



p. 105
20.9.72

0922

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM X

1972

ZESZ. 3

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom X

Lipiec—Wrzesień 1972

Nr 3

KOMITET REDAKCYJNY

Maria Dąmbska (Warszawa), *Jerzy Dymecki* (Pruszków), *Andrzej Głuszczyński* (Łódź),
Janusz Groniowski (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Mirosław Mossakowski*
(Warszawa), *Ewa Osetowska* (Warszawa), *Stanisław Stefanko* (Kraków), *Mieczysław*
Wender (Poznań), *Irmína Zelman* (Warszawa).

Przy współpracy

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

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Mirosław Mossakowski*
Redaktor Działu Neuropatologii: *Ewa Osetowska*
Redaktor Działu Ultrastruktury OUN: *Janusz Groniowski*
Redaktor Działu Neuroonkologii: *Adam Kunicki*
Redaktor Działu Neurochemii: *Mieczysław 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 J. MOSSAKOWSKI, ZUZANNA KRAŚNICKA,
KRYSTYNA RENKAWEK

CONTRIBUTION DES ÉTUDES DES CELLULES D'OPALSKI
À LA CONNAISSANCE DE LA PATHOGENÈSE DE LÉSIONS
DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DANS LES
MALADIES HÉPATOCEREBRALES *

Centre de la Médecine Expérimentale et Clinique de l'Académie Polonaise des
Sciences

Département de Neuropathologie

Chef du département: prof. dr M. J. Mossakowski

Une grave lésion du tissu glial constitue, comme nous le savons, un élément essentiel de dégénérescence hépatolenticulaire ainsi que d'encéphalopathie hépatogénique. Ce qui est digne d'être noté comme le soulignent de nombreux auteurs (Stadler 1936, Adams, Foley 1953, Baltazan et al. 1957, Shiraki 1965, Mossakowski 1966), c'est une grande ressemblance, pour ne pas dire une identité, des lésions gliales dans ces deux processus morbides. Le premier est un trouble métabolique, génétiquement conditionné, le second résulte de nombreuses lésions hépatiques non spécifiques. Ces similitudes peuvent être si grandes qu'il est impossible de différencier, sans examen supplémentaire biochimique du tissu nerveux, certaines encéphalopathies hépatiques d'une forme pseudosclérotique de la maladie de Wilson.

Il faut souligner aussi la fréquence des lésions du tissu nerveux dans les maladies du foie. Les lésions caractéristiques de la glie, pratiquement limitées aux astrocytes, que l'on observe dans la pathologie hépato-cérébrale, autre que la maladie de Wilson, sont constatées également dans les processus chroniques et aigus des maladies du foie.

La structure et l'intensité de la gliopathie n'est déterminée que par la durée de la maladie du foie.

Dans notre matériel sur 33 cas autopsiés des lésions chroniques du foie (dont 21 cas de coma hépatique) 31 témoignaient des affections typi-

* On le présente au Symposium Franco-Polonais, Varsovie-Cracovie, le 8-10 septembre 1971.



ques de nevroglie (Mossakowski 1965). Cette lésion fut constatée dans 19 cas sur 21, de nécrose aigue du foie au cours de l'hépatitis viralis (Mossakowski, Kraśnicka 1971). Ces même lésions sont aussi remarquées dans la cirrhose du foie, expérimentalement provoquée chez les animaux, soit par un régime pauvre en proteines, soit par intoxication par tétrachlorure de carbone, soit enfin dans tous les cas de fistule chirurgique d'Eck (Mossakowski 1966, Mossakowski et coll. 1969).

Nos observations morphologiques et histochimiques effectuées sur un vaste matériel humain, ainsi que sur un matériel expérimental, permettent de conclure que les lésions astrogliales en pathologie hépatocérébrale sont primaires par rapport aux autres lésions du système nerveux central (pertes neuronales, dégénérescence spongieuse du tissu, troubles de la perméabilité de la barrière hémato-céphalique) qui, toutes, résultent d'une insuffisance fonctionnelle et métabolique de nevroglie.

L'image morphologique de la gliopathie, commune à la maladie de Wilson et à l'encéphalopathie hépatique, est constituée par la prolifération généralisée d'astrocytes et aussi par leur hypertrophie et dégénération. Parmi les astrocytes pathologiquement changés nous trouvons trois types de cellules bien connus en neuropathologie comme: cellules d'Alzheimer I et II et cellules d'Opalski. Les cellules d'Alzheimer II sont rencontrées non seulement dans les cas de pathologie hépato-cérébrale; les cellules d'Alzheimer I semblent être toujours liées à la maladie de Wilson. Les géantes, hypertrophiques, cellules gliales, décrites par Opalski (1930), ont été reconnues au début comme pathognomiques à la dégénérescence hépato-lenticulaire. Plus tard, cependant, nous avons pu constater leur apparition dans la majorité des cas de pathologie hépatique ainsi que dans les encéphalopathies expérimentales. Taraszewska (1971) a décrit leur présence dans l'encéphalopathie hépatique chez le chien avec la néoplasme primaire du foie.

Du point de vue morphologique, les cellules d'Opalski sont géantes, pour la plupart mononucléaires surtout ovales, mais aussi arrondies ou irrégulières. Leur noyaux, d'habitude petits, foncés, retrécis se trouvent souvent sous la membrane cellulaire. Elles ne sont polynucléaires que par exception (Fig. 1). Nous apercevons parfois des restes des prolongements, visible surtout à l'imprégnation de Cajal.

La cytoplasme des cellules d'Opalski est remplie de granulations, soit entièrement soit seulement dans le région de noyau. Les granulations mentionnées donent une réaction positive avec PAS (Fig. 2) et se colorent au bleu d'alcian et au bleu d'astra. Leur réaction est négative aux colorations qui dépistent les graisses et est positive aux colorations pour dépister les proteines.

Des examinations histochimiques permettent de définir les granulations des cellules d'Opalski comme agglomérations mucopolyccharides neutres et acides, liées aux protéines cellulaires. Dans les cas de la maladie de Wilson elles contiennent aussi des ions de cuivre.

Ces données histochimiques nous autorisent à conclure que les granulations cytoplasmiques des cellules d'Opalski résultent des troubles de métabolisme des carbo-hydrates de la cellule astrocytaire. Ces troubles dans le système nerveux central au cours des maladies hépato-cérébrales sont confirmés par l'apparition d'inclusions glycogéniques dans les noyaux nus d'Alzheimer ainsi que par les agglomérations de glycogène et des musopolysaccharides dans leur entourage (Shiraki 1968).

L'étape suivante de notre recherche, notamment l'essai de reproduire la gliopathie Wilsonienne et hépatique dans les conditions de la culture de tissu glial, fut effectué avec des serums des sujets atteints de la maladie de Wilson non traitée ou de coma hépatique (Mossakowski et coll. 1970). Compte tenu de l'opinion générale que le cuivre endommage le cerveau au cours de dégénérescence hépato-lenticulaire, et l'amoniaque agit de la même sorte dans la majorité d'encéphalopathies hépatiques (Porter 1964, Vogel, Kemperer 1963, Bessman et Bessman 1955), nous avons complété notre recherche par une série d'expériences sur l'influence directe des ions de cuivre et d'amoniaque, ajoutés au medium-standard de culture, en quantité relative au contenu de cuivre dans le cerveau des sujets atteints de dégénérescence hépato-lenticulaire et avec contenu moyen d'amoniaque dans le serum sanguin de ceux qui

Tableau 1: Schéma des expériences

Tabela 1: Schemat doświadczeń

No Lp.	Groupe expérimental Grupa doświadczalna	Contenance dans medium Zawartość w medium
1	Contrôle — serum humain Kontrola — surowica ludzka	50%
2	Serum de patients avec maladie de Wilson Surowica od chorych z chorobą Wilsona	50%
3	Serum de patients avec coma hépatique Surowica od chorych ze śpiączką wątrobową	50%
4	Acetate de cuivre Octan miedzi	Cu ⁺⁺ 49 γ/ml
5	Ammonium chloride Chlorek amonu	100 mg %

souffrent du coma hépatique. Le tableau 1 présente le schéma de l'expérience, effectuée dans les conditions de la culture du tissu glial des cerveaux de rats nouveau-nés.

Les dégénérescences de nevroglie d'après le modèle obtenu, étaient identiques dans tous les groupes expérimentaux. Elles consistaient en dégénérescences typiques des astrocytes, s'exprimant par une perte généralisée et progressive des prolongements cellulaires. On y a dépisté de nombreuses cellules, semblables aux cellules d'Opalski (Fig. 3). Elles avaient une forme caractéristique ronde ou ovale, avec cytoplasme granulé et possédaient de petits noyaux rétrécis à la périphérie des cellules, souvent polynucléaires et parfois munies de prolongements en voie de disparition. Un autre élément à signaler, ce furent des cellules intermédiaires, présentant une transition entre les astrocytes normaux et les cellules d'Opalski typiques à noyaux de position centrale (Fig. 4). Elles avaient deux types de prolongements nombreux et fins ou épais en forme de massues. Les divers stades de formation des cellules d'Opalski, sont décisifs à notre avis, quant à leur provenance du tissu glial.

Des changements qui pourraient signifier la présence de cellules d'Alzheimer I typiques étaient rares. De nombreux noyaux, pauvres en chromatine et bien délimités, ressemblaient plutôt à cellules d'Alzheimer II (Fig. 5).

La cytoplasme des cellules d'Opalski était remplie de nombreuses granulations PAS-positives que l'on ne peut pas considérer comme glycogène (Fig. 6) et positives aussi pour les réactions aux protéines (Danielli cit. d'après Pearse 1960). On y trouvait aussi d'autres granulations plus petites, positives à la coloration d'alcian blue. Par contre les substances lipidiques étaient introuvables dans les cellules d'Opalski.

Les cellules intermédiaires ressemblaient du point de vue histochemique à celles d'Opalski mais la quantité des substances PAS et alcian bleu positives y était inférieure.

Les examens histoenzymatiques effectués dans les cellules d'Opalski laissent détecter une grande activité de glucoso-6-phosphate déshydrogenase et une activité moindre de succinate déshydrogenase (Fig. 7). Son activité était plus marquée dans les cellules intermédiaires. On remarquait aussi une baisse d'activité de glutamate déshydrogenase (Fig. 8) dans tous les types de glie. La phosphatase acide avait une activité plus accrue dans les cellules d'Opalski que dans les cellules intermédiaires.

L'image ultrastructurale des cellules d'Opalski (Mossakowski et coll. 1972) présentait des noyaux clairs, de situation excentrique, avec la membrane du noyau bien dessinée, sans plis à chromatine disposée sur la bordure avec nucléole bien formée (Fig. 9). Les mitochondres ovales

ou allongés étaient moins nombreux que dans les astrocytes normaux de la culture. Le reticulum endoplasmique se présentait sous forme de membranes parallèles, avec des rybosomes adhérents. L'appareil de Golgi peu développé, se présentait sous forme tubulovesiculaires.

Toute la cytoplasmie contenait des inclusions de différents types et dimensions. On peut en discerner deux types. Plus fréquentes étaient les structures à caractère de lysosomes; ensuite des structures plus monogènes du type d'organelles, entourées d'une simple membrane et remplies d'une substance monogène de basse densité électronique, parfois ressemblant à une glace brisée (Fig. 10). Par rapport à l'image histochimique nous pourrions supposer qu'elles répondent à une agglomération de substances mucopolysaccharidiques.

Malgré le même type de changements gliaux dans tous les groupes expérimentaux, des différences ont été aussi observées quant au temps de l'apparition des altérations en leur intensité, et à la proportion des différents types de cellules lésées.

Tout cela prouve, qu'il est possible d'obtenir expérimentalement *in vitro* le même genre de lésions gliales qui dans la pathologie hépato-cérébrale apparaissent dans le cerveau humain et animal.

Selon nos expériences, les facteurs causant la dégénérescence gliale se trouvent dans le sang des sujets atteints de la maladie de Wilson et du coma hépatique. Les ions de cuivre et d'amoniaque semblent être ici le facteur lésionnel direct. Ceci confirme les hypothèses antérieures de Cumings et Kremer (1959), McDermott et Adams (1954), Bessman et Bessman (1955), Vogel et Kemperer (1963), Porter (1964). Ce qui est à souligner, c'est l'identité des lésions provoquées par ces deux agents. Le patomécanisme de ces lésions gliales est complexe et est difficile à expliquer par le seul examen morphologique.

Seules les hypothèses peuvent être ici suggérées. La diminution de l'activité succinate et glutamate des déshydrogenases dans les cellules d'Opalski répondent aux résultats biochimiques obtenus par Bessman's (1955), Vogel et Kemperer (1963). Les altérations du transport d'électrons dans le cycle de Krebs qui sont signalées par des troubles d'activité des enzymes sus-mentionnés pourraient conduire aux perturbations du métabolisme des carbohydrates dans les astrocytes, s'exprimant par une agglomération de mucopolysaccharidès acides et neutres. Les examens expérimentaux de Friede (1954) et Oksche (1961) suggèrent le rôle de l'astroglie dans le transport et dans le métabolisme des carbohydrates du cerveau. L'accélération de l'activité de glucoso-6-phosphate deshydrogenase dans les cellules d'Opalski, d'Alzheimer I et intermédiaires constatée dans la culture du tissu constitue ici un argument complé-

mentaire. Néanmoins ni le mécanisme d'accumulation des mucopolysaccharides dans les cellules d'Opalski, ni l'identité des altérations provoquées par les deux facteurs nocifs ne sont pas toujours expliqués. Pour le tenter nous avons effectué une nouvelle série d'expériences.

Se basant sur les résultats obtenus par Porter (1964), Vogel et Kemperer (1963) qui ont démontré l'influence nocive des ions de cuivre sur le système de succinate déshydrogénase, nous nous sommes efforcés d'obtenir les cellules d'Opalski et d'autres lésions gliales au moyen de l'inhibiteur chimique de la déshydrogénase succinique, à savoir le malonate (Renkawek et coll. 1972).

Le malonate en concentration 1,2—0,6 et 0,24% fut ajouté à la culture gliale standard. La dose maximale était déterminée par l'inhibition de l'activité du succinate déshydrogénase dans les cultures de contrôle. Sous l'action de toutes les doses de malonate on obtenait des cellules d'Opalski type (Fig. 11). Elles sont identiques au point de vue morphologique et histochimique à celles qui ont été antérieurement examinées. D'autres formes de lésions gliales, ont été également obtenus. De nombreuses cellules intermédiaires ont été aussi remarquées (Fig. 12). La concentration du malonate influait seulement sur la formation rapide des cellules d'Opalski et sur leur nombre. Les premières altérations pathologiques ont été observées 24 ou 48 heures après l'addition de la composition. D'autre part l'application de la solution de α -keto-glutarate à la culture annulait l'action du malonate.

La comparaison des résultats de toutes nos expériences amène à l'hypothèse que c'est l'amoniaque qui est le facteur direct, affectant le tissu glial et causant la formation des cellules d'Opalski, et ceci indépendamment du genre du facteur pathogénique.

La détoxication de l'amoniaque dans le tissu nerveux se produit par son passage à la glutamine. L'alfa-keto-glutarate produit au cours du cycle de Krebs constitue ici le produit initial. Selon nos observations, le résultat final de l'action du cuivre ou de l'amoniaque sera le même. Au cas de surplus d'amoniaque l'alfa-keto-glutarate endogène est insuffisante pour la détoxication de l'amoniaque. A l'application du cuivre (ou d'une autre substance analogue) les troubles produits dans le cycle de Krebs causent l'insuffisance de l'alfa-keto-glutarate endogène pour détoxiquer l'amoniaque, même en quantité normale. Une accumulation d'amoniaque peut cependant avoir lieu dans les deux cas. Cette accumulation, avec un trouble simultané du métabolisme des carbohydrates, causé par l'insuffisance du cycle de Krebs, peut favoriser la synthèse d'aminosucres. Ces derniers constituent un élément essentiel de mucopolysaccharides qui s'accumulent dans la cytoplasme des cellules

d'Opalski. Le mécanisme de leur synthèse exige des nouvelles recherches, surtout biochimiques.

Tout en reconnaissant la difficulté de transposer les résultats des différentes expérimentations à la pathologie humaine, nous admettons néanmoins que les mécanismes des lésions cérébrales au cours de la maladie de Wilson et des encéphalopathies hépatiques peuvent rappeler ceux qui ont été présentés. Alors nos observations contribueraient à l'appui de la conception unitaire de la pathogénese des syndromes hépato-cérébraux, malgré leur étiologie différente.

M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, K. Renkawek

ZNACZENIE BADAŃ NAD KOMÓRKAMI OPALSKIEGO DLA POZNANIA
PATOGENEZY USZKODZEŃ OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO
W CHOROBAH WĄTROBOWO-MÓZGOWYCH

Streszczenie

W pracy przedstawiono analizę właściwości morfologicznych i histochemicznych komórek Opalskiego, spotykanych w mózгах chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym Wilsona i w nieswoistych encefalopatiach pochodzenia wątrobowego.

Wyniki serii doświadczeń prowadzonych w warunkach glejowej hodowli tkankowej pozwoliły na odtworzenie komórek Opalskiego *in vitro*, zarówno przy użyciu surowic od pacjentów z chorobą Wilsona i śpiączką wątrobową, jak również przy podaniu egzogennych jonów miedzi i amoniaku. Analiza histochemiczna i ultrastrukturalna pozwoliła na identyfikację związków gromadzących się w cytoplazmie komórek Opalskiego, jako substancji o charakterze kwaśnych i obojętnych mukopolisacharydów. Komórki Opalskiego wykazują niską aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej. Na podstawie powyższych wyników wysunięto hipotezę, że zarówno jony miedzi, jak i amoniaku prowadzą do zaburzeń metabolicznych w cyklu Krebsa.

W kolejnej serii doświadczeń *in vitro* uzyskano komórki Opalskiego po podaniu egzogennego malonianu, jako inhibitora systemu dehydrogenazy bursztynianowej. Równoczesne podanie malonianu i alfa-ketoglutaranu nie powoduje powstawania komórek Opalskiego. Wyniki pracy pozwalają na wyjaśnienie znacznego podobieństwa zmian patologicznych stwierdzonych w ośrodkowym układzie nerwowym w etiologicznie różnych procesach, jakimi są choroba Wilsona i encefalopatie pochodzenia wątrobowego, związane z nieswoistymi uszkodzeniami wątroby.

M. E. Моссаковский, З. Красьницка, К. Ренкавек

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕТОК ОПАЛЬСКОГО В ПОЗНАНИИ
ПАТОГЕНЕЗА ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
В ПЕЧЕНОЧНО-МОЗГОВЫХ БОЛЕЗНЯХ

Резюме

В работе представлен анализ морфологических и цитохимических свойств клеток Опальского, встречаемых в мозгах больных гепато-лентикулярной де-

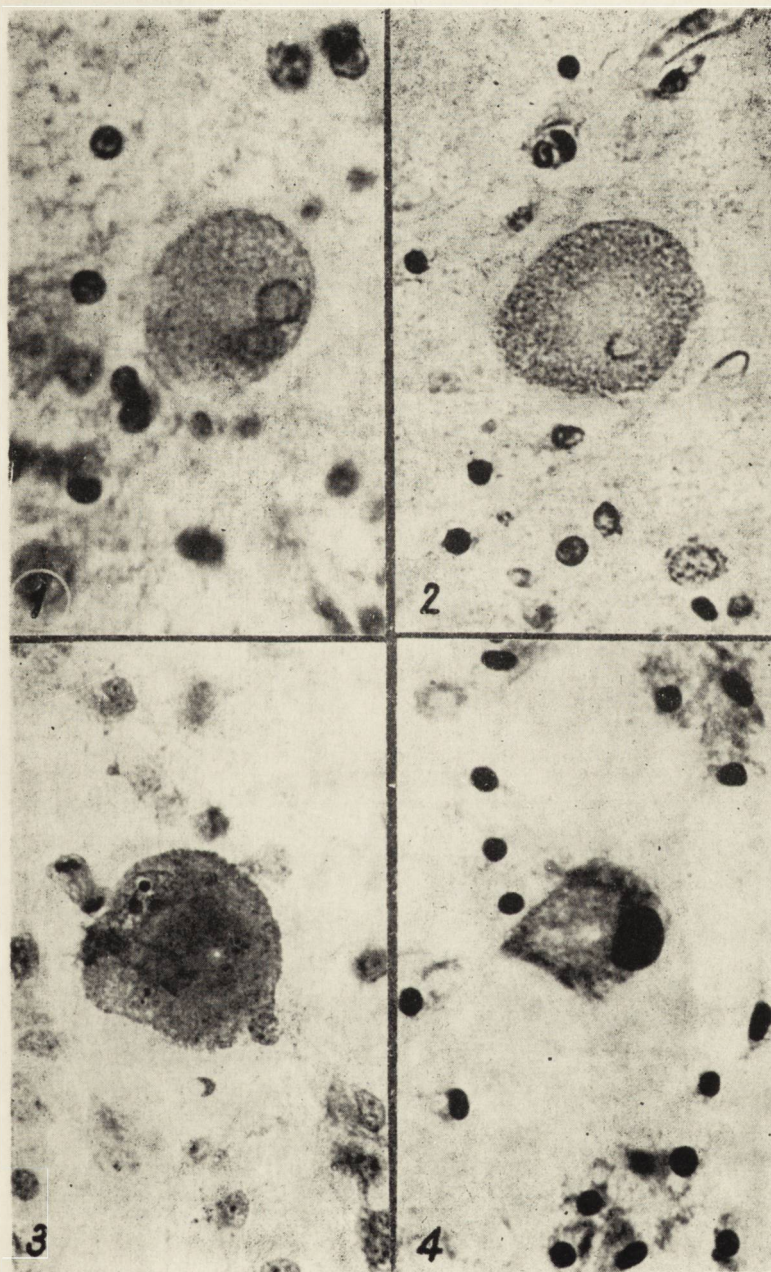
генерацей Вильсона и в неспецифических энцефалопатиях, печеночного происхождения.

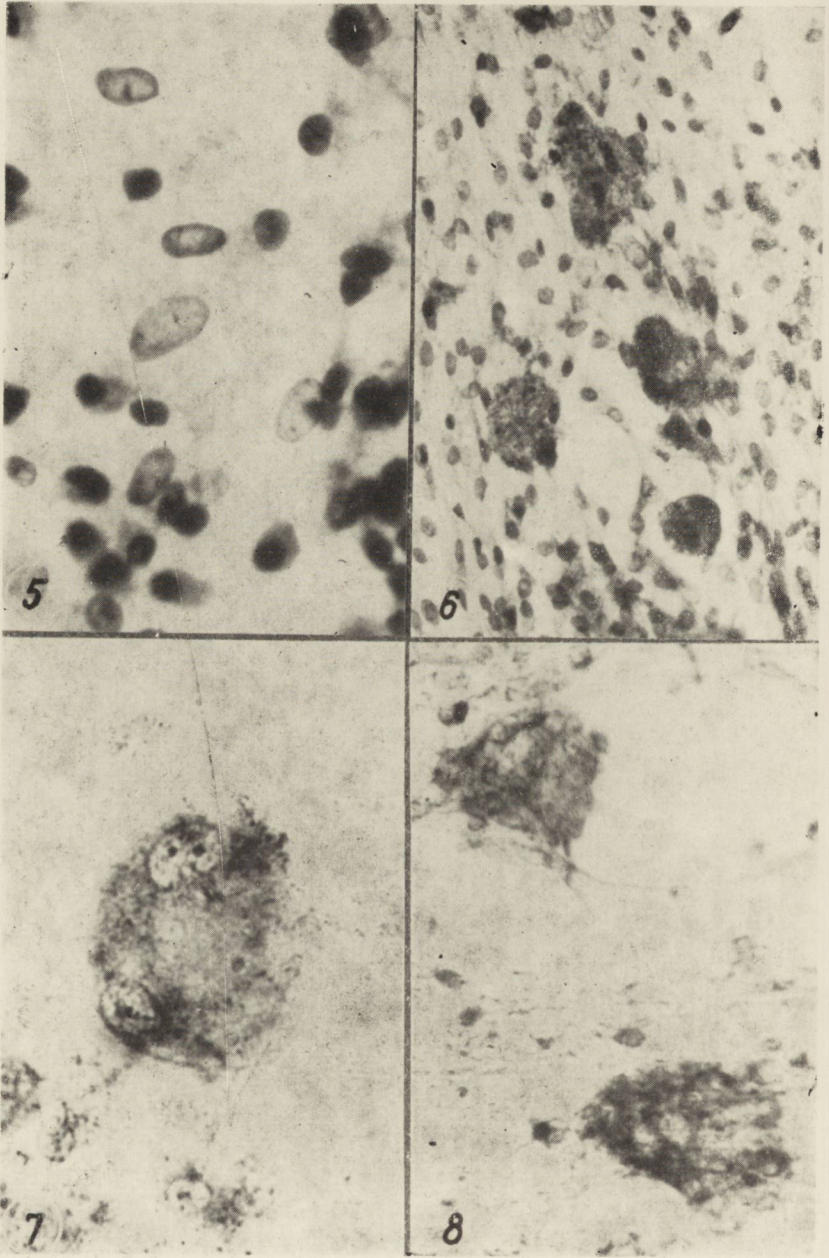
Результаты серии опытов, проводимых в условиях глиальной тканевой культуры позволили восстановить клетки Опальского *in vitro*, как при использовании сывороток от пациентов больных болезнью Вильсона и печеночной комой, так и при подаче экзогенных ионов меди и аммиака. Гистохимический и ультраструктурный анализ позволил идентифицировать соединения, скоп-ливающиеся в цитоплазме клеток Опальского как вещества характера кислых и нейтральных мукополисахаридов. Клетки Опальского обнаруживают низкую активность сукцинатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы. На основании выше указанных результатов выдвигается гипотеза, что как ионы меди так и аммиак ведут к нарушениям цикла Кребса.

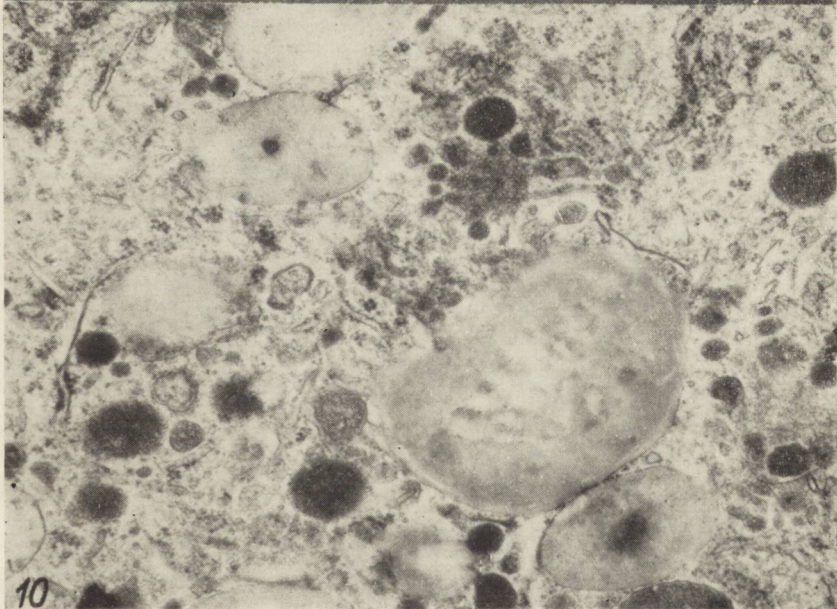
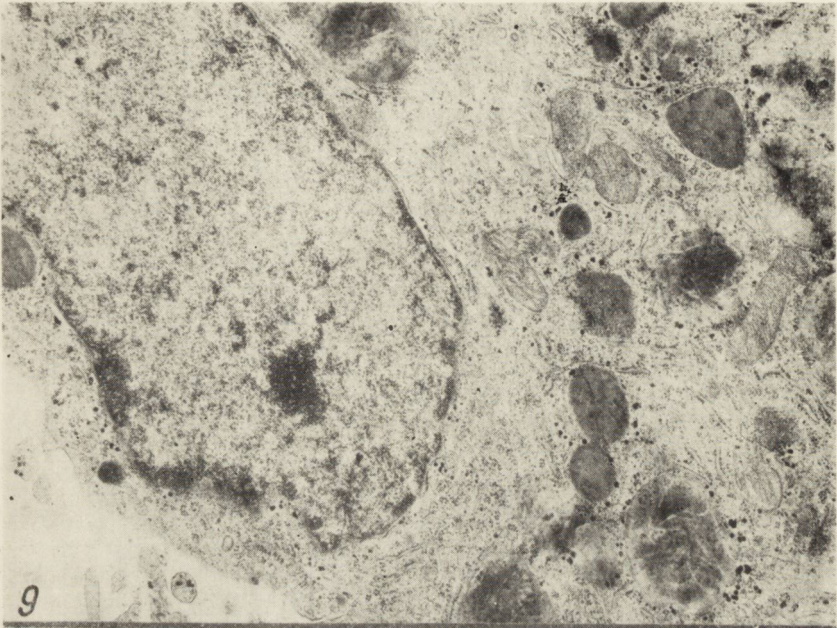
Очередная серия опытов *in vitro* позволила получить клетки Опальского после подачи малоната в качестве ингибитора системы сукцинатдегидрогеназы. Одновременная подача малоната и альфа-кето-глутарата не вызывает возникновения клеток Опальского. Результаты работы позволяют выяснить значительную сходность патологических изменений, наблюдаемых в центральной нервной системе в этиологически разных процессах, какими являются болезнь Вильсона и энцефалопатии, печеночного происхождения, связанные с неспецифическими повреждениями печени.

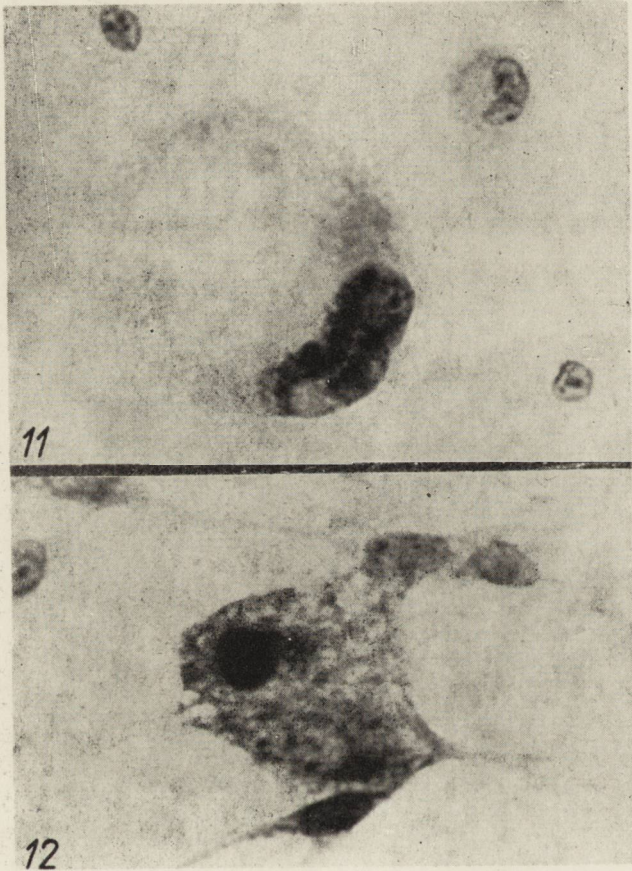
BIBLIOGRAPHIE

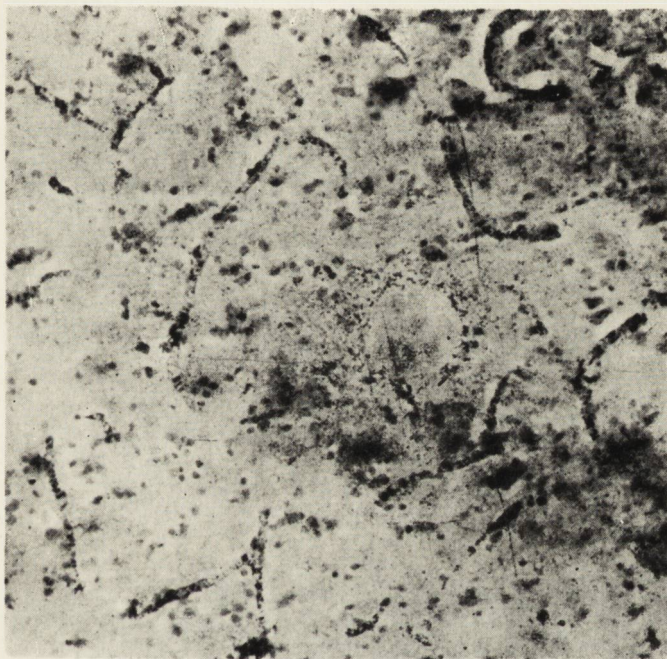
1. Adams R. D., Foley J. M.: The neurological disorders associated with liver disease. Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis., 1953, 32, 198—237.
2. Baltazan M. A., Olszewski J., Zervas N.: Chronic porto-hepatic encephalopathy. J. Neuropath. Exp. Neurol., 1957, XVI, 410—421.
3. Bessman S. P., Bessman A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanism of hepatic coma. J. Clin. Invest., 1955, 34, 622—628.
4. Cumings J. N., Kremer M.: Biochemical aspects of neurological disorders. Oxford: Blackwell Scient. Publ., 1959.
5. Danielli J. F.: cit. d'après A.G.E. Pearse „Histochemistry”, Churchill, London Ltd. 1960, p. 796—797.
6. McDermott W. V., Adams R. D.: Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference, to the metabolism et ammonia. J. Clin. Invest., 1954, 33, 1—9.
7. Friede R.: Die Bedeutung der Glia für den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel. Zbl. Allg. Path. Anat., 1954, 92, 65.
8. Mossakowski M. J.: Some remarks on the morphology and histochemistry of the so-called Opalski cells. Acta Neuropath. (Berl), 1965, 4, 659—668.
9. Mossakowski M. J.: Some aspects on the morphology and histochemistry of the cerebral changes in hepatic coma. Proc. of the V Int. Congress of Neuropath. Zürich 1965, Ex. Med. Found., 1966, p. 981—986.
10. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. Neuropat. Pol., 1966, IV/2, 231—304.
11. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol., 1970, VIII, 4, 365—374.











Ryc. 1. Krater w korze mózgu w miejscu działania promieni laserowych. Hematoksylina. Pow. 100 \times .

Fig. 1. Crater in brain cortex in the region of laser irradiation. Hematoxyline staining. $\times 100$.

12. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropath.*, (Berl) 1970, 16, 1—16.
13. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z.: Pathomorphology of the cerebral abnormalities in acute liver damage. *Proc. Donau Symposium*, Vienne 1971.
14. Mossakowski M. J., Borowicz W. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Ultrastructure of Opalski cells cultured in vitro. *Acta Neuropath. (Berl)* 1971, 19, 301—307.
15. Oksche A.: Der histochemisch nachweisbare Glykogenaufbau und Abbau in den Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer Funktions — abhängigen Stoffwechselaktivität der Neuroglia. *Z. Zellforsch.*, 1961, 54, 307.
16. Opalski A.: Über eine besondere Art von Gliazellen bei der Wilson — Pseudosclerose — Gruppe. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.*, 1930, 124, 424—425.
17. Porter H.: Tissue copper proteins in Wilson's disease. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1964, 11, 341—349.
18. Renkawek K., Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Wpływ inhibitora dehydrogenazy bursztynianowej na powstawanie zmian morfologicznych, histochemicznych i enzymatycznych tkanki glejowej hodowanej in vitro. (Personal communication).
19. Shiraki H.: The comparative study of various types of hepatocerebral diseases in the Japanese. In: "The Central Nervous System" ed. Williams Willins comp., 1968, p. 252—272.
20. Stadler H.: Histologische Untersuchungen zur Frage der Beziehungen zwischen Leber und Gehirnveränderungen. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.*, 1936, 154, 626—657.
21. Taraszewska A., Lewicka-Wysocka H., Nozdryn-Płotnicki B.: Analiza neuropatologiczna zmian u psów starczych z nowotworami narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.*, 1971, IX/3, 219—230.
22. Vogel F. S., Kemper L.: Biochemical reactions of copper with its neuronal mitochondria with consideration of the role of the metal in the pathogenesis of Wilson disease. *Lab. Invest.*, 1963, 12, 171—179.

Adresse des auteurs: Zespół Neuropatologii CMD i K, PAN — Warszawa, Dwor-kowa 3.

