

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XI

1973

ZESZ. 4

WARSZAWA

egz 2
p. 165
p. 105

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XI

Październik – Grudzień 1973

Nr 4

KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Groniowski (Warszawa), *Hanna Jędrzejowska* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Szczecin), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Danuta Markiewicz* (Pruszków), *Mirostlaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmina 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 ŚCISŁA

Janusz Groniowski, *Adam Kunicki*, *Mirostlaw Mossakowski*, *Ewa Osetowska*, *Mieczysław Wender*

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmina Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Tadeusz Majdecki*
Sekretarz techniczny: *Władysława Smolińska*

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 45-56-76

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA

THE GANGLIOSIDE PATTERN IN DEMYELINATING
LESIONS OF THE BRAIN *)Department of Neurology, Institute of Diseases of Nervous System and Sensory
Organs, Medical Academy, Poznań

The sialic acid-containing group of tissue glycosphingolipids, known as gangliosides is found predominantly in the grey matter of the brain as one of the constituents of neuronal membranes and of synaptic junctions. Owing to the recent progress in the field of analytical chemistry of lipids, it has been possible to identify also in the cerebral white matter at least 6 different gangliosides, differing from each other by their molecular structure and composition (Suzuki, 1965). The individual gangliosides may be distinguished by the number and position of monosaccharides and by the number of sialic acid molecules constituting the nonlipid part of the ganglioside molecule. With these observations as basis, some primary investigations were performed, dealing with changes of the ganglioside pattern in the cerebral white matter in various diseases of the central nervous system. Apart from deviations observed in storage diseases such as the GM₁, GM₂ and other types of gangliosidoses, where the alterations found in the white matter are only a side effect of the pathological process affecting mainly the neurocytes data available are, showing disting alterations both as regards total ganglioside content and the contribution of individual ganglioside fractions in leucodystrophies, in inflammatory as well as in degenerative processes in the central nervous system (Norton et al., 1966; Kishimoto et al., 1967; Cumings, Goodwin, 1968; Suzuki et al., 1970).

In view of these observations our investigations dealing with the ganglioside pattern of the cerebral white matter in diseases associated with myelin decomposition may be of interest. Special attention has been devoted to the apparently normal white matter of multiple sclerosis cases, i.e. to the problem which lies in the focus of interest of those who are concerned with the neurochemistry of that disease (Alling et al. 1971; Wender et al., 1973).

*) This investigation was supported by NIH PL 480 Research Agreement No. 05-027-1.

MATERIAL AND METHODS

The investigated material covers 8 cases of multiple sclerosis, 1 myelinopathy caused by CO intoxication, 1 case of the Marchiafava-Bignami disease, 2 cases of subacute sclerosing leucoencephalitis, 3 cases of leucodystrophy (one sudanophilic leucodystrophy, one of the Krabbe type — published by Adamczewska and Kulczycki, 1972, and one case Pelizaeus-Merzbacher disease), 1 case of spontaneous progressive multifocal leucoencephalopathy — published by Markiewicz et al. (1972), and 2 cases of postcomatous encephalopathy.

The pathological material was compared with 14 control specimens, from adults and children. Eight adult brains derived from persons aged 16—46, who had died in accidents, and who did not suffer from evident cerebral injury. The infants' brains were taken from children who died from other than neurological reasons. The pathological and control brains were formaline-fixed specimens.

The total gangliosides were isolated from brain slices by means of the extraction procedure of Folch et al. (1957), and were further separated and quantitatively estimated by the method of Suzuki (1964).

Extraction of gangliosides. A weighed portion of white matter slices was homogenized in 20 volumes of chloroform : methanol (2 : 1, v/v) and filtered. To the so obtained lipid extract 0.2 vol. of 0.05 M NaCl was added, and the mixture was vigorously shaken on a vortex mixer. After separation of phases the upper one was sucked off and the walls of the tube rinsed twice with the "solvent upper phase". The combined upper phase and rinsing solvent were taken down to dryness in a rotatory evaporator. The dry residue containing the gangliosides was extracted with chloroform : methanol 2 : 1, the undissolved material was filtered off, and the so obtained extract evaporated under a stream of nitrogen. The residue was again dissolved in a small volume of chloroform : methanol 2 : 1 and used for separation of gangliosides by means of thin-layer chromatography.

Chromatography and quantitative estimation. The purified ganglioside extract, corresponding to ca 20 mg of white matter was spotted on a thin-layer plate coated with silica gel B (Merck) and the plates were developed with n-propanol-water (7 : 3, v/v) by means of ascending chromatography. The separated gangliosides were visualized by exposing the plates to iodine vapour. After complete sublimation of iodine, the outlined areas containing the individual gangliosides, and the corresponding blank areas of silica gel were scraped off, 0.5 ml of H₂O was added, and the whole was vigorously shaken. A few minutes later the resorcinol reagent was added and the colour developed on a boiling water bath.

The resulting colour was extracted into butyl acetate-butanol (85 : 15) and the optical density of the solution was read at 580 m μ in a „Spectronom” spectrophotometer.

The individual ganglioside fractions were identified by comparing their positions to reference gangliosides GM₁ and GM₂ (the main monosialogangliosides), contained in fraction III of purified ganglioside from bovine brain, prepared according to the method of Gammack (1963), produced by Sigma, Chemical Company (St. Louis, USA).

RESULTS

The results of our investigations of the ganglioside pattern of mature cerebral white matter in diseases characterized by myelin decomposition are presented in Table 1. The ganglioside composition of the apparently normal white matter of multiple sclerosis cases did not reveal any significant alterations. Likewise, a normal pattern was observed in CO-induced myelinopathy.

In the Marchiafava-Bignami disease, however, a twofold increase of the relative content of monosialogangliosides G₄ (GM₁) and G₅ (GM₂) at the expense of the G₀ and G₁ fractions was noted.

The results of investigations of infantile white matter in demyelinating diseases are shown in Table 2. The most apparent changes in the ganglioside spectrum have been observed in cases of subacute sclerosing leucoencephalitis. The percentage of disialoganglioside G₂ (GD_{1b}) and of trisialoganglioside G₁ (GT₁) was increased and that of the basic monosialoganglioside G₄ (GM₁) appeared in this disease markedly decreased. Less pronounced alterations of the ganglioside spectrum were found in sudanophilic leucodystrophy, in Krabbe's leucodystrophy and in progressive multifocal leucoencephalopathy cases.

On the contrary, the ganglioside pattern of the cerebral white matter in the Pelizaeus-Merzbacher disease as well as in a postcomatous encephalopathy was perfectly normal.

DISCUSSION

The intracellular localization of gangliosides in the cerebral white matter has so far not been ascertained in detail. The reported large differences in the content of gangliosides in myelin preparations isolated by means of preparative ultracentrifugation could indicate that the ganglioside contribution should rather be interpreted in terms of contaminating impurities of axonal origin (Norton, Autilio, 1966).

The glial cells of the white matter have been shown to lack gangliosides, and so does the mitochondrial fraction. The above mentioned observations gave rise to some hitherto speculative assumptions that gangliosides isolated from the white matter are constituents of axonal membranes. However, the ganglioside pattern of the grey matter differs substantially

Table 1. Distribution of gangliosides in adult cerebral white matter
 Tabela 1. Rozdział gangliozydów w dojrzałej istocie białej mózgu w chorobach

		G ₀	G ₁ (G _{T1})
Normal brain	8 cases	5.9** ±2.4(0.7)	11.4 ±1.9(0.6)
Multiple sclerosis (slices apparently normal)	8 cases	3.7 ±1.5(0.4)	13.1 +3.1(0.9)
I. M.S. case Frontal lobe	Age-	4.0	12.8
I.M.S.case Occipital lobe	32 years	7.2	13.8
II.M.S.case Frontal lobe	Age-	4.3	10.7
II.M.S.case Occipital lobe	36 years	4.6	11.9
III.M.S.case Frontal lobe	Age-	1.7	12.7
III.M.S.case Occipital lobe	35 years	0.9	9.2
IV.M.S.case Frontal lobe	Age-	3.5	13.8
IV.M.S.case Occipital lobe	47 years	3.5	14.6
V.M.S.case Frontal lobe	Age-	4.7	19.5
V.M.S.case Occipital lobe	50 years	4.5	19.6
VI.M.S.case Frontal lobe	Age-	3.8	11.5
VI.M.S.case Occipital lobe	55 years	4.0	12.6
CO — myelinopathy	Age- 58 years	2.4	11.6
Marchiafava-Bignami disease (apparently normal)	Age- 43 years	0.0	5.7

from that of the white matter, the latter being enriched with respect to monosialogangliosides, and rather poor in trisialogangliosides. As there is no evidence that axons can synthesize their own gangliosides, it has been assumed that after being synthesized in the perikaryon they undergo some changes when transported along the axon (Eichberg et al., 1964; Svennerholm, 1964).

In the light of the available information about the localization of gangliosides in the white matter which suggest that they are not true myelin constituents, it is by no means surprising that our material, consisting of a rather broad collection of cases afflicted with myelin decomposition, did not reveal any consistent deviations for which myelin decay as such could be responsible.

Likewise, the completely unchanged ganglioside pattern of the apparently normal white matter of multiple sclerosis cases is in keeping with the above considerations.

Despite the fact that great caution should be applied when interpreting changes of the chemical composition of formaline fixed material, our

in diseases connected with myelin lesions (material fixed in formaline)
połączonych z rozpadem mieliny (material utrwalony w formalinie)

Ganglioside fractions *				
G ₂ (GD _{1b})	G ₃ (GD _{1a})	G ₄ (GM ₁)	G ₅ (GM ₂)	G ₆ (GM ₃)
30.1 ± 6.7(2.1)	32.6 ± 4.0(1.3)	14.8 ± 2.1(0.7)	5.2 ± 2.2(0.7)	< 0.1
31.2 ± 6.5(1.8)	30.3 ± 4.9(1.4)	15.2 ± 3.3(0.9)	6.5 ± 2.1(0.6)	< 0.1
37.6	25.5	13.8	6.3	< 0.1
22.3	36.8	11.5	8.4	< 0.1
22.1	36.8	20.7	5.4	< 0.1
23.8	36.0	19.1	4.6	< 0.1
35.4	30.8	14.8	4.6	< 0.1
33.2	40.6	13.5	2.6	< 0.1
32.5	26.3	17.8	6.1	< 0.1
31.9	28.0	17.3	4.7	< 0.1
31.8	26.3	11.9	5.8	< 0.1
33.2	25.9	11.8	5.0	< 0.1
40.4	24.7	11.9	7.7	< 0.1
40.5	24.3	12.9	5.7	< 0.1
27.2	30.6	20.6	7.6	< 0.1
25.4	23.0	31.2	14.7	< 0.1

* In % of NANA

** Mean ± S.D.(S.E.)

results seem to indicate the existence of definite changes in the ganglioside pattern of the cerebral white matter in various pathological processes leading to demyelination, dependent on the nature of the pathological process itself.

Decreased contents of the main monosialoganglioside — G₄ (GM₁) together with concomitant increased G₁ (GT₁) and G₂ (GD_{1b}) percentages are the characteristic changes observed in cases of subacute sclerosing leucoencephalitis.

Norton and Autilio (1966) reported on changes essentially comparable with our results in the some pathological process. They assumed that these changes could result from increased amounts of ganglioside-rich cellular components, without specifying their exact nature. It is interesting to mention, that similar results have been obtained by Suzuki et al. (1970) in Schilder's disease. The authors suppose, that the observed deviations of the ganglioside spectrum in subacute sclerosing leucoencephalitis, and presumably also in Schilder's disease may be causatively related to virus infection (probably measles virus) affecting the metabolism of cellular membranes.

Table 2. Distribution of gangliosides in infantile cerebral white matter
 Tabela 2. Rozdział gangliozydów w dziecięcej istocie białej mózgu w chorobach

	Age		
		G ₀	G ₁ (G _{T1})
Normal brain	2.5 months	3.9	4.6
Normal brain	3.5 months	1.8	8.9
Normal brain	6 months	0.6	3.1
Normal brain	6 years	4.2	6.8
Normal brain	7 years	0.7	4.0
Normal brain	13 years	0.0	3.7
LESS	5 years	3.1	10.6
LESS	14 years	3.8	11.8
Sudanophilic leukodystrophy	1 month	1.8	7.2
Leukodystrophy, Krabbe type	7 months	0.0	3.4
Pelizaeus-Merzbacher disease	14 years	1.4	2.2
Progressive multifocal leukoencephalopathy	13 years	5.5	11.8
Postcomatous encephalopathy	8 years	3.4	4.1
Postcomatous encephalopathy	14 years	6.1	6.5

If that is the case, one could assume, that the nature of changes in the ganglioside pattern would be somehow related to the kind of pathogenic virus. In our own investigations of a case of spontaneous progressive leucoencephalopathy, which is presumably brought about by a papova virus, we have also established significant changes in the white matter ganglioside spectrum, but the obtained picture was definitely different from that in cases of subacute sclerosing leucoencephalitis (increased content of G₁ (G_{T1}) ganglioside with normal level of the G₄ (GM₁) one).

The interpretation of our results obtained in sudanophilic and in globoid leukodystrophy is rather difficult. Suzuki (1966) reported on a changed ganglioside pattern in the white matter of a metachromatic leukodystrophy. These observations could eventually, and obviously quite hypothetically be interpreted in terms of genetically determined alterations in the composition of axonal membranes in leukodystrophies. However, this assumption would need confirmation by appropriate investigations.

The alterations observed in the apparently normal white matter in a Marchiafava-Bignami case seem to indicate a generalized impairment of ganglioside metabolism, similarly as in the case of other cerebral lipids, resulting from chronic abuse of alcohol intake, that only finally causes demyelination within the commissural system.

in diseases connected with myelin lesions (material fixed in formaline)
Połączonych z rozpadem mieliny (material utrwalony w formalinie)

Ganglioside fractions*

G ₂ (G _{D1b})	G ₃ (G _{D1a})	G ₄ (G _{M1})	G ₅ (G _{M2})	G ₆ (G _{M3})
8.5	28.9	37.1	10.8	6.2
13.6	23.4	37.0	14.4	0.9
6.8	21.6	39.5	18.5	9.9
9.3	19.5	49.0	7.0	4.2
8.7	18.6	49.3	14.0	4.7
13.7	33.8	31.4	11.2	6.2
30.5	30.1	18.5	7.2	<0.1
31.0	33.5	17.1	2.8	<0.1
21.0	38.3	23.5	4.7	3.5
1.7	12.1	55.2	19.0	8.6
10.9	28.6	51.6	5.3	<0.1
8.2	22.2	52.9	2.4	<0.1
13.1	8.9	51.3	15.9	3.4
11.3	14.0	50.0	10.1	2.0

* In % of NANA

CONCLUSIONS

1. Demyelination does not affect the ganglioside pattern of the cerebral white matter.
2. The ganglioside composition of the apparently normal white matter in multiple sclerosis remains unaltered.
3. The ganglioside pattern of the white matter in subacute sclerosing leucoencephalitis as well as in the spontaneous progressive leucoencephalopathy is deviated, and presumably due to virus infection capable of altering the metabolism of cellular membranes.
4. The observed changes in the ganglioside composition of the apparently normal white matter in the Marchiafava-Bignami disease should be interpreted as one of the effects of a generalized impairment of the cerebral lipid metabolism, preceding demyelination in the commissural system.

M. Wender, Z. Adamczewska

OBRAZ GANGLIOZYDÓW W USZKODZENIACH DEMIELINIZACYJNYCH
MÓZGU

Streszczenie

Przeprowadzono badania obrazu chromatograficznego gangliozydów istoty białej mózgu w przypadkach stwardnienia rozsianego, podostrego stwardniającego zapalenia istoty białej mózgu, leukodystrofii, choroby Marchiafava-Bignami, postępującej

samoistnej leukoencefalopatii oraz w uszkodzeniu mieliny w zespole pośpiączkowej encefalopatii.

Wyniki badań, w których stwierdzono odchylenia obrazu gangliozydów tylko w niektórych badanych przypadkach świadczą, że rozpad osłonek mieliniowych nie prowadzi do zmian w obrazie gangliozydów istoty białej mózgu. Również w pozornie prawidłowej istocie białej mózgu w stwardnieniu rozsianym obraz gangliozydów jest normalny. W podostrym stwardniającym zapaleniu istoty białej mózgu i w postępującej samoistnej leukoencefalopatii występują znaczne przesunięcia w obrazie gangliozydów istoty białej, prawdopodobnie jako wynik zmian w metabolizmie błon komórkowych, wywołanych zakażeniem wirusowym. Odchylenia obserwowane w pozornie prawidłowej istocie białej w chorobie Marchiafava-Bignami zdają się być jednym z przejawów uogólnionych zaburzeń przemiany lipidowej mózgu, wyprzedzających demielinizację w układzie spoidłowym.

M. Вендер, З. Адамчевска

КАРТИНА ГАНГЛИОЗИДОВ В ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МОЗГА

Резюме

Проводились исследования хроматографической картины ганглиозидов белого вещества мозга в случаях рассеянного склероза, субхронического склеротического лейкоэнцефалита, болезни Маркиафава-Биньями, прогрессирующей спонтанной лейкоэнцефалопатии и повреждения миелина в симптоме послексломатозной энцефалопатии.

Результаты исследований в которых обнаруживались отклонения картины ганглиозидов лишь в некоторых исследованных случаях свидетельствуют, что распад миелиновых оболочек не ведет к изменениям в картине ганглиозидов белого вещества мозга. Также в кажущимся правильном белом веществе мозга в рассеянном склерозе картина ганглиозидов нормальная. В субхроническом склеротическом лейкоэнцефалите и в спонтанной прогрессирующей лейкоэнцефалопатии имеются значительные сдвиги в картине ганглиозидов белого вещества, вероятно вследствие изменений метаболизма клеточных мембран, вызванных вирусной инфекцией.

Отклонения, наблюдаемые в кажущимся правильном белом веществе в болезни Маркиафава-Биньями, кажутся быть одним из признаков обобщенных нарушений липидного метаболизма мозга, опережающих демиелинизацию в комиссуральной системе.

REFERENCES

1. Adamczewska Z., Kulczycki J.: Badania lipidów mózgu w leukodystrofii Krabego. *Neur. Neurochir. Pol.* 1972, 6, 473—477.
2. Alling Ch., Vanier M., Svennerholm L.: Lipid alterations in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Brain Res.*, 1971, 35, 325—336.
3. Cumings J., Goodwin M.: Sphingolipids and phospholipids of myelin in multiple sclerosis. *Lancet*, 1968, II, 664—665.
4. Eichberg J., Whittaker V., Dawson R.: Distribution of lipids in subcellular particles of guinea-pig brain. *Biochem. J.*, 1964, 93, 91—100.
5. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.

6. Gammack D.: Physicochemical properties of ox-brain gangliosides. *Biochem. J.* 1963, 88, 373—381.
7. Kishimoto Y., Radin N., Tourtellotte W., Parker J., Itabashi H.: Gangliosides and Glycerophospholipids in multiple sclerosis white matter. *Arch. Neurol.* 1967, 16, 44—54.
8. Markiewicz D., Dymecki J., Adamczewska Z., Goncerzewicz A.: Spontaneous progressive multifocal leucoencephalopathy (clinicomorphological study). *Al III-lea Simposion National de Neuropatologie, 1972, Bucuresti*, p. 148.
9. Norton W., Autilio L.: The lipid composition of purified bovine brain myelin. *J. Neurochem.* 1966, 13, 213—222.
10. Norton W., Poduslo S., Suzuki K.: Subacute sclerosing leukoencephalitis. II Chemical studies including abnormal myelin and an abnormal ganglioside pattern. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1966, 25, 582—597.
11. Suzuki K.: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. *Life Sciences* 1964, 3, 1227—1233.
12. Suzuki K.: The pattern of mammalian brain gangliosides. *J. Neurochem.* 1965, 12, 969—979.
13. Suzuki K.: Ganglioside patterns of normal and pathological brains. In: *Inborn disorders of sphingolipid metabolism*. Pergamon, Oxford—New York 1966, 215—230.
14. Suzuki Y., Tucker S., Rorke L., Suzuki K.: Ultrastructural and biochemical studies of Schilder's disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1970, 29, 405—419.
15. Svennerholm L.: The gangliosides. *J. Lipid Res.* 1964, 5, 145—155.
16. Wender M., Adamczewska Z., Wajgt A.: Cerebral lipids in a case with a clinically silent isolated plaque of the multiple sclerosis type. *Europ. Neurol.* 1973, 9, 21—29.

Authors' address: Institute of Neurology, Medical Academy, Poznań, Poland,
49 Przybyszewskiego Str.

KOMUNIKAT

W dniach od 14.11 do 16.11.1974 r. odbędzie się w Poznaniu Sympozjum Dunajskie Neurologii, Neuropatologii i Neurologii Dziecięcej na temat:

„WPLYW CYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH CHEMICZNYCH I FIZYCZNYCH
NA UKŁAD NERWOWY”

Obrady toczyć się będą w języku angielskim i niemieckim.

Termin zgłoszenia doniesień — 1 marca 1974 r.

Termin nadsyłania streszczeń — 1 maja 1974 r.

Adres komitetu sympozjum — prof. dr M. Wender.
60-355 Poznań, Klinika Neurologiczna,
ul. Przybyszewskiego 49.

LECH IWANOWSKI, AGNIESZKA JĘDRZEJEWSKA

ODCZYN PRYMITYWNYCH KOMÓREK SIATECZKI W PRZYPADKU DŁUGOLETNIEJ CUKRZYCY

Klinika Neurologiczna AM, Warszawa
Kierownik: prof. dr I. Hausmanowa-Petrusewicz

Omawiany przypadek zwrócił naszą uwagę ze względu na szczególny odczyn mikrogleju, który ujawnił się prawdopodobnie w specyficznych warunkach w tkance mózgowej, wywołanych cukrzycą.

OPIS PRZYPADKU

Pacjentka W. W., lat 57 (Hist. chor. 269/68) przez 10 lat chorowała na cukrzycę; w ostatnich 5 miesiącach jej życia wystąpiły objawy neurologiczne w postaci przemijających niedowładów i również przemijających objawów polineuropatii, z powodu których została przyjęta do Kliniki Neurologicznej AM w Warszawie. Chora zmarła z powodu zatoru tętnicy płucnej, po półrocznym pobycie w Klinice. Badania dodatkowe prócz wysokiego poziomu cukru we krwi (76—421 mg⁰/o) i w moczu (0,4—6,5⁰/o) nie wniosły nic istotnego. Badanie ogólne i analiza elektroforetyczna białek płynu mózgowo-rdzeniowego były prawidłowe. Rozpoznanie kliniczne: *Laesio cerebri in individuo cum diabete mellito decompensato. Bronchopneumonia bilateralis. Insufficiencia circulatoria*. Na sekcji ogólnej poza zatorem tętnicy płucnej i zakrzepem żyły udowej lewej, stwierdzono stłuszczenie trzustki.

Mózg utrwalony w formolu wykazywał cechy obrzęku oraz zanik obu biegunów czołowych. Naczynia podstawy były cienkościenne, spadnięte. Na przekrojach czołowych stwierdzono obniżoną spoistość obu gałek białych i prążkowiec oraz liczne ogniska martwicy, dwa z nich były ukrwotocznione.

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z obu półkul mózgowych, pnia i rdzenia kręgowego, t. podstawną, t. szyjną wewnętrzną w miejscu trójpodziału, korzonek przedni i tylny z odcinka lędźwiowego rdzenia, pień nerwowy ze splotu barkowego i wycinek mięśnia naramiennego.

Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, metodą PAS, van Gieson, Heidenhaina, Klüvera, Bodiana, Hortegi, Gomoriego, Holmesa i Cajala.

W badaniu mikroskopowym stwierdzono uszkodzenie wielu komórek nerwowych, polegające na zmianach ischemicznych, przewlekłych, stłuszczeniu i rozplywaniu tigroidu oraz rozlany odczyn glejowy z licznymi postaciami przerostowymi neuro- i mikrogleju, a zwłaszcza licznymi pałeczkami w korze centralnej i wyspie (ryc. 1), a ponadto obrzęk i przekrwienie. W obu półkulach były widoczne liczne ogniska martwicze. Martwice te miały charakter wielofazowy: w jednym ognisku można było zaobserwować zarówno odczyn leukocytarny, jak też makrofagowy, czy też obraz blizny glejowo-mezodermalnej, lub objawy bardzo wczesnego niedotlenienia. Zwracało uwagę wyraźniejsze uszkodzenie wraz ze zgębczeniem podłoża piątej i szóstej, a odcinkami trzeciej warstwy kory. Opustoszenia komórkowe były wyraźne zwłaszcza w sektorach Sommera. Grudki krwiopochodnego barwika występowały w komórkach żernych i pozakomórkowo. Ciałka skrobiowate skupiały się wokół komór i w warstwie drobinowej kory. W zgębczałej istocie białej płata czołowego i ciemieniowego obserwowano okołonaczyniowe nacieki złożone z komórek limfocytopodobnych i żernych. Niektóre naczynia wykazywały niewielkie zmiany szkliste i włókniste. W korzonkach rdzenia kręgowego stwierdzono rozpad mieliny i uszkodzenie włókien osiowych, wyraźniejsze w korzonkach przednich.

W obrębie jąder podstawy obu półkul i w korze wyspy, a mniej licznie w opisanych powyżej ogniskach martwic wielofazowych i polach zgębczeń, stwierdzono obecność nietypowych komórek. Komórki te występowały w kilku odmianach: miały one owalne lub okrągłe jądro, nieco większe od jądra dojrzałego mikrogleju, z umiarkowaną ilością chromatyny (ryc. 2). Niektóre z nich miały jądro pęcherzykowate, przejaśnione, skąpą ilość zarodki i wyglądały jak komórki siateczki (ryc. 3). Lepszemu wysy-

Ryc. 1. Rozplem komórek pałeczkowatych w korze ruchowej. H.—E. Pow. 200 ×.

Fig. 1. Proliferation of rod cells in motor cortex. H.—E. × 200.

Ryc. 2. Stan gąbczasty w istocie białej przylegającej do ogniska martwicy w korze płata ciemieniowego. Widoczne młode komórki mikroglejowe. H.—E. Pow. 1000 ×.

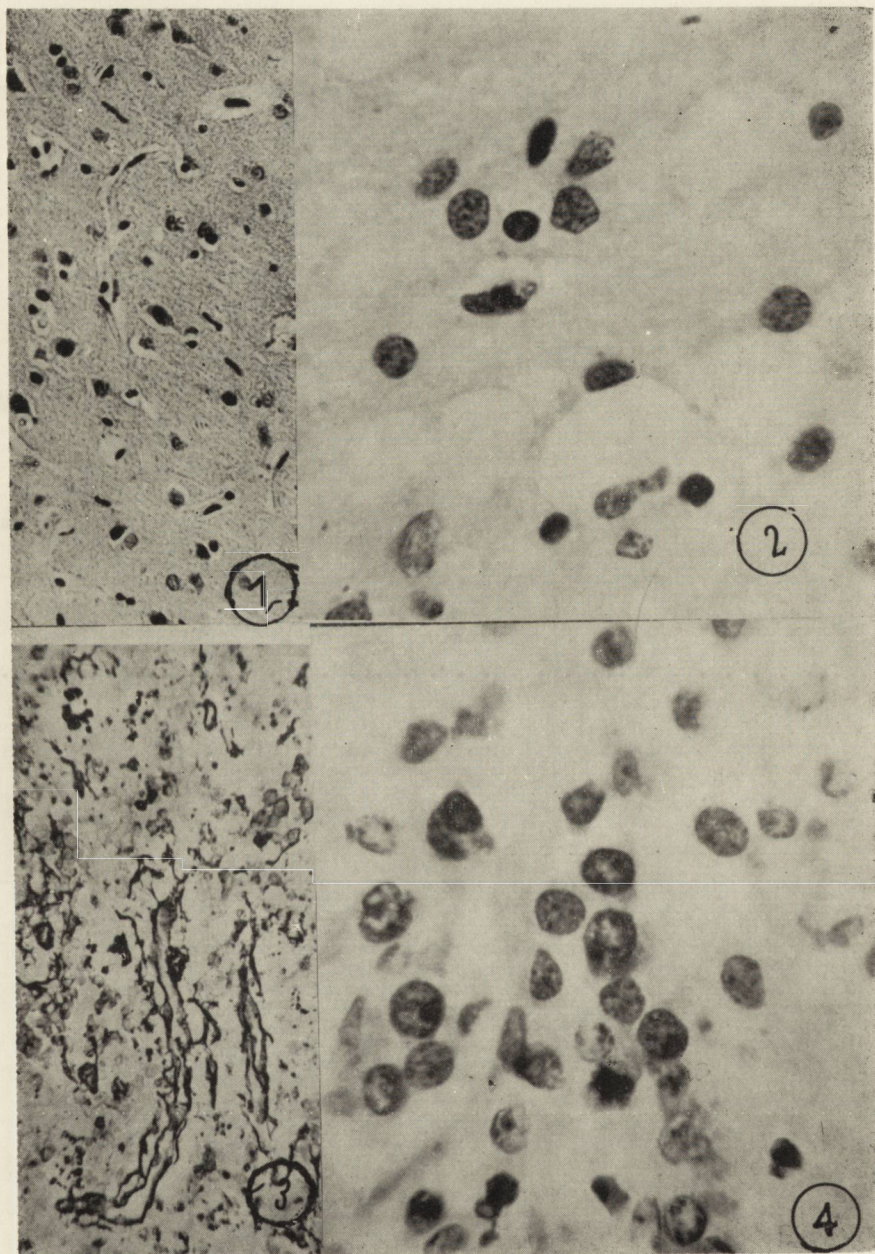
Fig. 2. Spongy state in the white matter near necrotic area in parietal cortex. Young microglial cells are seen. H.—E. × 1000.

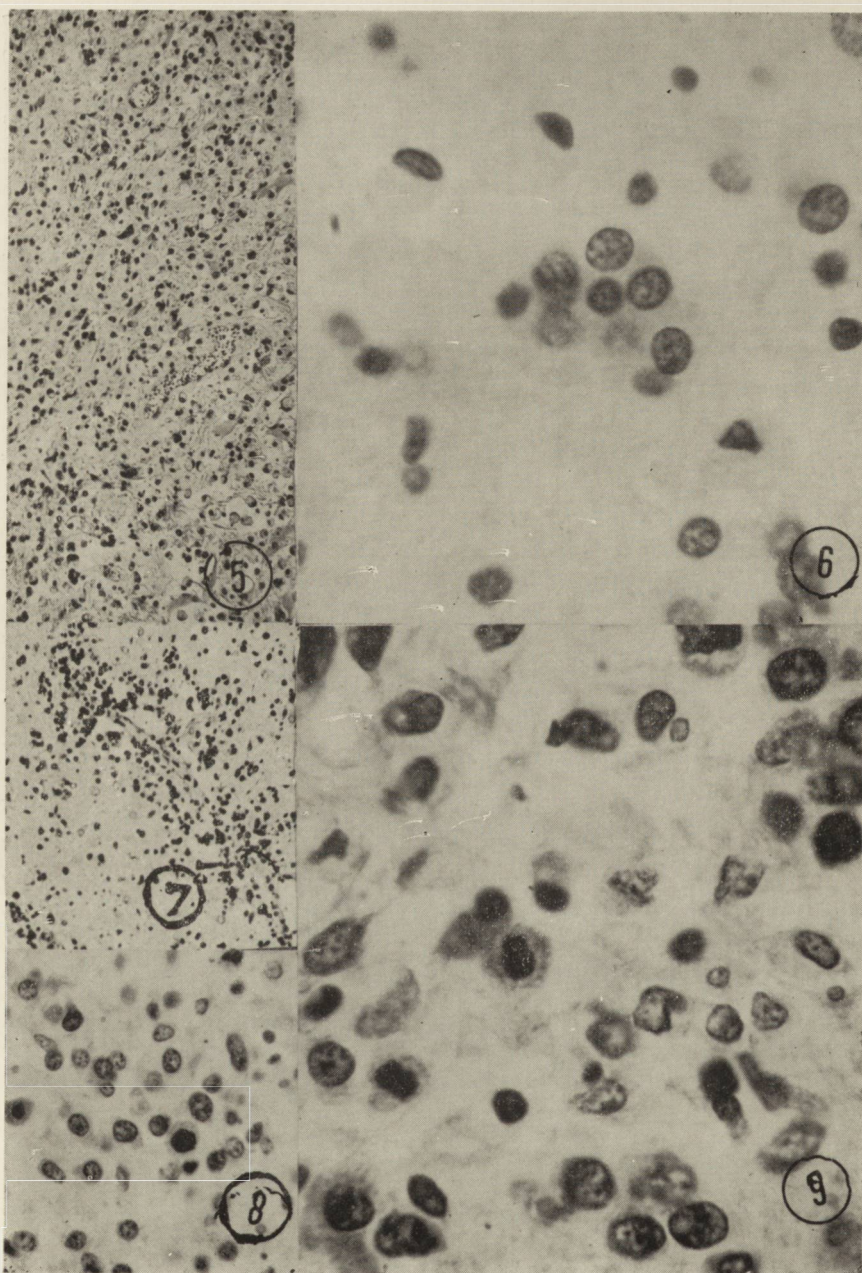
Ryc. 3. Pierwotne komórki siateczki w okolicy jąder podstawy w impregnacji metodą Gomoriego. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Primitive microglial cells in basal ganglia. Impregnation after Gomori. × 200.

Ryc. 4. Rozplem pierwotnych komórek siateczki wokół włośniczki. Most. H.—E. Pow. 1000 ×.

Fig. 4. Proliferation of primitive microglial cells around the capillary. Pons. H.—E. × 1000.





ceniu jądra chromatyną towarzyszyło powiększanie się rąbka cytoplazmy, aż do przekształcenia się komórki w dojrzałego makrofaga (ryc. 6). Komórki z jasnym jądrem i skąpą ilością cytoplazmy wykazywały dużą aktywność mitotyczną (ryc. 9). W rozwojowo starszych komórkach obserwowano jedynie podziały amitotyczne. Rozplem komórek był widoczny wokół włóścików lub przydanki większych naczyń i był najżywszy w okolicach dotkniętych przewlekłym niedotlenieniem, dającym obraz martwicy niezupełnej. Obszary martwicy niezupełnej występowały w jądrach podstawy (ryc. 6, 7), w korze wyspy i części podstawowej mostu (ryc. 4). Dla otrzymania pełnej charakterystyki tych komórek wykonano metodą Hortegi barwienie na mikroglej, w którym jądra tych komórek wyimpregnowały się bardzo silnie, natomiast w okolicach żywego rozplemu zarys cytoplazmy był ledwo widoczny. Barwienie na siateczkę, wg Gomoriego, uwidoczniało również zarys jąder tych komórek i bardzo delikatne włóściki srebrochłonne (ryc. 3).

OMÓWIENIE

W opisanym przypadku chorej na cukrzycę, która zmarła z przyczyny pozamózgowej, sekcyjnie nie stwierdzono uszkodzenia układu naczyniowego; nie znaleziono też materiału zatorowego w tętnicach szyjnych, ani w lewym sercu; jak również żadnego patologicznego połączenia między sercem prawym a lewym, ani przerostu mięśnia serca.

W przedstawionym powyżej obrazie uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego zwracają uwagę:

1. Zmiany typu przewlekłego niedotlenienia mózgu z licznymi ogniskami martwicy wielofazowej przy niewspółmiernie małym uszkodzeniu układu naczyniowego. Lokalizacja i charakter tych zmian pozwalały zakwalifikować je jako encefalopatię i neuroradikulopatię cukrzycową (Bell 1952, Boudnelle i wsp. 1966, Ditzel 1968, Erbsloeh, Schraeder 1963,

Ryc. 5. Ognisko rozmiękania w okolicy ciemieniowo-potylicznej, H-E. Pow. 100 ×.

Fig. 5. Necrotic area in parieto-occipital region. H.-E. × 100.

Ryc. 6. Ognisko rozmiękania w okolicy ciemieniowo-potylicznej. Widoczny rozplem pierwotnych komórek siateczki i makrofagi. H.-E. Pow. 1000 ×.

Fig. 6. Necrotic area in parieto-occipital region. Proliferation of primitive microthese cells mitotic figures are seen. H.-E. × 1000.

Ryc. 7. Okołonaczyniowy rozplem komórek siateczki w jądrach podstawy. W komórkach tych widoczne podziały mitotyczne. H.-E. Pow. 1000 ×.

Fig. 7. Perivascular proliferation of primitive reticular cells in basal ganglia. In these cells mitotic figures are seen. H.-E. × 1000.

Ryc. 8. To samo pole co na ryc. 7. H.-E. Pow. 400 ×.

Fig. 8. The same region as in Fig. 7. H.-E. × 400.

Ryc. 9. To samo pole co na ryc. 7. H.-E. Pow. 1000 ×.

Fig. 9. The same region as in Fig. 7. H.-E. × 1000.

de Jong 1950, Moss 1964, Nevsimal, Stein 1967, Taubin, Matz 1968, Vital i wsp. 1967).

2. Obecność charakterystycznych komórek w zmienionej, niedotlenionej tkance. Występowały one w kilku odmianach, dając się uszeregować w ciągu rozwojowym od prymitywnej komórki siateczki do dojrzałego makrofaga. Komórki te wykazywały wyraźny związek ze ścianą naczyń i żywo się mnożyły (figury podziału). Zgodnie z Feiginem (1969) zakwalifikowano je jako prymitywne komórki siateczki i ich pochodne ulegające przekształceniu w komórki żerne mikrogleju.

Obecność różnorodnych form mikroglejowych i liczne postacie mitotyczne nasuwały konieczność różnicowania ze sprawą nowotworową — *microgliomatosis*. Brak charakterystycznych dla tego nowotworu komórek przemawiał przeciwko takiemu rozpoznaniu (Russel, Marshall 1948, Russel, Rubinstein 1963, Peison 1967, Vuia 1968, Castaigne 1968).

W omawianych komórkach oprócz mitoz, obserwowano tylko niewielkie przejaśnienie jądra w porównaniu do jądra dojrzałego mikrogleju, poza tym brak było makroskopowo widocznego utkania nowotworowego. W literaturze spotkano tylko jeden przypadek bez makroskopowo widocznego utkania nowotworowego, który Adams i Jackson (1966) zaliczyli do *microgliomatosis*.

