

0922 6

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

P. 18-

NEUROPATOLOGIA POLSKA

~~No~~

TOM XIII

1975

ZESZ. 2

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XIII

Kwiecień-Czerwiec 1975

Nr 2

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), *Werner Jänisch* (Erfurt), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs), *William H. McMenemey* (London), *Jochen Quandt* (Bernburg-Saale), *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. 49-54-10

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

<http://rcin.org.pl>



EWA OSETOWSKA

CHOROBA ROSENTHALA CZY GLEJ ROSENTHALA? *

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki
Kierownik Ośrodka: prof. dr E. Osetowska

Rozpoznanie „choroba Rosenthala” zostało zaproponowane na Sympozjum Neuropatologii w Wiedniu, w roku 1972, w odniesieniu do przypadków stwardnienia rozsianego (S.M.), w których stwierdzono występowanie włókien Rosenthala (Seitelberger, 1972; Schlote, 1972, 1973). Razem z materiałem Schlote’go, demonstrowanym na tym Sympozjum, przypadków takich opisano do roku 1973 zaledwie 6 w całej literaturze światowej. „Choroba Rosenthala” nie jest więc rozpoznaniem oficjalnie przyjętym, lecz raczej dyskusyjną propozycją.

Momentem wywoławczym poniższej pracy jest siódma obserwacja S.M. z włóknami Rosenthala.

Sama kazuistyka służy jednak przede wszystkim jako uzasadnienie do zajęcia głosu w dyskusji na temat „choroby Rosenthala” oraz jako źródło oryginalnego materiału ilustracyjnego. Dlatego opis przypadku potraktowano bardzo skrótowo. Natomiast wydawało mi się celowe szersze ujęcie zagadnienia włókien Rosenthala wraz z przypomnieniem ich historii oraz próbą sformułowania poglądów własnych na zaklasyfikowanie tego tworu morfologicznego w szeregu form patologicznych gleju ektodermalnego. „Włókno” zostało opisane po raz pierwszy przez Rosenthala w roku 1898 w przypadku syringomyelii i guza glejowego rdzenia. Termin „włókno Rosenthala” (w.R.) został użyty dopiero w roku

* Praca niniejsza została w pierwszej wersji przygotowana do druku w roku 1972, podczas pobytu autora na stypendium Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Neuropathologische Abteilung (Direktor: Prof. Dr med. Wilhelm Krücke) we Frankfurt nad Menem. W końcu roku 1972 i w roku 1973 ukazało się kilka nowych publikacji dotyczących zagadnienia włókien Rosenthala. Doniesienia te skłoniły autora do ponownego rozpatrzenia posiadanego materiału i zmiany ujęcia tematu. Pracę w wersji obecnej przedstawiono na posiedzeniu Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich w dniu 26.I.1974 r., dedykując ją pamięci Adama Opalskiego i Andrzeja Głuszcza, w których dorobku naukowym włókna Rosenthala zajmują pozycję doniosłą, docenioną w literaturze międzynarodowej. Rok 1973 jako Rok Nauki Polskiej wydawał się uzasadnioną okazją dla przypomnienia prac obu polskich uczonych. Ze względów technicznych publikacja ukazuje się z niejakim opóźnieniem w stosunku do tej daty.

1920 przez Bielschowsky'ego i Ungera, którzy spostrzegli twór morfologiczny, odpowiadający opisowi Rosenthala w przypadku współistnienia syringomyelii i potworniaka rdzenia. Z dwoma wyjątkami, do których powrócę, w.R. obserwowano do roku 1957 głównie w syringomyelii oraz guzach pochodzenia glejowego. Wywodzono w.R. przede wszystkim ze zwyrodniałego spongioblastu a lokalizację wiązano z linią pośrodkową OUN („mid-line” Zülch, 1941, Hallervorden, 1952, Grcevic i Yates, 1957 — 115 przypadków guzów mózgu z w.R.).

Dopiero w roku 1958 Diezel i Rottmann zasygnalizowali po raz pierwszy obecność w.R. w okołokomorowej ziarninie zapalnej w przebiegu przewlekłego procesu ropnego. Im też przypada zasługa przypomnienia wspomnianych wyżej dwóch wyjątków, mianowicie prac Opalskiego z roku 1931 i 1934, jako naprawdę pierwszych opisów włókien Rosenthala w ziarninie zapalnej w otoczeniu układu komorowego. Opalski dał w obu swoich pracach: studium poświęconemu wągrzycy mózgu (1931) oraz w monografii, dotyczącej budowy ścian i otoczenia układu komorowego (1934) dokładny opis morfologiczny w.R. oraz próbę interpretacji ich pochodzenia. Warto dodać, że również w swojej ostatniej pracy oryginalnej (1959), niemal nieznannej w Polsce, Opalski przedstawia opisy i piękną dokumentację masowego występowania włókien Rosenthala w złożonym procesie pasożytniczo-nowotworowym. Według Diezel'a i Rottmann'a do roku 1958 istniało 18 publikacji zajmujących się istnieniem w.R. Od tego czasu zaobserwowano je w licznych stanach chorobowych, jak w bliźnie poroźmięknieniowej (Schiffer i wsp., 1964), w ogniskach demielinizacji w procesie odpowiadającym *glioblastosis multilocularis* Scherera (Głuszcz, 1964); w roku 1965 Ogasawara znalazł po raz pierwszy włókna Rosenthala w plakach S.M.; Tihen (1972) w „central pontine myelinolysis”; Hardmann i wsp. w astrocytach potworniaków jajnikowych (1972); Ule (1972) postulował ich istnienie w dystrofii neuro-axonalnej Seitelbergera, czemu sprzeciwił się Ametani (1973), opisując natomiast w.R. w dystrofii neuroaksonalnej przedstarczej w jądrach Golla. Należy jednak dodać, że jeszcze w latach ostatnich, w których repertuar stosowanych technik poszerzył się o badania histochemiczne, fazokontrast i mikroskop elektronowy, występowanie w.R. przypisywano przede wszystkim spongioblastom, zahamowanym w rozwoju i wyrodniającym wtórnie w przebiegu procesów patologicznych (Kalm, 1957; Schlote, 1966 A i B; Schlote, 1967; Vuia, 1973).

Związek w.R. z „mid-line” rozluźnił się zdecydowanie wraz z pierwszymi opisami choroby Alexandra (1949). Dziwną morfologię tej choroby skojarzył po raz pierwszy z masowym wielo-lokalizacyjnym występowaniem w.R. Hallervorden (1961 — on zresztą jest także autorem tak popularnego dziś rozpoznania „choroba Alexandra”). Również chorobie Alexandra zawdzięczamy zdecydowany zwrot w poglądach na pro-

dukcję w.R. nie (lub nie tylko) przez spongioblast, lecz przez progresywno-regresywne astrocyty (badania mikroskopowo-elektronowe: Schochet i wsp. (1968), Herndon i wsp. (1970), Ametani (1973), Colmant (1973)). Herndon i wsp. oraz Ametani opisują obecność w.R w astrocytach włóknistych; Colmant — w protoplazmatycznych. Włókna Rosenthala w powiększeniach M.E. przedstawiają się jako elektrono-optyczne zagęszczenia, różniące się ziarnistą strukturą od pęczków włókienek astrocytarnych. Początkowo umiejscowione są one w pobliżu jądra astrocytu, bez powiązania z innymi organellami komórkowymi, w późniejszych fazach rozwojowych przesuwają się ku obwodowi protoplazmy i ku wypustkom. Ametani zwraca uwagę, że brak mitochondriów w pobliżu w.R. pozwala na zróżnicowanie ich z „schollami” rozdętych aksonów, charakterystycznymi dla dystrofii neuro-axonalnej Seitelbergera.

Zatrzymując się jeszcze na chwilę przy poglądach na pochodzenie w.R. trzeba podkreślić niezależność i prekursyjne spostrzeżenia obu neuropatologów polskich. Mianowicie Opalski (1931), przyjmując w materiale własnym pochodzenie w.R. od spongioblastów, pisze: „Es ist daher möglich dass die Rosenthalschen Fasern, ungeachtet ihrer grossen Ähnlichkeit in differenten Prozessen, nicht die gleiche Abstammung in verschiedenen Fällen haben”. Natomiast Głuszczyk już w roku 1963 wysunął zdecydowaną koncepcję pochodzenia włókien Rosenthala od zmienionych wstecznie astrocytów. Ci z pomiędzy starszych członków Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, którzy przypominają sobie oryginalne doniesienie Głuszczyka, przedstawione w roku 1963 na posiedzeniu Stowarzyszenia (publikacja 1964), pamiętają także zapewne piękną sekwencję jego barwnych przezroczy, obrazujących stopniowe przekształcanie się wypustek astrocytarnych we włókna Rosenthala. Po tym celowo poszerzonym wstępie przechodzę do ilustracji kazuistycznej.

Przypadek (PAN 150/66): dotyczy kobiety 48-letniej z typowym wieletnim remisyjnym wywiadem S.M.*. Ostatni dwuletni rzut choroby przebiega bez wyraźniejszych okresów poprawy. Chora przebywa w Szpitalu dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Abramowicach. Ciężki zespół neurologiczny obejmuje niedowład spastyczny kończyn górnych, bezwład kończyn dolnych, oczopląs poziomy, zaburzenia zwieraczy w postaci nietrzymania moczu oraz liczne objawy drobniejsze, charakterystyczne dla S.M. Pod koniec życia odleżyny, wstępujące zakażenie dróg moczowych, wreszcie uogólniona posocznica. Badania laboratoryjne: w płynie mózgowo-rdzeniowym niewielka pleocytoza oraz wzmożenie odczynów białkowych. W moczu zmiany odpowiadające *pyelonephritis*. Wynik

* Skróć historii choroby i dane z sekcji ogólnej przygotowała dr med. Danuta Markiewicz. Opracowanie techniczne oraz opis i rozpoznanie neuropatologiczne — Zakład Neuropatologii PAN, obecnie materiał archiwalny Ośrodka Dośw. Neurologii Porównawczej CMDiK PAN.

badania sekcyjnego ogólnego potwierdza rozpoznanie kliniczne: *Sclerosis multiplex*; *Pyelo-nephritis*, *Decubiti* oraz objawy wyniszczenia ogólnego.

Badanie mikroskopowe przeprowadzono na dużych skrawkach półkulowych, oraz skrawkach przez pień i mózdzek. Technika parafinowa, barwienia: HE, fiolet krezyłu, wg van Gieson, Heidenhaina i Holzera w modyfikacji Kanzler-Arendta. Na skrawkach przez półkule mózgu, barwionych metodą Heidenhaina stwierdzono: drobne, ostro odgraniczone i raczej nieliczne ogniska demielinizacji. Większa plaka o typowej lokalizacji przy rogu komory bocznej, zlewająca się z mniej ostro „wysztancowanym” podłużnym ogniskiem w *corpus callosum* (ryc. 1a). Większe ognisko demielinizacji otacza róg tylny komory na poziomie styku ciemieniowo-skroniowo-potylicznego (ryc. 1b). Duże brzeżne, zlewające się ze sobą plaki na poziomie śródmózgowia i mostu. W istocie białej mózdzku duża plaka prawostronna, oddzielona pasmem lepiej zachowanej mieliny od *nucleus dentatus* oraz brzegu komorowego (ryc. 1c). Demielinizacja dookoła dna komory IV oraz brzeżne spłowienia w drogach piramidowych na poziomie opuszki.

Zaniki komórkowe w strukturach szarych odpowiadają dość znacznym zmianom naczyniowym miażdżycowym i stwardnieniowym. W obrębie półkulowych i pniowych ognisk demielinizacji uderza przeredzone utkanie podłoża i nieliczne jądra komórek glejowych. Wśród tych ostatnich widoczne są bądź to poszczególne komórki astrocytarne o jądrach hypertroficznym, bogato-chromatynowym, bądź skupiska kilku jąder astrocytarnych leżących obok siebie (ryc. 1 d, e). W płacie około rogu potylicznego komórki astrocytarne są liczniejsze, z zaznaczającym się przekształceniem protoplazmy w rozlane lub ziarniste przedłużenie przy utrzymanym jeszcze związku z resztkami jądra komórkowego (ryc. 1f). Dopiero w płacie demielinizacyjnej w mózdzku napotyka się profuzję wydłużonych, maczugowatych lub kroplistych zgrubień, częściowo już oderwanych, częściowo jeszcze związanych z resztkami przekształconej protoplazmy i jądra astrocytów. Twory te wybarwiają się jednolicie eozynofilnie w HE i czarno w barwieniu metodą Heidenhaina odpowiadają typowym włóknom Rosenthala (ryc. 2a, b, c, d). Na kilku skrawkach mrozikowych barwionych sudanem III stwierdza się obecność pojedynczych makrofagów sudanofilnych w przestrzeniach okołonaczyniowych. Brak jest jakichkolwiek nacieków zapalnych.

Jak zaznaczono we wstępie jest to siódmy przypadek S.M. z włóknami Rosenthala i podobnie jak sześć publikowanych lub demonstrowanych uprzednio (Ogasawara, 1965 — 1 przypadek; Herndon i wsp., 1970 — 2 przypadki; Schlote, 1972 — 3 przypadki) nie przedstawia, poza obecnością w.R., innych odrębności, które klinicznie lub morfologicznie podważałyby rozpoznanie stwardnienia rozsianego. We wszystkich tych przypadkach jako cechy wspólne występują: progresywne, wtórnie wyrod-

niejące astrocyty, mała ilość makrofagów ze skąpym materiałem sudanofilnym. Różne odmiany przerosłych astrocytów nie należą jednak do rzadkości w S.M., a skąpy rozpad sudanofilny i ubóstwo komórkowe plak jest raczej charakterystyczne dla S.M. z przebiegiem wieloletnim. Włókna Rosenthala opisane w tych przypadkach wykazują powiązanie lokalizacyjne bądź z jedną, bądź z kilkoma plakami (Herndon i wsp. — przypadek 5; Schlote — cały materiał; nasz przypadek: lokalizacja mózdkowa przeważająca, dodatkowo okołokomorowa i w plakach brzeżnych; Herndon i wsp. — przypadek 4: w.R. we wszystkich rozsianych ogniskach demielinizacji). Analizując tę kazuistykę odnosi się wrażenie, że obecność w.R. nie ma aż tak zasadniczego znaczenia, ażeby materiał obejmujący siedem przypadków podnosić do rangi wyodrębnionej jednostki pod nazwą choroby Rosenthala. Z drugiej strony trudno jest nie zauważyć, że wśród ogromnej liczby weryfikacji mikroskopowych S.M., które szczególnie w opracowaniach dawniejszych były przedmiotem uwagi największych klasyków neuropatologii tkankowej, tylko w kilku przypadkach stwierdzono obecność włókien Rosenthala. Toteż narzucałoby się tu raczej hipotetyczne skojarzenie z inną chorobą, dla której w.R. są cechą charakterystyczną, mianowicie z chorobą Alexandra.

Poglądy na chorobę Alexandra uległy w świetle ostatnich doniesień dość istotnym uzupełnieniom. Według doniesień wcześniejszych była to choroba właściwa dla wieku niemowlęcego, cechująca się klinicznie zahamowaniem rozwoju i często spotykanym powiększeniem wymiaru czaszki. Neuropatologicznie traktowano ją jako leukodystrofię niesudanofilną, przy czym nieokreślony dotychczas charakter rozpadu mieliny, względnie dysmielinizacja, miały być odpowiedzialne za zwyrodnienie astrocytów z masowym występowaniem w.R. Liczni autorzy wiązali oba procesy z upośledzeniem funkcji mezogleju (Alexander, 1949; Stevenson, Vogel, 1952; Wohlwill i wsp., 1959), a już co najmniej z jego uderzającym zubożeniem (Crome, 1954; Vogel, Hallervorden, 1961). Ale kazuistyka lat ostatnich przyniosła po pierwsze obserwacje, dotyczące występowania choroby Alexandra u dorosłych (Seil, 1968 — 32 lata, Herndon i wsp., 1970 — 22 lata; Klein, 1970 — 37 lat), po drugie współistnienie charakterystycznego obrazu w.R. z leukodystrofią sudanofilną (Sherwin i Berthrong, 1970; Colmant, 1973). Co więcej trzeba podkreślić, że u chorych w trzeciej i czwartej dekadzie wieku ubytki mieliny miały charakter nieciągły, ogniskowy. Może warto także przypomnieć, że Wohlwill i wsp. (1959) obok rozległej demielinizacji w *centrum semiovale*, z typowymi skupieniami w.R., znaleźli w swoim przypadku na poziomie kompleksu jąder przedsiolkowych dwa ogniska morfologicznie podobne do plak S.M. Powyższej hipotezy nie da się rozstrzygnąć w dyskusji akademickiej. Trzeba raczej czekać na potwierdzenia lub zaprzeczenia na podstawie znacznie liczniejszej kazuistyki, zarówno typowych przypadków

choroby Alexandra (Colmant, 1973 — naliczył zaledwie 17 doniesień), jak i tak odosobnionych dotychczas przypadków „S.M. z włóknami Rosenthala”.

Istnieje zresztą jeszcze jedna możliwość interpretacji pojawiania się w.R. niesprzeczna zresztą z hipotezą przedstawioną powyżej. W pewnej analogii z poglądami Głuszcza, Herndon i wsp. wysuwają przypuszczenie, że zwyrodnienie astrocytu, pociągające za sobą wytwarzanie w.R. uwarunkowane jest wrodzoną (genetyczną — ?) predylekcją astrogleju. Ta „skaza” może dotyczyć bardzo licznej populacji astrocytów, może też przejawiać swój wpływ w grupach lokalizacyjnie wybranych, obdarzonych dodatkowymi właściwościami z tytułu specjalnych funkcji, jak astrocyty podoponowe, czy okołokomorowe. Utajone właściwości tych komórek ujawniają się pod wpływem dodatkowych bodźców patologicznych (demielinizacja, zapalenia, procesy naczyniowe, rozplem nowotworowy). Nierównomierne „uzdolnienia” wybranych grup astrocytarnych przypominają choroby metaboliczne, koncentrujące się w neuronach i tam również napotyka się przesunięcia lokalizacyjne i wybiórcze nasilenia uszkodzeń w pewnych grupach neuronalnych. Wreszcie warto jest wyeksponować nie podkreślone dotychczas tak wyraźnie w literaturze „wszędobylstwo” włókien Rosenthala. Tabela 1 zestawia procesy i bardziej reprezentatywne publikacje dotyczące obecności w.R. w najrozmaitszych stanach chorobowych OUN, po „normę” (jeżeli taka istnieje) włącznie.

Przedstawiona tabela wymaga jednego komentarza uzupełniającego niezależnie od rozrzutu diagnostycznego wyliczonych stanów chorobowych morfologia i histochemia włókien Rosenthala były zawsze jednako- kowe (Diezel i Rottmann, 1958; Kalm, 1957; Scarlato, Müller, 1958; Fotakis, 1961; Friede, 1964; Schiffer i wsp., 1964, Schlote, 1964, 1966 A, B, 1967; Ogasawara, 1965, 1966; Peiffer, 1968). Przesunięcia od współskładowej lipidowej do składu wyłącznie białkowego obserwowano niekiedy w jednym i tym samym przypadku w zależności od stadium wykształcenia w.R. Podsumowanie powyższych rozważań daje się zamknąć w kilku punktach:

1. „Włókno” Rosenthala nie jest tak rzadkim zjawiskiem morfologicznym, ażeby kojarzyć jego występowanie tylko z określonymi jednostkami chorobowymi. Lepsza znajomość morfologii w.R. pozwoli zapewne potwierdzić ich obecność w szeregu badań rutynowych, w których po prostu nie identyfikowało się ich obecności.

