii PAN, Kraków).

Sprawozdanie z VI Międzynarodowego Kongresu Neuropatologicznego w Paryżu, w sierpniu 1970 r. — A. Głuszcz (Pracownia Neuropatologii Zakładu Anatomii Patologicznej AM, Łódź)

Luty

Ultrastruktura komórek Opalskiego w doświadczalnej gliopatii wilsonowskiej w warunkach hodowli tkankowej — M. J. Mossakowski, J. Borowicz, Z. Kraśnicka, B. Gajkowska (Zespół Neuropatologii i Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa)

Obraz ultrastrukturalny leukodystrofii Krabbego — E. Sluga, M. Ostenda (Neurologisches Institut der Universität Wien i Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa)

Marzec

Classification des maladies neurologiques, dites virales lentes. Reflexions sur les amino-acidopathies — A. Lowenthal (Foundation Born-Bunge pour la Recherche, Department de Neurochimie, Antwerpen)

Kwiecień

Biochemiczne podstawy leukodystrofii metachromatycznej — W. Błęszyński (Zakład Biochemii Instytutu Biologii, Uniwersytet im. M. Kopernika, Toruń)

Obraz postaci przejściowej stwardnienia rozlanego do rozlanego w okresie zaostrzenia — L. Iwanowski, A. Jędrzejewska, L. Dydyk (Pracownia Neuropatologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa)

Maj

Pathologie du thalamus — J. J. Martin (Foundation Born-Bunge pour la Recherches Scientifiques, Department de Neuropathologie, Antwerpen)

Czerwiec

Zagadnienie grzybic ośrodkowego układu nerwowego (klasyfikacja, morfologia, diagnostyka) — D. Wierzbička (Pracownia Anatomii Patologicznej Wojewódzkiego Szpitala Dziecięcego w Dziekanowie Leśnym)

Zmiany morfologiczne w mózdzku szczurów w wyniku przewlekłego podawania leków przeciwpadaczkowych — J. Karkos (Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Pruszków)

*Dalszy ciąg na str. 86.*



LECH IWANOWSKI, AGNIESZKA JĘDRZEJEWSKA, LUBOMIRA DYDYK

## OBRAZ POSTACI PRZEJŚCIOWEJ STWARDNIENIA ROZSIANEGO DO ROZLANEGO W OKRESIE ZAOSTRZENIA

Pracownia Neuropatologii Porównawczej Zespołu Neuropatologii,  
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN  
Kierownik Pracowni: prof. dr E. Osetowska

Niniejszy przypadek przedstawiamy ze względu na jego złożony obraz morfologiczny. Wydaje się, że stanowi on dość wymowną ilustrację powiązań patogenetycznych stwardnienia rozsianego i choroby Schildera z procesem alergicznym.

### OPIS PRZYPADKU

Chora C. K. lat 33 przebywała na II Oddziale Neurologicznym Szpitala Wolskiego w Warszawie od 3.II do 2.VI. 1970 r. (H. Ch. 1952/108/70, lekarz prowadzący dr M. Bortnowska). Na dwa lata przed przyjęciem do szpitala zaczęła się zmieniać psychicznie. Na rok przed hospitalizacją urodziła trzecie dziecko. W trzy tygodnie po porodzie przebyła infekcję „grypową” przebiegającą z wysoką ciepłotą. Od tego czasu zaobserwowano zaburzenia chodu i pogłębienie się zmian psychicznych. Przy przyjęciu do szpitala była zupełnie nieorientowana w czasie i przestrzeni, zawszona, zanieczyszczająca się. W stanie internistycznym prócz znacznego stopnia wychudzenia i głębokiej odleżyny w okolicy krzyżowej innych zmian nie stwierdzono. Stan neurologiczny wykazywał rozsiane zmiany ogniskowe ze strony nerwów czaszkowych (II, III, VII, IX, X, XII), niedowład kończyn, zwłaszcza dolnych, objawy mózdkowe. W badaniach dodatkowych stwierdzono: obraz krwi charakterystyczny dla niedokrwistości niedobarwliwej średniego stopnia, zmiany w moczu o cechach zapalenia wstępującego dróg moczowych, z posiewu krwi wyhodowano gronkowca białego koagulazo-ujemnego. Płyn mózgowy: rdzen.: cytoza 9, białko 62 mg%, krzywa złotowa porażenna (66654210).

W stanie neurologicznym początkowo przeważał prawostronny połowiczny zespół kurczowy, na który nałożył się obustronny zespół pozapiramidowy, a potem bezwład kurczowy obu nóg, prowadzący do ich pełnego przykurczu. Błądź tarcz nerwów wzrokowych przeszła w obraz zaniku. Przez cały czas utrzymywał się zespół mózdkowy.

Stałe zanieczyszczanie się doprowadziło do zakażenia poszerzających się odleżyn i do posocznicy z rzutami wysokiej ciepłoty. Pod koniec życia chora była w stanie skrajnego wyniszczenia. Zmarła po 4-miesięcznym pobycie w szpitalu, a około dwu i pół-letnim trwaniu choroby.

Rozpoznanie kliniczne: *Leucoencephalitis transitoria (Morbus Schilderi)*. *Inanitio*. *Decubitus*. *Pediculosis*. *Anaemia hypochromica*.

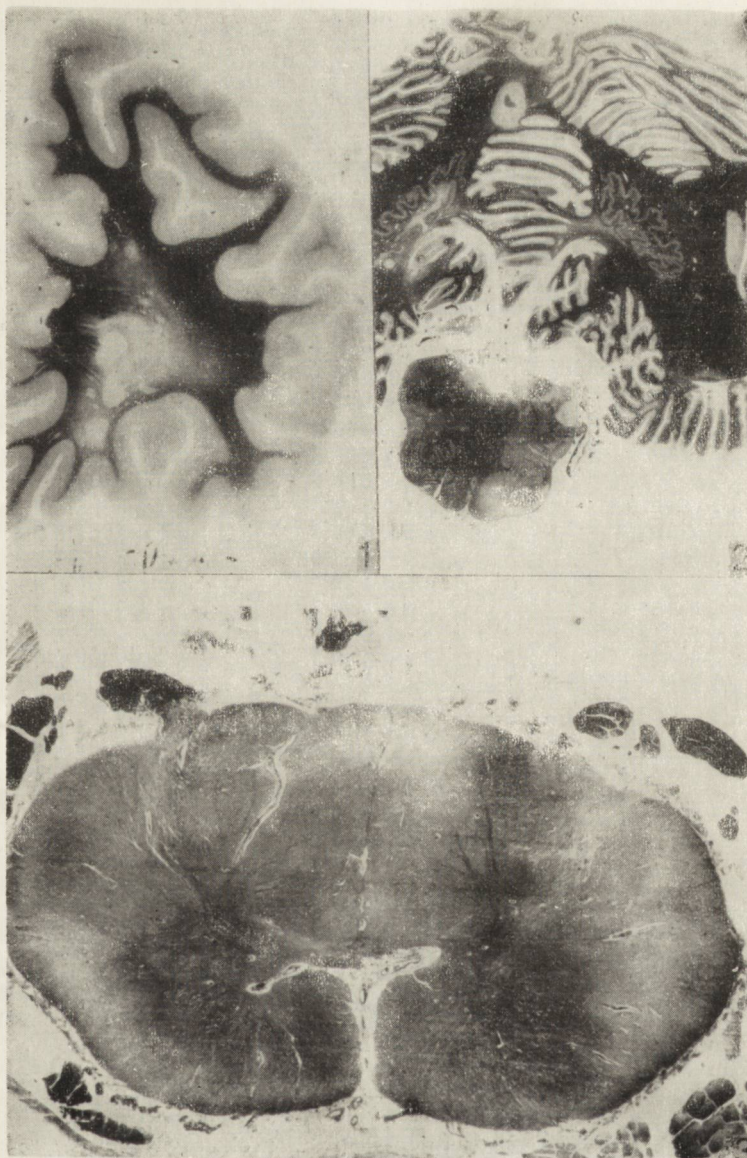
Badaniem sekcyjnym wykonanym w Zakładzie Anatomii Patologicznej Szpitala Wolskiego (dr med. J. Winczerski, prot. sekc. 6362) rozpoznano: obustronne płacikowe zapalenie płuc, obrzęk płuc, zanik prosty mięśnia sercowego ze zwłóknieniem, przewlekłe zapalenie miedniczek nerkowych i miąższu nerek z rozległym uszkodzeniem kanalików, zanik brunatny wątroby z ogniskami stłuszczenia, zanik prosty śledziony, stłuszczenie kory nadnerczy, uogólnioną niedokrwistość oraz rozległe odleżyny okolicy krzyżowej, pośladkowej i krętarzy.

Makroskopowo w mózgu utrwalonym stwierdzono: zanik obu płatów czołowych, symetryczne poszerzenie całego układu komorowego, ścięczenie spoidła wielkiego i przegrody przezroczystej; na przekrojach czołowych w istocie białej obu półkul plaki demielinizacyjne; podobne zmiany również na przekrojach mózdzku.

Do badania mikroskopowego pobrano 4 skrawki przez obie półkule mózgu, 2 przekroje przez mózdzek i pień, 3 poziomy rdzenia. Materiał zatopiony w parafinie barwiono: hematoksyliną-eozyną, fioletem kryzylu, oraz metodami: Heidenhaina, Holzera w modyfikacji Kanzler-Arendta, van Gieson i Holmesa. Technika mrozikowa: wycinek z płata czołowego, Sudan III.