Obecność mitoz w tych komórkach nie wydaje się przeczyć ich odczynowemu charakterowi. Prymitywne komórki siateczki stanowią potencjalną rezerwę mezenchymalnych możliwości odczynowych w tkance mózgowej i mogą się rozmnażać w następstwie uszkodzenia. Ich dorosłymi postaciami mogą być makrofagi (Feigin 1969). Na odczynową aktywność mitotyczną tych komórek zwracali uwagę Hachenberg i Graf (1968) w przypadku bakteryjnego zapalenia opon z odczynem siateczkowo-histiocytarnym oraz Cammermeyer (1967) w rozsianym ziarniniakowatym zapaleniu mózgu u szczurów. Kreutzberg (1968) obserwował wysoką aktywność mitotyczną komórek zidentyfikowanych jako okołoneuronalne komórki mikrogleju po przecięciu n. VII. Utożsamiając te komórki z prymitywnymi komórkami siateczki pozostaje uzasadnić, dlaczego uwidoczniły się one właśnie w tym przypadku, a tak rzadko stwierdza się je w innych uszkodzeniach mózgu. Feigin, opierając się m.in. na pracach Haina, uważa, że czas życia tych komórek w uszkodzonej tkance jest bardzo krótki, przechodzą one bowiem szybko w dojrzałe makrofagi; ujawnia je martwica skrzepowa. Ponadto są one widoczne w polach wczesnego niedotlenienia, zwłaszcza, gdy niedotlenienie to powstaje powoli i jego nasilenie nie jest jednakowe w obrębie niedotlenionego obszaru. Wydaje się, że takie warunki zaistniały właśnie w naszym przypadku, w którym proces cukrzycowy sprzyjał niejednoczasowemu uszkodzeniu nawet poszczególnych neurocytów. Zwłaszcza, że w opisanym przypadku cukrzyca trwała 10 lat i przez ostatnie 6 miesięcy życia chorej była z całą pewnością niewyrównana. Nagły zgon chorej z powodu zatoru tętnicy płucnej przy-

czynił się niejako do „utrwalenia” pewnej ilości komórek mikroglejowych w ich młodej postaci, hamując przemianę w makrofagi.

Л. Ивановски, А. Енджеевска

РЕАКЦИЯ ПРИМИТИВНЫХ КЛЕТОК СЕТОЧКИ В СЛУЧАЕ
МНОГОЛЕТНЕГО ДИАБЕТА

Резюме

Описан случай больной диабетом в течение 10 лет. Посмертное исследование мозга, кроме картины диабетной энцефалопатии, обнаружило в районах гипоксии многочисленные характерные клетки инфильтрата. Авторы зачислили эти клетки к примитивным клеткам сеточки и их производные — в направлении изменений к форме взрослых макрофагов. Благодаря наличию особенных условий часть клеток не подверглась изменению.

L. Iwanowski, A. Jędrzejewska

REACTION OF THE PRIMITIVE CELLS OF THE RETICULUM IN THE CASE
OF DIABETES MELLITUS OF MANY YEARS DURATION

Summary

The case concerns a patient who during the last 10 years of her life suffered from diabetes mellitus. Post mortem microscopic examination of the brain showed, beside diabetic encephalopathy, numerous cells infiltrating the area diagnosed to be damaged by a chronic hypoxia process. The authors believe these cells to be primitive reticular cells, some of which owing to peculiar circumstances did not transform into mature macrophages.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams H. J., Jackson J. M.: Intracerebral tumors of reticular tissue: the problem of microgliomatosis and reticuloendothelial sarcomas of the brain. *J. Path. Bact.* 1966, 91, 369—381.
2. Bell E. T.: A postmortem study of vascular diseases in diabetics. *Arch. Path.* 1952, 53, 444—455.
3. Boudnelle M., Denil R., Yazbeck A.: The regressive subacute radiculoneuritis of diabetic. *Diabete*, 1966, 14, 21—31.
4. Cammermeyer J.: Microglia cells in diffuse and granulomatous encephalitis in the rabbit. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1967, 7, 261—274.
5. Castaigne P., Cambier J., Escourolle R.: Circumscribed cerebral reticulosis involving the pons and hypothalamus. Clinical and pathological findings. *Presse Med.*, 1968, 76, 1213—1216.
6. Ditzel J.: Functional microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes*, 1968, 17, 388—401.
7. Erbsloeh F., Schrader A.: Klinik und Pathogenese neurologischer Krankheitsbilder beim Diabetes Mellitus. *Med. Klin.* 1963, 58, 50—56.

8. Feigin I.: Presidential address. Mesenchymal tissue of the nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 6—21.
9. Hackenberg P., Graf K.: Zur meningitischen Verlaufstorm der etiologisch unklaren reticulo-histiocytären Affektionen des Zentralnervensystem. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1967, 191, 141—145.
10. Hain R. F.: cyt. wg Feigina 1969 (poz. 8).
11. Jong de R. N.: The nervous system complications of diabetes mellitus with special reference to cerebrovascular changes. *J. Nerv. Ment. Disease.* 1950, 111, 181—202.
12. Kreutzberg G. W.: Uber perineuronale Mikrogliazellen (Autoradiographische Untersuchungen). *Acta Neuropath. (Berl.)* 1968, Suppl. 4, 141—145.
13. Moss G.: The contribution of the hexose monophosphate shunt to cerebral glucose metabolism. *Diabetes*, 1964, 13, 585—591.
14. Nevsimal O., Stein J.: Unusual central complication in diabetes and their eeg picture. *CS Neurol.*, 1967, 30, 19—24.
15. Peison B.: Microglial glioma of brain with extracerebral involvement. *Cancer (Philad.)* 1967, 20, 983—990.
16. Russel D. S., Marshall A. H. E., Smith F. B.: Microgliomatosis. A form of reticulosis affecting the brain. *Brain* 1948, 71, 1—16.
17. Russel D. S., Rubinstein L. J.: Pathology of tumors of the nervous system. Ed. E. Arnold (Publishers) LTD, London 1963, 63—71.
18. Taubin H., Matz H.: Cecebral edema, diabetes insipidus and sudden death during treatment of diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1968, 17, 108—109.
19. Vital C., Picard J., Arné L., Aubertin J., Fenelen J., Monteu L.: Étude anatomoclinique de 3 cas d'encephalopathie hypoglycémique. *Diabete* 1967, 4, 131—136.
20. Vuia O.: The relationships between the periadventitial histiocyte and the microglia in pathological conditions; cerebral reticulo-histio-microgliomatosis. *Cerc. Med. (Tg-Mures)* 1968, 153—158.

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

TERESA ZALEWSKA

BADANIA NAD WBUDOWYWANIEM ⁷⁵SE-SELENOMETIONINY DO BIAŁEK OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO KRÓLIKA Z UWZGLĘDNIENIEM LOKALIZACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: dr n. przyr. A. Gromek

Zainteresowanie metioniną wiąże się z funkcją, jaką pełni ten aminokwas w ośrodkowym układzie nerwowym. Metionina metabolizowana na drodze trans-sulfuracji daje związki regulujące przewodnictwo i potencjał oksydoredukcyjny neuronu. Ponadto jest ona niezbędnym prekursorem i składnikiem w procesie biosyntezy białka.

Wyniki dotychczasowych badań, prowadzonych głównie na układach bakteryjnych wykazały, że podstawienie związków organicznych selenu w miejsce analogów siarkowych nie zmienia ich aktywności biologicznej a aminokwasy znakowane selenem zachowują się podobnie do aminokwasów siarkowych (Lam, Olson 1964, Rosenfeld, Beath 1964). Zastosowanie w badaniach ⁷⁵Se-selenometioniny nie wskazuje na występowanie zmian ubocznych, związanych z obecnością selenu, ponieważ stężenie tego pierwiastka w badanych układach jest znacznie niższe od poziomu toksycznego. Ponadto ⁷⁵Se, posiadający korzystne własności fizyczne (promieniowanie gamma o stosunkowo wysokiej energii) upraszcza w znacznym stopniu technikę pomiaru radioaktywności w materiale biologicznym.

Celem podjętej pracy było prześledzenie dynamiki wbudowywania selenometioniny znakowanej selenem ⁷⁵Se do białek różnych struktur anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego, określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji izotopu i ocena przydatności selenowej pochodnej metioniny do badań nad metabolizmem metioniny siarkowej w tkance nerwowej.

W związku z teoretycznie uzasadnioną możliwością metabolizowania selenometioniny do selenocystyny, oznaczano również względną zawartość obu aminokwasów w radioaktywnych białkach.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 60 królikach rasy szynszyl, płci obojga, w wieku 2—3 miesięcy, wagi 2—3 kg, odżywianych dietą stan-

dardową. Zwierzętom wstrzykiwano ^{75}Se -l-selenometioninę (prod. Amer-sham—Anglia) do żyły usznej brzeżnej w ilości 10 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ wagi, uśmiercano je zatorem powietrznym w czasie 10, 20, 40, 60 min, 2, 4, 6, 12 i 72 godz. po wstrzyknięciu izotopu i wyjmowano mózg, z którego pobierano do badania półkule mózgu, wzgórze, pień mózgu, górny odcinek rdzenia szyjnego i półkule mózdzku. Pobrane wycinki tkanki homogenizowano w 5% zimnym TCA, wytrącony osad białka poddawano kolejnym ekstrakcjom wg metody podanej przez Robertsa i wsp. (1955) i oznaczono względne radioaktywności w uzyskanych drogą ekstrakcji frakcjach wolnych aminokwasów, lipidów, kwasów nukleinowych i białek. Azot białkowy oznaczano mikrometodą Kjeldahla wg Steyermerka (1961). Dla określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji ^{75}Se -selenometioniny badano aktywność frakcji jądrowej, mitochondrialnej i układu cytoplazmatycznego, obejmującego mikrosomy i cytoplazmę, w czasie 15, 30, 60 min po wstrzyknięciu izotopu.

Wymienione ultrastruktury otrzymywano na drodze frakcjonowanego wirowania homogenatów wybranych części mózgu (półkuli mózgu, wzgórza i pnia mózgu) wg metody Stahla i wsp. (1963). Czystość otrzymanych frakcji kontrolowano testami biochemicznymi, badając aktywność charakterystycznych enzymów. Układ cytoplazmatyczny testowano biochemicznie oznaczając aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (E.C.1.1.1.49) — enzymu specyficznego dla frakcji cytoplazmatycznej (Löhr i Walter 1963) i glukozo-6-fosfatazy (E.C.3.1.3.9) — enzymu związanego z frakcją mikrosomalną (Harper 1963). Enzymem specyficznym dla frakcji mitochondrialnej była dehydrogenaza glutaminianowa (E.C.1.4.1.2), której aktywność oznaczano wg metody Schmidta podanej przez Bergmeyera (1963). Frakcję mitochondrialną dodatkowo przebadano pod względem czynnościowym, określając jej zdolność do procesów oksydacyjnej fosforylacji i przeprowadzając kontrolę oddechową. Oceny aktywności oddechowej dokonywano metodą polarograficzną opisaną przez Chance'a (1955). Frakcję jądrową sprawdzono na zawartość hemoglobiny wg metody Bergmana i Prinzmęta (1946). Z otrzymanych ultrastruktur komórkowych izolowano białko za pomocą TCA o stężeniu końcowym 5% i wytrącony osad oczyszczano wg metody podanej przez Robertsa i wsp. (1955).

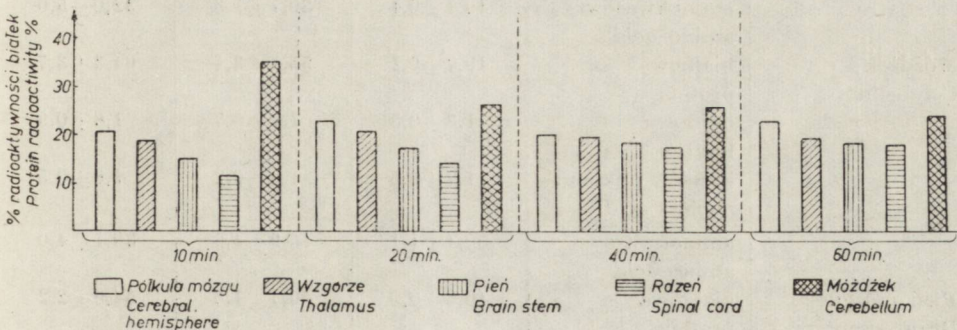
W celu ustalenia, czy podana zwierzęciu ^{75}Se -selenometionina wbudowuje się bezpośrednio do białek ośrodkowego układu nerwowego, czy też jest uprzednio metabolizowana do selenocystyny, izolowano z hydrolizatu białek oddzielnie metioninę i cystynę, łącznie z ich analogami selenowymi. Cystynę wytrącano za pomocą tlenu miedziowego w warunkach podanych przez Simpsona i Tarwera (1950). Dla wyizolowania metioniny zastosowano metodę Williamsa i Dawsona (1952). Następnie określano względne radioaktywności ^{75}Se -selenometioniny i ^{75}Se -selenocystyny. Pomiar radioaktywności prowadzono w scyntylacyjnym liczniku studzienkowym

typu SE-2 z kryształem NaJ (Tl). Pomiary przeprowadzono przy nastawionej liczbie zliczeń, wynoszącej 10.000 impulsów. Wartości liczenia przekraczały najczęściej 20-krotnie wartości tła, co pozwoliło przewidzieć średni względny błąd kwadratowy wynoszący około 1⁰%. Uzyskane wyniki liczbowe wyrażono w postaci średnich arytmetycznych oraz odchylenia standardowego dla każdej z badanych grup zwierząt.

WYNIKI

Analiza rozkładu radioaktywności pomiędzy poszczególne frakcje chemiczne otrzymane w procesie izolowania i oczyszczania białka z wybranych struktur anatomicznych wykazała, że w przedziale czasu objętym doświadczeniem najwyższa radioaktywność występuje we frakcji aminokwasowej i białkowej, przy bardzo niskim poziomie radioaktywności kwasów nukleinowych i lipidów (tab. 1). W miarę upływu czasu krążenia związku (20—60 min) obserwowano spadek względnej radioaktywności selenometioniny wolnej we frakcji aminokwasowej przy równoczesnym jej wzroście w białkach. Zjawisko to występowało najwyraźniej w półkuli mózgu i mózdzku, nieco słabiej w pniu mózgu.

W celu ustalenia różnic topograficznych w stężeniu znacznika w białkach określono radioaktywność właściwą białek badanych struktur anatomicznych w różnym czasie po wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny. Proces wbudowania aminokwasu do białek przebiegał wydajnie tylko w pierwszej godzinie krążenia związku (tab. 2). W dalszym przedziale czasu od 1 do 72 godziny nie obserwuje się już istotnego przyrostu radioaktywności we frakcji białkowej. Nieznaczny spadek radioaktywności właściwej białek, występujący najczęściej w czasie między 1—2 godziną od wstrzyknięcia związku i zaznaczający się we wszystkich badanych okolicach jest statystycznie nieznamienisty. Pomimo braku statystycznie znamienistych różnic we wbudowywaniu selenometioniny do białek po-



Ryc. 1. Względny rozkład radioaktywności białek badanych struktur anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego po dożylnym wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny.
Fig. 1. Relative distribution of protein radioactivity of the central nervous system anatomical structures after injection of ^{75}Se -selenomethionine.

szczególnych struktur, widoczne są tendencje wartości liczbowych, wyraźnie zaznaczone u pojedynczych zwierząt. Zarówno po 1 jak i po 72 godzinach radioaktywność właściwa białek malała w kierunku:

mózdzek → półkula mózgu → wzgórze → pień mózgu → rdzeń

Największe różnice procentowe poziomu radioaktywności białek badanych struktur stwierdza się w 10 i 20 minucie po wstrzyknięciu związku (ryc. 1). Najwyższą radioaktywność mają w tym czasie białka móżdżku, najniższą białka rdzenia. Pośrednie wartości wykazują kolejno białka półkuli mózgu, wzgórza i pnia mózgu.

Wewnątrzkomórkową lokalizację ^{75}Se -selenometioniny określono na podstawie pomiarów radioaktywności ultrastruktur. Na podstawie wyni-

Tabela 1. Względna radioaktywność frakcji chemicznych badanych okolic ośrodkowego układu nerwowego wyrażona jako odsetek radioaktywności homogenatu po dożylnym wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny (wszystkie doświadczenia wykonano w grupach liczących po 5 zwierząt)

Table 1. Relative radioactivity of the chemical fractions of the examined central nervous system regions expressed as a percentage of the homogenate radioactivity after intravenous injection of ^{75}Se -selenomethionine (all experiments were performed in groups of 5 animals)

Badana okolica Region	Badana frakcja Fraction	Czas Time		
		20 min	40 min	60 min
Półkula mózgu Cerebral hemisphere	aminokwasowa amino acid	46,0 ± 1,9	39,0 ± 3,5	31,2 ± 4,5
	białkowa protein	51,0 ± 1,0	58,3 ± 4,0	65,8 ± 2,6
	lipidowa lipid	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,8
	kwasów nuklein. nucleic acid	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,4	2,1 ± 1,0
Mózdzek Cerebellum	aminokwasowa amino acid	46,1 ± 0,4	39,7 ± 1,3	32,0 ± 5,0
	białkowa protein	49,7 ± 0,1	55,1 ± 3,1	64,3 ± 3,7
	lipidowa lipid	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,7	1,8 ± 0,9
	kwasów nuklein. nucleic acid	1,7 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,5
Pień mózgu Brain stem	aminokwasowa amino acid	50,4 ± 1,1	45,9 ± 4,6	39,1 ± 4,0
	białkowa protein	46,6 ± 0,9	50,7 ± 1,5	54,0 ± 2,2
	lipidowa lipid	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,5 ± 0,4
	kwasów nuklein. nucleic acid	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,5	2,7 ± 0,5

ków badań kontrolnych, dotyczących rozkładu aktywności enzymów charakterystycznych dla badanych frakcji subkomórkowych stwierdzono, że obrana metoda frakcjonowania daje ultrastruktury, charakteryzujące się specyficznym obrazem enzymatycznym o względnie niskiej kontaminacji krzyżowej (ryc. 2). Ocena aktywności oddechowej i fosforylacyjnej frakcji mitochondrialnej wykazała wysoki stopień sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji z oddychaniem. Kontrola oddechowa dla substratu, jakim był glutaminian, wynosiła powyżej 6, a iloraz fosforylacyjny ADP/O wynosił 2,2—2,4. Otrzymywana frakcja jądrowa nie była w sposób istotny zanieczyszczona krwinkami czerwonymi.

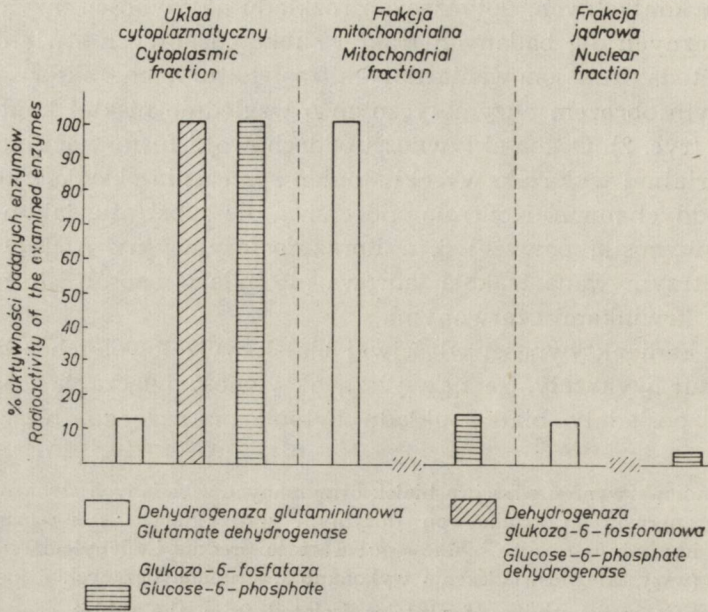
Pomiary radioaktywności właściwej białek wyizolowanych z badanych ultrastruktur wykazały, że najwyższą aktywność włączania ^{75}Se -selenometioniny posiadały białka układu cytoplazmatycznego, niższą białka

Tabela 2. Radioaktywność właściwa białek otrzymanych z badanych struktur ośrodkowego układu nerwowego królika po dożylnym wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny wyrażona w imp/min/mg azotu białkowego; wartości średnie i odchylenia standardowe (wszystkie doświadczenia wykonano w grupach liczących 5 zwierząt)

Table 2. Specific radioactivity of proteins isolated from the rabbit central nervous system structures after intravenous injection of ^{75}Se -selenomethionine expressed in counts/min/mg of protein nitrogen; mean values and standard deviations (all experiments were performed in groups of 5 animals)

Czas od wstrzyknięcia związku Time after injection	Struktura anatomiczna Anatomical structure				
	Półkula mózgu Cerebral hemisphere	Wzgórze Thalamus	Pień Brain stem	Rdzeń Spinal cord	Mózdzek Cerebellum
10 min	63 ± 13	55 ± 14	45 ± 11	35 ± 12	105 ± 23
20 min	267 ± 46	247 ± 55	205 ± 40	164 ± 36	308 ± 67
40 min	365 ± 43	355 ± 27	325 ± 36	307 ± 42	450 ± 66
1 h	554 ± 109	465 ± 63	450 ± 68	421 ± 56	563 ± 56
2 h	527 ± 60	432 ± 42	408 ± 40	315 ± 31	499 ± 61
4 h	512 ± 82	435 ± 33	432 ± 50	380 ± 70	531 ± 62
6 h	531 ± 75	440 ± 78	403 ± 60	349 ± 52	547 ± 22
12 h	562 ± 87	530 ± 88	515 ± 74	423 ± 67	583 ± 41
72 h	665 ± 81	645 ± 70	635 ± 67	458 ± 85	673 ± 84

frakcji jądrowej, najniższą białka mitochondrialne (tab. 3). Przebieg krzywych ma ten sam charakter we wszystkich badanych strukturach, różnice dotyczą jedynie wartości liczbowych. Typowy rozkład radioaktywności właściwej białek ultrastruktur komórkowych mózdzku przedstawia ryc. 3. Proces wbudowywania selenometioniny do białek ultrastruktur przebiega z różną prędkością. Pomimo, że radioaktywność białek układu cytoplazmatycznego w czasie 15—60 min wykazuje najwyższe wartości, jej wzrost

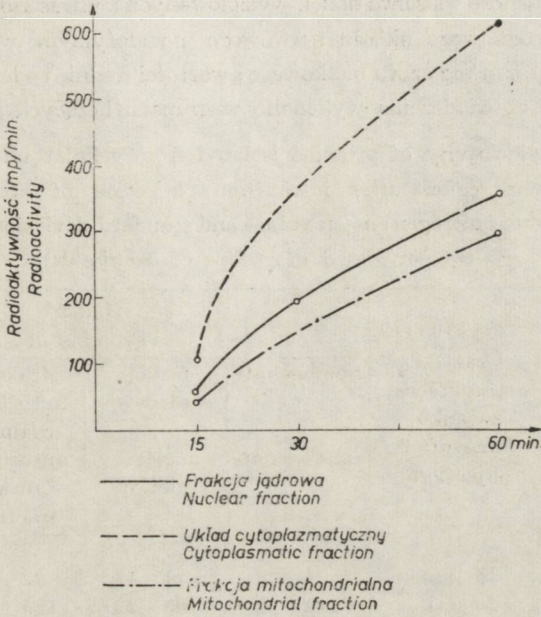


Ryc. 2. Aktywność enzymów wyrażona jako odsetek aktywności enzymu specyficznego dla danej frakcji.

Fig. 2. Enzymes activity expressed as a percentage of activity of enzyme specific for given fraction.

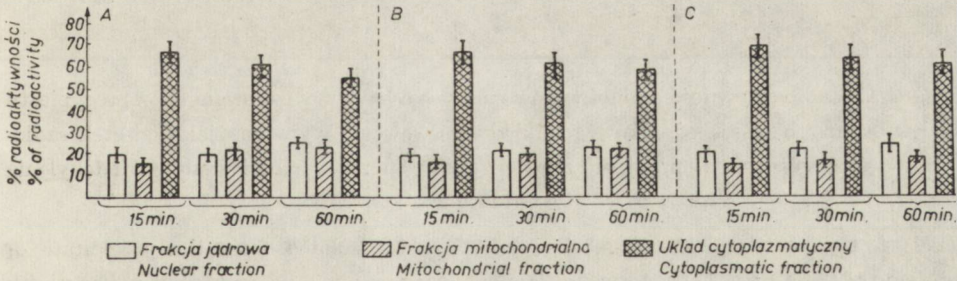
począwszy od 15 minuty krążenia związku jest wolniejszy w porównaniu ze wzrostem radioaktywności białek frakcji mitochondrialnej i jądrowej. W czasie 15—60 minut radioaktywność białek wyizolowanych z frakcji mitochondrialnej rośnie średnio 10 razy, białek wyizolowanych z frakcji jądrowej 8 razy. Najniższy, 7-krotny wzrost wykazują białka układu cytoplazmatycznego. Różnice pomiędzy poszczególnymi ultrastrukturami zaznaczone są wyraźnie przy porównaniu względnego rozkładu ich aktywności w odniesieniu do radioaktywności homogenatu (ryc. 4). Wyniki wskazują na zmniejszanie się w czasie radioaktywności układu cytoplazmatycznego z równoległym wzrostem radioaktywności frakcji mitochondrialnej i jądrowej. Zjawisko to ma podobny przebieg we wszystkich badanych strukturach anatomicznych.

W celu ustalenia, czy selenometionina wbudowuje się do białek ośrodkowego układu nerwowego w postaci natywnej czy też ulega uprzednio przekształceniu do selenocystyny czy selenocysteiny, przeprowadzono identyfikację aminokwasów znakowanych ^{75}Se w hydrolizacie wyizolowanego białka. Strata radioaktywności w czasie hydrolizy, spowodowana częściowym rozpadem aminokwasów znakowanych ^{75}Se wynosiła w tej serii badań około 10%. Badania wykazały, że ^{75}Se -selenometionina wbudowuje się do białek mózgu zarówno w postaci selenometioniny jak i selenocystyny (tab. 4). Po 20 i 40 minutach ilość selenometioniny zmniejsza się we wszystkich badanych strukturach, wzrasta natomiast ilość seleno-



Ryc. 3. Radioaktywność właściwa białek wyizolowanych z ultrastruktur komórkowych mózdzku po dożylnym wstrzyknięciu ⁷⁵Se-selenometioniny (imp/min/mg azotu białkowego). Wartości średnie.

Fig. 3. Specific radioactivity of proteins isolated from cellular ultrastructures of cerebellum after intravenous injection ⁷⁵Se-selenomethionine (counts/min/mg of protein nitrogen). Mean values.



Ryc. 4. Względny rozkład radioaktywności w ultrastrukturach komórkowych badanych okolic jako odsetek radioaktywności homogenatu (pozbawionego debrytu i frakcji przemycia) przyjętej za 100% po dożylnym wstrzyknięciu ⁷⁵Se-selenometioniny. A — półkula mózgu, B — mózdzek, C — pień mózgu.

Fig. 4. Relative distribution of radioactivity in cellular ultrastructure of the examined regions expressed as a percentage of homogenate radioactivity (free of cell debris and wash) after intravenous injection of ⁷⁵Se-selenomethionine. A — cerebral hemisphere, B — cerebellum, C — brain stem.

cystyny. Po jednej godzinie od dożylnego wstrzyknięcia związku stwierdzono w hydrolizacie białka izolowanego 69—72% ⁷⁵Se-selenometioniny i 28—31% ⁷⁵Se-selenocystyny. Uzyskane wyniki wskazują na metabolizowanie selenometioniny przez ośrodkowy układ nerwowy.

Tabela 3. Radioaktywność właściwa białek wyizolowanych z ultrastruktur komórkowych badanych okolic ośrodkowego układu nerwowego po dożylnym wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny imp/min/mg azotu białkowego; wartości średnie i odchylenia standardowe (wszystkie doświadczenia wykonano w grupach liczących po 5 zwierząt)

Table 3. Specific radioactivity of proteins isolated from cellular ultrastructure of the central nervous system regions after intravenous injection of ^{75}Se -selenomethionine counts/min/mg of protein nitrogen; mean values and standard deviations (all experiments were performed in groups of 5 animals)

Badana okolica Region	Czas od wstrzyknięcia związku Time after injection	Białka Proteins of			
		homogenatu homogenate	frakcji jądrowej nuclear fraction	frakcji mitochon- drialnej mitochon- drial fraction	układu cytoplaz- matycznego cytoplasmic system
Półkula mózgu Cerebral hemisphere	15 min	61 ± 6	41 ± 11	22 ± 4	82 ± 14
	30 min	247 ± 32	165 ± 23	125 ± 19	307 ± 51
	60 min	490 ± 39	348 ± 41	230 ± 42	583 ± 42
Móźdżek Cerebellum	15 min	89 ± 16	57 ± 12	42 ± 11	108 ± 18
	30 min	297 ± 43	195 ± 32	149 ± 17	362 ± 34
	60 min	535 ± 29	354 ± 51	292 ± 37	615 ± 47
Pień mózgu Brain stem	15 min	49 ± 8	31 ± 9	16 ± 4	70 ± 11
	30 min	203 ± 17	151 ± 18	96 ± 19	286 ± 35
	60 min	443 ± 29	286 ± 31	198 ± 31	524 ± 58

Tabela 4. Radioaktywność aminokwasów znakowanych ^{75}Se izolowanych z precypitatu białek badanych okolic ośrodkowego układu nerwowego, wyrażona jako odsetek radioaktywności hydrolizatu, przyjętej za 100% (imp/min); wartości średnie i odchylenia standardowe

Table 4. Radioactivity of ^{75}Se -labelled amino acid isolated from the precipitate of proteins of the central nervous system regions expressed as a percentage of radioactivity of the hydrolizate (counts/min); mean values and standard deviations

Czas od wstrzyknię- cia związku Time after injection	Półkula mózgu Cerebral hemisphere		Móźdżek Cerebellum		Pień mózgu Brain stem	
	^{75}Se - Cystyna ^{75}Se - cystine	^{75}Se - Metionina ^{75}Se - methionine	^{75}Se - Cystyna ^{75}Se - cystine	^{75}Se - Metionina ^{75}Se - methionine	^{75}Se - Cystyna ^{75}Se - cystine	^{75}Se - Metionina ^{75}Se - methionine
20 min	18 ± 7	82 ± 10	20 ± 8	80 ± 12	17 ± 6	83 ± 15
40 min	24 ± 9	76 ± 11	22 ± 6	78 ± 11	19 ± 8	81 ± 11
60 min	29 ± 12	71 ± 10	31 ± 8	69 ± 9	28 ± 13	72 ± 14

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Wstępnym zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia było dokonanie oceny przydatności selenowej pochodnej metioniny do badań nad włączaniem metioniny siarkowej do białek ośrodkowego układu nerwowego. Na podstawie otrzymywanych wyników ustalono, że ^{75}Se -selenometionina przechodzi z układu naczyniowego do puli wolnych aminokwasów tkanki nerwowej i wbudowuje się do białek. Śladową radioaktywnością charakteryzowały się frakcje lipidowe, a nieco wyższą frakcja zawierająca kwasy nukleinowe. Radioaktywność tej ostatniej można przypisać obecności nie wyekstrahowanych aminokwasów i nie zhydrolizowanego aminoacylo-tRNA. Podobny rozkład radioaktywności we frakcjach chemicznych tkanki nerwowej po podaniu ^{35}S -metioniny opisali Gaitonde i Richter (1956) oraz Koloušek i Babický (1961). Procentowy udział radioaktywności wolnej selenometioniny malał w miarę upływu czasu na rzecz selenometioniny związanej z białkami.

Oznaczając radioaktywność właściwą białka w różnym czasie po podaniu radioaktywnego związku można ocenić kinetykę procesu wbudowywania aminokwasów do białek, będącą wyrazem wydajności syntezy. W przeprowadzonych doświadczeniach największy wzrost radioaktywności właściwej białek ośrodkowego układu nerwowego miał miejsce w pierwszej godzinie krążenia związku. W dalszym przedziale czasu (1 godz — 72 godz) nie stwierdzono już tak istotnych zmian. Zaobserwowane zjawisko przemawia za istnieniem w ośrodkowym układzie nerwowym białek o intensywnej przemianie.

Warto zaznaczyć, że między 1—2 godziną od chwili podania ^{75}Se -selenometioniny we wszystkich badanych okolicach występowała tendencja do spadku aktywności białek i następnie do jej ponownego wzrostu. Mogłoby to świadczyć o istnieniu dwóch grup białek o różnych okresach półtrwania ($T_{1/2}$), co jest zgodne z wynikami badań Liwnicza (1968) nad kinetyką zaniku puli wolnej ^{75}Se -selenometioniny w mózgu i przechodzenia jej w formy związane z białkami. Podobne tendencje spadkowe zaobserwował Burdman i wsp. (1970), badając włączanie leucyny znakowanej trytem do białek ultrastruktur komórkowych mózgu.

Wyniki pomiarów radioaktywności właściwej białek badanych struktur anatomicznych, wskazują na różnice topograficzne w intensywności biosyntezy białka, zaznaczone najwyraźniej w 10 i 20 minucie krążenia związku. Najwyższe radioaktywności właściwe uzyskano dla białek mózdzku, niższe kolejno dla białek półkuli mózgu, wzgórza, pnia mózgu i rdzenia. Wymienione struktury różnią się wiekiem filogenetycznym i budową histologiczną, przede wszystkim stosunkiem populacji neuronalnej i glicyjowej. Wbudowywanie ^{75}Se -selenometioniny do białek, podobnie zresztą jak innych aminokwasów, jest wyższe w strukturach z przewagą neuronów i mniejszą ilością komórek glicyjnych, ponieważ synteza białka zachodzi

głównie w perikarionach komórek nerwowych (Altman 1963, Mérei i Gallas 1964, Droz 1969).

Badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji ^{75}Se -selenometioniny w różnym czasie po dożylnym wstrzyknięciu wykazały najwyższą radioaktywność ultrastruktur komórkowych mózdzku, najniższą ultrastruktur komórkowych pnia mózgu. Półkula mózgu zajmowała miejsce pośrednie.

Zróznicowanie radioaktywności ultrastruktur w zależności od topografii analizowanych okolic najwyraźniej zaznaczało się na początku doświadczenia. Po 15 minutach krążenia ^{75}Se -selenometioniny radioaktywność białek układu cytoplazmatycznego mózdzku była o 30% wyższa od analogicznej ultrastruktury półkuli mózgu. Radioaktywność frakcji mitochondrialnej przewyższała o prawie 90% radioaktywność frakcji mitochondrialnej półkuli. Podobne wyniki uzyskał Palladin i wsp. (1959) w badaniach prowadzonych na mózgach kotów przy pomocy ^{35}S -metioniny. Wiadomo, że mózdzek charakteryzuje pewne odrębności morfologiczne i biochemiczne, wyróżniające go spośród innych struktur ośrodkowego układu nerwowego. W związku z powyższym trudno wnioskować o jego cechach metabolicznych na podstawie badań porównawczych z innymi okolicami mózgowia, prowadzonych na poziomie komórki.

Badania nad włączaniem aminokwasów do białek układu nerwowego prowadzone zarówno w układach *in vitro* jak i *in vivo* wykazały, że proces ten najintensywniej przebiega we frakcji mikrosomalnej (Clouet, Richter 1957, 1959, Furst i wsp. 1958, Palladin i wsp. 1959). Również w moich doświadczeniach radioaktywność właściwa białek układu cytoplazmatycznego (zawierającego mikrosomy i cytoplazmę), przewyższała znacznie radioaktywność białek wyizolowanych z pozostałych ultrastruktur. Wyniki różnią się od wyników Burdmana (1970). Autor ten zaobserwował intensywne włączanie znakowanej leucyny do białek frakcji jądrowej mózgu, w wyniku czego specyficzna radioaktywność białek jądrowych była równa lub nawet nieco wyższa od radioaktywności białek mikrosomalnych.

Kinetyki włączania ^{75}Se -selenometioniny do poszczególnych ultrastruktur różniły się między sobą. W czasie 15—60 minut przyrost radioaktywności białek frakcji cytoplazmatycznej był niższy niż białek frakcji jądrowej i mitochondrialnej. W konsekwencji różnica między radioaktywnością właściwą białek układu cytoplazmatycznego i pozostałych ultrastruktur zmniejszała się w czasie. Analogiczne badania przeprowadzone przez Bielika i Tjuleniewa (1966) z ^{35}S -metioniną wykazały najwyższą radioaktywność frakcji mikrosomalnej przy stosunkowo niskiej radioaktywności pozostałych ultrastruktur do 5-tej godziny krążenia związku. Począwszy od tego czasu miał miejsce stopniowy spadek radioaktywności nukleoproteidów mikrosomalnych z równoczesnym wzrostem radioaktywności frakcji mitochondrialnej i jądrowej. Po 12 godzinach krążenia

związku różnice poziomu znacznika pomiędzy badanymi ultrastrukturami były już minimalne.

Wzrost radioaktywności białek frakcji jądrowej i mitochondrialnej można tłumaczyć bądź przeniesieniem z mikrosomów uformowanych białek aktywnych, bądź też opóźnioną biosyntezą w obu ultrastrukturach.

Istnieje szereg doniesień na temat zdolności frakcji jądrowej i mitochondrialnej do biosyntezy białka (Khouvine i wsp. 1965, Gordon, Deanin 1968, Burdman 1970, Schatz 1970), nie wykazano jednak zdolności mitochondriów do syntezy białek rozpuszczalnych (enzymów). Prawdopodobnie białka te syntetyzowane są przez mikrosomy i przenoszone do frakcji mitochondrialnej (Wheeldon, Lehninger 1966, Beattie i wsp. 1967, Kadenbach 1967).

Na podstawie wyników badań własnych można stwierdzić, że ^{75}Se -selenometionina w ośrodkowym układzie nerwowym włączyła się w cykl syntezy białek w taki sam sposób jak naturalne aminokwasy.

Wprowadzona do organizmu ^{35}S -metionina wbudowuje się do białek ośrodkowego układu nerwowego częściowo w postaci natywnej, częściowo zaś w postaci cystyny. Z pracy Gaitonde i Richtera (1956) wynika, że po podaniu ^{35}S -metioniny do płynu mózgowo-rdzeniowego po 3 godzinach około 24% znakowanej siarki białek znaleziono w cystynie. Autorzy przypuszczają, że po upływie 1 godz. 50% radioaktywnej siarki wbudowało się do białek układu nerwowego w postaci cystyny.

Badania nad metabolizmem aminokwasów selenowych w układach bakteryjnych wykazały obecność prawie wszystkich selenowych analogów aminokwasów siarkowych, co wskazuje, że po podaniu ^{75}Se -selenometioniny w trakcie syntezy do białek mózgu wbudowują się także jej metabolity.

Niniejsze doświadczenia wykazały, że nowosyntezowane białka w ośrodkowym układzie nerwowym zawierają zarówno ^{75}Se -selenometioninę jak i ^{75}Se -selenocystynę. Analogiczne wyniki uzyskali Awwad i wsp. (1967), badając białka surowicy krwi i wątroby szczura. Analizując dane liczbowe uzyskane w warunkach prowadzonych doświadczeń oraz wyniki opublikowane przez Gaitonde i Richtera (1956) stwierdza się, że selenometionina ulega łatwiej przekształceniu do selenocystyny, aniżeli jej analog siarkowy. Istota zjawiska ma jednak ten sam charakter.

Uogólniając wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że stwarzają one pełne przesłanki dla zastosowania selenometioniny w przyszłych badaniach nad metabolizmem jej naturalnego odpowiednika siarkowego w ośrodkowym układzie nerwowym zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w patologii.

WNIOSKI

- 1) ^{75}Se -selenometionina wstrzyknięta dożylnie królikowi przechodzi do tkanki nerwowej i wbudowuje się do białek.