FIGURES

Fig. 1. La cellule d'Opalski dans le cerveau du patient avec maladie de Wilson. H—E. Agr. 400 X.

Ryc. 1. Komórka Opalskiego w mózgu z przypadku choroby Wilsona. H—E. Pow. 400 X.

Fig. 2. La cellule d'Opalski avec granulations PAS-positives. PAS. Agr. 400 X.

Ryc. 2. Komórka Opalskiego z ziarnistościami PAS pozytywnymi. PAS. Pow. 400 X.

Fig. 3. La cellule d'Opalski obtenue dans la culture du tissu après l'administration du serum de patient avec maladie de Wilson. H—E. Agr. 400 X.

Ryc. 3. Komórka Opalskiego otrzymana w hodowli tkankowej pod wpływem surowicy od chorego z chorobą Wilsona. H—E. Pow. 400 X.

Fig. 4. La cellule intermédiaire dans la culture du tissu. Bl. de toluid. Agr. 400 X.

Ryc. 4. Komórka pośrednia w hodowli tkankowej. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 5. Les noyaux nus (les cellules d'Alzheimer II) dans la culture du tissu. Bl. de toluid. Agr. 400 X.

Ryc. 5. Nagie jądra (komórki Alzheimer'a typu II) w hodowli tkankowej. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 6. Les cellules d'Opalski remplies de granulations PAS positives. PAS. Agr. 200 X.

Ryc. 6. Komórki Opalskiego z hodowli tkankowej wypełnione ziarnistościami PAS pozytywnymi. Pow. 200 X.

Fig. 7. La cellule d'Opalski à l'activité de déshydrogenase succinique affaiblie. Agr. 400 X.

Ryc. 7. Komórka Opalskiego z obniżoną aktywnością enzymatyczną dehydrogenazy bursztynianowej. Pow. 400 X.

Fig. 8. Les cellules d'Opalski. L'activité de déshydrogenase glutamique. Agr. 200 X.

Ryc. 8. Komórki Opalskiego. Aktywność dehydrogenazy glutaminowej. Pow. 200 X.

Fig. 9. Ultrastructure de la cellule d'Opalski, le noyau clair — situation excentrique, quelques mitochondres et inclusions de différents types. Agr. 10.000 X.

Ryc. 9. Ultrastruktura komórki Opalskiego, jasne jądro położone ekscentrycznie, nieliczne mitochondria, dwa rodzaje wtrętów. Pow. 10.000 X.

Fig. 10. Une part de cytoplasme de la cellule d'Opalski avec inclusions denses et claires. Agr. 14.000 X.

Ryc. 10. Część cytoplazmy komórki Opalskiego z jasnymi i ciemnymi wtrętami. Pow. 14.000 X.

Fig. 11. La cellule d'Opalski obtenue après l'administration de malonate. Bl. de toluid. Agr. 400 X.

Ryc. 11. Komórka Opalskiego otrzymana w hodowli tkankowej pod wpływem malonianu. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 12. La cellule intermédiaire après l'administration de malonate avec les granulations PAS-positives. PAS. Agr. 400 X.

Ryc. 12. Komórka pośrednia z ziarnistościami PAS pozytywnymi otrzymana w hodowli tkankowej pod wpływem malonianu. PAS. Pow. 400 X.

MIROSLAW KOZIK, BRONISLAW ARCIMOWICZ, JERZY DEMBCZYŃSKI

ANALIZA LASEROWA ZAWARTOŚCI NIEKTÓRYCH KATIONÓW W MÓZGU W CHOROBYCH UKŁADU POZAPIRAMIDOWEGO

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM,
w Poznaniu

Kierownik: doc. dr hab. M. Kozik
Instytut Fizyki Politechniki Poznańskiej
Kierownik: doc. dr hab. M. Frąckowiak

Zjawisko gromadzenia się w mózgu miedzi i innych kationów w zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym jest dobrze znane (Cumings 1959, Yoshinaga, Shimizu 1968, Green 1955). Stosunkowo skąpsze są doniesienia dotyczące zawartości kationów w mózgu w przebiegu innych chorób układu pozapiramidowego. Nieliczne badania w tym zakresie zazwyczaj były prowadzone przy pomocy metod biochemicznych (Cumings 1959, Harris et al. 1954, Neumann 1963). Technika badań biochemicznych ogranicza jednak w znacznej mierze szczegółowe określenie topografii gromadzenia się badanych substancji. Trudno np. ustalić dokładnie metodami chemicznymi, w jakiej warstwie kory mózgu lub w jakiej grupie neuronów występują stwierdzane zmiany. Stosowane dotychczas metody histochemiczne służące do wykrywania kationów w skrawkach histologicznych, oparte na mikrospoielaniu lub odpowiednich reakcjach barwnych, także często nie spełniają stawianych im wymagań.

W poszukiwaniu lepszej metody określania zawartości niektórych kationów w chorobach układu pozapiramidowego, podjęto próbę wykorzystania do tego celu nowo opracowanej techniki mikroanalizy laserowo-spektrograficznej (Kozik et al. 1970a, 1970b, 1971a 1971b).

MATERIAŁ I METODA

Badania prowadzono na skrawkach histologicznych mózgów, pochodzących z 3 przypadków zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego, 3 przypadków parkinsonizmu miążdżycowego i 1 przypadku choroby Parkinsona.

Mózg utrwalano w 10% formalinie, pobierano wycinki z jego określonych okolic, a następnie cięto skrawki mrożone grubości 30 μ , które poddawano analizie laserowej. Do tego celu użyto mikroanalizator laserowy firmy Zeiss, typ LMA-1 z rezonatorem szklanym zawierającym trójwartościowy neodym. Wiązkę promieni laserowych o energii 1 dżula kierowano na odpowiednio wybrane miejsce w skrawku histologicznym. Emitowane w tym procesie promieniowanie analizowano przy pomocy spektrografu siatkowego firmy Zeiss typ PGS-2, w zakresie długości fal od 2500 Å do 5000 Å. Po przeprowadzonej analizie skrawki przykrywano szkiełkiem przykrywkowym, uzyskując w ten sposób trwałe preparaty i możliwość dokładnej kontroli badanego miejsca.

WYNIKI

W skrawkach histologicznych w miejscu działania promieni laserowych obserwowano wypalony krater o średnicy 20 do 50 μ (ryc. 1). Na uzyskanych tą drogą widmach spektrograficznych oprócz prążków charakterystycznych dla pierwiastków wchodzących w skład związków organicznych, można wykazać obecność również niektórych kationów, występujących w bardzo małych ilościach.

W przypadkach zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego oprócz miedzi, przy pomocy zastosowanej metody wykryto również obecność magnezu, glinu, żelaza, rtęci i chromu. Na uwagę zasługuje tu większa intensywność prążków charakterystycznych dla miedzi w obrębie istoty białej, aniżeli w istocie szarej.

W parkinsonizmie miażdżycowym wykazano w mózgu obecność glinu, magnezu, wapnia i żelaza. Spośród kationów obecnych w mózgu w przypadku choroby Parkinsona stwierdzono wyraźne występowanie miedzi, magnezu, glinu i krzemu. Szczegółowe zestawienie pierwiastków wykrytych przy pomocy mikroanalizy laserowej w badanych przypadkach podano w tabeli 1.

Rozmieszczenie wykrytych kationów w poszczególnych okolicach mózgu nie jest jednakowe. O ile miedź i magnez w przypadkach zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego wykazano we wszystkich badanych okolicach, to linie spektrograficzne dla rtęci obserwowano tylko w obrębie jąder kresomózgowia, a prążki charakterystyczne dla chromu tylko w skorupie. Zróznicowanie topograficzne poszczególnych kationów obserwowano również w przypadkach parkinsonizmu miażdżycowego i choroby Parkinsona. Różnice topograficzne wykrytych pierwiastków ilustruje tabela 2.

Tabela 1. Zestawienie przypadków i uzyskanych wyników badań laserowych

Table 1. Index of cases and results of laser examinations

Rozpoznanie Diagnosis	Liczba przy- padków Number of cases	Wykryte kationy oraz długość fal Cations detected and wave lengths
Degeneratio hepatolenticu- laris	3	Cu 3247,5 Å Mg 2795,5 Å Al 3092,7 Å Fe 3581,1 Å 3273,9 Å 2802,6 Å 2852,1 Å Hg 3650,1 Å Cr 4244,3 Å 4046,5 Å 4274,8 Å 4358,3 Å 4289,7 Å
Parkinsonismus arteriosclero- ticus	3	Ca 3158,8 Å Mg 2795,5 Å Al 3092,7 Å Fe 3581,1 Å 3179,3 Å 3082,1 Å 3933,6 Å
Morbus Parkinsoni	1	Cu 3247,5 Å Mg 2795,5 Å Al 3092,7 Å Si 2881,5 Å 2802,6 Å

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania poza wynikami, których należało oczekiwać w oparciu o dotychczasowe spostrzeżenia biochemiczne, pozwalają również zwrócić uwagę na niektóre mniej znane zjawiska. Godnym podkreślenia wydaje się spostrzeżenie dotyczące obecności rtęci w jądrach kresomózgowia i w istocie czarnej. Obecność tego pierwiastka w badanych preparatach wykazana w zakresie trzech długości fal jest oczywista. Oddzielnym zagadnieniem jest mechanizm patogenetyczny, prowadzący do odkładania się rtęci w mózgu. Wyjaśnienie tego zagadnienia przekracza ramy wykonanych badań, chociaż można przypuszczać, że złogi pierwiastków metali ciężkich, takich jak: rtęć i chrom odkładają się w mózgu w przebiegu choroby Westfal-Strümpfla w wyniku uszkodzenia czynności wątroby. Do takiego przypuszczenia skłaniają spostrzeżenia poczynione w równoległe prowadzonych badaniach nad zawartością kationów w mózgu w przebiegu marskości wątroby.

W świetle przytoczonych rozważań wydają się również interesujące wyniki osiągnięte drogą mikroanalizy laserowej w przypadkach parkinsonizmu miazdźcowego i choroby Parkinsona. W obu tych jednostkach chorobowych stwierdzono odkładanie się w mózgu dość licznych pierwiastków. Szczególnie ciekawe wydaje się odkładanie miedzi w mózgu w przypadku choroby Parkinsona. Spostrzeżenie to może nasuwać przy-

Tabela 2. Topografia ukrytych pierwiastków

Table 2. Topography of detected elements

Okolica Region	Choroba Westfal-Strumpla Westfal-Strumpl disease	Parkinsonizm miażdżycowy Sclerotic parkinsonism	Choroba Parkinsona Parkinson disease
Kora mózgu (z. środk. przed.) Cerebral cortex (precentr. g.)	Cu, Mg, Al	Mg, Al, Ca	Mg, Al, Ca, Cu
Istota biała (płat czołowy) White matter (frontal lobe)	Cu, Mg, Al	Mg, Al, Ca	Mg, Al, Ca, Cu
Kora mózdzku Cerebellar cortex	Cu, Mg, Al,	Mg, Al	Mg, Al, Si
Skorupa Putamen	Cu, Mg, Al, Hg, Fe, Cr	Mg, Al, Ca, Fe	Mg, Al
Gałka biała Globus pallidus	Cu, Mg, Al, Hg, Fe	Mg, Al, Ca	Mg, Al, Ca, Cu
Jądro ogoniaste Nucleus caudatus	Cu, Mg, Al, Hg, Fe	Mg, Al, Ca, Fe	Mg, Al
Istota czarna Substantia nigra	Cu, Mg, Al, Hg, Fe	Mg, Al, Ca, Fe	Mg, Al, Si

puszczenie, że patogeneza różnych chorób zwyrodnieniowych układu pozapiramidowego ma pewne wspólne ogniwa.

Przedstawione wyniki nie upoważniają do wysuwania daleko idących wniosków, przede wszystkim ze względu na zbyt skąpą liczbę badanych przypadków. Uwzględniając jednak trudności z nagromadzeniem dostatecznie dużej liczby tego rodzaju materiału, zdecydowano się przedstawić dotychczasowe rezultaty, traktując je jako doniesienie wstępne. W dalszych badaniach nad tym zagadnieniem wyłania się również potrzeba ilościowego oznaczania wykazanych kationów w poszczególnych okolicach mózgu, szczególnie wobec zaobserwowania bardziej intensywnego natężenia prążków miedzi w istocie białej w chorobie Westfal-Strümpfla w stosunku do istoty szarej.

WNIOSKI

1. W zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym dochodzi do gromadzenia się w mózgu licznych pierwiastków metali ciężkich, a w szczególności Cu, Fe, Mg, Al, Hg i Cr.
2. Patogeneza odkładania rtęci i chromu w jądrach kresomózgowia oraz w istocie czarnej w chorobie Westfal-Strümpfla pozostaje nie wyjaśniona.
3. Stwierdzono występowanie wielu kationów w mózgu również w parkinsonizmie miażdżycowym i chorobie Parkinsona.

M. Козик, Б. Арцимович, Я. Дембчиньски

ЛАСЕРНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ КАТИОНОВ В БОЛЕЗНЯХ ЭКСТРАПИРАМИДНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

На основании метода лазерного микроанализа проводились гистохимические исследования содержания катионов в мозгу в болезни Вестваль-Штрюмпля, атероматозном паркинсонизме и болезни Паркинсона.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что в гепато-лентикулярной дегенерации кроме меди накапливаются также другие элементы тяжелых металлов в мозгу и в особенности Mg, Fe, Al, Hg и Cr. Кроме того наблюдались наличие многих катионов в мозгу также в атероматозном паркинсонизме и в болезни Паркинсона.

В обсуждении обращается внимание на необходимость дальнейших исследований ближайшего выяснения патогенного механизма, ведущего к отложению в мозгу тяжелых металлов в протекании некоторых дегенеративных болезней экстрапиримидной системы.

M. Kozik, B. Arcimowicz, J. Dembczyński

LASER ANALYSIS OF THE CONTENT OF SOME CATIONS IN DISEASES
OF THE EXTRAPYRAMIDAL SYSTEM

Summary

Basing on the laser microanalysis method, histotopochemical studies were carried out on the content of a number of cations in brain in Westfal-Strümpf disease, arterio-sclerotic parkinsonism and Parkinson disease.

As to the hepato-lenticular degeneration, the studies revealed accumulation in brain, apart from Cu, of other heavy metals, in particular Mg, Fe, Al, Hg and Cr. Moreover, the occurrence of numerous cations was noticed in arterio-sclerotic parkinsonism and Parkinson disease.

In the discussion, the authors stressed the necessity of further studies on the pathogenic mechanism leading to the accumulation in brain of heavy metals.

PISMIENNICTWO

1. Cumings J. N.: Biochemical aspects of copper metabolism. In: Biochemical aspects of neurological disorders (Cumings J. N. and Kremer M.). Blackwell, Oxford 1959.
2. Green C. L.: Histochemical demonstration of copper in a case of hepatolenticular degeneration. *Am. J. Path.*, 1955, 31, 545.
3. Harris W. H., Beauchemin J. A., Hershenson H. M., Roberts S. H., Matsugama G.: A study of metal ions in the central nervous system. *J. of Neuropath. exp. Neurol.*, 1954, 13, 427—434.
4. Kozik M., Arcimowicz B., Dembczyński J.: An attempt of applying Laser rays for the detection and analysis of chemical elements in tissue slices. *Acta Histochem.*, 1970a, 37, 203—205.
5. Kozik M., Warchoń J., Arcimowicz B.: The assay of acid phosphatase activity by means of a laser method. *Histochemie*, 1970b, 24, 245—250.
6. Kozik M., Warchoń J., Arcimowicz B.: Preparation of histochemical sections for quantitative determination of acid phosphatase activity by means of laser microanalysis. *Histochemie*, 1971a, 26, 74—79.
7. Kozik M., Warchoń J., Arcimowicz B.: Further investigations concerning the applicability of laser analysis in quantitative histochemistry. *Histochemie*, 1971b, 26, 212—217.
8. Neumann M. A.: Iron and calcium dysmetabolism in the brain. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 148—163.
9. Yoshinaga T., Shimizu N.: Histochemische Untersuchung des färbbaren Zinks und Kupfers in Gehirn des Menschen. *Acta Histochem.*, 1968, 30, 90—95.

Adres autorów: Sam. Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

ZUZANNA KRAŚNICKA, JERZY W. BOROWICZ, BARBARA GAJKOWSKA

ULTRASTRUKTURA KOMÓRKI GLEJOWEJ Z HODOWLI TKANKOWEJ *IN VITRO* *

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski
Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN
Kierownik: doc. dr J. W. Borowicz

Podjęte przez nas badania ultrastruktury komórek glejowych hodowanych *in vitro* są kontynuacją poprzednich opracowań morfologicznych i histochemicznych gleju w warunkach hodowli tkankowej, prowadzonych w mikroskopie świetlnym (Kraśnicka, Mossakowski 1965, Mossakowski i wsp. 1965, Renkawek, Mossakowski 1966, Renkawek 1967, Kraśnicka, Renkawek 1969). We wstępnym doniesieniu dotyczącym badań ultrastruktury (Kraśnicka, Borowicz 1971) przedstawiono jedynie wyniki badań młodych, niezróżnicowanych komórek glejowych z jednodobnych hodowli. Nieliczne tylko prace w dostępnym nam piśmiennictwie światowym dotyczą ultrastruktury gleju hodowanego *in vitro* (Duncan, Hild 1960, Ross i wsp. 1962, Galey, De Vellis 1969). Pierwsza z nich omawia patologiczne zmiany w mitochondriach komórek glejowych pochodzących z hodowli tkankowej (Duncan, Hild 1960). Autorzy drugiej pracy przedstawiają stosunki między glejem i neuronem w okresie mielinizacji włókien nerwowych w warunkach *in vitro* (Ross i wsp. 1962).

Celem naszej pracy jest przedstawienie morfologii komórek glejowych w obrazie mikroskopowo-elektronowym z uwzględnieniem ich różnicowania i dojrzewania w warunkach hodowli tkankowej. Skłoniła nas do tego zarówno niewielka ilość opracowań z tego zakresu, jak i potrzeba utworzenia modelu — podstawy dla dalszych prac nad ultrastrukturą gleju patologicznego w warunkach hodowli *in vitro*.

* Praca wykonana częściowo w oparciu o pomoc finansową PL 480 US Public Health Service. Agreement 05-004-1.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowli gleju pochodzącej z mózdzku 1—2-dniowych noworodków szczurzych szczepu Wistar z hodowli losowej. Hodowle gleju były przeprowadzane wg standardowej metody przedstawionej w pracy Kraśnickiej i Mossakowskiego (1965) z niewielką modyfikacją własną, polegającą na zastąpieniu płytek szklanych płytkami ze spolimeryzowanego eponu, pokrytymi błoną kolagenową. Metoda ta została opisana w pracy Borowicza i Kraśnickiej (1971). Do badań morfologicznych, histochemicznych, jak i ultrastrukturalnych pobierano komórki z hodowli 7-dniowej, 25-dniowej i 6-tygodniowej.

Badania morfologiczne

Do badań histologicznych hodowle utrwalono w płynie Carnoya i barwiono błękitem toluidyny.

Do mikroskopii elektronowej materiał utrwalano w 5% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym Milloniga o $\text{pH} = 7,4$ przez 1,5 godz. oraz w 1% OsO_4 w buforze Milloniga o $\text{pH} 7,4$ przez 1,5 godz. Następnie materiał odwadniano w alkoholu etylowym o wzrastających stężeniach i tlenku propylenu, po czym zatopiono w Epon 812 (A : B = 3:5).

Badania histochemiczne

Odczyny na aktywność enzymów z grupy oksydoredukcyjnej, a mianowicie: dehydrogenazy bursztynianowej (SDH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy glutaminowej (GDH), były wykonywane wg metody Hess, Scarpelli, Pearse (1958) przy użyciu Nitro-BT. Czas inkubacji dla mikroskopu świetlnego — 1 godz., dla mikroskopu elektronowego — 30 min. Odczyny były wykonane na materiale nieutrwalonym.

Odczyny na aktywność enzymów hydrolitycznych adenozyνο-trójfosfatazę ATP-azę (metodą Wachsteina i Meisela 1957) i fosfatazę kwasną FK (metodą Gomoriego, w modyfikacji Holta 1959) wykonano na materiale utrwalonym w płynie Bakera dla mikroskopii świetlnej, a w 5% aldehydzie glutarowym w buforze weronałowo-octanowym o $\text{pH} = 7,4$ — dla mikroskopii elektronowej.

Skrawki wykonano na ultramikrotomie Reichert OmU2, a zdjęcia w mikroskopie elektronowym JEM-7A przy napięciu przyspieszającym 80 kV na kliszach ORWO — EU2.

W przypadku wszystkich odczynów histochemicznych wykonano każdorazowo równoległe badania kontrolne (bez dodatku substratu do płynu inkubacyjnego).

Materiał do mikroskopu elektronowego został po wykonaniu odczynów utrwalony w 1% OsO₄ i po typowym przygotowaniu zatopiony w Epon 812.

WYNIKI

Badania morfologiczne

Hodowla komórek glejowych 7-dniowa. W ciągu pierwszego tygodnia wzrostu hodowli obserwuje się namnażanie komórek glejowych z eksplantatu. Komórki te jednak nie posiadają cech zróżnicowanego gleju i jedynie w bardzo niewielkiej liczbie komórek można się dopatrzeć — zwłaszcza w mikroskopie elektronowym — tendencji różnicowania się w kierunku oligo-, lub astrogleju. W mikroskopie świetlnym komórki te cechuje obfita cytoplazma z nielicznymi krótkimi wypustkami i obecnością dość dużego jądra (ryc. 1). W tym okresie stwierdza się liczne komórki znajdujące się w różnych fazach podziału mitotycznego.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym komórki glejowe są kształtu nieregularnie owalnego, często wydłużone z dość licznymi, krótkimi wypustkami cytoplazmatycznymi. Jądro owalne jest położone ekscentrycznie, o gładkim obrysie, niekiedy z głębokimi wpukleniami cytoplazmatycznymi. Chromatyna jądrowa jest dość równomiernie rozłożona; zwykle widoczne jest wyraźne, ciemne jąderko. Cytoplazma komórek glejowych zawiera skąpą ilość siatki endoplazmatycznej typu szorstkiego, natomiast obfitą ilość wolnych ziarnistości rybosomalnych. Mitochondria liczniejsze niż w gleju z wycinków tkankowych są wydłużone o dobrze wykształconych poprzecznych grzebieniach i słabo widocznej macierzy. W pobliżu jądra w przeważającej większości komórek znajduje się bardzo dobrze wykształcony aparat Golgiego, ułożony podkoświasto, równoległe do błony jądrowej, a składający się z kilku warstw struktur kanalikowych, miejscami z pęcherzykowatymi rozszerzeniami (ryc. 2). W cytoplazmie znajdują się liczne twory lizosomalne zwykle duże, w postaci tzw. dense bodies (ryc. 2). W nielicznych komórkach tej grupy spotykano na powierzchni błony komórkowej pasmowate, ciemne, błoniaste twory, nieco podobne do tworzącej się mieliny (ryc. 3).

Hodowla komórek glejowych 25-dniowa. W tym okresie stwierdza się znaczny wzrost hodowli. Komórki glejowe występują w licznych skupieniach, wyrastając daleko poza eksplantat. W mikroskopie świetlnym można już wyraźnie obserwować zróżnicowane typy gleju (ryc. 4). Widoczne są typowe astrocyty, oligodendrocyty, komórki mikrogleju, a także pałeczkowate komórki gleju Hortégi oraz formy komórkowe trudne do

jednoznacznego sklasyfikowania. Przeglądając w mikroskopie płytki z hodowlami zauważa się, że zwykle poszczególne typy komórek glejowych układają się w oddzielnych skupieniach po kilka lub kilkanaście. Bywa też, że w niektórych hodowlach występuje przewaga różnicowania się komórek glejowych w kierunku astrocytów, lub oligodendrocytów, przy czym ten drugi typ widywano częściej. Ilość komórek mikrogleju jest stosunkowo najmniejsza. Nieliczne również są komórki typu makrofagów i fibroblastów.

W mikroskopie elektronowym obserwuje się też wyraźną różnicę w porównaniu z komórkami glejowymi z hodowli 7-dniowych. Stopień i kierunek zróżnicowania odpowiadają temu, co spostrzega się w mikroskopie świetlnym. Wszystkie komórki są większe, a cytoplazma ich bardziej obfita niż w hodowlach jednotygodniowych. Kształt komórek wydłuża się nieregularnie, zwykle z obecnością tzw. stożka wypustkowego. Jądra o ułożeniu mimośrodkowym. Zarówno astrocyty jak i oligodendrocyty oraz nieliczne komórki mikrogleju nie odbiegają wyglądem swych struktur od odpowiednich komórek glejowych z wycinków tkankowych.

W astrocytach widoczne są również bardzo delikatne, nieregularnie układające się włókienka glejowe (gliofibryle) (ryc. 5—7) oraz drobne skupienia ziarnistości glikogenowych. Poza tym obecne są też komórki glejowe, które trudno jednoznacznie określić i zaliczyć do któregoś typu. W hodowli 25-dniowej, podobnie jak w hodowli 7-dniowej typowe dla wszystkich komórek glejowych jest występowanie w cytoplazmie stosunkowo dużej ilości mitochondriów o wydłużonym kształcie i dobrze wykształconych poprzecznie przebiegających grzebieniach oraz tworów lizosomalnych o typie tzw. dense bodies (ryc. 8, 9).

W przeciwieństwie do hodowli 7-dniowych aparat Golgiego wydaje się być nieco mniej rozbudowany. W pojedynczych komórkach glejowych, przeważnie dużych, nieregularnych w kształcie spotyka się w cytoplazmie typowe kule tłuszczowe.

Hodowla komórek 6-tygodniowa. W mikroskopie świetlnym stwierdza się obecność komórek glejowych nie różniących się od gleju z hodowli 25-dniowej. Poza komórkami glejowymi są widoczne jednak dość liczne fibroblasty.

W mikroskopie elektronowym poza komórkami glejowymi o strukturze takiej jak uprzednio opisana znajdują się dość liczne komórki gleju zawierające w cytoplazmie duże kule tłuszczowe, a także komórki o cechach zwyrodnienia i dezintegracji objawiającej się obrzmiałymi mitochondriami, rozrzedzeniem i zanikiem chromatyny w jądrach, a w niektórych komórkach również zupełnym przemieszczaniem struktur jądrowych i cytoplazmatycznych (ryc. 10, 11).

Badania histochemiczne

Enzymy oksydoredukcyjne (LDH, GDH, SDH). Zasadniczy wzorec rozkładu aktywności enzymatycznej jest wspólny dla wszystkich badanych dehydrogenaz. Różnice spostrzega się jedynie w rozkładzie i rozmieszczeniu aktywności enzymatycznej w zależności od typu komórek glejowych i wieku hodowli. Astrocyty wykazują wysoką aktywność reprezentowaną przez obfite ciemnoniebieskie złogi formazanów. Ziarna te wypełniają jednolicie zarówno cytoplazmę komórek jak i wypustek. Ten typ rozkładu aktywności wykazują astrocyty wielowypustkowe, jak również ich formy mniej zróżnicowane — spongioblasty. Oligodendrocyty — w młodych hodowlach wykazują niską aktywność. Ziarna formazanu reprezentujące aktywność są umiejscowione w jednym biegunie komórki, natomiast w tym okresie nie obserwuje się aktywności enzymatycznej w wypustkach (ryc. 12). W 25-dniowej i 6-tygodniowej hodowli narasta natężenie reakcji enzymatycznej w cytoplazmie i wypustkach przede wszystkim w oligodendrocytach, najwyższe wydaje się być w hodowli 25-dniowej (ryc. 13, 14).

Mikroglej w postaci drobnych, niekiedy wydłużonych komórek, jak również w postaci przerosłej, pałeczkowatej i amboidalnej wykazuje wysoką aktywność enzymatyczną. Ziarna formazanu są grube i jednolicie rozmieszczone w całej cytoplazmie komórek mikrogleju.

Spśród badanych dehydrogenaz najwyższą aktywność w astrocytach i oligodendrocytach wykazuje dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH) i bursztynianowa (SDH) wykazują aktywność słabszą.

W mikroskopie elektronowym, przy stosunkowo długim okresie inkubacji, spostrzegano bardzo silny odczyn na dehydrogenazy w postaci dużego zaczerwienienia błon mitochondrialnych, przede wszystkim grzebieni i niekiedy wypełnienie przestrzeni między błonami grzebieni (odczyn o charakterze dyfuzyjnym). Dodatnie odczyny występują we wszystkich trzech grupach czasowych hodowli i we wszystkich typach komórek glejowych. W zasadzie dodatni wynik stwierdzono we wszystkich mitochondriach, choć nasilenie odczynu w postaci silniejszego, lub słabszego skontrastowania w błonach bywa różne, nawet wśród mitochondriów tej samej komórki glejowej. Wydaje się, że odczyn na dehydrogenazę mleczanową jest bardziej nasilony, natomiast odczyn na dehydrogenazę bursztynianową jest bardziej równomiernie rozłożony (ryc. 15, 16, 17, 18).

Enzymy hydrolityczne. Fosfataza kwaśna (FK). Dodatni odczyn w postaci rozrzuconych w cytoplazmie ziarnistości brunatno-czarnych, różnej wielkości spotyka się we wszystkich komórkach glejowych

i wszystkich trzech czasach obserwacji. W komórkach z hodowli 25-dniowych i 6-tygodniowych jest on wyraźnie większy niż w hodowlach 7-dniowych. Wydaje się też, że we wszystkich typach komórek mikrogleju odczyn ten jest bardziej nasilony (ryc. 19).

W mikroskopie elektronowym produkty końcowe odczynu histochemicznego występują w postaci czarnych nieregularnych złogów zlokalizowanych w lizosomach. Jednakże w komórkach ze starych hodowli są widoczne również mniej gęste i drobniejsze złogi ołowiowe w cytoplazmie, poza obrębem lizosomów, w ich pobliżu. Nasilenie odczynu jest proporcjonalne do ilości struktur lizosomalnych w komórce, a więc większe w hodowlach starszych (ryc. 20).

ATP-aza, badana metodą Wachsteina i Meisela, w pierwszym tygodniu wzrostu hodowli wykazuje niską aktywność. Przy użyciu tej metody otrzymuje się reakcję enzymatyczną w błonach komórkowych. Końcowy produkt reakcji enzymatycznej gromadzi się w postaci drobnych czarnych ziaren wzdłuż linii błon komórkowych. Wraz z wiekiem hodowli wzrasta aktywność tego enzymu. W hodowlach 25-dniowych aktywność osiąga najwyższe nasilenie. Stwierdzono wyraźnie okonturowane błony komórkowe, oraz błony jądrowe. Przy badaniu aktywności ATP-azy nie spostrzegano różnicy aktywności w poszczególnych typach komórek glejowych (ryc. 21).

W mikroskopie elektronowym jest widoczny odczyn w postaci bardzo silnie skonstrastowanych złogów, szczególnie obfitych na błonach komórkowych (ryc. 22).

OMÓWIENIE

Podobnie jak i inni autorzy (Duncan, Hild 1961, Caley, De Vellis 1969, Ross i wsp. 1962) stwierdziliśmy, że w ciągu 6 tygodni udaje się bez trudu utrzymać hodowlę komórek glejowych *in vitro*. Wprawdzie w 6 tygodniu znajdowaliśmy już w hodowli dość znaczny rozplem komórek typu makrofagów i fibroblastów, tym niemniej w strefie wzrostu prawidłowy glej stanowił nadal większość elementów komórkowych hodowli. Podobnie jak w poprzednich naszych badaniach nie stwierdziliśmy różnic we wzroście i morfologii komórek pomiędzy hodowlami prowadzonymi na płytkach szklanych i na płytkach eponowych.

Najwcześniejszy okres — pierwszy tydzień hodowli — jest okresem szybkiego namnażania się komórek wyrastających z eksplantatu, jednakże w tym czasie zarówno w mikroskopie świetlnym jak i elektronowym nie znajduje się wyraźnych oznak różnicowania się poszczególnych typów gleju. Różnicowanie się następuje w drugim tygodniu, około 10-go dnia, co zresztą obserwowaliśmy we wcześniejszych naszych ba-

daniach (Kraśnicka, Borowicz 1971). Podobne spostrzeżenia, dotyczące rozwoju komórek glejowych w mózgu noworodków szczurzych wysuwają Caley i Maxwell (1968). Dla hodowli jest typowe gromadzenie się oddzielnych skupień astrocytów i oligodendrocytów. Częstym zjawiskiem nie dającym się *a priori* przewidzieć, ani przekonywująco wyjaśnić jest przeważające w niektórych hodowlach różnicowanie w kierunku oligodendrocytów. Mimo zdolności wzrostu i różnicowania się, komórka glejowa z hodowli *in vitro* różni się nieco od komórki glejowej obserwowanej w wycinku z tkanki mózgowej. Wpływają na to krańcowo odmienne warunki bytowania komórki glejowej w hodowli i konieczność przystosowania się do tych warunków. Najważniejszymi czynnikami różniącymi glej w hodowli od gleju *in situ* w tkance mózgowej są: brak bariery krew-mózg i bezpośredni kontakt komórki z płynami stanowiącymi medium, w którym żyje hodowla, oraz obecność szerokiej przestrzeni międzykomórkowej. Oczywiście więc jest, że w takich warunkach komórka glejowa musi rozbudowywać niektóre struktury cytoplazmatyczne, słabo rozwinięte w komórkach gleju *in situ*. Łączą się z tym pewne różnice w aktywności enzymów związanych z tymi strukturami. Wielkość komórek z hodowli w zasadzie nie różniła się od komórek gleju w tkance mózgowej. Już od pierwszych dni posiadały one również zdolność tworzenia wypustek podobnych do tworzonych przez glej *in situ*.

Jądra komórek w hodowli w zasadzie nie różnią się swym obrazem od jąder odpowiednich typów komórek gleju w tkance mózgowej. Wśród struktur cytoplazmy, już od najwcześniejszego okresu życia hodowli zwraca uwagę znacznie większa niż w komórkach gleju *in situ* ilość mitochondriów dużych, wydłużonych, z dobrze rozwiniętymi grzebieniami. Znaczne rozbudowanie układu mitochondrialnego, szczególnie wyraźne przy porównaniu obrazu ultrastrukturalnego astrocytów hodowanych *in vitro* z astrocytami z uformowanej tkanki nerwowej może stanowić wyjaśnienie różnic w histochemicznie wykrywanej aktywności enzymów mitochondrialnych w gleju w hodowli tkankowej i w prawidłowym układzie nerwowym (Mossakowski i wsp. 1965, Renkawek, Mossakowski 1966).

Aparat Golgiego jest szczególnie silnie rozwinięty w okresie pierwszego tygodnia hodowli, mniej rozbudowany w późniejszych fazach jej rozwoju jest jednak wyraźnie większy niż w gleju *in situ*. Jedynie komórki mikrogleju nie wykazują zwiększenia struktur aparatu Golgiego. Caley i Maxwell (1968) badając w mikroskopie elektronowym różnicowanie się komórek gleju w wycinkach z mózgu szczurów po urodzeniu, stwierdzali także w tym czasie obecność dobrze rozwiniętego aparatu Golgiego w komórkach. Silny rozwój aparatu Golgiego, zwłaszcza w pierwszych okresach hodowli można by zapewne wiązać z intensywną

w tym okresie syntezą białek strukturalnych komórki (Schultze 1968). Na uwagę zasługuje obecność i czas pojawiania się gliofibryli w gleju astrocytarnym. Stanowią one wykładnik różnicowania się oraz morfologicznego i czynnościowego dojrzewania komórek glejowych w hodowli pozaustrojowej.

We wszystkich okresach życia hodowli w komórkach typu astrogleju i oligodendrogleju obecne były liczne struktury lizosomalne, występujące przeważnie w postaci tzw. dense bodies wraz z znacznie nasilonym odczynem na kwaśną fosfatazę. Duża ilość lizosomów, przewyższająca bardzo znacznie ilość tych struktur w gleju w tkance uformowanej, może być tłumaczona zwiększonym zapotrzebowaniem na enzymy hydrolityczne w komórkach żyjących w całkiem odmiennych warunkach. Silny odczyn na dehydrogenazę mleczanową wyraźnie przewyższający odczyny na inne dehydrogenazy w mitochondriach, wydaje się świadczyć o przewadze przemiany beztlenowej nad tlenową w tych komórkach.