Badaniem mikroskopowym (protok. mikr. H-4/70) stwierdzono:

1. Liczne ostro ograniczone plaki demielinizacyjne, rozrzucone w istocie białej półkul mózgu (ryc. 1), mózdzku oraz w pniu i rdzeniu kręgowym; część ich była położona podkorowo, odgraniczona ostro przy włóknach „U”, część przechodziła na korę. Wiele plak było położonych w bezpośrednim sąsiedztwie układu komorowego, a prawie całą ścianę komór bocznych i trzeciej otaczało pasmo całkowitej demielinizacji. W obrębie ograniczonych plak stwierdzono różny stopień zaawansowania demielinizacji z rozpadem do tłuszczu sudanofilnych. Obraz komórkowy wahał się od charakterystycznego zagęszczenia elementów komórkowych w płacie świeżej do ubogokomórkowej plaki starszej, w której obszar zdemielinizowany wypełniały włókna glejowe, a wał gleju komórkowego wytyczał jej granice. W pasmie demielinizacji przykomorowej występowała glejoza astrocytarna i pałeczkowata. W obrębie plak występowały limfocytowe nacieki okołonaczyniowe. Dotyczyły one



*Ryc. 1.* Przekrój przez płaty czołowe — zmiany demielinizacyjne typu drobnych, ostro odgraniczonych ognisk oraz demielinizacji rozlanej. Heidenhain. Pow. lup.

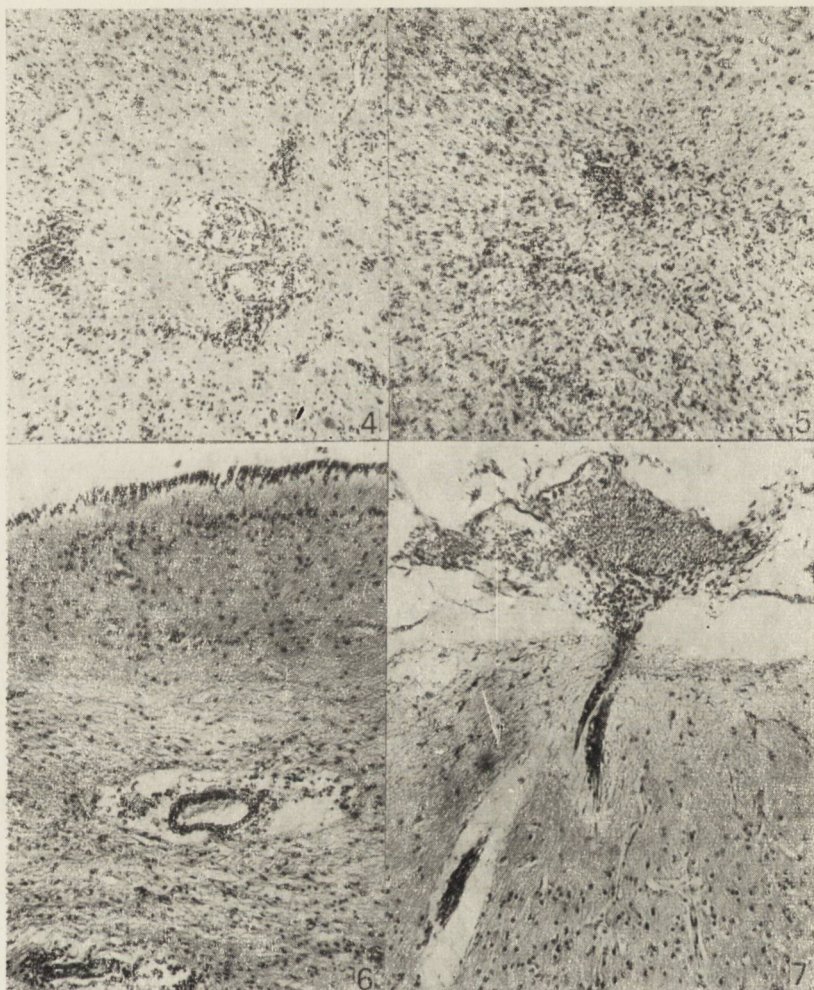
*Fig. 1.* Section through frontal lobes. Demyelination changes of two types: small plaques with sharp outlines and diffuse demyelination. Heidenhain. Magn. glass.

*Ryc. 2.* Przekrój przez mózdzek i opuszkę. Plaki i demielinizacja rozlana w istocie białej mózdzku i w opuszce. Heidenhain. Pow. lup.

*Fig. 2.* Section through the cerebellum and medulla. Demyelinated plaques and diffuse demyelination in the white matter of the cerebellum and in medulla. Heidenhain. Magn. glass.

*Ryc. 3.* Rdzeń kręgowy w odcinku szyjnym. Demielinizacja istoty białej z większym dotknięciem sznurów bocznych i tylnych. Heidenhain. Pow. lup.

*Fig. 3.* Section through cervical cord. Demyelination of white matter, lateral and posterior columns are more affected. Heidenhain. Magn. glass.



Ryc. 4. Plaka w istocie białej mózgu. Widoczne nacieki limfocytarne wokół naczyń, opustoszenia komórkowe w środku i glejoza na obwodzie. H-E. Pow. 60 X.

Fig. 4. Demyelination plaque in the centrum ovale. Lymphocytic perivascular infiltration, lack of cells in the centre, marked gliosis on the periphery are seen. H-E. X 60.

Ryc. 5. Istota biała mózgu. „Alergiczny” naciek okołozylny nieograniczony do przestrzeni okołonaczyniowej, a rozpraszający się w otaczającej tkance. W nacieku limfocyty i mikroglej. H-E. Pow. 60 X.

Fig. 5. Cerebral white matter. Perivenous „allergic” infiltration, not limited to the perivascular space only, but dispersing in the adjacent tissue. In the infiltration lymphocytes and microglia cells. H-E. X 60.

Ryc. 6. Okolica przykomorowa. „Posocznicowe” nacieki okołozylne i okołotętnicze. H-E. Pow. 60 X.

Fig. 6. Periventricular area. „Septic” perivenous and periarterial infiltration. H-E. 60 X.

Ryc. 7. Naciek z opony miękkiej wnikaający wzdłuż naczyń do powierzchniowych warstw kory. H-E. Pow. 60 X.

Fig. 7. Infiltration of meninges penetrating along the vessels to superficial layers of cerebral cortex. H-E. X 60.

nie tylko plak świeżych, ale niekiedy i tych, których demielinizacja wydawała się być zakończona.

2. Zmiany demielinizacyjne rozlane były najwyraźniejsze w obu płatach skroniowych, ale i na innych poziomach obserwowano pola rozlanej demielinizacji zatrzymującej się na włóknach „U” z dużą glejozą, licznymi, obfitymi naciekami okołonaczyniowymi i przerzedzeniem włókien nerwowych (ryc. 4). Nie obserwowano wyraźnej, wybiórczej demielinizacji dróg piramidowych. Przekroje przez rdzeń przedłużony (ryc. 2) i kręgowy (ryc. 3) były zdemielinizowane w różnym stopniu na poszczególnych poziomach, a na tym tle widoczne były drobne ostro ograniczone plaki.

3. Jako trzeci składnik charakterystyczny tego obrazu występowały okołozylne, nacieki limfocytarne-mikroglejowe z typowym rozpraszaniem się elementów nacieku w otaczającej tkance mózgowej (ryc. 5). Dotyczyły one głównie drobnych żył. Naciekiem przeważnie towarzyszyła demielinizacja okołonaczyniowa, a w jej obszarze odczyn gleju włóknistego. Nacieki te nie były jednak równomiernie rozłożone w mózgu. Poza plakami widoczne były głównie w płatach skroniowych i ciemieniowych; pozostałe okolice były wolne od nacieków.

4. Wreszcie obserwowano odrębnego typu obfite nacieki z pojedynczymi leukocytami, niekiedy nawet mukowate, występujące w korze i okolicach przykomorowych mózgu (ryc. 6). Charakteryzowały się one występowaniem również okołotętniczym i często wzdłuż naczyń łączyły się z naciekiem w przestrzeni podpajęczynówkowej. Ten ostatni był bardziej obfity i prócz limfocytów zawierał również liczne makrofagi i komórki plazmatyczne, składając się na obraz zapalenia opon miękkich (ryc. 7).

5. W obrazie istoty szarej były widoczne przerzedzenia neuronalne, głównie w korze, i glejoza, dająca odcinkami obraz stwardnienia zawojów. Odpowiadały one opisanemu makroskopowo zanikowi mózgu.

Rozpoznanie mikroskopowe: *Sclerosis multiplex, forma transitionalis ad sclerosem diffusam in stadio recurrente acuto. Sepsis.*

#### OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek miał cechy stwardnienia rozsianego: liczne ostro cięte plaki rozsiane, których różny stopień organizacji świadczył o wielofazowości procesu. Występowała w nim równocześnie tendencja do demielinizacji rozlanej, jak w *sclerosis diffusa*, z odpowiednio bogatym odczynem komórkowym w tych polach, z uszkodzeniem aksonów, ale bez wyraźnej demielinizacji układowej.