2) Radioaktywność białek wyizolowanych z badanych struktur ośrodkowego układu nerwowego wykazuje następujące zależności:

mózdzek > półkula mózgu > wzgórze > pień > rdzeń

co świadczy o najintensywniejszym włączeniu aminokwasów do struktur z przewagą komórek nerwowych.

3) Wyniki badań z użyciem selenometioniny przemawiają za najwyższą wydajnością biosyntezy białka w mikrosomach, niższą w jądrach, najniższą w mitochondriach.

4) Nowosyntezowane białka zawierają zarówno selenometioninę jak i selenocystynę, co świadczy o możliwości metabolizowania selenometioniny na drodze analogicznej do metioniny siarkowej (szlakiem trans-sulfuracji).

5) Wyniki przeprowadzonych doświadczeń upoważniają do stwierdzenia, że selenometionina może być stosowana do badań nad metabolizmem metioniny w ośrodkowym układzie nerwowym, jako jej „podstawnik”.

T. Zalewska

ИССЛЕДОВАНИЯ ИНКОРПОРАЦИИ ^{75}Se -СЕЛЕНМЕТИОНИНА В БЕЛКИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКА С УЧЕТОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Резюме

Цель работы — проследить динамику инкорпорации ^{75}Se -селенметионина в белки разных анатомических структур нервной системы, определение внутриклеточной локализации этой аминокислоты и оценка пригодности селенпроизводной метионина в исследованиях метаболизма серного метионина в нервной ткани.

^{75}Se -селенметионин вводился кроликам внутривенно в ушную маргинальную вену в количестве 10 мкк/кг веса. В определенных временных группах (от 10 минут до 72 часов) животных убивали воздушной эмболией и вынимали мозг, из которого брали для исследований ткань из больших полушарий, охватывающую кору и белое вещество, таламус, ствол мозга, верхний участок продолговатого мозга и полушария мозжечка.

В результате проведенных исследований обнаружено, что ^{75}Se -метионин, введенный внутривенно кролику, переходит в нервную ткань и включается в белки исследованных анатомических структур. Радиоактивность изолированных белков обнаруживает следующие зависимости в исследованных структурах: мозжечок > большие полушария мозга > таламус > ствол мозга > продолговатый мозг. Это свидетельствует о самой интенсивной инкорпорации аминокислоты в структуры с преобладанием нервных клеток. Результаты исследований указывают на самый высокий выход синтеза белка в микросомах, более низкую в ядрах и самую низкую в митохондриях. Вновь синтезированные белки содержат как селенметионин как и селенистин, что свидетельствует о возможности метаболизма селенметионина аналогичным путем как серного метионина путем транссульфурации. Результаты исследований дают основание заключить, что селенметионин может применяться в исследованиях метаболизма серного метионина в центральной нервной системе в качестве его „подставника”.

T. Zalewska

⁷⁵Se-SELENOMETHIONINE INCORPORATION INTO THE CNS PROTEINS OF RABBIT WITH REGARD TO ITS SUBCELLULAR LOCALIZATION

Summary

The aim of this work was: to follow the dynamics of ⁷⁵Se-selenomethionine incorporation into the proteins of various anatomical structures of the central nervous system, to determine the intracellular localization of this amino acid and to evaluate its usability for studies on the metabolism of sulphuric methionine in the nervous tissue.

⁷⁵Se-selenomethionine was injected intravenously in a 10 μCi/kg body weight dose. In defined time intervals the animals were sacrificed by air embolia and the brains removed.

It was found that selenomethionine injected intravenously passes into the nerve tissue and become incorporated into the proteins of the examined structures. The radioactivity of the isolated proteins in the structures was found to increase in the following order:

spinal cord → cerebral trunk → thalamus → cerebral hemisphere → cerebellum

This is an evidence of the most intensive amino acid incorporation into the structures where the nerve cells predominate. The results indicate further that the most efficient protein biosynthesis takes place in microsomes, being less efficient in nuclei and the lowest in mitochondria.

The newly synthesized proteins contain both selenomethionine and selenocystine, which indicates that selenomethionine, just as sulphur methionine, may undergo transsulphuration.

It is concluded that selenomethionine can be successfully applied as a tool in studies on the sulphuric methionine metabolism in the central nervous system.

PIŚMIENNICTWO

1. Altman J.: Regional utilization of Leucine — H³ by normal rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* 1963, 11, 741—750.
2. Awwad H. K., Adelstein S. J., Potchen E. J., Dealy J. B. Jr: The interconversion and reutilization of injected ⁷⁵Se-selenomethionine in the rat. *J. Biol. Chem.* 1967, 242/3, 492—500.
3. Beattie D. S., Basford R. E., Koritz S. B.: The Turnover of the Protein Components of Mitochondria from Rat Liver, Kidney and Brain. *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 4584—4586.
4. Bergman H. C., Prinzmetal P.: The antishock action of ethanol in burned mice. *J. Lab. Clin. Med.* 1946, 31, 654—662.
5. Bielik J. W., Tjuleniew W. I.: Metabolicszka gieteroziennost bielkow tkani gołownego mozga. *Problemy Newrochimii. Izd. Nauka*, 1966, str. 8—27.
6. Burdman J. A., Haglid K., Dravid A. R.: Protein synthesis in fractions from isolated brain cell nuclei. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 669—676.
7. Burdman J. A.: Incorporation in vivo of radioactive leucine into neuronal and glial nuclear proteins of rat brain. *J. Neurochem.* 1970, 17, 1555—1562.

8. Chance B., Williams G. R.: Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I. Kinetics of Oxygen Utilization. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 383—393.
9. Clouet D. H., Richter D.: The incorporation of ^{35}S -methionine into protein fractions of the rat brain. *Biochem. J.* 1957, 65, 20 P.
10. Clouet D. H., Richter D.: The incorporation of ^{35}S -labeled methionine into the proteins of the rat brain. *J. Neurochem.* 1959, 3, 219—229.
11. Droz. B.: Protein metabolism in the nerve cells. *Int. Rev. Cytol.* 1969, 25, 363—390.
12. Furst S., Lajtha A., Waelsch H.: Amino acid and protein metabolism of the brain — III. Incorporation of lysine into the proteins of various brain areas and their cellular fractions. *J. Neurochem.* 1958, 2, 216—225.
13. Gaitonde M. K., Richter D.: The metabolic activity of the proteins of the brain. *Proc. Roy. Soc.* 1956, 145, 83—99.
14. Gordon M. W., Deanin G. G.: Protein synthesis by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 4222—4226.
15. Harper A.: Glucose-6-phosphatase in methods of enzymatic analysis Ed. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, N. York, 1963, 788—792.
16. Kadenbach B.: Synthesis of mitochondrial proteins: demonstration of transfer of proteins from microsomes into mitochondria *Biochim. Biophys. Acta* 1967, 134, 430—442.
17. Khouvine Y., Okuda J., Szafarz D., Matsuura T.: Facteur nucléaire inhibant l'incorporation des acides aminés dans les protéines des noyaux de foie de rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1965, 47, 1289—1290.
18. Koloušek J., Babický A.: The metabolism of methionine derivatives containing ^{35}S in the rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 1961, 7, 141—146.
19. Lam K. W., Olson R. E.: A biosynthesized organic selenium with biological activity. *Fed. Proc.* 1964, 23, 183.
20. Liwnicz B. H.: Kinetyka aminokwasów w ośrodkowym układzie nerwowym badana za pomocą ^{75}Se -selenometioniny. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 251—278.
21. Löhr G. W., Walter H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Ed. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, N. York, 1963, 744—751.
22. Mérei F. T., Gallyas F.: Quantitative determination of ^{35}S -methionine incorporated into proteins of cell groups or nuclei of the CNS. *J. Neurochem.* 1964, 11, 251—265.
23. Palladin A. W., Bielik J. W., Kraczkó L. S.: Wniedrzenie metionina S^{35} w białki różnych strukturalnych elementów komórek połuszczyk mózgu i mózżeczkę. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1959, 127, 702—705.
24. Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T., Britten R. J.: Studies of biosynthesis in *Escherichia Coli*. Carnegie Institut of Washington (Publication 607), Washington, D. C., 1955, In: *Instrumental methods of experimental biology*. Ed. by D. W. Newman, 1964.
25. Rosenfeld I., Beath O. A.: Selenium, Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition. Acad. Press, New York and London, 1964.
26. Schatz G.: The biogenesis of mitochondria. *Proc. of the Biochem. Soc.* 8 P. *Biochem. J.* 1970, 116.
27. Schmidt E.: Glutamic Dehydrogenase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Ed. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, N. York, 1963, 752—756.
28. Simpson M. V., Tarver H.: Studies on Protein Synthesis in vitro. III Further observations on the incorporation of methionine into liver protein. *Arch. Biochem.* 1950, 25, 384—395.

29. Stahl W. L., Smith J. C., Napolitano L. M., Basford R. E.: Brain Mitochondria. I. Isolation of Bovine Brain Mitochondria. *J. Cell Biol.* 1963, 19, 293—307.
30. Steyermark A.: Quantitative organic microanalysis. Ed. II, New York 1961, Acad. Press.
31. Wheeldon L. W., Lehninger A. L.: Energy—linked synthesis and decay of membrane proteins in isolated rat liver mitochondria. *Biochemistry* 1966, 5, 3533—3545.
32. Williams R. B., Dawson R. M. C.: The biosynthesis of L-cystine and L-methionine labeled with radioactive sulphur (^{35}S). *Biochem. J.* 1952, 52, 314—317.

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

HALINA KROH, JAN ALBRECHT

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN MOUSE BRAIN
IN THE PERIOD OF LATENCY AND TUMOUR GROWTH
AFTER IMPLANTATION OF METHYLCHOLANTRENE *)

Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences

Head of Department: Prof. M. J. Mossakowski, M. D.

It results from the investigations of various authors (Kwan et al., 1968; Cravela, 1970; Viale et al., 1967) that neoplastic tissue may show wide differences in protein biosynthesis as compared with the normal tissue in which the tumour is developing. These changes are manifested quantitatively in an increased intensity of synthesis and qualitatively are connected with the appearance of new polysomal forms not found in normal tissue.

These phenomena show neither organ nor species specificity. The causes of the changes are so far unknown. Neither is the causal nexus and relation in time between the changes in protein biosynthesis and the neoplastic process understood. In the present study methylcholantrene — a compound with proved carcinogenic action — was used in order to investigate changes in protein synthesis in the brain of mice in the preneoplastic period and during tumour development, with reference to amino acid transport into the brain.

MATERIAL AND METHODS

The experiments included two variants, one of which (A) comprised *in vitro*, and the other (B) *in vivo* studies.

Brain tissue from C₃H mice, into which at the age of 8 weeks a methylcholantrene pellet had been implanted according to the previously employed method (Kroh, 1969) was examined. The mice of variant A were sacrificed in groups of 3 animals 4, 8, 12, 16, 36 and 48 weeks following implantation, and in variant B after 4, 12, 20, 28 and 36 weeks. In addition in group B, 17 mice were sacrificed which showed symptoms of an intracranial tumour at various times after implantation.

*) Work was partially supported by PL 480 Grant Public Health Service USA. Agreement 05-004-1.

To each experimental group, two individuals of corresponding age were attached as control, and to each mouse with a brain tumour — one control individual.

The course of the experiment was as follows:

V a r i a n t A. Immediately after decapitation the methylcholantrene pellet was removed from the brain hemisphere and the brain was homogenized with 1 ml of buffer C (25 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 50 mM tris-HCl, pH 7.6, containing 20 mg bentonite) in a glass homogenizer with teflon pestle at 2 500 r.p.m. at 0°C. The homogenate was centrifuged for 15 min at 10 000 g in a Unipan centrifuge cooled to 0°. The supernatant free of mitochondria was used as a cell-free protein-synthesizing system. Samples of the postmitochondrial fractions containing 700—800 µg protein (determined after Lowry, 1951) were incubated at 37° with 0.25 µCi ⁷⁵Se-selenomethionine (Rotop, West Germany, 3.2 Ci/mmM) in the presence of 25 mM KCl, 6 mM MgCl₂ and 50 mM tris-HCl, pH 7.6, the final volume was 0.25 ml. Incubation was stopped by adding an equal volume of 10 per cent TCA. The sediment was centrifuged and 2 ml 5 per cent TCA were added. The suspension was heated for 30 min at 90°. After centrifugation of the suspension, the sediment was washed twice with 5 per cent TCA and its radioactivity was measured in a welltype counter.

V a r i a n t B. Both the symptomless mice and those with brain tumours received intraperitoneal injections of ⁷⁵Se-selenomethionine in the amount of 3—10 µCi in 0.1 ml of saline. After 30 min the animals were decapitated and the methylcholantrene pellet was removed. If there was a brain tumour, part of the neoplastic tissue was taken for histological examination and stained routinely. During decapitation arterial and venous blood was collected from the large vessels. When neoplasm was present, the brain was weighed together with tumour and their radioactivity as well as that of the blood were measured. Then the brains were homogenized in 1 ml of buffer C in a glass homogenizer. To the homogenate, 0.5 ml of 25 per cent TCA were added and homogenization repeated. The homogenates were centrifuged on a table centrifuge (4 000 r.p.m.), the sediment was washed once with 2—3 ml 5 per cent TCA, boiled for 20 min on a water bath at 90°, and centrifuged after cooling once more. Denatured protein was extracted with ether — 100% ethanol (1 : 1). After centrifugation radioactivity was measured as in variant A.

RESULTS AND DISCUSSION

It results from the experiment shown in Fig. 1 that under the conditions described the postmitochondrial fraction of mouse brain incorporates actively ⁷⁵Se-selenomethionine into its protein. The time curve reaches a plateau after 60 min, this being in agreement with the time parameter of synthesis reported by various authors for other protein-synthesising

systems isolated from the brain (Johanson, 1968; Dunn, 1970). The relatively most intensive incorporation was noted during the first 15 min, and this predicted the choice of the incubation time in further experiments.

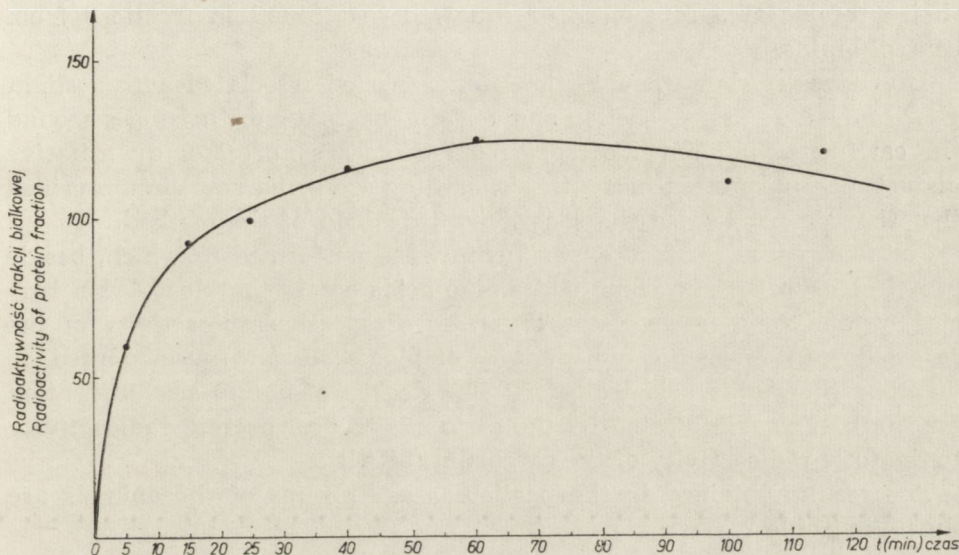


Fig. 1. ^{57}Se -selenomethionine incorporation in vitro into proteins of the postmitochondrial fraction of mouse brain as a function of time. Experimental conditions described in text.

Ryc. 1. Włączenie ^{75}Se -selenometyoniny in vitro do białek frakcji postmitochondrialnej mózgu myszy wyrażone jako funkcja czasu. Warunki doświadczalne w tekście.

Table 1. Incorporation in vitro of ^{75}Se -selenomethionine into proteins of the postmitochondrial fraction isolated from mouse brain at various times after methylcholantrene pellet implantation. See text for explanations to variant A

Tabela 1. Włączenie ^{75}Se -selenometyoniny in vitro do białek frakcji postmitochondrialnej izolowanych z mózgu myszy w różnych okresach po wszczepieniu metylocholantrenu. Objaśnienia w tekście dotyczącym wariantu A

Group	Time after implantation (weeks)	Relative incorporation (% of control \pm SEM)
Grupa	Czas po wszczepieniu (tygodnie)	Względne włączenie (% kontroli \pm SEM)
I	4	109.8 \pm 12.9
II	8	107.6 \pm 8.5
III	12	108.6 \pm 5.3
IV	16	92.4 \pm 8.5
V	36	111.4 \pm 5.9
VI	48	108.5 \pm 13.0

The experimental results (Table 1) indicate that the presence of the methylcholantrene pellet in the brain does not cause significant changes in the activity of the isolated protein-synthetising system. The postmitochondrial fractions isolated from the brains in the period of 4—48 weeks after methylcholantrene implantation incorporated selenomethionine into their proteins at a rate close or equal to that found in fractions from control brains.

These results show that, in the latency period associated with a slight glial-connective tissue reaction and certain enzymatic disturbances around the carcinogen implanted, (Kroh, 1969) there are no major quantitative disturbances in protein biosynthesis, or they are so narrow circumscribed that they do not exceed the sensitivity threshold of the method.

For this reason, *in vivo* experiments were performed in which, beside protein biosynthesis, transport of amino acids across the blood-brain barrier system could be assessed. The ratio of specific radioactivity of the cerebrum to the specific radioactivity of blood (sRc/sRb) was adopted, to manifest the amino acid transport. The degree of amino acid utilisation for synthesis was indicated by the ratio of cerebral protein radioactivity to the total radioactivity of the cerebrum (pR/tR).

The results obtained in the particular age groups of the animals are shown in Table 2.

Table 2. ⁷⁵Se-selenomethionine transport to brain and its incorporation into the protein fraction at various times after methylcholantrene implantation. See text for explanations to variant B

Tabela 2. Transport ⁷⁵Se-selenometioniny do mózgu i włączenie jej do frakcji białkowej w różnych okresach po wszczepieniu metylecholantrenu. Objaśnienia w tekście dotyczącym wariantu B

Group Grupa	Time after implanta- tion (weeks) Czas po wszczepieniu (tygodnie)	sRc/sRb × 100 Rwm/Rwk × 100		pR/tR × 100 Rb/Rc × 100	
		Experimen- tal Doświad- czal.	Control Kontrola	Experimen- tal Doświad- czal.	Control Kontrola
I	4	0.89 ± 0.38	0.88 (0.87, 0.80)	43.2 ± 6.8	48.1 (47.5, 48.7)
II	12	0.61 ± 0.12	0.38 (0.32, 0.45)	46.2 ± 3.7	55.2 (53.5, 56.9)
III	20	1.11 ± 0.31	1.14 (0.96, 1.32)	44.7 ± 2.1	53.2 (52.1, 54.4)
IV	28	0.46 ± 0.08	0.67 (0.78, 0.56)	55.7 ± 4.6	50.0 (49.3, 50.8)
V	36	0.76 ± 0.33	1.09 (1.21, 0.98)	49.8 ± 2.4	46.9 (45.8, 48.0)

The data for selenomethionine transport across the blood-brain barrier system show that, as the result of methylcholantrene implantation, the permeation of the amino acids demonstrates transient variability. Wide individual differences were found in the group investigated 4 weeks after

implantation, which may be ascribed rather to surgical trauma than to the carcinogenic action of methylcholantrene. In this period the degree of amino acids utilization in synthesis does not show marked changes. In the 12th week an enhanced transport was observed. The fact that the synthesis of protein — a process dependent of active transport — is reduced simultaneously may be evidence of changed permeability of the blood-brain barrier for the amino acid investigated. In the 20th week no changes in permeability of blood vessels were noted while protein synthesis continued to be low. Between the 28th and 36th week of the experiment a new tendency to a depression of transport appears, although wide individual differences do not allow any final conclusions. In this period protein synthesis does not vary from normal. The results of experiments carried out with animals with brain tumours are shown in Table 3.

Diagnosis based on very small sections of the tumours showed that among the 17 cases, ten were fibrosarcomas, two monstrocellular sarcomas, one a nonclassified sarcoma, one a gliosarcoma, two III and IV grade astrocytomas and in one case glioma cells were dispersed between striated muscles. In the tumours particularly noteworthy was the abundancy or reduced number of vessels and necrotic foci, factors which may affect amino acid transport as well as the number of mitoses related to protein synthesis. Also the presence of reticulin fibres being an anabolically inactive component, might lower the results of calculations per weight unit.

The formulae given below were used for calculation in order to demonstrate the different proportion of the tumours in the total weight of the tissues examined in determinations of changes in transport and amino acid incorporation into the protein fraction.

$$1) \text{ ret} = \frac{sRc_{Ex}/sRb_{Ex} - sRc_C/sRb_C}{sRc_C/sRb_C} \cdot 100 \frac{wc_C}{wc_{Ex}}$$

$$2) \text{ rei} = \frac{pR_{Ex}/tR_C - pR_C/tR_C}{pR_C/tR_C} \cdot 100 \frac{wc_C}{wc_{Ex}}$$

Where:

- ret — relative enhancement of transport
- sRc_{Ex} — specific radioactivity of experimental cerebrum
- sRc_C — " " " control
- sRb_{Ex} — " " " experimental blood
- sRb_C — " " " control "
- rei — relative enhancement of incorporation
- pR_{Ex} — radioactivity of protein fraction of experimental cerebrum
- tR_{Ex} — total radioactivity of protein fraction of experimental cerebrum
- pR_C — radioactivity of protein fraction of control cerebrum
- tR_C — total radioactivity of protein fraction of control cerebrum
- wc_{Ex} — weight of experimental cerebrum
- wc_C — " " control "

Table 3. ⁷⁵Se-selenomethionine transport and its incorporation in vivo into the proteinTabela 3. Transport ⁷⁵Se-selenometioniny i jej włączanie in vivo do frakcji białkowej

Tumour type Typ guza	Vessels Naczynia	Necroses Martwice	Mitoses Mitozy	Reticuline Retikulina	Remarks Uwagi
Astr. III—IV	++	++	+++	—	—
Astr. III	++	—+	—+	—	—
Glioma	—+	+	—	—	Muscles
Glio-Sa	++	+++	—+	+++	„
F-Sa	+++	++	++	+++	—
F-Sa	+	—	+	++++	Muscles
F-Sa	+	++	++	++	—
F-Sa	++	++++	+	++	—
F-Sa	+	+++	++	++	—
F-Sa	++	+	+	+++	—
F-Sa	+	+	++	++++	—
F-Sa	+	++	++	++	—
F-Sa	+++	—	++	—+	—
F-Sa	+	++	++	+	—
Mc-Sa	++	—	+	+	—
Mc-Sa	+++	++	++	++	—
Ncl-Gl	++	—	—+	—	—

The results in Table 3 (cols 7, 8, 9) show, that in all cases of experimental tumours, an enhanced transport of the amino acid to the tissue occurs as compared with that in control brains. The relative increase in transport varied within wide limits, but seems to be independent both of the degree of vascularization of the tumour and of the number of necrotic foci.

The enhanced amino acid transport to the tumour, as compared with that to the brain of control animals may therefore be attributed rather to an increase in active transport than to impairment of the barrier mechanism for the given amino acid. Only in one case was a marked reduction of transport noted, which might have been connected with the presence of a large number of muscle fibres in the preparation. No relation could be established between enhanced transport and the type of tumour, although the results for two gliomas were very similar and indicated a relatively slight increase as compared with transport to brains of control animals.

Analysis of the results led to similar conclusions (Table 3, cols 10, 11, 12) as to amino acid incorporation into the protein fraction. In most of the cases examined an increased degree of amino acid utilization for synthesis was observed parallel to the enhanced transport. Here too no relation of this finding to the morphological features or the tumour type could be found. In the four cases in which a lowered relative radioactivity

fraction of various mouse brain tumours. Explanation in text, in parentheses the brain weights in mg

w różnych guzach mózgu myszy. W nawiasach podano wagę mózgów doświadczalnych i kontrolnych w mg

$sR_{Ex}/sR_{B_{Ex}}$ Erwm/rwk	$sR_{C}/sR_{B_{C}}$ Krw/rwk	ret wpt	pR_{Ex}/tR_{C} Erb/re	pR_{C}/tR_{C} Krb/r ^C	rei wpw
1.19(1213)	0.85(382)	12.6	51.2	49.1	1.4
1.15(709)	0.92(412)	14.5	48.6	44.6	5.2
0.84(574)	0.94(437)	-8.1	42.6	47.2	-7.4
0.92(702)	0.87(393)	6.1	43.5	44.9	-1.7
1.15(916)	0.92(412)	11.2	48.3	44.6	3.7
1.28(875)	0.89(456)	22.8	49.9	47.0	3.2
1.62(716)	0.94(405)	40.9	48.9	46.6	2.8
1.43(918)	1.00(419)	19.6	48.8	45.8	3.0
1.36(2170)	1.02(390)	6.0	50.1	48.7	0.5
2.21(545)	0.85(402)	118.0	48.0	44.1	6.5
1.15(625)	0.93(358)	13.5	32.5	38.4	-8.7
1.74(770)	1.09(395)	30.5	48.8	44.9	4.5
1.58(945)	0.66(410)	60.5	45.2	40.5	5.0
1.67(2640)	0.87(420)	14.6	52.9	47.5	1.8
0.98(646)	0.98(412)	0.0	42.0	44.2	-3.2
1.92(1642)	0.96(438)	26.6	52.2	42.3	6.2
2.31(705)	0.95(408)	82.8	47.9	44.3	4.7

of the protein fraction was noted, two showed the presence of muscle fibres in the preparation. Thus, the lowered incorporation may have been in these cases only apparent. To sum up, it may be stated that the theoretically probable enhancement of protein synthesis in neoplastic as compared to that in normal tissue may be due to the following causes: (a) an enhanced amino acid transport from the vessels bed to the tissue, leading to its increased pool in the tissue; (b) a higher degree of utilization of the amino acid in synthesis, probably on expense of other pathways of amino acid metabolism.

H. Kroh, J. Albrecht

BIOSYNTENZA BIAŁEK W MÓZGU MYSZY W OKRESIE UTAJENIA I WZROSTU NOWOTWORU PO IMPLANTACJI METYLCHOLANTRENU

Streszczenie

Badania przeprowadzono na mózgach myszy, którym w wieku 8 tygodni implantowano do mózgu kryształ metylcholantrenu — związku o udowodnionym działaniu karcinogennym. W różnych czasach pomiędzy 4 a 36 tygodniem po implantacji przeprowadzono dwa rodzaje doświadczeń: A — z mózgów wyodrębniono frakcję postmitochondrialną, stanowiącą nie oczyszczony układ bezkomórkowy syntetyzujący białko, a następnie badano jej zdolność do włączania in vitro ⁷⁵Se-selenometioniny do białek; B — zwierzętom podawano dootrzewnowo selenometioninę, po czym izolowano mózgi, a następnie określano stosunek radioaktywności frakcji białkowej

mózgu do jego radioaktywności całkowitej, świadczący o stopniu wykorzystania aminokwasu w syntezie białek *in vivo* oraz stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi, będący wykładnikiem przechodzenia aminokwasu przez barierę krew—mózg. Badania *in vitro* nie wykazały w żadnej z grup doświadczalnych istotnych zmian w aktywności układu syntetyzującego białko. W badaniach *in vivo* stwierdzono przejściowe zmiany w transporcie aminokwasu do mózgu, przy czym w 12 tygodni po implantacji ujawniła się tendencja do wzrostu transportu, a w czasach późniejszych do jego obniżenia. Brak jest wyraźnej korelacji pomiędzy występowaniem nieznacznych zmian w stopniu wykorzystania aminokwasu do syntezy a wahaniami w jego transporcie do mózgu, co świadczy o tym, że powyższe zaburzenia dotyczą raczej przepuszczalności bariery krew—mózg niż aktywnego transportu aminokwasu do mózgu.

Г. Крох, Я. Альбрехт

БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ МЕТИЛХОЛАНТРЕНА В ПЕРИОД ЛАТЕНЦИИ И РОСТА ОПУХОЛИ

Резюме

Исследования проводились на постмитохондриальной фракции, изолированной из мозга мышей 4—48 недель спустя после имплантации метилхолантрена в мозг при применении $^{75}\text{-Se}$ -селенметионина „*ин виво*” и „*ин витро*”. Кроме того исследовалась эта фракция из мозгов с опухолями разного типа.

Результаты исследований в передопухоловой период указывают, что метилхолантрен не вызывает существенных изменений в активности системы синтезирующей белок. Исследования „*ин виво*” обнаруживают переходящие изменения в транспорте аминокислоты через барьер кровь—мозг и связанные с этим процессом снижения синтез белка.

Исследования на опухолевом материале указывают, что независимо от качества опухоли наблюдается усиленный транспорт аминокислоты в ткань. Относительное увеличение транспорта кажется быть независимым от степени васкуляризации и некротических изменений в опухоли, и может следовательно расцениваться как результат усиления активного транспорта данной аминокислоты, а не связываться с структурными изменениями барьера кровь—мозг. Не удалось обнаружить корреляции между увеличением транспорта и типом опухоли. Увеличенная степень инкорпорации аминокислоты в белковую фракцию согласуется с увеличением транспорта. Не обнаруживается зависимости между степенью инкорпорации аминокислот и исследованными морфологическими изменениями.

REFERENCES

1. Dunn, A. J.: The limiting factors of a cell-free protein synthesizing system from rat brain. *Biochem. J.* 1970, 116, 135—141.
2. Gravela, E.: The dissociation of Yoshida hepatoma ribosomes into active particles. *Biochem. J.* 1970, 121, 145—150.
3. Johnson, T. C.: Cell-free protein synthesis by mouse brain during early development. *J. Neurochem.* 1968, 15, 1189—1194.
4. Kroh, H.: Preneoplastic Changes in the Central Nervous System of Mice Induced by Methylcholantrene. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 55—72.

5. Kwan, S., Webb, T. E., Morris, H. P.: Diversity and nature of ribosomal pools in hepatoma 7800 and host liver. *Biochem. J.* 1968, 109, 617—626.
6. Lowry, H. N., Rosenbrough, J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Rolin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—270.
7. Viale, G. L., Fondelli Restelli, A., Gentile, S. L., Viale, E.: Preparazione dei ribosomi del cervello e dai tumori cerebrali. *Sistema Nervoso* 1967, 19, 125—130.

Authors' address: Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research Centre, Warsaw, Dworkowa 3, Poland.

ZUZANNA KRAŚNICKA, KRYSZYNA RENKAWEK, BARBARA GAJKOWSKA

WPLYW KRÓTKOTRWAŁEJ ANOKSJI NA OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY KOMÓREK GLEJOWYCH HODOWANYCH *IN VITRO* *)

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

Gromadzenie się złogów glikogenu w elementach strukturalnych tkanki nerwowej traktowane jest przez wielu autorów (Mossakowski i wsp. 1968, Klatzo i wsp. 1970, Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971) jako wykładnik zaburzeń metabolizmu komórek, nie znajdujących swojego odzwierciedlenia w obrazie histologicznym tkanki.

W poprzednim cyklu doświadczeń (Kraśnicka, Renkawek 1972) nad wpływem krótkotrwałej anoksji na komórki glejowe hodowane *in vitro* stwierdzono również przejściowe gromadzenie się glikogenu w cytoplazmie astrocytów, które nie wykazywały w ogóle, lub tylko nieznaczne cechy uszkodzeń morfologicznych. Przedłużenie czasu anoksji prowadziło do znacznego nasilenia uszkodzeń komórek, w których nie stwierdzano wówczas odkładania się glikogenu.

W obecnej pracy przeprowadzono analizę obrazu mikroskopowo-elektronowego komórek glejowych hodowanych w warunkach pozaustrojowych, poddanych działaniu przejściowej anoksji, w celu skonfrontowania zjawiska gromadzenia się glikogenu z ewentualnymi uszkodzeniami ultrastruktury komórek.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto hodowle mózdzku jednodniowych noworodków szczu-rych, prowadzone w sposób standardowy (Kraśnicka, Mossakowski 1965). Hodowle glejowe wzrastały na szkiełkach podstawowych pokrytych warstwą Eponu i żelifikowanego kolagenu. Hodowle w wieku 1 i 3 tygodni przetrzymywano w atmosferze czystego azotu przez 30 min., z zachowaniem tych samych warunków doświadczalnych, jak w poprzedniej pracy (Kraśnicka, Renkawek 1972).

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

Do obserwacji w mikroskopie elektronowym pobierano hodowle w 2, 3 i 4 dniu po anoksji. Materiał do badań opracowywano w sposób opisany przez Borowicza i Kraśnicką (1971), a następnie oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7 A. Zdjęcia wykonano na kliszach ORWO EU-2 przy napięciu przyśpieszającym 80 kv.

WYNIKI

Hodowle 1-tygodniowe

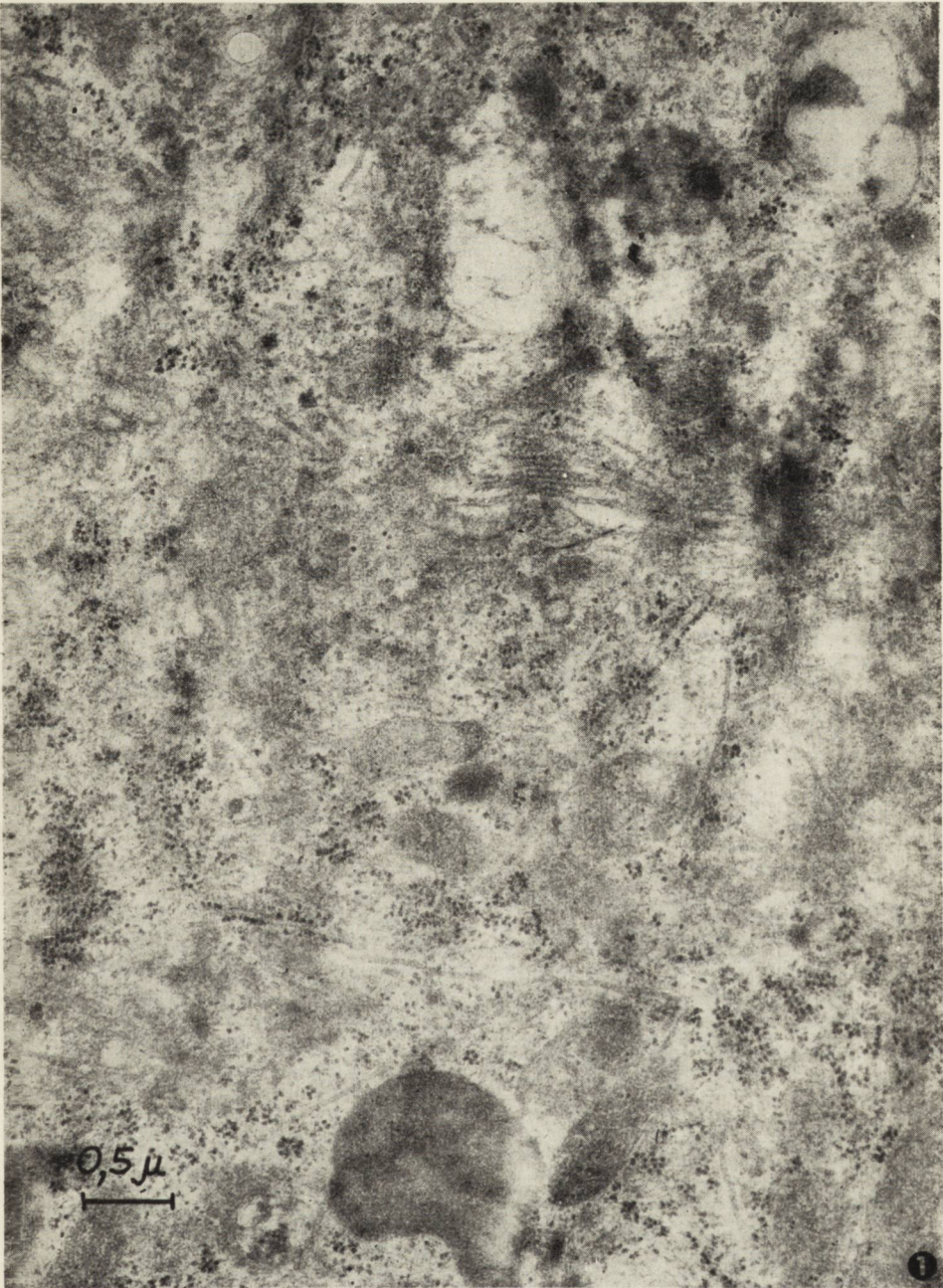
Po 2 dniach przeżycia hodowli po anoksji niezróżnicowane komórki glejowe wykazują w obrazie mikroskopowo-elektronowym zmiany aparatu Golgiego, polegające na poszerzeniu i rozbudowaniu jego kanalików i pęcherzyków (ryc. 1). Mitochondria są obrzmiałe, tracą grzebienie, a ich struktura często ulega zatarciu i przejaśnieniu. W niektórych komórkach obserwuje się mitochondria znacznie lepiej zachowane, z ciemną macierzą i wyraźnymi grzebieniami. Siatka śródplazmatyczna nie wykazuje większych zmian w porównaniu z komórkami z hodowli kontrolnych. W tym samym okresie po anoksji, w cytoplazmie niezróżnicowanych komórek glejowych pojawiają się pojedyncze gliotubule (ryc. 1).

W 3 i 4 dniu po anoksji obraz mitochondriów i siatki endoplazmatycznej nie ulega większym zmianom w porównaniu ze stanem zaobserwowanym w drugim dniu. Występuje natomiast znacznie większa ilość gliofibryli i gliotubul. W 4 dniu po anoksji w cytoplazmie astrocytów stwierdza się liczne skupienia ziaren glikogenu (ryc. 2). W tym samym dniu wzrasta ilość pęcherzyków pinocytarnych. Ilość lizosomów i ich wygląd w komórkach glejowych, w materiale doświadczalnym, nie wykazują istotnych różnic w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach prawidłowych.