Wreszcie wybitnie silny odczyn na aktywność ATP-azy błonowej może z kolei wiązać się ze zmianami w przepuszczalności błon komórek żyjących w hodowli pozaustrojowej. Komórki mikrogleju wykazywały najmniej różnic zarówno w morfologii, jak i w aktywności badanych enzymów w porównaniu z komórkami mikrogleju w tkance mózgowej.

З. Краśницка, Е. В. Борович, Б. Гайковска

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЫ

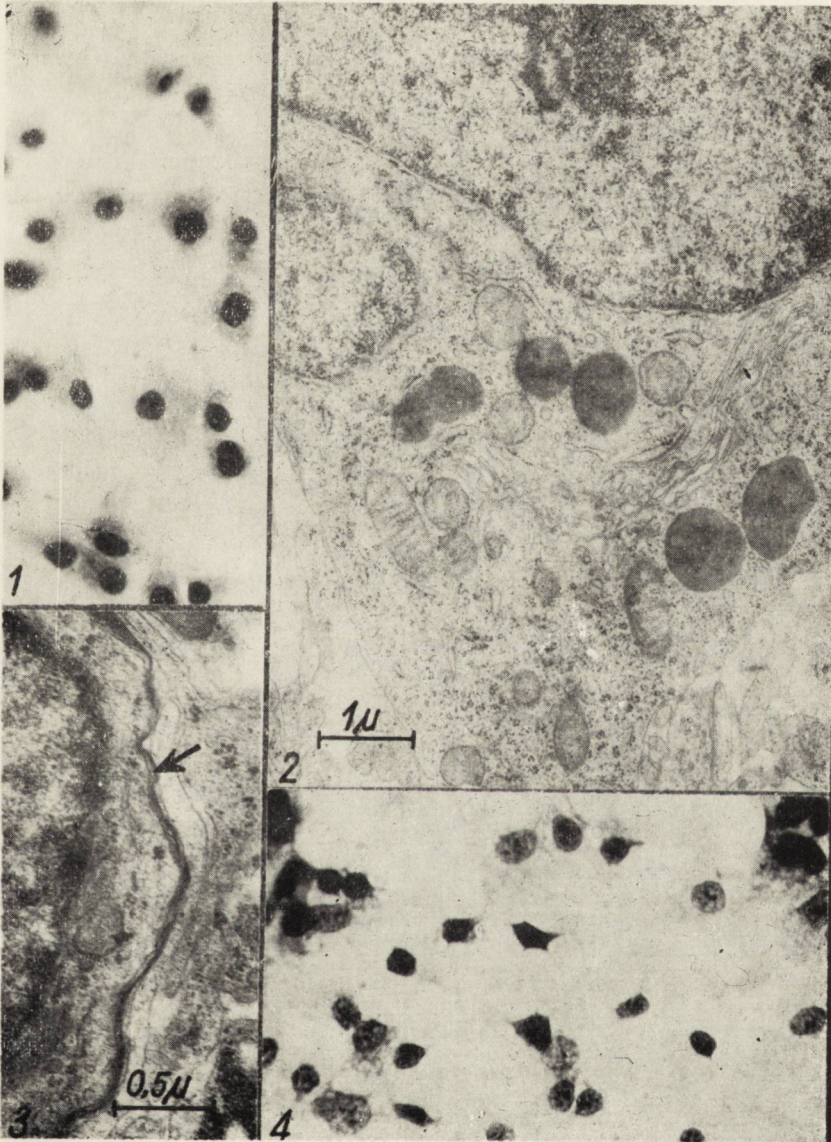
Резюме

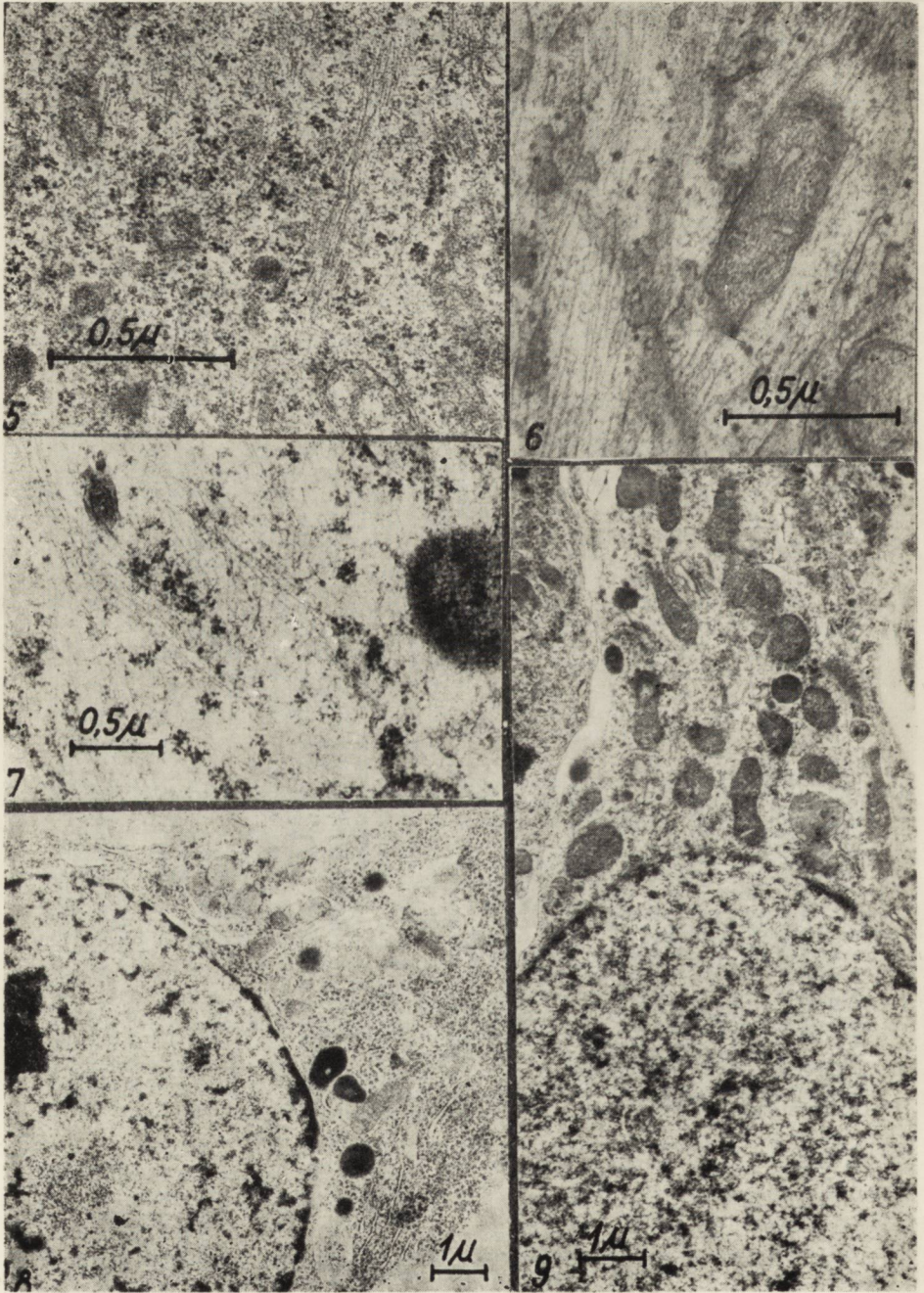
Авторы представляют морфологию и гистоэнзиматические свойства глиальных клеток в электронно-микроскопической картине с учетом их созревания и дифференцирования в условиях тканевой культуры.

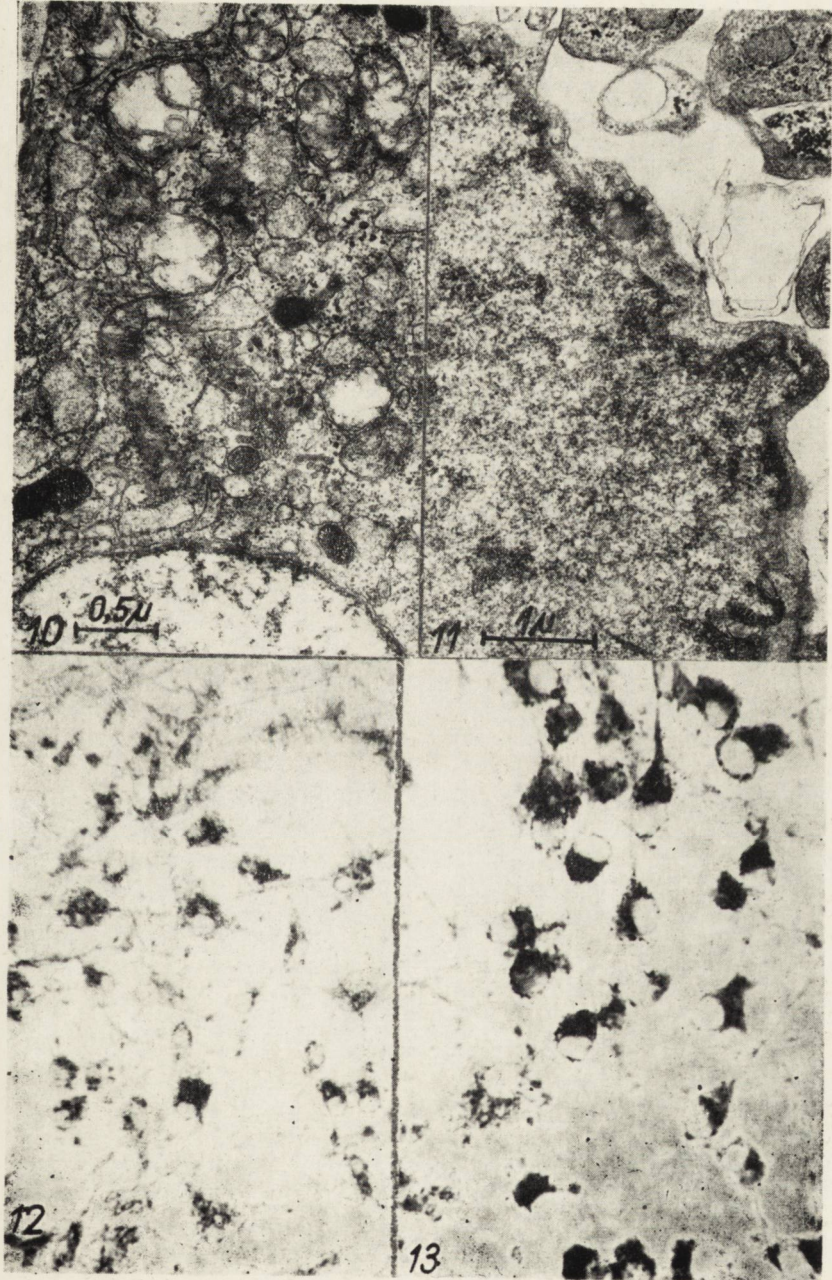
Исследования проводились с глиальной культурой, возраста 7, 25 дней и 6 недель, происходящей из мозжечка крысиных новорожденных. Исследовалась активность оксидоредукционных энзимов (SDH, LDH, GDH) и гидролитических энзимов (кислая фосфатаза и АТФ-аза). Параллельно электронно-микроскопическим исследованиям проводились наблюдения в световом микроскопе.

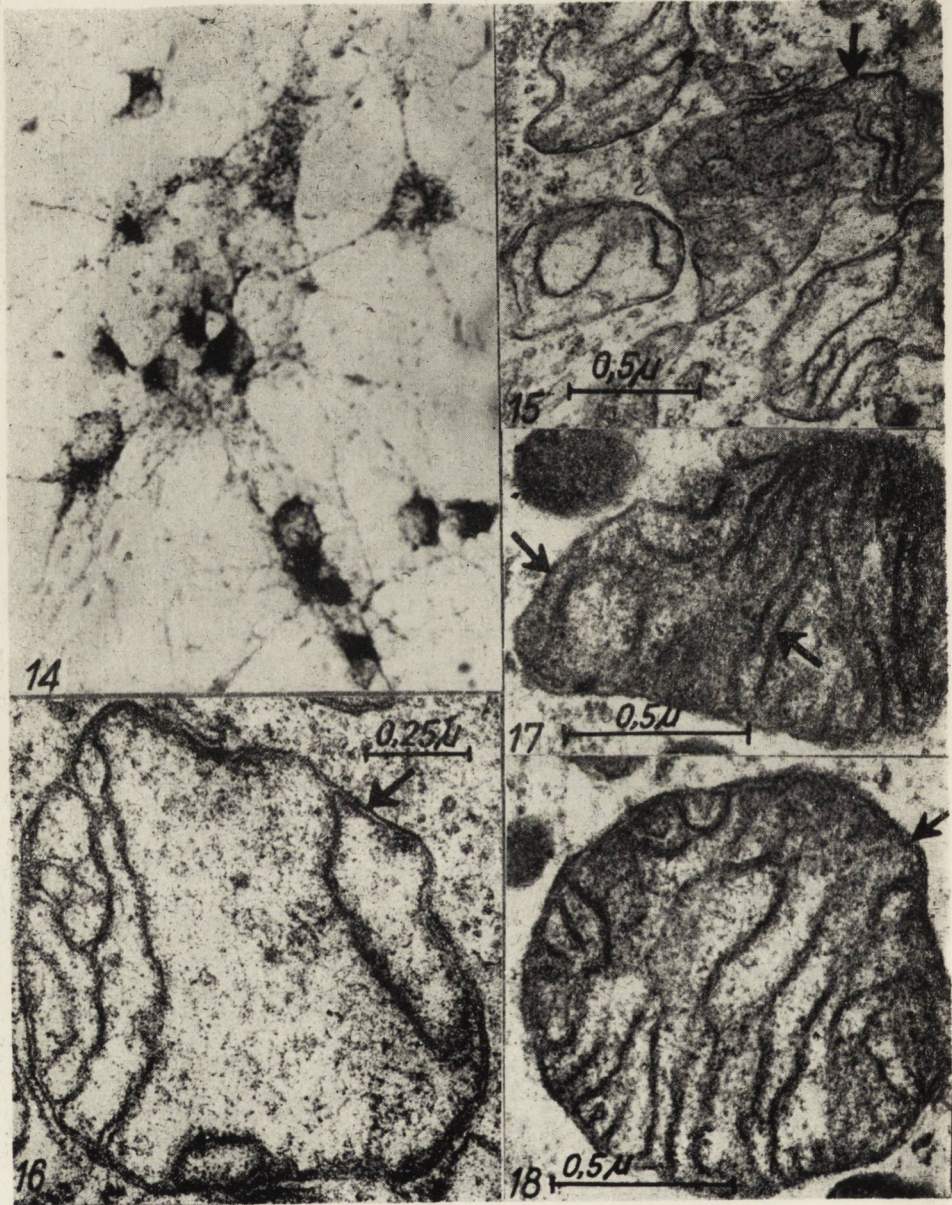
Морфологические исследования в электронном микроскопе подтверждают факт созревания и дифференцирования глиальных клеток за время их роста в культуре. Кроме того наблюдаются некоторые морфологические различия между глиальными клетками в культуре и их соответствующими образованиями в нервной ткани.

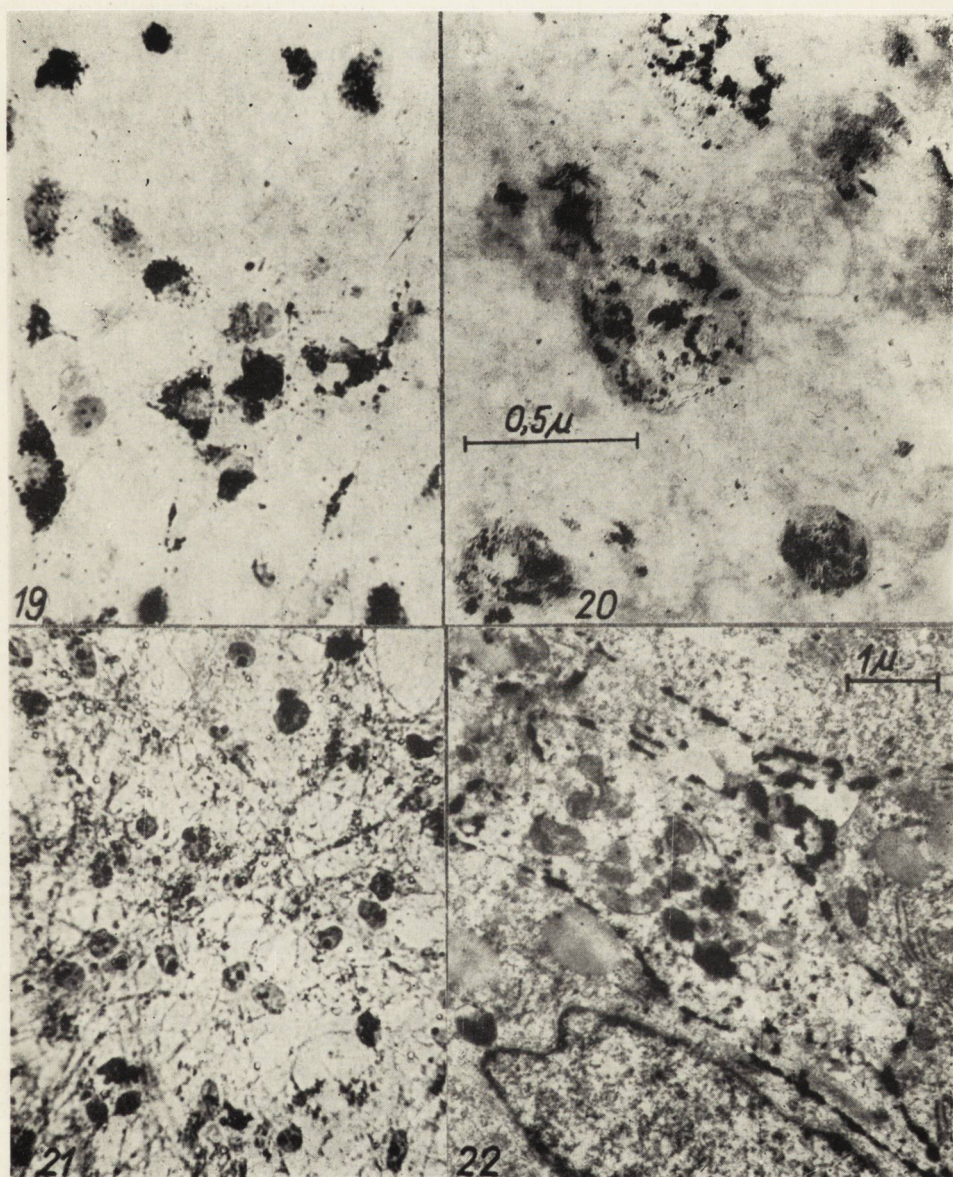
Энзиматические исследования в электронно-микроскопической картине обнаруживают сильную реакцию всех исследованных дегидрогеназ в виде зачернения митохондриальных оболочек и особенно их гребешков. Касается это











трех типов глиальных клеток и всех временных периодов исследованных культур. Выражением активности кислой фосфатазы являются темные нерегулярные отложения, локализованы в лизосомах. Исследование активности АТФ-азы в электронном микроскопе локализует конечный продукт энзиматической реакции на клеточных оболочках.

Наблюдаемые морфологические и энзиматические изменения глиальных клеток в культуре детерминируются отличающимися условиями пребывания в культуре и необходимостью приспособления к ним.

Z. Kraśnicka, J. W. Borowicz, B. Gajkowska

ULTRASTRUCTURE OF GLIAL CELLS IN TISSUE CULTURE *IN VITRO*

Summary

The authors describe the morphology and histoenzymatic properties of glial cells in the electron microscopic picture, taking into consideration their maturation and differentiation under the conditions of tissue culture.

The studies were carried out on 7-days, 25-days and 6-weeks tissue cultures derived from new born rat cerebellum. The activity of oxydoreductive (SDH, LDH and GDH) and hydrolytic (acid phosphatase and ATP-ase) enzymes was examined. Observations in light microscope were done parallel to the electron-microscopic examinations.

Morphological studies in electron microscope confirmed the fact, that both maturation and differentiation of glial cells are taking place in the period of growth in culture. Moreover, some morphological differences were observed between the glial cells in culture and their homologues in the nervous tissue *in situ*.

Enzymatic studies revealed in the electron-microscopic picture a strong reaction of all of the examined dehydrogenases manifested in the form of blackening of mitochondrial membranes and on their crists. This effect concerned all three types of glial cells and all periods of growth. The acid phosphatase activity found expression in dark, irregular deposits localized in lysosomes, whereas that of ATP-ase was manifested by the presence of the final reaction product on the cellular membranes.

The morphological and histochemical changes observed in glial cells cultured *in vitro* may result from the alteration in living conditions and adaptation to them.

PIŚMIENNICTWO

1. Borowicz J., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania tkanki nerwowej hodowanej *in vitro* do badania w mikroskopie elektronowym. Pat. Pol., 1971, 4.
2. Caley D. W., Maxwell D. S.: An electron microscopic study of neuroglia during postnatal development of the rat cerebellum. J. comp. Neurol., 1968, 133, 17—44.
3. Caley F. R., Vellis D. C.: Electron microscopy of cultured glial cells. UCL, 1969, 12, 724.

4. Duncan D., Bild W.: Mitochondrial alterations in cultures of the central nervous system as observed with the electron microscope. *Zeitsch. Zell. Mikr. Anat.*, 1961, 51, 123—137.
5. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A.G.E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753—760.
6. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Morfologia i histochemia mikrogleju w hodowli tkankowej prowadzonej w warunkach prawidłowych i patologicznych. *Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 73—90.
7. Kraśnicka Z., Mossakowski M.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
8. Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of glial cells cultured in vitro. *Acta Med. Pol.*, 1971, 12, 199—202.
9. Mossakowski M., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Aktywność enzymów oksydacyjnych w tkance glejowej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 243—258.
10. Renkawek K., Mossakowski M.: Aktywność enzymów oksydacyjnych w tkance glejowej hodowanej in vitro. Cz. II. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 53—62.
11. Renkawek K.: Aktywność enzymów hydrolitycznych w tkance glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1967, 5, 105—114.
12. Ross L. L., Borstein M. B., Lehrer G. M.: Electron microscopic observations of rat and mouse cerebellum in tissue culture. *J. Cell Biol.*, 1962, 14, 19—30.
13. Schultze B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. W monografii: *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*, red. F. Büchner, Band 2, Teil 5, 466—670. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1968.
14. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Path.*, 1957, 27, 13.

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

PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Niezróznicowane komórki glejowe z 1-tygod. hodowli. Bł. toluid. Pow. 400 X.

Fig. 1. Undifferentiated glial cells in one-week culture. Toluid. blue. X 400.

Ryc. 2. Fragment komórki glejowej z hodowli 1-tygod. W pobliżu jądra widoczny dobrze rozwinięty aparat Golgiego oraz liczne struktury typu lizosomów. Liczne wydłużone mitochondria.

Fig. 2. Glial cell fragment from 1-week culture. A well-developed Golgi apparatus and numerous lysosome-like structures visible in the vicinity of nucleus. Numerous elongated mitochondria.

Ryc. 3. Fragment komórki z hodowli 1-tygod. z widocznymi na powierzchni błony komórkowej strukturami wielowarstwowymi (strzałka).

Fig. 3. Cell fragment from 1-week culture with multi-layer structures visible on the cellular surface (arrow).

Ryc. 4. Hodowla glejowa 25-dniowa. Widoczna różnica pomiędzy jądrami astrocytów i oligodendrocytów. Bł. toluid. Pow. 100 X.

Fig. 4. A 25-day glial culture, Marked difference between astrocytic and oligodendroglial nuclei. Toluid. blue. X 400.

Ryc. 5. Komórka oligodendrogleju z hodowli 25-dniowej z widocznymi strukturami typu lizosomów.

Fig. 5. Oligodendroglial cell from 25-day culture with visible lysosome-like structures.

Ryc. 6. Fragment komórki glejowej typu astrocyta z hodowli 25-dniowej. Widoczne bardzo liczne mitochondria oraz struktury lizosomalne.

Fig. 6. Glial cell fragment from 25-day culture. Astrocyte type. Numerous mitochondria and lysosome-like structures.

Ryc. 7. Fragment komórki glejowej z hodowli 25-dniowej z widocznymi pęczkami gliofibryli.

Fig. 7. Glial cell fragment from 25-day culture with visible gliofibrillar bundles.

Ryc. 8. Fragment komórki glejowej z hodowli 25-dniowej z bardzo delikatnymi, nieregularnie przebiegającymi gliofibrylami.

Fig. 8. Glial cell fragment from 25-day culture with very delicate, irregularly arranged gliofibrills.

Ryc. 9. Wyraźne widoczne, o regularnym przebiegu gliofibryle w cytoplazmie komórki glejowej w hodowli 25-dniowej.

Fig. 9. Well-discernible gliofibrills of regular arrangement in glial cell cytoplasm from 25-day culture.

Ryc. 10. Fragment komórki glejowej z hodowli 6-tygod. z zaznaczonymi cechami zwyrodnienia. W jądrze widoczne rozrzedzenie i zanik chromatyny. W cytoplazmie liczne mitochondria okrągłe z przejaśnieniami w obrębie macierzy i z nieregularnymi, porożowanymi grzebieniami. Pojedyncze struktury typu dense bodies.

Fig. 10. Glial cell fragment from 6-week culture with marked degenerative features. Dispersion and disappearance of chromatin in nucleus. Numerous round shaped mitochondria with intense spots within the mitochondrial matrix and few crests. Single structures of dense bodies type.

Ryc. 11. Fragment komórki mikrogleju z hodowli 6-tygodn.

Fig. 11. Microglial cell fragment from 6-week culture.

Ryc. 12. Hodowla 7-dniowa z odczynem na dehydrogenazę bursztynianową. Brak wyraźnego zróżnicowania komórek. Wypustki na ogół nie wykazują aktywności enzymatycznej. Pow. 200 X.

Fig. 12. A 7-day culture with succinic dehydrogenase reaction. No discernable cellular differentiation. Processes usually show no enzymatic activity. X 200.

Ryc. 13. Hodowla 25-dniowa z odczynem na dehydrogenazę mleczanową. Zaznaczona widoczna różnica w aktywności enzymatycznej oligodendrocytów i astrocytów. Pow. 400 ×.

Fig. 13. A 25-day culture with lactate dehydrogenase reaction. Marked difference between enzymatic activities of oligodendrocytes and astrocytes. × 400.

Ryc. 14. Hodowla 6-tygodn. z odczynem na dehydrogenazę glutaminową. Ziarna formazanowe wyraźnie oznaczają przebieg wypustek glejowych. Pow. 400 ×.

Fig. 14. A 6-week culture with glutamate dehydrogenase reaction. Formosan grains distinctly mark the route of glial processes. × 400.

Ryc. 15. Mitochondria komórki glejowej w hodowli 7-dniowej z dodatnim odczynem na dehydrogenazę bursztynianową (strzałka).

Fig. 15. Glial cell mitochondria from 7-day culture with positive succinic dehydrogenase reaction (arrow).

Ryc. 16. Mitochondrium komórki glejowej z hodowli 25-dniowej z dodatnim odczynem na dehydrogenazę bursztynianową (strzałka).

Fig. 16. Glial cell mitochondrium from 25-day culture with positive succinic dehydrogenase reaction (arrow).

Ryc. 17. Mitochondrium komórki glejowej z hodowli 7-dniowej z dodatnim odczynem na dehydrogenazę mleczanową (strzałka).

Fig. 17. Glial cell mitochondrium from 7-day culture with positive lactate dehydrogenase reaction (arrow).

Ryc. 18. Mitochondrium komórki glejowej z hodowli 25-dniowej z dodatnim odczynem na dehydrogenazę mleczanową (strzałka).

Fig. 18. Glial cell mitochondrium from 25-day culture with positive lactate dehydrogenase reaction (arrow).

Ryc. 19. Hodowla 25-dniowa. Różny stopień aktywności fosfatazy kwaśnej w poszczególnych komórkach glejowych. Pow. 400 ×.

Fig. 19. A 25-day culture. Acid phosphatase activity varying in individual glial cells. × 400.

Ryc. 20. Odczyn na fosfatazę kwaśną w komórce glejowej z hodowli 25-dniowej widoczny w lizosomach i miejscami poza nimi w cytoplazmie.

Fig. 20. Acid phosphatase reaction in glial cell from 25-day culture visible in lysosomes and in some regions of cytoplasm.

Ryc. 21. Hodowla 7-dniowa z wyraźnym odczynem na ATP-azę błonową w komórkach glejowych. Pow. 400 ×.

Fig. 21. A 7-day culture with marked membrane ATP-ase reaction in glial cells. × 400.

Ryc. 22. Odczyn na ATP-azę w komórce z hodowli 7-dniowej widoczny szczególnie wyraźnie w błonie komórkowej gleju.

Fig. 22. ATP-ase reaction in a glial cell from 7-day culture, strongly pronounced in the glial cell membrane.

MARIA OSTENDA

BADANIA HISTOCHEMICZNE
KOMÓREK GLEJOWYCH NAPROMIENIANYCH *IN VITRO*
DAWKĄ 5000 R PROMIENI GAMMA *Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Dotychczasowe badania nad zmianami popromiennymi tkanki nerwowej dotyczyły głównie komórek nerwowych (Trowell 1965, Masurovsky 1967, Pomerat i wsp. 1964, Estable-Puig R. F., Estable-Puig J. F. 1971, Roizin, Schadé 1968). Mniej badań poświęcono zmianom w gleju, jakkolwiek mogą one okazać się istotne ze względu na wyższą promienio-czułość komórek glejowych i ich ścisły związek z metabolizmem neuro-nów. Komórki nerwowe odznaczają się wysoką promienioodpornością (Trowell 1965, Pomerat i wsp. 1964) zwłaszcza w warunkach hodowli pozaustrojowej, wyłączającej tkankę między innymi spod wpływu krą-żenia. Być może zmiany popromienne w komórkach nerwowych, stwier-dzane w warunkach *in vivo* są wtórne w stosunku do zmian w układzie barierowym, w którym glej odgrywa zasadniczą rolę.

Metoda hodowli tkankowej stwarza możliwość badania reakcji popromiennej różnych elementów tkanki nerwowej, niezależnie od krążenia.

Celem obecnej pracy jest badanie reakcji komórek glejowych na jed-norazowe napromienienie *in vitro*, w różnych odstępach czasu po ekspozycji.

MATERIAŁ I METODY

Badania były prowadzone na 265 hodowlach tkankowych pochodzą-cych z mózdków noworodków szczurzych, szczepu Wistar. Opis stoso-wanej techniki hodowli podano w pracy Kraśnickiej i Mossakowskiego (1965). Hodowle tkankowe w 7 dniu *in vitro* zostały poddane działaniu promieni gamma. Źródłem napromieniania była bomba kobaltowa typu

* Praca wykonana częściowo w oparciu o pomoc finansową PL 480 US Public Health Service. Agreement 003-04-1.

„Eldorado A”, dawka wynosiła 5000r w jednorazowej ekspozycji. Hodowle tkankowe badano metodami histochemicznymi w następujących okresach czasu po ekspozycji: 3 godz., 6 godz., 12 godz., 24 godz., 48 godz., 72 godz. i 167 godz. (7 dni).

W hodowlach badano aktywność następujących enzymów: dehydrogenaza bursztynianowa i mleczanowa (SDH, LDH), fosfataza kwaśna (AcP) czynna przy pH 7,2, oraz adenzynotrójfosfataza błonowa (ATP) wg Barki i Andersona (1965). Odczyn PAS badano wg Mowry (Pearse 1960) z podwójną kontrolą trawieniem diastazą oraz blokowaniem dime-donem. Dla oceny obrazu morfologicznego komórek glejowych oraz obliczenia mitoz wykonano barwienie błękitem toluidyny wg standardowej metody (Lillie 1965).

Hodowle kontrolne w liczbie 260 były badane w tych samych okresach życia *in vitro*, tymi samymi metodami, bez uprzedniego napromieniania.

Tabela 1 podaje zestawienie badanych hodowli i stosowanych metod.

Tabela 1. Badania histochemiczne hodowli komórek glejowych napromienionych jednorazową dawką 5000 r promieni gamma
Table 1. Histochemical examinations of the glial tissue culture irradiated with one-time dose of 5000 r gamma rays

Godz. Hrs	SDH	LDH	AcP	ATP-aza	PAS	Błęk. toluid. Toluid. blue	Razem Total
3	5	6	6		21	2	40
6	3	3	4		10	2	22
12	4	4	6		11	2	27
24	14	13	19	21	20	6	93
48	3	1	2		9	3	18
72	6	5	4		16	5	36
168	4	4	4		15	2	29
	39	36	45	21	102	22	265

WYNIKI

Histochemiczne odczyny w komórkach glejowych w okresie między 7—14 dniem hodowli

W badanym okresie obok komórek prawidłowych występowała pewna ilość komórek ze zmianami wstecznymi, przeważnie na obwodzie hodowli. Ilość tych komórek zwiększała się z wiekiem. W strefie wzrostu

występowały komórki w różnych stadiach podziałów mitotycznych. Częstość ich występowania wynosiła 20—30% populacji komórkowej.

Aktywność enzymów SDH i LDH była podobnie zlokalizowana. Na ogół odczyn histochemiczny oligodendrogleju był żywszy, produkty końcowe reakcji wypełniały zarówno skąpy rąbek cytoplazmy jak i wypustki. W astrocytach ziarna formazanu występowały mniej licznie, były rozsiane w cytoplazmie, czasem gęściej zgromadzone dokoła jądra tworzyły na nim rodzaj rąbka. Wypustki astrocytów były wypełnione ziarnistościami formazanu nawet w odcinkach znacznie oddalonych od perikarionu. W komórkach ze zmianami wstecznymi nie spostrzegano obniżenia reakcji badanych enzymów.

Ziarna wyznaczające miejsca aktywności enzymu AcP były zlokalizowane w cytoplazmie komórkowej, wykazując zagęszczenie w sąsiedztwie błony komórkowej i jądrowej. Intensywność odczynu znacznie się różniła w poszczególnych komórkach. Oligodendroglej na ogół wykazywał wyższą aktywność niż astrocyty. W komórkach wykazujących cechy zwyrodnienia aktywność tego enzymu wzrastała.

Aktywność ATP-azy błonowej w badanych komórkach była dość niska, zlokalizowana w ich cytoplazmie, przede wszystkim na błonach komórkowych.

Ziarnistości o dodatnim odczynie PAS występowały jedynie w cytoplazmie niektórych komórek zmienionych wstecznie. Częściowo trawiła je diastaza. Po zablokowaniu dimedonem znikwały całkowicie.

Ziarna glikogenu występowały wyłącznie w eksplantacie. W strefie wzrostu glikogenu nie stwierdzono.

Histochemiczne odczyny w komórkach glejowych napromienianych promieniami gamma w dawce 5000 r w 7-dniowej hodowli

Czas od ekspozycji 3 godz.: Aktywność enzymów oksydoredukcyjnych była zlokalizowana w cytoplazmie komórek glejowych dość równomiernie, wykazując często zagęszczenia okołojądrowe, podobnie jak w hodowlach nie napromienianych, obserwowanych w tym samym okresie. Natężenie aktywności fosfatazy kwasnej było nierównomierne w poszczególnych komórkach. Nierównomierność ta wydawała się wyższa niż w hodowlach nie napromienianych. W strefie wzrostu w pojedynczych komórkach, przeważnie astrocytach, pojawiały się ziarna glikogenu. Były one rozsiane nierównomiernie w cytoplazmie, przeważnie okołojądrowo (ryc. 1). Pojedyncze ziarna występowały także w wypustkach (ryc. 2).

Czas po napromienianiu 6 godz.: Obraz histochemiczny nie różnił się od opisanego powyżej.

Czas po napromienianiu 12 godz.: Natężenie aktywności dehydrogenaz wykazywało wyraźne różnice w poszczególnych komórkach glejowych. Dotyczyło to przede wszystkim astrocytów. Obok komórek o wysokiej aktywności, występowały prawie całkowicie jej pozbawione (ryc. 3). W wielu komórkach występowały ziarnistości glikogenu, zlokalizowane podobnie jak w poprzednich okresach obserwacji, jednakże były one liczniejsze i obecne w większej liczbie komórek.