Prócz tych cech występowały elementy, przypominające obraz klasycznego alergicznego zapalenia mózgu. Sięgając po analogie w piśmiennictwie należy przytoczyć demonstrowany w Polsce w 1965 roku przypadek Oppenheimera. Dotyczył on zapalenia mózgu po szczepieniu przeciwko ospie. Prócz zmian zapalnych, występowała tam rozlana demielinizacja, jednak bez „ostro ciętych” plak. Zmiany miały charakter jednoczasowy. Kolejną analogię stanowią japońskie przypadki zapaleń mózgu po szczepieniu przeciwko wścieklicznie, opisane przez Uchimurę i Shirakiego (1957). Były to pierwsze spotkane w Japonii przypadki z rozszianymi zmianami demielinizacyjnymi. Demielinizacji towarzyszył naciek zapalny limfocytarny i mikroglejowy. Zmiany były umiejscowione wokół żył i przykomorowo. Występowały w istocie białej mózgu i pniu, a prócz jednego przypadku oszczędzały mózdzek. Obrazy poszczególnych przypadków różniły się pomiędzy sobą intensywnością i długo-trwałością procesu, co odpowiadało różnym okresom przeżycia, ale w poszczególnych przypadkach wszystkie zmiany były jednoczasowe. U chorych zmarłych w kilka lat po zachorowaniu występowały stare, dobrze zorganizowane plaki, typowe dla stwardnienia rozsianego. Być może nieobecność czynników alergizujących w rozwoju cywilizacji japońskiej (żywność, klimat, brak szczepień prewencyjnych), wpływała na niewystępowanie tam stwardnienia rozsianego i dopiero prowokacja szczepieniem wywołała podobne zmiany u osobników odpowiednio predysponowanych. Szukając dalszych analogii natrafiliśmy na przypadek opisany przez Radermeckera i Guazziego (1962), w którym u 29-letniego mężczyzny po przebyciu infekcji grypowej wystąpiły objawy zapalenia mózgu z niedowładem połowicznym. Po 2-letniej remisji wystąpił nowy rzut choroby również pod postacią kliniczną zapalenia mózgu. Chory zmarł w 2 1/2 roku od pierwszego incydentu. Badaniem neuropatologicznym autorzy stwierdzili współistnienie plak starych i świeżych w obrębie wzgórza, podwzgórza i pnia oraz czynne nacieki zapalne okołozylne w tych strukturach. Poza tym obserwowano zmiany zapalne w oponach, określone jako *leptomeningitis fibrosa*. Autorzy rozważali możliwość przejścia ostrego poinfekcyjnego zapalenia mózgu w ostrą postać stwardnienia rozsianego w przypadku zaistnienia pewnych określonych osobniczych predyspozycji, dotychczas nie wyjaśnionych. Przypadek ten jest najbardziej zbliżony do naszego zarówno pod względem rozmieszczenia i charakteru zmian, jak i początkowej ostrej sprawy infekcyjnej. Opierając się na przytoczonych analogiach jesteśmy skłonni traktować nasz przypadek jako postać przejściową stwardnienia rozsianego w okresie ostrym, odpowiadającą schorzeniu nazwanemu przez Babińskiego „sclerose en plaque aigue maligne”.

W interpretacji patogenetycznej przypadku należałoby przyjąć, że u osobnika z klasycznym stwardnieniem rozsianym o przebiegu subklinicznym (postać klinicznie niemego stwardnienia rozsianego była opisana przez Osetowską w roku 1965) nastąpiło zaostrzenie procesu wskutek zadziałania czynnika traumatyzującego, jakim był poród i bliżej nieokreślona infekcja, prawdopodobnie grypowa. Wzmoczony rozpad mieliny spełnił rolę antygeny, działającego na podatne podłoże, jakim był organizm zdolny do tworzenia przeciwciał autoantymielinowych.

Przeciw rozpoznaniu okołozylnego zapalenia mózgu w czystej postaci przemawiał: brak przebytego szczepienia (z wywiadu), brak demielinizacji wokół całego drzewa naczyniowego, wieloczasowy przebieg procesu demielinizacyjnego, występowanie licznych zmian w mózdku, „trzymanie się” nacieku raczej ognisk demielinizacyjnych, a nie całego pnia naczyniowego, jak również fakt, że całe obszary istoty białej mózgu były zupełnie pozbawione nacieków okołozylnych.

Elementy nie mieszczące się w powyższym omówieniu przypisujemy uogólnionej posocznicy.

Obraz zaniku mózgu jest niespecyficzny, występuje w każdym przypadku stwardnienia rozsianego o długim okresie przeżycia.

Różne składniki tego bogatego obrazu morfologicznego dałyby się sprowadzić do wpływu tego samego alergicznego i alergizującego patomechanizmu. Oczywiście nie pomijamy faktu, że w ostatnich czasach badania nad stwardnieniem rozsianym weszły w fazę rozważań etiologicznych (powiązanie stwardnienia rozsianego i przeciwciał odrowych), niemniej tego typu przypadki „pograniczne” zachowują wartość ilustratywną dla zrozumienia atypowych przebiegów klinicznych i złożonej natury chorób demielinizacyjnych.

Autorzy wyrażają podziękowanie p. dr med. Barbarze Wąsowicz Ordynatorowi II Oddziału Neurologicznego Szpitala Wolskiego za udostępnienie materiału.

Л. Ивановски, А. Енджеевска, Л. Дыдык

#### КАРТИНА ПЕРЕХОДНОГО ВИДА РАССЕЯНОГО СКЛЕРОЗА К ДИФФУЗНОМУ СКЛЕРОЗУ ВО ВРЕМЯ ОБОСТРЕНИЯ БОЛЕЗНИ

##### Резюме

Описан случай 33-летней женщины, психика которой начала изменяться на 2 года перед приемом ее в больницу. Год перед госпитализацией родила третьего ребенка, а спустя три недели после родов прошла гриппозную инфекцию. Клиническая картина представляла собой: глубокие психические изменения, значительное истощение, обширные пролежни. Нейрологически очаговые изменения со стороны черепно-мозговых нервов II, III, VII, IX, X,

XII, спастический синдром, — правосторонний и двухсторонний экстрапирамидный, кроме этого спастический паралич обеих ног с контрактурой и мозжечковым симптомокомплексом. Женщина умерла вследствие обобщенного сепсиса после 2,5-годичной болезни. Клинический диагноз: leucoencephalitis transitoria. При вскрытии обнаружено обобщенный сепсис и дегенерацию внутренних органов.

Макроскопически мозг представлял свойства дегенерации и многочисленные рассеянные демиелизационные изменения мозга, мозжечка, ствола и спинного мозга. Микроскопически были обнаружены 4 вида изменений: I. Демиелизационные — рассеянные, возникшие в разное время как в белом веществе, так и переходящие в серое вещество с большой склонностью возникновения в стенках желудочков. Иногда демиелинизация переходила в разлитую. II. Изменения, соответствующие аллергическому перивенозному энцефалиту. III. Изменения, соответствующие сепсису. IV. Изменения, соответствующие дегенерации.

В патогенетической интерпретации случая авторы полагают, что у osoby с классическим рассеянным склерозом с субклиническим протеканием имело место обострение в результате травмирующего фактора, каким оказались роды и гриппозная инфекция. Усиленный распад миелина сыграл роль антигена, воздействующего на благоприятные условия, которые представлял собой организм, способный образовать аутоантимиелиновые противтела. Это усугубил обобщенный сепсис. Приводятся аргументы против диагноза перивенозного энцефалита в чистом виде — между прочим наличие изменений вокруг нецелого сосудистого дерева и долгосрочное протекание процесса. Авторы ссылаются на аналогичные случаи в литературе.

L. Iwanowski, A. Jędrzejewska, L. Dydyk

#### A TRANSITIONAL FORM OF DISSEMINATED AND DIFFUSE SCLEROSIS IN THE PERIOD OF EXACERBATION

##### S u m m a r y

The case of a 33-years old woman is described who two years before hospitalisation began to change mentally. One year before being admitted she gave birth to her third child and three weeks later she underwent an influenza infection. The clinical picture was: deep psychic changes, considerable emaciation, extensive bedsores. Neurologically focal changes comprising the cranial nerves II, III, VII, IX, X and XII, a spastic right-sided syndrome and a bilateral extrapyramidal syndrome were stated with further spastic paralysis and contractures of both feet and a cerebellar syndrome. The woman died of generalized septicaemia after two years of illness with clinical diagnosis of leukoencephalitis transitoria.

Macroscopically, the brain exhibited atrophy and numerous disseminated demyelination plaques also discernible in the cerebellum, brain stem and spinal cord. Microscopically, four kinds of changes were distinguished: 1) disseminated demyelination foci of various size in white matter exceeding to the gray matter, with a particular predilection for the ventricular system. In some places there was a transition from disseminated to diffuse demyelination; 2) changes corresponding to allergic perivenous encephalitis; 3) changes corresponding to septicaemia; 4. changes corresponding to atrophy.



In the pathogénetic interpretation of this case, the authors presume that in the patient with classical disseminated sclerosis with a subclinical course, exacerbation occurred owing to labour and influenza infection. The products of the enhanced myelin breakdown might have played a role of an antigen acting on a susceptible substrate. Arguments are presented contradicting the diagnosis of genuine perivenous encephalitis, among them the fact that the changes did not occur around the entire vascular tree and that the process was found to appear in various phases.