Hodowle 3-tygodniowe

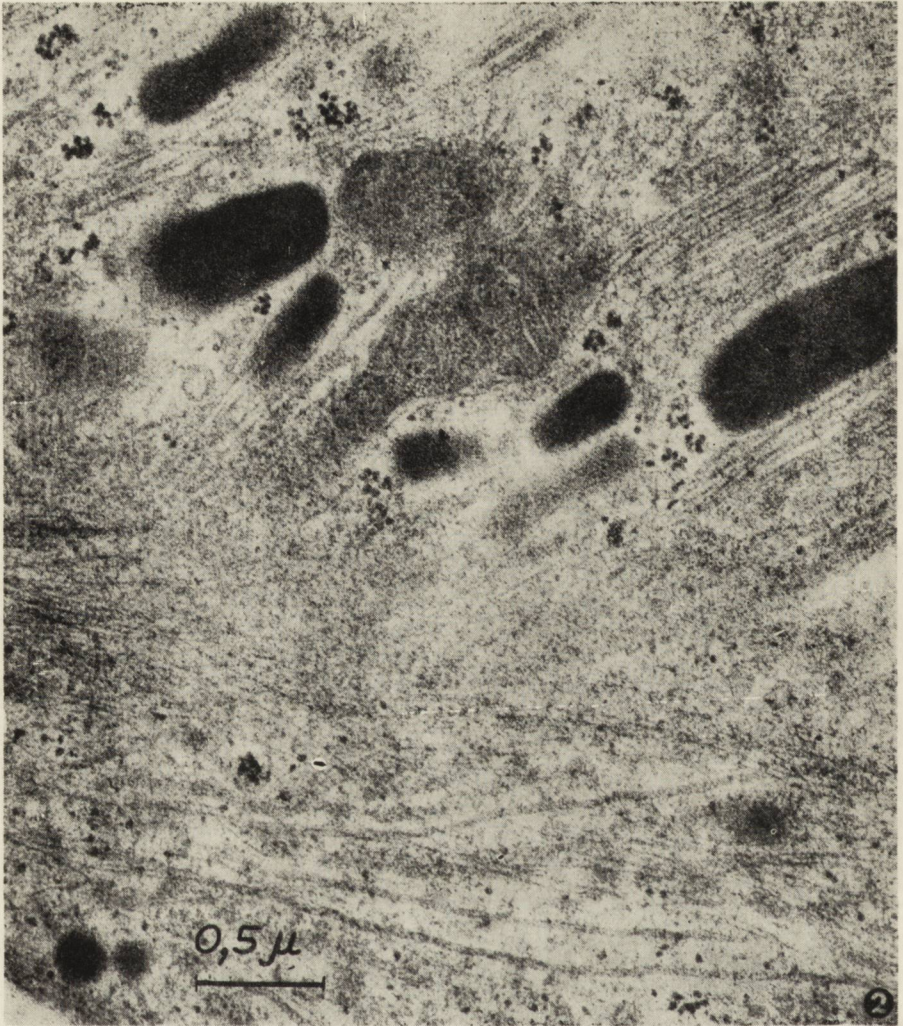
Charakter i natężenie zmian w obrazie ultrastrukturalnym są uzależnione od typu komórki glejowej.

W okresie od 2 do 4 dnia po anoksji w komórkach astrogleju obserwuje się znaczny rozrost i poszerzenie kanałów gładkiej siatki śródplazmatycznej oraz nagromadzenie gliofibryli i gliotubul (ryc. 3). Mitochondria wykazują przerzedzenie grzebieni i przejaśnienie macierzy. Zmiany w mitochondriach są jednak mniej nasilone niż w hodowlach 1-tygodniowych. Szorstka siatka śródplazmatyczna nie wykazuje większych zmian w porównaniu z jej obrazem w astrogleju z hodowli prowadzonych w warunkach standardowych. Rybosomy występują w zmiennej ilości w poszczególnych komórkach, często są skupione w większych ugrupowaniach. W cytoplazmie perikariów i wypustek astrocytów już w drugim tygodniu



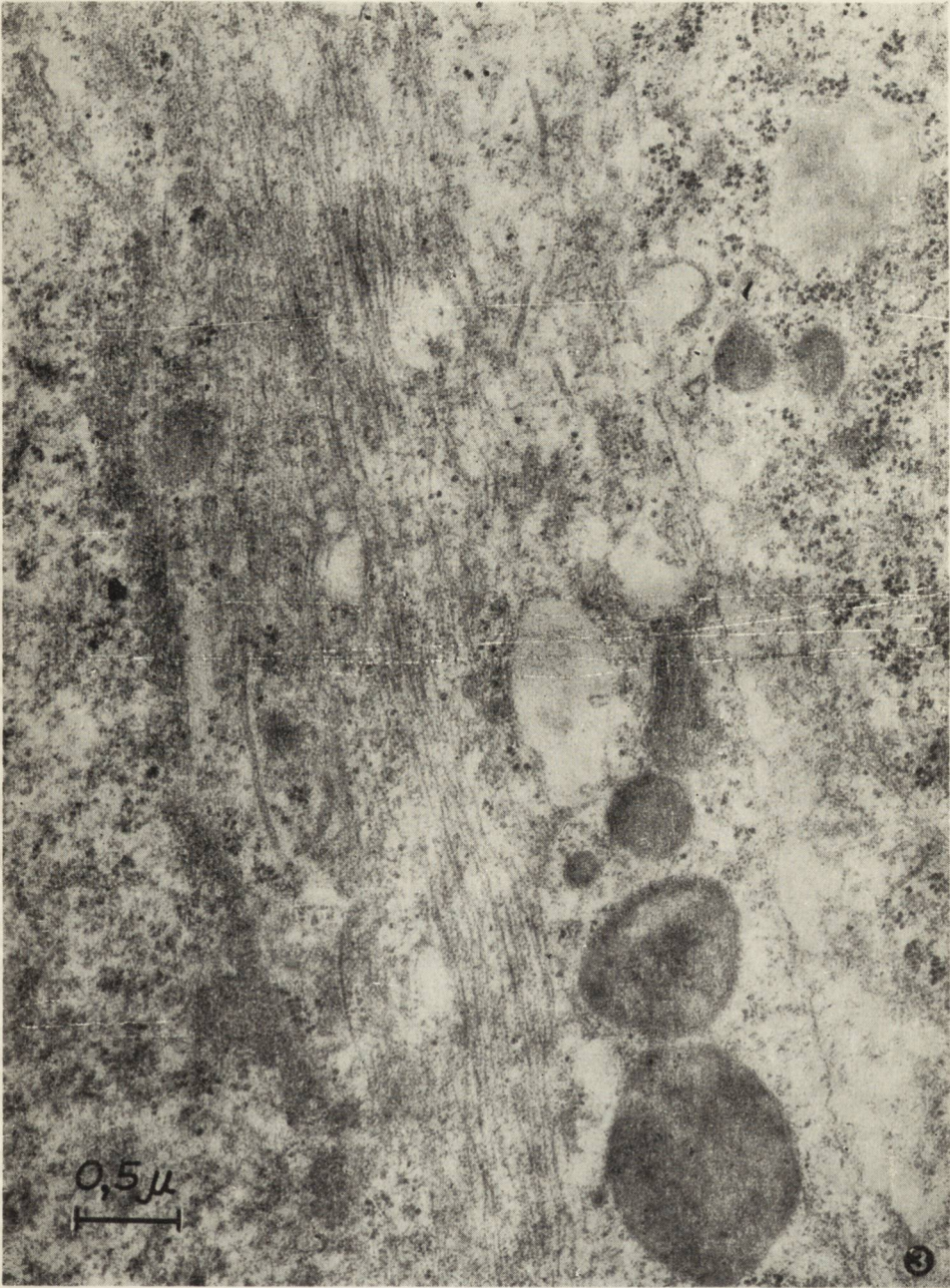
Ryc. 1. Hodowla 1-tygodniowa, 2 dni przeżycia po anoksji. Znaczne obrzmienie mitochondriów i poszerzenie kanalików aparatu Golgiego w astrogleju.

Fig. 1. One week culture, 2 days after anoxia. Swollen mitochondria and enlargement of Golgi apparatus in astroglial cell.



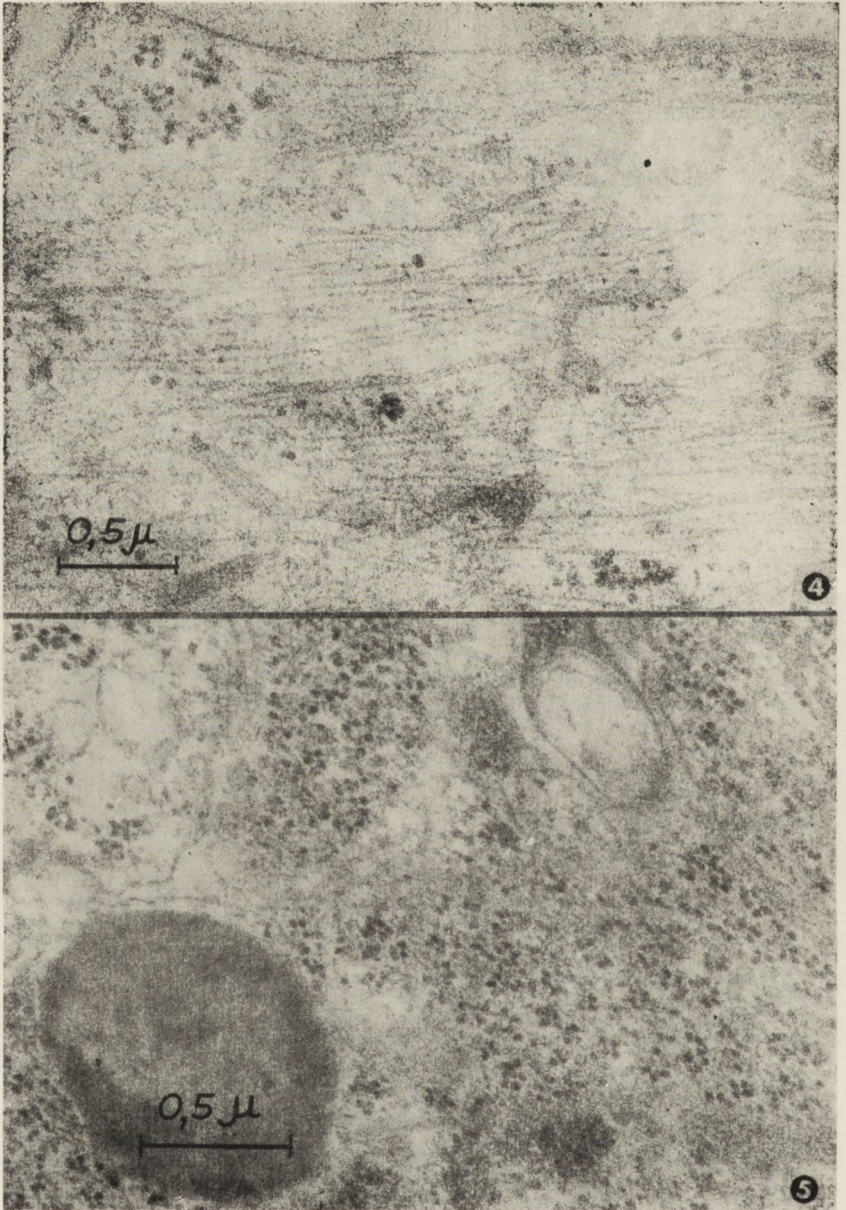
Ryc. 2. Hodowla 1-tygodniowa, 4 dni przeżycia po anoksji. Liczne gliofibryle i gliotubule, znaczne nagromadzenie ziaren glikogenowych w komórce astrogleju.

Fig. 2. One week culture, 4 days after anoxia. Numerous gliofibrils and gliotubules and accumulation of glycogen granules in astroglial cell.



Ryc. 3. Hodowla 3-tygodniowa, 2 dni po anoksji. Pofałdowanie błony komórkowej i pęcherzyki pinocytarne.

Fig. 3. Three week culture, 2 days after anoxia. Folded astrocytic cellular membrane and pinocytic vesicles.

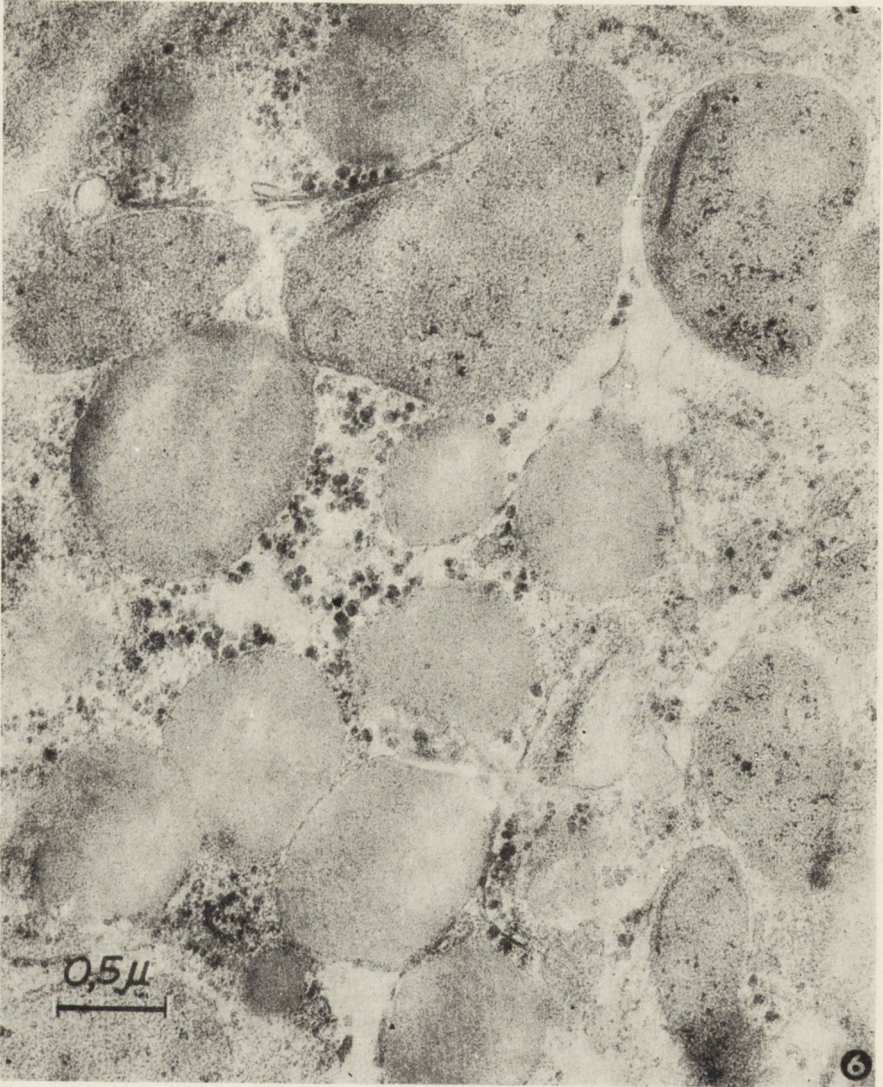


Ryc. 4. Hodowla 3-tygodniowa, 2 dni po anoksji. Liczne ziarna glikogenowe w wypustce astrocytu.

Fig. 4. Three week culture, 2 days after anoxia. Numerous glycogen granules in astrocytic process.

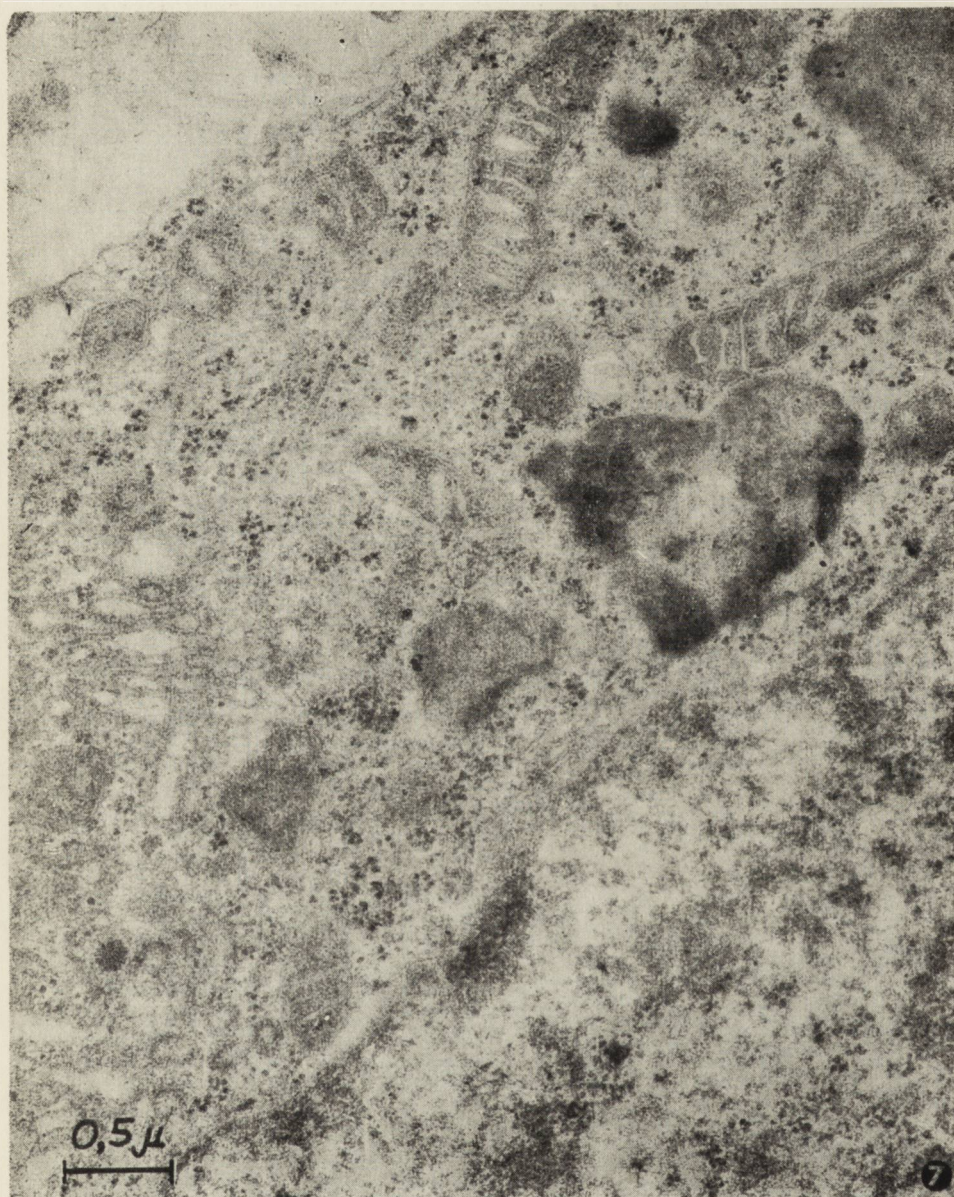
Ryc. 5. Hodowla 3-tygodniowa, 4 dni po anoksji. Nagromadzenie ziaren glikogenowych w cytoplazmie astrocytu.

Fig. 5. Three week culture, 4 days after anoxia. Accumulation of glycogen granules in astrocytic cytoplasm.



Ryc. 6. Hodowla 3-tygodniowa, 4 dni po anoksji. Liczne ciała lizosomopodobne i nagromadzenie ziaren glikogenowych w cytoplazmie astrocytu.

Fig. 6. Three week culture, 4 days after anoxia. Lysosome-like bodies and glycogen deposits in the cytoplasm of astrocyte.



Ryc. 7. Hodowla 3-tygodniowa, 4 dni po anoksji. Komórka oligodendrogleju z charakterystycznie zmienionymi mitochondriami, z zagęszczoną macierzą. Poszerzenie kanalików aparatu Golgiego.

Fig. 7. Three week culture, 4 days after anoxia. Electron-dense matrix of mitochondria and enlargement of Golgi apparatus in oligodendroglial cells.

spotyka się pojedyncze ziarna glikogenu (ryc. 4). W trzecim dniu występują one w znacznej ilości w skupieniach położonych wśród licznych gliofibryli i gliotubul. Ilość ziaren glikogenowych wzrasta jeszcze bardziej w czwartym dniu po anoksji (ryc. 5).

W hodowlach 3-tygodniowych zjawisko pinocytozy jest słabiej wyrażone, niż w niedojrzałych komórkach z hodowli 1-tygodniowych. W dojrzałych astrocytach obserwuje się jedynie pojedyncze pęcherzyki pinocytarne. W niektórych komórkach astrogleju występują liczne ciała lizosomopodobne o różnej wielkości i gęstości elektronowoptycznej (ryc. 6).

W komórkach gleju skąpowypustkowego obserwowane zmiany dotyczą przede wszystkim szorstkiej siatki śródplazmatycznej, której kanały ulegają znacznemu poszerzeniu. Mitochondria oligodendrocytów wykazują zmiany na ogół mniej nasilone niż mitochondria astrocytów. W wielu komórkach obserwuje się zagęszczenie macierzy mitochondriów, a tylko w niektórych spośród nich poszerzenie przestrzeni między grzebieniami i ich obrzmienie (ryc. 7).

OMÓWIENIE

Po zadziałaniu krótkotrwałej anoksji na pozaustrojową hodowlę tkanki glejowej, zmiany ultrastrukturalne występują głównie w astrocytach, natomiast w komórkach gleju skąpowypustkowego są one mniej nasilone. Zmiany strukturalne w astrocytach wykazują różny stopień nasilenia w poszczególnych komórkach i polegają głównie na obrzmieniu ich cytoplazmy i organelli śródplazmatycznych, korespondując w pełni z poprzednimi obserwacjami histologicznymi i histochemicznymi.

Zaobserwowane przez nas znacznego stopnia obrzmienie cytoplazmy astrocytów należy zapewne wiązać ze szczególną ich właściwością selektywnego gromadzenia wody stwierdzaną w różnych stanach patologicznych, w tym również w hipoksji (Hills 1964, Bakay, Lee 1968, Klatzo i wsp. 1970).

Na podkreślenie zasługuje znaczne poszerzenie aparatu Golgiego i gładkiej siatki śródplazmatycznej, prowadzące w niektórych komórkach do powstawania mniej lub bardziej licznych wakuoli. Krótkotrwała anoksja wywołuje ponadto w mitochondriach, z których większość wykazuje cechy obrzmienia z zatarciem struktury i utratą grzebieni. We wszystkich okresach przeżycia po anoksji w cytoplazmie perikariów i wypustek astrocytów stwierdzano zwiększoną ilość gliofibryli i gliotubul. Stałość i powtarzalność zjawiska pozwala przypuszczać, że anoksja wywiera wpływ stymulujący na proces wytwarzania struktur włókienkowych w komórkach. Podobne zjawisko obserwowano w doświadczalnym obrzęku mózgu (Rubinstein i wsp. 1961). W tych przypadkach włókienka glejowe, wybarwiająca się metodą Holzera pojawiły się w tkance już po upływie 6 godzin od zadziałania czynnika uszkadzającego.

W późniejszych okresach po anoksji w cytoplazmie astrocytów, obok wyżej opisanych zmian, stwierdza się zwiększenie ilości ciał lizosomopodobnych o różnej gęstości elektronowoptycznej, świadczących zapewne o zachodzących w komórkach procesach zwyrodnieniowych.

Porównanie obrazów elektronowo-mikroskopowych hodowli 1- i 3-tygodniowych wskazuje, że typ zmian jest zasadniczo identyczny w niedojrzałych i w zróżnicowanych hodowlach. Podobnie niewielkie różnice dotyczą natężenia zmian. Mitochondria w hodowlach 1-tygodniowych wydają się bardziej zmienione niż w 3-tygodniowych. Ziarnistości glikogenowe w cytoplazmie astrocytów z hodowli 3-tygodniowej pojawiają się nieco wcześniej po anoksji niż w 1-tygodniowej.

Niewielkie ilości ziaren glikogenu obserwowano sporadycznie w cytoplazmie astrocytów z hodowli prowadzonej w standardowych warunkach (Bunge i wsp. 1965, Kraśnicka, Borowicz 1970). Ilość złogów glikogenu spostrzeganych w komórkach poddanych uprzedniemu działaniu anoksji jest jednak niewspółmiernie większa niż w materiale kontrolnym. Pojawiają się one w cytoplazmie perikariów i wypustek astrocytów już w drugim dniu po anoksji (w niezróżnicowanych komórkach później) i wrażliwość wraz z czasem przeżycia po zadziałaniu czynnika uszkodzającego, w pełnej zgodności czasowej z obserwacjami w mikroskopie świetlnym (Kraśnicka, Renkawek 1972). Biorąc pod uwagę niewielkie różnice zmian ultrastrukturalnych w astrocytach obserwowane w 2, 3 i 4 dniu po zadziałaniu anoksji, można stwierdzić, że maksymalne nagromadzenie glikogenu jest zjawiskiem późniejszym niż nieprawidłowości w ultrastrukturze ich cytoplazmy i organelli śródplazmatycznych. Sekwencja czasowa tych zjawisk pozwala przypuszczać, że gromadzenie się glikogenu jest następstwem zaburzeń w strukturze i metabolizmie komórki. Należy przy tym podkreślić nieswoistość tego zjawiska. Astrocytarne złogi glikogenu opisywano bowiem w szeregu różnorodnych procesów patologicznych (Oksche 1961, Miquel, Haymaker 1965, Klatzo i wsp. 1970, Korthals i wsp. 1972, Mossakowski, Penar 1972).

W podsumowaniu naszych obserwacji na podkreślenie zasługuje znaczna wrażliwość astrocytów na krótkotrwałą, przejściową anoksję. Podobnie wysoką wrażliwość gleju i komórek Schwanna na niedotlenienie opisywali uprzednio Hills (1964) i Rouiller i wsp. (1970).

З. Краśницка, К. Ренкавек, Б. Гайковска

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ АНОКСИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ
КАРТИНУ ГЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ, ВЫРАЩИВАЕМОЙ „ИН ВИТРО”

Резюме

Исследовалась ультраструктура глиальных клеток из культур, подвергнутых кратковременной гипоксии. Исследования проводились на 1 и 3-недельных культурах. Время воздействия аноксии составляло 30 мин. Для наблюдения в элек-

тронном микроскопе культуры фиксировались после 2, 3 и 4 дней по воздействию аноксии.

Электронномикроскопическая картина глиальных клеток после получасовой гипоксии обнаруживает незначительные изменения в ультраструктуре. Изменения сводятся к отечности митохондрий и полиферации гольджиевого аппарата. В некоторых клетках наблюдается расширение канальцев эндоплазматического ретикулума и мелкие вакуоли. Самые существенные изменения сводятся к скоплению излишнего количества гликогенных зерен в цитоплазме клеток вблизи ядра и клеточных отростках. Кроме того обнаруживается значительное количество глиофибриллов и глиотубуллов.

1-дневные культуры обнаруживают большую выраженность морфологических изменений чем более старые культуры. В 3-недельных культурах более выраженные изменения имеются в астроцитах чем в олигодендроцитах.

Z. Kraśnicka, K. Renkawek, B. Gajkowska

EFFECT OF SHORT-TERM ANOXIA ON THE ULTRASTRUCTURAL PICTURE OF THE GLIAL TISSUE IN VITRO

Summary

The ultrastructure of glial cells cultured *in vitro* subjected to short-term anoxia was being investigated. The studies were performed on 1- and 3-week culture, exposed to 30 minutes' anoxia. For the electron-microscopic examinations the cultures were fixed on the 2nd and 4th day after anoxia.

In the electron-microscopic picture, the glial cells after 30 minutes' anoxia show insignificant ultrastructural changes, consisting in mitochondrial swelling and extension of Golgi apparatus. In some of the cells there is to be observed dilatation of the smooth endoplasmic reticulum channels and small vacuoles. The most significant changes consist in the accumulation of excessive amount of glycogen grains in the cell cytoplasm close to the nucleus and in cellular processes. In addition, significant amounts of gliofibrils and gliotubules were found.

The one-week cultures show a higher intensity of morphological changes than the older ones. In the 3-week cultures, the changes in astrocytes are more intensive than in oligodendrocytes.

PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain* 1968, 91, 697—706.
2. Borowicz J., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania tkanki nerwowej hodowanej *in vitro* do badań w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 22, 691—697.
3. Bunge R. P., Bunge M. P., Peterson E. R.: An electron microscope study of cultured rat spinal cord. *J. Cell Biol.* 1965, 24, 163—191.
4. Hills C. P.: The ultrastructure of anoxic-ischemic lesions in the cerebral cortex of the adult rat brain. *Guy's Hosp. Reports* 1964, 113, 333—348.
5. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. VI Intern. Congr. Neuropath. Masson et Cie, 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. Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of glial cells in vitro tissue culture. *Acta Med. Pol.* 1971, 2, 199—202.
8. Kraśnicka Z., Borowicz J., Gajkowska B.: Ultrastruktura komórki glejowej z hodowli tkankowej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 3, 401—412.
9. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 4, 507—518.
10. Miquel J., Haymaker W.: Astroglial reaction to ionizing radiation with emphasis on glycogen accumulation. W: *Progress in brain research*, Vol. 15. *Biology of Neuroglia*. Ed. E.D.P. de Robertis, R. Carrera. Amsterdam, Elsevier Publ. 1965, 89—114.
11. Mossakowski M. J.: Histochemistry of pathological glia. *Proceed. VI Intern. Congres of Neuropath.* Masson et Cie, Paris 1970, 366—376.
12. Mossakowski M. J., Long D. M., Mayers R. E., de Curet H. R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
13. Mossakowski M. J., Penar B.: Some aspects of the histochemistry of the reactive glia. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 2, 317—323.
14. Oksche A.: Der histochemisch nachweisbare Glycogen-Aufbau und Abbau in den Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer funktionsabhängigen Stoffwechselaktivität der Neurologia. *Z. Zellforsch.* 1961, 54, 307—361.
15. Pronaszko-Kurczyńska A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany w zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.* 1971, IX, 3, 281—396.
16. Rouiller Ch., Nicolescu P., Orci L., Rufener C.: The effect of anoxia on the ultrastructure of the superior cervical ganglion of the rat in vitro. *Virchow Arch. B. Zellpath.* 1971, 7, 269—292.
17. Rubinstein L. J., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1962, 21, 1, 116—136.

Adres autorek: Zespół Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

MARIA OSTENDA

ULTRASTRUKTURA KOMÓREK GLEJOWYCH NAPROMIENIONYCH *IN VITRO* PROMIENIAMI GAMMA (Co^{60})^{*)}

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

Hodowle tkanki glejowej poddane działaniu czynnika uszkadzającego stanowią dogodny model do badania reakcji komórki izolowanej od różnorodnych wpływów, którym podlegają tkanki *in situ* (Pomerat i wsp. 1964). Badania histochemiczne hodowli komórek glejowych poddanych działaniu promieni jonizujących wskazują na występowanie szeregu zaburzeń w metabolizmie komórek i przepuszczalności błon (Ostenda 1972). Ustalenie dynamiki tych zmian oraz próba zlokalizowania ich na poziomie ultrastruktury jest celem obecnej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Do hodowli pobierano skrawki mózdzku jednodniowych szczurów. Eksplantat umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych Eponem i kolagenem, hodowano we flaszki Carrela w medium standardowym w temperaturze 37° (Borowicz, Kraśnicka 1971). Zdrowe, dobrze rosnące hodowle napromieniano w 7 dniu *in vitro* jednorazową dawką 5000 r promieni gamma. Źródłem promieniowania była bomba kobaltowa Gammatron 3, średnia wydajność 180 r/min., czas napromieniania 27'19". Hodowle przeznaczone do badań kontrolnych pozostawały przez ten czas poza cieplarką. Napromienione hodowle pobierano do badań w mikroskopie elektronowym w 3, 6, 24, 48 i 72 godz. po ekspozycji. Materiał utrwalano w 1,5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze Milloniga o pH 7,2 przez 90 minut w temperaturze 4°, następnie umieszczano w 2% roztworze OsO₄ w buforze Milloniga o pH 7,2 na 90 minut w temperaturze 4°. Skrawki odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu, a następnie zatapiano w Eponie. Bloczki skrawano na ultramikromie firmy Reichert, kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obserwacje przeprowadzono i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym typu JEM 7 A.

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

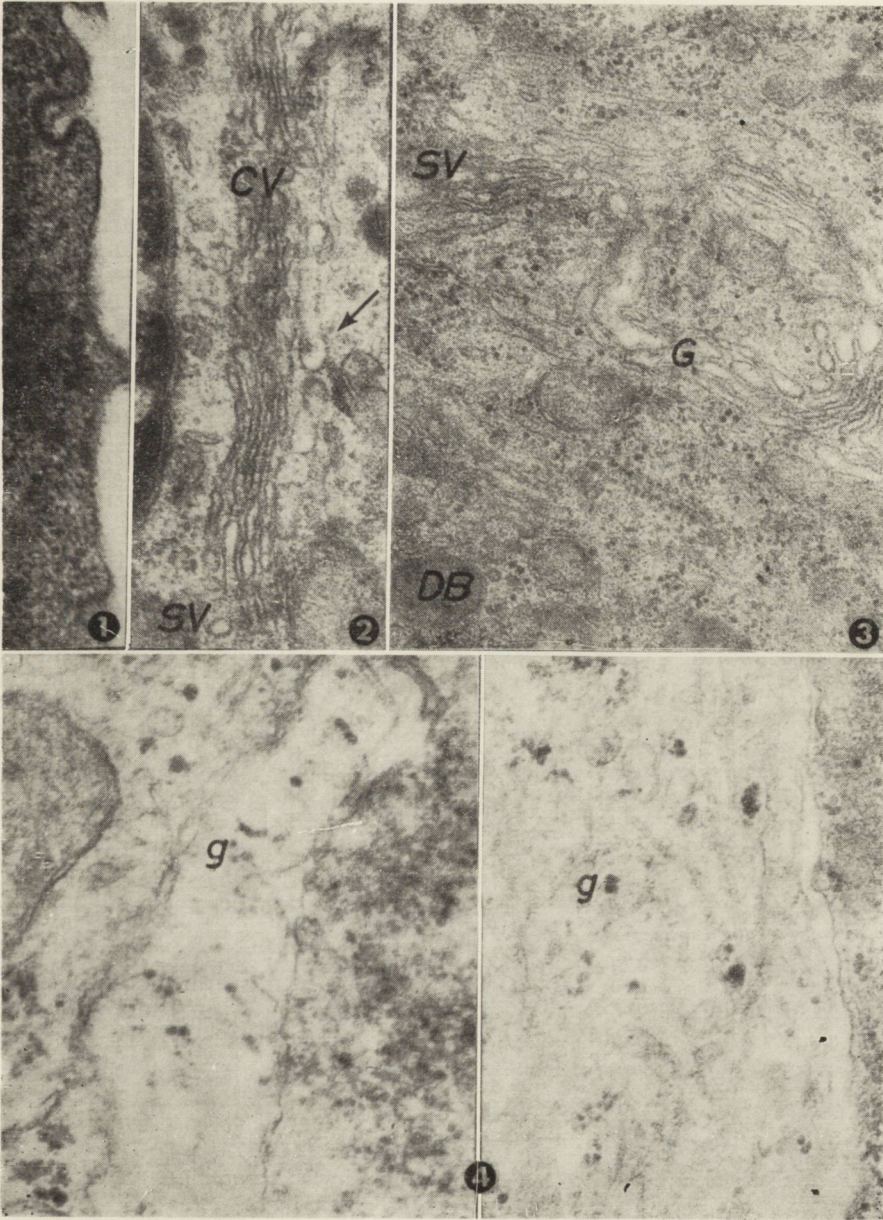
WYNIKI

Ultrastruktura komórek glejowych *in vitro* była opisywana niejednokrotnie (Holtzman 1969, Wolff i wsp. 1971, Kraśnicka, Borowicz 1971) ograniczono się przeto do charakterystyki tych jej cech, które stanowią punkt odniesienia przy porównaniach z hodowlami napromienionymi. W komórkach glejowych nienapromienionych spotykano często objawy pinocytozy w postaci wgłabiania odcinków błon komórkowych do cytoplazmy, przy czym obie powierzchnie były pokryte pewnego rodzaju kolcami (ryc. 1). Obserwowano różne stadia wgłabiania, aż do tworzenia typowych pęcherzyków pinocytarnych. Cysterny Golgiego były liczne, ułożone równolegle, ich końce często były rozdęte, a zawartość miała mierną gęstość elektronową (ryc. 2). Można było dostrzec pączkowanie z cystern pęcherzyków o tej samej gęstości elektronowej oraz pęcherzyków oplaszczonych (ryc. 3). Lizosomy miały charakter typowych ciał gęstych. Komórki o małej gęstości elektronowej cytoplazmy, zawierające gliofibryle, rozpoznawano jako astrocyty.

W komórkach glejowych napromienionych w 7 dniu hodowli *in vitro*, już w 3 godz. po ekspozycji strefa Golgiego zajmowała znaczną przestrzeń cytoplazmy. Poszerzone cysterny przybierały kształt łukowaty, pojawiały się bardzo liczne, małe pęcherzyki o małej gęstości elektroooptycznej, podobnie jak zawartość cystern aparatu Golgiego (ryc. 3). Występowały liczne ciała lizosomopodobne (ryc. 3). Często spotykano wakuole puste, lub zawierające struktury pęcherzykowe, albo ziarniste (ryc. 7). W cytoplazmie komórki pojawiały się złogi glikogenu początkowo nieliczne, 6 godz. po ekspozycji glikogen znajdował się w wielu komórkach. Pojedyncze ziarna lub całe ich grupy leżały luźno w cytoplazmie, były nieobłonione i nie związane z żadną strukturą śródkomórkową (ryc. 4). Większość komórek zawierających glikogen identyfikowano jako astrocyty. W komórkach oligodendrogleju złogów glikogenu nie stwierdzono.

We wczesnych okresach po napromienieniu (3—6 godz.) objawy pinocytozy były niedostrzegalne. Pojawiały się one po 24 godzinie od ekspozycji w postaci wgłobienia błony komórkowej (ryc. 5) i typowych pęcherzyków pinocytarnych, leżących tuż pod błoną (ryc. 6).

W tym samym okresie zmiany strefy Golgiego osiągały największe nasilenie. Cysterny pomnożone, o łukowatym przebiegu, zajmowały znaczną przestrzeń cytoplazmy, w pojedynczej komórce można było naliczyć do 8 skupisk cystern (ryc. 8). Zawartość ich była przejrzysta, lub wykazywała umiarkowaną gęstość elektroooptyczną, widoczne były między nimi liczne, małe pęcherzyki o podobnej zawartości (ryc. 7, 8). W tym czasie spotykano jeszcze śródplazmatyczne złogi glikogenu, które były jednak znacznie mniej liczne, niż w poprzednim okresie i zniknęły całkowicie w 48 godz. po ekspozycji. Liczba lizosomów oraz ciał lipofusynowych narastała, zwłaszcza w późniejszych grupach czasowych, wypełniając niejednokrotnie całą cytoplazmę komórkową. W okresie 48—



Ryc. 1. Hodowla komórek glejowych 7 dnia *in vitro*. Odcinkowe wgłobienia błony komórkowej do cytoplazmy tworzące zachyłki. Obie powierzchnie błony pokryte drobnymi ziarnami o znacznej gęstości elektronowej. Pow. 37 500.

Fig. 1. A 7-day culture of glial cells *in vitro*. Segmental invaginations of cell membrane into the cytoplasm forming recesses. Both membrane surfaces are covered with small granules of a significant electron density. $\times 37\,500$.

Ryc. 2. W nienapromienionej komórce glejowej zespół Golgiego składający się z licznych równolegle ułożonych cystern o rozdętych końcach, pustych, lub umiarkowanej gęstości elektronowej (strzałka), wśród cystern widoczne małe pęcherzyki o tej samej gęstości elektronowej (sv) oraz pojedyncze pęcherzyki opłaszczone (cv). Pow. 42 000.

Fig. 2. Golgi apparatus in non-irradiated glial cell, consisting of a number of parallel arranged cisterns with swollen endings, which are empty or of a moderate electron density (arrow). Among cisterns, small vesicles of the same electron density (sv) and single coated vesicles (cv). $\times 42\,000$.