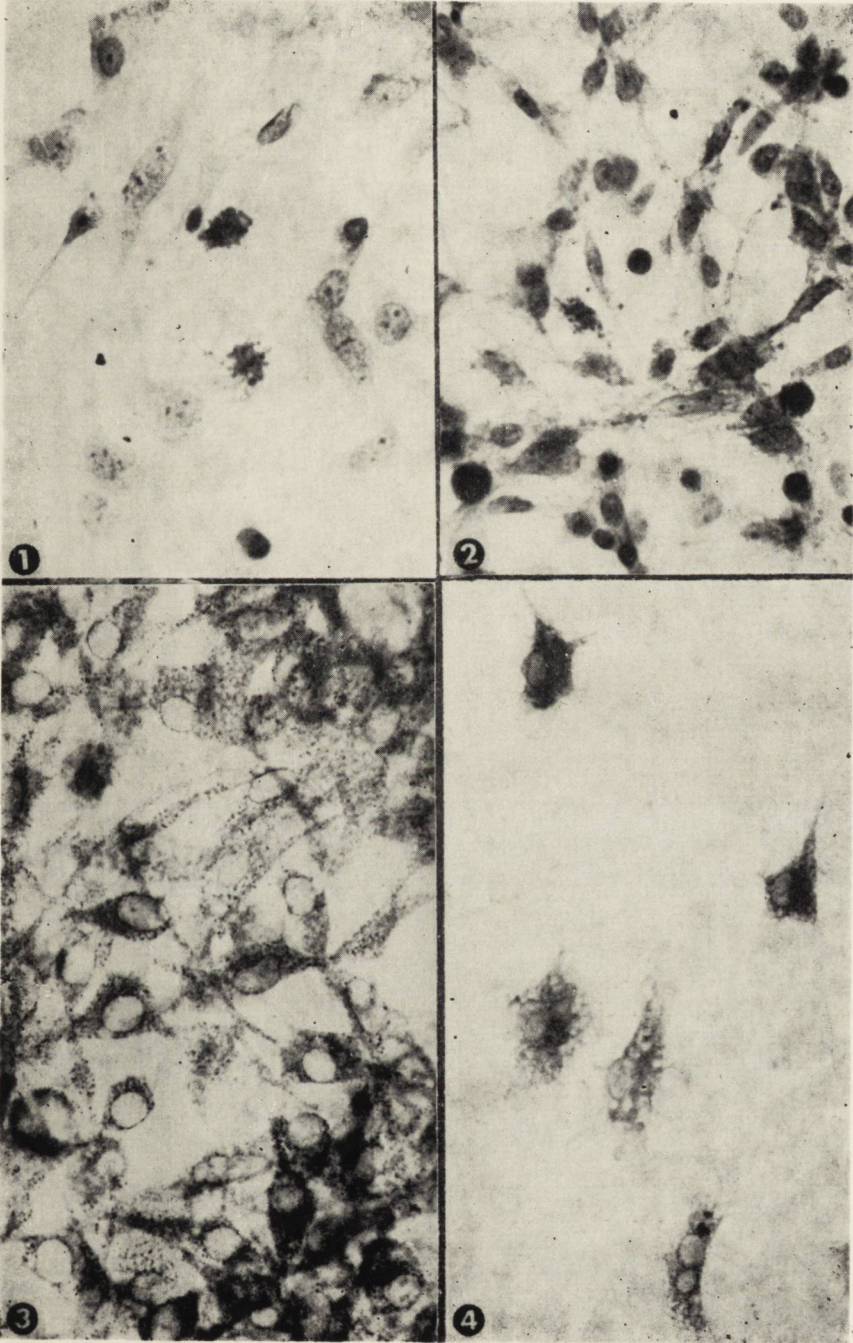
Czas po napromienianiu 24 godz.: W wielu komórkach aktywność fosfatazy kwaśnej była wybitnie podwyższona, produkty reakcji końcowej wypełniały często całą cytoplazmę (ryc. 4), a nie jak w hodowlach kontrolnych, skupiały się jedynie w okolicy błon komórkowych. Różnice w natężeniu aktywności dehydrogenaz w poszczególnych komórkach uległy pogłębieniu. W strefie wzrostu występowały liczne komórki prawie całkowicie pozbawione aktywności tych enzymów obok komórek o wysokiej aktywności (ryc. 5, 6). Liczba mitoz w tym okresie wynosiła zaledwie 2—4%. Pojawiały się nieprawidłowe formy podziałów mitotycznych. Ziarnistości glikogenu występowały w bardzo licznych komórkach, wypełniając gęstymi masami cytoplazmę i wypustki.

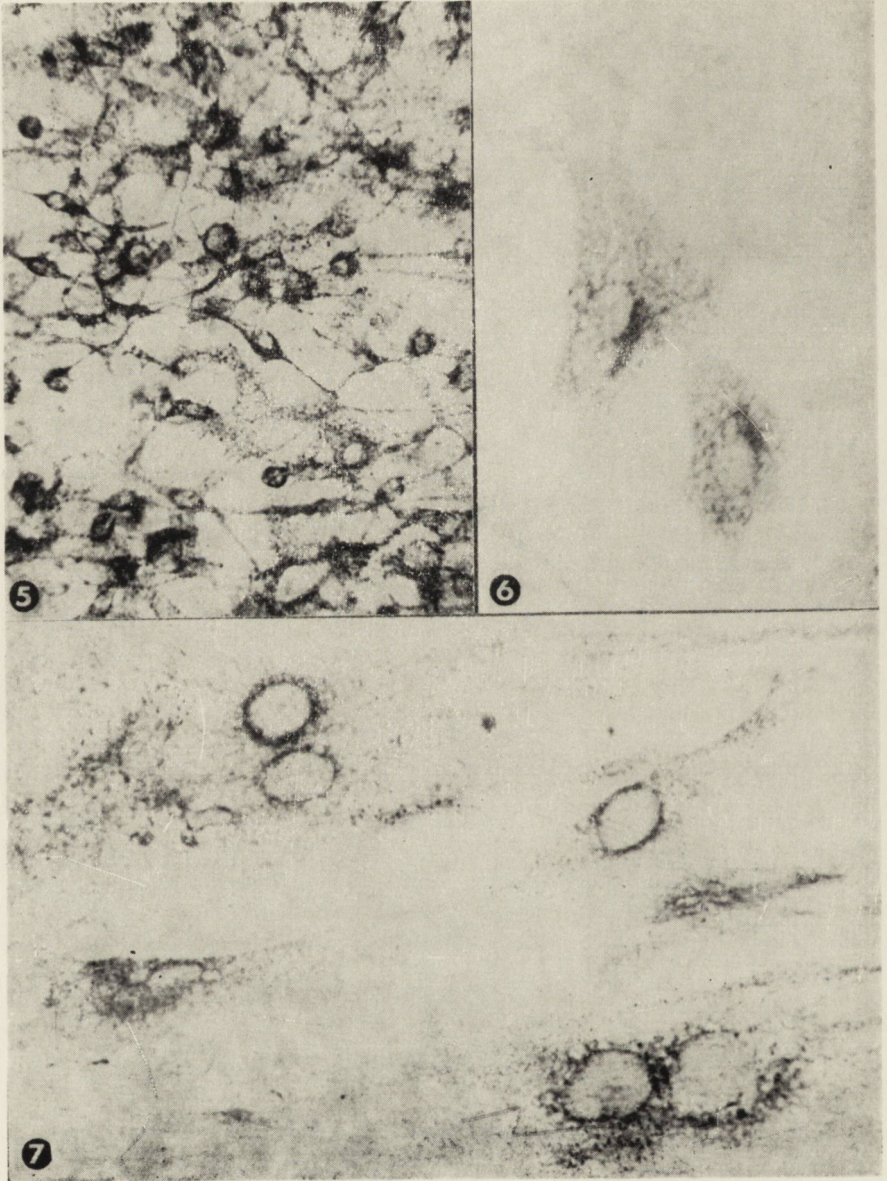
Czas po napromienianiu 48—168 godz.: Obraz histochemiczny był podobny do obserwowanego wcześniej (ryc. 7), jednakże zmniejszyła się liczba komórek z opisanymi powyżej zmianami, a za to narastała liczba komórek z objawami zwyrodnienia. W komórkach ze zmianami wstecznymi występowały ziarnistości PAS-dodatnie, blokujące się dimedonem, podobnie jak w hodowlach nie napromienianych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W komórkach glejowych napromienionych dawką 5000r promieni gamma w 7 dniu hodowli *in vitro* stwierdzono zmiany w lokalizacji niektórych odczynów enzymatycznych oraz pojawianie się glikogenu. Zmiany te polegały na znacznym spadku aktywności enzymów oksydo-redukcyjnych w niektórych astrocytach. Zmieniła się także lokalizacja śródkomórkowa produktów końcowych reakcji enzymatycznej. Występowało znaczne nasilenie w niektórych komórkach aktywności fosfatazy kwaśnej (czynnej w lizosomach). Obserwowano pojawianie się ziarnistości glikogenu w astrocytach, znajdujących się w strefie wzrostu, w których w hodowlach nie napromienianych glikogen nie występował.

Opisane objawy wystąpiły już w 3 godz. po ekspozycji, po czym liczba zmienionych komórek i natężenie zmian narastały stopniowo do 24 godz. W okresie 72 godz. — 7 dni zmiany histochemiczne były mniej wyraźne, pojawiła się natomiast duża liczba komórek wykazujących cechy zwyrodnienia.





Poszczególne komórki różniły się znacznie wrażliwością na czynnik uszkadzający. Zmiany dotyczyły przeważnie astrocytów. Obok komórek prawidłowych występowały komórki o różnym nasileniu zmian. Obraz ten został w pewnym stopniu uwarunkowany wyborem dawki, znacznie niższej od LD₁₀₀ określonej dla tkanki nerwowej w wysokości kilkudziesięciu tysięcy R (Trowell 1965), ale pozostającej dawką wystarczająco wysoką, aby nie powodując śmierci wywołać efekt biologiczny w tych komórkach, które odznaczają się wyższą promienioczułością.

Okres, w którym hodowle komórek glejowych zostały poddane działaniu promieni jonizujących jest uważany za okres rozpoczynającego się różnicowania hodowli tkankowej, w którym jeszcze nie rozpoczęła się mielinizacja z towarzyszącymi jej zmianami enzymatycznymi, ale aktywność enzymów oksydoredukcyjnych jest już wysoka i zróżnicowana w astrocytach i oligodendrogleju (Mossakowski i wsp. 1965, Mossakowski 1970).

W badanym materiale obserwowano zarówno spadek jak i wzrost aktywności enzymów oksydoredukcyjnych, dający w rezultacie bardzo znaczne wahania intensywności odczynu w sąsiadujących ze sobą komórkach. Zmiany te, bardziej uchwytnie w astrocytach, mogą świadczyć o zróżnicowanych zaburzeniach metabolizmu komórkowego. Wzrost aktywności enzymów zlokalizowanych w mitochondriach może być pozorny, związany z uszkodzeniem ich błon w wyniku napromieniania (Masurovsky i wsp. 1967). Natomiast spadek aktywności enzymów obserwowany w astrocytach równocześnie z wzrostem aktywności fosforylasy kwaśnej może świadczyć o przesunięciach w metabolizmie po napromienianiu, co stwierdzał Shimizu i Hamuro (1958) po napromienianiu tkanki nerwowej *in vivo*.

W obserwowanym przez nas materiale glikogen pojawiał się w licznych astrocytach. Ze względów technicznych trudno odpowiedzieć, czy w tych samych astrocytach była obniżona aktywność enzymów oksydoredukcyjnych, za czym przemawiałoby równoległe narastanie obu zmian i znikanie ich w tym samym czasie. Bez badań ultrastrukturalnych, które pozwoliłyby na porównanie występowania złogów glikogenu z ewentualnymi zmianami w mitochondriach astrocytów — zagadnienie to pozostaje otwarte.

Pojawienie się glikogenu w tkance mózgowej *in situ* było niejednokrotnie opisywane w różnych stanach patologicznych, również w wyniku działania promieni jonizujących (Miquel, Haymaker 1965, Estable-Puig R. F., Estable-Puig J. F. 1971, Klatzo i wsp. 1970, Shimizu, Hamuro 1958). Mechanizmy powodujące nagromadzenie się wielocukru pozostają nadal niejasne. Miquel i Haymaker (1965), rozważając pojawianie się glikogenu w gleju uszkodzonej napromienianiem okolicy, pro-

ponują trzy hipotezy wyjaśniające mechanizm tego zjawiska. 1) wchłanianie glukozy z rozpadłych komórek i magazynowanie jej w postaci glikogenu, 2) zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg, 3) zahamowanie glikozy beztlenowej lub tlenowej neuronów i gleju. Shimizu i Hamuro (1958), stwierdzając obok wzmożenia aktywności fosforylaz równoczesny spadek aktywności enzymów oksydoredukcyjnych w astrocytach w uszkodzonej okolicy mózgu, uważali pojawianie się glikogenu za przejaw spadku utleniania na korzyść glikolizy beztlenowej.

Mechanizm gromadzenia się glikogenu w napromienianej hodowli tkankowej może różnić się od występującego *in situ*, nie występują tu bowiem masywne zmiany martwicze, mogące stanowić źródło glukozy akumulującej się w formie glikogenu, zaś procesy transportu glukozy w hodowli tkankowej, gdzie nie ma neuronów ani naczyń krwionośnych muszą siłą rzeczy przebiegać odmiennie. Akumulacja glikogenu w astrocytach napromienianych *in vitro* nie byłaby więc wyrazem zahamowania transportu węglowodanów, świadcząc o tym że przemiany glukozy zachodzą wewnątrz astrocytów niezależnie od ich funkcji odżywczej i transportowej.

Poza zmianami w metabolizmie węglowodanowym w napromienianej hodowli mogły wystąpić zmiany przepuszczalności błon komórkowych. Świadczyłaby o tym wzmożona aktywność ATP na błonach komórkowych. Zmiany te, w odróżnieniu od gromadzenia się glikogenu i spadku aktywności dehydrogenaz występują zarówno w astrocytach jak i oligodendrogleju. Wzmożenie aktywności enzymów lizosomalnych zwykle poprzedza zmiany martwicze (Lierse, Franke 1970). Różnice dostrzeżone w oddziaływaniu astrocytów i oligodendrogleju na napromienianie mogą być uwarunkowane odmiennością ich funkcji metabolicznych w tkance nerwowej (Friede 1954).

М. Остенда

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ОБЛУЧЕННЫХ ДОЗОЙ 5000 Р ГАММА ЛУЧЕЙ

Резюме

В глиальных клетках, облученных *in vitro* однократной дозой 5000 р гамма лучей наблюдали: 1) падение активности SDH и LDH а также наличие во многих астроцитах отложений гликогена, 2) усиление кислой фосфатазы во многих клетках, как в астроцитах так и в олигодендроглии, 3) в более поздних периодах наблюдений (72 часа — 7 дней) увеличение количества дегенеративно измененных клеток. Это говорит за вероятным снижением окисли-

тельных процессов в пользу анаэробного гликолиза в клетках с большей радиочувствительностью. Примененная доза ионизирующих лучей может вести к тяжелому повреждению клетки, которому предшествовало усиление активности лизосомальных энзимов и после чего — дегенеративные изменения.

M. Ostenda

HISTOCHEMICAL STUDIES ON GLIAL CELLS IRRADIATED
IN VITRO WITH A 5000R DOSE OF GAMMA RAYS

Summary

The following events were observed in glial cells irradiated *in vitro* with one time 5000r dose of gamma rays: 1) drop in LDH and SDH activity and in numerous astrocytes — presence of glycogen deposits, 2) in numerous cells, both in astrocytes and oligodendroglia enhancement of acid phosphatase activity, 3) in the later periods after irradiation (72 hrs — 7 days) an increase of the number of cells with degenerative changes. These events are indicative of a decreased activity of oxidative processes and enhancement of anaerobic glycolysis in the cells of a higher sensitivity to irradiation. The applied dose may lead to severe damages of the cells, preceded by an increase in activity of lysosomal enzymes and thereafter by degenerative changes.

PIŚMIENICTWO

1. Barka T., Anderson P.: Histochemistry. Theory. Practice. Bibliography, Harper and Rev. New York 1965.
2. Estable-Puig R. F. de, Estable-Puig J. F.: Cell response of the olfactory bulb to ionizing radiation injury. *Acta Neuropath.*, 1971, 17, 287—301.
3. Friede R.: Die Bedeutung der Glia für den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel. *Z. f. Allg. Path. Anat.* 1954, 92, 65—75.
4. Friede R. L.: Enzyme histochemistry of neuroglia. *Progress in Brain Res. Biology of Neuroglia.* 1965, 15, 35—47. Elsevier, Amsterdam.
5. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. *Proceed of the VI Intern. Congr. Neuropath.* Paris 1970, 351—365.
6. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
7. Lierse W., Franke H. D.: Histochemical and ultrastructural events in radiation injury of the brain. *Proceed. of VI Intern. Congr. Neuropath.*, Paris 1970, 228—236.
8. Lillie R. D.: *Histopathologic technic and practical histochemistry*, Mc Graw Hill 1965.
9. Masurovsky E., Bunge M. B., Bunge R. P.: Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following X-irradiation *in vitro*. I. Changes in neurons and satellite cells. *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 467—496.
10. Masurovsky E. B., Bunge M. B., Bunge R.: Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following X-irradiation *in vitro*. II. Changes in Schwann cells, myelin sheaths and nerve fibres. *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 497—518.

11. Miquel J., Haymaker W.: Astroglia reactions to ionizing radiation, with emphasis on glycogen accumulation. *Progr. in Brain Res. Biology of Neuroglia*, 1965, 15, 89—114.
12. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Aktywność enzymów oksydacyjnych w tkance glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 245—258.
13. Mossakowski M. J.: Histochemistry of pathological glia. *Proceed. VI Intern. Congr. Neuropath.*, Paris 1970, 366—373.
14. Pomerat C. M., Rounds D. E., Rainborn C. W., Pollard T. D.: Observations on newborn rat dorsal root ganglia *in vitro* following gamma irradiation. Response of the nervous system to ionizing radiation. II Symposium, Los Angeles 1964. Ed. Haley, Snider 1964, 175—200.
15. Pearse A. E. G.: *Histochemistry*. Churchill (London), 1960.
16. Roizin L., Schadé J. P.: Irradiation of cerebral cortex. *Brain Res.*, 1968, 7, 28—109.
17. Shimizu N., Hamuro Y.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wounds. *Nature*, 1958, 181, 781—782.
18. Trowell O. A.: Tissue culture in radiology. In: *Cells and Tissue Culture*. Ed. Willmer. Acad. Press, London 1965, vol. 3.

Adres autorki: Zespół Neuropatologii CMD i K, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 3 godz. W astrocytach występują ziarna glikogenu wypełniające gęstymi masami cytoplazmę, często przesłaniając jądro komórkowe. Metoda: PAS dimedon. Pow. 400 \times .

Fig. 1. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 3 hrs. Glycogen grains are found in astrocytes, filling their cytoplasm with dense masses and frequently covering the cell nucleus. PAS dimedon reaction. \times 400.

Ryc. 2. Komórki glejowe napromienione dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 3 godz. W polu widzenia znajdują się liczne astrocyty, karioplazma niektórych wypełniona jest ziarnistościami glikogenu, widocznymi również w niektórych wypustkach. Metoda: PAS dimedon. Pow. 400 \times .

Fig. 2. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 3 hrs. Numerous astrocytes are present in the range of view, karioplasm of some of them being filled with glycogen grains, which are to be observed also in some processes. PAS dimedon reaction. \times 400.

Ryc. 3. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 12 godz. Intensywność odczynu LDH różni się w poszczególnych komórkach. Występuje duża liczba komórek ze znacznie obniżoną aktywnością odczynu, w niektórych aktywność enzymu tworzy jedynie wąski rąbek na błonie jądrowej. Metoda: LDH. Pow. 400 \times .

Fig. 3. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 12 hrs. Intensity of LDH reaction differs in individual cells. A great number of cells exhibit a markedly decreased LDH activity, in some of them it forms nothing but a narrow edge on the nuclear membrane. LDH method. \times 400.

Ryc. 4. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 24 godz. Aktywność fosfatazy kwaśnej jest dodatnia we wszystkich komórkach, w dwóch jest wysoka, wypełnia całą cytoplazmę. Metoda: AcP. Pow. 400 \times .

Fig. 4. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 24 hrs. Acid phosphatase activity positive in all of the cells, in two of them high, filling the whole cytoplasm. AcP method. \times 400.

Ryc. 5. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 24 godz. Intensywność odczynu SDH znacznie się różni w poszczególnych komórkach. Pow. 200 \times .

Fig. 5. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 24 hrs. Intensity of SDH reaction markedly differs in individual cells. \times 200.

Ryc. 6. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 24 godz. Widoczne dwa zmienione astrocyty z niskim odczynem SDH w cytoplazmie, zgromadzone produkty końcowe reakcji w postaci rąbka okołojądrowego. Metoda SDH. Pow. 400 \times .

Fig. 6. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 24 hrs. In the range of view, two changed astrocytes are visible with a low SDH reaction in the cytoplasm, accumulated in the form of a perinuclear edge. SDH method. \times 400.

Ryc. 7. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką 5000 r promieni gamma. Czas po ekspozycji: 48 godz. Odczyn LDH umiarkowanie intensywny w cytoplazmie, gromadzi się na błonie jądrowej. Metoda: LDH. Pow. 400 \times .

Fig. 7. Glial cells irradiated *in vitro* with a 5000 r dose of gamma rays. Time after exposition: 48 hrs. The LDH reaction moderate in cytoplasm, accumulates on the nuclear membrane. LDH method. \times 400.

IRMINA B. ZELMAN

ZMIANY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM SZCZURA PO DOMÓZGOWYM WSTRZYKNIĘCIU OUABAINY *

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M.J. Mossakowski

Ouabaina (strofantyna G), glikozyd o znanym działaniu nasercowym wykazuje zdolność blokowania ATP-azy błon komórkowych, odgrywającej podstawową rolę w aktywnym transporcie sodu i potasu. Zablockowanie ATP-azy prowadzi do zaburzenia funkcjonowania pompy sodowo-potasowej i zwiększenia zawartości wody w komórkach i tkankach (Schatzmann 1953, Ginn i wsp. 1968).

Obserwacje Schatzmanna (1953) wykazały, że glikozydy nasercowe działają jako inhibitory pompy sodowo-potasowej tylko wówczas, gdy znajdują się w płynie okołokomórkowym. Wprowadzenie nawet dużych ilości ouabainy do włókna nerwowego kraba pozostawało bez wpływu na aktywny transport.

Zablokowanie wrażliwej na ouabainę ATP-azy prowadzi do wydalenia potasu i zatrzymywania sodu, chloru i wody w komórce, powoduje stopniowy wzrost jej objętości, aż do pęknięcia błony komórkowej (Ginn i wsp. 1968).

Badania doświadczalne wykazały, że domózgowe wstrzyknięcie ouabainy powoduje u szczurów i świnek morskich obrzęk astrogleju i zwyrodnienie gąbczaste w strukturach szarych, przede wszystkim w korze (Bignami, Palladini 1966a, 1966b). Sugestie, że zgąbczenie substancji szarej jest następstwem zaburzenia przepuszczalności błon komórkowych astrogleju potwierdziły badania ultrastrukturalne (Carnog i wsp. 1968) oraz doświadczenia prowadzone na tkance glejowej hodowanej *in vitro* (Renkawek i wsp. 1970). Ouabaina oddziałuje pierwotnie na astrocyty, których uszkodzenie decyduje o zespole zmian morfologicznych w mózgu i prowadzi do wtórnych uszkodzeń pozostałych elementów tkanki nerwowej.

* Praca wykonana częściowo przy pomocy finansowej PL 480 US Public Health Service. Agreement 005-04-1.

Częstość występowania i znaczenie zwyrodnienia gąbczastego w patologii ośrodkowego układu nerwowego (Seitelberger 1965, Gonatas 1970) oraz udział astrocytów w jego powstawaniu, a także stosunkowo skąpe opisy zmian morfologicznych w doświadczalnej encefalopatii ouabainowej skłoniły nas do podjęcia dalszych badań w tym zakresie.

Bezpośrednim celem pracy była analiza morfologiczna zmian w mózgu szczura po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy w zależności od rodzaju uszkodzonej struktury anatomicznej i czasu przeżycia zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach, wagi 150—180 g.

W lekkiej narkozie eterowej zwierzętom przecinano skórę w linii środkowej czaszki, przez kość i oponę twardą wprowadzano do mózgu cienką igłę i wstrzykiwano roztwór ouabainy w soli fizjologicznej w objętości 0,01—0,02 ml. Miejsce wkłucia znajdowało się nieco ku tyłowi od szwu poprzecznego i bocznie od linii środkowej. Dawka ouabainy zawartej w roztworze wynosiła 0,005—0,03 mg. Zwierzęta kontrolne otrzymywały w takich samych warunkach odpowiednią ilość fizjologicznego roztworu chlorku sodu. Po zabiegu skórę zeszywano, lub zakładano klamferki.

Szczury zabijano w grupach, obejmujących zwierzęta doświadczalne i kontrolne, w czasie 2, 4, 6, 24, 48 godzin i 5 dni po wstrzyknięciu ouabainy, stosując w narkozie eterowej przezsercową perfuzję 4% roztworem formaliny w soli fizjologicznej.

Mózg wraz z pniem i mózdzkiem po wyjęciu z jamy czaszki pozostawiano w 4% formalinie przez 24 godziny, po czym krajano na bloczki grubości 2—3 mm, które przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny. Preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, wg metody Heidenhaina, Klüvera i Holmesa.

W grupach doświadczalnych z przeżyciem do 24 godzin bezpośrednio przed iniekcją domózgową ouabainy, 2 szczury z każdej grupy otrzymywały dootrzewnowo po 2 ml 1% roztworu błękitu trypanu. Zwierzęta te uśmiercano przez przecięcie serca i skrwawienie.

WYNIKI BADAŃ

Obserwacje kliniczne

Bezpośrednio po wstrzyknięciu ouabainy obserwowano u szczurów przyspieszenie tętna i oddechu. W ciągu kilku minut występowało u nich

wybitne pobudzenie ruchowe, obserwowano również prężenia i drobno-faliste drżenia mięśniowe. Po 10—30 minutach pojawiały się napady drgawek toniczno-klonicznych, które występowały początkowo w bardzo krótkich odstępach czasu, potem coraz rzadziej utrzymując się do 2—3 godzin. W okresie między napadami zwierzęta były w stanie śpiączki i bardzo często ginęły z objawami niewydolności krążeniowo-oddechowej. Po przeżyciu krytycznego okresu 4 godzin stan szczurów stopniowo poprawiał się i po 24 godzinach były one tylko mniej ruchliwe od zwierząt kontrolnych.

Ponieważ tak nasilone objawy występowały u szczurów, którym wstrzyknięto powyżej 0,01 mg ouabainy, u większości zwierząt starano się nie przekraczać tej dawki celem uniknięcia serii napadów drgawkowych mogących wpływać modyfikująco na obraz morfologiczny ośrodkowego układu nerwowego.

U szczurów, które otrzymały mniejsze dawki ouabainy, po wstrzyknięciu domózgowym występował jedynie trwający około 1—2 godzin okres pobudzenia ruchowego, któremu towarzyszyły pojedyncze napady drgawek toniczno-klonicznych oraz prężenia i mioklonie. Obserwowano znaczne różnice w zachowaniu się szczurów po wstrzyknięciu teoretycznie wyliczonej, takiej samej dawki glikozydu. Można to tłumaczyć niejednakową ilością ouabainy, która dostała się do mózgu. Przymuszczałnie pewna część roztworu wypływała z powrotem po cofnięciu igły. Nie można było również wyłączyć osobniczych różnic wrażliwości na działanie glikozydu.

Szczury, którym wstrzyknięto domózgowo roztwór soli fizjologicznej, po wyjściu z narkozy, nie wykazywały żadnych zaburzeń.

Obserwacje morfologiczne

Obraz makroskopowy. U zwierząt z krótkim okresem przeżycia (2—6 godz.) obserwowano obrzęk mózgu z wygładzeniem jego powierzchni, zwężeniem lub całkowitym zaciśnięciem układu komorowego. Był on szczególnie nasilony w grupie szczurów, które padły samostnie. W tych przypadkach stwierdzano ponadto cechy znacznego przekrwienia mózgu. U szczurów, które przeżyły okres 24 godzin lub dłuższy oraz u zwierząt kontrolnych nie stwierdzono objawów, świadczących o zwiększonej objętości mózgu. Na przekrojach poprzecznych widoczny był kanał wkłucia i w jego bezpośrednim sąsiedztwie drobne wynaczynienia krwi.

Obraz mikroskopowy. U szczurów, które przeżyły 2 godziny po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy oraz u zwierząt, które padły

już po 1 godzinie stwierdzano uogólnione zmiany w strukturach szarych mózgu w postaci obrzmienia jąder astrogleju oraz poszerzenia przestrzeni okołoneuronalnych i dookoła jąder astrogleju. Nie obserwowano natomiast okołonaczyniowego rozluźnienia utkania tkanki, ani powiększenia przestrzeni wokół kapilarów i naczyń żylnych. Oligodendrocyty, mikroglej i elementy ścian naczyniowych były niezmienione. Podobnie neurocyty nie wykazywały cech uszkodzenia, czasami jedynie barwiły się bardziej błado w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych. Osłonki mielinowe i włókna nerwowe w istocie białej były prawidłowe. Zmiany w strukturach szarych były szczególnie nasilone u szczurów, które padły spotanicznie oraz u szczurów, które przeżyły mimo ciężkiego zespołu zmian klinicznych. W mniejszym natężeniu stwierdzano je u szczurów, u których występowało jedynie pobudzenie ruchowe, mioklonie i pojedyncze napady drgawek uogólnionych.

Rozluźnienie struktury neuropilu stwierdzano przede wszystkim w I warstwie kory mózgu, na wypukłej powierzchni półkul, wokół wodociągu i komory III (ryc. 1) oraz pod dnem komory IV. Rozrzedzenia neuropilu w mózdzku ograniczały się najczęściej do warstwy drobnowej i warstwy komórek Purkinjego, niekiedy jednak obejmowały one całą szerokość kory. Ten typ zmian obserwowano w płacikach mózdzku, sąsiadujących bezpośrednio z komorą IV. Identyczne zmiany występowały również w innych strukturach szarych, znajdujących się bądź to w pobliżu miejsca wkłucia, albo w bezpośrednim sąsiedztwie przestrzeni płynowych.

W tym samym czasie stwierdzano również w strukturach szarych ogniska o charakterystycznym obrazie gąbczastego zwyrodnienia tkanki. Były one zlokalizowane zarówno w bezpośrednim sąsiedztwie kanału wkłucia w korze, jak i w strukturach położonych daleko od miejsca iniekcji — w zakręcie zębatym, w zawoju hipokampa, w sąsiedztwie komory przedniej (ryc. 2). Zgąbczenia nie przekraczały granicy struktur szarych i były zwykle ostro odgraniczone od niezmienionej tkanki. W ich obrębie stwierdzano obecność wodniczek wokół jąder astrogleju (ryc. 3), zwykle jednak nawet w powiększeniach immersyjnych trudno było ustalić, czy są one zlokalizowane wewnątrz, czy pozakomórkowo. W polach z bardziej nasilonymi zmianami zlewające się wodniczki tworzyły różnej wielkości jamki, układające się często pasmowato na pograniczu z tkanką nie uszkodzoną, na granicy istoty białej, albo wzdłuż niektórych warstw kory. W polach gąbczastego zwyrodnienia występowały rozległe ubytki komórek nerwowych o różnym nasileniu. Zachowane neurocyty były obkurczone i ciemne, w niektórych z nich obecne były okołojądrowe wodniczki (ryc. 4). Podobne uszkodzenia komórek

nerwowych obserwowano w bezpośrednim sąsiedztwie zgąbczenia ze stopniowym przejściem do struktury prawidłowej tkanki. Jądra astrocytów w obrębie ognisk były zwykle również obkurczone i hyperchromatyczne oraz znacznie przerzedzone. Natomiast pęczki włókien mielinowych przechodzące bezpośrednio przez ognisko zgąbczenia, lub leżące w jego sąsiedztwie nie wykazywały cech uszkodzenia (ryc. 5).

Po upływie 6 godzin w ogniskach gąbczastego zwyrodnienia oraz w ich otoczeniu jeszcze wyraźniej manifestowały się ubytki i uszkodzenia komórkowe (ryc. 6). Obserwowano również większą tendencję do zlewania się wodniczek i tworzenia większych jamek (ryc. 7). Poza tym obraz morfologiczny nie ulegał zasadniczym zmianom w porównaniu z grupą poprzednią.

Po 24 i 48 godzinach nie stwierdzano już poszerzenia przestrzeni okołokomórkowych, ani obrazu rozlanego rozrzedzenia neuropilu występującego w grupach z krótszym przeżyciem. Natomiast ogniska gąbczastego zwyrodnienia utrzymywały się jako trwałe uszkodzenie tkanki w postaci ostro odgraniczonych pól (ryc. 8), a przy bardziej nasilonym uszkodzeniu przechodziły w dalsze stadia martwicy z obecnością makrofagów i rozpoczynającym się rozplemem śródbłonnków i młodych naczyń.

U szczurów z 5-dniowym przeżyciem ogniska takie przedstawiały obraz zaawansowanej rozbiórki makrofagowej i w pełni rozwiniętego reparacyjnego odczynu glejowo-mezodermalnego.

W grupie zwierząt kontrolnych, w sąsiedztwie kanału wkłucia, obserwowano wynacznienia śródkankowe, niewielkie ubytki i uszkodzenia komórkowe z odpowiednim do czasu przeżycia obrazem organizacji tkankowej.

U szczurów, które otrzymały dootrzewnowo błękit trypanu przed domózgowym wstrzyknięciem ouabainy, nie stwierdzono obecności barwika w tkance poza bezpośrednim sąsiedztwem urazu mechanicznego.

Topografia zmian ogniskowych była uwarunkowana tylko w pewnym stopniu miejscem wstrzyknięcia ouabainy. Przy podaniu roztworu do przestrzeni podpajęczynówkowej występowało rozległe zgąbczenie kory górnej powierzchni obu półkul. Przy wstrzyknięciu bezpośrednio do kory zmiany ogniskowe występowały zwykle na bardziej ograniczonej przestrzeni i obejmowały częściej korę przyśrodkowych powierzchni obu półkul. Wstrzyknięcie do istoty białej powodowało zwykle znacznie większe wynacznienia, porozsuwanie i porozrywanie włókien, nie stwierdzano natomiast zgąbczenia tkanki w obrębie tej struktury. Uszkodzenia tego typu były obecne natomiast w tych przypadkach w strukturach szarych, chociaż zwykle nie tak rozległe, jak w pozostałych grupach.

OMÓWIENIE

Ouabaina jako inhibitor ATP-azy błon komórkowych powoduje w mózgu szczerą dwojakiego rodzaju zmiany: odwracalny, cytotoksyczny obrzęk mózgu w strukturach szarych oraz ogniskowe zmiany gąbczaste z zanikiem elementów strukturalnych, stanowiące trwałe uszkodzenie tkanki nerwowej. Oba typy zmian spowodowane są działaniem tego samego czynnika i stanowią wykładnik uszkodzenia astrogleju. Stopień uszkodzenia astrocytów decyduje w tym przypadku o tym, czy w tkance powstaną zmiany nieodwracalne, czy też zaburzenie zostanie po pewnym okresie czasu wyrównane.

Gąbczaste zwyrodnienie tkanki występuje ogniskowo w tych strukturach szarych, lub w tych ich częściach, które były poddane działaniu najwyższych stężeń ouabainy.

Uszkodzenia zmniejszają się w miarę zwiększania odległości od miejsca wprowadzenia glikozydu. Zwraca jednak uwagę fakt strukturalnej wybiórczości powstawania zmian o charakterze zwyrodnienia gąbczastego, które nie występowało nigdy np. w istocie białej, mimo podania glikozydu do tej właśnie struktury mózgu. W tych samych jednak przypadkach zgąbczenie było obecne w odległych nawet od miejsca podania strukturach szarych. Lokalizacja zmian gąbczastych przy pełnym zaoszczędzeniu istoty białej, w konfrontacji z doświadczeniami *in vitro* (Renkawek i wsp. 1970) może wskazywać na wybiórczą wrażliwość na glikozyd astrocytów protoplazmatycznych. Zarówno stopień uszkodzenia tkanki jak i rozległość zmian były proporcjonalne do stężeń wprowadzonego roztworu, który podawano stale w tej samej objętości, żeby nie zmieniać warunków wywołujących uraz mechaniczny.

Z doświadczeń przeprowadzonych przez Ginna i wsp. (1968) *in vitro* na izolowanych nefronach poddanych działaniu roztworu zawierającego ouabainę, wiadomo, że po przekroczeniu określonego progu stężenia, cofnięcie się zmian ultrastrukturalnych, a więc i przywrócenie prawidłowej funkcji uszkodzonych elementów jest niemożliwe. Ta sama zależność występuje prawdopodobnie w tkance nerwowej.