2. Niezależnie od słuszności hipotezy Głuszcza („Dysontogenetic deficit”) i analogicznych postulatów hipotetycznych Herndona i wsp. musi istnieć w patologii różnych procesów mózgowych dość rozpowszechniony błąd metaboliczny, wyzwalający ostatecznie przekształcenie zwyrodnieniowe astrocytów.

Tabela 1

Procesy chorobowe z obecnością w.R.	Nazwiska autorów ważniejszych publikacji
GUZY OUN	
Astrocytoma	
Spongioblastoma	Züleń 1941; Hallervorden 1952;
Ependymoma	Greevic, Yates 1957; Krüecke (mat. nie publ.) i inni
Hemangioma cyst.	
Craniopharyngioma	
Neurofibromatosis	
SYRINGOMYELIA	Rosenthal 1898; Bielschowsky, Ungern 1920
GUZY POZA OUN	
Teratoma ovarii	Hardman i wsp. 1972
PROCESY ZAPALNE	
Cysticercosis	Opalski 1931, 1934
Encephalitis purulenta	Diezel i Rottmann 1958
PROCESY NACZYNIOPACHODNE	
Organizacja ognisk rozmiękania	Schiffer i wsp. 1964
Central pontine myelinolysis	Tihen 1972
LEUKODYSTROFIE I DEMIELINIZACJE ROZSIANE	
Choroba Alexandra	Alexander 1949
Glioblastosis diffusa multilocularis (Scherer)	Głuszcz 1965
Sclerosis multiplex(?)	Ogasawara 1965
DYSTROPHIA NEUROAKSONALNA	
Postać Seitelberga (?)	Ule 1972
Postać starca	Ametani 1973
MÓZG BEZ CHARAKTERYSTYCZNYCH ZMIAN PATOLOG.	Mastri i Sung 1972

3. Wydaje się uzasadnione zastąpienie niejednokrotnie już kwestionowanej nazwy „włókno” Rosenthala przez nazwę „glej Rosenthala” choćby przez przykładowe analogie do „gleju Alzheimer’a I i II”, czy „komórki glejowej Opalskiego” itp. postaci patologicznych ektogleju. Pojawienie się tych postaci jest mniej patognomiczne niż przypuszczali ich pierwsi odkrywcy i prawdopodobnie również wymagające dla właściwych przekształceń morfologicznych i predyspozycji osobniczych i momentu wywoławczego, wspólnego dla szerszego kręgu patologii mózgowej.

4. Wyodrębnienie przypadków S.M. z glejem Rosenthala w osobną jednostkę chorobową pod nazwą „choroba Rosenthala” nie ma dotych-

czas dostatecznej motywacji klinicznej ani morfologicznej. Przypadki takie kojarzą się raczej z postaciami choroby Alexandra obserwowanej u dorosłych.

Э. Осетовска

„BOLEZŃ ROZENTALEJA” ILI „GLIA ROZENTALEJA”?

Резюме

Согласно автору, отправной точкой к дискуссии о диагнозе „болезни Розенталя” является седьмой случай Рассеянного Склероза с волокнами Розенталя, описанный в литературе. Случай касается 48-летней женщины. Клиническое течение и морфологическая картина типичны для S.M. Волокна Розенталя (В.Р.) выступают главным образом в мозжечковом очаге демиелинизации, а также немногочисленные и не полностью образовавшиеся в очаге вблизи затылочного угла желудочка. По мнению автора присутствие Волокон Розенталя в одной или даже в нескольких очагах S.M. не является достаточным основанием для выделения группы из 7 случаев в отдельную „болезнь Розенталя”. Однако, факт, что в столь многочисленных наблюдениях S.M. так редко можно видеть В.Р., ассоциируется скорее со случаями болезни Александра, описанной у взрослых людей, тем более, что морфология этих случаев характеризуется, в частности, присутствием прерывных очагов и иногда также суданофильным распадом. Сопоставляя процессы, в которых наблюдалось наличие В.Р., автор указывает на факт неспецифичности этого явления. По-видимому, есть основание, чтобы название „волокна Розенталя” (подвергнутое сомнению уже во многих работах как морфологически несоответствующее) заменить понятием „глия Розенталя” по аналогии с „глией Альцхаймера I и II”, или „глиальные клетки Опальского” и т.п. Разнообразие условий проявления глии Розенталя указывает на существование скорее довольно частого, общего для разных процессов метаболического стимула, являющегося сигнальным моментом для преобразования предрасположенных астроцитов (или споглиобластов).

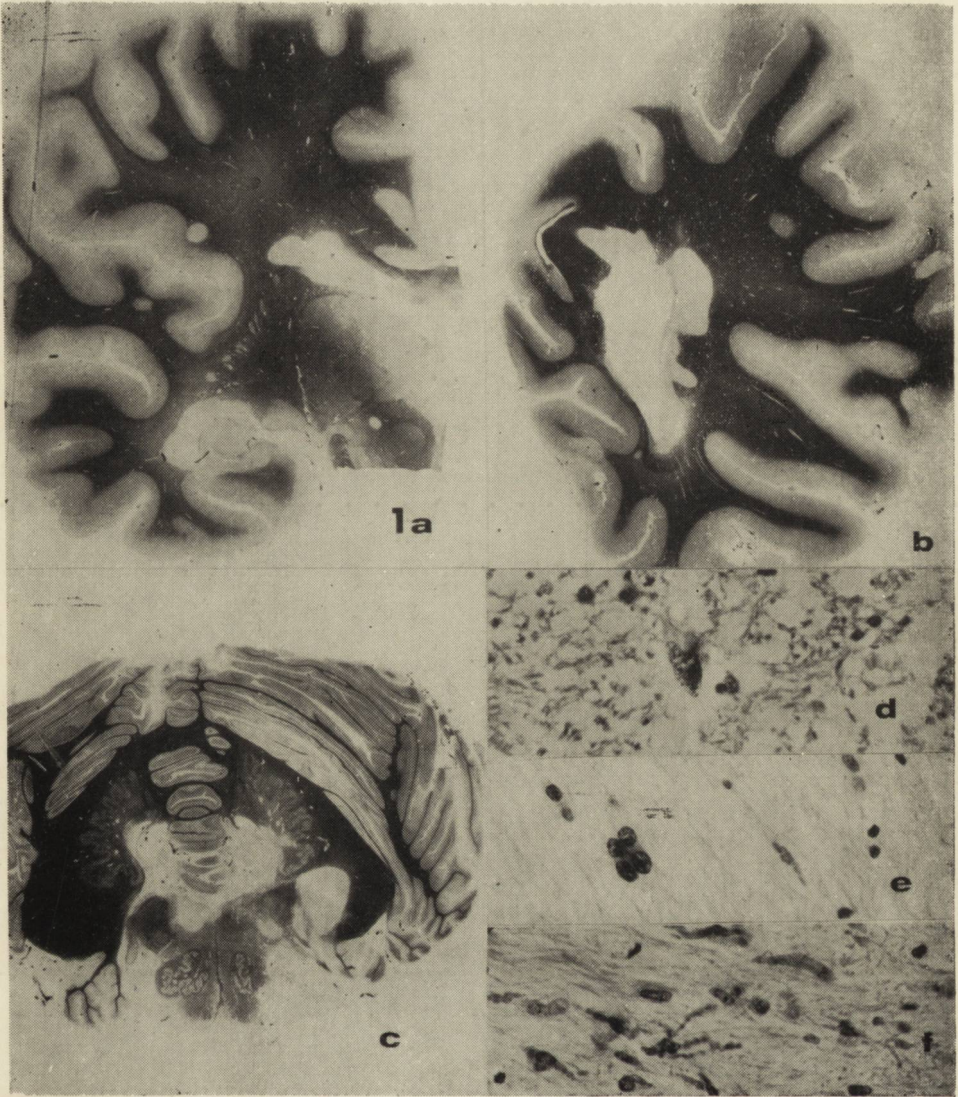
Автор посвящает эту работу памяти польских невропатологов Ддама Опальского и Анджея Глушча, которые в своих научных трудах посвятили особое место глии (волокнам) Розенталя.

E. Osetowska

„ROSENTHAL DISEASE” OR „ROSENTHAL GLIA”?

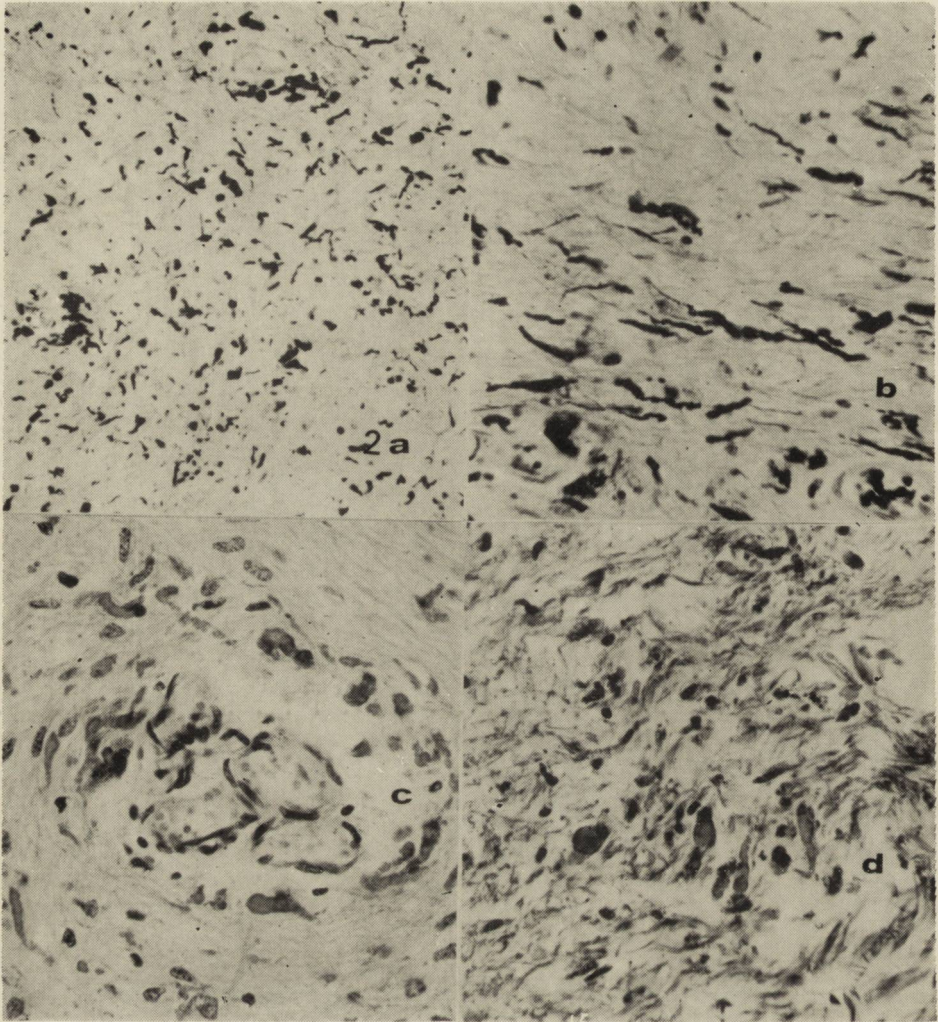
Summary

As a starting point to the discussion on the diagnosis of „Rosenthal disease” (Vienna 1972), the author presents the seventh case in the literature of multiple sclerosis with Rosenthal fibres. The case concerns a 48-years woman with the clinical course and morphological picture typical of multiple sclerosis (m.s.). Rosenthal fibres (R.F.) appeared mostly, in the cerebellar plaque (Figs. 1c and 2a, b, c, d) and some of them, not fully developed in a plaque in the vicinity of occipital horn (Figs. 1b and f). In the author’s opinion, the appearance of R.F. in one or even several m.s. plaques does not provide sufficient ground to classify a group of 7 cases as a separate „Rosenthal disease” unit. The fact of a very rare occurrence



Ryc. 1 a, b, c. Typy plak demielinizacyjnych obserwowanych w przypadku. Włókna Rosenthala występowały masowo w placie mózdkowej, pojedynczo w postaciach poronnych w placie okołokomorowej (b). Heidenhain. Skrawki wielkości naturalnej. d, e. Progresywne odmiany jąder glejowych spotykanych w ogniskach demielinizacji. Fiolet kryzylu. Pow. 400 \times . f. Pojedyncze włókna Rosenthala w placie okołokomorowej. H-E. Pow. 400 \times .

Fig. 1 a, b, c. Demyelination plaques observed in the case. Numerous Rosenthal fibres in cerebellar and periventricular plaques. Heidenhain meth. Nat. size. d, e. Progressive glial nuclei in demyelinated foci. Cresyl violet. $\times 400$. f. Single Rosenthal fibres in the periventricular plaque. H-E. $\times 400$.



Ryc. 2. Włókna Rosenthala w placie mózdkowej. *a.* Widok ogólny. Heidenhain. Pow. $150\times$. *b, c, d.* Różne odmiany morfologiczne włókien Rosenthala — postaci wydłużone „włókno-podobne” leżące śródkankowo i kropliste, ugrupowane przeważnie okołonaczyniowo. Heidenhain. (*b.*) H-E. (*c, d.*) Pow. $400\times$.

Fig. 2. Rosenthal fibres in cerebellar plaque. *a.* General view. Heidenhain meth. $\times 150$. *b, c, d.* Different forms of Rosenthal fibres — elongated in the cerebral tissue and droplike located usually perivascularly. Heidenhain meth. *b.* H-E. *c, d.* $\times 400$.

ce of R.F. within the group of m.s. cases, however, would rather suggest an association with the cases of Alexander's disease described in adults (Seil, 1968; Herndon et al., 1970; Klein, 1970), in particular because the morphology of these cases is characterized a.o. by the presence of discontinuous foci and sometimes also by sudanophilic degradation.

Compiling the list of processes in which R.F. could be observed (table 1) the author points out the unspecificity of this phenomenon. It seems justified to replace the designation Rosenthal fibres (questioned in a number of works as morphologically inadequate) by the notion „Rosenthal glia” by analogy with „Alzheimer glia I and II” or „Opalski glial cells” etc. The diversity of conditions in which Rosenthal glia becomes manifest, rather suggests the existence of a frequent metabolic stimulus, which is common to a number of processes and provokes the transformation of predisposed astrocytes (or sponglioblasts).

The author dedicates this paper to the memory of two polish neuropathologists, Adam Opalski and Andrzej Głuszczyk, who in their scientific work devoted a particular attention to Rosenthal glia (fibres).

PIŚMIENNICTWO

1. Alexander W. S.: Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant. *Brain*, 1949, 72, 373—381.
2. Ametani T.: Rosenthalsche Fasern im Gollischen Kern. *Acta neuropath.*, 1973, 24, 90—91.
3. Bielschowsky M., Ungern E.: Syringomyelie mit Teratom und extramedullärer Blastombildung. *J. Psychol. Neurol.* 1920, 25, 173—218.
4. Colmant H. J.: Alexander'sche Dystrophie mit begleitender sudanophiler Leukodystrophie und subakuter nekrotisierender Encephalopathie (Leigh). Eine Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 127—141.
5. Crome L.: Megalencephaly associated with hyalin pan-neuropathy. *Brain*, 1973, 76, 215—228.
6. Diezel P. B., Rottmann E.: Histochemische Untersuchungen an „Rosenthalschen Fasern” in Ependymgranulationen und in Sponglioblastom. *Dtsch. Ztschr. Nervenheilk.* 1958, 177, 222—234.
7. Fotakis N. S.: Zur Histochemie der Rosenthalschen Fasern. *Dtsch. Ztschr. Nervenheilk.* 1961, 182, 445—454.
8. Friede R. L.: Alexander's Disease. *Arch. Neurol.* 1964, 11, 414—422.
9. Głuszczyk A.: Disseminate Cerebral Gliomatosis with Fibrillary Degeneration of the Glia and with Rosenthal Fibers. *Acta neuropath.* 1964, 4, 212—217.
10. Grcevic N., Yates P. O.: Rosenthal Fibers in Tumours of the central nervous System. *J. Path. Bacteriol.* 1957, 73, 467—472.
11. Hallervorden J.: Bemerkungen zur zentralen Neurofibromatose und tuberöse Sklerose. *Dtsch. Ztschr. Nervenheilk.* 1952, 169, 308—321.
12. Hallervorden J.: Die Markscheidenentwicklung und die Rosenthalschen Fasern. *Dtsch. Ztschr. Nervenheilk.* 1961, 181, 547—580.
13. Hardman J. M., Schochet S. S. Jr., Libcke J. H., Earle K. M.: Rosenthal Fibers in ovarian teratomas. *Arch. Path.* 1972, 93, 447—452.
14. Herndon R. M., Rubinstein L. J., Freeman J. M., Mathieson G.: Light and electron microscopic observation on Rosenthal Fibers in Alexander's Disease and in Multiple Sclerosis. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1970, 29, 524—551.

15. Kaln H.: Rosenthalsche Fasern und Gliafasern in Phasenkontrast. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* 1957, 97, 56—58.
16. Klein H.: Alexandersche Krankheit bei einer Erwachsenen. *Zbl. ges. Neurol. Psych.* 1970, 197, 338.
17. Mastri A. R., Sung J. H.: Widespread Rosenthal Fiber Formation in Brain Stem and Spinal Cord without other pathological Changes. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1972, 31, 189.
18. Ogasawara N.: Zur Histochemie der Rosenthalschen Fasern. *Wien. Ztschr. Nervenheilk.* 1966, 23, 185—196.
19. Ogasawara N.: Multiple Sklerose mit Rosenthalschen Fasern. *Acta neuropath.* 1965, 5, 61—68.
20. Opalski A.: Histopathologische Veränderungen des zentralen Nervensystem bei Zystizerkose und ihre Pathogenese. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 1931, 277—341.
21. Opalski A.: Studien zur allgemeinen Histopathologie der Ventrikelwände. *Ztschr. ges. Neurol. Psych.* 1934, 150, 42—74.
22. Opalski A.: Influence de la cysticerose sur la formation de tumeurs cérébrales. *Ann. Anat. Path.* 1959, 4, 43—62.
23. Peiffer J.: Alexander's Disease — really a Leucodystrophy? in „Cerebral Lipidoses II” Ed-s.: Nunes-Vincente A., Dustin P., Lowenthal A. Bruxelles, Presses Académiques Européennes, 1968, 191—198.
24. Rosenthal W.: Über eine eigentümliche mit Syringomyelie komplizierte Geschwulst des Rückenmarks. *Beitr. path. Anat.* 1898, 23, 111—143.
25. Scarlato G., Müller W.: Promi dati istochimici sulle fibre di Rosenthal negli spongioblastomi. *Riv. Istochimica (Milano)* 1958, 4, 33—44.
26. Schiffer D., Fabiani A., Vesco C.: Histochemical Study of Rosenthal Fibres with observations about some enzym activities. *Psych. Neurol. (basel)* 1964, 147, 68—80.
27. Schlote W.: Zur Ultrastruktur der sog. Rosenthalschen Fasern im Zentralnervensystem. *Naturwissenschaften.* 1964, 51, 165—166.
28. Schlote W.: Rosenthalschen „Fasern” und Spongioblasten im Zentralnervensystem: Vorkommen in ventrikelfernen Reparationsglionen. *Beitr. path. Anat. all. Path.* 1966 (A), 133, 225—248.
29. Schlote W.: Rosenthalsche „Fasern” und Spongioblasten in Zentralnervensystem. Elektronmikroskopische Untersuchungen. Bedeutung der Rosenthalschen „Fasern”. *Beitr. path. Anat. allg. Path.* 1966 (B), 133, 461—480.
30. Schlote W.: Beitrag zum Vorkommen und Veränderungen an intracytoplasmatischen Filamenten in Gliomen. *Acta neuropat.* 1967, 8, 108—112.
31. Schlote W.: Demonstracja 3 przypadków Sclerosis Multiplex z „włóknami” Rosenthala. *Symposium Neuropatologiczne. Wiedeń* 1972.
32. Schlote W.: Konsultacja osobista. *Wiedeń* 1973.
33. Schochet S. S., Lampert P. W., Earle K. M.: Alexander's Disease. A case Report with Electron Microscopic Observation. *Neurology*, 1968, 18, 543—549.
34. Seil F. J., Schochet S. S., Earle K. M.: Alexander's Disease in an Adult. *Arch. Neurol.* 1968, 19, 494—502.
35. Seitelberger F.: Korespondencja i konsultacja osobista 1972/1973.
36. Shervin M., Bertrong M.: A case of Alexander's Disease with sudanophilic Leucodystrophy. *Arch. Path.* 1970, 89, 321—328.
37. Stevenson L. D., Vogel F. S.: A case of macrocephaly associated with feeble mindedness and encephalopathy with peculiar deposits throughout the brain and spinal cord. *Ciencia (Mexico)*, 1952, 12, 71—74.