#### PISMIENNICTWO

1. Oppenheimer D.: A case of so-called demyelinating encephalitis. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4 Suppl. 717—721.
2. Osetowska E.: Charakterystyka morfologiczno-topograficzna typów uszkodzeń mieliny w stwardnieniu rozsianym. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 3, 259—269.
3. Radermecker J., Guazzi S. G.: Sclerose en plaques aiguë et encephalites disséminées aiguë. *Livre Jubilaire docteur Ludo van Bogaert*, 1962, 646—658.
4. Uchimura I., Shiraki H.: A contribution to the classification and the pathogenesis of demyelinating encephalomyelitis with special reference to the central nervous system lesions caused by preventive inoculation against rabies. *J. Neuropath.*, 1957, 16, 2, 139—208.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Pasteura 3.

## Wrzesień

Heredopathia atactica polyneuritiformis. An inborn error of lipid metabolism involving the nervous system. Some recent biochemical and dietary studies — S. Refsum (Department of Neurology, University of Oslo)

## Październik

Struktury wiruso-podobne w komórce mięśniowej w przypadku zapalenia wielomięśniowego — A. Fidziańska (Klinika Neurologiczna AM, Warszawa)

Przypadek kiły wrodzonej układu nerwowego o obrazie młodzieńczego porażenia postępującego — W. Nyka (Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa)

## Listopad

Biopsy studies of neuropathies — E. Sluga (Neurologisches Institut der Universität Wien)

## Grudzień

Biosynteza białka w warunkach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego — J. Albrecht (Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN)

Śluzak lewego przedsionka serca przyczyną powtarzających się zatorów tętnic mózgowych i obwodowych — J. Borowska-Lehman, E. Mierzejewska (Zakład Patologii Instytutu Zmysłów AM, Gdańsk)

Sprawozdanie z Sympozjum Krajów Naddunajskich — M. J. Mossakowski (Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa).

HANNA JĘDRZEJOWSKA, EWA SAWICKA, HANNA DRAC, ZOFIA GLINKA

## METODY BADANIA HISTOLOGICZNEGO NERWÓW OBWODOWYCH \*)

Klinika Neurologiczna AM, w Warszawie  
Kierownik: prof. dr med. I. Hausmanowa-Petrusewicz

W ostatnich latach jesteśmy świadkami dużego wzrostu zainteresowania patomorfologią i patofizjologią nerwów obwodowych, do czego w znacznej mierze przyczyniło się zastosowanie nowych metod badawczych umożliwiających ocenę struktury i czynność nerwu. W niniejszej pracy chcemy podzielić się naszymi spostrzeżeniami w zakresie stosowania histologicznych metod badania nerwów obwodowych. Wszystkie poniżej omówione metody mogą być zastosowane zarówno do materiału biopsyjnego jak i sekcyjnego.

### POBIERANIE MATERIAŁU DO BADANIA HISTOLOGICZNEGO

Do badania bioptycznego najczęściej pobierany jest nerw łydkowy. W rzadkich przypadkach wykonuje się biopsję innego nerwu np. u chorych z przerostową neuropatią można pobrać wycinek z nerwu usznego wielkiego, w przypadku stwierdzonego obmacywaniem pogrubienia tego nerwu (Thévenard, Berdet 1958).

Biopsję nerwu łydkowego wykonujemy w sposób następujący: po nacięciu skóry i tkanki podskórnej 1% r. ksylokainy, na zewnętrznej powierzchni podudzia, mniej więcej na wysokości 3 cm powyżej kostki zewnętrznej i w połowie odległości pomiędzy nią a ścięgnem Achillesa, nacina się skórę na długości około 5 cm. Po bardzo ostrożnym odpreparowaniu nerwu łydkowego od okolicznych tkanek wycina się go na długości 2—3 cm. Jest to tzw. biopsja całkowita. W przypadku, gdy średnica nerwu jest duża, można pobrać do badania tylko część nerwu. Biopsja taka nosi nazwę biopsji pęczkowej i jest zalecana przez wielu autorów, a w szczególności przez Dycka i wsp. (1966, 1968) oraz Tho-

\*) Praca częściowo subsydiowana z umowy polsko amerykańskiej (NINDS — Bethesda). Nr umowy 05-002-1.

masa (1970). W Warszawskiej Klinice Neurologicznej biopsję pęczkową wykonujemy w przypadkach neuropatii przerostowych oraz u dorosłych, natomiast u dzieci jesteśmy często zmuszeni do pobrania całego pnia nerwowego. W czasie pobierania wycinka jest niezmiernie ważne, by nie uszkodzić nerwu. Nawet nieznaczny ucisk czy naciągnięcie wywołują zmiany we włóknach nerwowych, które mogą imitować rzeczywiste zmiany chorobowe.

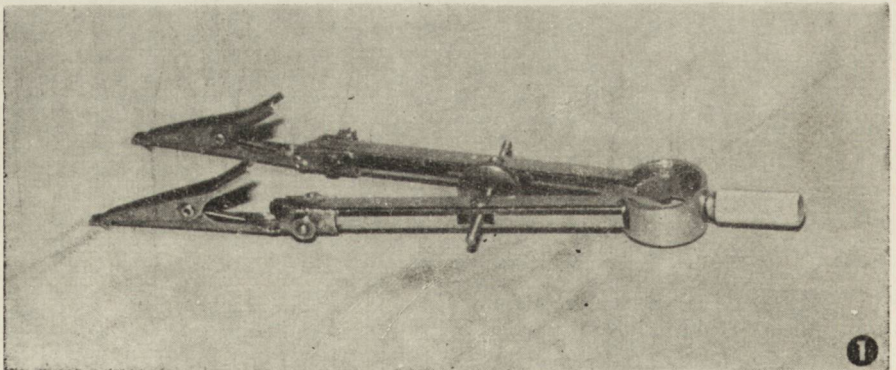
#### OBJAWY SUBIEKTYWNE I OBIEKTYWNE PO USUNIĘCIU NERWU ŁYDKOWEGO

Obserwacje Dycka i wsp. (1966, 1968) oraz Thomasa (1970) wskazują, iż biopsja całkowita powoduje trwałą niedoczulicę skóry bocznej powierzchni pięty i stopy, natomiast pęczkowa — nie pozostawia żadnych objawów, bądź też są one znikome.

W naszym materiale, na 65 pobranych biopsji, obserwowaliśmy w jednym przypadku długotrwałe utrzymywanie się objawów bólowych w obszarze skóry unerwianej przez nerw łydkowy. Dotyczyło to chorego, u którego wykonano całkowitą biopsję. W paru przypadkach stwierdziliśmy przemijającą niedoczulicę tej okolicy, a u kilku chorych — parestezję lub bóle trwające kilka do kilkunastu dni. Wyraźnej zależności pomiędzy występowaniem powyższych objawów a sposobem wykonywania biopsji (pęczkowa, całkowita) nie zaobserwowano.

#### PREPARATYKA HISTOLOGICZNA NERWU OBWODOWEGO

Z pobranego wycinka nerwu usuwamy przylegającą do niego tkankę tłuszczową i dzielimy go na 3 części. Dwie części (każdą osobno) lekko rozciągamy za pomocą specjalnie w tym celu przerobionym cyrkli za-



Ryc. 1. Cyrkiel używany do rozciągania nerwu.

Fig. 1. Compasses used for nerve stretching.

kończonych zaciskami (ryc. 1) i umieszczamy w utrwalaczach. Jedną część — w 10% formalinie lub w płynie Bakera \*) — materiał ten barwiony jest następnie rutynowymi metodami; drugą część — przeznaczoną do badań ilościowych — w 2% roztworze aldehydu glutarowego. Trzecią, pozostałą część pobranego wycinka, umieszczamy w płynie Ringera — służy ona do wykonania „czesanych preparatów”.

#### METODY RUTYNOWE

Po utrwaleniu w formalinie lub w płynie Bakera jedna część wycinka zatapia się w parafinie, druga zaś skrawana na mikrotomie zamrożeniowym. Podczas krajania skrawków parafinowych staramy się otrzymać zarówno przekroje podłużne jak i poprzeczne. Skrawki parafinowe barwimy rutynowo następującymi metodami: hematoksyliną i eozyną, met. van Gieson oraz błękitem toluidyny. Do barwienia neurofibryli posługujemy się metodą impregnacji srebrem wg Holmesa; mielinę barwimy metodą Klüvera-Barrera. Te dwie ostatnie metody dają w naszej pracowni najlepsze wyniki — wybraliśmy je spośród wielu innych stosowanych przez nas poprzednio. Poza powyższymi metodami, w każdym badanym przypadku wykonujemy barwienie met. PAS. Inne metody barwienia skrawków parafinowych stosujemy zależnie od przypadku.

W przypadku obecności złożeń mogących odpowiadać złogom amyloidu, polecamy, zgodnie ze stanowiskiem Małyka i wsp. (1967, 1970) barwienie saturnem czerwonym, obok oczywiście takich metod jak czerwień Kongo i fiolet metylowy. Skrawki mrozkowe barwimy rutynowo jedynie kwaśnym fioletem krezylowym wg Hirscha i Peiffera (1955) w celu wykrycia złożeń swoistych dla leukodystrofii metachromatycznej. W przypadku uzyskania technicznie złych preparatów w barwieniu srebrowym skrawków parafinowych, impregnację srebrem w materiale mrozkowym przeprowadzamy wg Gross-Bielschowsky'ego.

#### METODY BADAŃ ILOŚCIOWYCH

Podajemy poniżej sposób przygotowania materiału do badań ilościowych, stosowany w naszej pracowni:

- 1) nerw utrwała się przez 24 godz. w mieszaninie złożonej z 2% roztworu aldehydu glutarowego i buforu fosforanowego o pH 7,3, zmieszanych w stosunku 3,6 ml : 11 ml,

---

\*) Zgodnie z zaleceniem Komisji Nerwowo-Mięśniowej przy Światowej Federacji Neurologicznej.