Ryc. 3. Napromieniona hodowla komórek glejowych w 6 godz. po ekspozycji. Strefa Golgiego (G) zajmuje w komórce znaczną przestrzeń, wśród cystern o łukowatych kształtach liczne małe pęcherzyki (sv); ciała lizosomopodobne mają wygląd typowy (DB). Pow. 42 000 \times .

Fig. 3. Irradiated glial cell culture 6 hrs after exposition. Golgi zone (G) occupying a significant space in the cell, numerous small vesicles (sv) among cisterns of arcuated shapes, typical lysosome-like bodies (DB). $\times 42\,000$.

Ryc. 4. Hodowla komórek glejowych 6 godz. po napromienieniu. Złogi glikogenu w wypustkach komórkowych o niskiej gęstości elektronooptycznej cytoplazmy. Pow. 37 500 \times .

Fig. 4. Irradiated glial cell culture 6 hrs after exposition. Glycogen deposits in cellular processes with cytoplasm of low electron density. $\times 37\,500$.

Ryc. 5. Hodowla komórek glejowych 24 godz. po napromienieniu. W błonie komórkowej widoczne wgłobienie stanowiące wczesne stadium pęcherzyka pinocytarnego. Pow. 37 500 \times .

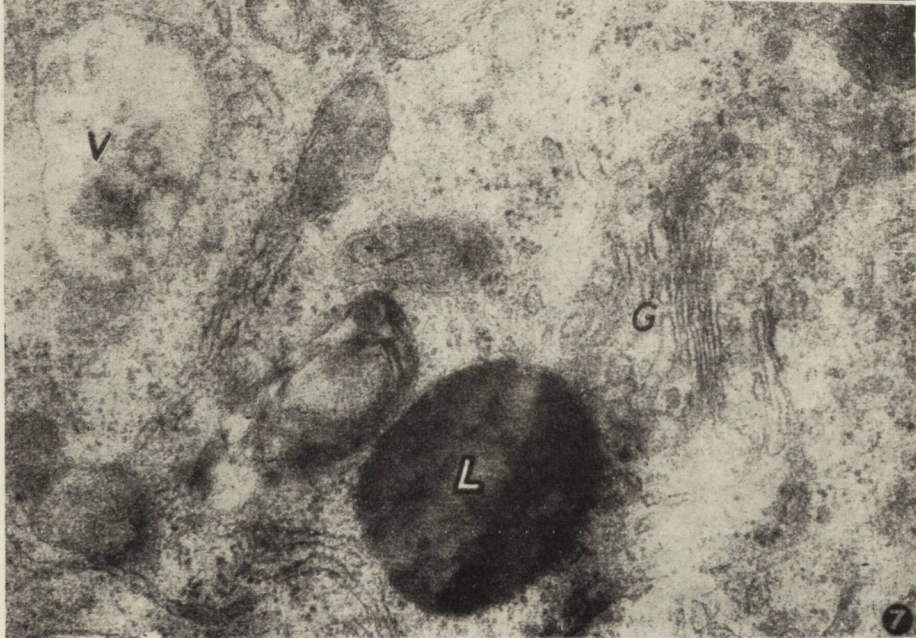
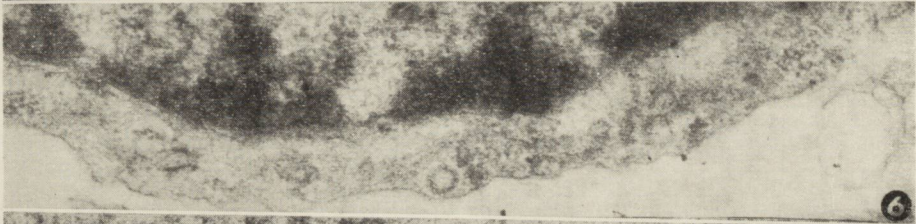
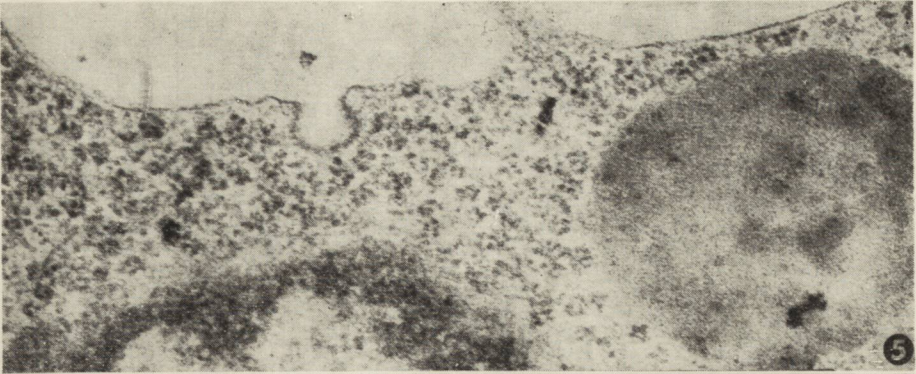
Fig. 5. Irradiated glial cell culture 24 hrs after exposition. In cell cytoplasm visible invagination forming the early stage of a pinocytic vesicle. $\times 37\,500$.

Ryc. 6. Hodowla 24 godz. po ekspozycji: pęcherzyki pinocytarne leżą bezpośrednio pod błoną komórkową. Pow. 37 500 \times .

Fig. 6. Culture 24 hrs after exposition: pinocytic vesicles directly under the cell membrane. $\times 37\,500$.

Ryc. 7. Hodowla 24 godz. po ekspozycji: poszerzony zespół Golgiego (G), lizosomy (L), autofagosomy (V). Pow. 37 500 \times .

Fig. 7. Culture 24 hrs after exposition: extended Golgi apparatus (G), lysosomes (L), autophagosomes (V). $\times 37\,500$.



uważane są za tzw. pierwotne lizosomy, zawierające hydrolazy (Holtzman 1969). Ich masowe pojawianie się w komórce może być objawem narastania procesów hydrolitycznych i może mieć bezpośredni związek z zwiększonym wytwarzaniem w późniejszych okresach ciał lizosomopodobnych, w których oprócz enzymów hydrolitycznych jest zawarty materiał podlegający trawieniu (Cohn, Fedorko 1969). Obecność ciał lizosomalnych zawierających struktury błoniaste, występujących bardzo rzadko w komórkach prawidłowych, świadczy o zachodzących w cytoplazmie procesach autolitycznych, które mogą prowadzić do śmierci komórki. Zwiększenie liczby lizosomów po napromienieniu stwierdzano również w tkance nerwowej *in situ* (Holtzman 1969).

Gromadzenie glikogenu w cytoplazmie astrocytów i zahamowanie pino-cytozy, występujące we wczesnych okresach po ekspozycji, może być wyrazem zahamowania procesów przemiany wewnątrzkomórkowej: zmniejszone wchłanianie przy równoczesnym spowolnieniu przemiany węglowodanów magazynowanych w cytoplazmie w postaci glikogenu. Pojawianie się glikogenu w cytoplazmie komórkowej jest częstą reakcją tkanki nerwowej na uszkodzenie. Opisywano również gromadzenie się glikogenu w astrocytach pod wpływem napromieniania (Masurovsky i wsp. 1967, Maxwell, Krüger 1965, Miquel, Haymaker 1965, Holtzman 1969, Estable-Puig, Estable-Puig 1971). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że również w warunkach hodowli tkankowej glikogen gromadzi się przede wszystkim w astrocytach. Objaw ten wykazuje znaczną dynamikę pojawiając się wcześnie (3 godz.) i szybko znikając (24 godz.). Nie ma jednak podstaw, aby sądzić, że cofanie się opisanego objawu stanowi *restitutio ad integrum*. W zbyt wielu komórkach pojawiają się liczne formy sekwestrujące lizosomów oraz kule lipofuscynowe, wypełniające niejednokrotnie całą cytoplazmę. Raczej należy sądzić, że zastosowana dawka energii promienistej powoduje uszkodzenie komórki, ujawniające się wzmożoną czynnością zespołu Golgiego, następnie ogólnym zahamowaniem przemiany komórkowej i wreszcie w późniejszych okresach autolizą cytoplazmy komórkowej. Zmiany te zachodzą głównie w astrocytach i mają charakter pierwotnych uszkodzeń tych komórek. W warunkach hodowli astrocyty są niezależne od wpływów toksycznych, przekazywanych przez układ krwionośny, jak również od zmian zachodzących w tym układzie. Można więc przypuszczać, że przy popromiennych zaburzeniach czynności bariery krew—mózg uszkodzenie astrogleju może odgrywać równie istotną rolę, jak pierwotne uszkodzenia elementów układu naczyniowego.

WNIOSKI

1. Komórki glejowe napromienione *in vitro* dawką subletalną promieni gamma (5000 r) reagują przede wszystkim wzmożoną czynnością aparatu Golgiego. W cytoplazmie astrocytów we wczesnych okresach po ekspozycji

pojawia się glikogen, który szybko znika (24 godz.). W tym samym czasie znikają objawy pinocytozy. Równoległość tych dwóch procesów nasuwa podejrzenie, że w napromienionej komórce ulegają czasowemu zaburzeniu procesy metaboliczne. Wzrastanie w późniejszych okresach ilości lizosomów zwłaszcza ich form o zawartości heterogennej może świadczyć, że zmiany te są wykładnikiem daleko posuniętej nekrobiozy.

2. Gromadzenie glikogenu w astrocytach napromienionych *in vitro*, podobnie jak w tkance nerwowej *in situ* może świadczyć o tym, że objaw ten jest niezależny od funkcji odżywczej i transportowej astrocytów.

M. Ostenda

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ОБЛУЧЕННЫХ „ИН ВИТРО” ЛУЧАМИ ГАММА (Co⁶⁰)

Резюме

Культуры глиальных клеток облучались однократной дозой 5 000 р гамма-лучей после чего их подвергали исследованию в электронном микроскопе спустя 3 до 72 часов после экспозиции.

В ранних периодах после экспозиции (3—6 часов) комплекс Гольджи обна- руживает усиленную активность, в цитоплазме астроцитов появляется гликоген, исчезают признаки пиноцитоза. Признаки эти отступают после 24 часов. Парал- лельное появление гликогена и прекращение пиноцитоза свидетельствует о временном повреждении клеточного метаболизма. Увеличение в более поздние периоды (72 часов) количества вторичных лизосомов, автофагосомов и липофус- циновых шаров дает основание полагать, что это повреждение может быть необратимым. Скопление гликогена в поврежденных астроцитах „ин витро” может свидетельствовать, что этот признак независим от их трофической и транс- портной функции.

M. Ostenda

ULTRASTRUCTURE OF GLIAL CELLS IRRADIATED *IN VITRO* WITH GAMMA RAYS (Co⁶⁰)

Summary

The cultures of glial cells were irradiated with a one-time dosis of 5000 r of gamma rays and thereafter were taken for electronmicroscopic examinations in the period of 3—72 hrs after exposition.

In the early periods after exposition (3—6 hrs) the Golgi apparatus showed an enhanced activity. In the cytoplasm, glycogen appears and the features of pinocytosis disappear. The symptoms retreat after 24 hrs. A parallel appearance of glycogen and reduction of pinocytosis are indicative of a transient impairment of the cellular metabolism. The increase in the later periods (72 hrs) of the number of secondary lysosomes, autophagosomes and lipofuscine suggests the irreversibility of this impairment. The accumulation of glycogen in the impaired astrocytes *in vitro* indicates that this feature is independent upon their nutritional and transporting functions.

PIŚMIENICTWO

1. Borowicz J., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych in vitro do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 22, 691—697.
2. Cohn Z. A., Fedorko M. E.: The formation and fate of lysosomes. W: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Ed. Dingle J. T. and Fell H. B., Vol. I, 44—63. North Holland Publ. Co, Amsterdam, London 1969.
3. Estable-Puig R. F. de, Estable-Puig J. F.: Cell response of the olfactory bulb to ionizing radiation injury. An electron microscopic study. *Acta Neuropath.* 1971, 17, 287—301.
4. Holtzman E.: Lysosomes in the physiology and pathology of neurons. W: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Ed. Dingle J. T. and Fell H. B., Vol. I, 192—216. North Holland Publ. Co, Amsterdam, London 1969.
5. Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of glial cells in vitro tissue culture. *Acta Med. Pol.* 1971, 12, 2.
6. Masurovsky E. B., Bunge M. B., Bunge R. P.: Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following X-irradiation in vitro. *J. Cell Biol.* 1967, 32, 467—496.
7. Maxwell D. S., Kruger L.: The fine structure of astrocytes in the cerebral cortex and their response to focal injury produced by heavy ionizing particles. *J. Cell Biol.* 1965, 25, 141—157.
8. Miquel J., Haymaker W.: Astroglial reaction to ionizing radiation with emphasis on glycogen accumulation. W: *Progress in Brain Research. Biology of Neuroglia*. Vol. 15, 89—114. Elsevier Publ. Co, Amsterdam, London, New York 1965.
9. Ostenda M.: Badania histochemiczne komórek glejowych napromieniowanych in vitro dawką 5000 r promieni gamma. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 413—421.
10. Pomerat C. M., Rounds D. E., Rainborn C. W., Pollard T. D.: Observations on newborn rat dorsal root ganglia in vitro following gamma irradiation. W: *Response of the Nervous System to Ionizing Radiation*. Ed. Haley and Snider. 1964, 175—200.
11. Wolff J. R., Hösli E., Hösli L.: Basement membrane material and glial cells in spinal cord cultures of newborn rats. *Brain Res.* 1971, 32, 198—202.

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

TADEUSZ MAJDECKI, MARIA MARCINIAK, MIROSLAW BESKID

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W MÓZGACH PSÓW
PO PODAWANIU ETANOLU *)Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Wpływ alkoholu etylowego na organizm zwierząt i ludzi stanowił przedmiot licznych badań morfologicznych i biochemicznych, w tym szczególnie bogate piśmiennictwo poświęcone jest patomorfologii ośrodkowego układu nerwowego. Na tym tle zwraca uwagę stosunkowo mała liczba opracowań, dotyczących mikroskopowo-elektronowego obrazu uszkodzeń tkanki nerwowej. Kissling i Tilander (1963) w pracy poświęconej przede wszystkim poalkoholowym zmianom ultrastrukturalnym wątroby, jedynie marginesowo omawiają uszkodzenia w ośrodkowym układzie nerwowym. Badania mikroskopowo-elektronowe Gernharda i wsp. (1968), dotyczące ostrej encefalopatii alkoholowej u ludzi prowadzone były na materiale autopsyjnym, co w sposób oczywisty ogranicza jednoznaczność interpretacyjną opisanych spostrzeżeń. Jedynie Artyukhina i Khachaturyan (1969) opracowali zagadnienie uszkodzeń mózgu wywołanych przez alkohol etylowy na szerszym i bardziej reprezentatywnym materiale doświadczalnym.

Skłoniło to nas do przeprowadzenia analizy obrazu mikroskopowo-elektronowego mózgu psów, poddanych w warunkach doświadczalnych podostremu działaniu alkoholu etylowego.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 12 psach mieszańcach, płci żeńskiej o wadze 12—14 kg. Siedem zwierząt stanowiło materiał doświadczalny, 5 — kontrolny. Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta przeszły podstawowe zabiegi kwarantannowe (odrobaczenie, szczepienie przeciwko wściekliźnie). Psy grupy doświadczalnej otrzymywały przez okres 20 tygodni 250 ml 25% roztworu alkoholu etylowego, dodawanego do pożywienia dwa razy dziennie. Po 20 tygodniach psy usypiano.

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

Wycinki tkanki do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano z kory okolic czołowo-ciemieniowych półkul mózgu, krojono na skrawki wielkości 1—2 mm³, które utrwalano przez 1,5 godz. w zbuforowanym 10% czterotlenku osmu o pH 7,4. Po odwodnieniu w etanolu o wzrastających stężeniach zatapiano je w Eponie 812. Materiał skrawano na ultramikrotomie f-my Reichert. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7 A.

Do wykonanych równolegle badań w mikroskopie świetlnym materiał pobierano z półkul mózgu na poziomie zwojów podstawy, oraz z mózdzku i pnia mózgu. Utrwalony w 10% formalinie materiał przeprowadzano w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu i błękitem trwałym luksolu.

Badanie histopatologiczne, histochemiczne i mikroskopowo-elektronowe wątroby stanowiło temat odrębnego opracowania (Beskid i wsp. 1972).

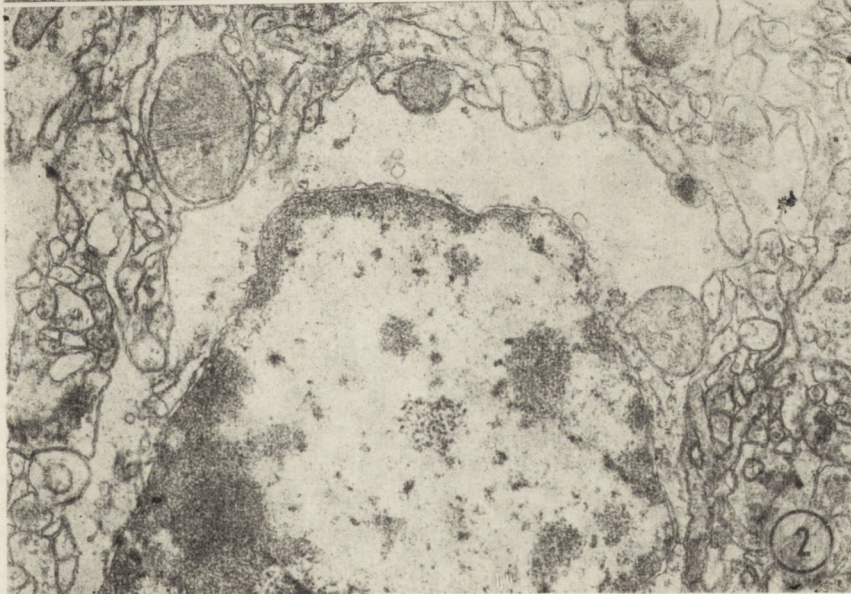
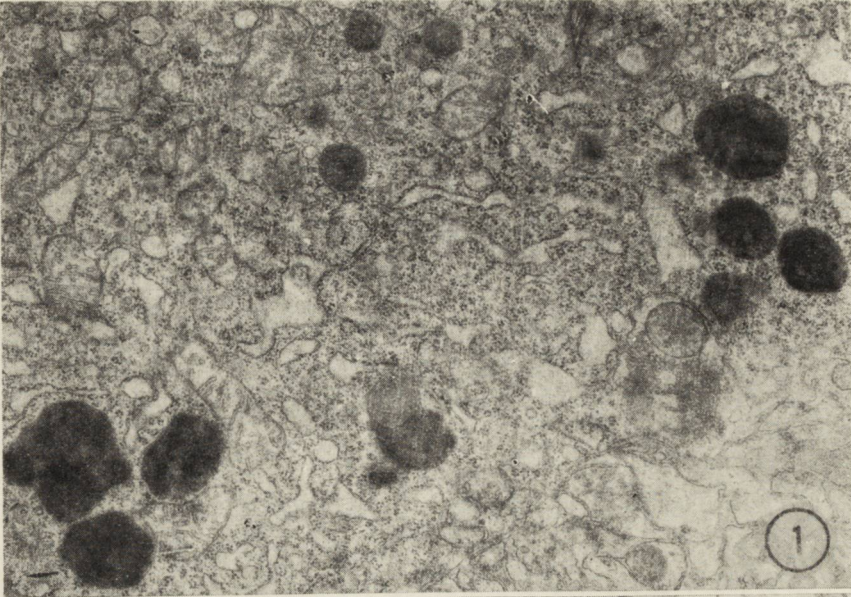
WYNIKI

Obraz histopatologiczny

Większość neuronów w strukturach szarych nie wykazywała zmian. W korze czołowej i amonalnej, w ciałach suteczkatych i warstwie komórek Purkinjego mózdzku spotykano rozsiane uszkodzenia neuronów. W korze, zwłaszcza amonalnej, obserwowano dyskretne przerzedzenia komórkowe. Niekiedy stwierdzano niewielką glejozę izomorficzną w istocie białej.

Obraz mikroskopowo-elektronowy

Neurony. Większość komórek nerwowych była nieco obkurczona. Nieznaczne zagęszczenie stałych elementów cytoplazmy komórkowej, szczególnie rybosomów, czyniło ją ciemniejszą. Jądra neuronów, błony jądrowe i komórkowe nie wykazywały istotnych zmian. Obserwowano powiększone mitochondria o dziwacznych kształtach i zwiększonej gęstości elektronowej macierzy. Podobne zmiany w mitochondriach tylko znacznie rzadziej stwierdzano również w mózgach zwierząt kontrolnych. Pomnożona była także liczba ciał lizosomopodobnych w porównaniu z grupą kontrolną. W cytoplazmie wielu komórek nerwowych obserwowano niekiedy dość liczne, gęste elektronowo ciała wtrętowe o nieregularnych zarysach (ryc. 1). Twory te, identyfikowane jako lipofuscyna, zawierały często okrągłe, ostro obrysowane, jednorodnie wodniczki o mniejszej gęstości elektronowej. W niektórych neuronach spostrzegano poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej. Większość synaps nie wykazywała istotnych zmian patologicznych. Czasami obserwowano jedynie nieznaczne pomnożenie liczby pęcherzyków synaptycznych.

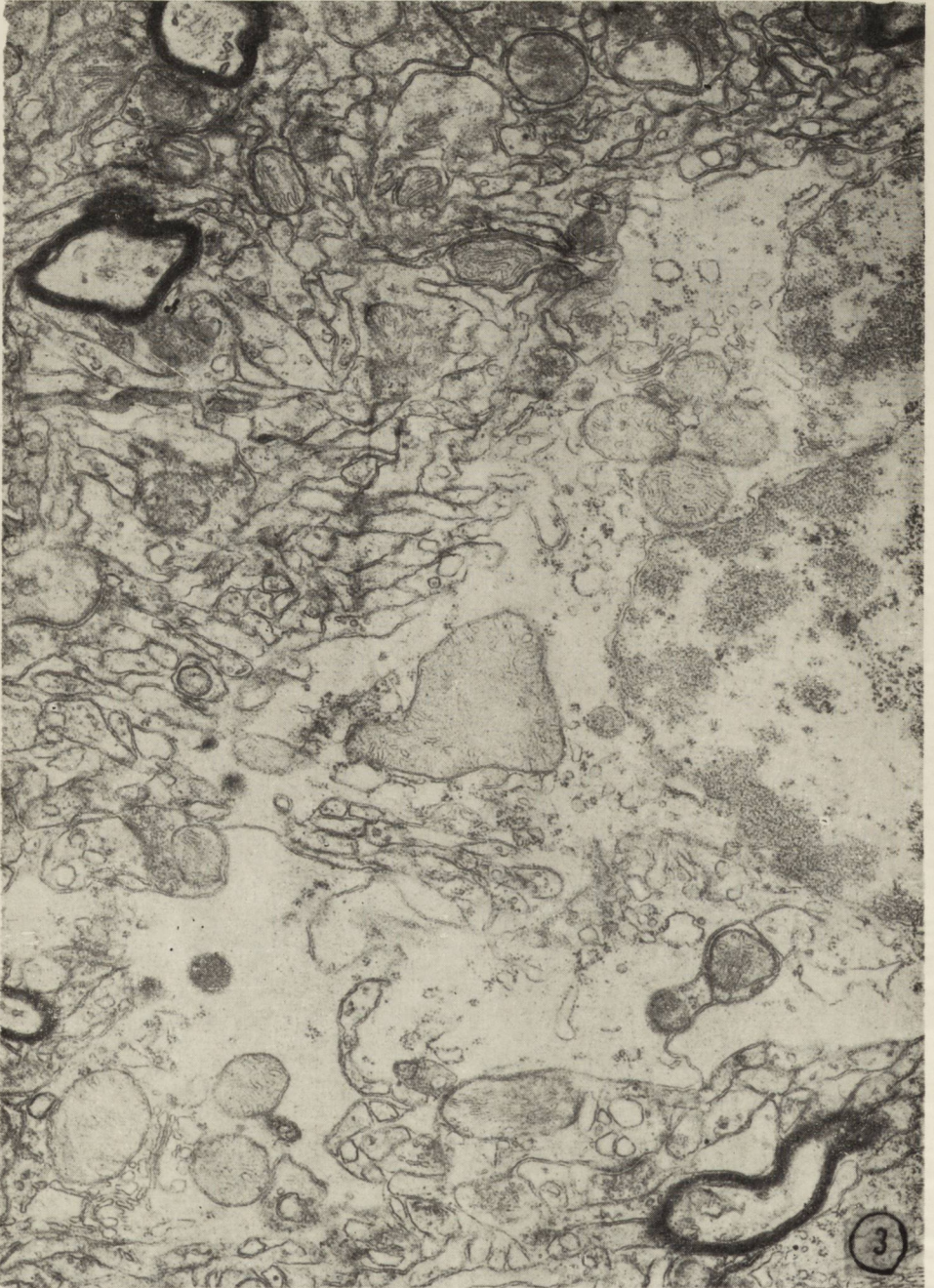


Ryc. 1. Komórka nerwowa z nieznacznym zagęszczeniem stałych elementów cytoplazmy, poszerzonymi kanałami siatki śródplazmatycznej, licznymi ciałami lizosomopodobnymi i lipofuscyną oraz nieznacznie zmienionymi mitochondriami. Pow. 14.700 \times .

Fig. 1. Nerve cell with a slight condensation of solid cytoplasm elements, widened endoplasmic reticulum channels, numerous lysosome-like bodies, lipofuscin and slightly changed single mitochondria. $\times 14700$.

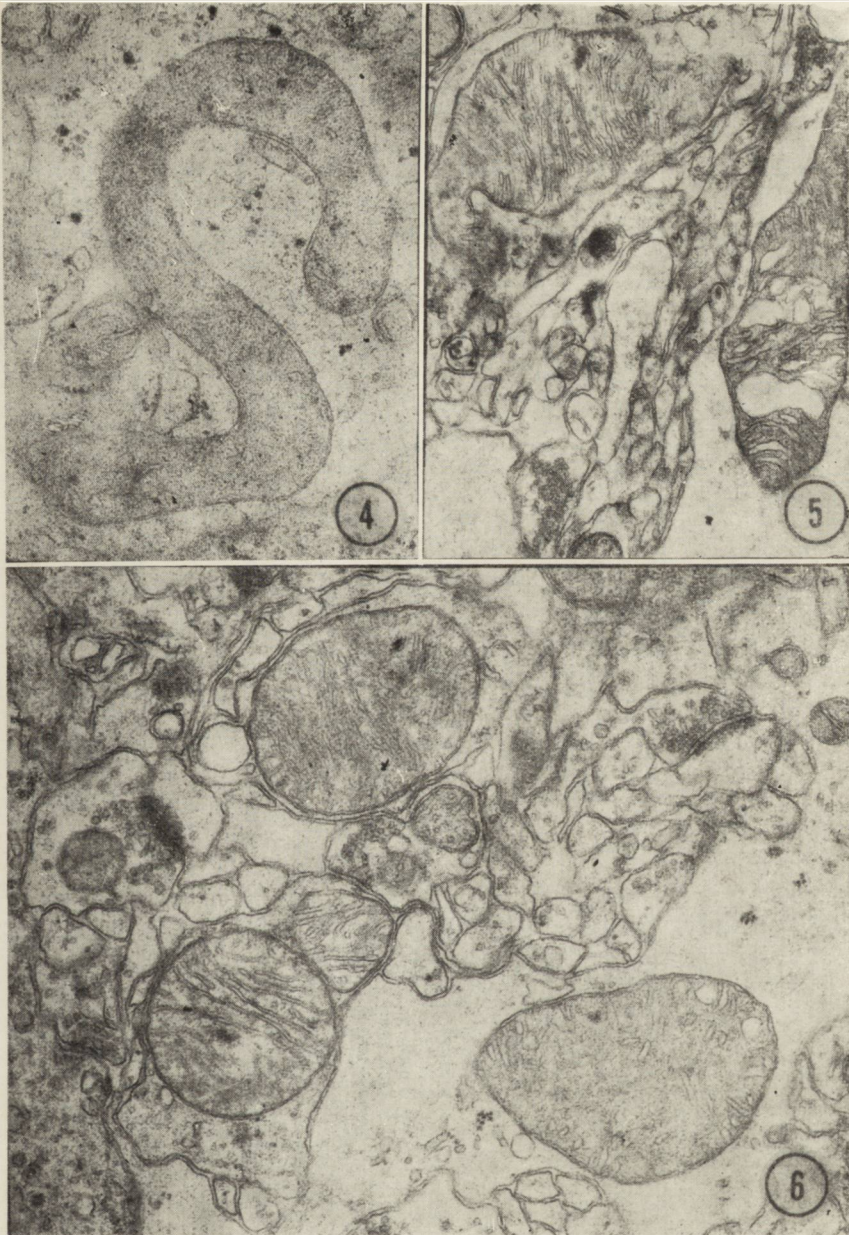
Ryc. 2. Astrocyt z niemal całkowicie opustoszałą cytoplazmą. Pow. 12.900 \times .

Fig. 2. Astrocyte with almost completely organelle-free cytoplasm. $\times 12900$.



Ryc. 3. Astrocyt z przerzedzoną cytoplazmą i wolno leżącymi pojedynczymi błonami siatki śródplazmatycznej. Mitochondrium o dużych rozmiarach. Pow. 18.600 \times .

Fig. 3. Astrocyte with rarefacted cytoplasm and free-lying single endoplasmic reticulum membranes. Mitochondrium of a large size. $\times 18\ 600$.



Ryc. 4. Mitochondrium astrocytu o dziwacznych kształtach. Pow. 32.000 \times .

Fig. 4. Astrocyte mitochondrion of bizzare shape. \times 32 000.

Ryc. 5. Mitochondrium wypustki astrocytu z rozdętymi błonami grzebieni. Pow. 45.500 \times .

Fig. 5. Mitochondrium of astrocytic process with swollen crist membranes. \times 45 500.

Ryc. 6. Mitochondrium wypustki astrocytu z chaotycznym układem bardzo licznych grzebieni. Pow. 22.200 \times .

Fig. 6. Mitochondrium of astrocytic process with chaotic arrangement of numerous cristae. \times 22 200.



Fig. 7. Lipofuscyna w cytoplazmie astrocytu, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, duże rozmiary mitochondrium. Pow. 12.300 X.

Fig. 7. Lipofuscine in astrocyte cytoplasm, endoplasmic reticulum channels widened, large mitochondrium. X 12 300.

Głej. Wyraźnie zmienione były astrocyty. Miały one cechy tzw. „komórek wodnistych” (watery cells) (ryc. 2). Cytoplazma wielu z nich była prawie zupełnie opustoszała, z wolno leżącymi, znacznie poszerzonymi, pojedynczymi błonami siatki śródplazmatycznej i zmienionymi mitochondriami (ryc. 3). Obserwowano mitochondria wyraźnie powiększone (ryc. 3), o dziwacznych kształtach (ryc. 4) i miejscami rozdętych błonach grzebieni (ryc. 5), lub chaotycznym ich ułożeniu (ryc. 6). W opustoszałej cytoplazmie astrocytów często znajdowano elektronowo gęste ciała wtrętowe o cechach ultrastrukturalnych odpowiadających złogom lipofuscyny (ryc. 7). W mniej uszkodzonych astrocytach obserwowano mierne opustoszenie cytoplazmy z rzadziej występującymi zmianami w mitochondriach. Większość oligodendrocytów była niezmieniona.

Naczynia krwionośne nie wykazywały istotnych odchyień od normy. W cytoplazmie pericytów rzadko stwierdzano obecność ciał wtrętowych o charakterze lipofuscyny. Sporadycznie okołonaczyniowe wypustki glejowe wykazywały słabo zaznaczone cechy obrzmienia, w większości astroglej był niezmieniony.

OMÓWIENIE

Największe nasilenie zmian mikroskopowo-elektronowych stwierdzono w astrocytach, przy nieproporcjonalnie mniejszym uszkodzeniu neuronów i prawie całkowitym oszczędzeniu oligodendrocytów. Nie obserwowano również istotnych zmian w naczyniach krwionośnych, ani w przylegających do nich wypustkach glejowych.

Zmiany w astrocytach polegały na opustoszeniu cytoplazmy, uszkodzeniu mitochondriów oraz obecności lipofuscyny. Opustoszenia cytoplazmy i zmiany w mitochondriach można by traktować jako element obrzęku mózgu. Brak było jednak zależności lokalizacyjnej między astrocytami wykazującymi opisane zmiany i naczyniami. Ponadto prawie wszystkie wypustki astrocytów otaczających naczynia były niezmienione. Również obraz mitochondriów nie odpowiadał obrazom uznanym za typowe dla obrzęku (równomierne powiększenie mitochondriów o kształcie na ogół okrągłym, jasna macierz, porozrywane struktury błoniaste grzebieni). Na marginesie stwierdzanych zmian w mitochondriach astrocytów warto zwrócić uwagę, że pod wpływem etanolu również w wątrobie ulegają uszkodzeniu głównie mitochondria hepatocytów: pojawiają się ich monstrualne postaci o dziwacznych kształtach, niezwykle układy grzebieni oraz zagęszczenie macierzy (Kiessling i wsp. 1964, Svoboda, Monning 1964, Franch 1968). Wyniki badań histochemicznych wskazują, że zmiany w mitochondriach wiążą się z zaburzeniami czynności enzymatycznych układu oddechowego komórek wątroby pod wpływem etanolu (Kiessling, Tilander 1963, Christophersen 1964, Rubin i wsp. 1970). Porównanie zmian w mitochondriach astrocytów i komórkach wątroby może sugerować, że pod

wpływem etanolu również w mózgu ulega pierwotnie zaburzeniu metabolizm astrocytów. Zmianom w wypustkach astrocytów przypisuje się w głównej mierze zaburzenia transportu metabolitów (Klatzo 1960), co wtórnie może prowadzić do uszkodzenia pozostałych elementów strukturalnych tkanki nerwowej. Badania przeprowadzone przez Negishi i Svaetichina (1966) wykazały szczególną wrażliwość astrocytów na działanie par alkoholu.

W neurocytach obserwowano jedynie nieznaczne obkurczenie cytoplazmy i poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej. Cechy patologiczne mitochondriów komórek nerwowych były słabo wyrażone w porównaniu z mitochondriami astrocytów. Jedynym elementem sugerującym zaburzenia metabolizmu komórkowego neurocytów jest obecność obfitych złogów lipofuscyny, z tym jednak, że zróżnicowany i w większości przypadków nie znany dokładny wiek zwierząt doświadczalnych, ogranicza jednoznaczność interpretacyjną tego zjawiska. Również w synapsach nie stwierdzono istotnych zmian patologicznych, podczas gdy Artyukhina i Khachaturyan (1969) obserwowali u zwierząt pojęnych etanolem liczne uszkodzenia synaps. Wspomniani autorzy czynią zmiany w strukturze błon synaptycznych i pęcherzykach odpowiedzialnymi za zaburzenia czynności kory mózgowej poddawanej przewlekłemu działaniu etanolu. Prawidłowy obraz synaps w naszym materiale potwierdzały poglądy Nagishi i Svaetichina (1966) oparty na badaniach siatkówki ryb, iż synapsy wykazują znaczną odporność na działanie par alkoholu.

Z przeprowadzonych badań mikroskopowo-elektronowych wynika, że w przypadku stosunkowo krótkotrwałego podawania niskich dawek etanolu psom, astrocyty są podstawowym elementem strukturalnym mózgu który zostaje pierwotnie uszkodzony. Nieznaczne uszkodzenie neurocytów jest prawdopodobnie wtórne w stosunku do zmian w astrocytach. Na tę możliwość wskazują wyniki badań nad zależnościami funkcjonalnymi między komórkami nerwowymi i giejem (Wallgren, Barry 1970). Biorąc pod uwagę zarówno czas podawania alkoholu zwierzętom doświadczalnym, jak i stosunkowo jego niską dawkę można uznać, że stwierdzone przez nas zmiany w obrazie ultrastrukturalnym ośrodkowego układu nerwowego stanowią wykładniki jego wczesnego uszkodzenia. W rozważaniach naszych należy również uwzględnić zagadnienie pierwotności lub wtórności zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w stosunku do uszkodzeń wątroby, stwierdzanych w naszym materiale (Beskid i wsp. 1972). Odmienność uszkodzeń astrocytarnych, brak zmian w ultrastrukturze drobnych naczyń, stanowiących dominujący element obrazu mikroskopowo-elektronowego encefalopatii wątrobowej (Ostenda i wsp. 1973) pozwalają przypuszczać, że obserwowane przez nas nieprawidłowości ultrastrukturalne, mają charakter pierwotny, niezależny od uszkodzenia wątroby. Brać trzeba jednak pod uwagę możliwość odrębności gatunkowych zwierząt używanych w obu grupach doświadczalnych.

T. Майдецки, М. Марциняк, М. Бескид

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГАХ СОБАК ПОСЛЕ
ПОДАЧИ ЭТАНОЛА

Резюме

Проводились электронномикроскопические исследования на собаках, которым в течение 20 недель ежедневно давали с пищей 250 мл 25% раствора этанола. 5 собак составляло контрольную группу. В световом микроскопе обнаруживались опустошения нейронов и патологические изменения нервных клеток главным образом во фронтальной коре, аммоновом роге маммиллярных тел, а также в слое клеток Пуркинье. Кроме того наблюдался небольшой изоморфический глейоз в белом веществе. В электронномикроскопическом исследовании обнаруживались самые большие изменения в астроцитах. В этих клетках наблюдалось опустошение цитоплазмы, повреждение митохондрий и скопление липофусцина. В нейроцитах обнаруживалось лишь незначительное сжатие цитоплазмы и расширение канальцев эндоплазматического ретикулума, а также небольшие скопления липофусцина. В синапсах не обнаруживались существенные ультраструктурные изменения. В электронномикроскопическом исследовании обращало внимание повреждение астроцитов и значительно менее выраженное изменение остальных структурных элементов нервной ткани. Кажется, что повреждение астроцитов имеет характер первичных изменений, вызывающих в свою очередь вторичные повреждения нервных клеток.

T. Majdecki, M. Marciniak, M. Beskid

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE BRAINS OF DOGS AFTER ETHANOL
INTOXICATION

Summary

The experiments were carried out on 7 dogs, which were receiving with food twice a day 250 ml of a 25% ethanol solution during a 20 weeks period. The control group consisted of 5 dogs. The dogs were anesthetized and fresh brain tissue samples were taken for the examinations. In the light microscope, degeneration of nerve cells, as well damage and rarefaction as neuronal loss were observed mainly in the frontal and hippocampal cortex, corpora mammillaria and in Purkinje cells layer. Slight isomorphic gliosis was stated in the white matter. The electron microscopic studies revealed the highest intensity of changes to have occurred in the astrocytes and to consist in the cytoplasm rarefaction, impairment of mitochondria and the presence of lipofuscin. In the neurocytes, only a slight shrinkage of cytoplasm and extension of endoplasmic reticulum channels as well as small amounts of lipofuscin could be observed. No significant ultrastructural changes were noticed in the synapses. In the electron-microscopic picture there was thus to be stressed selective impairment of astrocytes with concomitant insignificant lesions in the remaining structural elements of the brain, in particular in the nerve cells. It seems that astrocytes are the cells primarily damaged by ethanol. The impairment of the nerve cells presumably are of a secondary nature.