38. Tihen W.: Central pontine myelinolysis and Rosenthal fibers of the brain stem. *Neurology*, 1972, 22, 710—716.
39. Ule G.: Progressive neurogene Muskelatrophie bei neuroaxonaler Dystrophie mit Rosenthalschen Fasern. *Acta neuropath.* 1972, 21, 332—339.
40. Vogel F. S., Hallervorden J.: Leukodystrophy with diffuse Rosenthal Fiber Formation. *Acta neuropath.* 1962, 2, 126—143.
41. Vuia O.: Dysplastic Gliosis (Spongioblastosis) and the Rosenthal Fibers. *Virchow's Archiv. Abt. A. Path. Anat.* 1973, 361, 1—10.
42. Wohlwill F. J., Bernstein J., Yakovlev P. J.: Dysmyelinogenic Leukodystrophy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1959, 18, 359—383.
43. Zülch K. J.: Über das sog. Kleinhirnstrocytom. *Virchows Arch.* 1941, 307, 222—252.

Adres autorki: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej, CMDiK PAN, ul. Warszawska 126, 05-300 Mińsk Mazowiecki.

M. B. KOZIK

HISTOENZYMIC CHANGES IN THE BRAIN IN A CASE OF CARDIAC ARREST

Autonomous Division of Pathology of the Nervous System and Sensory Organs,
Medical Academy, Poznań
Head: Doc. Dr. M. Kozik

The technical progress in medical sciences, particularly in the field of reanimation creates a series of new problems for the human pathologists and in that also for neuropathologists.

Undoubtedly new in the neuropathological approach are studies concerned with the pathogenetic mechanisms of changes occurring in the brain following resuscitation of the circulation. The clinical and histopathological casuistics of these cases in already quite numerous (Mandel, Berry 1959; Adams et al., 1966; Steegmann, 1969), however, the molecular background of pathological processes induced in the brain by cardiac arrest is still badly understood.

Having this in mind, we have undertaken our study on the histoenzymic reactions of the brain in a case of cardiac arrest.

MATERIAL AND METHODS

Case history. An appendectomy, performed under general anaesthesia on a female aged 18, finished up by a sudden cardiac arrest. Following 6 minutes of cardiac massage, the heart action was restored, but the patient demonstrated severe disturbances of consciousness. She was unable to answer questions, could not carry out commands and had deglutition difficulties. She was only able to sweep around with her eyes and reacted rather vividly to pain stimuli. On neurological examination, there were missing the corneal, pharyngeal, oesophageal and palatal reflexes, whereas the profound reflexes from the upper and lower extremities were exaggerated. The muscular tonus was spatically increased causing the upraised extremities to fall down inertly. The Babinsky reflex was bilaterally positive.

The patient remained in such a state for about one month and then started to develop subfebrilic states, decubitus and finally, 6 weeks after the cardiac arrest, she died of bilateral bronchopneumonia. On autopsy apart from passive hyperemia of all organs and apart from symptoms of bronchopneumonia — no other pathological findings were revealed.

Brain autopsy was performed 2 hours following the patient's death. Specimens from all cerebral lobes, from the basal nuclei, from the cerebellum and from the oblongate medulla were secured for histopathological and histochemical investigation. For routine histology, the material was fixed in 10% neutral formaline and embedded in paraffine, and the obtained slices were stained with H + E, with the methods of Nissl, Kanzler, Bodian, Klüver-Barrera and van Gieson.

The material secured for histoenzymic assays instead, was fixed in Baker's solution for 16 hours at 4°C, frozen sections were cut therefrom and the respective enzyme activities were estimated histochemically:

Carboxylic ester hydrolase (nonspecific esterases — NsE) — E.C. 3.1.1.1. — according to the method of Nachlas and Seligmann (1949).

Acetylcholine — acetyl-hydrolase (acetylcholinesterase — AChE) — E. C. 3.1.1.7. — according to the method of Koelle, as modified by Gerbtzoff (1953).

Acylcholine — acyl-hydrolase (nonspecific cholinesterase — ChE) — E.C. 3.1.1.8. — according to the method of Koelle, as modified by Gerbtzoff (1953).

Thiaminephosphate pyrophosphorylase (Thiamine pyrophosphorylase — TPPase) — E.C. 2.5.1.3. — according to the method of Novikoff and Goldfischer (1961).

Ortophosphate-monoester-phosphohydrolase (alkaline phosphatase — alkP) — E.C. 3.1.3.1. — according to the method of Gomori (1953).

Orthophosphate-monoester-phosphohydrolase (acid phosphatase — acP) — E.C. 3.1.3.2. — according to the method of Gomori (1953).

Adenosinetriphosphate phosphohydrolase (Adenosinetriphosphatase — ATPase) — E.C. 3.6.1.3. — according to the method of Wachstein and Meisel (1957).

RESULTS

The brain section revealed a distinct diminution of both hemispheres with considerable narrowing of the cerebral gyri and widening of the interposing sulci. The lateral ventriculi as well as the IIIrd cerebral ventricle were enlarged.

Microscopic investigation revealed a generalized, rather severe loss of neurocytes both in the cerebral cortex and in the basal nuclei. The preparations, when stained with the method of Nissl, demonstrated most

frequently neuronal shrinkage, cytoplasmic vacuolization and hypochromicity of both the cytoplasm and cell nuclei. At the same time, the neuroglia appeared markedly proliferated, except for the microglia which was only negligibly changed.

The cerebellar cortex exhibited considerable loss of Purkinje cells, the granular layer looked considerably thinned out, whereas the Bergmann's glial cells were proliferated (Fig. 1).

The most severe changes were located in frontal lobes, gyrus hippocampi, Ammon's horn, striatum, globus pallidus and in the cerebellar cortex. The remaining structures were less severely affected, though distinct neurocyte losses, as well as glial proliferation was evident in all examined brain regions.

When stained with the method of Klüver-Barrera, i.e. with the myelin stain — there was no evident damage in the myelin sheaths to be seen in spite of the considerable glial proliferation within the cerebral white matter.

It is interesting to note that in the phylogenetically older cerebellar structures, i.e. in the flocculus, lobuli centrales, lobuli quadrangulares (Fig. 1) — the changes were expressed much stronger than in the phylogenetically younger ones, e.g. the lobuli semilunares superior and inferior, lobulus gracilis, and lobulus biventer (Fig. 2). In neither of the preparations were there ischemic or homogenizing cell changes to be seen.

Nonspecific esterases (NsE)

The shrunken neurocytes and pericytes of the cerebral cortex showed distinct NsE activity (Fig. 3). Occasionally, considerable enzyme activity was seen also in the microglia of the molecular layer. The hypothalamic neurocytes as well as the subependymal glial cells instead demonstrated a strong enzyme activity, whereas in the white matter and in the cerebellum, it was only the pericytes which were reactive with respect to NsE.

Acetylcholinesterase (AChE)

The cerebral cortex of the frontal and occipital lobes was unreactive with respect to AChE. Occasionally in the frontal lobes there was seen a slight diffusive enzyme reaction within the axonal processes. Sometimes the white matter oligodendroglia was weakly stained for AChE. The neuropil and neurocytes of the striatum, the thalamus and hypothalamus instead demonstrated strong enzymic activity. In the cerebellum, there were only the molecular and granular layers that showed a weak diffusive staining for AChE.

Nonspecific cholinesterase (ChE)

The neurocytes and the neuroglial cells of the cerebral cortex were not reactive with respect to ChE. In the basal nuclei, there was only the neuropil and blood vessel walls that showed a weak diffusive staining for that enzyme. The cerebellum was not reactive as well.

Thiamine pyrophosphatase (TPPase)

The Golgi structures of the still preserved cortical neurocytes exhibited a faint enzyme activity. In contrast to this, the protoplasmatic astrocytes as well as vascular walls were appreciably stained. However, the astrocytes and oligodendrocytes of the white matter displayed significantly higher TPPase activity than the cortical cells (Fig. 4). The enzyme activity was particularly strong in the hyperplastic forms of the astroglia. At sites, a weak TPPase activity was present also in axonal processes. A strong activity was seen also in the proliferating glia of basal nuclei, whereas neurocytes of these nuclei were weakly reactive. In the cerebellum, there was only the white matter neuroglia which demonstrated strong TPPase activity. The neurocytes, as well as glial cells of the cerebellar cortex were unreactive.

Alkaline phosphatase (alkP)

A significant alkaline phosphatase activity was present only in blood vessel walls of the grey as well as white cerebral matter. In addition to that, a slight diffusive staining was demonstrable in the myelin she-

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Lobulus quadrangularis. Massive loss of Purkinje cells, the granular layer looking attenuated with the number of Bergmann's glial cells substantially increased. Nissl's stain. $\times 30$.

Ryc. 1. Lobulus quadrangularis. Bardzo duży ubytek komórek Purkinjego, przeredzenie warstwy ziarnistej i rozrost gleju Bergmanna. Met. Nissla. Pow. $80 \times$.

Fig. 2. Lobulus biventer. Shrunken Purkinje cells, proliferating Bergmann's glial cells and rarefied granular layer. Nissl's stain. $\times 180$.

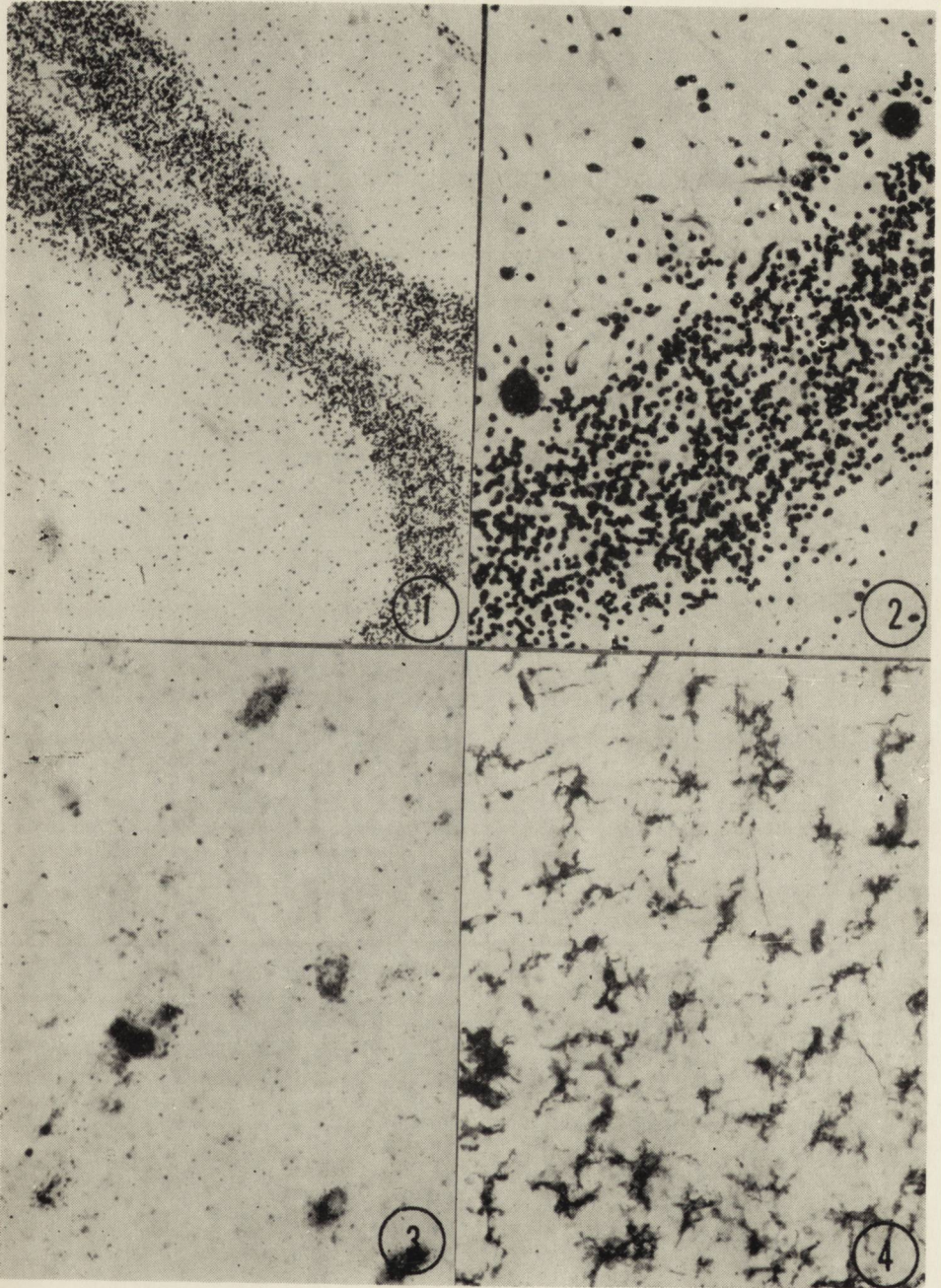
Ryc. 2. Lobulus biventer. Obkurczone komórki Purkinjego, rozrost gleju Bergmanna, przeredzenie warstwy ziarnistej. Met. Nissla. Pow. $180 \times$.

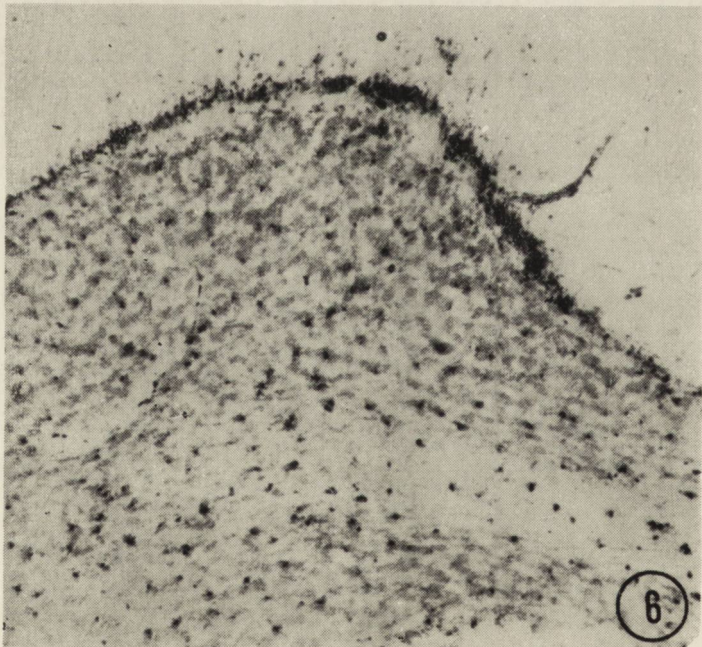
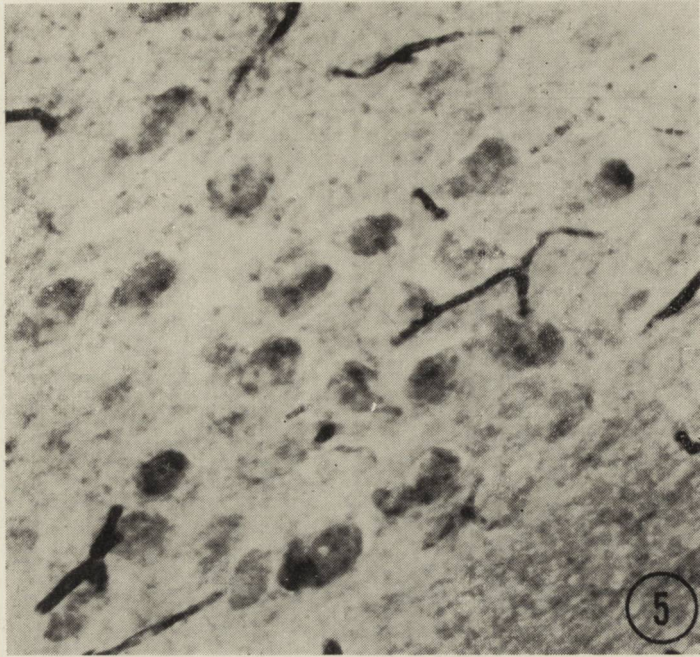
Fig. 3. Cortex of the frontal lobe. Significant NsE activity in some neurocytes and pericytes. $\times 250$.

Ryc. 3. Kora płata czołowego. Wysoka aktywność NsE w niektórych komórkach nerwowych i pericytach. Pow. $250 \times$.

Fig. 4. Frontal lobe, white matter. Strong TPPase activity in the proliferating astro- and oligodendrocytes. $\times 200$.

Ryc. 4. Istota biała płata czołowego. Silna aktywność TPPazy w rozrastających się astro- i oligodendrocytach. Pow. $200 \times$.





aths. In the cerebellum, it were the preserved Purkinje cells which were weakly positive. The glial cells were unreactive. The neurocytes of the supraoptic and paraventricular nuclei displayed distinct alkP activity (Fig. 5).

Acid phosphatase (acP)

In the frontal and parietal lobes of the cerebral cortex, there were only the larger neurocytes demonstrating features of a chronic cell disease that were weakly reactive for acP. The proliferating oligo- and astroglia was somewhat more reactive. A very strong enzymic reaction was evident in the basal nuclei, especially in the putamen, in the caudate nucleus and in the hypothalamus, where all the preserved neurocytes as well as all sorts of glial cells were positively stained. In the cerebellum, there were the Bergmann's glial cells that were strongly reactive for acP (Fig. 6). The Purkinje cells, but only those of some regions of the neocerebellum displayed microgranular staining for acP. The neurocytes and glial cells of the molecular layer lacked any enzyme activity.

Adenosinetriphosphatase (ATPase)

A slight diffusive ATPase activity was demonstrated in nuclei of the cortical neuroglia and by blood vessel walls. In the white matter instead, it were the perivascular processes of the astroglia and gemistocytes that demonstrated large amounts of enzyme reaction products. In addition to that, a positive staining was also seen within the nuclei of oligodendrocytes and in vessel walls. As far as the cerebellum is concerned, a positive staining for ATPase was seen in the neuroglia of the white matter.

Phe Purkinje cells, as well as the granular layer were not reactive with respect to ATPase.

Fig. 5. Supraoptic nucleus. Significant intraneuroplasmic alkP activity and strong enzymic reactivity of blood vessels walls. $\times 200$.

Ryc. 5. Jądro nadwzrokowe. Wyraźny odczyn dla fosfatazy zasadowej w cytoplazmie neurocytów i silna aktywność w ścianach naczyń krwionośnych. Pow. $200 \times$.