Badania ultrastrukturalne Carnoga i wsp. (1968) nie wykazały pierwotnego uszkodzenia neuronów w przypadku encefalopatii ouabainowej przy istniejącej zaawansowanej wakuolizacji astrogleju.

Obserwacje nasze wskazują na występowanie uszkodzeń komórek nerwowych. Zmiany te należy traktować jako uszkodzenia wtórne. Pierwotnie uszkodzone astrocyty są bowiem nie tylko elementem regulującym przemianę wodno-elektrolitową neuronów, lecz spełniają równocześnie rolę transportera metabolitów do i z komórki nerwowej.

W dotychczasowych badaniach doświadczalnych udało się uzyskać zmiany gąbczaste w układzie nerwowym przy pomocy różnych związków chemicznych. Metionina sulfoksymina wywołuje również napady drgawkowe i prowadzi do powstawania ognisk zwyrodnienia gąbczastego w korze zwierząt doświadczalnych (psów i myszy), prawdopodobnie przez zahamowanie syntetazy glutaminowej (Hicks i wsp. 1958, Harris 1964).

Hydrazyd kwasu izonikotynowego, jak wykazały doświadczenia Carltona i wsp. (1965) oraz Carltona i Kreutzberga (1966) podawany drogą pokarmową jest neurotoksyczny dla młodych kaczek i powoduje gąbczaste zwyrodnienie istoty białej mózdzku. Powstawanie tych zmian jest również związane z pierwotnym uszkodzeniem astrocytów i zaburzeniem przepuszczalności ich błon komórkowych (Kreutzberg, Carlton 1967).

W doświadczalnych encefalopatiach gąbczastych na szczególne podkreślenie zasługuje wybiórcza wrażliwość pewnych struktur na działanie czynnika uszkodzającego. W encefalopatii ouabainowej np. dotknięta jest przede wszystkim kora, podczas gdy w zatruciu hydrazidem kwasu izonikotynowego w pierwszym rzędzie istota biała mózdzku. To zróżnicowanie topograficzne glejowopochodnych stanów gąbczastych znane jest również w patologii ludzkiej. Inna jest lokalizacja zmian w chorobie Jakoba-Creutzfeldta, zwyrodnieniu gąbczastym van Bogaerta-Bertranda, czy w encefalopatiach wątrobowych. W przypadkach zwyrodnienia gąbczastego tkanki nerwowej w różnych procesach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego u ludzi różnice topograficzne sugerują działanie różnego czynnika patogenetycznego na te same elementy tkankowe przy istniejących odrębnościach metabolicznych poszczególnych struktur. W patologii doświadczalnej sprawę komplikuje dodatkowo fakt istnienia gatunkowych i rodzajowych różnic metabolicznych, uniemożliwiających przeprowadzanie korelacji wzajemnych i ze spontaniczną patologią ludzką.

WNIOSKI

Z przeprowadzonych doświadczeń nasuwają się następujące wnioski:

- 1) ouabaina wstrzyknięta domózgowo powoduje u szczurów uogólniony cytotoksyczny obrzęk mózgu i zmiany gąbczaste w strukturach szarych, przy czym te ostatnie mają charakter nieodwracalnych uszkodzeń tkanki;
- 2) wysokie stężenie ouabainy, podanej w małej objętości płynu wywołuje dużo cięższe ogniskowe uszkodzenia tkanki, aż do jej pełnej martwicy;

3) występowanie stanów gąbczastych w miejscach odległych od kanału wkłucia przemawia za zróżnicowaną wrażliwością poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego na działanie glikozydu;

4) w encefalopatii ouabainowej bariera krew-mózg dla konwencjonalnych wskaźników barierowych jest nie uszkodzona, to jest nie wykazuje zwiększonej przepuszczalności;

5) martwica spowodowana działaniem ouabainy ulega tym samym procesom reparacyjnym, jak tego typu uszkodzenie wywołane działaniem innych czynników. Przemawia to za brakiem uszkodzenia mikrogleju i elementów ścian naczyńowych, biorących udział w organizacji ogniska.

И. В. Зельман

ИЗМЕНЕНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ВНУТРИМОЗГОВОЙ ИНЪЕКЦИИ СТРОФАНТИНА

Резюме

Проведен морфологический анализ изменений в центральной нервной системе, вызванных внутримозговой подачей строфантина, гликозида обладающего способностью блокировать АТФ-азу клеточных оболочек. Обращалось особенное внимание на характер и протяженность изменений в центральной нервной системе в зависимости от места подачи гликозида и времени выживаемости опытных животных.

На основании проведенных исследований автор приходит к следующим заключениям:

1. внутримозгово введенный строфантин вызывает у крыс обобщенный цитотоксический отек мозга и губчатые изменения в серых структурах, при чем эти последние имеют характер необратимых повреждений ткани;

2. высокая концентрация строфантина, введенная в малом объеме жидкости вызывает на много более тяжелые повреждения ткани, вплоть к полному некрозу;

3. наличие губчатых состояний в удаленных местах от канала инъекции говорит за дифференцированной чувствительностью отдельных структур центральной нервной системы на действие гликозида;

4. в строфантинной энцефалопатии барьер кров-мозг по отношению к обычным барьерным показателям является неповрежденный, т.е. не обнаруживает повышенной проницаемости;

5. некроз, вызванный действием строфантина подвергается тем же репаративным процессам, как повреждение этого типа вызванное действием других факторов. Это говорит за отсутствием повреждения микроглии и элементов сосудистых стенок, принимающих участие в организации очага.

I. B. Zelman

CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RAT AFTER
INTRACEREBRAL INJECTION OF OUABAIN

Summary

The present work deals with morphological analysis of changes in the central nervous system produced by intracerebral injection of ouabaine, a glycosid known to block the cell-membrane ATPase. A special attention was paid to the extensiveness and character of changes in relation to the region of ouabaine administration and time of survival.

The following conclusions were drawn:

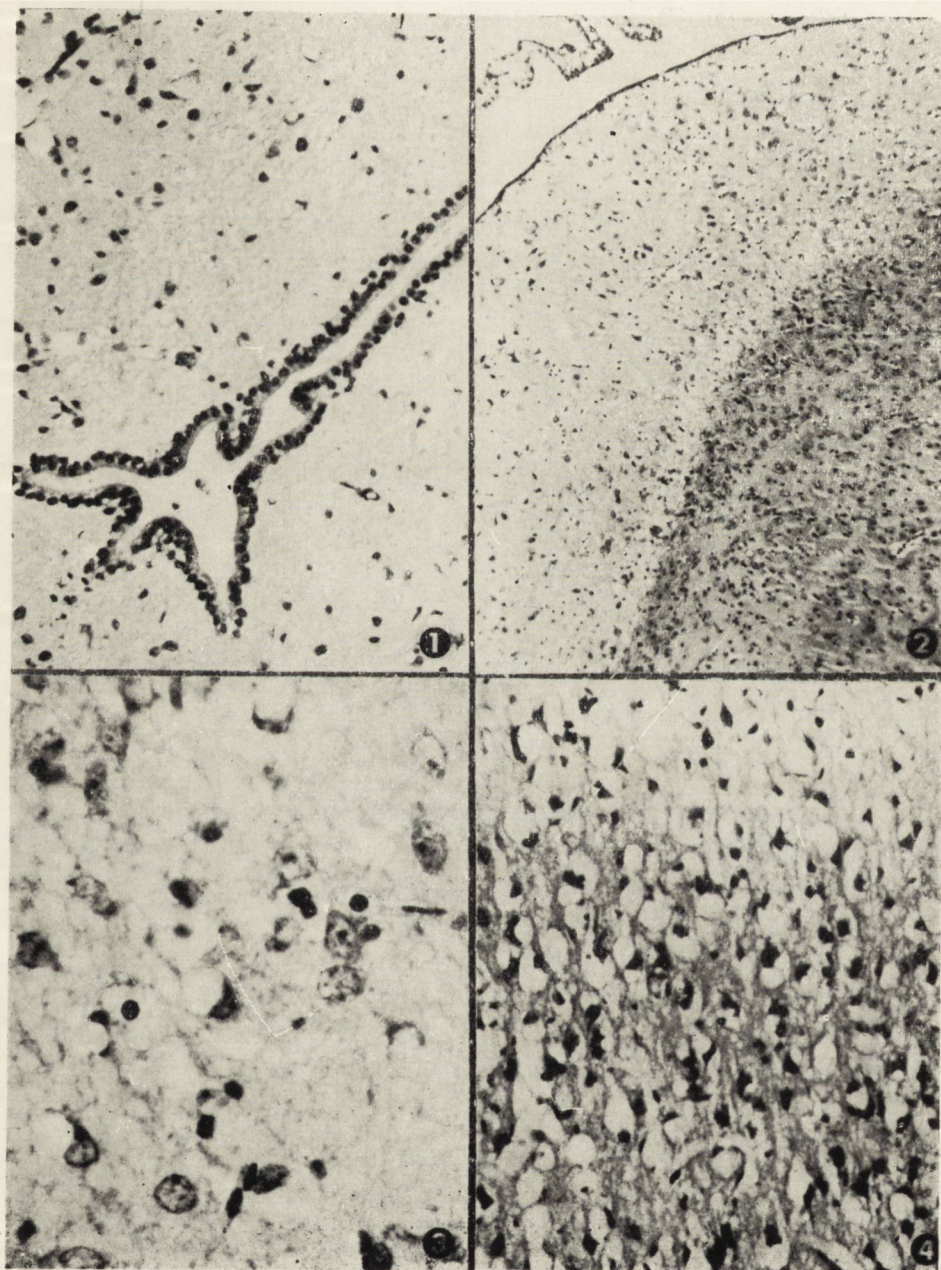
1. Intracerebrally injected ouabaine produces in rats a generalized, cytotoxic brain oedema and spongy degeneration in grey structures, the latter exhibiting features of irreversible damages.
2. Ouabaine administered in high concentrations brings much more severe damages, reaching a degree of full necrosis.
3. The appearance of spongy degenerations in the regions distant from place of injection is indicative of differential vulnerability of particular CNS structures to glycoside action.
4. The blood-brain barrier in ouabaine encephalopathy remains unimpaired for conventional indicators; it does not exhibit any increased permeability.
5. Ouabaine induced necrosis undergoes the same reparative processes as does any necrosis produced by other factors. This suggests that neither the damages of microglia nor those of vascular wall-elements taking part in the reparation process had taken place in this case.

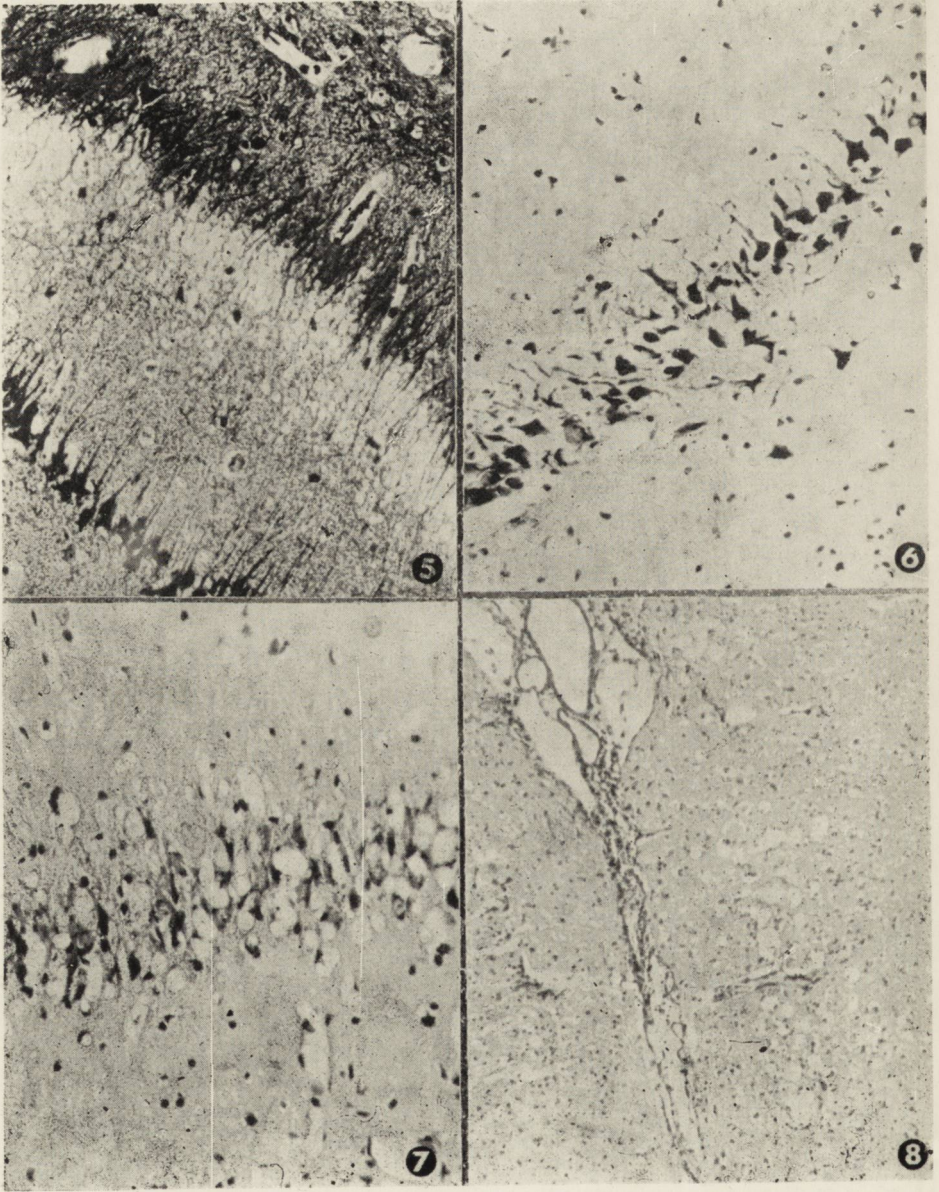
PISMIENNICTWO

1. Bignami A., Palladini E.: Experimentally produced cerebral status spongiosus and continuous pseudorhythmic electroencephalographic discharges with a membrane ATPase inhibitor in the rat. *Nature*, 1966a, 209, 413—414.
2. Bignami A., Palladini E.: Subacute spongiform encephalopathy. An experimental study. *Proc. V. Intern. Congr. Neuropath. Excerpta Med. Found, Amsterdam* 1966b.
3. Carlton W., Hunt C., Neberne P.: Neural lesions induced in ducklings by isonicotinic acid hydrazide and semicarbozide hydrochloride. *Exp. molec. Path.*, 1965, 4, 438—448.
4. Carlton W., Kreutzberg G.: Isonicotinic acid hydrazide-induced spongy degeneration of the white matter in the brains of Peking ducks. *Amer. J. Path.*, 1966, 48, 91—105.
5. Cornog J., Gonatas N., Feierman J.: Effects of intracerebral injection of ouabaine on the fine structure of rat cerebral cortex. *Amer. J. Path.*, 1967, 51, 573—590.
6. Ginn F., Shelburne J., Trump B.: Disorders of cell volume regulation. I. Effects of inhibition of plasma membrane adenosine triphosphatase with ouabain. *Amer. J. Path.*, 1968, 53, 1041—1071.

7. Gonatas N. K.: Comparative studies of status spongiosus in human and experimental toxic encephalopathies. Proc. V. Intern. Congr. Neuropath., Paris 1970, p. 49—59, Masson et Cie.
8. Harris B.: Cortical alterations due to methionine sulfoximine, Arch. Neurol. (Chicago), 1964, 11, 388—407.
9. Hicks S., Coy M. A.: Pathologic effects of antimetabolites. II. Convulsions and brain lesions caused by methionine sulfoximine and their variation with genotype. Arch. Path. (Chicago), 1958, 65, 378—387.
10. Kreuzberg G., Carlton W.: Pathogenetic mechanism of experimentally induced spongy degeneration. Acta Neuropath., 1967, 9, 175—184.
11. Renkawek K., Palladini G., Ieradi L.: Morphology of glia cultured in vitro in presence of ouabaine. Brain Res., 1970, 18, 363—367.
12. Seitelberger F.: Problem of status spongiosus. In: Brain edema. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer Publ. Comp., Vienna 1967.
13. Schatzmann J. H.: Herzglycoside als Hemmstoffe für der activen Kalium und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. Helv. physiol. Acta, 1953, 11, 346—354.

Adres autorki: Zespół Neuropatologii CMD i K, Warszawa, ul. Dworkowa 3.





PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Szczur z 2-godz. przeżyciem po wstrzyknięciu ouabainy. Rozrzedzenie utkania neuropilu w otoczeniu komory III. H-E. Pow. 160 X.

Fig. 1. Rarefaction of neuropil structure in the vicinity of the III ventricle in a rat with 2 hr survival time after ouabaine injection. H-E. X 160.

Ryc. 2. Szczur z 4-godz. przeżyciem po wstrzyknięciu ouabainy. Rozrzedzenie utkania neuropilu oraz warstwowe zwyrodnienie gąbczaste w okołokomorowej części wzgórza wzrokowego. H-E. Pow. 100 X.

Fig. 2. Rarefaction of neuropil structure involving periventricular layers of thalamus with a laminary spongy degeneration in a rat with 4hr survival time after ouabaine injection. H-E. X 100.

Ryc. 3. Zwyrodnienie wodniczkowe astrocytów w obszarze wczesnego zgąbczenia tkanki nerwowej. Szczur z 4-godz. przeżyciem. H-E. Pow. 400 X.

Fig. 3. Vacuolar degeneration of astrocytes in a focus of a recent spongy degeneration. Rat with 4 hr survival time. H-E. X 400.

Ryc. 4. Znaczne zwyrodnienie komórek nerwowych kory mózgu w miejscu odległym od wstrzyknięcia ouabainy podanej do istoty białej. 6-godz. przeżycie. H-E. Pow. 200 X.

Fig. 4. Advanced degeneration of neurons in an area distant from the injection site; glycoside being injected into white matter. 6 hr survival time. H-E. X 200.

Ryc. 5. Warstwowe zwyrodnienie gąbczaste w korze ammonalnej. Szczur z przeżyciem 6-godz. Prawidłowo zachowana mielina w sąsiedztwie zgąbczenia. Heidenhain. Pow. 140 X.

Fig. 5. Laminary spongiosis involving hippocampal lobe. Normal myelin is preserved in the direct vicinity of spongiosis. 6 hr survival time. Heidenhain met. X 140.

Ryc. 6. Zaawansowane uszkodzenie komórek nerwowych kory ammonalnej położonych w obszarze rozrzedzonej tkanki. Przypadek z podaniem glikozydu do istoty białej. Czas przeżycia 24 godz. Fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

Fig. 6. Advanced neuronal degeneration within an area of rarefied tissue in hippocampal cortex; 24 hr survival time after ouabaine injection into cerebral white matter. Cresyl violet. X 200.

Ryc. 7. Stan gąbczasty obejmujący warstwę komórek piramidowych zawoju hipokampa przy dokorowym podaniu glikozydu. Czas przeżycia 48 godz. H-E. Pow. 200 X.

Fig. 7. Spongy degeneration involving hippocampal cortex in a case of intracortical injection of glycoside; 48 hr survival time. H-E. X 200.

Ryc. 8. Warstwowy stan gąbczasty w korze mózgu u zwierzęcia z 5-dniowym przeżyciem. H-E. Pow. 100 X.

Fig. 8. Laminary degeneration in superficial cortical layer in a case with 5-day survival time. H-E. X 100.

JÓZEF KAŁUŻA, ZOFIA KOWALSKA

BADANIA NAD TRANSFORMACJĄ ŚRÓDNOWOTWOROWĄ
GUZÓW GLEJOPOCHODNYCH *IN VITRO*
W HODOWLI DŁUGOTRWALEJ I PASAŻOWANEJPracownia Patologii Neurochirurgicznej Zakładu Farmakologii PAN
Kierownik: prof. dr J. Hano

W nowotworach glejopochodnych wyróżnić można pewną grupę cechującą się tworzeniem komórek poliploidalnych w następstwie podziałów endomitotycznych lub amitotycznych. Zmianom tym towarzyszy różnaitość kształtu komórki i jej jądra, różnice stosunku plazmojądrowego oraz ilości jąder zawartych w komórce. Formy takie występują zarówno w guzach pochodzenia astrocytarnego jak i oligodendroglejowego.

Występowanie komórek olbrzymich, w szczególności takich, których cytoplazma wykazuje degenerację ziarnistą i różne postacie zwyrodnieniowe gliofibryli, stało się podstawą do wyodrębnienia grupy nowotworów glejopochodnych pod nazwą guzów dysplastycznych (Głuszczyk 1963, Głuszczyk, Szydłowska 1967a, 1967b, Głuszczyk 1970, Alwasiak 1970).

Zwraca uwagę fakt, że występowanie monstualnych form komórkowych związane jest ze wzrostem anaplazji nowotworu (Bailey, Cushing 1926, Kersting 1961). Kersting (1961) obserwował takie formy w hodowli *in vitro* w grupie tzw. złośliwych gwiazdziaków, stanowiących grupę przejściową do gąbczaków wielopostaciowych. Hodowla *in vitro* może zmieniać morfologię poszczególnych linii hodowlanych komórek prawidłowych i nowotworowych.

W warunkach *in vitro* prawidłowa tkanka może ulegać odróżnicowaniu morfologicznemu i czynnościowemu (Barski 1964). Adaptacji komórek do warunków *in vitro* mogą towarzyszyć zmiany w ich karyotypie. Komórki te charakteryzuje poliploidalność chromosomów, która jest wynikiem podziałów endomitotycznych, aneuploidalność a w większości przypadków hypotetraploidalna liczba chromosomów. Bayreuther (1960) stwierdził, że w przeciwieństwie do tkanki prawidłowej ulegającej transformacji nowotworowej *in vitro*, w nowotworach doświadczal-

nych liczba chromosomów pozostaje prawidłowa. Zdaniem tego autora nieprawidłowe zestawy chromosomów powstają dopiero po nowotworowym przekształceniu, a zmiana w aparacie chromosomalnym następuje po wielokrotnym seryjnym przeszczepianiu nowotworu. Hauschka (1961) badając różne rodzaje nowotworów ludzkich stwierdził, że większość z nich wykazuje wartości modalne chromosomów o typie aneuploidalnym. Chociaż zmiany w karyotypie komórki niekoniecznie przebiegają równolegle ze zmianą jej kształtu, to w przypadkach komórek olbrzymich można przyjąć taką łączność, ponieważ chromatyna jądrowa tych komórek wykazuje duży polimorfizm, a trójbiegunowe podziały mitotyczne nie należą do rzadkości. Z tej przyczyny komórki olbrzymie zostały przez nas wybrane jako wskaźniki ewentualnych przekształceń utkania nowotworowego *in vitro*. Jeśli bowiem słuszne jest twierdzenie, że komórki te są wyrazem anaplazji nowotworowej, to mimo długotrwałego hodowania i pasażowania powinny utrzymać się w utkaniu nowotworu, nadając mu charakterystyczne piętno morfologiczne. Jeśli natomiast są to formy dysplastyczne z piętnem zmian wstecznych nie uwarunkowanych genetycznie, to należy oczekiwać, że znikną one z hodowli nowotworu w miarę pasażowania.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 3 gąbczakach wielopostaciowych, 1 gwiaździaku włókienkowym i 1 glejaku mieszanym.

Nowotwory otrzymane bezpośrednio z sali operacyjnej w jałowym naczyniu rozkawałkowały na drobne cząsteczki o wielkości około 2 mm², które implantowano na szkiełkach pokrytych plazmą z dodatkiem wyciągu embrionalnego. Eksplantaty hodowano w płynie Parkera wzbogaconym surowicą cielęcą i ekstraktem embrionalnym. Medium hodowlane rutynowo zmieniano w odstępach tygodniowych, o ile nie zachodziła konieczność zmieniania częstszego. Hodowlę prowadzono w probówkach Leightona.

Hodowle pasażowano w odstępach 30—34-dniowych. Ilość pasaży i czas trwania poszczególnych hodowli przedstawia tabela 1. Obserwację hodowli prowadzono w mikroskopie fazowo-kontrastowym i metodą mikrokinematograficzną. Dokumentację fotograficzną wykonywano systematycznie w odpowiednich odstępach czasu, np. po ukształtowaniu się strefy wzrostu, zarówno w hodowli macierzystej, jak i hodowli pasażowanej. Po zakończeniu obserwacji hodowle utrwalano w 4% roztworze formaliny sporządzonym z płynem fizjologicznym (0,8% roztwór NaCl). Hodowle porównywano ze skrawkami nowotworu pobranego w czasie

Tabela 1. Rodzaj nowotworów hodowanych *in vitro* i całkowity czas trwania poszczególnych hodowli

Table 1. Types of tumours cultured *in vitro* and the total time of duration of the individual cultures

Lp. No	Nr hist. His. No.	Rodzaj nowotworu Type of tumour	Całkowity czas trwania hodowli The total time of tissue culture duration
1	6546	Glioblastoma multiforme monstrocellulare	896 dni days
2	6944	Glioblastoma multiforme	240 dni days
3	6743	Glioblastoma multiforme	140 dni days
4	6763	Astrocytoma	135 dni days

zabiegu operacyjnego, utrwalonego i przeprowadzonego przez alkohole, zatopionego w parafinie i zabarwionego w sposób rutynowy.

WYNIKI

Obserwacje prowadzono z uwzględnieniem: a) zmian zachodzących w komórkach nowotworowych w porównaniu z hodowlą macierzystą, b) wzrostu hodowli w zależności od warunków zewnętrznych, c) zmian czynnościowych w komórkach.

Mimo prowadzenia badań na kilku hodowlach, przedmiotem szczególnych opisów i dokumentacji jest gąbczak wielopostaciowy monstrocellularny nr 6546. Hodowla nowotworu trwała 896 dni. Jak przedstawia tabela 2, pierwotna hodowla macierzysta utrzymywana była przy życiu przez 346 dni. Równoległe do trwania hodowli macierzystej przeprowadzono 10 pasaży, przy czym każda następna subkultura nowotworu pochodziła z subkultury poprzedniej. Czas trwania poszczególnych subkultur uwidoczniło w tabeli 2. Po upływie 346 dni hodowli macierzystej, wykonano pasaż tej hodowli, a uzyskane z tego pasażu subkultury utrzymywały się przy życiu przez następnych 450 dni. Z tej wtórnej hodowli macierzystej wykonano 15 subkultur, których czas przeżycia podaje tabela 2.

Czasy przeżycia hodowli w drugiej serii badań są krótkie, ponieważ chodziło nam tylko o stwierdzenie, czy w poszczególnych subkulturach tkanka nowotworowa będzie odtwarzała przede wszystkim komórki olbrzymie i jakie inne formy komórkowe będą wzrastały z pasażowa-

Tabela 2. Czas trwania hodowli pasażowych
Table 2. Time of duration of the individual subcultures

Hodowla macierzysta
 Nr hist. 6546
 Glioblastoma multiforme
 monstrocellulare
 Paternal culture
 Hist. No. 6546

349 dni po założeniu subkultury 11,
 hodowlę macierzystą utrwalono.
 After 349 days the 11 subculture was established and
 the paternal culture fixed.

Subkultury nowotworu pasażowane Subcultures of the tumors	Pasaż 1. po 27 dniach hodowli macierzystej Subculture 1. after 27 days growth of the parent culture	Pasaż 1. czas przeżycia hodowli 254 dni	Pasaż 11. czas przeżycia hodowli 36 dni
	Pasaż 2. „ „ „ 178 „	Pasaż 12. „ „ „ 47 „	
	Pasaż 3. „ „ „ 186 „	Pasaż 13. „ „ „ 95 „	
	Pasaż 4. „ „ „ 205 „	Pasaż 14. „ „ „ 63 „	
	Pasaż 5. „ „ „ 155 „	Pasaż 15. „ „ „ 62 „	
	Pasaż 6. „ „ „ 116 „	Pasaż 16. „ „ „ 73 „	
	Pasaż 7. „ „ „ 112 „	Pasaż 17. „ „ „ 65 „	
	Pasaż 8. „ „ „ 48 „	Pasaż 18. „ „ „ 44 „	
	Pasaż 9. „ „ „ 25 „	Pasaż 19. „ „ „ 29 „	
	Pasaż 10. „ „ „ 33 „	Pasaż 20. „ „ „ 44 „	
		Pasaż 21. „ „ „ 28 „	
		Pasaż 22. „ „ „ 39 „	
		Pasaż 23. „ „ „ 30 „	
		Pasaż 24. „ „ „ 135 „	
		Pasaż 25. „ „ „ 49 „	
	Subculture No. — duration time of culture — days	Subculture No. — duration time of culture — days	

nego eksplantatu. Nie czekano na naturalne obumieranie hodowli. W odpowiednich odstępach czasu (tabela 2) hodowle utrwalano i oglądano pod mikroskopem.

Nowotwór hodowli macierzystej reprodukował od założenia hodowli komórki dwubiegunowe, monstrialne i pojedyncze komórki gleju wielowypustkowego. Po upływie 24—48 godz. obserwowano wąski rąbek wzrostu wokół eksplantatu w postaci wypustek. Czas wytworzenia strefy wzrostu w hodowli macierzystej wynosił 7—10 dni, a zatem odpowiadał on wzrostowi innych nowotworów glejopochodnych. Charakterystycznym objawem było występowanie komórek monstrialnych w samym eksplantacie hodowli macierzystej (ryc. 1), zgodnym z obrazem histologicznym guza (ryc. 2, 3). W eksplantacie jednak komórki nie wykazywały takiego zróżnicowania morfologicznego, jakie było widoczne w strefie wzrostu. Komórki te w samym eksplantacie miały zachowany kadłub komórkowy, lecz nie wytwarzały wypustek. Opuszczając eksplantat były również bezwypustkowe (ryc. 4), a dopiero w miejscach swobodnego wzrostu wytwarzały wypustki. W pierwszej fazie wzrostu, w strefie otaczającej eksplantat przeważały komórki dwubiegunowe, które nadawały tej strefie charakterystyczne promieniste ukształtowanie. W następnym okresie tj. po 10 dniach pojawiały się formy wielowypustkowe oraz komórki olbrzymie, monstrialne. Odtwarzanie form monstrialnych obserwowano we wszystkich fazach hodowli. Celem porównania wzrostu, lub spadku ilości tych komórek w poszczególnych hodowlach, zarówno w macierzystej, jak i subkulturach badanego nowotworu, obliczono w wybranych losowo polach ilość komórek olbrzymich. Zależność między czasem trwania hodowli, a ilością zawartych w nich komórek ilustruje schemat 1. Z danych liczbowych wynika, że we wszystkich okresach hodowli komórki te znajdowały się w strefie wzrostu zarówno w subkulturach, jak i hodowli macierzystej, jednak ilość ich w subkulturach była nieco mniejsza. Nawet w subkulturze 887-dniowej, utrwalonej i zabarwionej hematoksyliną widoczne były komórki monstrialne (ryc. 5).

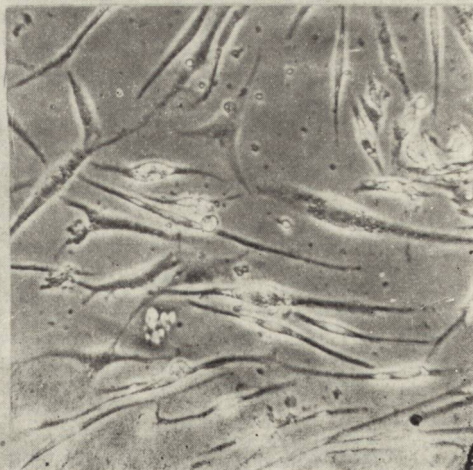
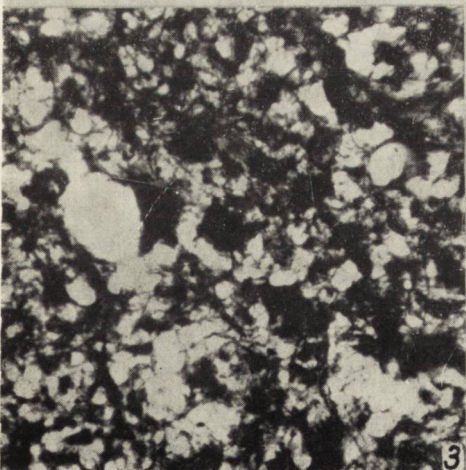
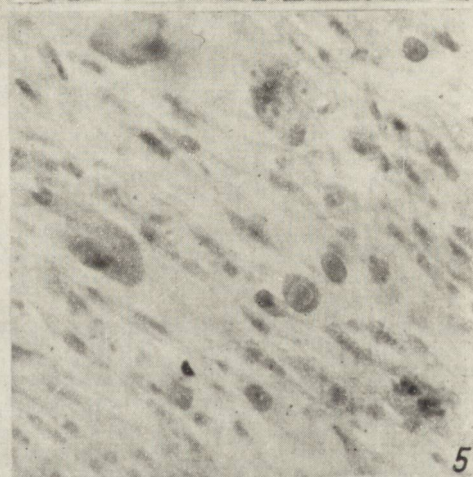
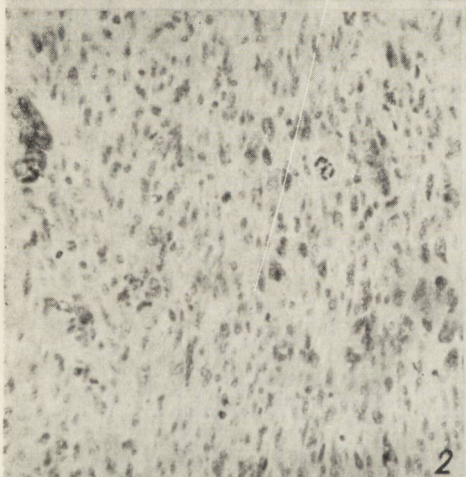
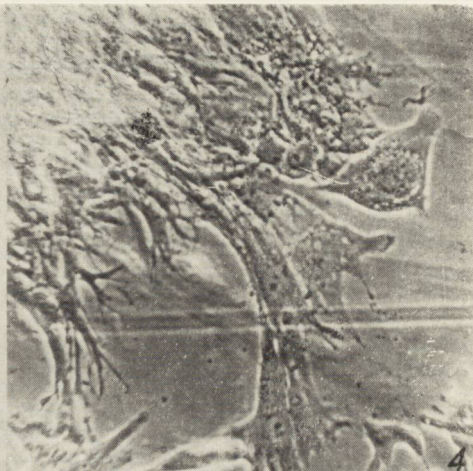
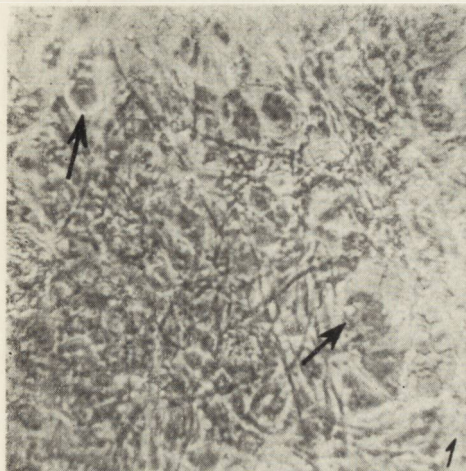
Zgodnie z oczekiwaniem, z przedłużaniem się czasu hodowli w strefie wzrostu widoczna była przewaga liczbową form dwubiegunowych, czego skrajnym przykładem jest ilustracja wybranego wycinka strefy wzrostu w 887 dniu (ryc. 6), w której pole obserwacji obejmuje prawie wyłącznie formy dwubiegunowe, spongioblastopodobne.