- 2) płucze się go w roztworze 0,15 M sacharozy zmieszanej z buforem fosforanowym o pH 7,3 (w stosunku 1 : 1) i pozostawia w tym roztworze co najmniej 24 godziny,
- 3) kroi się poprzecznie na skrawki grubości 3 mm,
- 4) skrawki wkłada się do 1% wodnego roztworu kwasu osmowego z dodatkiem 1% kwasu chromowego na 24 godziny (10 kropli 1% kwasu chromowego na 100 ml 1% kwasu osmowego),
- 5) skrawki przekłada się do 1% wodnego roztworu dwuchromianu potasu na 24 godziny,
- 6) przenosi się do 50% alkoholu na 48 godzin. Do tego momentu materiał znajduje się w temperaturze 4°C,
- 7) skrawki wkłada się do alkoholowego roztworu hematoksyliny Kulczyckiego na 5 dni (przy cieńszych skrawkach, o grubości 1 mm — na 2 doby) w temp. pokojowej, w ciemnym naczyniu (roztwór hematoksyliny Kulczyckiego : 10% dojrzała hematoksylina alkoholowa — 10 ml + 90 ml wody destylowanej + 2 ml lodowatego kwasu octowego). Roztwór ten trzeba często zmieniać,
- 8) płucze się skrawki przez 2 dni w 70% etanolu (konieczna częsta zmiana roztworu),
- 9) materiał przeprowadza się przez alkohol i aceton:
  - 25% alkohol 4 × 1 min.
  - 50% „ 3 × 2 min.
  - 70% „ 2 × 2 1/2 min.
  - 80% „ 3 × 5 min.
  - 90% „ 3 × 5 min.
  - (w temp. 4°C).
  - 90% alkohol + 90% aceton w stosunku 1:1 — 5 min.
  - 90% aceton — 5 min.
  - 95% „ 3 × 5 min.
  - absolutny aceton 3 × 5 min.
  - (w temp. pokojowej);
- 10) skrawki przesyca się mieszanką plastykową (eponową), w temp. pokojowej,
  - a) mieszanka: aceton absolutny + epon 3 : 7 (w stosunku 1 : 1) przez 3 godziny,
  - b) epon 3 : 7 przez 24 godziny.
 Opis przyrządzenia eponu 3 : 7 (dwa warianty):
  - epon 812 = Epikota 812 — 88,6 ml
  - DDSA — 30,0 ml
  - MNA — 62,3 ml

— wymieszać dokładnie, odpompować w pompie próżniowej. Na 10 ml mieszanki dodać 0,15 ml akceleratora (DMP) tuż przed użyciem. Z akceleratorem mieszać 10 minut.

- b) mieszanka A: Epon 812 — 62 ml  
              DDSA — 100 ml  
mieszanka P: Epon 812 — 100 ml  
              MNA — 89 ml

zmieszać A i B w stosunku 3 : 7;

- 11) materiał zatapia się w eponie w kapsułkach żelatynowych (na dno kapsułki daje się niewielką ilość eponu, następnie wkłada skrawki i dopełnia eponem). Po zatopieniu pozostawia się kapsułki w temp. pokojowej przez 24 godz., następnie w temp. 37°C przez 24 godz. i w temp. 60°C przez 5 dni;
- 12) skrawki o grubości 1 — 1,5  $\mu$  kroi się na ultramikrotomie;
- 13) w razie niedostatecznego zróżnicowania, przeprowadza się dodatkowo różnicowanie na szkiełku, pod kontrolą mikroskopu: w 0,25% roztworze wodnym  $\text{KMnO}_4$  przez 1 — 2 min., a następnie w mieszaninie 1% wodnego roztworu kwasu szczawowego z 1% siarczynem potasu (w stosunku 1 : 1) przez 4 — 5 min.;
- 14) preparaty płucze się w wodzie destylowanej i przykrywa glicerożelatyną.

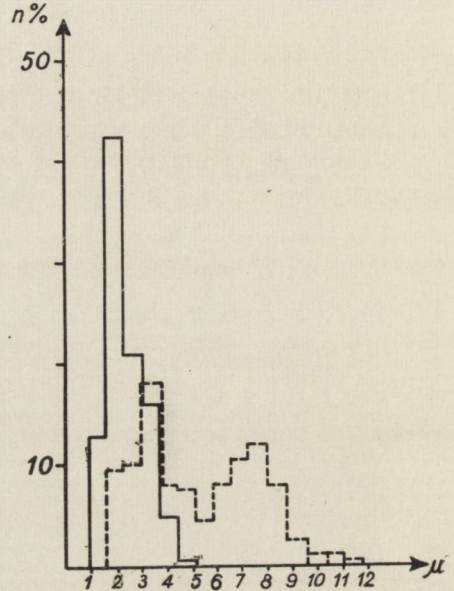
Powyższa metoda wprowadzona została przez Buchthala i Rosenfalck (1966). Jediną różnicę w stosunku do oryginalnego opisu stanowi wprowadzenie przez nas różnicowania na szkiełku (p. 13). Niektórzy autorzy w inny sposób przygotowują materiał do badań ilościowych, jednakże w ocenie preparatów posługują się zazwyczaj mikroskopem fazowym, podczas gdy Buchthal i Rosenfalck (1966), a także my — używamy mikroskopu zwykłego.

Do opracowania wybieramy wyłącznie te skrawki, w których przekrój nerwu jest dokładnie poprzeczny. Fotografujemy pod małym (60  $\times$ ) i dużym (400  $\times$ ) powiększeniem. W przypadku całkowitej biopsji wykonujemy tyle małych powiększeń, by uzyskać na zdjęciach całą powierzchnię pobranego nerwu. Pod powiększeniem 400  $\times$  wykonujemy po 2 — 3 zdjęcia z każdego pęczka. Uzyskane fotografie powiększamy: 60 do 90  $\times$ , a 400 do 660  $\times$  (wartości dowolnej). W celu uzyskania dokładniejszych danych ostatnio posługujemy się powiększeniem 1000  $\times$ . Z wykonanych mikrofotografii obliczamy liczbę mielinowych włókien nerwowych w jednostce pola powierzchni oraz histogram średnicy mielinowych włókien. W przypadku, w którym pobrano do badania cały nerw, obliczamy całkowitą powierzchnię pęczkową (powierzchnię

nia zajęta przez wszystkie pęczki) oraz całkowitą liczbę włókien mielinowych. Całkowitą powierzchnię pęczkową obliczamy przy użyciu planimetru, pozostałe parametry — przez liczenie (ryc. 2 i 3). Dyck i wsp. (1968) poza powyższymi, obliczają jeszcze odsetki powierzchni pęczkowej zajmowanej przez włókna mielinowe.

Ryc. 2. Histogram średnic mielinowych włókien w nerwie łydkowym: linia przerywana — norma — przypadek sekcyjny, chłopiec lat 17, zmarły śmiercią nagłą, całkowita powierzchnia pęczkowa — 0,9 mm<sup>2</sup>; całkowita liczba mielinowych włókien — 16830; liczba włókien mielinowych na 0,1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczkowej — 1872; mediana średnicy — 5,3  $\mu$ ; linia ciągła — mężczyzna lat 36 z polineuropatią. Biopsja pęczkowa; liczba mielinowych włókien na 0,1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczkowej — 480; mediana — 1,9  $\mu$ .

Fig. 2. Fibre spectrum of myelinated nerve fibres in sural nerve: dashed line — in control (autopsy material; boy aged 17 who died suddenly), total fascicular surface area — 0.9 mm<sup>2</sup>; total number of myelinated nerve fibres — 16830; number of myelinated nerve fibres per 0,1 mm<sup>2</sup> of fascicular area — 1872; medial diameter — 5.3  $\mu$ ; continuous line — in man aged 36 with polyneuropathy (fascicular biopsy) number of myelinated nerve fibres per 0,1 mm<sup>2</sup> of fascicular area — 480; medial diameter — 1.9  $\mu$ .



Przy badaniu ilościowym należy pamiętać, że sposób utrwalania i przeprowadzania materiału wpływa na zachowanie się średnicy nerwu, powierzchni pęczkowej i poszczególnych włókien. Dlatego też można porównywać materiał opracowany tymi samymi metodami.

#### METODA BADANIA IZOLOWANYCH („CZESANYCH”) WŁOKIEN NERWOWYCH

Część wycinka nerwu pobraną do płynu Ringera (skład poniżej) przekładamy następnie do płynu Ringera z dodatkiem trypsyny (40 mg trypsyny na 10 ml płynu Ringera pozbawionego Ca) na około 20 min. w temp. 37°C\*.

Z wyjątego na szklaną płytkę nerwu dwoma twardymi pincetami usuwa się *epineurium* i na jednym z końców zawiązuje nitkę. Zarówno powyższe jak i następne czynności wykonywane są pod kontrolą lupy binokularowej. Każdy z pęczków jest czesany kilkakrotnie cienką igieł-

\* W przypadkach sekcyjnych używamy samego płynu Ringera (bez dodatku trypsyny) bowiem trypsyna trawi martwe tkanki — uszkodza włókna nerwowe.



ką. Nadmiar płynu Ringera usuwa się bibułą, preparat zakrapla na płytce osmem (przygotowanie osmu poniżej) i przykrywa szklaną przykrywką.