PIŚMIENICTWO

1. Artyukhina N. J., Khachatryan A. A.: Concerning the brain cortical ultrastructure of experimental animals in alcoholic intoxication. Zh. Nevropat. Psikhiat. 1969, 69/8, 1198—1205.

2. Beskid M., Majdecki T., Marciniak M.: The effect of ethanol on the activity of some oxidative enzymes and on the ultrastructure of liver cells in the dog. *Folia Histochem. Cytochem.* 1972, 10, 2, 155—162.
3. Christophersen B.: Effects of ethanol on mitochondrial oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 86, 14—21.
4. French S.: Fragility of liver mitochondria in ethanol—fed rats. *Gastroenterology*, 1968, 54, 1106—1110.
5. Gernhard L., Bergener M., Reinhardt V., Renkert J., Eichenauer M.: Vitamin-B₁-Mangel und chronischer Alkoholismus. A. Klinische und morphologische Befunde. *Zbl. Allg. Path.* 1968, 111, 4, 446—447.
6. Kiessling K., Tilander K.: The effect of prolonged alcohol treatment on the respiration of liver and brain mitochondria from male and female rats. *Exp. Cell Res.* 1963, 30, 476—484.
7. Kiessling K., Lindgren L., Strandberg B., Tobé U.: Electron microscopic study of liver mitochondria from human alcoholics. *Acta Med. Scand.* 1964, 176, 595—601.
8. Klatzo I., Miquel J.: Observation on pinocytosis in nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1960, 19, 475—487.
9. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A.: Ultrastructural studies of experimental hepatogenic encephalopathy. IV Danube Symposium on Neuropathology 1973. Abstracts.
10. Rubin E., Beattie D., Lieber C.: Effect of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions, *Laborat. Invest.* 1970, 23, 620—627.
11. Svoboda D., Manning R.: Chronic alcoholism with fatty metamorphosis of the liver. Mitochondria alterations in hepatic cells. *Amer. J. Path.* 1964, 44, 645—652.
12. Wallgren H., Barry H.: *Actions of alcohol.* Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, New York 1970.

Adres dr T. Majdeckiego: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA, ANDRZEJ WAJGT

CEREBRAL LIPIDS
IN EXPERIMENTAL CYANIDE ENCEPHALOPATHY *)

Department of Neurology, Institute of Diseases of Nervous System and Sensory
Organs, Medical Academy, Poznań

Both in experimental and in accidental cyanide intoxication, morphological alterations have become almost selective in the white brain matter, in the form of demyelinating, more rarely of necrotic foci. Marked damage to the neurocytes is observed only in prolonged, acute cases of intoxication. The reason for the above distribution of anatomical changes in the brain, in cyanide encephalopathy, has not so far been explained.

In the mechanism of histotoxic anoxia caused by cyanide poisoning, an important role is played by the influence of cyanides on cytochrome oxidase, whose activity in the white matter is very low. Even if we assume that the above enzymatic system forms a particularly sensitive locus of oxidizing metabolism of the white matter, one cannot explain in this way the topographical selectivity characterized, in cyanide encephalopathy, by demyelination lesions limited almost exclusively to the commissural structure (Levine, 1967).

In cyanide encephalopathy, diffuse spongy changes are frequently observed in the white matter (Hirano et al., 1967). It would seem, therefore, that cytotoxic edema plays an important role in the pathogenesis of demyelinating and necrotic lesions, in this experimental disease. As our own experiments showed, this edema is not connected with the leakage of protein fractions from the serum into the nervous tissue (Wender et al. 1972). Thus seemingly myelin destruction cannot be considered only as a secondary effect of edematous changes, caused by increase in the per-

*) The work was performed on behalf of the Polish Academy of Sciences (No. 09.4.1.3.2).

meability of the blood-brain barrier. More important seems to be the role of the processes arising in the protein and lipid structural components, especially in the myelin connected in development and function with the oligodendroglia. With these assumptions, we undertook investigations of the wide spectrum of brain lipids in cyanide encephalopathy.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white rats of 200—250 g body weight, which were made to inhale HCN, according to a technique worked out by Levine and Stypulkowski (1959). The animals were placed in a glass exsiccator. Into this was fed a gaseous mixture of air and cyanide. A glass receptacle containing a solution of 10% KCN, through which air was circulated at a flow of 7 litres/min., was placed between the exsiccator and a cylinder with compressed air. Under these conditions, after about 10 min., the animals lost their motoric ability, though shallow breathing continued. The corneal reflex was preserved. The animals were kept in these conditions for 35 min. Then they were reanimated with pure oxygen. Chemical experiments were carried out on groups of 6 animals, killed 5 hours, 18 hours and 14 days after intoxication with HCN.

Chemical investigations: The lipids were extracted from the nervous tissues of the white and the grey matter separately, by the method of Folch-Pi et al. (1957). The total lipids thus extracted were separated by column and thin-layer chromatography according to Svennerholm (1964). The separated phospholipid and cerebroside fractions were quantitatively estimated according to the methods of Bartlett (1959) and of Rodin et al. (1955). Cholesterol was estimated after Sperry and Webb (1950). Gangliosides were chromatographically separated and estimated according to Suzuki (1964).

Histological methods: For histological purposes, samples of the brain, fixed in formaline, were embedded in paraffin. They were then stained by the Nissl, H+E, and Klüver-Barrera methods. Frozen sections were stained by the Spielmeyer method.

RESULTS

Histology. The pathomorphological picture in the experimental group does not differ from that described in our previous work (Wender et al., 1972). Notable changes of demyelination type were seen only in animals examined 14 days after cyanide intoxication, particularly in the po-

Table 1. Lipids of cerebral white matter in experimental cyanide encephalopathy (in g/100 g of dry weight)

Tabela 1. Lipidy istoty białej mózgu w encefalopatii cyjanowej (w g/100 tkanki suchej)

Lipids	Normal animals	4 hrs after HCN intoxication	18 hrs after HCN intoxication	14 days after HCN intoxication
Lipidy	Norma	4 godz. po zatruciu HCN	18 godz. po zatruciu HCN	14 dni po zatruciu HCN
Phosphatidyl serine + +phosphoinositides	4.5 ± 0.06	3.5 ± 0.09	3.6 ± 0.20	2.9 ± 0.20
Fosfatydyloseryna + fosfoino- zytol				
Phosphatidyl ethanolamine	7.6 ± 0.08	5.9 ± 0.04	5.1 ± 0.17	4.0 ± 0.22
Fosfatydyloetanolamina				
Phosphatidyl choline	5.6 ± 0.07	5.4 ± 0.09	4.2 ± 0.07	4.3 ± 0.19
Fosfatydylocholina				
Sphingomyelins	2.6 ± 0.05	1.4 ± 0.07	1.2 ± 0.07	1.2 ± 0.11
Sfingomieliny				
Cerebrosides	6.2 ± 0.19	5.8 ± 0.09	4.8 ± 0.14	5.8 ± 0.22
Cerebrozydy				
Sulphatides	2.2 ± 0.10	1.6 ± 0.08	1.1 ± 0.07	1.8 ± 0.14
Sulfatydy				
Cholesterol	12.7 ± 0.19	6.0 ± 0.13	8.4 ± 0.19	6.6 ± 0.26
Cholesterol				
Cholesterol esters	0	1.3 ± 0.05	0.7 ± 0.05	1.1 ± 0.07
Estry cholesterolu				

Results are given as mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group : 10

Liczba zwierząt w każdej grupie : 10

sterior part of the corpus callosum, in the anterior commissure, and in the fibres of the interna capsule running through the subcortical nuclei. At an earlier stage one could note only a light fading of the myelin in the already mentioned areas of brain, connected with a collateral macro- and microglial reaction. Changes in the grey structures were slight, affecting only individual neurocytes of the cortex.

Chemical findings. The results of investigations of the lipids of the cerebral white matter presented in table 1 show in cyanide encephalopathy, marked changes in the form of a reduction in the content

Table 2. Lipids of cerebral grey matter in experimental cyanide encephalopathy (in g/100g of dry weight)

Tabela 2. Lipidy istoty szarej mózgu w encefalopatii cyjanowej (w g/100 g tkanki suchej)

Lipids Lipidy	Normal animals Norma	4 hrs after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN	18 hrs after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN	14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN
Phosphatidyl serine + phosphoinositides Fosfatydyloseryna + fosfoinozitol	2.6 ± 0.04	3.1 ± 0.04	2.4 ± 0.05	1.6 ± 0.09
Phosphatidyl ethanolamine Fosfatydyloetanolamina	4.6 ± 0.05	3.2 ± 0.01	2.9 ± 0.11	2.4 ± 0.12
Phosphatidyl choline Fosfatydylocholina	4.6 ± 0.13	4.7 ± 0.09	3.9 ± 0.26	3.7 ± 0.34
Sphingomyelins Sfingomieliny	1.9 ± 0.09	1.0 ± 0.01	1.4 ± 0.03	1.4 ± 0.09
Cerebrosides Cerebrozydy	2.5 ± 0.09	2.3 ± 0.08	1.9 ± 0.09	2.0 ± 0.06
Sulphatides Sulfatydy	1.5 ± 0.04	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.7 ± 0.04
Cholesterol	6.2 ± 0.09	3.6 ± 0.02	3.4 ± 0.13	2.5 ± 0.16
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0	0.6 ± 0.04	1.0 ± 0.14	1.5 ± 0.07

Results are given as mean ± standard error
Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group : 10

Liczba zwierząt w każdej grupie : 10

of sulphatides, free cholesterol and also of phospholipids especially of sphingomyelin. Cholesterol esters were also detected at all stages of the experimental illness. In the cerebral grey matter a reduction was noted in the content of phosphatidyl ethanolamine, sulphatides and free cholesterol, with simultaneous appearance of estrified cholesterol. Table 2 presents these investigations in detail. Changes are also noted in the percentual content of ganglioside fractions. In the cerebral white matter (Table 3), at the early as well as at the later stage after intoxication, a reduction in the content of gangliosides G_3 (G_{D1a}) and G_4 (G_{M1}) is observed together with an increase in the relative content of gangliosides G_0 and G_1 (G_{T1}). Results of investigations of the ganglioside spectrum in the cerebral grey matter presented in table 4, show a particularly marked reduction in the percentage of gangliosides of G_3 (G_{D1a}) type, in favour of fractions G_0 and G_5 (G_{M2}).

Table 3. Pattern in cerebral white matter gangliosides in experimental cyanide encephalopathy (in rel. %)

Tabela 3. Odsetkowa zawartość frakcji gangliozydów istoty białej mózgu w encefalopatii cyjanowej

Ganglioside fractions Frakcje gangliozydowe	Normal animals Norma	4 hrs after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN	18 hrs after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN	14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN
G ₀	0.6 ± 0.14	5.8 ± 0.17	5.2 ± 0.92	6.0 ± 1.49
G ₁ (G _{T1})	5.3 ± 0.40	7.8 ± 0.41	6.7 ± 0.56	9.5 ± 0.56
G _{2α} (G _{D1bz})	9.3 ± 0.60	6.0 ± 1.01	6.1 ± 0.74	9.0 ± 1.54
G _{2β} (G _{D1bβ})	28.8 ± 0.62	24.0 ± 0.36	29.3 ± 1.52	26.0 ± 1.28
G ₃ (G _{D1a})	19.9 ± 0.98	17.3 ± 0.28	16.9 ± 0.96	13.7 ± 1.15
G ₄ (G _{M1})	28.3 ± 0.65	24.4 ± 0.40	23.4 ± 1.17	21.8 ± 1.02
G ₅ (G _{M2})	4.2 ± 0.29	9.3 ± 0.30	8.0 ± 0.96	8.5 ± 0.56
G ₆ (G _{M3})	3.3 ± 0.51	5.4 ± 0.50	4.4 ± 0.37	5.5 ± 0.95

Results are given as mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group : 10

Liczba zwierząt w każdej grupie : 10

Table 4. Pattern in cerebral grey matter gangliosides in experimental cyanide encephalopathy (in rel. %)

Tabela 4. Odsetkowa zawartość frakcji gangliozydów istoty szarej mózgu w encefalopatii cyjanowej

Ganglioside fractions Frakcje gangliozydowe	Normal animals Norma	4 hrs after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN	18 hrs after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN	14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN
G ₀	1.7 ± 0.28	4.2 ± 0.10	4.9 ± 0.51	6.7 ± 1.26
G ₁ (G _{T1})	4.1 ± 0.31	4.9 ± 0.36	6.4 ± 1.26	6.0 ± 0.42
G _{2α} (G _{D1bα})	7.6 ± 0.72	6.2 ± 0.55	8.0 ± 1.17	9.3 ± 0.82
G _{2β} (G _{D1bβ})	21.5 ± 0.87	29.3 ± 0.53	16.4 ± 1.04	24.2 ± 1.03
G ₃ (G _{D1a})	33.4 ± 0.75	25.2 ± 0.40	25.7 ± 1.63	23.8 ± 1.84
G ₄ (G _{M1})	23.2 ± 0.57	19.6 ± 0.39	19.1 ± 1.60	15.4 ± 1.30
G ₅ (G _{M2})	4.7 ± 0.62	6.7 ± 0.36	5.0 ± 0.47	8.7 ± 0.89
G ₆ (G _{M3})	3.8 ± 0.46	3.9 ± 0.19	4.5 ± 0.37	5.9 ± 0.95

Results are given as mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group : 10

Liczba zwierząt w każdej grupie : 10

DISCUSSION

Application of HCN by respiration, even for a short period, causes, in almost all the experimental animals, damage to the white brain matter in the form of very typically situated anatomical changes in the commissural structures. Our chemical findings show that damage to the myelin sheaths thus caused, is concomitant with a decrease in the content of sphingomyelin, sulphatides, and free cholesterol, the typical myelin lipids. On the other hand, we did not observe marked deviations in the content of neutral cerebrosides. This was stressed by Bass (1968) as being characteristic of this type of encephalopathy. In other phospholipid fractions of the white matter, apart from sphingomyelin, we also observed a decrease in phosphatidyl serine and phosphatidyl ethanolamine. Alterations in phosphatidyl choline were insignificant. Varying degrees of deviation in the particular phosphatides content, seem to indicate that in demyelination in cyanide encephalopathy, the role of general disturbances of phospholipid synthesis is not as great as was supposed by Ibrahim et al. (1963).

Already in the early stage of cyanide encephalopathy, we observed the appearance of cholesterol esters in the white matter. Though this is considered to be a sign of active demyelination, one cannot consider it as characteristic of this process, since it is also observed in pathological processes unconnected with a marked disintegration of the myelin sheaths, eg. in brain edema caused by triethyl tin (Wender et al., 1973). Noteworthy is also the presence of cholesterol esters in the cerebral grey matter.

The lack in the morphological picture of a notable macrophage reaction, also shows that the estrification of cholesterol does not occur merely as a secondary result of the action of lipomacrophages around the demyelination focus, but is rather a consequence of serious enzymatic disturbances connected with cholesterol metabolism in the nervous tissue, resulting from cyanide poisoning. The nature of these deviations in enzymatic activity is not known.

We observed in the cerebral grey matter a reduction in sulphatide and cholesterol content, and in the early stage also of sphingomyelin content. This, it would seem is related in a great part with damage to the myelin sheaths of the cortical fibres. However, it does not seem possible to explain in a similar way the reduction of phosphatidyl ethanolamine content, greater in the brain cortex than in the cerebral white matter. This indicates clearly that other cell membranes in the brain cortex, apart from myelin, have been affected.

In our own investigations we also observed substantial deviations in the ganglioside pattern, both in the grey and the white cerebral matter, caused by experimental cyanide intoxication. Gangliosides are among the basic chemical components of the cell membrane: neurocytes in the grey matter,

and dendrites in the white matter. In the brains of mammals at least 7 different gangliosides are observed, having different molecular compositions and structures. Suzuki (1966) notes that in pathological conditions there is a tendency for group changes of ganglioside fractions, in the sense that changes take a similar direction either in the polar gangliosides of G₁ and G₂ type, or in the less polar gangliosides of G₃ and G₄ type. In view of this, a polar and less polar pattern of brain gangliosides emerges. We were unable to observe this phenomenon in cyanide encephalopathy.

However, in the experimental process investigated, both in the white and in the grey cerebral matter, we observed a series of changes in the percentual composition of various ganglioside fractions. This would seem to show that cyanide intoxication results in serious disorders in the components of the nerve cell membranes, which precede visible morphological changes in neurocytes, observed only in the most severe cases of experimental intoxication. Bass (1968), who observed, in cyanide encephalopathy, a marked reduction in total ganglioside content in the brain cortex, suggests that cyanide intoxication causes temporary biochemical disorders of the neuron membranes. These disorders seem to be reversible, so that neurocytes are not subjected to irreversible enzymatic damage.

CONCLUSIONS

1. In cyanide encephalopathy, there is in the cerebral white matter, a marked fall in the content of basic myelin lipids: sulphatides, sphingomyelin and free cholesterol, and also a reduction in phosphatidyl serine and phosphatidyl ethanolamine content. The level of phosphatidyl choline is not subjected to any notable changes.

2. The varying degrees of deviations as regards different phosphatides indicate that in the demyelination mechanism of cyanide encephalopathy, generalised disorders of phospholipid synthesis are not of great importance.

3. In cyanide encephalopathy, in the white and grey cerebral matter, cholesterol esters are observed. Because of lack of connection with the reactivity of macrophages, they point to serious enzymatic disorders related to the metabolism of cholesterol in the nervous tissue, resulting from cyanide poisoning.

4. The reduction, in the brain cortex, of the content of sulphatides, free cholesterol and in the early stage of sphingomyelin, observed in cyanide encephalopathy, should be referred, in particular, to the damage caused to the cortical fibres. On the other hand, the reduction of phosphatidyl ethanolamine, greater in the grey than in the white cerebral matter, shows that cells membranes, other than myelin, have also been affected.

5. A marked shift in the ganglioside pattern is observed in cyanide encephalopathy. Deviations in the area of these components of the cellular membranes, precede perceptible morphological changes in the neurocytes in the grey cerebral matter.

M. Wender, Z. Adamczewska, A. Wajgt

LIPIDY MÓZGU W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII CYJANOWEJ

Streszczenie

Badano skład lipidów mózgu białych szczurów w różnych okresach po zatruciu HCN metodą wziewną według techniki Levine i Stypulkowskiego. Oznaczenia ilościowe poszczególnych lipidów mózgu wykonywano po rozdziale przy pomocy chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w encefalopatii cyjanowej występuje w istocie białej mózgu znaczny spadek zawartości sfingomielin, sulfatydów i wolnego cholesterolu, a także fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanalaminy oraz wyraźna estryfikacja cholesterolu. W istocie szarej mózgu stwierdza się obniżenie zawartości sulfatydów, cholesterolu a w okresie wczesnym również sfingomielin, a także spadek zawartości fosfatydyloetanalaminy; następuje również estryfikacja cholesterolu. Zarówno w istocie białej jak i w szarej mózgu stwierdza się ponadto przesunięcia w obrazie gangliozydów, wyprzedzające uchwytne morfologicznie zmiany w neurocytach.

Różny stopień odchyień w zakresie poszczególnych fosfatydów mózgu świadczy, że w mechanizmie demielinizacji w encefalopatii cyjanowej nie odgrywa większej roli uogólnione zaburzenie syntezy fosfolipidów. Brak współzależności pomiędzy estryfikacją cholesterolu a reakcją makrofagów wskazuje na występowanie w encefalopatii cyjanowej poważnych zaburzeń enzymatycznych związanych z przemianą cholesterolu w samej tkance nerwowej. Zmiany lipidowe w korze mózgu należy odnieść tak do uszkodzenia mieliny we włóknach rdzennych jak i do uszkodzeń innych oprócz mieliny błon komórkowych.

М. Вендер, З. Адамчевска, А. Вайгт

LIPIDY MOZGA W EKSPERYMENTALNEJ CIJANOWEJ ENCEFALOPATII

Резюме

Исследовалось содержание липидов мозга белых крыс в разные периоды после отравления HCN ингаляционным методом техникой Левина и Стыпулковского. Количественные определения отдельных липидов мозга проводилось после разделения при помощи хроматографии на колоннах и тонкослойной хроматографии.

В результате проведенных исследований обнаружено, что в циановой энцефалопатии в белом веществе мозга имеет место значительное падение содержания сфингомиелинов, сульфатидов и свободного холестерина, а также фосфатидилсерина и фосфатидилэтанолamina и отчетливая этерификация холестерина. В сером веществе мозга наблюдается снижение содержания сульфатидов, холестерина и в раннем периоде также сфингомиелинов и падение содержания фосфатидилэтанолamina; имеет место также этерификация холе-

стерола. Как в белом так и в сером веществе мозга наблюдаются кроме того сдвиги в картине ганглиозидов, опережающие заметные морфологически изменения в нейронах.

Разная степень отклонений отдельных фосфатидов мозга свидетельствует о том, что в механизме демиелинизации в циановой энцефалопатии не играет значительной роли обобщенное нарушение синтеза фосфолипидов. Отсутствие зависимости между этерификацией холестерина и реакцией макрофагов указывает на наличие в циановой энцефалопатии серьезных энзиматических нарушений, связанных с обменом холестерина в самой нервной ткани. Липидные изменения в коре мозга следует отнести как к повреждению миелина в мягкотканых волокнах так и к другим повреждениям кроме повреждений миелина клеточных мембран.

REFERENCES

1. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 466—468.
2. Bass N.: Pathogenesis of myelin lesions in experimental cyanide encephalopathy. *Neurology (Minneapolis)* 1968, 18, 167—177.
3. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
4. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy. *J. Neuropath. Exper. Neurol.* 1967, 26, 200—213.
5. Ibrahim M., Ph. Briscoe, Jr., O. Bayliss, C. Adams: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy in the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1963, 26, 479—486.
6. Levine S.: Experimental cyanide encephalopathy. *J. Neuropath. Exper. Neurol.* 1967, 26, 214—222.
7. Levine S., W. Stypulkowski: Experimental cyanide encephalopathy. *Arch. Pathol.* 1959, 67, 306—323.
8. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determinations of cerebrosides. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 789—796.
9. Sperry W., M. Webb: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
10. Suzuki K.: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. *Life Sciences* 1964, 3, 1227—1233.
11. Suzuki K.: Ganglioside patterns of normal and pathological brains. Inborn disorders of sphingolipid metabolism. Pergamon Press, Oxford New York, 1966, 215—230.
12. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.* 1964, 11, 839—859.
13. Wender M., Piechowski A., Z. Adamczewska: Biochemical investigations of the brain in triethyl tin intoxication. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 223—234.
14. Wender M., A. Piechowski, A. Wajgt: Cerebral proteins in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 519—527.

Authors' address: Department of Neurology, Institute of Diseases of Nervous System and Sensory Organs, Medical Academy, Poznań, ul. Przybyszewskiego 49, Poland.

JÓZEF KARKOS

WPŁYW LEKÓW PRZECIWPADACZKOWYCH
NA OBRAZ MORFOLOGICZNY MÓZDŻKU SZCZURÓW *)

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa
Kierownik: doc. dr J. Dymecki

W ośrodkowym układzie nerwowym ludzi chorych na przewlekłą padaczkę można stwierdzić zmiany morfologiczne o charakterystycznym obrazie i umiejscowieniu (Dowżenko 1966, Afifi, Allen 1968, Dymecki 1971). Patogeneza tych zmian nie jest dotychczas wyjaśniona. Współczesny stan wiedzy pozwala na przyjęcie dwóch czynników patogenetycznych: częstych napadów padaczkowych, które są przyczyną zmian określanych jako podrgawkowe (Scholz 1953, Dąmbska 1968) oraz toksycznego wpływu leków przeciwpadaczkowych na tkankę nerwową (Haberland 1962, Karkos 1972b).

W piśmiennictwie ostatnich lat pojawiły się prace, których autorzy skłonni są przypisywać zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym chorych na padaczkę przewlekłą przede wszystkim toksycznemu działaniu leków przeciwpadaczkowych (Dreyer 1966, Meyler, Herzheimer 1968). Uszkodzenia te powstają szczególnie wskutek stosowania fenytoiny, przy czym najbardziej dotknięty jest mózdzek.

Średnio po upływie 15 lat, u pacjentów z przewlekłą padaczką, występują objawy uszkodzenia mózdzku, którym towarzyszą inne objawy neurologiczne oraz zaburzenia psychiczne.

Celem pracy było wykazanie zmian morfologicznych w mózdzku szczurów po dłuższym stosowaniu kilku wybranych leków przeciwpadaczkowych, używanych od dawna w leczeniu. Badania te umożliwiłyby również porównanie i zróżnicowanie zmian polekowych i podrgawkowych.

Badania nad padaczką doświadczalną wskazują, że mózdzek wywiera hamujący wpływ na napad padaczkowy (Karkos 1972a). Podobnie jak okolica amonalna mózdzek jest tą strukturą anatomiczną ośrodkowego układu nerwowego, w której zmiany morfologiczne u chorych na padaczkę przewlekłą są najczęstsze i najwyraźniejsze. Elementy morfologiczne mózdzku charakteryzują się dużą wrażliwością na działanie czynników

*) Praca częściowo subsydiowana przez PAN w ramach problemu węzłowego 09.4.1.3.3.

toksycznych endo- i egzogennych (Wender 1966, Collins 1970). Ponadto niektóre leki przeciwpadaczkowe np. fenytoina wykazują skłonność do kumulowania się w tym narządzie (van der Kleijn 1972). Istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia mechanizmu działania leków przeciwpadaczkowych, jak też mechanizmu napadów drgawkowych posiadają pewne właściwości biochemiczne tkanki nerwowej mózdzku jak wysoka przemiana białkowa, duża zawartość cyjanokobalaminy (Reynolds 1968, Karkos 1972a, 1972c).

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 440 szczurach szczepu Wistar obu płci, o wadze wyjściowej 180—200 g, wg zasad obowiązujących w skryningu farmakologicznym, szczególnie w odniesieniu do badania toksyczności przewlekłej, określania tolerancji na leki przeciwpadaczkowe (Godlewski, Danysz 1970) oraz zasad oceny toksyczności leków. Do badań użyto leki produkcji ZPF POLFA: 1) Hydantoinal (Phenytoin), 2) Luminal (Phenobarbital), 3) Ronton (Ethosuximide) i 4) Mizodin (Primidone). Wielkość dawek tych leków podawanych szczurom oraz porównanie z dawkami podawanymi człowiekowi przedstawiono w tabeli I.

Tabela 1 Porównanie dawek leków podawanych zwierzętom doświadczalnym z dawkami stosowanymi u ludzi

Table 1. Comparison of the drugs doses administered into experimental animals and those employed in humans

Lek Drug	LD ₅₀ mg/kg	Dawka podawana szczurom Dose given to rats mg/kg	ED ₁₀₀ mg/kg per os	Stosunek LD ₅₀ do dawki po- dawanej szczurom Ratio LD ₅₀ to dose emp- loyed experi- mentally	Całkowita dawka dzienna dla czło- wieka Full daily dose for adult	Stosunek dawki podawanej szczurom do dawki podawanej człowiekowi Ratio of experimen- tal dose/do- se given into humans
Fenytoina Phenytoin	3250	110	200	1/20	500	15,40
Fenobarbital Phenobarbital	660	33	20	1/20	200	11,53
Etosuksymid Ethosuximide	1820	125	125	1/15	1000	9,72
Primidon Primidone	2000	100	200	1/20	1000	7,50

Zwierzęta podzielono na trzy grupy doświadczalne: w grupie pierwszej obejmującej 120 szczurów określono tolerancję w stosunku do każdego z badanych leków; na każdy lek użyto 30 szczurów. Grupa druga obejmowała 240 zwierząt, którym podawano leki przez okres 1, 3 i 6 miesięcy. Zwierzęta te podzielono na 4 podgrupy w zależności od rodzaju podawanego leku. Grupa trzecia obejmująca 80 szczurów stanowiła kontrolę doświadczenia. Czas przeżycia zwierząt wynosił 1, 3 i 6 miesięcy.

Leki podawano zwierzętom *in substantia* w 5% zawiesinie z gumą arabską, raz dziennie przed karmieniem. Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały wodę wodociągową. Zarówno leki przeciwpadaczkowe (w grupie pierwszej i drugiej) jak i wodę (w grupie trzeciej) podawano zwierzętom sondą metalową dożołądkowo. Przez cały okres doświadczeń prowadzono kontrolę stanu neurologicznego i somatycznego szczurów. Ciężar ciała zwierząt kontrolowano co 10 dni.

Po upływie 1, 3 i 6 miesięcy zwierzęta dekapitowano, gdyż ten sposób zabijania daje najmniej artefaktów w mózdku (Barlehner 1969). Mózgowie utrwalano w formalinie bromformolu przez 3 tygodnie. Materiał utrwalony w formalinie przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny, utrwalony w bromformolu zamrażano. Mózdzki skrawano seryjnie w płaszczyznach czołowej, strzałkowej lub poziomej. Metody barwień i impregnacji: H—E, Nissl, Bielschowsky, Holmes, Weil, Cajal, Kanzler-Arendt, Herxheimer i van Gieson.

WYNIKI

W odchyleniach w stanie neurologicznym i somatycznym zwierząt najczęstszym objawem mózdkowym była niezborność, która w pierwszym miesiącu doświadczeń występowała u większości zwierząt otrzymujących fenytoinę, a tylko sporadycznie u szczurów otrzymujących pozostałe leki. Po podaniu fenytoiny u kilku zwierząt, zwłaszcza u samic, niezborność można było zauważyć także w ostatnich tygodniach doświadczenia. Przez cały okres doświadczeń zwierzęta płci żeńskiej wykazywały wolniejszy przyrost ciężaru ciała w porównaniu ze zwierzętami płci męskiej i z grupą kontrolną.

Obraz morfologiczny mózdku

Makroskopowo u 5 szczurów otrzymujących fenytoinę przez okres 6 miesięcy opony miękkie były zgrubiałe, obrzękłe, a między oponą miękką i twardą były widoczne zlepy płaszczyznowe, a rzadziej zrosty (ryc. 1).

W obrazie mikroskopowym obserwowano uszkodzenie elementów mezenchymalnych i parenchymalnych tkanki nerwowej. Zmiany morfologiczne w elementach mezenchymalnych pojawiały się bądź to wcześniej niż w elementach parenchymalnych (etosuksymid i primidon), bądź też występowały równocześnie z nimi (fenytoina i fenobarbital).

Zmiany zwyrodnieniowe w komórkach zwojowych mózdzku zwierząt otrzymujących fenytoinę i fenobarbital występowały wcześniej i były bardzo wyraźne (ryc. ryc. 2, 3, 4, 5, 6, 7), a dynamika ich rozwoju była bardziej nasiloną między 1 i 3, niż między 3 i 6 miesiącem doświadczenia. U zwierząt, którym podawano etosuksymid i primidon uszkodzenie neurocytów można było stwierdzić po upływie 3 miesięcy (ryc. ryc. 8, 9, 10); po tym okresie narastanie zmian morfologicznych było raczej powolne. Najbardziej wrażliwe na działanie czynnika patogennego były komórki Purkiniego, w których obserwowano tigrilizę, pyknozę jąder, a następnie rozpad perikarionów. Wyjątkowo tylko spotykano komórki, w których tigrOID tworzył większe bryłki, a ciało ulegało obkurczeniu i sklerotyzacji. Tak zmienione komórki były widoczne w obrębie całego listka. Zmiany morfologiczne o podobnym charakterze i nasileniu spotykano w komórkach Golgiego.

Po upływie jednego miesiąca podawania fenobarbitalu stwierdzono uszkodzenie jąder komórek gwiaździstych pod postacią ich nierównomier-

Ryc. 1. Prawa półkula mózgu widoczna od strony grzbietowej. Opony miękkie ogniskowo zmleczają. Płaszczyznowy zrost między oponą miękką i twardą. Fenytoina — 6 mies. podawania leku. Pow. 10 ×.

Fig. 1. Right cerebral hemisphere seen from the dorsal side. Pia mater focally milked. Plane adhesion between the pia and dura mater. Phenytoin — 6 months of administration. × 10.

Ryc. 2. Kora mózdzku. Prawidłowe aksony komórek koszyczkowych oraz włókna równoległe. U podstawy koszyczków widoczne zgrubienia. Rozpad włókien pnących i mszystych. Fenytoina — 1 mies. podawania leku. Met. Bielschowsky'ego. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Cerebellar cortex. Normal axon of basket cells and parallel fibres. Thickenings at the base of baskets. Disintegration of mossy and climbing fibres. Phenytoin — 1 month of administration. Bielschowsky meth. × 200.

Ryc. 3. Kora mózdzku. Cienie komórek Purkiniego w zwyrodniałych koszyczkach. Fenytoina — 3 mies. podawania leku. Met. Holmesa. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Cerebellar cortex. Shadows of Purkinje cells in degenerated baskets. Phenytoin — 3 months of administration. Holmes meth. × 200.

Ryc. 4. Kora mózdzku. Na pograniczu z warstwą zwojową widoczna komórka koszyczkowa (strzałka) oraz zwyrodniałe włókna poprzeczne. Koszyczki oraz włókna pnące i mszyste uległy rozpadowi. Fenytoina — 6 mies. podawania leku. Met. Bielschowsky'ego. Pow. 200 ×.

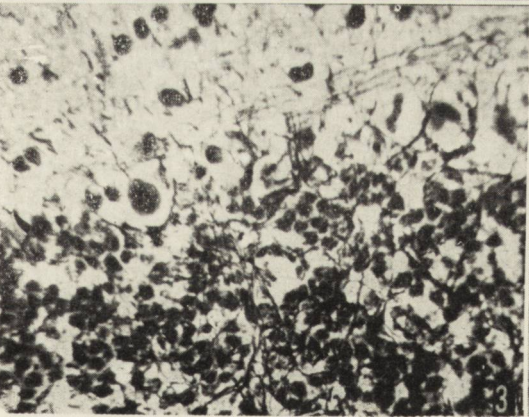
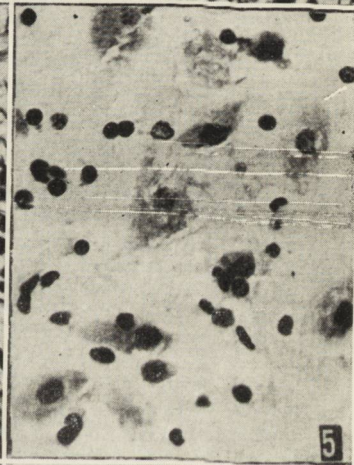
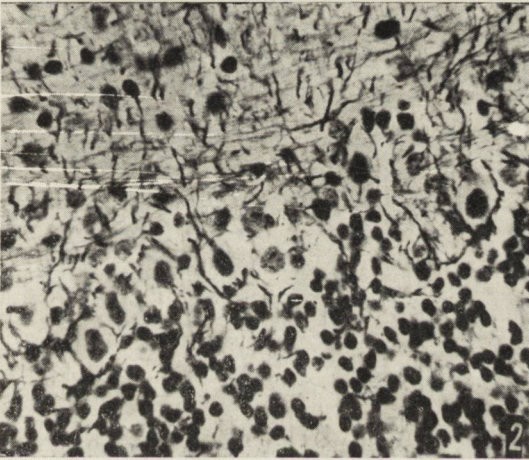
Fig. 4. Cerebellar cortex. Basket cell (arrow) on the border of the ganglion cells layer and degenerated transverse fibres. Disintegrated baskets and climbing and mossy fibres. Phenytoin — 6 months of administration. Holmes meth. × 200.

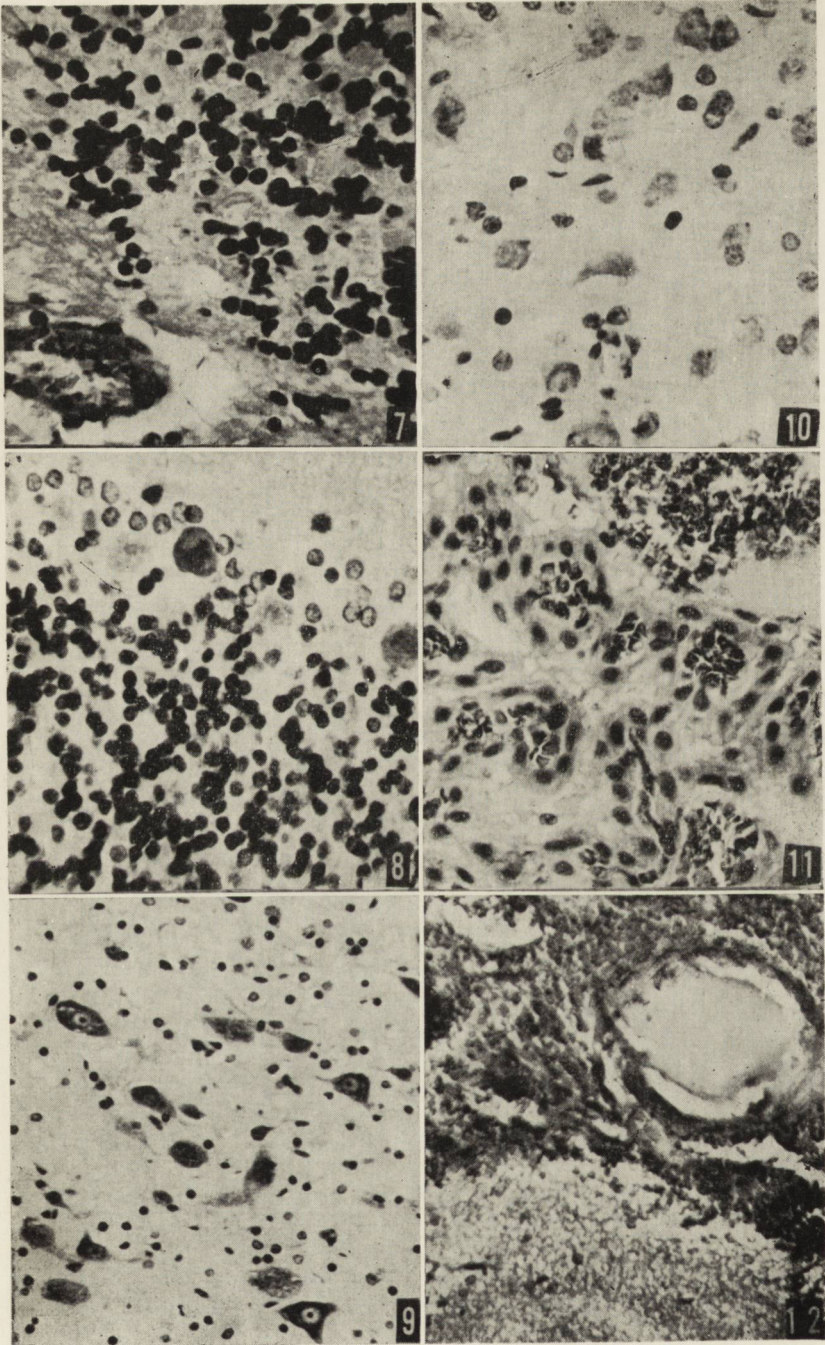
Ryc. 5. Jądro zębate. Pyknotyczne jądra komórek zwojowych, wodniczki w cytoplazmie, rozplywanie się komórek. Fenytoina — 6 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Dentate nucleus. Ganglion cells with pyknotic nuclei and vacuoles in the cytoplasm. Liquefaction of the cells. Phenytoin — 6 months of administration. Nissl meth. × 400.