Fig. 6. Cerebellar cortex. Very strong acP activity seen in Bergmann's glial cells as well as in the proliferating glia of the granular layer and cerebellar white matter. $\times 100$.

Ryc. 6. Kora mózdzku. Bardzo silna aktywność fosfatazy zasadowej w komórkach glejowych Bergmanna oraz w rozrastającym się gleju warstwy ziarnistej i istoty białej. Pow. $100 \times$.

DISCUSSION

The above presented results of histoenzymic investigations and of morphological observations are worth considering, in spite of the fact that they may be regarded as a net effect of both the cardiac arrest and of the intensive therapy that has been applied in this case. Unfortunately the individual effects exerted by the two separate pathogenic factors cannot be distinguished in human pathology. In the case described herewith, there are the differences in enzymic activity between the glial cells of the cerebral cortex and those of the white matter, despite the obvious similarity in morphological appearance as evidenced by routine histological staining, that draw our attention. These differences were particularly outstanding with respect to TPPase, acP and ATPase.

From observations made in experimental conditions (Wender et al., 1971) and from the results of investigations concerned with histoenzymic activity of the neuroglia in the course of ontogenetic development (Wender et al., 1970, 1971) it would be conceivable to assume that this divergent enzymic activities are due to „age” differences between the cell populations in question. It appeared namely that older glial cells, i.e. those which have reached a higher grade of maturity were histoenzymatically less reactive than the young, still developing glial cells. The immature neuroglia in form of sponglioblasts, oligodendroblasts or astroblasts happened to exhibit high phosphatase and esterase activities while the mature oligodendrocytes and astrocytes were completely unresponsive (Wender et al., 1970, 1971). Applying these observations and conclusions to the case under discussion, it would be possible to assume that the observed generalized gliosis in the patient's brain is not of the same age, i.e. that glial proliferation had started earlier in the cerebral cortex than in the white matter. Consequently, the cortical glial cells, as the older cells demonstrated lower enzymic activity. Following this line, the proliferated neuroglia of the white matter, as the ontogenetically younger cell population, would according to this assumption display comparatively higher enzymic reactivity, which indeed was the case.

However, increased TPPase, acP and ATPase activities were also observed in glial cells that did not undergo proliferation. The explanation of mechanisms responsible for this effect is not an easy one. We may only cite some other examples in which the histoenzymic reactivity of the neuroglia was likewise altered, that is in the apparently normal white matter of M.S. cases (Wender and Kozik, 1969) in EAE (Wender and Kozik, 1972) and in experimental cerebral hypoxia and ischemia (Colmant, 1965; Miller, Myers, 1972).

Basing on these observations it may be inferred that the increased phosphatase activity in not proliferating glial cells could be due to some enhancement of their biological activity.

The essential lack of changes with respect to AChE, ChE and alkP is worth pointing out. May be, the several weeks lasting survival of the patient after the cardiac arrest was somehow related to the unaffected level of these enzymic activities. It is commonly known that a block of the AChE enzymic system inevitably leads to death.

On the margin of the histoenzymic studies performed in this case, the lack of ischemic and homogenizing cell changes, regarded by many authors (Körney, 1955; Scholz, 1953) as pathognomic for cerebral anoxia and ischemia — should be pointed out. Such changes have been produced in experimental cardiac arrest (Ginsberg, Myers, 1972; Miller, Myers, 1972). On the other hand, many authors believe that these neuronal changes are unspecific (Kozik, 1969, 1970; Mc Donald, 1961) and may be evoked by various ethiologic factors (Schümmelfeder, 1962; Liu et al., 1950).

The herewith presented case gives rise to many other important, till yet inexplicable questions. The lack of demyelination, or the preference with which the pathological process affects the phylogenetically older cerebellar structures are the examples that outstand in this instance. Without penetrating into the difficult problems of the complex pathogenetic mechanism responsible for these changes, we think it meaningful to register the observations made herewith.

Systematic observations of such cases supported by investigations of the molecular basis of the pathological process induced by the cardiac arrest in human brains will most certainly advance our knowledge about the sequence and development of pathological changes accompanying this event.

CONCLUSIONS

1. In a mortal case caused by the consequences of a cardiac arrest there were found widespread neuronal losses in the cerebral cortex, in the cerebellum and in the basal nuclei, accompanied by a generalized proliferation of the neuroglia.

2. Neuroglial cells were strongly reactive with respect to TPPase, acP and ATPase. The enzymic reactivity of the white matter neuroglia and of glial cells located in the basal nuclei was significantly higher than that demonstrated by cortical neuroglial cells.

3. The activity of AChE, of ChE and of alkP in the investigated brain specimens remained essentially unchanged.

4. Phylogenetically older structures of the cerebellum were, compared to the phylogenetically younger structures of the neocerebellum, affected more severely by the pathological process.

M. B. Kozik

ZMIANY HISTOENZYMATYCZNE W MÓZGU W PRZYPADKU ZATRZYMANIA CZYNNOSCI SERCA

Streszczenie

Przeprowadzono badanie aktywności fosfataz i esteraz w mózgu w przypadku pacjentki zmarłej po upływie 6 tygodni od chwili skutecznej resuscytacji krążenia.

Poza rozległymi i znacznymi zmianami morfologicznymi stwierdzono znaczny wzrost aktywności TPPazy, fosfatazy kwaśnej i ATPazy w komórkach glejowych, wyższy w strukturach podkorowych niż w korze mózgu. Nie zaobserwowano natomiast zmian w aktywności acetylocholinesterazy, cholinesterazy i fosfatazy zasadowej. Zwrócono również uwagę na większe uszkodzenie starszych filogenetycznie struktur mózdzku w porównaniu z okolicami filogenetycznie młodszymi.

М. Б. Козик

ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПРИ ОСТАНОВКЕ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СЕРДЦА

Резюме

Были проведены исследования активности фосфатаз и эстераз в мозге больной, умершей по истечении 6 недель с момента эффективной реанимации кровообращения.

Кроме обширных и значительных морфологических изменений был обнаружен значительный рост активности ТПН-азы, КФ и АТФ-азы в глиальных клетках, причем более высокий в подкорковых структурах, чем в коре мозга. С другой стороны, однако, не наблюдались изменения в активности АХЭ, ХЭ, ЩФ. Было обращено также внимание на то, что филогенетически старые структурные формации были более задеты по сравнению с филогенетически более молодыми областями.

REFERENCES

1. Adams, J. H., Brierley, J. B., Connor, R. C. et al.: The effects of systemic hypotension upon the human brain: Clinical and neuropathological observations in 11 cases. *Brain* 1966, 89, 235—244.
2. Colmant, H. J.: Zerebrale Hypoxie. *Zwangslose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*. G. Thieme, Stuttgart, 1965, Heft 16.
3. Mc Donald, W. J.: Cortical cerebellar degeneration with ovarian carcinoma. *Neurology* 1961, 11, 328—334.
4. Gerebtzoff, M.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases. *Acta Anat.* 1953, 19, 336—347.

5. Ginsberg, M. D., Myers, R. E.: The topography of impaired microvascular perfusion in the primate brain following total circulatory arrest. *Neurology* 1972, 22, 998—1011.
6. Gomori, G.: *Microscopic Histochemistry*. Univ. Press., Chicago 1953.
7. Kozik, M.: Histochemistry of Purkinje cells in experimental homogenization necrosis. *Pathologia Europea*, 1969, 4, 122—137.
8. Kozik, M.: Histochemical studies on degenerative lesions in neurocytes. *Ann. Med. Sec. Pol. Acad. Sc.* 1970, 15, 71—97.
9. Körney, St.: *Histopathologie und klinische Symptomatologie der Anoxisch-Vasalen Hirnschädigungen*. Akadémiai Kiadó, Budapest 1955.
10. Liu, Ch. N., Bailey H. L., Windle, W. F.: An attempt to produce structural changes in nerve cells by intense functional excitation induced electrically. *J. Comp. Neurol.* 1950, 92, 169—181.
11. Mandel, M. M., Berry, R. G.: Human brain changes in cardiac arrest. *Surg. Gynec. Obstet.* 1959, 108, 692—700.
12. Miller, J. R., Myers, R. E.: Neuropathology of systemic circulatory arrest in adult monkeys. *Neurology* 1972, 22, 889—904.
13. Nachlas, M., Seligmann, A.: The histochemical demonstration of esterase. *J. Nat. Cancer Inst.* 1949, 9, 415—425.
14. Novikoff, A., Goldfischer, B. S.: Nucleotide diphosphatase activity in the Golgi Apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. nat. Acad. Sci.* 1961, 47, 802—810.
15. Scholz, W.: Selective neuronal necrosis and its topistic patterns in hypoxemia and oligemia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1953, 12, 249—261.
16. Schümmelfeder, N.: Sequence of X-radiation damage in mouse cerebellum. In: *Response of the Nervous System to Ionizing Radiation*. Academic Press 1962, 191—210.
17. Steegmann, A. T.: The neuropathology of cardiac arrest. In: *Pathology of the Nervous System*. Ed. J. Minckler, New York 1969, 1005.
18. Wachstein, M., Meisel, E.: Histochemistry of „thioacetic acid esterase” in relation to De Duve's lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 1960, 8, 317—318.
19. Wender, M., Kozik, M.: Contribution to the histoenzymatic changes in multiple sclerosis. *Acta Neuropath.* 1969, 13, 143—148.
20. Wender, M., Kozik, M., Wojciechowski, T.: Enzym histochemische Untersuchungen zur Entwicklung der Neuroglia des menschlichen Gehirns. *Acta histochem.* 1970, 36, 32—43.
21. Wender, M., Kozik, M., Mularek, O.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.* 1971, 13, 223—230.
22. Wender, M., Kozik, M.: The activity of neuroglial enzymes during myelination and demyelination. *Pol. Med. J.* 1972, 11, 714—721.

Authors' address: Medical Academy Poznań, Division of Pathology, 60-355 Poznań, Poland, Przybyszewskiego 49.

STEFAN KASPEREK, CZESŁAWA WAŻNA-BOGUŃSKA,
ZDZISŁAW GRALEWSKI

SKÓRZAK ŚRÓDCZASZKOWY I PODWOJENIE RDZENIA
KRĘGOWEGO W PRZYPADKU Z WIELOLETNIMI OBJAWAMI
PSYCHOTYCZNYMI

Klinika Neurologiczna ICUN Śl. AM w Katowicach

Kierownik: doc. dr A. Musicł

Zakład Patomorfologii Instytutu Patologii Śl. AM

Kierownik: prof. dr M. Sońnierz

Oddział Neurologiczny Państwowego Szpitala dla Nerwowo i Psychiczenie Chorych
w Rybniku

Ordynator: dr Z. Gralewski

Naskórzaki, a szczególnie skórzaki mózgu są bardzo rzadkie. Rozwijają się z zawiązków skóry, przemieszczonych w obręb układu nerwowego w okresie zamykania się pierwotnej rynienki nerwowej tj. w 3—5 tygodniu embriogenezy (Bostroem 1897). Z reguły mają postać torbieli wypełnionych złuszczonego naskórkiem, kryształkami cholesterolu (naskórzaki) oraz wydzieliną gruczołów łojowych, włosami (skórzaki). W ścianie pie. wszych występuje nabłonek wielowarstwowy płaski, w drugich ponadto przydatki skóry: gruczoły łojowe i potowe, włosy.

Skórzaki śródczaszkowe stanowią zaledwie 0,15% materiału Cushinga (1932) i 0,1% Zülcha (1956). Ich stosunek liczbowy do naskórzaków śródczaszkowych wynosi w materiale Cushinga 1 : 4, Broagera (1941) 1 : 4,5, Keville i Wise (1959) 1 : 8.

Mamy sposobność przedstawić przypadek nie operowanego skórzaka śródczaszkowego z towarzyszącą diplomyelią.

OPIS PRZYPADKU

Kobieta M. W., urodzona w 1921 r. w nie obciążonej dziedzicznie rodzinie, od najmłodszych lat miała obficie owłosioną okolice krzyżową i nie zupełnie prawidłowo chodziła. Nie zwracała się z tym jednak do lekarzy. Ukończyła szkołę w przewidzianym czasie, wcześniej wyszła za mąż, trzy razy rodziła bez powikłań.

W grudniu 1952 dość nieoczekiwanie oddaliła się z domu w Katowicach. Została zatrzymana w Bydgoszczy i skierowana do szpitala psychiatrycznego w Świeciu. Stwierdzono zaburzenia orientacji, dziwaczne zachowanie, autyzm oraz obwodowy niedowład kończyn dolnych. Rozpoznano schizofrenię katatoniczną i zapalenie wielonerwowe. Mimo intensywnej terapii nie uzyskano poprawy w stanie psychicznym. Ujawniona w 1957 gruźlica płuc została wyleczona. Po 7 latach przekazano chorą do szpitala psychiatrycznego w Lubiążu, gdzie przebywała przez następne 12 lat bez trwałej remisji objawów psychotycznych.

Od 1959 nie chodziła z powodu wiotkiego porażenia stóp ze zniesieniem odruchów skokowych, a wzmożeniem kolanowych. Po stronie lewej dodatni był odruch Babińskiego. W okolicy krzyżowej występowało obfite owłosienie, a radiologicznie stwierdzono rozszczep grzebienia pośrodkowego kości krzyżowej. Podejrzewano myelodysplazję.

Otyłość, basowy głos, męski zarost na twarzy sugerowały uszkodzenie podwzgórza i somatogenne podłoże zaburzeń psychicznych. Ponieważ wykonane w 1964 zdjęcia rtg czaszki wykazały zwapnienie o niepewnej lokalizacji i zmiany w siodle tureckim, wykonano odmę mózgową. Wyniku tego badania nie udało się odnaleźć. Ostatecznie utrzymano jednak rozpoznanie schizofrenii przewlekłej. W pmr, pobranym lędźwiowo w 1964 r., stwierdzono 0,52% białka, słabo dodatnie odczyny globulinowe, prawidłową krzywą złotową.

W lutym 1972 przekazano pacjentkę do szpitala psychiatrycznego w Rybniku, gdzie po 2 miesiącach zmarła.

Sekcja ogólna wykazała zapalenie płuc. Po nacięciu jednej półkuli mózgu sposobem Virchowa zauważono liczne białe ziarenka w poszerzonej komorze bocznej. W tym stanie utrwalono mózg w 10% roztworze formaliny.

Badanie neuropatologiczne

Obraz makroskopowy: Oglądaniem zewnętrznym mózgu nie zauważono nieprawidłowości poza asymetrią półkul wskutek uprzedniego nacięcia. Na czołowych przekrojach znacznie poszerzone komory boczne i trzecia były szczelnie wypełnione kremowej barwy ziarenkami wielkości ryżu, mazistej konsystencji, wolno leżącymi bądź słabo przylegającymi do zmienionych ścian komór i do splotów naczyniastych (ryc. 1). Do światła komory trzeciej i wybitnie zwężonego wodociągu sterczały pojedyncze siwe włosy (ryc. 2). Na powierzchni ścian układu komorowego znajdowała się gruba błona, nierówna wskutek nisz wyłobionych przez ziarenka, a ponadto drobnoziarnista, zrosnięta z otoczeniem. Najmniejsze zmiany spostrzegano w komorze IV. W dostarczonych do badania fragmentach rdzenia piersiowego i lędźwiowo-krzyżowego, mechani-





PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Przekrój na poziomie rogów przednich komory bocznej. Ziarna łoju w obu komorach (większość wypadła przy krojeniu). Asymetria półkul jest artefaktem. Wielkość naturalna.

Fig. 1. Section at the level of anterior horns of lateral ventricles. Sebaceous granules (a majority lost during sectioning). Assymetry of hemispheres is an artefact. Natural size.

Ryc. 2. Gruba nierówna błona na ścianach komory bocznej i trzeciej (strzałki). Po usunięciu mas łojoywych uwidoczniły się dwa włosy. Nieco powiększone.

Fig. 2. Thick uneven membranae on the walls of lateral and IIIrd ventricles. After removal of sebaceous masses two hairs became visible. Slightly magnified.

Ryc. 3. Ziarnina w świetle wodociągu. Rozplem komórek wyściółki. H-E. Pow. 100 ×.

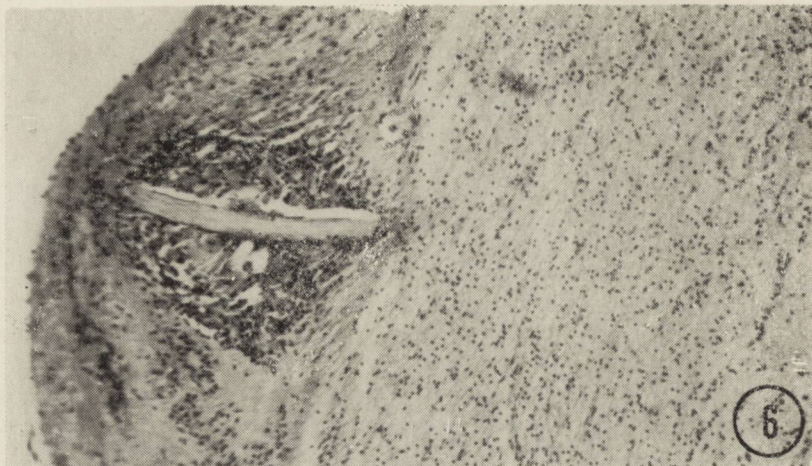
Fig. 3. Granulation in aqueduct lumen. Proliferation of ependymal cells. H-E. × 100

Ryc. 4. Nabłonek wielowarstwowy płaski w ścianie komory bocznej. H-E. Pow. ok. 160 ×.

Fig. 4. Multistratified squamous epithelium in the lateral ventricle wall. H-E. ca × 160.

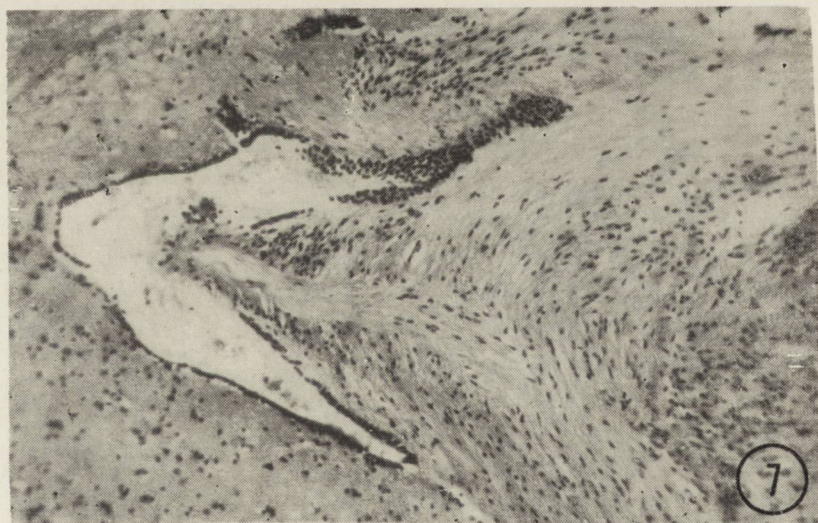
Ryc. 5. Masy łojoywe w ścianie komory bocznej. Na biegunach tworów drobne zwapnienia. H-E. Pow. 70 ×.

Fig. 5. Sebaceous masses in the lateral ventricle wall. Small calcifications at the poles of these structures. H-E. × 70.



Ryc. 6. Podłużny przekrój włosa w ziarninie otoczonego naciekiem zapalnym.
H-E. Pow. 100 ×.