Kiedy zewnętrzne części pęczków nerwowych wyczerpią się, należy jeszcze dokładniej porozdzielać włókna i nerw umieścić w hermetycznie zamkniętym naczyniu z osmem do całkowitego wyczernienia, co trwa około 45 min. Następnie nerw płucze się w wodzie bieżącej, po czym wkłada się go do wody bidestylowanej i umieszcza w lodówce. Z tak przygotowanego nerwu można już uzyskiwać włókna czesane, jednakże nie może on być przez dłuższy czas przechowywany w wodzie. Przeprowadzenie nerwu przez wzrastające od 5 — 40% stężenia gliceryny, a następnie przetrzymanie go (w lodówce) w 40% roztworze gliceryny pozwala wyczesywać pojedyncze włókna przez kilkanaście miesięcy. Włókna wyizolowuje się za pomocą cienkich igiełek na szkiełku podstawowym pod lupą binokularową, a następnie przykrywa szkiełkiem nakrywkowym.

#### Przygotowanie płynu Ringera:

37,40 g — NaCl

1,85 g — KCl

0,885 g —  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

7,1 g bezwodnego  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i przy pomocy HCl doprowadzić pH roztworu do wartości 7,4.

Bezpośrednio przed użyciem, do 20 ml w/w płynu dodaje się 80 ml wody bidestylowanej.

#### Przygotowanie osmu:

2% osm zmieszać w stosunku 1 : 1 z 1,3% NaCl

#### Przygotowanie gliceryny:

1 ml 5% gliceryny + 19 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidestylowanej

2 ml 10% „ + 18 ml „ „

3 ml 15% „ + 17 ml „ „

4 ml 20% „ + 16 ml „ „

6 ml 30% „ + 14 ml „ „

8 ml 40% „ + 12 ml „ „

W każdym z roztworów gliceryny od 5 do 30%, nerw przetrzymuje się co najmniej przez 1,5 godz. W 40% glicerynie pozostawia się go na stałe. Badania izolowanych włókien przeprowadzamy wg zaleceń Lubińskiej (1960, 1961 oraz wskazówki ustne).

## OCENA PRZYDATNOŚCI POSZCZEGÓLNYCH METOD BADAŃ

Przedstawione powyżej metody badań zapewniają podstawowe opracowanie histologiczne nerwu obwodowego. Jednakże nie wydaje się, by w każdym przypadku istniała konieczność stosowania wszystkich tych metod; cel badania winien określać dobór metody badania. Ponadto, nie bez znaczenia pozostaje fakt, że wprowadzenie wszystkich tych metod przekracza możliwości kadrowe i wyposażeniowe wielu pracowni neuropatologicznych i anatomopatologicznych.

Badania rutynowe mają przede wszystkim znaczenie diagnostyczne. Stanowią one podstawę dla rozpoznania zmian swoistych w nerwach (*amyloidoza*, *panarteritis nodosa*, *leukodystrofia metachromatyczna*) oraz pozwalają ocenić nieswoiste zmiany w śródmięzszowej tkance łącznej i w obrębie naczyń. W powyższym zakresie są one jedynymi metodami spośród podanych. Preparaty dobre pod względem technicznym orientują nadto o stopniu zaawansowania procesu chorobowego. I tak np. w przypadkach przewlekłych neuropatii stopień ubytku włókien mielino-wych i rozrostu tkanki łącznej w *endoneurium*, świadczący o zaawansowaniu procesu chorobowego, jest z pewnymi zastrzeżeniami, możliwy do określenia na podstawie badań rutynowych. Ocena ta zawodzi jednakże w przypadkach mało zaawansowanych; możliwość popełnienia błędu wynika ponadto z tego, że włókna zdmielinizowane we wszystkich barwieniach, poza srebrowymi, są na ogół niewidoczne.

Przeprowadzenie badań ilościowych z odpowiednio przygotowanych preparatów wykrywa wczesne okresy procesu chorobowego, a stopień ubytku włókien i rozrostu tkanki łącznej przedstawiony jest w postaci wartości bezwzględnych.

Wykreślenie histogramu średnicy włókien ujawnia nadto rozmiary włókien uszkodzonych i zachowanych. Możliwość popełnienia błędu jest tu jednak dość duża, ponieważ wśród mierzonych włókien nerwowych pewną część stanowią włókna nieprawidłowe, tym samym, posiadające zmienioną średnicę. Tak np. niecałkowita remielinizacja uprzednio zdmielinizowanego grubego włókna przesuwa je przy liczeniu do kategorii włókien cieńszych; cienkie włókna regenerujące dołączone są do populacji włókien prawidłowych o małej średnicy itd. Wyniki te w pewnym stopniu można poprawić poprzez obliczenie stosunku średnicy aksonu do mieliny. Pomimo tych zastrzeżeń, histogramy oddają cenne usługi przy przeprowadzaniu korelacji z obrazem klinicznym i niektórymi parametrami elektrofizjologicznymi.

Ocena charakteru zmian we włóknach nerwowych na podstawie badań rutynowych ogranicza się do rozpoznania zwyrodnienia Wallera. Zmiana ta powinna być widoczna tak w barwieniach srebrowych jak

i mielinowych (ryc. 4), jednakże z uwagi na znaną zawodność tych metod jest ona czasem trudna do ustalenia, szczególnie we wczesnym okresie. Rozpoznanie nasilonych zmian typu zwyrodnienia Wallera nie nastęrcza na ogół trudności (ryc. 5, 6). Ocena drugiego typu reakcji włókna nerwowego tj. demielinizacji odcinkowej, na podstawie badań rutynowych jest co najmniej wątpliwa, ze względu na częstość występowania artefaktów imitujących ten rodzaj zmian.

Niewątpliwie najlepszą metodą dla rozpoznania odcinkowej demielinizacji jest badanie czesanych, izolowanych włókien nerwowych (ryc. 7). Obserwowane obrazy pozwalają na uchwycenie kolejnych etapów procesu demielinizacji i następowej remielinizacji (ryc. 8). Przy użyciu tej metody staje się nadto możliwe ustalenie, które z cienkich włókien odpowiadają włóknom regenerującym, a które prawidłowym (na podstawie stosunku długości międzywęzła do średnicy włókna). Ta metoda wreszcie, w ocenie zwyrodnienia Wallera, nie tylko nie ustępuje badaniom rutynowym, ale nawet je przewyższa (ryc. 9). Sądzymy, że badanie czesanych włókien ogromnie rozszerza możliwość oceny zmian we włóknach nerwowych i stanowi najlepszą spośród omawianych, w tym względzie metodę.

Niezbędnym warunkiem dla wyciągnięcia miarodajnych wniosków z tego badania, jest obejrzenie dużej liczby, długich (co najmniej 3 — 4 międzywęzła) włókien nerwowych.

Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym, osmowany i zatopiony w plastiku służy, jak powiedziano poprzednio, do badań ilościowych. Niemniej, jak się okazuje oddaje on pewne usługi również i w badaniu jakościowym. Obserwowane obrazy pozwalają na uchwycenie pewnych szczegółów morfologicznych, niewidocznych w badaniach rutynowych, a dotyczących zarówno włókien nerwowych jak i śródmiąższowej tkanki łącznej oraz naczyń (ryc. 10, 11).

Trzeba jednakże podkreślić, że do oceny włókien nerwowych nadają się zazwyczaj jedynie skrawki poprzeczne, bowiem na podłużnych trudno jest uzyskać długie przekroje włókna o zachowanej ciągłości.

#### WNIOSKI

1) Rutynowe metody barwień odgrywają zasadniczą rolę w określaniu typu neuropatii (swoista, nieswoista — np. przerostowa) oraz informują, w pewnym przybliżeniu, o stopniu zaawansowania procesu chorobowego.

2) Ocena preparatów czesanych daje miarodajną odpowiedź co do charakteru zmian we włóknach nerwowych.

3) Badania ilościowe obiektywizują ocenę stopnia zaawansowania procesu chorobowego oraz dostarczają danych odnośnie średnicy uszkodzonych włókien. Preparaty używane do badań ilościowych dostarczają nadto pewnych informacji o zmianach jakościowych włókien nerwowych, śródmiaższowej tkanki łącznej i naczyń.

Autorki składają gorące podziękowania pani prof. L. Lubińskiej za nauczanie metody badania „czesanych” włókien nerwowych oraz za liczne rady i uwagi w czasie wykonywania badań i pisanie niniejszej pracy.

Panu doc. L. Aleksandrowiczowi serdecznie dziękujemy za pobieranie biopsji nerwu łydkowego, a pani doc. I. Zelman — za pomoc przy wprowadzaniu do badania nerwów obwodowych niektórych metod histochemicznych.

Wszystkie mikrofotografie zostały wykonane przez pana R. Szopińskiego, za co bardzo dziękujemy.