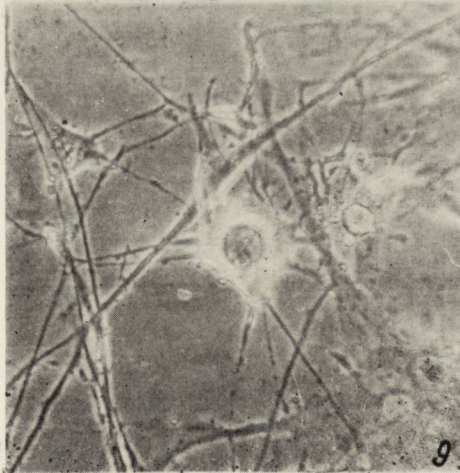
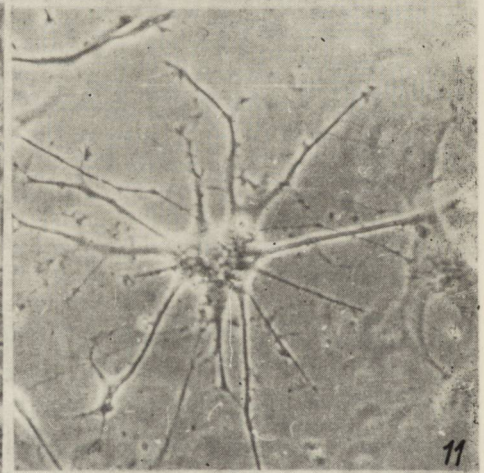
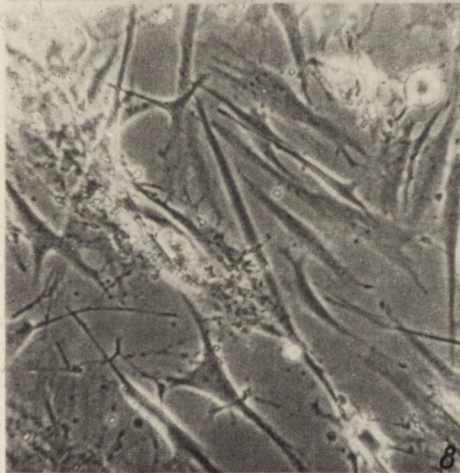
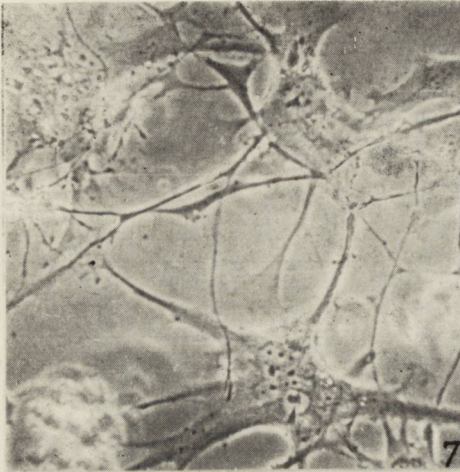
Wzrostowi hodowli w subkulturach towarzyszyły więc dwa zjawiska. Pierwsze związane jest z różnicą w szybkości wzrostu komórek monstrialnych i komórek dwubiegunowych. Formy monstrialne nie emigrują do strefy wzrostu w ciągu 24—48 godz., lecz dopiero po upływie 7—10 dni, a nawet później.

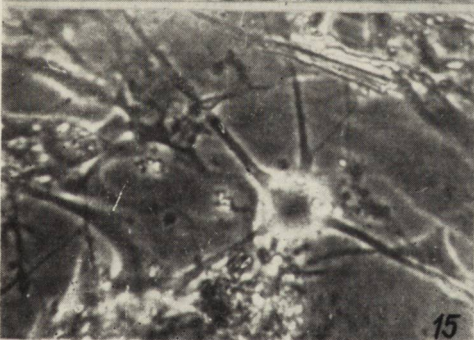
Opóźnienie emigracji tych komórek z eksplantatu można tłumaczyć dużą masą ich ciała, brakiem wypustek oraz właściwościami czynnościowymi komórki. Z naszych badań mikrokinematograficznych wynika, że okres pulsacji komórki olbrzymiej trwa bardzo długo, bo ponad 20 godz., na podstawie czego można przypuszczać, że również jej ruchliwość jest mała.

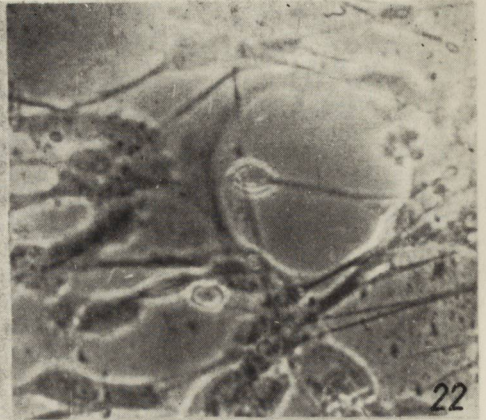
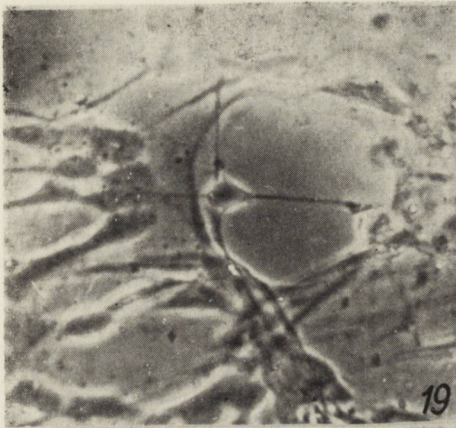
Drugim obserwowanym zjawiskiem w czasie pasażowania był występujący każdorazowo okres latencji wzrostu eksplantatu. Elementy komórkowe, pasażowane pochodziły zawsze ze strefy wzrostu, należy więc przypuszczać, że zniszczenie zespólni komórkowej strefy wzrostu w czasie manipulacji związanych z przeprowadzeniem pasażu osłabiało dynamizm wzrostowy eksplantowanych komórek. Przeżycie okresu adaptacji po założeniu nowej subkultury pozwalało hodowli na ponowne odtwarzanie form komórkowych. Pod koniec hodowli pasażowanej obserwowano osłabienie aktywności biologicznej tych komórek, bowiem liczba ich nie zwiększała się. Jednak ponowne pasażowanie utrzymuje liczbę tych komórek prawie na równym poziomie we wszystkich obserwowanych subkulturach (ryc. 7—12). Do cech morfologicznych, które komórki zachowują przez cały czas trwania hodowli, należą niepełne lub spaczone podziały, wielojądrowość i co jest również znamienne nieuporządkowanie chromatyny jądrowej w tych przypadkach, w których nie dochodzi do pełnego ukształtowania morfologicznego jądra. Cytoplazma tych komórek obfitowała w duże ilości wakuoli, których ilość i wielkość wykazują dużą zmienność w czasie.

W celu przesłedzenia sprawności czynnościowej tych komórek, dokonano obserwacji mikrokinematograficznej jednej z komórek menstrualnych. Posiadała ona zdolność kurczenia ciała komórkowego o charakterze wolnej pulsacji, przy czym we wszystkich fazach tego zjawiska utrzymywała wypustki, podlegające pewnym zmianom. Wypustki kurczyły się w podobny sposób jak kadłub komórkowy, stawały się cieńsze, długie i wysmukłe, jednak nie traciły łączności z kadłubem komórkowym. Na rycinach można dokładnie przesłedzić ciągłość błony wypustki z ciałem komórkowym, szczególnie na ryc. 11, przedstawiającej stadium największego obkurczania komórki. Dla zilustrowania tego zjawiska wykonano montaż fotograficzny, przedstawiający poszczególne fazy tego procesu (ryc. 13—18). Na podstawie długości filmu, ilości zawartych w nim klatek, czasu ekspozycji, interwału czasowego między poszczególnymi klatkami obliczono czas przebiegu pulsacji komórki, który w naszych obserwacjach wynosił 20 godz., 20 min., 6 sek. Porównanie czasu pulsacji komórki olbrzymiej z komórką nowotworową pochodzenia oligodendroglejowego (ryc. 19—24), której czas pulsacji wynosi 5 godz., 18 min., 6 sek. pozwala wykazać, że zjawisko to w komórce olbrzymiej









przebiega aż czterokrotnie wolniej. Po zakończeniu pulsacji komórka wraca do pierwotnego kształtu odtwarzając nie tylko ilość wypustek, lecz także ich grubość. Równoległe ze zjawiskiem pulsacji, czy też obkurczenia, następuje przemieszczenie chromatyny jądrowej w kierunku środka komórki razem z jej składnikami. Błona komórkowa staje się bardzo wyraźna, łamiąc bardzo silnie światło. Na ryc. 16 można dokładnie zaobserwować ciągłość błony komórkowej i wypustek. Godnym podkreślenia jest powrót odkształconej komórki do pierwotnej postaci (ryc. 17, 18).

OMÓWIENIE

Przeprowadzone przez nas badania dowodzą, że nawet formy komórkowe o znacznym nasileniu nieprawidłowych podziałów komórkowych w hodowli *in vitro* odtwarzają swój kształt morfologiczny. Nasze spostrzeżenia są zbieżne z obserwacjami Kerstinga (1961) i Hermana i wsp. (1967). Różnica między hodowlą krótkotrwałą, a hodowlą długotrwałą pasażowaną polega na tym, że ta ostatnia w miarę wydłużania się czasu przeżycia reprodukuje formy, które mogą świadczyć o wzroście anaplazji; mianowicie wzrasta w utkaniu ilość komórek dwubiegunowych, spongioplastopodobnych. W czasie trwania doświadczenia nie obserwowano *in vitro* wzrostu form zwyrodnieniowych, które wg Kerstinga mają charakter syncytium komórkowego i zostały przez niego określone jako synplazmocyty. W miarę czasu trwania hodowli, w naszych doświadczeniach, strefa wzrostu opanowywana była przez komórki dwubiegunowe. Komórki te stanowią integralną część utkania nowotworu (ryc. 2). W pierwszym okresie hodowli ilość komórek wielowypustkowych jest mała, znajdują się jednak w strefie wzrostu. W następnych subkulturach w miarę wydłużania się czasu hodowli ilość ich maleje, a hodowla opanowywana jest przez komórki dwubiegunowe. Porównując stosunki ilościowe między komórkami wielowypustkowymi a dwubiegunowymi, stwierdzono, że piętno morfologiczne nadają hodowli formy komórkowe najbardziej aktywne rozplemowo. Powstaje zatem pytanie, czy proces, który określamy jako odróżnicowanie hodowli *in vitro*, jest rzeczywiście odróżnicowaniem. Na podstawie naszych badań można wnioskować, że w niektórych nowotworach anaplastycznych *in vitro*, dominacja elementów anaplastycznych jest w mniejszym stopniu wynikiem przekształcania się komórek, a w większym opanowania terenu przez komórki bardziej dynamiczne rozplemowo.

Znamiennym zjawiskiem w tego typu hodowlach jest mała ilość komórek wielowypustkowych w strefie swobodnego wzrostu. Czynniki

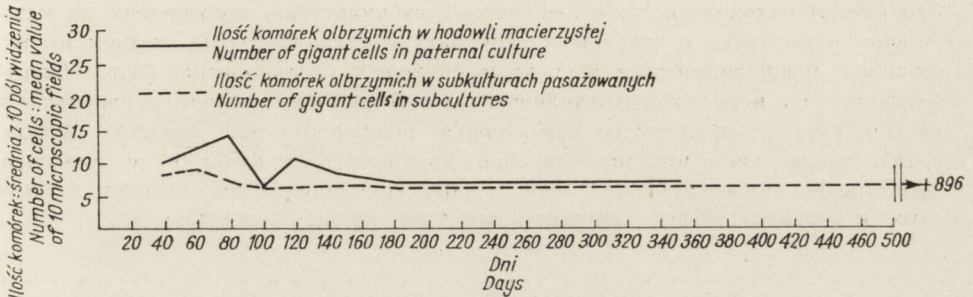
uwarunkowania przestrzennego kształtu komórki, w tym przypadku, nie może odgrywać żadnej roli, ponieważ w strefie wzrostu istnieje duża swoboda ruchu. Następuje natomiast naturalna eliminacja komórek najbardziej zróżnicowanych, wymagających licznych powiązań czynnościowych z innymi komórkami. Im niżej zróżnicowana komórka, tym tych zależności jest mniej, dlatego aktywność wzrostu nie ulega zahamowaniu.

Komórki wielojądrzaste, spełniające w naszym materiale rolę wskaźnika reprodukcji form niezwykłych, a przez to znamiennych, ulegają odtworzeniu w hodowlach krótkotrwałych (Kersting 1961), jak i długotrwałych (badania własne). Komórki te stanowią integralną część utkania anaplastycznego. W czasie naszych badań, zarówno w hodowli macierzystej jak i w hodowlach pasażowanych, ulegają one reprodukcji, utrzymując się w hodowli przez cały okres jej trwania. Ze względu na zaburzenia w podziałach komórkowych, komórki te mogą być nie w pełni wydolne czynnościowo, co może być przyczyną ich wcześniejszego obumierania. Wśród tych komórek można wyróżnić te, które w następstwie podziałów endomitotycznych odtwarzają struktury morfologiczne jak jądro i jąderko, oraz te, w których podziały komórkowe przebiegają w sposób zniekształcony do końca. W tych ostatnich komórkach nie dochodzi do odtworzenia prawidłowych układów chromatyny jądrowej, ani do wytworzenia prawidłowego jądra. Takie komórki posiadają jedno lub kilka jąder o zupełnie zdeformowanej chromatynie jądrowej. W następstwie dochodzi do zachwiania podziału komórki i zależności między jądrem a cytoplazmą. Różnorodność jądra, lub zupełny brak jego organizacji w postaci, w jakiej znajdujemy je w komórkach, w których podział dokonuje się prawidłowo jest cechą komórek olbrzymich. Chromatyna jądrowa ma dziwne ukształtowanie, a błony jądrowej niejednokrotnie nie udaje się zidentyfikować.

Zaburzeniami zależności między jądrem a cytoplazmą można by tłumaczyć również zmiany zachodzące w samej cytoplazmie. Polegają one na pojawieniu się pewnych substancji w cytoplazmie oraz na zmianie jej odczynów barwnych (Głuszczyk, Szydłowska 1967). W dalszych doświadczeniach, mimo tak daleko posuniętych odkształceń chromatyny jądrowej i cytoplazmy nie uzyskaliśmy dowodów za uznaniem tych form komórkowych, jako wyrazu zmian wstecznych w nowotworze.

Trwałość odtwarzanych komórek olbrzymich w hodowli macierzystej (346 dni) oraz w poszczególnych subkulturach może wskazywać, że komórki olbrzymie są trwałą zmianą epigenetyczną nowotworu. Zarówno w hodowli macierzystej, jak i w pasażach komórki te utrzymywały się w zasadzie w niezmienionej liczbie (schemat 1). Gdyby były to formy

zwyrondnieniowe należałoby oczekiwać zanikania ich w hodowlach długotrwałych i pasażowanych. Tymczasem, nawet po upływie 896 dni (ryc. 5) hodowli formy te utrzymują się w strefie wzrostu i nie posiadają charakteru synplazmocytów (Kersting 1961).



Schemat. 1. Zależność liczby komórek olbrzymich od wieku hodowli.
Diagram 1. Relationship between the number of giant cells and cultures age.

————— Ilość komórek olbrzymich w hodowli macierzystej
Number of giant cells in paternal culture
----- Ilość komórek olbrzymich w subkulturach pasażowanych
Number of giant cells in subcultures.

W naszych wnioskach końcowych ograniczymy się do następujących stwierdzeń:

1. Im dłuższy czas hodowli, tym większą przewagę w utkaniu uzyskuje forma anaplastyczne, dwubiegunowe;
2. Przewaga w utkaniu nowotworowym form anaplastycznych *in vitro* nie jest wynikiem transformacji komórek nowotworowych, lecz uzyskaniem przez formy anaplastyczne przewagi w utkaniu, dzięki większemu dynamizmowi rozplemowemu;
3. Nowotwory glejopochodne odtwarzają *in vitro* w hodowlach długotrwałych formy komórkowe utkania macierzystego, a w miarę czasu trwania hodowli eliminacji ulegają formy wyżej zróżnicowane;
4. Komórki olbrzymie są odtwarzane w hodowli długotrwałej macierzystej oraz w poszczególnych subkulturach.

Ю. Калужа, З. Ковальска

ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ГЛИОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ ДОЛГОСРОЧНОЙ И ПАССАЖИРОВАННОЙ

Резюме

Проводились исследования трансформации глиогенных опухолей *in vitro* в культуре долгосрочной и пассазированной. Особое внимание уделялось сохранению в долгосрочной культуре монструальных клеток полиморфной спон-

гиобластомы, которые по некоторым авторам являются проявлением анаплазии, а по мнению других — дисплазии опухоли. В результате опытов было обнаружено, что гигантские и монструальные клетки сохранялись в первоначальной материнской культуре в течение 349 дней и во вторичной материнской культуре в течение 447 дней, что в сумме дает выживаемость в течение 896 дней. Эти клетки находились также во всех 25 субкультурах, получаемых из материнских субкультур и отдельных субкультур. Из-за этого мы считаем их постоянным морфологическим элементом опухолей. Одновременно было обнаружено, что по мере продолжительности культуры преобладают двухполюсные клетки, которые придают ей характерные морфологические свойства. Выдвигается заключение, что преобладание двухполюсных форм в долгосрочной культуре не является проявлением дедифференциации а проявлением захвата самыми гиперпластически динамичными клеточными элементами.

J. Kałuża, Z. Kowalska

INVESTIGATIONS ON ENDONEOPLASTIC TRANSFORMATION OF GLIOMAS IN LONG-TERM CULTURE AND SUBCULTURES *IN VITRO*

Summary

Investigations on transformation of tumors of glial origin in long-term culture and subcultures *in vitro* have been performed. Special attention was paid to giant and monstrous cells of glioblastoma multiforme, because some authors considered them as a significant feature of anaplasia some others as dysplastic cells. It was shown, that the giant cells survived 349 days in the primary paternal culture and in the secondary paternal culture during the next 447 days as well. The giant and monstrous cells were reproduced in each of the 25 subcultures which were obtained from the paternal cultures during the 896 days of growth, since than we considered them as a constant morphological element of that type of tumor. Additionally we observed that with the duration of tissue culture bipolar cells predominate as a characteristic feature of tumor growth. It was concluded that the dominance of these bipolar cells in long-term cultures is not a result of dedifferentiation only an effect of reproduction of the most active cellular elements.

PIŚMIENNICTWO

1. Alwasiak J.: Zmiany mikroskopowe w pooperacyjnych wznowach i pozostałościach glejaków nadnamiotowych mózgu. *Neuropat. Pol.* 1970, VIII, 1, 37—78.
2. Bailey P., Cushing H.: A Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. J. B. Lippincott Co., Philadelphia 1926.
3. Barski G.: Genetic transformation and interactions *in vitro* somatic cell cultures in: Cellular control mechanisms and Cancer. pp. 52—59 Elsevier Publishing Company, Amsterdam — London — New York, 1964.
4. Bayrenther, K. cyt. wg Barskiego.

5. Głuszcz A., Szydłowska H.: Studies of dysplastic forms of glioma cells based on the application of polychromes. Abstract 11, *Folia Histochem.* 1967a, V, 189—190.
6. Głuszcz A., Szydłowska H.: The study of so-called dysplastic gliomas using polychrome stains. *Neuropatologia Polska*, 1967b, V, 4, 429—435.
7. Głuszcz A.: Badania histologiczne i histochemiczne glejaków mózgu ze szczególnym uwzględnieniem ich zrębu naczyniowego. *Łódzkie Tow. Nauk. Prace Wydz. IV. Nauk Lekarskich — Łódź*, 1963.
8. Hauschka T., cyt. wg. Barskiego.
9. Herman M. M., Adams W. R. Manuelidis E. E.: The ultrastructure of a Human Glioblastoma Multiforme-derived Tumor Heterologously Transplanted to Guinea Pig Eye and Brain. *Acta Neuropath.*, 8, 321—330, 1967.
10. Kersting G.: Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste. — *Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961.

Adres autorów: Pracownia Patologii Neurochirurgicznej, Kraków ul. Botaniczna 2.

PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Guz nr 6546. — 314 dzień hodowli macierzystej. Komórki olbrzymie w eksplantacie oznaczone strzałkami. Mikroskop odwrócony. Fazo-kontr. Pow. $10 \times 12,5$.

Fig. 1. Tumor No. 6546. — 313-day of paternal culture with monstrous cells. The cells are indicated with arrows. Phase-contr. Magn. $10 \times 12,5$. Plankton-microscope.

Ryc. 2. Wycinek histologiczny guza nr 6546. Barw. H-E. — W utkaniu nowotworu przewaga komórek dwubiegunowych i olbrzymich. Pow. 25×12 .

Fig. 2. Histological specimen of the tumor No. 6546. H.E. staining. — In the tumor tissue spongioblast-like forms and giant cells dominate. Magn. 25×12 .

Ryc. 3. Wycinek histologiczny guza nr. 6546. — Impregnacja metodą Cajala. — Komórki olbrzymie bez wyimpregnowanych wypustek. Pow. 25×12 .

Fig. 3. Histological specimen of the tumor No. 6546. — Impregnation after Cajal. Only the cell body is impregnated not the cell processes. Magn. 25×12 .

Ryc. 4. Guz nr. 6546. — 887-y dzień hodowli, 25 pasaż. Komórka olbrzymia, bezwypustkowa w czasie wywędrowywania z eksplantatu. Mikroskop odwrócony, fazo-kontr. Pow. $10 \times 12,5$.

Fig. 4. Tumor No. 6546. — 25-th subculture — 887 day of culture duration. Giant monstrous-cell emigrating from the explantate. Plankton-microscope. Phase-contr. Magn. $10 \times 12,5$.

Ryc. 5. Guz nr 6546 887 dzień hodowli. Hodowla utrwalona w form. + 0,85% NaCl, zabarw. H.E. Liczne komórki olbrzymie. Mikroskop odwrócony. Faz.-kontr. Pow. $10 \times 12,5$.

Fig. 5. Tumor No. 6546. — 87-day of culture. The culture was fixed in formalin + 0,85% NaCl, thereafter stained with H.E. Numerous giant cells in the growth-zone. Plankton-microscope. Phase-contr. Magn. $10 \times 12,5$.

Ryc. 6. Guz nr 6546. — 887-y dzień hodowli. Komórki dwubiegunowe w strefie wzrostu. Mikroskop odwrócony. Faz.-kontr. Pow. $10 \times 12,5$.

Fig. 6. Tumor No. 6546. — 887-day of culture, — bipolare, spongioblast-like cells in the growth-zone. Plankton-microscope. Phase-contr. Magn. $10 \times 12,5$.

Ryc. 7—12. Guz nr 6546. — Komórki olbrzymie w hodowlach pasażowanych: 42, 172, 322, 420, 437 i 627-dniu trwania hodowli. Mikroskop odwrócony. Fazo-kontr. Pow. $10 \times 12,5$.

Fig. 7—12. Tumor No. 6546. — Giant cells in subcultures of 42, 172, 322, 420, 437 and 627-days of duration. Plankton-microscope. Phase-contr. Magn. $10 \times 12,5$.

Ryc. 13—18. Poszczególne fazy pulsacji komórki olbrzymiej z hodowli gąbczaka wielopostaciowego, olbrzymio-komórkowego. Guz nr 6546. — Fotografie wykonano z taśmy 16 mm, użytej do rejestracji mikrokinematograficznej hodowli. Czas pulsacji 20 godz., 16 min., 6 sek.

Fig. 13—18. Individual phases of pulsation of a giant cells. The registration of the pulsation was performed by the use of microcinematography. The figure presented were reproduced from the movie. Duration of pulsation 20 hrs, 16 min, 6 sec. Tumor No. 6546.

Ryc. 19—24. Oligodendroglioma — Nr 5892. Poszczególne fazy pulsacji komórki pochodzenia skąpodrzewiowego z hodowli nowotworu. Fotografie wykonano z filmu 16 mm, użytego do rejestracji mikrokinematograficznej hodowli. — Czas pulsacji 6 godz., 16 min., 6 sek.

Fig. 19—24. Oligodendroglioma — No. 5892. Individual phases of pulsation of a cell of oligodendroglial origin registred with microcinematography thereafter reproduced from the movie. Duration of pulsation 5 hrs, 16 min, 6 sec.

JOANNA STROSZNAJDER, ANDRZEJ GROMEK, JERZY ŁAZAREWICZ

WPŁYW NIEDOKRWIENIA NA ZAWARTOŚĆ WOLNYCH KWASÓW
TŁUSZCZOWYCH W MÓZGU ŚWINEK MORSKICH *Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: dr n. przyr. A. Gromek

Niedotlenienie tkanki nerwowej, podobnie jak i innych tkanek powoduje występowanie całego szeregu zaburzeń w ogólnym metabolizmie komórkowym. Najbardziej istotne zmiany wyrażają się obniżeniem związków wysoko energetycznych (fosfokreatyny i ATP), któremu towarzyszy spadek i zanik czynności bioelektrycznej mózgu. Równocześnie obserwuje się wzrost zawartości pirogronianu i kwasu mlekowego.

Do chwili obecnej stosunkowo niewiele prac poświęcono badaniom metabolizmu fosfolipidów w warunkach anerobiozy. Jak wynika z prac Fleischera i wsp. (1962), Greena (1966), Hokina, Hokina (1959) fosfolipidy stanowiące strukturalny składnik błon komórkowych biorą również czynny udział w procesach oksydacyjnej fosforylacji i w procesach aktywnego transportu.

Obserwowany spadek zawartości fosfolipidów w warunkach niedokrwienia może być spowodowany działaniem fosfolipaz (Hinzen i wsp. 1970, Bazan 1970). Enzymatyczna hydroliza fosfolipidów prowadzi wówczas do uwalniania rozpuszczalnych w wodzie końcowych produktów hydrolizy oraz kwasów tłuszczowych, które mogą wywierać wpływ na szereg istotnych procesów metabolicznych w komórkach ośrodkowego układu nerwowego.

W obecnej pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu niedokrwienia na zawartość fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych w różnych częściach mózgu w korelacji z biochemicznymi właściwościami mitochondriów:

* Praca częściowo wykonana w oparciu o pomoc finansową z umowy polsko-amerykańskiej PL 480, Grant Public Health Service USA. Agreement 05-004-1.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto świnek morskich obu płci o wadze 200—250 g. Badania prowadzono w warunkach 5-minutowej całkowitej ischemii, przy użyciu modelu dekapitacyjnego w temp. 37°C. W jednej z grup doświadczalnych niedotlenienie u zwierząt wywoływano umieszczając je w komorze w atmosferze azotu zawierającego 2—3% tlenu przez okres do pełnego bezdechu zwierząt (wynoszący średnio od 3—5 min.). Równoległe badania kontrolne przeprowadzano na zwierzętach nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

Badania prowadzono na tkance pochodzącej z kory mózgu, móżdżku i pnia mózgu. Mózg zamrażano w ciekłym azocie. Lipidy ekstrahowano wg metody opisanej przez Folcha i wsp. (1957) i rozdzielano na fosfolipidy i lipidy obojętne przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej, a następnie oznaczano metodą wagową. Kwasy tłuszczowe ekstrahowano wg metody opisanej przez Dole'a i Meinertz'a (1960) i oznaczano metodą kolorymetryczną Duncomba w modyfikacji Itaya i Ui (1965).

Frację mitochondrialną otrzymywano wg metody podanej przez Ozawę i wsp. (1966). Zużycie tlenu oznaczano w temp. 25°C metodą polarograficzną. Wskaźnik fosforylacji ADP/O oznaczano wg metody Chance i Williama (1955). Wskaźnik kontroli oddechowej RC obliczano ze stosunku zużycia tlenu w obecności nadmiaru substratu i ADP do zużycia tlenu po wyczerpaniu ADP (stan 3, stan 4). Białko oznaczano metodą Layne (1957). Znamienność statystyczną wyników obliczano testem Studenta (Richter 1971).

WYNIKI

Zaobserwowano obniżenie zawartości fosfolipidów w różnych częściach ośrodkowego układu nerwowego w warunkach całkowitej ischemii.

Występujące podczas niedokrwienia zmiany w zawartości fosfolipidów w różnych częściach mózgu, ze względu na duży rozrzut, charakteryzują się brakiem znamienności statystycznej. Najwyższy stopień obniżenia zawartości fosfolipidów, w 5 minut po dekapitacji obserwuje się w korze mózgu. W móżdżku i w pniu mózgu efekt ten występuje w znacznie mniejszym stopniu (tabela 1).

Równocześnie w tych samych warunkach doświadczalnych obserwowano wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych. W korze mózgu stwierdzono statystycznie znamienny wzrost ilości wolnych kwasów tłuszczowych. W móżdżku i w pniu mózgu wzrost ten nie miał cech znamienności statystycznej (tabela 2). Wzrost poziomu wolnych kwasów

Tabela 1. Wpływ ischemii na zawartość fosfolipidów w różnych częściach ośrodkowego układu nerwowego

Table 1. Effect of ischemia on the phospholipid content in various parts of the central nervous system

Badane struktury Examined structures	Zawartość fosfolipidów mg/g w.m. Phospholipid content mg/g w.w.	
	Kontrola Control	Ischemia Ischemia
Kora mózgu Brain cortex	64,9 ± 5,5 (8)	54,9 ± 4,2 (8)
Móżdżek Cerebellum	57,8 ± 3,2 (6)	51,8 ± 1,9 (7)
Pień mózgu Brain stem	73,2 ± 4,2 (8)	67 ± 2,8 (8)

Wyniki przedstawiają średnie ± standardowe odchylenie.

Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń.

Mean values ± standard deviations are presented. In paratheses — number of experiments.

Tabela 2. Wpływ ischemii na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w różnych częściach ośrodkowego układu nerwowego

Table 2. Effect of ischemia on the free fatty acid content in various parts of the central nervous system

Badane struktury Examined structures	Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych μmole/g w.m. Free fatty acid concentration μmoles/g w.w.	
	Kontrola Control	Ischemia Ischemia
Kora mózgu Brain cortex	1,21 ± 0,13 (7)	1,97 ± 0,29 (9)
Móżdżek Cerebellum	1,64 ± 0,14 (4)	1,71 ± 0,26 (4)
Pień mózgu Brain stem	1,92 ± 0,14 (4)	2,15 ± 0,40 (4)

Wyniki przedstawiają średnie ± standardowe odchylenie. Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń.

Mean values ± standard deviations are presented. In paratheses — number of experiments.

tłuszczowych stwierdzono również w korze mózgu w warunkach hypoksji u zwierząt przetrzymywanych przez okres 2—3 minut w atmosferze azotu zawierającego 2—3% tlenu. Ze względu na znaczne rozrzuty, otrzymane wyniki charakteryzują się brakiem znamienności statystycznej (tabela 3).

Tabela 3. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w korze mózgu świńek morskich podczas ischemii i hypoksji

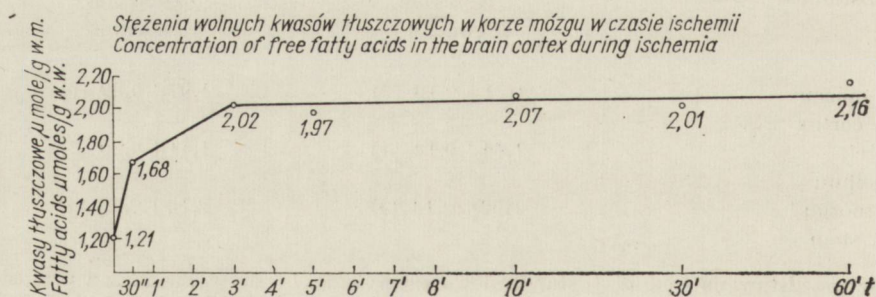
Table 3. Free fatty acid concentration in guinea pig brain cortex in ischemia and hypoxia

Grupy doświadczalne Experimental groups	Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych $\mu\text{mole/g}$ w.m. Free fatty acid concentration $\mu\text{moles/g}$ w.w.
Kontrola Control	$1,21 \pm 0,13$ (7)
Ischemia Ischemia	$1,97 \pm 0,29$ (9)
Hypoksja (2–3% O ₂) Hypoxia	$1,88 \pm 0,54$ (7)

Wyniki przedstawiają średnie \pm standardowe odchylenie. Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń.

Mean values \pm standard deviations. In parantheses — number of experiments.

Dalsze badania prowadzono wyłącznie przy stosowaniu modelu ischemii wywołanej dekapitacją zwierząt. Prześladowano dynamikę uwalniania kwasów tłuszczowych w czasie trwania ischemii (schemat 1). Stwierdzono, że wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w korze mózgu świńek morskich zachodzi w pierwszych 3 minutach niedokrwienia. W następnych minutach trwania ischemii przyrost wolnych kwasów tłuszczowych osiąga nieznaczne wartości.



Schemat 1. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w korze mózgu w czasie ischemii. Punkty odpowiadają średnim wynikom z trzech doświadczeń.

Diagram 1. Concentration of free fatty acids in the brain cortex during ischemia. The points correspond to mean results from three experiments.

Z badań Lehningera i Remmerta (1959) oraz Wojtaczaka i wsp. (1960, 1963) wiadomo, że kwasy tłuszczowe odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie energetycznym komórki, są dobrymi substratami oddechowymi w przypadku sprzężonego z fosforylacją oddychania, ale

mogą być również czynnikiem rozprzegającym oksydacyjną fosforylację. Można przyjąć, że spełniają one rolę czynnika regulującego stopień sprzężenia oddychania z syntezą ATP w komórce. Skłoniło to do zbadania aktywności oddechowej i fosforylacyjnej frakcji mitochondrialnej mózgu świnek morskich po 5 minutach ischemii (tabela 4).

Wyniki tabeli 4 wskazują na obniżenie wskaźnika oksydacyjnej fosforylacji (ADP/O), wskaźnika kontroli oddechowej (RC) oraz zużycia tlenu w stanie 3. Zmianom tym towarzyszy prawie dwukrotny wzrost ilości wolnych kwasów tłuszczowych w badanej frakcji mitochondrialnej. Można więc przypuszczać, że uwolnione podczas niedokrwienia kwasy tłuszczowe są odpowiedzialne za wyżej wymienione zmiany funkcji mitochondriów. Przemawiają za tym wyniki doświadczeń przeprowadzonych z dodaniem albuminy do środowiska inkubacyjnego. Albumina w znacznym stopniu zapobiega rozwojowi wyżej opisanych zmian w biochemicznej funkcji mitochondriów w warunkach niedokrwienia.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich badanych w 5 minut po dekapitacji zachodzi prawdopodobnie w wyniku hydrolizy endogennych lipidów mózgu, głównie fosfolipidów. Ze względu na nieprzepuszczalną dla kwasów tłuszczowych barierę krew-mózg, ich zawartość we krwi nie może mieć wpływu na zmianę ich stężeń w mózgu (Gatt 1968). W nieznacznym stopniu mogą one powstawać w wyniku hydrolizy trójglicerydów, których poziom w mózgu jest bardzo niski (Rowe 1969). Estry cholesterolu nie występują w mózgach dorosłych ssaków (Wells, Dittmer 1967), natomiast mielina wykazuje bardzo wolny metabolizm fosfolipidów (Cuzner i wsp. 1966). Można więc przyjąć, że wzrost wolnych kwasów tłuszczowych spowodowany jest aktywacją lipolizy fosfolipidów. Można sugerować, że obserwowane przez nas obniżenie zawartości fosfolipidów podczas niedokrwienia może dotyczyć głównie metabolicznie aktywnej części fosfolipidów (Hinzen i wsp. 1970). Istniejące dysproporcje pomiędzy stopniem obniżenia zawartości fosfolipidów, a przyrostem wolnych kwasów tłuszczowych mogą być uwarunkowane hydrolizą fosfolipidów do rozpuszczalnych w wodzie substratów i kwasów tłuszczowych zużywanych następnie w innych procesach metabolicznych. Za pełną hydrolizą fosfolipidów w mózgu podczas ischemii przemawiają obserwacje Hinzena i wsp. (1970), którzy nie wykazali w tych warunkach obecności lizofosfolipidów w mózgu. Z prac wyżej wymienionych badaczy wynika, że katabolizm fosfolipidów przebiega gwałtownie w pierwszych minutach trwania niedokrwienia, a w następnych minutach proces ten postępuje znacznie wolniej. Wyniki

Tabela 4. Wpływ ischemii na właściwości metaboliczne mitochondriów mózgu
 Table 4. Effect of ischemia on metabolic properties of brain mitochondria

		Kontrola Control		Ischemia Ischemia	
		—albumina — albumin	+albumina + albumin	—albumina — albumin	+ albumina + albumin
Zużycie O ₂ ng atomy/mg białka/minutę	Stan 3 State 3	62,1±9,4 (7)	57,6±10,0 (7)	28,9±10,8 (6)	30,3±19,5 (6)
O ₂ consumption ng atoms/mg protein/min.	Stan 4 State 4	17,7±4,5 (7)	11,3±3,8 (7)	15,1±5,5 (6)	9,3±3,5 (6)
RC		3,6±0,9 (7)	5,4±1,1 (7)	1,9±0,2 (6)	3,3±1,3 (6)
ADP/O		1,9±0,2 (7)	2,2±0,3 (7)	1,2±0,3 (6)	1,8±0,2 (6)
Zawartość kwasów tłuszczowych białka		23,4±4,5 (8)		40,1±8,3 (8)	
Fatty acid content	μmoles/mg protein				

Wyniki przedstawiają średnie ± standardowe odchylenia. Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń.
 Means ± standard deviations are presented. In parantheses — number of experiments.

naszych doświadczeń wskazują, że zarówno rozpad fosfolipidów, jak i związany z tym procesem wzrost wolnych kwasów tłuszczowych zachodzi w znacznie większym stopniu w korze mózgu, aniżeli w mózdzku i w pniu mózgu. Podobne obserwacje poczynił Müller i wsp. (1970), badając poziom związków wysoko energetycznych w mózdzku zwierząt doświadczalnych w warunkach niedokrwienia.