Fig. 6. Longitudinal section of a hair surrounded by inflammatory infiltrate.
H-E. × 100.



Ryc. 7. Fragment wodociągu mózgu o świetle zaledwie szczelinowatym. H-E.
Pow. 100 ×.

Fig. 7. Fragment of aqueduct with a fissure-like lumen. H-E. × 100.

cznie uszkodzonych, zauważono płaskie białawe blaszki w oponach miękkich, przypominające szkliste blaszki pajęczynówki.

Ziarenka usunięte z komór rozpuszczały się w eterze i w mieszaninie chloroformu i metanolu, natomiast w alkoholu etylowym tworzyły emulsję.

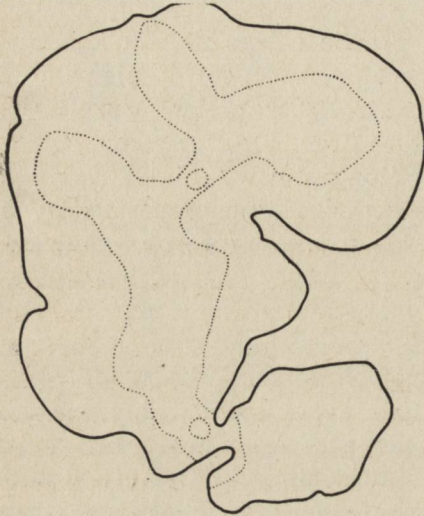
Obraz mikroskopowy: Ściany prawie całego układu komorowego wysłane były grubą warstwą ziarniny, złożonej z elementów tkanki łącznej i ependymy, która rozrastała się w postaci ziarnistości nadwyściółkowych i tworów gruczołowatych (ryc. 3). Część obu komór bocznych ponadto wyścielał nabłonek wielowarstwowy płaski (ryc. 4). W ziarninie znajdowały się liczne owalne skupienia bezpostaciowych mas (ryc. 5), barwiących się dodatnio Sudanem oraz przekroje poprzeczne i podłużne pojedynczych włosów (ryc. 6). Twory sudanofilne występowały w różnych warstwach ziarniny, miejscami również pod naskórkem, nie wnikały jednak w głąb tkanki nerwowej. Miejscami otaczały je skąpe nacieki okrągłokomórkowe, makrofagi, komórki olbrzymie i blaszkowate zwapnienia. Nie znaleziono natomiast gruczołów łojowych ani potowych. Zmiany te były bardziej nasilone w nadnamiotowej części układu komorowego. Wodociąg uległ niemal zamknięciu (ryc. 7). Komorę IV wypełniała w znacznym stopniu ziarnina nadwyściółkowa, a poprzez zachyłki proces szerzył się na część opon pnia mózgu i mózdzku. Leżąca w sąsiedztwie ziarniny tętnica kręgową okazywała cechy zapalenia wytwórczego.

W obrazie lupowym rdzenia lędźwiowego stwierdzono jego niepełne podwojenie. Jeden z członów był w pełni rozwinięty z tym, że jeden róg przedni łączył się w sposób ciągły z rogiem drugiego członu, który był widoczny tylko częściowo w preparacie. Skupienia komórek wyściółki na końcach wspólnego rogu przedniego odpowiadały dwóm kanałom centralnym. Do dwu szczelin pośrodkowych przednich wnikały opony i naczynia. Na grzbietowo-bocznej powierzchni tworów rysowała się bruzda. Jej dno znajdowało się w połowie odległości między obu kanałami środkowymi (schemat 1). Poza znacznym zeszkliwieniem opon i naczyń oponowych w części lędźwiowo-krzyżowej, nie znaleziono zmian mikroskopowych.

OMÓWIENIE

Po blisko 20-letnim przebiegu psychotycznym badanie sekcyjne mózgu wykazało jednoznacznie obecność skórzaka o umiejscowieniu komorowym. Zaburzenia embriogenetyczne, w wyniku których się rozwinął, wystąpiły też na przeciwnym, ogonowym końcu zarodkowej cewy nerwowej. Wskazuje na to podwojenie rdzenia lędźwiowego, współistniejące

z rozszczepem kości krzyżowej, owłosieniem tej okolicy i z zespołem neurologicznym. Błędne rozpoznanie kliniczne było wynikiem pominięcia trafnej koncepcji somatogennego podłoża choroby psychicznej.



Schemat 1. Przekrój podwojonego rdzenia kręgowego.

Diagram 1. Section of duplicated spinal cord.

Mimo anomalii rozwojowej rdzenia, przyczyna narastania objawów rdzeniowych nie wydaje się całkowicie wyjaśniona. Brak dokładnych danych sekcyjnych o stosunkach anatomicznych w kanale kręgowym. Warto wspomnieć, że opisywano jednoczesne występowanie skórzaków śródczaszkowych i zewnątrzrdzeniowych (Trachtenberg 1898, Raymond i wsp. 1904), które jak wiadomo najczęściej występują w okolicy lędźwiowo-krzyżowej (Bischof, Nittner 1969, Russell, Rubinstein 1963) i którym towarzyszy tarń dwudzielna i inne anomalie dysraficzne (Vuia 1973), w tym diplomyelia (Harriehausen 1909, Hamby 1936, Salotti 1928).

Mimo braków w dokumentacji, przypadek stanowi rzadką okazję wzbogacenia kazuistyki skórzaków śródczaszkowych wyjątkowo bogatym obrazem neuropatologicznym.

Od czasu badań Bostroema (1897) wyróżnia się pewne typy tych guzów w zależności od umiejscowienia ich macierzy (matrix), która jest nieproporcjonalnie małym w stosunku do objętości guza miejscem wytwarzania łożu i włosów („Dermoidzotte” Bostroema). Większość znanych skórzaków mózgu należy do typu naczyniówkowego. Esselier (1945) kwestionuje istnienie typu komorowego uważając, że opisane do 1941 r. (Broager) skórzaki „komorowe” wywodziły się w rzeczywistości z opony naczyniowej, ze splotu naczyniastego, bądź że zawartość pękniętej torbieli

przedostała się do światła komór. Henschen (1955) nadal jednak przytacza pojedyncze znane skórzaki wewnątrzkomorowe.

W przypadku Esseliera (1945) torbiel skórzasta o wymiarach zaledwie $9 \times 5 \times 4$ mm znajdowała się w oponie naczyniowej zbiornika bruzdy bocznej. Wskutek pęknięcia jej zawartość przedostała się do zewnątrz i wewnątrz-mózgowych przestrzeni płynowych, co autor określił jako „Vertalgung”.

W przedstawionym przypadku mimo łoju i włosów w komorach, odczynów zapalnych w ich ścianie i w oponach podstawy mózgu, nie znaleziono samych gruczołów łojoych i mieszków włosowych. Nie pozwala to zakwalifikować tego skórzaka jednoznacznie jako „komorowego”.

Według Bostroema (1897) pierwotne wysepki naskórkowe i skórne wykazują tendencję do stopniowego „wytapetowania” jamy, w której się znajdują. Zwykle jednak tylko niewielką część ściany torbieli stanowi typowa skóra. Pozostałą tworzy naskórek, tkanka łączna oraz ziarnina, powstała pod wpływem złuszczonej masy rogowej, łoju i włosów (Esselier 1945). Obecność naskórka w komorach bocznych nie wyklucza więc umiejscowienia macierzy guza w splocie naczyniastym. W materiale pobranym do opracowania znalazły się jedynie jej obwodowe fragmenty naskórkowe. W przypadkach Bostroema (1897) i Esseliera (1945) naskórek sięgał również poza obszar, w którym znaleziono gruczoły łojoye, a Stefanki i wsp. (1972) występował tylko w części ściany epidermoidu.

Wydaje się, że w razie umiejscowienia macierzy skórzaka w splocie naczyniastym, czy też ewentualnie w ścianie komory, może nie dojść do powstania torbieli, której pęknięcie prowadzi do wypełnienia komór jej zawartością, co wielokrotnie opisywano (Broager 1941, Esselier 1945). Masy łojoye mogą wypełniać wtedy stopniowo układ komorowy, a ziarnina tworzy rodzaj ścian rozgałęzionego tworzywa skórzastego. Taka patogeniza mogłaby tłumaczyć długoletni przebieg choroby pacjentki — bez burzliwych objawów nadciśnienia śródczaszkowego, mimo wewnątrzkomorowego procesu rozrostowego, jak również niezwykle obraz sekcyjny: szczelne wypełnienie łojem nadnamiotowej części układu komorowego.

Makroskopowy obraz mózgu (ryc. 1) nasuwa na myśl nazwę „sebocephalus internus”, analogicznie do pyocephalus i haemocephalus. Określenie Esseliera jest na język polski nieprzetłumaczalne, a znane z piśmiennictwa podobne przypadki uzasadniają celowość tej nazwy.

Autorzy dziękują Panu dr med. Zbigniewowi Thillemu, dyrektorowi Wojewódzkiego Szpitala Chorób Układu Nerwowego w Lubiążu oraz pracownikom gabinetu radiologicznego Szpitala, za udostępnienie dokumentacji klinicznej.

С. Касперек, Ч. Важна-Богуньска, З. Гралевски

ВНУТРИЧЕРЕПНОЙ ДЕРМОИД И РАЗДВОЕНИЕ СПИННОГО МОЗГА
С МНОГОЛЕТНИМИ ПСИХОТИЧЕСКИМИ ЯВЛЕНИЯМИ

Резюме

У 31-летней женщины развился неподдающийся лечению психоз, который был определен как хронический шизофрения. Волосной покров кожи, расщепление крестцовой кости и паралич нижних конечностей указывали на наличие также миелодисплазии. Больная находилась в психиатрической больнице до самой смерти в 52 года. Патоморфологические исследования обнаружили дермоид мозга, расположенный в области желудочков, а также раздвоение поясничного отдела спинного мозга.

Супратенториальная часть желудочковой системы была плотно заполнена жировыми гранулами и отдельными волосками. Стенки всех желудочков были выстланы толстым слоем надependимной грануляции, а также боковых желудочков также и эпидермисом. Не было обнаружено ни самих салльных желез, ни волосяных мешочков. Процесс распространялся из IV желудочка на основание мозга.

Внутрижелудочковое расположение опухоли не позволяет исключить возможность её происхождения из сосудистого сплетения.

Для данного случая и немногих похожих из литературных данных авторы предлагают дать определение „sebocephalus internus”.

S. Kasperek, C. Ważna-Boguńska, Z. Gralewski

INTRACRANIAL DERMOID AND DUPLICATION OF SPINAL CORD
IN A CASE WITH MANY-YEARS PSYCHOTIC SYMPTOMS

Summary

In a 31-year woman, therapy-resistant psychosis has developed, classified as chronic schizophrenia. Skin pilosis and cleft sacrum as well as paraplegia of lower extremities suggested coexistence of myelodysplasia. The patient was permanently hospitalized in psychiatric hospitals until death in the age of 52.

Neuropathological examination revealed cerebral dermoid of ventricular localization and duplication of the lumbar part of spinal cord. The supratentorial part of the ventricular systems was filled up by sebaceous granules and single hairs. All the ventricular walls were covered by a thick layer of supraependymal granulation, and a part of lateral ventricles also by epidermis. Sebaceous glands and hair follicles were absent. The process spread over the IVth ventricle into a part of cerebral base meninges.

The intraventricular localization of the tumour does not allow to exclude its origin from vascular plexus.

The authors propose to designate the autopsy picture of this and similar cases as „sebocephalus internus”

PIŚMIENICTWO

1. Bischof W., Nittner K.: Epidermoide und Dermoide des Spinalkanals. Zbl. Neurochir., 1969, 30, 101—118.

2. Bostroem M.: Über die pialen Epidermoide, Dermoide und Lipome und duralen Dermoide. *Zbl. allg. Path. u. path. Anat.*, 1897, 8, 1—98.
3. Broager B.: Two cases of intracranial dermoid; with a survey of the previously reported cases. *Acta Chir. Scand.*, 1941, 85, 51—75.
4. Cushing H.: *Intracranial tumours*. Ch. C. Thomas, Springfield 1932.
5. Esselier A.: Vertalung der Hirnventrikel und Subarachnoidalräume, Meningitis chronica cerebri et spinalis infolge Ruptur einer pialen Dermoidzyste. *Schweiz. Ztsch. Path. u. Bakteriolog.*, 1945, 8, 41—56.
6. Hamby: *Arch. Pathol.*, 1936, 21, 831 (cyt. wg Henschen).
7. Harriehausen: *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1909, 36, 268 (cyt. wg Henschen).
8. Henschen F.: Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Hüllen, w *Hdb. spez. path. Anat. u. Histol.*, O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle (red.) *Nervensystem: XIII/3*, Springer, Berlin 1955, 754—756, 868—872.
9. Keville F. J., Wise B. L.: Intracranial epidermoid and dermoid tumors. *J. Neurosurg.*, 1959, 16, 564—569.
10. Raymond F., Alquier L., Courtellement V.: *Rev. Neurol.*, 1904, 12, 635 (cyt. wg Broager).
11. Russell D. S., Rubinstein L. J.: *Pathology of tumors of the nervous system*. E. Arnold, London 1963, 14.
12. Salotti: *Arch. ital. Chir.*, 1927—1928, 19, 135 (cyt. wg Henschen).
13. Stefanko S., Retinger M., Głowacki J.: Epidermoid komory IV o niezwykłym przebiegu. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1972, 6 (22), 145—148.
14. Trachtenberg M. A.: *Virch. Arch.*, 1898, 154, 274 (cyt. wg Broager).
15. Vuia O.: Epidermoid und Dermoid des Zentralnervensystems vergesellschaftet mit dysraphischen Störungen, Spongioblastose und Rosenthalsche Fasern. *Dtsch. Z. Neurol.*, 1973, 203, 279—298.
16. Zülch K. J.: *Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste*, w *Hdb. Neurochir.*, t. III, Springer, Berlin 1956, 543—544.

Adres: Klinika Neurologiczna Śl. AM, 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze.

IRENA RYBARKA

IMMUNOGENNE WŁAŚCIWOŚCI ANTYGENÓW GLEJAKOWYCH
MÓZGU LUDZKIEGO NA PODSTAWIE OCENY SUROWIC
KRÓLIKÓW W ODCZYNIĘ WIĄZANIA DOPEŁNIACZA *Pracownia Patologii Neurochirurgicznej PAN i Klinika Neurochirurgii AM
w Krakowie

Kierownik: prof. dr A. Kunicki

Niektórzy onkolodzy przyjmują, że dopełniacz odgrywa czynną rolę w odpornościowych procesach między tkanką złośliwego nowotworu a gospodarzem (Kólar i wsp. 1967, Lewis i wsp. 1969). Wahania zawartości dopełniacza w surowicy obserwowano bowiem w przebiegu schorzeń nowotworowych różnych narządów. Według Wilkinsa (1963) surowice chorych ze złośliwymi nowotworami mózgu, podobnie jak innych narządów zwiększają *in vitro* zdolność regeneracyjną komórek w porównaniu do surowic osobników zdrowych lub z łagodnymi nowotworami. Zjawisko to tłumaczy się znikaniem w surowicy jednego z czynników hamujących wzrost komórek dzięki czemu przeważa w surowicy stymulator. Ta właściwość surowicy chorych zmniejsza się po operacji nowotworu. Nie wiadomo w jakim stopniu znikanie czynnika hamującego regenerację komórek zależy od dopełniacza i jaki posiada związek z odpornością ustroju. Różny przebieg choroby a także przeżywalności chorych z nowotworami mózgu pozwala przypuszczać udział procesów odpornościowych podobnych do występujących u zwierząt uodpornianych tkanką nerwową (Korey 1959, Mihailovic, Jankovic 1961, Mahaley i wsp. 1969) lub opisywanych w spontanicznej regresji nowotworów (Harłodzińska, Stelmachowska 1968, Harłodzińska i wsp. 1969, Bek 1970). Wstrzykiwanie autologicznej bądź homo- czy heterologicznej tkanki nerwowej prawidłowej lub glejaka myszy z dodatkiem adiuwantu Freund'a może wywołać u zwierząt alergiczne zapalenie mózgu z demielinizacją oraz tworzeniem się różnych typów przeciwciał w surowicy zwierząt (Appel, Bornstein 1963, Levine, Wenke 1963, Wender 1966), między innymi przeciwciał wiążących dopełniacz dla ludzkich i zwierzęcych tkanek

* Praca wykonana w latach 1968—69 w ramach umowy polsko-amerykańskiej (Grant PL 480, nr 227708).

nerwowych bądź ich frakcji (Mahaley i wsp. 1969), a także dla białka S₁₀₀, występującego również w tkankach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (Benda i wsp. 1968). Obserwacje te są niezgodne z wynikami autorów cytowanych przez Koreya (1959) i Mahaleya i wsp. (1969), którym nie udało się wykryć przeciwciał po wstrzyknięciu wodnych zawiesin tkanki nerwowej.

Przeważająca liczba glejaków wśród nowotworów mózgu u chorych operowanych w ciągu 20 lat w Klinice Neurochirurgicznej AM w Krakowie skłoniła nas do podjęcia wstępnych badań nad immunogennymi właściwościami antygenów glejakowych. Celem niniejszej pracy jest próba oceny tych właściwości na podstawie odczynu wiązania dopełniacza z surowicami królików uodparnianych antygenami glejaków bez zastosowania adiuwantów.

MATERIAŁ I METODY

Antygeny nowotworowe pochodziły z glejaków mózgu chorych operowanych w Klinice Neurochirurgii AM w Krakowie: 1) B.W., lat 30, guz okolicy czołowej, wagi 57,6 g, rozpoznanie histopatologiczne *astrocytoma protoplasmaticum* (dr hab. J. Kałuża) i 2) K.J., lat 15, guz okolicy czołowej, wagi 105 g, rozpoznanie histopatologiczne *glioblastoma multiforme partim oligodendrogenes* (dr hab. J. Kałuża). Antygeny kontrolne stanowiła tkanka mózgowa okolicy skroniowej oraz jąder podstawy pobrana od 37-letniej kobiety zmarłej z powodu porażenia prądem. Materiał uzyskano w czasie sekcji, wykonanej 24 godziny po zgonie w Zakładzie Medycyny Sądowej AM w Krakowie. Makroskopowo mózg nie wykazywał odchyleń od normy.

Do pierwszych wstrzykiwań dla królików przygotowano zawiesiny świeżych tkanek, do 5 godzin po zabiegu operacyjnym lub po sekcji. Tkanki ważono a następnie dzielono na małe fragmenty. Rozdrobniony materiał miażdżono w szklanych homogenizatorach dodając stopniowo fizjologiczny roztwór NaCl. Przygotowany w ten sposób 10% homogenat tkankowy stanowił jednorodną zawiesinę wykazującą tendencję do tworzenia piany przy lekkim wstrząśnięciu. Do dalszego uodparniania królików i do badań serologicznych używano tkanki przechowywane w zamrażarce w temperaturze około -30°C . Po odmrożeniu przygotowano zawiesiny w sposób opisany powyżej.

Do badań immunogennych właściwości glejaków przeznaczono 10 królików obu płci, wagi 2,5—3,0 kg. Króliki przeszły dwa cykle uodparniania przez podawanie wodnych zawiesin antygenów różnymi drogami: podskórną, domięśniową, dootrzewnową i śródskórną (Korey 1959, Kubica i wsp. 1967). Biorąc pod uwagę znaczną patogenność tkanki nerwowej dla zwierząt doświadczalnych zastosowano niewielkie dawki anty-

genów, wynoszące 100 mg tkanki glejaka lub tkanki prawidłowego mózgu ludzkiego na 1 kg wagi królika.