Г. Енджеёвска, Е. Савицка, Г. Драц, З. Глинка

#### ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

##### Резюме

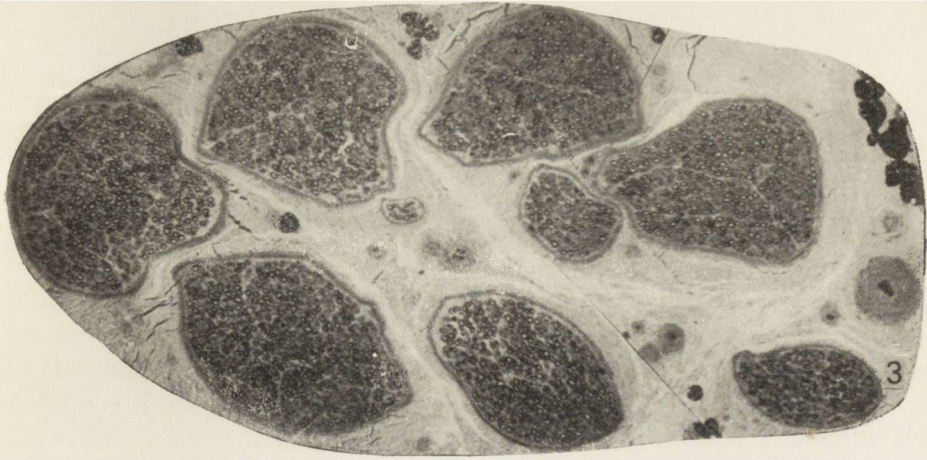
В введении авторы описывают технику взятия биопсии периферических нервов, а также субъективные и объективные симптомы, имеющие место после операции.

Гистологические исследования подразделяются на 3 группы:

1. Обычно принятые исследования,
2. Количественные методы — определение числа миелинированных волокон и их диаметров на единицу поверхности и измерение поверхности пучка,
3. Исследования изолированных нервных волокон.

Что касается этих последних двух групп, авторы дают точные данные, касающиеся лабораторной техники. В обсуждении дискутируют значение отдельных методов в оценке повреждений периферических нервов, что подитожи-вают следующими заключениями:

- 1) Обычно принятые методы окрашиваний играют основную роль в определении типа нейропатии (специфические, неспецифические — например прорастные), а также в какой-то степени информируют о выраженности болезненного процесса.
- 2) Оценка чесанных препаратов дает достоверный ответ что касается характера изменений в нервных волокнах.
- 3) Количественные исследования объективизируют оценку степени выраженности болезненного процесса и дают данные относительно диаметра поврежденных волокон. Препараты, использованные в количественных исследованиях, дают кроме того определенные информации о качественных изменениях нервных волокон, интерстициальной соединительной ткани и сосудов.



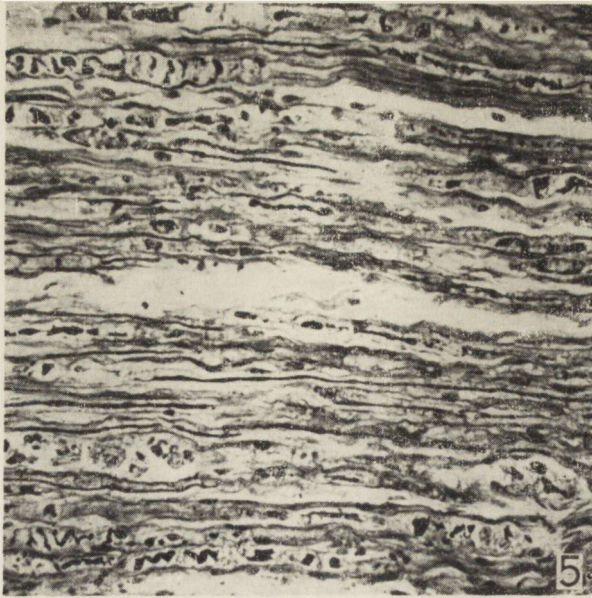
Ryc. 3. Przekrój poprzeczny całego nerwu łydkowego pobranego w miejscu typowym. Pow. 90  $\times$ .

Fig. 3. Cross section of total sural nerve cut out at typical site of biopsy.  $\times$  90.



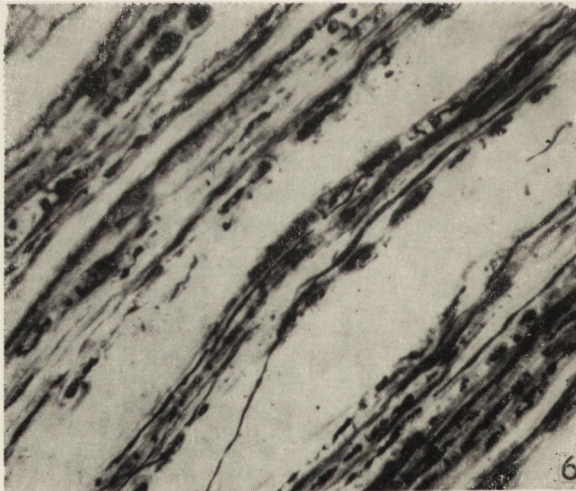
Ryc. 4. Zwyródnienie Wallera (widoczne owoidy) w barwieniu met. Klüvera-Barrera. Przypadek polineuropatii. Wycinek z nerwu łydkowego. Pow. 400  $\times$ .

Fig. 4. Wallerian degeneration (ovoids) in Klüver-Barré's staining. A case of polyneuropathy. Biopsy from sural nerve.  $\times$  400.



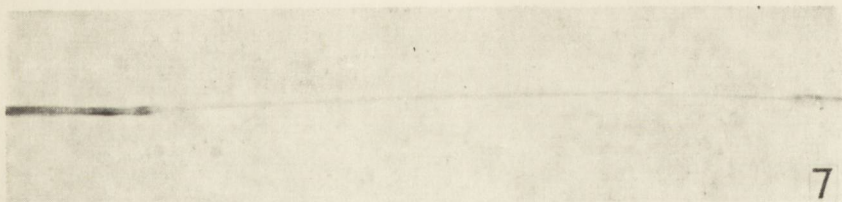
*Ryc. 5.* Nasilone zmiany typu zwyrodnienia Wallera w barwieniu met. Holmesa. Przypadek sekcyjny porfirii. Nerw łokciowy. Pow. 200 X.

*Fig. 5.* Advanced Wallerian degeneration. Holmes staining. Autopsy case of porphyria. Ulnar nerve. X 200.



*Ryc. 6.* Zaawansowane zmiany typu zwyrodnienia Wallera w barwieniu met. Gross-Bielschowsky'ego. Przypadek sekcyjny porfirii. Nerw łokciowy. Pow. 200 X.

*Fig. 6.* Advanced Wallerian degeneration. Gross-Bielschowsky staining. Autopsy case of porphyria. Ulnar nerve. X 200.



*Ryc. 7.* Odcinkowa demielinizacja w „wyczesanym” włóknie. Przypadek z grupy lipidoz ośrodkowego układu nerwowego. Wycinek z nerwu łydkowego. Pow. 100 X.

*Fig. 7.* Segmental demyelination in teased-fibre preparation. A case of cerebral lipidosis. Biopsy from sural nerve. X 100.



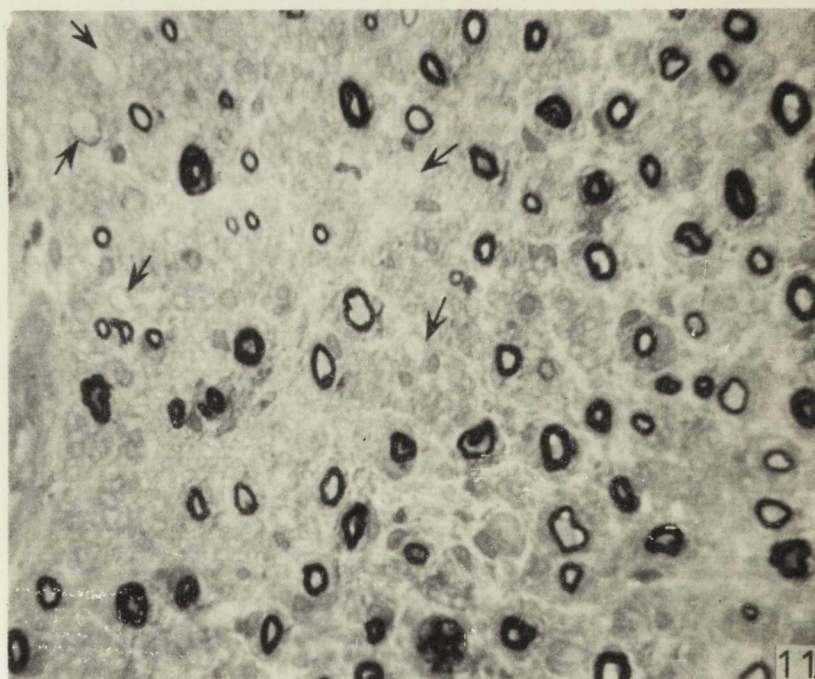
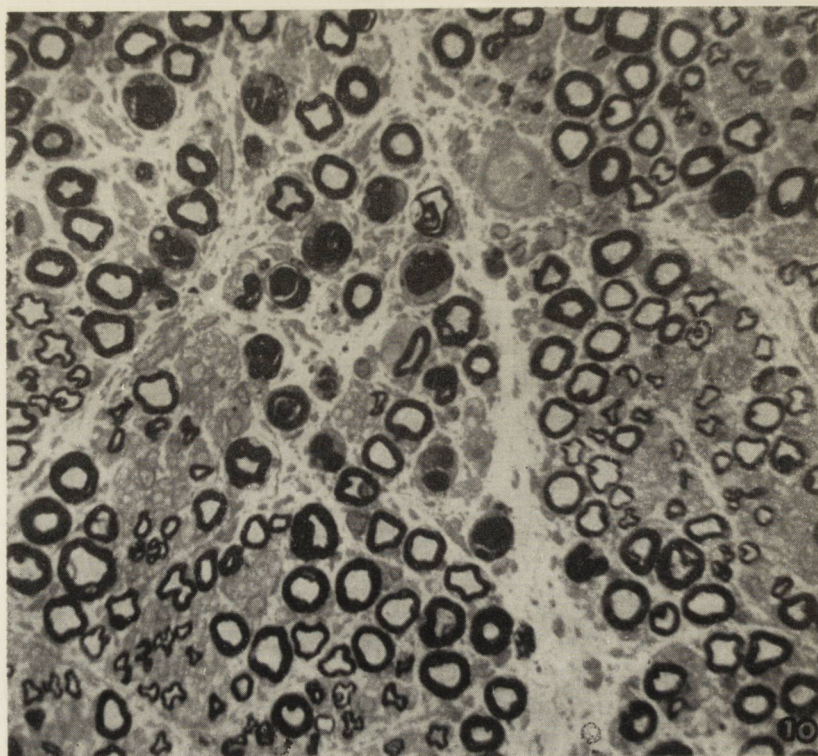
*Ryc. 8.* Remielinizacja odcinka włókna w preparacie „czesanym”. Przypadek z grupy lipidoz ośrodkowego układu nerwowego. Wycinek z nerwu łydkowego. Pow. 300 X.