Ryc. 6. Jądro stropu. Hyperchromatyczne jądra komórek zwojowych, nierównomier-ny rozpad tigrOIDu, niektóre perikariony obkurczone. Widoczne cienie rozpadających się neurocytów. Fenobarbital — 3 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 400 ×.

Fig. 6. Fastigial nucleus. Hyperchromatic nuclei of ganglion cells, irregular tigrOIDolysis, some perikarions crinched. Shadows of disintegrating neurocytes. Phenobarbital — 3 months of administration. Nissl meth. × 400.





nego obkurczania i zacierania rysunku chromatyny jądrowej. Po upływie trzech miesięcy podawania fenytoiny i etosuksymidu spostrzeżono również zmiany zwyrodnieniowe w cytoplazmie tych komórek. U zwierząt otrzymujących primidon uszkodzenie jąder pojedynczych komórek gwiaździstych występowało dopiero po upływie 6 miesięcy podawania leku.

Zmiany morfologiczne w komórkach ziarnistych były widoczne po upływie jednego miesiąca podawania zwierzętom fenytoiny i primidonu. Chromatyna jądrowa miała wygląd gruboziarnisty, barwiła się nierównomierne, a jądra obkurczały się oraz rozpadały. Ogniskowe ubytki tych komórek spostrzegano po upływie trzech miesięcy podawania każdego leku. Uszkodzenie perikarionów i wypustek osiowych komórek ziarnistych (włókien równoległych) występowało równocześnie.

Charakterystycznie zachowywały się włókna śródkorowe (podłużne i poprzeczne) oraz włókna osiowe dróg doprowadzających (pnać i mszyste). Włókna śródkorowe ulegały uszkodzeniu wcześniej i silniej, niż włókna dróg doprowadzających. Wśród włókien śródkorowych wcześniejsze pojawianie się zmian i większe ich nasilenie można było wykazać we włóknach podłużnych niż poprzecznych, natomiast we włóknach dróg doprowadza-

Ryc. 7. Kora mózdzku. Zgąbczenie istoty białej osi listków. Przyległe komórki ziarniste hyperchromatyczne, ogniskowo zanikłe. Fenobarbital — 6 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 400 ×.

Fig. 7. Cerebellar cortex. Marked spongy degeneration of white matter of cerebellar folia. Adjacent granular cells hyperchromatic and focally declined. Phenobarbital — 6 months of administration. Nissl meth. × 400.

Ryc. 8. Kora mózdzku. Uszkodzenie komórek Purkiniego, rozplem i przerost gleju Bergmanna. Komórki ziarniste barwią się nierównomiernie i zanikają. Etosuksymid — 6 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 400 ×.

Fig. 8. Cerebellar cortex. Damage of Purkinje cells, proliferation and hypertrophy of Bergmann astroglia. Granular cells staining irregularly and disappearing. Ethosuximide — 6 months of administration. Nissl meth. × 400.

Ryc. 9. Jądro zębate. Tigroliza i zwyrodnienie wodniczkowe komórek zwojowych, zanik pojedynczych neurocytów, rozplem astro- i mikrogleju. Etosuksymid — 6 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 200 ×.

Fig. 9. Dentate nucleus. Tigrolysis and vacuolar degeneration in the cytoplasm of ganglion cells, loss of some neurocytes, proliferation of astro- and microglia. Ethosuximide — 6 months of administration. Nissl meth. × 200.

Ryc. 10. Jądro stropu. Zmiany rozplywne oraz zanik komórek zwojowych. Widoczne pałeczki Nissla. Primidon — 6 mies. podawania leku. Met. Nissla. Pow. 400 ×.

Fig. 10. Fastigial nucleus. Liquefaction and loss of ganglion cells. Progressive microglia — rod cells. Primidone — 6 months of administration. Nissl meth. × 400.

Ryc. 11. Przekrwienie i obrzęk w splocie naczyniówkowym komory IV. Fenobarbital — 6 mies. podawania leku. H—E. Pow. 400 ×.

Fig. 11. Hyperaemia and edema of choroid plexus of the IVth ventricle. Phenobarbital — 6 months of administration. H—E. × 400.

Ryc. 12. Zachyłek boczny komory IV. Krwotok dokomorowy. Ściana naczynia z zartartą budową warstwową. Fenytoina — 6 mies. podawania leku. Met. van Gieson. Pow. 400 ×.

Fig. 12. Lateral recessus of the IVth ventricle. Intraventricular haemorrhage. Vessel wall with obliterated laminar structure. Phenytoin — 6 months of administration. Van Gieson. × 400.

jących stwierdzono równoczesne wystąpienie zmian. W końcowym okresie doświadczeń zmiany zwyrodnieniowe we włóknach podłużnych, niezależnie od rodzaju podawanego leku, przewyższały swym nasileniem zmiany we włóknach poprzecznych.

Koszyczki, które są utworzone z kolaterali aksonów komórek koszyczkowych, zachowywały się odmiennie niż perikarion komórki koszyczkowej i jej akson (włókno poprzeczne). Uszkodzenie perikarionu i jej wypustki osiowej pojawiało się dopiero w późniejszym okresie, natomiast zmiany morfologiczne w koszyczkach występowały równocześnie, lub nawet wyprzedzały uszkodzenie komórek Purkiniego. Zwyrodnienie koszyczków można było zauważyć najwcześniej u ich podstawy, w miejscu styku synaptycznego aksonu komórki koszyczkowej ze stożkiem odejścia aksonu komórki Purkiniego. Stopniowo zmiany zwyrodnieniowe obejmowały cały koszyczek.

Zmiany morfologiczne w komórkach zwojowych jąder mózdzku spostrzegano niezależnie od rodzaju i czasu podawania leków, z wyjątkiem jąder mózdzku szczurów otrzymujących primidon przez jeden miesiąc, w których nie stwierdzono zmian. Nasilenie zmian w jądrach *archicerebellum* zwierząt otrzymujących fenytoinę przez okres jednego miesiąca było większe niż w innych jądrach mózdzku.

Uszkodzenie osłonek mielinowych występowało pod postacią ich niejednolitego barwienia się, nieregularnych zgrubień oraz zacierania się ich granic. Nasilenie i rozległość tych zmian zależały zarówno od rodzaju jak i czasu podawania leków. Obserwowano je wcześniej u zwierząt otrzymujących fenytoinę i fenobarbital, niż u zwierząt, którym podawano etosuksymid i primidon, przy czym zmiany po podaniu fenytoiny i fenobarbitalu były również cięższe. Zmiany zwyrodnieniowe w osłonkach mielinowych nie wykazywały predylekcji okołonaczyniowej, natomiast były bardziej nasilone w polach obrzęku.

Astroglej ulegał najczęściej przerostowi oraz ogniskowemu i uogólnionemu rozplemowi. Zmiany tego rodzaju obserwowano u zwierząt otrzymujących fenobarbital i etosuksymid już po upływie jednego miesiąca, a w przypadku fenytoiny i primidonu — dopiero po upływie trzech miesięcy. Pojedyncze astrocyty wykazujące zmiany wsteczne można też było spotkać już po upływie trzech miesięcy, a po upływie sześciu miesięcy były widoczne zmiany zwyrodnieniowe w perikarionach i wypustkach cytoplazmatycznych większości komórek astrogleju. Astrocyty Bergmana najczęściej ulegały przerostowi, oraz ogniskowemu bądź uogólnionemu rozplemowi, a u zwierząt otrzymujących fenytoinę przez 6 miesięcy spostrzegano zmiany zwyrodnieniowe w wypustkach cytoplazmatycznych tych komórek.

Oligodendroglej ulegał ogniskowemu rozplemowi u zwierząt otrzymujących leki przez 1 i 3 miesiące. U szczurów, którym podawano fenytoinę przez 6 miesięcy był widoczny obrzęk cytoplazmy tych komórek. Mikro-

glej na wprowadzone do ustroju leki reagował ogniskowym rozplemem oraz przerostem. Rozplem i przerost mikrogleju spotykano w początkowym okresie po podaniu każdego leku, były one jednak wyraźniejsze u zwierząt otrzymujących primidon, a mniej nasilone u szczurów, którym podawano etosuksymid.

Glioza włókienkowa występowała rzadko i była skąpa. Obserwowano ją w początkowym okresie doświadczeń, wokół naczyń włosowatych w warstwie drobinowej i w istocie białej ciała rdzennego u zwierząt, którym podawano etosuksymid i primidon.

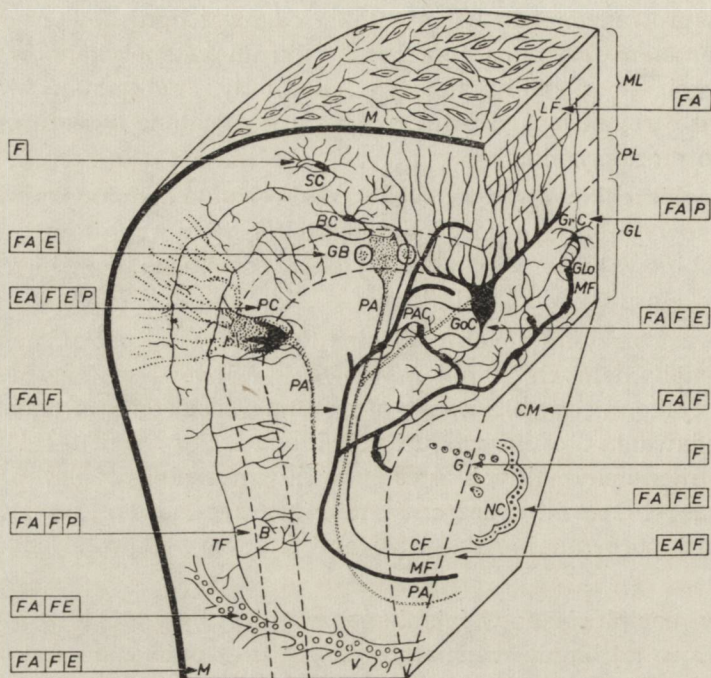
U zwierząt otrzymujących fenytoinę i fenobarbital uszkodzenie elementów mezenchymalnych tkanki nerwowej występowało wcześniej i ulegało nasileniu tylko między pierwszym a trzecim miesiącem. Natomiast w przypadku podawania etosuksymidu i primidonu zmiany morfologiczne w elementach mezenchymalnych występowały znacznie później. U zwierząt otrzymujących te leki przez sześć miesięcy zauważono znaczne nasilenie się zmian w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano oba leki przez 3 miesiące.

Zmiany morfologiczne w ścianie naczyniowej były zlokalizowane przede wszystkim w jej błonie wewnętrznej, w której było widoczne obrzmienie i stłuszczenie śródbłonek, a w późniejszym okresie śródbłonek złuszczał się do światła naczynia. U zwierząt otrzymujących fenytoinę i fenobarbital błona sprężysta ulegała niekiedy rozwarstwieniu i fragmentacji. Nierzadko spotykano zacieranie się warstwowości ściany naczyń. Rozplem elementów łącznotkankowych przydanki spotykano u zwierząt otrzymujących leki przez okres jednego i trzech miesięcy. Światło naczyń śródmiąższowych było poszerzone i szczelnie wypełnione krwinkami. U zwierząt otrzymujących leki dłużej, wokół naczyń większego kalibru były widoczne poszerzone przestrzenie okołonaczyniowe, wypełnione płynem wysiękowym i elementami upostaciowanymi krwi.

Obrzęk tkanki nerwowej obserwowano nie tylko w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, ale także w znacznej od nich odległości. Występował on częściej i z większym nasileniem w istocie białej niż w istocie szarej, rozsuwając włókna osiowe i komórki zwojowe.

Sploty naczyniówkowe komory IV początkowo były tylko silniej ukrwione, a u zwierząt otrzymujących dłużej leki również obrzękłe (ryc. 11).

Fibroblasty opon miękkich, u zwierząt otrzymujących leki przez okres jednego miesiąca, wykazywały cechy pobudzenia, a w późniejszym okresie spostrzegano także ich rozrost. Pogrubienie zrębu łącznotkankowego opon miękkich, widoczne u zwierząt otrzymujących fenytoinę i fenobarbital już po upływie trzech miesięcy, było wynikiem rozplemu włókien kolagenowych. Po sześciu miesiącach podawania leków opony miękkie były przekrwione, obrzękłe, spotykano także wynaczynienia zarówno śródjak i podoponowe (ryc. 12).



Schemat 1. Topografia zmian strukturalnych w mózdzku po podawaniu przez 1 miesiąc leków przeciwpadaczkowych (schemat wg Murphy i wsp. 1970 — modyfikacja autora).

Diagram 1. Topography of structural changes in cerebellum after 1 month administration of antiepileptic drugs (diagram after Murphy et al. 1970 — author's modification).

ML	warstwa drobinowa	molecular layer
PL	warstwa zwojowa	ganglion cell layer
GL	warstwa ziarnista	granular layer
CM	ciało rdzenne	corpus medullare
V	naczynie krwionośne	blood vessel
M	opona miękka	pia mater
MF	włókna mszyste	mossy fibres
CF	włókna pnące	climbing fibres
SC	komórka gwiaździsta	stellate cell
LF	włókno podłużne	longitudinal fibre
TF	włókno poprzeczne	transverse fibre
PC	komórka Purkinjego	Purkinje cell
PA	akson komórki Purkinjego	axon of Purkinje cell
PAC	kolaterale aksonu komórki Purkinjego	collaterals of Purkinje cell
BC	komórka koszyczkowa	basket cell
B	koszyczek	basket
GoC	komórka Golgiego	Golgi cell
GrC	komórka ziarnista	granular cell
Glo	kłębuszek	glomerulus
G	komórka glejowa	glial cell
NC	jądra mózdzku	cerebellar nuclei
GB	glej Bergmanna	Bergmann glia
FA	Fenytoina	Phenytoin
F	Fenobarbital	Phenobarbital
E	Etosuksymid	Ethosuximide
P	Primidon	Primidone

Umiejscowienie zmian morfologicznych w mózdzku, po upływie jednego miesiąca ich podawania, najbardziej typowe dla każdego ze stosowanych leków przeciwpadaczkowych przedstawia schemat 1.

U zwierząt grupy kontrolnej makroskopowo było widoczne przekrwienie opon i mózdzku. W badaniu mikroskopowym naczynia krwionośne były poszerzone i obficie wypełnione krwinkami. Śródbłonki były obrznięte, natomiast nie spotykano wynaczynień.

OMÓWIENIE

Z obserwacji klinicznych oraz badań doświadczalnych wiadomo, że długotrwałe stosowanie leków przeciwpadaczkowych może być przyczyną zaburzeń czynnościowych oraz organicznego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (Woodbury i wsp. 1972). Ten pogląd potwierdzają wyniki przedstawionych doświadczeń nad wpływem fenytoiny, fenobarbitalu, etosuksymidu i primidonu na mózdzek szczurów.

Zaburzenia czynnościowe przypisuje się hamowaniu przewodnictwa synaptycznego przez leki przeciwpadaczkowe (Majkowski 1969, Karkos 1972). Fenobarbital hamuje przewodnictwo synaptyczne między innymi w istocie siatkowatej, a etosuksymid w neuronach wzgórzowo-korowych. Ponieważ mózdzek jest strukturą, której połączenia neuronalne mają charakter wielosynaptyczny (McLennan 1963, Karkos 1972), zarówno w warunkach doświadczalnych jak i u chorych należy się spodziewać osłabienia jego czynności pod wpływem stosowania tych leków. W naszym materiale doświadczalnym świadczy o tym również występowanie objawów mózdkowych.

Przemijający charakter tych zaburzeń związany jest z właściwościami farmakologicznymi leków przeciwpadaczkowych (Black 1969, van der Kleijn 1972), a także świadczy o dużych zdolnościach wyrównawczych struktur anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego związanych czynnościowo z mózdzkiem.

Uszkodzenie organiczne mózdzku opisywano tylko u chorych otrzymujących leki przeciwpadaczkowe przez długi okres czasu (Roger, Soulayrol 1959, Haberland 1962, Dreyer 1966). Badania doświadczalne wskazują, że o wystąpieniu zmian morfologicznych w mózdzku decyduje długość okresu podawania leku, a w mniejszym stopniu wielkość dawki (Reynolds 1968). Przyjmuje się, że zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym powstałe pod wpływem leków przeciwpadaczkowych, są przede wszystkim wynikiem ich toksycznego działania spowodowanego przedawkowaniem tych leków. Mniejsze znaczenie w patogenezie tych zmian odgrywają natomiast takie zjawiska, jak nietolerancja, alergia i idiosynkrazja (Kioerboe 1965, Karkos 1972, Woodbury i wsp. 1972). Nadmiar niezmetabolizowanych leków przeciwpadaczkowych, lub też toksyczne metabolity powstałe w trakcie ich przemiany w ustroju, uszkodzają

tkankę nerwową działając bezpośrednio na parenchymę, tj. komórki zwojowe i glej, na naczynia krwionośne, a także na narządy wewnętrzne, co z kolei może powodować powstanie wtórnych uszkodzeń w ośrodkowym układzie nerwowym.

Nie opisane dotychczas w literaturze, a spotykane przez nas pogrubienie zrębu łącznotkankowego opon miękkich, a wyjątkowo także zlepy i zrosty między oponą miękką i twardą, są prawdopodobnie wyrazem odczynowego rozrostu tkanki łącznej na drażniące działanie badanych leków lub ich metabolitów oraz hemosydera.

Odchylenia w stanie somatycznym zwierząt wyrażały się głównie wolniejszym przyrostem ich ciężaru ciała, zależnym od rodzaju podawanego leku i od płci zwierząt. Ponieważ wszystkie zwierzęta pozostawały na tej samej diecie można przypuszczać, że odchylenia te zostały spowodowane wywołanym przez leki przeciwpadaczkowe zaburzeniem procesu wchłaniania, metabolizowania i wydalania katabolitów przemiany materii oraz zakłócenia neurohormonalnej regulacji wzrostu zwierząt. Leki przeciwpadaczkowe, jak wynika z piśmiennictwa, mogą być przyczyną zaburzenia wielu ogniw homeostazy ustrojowej (Fichman i wsp. 1970, Woodbury i wsp. 1972).

Mózdzek ulega bardzo łatwo uszkodzeniu w szeregu procesów patologicznych, między innymi w chorobie nowotworowej, zaburzeniach metabolicznych i innych (Karkos 1972). Ponieważ mózdzek zarówno w stanach fizjologicznych jak patologicznych wywiera wpływ hamujący na określone struktury ośrodkowego układu nerwowego, głównie ruchowe, można przypuszczać, że każdy proces chorobowy uszkadzający mózdzek pozbawia ustrój naturalnej ochrony w stanach zwiększonej gotowości drgawkowej. Stąd uszkodzenie mózdzku w przebiegu terapii lekami przeciwdrgawkowymi zasługuje na specjalną uwagę.

WNIOSKI

1. Leki przeciwpadaczkowe: fenytoina, fenobarbital, etosuksymid i primidon, podawane szczurom przez okres 1, 3 i 6 miesięcy w dawkach efektywnych (ED_{100}) powodują uszkodzenie większości struktur anatomicznych mózdzku, które ujawnia się już po upływie jednego miesiąca.

2. Spośród zastosowanych leków przeciwpadaczkowych przyczyną najczęstszych i najcięższych zmian morfologicznych była fenytoina, a w następnej kolejności fenobarbital, etosuksymid i primidon.

3. Zmiany morfologiczne w mózdzku wywołane stosowanymi lekami nie mają cech swoistych makroskopowo, ani mikroskopowo, a w szczególności nie stwierdzono cech swoistości topograficznej. Zależnie od rodzaju leku i czasu jego podawania występują różnice w kolejności, częstotliwości, nasileniu i rozległości uszkodzeń elementów parenchymalnych i mezenchymalnych tkanki nerwowej.

4. Objawy uszkodzenia mózdzku występują najczęściej pod postacią przemijającej niezdolności. Z odchyień w stanie somatycznym na uwagę

zasługuje wolniejszy przyrost ciężaru ciała, zwłaszcza u samic. Zwierzęta te również gorzej tolerowały stosowane leki przeciwpadaczkowe.

5. Porównanie obrazu morfologicznego mózdzku chorych na padaczkę przewlekłą i szczurów otrzymujących leki przeciwpadaczkowe wykazuje przede wszystkim różnice w topografii procesu chorobowego. Należy również podkreślić uszkodzenie łożyska naczyniowego oraz włókien osiowych i osłonek mielinowych w ośrodkowym układzie nerwowym szczurów, którego nie spotyka się w mózdzku chorych na padaczkę przewlekłą.

Ю. Каркос

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ КАРТИНУ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

Резюме

Проведено морфологическое исследование мозжечка крыс, которым подавали в эффективных дозах в течение 1, 3 и 6 месяцев противэпилептические средства: фенитоин, фенобарбитал, этосуксимид и примидон.

В морфологической картине мозжечка не наблюдалось ни микроскопно ни микроскопно свойственных черт, а обнаруженные изменения имели дегенеративный характер. Установлены различия в очередности, частоте и силе повреждения паренхиматических и мезенхиматических элементов мозжечка в зависимости от даваемого лекарства. Повреждение этих элементов выступало по истечению 1 месяца подавания фенитоина и фенобарбитала. При действии этосуксимида и примидона нарушение элементов мезенхиматических опережало морфологические изменения в нейронах и глии. Наиболее чувствительны на токсическое действие лекарств были клетки Пуркинье, затем клетки Гольди, зернистые клетки и клетки молекулярного слоя. Установлено также повреждение нервных волокон центральных и проводящих путей, а также повреждение ганглионарных клеток ядер мозжечка. Кроме того констатированы дегенеративные изменения в миелиновых оболочках, усиливающиеся в поле отека ткани, локальная и обобщенная гиперплазия и гипертрофия глии, а в случае более длительного подавания лекарств также регрессивные изменения глии. Повреждение сосудистой системы, выступающее раньше и всегда с большой силой было причиной кровоизлияния в мозжечковой мякоти и под твердой оболочкой, а также отека, прежде всего, белого вещества.

Клиническое повреждение мозжечка объявлялось переходным астигматизмом, кроме того наблюдалось расстройство в росте веса тела животных, особенно у самок.

Результаты проведенных исследований приводят к выводу, что изучаемые противэпилептические средства обладают токсическим действием на нервную ткань, причем, наиболее нейротоксическим является фенитоин, затем фенобарбитал, этосуксимид и примидон.

J. Karkos

EFFECT OF ANTIEPILEPTIC DRUGS ON THE MORPHOLOGICAL PICTURE OF RAT CEREBELLUM

Summary

Morphological studies were performed on cerebella of rats which received antiepileptic drugs: phenytoin, phenobarbital, ethosuximide and primidone in effective doses for a period of 1, 3 and 6 months.

Morphological picture of cerebellum was neither microscopically and macroscopically specific, the changes observed having shown a degenerative character. Drug — dependent differences were stated in the sequence, frequency and intensity of impairment of the parenchymal and mesenchymal elements of cerebellum. Impairment of both of those elements took place after 1 month administration of phenytoin and phenobarbital. In the case of ethosuximide and primidone, impairment of the mesenchymal elements preceded morphological changes in neurocytes and glia. The most vulnerable to the toxic effect of the drugs were Purkinje cells, followed by Golgi cells, granular cells and stellate cells. There was also stated impairment of nerve fibres of intracortical and ascending tracts and damage of ganglion cells of cerebellar nuclei. Furthermore, there were found degenerative changes in myelin sheaths, being most intensive in the areas of tissue edema, focal and generalized proliferation and hypertrophy of glia and in case of prolonged drug administration also regressive changes in glia. Impairment of the vascular system occurring early and always in high intensity was the cause of intraparenchymal and subarachnoidal extravasations of blood cells and of edema, mainly of the white matter. The impairment of cerebellum was manifested clinically with transient ataxy and disturbances in the body weight increase, the latter concerning in particular the females.

The present results demonstrate that the antiepileptic drugs examined act toxically on the nervous tissue, whereby phenytoin turned out to be the most neurotoxic one, followed in the sequence by phenobarbital, ethosuximide and primidone.

PIŚMIENICTWO

1. Afifi A. K., Allen van M. W.: Cerebellar atrophy in epilepsy, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1968, 31, 169—174.
2. Bärleher E.: The effect of the method of killing on synapses structure in the cerebellar cortex in *Rattus norvegicus*, *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, 1969, 80, 101—105.
3. Black P.: *Drugs and the Brain*, John Hopkins Press Book, Baltimore 1969.
4. Buksowicz Cz., Barańska-Gieruszczak M.: Przewlekłe zaburzenia mózdkowe w przypadku padaczki leczonej dwufenylohydantoiną, *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1969, 3, 653—655.
5. Collins G.: Cerebellar degeneration in thiamine-deficient rats, *Am. J. Path.*, 1970, 58, 219—223.
6. Dąbska M.: Zagadnienie zmian podgrawkowych w padaczce, *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1968, 2, 276—280.
7. Dowżenko A.: Podłoże patomorfologiczne i patogeniza postępujących zmian psychicznych w padaczce. W książce: Współczesne zagadnienia niedorozwoju umysłowego, PZWL, Warszawa 1966.
8. Dreyer R.: Kleinhirndauerschädigung infolge Diphenylhydantoinintoxikation, *Fortschr. Neurol. Psychiat.*, 1966, 34, 224—235.
9. Dymecki J.: Patomorfologia zmian mózgowych w padaczce. W książce: Padaczka (Red. A. Dowżenko), PZWL, Warszawa 1971.
10. Fichman M. P., Kleeman C. R., Bethurce J. E.: Inhibition of Antidiuretic Hormone Secretion by Diphenylhydantoin, *Arch. Neurol.*, 1970, 22, 45—48.
11. Glasson B., Benakis A., Ernst C.: Métabolisme et excretion comparée de quelques médicaments anti-convulsivants, *Thérapie*, 1963, 18, 1483—1491.
12. Godlewski H. G., Danysz A.: Metody farmakologicznego skryningu, ZPF „Polfa”, Warszawa 1970.
13. Haberland C.: Cerebellar degeneration with clinical manifestation in chronic epileptic patients, *Psychiat. Neurol.*, 1962, 143, 29—44.
14. Karkos J.: Wpływ mózdku na hamowanie napadu padaczkowego, *Pol. Tyg Lek.*, 1972, 27, 574—577.

15. Karkos J.: Obraz kliniczny, patomorfologia i patogeniza uszkodzenia mózdzku w padaczce przewlekłej, *Pol. Tyg. Lek.*, 1972, 27, 601—603.
16. Karkos J.: Mechanizm dzialania ubocznego i toksycznego leków przeciwpadaczkowych, *Pol. Tyg. Lek.*, 1972, 27, 1411—1415.
17. Kioerboe E.: Drug therapy of epilepsy, *Nord. Med.*, 1965, 73, 291—295.
18. Laurence D. R., Bacharach A. L.: Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics, Academic Press, London—New York 1964.
19. Majkowski J.: Neurofizjologiczne i farmakologiczne aspekty leczenia padaczki, *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1969, 3, 513—518.
20. McLennan H.: Synaptic transmission, W. B. Saunders Company, Philadelphia 1963.
21. McIlvain H., Bachelard H. S.: Biochemistry and the Central Nervous System, Churchill Livingstone, Edinburgh and London 1971.
22. Merck Index (Red. P. Stecher), Merck and Co., Inc., Rahway, N. J., 1968.
23. Meyler L., Herxheimer A.: Side effects of drugs, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1968.
24. Principles for Pre-Clinical Testing of Drug Safety, Report of WHO Scientific Group, Geneva 1966.
25. Reynolds E. H.: Mental effects of anticonvulsants, and folic acid metabolism, *Brain*, 1968, 91, 197—205.
26. Roger J., Soulayrol R.: Apropos of neurological complications of treatment of epilepsy by hydantoins, *Rev. Neurol.*, 1959, 100, 640—648.
27. Scholz W.: Selective neuronal necrosis and its topistic patterns in hypoxemia and oligemia, *J. Neuropath. exper. Neurol.*, 1953, 12, 249—261.
28. Spector W. S.: Handbook of Toxicology, Vol. I, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London 1956.
29. Weil C. S.: Relationships between single-peroral, one-week, and ninety-day rat feeding studies, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1969, 14, 426—430.
30. Wender M.: Z kazuistyki rozlanych zaników mózdzku, *Neurol. Neurochir. Psychiat. Pol.*, 1966, 16, 857—860.
31. Woodbury D. M., Penry J. K., Schmidt R. P.: Antiepileptic drugs, Raven Press, New York 1972.

Pełne piśmiennictwo do wglądu u autora.

Adres autora: Instytut Psychoneurologiczny, Warszawa, ul. Sobieskiego 1/9.

IRMINA B. ZELMAN, GRAŻYNA SZUMAŃSKA

ZMIANY HISTOCHEMICZNE W MÓZGU SZCZURÓW W ENCEFALOPATII OUABAINOWEJ *)

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

W serii uprzednio przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że domózgowe wstrzyknięcie ouabainy prowadzi u szczurów do powstania uogólnionego, cytotoksycznego obrzęku mózgu oraz ogniskowego zwyrodnienia gąbczastego tkanki (Zelman 1972). Zarówno zmiany rozlane jak i ogniskowe występują w strukturach szarych, przede wszystkim w korze półkul mózgowych i są tylko częściowo zależne od miejsca wstrzyknięcia glikozydu do tkanki. Stwierdzany obrzęk śródkomórkowy jest zjawiskiem odwracalnym, cofającym się w ciągu stosunkowo krótkiego czasu, natomiast zwyrodnienie gąbczaste stanowi trwałe uszkodzenie tkanki, powstające zwykle w miejscu działania najwyższych stężeń glikozydu.

Badania ultrastrukturalne przeprowadzone na szczurach (Cornog i wsp. 1968) oraz na tkance nerwowej hodowanej *in vitro* (Renkawek i wsp. 1970) wykazały istotny udział astrocytów w kształtowaniu zmian w mózgu oraz wtórne uszkodzenie neuronów.

Podjęte badania miały na celu ustalenie charakteru i dynamiki zmian histochemicznych w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy z uwzględnieniem ich stosunku do opisanych zmian strukturalnych w tkance nerwowej.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 2-miesięcznych szczurach rasy Wistar. W narkozie eterowej przecinano zwierzętom skórę na głowie i przy pomocy wiertła dentystycznego wykonywano otwór w pokrywie czaszki prawej półkuli, bocznie od linii środkowej i nieco ku przodowi od szwu czołowo-ciemieniowego. Przez otwór ten wprowadzano do mózgu cienką igłę i wstrzykiwano 0,01—0,02 ml roztworu ouabainy, zawierającego 0,0025—0,004 mg glikozydu. Ranę na głowie zaszywano lub zamykano

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

przy pomocy klamerek. Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym wstrzyknięto domózgowo taką samą objętość fizjologicznego roztworu NaCl. W ustalonych przedziałach czasu, obejmujących okres od 2 godzin do 14 dni zwierzęta doświadczalne i kontrolne dekapitowano w grupach składających się z 3—5 szczurów. Mózgi przeznaczone do badań morfologicznych i oznaczania glikogenu na skrawkach, po wyjęciu z jamy czaszkowej, cięto na bloczki grubości 2—3 mm, utrwalano w płynie Rossmanna i przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny. Preparaty barwiono rutynowo hematoksyliną-eozyną i fioletem krezylu oraz dla wykazania glikogenu metodą PAS po uprzednim blokowaniu dimedonem wg Bulmera (1959). Czas przeżycia tej grupy zwierząt wynosił 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 godzin oraz 6, 8, 10 i 14 dni.

Szczury przeznaczone do badań histoenzymatycznych dekapitowano 2, 6, 24 i 48 godzin oraz 6 i 14 dni po zabiegu. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszkowej dzielono na poziome wkłucia na 2 bloki, które zamrażano w suchym lodzie i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 14 μ . Badanie histoenzymatyczne obejmowało określenie aktywności następujących enzymów: UDPG-G-transferazy wg Takeuchi i Glennera (1962), fosforylasy a, a + b i całkowitej wg Takeuchi i Kuriaki (1955) w modyfikacji Godlewskiego (1963), dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu wg Hessa i wsp. (1958), dehydrogenazy bursztynianowej wg Novikoffa (1963), dehydrogenazy mleczanowej wg Hessa i wsp. (1958), fosfatazy kwaśnej wg Barki (1963) i fosfatazy zasadowej wg Gomoriego (1953).

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

U szczurów, którym wstrzyknięto ouabainę obserwowano bezpośrednio po zabiegu przyśpieszenie czynności serca i oddechu. Po 15—30 minutach występowało pobudzenie ruchowe, napady prężeń tułowia, kończyn i ogona oraz mioklonie. Zaburzenia te, wykazujące zmienne nasilenie u poszczególnych zwierząt, utrzymywały się zwykle przez 2—3 godziny, a jedynie w pojedynczych przypadkach dłużej i stopniowo zmniejszając się ustępowały całkowicie. W okresie dalszej obserwacji szczury poza zmniejszoną ruchliwością nie wykazywały odchyień od normy. Duże napady drgawkowe, opisywane przez większość autorów (Bignami, Palladini 1966a, 1966b, Petsche, Seitelberger 1967, Cornog i wsp. 1968) obserwowano sporadycznie. Śmiertelność zwierząt doświadczalnych nie przekraczała 10%.

Szczury kontrolne, którym wstrzyknięto fizjologiczny roztwór chlorku sodu, po wyjściu z narkozy nie wykazywały żadnych objawów chorobowych.

Badanie neuropatologiczne

Makroskopowo u zwierząt doświadczalnych i kontrolnych widoczny był kanał wkłucia, niekiedy punkcikowate krwotoczki w jego bezpośrednim otoczeniu i nieco większe wynaczynienia w spoidle wielkim mózgu.

Mikroskopowo u zwierząt obu grup stwierdzono w otoczeniu kanału wkłucia rozluźnienie struktury tkanki, ubytki i uszkodzenie neuronów, a ponadto u części zwierząt drobne, wrzecionowate ogniska krwotoczne lub martwicze w spoidle, ułożone równolegle do przebiegu włókien. U zwierząt doświadczalnych uszkodzenie tkanki wokół kanału wkłucia i w obrębie spoidła było bardziej nasilone. U szczurów, którym wstrzyknięto ouabainę stwierdzono ponadto ostro odgraniczone ogniska gąbczastego zwyrodnienia tkanki z ubytkami neuronów i obecnością licznych różnej wielkości jamek. Ogniska te występowały zwykle obustronnie w położonej podspoidłowo części zawoju hipokampa. Na pograniczu ognisk zgąbczenia oraz w korze półkul mózgowych i niektórych strukturach podkorowych (*nucleus septi lateralis*) obserwowano rozuźnienie utkania neuropilu, obrzęk astrocytów i poszerzenie przestrzeni okołoneuronalnych. Ogniskowe zgąbczenie stanowiło trwałe uszkodzenie tkanki, natomiast obrzęk miał charakter przejściowy i cofał się zwykle w czasie od 24 do 48 godzin.

Gleju mezodermalny odczyn reparacyjny w otoczeniu kanału wkłucia nie różnił się w obu grupach zwierząt, a jego obraz morfologiczny był uwarunkowany czasem przeżycia po zabiegu.

Badanie histochemiczne

Glikogen. U szczurów kontrolnych skąpe złogi glikogenu występowały w lokalizacji typowej dla prawidłowego mózgu i obejmowały splot naczyńiówkowy, wyściółkę oraz warstwę podwyściółkową i podoponową. U zwierząt grupy kontrolnej i doświadczalnej obfite nagromadzenie wielocukru obserwowano w bezpośrednim otoczeniu kanału wkłucia poza obszarem martwiczo zmienionej tkanki. Spotykano je również w spoidle mózgu w polu obrzęku pourazowego. Złogi glikogenu występowały zarówno w postaci luźnych ziaren rozsianych w neuropilu, jak również w skupieniach okołonaczyniowych i w cytoplazmie astrocytów.

U szczurów doświadczalnych obserwowano ponadto obfite nagromadzenie złogów wielocukru, obejmujące prawie całą korę mózgu, niektóre struktury podkorowe i część kory mózdzku. Obecność glikogenu stwierdzano w obu półkulach mózgu symetrycznie, lub z zaznaczoną przewagą po stronie wkłucia. Przy uogólnionym charakterze procesu szczególnie obfite złogi glikogenu gromadziły się w zawoju hipokampa, *subiculum* i w korowej części jądra migdałowatego. Zarówno w korze nowej, jak i w korze limbicznej złogi wielocukru były najobfitsze w górnych wars-

twach, odcinkowo tylko zajmowały całą jej szerokość, a na sklepiści nasilały się niekiedy w jednej z głębszych warstw. Bardzo obfite złogi wielocukru stwierdzano ponadto w jądrze bocznym przegrody oraz w warstwie drobinowej i zwojowej kory mózdzku. W tym umiejscowieniu były ograniczone niemal wyłącznie do płacików położonych w bezpośrednim sąsiedztwie komory IV.

Glikogenu gromadził się w postaci drobnych ziaren rozsianych luźno w neuropilu, a w obszarach wykazujących większe nasilenie zmian był widoczny dookoła drobnych naczyń oraz w perikarionach i wypustkach astrocytów (ryc. 1). Astrocytarne skupienia glikogenu występowały zarówno w postaci ziarnistej, jak i homogennej. W żadnym przypadku nie obserwowano gromadzenia glikogenu w komórkach nerwowych.

Złogi glikogenu pojawiały się najwcześniej w 4 godziny po zabiegu, narastając znacznie w okresie do 24 godzin (ryc. 2). Osiągały one swoje maksymalne nagromadzenie w 48—72 godzinie, utrzymując się mniej więcej w niezmienionej ilości do 6 dnia doświadczenia. W okresie dalszej obserwacji zmniejszała się stopniowo ilość wielocukru. Po 14 dniach skąpe złogi glikogenu obserwowano jeszcze w dwóch górnych warstwach kory oraz w tych strukturach, w których stwierdzano największe zmiany histologiczne. Największe nagromadzenie wielocukru występowało w tym czasie w zwojach hipokampa, przy czym dominowały tu duże, przerosłe astrocyty z obfitą, jednorodną PAS-dodatnią cytoplazmą (ryc. 3). Zwracało uwagę znaczne zróżnicowanie ilości złogów i stopnia zajęcia poszczególnych struktur u zwierząt z tej samej grupy czasowej.