Zwierzęta podzielono na 3 grupy. Pierwsza grupa uodparniana antygenem *astrocytoma* obejmowała 4 króliki oznaczone A-1, A-2 i A-3. Czwarty królik tej grupy padł przed zakończeniem pierwszego cyklu uodparniania. Druga grupa uodparniana antygenem *glioblastoma* obejmowała 3 króliki oznaczone G-4, G-5 i G-6. Trzecią grupę (kontrolną) stanowiły trzy króliki; oznaczony K-7 otrzymał substancję białą okolicy skroniowej, oznaczony K-8 — substancję szarą tej okolicy a oznaczony K-9 uodporniony został tkanką z okolicy jąder podstawy.

Próbki krwi pobierano od królików od 10 dnia do 2 miesięcy po zakończeniu pierwszego cyklu uodparniania (wstępne oznaczenie mian surowic) oraz od 10 dnia do 3 miesięcy po podaniu ostatniej dawki antygeny. Ogółem wykonano 8—12 oznaczeń przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach królików uodparnianych zarówno tkanką glejaków jak i prawidłową tkanką mózgową. Surowice przechowywano w temperaturze -20°C . Ponadto do odczynu wiązania dopełniacza stosowano preparaty liofilizowane Biomed: surowicę hemolityczną dla krwinek barana oraz dopełniacz (surowica świnek morskich), które przechowywano w temperaturze 4°C i każdorazowo rozcieńczano zgodnie z przepisem.

Po wykluczeniu antykomplementarnego działania antygenów określano ich miano stosując rozcieńczenia w płynie fizjologicznym (0,9% NaCl) na płytkach pleksiglasowych. Właściwy odczyn wiązania dopełniacza wykonano z antygenami w rozcieńczeniu: 1,2% zawiesiny tkanki glejaka oraz 0,6% zawiesiny tkanki mózgowej w fizjologicznym roztworze NaCl. Przed wykonaniem odczynu surowice inaktywowano w temperaturze 56° przez 30 minut. Do odczynu wiązania dopełniacza użyto surowice nierozcieńczone oraz następujący szereg rozcieńczeń w fizjologicznym roztworze NaCl: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512 i 1 : 1024.

Każdorazowo mianowano system hemolityczny przyjmując jako podstawę oceny całkowitą hemolizę przy 2 i 1 jednostce dopełniacza a przy 1/2 i 1/4 jednostki zahamowanie hemolizy krwinek na 4+ i 3+. Właściwy odczyn wiązania dopełniacza wykonano mikrometodą wg schematu zalecanego przez Światową Organizację Zdrowia (Garlacz 1969). Pierwsza faza odczynu przebiegała w temperaturze 37°C a ostateczny wynik odczytywano po 18 godzinach przechowywania w temperaturze 4°C . W odczynie właściwym wiązania dopełniacza przeprowadzono również kontrolę antygenów w rozcieńczeniu optymalnym, surowic nierozcieńczonych oraz układu hemolitycznego.

W ocenie wyników odczynu wiązania dopełniacza wyróżniono 4 stopnie zahamowania hemolizy oznaczane 4+, 3+, 2+ i 1+. Zahamowanie hemolizy na \pm traktowano jako wynik ujemny. W przypadku zahamo-

wania hemolizy na 1+ uwzględniono wynik jeśli odczyt powtarzał się przynajmniej dla dwóch kolejnych rozcieńczeń surowicy.

W ocenie poziomu przeciwciał wiązania dopełniacza w poszczególnych surowicach obliczano maksymalne i optymalne miana, w ocenie grup badanych surowic brano pod uwagę średnie miana (Turowski, Chachulska, 1964). Maksymalne miana to miana o najwyższych wartościach, powtarzające się przynajmniej dwa razy w toku serologicznej kontroli królików przy zahamowaniu hemolizy na 1+. W obliczeniu optymalnych mian brano pod uwagę także najwyższe wartości mian, ale powtarzające się przynajmniej 3 razy w badaniu każdego królika przy zahamowaniu hemolizy na 2+ i 3+. Zahamowanie hemolizy na 4+ występowało z reguły przy dwa razy większym rozcieńczeniu surowicy. Średnie miana obliczano ze średnich arytmetycznych maksymalnych i optymalnych mian surowic glejakowych i kontrolnych (antymózgowych) oraz oddzielnie dla surowic *anty-astrocytoma* i *anty-glioblastoma*. Za istotne różnice mian surowic przyjęto odchylenia ich wartości większe niż dwukrotne rozcieńczenie surowic (Bałasz i wsp. 1965).

WYNIKI

W tabeli 1 zestawiono maksymalne miana przeciwciał wiążących dopełniacz z uwzględnieniem warunków przechowywania antygenów.

Tabela 1. Maksymalne miana przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach uodpornianych królików

Table 1. Maximal titres of adjuvant-binding antibodies in sera of immunized rabbits

Królik Rabbit	Antygen Antigen	Miano maksymalne 1 : Maximal titre 1 :
A—1 ♀c	Astrocytoma protoplasmaticum	256
A—2		64
A—3*		64
G—4	Glioblastoma multiforme	32
G—5		32
G—6*		16
K—7	substancja biała white matter	128
K—8	substancja szara grey matter	128
K—9 ♀c*	zwoje podstawy basal ganglia	128

♀c — samica ciężarna
pregnant female

* króliki uodporniane antygenami przechowywanymi w temperaturze —30°C przez 4—6 miesięcy
rabbits immunized with antigens stored at —30°C for 4—6 months

Przedstawione wyniki wskazują, że wszystkie króliki zareagowały na podane antygeny. Surowice kontrolne antymózgowe posiadały jednakowe miana (1 : 128) bez względu na to, czy króliki otrzymały antygeny białej lub szarej substancji okolicy skroniowej czy antygen z jąder podstawy tego samego osobnika. Surowice antyglejakowe miały niższe miana od surowic kontrolnych z wyjątkiem surowicy samicy, u której pierwszy cykl uodparniania przeprowadzono w okresie ciąży. Warto podkreślić, że tylko surowice *anty-glioblastoma* miały istotnie niższe miana od surowic antymózgowych. Przechowywanie antygenów tkankowych w temperaturze około -30° nie miało wpływu na wysokość maksymalnych mian.

W celu dokładniejszej analizy otrzymanych wyników zestawiono w tabeli 2 wartości mian optymalnych badanych surowic. W zależności od stopnia zahamowania hemolizy miana optymalne mają odpowiednio niższe wartości od mian maksymalnych. Wyniki te wykazują pełną równoległość do wyników przedstawionych w tabeli 1. Surowice kontrolne antymózgowe mają więcej niż dwa razy wyższe miana od surowic *anty-glioblastoma* i nieznacznie wyższe miana od surowic *anty-astrocytoma*.

W zestawieniu średnich arytmetycznych wartości mian maksymalnych (zahamowanie hemolizy na 1+) i optymalnych (zahamowanie he-

Tabela 2. Optymalne miana przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach badanych królików

Table 2. Optimal titres of adjuvant-binding antibodies in sera of immunized rabbits

Królik Rabbit	Antygen Antigen	Zahamowanie hemolizy Haemolysis inhibition	
		2+	3+
		Miano Titre	1 : Titre
A—1♀c	Astrocytoma protoplasmaticum	128	64
A—2		16	8
A—3		32	8
G—4	Glioblastoma multiforme	8	4
G—5		8	4
G—6		4	2
K—7	Substancja biała White matter	64	32
K—8	Substancja szara Grey matter	64	16
K—9♀c	Zwoje podstawy Basal ganglia	32	16

♀c — samica ciężarna
pregnant female

Tabela 3. Ocena poziomu przeciwciał wiążących dopełniacz na podstawie średnich arytmetycznych mian maksymalnych i optymalnych surowic antyglejakowych i antymózgowych

Table 3. Evaluation of the level of adjuvant-binding antibodies on the basis of arithmetic mean of maximal and optimal titres of anti-glioma and anti-brain sera

Surowice Sera	Średnie arytmetyczne mian Arithmetic mean of titres	
	maksymalnych maximal	optymalnych optimal
Anty-astrocytoma	1 : 128	1 : 26
Anti-astrocytoma		
Anty-glioblastoma	1 : 26	1 : 3
Anti-glioblastoma		
Anty-glioma*	1 : 77	1 : 14
Anti-glioma		
Anty-mózg	1 : 128	1 : 21
Anti-brain		

* średnia mian anty-glioblastoma i anty-astrocytoma
arithmetic mean of titres of anti-glioblastoma and anti-astrocytoma

molizy na 3+) poziom przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach antymózgowych jest wyższy niż w surowicach antyglejakowych (obliczonych łącznie dla mian surowic anty-*astrocytoma* i anty-*glioblastoma*), jednak różnice te nie są istotne. Nie różnią się również średnie miana przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach antymózgowych od anty-*astrocytoma*. Natomiast nawet w zakresie średnich mian tych przeciwciał spostrzega się istotnie niższe wartości mian surowic anty-*glioblastoma* w odniesieniu zarówno do surowic antymózgowych jak i anty-*astrocytoma*.

OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że długotrwałe uodparnianie królików wodnymi zawiesinami tkanek glejaków mózgu podobnie jak prawidłowej tkanki nerwowej człowieka powoduje u uodparnianych zwierząt powstanie przeciwciał wiążących dopełniacz. Na podkreślenie zasługuje fakt, że ilość przeciwciał jest tym mniejsza im stopień złośliwości glejaka jest większy. Lewis i wsp. (1969) opisał znikanie przeciwciał w surowicy pacjentów ze złośliwym *melanoma*, u których proces chorobowy ulegał regresji. W hodowli autologicznych komórek *melanoma* te auto-przeciwciała są cytotoksyczne w obecności dopełniacza i hamują syntezę RNA. Struktura przeciwciał wiążących dopełniacz dla nowotworowych antygenów układu nerwowego nie jest w pełni poznana (Mahaley i wsp.

1969). Według Pette i Pette (1963) przeciwciała wiążące dopełniacz dla prawidłowej tkanki nerwowej mają charakter lizolecytyn i w obecności dopełniacza również uszkodzają komórki neurogleju w hodowli. Kornblith i wsp. (1969) spostrzegali również *in vitro* cytotoksyczne działanie króliczych surowic odpornościowych na komórki doświadczalnych glejaków w obecności dopełniacza. Benda i wsp. (1968) wykazali *in vivo* zmiany w przewodzeniu bodźców nerwowych pod wpływem surowicy, zawierającej przeciwciała dla białka S₁₀₀, wyizolowanego zarówno z prawidłowej tkanki mózgowej jak również z doświadczalnych glejaków u zwierząt.

Uzyskane w naszych doświadczeniach wyniki w zakresie przeciwciał wiążących dopełniacz jakkolwiek wnoszą nowe dane do zagadnienia odrębności antygenowej *glioblastoma multiforme* w porównaniu z tkanką prawidłowego mózgu a w mniejszym stopniu także z *astrocytoma protoplasmaticum*, są bardzo trudne do interpretacji, zwłaszcza, że średnie miana surowic antyglejakowych nie różnią się istotnie od mian surowic antymózgowych. Stosunkowo niewielkie różnice mian surowic królików uodpornianych heterologicznymi antygenami ludzkich glejaków i prawidłowego mózgu być może odnieść należy raczej do odporności swoistej narządowo (Ślopek 1963) niż gatunkowo w odniesieniu do tkanek mózgu (Waksman i wsp. 1954, Condie i wsp. 1959, Milgrom i wsp. 1967). Zgodnie z poglądem Mahaleya i wsp. (1969) immunologiczne badania nowotworów powinny być prowadzone równoległe z antygenową charakterystyką prawidłowego mózgu. Z wstępnych badań autorów cytowanych przez Mahaleya wynika, że nie ma różnic antygenowych między ludzkimi glejakami a prawidłową tkanką mózgową. Crowle (1961) podkreśla trudność rozdzielenia antygenów nowotworowych od tkanki prawidłowej ze względu na wzrost nowotworu w obrębie tej tkanki.

Obraz reakcji antygen — przeciwciało maskuje niejako równocześnie rozwijający się proces patologiczny. Wielu badaczy uważa, że tkanka mózgowa zawiera liczne substancje o właściwościach antygenów encefalitogennych (Waksman 1956, Wender 1966, Milgrom i wsp. 1967, Lamoureux i wsp. 1968). Wg Huges i Fielda (1968) przyjąć należy, że przy uodpornianiu zawiesiną niefrakcjonowanej tkanki nerwowej w procesie mogą brać udział inne antygeny niż czynnik encefalitogeny. Badania immunochemiczne tkanki nerwowej wskazują na jej bogactwo antygenowe a swoistość narządowa i gatunkowa wykrytych antygenów ciepłostalnych, rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w etanolu oraz ciepłochwiejnych nierozpuszczalnych w etanolu ciągle jeszcze są przedmiotem dyskusji. Z piśmiennictwa wiadomo, że istnieją różnice antygenowe w zależności od typu nowotworu (Crowle 1961). W naszych doświadczeniach podobne miana surowic antymózgowych i *anti-astrocytoma* w odróżnieniu od mian surowic *anti-glioblastoma* mogą przemawiać za więk-

szym podobieństwem antygenów astrocytów nowotworowych do prawidłowej tkanki niż bardziej histologicznie zróżnicowanych komórek neurogleju w przypadku *glioblastoma multiforme*.

Właściwość wzbudzania wzrostu nowotworów w ośrodkowym układzie nerwowym posiadają wirusy polioma. Shein (1967) wykazał, że zakażenie chomików transformowanymi pod wpływem wirusa Sv₄₀ liniami komórkowymi prowadziło do rozwoju nowotworu histologicznie odpowiadającego *glioblastoma multiforme* (*astrocytoma* 4°). Smirnov (1968) doniósł o bliżej nieokreślonych strukturach krystalicznych w *astrocytoma*. Być może odrębność antygenowa *glioblastoma* od tkanki prawidłowej oraz od *astrocytoma protoplasmaticum* znajdzie wytłumaczenie w wynikach badań nad onkogennymi wirusami.

Poza strukturą antygenową tkanki, na poziom przeciwciał może mieć wpływ wiele czynników, związanych ze sposobem przygotowania antygenów oraz sposobem uodparniania królików (Waksman 1956), a także zależność indywidualnej reakcji uodparnianego osobnika od szeregu stygulatorów bądź inhibitorów (Appel i wsp. 1963, Kolár i wsp. 1967, Ganushkina i wsp. 1968, Šlopek 1963). Brak istotnych różnic mian w surowicach królików uodparnianych tkankami, przechowywanymi przez kilka miesięcy w temperaturze —30° może być spowodowany stabilnością niektórych antygenów mózgowych (Condie 1959), które np. zachowują zdolność wywoływania doświadczonego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia także po poddaniu ich działaniu ultradźwięków, gotowaniu w postaci zawiesiny w roztworze fizjologicznym, autoklawowaniu a nawet pod postacią autolizatu mózgu.

W przeprowadzonych badaniach posłużono się pełną tkanką glejową oraz tkanką prawidłowego mózgu ze względu na sprzeczne opinie odnośnie słabszej aktywności antygenów encefalitogennych pewnych frakcji w porównaniu ze świeżą tkanką mózgową (Eastable i wsp. 1963). Po jednorazowym wstrzyknięciu królikom wodnych zawiesin tkanek nerwowych (bez adiuwantów) nie stwierdzono przeciwciał w surowicy. W pierwszym cyklu uodparniania nie wykazano również obecności przeciwciał wiążących dopełniacz, pomimo wielokrotnych wstrzykiwań. Wyjątek stanowiła surowica ciężarnej samicy, u której po pierwszym podaniu antygenu *astrocytoma* miano przeciwciał wiążących dopełniacz wynosiło 1 : 40. Miano uzyskane po przeprowadzeniu dwóch cykli uodparniania mieściły się w granicach wyników uzyskiwanych przez innych autorów, którzy stosowali do uodparniania adiuwanty zmieszane z heterologicznymi antygenami mózgu ludzkiego lub zwierzęcego bądź ich frakcji (Waksman i wsp. 1954, Milgrom i wsp. 1967).

Wydaje się, że spostrzeżenia nad immunogennymi właściwościami antygenów glejakowych mózgu ludzkiego są istotne z punktu widzenia immu-

nologicznego leczenia tych nowotworów, zwłaszcza że Scheinberg i wsp. 1963, Battista i wsp. 1968, zajmujący się tym problemem nie podejmowali próby wykrywania przeciwciał w surowicy osobników szczepionych tkankami glejaków.

WNIOSKI

W surowicach królików wielokrotnie uodpornianych wodnymi zawiesinami antygenów *astrocytoma protoplasmaticum*, *glioblastoma multiforme* oraz prawidłową tkanką mózgu ludzkiego wykryto obecność przeciwciał wiążących dopełniacz.

Poziom przeciwciał wiążących dopełniacz w surowicach królików uodpornianych *glioblastoma* jest istotnie niższy niż poziom przeciwciał w surowicach królików uodpornianych prawidłową tkanką mózgową oraz uodpornianych *astrocytoma*.

Średnie miana surowic zawierających przeciwciała wiążące dopełniacz dla *astrocytoma* mają wartości podobne do średnich mian otrzymanych w przypadku uodporniania prawidłową tkanką mózgową.

Autorka pragnie złożyć podziękowania Panu Profesorowi A. Kunickiemu za stworzenie organizacyjnych podstaw dla immunologicznego kierunku badań nad glejakami oraz udostępnienie materiału operacyjnego; Panu Profesorowi S. Ślopkowi — za wstępne konsultacje oraz Panu Profesorowi L. Lachowiczowi — za cenne wskazówki metodyczne i omówienie wyników badań serologicznych.

И. Рыбарска

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ГЛИОМАТОЗНЫХ АНТИГЕНОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЗГА НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ СЫВОРОТОК КРОЛИКОВ В РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Резюме

Исследования иммуногенных свойств глиом человеческого мозга проводились на кроликах. Обнаружено, что многократная и продолжительная подача водяных, без адювантов взвесей тканей: *Glioblastoma multiforme* и *Astrocytoma protoplasmaticum* подобным образом как и нормального мозга — позволяет обнаружить в сыворотках этих животных антител, связывающих комплемент.

На основании статистического анализа максимальных и оптимальных титров, а также арифметических средних этих титров доказано, что уровень антител, связывающих комплемент в сыворотках кроликов, иммунизированных *Glioblastoma* действительно ниже чем уровень в контрольных сыворотках для нормального мозга. Не обнаруживали же существенных разниц между уровнем этих антител в сыворотках кроликов, иммунизированных *Astrocytoma* и тканью правильного мозга. Средние титры сывороток для *Glioblastoma* также существенно низшие чем титры сывороток для *Astrocytoma*. Средние титры, подсчитанные совместно для сывороток обеих исследованных глиом, хотя пред-

ставляют низшие величины, не отличаются существенным образом от титров сывороток правильного мозга. Объясняется это между прочими органическим сходством этих антигенов.

Эти опыты указывая на отличающееся антигенное строение Glioblastoma multiforme от ткани правильного мозга и в меньшей степени также от Astrocytoma protoplasmaticum подтверждают их гистологическую дифференциацию. Могут также свидетельствовать о сходной антигенной структуре менее гистологически дифференцированных: Astrocytoma и правильного мозга.

Представленная опытная модель может иметь некоторое практическое значение в дальнейших исследованиях патогенеза или в попытках иммунологической терапии человеческих глиом, и прежде всего может служить для разработки диагностических методов.