*Fig. 8.* Remyelination of demyelinated segment in teased-fibre preparation. A case of cerebral lipidosis. Biopsy from sural nerve. X 300.



*Ryc. 9.* Położone linijnie skupienia mieliny są traktowane jako wykładnik zwyrodnienia Wallera (Dyck 1968). Przypadek polineuropatii. Wycinek z nerwu łydkowego. Pow. 300 X.

*Fig. 9.* Teased-fibre preparation. Myelin ovoids in linear rows are known to be an evidence of Wallerian degeneration (Dyck 1968). A case of polyneuropathy. Biopsy from sural nerve. X 300.





H. Jędrzejowska, E. Sawicka, H. Drac, Z. Glinka

## HISTOLOGICAL METHODS APPLIED TO PERIPHERAL NERVES

## S u m m a r y

The technique of nerve biopsy is briefly described. The methods used for peripheral nerves examination are divided into three groups: 1) routine histological examination, 2) quantitative methods including measurement of myelinated nerve fibre density, size distribution and fascicular areas, 3) examination of isolated nerve fibres (teased-fibre preparation).

Full details concerning preparation of the nerve for quantitative examination and teased fibre evaluation are reported. The value of these methods is discussed and the following conclusions are drawn:

1. Routine histological methods are essential for determination of the type of neuropathy (specific, unspecific — i.e. hypertrophic). Moreover they inform, to some extent, on the degree of lesion.

2. Estimation of teased-fibre preparations indicates the type of changes in the nerve fibres.

3. Quantitative methods applied to peripheral nerves show the degree of advancement of the pathological process and the diameter of the damaged nerve fibres. The same specimens can be also used for qualitative evaluation of nerve fibres, endoneurial connective tissue and blood vessels.

## PIŚMIENNICTWO

1. Buchthal F., Rosenfalck A.: Number and diameter of myelinated fibres in the median nerve. *Brain Research*, 1966, 3, 85—94.
2. Dyck P. J., Gutrecht J. A., Bastron J. A., Kernes W. E., Dale A. J. D.: Histologic and teased-fiber measurements of sural nerve in disorders of lower motor and primary sensory neurons. *Mayo Clin., Proc.*, 1968, 43, 81—123.
3. Dyck P. J., Lofgren E. P.: Fascicular biopsy of nerve. *Mayo Clin. Proc.*, 1966, 41, 778—784.
4. Von Hirsch T., Peiffer J.: Über histologische Methoden in der Differentialdiagnose von Leukodystrophien und Lipoidosen. *Arch. Psych. Nervenkr.*, 1955, 194, 88—104.

*Ryc. 10.* Przekrój poprzeczny nerwu zatopionego w eponie. Kilkanaście włókien wykazuje zmiany typu zwyrodnienia Wallera. Przypadek sekcyjny porfirii. Nerw łokciowy. Pow. 660 X.

*Fig. 10.* Cross section of epon-embedded material. Some nerve fibres show Wallerian degeneration. Autopsy case of porphyria. Ulnar nerve. X 660.

*Ryc. 11.* Przekrój poprzeczny nerwu zatopionego w eponie. Widoczne zdmielinizowane włókna nerwowe (strzałki). Przypadek polineuropatii. Wycinek z nerwu łokciowego. Pow. 660 X.

*Fig. 11.* Cross section of epon-embedded material. Demyelinated nerve fibres are seen (arrows). A case of polyneuropathy. Biopsy from sural nerve. X 660.

5. Lubińska L.: Method of peripheral nerve fibres preparation for quantitative morphological purposes. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1960, 8, 117—120.
6. Lubińska L.: Demyelination and remyelination in the proximal parts of regenerating nerve fibres. *J. Comp. Neur.*, 1961, 117, 275—285.
7. Małyk E., Wagner T.: Wykrywanie amyloidu za pomocą bezpośrednich, światłotrwałych włókienniczych barwników helionowych. *Pat. Pol.*, 1967, 28, 211—216.
8. Małyk E., Wagner T., Abgarowicz T.: Zastosowanie barwnika saturna czerwonego do wykrywania amyloidu. *Pat. Pol.*, 1970, 31, 307—310.
9. Thévenard A., Berdet H.: Remarques sur l'hypertrophie des nerfs peripheriques. *Presse Med.*, 1958, 66, 529—530.
10. Thomas P. K.: The quantitation of nerve biopsy findings. *J. Neurol. Sci.*, 1970, 11, 285—295.

Adres autorek: Klinika Neurologiczna AM, Warszawa, ul. Oczki 6.

## T R E Ś C:

|  |    |
|--|----|
| M. Kozik: Doświadczalny obrzęk neuronu w świetle badań histoenzymatycznych. . . . .  | 1  |
| K. Domańska-Janik: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym . . . . .  | 17 |
| A. Kapuściński, M. J. Mossakowski, J. Albrecht, S. Januszewski: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew — mózg u szczurów. . . . .                                      | 45 |
| H. Szydłowska, H. Wiśniewski, M. Śmiałek, Z. Rap, T. Zalewska: Badania doświadczalne nad zmianą zawartości wody w mózgu kota pod wpływem rozmiękania, zamrażania i krwotoku. . . . . | 65 |
| L. Iwanowski, A. Jędrzejewska, L. Dydyk: Obraz postaci przejściowej stwardnienia rozsianego do rozlanego w okresie zaostrzenia. . . . .  | 79 |
| H. Jędrzejowska, E. Sawicka, H. Drac, Z. Glinka: Metody badania histologicznego nerwów obwodowych. . . . .   | 87 |

## СОДЕРЖАНИЕ

|   |    |
|---|----|
| M. Kozik: Экспериментальный отек нейрона в свете гистоэнзиматических исследований . . . . .   | 1  |
| K. Домањска-Яник: Экспериментальная гипоксия и некоторые вопросы кислородного метаболизма глюкозы в центральной нервной системе . . . . .   | 17 |
| A. Капустьински, М. Я. Моссаковски, Е. Альбрехт, С. Янушевски: Влияние ишемии и гипоксии на барьер кровь-мозг у крыс . . . . .  | 45 |
| Г. Шидловска, Г. Висьневски, М. Смялек, З. М. Рап, Т. Залевска: Экспериментальные исследования изменения содержания воды в мозгу кошки под влиянием размягчения, замораживания и кровотечения . . . . . | 65 |
| Л. Ивановски, А. Енджеевска, Л. Дыдык: Картина переходного вида рассеяного склероза к диффузному склерозу во время обострения болезни . . . . .   | 79 |
| Г. Енджеёвска, Е. Савицка, Г. Драц, З. Глинка: Гистологические методы исследования периферических нервов . . . . .  | 87 |

## CONTENTS

|  |    |
|--|----|
| M. Kozik: Experimental neurone swelling in the light of histoenzymatic studies . . . . .   | 1  |
| K. Domańska-Janik: Experimental hypoxia and some problems of oxygenic glucose metabolism in the central nervous system. . . . .  | 17 |
| A. Kapuściński, M. J. Mossakowski, J. Albrecht, S. Januszewski: Effect of ischemia and hypoxia on the permeability of the blood-brain barrier in rat. . . . .  | 45 |
| H. Szydłowska, A. Wiśniewski, M. Śmiałek, Z. M. Rap, T. Zalewska: Experimental investigations on changes in the brain water content in cat under the influence of softening, freezing and haemorrhage. . . . . | 65 |
| L. Iwanowski, A. Jędrzejewska, L. Dydyk: A transitional form of disseminated to diffuse sclerosis in the period of exacerbation. . . . .   | 79 |
| H. Jędrzejowska, E. Sawicka, H. Drac, Z. Glinka: Histological methods applied to peripheral nerves. . . . .  | 87 |

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie — 100.—

półrocznie — 50.—

Instytucje państwowe i społeczne, zakłady pracy, szkoły itp. mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach Przedsiębiorstw Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch”, w terminie do 25 listopada na rok następny.

Prenumeratory indywidualni w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty mogą opłacać prenumeratę w urzędach pocztowych i u listonoszy, lub dokonywać wpłat na konto PKO Nr 1-6-100020 — Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch”, Warszawa, ul. Towarowa 28.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch” Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

Sprzedaż egzemplarzy numerów zdezaktualizowanych, na uprzednie pisemne zamówienia, prowadzi Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch”, Warszawa, ul. Towarowa 28.

**Indeks 36910**