Dane te wskazują na różny stopień wrażliwości poszczególnych części ośrodkowego układu nerwowego na niedotlenienie, uzależniony najprawdopodobniej odmiennością struktury morfologicznej i funkcji fizjologicznej badanych części mózgu.

Stwierdzony przez nas szybki wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w korze mózgu w pierwszych minutach trwania ischemii zgodny jest z obserwacjami Bazana (1970) i odmienny od obserwowanego przez tego badacza wskaźnika przyrostu wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie i śledzionie.

Istniejące w piśmiennictwie rozbieżności dotyczące zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu wynikają z odmienności stosowanych metod ekstrakcji i oznaczania (Lunt, Rowe 1968).

W poprzedniej pracy (Łazarewicz i wsp. 1971) wykazano, że egzogenne kwasy tłuszczowe rozprzęgają oksydacyjną fosforylację mitochondriów mózgu, wywierając wpływ na aktywność ATP-az, hamują wymianę ATP-Pi oraz powodują pęcznienie mitochondriów. Dane te, jak również wyniki doświadczeń wskazujące na zaburzenia oksydacyjnej fosforylacji w warunkach niedokrwienia, pozwalają przypuszczać, że wolne kwasy tłuszczowe poprzez hamujące działanie na metabolizm energetyczny mitochondriów, mogą być jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój nieodwracalnych uszkodzeń mózgu.

Я. Штрошнайдер, А. Громек, Е. Лазаревич

ВЛИЯНИЕ ИСХЕМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МОЗГУ МОРСКИХ СВИНОК

Резюме

Исследовалось влияние 5-минутной последекапитационной ischemии на липидный метаболизм центральной нервной системы морской свинки. Наблюдалось снижение содержания фосфолипидов значительно более отчетливо выраженное в мозговой коре по сравнению с мозжечком и стволом мозга.

Одновременно в этих же экспериментальных условиях обнаружился рост уровня свободных жирных кислот, также наиболее заметный в мозговой коре.

Существенный отчетливый рост уровня свободных жирных кислот имеет место в первых 3 мин. протекания ischemии. Учитывая наблюдаемый во время

исхемии, рост уровня свободных жирных кислот казался интересным исследовать поведение оксидационной фосфорилиции митохондриальной фракции в этих условиях.

Было обнаружено частичное разобщение оксидационной фосфорилиции, снижение соотношения АДФ/0, показателя RC, ингибирование дыхательной активности митохондрий в состоянии 3, а также почти двухкратный рост уровня свободных жирных кислот.

Эти наблюдения позволяют предполагать, что свободные жирные кислоты, освобождающиеся в мозгу во время ишемии, могут являться одним из факторов ответственных за развитие необратимых повреждений мозга в этих условиях.

J. Strosznajder, A. Gromek, J. Łazarewicz

EFFECT OF ISCHEMIA ON THE FREE FATTY ACID CONTENT IN GUINEA PIG BRAIN

Summary

The effect of a five minute postdecapitative ischemia on the lipid metabolism in the central nervous system of guinea pig was examined.

A drop in level of phospholipids was observed under these conditions, the effect being more pronounced in brain cortex than in cerebellum or brain stem. In addition, an increase of the free fatty acid content was noticed, the most evident again in brain cortex.

The level of free fatty acids rises markedly during the first three minutes of ischemia. Considering the above findings it seemed interesting to investigate the process of oxidative phosphorylation. A partial decoupling of oxidative phosphorylation, decrease of ADP/O ratio and RC index, inhibition of respiratory activity of mitochondria in state III and an almost two-fold rise in level of free fatty acids were observed.

These observations allow to presume that the free fatty acids liberated in brain during ischemia may be one of the factors responsible for the development under these conditions of irreversible brain lesions.

PIŚMIENNICTWO

1. Bazan N. G.: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 218, 1—10.
2. Chance B., Williams G. R.: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 383—393.
3. Cunzer M. L., Davidson A. N., Gregson N. A.: Turnover of brain mitochondrial membrane lipids. *Biochem. J.*, 1966, 101, 618.
4. Dole V. P., Meinertz H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2595—2599.
5. Fleischer S., Brierley G., Klouwen H., Slauterback D. B.: Studies of the electron transfer system. XLVII. The role of phospholipids in electron transfer. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3264—3272.

6. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—509.
7. Gatt S.: Purification and properties of phospholipase A₁ from rat and calf brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 159, 304—316.
8. Green D. C.: The mitochondrial electron transport system in comprehensive biochemistry. Ed. by M. Florin, El. Pub. Company, 1966, vol. 14.
9. Hinzen D. H., Isselhard W., Füsgen I., Müller U.: Phospholipid-Stoffwechsel und Funktion des Säugergehirns in vivo. *Pflügers Arch.*, 1970, 318, 117—129.
10. Hokin L. E., Hokin M. R.: Evidence for phosphotidic acid as the sodium carrier. *Nature (Lond.)*, 1959, 184, 1068—1069.
11. Itaya K., Ui M.: Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J. Lipid Res.*, 1965, 6, 16.
12. Lehninger A. L., Remmert L. F.: An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2459—2464.
13. Layne E.: Protein estimation with folin-ciocalten reagent methode in enzymology. Ed. Colowick and P. Kaplan N.O. Acta Press, N. York 1957, 3, 448—450.
14. Lunt G. G., Rowe C. E.: The production of unesterified fatty acid in brain. *Biochim. Biophys Acta*, 1968, 152, 682—693.
15. Lazarewicz J. W., Strosznajder J., Gromek A.: Effects of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria (in press).
16. Müller U., Isselhard W., Hinzen D. H., Geppert B.: Regionaler Energiestoffwechsel im Kaninchengehirn während kompletter Ischemie in Normothermie. *Pflügers Arch.* 1970, 320, 168—180.
17. Ozawa K., Seta K., Takeda H., Ando K., Handa H., Araki C.: On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem.*, 1966, 59, 501—510.
18. Richter R.: *Chemia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1971.
19. Rowe C. E.: The measurement of triglyceride in brain and the metabolism of brain triglyceride in vitro. *J. Neurochem.*, 1969, 16, 205.
20. Wells M. A., Dittmer J. C.: A comprehensive study of the postnatal changes in the concentration of the lipids of developing rat brain. *Biochemistry*, 1967, 6, 3169—3172.
21. Wojtczak L., Wojtczak A. B.: Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-Pi exchange by a substance from insect mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 39, 277—286.
22. Wojtczak L., Włodawer P., Zborowski J.: Adenosine triphosphate induced contraction of rat liver mitochondria and synthesis of mitochondrial phospholipids. *B.B.A.* 1963, 70, 290—305.

Adres autorów: Zespół Neurochemii CMD i K, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

JAN ALBRECHT

WPŁYW NIEDOTLENIENIA I NIEDOKRWIENIA
NA BIOSYNTEZĘ BIAŁKA W MÓZGU SZCZURA *Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Fakt, że biosynteza białka w wysokim stopniu jest uzależniona od poziomu energetycznego komórek, pozwolił założyć, że niedostateczny transport tlenu oraz substratów do mózgu nie może pozostać bez wpływu na wydajność tego procesu w jego tkankach. Za słusznością takiego założenia, w odniesieniu do doświadczalnych modeli niedokrwienia i niedotlenienia mózgu, pośrednio przemawiały wyniki badań przeprowadzonych między innymi przez Thorna i wsp. (1958), Lowry'ego i wsp. (1968) oraz Broniszewską-Ardelt i Jongkinda (1971). Autorzy ci wykazali, że w wyniku ostrej anoksji, względnie ischemii mózgu, poziom związków wysokoenergetycznych (zwłaszcza ATP) oraz substratów glikolizy ulega gwałtownemu obniżeniu.

Z dotychczasowych badań przeprowadzonych na różnych modelach niedotlenienia wynika, że podczas gdy proste niedotlenienie spowodowane oddychaniem mieszaniną gazową o niskiej zawartości tlenu, względnie częściowe niedokrwienie, polegające na jedno- lub obustronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej zastosowane oddzielnie, wywołują jedynie nieznaczne i przejściowe zmiany biochemiczne, histologiczne i histochemiczne (Ibrahim i wsp. 1970, Domańska-Janik 1970, Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971, Śmiałek i wsp. 1971) to skojarzenie obu czynników w tzw. modelu Levine'a prowadzi do głębokich zaburzeń metabolizmu, rozległych, nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego oraz zaburzeń w przepuszczalności bariery krew-mózg dla różnych związków (Kapuściński i wsp. 1972, Mc Gee-Russel i wsp. 1970, Levine 1960, Spataro 1966, Yap, Spector 1965).

* Praca częściowo oparta o pomoc finansową umowy polsko-amerykańskiej PL 480 US Public Health Service. Agreement 05-004-1.

W przedstawionych badaniach dokonano próby jednoczesnej, porównawczej oceny wpływu niedotlenienia i niedokrwienia na transport do mózgu podanego do układu krążenia znakowanego aminokwasu ^{75}Se -selenometioniny oraz na intensywność jego włączania *in vivo* do frakcji białkowej mózgu. Równocześnie zwrócono uwagę na rolę przyrostu masy mózgu, stanowiącego najprawdopodobniej wykładnik rozwijającego się jego obrzęku (Kapuściński i wsp. 1972) na proces wbudowywania się aminokwasu do frakcji białkowej.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 8—10-tygodniowych szczurach rasy Wistar, obojga płci, wagi 180—280 g. Zastosowano następujące modele doświadczalne:

a) model niedokrwienno — zwierzętom w narkozie eterowej podwiązano jednostronnie tętnicę szyjną wspólną,

b) model niedokrwienno hypoksyjny (Levine 1960) — szczury z podwiązaną tętnicą szyjną wspólną lewą przetrzymywano w komorze ze stałym przepływem mieszaniny gazów o składzie 4% tlenu i 96% azotu, przez okres 30 min., z krótkimi przerwami stosowanymi w przypadku stwierdzonego u zwierząt bezdechu. Skład mieszaniny gazowej ustalony był drogą pomiarów objętościowych z kontrolą ciśnienia cząstkowego tlenu elektrodą Clarka. Czas przeżycia zwierząt po niedotlenieniu wynosił 0, 30 min., 2, 4 i 24 godz.

Do oceny zmian wywołanych wyłącznie przez niedotlenienie posłużyły wyniki uzyskane z półkuli mózgu po stronie nie podwiązanej tętnicy szyjnej, podczas gdy wyniki z półkuli po stronie podwiązanej tętnicy służyły do oceny nieprawidłowości wywołanych skojarzonym działaniem niedokrwienia i niedotlenienia. Zwierząt kontrolnych nie poddawano żadnym zabiegom z wyjątkiem narkozy eterowej o takim samym czasie trwania, jak w grupach doświadczalnych.

Dokładnie na 10 minut przed uśmierceniem, zwierzętom we wszystkich grupach doświadczalnych wstrzykiwano dożylnie ^{75}Se -selenometioninę f-my Rotop, NRD (3,2 Ci/mmol) w ilości 10—15 μCi w objętości 0,2 ml. Pobrany po dekapitacji mózg wraz z mózdzkiem oraz pniem mózgu płukano w roztworze fizjologicznym chlorku sodu, a następnie dzielono wzdłuż spoidła wielkiego na 2 półkule.

Każdą półkulę ważono oddzielnie, po czym mierzono jej radioaktywność w sposób opisany w poprzedniej pracy (Kapuściński i wsp. 1972). Radioaktywność całkowitą półkuli, mieszczącą się w granicach ok. 0,5% podanej dawki (por. Kapuściński i wsp. 1972) przeliczano na gram mokrzej masy, uzyskując w ten sposób wartość radioaktywności właściwej.

Górny pułap różnicy pomiędzy radioaktywnościami właściwymi półkuli lewej i prawej w normie ustalono na podstawie pomiarów dokonanych na 25 szczurach kontrolnych. Dla każdego ze szczurów obliczano stosunki różnicy radioaktywności właściwych półkul do radioaktywności całkowitej mózgu wg wzoru:

$$x(\%) = \frac{L/gmm - P/gmm}{L + P} \times 100$$

gdzie L/gmm i P/gmm odpowiadało radioaktywności właściwej półkuli mózgu lewej i prawej, a L + P radioaktywności całkowitej mózgu. Dla średniej z grupy kontrolnej szczurów z uwzględnieniem odchylenia standardowego uzyskano wartość $1,2 \pm 0,6$. Zgodnie z tym ustaleniem, w przypadku zwierząt badanych, różnica pomiędzy radioaktywnościami właściwymi przekraczająca 1,8% radioaktywności całkowitej in plus świadczyła o wzroście ponad normę transportu aminokwasu do mózgu, a in minus — o jego obniżeniu.

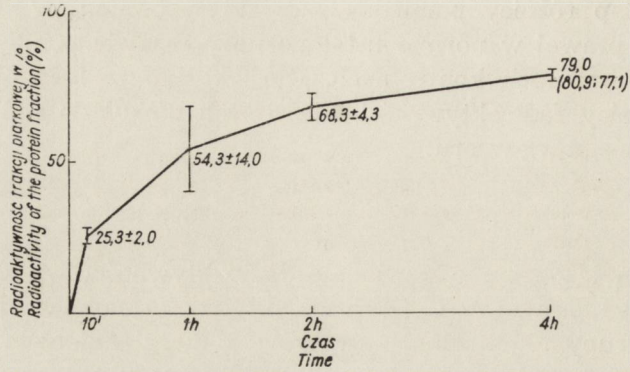
W podobny sposób ustalono normę dla względnej różnicy masy półkuli prawej i lewej, stanowiącej o błędzie przecięcia wzdłuż spoidła wielkiego. Analogicznie, wartość różnicy pomiędzy półkulą lewą i prawą przekraczająca 2,5% całkowitej masy mózgu świadczyła o przyroście masy półkuli ponad normę.

Natychmiast po pomiarze radioaktywności półkule homogenizowano z 2 ml wody destylowanej oziębionej do $+2^{\circ}\text{C}$ w homogenizatorze szklanym przez 10 sek. przy 1000 obr./min. Do homogenatu dodawano następnie 0,5 ml 25% kwasu trójchlorooctowego (TCA) i homogenizację powtarzano. Homogenizator przemywano 5% roztworem TCA. Osady odwirowywano, a następnie dwukrotnie płukano 5% roztworem TCA, mieszając zawartości probówek mieszadłem wibracyjnym. Po ponownym zawieszeniu osadu w 5% TCA, zawartość probówki ogrzewano przez 30 min. w temperaturze 90°C . Po oziębieniu zawiesiny, osad odwirowywano i mierzono jego radioaktywność. Wynik pomiaru charakteryzował radioaktywność frakcji białkowej półkuli.

WYNIKI I OMÓWIENIE

^{75}Se -selenometionina jako analog metioniny, znakowany γ — emitorem okazała się bardzo przydatna do niniejszych badań, ze względu na możliwość pomiaru radioaktywności bezpośrednio, bez uprzedniej skomplikowanej obróbki materiału, niezbędnej przy pomiarach radioaktywności β .

Ustalenie czasu krążenia aminokwasu w ustroju na 10 min. podyktowane było wynikami doświadczeń, przedstawionych na schemacie 1.



Schemat 1. Radioaktywność frakcji białkowej w procentach całkowitej radioaktywności mózgu po różnym czasie krążenia ^{75}Se -selenometioniny w organizmie w warunkach normy.

Diagram 1. Radioactivity of the protein fraction in brain following various times of ^{75}Se -selenomethionine circulation in the organism under normal conditions, expressed with the percentage of the total brain radioactivity.

Ze schematu przedstawiającego przyrost procentowy zawartości ^{75}Se -selenometioniny we frakcji białkowej mózgu w czasie wynika, że najbardziej intensywne włączanie znakowanego aminokwasu do białek ma miejsce w pierwszych 10 min. krążenia, podczas gdy w dalszych przedziałach czasu udział radioaktywnej selenometioniny w syntezie spada, przy czym na wynik końcowy prawdopodobnie rzutuje katabolizm nowosyntetyzowanych radioaktywnych białek. Wcześniejsze badania (Kapuściński i wsp. 1972) wykazały ponadto, że w pierwszych 10 min. krążenia selenometionina ulega szybkiemu transportowi do mózgu, przy czym zarówno jej całkowita zawartość w mózgu, jak też stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi osiągną najwyższy poziom.

Wpływ niedotlenienia prostego na włączanie aminokwasu do frakcji białkowej mózgu przedstawiają tabela 1 i schemat 2. W trakcie 30-minutowego (a nawet 10-minutowego) niedotlenienia intensywność wbudowywania aminokwasu ulega niewielkiemu, lecz statystycznie znaczącemu obniżeniu.

Przeniesienie zwierząt do normalnych warunków tlenowych powoduje stopniowy wzrost włączania aminokwasu. Całkowity powrót do wartości kontrolnych stwierdza się po 4 godz. od momentu przerwania niedotlenienia. Uwagę zwracają niewielkie różnice osobnicze zarówno w reakcji na niedotlenienie, jak i w przebiegu powrotu do normy.

Wydaje się, że w tym przypadku obniżenie poziomu syntezy związane jest raczej z przejściowymi skutkami niedotlenienia całego ustroju, niż z występowaniem uszkodzeń układu nerwowego. Sugestia jest zgodna

Tabela 1. Wpływ niedotlenienia prostego na włączenie ^{75}Se -selenometioniny do frakcji białkowej mózgu szczura

Table 1. Effect of simple hypoxia on ^{75}Se -selenomethionine incorporation into the rat brain protein fraction

Liczba zwierząt Number of animals	Czas ekspozycji Exposition time	Czas przeżycia po doświadczeniu Survival time after experiment	Względna radioaktywność frakcji białkowej*) Relative radioactivity of the protein fraction*)	p
9	—	—	$25,3 \pm 2,0^{**})$	—
5	10 min.	0 min.	$17,7 \pm 2,5$	< 0,001
10	30 min.	0 min.	$16,0 \pm 3,2$	< 0,001
8	30 min.	30 min.	$18,8 \pm 3,4$	< 0,001
9	30 min.	2 godz.	$21,9 \pm 4,2$	< 0,05
10	30 min.	4 godz.	$26,2 \pm 1,5$	< 0,05
8	30 min.	24 godz.	$25,4 \pm 3,2$	< 0,05

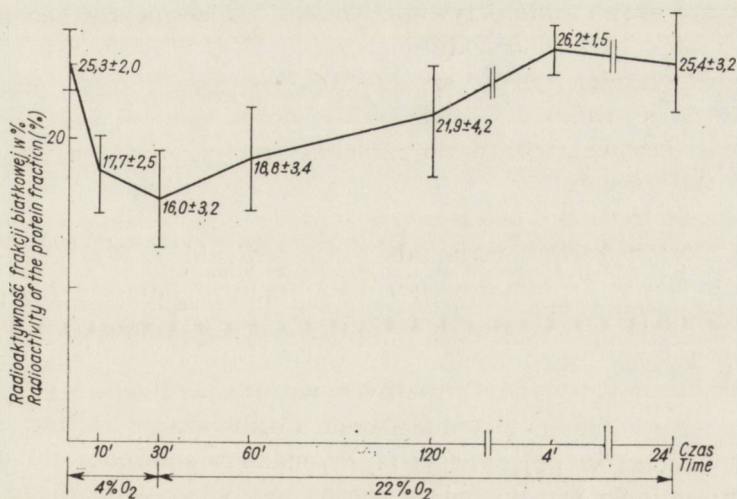
*) radioaktywność frakcji białkowej

$$\frac{\text{radioaktywność frakcji białkowej}}{\text{radioaktywność całkowita}} \times 100$$

radioactivity of the
protein fraction

$$\frac{\text{radioactivity of the protein fraction}}{\text{total radioactivity}} \times 100$$

**) wartości średnie \pm odchylenia standardowe
 mean value \pm standard deviation
 p — prawdopodobieństwo błędu
 probability of error



Schemat 2. Wpływ niedotlenienia prostego na włączenie ^{75}Se -selenometioniny do frakcji białkowej mózgu szczura. Ilustracja do tabeli 1.

Diagram 2. Effect of simple hypoxia on ^{75}Se -selenomethionine incorporation into the rat brain protein fraction.

z uprzednio poczynionymi obserwacjami, wykazującymi, że niedotlenienie proste nie prowadzi do zaburzeń w transporcie różnych związków chemicznych do mózgu, ani nie wywołuje istotnych uszkodzeń morfologicznych (Kapuściński i wsp. 1972). W poprzednich badaniach (Albrecht i wsp. 1972) wykazaliśmy również, że hypoksja prosta nie wywołuje zaburzeń we włączaniu *in vitro* znakowanego aminokwasu do białek frakcji postmitochondrialnej. Bloemstrand (1970) wykazał podobnie nikły i odwracalny wpływ niedotlenienia prostego na włączanie ^{14}C -leucyny do białek mózgu królika w doświadczeniach przeprowadzonych zarówno *in vivo*, jak też *in vitro* na skrawkach.

Tabela 2. Wpływ jednostronnego ograniczenia ukrwienia mózgu na transport ^{75}Se -selenometioniny do półkuli mózgowej po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej i na włączanie aminokwasu do frakcji białkowej (15 min. po podwiązaniu tętnicy)

Table 2. Effect of unilateral ischemia on ^{75}Se -selenomethionine transport to the brain hemisphere on the side of the ligated common carotid artery, and incorporation into proteins (15 min. after ligation of the artery)

Szczur nr Rat No.	Transport*)	Względne włączenie Relative incorporation (L/P × 100)**)
1	n***)	100,0
2	n	102,3
3	-2,4	103,1
4	-2,7	93,0
5	-2,3	94,0
6	-2,6	99,5

*) $\frac{(L/\text{gmm} - P/\text{gmm})}{L + P} \times 100$ gmm — g wet wight

***) Włączenie do półkul lewej (L) i prawej (P) wyrażono w sposób opisany w tekście i w tabeli 1. Dalsze objaśnienia w tekście.

Incorporation into the left (L) and right (P) hemispheres expressed in a way described in text and table 1. Further explanations in text.

***) n — norma — norm

Jak wynika z tabeli 2 jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, chociaż w pojedynczych przypadkach spowodowało obniżenie transportu aminokwasu do mózgu, pozostawało bez widocznego wpływu na biosyntezę białka. Również i w tym przypadku zachodzi zbieżność z brakiem wyraźnych zmian patologicznych w tkance, jakkolwiek obniżenie transportu aminokwasu świadczyć może o nieznacznym niedokrwieniu półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy.

Tabela 3. Wpływ niedotlenienia ischemiczno-hypoksyjnego na transport ^{75}Se -selenometioniny oraz jej włączenie do frakcji białkowej półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej w powiązaniu ze wzrostem masy tej półkuli

Table 3. Effect of ischemic-hypoxic hypoxia on ^{75}Se -selenomethionine transport and incorporation into proteins of brain hemisphere on the side of the ligated common carotid artery, in relation to the weight gain of the hemisphere.

Grupa Group	Czas przeżycia po doświad. Survival time after experi- ment	Ilość szczurów Number of rats					Względne włączenie Relative incorporation (L/P × 100)		
		ogółem total	bez zmian without changes	ze zmianami with changes			półkule hemispheres		
				masa weight	transport		ze zmianami with changes	bez zmian without changes	
					podwyż- szony increased	obniżony decreased			
I	0 min.	10	5	0	0	5	69,2 ± 5,6*)	88,5 ± 11,7	< 0,05
II	30 min.	9	2	4	4	1	76,1 ± 6,6	106,6 (111,8; 101,3)	< 0,001
III	2 godz.	10	4	4	5	1	61,5 ± 4,8	104,2 ± 10,5	< 0,001
IV	4 godz.	10	5	4	2	1	71,4 ± 11,5	105,2 ± 11,9	< 0,01
V	24 godz.	12	2	9	5	4	91,7 ± 9,9	99,3 (100,2; 98,4)	< 0,05

*) Wartości średnie ± odchylenia standardowe. Dalsze objaśnienia w tekście oraz w opisach do tabeli 1 i 2.

Mean value ± standard deviation. Further explanations in text and legends to Tables 1 and 2.

Skojarzenie działania niedokrwienia i niedotlenienia (półkula mózgu po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej w modelu Levine'a) powoduje u licznych zwierząt spadek poziomu włączania aminokwasu do białek półkuli po stronie podwiązanej tętnicy w stosunku do półkuli poddanej wyłącznie działaniu niedotlenienia. Spadek ten w większości przypadków pokrywa się z wystąpieniem zaburzeń w transporcie aminokwasu lub/i w masie półkuli.

W grupie zwierząt o zerowym czasie przeżycia (tabela 3, grupa I) bardzo znaczne, bo sięgające 35% obniżenie syntezy stwierdzono jedynie w tych przypadkach, w których również wystąpiło obniżenie transportu aminokwasu. W grupach z 30-minutowym oraz 2 i 4-godzinnym czasem przeżycia po doświadczeniu (tabela 3, grupa II, III i IV) uwidoczniła się również korelacja pomiędzy wystąpieniem nieprawidłowości dotyczących masy półkuli i transportu aminokwasu, a obniżeniem syntezy. Wyniki przedstawione w tabeli 3 wykazują, że częstotliwość występowania wyżej wymienionych nieprawidłowości zgodna jest z częstością stwierdzanych w mikroskopie świetlnym uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej w zastosowanym modelu doświadczalnym (Levine 1960).

Wpływ hypoksji ischemiczno-hypoksyjnej na biosyntezę białka oceniono osobno dla przypadków bez zmian oraz dla tych, w których stwierdzono przyrost masy półkuli i podwyższenie względnie obniżenie transportu aminokwasu. W wielu przypadkach przyrost masy półkuli świadczący najprawdopodobniej o pojawieniu się obrzęku mózgu, występował równolegle, albo ze wzrostem transportu, będącym wykładnikiem uszkodzenia bariery krew-mózg albo z jego obniżeniem przemawiającym bądź za niedokrwieniem, bądź obniżeniem aktywności układów enzymatycznych biorących udział w aktywnym transporcie aminokwasu. We wszystkich trzech grupach (tabela 3, grupy II, III, IV) półkule bez zmian patologicznych charakteryzowały się niezmiennym w stosunku do odpowiednich półkul kontrolnych włączaniem ^{75}Se -selenometioniny do frakcji białkowych. Natomiast półkule ze stwierdzonymi zmianami patologicznymi syntetyzowały białko z wydajnością obniżoną znamienne zarówno w stosunku do półkul poddanych wyłącznemu działaniu hypoksji, jak też w stosunku do półkul po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej, lecz nie wykazujących zarówno zmian w ich masie, jak i w transporcie aminokwasu. Świadczą o tym odpowiednie prawdopodobieństwa błędów (p). Najpoważniejszy spadek syntezy zanotowano w grupie z przeżyciem 2-godzinnym. Jest to zgodne z obserwacjami Kapuścińskiego i wsp. (1972), którzy twierdzili, że czas ten jest przełomowy dla pojawienia się zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla różnych związków chemicznych. Zgodne z wyżej wymienionymi spostrzeżeniami jest stwierdzenie w tej właśnie grupie z jednej strony najznacz-

niejszego średniego wzrostu gromadzenia się selenometioniny w uszkodzonej półkuli, z drugiej zaś znacznego przyrostu jej masy (tabela 4).

Wydaje się, że spadek biosyntezy białka w mózgu w modelu skojarzonym zachodzi dwufazowo. W pierwszej, wcześniejszej fazie jest on prawdopodobnie bezpośrednim następstwem niedostatku tlenowego i substratowego, w drugiej natomiast późniejszej fazie (czas przeżycia 30 min. — 4 godz.), kiedy jak wynika z doświadczeń nad wpływem hypoksji prostej, bezpośredni efekt niedotlenienia cofa się, globalny spadek

Tabela 4. Stopień nasilenia zmian w półkuli mózgu po stronie połączanej tętnicy szyjnej wspólnej w następstwie niedotlenienia w różnym czasie przeżycia po doświadczeniu

Table 4. Extensiveness of posthypoxic changes in the brain hemisphere on the side of the ligated common carotid artery at various times of survival

Grupa Group	Przyrost masy (L — P/L + P × 100) Weight gain	Transport*)	
		podwyższenie increase	obniżenie decrease
I	—	—	3,8 ± 1,9**)
II	3,7 ± 1,1	4,1 ± 1,1	3,3
III	4,9 ± 2,0	6,5 ± 2,2	6,1
IV	4,0 ± 0,8	2,2(1,8; 2,7)	4,5
V	7,1 ± 2,6	4,0 ± 2,0	7,0 ± 2,4

*) $\frac{(L/gmm - P)gmm}{L + P} \times 100$ gmm — g wet weight

***) Wartości średnie ± odchylenia standardowe. Ilość zwierząt oraz warunki doświadczenia w poszczególnych grupach opisano w tabeli 3. Pozostałe objaśnienia w tekście

Mean value ± standard deviation. Number of animals and experimental conditions in individual groups were as described in table 3. Further explanations in text.

syntezy wiąże się z samym uszkodzeniem tkanki. Jest to więc efekt wtórny, wynikający z wystąpienia poniedotlenieniowych uszkodzeń tkankowych. Za bezpośrednim uszkodzeniem samego układu syntetyzującego białko w tej fazie przemawiałyby wyniki uprzednio cytowanych doświadczeń in vitro (Albrecht i wsp. 1972). Ponadto, jak wynika z badań przeprowadzonych przez Yapa i Spectora (1965), zastosowanie modelu ischemiczno-hypoksyjnego powoduje znaczny spadek zawartości RNA, co może rzutować na wydajność biosyntezy białka. Należy wziąć również pod uwagę ewentualność ujawnienia się aktywności enzymów

proteolitycznych, które uwalniając się w tych warunkach z lizosomów (Becker, Barron 1961) mogłyby powodować szybszą degradację produktów syntezy.

W 24 godz. po doświadczeniu synteza białek w półkulach uszkodzonych prawie całkowicie wraca do normy (tabela 3, grupa V), choć jednocześnie towarzyszy temu pogłębienie się objawów patologicznych (tabela 4, grupa V). Trzeba się jednak liczyć z możliwością, że w niektórych przynajmniej przypadkach przytoczone tu wielkości, odnoszące się do transportu aminokwasu do mózgu, są nieco zawyżone. Może bowiem na nie rzutować zwiększona ilość izotopu zalegająca w naczyniach mózgu na skutek wtórnego przejściowego przekrwienia tkanek (Sundt i wsp. 1971). Z poprzednich naszych badań (Kapuściński i wsp. 1972) wiadomo jednak, że ta ilość stanowi tak nikły odsetek radioaktywności całkowitej mózgu, że w tych rozważaniach można było ją pominąć.

Fakt, że mimo daleko posuniętej patologii tkankowej włączanie aminokwasu do frakcji białkowej mózgu nie odbiega w tym okresie od normy nasuwa przypuszczenie, że może tu mieć miejsce wzmożony, wyrównawczy proces syntezy w proliferującym neurogleju, względnie w zachowanych, nie uszkodzonych, lub odwracalnie tylko uszkodzonych neuronach (Kozik 1972). W celu sprawdzenia słuszności jednej z tych hipotez, jak również przesłedzenia mechanizmu stymulacji syntezy białka należy przeprowadzić odrębne badania na frakcjach wzbogaconych w neurony i neuroglej. Badania takie są w toku.

WNIOSKI

1. Częściowe niedokrwienie mózgu szczura poprzez jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej nie powoduje żadnych wykrywalnych zmian w intensywności syntezy białka w półkuli po stronie zamkniętej tętnicy.

2. Proste niedotlenienie spowodowane oddychaniem mieszaniną gazową o niskiej zawartości tlenu (4%) wywołuje niewielkie, przejściowe obniżenie poziomu syntezy, cofające się całkowicie w przeciągu 4 godzin oddychania powietrzem o normalnym składzie.

3. Skojarzenie jednostronnego niedokrwienia z prostym niedotlenieniem prowadzi do znacznego obniżenia syntezy białka w półkuli po stronie podwiązanej tętnicy. Spadek intensywności syntezy, pogłębiający się w pierwszych godzinach po operacji, wiąże się u poszczególnych zwierząt z pojawieniem się zaburzeń w transporcie aminokwasu (^{75}Se -selenometioniny) do mózgu oraz z formowaniem się obrzęku półkuli mózgu. W późnych czasach po zabiegu (24 godz.) dalszemu pogłębieniu

się zmian, dotyczących masy mózgu i transportu aminokwasu towarzyszy kompensacyjny powrót syntezy białka do normy. Przypuszcza się, że kompensacja ta odbywa się z udziałem proliferującego gleju.

Я. Альбрехт

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И НЕДОСТАТОЧНОГО КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В МОЗГУ КРЫСЫ

Резюме

Двумесечные крысы расы Вистар подвергались действию следующих моделей гипоксии: в) модели простой гипоксии, сводящемуся к выдерживанию крыс в течение 30 минут в атмосфере 4% кислорода и 96% азота, б) модели частичной ишемии с левосторонней подвязкой общей сонной артерии, а также в) гипоксийно-ишемической модели (т. наз. модели Левина), представляющей собой сочетание моделей а) и б). Исследовалось влияние отдельных моделей на транспорт к мозгу и включение в его белковую фракцию аналога метионина ^{75}Se селенметионина, вводимого на 10 мин перед взятием мозга. В случае простой гипоксии было обнаружено небольшое падение включения, исчезающее после 4 часов от момента опыта. Односторонняя ишемия не вызывает никаких изменений интенсивности синтеза белка, несмотря на отчетливое снижение, в некоторых случаях, транспорта аминокислот в мозг. Зато сочетанное действие гипоксийного и ишемического факторов (модель в) вызвало значительное, достигающее 40% снижение синтеза с участием селенметионина, при чем этот эффект углублялся за период 4 часов после опыта. Падение синтеза в полушарии со стороны подвязанной общей сонной артерии почти всегда сопровождало снижение или повышение транспорта аминокислот в мозг и возникновение вазогенного отека, измеряемого приращением массы полушарий. После 24 часов зато дальнейшему углублению патологических признаков сопутствовало почти полное возвращение синтеза белка к норме. Обсуждается предполагаемый механизм возникновения выше указанных изменений.

J. Albrecht

EFFECT OF HYPOXIA AND ISCHEMIA ON PROTEIN BIOSYNTHESIS IN RAT BRAIN

Summary

Two-month old albino Wistar rats were subjected to the following models of hypoxia: a) model of simple hypoxia, consisting on a 30 minute exposure of the animal to 4% oxygen and 96% nitrogen; b) model of partial ischemia with unilateral (left side) ligation of the common caroid artery and c) ischemic-hypoxic model (so-called Levine model), resulting from the combination of models a and b. Effects of these models on ^{75}Se -selenomethionine transport to brain and its incor-

poration into brain proteins were compared, the brains having been collected 10 minutes after intravenous administration of the labelled compound. In the case of simple hypoxia a small transient decrease in incorporation level was observed, with the return to control values manifested usually within 4 hrs after exposure. Unilateral ischemia remained without effect on the intensity of protein synthesis, despite that a remarkable decrease of aminoacid transport was noted in some these cases.

A combined application of the hypoxic and the ischemic factor, however, led to a significant reduction of protein synthesis, the reduction reaching 40% in comparison with the control value. The latter effect has been gradually increasing in the course of the first 4 hrs after experiment. The drop in protein synthesis in the hemisphere at the operated side was almost always accompanied by either a decrease or increase of amino acid transport and formation of brain oedema as measured with the weight gain of the respective hemisphere. After 24 hrs, however, further development of pathological symptoms coincided with an almost complete return to control values of the protein synthesis level. A presumable mechanism of the above processes is discussed.

PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J., Kapuściński A., Januszewski S.: Effect of partial ischemia and ischemic-hypoxic hypoxia on the activity of a cellfree protein synthesizing system from rat brain. *Bull. Acad. Sci. Pol.*, 1972, XX, 4, 269—272.
2. Becker N. H., Barron K. D.: The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. I. Alteration in neuronal lysosomes identified by acid phosphatase activity. *Amer. J. Path.*, 1961, 38, 161—168.
3. Bloemstrand Ch.: Effect of hypoxia on protein metabolism in neuron- and neuroglia cell-enriched fractions from rabbit brain. *Exp. Neurol.*, 1970, 29, 175—188.
4. Broniszewska-Ardelt B., Jongkind J. F.: Effect of hypoxia on substrate levels in the brain of the adult mouse. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 2237.
5. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropatol. Pol.*, 1972, X, 1, 17—43.
6. Ibrahim M.Z.M., Pascoe E., Alam S., Michel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.*, 1970, 60, 403—415.
7. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów. *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 1, 45—64.
8. Kozik M.: Doświadczalny obrzęk neuronu w świetle badań histoenzymatycznych. *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 1, 1—15.
9. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.*, 1960, 36, 1—17.
10. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X., Schulz D. W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 18—30.

11. Mc Gee-Russel S., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell changes in rat brain. *Brain Res.*, 1970, 20, 193—200.
12. Pronaszko-Kurczyńska A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 281—294.
13. Spataro J.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rat brain. *Exp. Neurol.*, 1966, 16, 16—27.
14. Sundt T. M., Waltz A. G.: Cerebral ischemia and reactive hyperemia. Studies of cortical blood flow and microcirculation before, during after temporary occlusion of middle cerebral artery of squirrel monkeys. *Circulation Res.*, 1971, 28, 426—433.
15. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDPglucose: glycogen α -glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.11) and α -1,4-glucan: ortophosphatase glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.1) activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropath.* (Berlin), 1971, 19, 242—248.
16. Thorn W., Mueldener B., Scholl H., Pfeleiderer W.: Stoffwechselforgänge in Gehirn bei normaler und herabgesetzter Temperatur unter ischemischer und anoxischer Belastung. *J. Neurochem.*, 1958, 2, 150—165.
17. Yap S. L., Spector R. G.: Intracellular enzyme changes in postanoxic rat brain. *Brit. J. Exp. Path.*, 1965, 46, 422—433.

Adres autora: Zespół Neuropatologii CMD i K, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

JÓZEF TARMAS

A STUDY ON THE INTRANUCLEAR DISTRIBUTION
OF ACID PHOSPHATASE IN SOME NUCLEI OF BRAIN-STEM
RETICULAR FORMATION
OF THE RABBIT AND GUINEA-PIG

Department of Anatomy, Biological Morphological Institute Medical School,
Białystok

Head: doc. dr J. Tarmas

During the last ten years detailed studies on the intraneuronal distribution of acid phosphatase in the various brain regions of various groups of animals have been performed. However, the studies on location and activity of this enzyme in neurons of the reticular formation have been restricted as yet only to a few papers (Abramowicz 1970, La Velle et al. 1954, Santolaya, Rodriguez 1967, Sopek 1970, Tarmas, Gałasińska-Pomykoł 1972). In nearly all the above mentioned papers intracytoplasmic localization and activity of acid phosphatase was observed.

It has recently been found that the intranuclear acid phosphatase is present in some neurons of central nervous system of a number of animals (Sood, Tewari 1969). So far this problem has not been studied in neurons of the reticular formation.

The present study aimed to localize the distribution of intranuclear acid phosphatase and to consider the activity of this enzyme in the neurons of *nucleus reticularis gigantocellularis*, *nucleus reticularis pontis oralis et caudalis* of the rabbit and guinea-pig.

MATERIAL AND METHODS

Examinations were carried out on ten normal healthy adult rabbits and ten guinea-pigs, living in the standard conditions of local environment and diet. The brain-stems of animals not anesthetized were removed as quickly as possible from the decapitated donors and placed in Backer's solution at 4°C for 18 hours.

Serial sagittal and transverse frozen sections 7, 10 or 20 μ thick were cut. Gomori's histochemical method was applied, using the acid phosphatase marker test with sodium β -glycerophosphate-lead nitrate at pH 5.0—5.4 (Pears, 1961). Sections were subjected to short periods of incubation from 30 to 90 minutes only and suitable controls were made at the same time. The time of incubation has been restricted to a minimum period to avoid the false nuclear localization of acid phosphatase (Deane 1963).

RESULTS

In the neurons of different sizes forming the *nucleus reticularis gigantocellularis*, *nucleus reticularis pontis oralis et caudalis*, small, spherical intranuclear granules, giving a positive reaction for acid phosphatase, are visible. Generally speaking they are similar to the lysosomes observed in the perikaryon.

The magnitude, quantity and localization of those granules as well as their coloration which varied from dark-brown to golden in the nucleus are dependent on the distribution of acid phosphatase in the perikaryon and its processes and on the location and size of the nucleus and nucleolus.

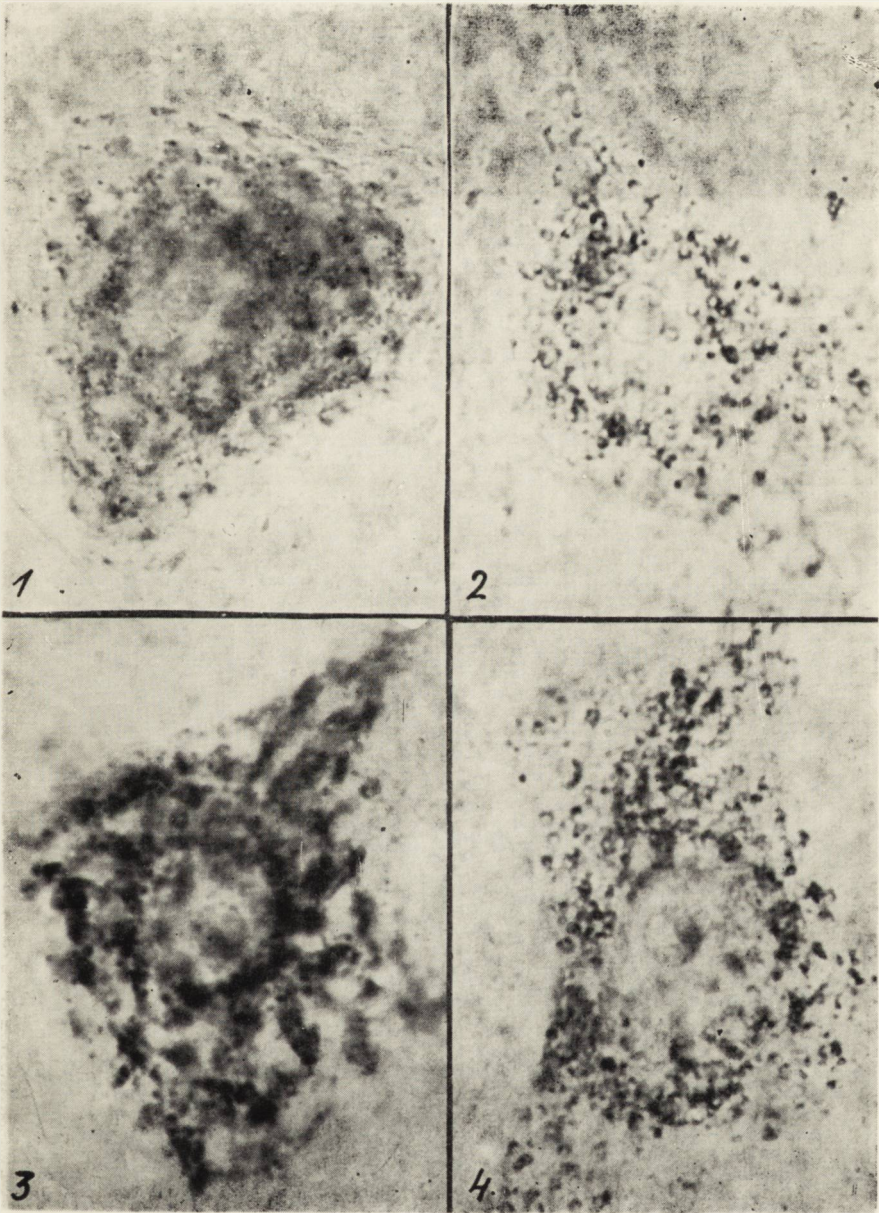
In the giant and large neurons with regular or almost regular distribution of the enzyme in the perikaryon and its processes and a centrally located nucleolus, the dark-brown and bigger acid phosphatase positive granules are distributed near the inner surface of the nuclear membrane and on the nucleolar periphery (Fig 1). In the rest mass of the nucleus there are only, single granules.

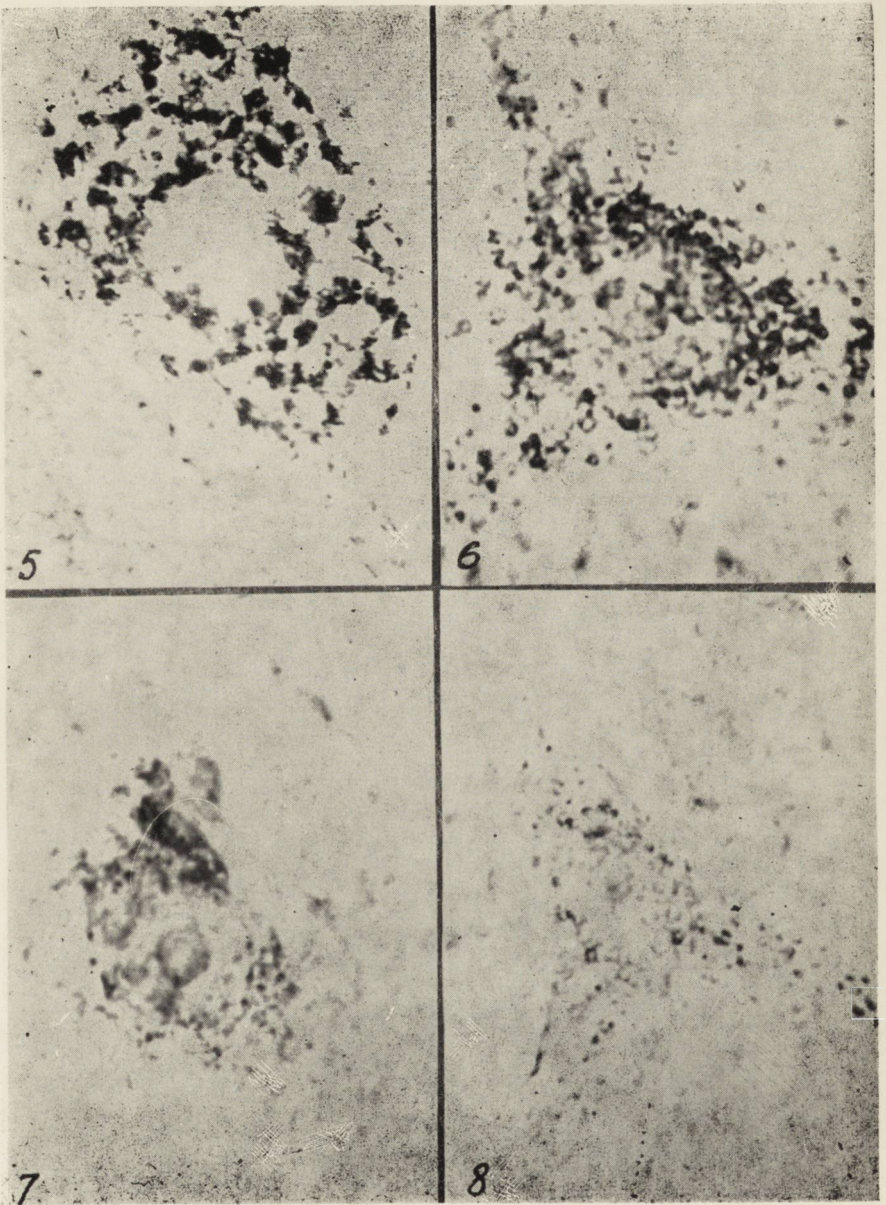
In the less numerous nerve cells with a centrally located enlarged nucleolus and regular or almost regular distribution of acid phosphatase in the neuroplasm, the perinucleolar granules give, on the whole, a weak or negative reaction (Fig. 2).

The intensively positive granules situated near the inner surface of the nuclear membrane are also found in the neurons with a concentration of the enzyme in the paranuclear zone of the neuroplasm (Fig. 3).

In the other nerve cells with the enzymatic activity limited to only part of perikaryon i.e. to one pole or to part of the paranuclear zone, the intranuclear peripheral and perinucleolar granules giving an intense phosphatase reaction are found on the latter side.

The slightly positive acid phosphatase and less numerous intranuclear granules are observed in those neurons, in which this enzyme is accumulated in the peripheral zone of the perikaryon and its processes.





In a few neurons with different forms of the enzymatic distribution in the cytoplasm, the acid phosphatase activity appears to be solely confined to the perinucleolar zone (Fig. 4).

In addition to the aforesaid patterns of intranuclear location of acid phosphatase some of the neurons reveal complete absence of this enzyme in the nuclei (Fig. 5).

In the medium sized and small neurons of the reticular formation nuclei, the intranuclear acid phosphatase positive granular bodies are similar to those in the giant and large nerve cells.

In comparison with the previously described neurons, the medium sized and small nerve cells on the whole in the test for acid phosphatase stain more intensely (Fig. 6).

In the medium sized and small neurons in which, as a rule, the distribution of the enzyme in the perikaryon is irregular the number of intranuclear granules and their acid phosphatase activity vary (Fig. 7).

Frequently in one and the same group of nerve cells, neurons with intensely positive nuclei and others with totally negative nuclei are seen intermingled.

In some neurons with the arrangements of enzymatic activity distributed particularly in the central zone of the cytoplasm, the perinucleolar and peripheral location of the granules intensely stained for acid phosphatase in the nucleus is visible.

However the nerve cells revealing an accumulation of the enzyme in the processes and in peripheral zone of the neuroplasm, give a weak or negative acid phosphatase reaction in the nucleus (Fig. 8).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In most of the giant, large, medium sized and small neurons forming the *nucleus reticularis gigantocellularis* or *nucleus reticularis pontis oralis et caudalis*, besides the various forms of acid phosphatase distribution and activity in the neuroplasm, a positive reaction for this enzyme was found in the cell nuclei.

This reaction appeared in varying number of small spherical bodies, similar to the lysosomal granules in the neuroplasm. They were usually located near the surface of the nucleolus and the inner surface of nuclear membrane.

However in the other cells particularly these with acid phosphatase positive material accumulated in the peripheral zone of the perikaryon and its processes and frequently with enlarged or extracentrally located

nucleolus, the acid phosphatase reaction in the nucleus was weak or absent.

Similar variations in intranuclear distribution of acid phosphatase in the neurons of olfactory lobes from animals like cat, guinea-pig, bat, rat, mouse, chicken, uromastrix, wall lizard, frog and toad have been described recently (Sood, Tewari 1969). In comparison with the results obtained by the authors mentioned above, it was found in our material that the positive acid phosphatase reaction occurred at the nuclear surface but that this reaction could not be incontestably detected within the nucleolus. Neither did we observe the homogenous staining of the nuclei as described by these authors in the neurons of olfactory lobe from rat, guinea-pig, mouse and wall lizard.

The results of our observations to date on the positive Gomori reaction in the nuclei of various neurons indicate that this phenomenon is not accidental but reproducible in methodical conditions revealing the lysosomal acid phosphatase in the neuroplasm.

A strong argument against the artefactual nature of such positive bodies emerges from the fact that in the groups of cells we have observed neurons with and without intranuclear granules which were found lying side by side, despite the fact that these groups of cells were subjected to the same physical and histochemical treatment. The artefactual nature of the intranuclear positive bodies is also contraindicated by the variations of their distribution in the nuclei of neurons of the same shape and size.

The reaction for acid phosphatase, an enzyme that together with the proteases forms part of the group of hydrolases identified within the lysosomes, is considered by Novikoff as specific for the identification of lysosomes (Novikoff 1963, 1967).

Thus the problem arises as to which structures, the intranuclear acid phosphatase positive granules are homologous and further as to what is the possible role of acid phosphatase at these sites.

On comparing Sood's and Tewari's (1969) observations and suggestions with the results of our studies on serial sections stained by galloycyanine or for acid phosphatase, we are in agreement that the small spherical bodies in the nuclei are comparable with ribonucleoprotein bodies.

The presence of acid phosphatase activity in these granular bodies acquires then considerable interest since it has been established that acid phosphatase is concerned with protein synthesis (Eránkő 1951, Novikoff 1961, 1967, Pearse 1961). On the other hand, the opinion that, like most other proteins, the acid phosphatase demonstrable in Golgi

vesicles and saccules is synthesized on ribosomes (Novikoff 1967), indicate some interdependence between this enzyme and nucleoproteins.

Comparing the present and our previous studies on the distribution of DNA, RNA, acid phosphatase, the nucleoprotein and glycogen in the neurons of the reticular formation (Tarmas, Gałasińska-Pomykał 1972) with the observations obtained by Sood and Tewari (1969), it seems to us reasonable to assume that there are direct relations between the nucleoprotein synthesis and the activity of acid phosphatase in the nuclei. This opinion may also find confirmation in investigations on the effect of effort and exhaustion (Gabrielescu, Bordeianu 1968) or stress and overstimulation (Benetato et al. 1965) on the activity of the neutral and acid proteases and acid phosphatase, the activity of which increases or decreases and distribution changes in the neurons as a result of those factors.

J. Tarmas

BADANIA NAD WEWNĄTRZJĄDROWYM ROZMIESZCZENIEM KWAŚNEJ
FOSFATAZY W NIEKTÓRYCH JĄDRACH UKŁADU SIATKOWATEGO
PNIA MÓZGU KRÓLIKA I ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

W pracy opisano rozmieszczenie wewnątrzjądrowe oraz aktywność kwaśnej fosfatazy w neuronach *nucleus reticularis gigantocellularis* oraz *nucleus reticularis pontis oralis et caudalis* królika i świnki morskiej. Stwierdzono korelację pomiędzy różnymi postaciami rozmieszczenia i aktywności kwaśnej fosfatazy w cytoplazmie, jak również wielkością i lokalizacją jąderka, a rozmieszczeniem tworów wewnątrzjądrowych o pozytywnym odczynie na kwaśną fosfatazę. Omówiono argumenty przemawiające za prawidłowością lokalizacji enzymu na podstawie aktywności metabolicznej stwierdzonej w jądrach niektórych neuronów.

Ю. Тармас

ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В НЕКОТОРЫХ ЯДРАХ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ СТВОЛА МОЗГА КРОЛИКА И МОРСКОЙ СВИНКИ

Резюме

Подробно описана внутриядерная локализация и активность кислой фосфатазы в нейронах *nucleus reticularis gigantocellularis* и *nucleus reticularis pontis oralis et caudalis* кролика и морской свинки. Обнаружена корреляция между разными образами локализации и активности кислой фосфатазы

в цитоплазме, а также величиной и локализацией ядрышка а распределением внутриядерных образований с положительной реакцией на кислую фосфатазу.

Обсуждаются аргументы говорящие за нормальной локализацией энзима на основании метаболической активности, обнаруженной в ядрах некоторых нейронов.

REFERENCES

1. Abramowicz, S.: Cytoarchitektonika i cytochemia jądra siatkowatego mostu ogonowego u królika. *Folia Morph.*, 1970, 29, 217—229.
2. Benetato, G.; Gabrielescu, E.; Stonescu, L.; and Bordeianu, A.: The histochemistry of proteases in the nervous system in the course of the stimulation process. *Rev. Roum. Physiol.*, 1965, 2, 13—22.
3. Deane, H. W.: Nuclear location of phosphatase activity: Fact or Artefact? *J Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 443.
4. Eránkö, O.: Histochemical evidences of intense phosphatase activity in the hypothalamic magnocellular nuclei of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 1951, 24, 1—6.
5. Gabrielescu, E.; and Bordeianu, A.: Histochemical study of the implication of certain tissue hydrolases in effort and exhaustion., *Acta Histochemica*, 1968, 31, 319—329.
6. Novikoff, A. B.: Lysosomes and related particles. In: *The Cell*, Ed. J. Brachet and A.E. Mirsky, New York, Academic Press, 1961, 423—488.
7. Novikoff A. B.: Lysosomes in the physiology and pathology of cell contribution of staining methods. In: *Lysosomes.*, Ed. A.V.S. Reuck and M.P. Cameron, Churchill Ltd., London 1963, 36—73.
8. Novikoff A. B.: Lysosomes in nerve cells. In: *The Neuron*. Ed. H. Hyden, Elsevier Publ. Comp., Ch. 7, London, 1967, 319—377.
9. La Velle, A.; Chan-Nao Lin, and La Velle, T. W.: Acid phosphatase activity as related to nuclei and sites in the nerve cell. *Anat. Rec.*, 1954, 119, 305—323.
10. Pearse, E.A.G.: *Histochemistry, theoretical and applied*. Churchill Ltd., London 1961, p. 881.
11. Santolaya, R. C., and Rodriguez, E. M.: The Reticular Substance of the medulla oblongata of the albino rat. *Z. Zellforsch.*, 1967, 79, 537—549.
12. Sood, P. P., and Tewari, H. B.: A comparative study on the distribution of acid phosphatase and its functional significance in nuclei of the olfactory neurons of vertebrates. *Acta Histochem.*, 1969, 32, 331—340.
13. Sopek, M.: Cytoarchitecture and cytochemistry of the neurons of the lateral reticular nucleus of the medulla oblongata in the rabbit. *Fol. Morph.*, 1970, 29, 51—66.
14. Tarmas, J., Gałasińska-Pomykoł, I.: Cytomorfologia i cytochemia jądra siatkowatego mostu głowowego królika. *Roczniki Akad. Med.*, Białystok 1972, 17, in press.

Author's address: Białystok, Wesołowskiego 8/26.

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1. Giant neuron from reticular pontis oral nucleus of rabbit. AcPase positive granules located perinucleolary and at inner surface of nuclear membrane and near regular distribution of AcPase in neuroplasm. $\times 1600$.

Ryc. 1. Neuron olbrzymi jądra przedniego siatkowatego mostu u królika. Ziarna o dodatnim odczynie na kwaśną fosfatazę zlokalizowane okołojąderkowo i na wewnętrznej powierzchni błony jądrowej oraz prawie regularne rozmieszczenie fosfatazy kwaśnej w neuroplazmie. Pow. 1600 \times .

Fig. 2. Great neuron from reticular gigantocellular nucleus of guinea-pig. Almost regular distribution of AcPase positive granules in neuroplasm and enlarged nucleolus giving weak reaction to AcPase. $\times 1600$.

Ryc. 2. Neuron wielki z jądra siatkowatego olbrzymiokomórkowego u świnki morskiej. Prawie regularne rozmieszczenie produktów reakcji enzymatycznej w neuroplazmie oraz powiększenie jąderka, dającego słabą reakcję na kwaśną fosfatazę. Pow. 1600 \times .

Fig. 3. Great neuron from the same nucleus of rabbit. Positive granules at the inner surface of nuclear membrane and perinuclear aggregations of terminal products of enzymatic reaction in cytoplasm. $\times 1600$.

Ryc. 3. Neuron wielki z tego samego jądra u królika. Dodatkowo ziarna na wewnętrznej powierzchni błony jądrowej i okołojądrowe skupiska produktów reakcji enzymatycznej w cytoplazmie. Pow. 1600 \times .

Fig. 4. Great neuron from reticular pontis oral nucleus of rabbit. Intense positive granules on surface of nucleolus and accumulation of AcPase positive granules in perinuclear zone of cytoplasm. $\times 1600$.

Ryc. 4. Neuron wielki z jądra przedniego siatkowatego mostu u królika. Intensywnie dodatnie ziarna na powierzchni jąderka oraz nagromadzenie produktów reakcji enzymatycznej w strefie okołojądrowej cytoplazmy. Pow. 1600 \times .

Fig. 5. Giant neuron. Completely negative nucleus and irregular distribution of aggregations of AcPase positive granules in neuroplasm. $\times 1600$.

Ryc. 5. Neuron olbrzymi. Całkowicie ujemne jądro i nieregularne rozmieszczenie skupisk końcowych produktów reakcji enzymatycznej w neuroplazmie. Pow. 1600 \times .

Fig. 6. Medium sized neuron of reticular pontis oral nucleus of rabbit. Proportionally intense reaction in nucleolus and particularly in cytoplasm. $\times 1600$.

Ryc. 6. Neuron średniej wielkości z jądra przedniego siatkowatego mostu u królika. Proporcjonalnie intensywna reakcja w jąderku i szczególnie intensywna w cytoplazmie. Pow. 1600 \times .

Fig. 7. Medium sized neuron from reticular pontis caudal nucleus of guinea pig. Almost regular distribution of AcPase activity in cytoplasm and weak AcPase reaction in nucleus. $\times 1600$.

Ryc. 7. Neuron średniej wielkości z jądra siatkowatego ogonowego mostu u świnki morskiej. Prawie regularne rozmieszczenie aktywności enzymatycznej w cytoplazmie i słaba reakcja na kwaśną fosfatazę w jąderku. Pow. 1600 \times .

Fig. 8. Small neuron from the same nucleus. Peripheral distribution of enzymatic activity in cytoplasm and weak reaction in perinuclear region. $\times 1600$.

Ryc. 8. Mały neuron z tego samego jądra. Obwodowe rozmieszczenie aktywności enzymatycznej w cytoplazmie i słaba reakcja w strefie okołojądrowej. Pow. 1600 \times .

HANNA SZYDŁOWSKA, ELŻBIETA JUNIKIEWICZ

METODA OTAN W TECHNICIE PARAFINOWEJ *

Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii AM, w Krakowie
Kierownik: doc. dr S. Stefanko

Metoda OTAN ujawnia zarówno fosfolipidy, jak i cholesterol oraz estry trójglicerydów, różnicując je równocześnie, dzięki odmiennemu zabarwieniu (Adams 1965, Adams, Bayliss 1963). Mimo krytycznego ustosunkowania się do tej metody niektórych autorów (Elleder, Lojda 1968a, 1968b, Lojda, Elleder 1968) jest ona często używana w badaniach osłonek mielinowych, zwłaszcza w obręku mózgu (Kałuża 1969), ponieważ pozwala ujawnić zmiany, zachodzące w osłonkach mielinowych wyraźniej, niż inne stosowane dotychczas metody. Wadą metody jest konieczność przeprowadzenia barwień na materiale skrawanym na mikrotomie do zamrażania i zamykania preparatów w żelu glicerolowym. Związana z tą techniką dość znaczna grubość skrawków (10—15 mikronów) i współczynnik załamania światła żelu glicerolowego, odmienny niż balsamu kanadyjskiego utrudniają obserwację poszczególnych włókien istoty białej, szczególnie w dużych powiększeniach.

Podobieństwo wyników barwienia skrawków parafinowych i krajanych na mikrotomie do zamrażania, uzyskane przez Elledera i Lojdę (1968b) w badaniach nad wybiórczością metody, skłoniło nas do przeprowadzenia prób barwienia metodą OTAN skrawków parafinowych.

Materiał utrwalany w formolu 4% lub w formalinie wapniowej Bakera odwadnianio i zatapiano w parafinie, zgodnie z przyjętymi zasadami.

Skrawki grubości 5—7 mikronów, po odparafinowaniu przenoszono z wody do mieszaniny złożonej z 1 części 1% roztworu OsO_4 i 3 części 1% roztworu KClO_3 na 18 godzin, w temp. pokojowej (jak w oryginalnej metodzie).

Następnie skrawki płukano przez 10 min. w wodzie destylowanej i przenoszono do wodnego roztworu α -naftyloaminy na 20 min. w temp. 37°C .

* Metoda OTAN — osmium tetroxide- α -naphtylamine method (Adams 1959).

Nasycony wodny roztwór α -naftyloaminy sporządzono zgodnie z oryginalną metodą, dodając α -naftyloaminę do wody destylowanej, ogrzanej do 40°C. Po 24 godzinach roztwór filtrowano.

Skrawki płukano wodą destylowaną przez 5 min i podbarwiano przez 2 min. (dwukrotnie dłużej niż w metodzie oryginalnej) 2% roztworem błękitu alcjawanowego w 5% kwasie octowym.

Następnie skrawki płukano wodą bieżącą, wodą destylowaną i odwadniano krótko w alkoholach: 70%, 85% i 96%, prześwietlano w 2 zmianach ksylenu i zamykano w balsamie kanadyjskim, lub w DPX, inaczej niż w oryginalnej metodzie, która zaleca zamykanie skrawków w żelu glicerolowym.

Hydrolizę skrawków w 2N NaOH dla zabarwienia wyłącznie sfingomieliny i lipidów odpornych na działanie zasad (Adams, Bayliss 1963) przeprowadzano na skrawkach przed naklejeniem ich na szkiełka podstawowe. Po rozprostowaniu skrawków w ciepłej wodzie na szalce Petriego, ostrożnie zlewano wodę, a szalkę napełniano roztworem 2N NaOH, w którym skrawki pozostawały przez 1 godz., w temp. 37°C. Następnie zlewano roztwór NaOH i szalkę na 1 min. napełniano kwasem octowym, a po zlianiu kwasu octowego — wodą.

Wyplukane skrawki naklejano na szkiełka podstawowe i suszono przez 24 godz. w zwykły sposób. Po odparafinowaniu barwiono je metodą OTAN.

Uzyskane wyniki pokrywają się z wynikami, uzyskanymi na skrawkach sporządzonych na mikrotomie mrożonym, jeśli materiał został utrwalony w formalinie wapniowej Bakera. W materiale utrwalonym w formolu 4% fosfolipidy barwią się słabiej.

Г. Шидловска, Е. Юникевич

МЕТОД ОТАН В ПАРАФИННОЙ ТЕХНИКЕ

Резюме

Работа является попыткой адаптации метода ОТАН для материала затопленного в парафине. Полученные результаты представленным методом не отличаются от результатов, полученных на срезах, произведенных на замораживающем микротоме; значительно тоньше чем замораживаемые парафиновые срезы облегчают наблюдения при больших микроскопических увеличениях.

H. Szydłowska, E. Junikiewicz

OTAN METHOD IN THE PARAFFIN TECHNIQUE

Summary

An adaptation of the OTAN method to material embedded in paraffin was attempted. The results obtained by this method do not differ from those on microtome sections prepared for freezing. The paraffin sections much thinner than the frozen ones make easier the observations at high microscopic magnifications.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams C.W.M.: *Neurochemistry*. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, N. York 1965.
2. Adams C.W.M., Bayliss O. B.: Histochemical observations on the localization and origin of sphingomyelin, cerebroside and cholesterol in the normal and atherosclerotic human artery. *J. Path. Bact.*, 1963, 85, 113—119.
3. Adams C.W.M., Bayliss O. B.: Reappraisal of Osmium Tetroxide and OTAN histochemical reactions. *Histochemie*, 1968, 16, 162—166.
4. Elleder M., Lojda Z.: Remarks on the detection of osmium derivatives in tissue sections. *Histochemie* 1968a, 13, 276—282.
5. Elleder M., Lojda Z.: Remarks on the OTAN reaction. *Histochemie*, 1968b, 14, 47—64.
6. Kałuża J.: Badania zmian demielinizacyjnych w doświadczalnym obrzęku mózgu. Streszczenia I Konferencji Stow. Neuropat. Pol., Warszawa, marzec 1969.
7. Lojda Z., Elleder M.: Reappraisal of Osmium Tetroxide and OTAN histochemical reactions. Comments about the Paper of C.W.M. Adams a. O.B Bayliss. *Histochemie*, 1968, 16, 167—169.

Adres autorek: Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologicznego AM. Kraków, ul. Botaniczna 3.

TREŚĆ

M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, K. Renkawek: Contribution des études des cellules d'Opalski à la connaissance de la pathogenèse de lésions du système nerveux central dans les maladies hépatocerebrales . . .	385
✓ M. Kozik, B. Arcimowicz, J. Dembczyński: Analiza laserowa zawartości niektórych kationów w mózgu w chorobach układu pozapiramidowego . . .	395
Z. Kraśnicka, J. W. Borowicz, B. Gajkowska: Ultrastruktura komórki glejowej z hodowli tkankowej in vitro	401
M. Ostenda: Badania histochemiczne komórek glejowych napromienianych in vitro dawką 5000 r promieni gamma	413
I. B. Zelman: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy	423
J. Kałuża, Z. Kowalska: Badania nad transformacją śródnowotworową guzów glejopochodnych in vitro w hodowli długotrwałej i pasażowanej . . .	435
J. Strosznajder, A. Gromek, J. Łazarewicz: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich . . .	447
✓ J. Albrecht: Wpływ niedoślenienia i niedokrwienia na biosyntezę białka w mózgu szczura	457
J. Tarmas: A study on the intranuclear distribution of acid phosphatase in some nuclei of brain-stem reticular formation of the rabbit and guinea-pig	471
H. Szydłowska, E. Junikiewicz: Metoda OTAN w technice parafinowej . . .	479

СОДЕРЖАНИЕ

М. Е. Моссаковски, З. Красъница, К. Ренкавек: Значение исследований клеток Опальского в познании патогенеза повреждений центральной нервной системы в печеночно-мозговых болезнях	385
М. Козик, Б. Арцимвич, Я. Дембчински: Лазерный анализ содержания некоторых катионов в болезнях экстрапирамидной системы	395
З. Красъница, Е. В. Борович, В. Гайковска: Ультраструктура глиальных клеток из тканевой культуры	401
М. Остенда: Гистохимические исследования глиальных клеток облученных дозой 5000 р гамма-лучей	413
И. Б. Зельман: Изменения в центральной нервной системе крысы после внутримозговой инъекции строфантина	423
Ю. Калужа, З. Ковальска: Исследования внутриопухолевой трансформации глиогенных опухолей в культуре долгосрочной и пассажированной	435
Я. Штрошнайдер, А. Громек, Е. Лазаревич: Влияние ишемии на содержание свободных жирных кислот в мозгу морских свинок	447
Я. Альбрехт: Влияние гипоксии и недостаточного кровоснабжения на биосинтез белка в мозгу крысы	457
Ю. Тармас: Исследования внутриядерной локализации кислой фосфатазы в некоторых ядрах ретикулярной формации ствола мозга кролика и морской свинки	471
Г. Шидловска, Е. Юникевич: Метод OTAN в парафинной технике	479

CONTENTS

M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, K. Renkawek: Contribution des études des cellules d'Opalski à la connaissance de la pathogenèse de lésions du système nerveux central dans les maladies hépatocérebrales	85
M. Kozik, B. Arcimowicz, J. Dembczyński: Laser analysis of the content of some cations in diseases of the extrapyramidal system	395
Z. Kraśnicka, J. W. Forowicz, B. Gajkowska: Ultrastructure of glial cells in tissue culture in vitro	401
M. Ostenda: Histochemical studies of glial cells irradiated in vitro with a 5000 r dose of gamma rays	413
I. B. Zelman: Changes in the central nervous system of rat after intracerebral injection of ouabaine	423
J. Kałuża, Z. Kowalska: Investigations on endoneoplastic transformation of gliomas in long-term culture and subcultures in vitro	435
J. Strosznajder, A. Gromek, J. Łazarewicz: Effect of ischemia on the free fatty acid content in guinea pig brain	447
J. Albrecht: Effect of hypoxia and ischemia on protein biosynthesis in rat brain	457
J. Tarmas: A study on the intranuclear distribution of acid phosphatase in some nuclei of brain-stem reticular formation of the rabbit and guinea-pig	471
H. Szydłowska, E. Junikiewicz: OTAN method in the paraffin technique	479

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie — zł 100.—

półrocznie — zł 50.—

Institucje 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.

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

*

Quarterly "Neuropatologia Polska" appearing since 1963, as an official Journal of Polish Association of Neuropathologists publishes papers in the field of: Clinical and Experimental Neuropathology, Neurooncology, Neurochemistry and Neuroanatomy.

Yearly subscription US \$ 12.— (prices in other currencies are the effective exchange rates in relation to the currency quoted above). Subscriptions from abroad should be paid to Ars Polona-Ruch account No 1595-006-71000 through the Bank Handlowy S.A. Warsaw, Poland.

Indeks 36910

Zakł. Graf. „Tamka”. Z. 2. Zam. 201. Pap. ilustr. kl. III. 80 g. B1.
Nakład 437 + 23 egz. Ark. druk. 6,25 + 1,375. A-73.