I. Rybarska

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF HUMAN BRAIN GLIOMAS ANTIGENS EVALUATED WITH RABBIT SERA IN THE COMPLEMENT-FIXATION TEST

Summary

The studies on the immunogenic properties of human brain gliomas were carried out on adult rabbits. It was found, that repeated and prolonged administration of adjuvant-free suspensions of glioblastoma multiforme and astrocytoma protoplasmaticum, as well as of that of normal brain, allows to detect complement-binding antibodies in the sera of these rabbits.

Statistical analysis of maximal and optimal titres and of arithmetic means of these titres revealed, that the level of complement-binding antibodies in the sera of rabbits immunized with glioblastoma is significantly lower than that in the control sera for normal brain. No differences in this respect were found between the sera of rabbits immunized with astrocytoma and those immunized with normal brain tissue. The mean titres for glioblastoma were significantly lower than those for astrocytoma. The mean titres calculated together for the sera against both gliomas were only insignificantly lower than those for the sera against normal brain, which may be explained a.e. by organ similarity of these antigens.

The experiments, indicating a different antigenic structure of glioblastoma multiforme and normal brain and to a lesser extent also of astrocytoma protoplasmaticum confirm the histological differences between their structures. The results are also indicative of a similar antigenic structure of histologically less differentiated astrocytoma and normal brain.

PIŚMIENICTWO

1. Appel S. H., Bornstein M. B.: Factors responsible for in vitro demyelination present in sera from animals with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 22, 324—334.
2. Bałasz A., Georgiades J., Osuchowski J.: Miano przeciwciał dla adenowirusów w surowicy krwi kobiet przed porodem, po porodzie i we krwi pępowinowej. *Ginekologia Pol.* 1965, 36, 1273—1277.
3. Battista A. F., Bloom W., Loffman M., Feigin I.: Autotransplantation of anaplastic astrocytoma into the subcutaneous tissue of man. *Neurology* 1968, 11, 977—981.

4. Bek W.: Primary retroperitoneal tumours. *Neoplasma* 1970, 17, 253—263.
5. Benda Ph., Lightbody J., Sato G., Levine L., Sweet W.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968, 161, 370—371.
6. Crowle A. J.: Immunodiffusion. Academic Press, N. York-London, 1961.
7. Estable R., Rabson A.: Histopathological studies of tumors produced by intraspinal inoculation of oncogenic viruses. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 22, 352.
8. Gannushkina I., Tsaregorodtseva T.: The influence exerted by specific sensitization in the course of cerebrocranial trauma. *Wopr. Nevrochirurgii* 1968, 4, 9—13.
9. Garlacz A.: Zastosowanie mikrometody płytkowej do badań w odczynie Bordet-Wassermanna. *Przegląd Dermatolog.* 1969, 56, 51—55.
10. Harłodzińska A., Stelmachowska A.: Spontaneous regression of Crocker Sarcoma and immune phenomena. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 1968, 16, 107—115.
11. Harłodzińska A., Stelmachowska A.: The influence of spontaneous regression of Crocker sarcoma on increase of antitumor immunity. *Acta Med. Polona* 1939, 10, 3, 309—314.
12. Harłodzińska A., Stelmachowska A., Richter R.: The Immunofluorescence method in the study of immunologic phenomena accompanying spontaneous regression of Crocker Sarcoma. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 1969, 17, 366—371.
13. Hughes D., Field E. J.: Inhibition of macrophage migration in vitro by brain and encephalitogenic factor in allergic encephalomyelitis. *Int. Arch. Allergy* 1968, 33, 45—58.
14. Kolar V., Kadlecova D., Mechl Z., Svabenikova L., Sakalova J.: The complement in human tumors. *Neoplasma* 1967, 14, 67—78.
15. Korey S. R.: Experimental allergic encephalomyelitis: its production, prevention and pathology as studied by light and electron microscopy (Condie R. M., Good R. A.) W: Progress in Neurobiology IV. The Biology of myelin. Ed. Hoeber-Harper Book, New York, 1959.
16. Kornblith P. L., Prieto A., Pollen D. A.: Alterations in glial and mesenchymal tumours cell membrane resistance with heteroimmune and autologous sera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1969, 159, 585—590.
17. Kubica J. F. (praca zbiorowa): Immunofluorescencja 1967, PZWL, Warszawa, 38—69.
18. Kunicki A., Szwagrzyk E., Ładzińska M.: Surgical treatment of gliomas. *Exc. Med.* 1969, 193, 19.
19. Lamoureux G., McPherson T. A., Carnegie P. R., MacKay I. R.: Lymph node localization and whole body distribution of radioiodinated encephalitogenic polypeptide in guinea-pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 1968, 3, 25—35.
20. Levine S., Wenke E.: Encephalitogenic potencies of nervous system tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1963, 114, 220—222.
21. Lewis M., Okonopisov R. L., Nairn R. C., Phillips T. M., Fairley G. H., Hamilton G., Bodenham D., Alexander P.: Tumour-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease. *Brit. Med. J.* 1969, 567, 547—552.
22. Mahaley M. S. Jr., Day E. D., Bigner D.: Problems inherent to the in vivo localization of anti-brain tumor antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1969, 158, 451—460.

23. Mahaley M. S. Jr.: Immunology of brain tumors related to therapy IV Intern. Congress Neurological Surgery, IX Inter. Congress of Neurology Exc. Med. 1969, 193, 18.
24. Michailovic L., Jankovic B.: Effects of intraventricularly injected anti-N. Caudatus antibody on the electrical activity of the cat brain. *Nature* 1961, 192, 665—666.
25. Milgrom F., Tuggac Z. M., Campbell W. A., Witebsky E.: Thermostable brain-specific autoantigen. *J. Immunol.* 1967, 98, 359—363.
26. Pette E., Pette H.: Some remarks on the pathogenesis of demyelinating diseases. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 22, 528—532.
27. Scheinberg L. C., Suzuki K., Edelman F., Davidoff L.: Studies in immunization against a transplantable cerebral mouse glioma. *J. Neurosurg.* 1963, 20, 312—317.
28. Shein H. M.: Neoplastic transformation induced by Simian virus in syrian hamster neuroglial and meningeal cell cultures. *Arch. Ges. Virusforschung* 1967, 156, 907—914.
29. Smirnov A. V.: Crystallin structures in the cells of dedifferentiated human brain astrocytomas. *Wopr. Nevrochirurgii* 1968, 4, 26—30.
30. Słopek S.: *Immunologia. Rozdz. XXIV. Choroby immunologiczne.* PZWL, Warszawa, 1963.
31. Turowski G., Chachulska W.: Endotoksyna jako adiuwant. I. Wpływ na poziom wytwarzanych precypityn dla białek surowicy ludzkiej. *Med. Doświad Mikrobiol.* 1964, 16, 123—129.
32. Waksman B. H., Porter H., Lees M., Adams R. D., Folch J.: A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J. Exp. Med.* 1954, 100, 451—471.
33. Waksman B. H.: Further study of skin reactions in rabbits with experimental allergic encephalomyelitis. Reactions to tests with purified white matter fractions. Use of a quantitative technique for evaluating sensitivity, production of sensitisation and disease by intradermal injection of antigen without adjuvants. *J. Infect. Dis.* 1956, 99, 258—269.
34. Wender M.: Rola czynnika immunologicznego w chorobach neurologicznych. W: *Immunopatologia kliniczna.* Ed. Bratkowska-Seniów B. PZWL, Warszawa, 1966.
35. Wilkins R. H.: Effects on cell growth by serum fraction from patients with central nervous system neoplasms. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1963, 22, 677—694.

Adres autorki: 31-066 Kraków, ul. Skawińska 10.

LUDWIKA GIERNAT

WPLYW AKTYNOMYCYNY D NA GLEJAKI HODOWANE IN VITRO *

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Patologii AM w Łodzi
Kierownik Zakładu: prof. dr A. Kurnatowski

Chemioterapia, stosowana szeroko w onkologii ogólnej, ciągle jeszcze znajduje się w fazie prób w dziedzinie neuroonkologii. Jedną z metod badania przydatności chemioterapeutyków do leczenia określonego nowotworu jest test na hodowli tkankowej. Na podstawie danych z piśmiennictwa można sądzić, że wrażliwość komórek nowotworowych w hodowli na leki będzie choćby w pewnym stopniu odpowiadała wrażliwości w ustroju żywym, a zmiany morfologiczne w obu przypadkach okażą się podobne (Gellhorn i wsp. 1954, Mungyerova i wsp. 1965, Zeman, Mealey 1965). Stwierdzono, że glejaki złośliwe w hodowli tkankowej wykazują odmienne zmiany morfologiczne pod wpływem różnych leków i są na nie niejednakowo wrażliwe (Chen, Mealey 1970; Gazso, Afra 1969, Gellhorn i wsp. 1954, Mungyerova i wsp. 1965, Wilson, Barker 1967).

W ośrodku łódzkim od szeregu lat jest stosowany, przydatny dla celów kliniczno-morfologicznych, podział glejaków zaproponowany przez Głuszcza (1969, 1972). Zdaniem Głuszcza glejaki dysplastyczne charakteryzują się mniejszą szybkością i rozległością rozrostu niż anaplastyczne, co ujawniło się również w przebiegu wielokrotnego przeszczepiania na świnki morskie (Głuszcza i wsp. 1973). W hodowlach glejaków poza ustrojem stwierdzono także różnice morfologiczne i histochemiczne między glejakami anaplastycznymi i dysplastycznymi (Głuszcza, Giernat 1969a i b, 1970; Głuszcza i wsp. 1970), co wskazywałoby na różne właściwości biologiczne tych dwóch typów guzów.

Celem obecnej pracy było sprawdzenie, czy hodowle glejaków tych dwóch typów będą zachowywały się podobnie czy też różnie pod wpływem aktynomycyny D.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na hodowlach 12 glejaków anaplastycznych i dysplastycznych. Tkanekę nowotworową, otrzymaną podczas zabiegu opera-

* Praca częściowo finansowana z umowy polsko-amerykańskiej NIH PL 580 Research Agreement No 05-013-1.

cyjnego, wysiewano w warunkach jałowych w postaci eksplantatów o średnicy około 1 mm na szkiełka nakrywkowe pokryte żelifikowanym kolagenem wg metody Bornsteina (1958). Szkiełka te umieszczano w naczyniach Carella w medium o składzie: 50% unieczynnionej surowicy cielęcej, 4% wyciągu z 10-dniowych zarodków kurzych, 0,5% 40% glukozy i 45,5% standaryzowanego płynu Hanksa. PH medium wahało się od 7,2—7,4. Hodowle inkubowano w temp. 37° zmieniając płyn odżywczy co 3—4 dni. Po 7—14 dniach od chwili założenia hodowli każdą z nich dzielono na 4 grupy. Do 3 grup hodowli dodawano aktynomycynę D (f-my Merc) w stężeniach 0,1, 1,0 i 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Pozostałą czwartą grupę traktowano jako grupę porównawczą i do środowiska hodowlanego nie dodawano żadnego leku. Barwienie hematoksyliną — eozyną wykonywano w hodowlach po upływie 24, 48, 72 i 96 godzin od chwili podania leku. Badania na kwas dezoksyrybonukleinowy (met. Feulgena) i na kwas rybonukleinowy (met. Bracheta) wykonywano po 48 i 72 godzinach działania leku. Glikogen (wg metody Bauer-Feulgena) i tłuszcz (czerwienią oleistą O) wykrywano po 72 godzinach. Ponadto po 48 i 72 godzinach wykonywano w hodowlach utrwalonych odczyny na fosfatazę kwaśną (wg metody Gomoriego w modyfikacji Holta (1959)), a w nieutrwalonych hodowlach odczyny na diaforazę Co I (wg metody Scarpelli i wsp. w modyfikacji Barki i Andersona (1958)) oraz na dehydrogenazę glutaminianową i glukozo-6-fosforanową (wg metody Nachlasa w modyfikacji Barki i Andersona). Za wzorzec porównawczy służyły hodowle badane bez substratu.

Z preparatów barwionych hematoksyliną — eozyną wykonywano w powiększeniu 1000 \times rysunki rzutów powierzchni jąder komórkowych posługując się okularzem typu MNR 2 f-my PZO, a następnie mierzono za pomocą planimetru biegunowego (planimetr PL-1, PZO) powierzchnie rzutów 50 jąder komórek nowotworowych. Celem zmniejszenia błędu pomiaru każdy rzut jądra mierzono czterokrotnie i wyznaczano średnią arytmetyczną. Bezpośrednie wyniki pomiarów poddano analizie statystycznej wg testu t-Studenta, określając znamienność statystyczną różnic z przyjętym prawdopodobieństwem $u = 0,95$. Ze względu na znaczne różnice wielkości jąder z poszczególnych hodowli guzów, przeliczono je w stosunku procentowym przyjmując jako 100% bezpośrednie wartości średnich powierzchni rzutów jąder z grup porównawczych.

WYNIKI

Glejaki złośliwe hodowane *in vitro* cechuje różny obraz morfologiczny w zależności od typu guza. Glejaki anaplastyczne rosną w hodowli w postaci smukłych, wrzecionowatych komórek, które w części obwodowej przekształcają się w komórki trójkątne lub wielobiegunowe, gwiaździste

(ryc. 1). Komórki te mają jedno lub kilka owalnych lub okrągłych jąder o równomiernie rozłożonej chromatynie, z jednym lub kilkoma jąderkami. W glejakach anaplastycznych z oznakami dużej atypii (III B) komórki są duże, wielokształtne, często z wieloma wypustkami, mają jedno lub kilka hyperchromatycznych, różnokształtnych jąder (ryc. 2).

W hodowlach glejaków dysplastycznych stwierdza się duże komórki, często wydłużone. Cytoplazma ich jest kwasochłonna, wypustki krótkie i szerokie, jądra owalne lub okrągłe, normochromatyczne z jednym lub kilkoma jąderkami (ryc. 3). W hodowlach bardziej złośliwych, olbrzymiokomórkowych glejaków dysplastycznych komórki tworzą nieregularne skupienia, złożone z komórek olbrzymich z wypustkami krótkimi i szerokimi. Duże komórki mają też duże jądra owalne lub pęcherzykowate z równomiernie rozłożoną chromatyną oraz jednym lub kilkoma jąderkami (ryc. 4).

Aktynomycyna D dodana do płynu odżywczego w hodowli glejaków powoduje w zasadzie jednolity charakter zmian patologicznych, jednakże o różnym nasileniu, nawet w poszczególnych hodowlach, zależnie od stężenia leku i czasu jego działania. Zmiany pojawiają się najwcześniej w jądrach komórkowych. Chromatyna jądrowa staje się drobnoziarnista, następnie gruboziarnista. Jądra powiększają się i to tym wyraźniej, im dłużej działa lek zwłaszcza w wyższym stężeniu. Chromatyna jądrowa przybiera postać dość dużych grud poprzedzielanych pustymi przestrzeniami (ryc. 5—10). Jąderka początkowo dość duże i dobrze widoczne, zmniejszają się znacznie i w końcowej fazie doświadczenia są niewidoczne. Zmiany morfologiczne w cytoplazmie hodowanych glejaków tworzą się nieco później niż zmiany w jądrach i polegają na powstaniu w niej kwasochłonnych ziarnistości (ryc. 6). Wypustki komórkowe skracają się i poszerzają, a następnie giną (ryc. 7, 8). W uszkodzonych komórkach pojawiają się drobne wodniczki (ryc. 9, 10) oraz nieliczne, kwasochłonne, bezpostaciowe masy (ryc. 9). Kończym wynikiem działania aktynomycyny D jest martwica komórek. Jednakże w preparatach z hodowli po różnych okresach czasu działania leku w różnych stężeniach widoczne były komórki nie uszkodzone lub mniej uszkodzone niż większość komórek w danym preparacie.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) w komórkach glejaków z grup porównawczych barwił się słabo różowo wg metody Feulgena (ryc. 11). To niezbyt natężone, różowe zabarwienie, równomiernie obejmowało całe jądro komórkowe. W preparatach z hodowli poddanych działaniu aktynomycyny D w powiększonych jądrach komórkowych DNA stwierdzano w postaci wyraźnie różowych grudek poprzedzielanych słabo zabarwionymi przestrzeniami. Ten ziarnisty układ DNA był coraz bardziej wyraźny, a ogólne natężenie zabarwienia stawało się coraz słabsze w miarę zwiększania się stężenia i czasu działania leku (ryc. 12—14).

Kwas rybonukleinowy (RNA) barwił się bardzo słabo wg metody Bracheta w komórkach hodowanych glejaków zarówno z grup porównawczych, jak i w komórkach poddanych działaniu aktynomycyny D. Dodatni odczyn stwierdzałam w całej cytoplazmie.

Barwienie na tłuszcz czerwieńią oleistą O nie wykazało w komórkach z grup porównawczych obecności tłuszczu. W hodowlach glejaków poddanych działaniu aktynomycyny D stwierdzałam komórki zawierające drobne kuleczki czerwono zabarwione. Liczba komórek zawierających te kuleczki zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia leku.

Barwienie na glikogen wypadło ujemnie zarówno w komórkach glejaków grup porównawczych, jak i w komórkach poddanych działaniu aktynomycyny D.

Odczyn na kwaśną fosfatazę w komórkach glejaków w grupach porównawczych okazał się dodatni pod postacią niezbyt licznych brunatnych ziaren (ryc. 15). Pod wpływem aktynomycyny D, zwłaszcza w wyższych stężeniach i po dłuższym okresie jej działania w większości komórek — odczyn ten nasilał się. Wtedy ziarna barwnika były znacznie większe niż w komórkach z grup porównawczych i czasem zajmowały całą komórkę (ryc. 16, 17).

W odczynach ujawniających aktywność dehydrogenazy glutaminianowej, glukozo-6-fosforanowej oraz diaforazy Co I w cytoplazmie komórek hodowli grup porównawczych występowały drobne ziarna granatowego formazanu (ryc. 18, 21, 24). Aktynomycyna D zastosowana w małych stężeniach wywoływała pojawienie się obok wielu drobnych ziarn także nielicznych grubych (ryc. 19, 22, 25). W hodowlach poddawanych działaniu leku w wyższych stężeniach i przez dłuższy okres czasu nasilenie odczynów nieco słabło (ryc. 20, 23, 26), natomiast w cytoplazmie niekiedy pojawiały się niezabarwione drobne przestrzenie otoczone obwódką niebieskiego barwnika (ryc. 20).

Ze średnich pomiarów planimetrycznych rzutów powierzchni jąder komórkowych sporządzono zestawienie, w którym glejaki złośliwe uszeregowano w grupach wg podziału Głuszcza (1969, 1972).

Z danych liczbowych przedstawionych w tej tabeli wynika, że powiększenie jąder komórkowych pod wpływem działania aktynomycyny D dotyczy wszystkich grup hodowanych glejaków, jednakże w różnym stopniu. I tak w hodowli 536, pochodzącej z guza sklasyfikowanego na pograniczu I/II B powiększenie średnich następuje powoli, dochodząc po dawce 10,0 µg/ml aktynomycyny D po 72 godzinach jej działania do wielkości o 24% wyższej niż w grupie porównawczej. W grupie 4 hodowli (566, 561, 501, 560) z glejaków typu II B wzrost wielkości średnich następuje szybciej i już po 48 godzinach działania leku w dwóch hodowlach tej grupy dochodzi do dwukrotnego powiększenia wielkości średnich.

Tabela 1. Wielkości średnich rzutów powierzchni jąder komórkowych hodowanych glejaków po zastosowaniu Aktynomycyny D
 Table 1. Sizes of mean surface projections of cell nuclei of cultured gliomas after application of actinomycin D.