UDPG — G — transferaza. U szczurów kontrolnych aktywność tego enzymu występowała w splocie naczyńiówkowym i podoponowo, tam gdzie stwierdzono ziarniste złogi glikogenu. Dodatkowo pojawiała się w otoczeniu martwicy spowodowanej wkluciem i w niewielkim obszarze pourazowego obrzęku. U szczurów doświadczalnych aktywność UDPG-G-transferazy pojawiała się 2 godziny po wstrzyknięciu ouabainy w neuropilu kory półkul mózgowych. Aktywność enzymatyczna miała charakter lekkiego, dyfuzyjnego odczynu i w tej samej postaci utrzymywała się u zwierząt z 6-godzinym przeżyciem. Po 24 i 48 godzinach produkty reakcji miały charakter ziarnisty (ryc. 4). U szczurów z 6-dniowym przeżyciem występował silny ziarnisty odczyn w obrębie całej kory, utrzymując się w tej samej postaci do końca obserwacji. U szczurów, które przeżyły 14 dni największą aktywność enzymu stwierdzono w korze zwojów hipokampa.

Fosforylaza. U zwierząt kontrolnych i doświadczalnych aktywność fosforylaz występowała w otoczeniu martwicy pourazowej, wyraźnie bardziej nasilona u zwierząt doświadczalnych. U szczurów, którym wstrzyknięto ouabainę obserwowano stopniowy wzrost aktywności tych enzymów w korze półkul mózgowych, utrzymujący się do końca doświadczenia. W grupie 2- i 6-godzinnej występował dodatni, ziarnisty odczyn

wokół kapilarów i nieco słabszy w neuropilu kory obu półkul mózgowych (ryc. 5 i 6). W dalszych grupach czasowych obserwowano nasilenie odczynu, widoczne zarówno w obrębie kory (ryc. 7), jak i w odczynowych astrocytach zawojów hipokampa (ryc. 8), utrzymujące się do dwóch tygodni. W grupie z przeżyciem 6, 24 i 48 godzin stwierdzono wzrost aktywności fosforylasy b, zależnej od AMP i fosforylazo-b-kinazy, wyrażające się wzrostem fosforylasy całkowitej.

Dehydrogenaza bursztynianowa. U szczurów kontrolnych aktywność tego enzymu była wysoka, zarówno w istocie szarej (ryc. 9), jak i w oligodendrocytach spoidła. W obu grupach zwierząt obserwowano spadek aktywności enzymatycznej w otoczeniu martwiczo zmienionej tkanki. U szczurów doświadczalnych występowało ponadto obniżenie aktywności enzymu w korze obu półkul i zawojach hipokampa. Osłabienie aktywności enzymatycznej w postaci zmniejszenia ilości ziaren diformazanu w cytoplazmie i wypustkach neurocytów było widoczne już 2 godziny po wstrzyknięciu ouabainy (ryc. 10) i utrzymywało się u zwierząt z przeżyciem 6, 24 i 48 godzin. U szczurów, które przeżyły 6 dni po wstrzyknięciu glikozydu, obserwowano w obrębie *fascia dentata* neurony o bardzo zróżnicowanej reakcji enzymatycznej przy utrzymującym się nadal znacznym obniżeniu aktywności tej dehydrogenazy. Obniżenie aktywności enzymu było widoczne również u zwierząt, które przeżyły 14 dni po zabiegu, ale już mniej nasilone niż w grupie 24 i 48-godzinnej. Ponadto na pograniczu kory i spoidła występowały złogi drobnych, luźno rozsianych ziarnistości formazanowych, skupiające się również wokół naczyń.

Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanu. U zwierząt kontrolnych występował słaby dyfuzyjny odczyn w korze mózgowej i w strukturach podkorowych i nieco wyższy w oligodendrocytach spoidła. Wzrost aktywności tego enzymu obserwowano tylko w otoczeniu pourazowej martwicy. U zwierząt doświadczalnych już w 2 godziny po podaniu ouabainy było widoczne wzmoczenie aktywności enzymatycznej w miejscach odległych od wkłucia w korze mózgu i w zawojach hipokampa, przy czym odczyn z dyfuzyjnego stawał się wyraźnie ziarnisty. Po 6 i 24 godzinach obserwowano dalsze narastanie aktywności enzymu szczególnie w neuronach i gleju głębszych warstw kory. W czasie 24 i 48 godzin pojawiały się w obu zawojach hipokampa odczynowe astrocyty, wykazujące silną aktywność enzymatyczną (ryc. 11), utrzymującą się do końca obserwacji, pomimo widocznego w tym czasie ogólnego spadku aktywności tej dehydrogenazy.

Dehydrogenaza mleczanowa. U zwierząt kontrolnych i doświadczalnych aktywność enzymu poza obszarem otaczającym pourazową martwicę, nie wykazywała zmian w żadnym okresie obserwacji. Wzrost aktywności tej dehydrogenazy stwierdzono jedynie w odczyno-

wych astrocytach zawojów hipokampa u zwierząt doświadczalnych, utrzymujący się do końca obserwacji.

Fosfataza kwaśna. U zwierząt doświadczalnych i kontrolnych obserwowano wzrost aktywności tego enzymu w otoczeniu wklęcia. Sześć godzin po wstrzyknięciu ouabainy występował wzrost aktywności enzymatycznej w neuronach kory, szczególnie w jej dolnych warstwach, a u zwierząt, które przeżyły 6 i 14 dni, był wyraźnie nasilony wokół naczyń. U zwierząt dwóch ostatnich grup czasowych występował również dodatni odczyn na pograniczu kory i spoidła w postaci gruboziarnistych, trudnych do zidentyfikowania złogów.

Fosfataza zasadowa. Zwiększoną aktywność tego enzymu stwierdzono w obu grupach zwierząt w okolicy wklęcia, a u szczurów doświadczalnych z dłuższym okresem przeżycia ponadto na pograniczu kory i spoidła w postaci gruboziarnistych produktów reakcji enzymatycznej (ryc. 12).

OMÓWIENIE

Stwierdzone w naszym materiale doświadczalnym nieprawidłowości obrazu histochemicznego, podobnie jak uprzednio opisane zmiany histologiczne, miały dwojaki charakter: ogniskowy i uogólniony.

Zmiany pierwszej grupy, występujące w bezpośrednim sąsiedztwie kanału wklęcia, identyczne w grupie zwierząt kontrolnych i doświadczal-

Ryc. 1. Ziarnistości glikogenu w neuropilu kory mózgowej, 24 godziny po wstrzyknięciu ouabainy. PAS — dimedon. Pow. 100 ×.

Fig. 1. Granular glycogen deposits in neuropile of cerebral cortex, 24 hrs after ouabain injection. PAS — dimedone reaction. × 100.

Ryc. 2. Ziarniste złogi glikogenu, w neuropilu, w cytoplazmie i wypustkach astrocytów oraz wokół naczyń krwionośnych, 96 godzin po wstrzyknięciu ouabainy. PAS — dimedon. Pow. 160 ×.

Fig. 2. Glycogen granules in neuropile, cytoplasm and processes of astrocytes and around blood vessels. PAS — dimedone reaction, 96 hrs after ouabain injection. × 160.

Ryc. 3. Homogenne i ziarniste złogi glikogenu w astrocytach zawoju hipokampa, 10 dni po wstrzyknięciu ouabainy. PAS — dimedon. Pow. 160 ×.

Fig. 3. Homogenous and granular glycogen deposits in astrocytes of hippocamp gyrus, 10 days after ouabain injection. PAS — dimedone reaction. × 160.

Ryc. 4. UDPG-G-transferaza, 24 godziny po wstrzyknięciu ouabainy. Ziarnisty odczyn w neuropilu zawoju hipokampa. Pow. 200 ×.

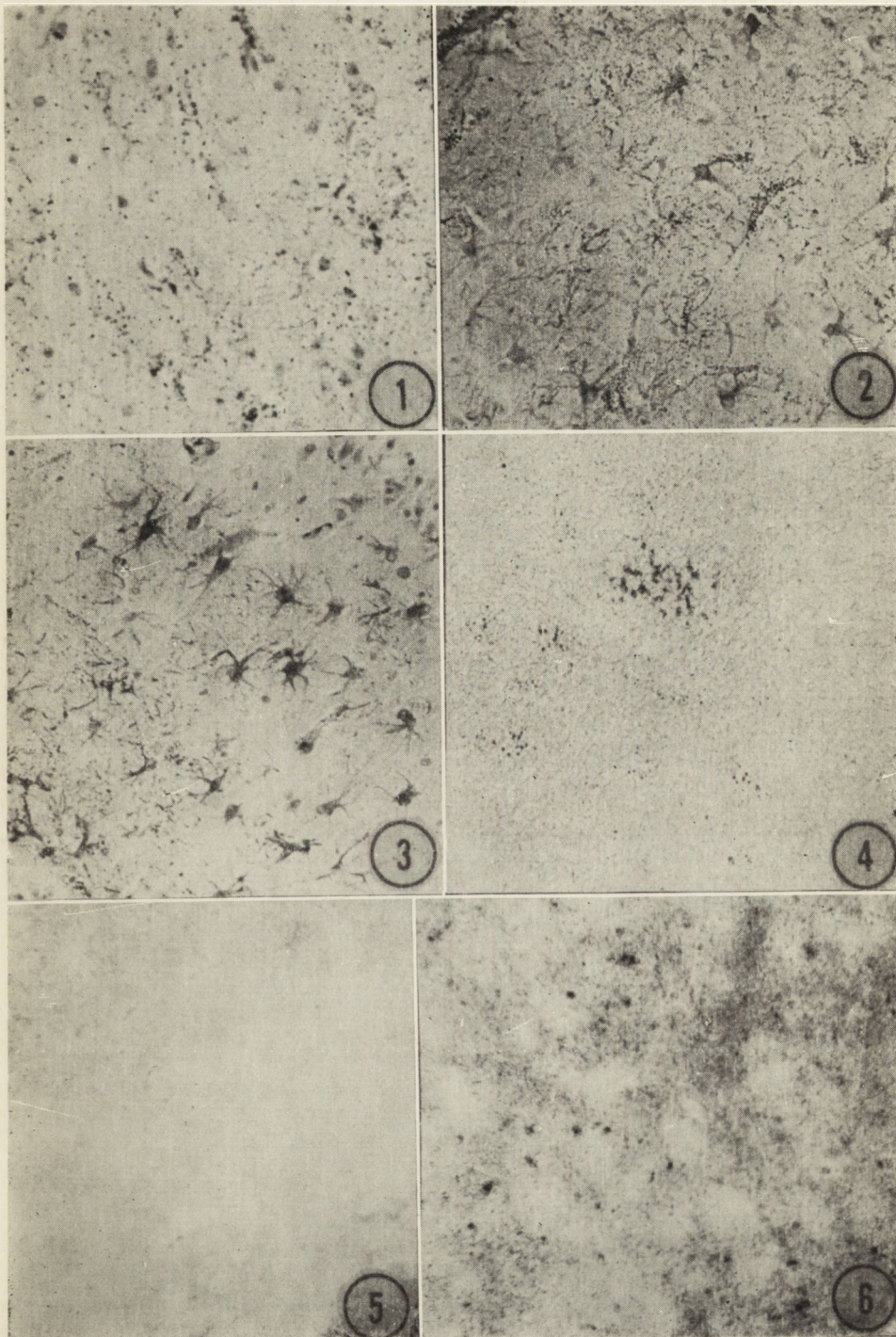
Fig. 4. UDPG-G-transferase, 24 hrs after ouabain injection. Granular reaction in neuropile of hippocamp gyrus. × 200.

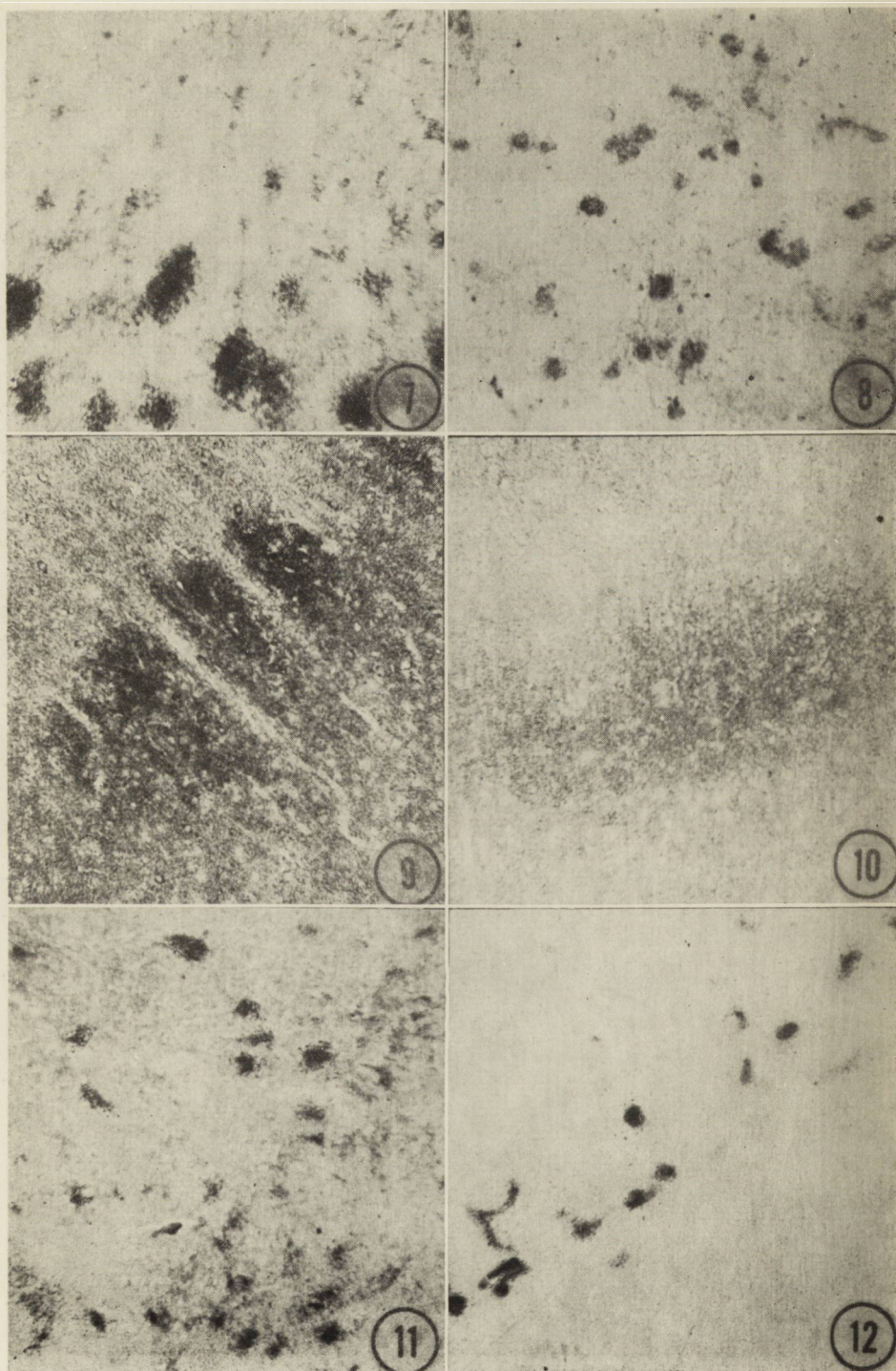
Ryc. 5. Fosforylaza a + b. Szczur kontrolny, 6 godzin po zabiegu. Słaby dyfuzyjny odczyn w korze mózgowej. Pow. 100 ×.

Fig. 5. Phosphorylase a+b. Control rats, 6 hrs after operation. Weak diffuse reaction in cerebral cortex. × 100.

Ryc. 6. Fosforylaza a + b 6 godzin po wstrzyknięciu ouabainy. Wzmoczona aktywność enzymatyczna w neuropilu kory. Pow. 100 ×.

Fig. 6. Phosphorylase a+b, 6 hrs after ouabain injection. Enhanced enzymic activity in neuropile of cerebral cortex. × 100.





nych, należy zapewne traktować jako nieprawidłowości związane z nie-swoistym uszkodzeniem tkanki i towarzyszącymi mu procesami reparacyjnymi. Przemawia za tym zarówno ich lokalizacja, jak i identyczny charakter i dynamika w obu grupach zwierząt oraz daleko idące podobieństwo do zmian opisywanych w doświadczalnych urazach mózgu (Shimizi, Himuro 1958, Guth, Watson 1968, Robinson 1972, Petrescu 1972, Farkas-Bargeton i wsp. 1972). Na podkreślenie zasługuje fakt, że wprowadzenie biologicznie aktywnego glikozydu nie zmieniało odczynowości tkanki na działanie urazu miejscowego.

Uogólnione zmiany histochemiczne stwierdzone wyłącznie u zwierząt doświadczalnych, pokrywające się z obszarem histologicznie stwierdzonego obrzęku mózgu, a nawet go przekraczające, należy odnieść do uogólnionego działania glikozydu. Zablockowanie ATPazy błon komórkowych prowadzi do zaburzenia mechanizmu pompy sodowo-potasowej i zwiększenia zawartości wody w astrocytach, wyrażającego się obrzmieniem ich cytoplazmy i wypustek. Proces ten znajduje odpowiednik morfologiczny w rozluźnieniu struktury neuropilu, a w przypadkach większego nasilenia zmian — w tworzeniu różnej wielkości jamek, prowadzących do powstania charakterystycznych ognisk zwyrodnienia gąbczastego. Tworzenie się jamek można wiązać, w oparciu o obserwację mikroskopowo-elektronowe, z pękaniem błon sąsiadujących ze sobą, maksymalnie obrzmiałych komórek glejowych.

Ryc. 7. Fosforylaza całkowita, 6 godzin po wstrzyknięciu ouabainy. Ziarnisty odczyn w korze mózgowej. Pow. 200 ×.

Fig. 7. Total phosphorylase, 6 hrs after ouabain injection. Granular reaction in cerebral cortex. × 200.

Ryc. 8. Fosforylaza całkowita, 6 dni po wstrzyknięciu ouabainy. Wysoka aktywność enzymu w odczynowych astrocytach zawoju hipokampa. Pow. 200 ×.

Fig. 8. Total phosphorylase, 6 days after ouabain injection. Significant enzymic activity in reactive astrocytes in Ammon's horn. × 200.

Ryc. 9. Dehydrogenaza bursztynianowa, szczur kontrolny 2 godziny po zabiegu. Wysoka aktywność enzymu w korze, zwłaszcza w III warstwie. Pow. 100 ×.

Fig. 9. Succinic dehydrogenase, control rat 2 hrs after operation. High enzymic activity in cerebral cortex, particularly in the IIIrd layer. × 100.

Ryc. 10. Dehydrogenaza bursztynianowa, 2 godziny po wstrzyknięciu ouabainy. Osłabienie odczynu w korze. Pow. 100 ×.

Fig. 10. Succinic dehydrogenase, 2 hrs after ouabain injection. Decrease of enzymic activity in cerebral cortex. × 100.

Ryc. 11. Dehydrogenaza glukozy — 6 — fosforanu, 24 godziny po wstrzyknięciu ouabainy. Wysoka aktywność enzymu w astrocytach zawoju hipokampa. Pow. 200 ×.

Fig. 11. Glucose — 6 — phosphate dehydrogenase, 24hrs after ouabain injection. Significant enzymic activity in astrocytes of Ammon's horn. × 200.

Ryc. 12. Fosfataza zasadowa, 6 dni po wstrzyknięciu ouabainy. Gruboziarniste produkty reakcji enzymatycznej na pograniczu kory i istoty białej. Pow. 200 ×.

Fig. 12. Alkaline phosphatase, 6 days after ouabain injection. Coarse granular products of enzymic reaction at the border of cerebral cortex and white matter. × 200.

Nasze obserwacje histochemiczne i histoenzymatyczne wskazują, że odwracalnemu obrzękowi cytotoksycznemu, wywołanemu ouabainą towarzyszą głębokie zaburzenia metaboliczne, których wykładnikiem jest gromadzenie się glikogenu, zmiany w aktywności enzymów metabolizujących glikogen oraz szeregu enzymów reprezentujących inne torry przemiany glikozy.

Dominującym elementem obrazu histochemicznego było odkładanie się obfitych złogów glikogenu w mózgu, obejmujące przede wszystkim formacje szare i występujące również chociaż tylko w niewielkim stopniu w istocie białej półkul. Zjawisku temu towarzyszył wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen, pojawiający się w charakterystycznych i powtarzalnych sekwencjach czasowych w stosunku do gromadzenia polisacharydu. Wzrost aktywności UDPG-G-transferazy wyprzedzał pojawienie się glikogenu i występował tylko w tych okolicach mózgu, które w późniejszych czasach charakteryzowały się obfitymi złogami polisacharydu. Sugeruje to, że złogi glikogenu stanowią wyraz wzmożonej syntezy, a nie zahamowanego rozpadu. Wzrost aktywności fosforylaz występował później niż pojawienie się ziarnistości glikogenu. Podobną sekwencję zmian obserwowano w różnych typach niedotlenienia i przyjmowano, że obecność złogów glikogenu może stanowić czynnik stymulujący układ fosforylaz (Nelson i wsp. 1968). Nasilenie aktywności tych enzymów, wskazujące na aktywizację procesów rozpadu glikogenu obserwowano u szczurów po wstrzyknięciu ouabainy od momentu pojawienia się nieprawidłowych złogów wielocukru aż do czasu zakończenia obserwacji.

Odkładanie się złogów glikogenu w tkance nerwowej i zmiany w aktywności enzymów biorących udział w jego syntezie i rozpadzie jest zjawiskiem występującym w przebiegu procesów patologicznych o różnej etiologii (Klatzo i wsp. 1970, Mossakowski 1970). Patomechanizm tego zjawiska jest zapewne różny i zależny od rodzaju czynnika uszkodzającego. Wskazują na to odrębności dynamiki procesu i jego lokalizacji. Pomimo nieswoistego charakteru zjawiska odkładanie się glikogenu w tkance nerwowej stanowi wykładnik zaburzeń metabolizmu glukozy i wydaje się być związane z upośledzeniem jej zużytkowania w przemianach śródkomórkowych. Na obecność zaburzeń metabolizmu śródkomórkowego, występujących w następstwie zadziałania ouabainy wskazują obserwacje dotyczące innych układów enzymatycznych, wyrażające się między innymi wczesnym, znacznym i długotrwałym spadkiem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej oraz równie wczesnym wzrostem aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu. Niestwierdzenie zmian w histochemicznie wykrywalnej aktywności dehydrogenazy mleczanowej, wobec znacznego zróżnicowania reaktywności jej izoenzymów (Latner, Skillen 1968) nie może stanowić jednoznacznego wykładnika nieobecności zaburzeń w torze glikolitycznym.

Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, stwierdzony w naszym materiale, może wskazywać na aktywizację aparatu lizosomalnego komórek, podczas gdy zmiany w aktywności fosfatazy zasadowej mogłyby sugerować zaburzenie przepuszczalności naczyń. Zagadnienie to wymaga jednak odrębnej serii badań przy użyciu innych technik badawczych.

Dotychczasowe obserwacje prowadzone zarówno przy pomocy mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego wskazują, że pierwotnie uszkodzonym elementem strukturalnym tkanki nerwowej w obręku ouabainowym są astrocyty (Cornog i wsp. 1968, Renkawek i wsp. 1970, Zelman 1972). Uszkodzenie komórek nerwowych ma charakter wtórny i występuje w ogniskach zwyrodnienia gąbczastego. Nasze spostrzeżenia histochemiczne, dotyczące przede wszystkim aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, sugerują, że zmiany aktywności enzymatycznej dotyczą zarówno gleju, jak i neurocytów. Mogą one być traktowane jako wykładnik zaburzeń metabolicznych, nie znajdujących odpowiednika histologicznego.

W naszym materiale doświadczalnym warto ponadto zwrócić uwagę na wybiórczą topografię zmian histochemicznych. Odkładanie się glikogenu, wyznaczające obszary zaburzeń metabolicznych stwierdzono przede wszystkim w korze półkul mózgowych i w zwojach hipokampa. Zaznaczała się przy tym wyraźna predylekcja zmian do struktur limbicznych, w obrębie których złogi wielocukru były najobfitsze. Nie stwierdzono natomiast odkładania się glikogenu w zwojach podstawy, wzgórz i podwzgórz i w obrębie pnia mózgowego. W strukturach tych obserwowano zwiększenie złogów glikogenu w tych obszarach, w których występuje on u zdrowych zwierząt. Obserwowany rozkład zmian histochemicznych nie daje się wytłumaczyć jedynie procesem dyfuzji glikozydu. Autoradiograficzne badania z ouabainą znakowaną trytem wykazały wprawdzie, że pole cytotoksycznego obręku pokrywa się z polem dyfuzji glikozydu (Towfighi, Gonatas 1972), jednak wyniki naszych obserwacji sugerują, że ouabaina wstrzyknięta domózgowo przedostaje się do płynu mózgowo-rdzeniowego, z którego przenika do mózgu. Przemawia za tym większe nasilenie zmian w zewnętrznych warstwach kory i niektórych płacikach mózdzku. Szerzy się ona również śródtkankowo z miejsca wstrzyknięcia powodując ogniskowo większe uszkodzenie istoty szarej. Przeprowadzone uprzednio badania wykazały, że ouabaina wstrzyknięta bezpośrednio do istoty białej nie powoduje w niej charakterystycznych zmian (Zelman 1972). Z obserwacji tych wynika, że nie miejsce iniekcji, a budowa cytoarchitektoniczna i właściwości metaboliczne poszczególnych struktur warunkują wybiórczą lokalizację uszkodzeń w encefalopatii ouabainowej.

W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach zwracano uwagę na występowanie po wstrzyknięciu ouabainy głębokich zaburzeń krąże-

niowo-oddechowych i napadów drgawkowych, pojawiających się seriami z charakterystycznym obrazem zmian elektroencefalograficznych (Bignami, Palladini 1966a, 1966b, Petsche, Seitelberger 1967). Zaburzenia te powodując dodatkowo niedotlenienie tkanki nerwowej mogą wpływać modyfikująco na ostateczny obraz zmian w mózgu. U większości obserwowanych przez nas zwierząt zaburzenia krążenia i oddechu trwały krótko i występowały w niewielkim nasileniu, a napady drgawkowe występowały tylko u pojedynczych zwierząt, można więc z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć działanie hipoksji w naszym doświadczeniu. Przypisać to należy stosunkowo niskiej dawce glikozydu, którą otrzymały szczury, praktycznie zresztą niższej od wyliczonej teoretycznie, ponieważ część roztworu wypływała na zewnątrz z krwią lub płynem mózgowo-rdzeniowym.

Z przeprowadzonych badań wynika, że jednorazowe wprowadzenie do mózgu szczura ouabainy w ilości nie prowadzącej do wystąpienia pełnego zespołu klinicznego i powodującego niewielkie i w większości odwracalne zmiany strukturalne w mózgu wywołuje rozległe i długotrwałe zaburzenie metabolizmu w tkance nerwowej.

WNIOSKI

1. Domózgowe wstrzyknięcie ouabainy powoduje u szczura zaburzenie przemiany glukozy w tkance nerwowej, co prowadzi do odkładania się glikogenu i wzrostu aktywności enzymów metabolizujących glikogen (UDPG-G-transferazy i fosforylaz). Stwierdzony u zwierząt doświadczalnych wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu, spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej wskazują na istnienie zaburzeń w przemianie śródkomórkowej w zakresie różnych torów metabolicznych.

2. Lokalizacja zmian histochemicznych wskazuje na zajęcie formacji szarych i szczególnie wrażliwość struktur limbicznych na działanie glikozydu. Topografia procesu nie da się wytłumaczyć jedynie procesem dyfuzji glikozydu. Jest ona prawdopodobnie zależna od budowy cytologicznej i właściwości metabolicznych tych formacji.

3. Zmiany histochemiczne nie pokrywają się z obszarem dostrzegalnych w mikroskopie świetlnym zmian strukturalnych. Są one bardziej rozległe i utrzymują się znacznie dłużej niż te ostatnie.

4. Zmiany histochemiczne w otoczeniu kanału wkłucia są identyczne w grupie zwierząt kontrolnych i doświadczalnych, co sugeruje, że wprowadzenie glikozydu nie wpływa modyfikująco na przebieg procesów reparacyjnych w tkance nerwowej.

И. В. Зельман, Г. Шуманьска

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРОФАНТИНОВОЙ
ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У КРЫС

Резюме

Строфантин, ингибитор мембранной АТФ-азы, введенный внутримозговым образом, вызывает у крысы цитотоксический отек и губчатые изменения в серых структурах. Ультраструктурные исследования „in vivo” и „in vitro” обнаружили существенное участие астроцитов в этом процессе, а также кратковременный и переходящий характер большинства наблюдаемых изменений. Предпринятые гистохимические исследования были направлены на познание нарушений метаболизма в строфантиновой энцефалопатии, что относилось бы к вопросу знания нарушений сопутствующих губчатой дегенерации нервной ткани.

Опыты проводились на 2-месячных крысах расы Вистар, которым внутримозговым образом вводили 0,01—0,02 мл раствора, содержащего 0,0025—0,004 мг строфантина. Контрольные животные получили такое же количество физиологической соли. За время от 2 часов до 14 дней животных убивали декапитацией и проводили реакции на гликоген, активность UDPG-трансферазы, фосфорилазы а, а + b и общей фосфорилазы, сукцилиндехидразы, лактатдегидразы и глюкозо-6-фосфатдегидразы, а также кислой и щелочной фосфатаз. Обнаружено скопление гликогена в астроцитах, опереженное во времени ростом активности энзимов метаболизирующих гликоген, рост активности глюкозо-6-фосфатной дегидрогеназы, снижение активности сукцилиндехидразы, а также увеличение активности кислой фосфатазы.

Обнаружение наличия отложений гликогена в районах, удаленных от места инъекции, а также удерживающихся в течение всего времени наблюдения нарушений активности большинства исследованных энзимов полагает существование широкого спектра изменений во внутриклеточном метаболизме. Находят они все отражение в снижении дыхательной активности митохондрий, в активации пентозового пути и вероятно — гликолитического, а также в увеличении активности лизосомов. Изменения активного транспорта вызывают нарушение энергетических процессов в нервной ткани и изменения ее метаболизма в степени не ведущей к прочным структурным повреждениям ткани.

I. B. Zelman, G. Szumańska

HISTOCHEMICAL CHANGES IN RATS BRAIN IN OUABAIN ENCEPHALOPATHY

Summary

Ouabain, inhibitor of membrane-bound ATPase injected intracerebrally produces in rats brain cytotoxic edema and spongy degeneration in grey structures. Electron microscopic studies *in vivo* and *in vitro* showed that astroglia play substantial role in the formation of pathological changes.

The purpose of our study was to investigate the character and dynamics of histochemical disturbances in ouabain encephalopathy and their relation to morphological changes. Experiments were carried out on two months old Wistar rats which were injected intracerebrally with 0.01—0.02 ml of ouabain solution containing 0.0025—0.004 mg of glycoside. Control rats were injected with 0.01—0.02 ml physiological

salt solution. In the period of 2 hours — 14 days the experimental and control animals were decapitated and histochemical studies for glycogen, UDPG-G-transferase, phosphorylases, SDH, LDH, G-6-PDH, acid and alkaline phosphatases activity were performed. The accumulation of glycogen deposits was accompanied and preceded by an increase of glycogen metabolizing enzymes. In the same structures a decrease of SDH activity, an increase of G-6-PDH activity and acid phosphatase activity was stated.

Glycogen deposits and enzymic disturbances were present in cerebral cortex and Ammon's horn of both hemispheres far from the injection place. The intensity of these disturbances was much more intense than could be expected from the histological picture.

It is difficult to explain the distribution of histochemical changes assuming only free diffusion of the ouabain. It seems likely that regional differences or distinct metabolism of the some structures may be responsible for their localization.

PIŚMIENNICTWO

1. Barka T., Anderson P. J.: *Histochemistry Theory, Practice and Bibliography*. Hoeber Med. Div. New York, London 1963.
2. Bignami A., Palladini G.: Subacute spongiform encephalopathy. An experimental study. Proc. Vth Congress Neuropathol. Excerpta Med. Found. Amsterdam 1966a.
3. Bignami A., Palladini G.: Experimentally produced cerebral status spongiosus and continuous pseudorhythmic electroencephalographic discharges with a membrane — ATPase inhibitor in the rat. *Nature (Lond.)*, 1966b, 209, 413—414.
4. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.* 1959, 34, 95—98.
5. Cornog L. J., Gonatas N. K., Feierman J. R.: Effects of intracerebral injection of ouabain on the fine structure of rat cerebral cortex. *Amer. J. Pathol.* 1967, 51, 573—590.
6. Farkas — Bargeton E., Olsson Y., Guth L., Klatzo I.: Glycogen reaction to cerebral stab wound during maturation of rat brain. *Acta neuropathol. (Berl.)* 1972, 22, 158—169.
7. Godlewski H. G.: Are active and inactive phosphorylases histochemically distinguishable? *J. Cytochem. Histochem.* 1963, 11, 108—112.
8. Gomori G.: w/g Pearse A. G. E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 2nd Ed. Little, Brown and Com. Boston, 1972.
9. Guth L., Watson P. K.: A correlated histochemical and quantitative study on cerebral glycogen after brain injury in the rat. *Exp. Neurol.* 1968, 22, 590—602.
10. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Piridine nucleotidelinked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 753—760.
11. Klatzo I., Farkas — Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. Proc. VIth Congress of Neuropathol. Masson, Paris, 1970.
12. Latner A. L., Skillen A. W.: *Isoenzymes in Biology and Medicine*. Academ. Press, 1968.
13. Mossakowski M. J.: Histochemistry of pathological glia. Proc. VIth Intern. Congress of Neuropathol. Masson, Paris, 1970.
14. Nelson S. R., Schulz D. W., Passoneau J., Lowry O. H.: Control of glycogen level in brain. *J. Neurochem.* 1968, 15, 1271—1279.
15. Novikoff A.: Electron transport enzymes biochemical and tetrazolium studies.

- Ist Intern. Congr. Histochem. Cytochem. Pergamon Press, Oxford 1963, 27, 500—516.
16. Petrescu A.: Histoenzymological aspects of reactive astroglia around a cerebral necrotic foci. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 365—371.
 17. Petsche H., Seitelberger F.: Hirnelektrische Tätigkeit und Rindenstruktur. *Wien. Klin. Wschr.* 1967, 79, 492—496.
 18. Renkawek K., Palladini G., Ieradi L. A.: Morphology of glia cultured in vitro in presence of ouabain. *Brain Res.* 1970, 18, 363—367.
 19. Robinson N.: Enzyme histochemical alterations following intracranial penetration of a microneedle. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 359—363.
 20. Shimizu N., Hamuro Y.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wound. *Nature (Lond.)* 1958, 181, 781—782.
 21. Takeuchi T., Kuriaki H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1955, 3, 153—160.
 22. Takeuchi T., Glenner G.: Histochemical demonstration of uridine diphosphate glucose — glycogen transferase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1961, 11, 304—316.
 23. Towfighi J., Gonatas N. K.: Effects of intracerebral ouabain injection in adult and developing rats. 48th Annual Meeting of American Assoc. of Neuropathologists. 1972.
 24. Zelman I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 423—433.

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

SPIS TREŚCI

✓ M. Wender, Z. Adamczewska: Obraz gangliozydów w uszkodzeniach demielinizacyjnych mózgu	357
L. Iwanowski, A. Jędrzejewska: Odczyn prymitywnych komórek siateczki w przypadku długoletniej cukrzycy	367
T. Zalewska: Badania nad wbudowywaniem ⁷⁵ -Se-selenometioniny do białek ośrodkowego układu nerwowego królika z uwzględnieniem lokalizacji wewnątrzkomórkowej	373
H. Kroh, J. Albrecht: Biosynteza białek w mózgu myszy w okresie utajenia i wzrostu nowotworu po implantacji metylcholantrenu	389
Z. Kraśnicka, K. Renkawek, B. Gajkowska: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz ultrastrukturalny komórek glejowych hodowanych in vitro	399
M. Ostenda: Ultrastruktura komórek glejowych napromienionych in vitro promieniami gamma (C ₀ ⁶⁰)	405
T. Majdecki, M. Marciniak, M. Beskid: Zmiany ultrastrukturalne w mózgach psów po podawaniu etanolu	411
✓ M. Wender, Z. Adamczewska, A. Wajgt: Lipidy mózgu w doświadczalnej encefalopatii cyjanowej	417
J. Karkos: Wpływ leków przeciwpadaczkowych na obraz morfologiczny mózdzku szczurów	427
✓ I. Zelman, G. Szumańska: Zmiany histochemiczne w mózgu szczurów w encefalopatii ouabainowej	441

СОДЕРЖАНИЕ

М. Вендер, З. Адамчевска: Картина ганглиозидов в демиелинизирующих повреждениях мозга	357
Л. Ивановски, А. Енджеевска: Реакция примитивных клеток сеточки в случае многолетнего диабета	367
Т. Залевска: Исследования инкорпорации ^{75}Se -селенметионина в белки центральной нервной системы кролика с учетом внутриклеточной локализации	373
Г. Крох, Я. Альбрехт: Биосинтез белков в мозге мышей после имплантации метилхолантрена в период латенции и роста опухоли	389
З. Красьницка, К. Ренкавек, Б. Гайковска: Влияние кратковременной аноксии на ультраструктурную картину глиальной ткани выращиваемой „ин витро”	399
М. Остенда: Ультраструктура глиальных клеток, облученных „ин витро” лучами гамма (Co^{60})	405
Т. Майдечки, М. Марциняк, М. Бескид: Ультраструктурные изменения в мозгах собак после подачи етанола	411
М. Вендер, З. Адамчевска, А. Вайгт: Липиды мозга в экспериментальной циановой энцефалопатии	417
Ю. Каркос: Влияние противэпилептических средств на морфологическую картину мозжечка крысы	427
И. Б. Зельман, Г. Шуманьска: Гистохимические исследования строфантинновой энцефалопатии у крыс	441

CONTENTS

M. Wender, Z. Adamczewska: The ganglioside pattern in demyelinating lesions of the brain	357
L. Iwanowski, A. Jędrzejewska: Reaction of the primitive cells of the reticulum in the case of diabetes mellitus of many years duration	367
T. Zalewska: ⁷⁵ Se-selenomethionine incorporation into the CNS proteins of rabbit with regard to its subcellular localization	373
H. Kroh, J. Albrecht: Protein biosynthesis in mouse brain in the period of latency and tumour growth after implantation of methylcholantrene	389
Z. Kraśnicka, K. Renkawek, B. Gajkowska: Effect of short-term anoxia on the ultrastructural picture of the glial tissue in vitro	399
M. Ostenda: Ultrastructure of glial cells irradiated in vitro with gamma rays (C ₀ ⁶⁰)	405
T. Majdecki, M. Marciniak, M. Beskid: Ultrastructural changes in the brains of dogs after ethanol intoxication	411
M. Wender, Z. Adamczewska, A. Wajgt: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy	417
J. Karkos: Effect of antiepileptic drugs on the morphological picture of rat cerebellum	427
I. Zelman, G. Szumańska: Histochemical changes in rats brain in ouabain encephalopathy	441

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:	
rocznie	— zł 100.—
półrocznie	— zł 50.—

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

Prenumeratory indywidualni w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty mogą opłacać prenumeratę w urzędach pocztowych i u listonoszy, lub dokonywać wpłat na konto PKO Nr 1-6-100020 — R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” CKPiW, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” BKWZ, Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

Sprzedaż egzemplarzy numerów zdezaktualizowanych, na uprzednie pisemne zamówienia, prowadzi R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” CKPiW, 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