Czas (godz.) Time (hours)	Ilość leku ($\mu\text{g/ml}$) Dose	536 I/II B	502 II B	566 II B	560 II B	561 II B	483 II/III B	488 III B	515 III B	473 II C	496 II C	458 III C	489 III C
24	0,1	98,28	129,74	117,88		147,35	201,44	158,40	150,62	95,00	236,96	228,47	111,73
	1,0	111,56	129,35	116,88	137,36	186,36		374,74	153,84	94,24	220,04	426,58	175,27
	10,0	163,04	137,74	155,16	147,85	170,12	133,88	160,98	203,63	134,23	200,41	207,07	227,68
48	0,1	121,36	111,79	172,48	157,83	182,75	116,25	193,86	190,09	139,76	328,34	460,70	174,74
	1,0	121,03	129,90	185,68	160,26	236,08	145,94	236,37	127,33	134,70	252,26	177,19	153,20
	10,0	126,75	186,05	223,48	159,24	213,53	214,63	225,58	161,05	144,34	237,61	244,21	144,45
72	0,1			123,12	115,74	252,76	212,25	mm	121,11	150,02		mm	155,35
	1,0			158,92	154,77	275,65	171,75	mm	110,53	99,74		mm	89,89
	10,0	124,47		217,16	145,25	226,72	170,25	302,39	116,08	84,66		264,13	151,08
96	0,1			343,00	161,80	224,58	183,56	mm	mm	87,97	mm	313,46	127,35
	1,0			219,80	mm	238,11	259,19	mm	mm	80,52	mm	mm	147,10
	10,0		155,54	210,40	237,91	230,78	124,31	mm	mm	91,21	mm	mm	525,79

Różnice znamienne statystycznie podkreślono

Differences statistically significant underlined

Za 100 przyjęto wielkości średnich z grup porównawczych

The mean values from reference groups were taken as 100.

W pozostałych dwóch hodowlach z tej grupy powiększenie średnich jest mniej pokaźne, ale szybsze niż w hodowli guza sklasyfikowanego jako I/II B.

W hodowli 483 z guza zaklasyfikowanego jako II/III B wielkość średnich powierzchni rzutów jąder komórkowych wzrasta nieco szybciej niż w grupie hodowli z glejaków sklasyfikowanych jako II B. W grupie hodowli glejaków zaszeregowanych do typu III B (515, 488) wzrost średnich już w pierwszej dobie osiąga wielkość dwukrotnie (515), a nawet trzykrotnie (488) wyższą w zestawieniu z grupami porównawczymi. W następnej dobie wzrost ten również jest wysoki, zwłaszcza w guzie 488, natomiast po 72 godzinach działania leku w hodowli 515 średnie maleją, a w innej — 488 po zadziałaniu aktynomycyny D nie mogłam określić średnich, ponieważ nie znajdowałam już w preparatach komórek. Również z tych powodów nie ma w tabeli wyników wielkości średnich w obydwu guzach po 96 godzinach działania leku.

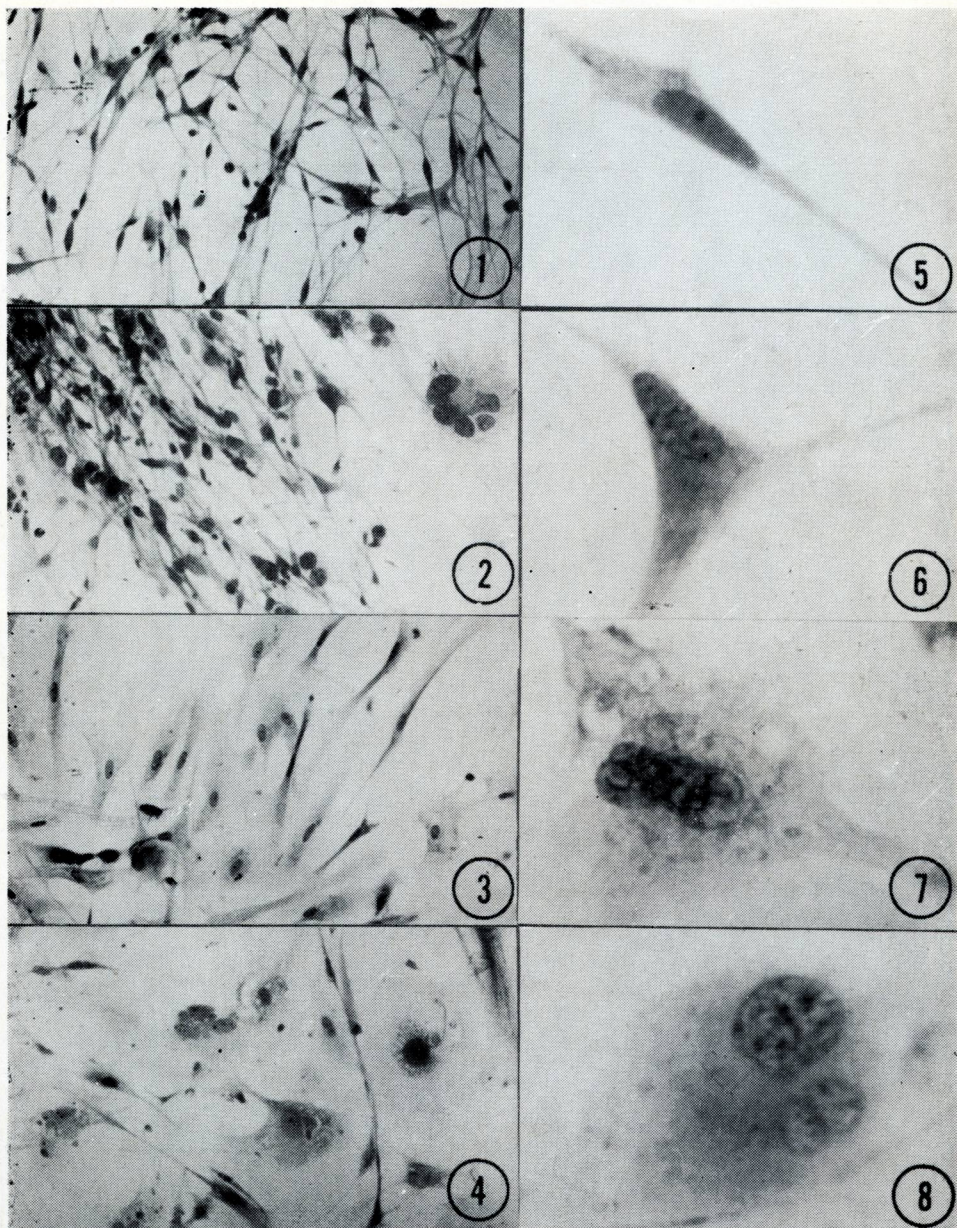
W grupie hodowli glejaków dysplastycznych różnice wielkości średnich rzutów powierzchni jąder komórkowych również istniały, ale w sposób nieuporządkowany.

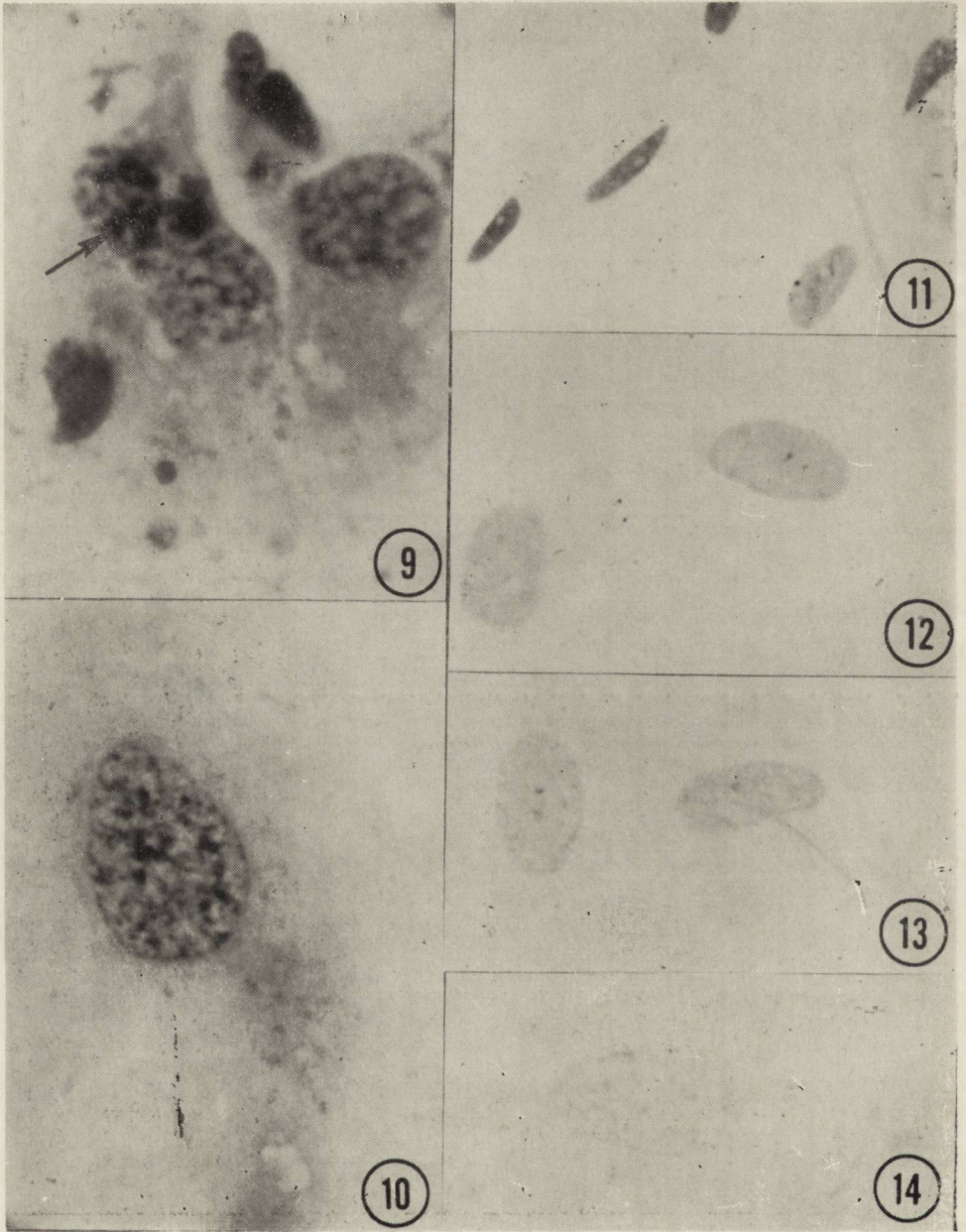
I tak w hodowli 473 pochodzącej z glejaka typu II C wzrost wielkości średnich w miarę upływu czasu i w zależności od dawki, jest powolny, natomiast w innej hodowli — 496 — także pochodzącej z glejaka typu II C, gwałtowny, podobny do wzrostu wielkości średnich w grupie glejaków typu III B.

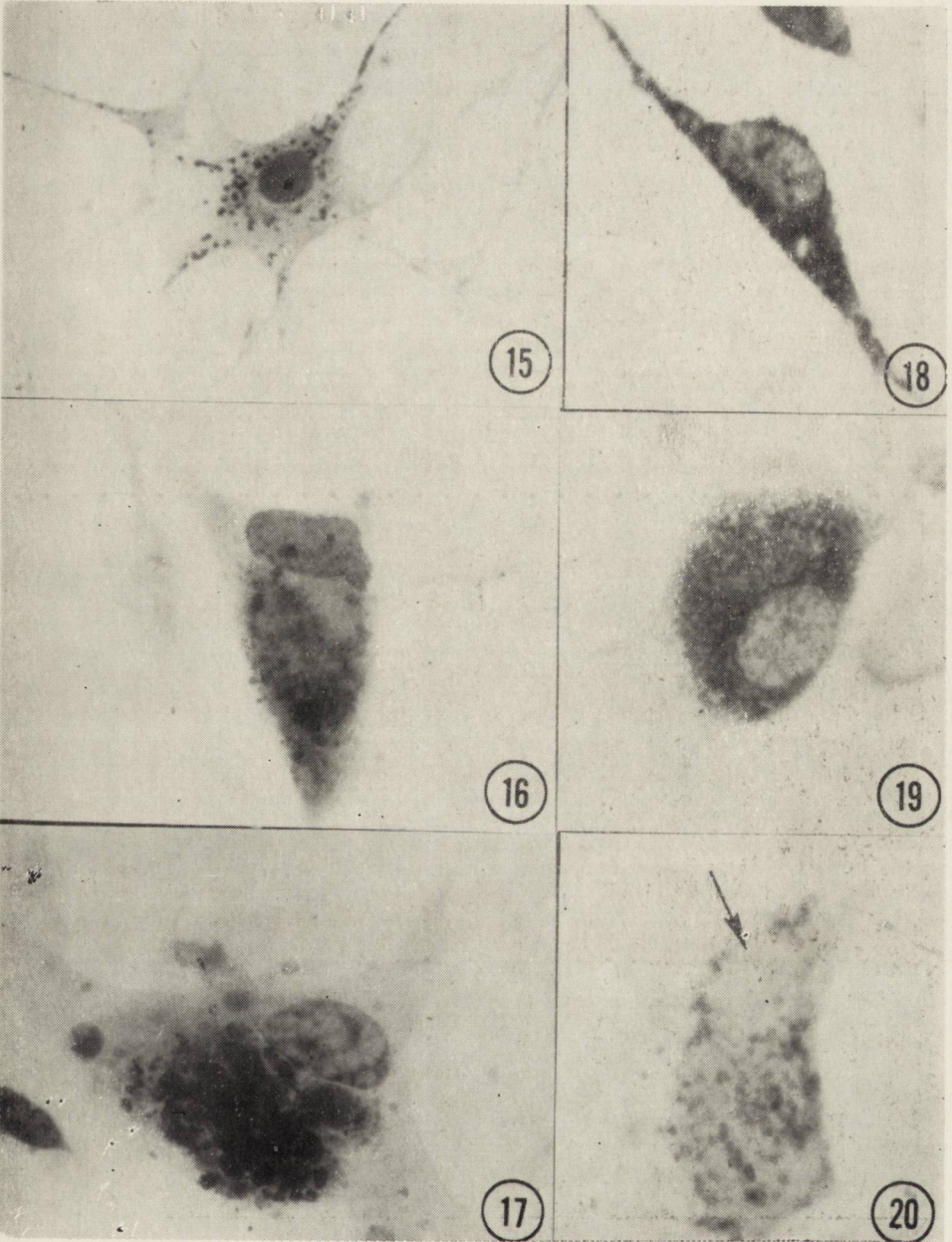
To samo dotyczy hodowli glejaków grupy III C. W jednym z tych guzów (489) wielkość średnich wzrasta wolniej niż w innym (458), w którym wzrost wielkości średnich dokonuje się bardzo raptownie i nasila się również w drugiej dobie. W trzeciej dobie doświadczenia nie mogłam obliczyć wartości średnich dla 1 guza (458) z powodu braku komórek w preparatach. Z tego samego powodu nie podałam wartości średnich dla obydwu guzów z grupy III C po 96 godzinach działania leku.

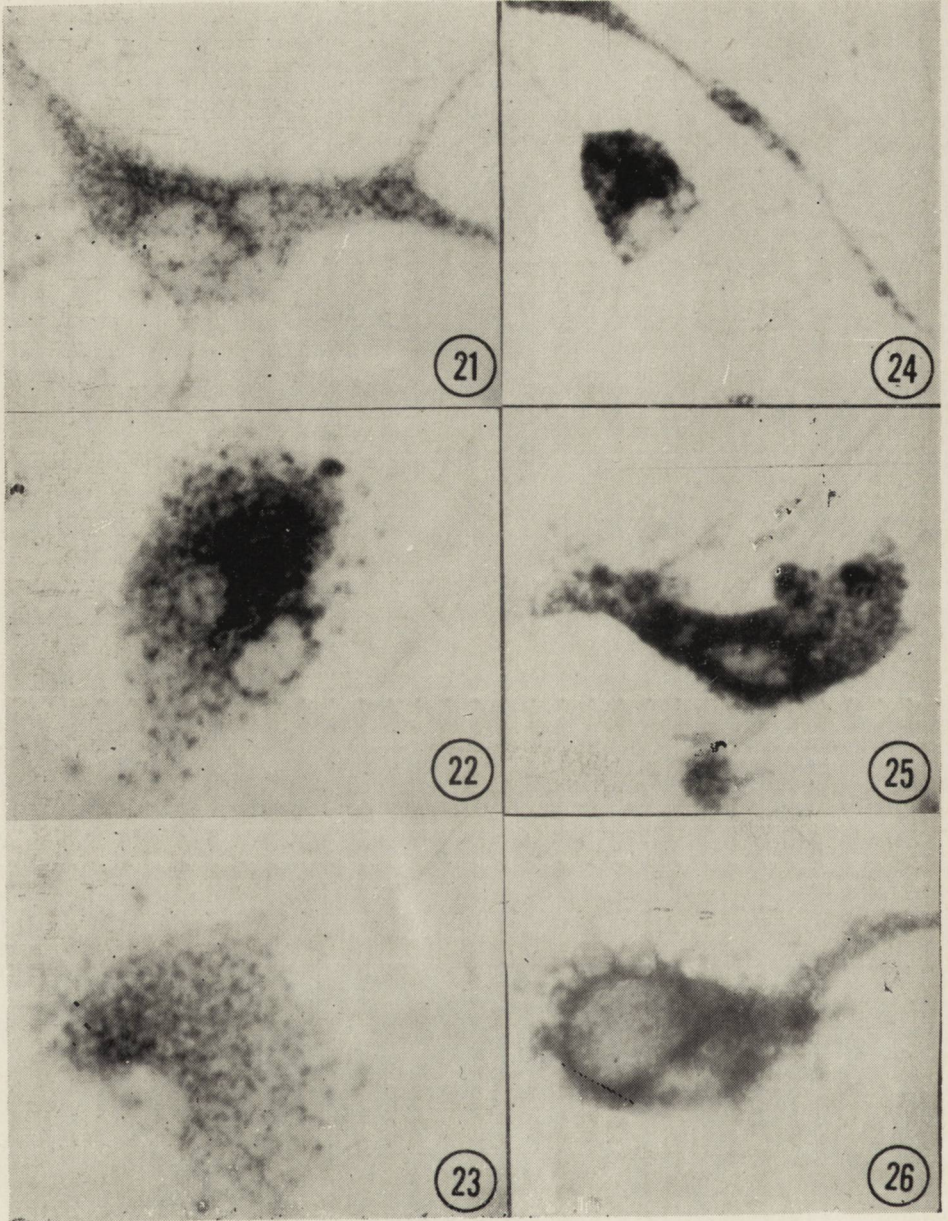
OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że morfologiczny charakter komórek wyrastających z poszczególnych eksplantatów w danym typie guza jest zawsze jednakowy niezależnie od miejsca ich pobrania. Świadczy to, że komórki danego glejaka pochodzą ze wspólnego pnia, a tylko ulegają wtórnie zmianom morfologicznym pod wpływem różnych czynników wewnątrzustrojowych. Podobnego zdania jest Kersting (1961a i b). Jednolity charakter wzrostu nowotworu w wielu hodowlach z tego samego guza pozwala uznać zespół hodowli pierwotnych danego glejaka za materiał jednorodny.









Do badań zastosowano aktynomycynę D, antybiotyk zaburzający syntezę kwasów rybonukleinowych, dezoksyrybonukleinowego oraz przemianę białek (Fuller, Reich 1963; Hennings i wsp. 1968; Schwartz i wsp. 1963; Young 1969). Uważa się, że ten lek oddziałuje na komórki najsilniej w fazie G-1 okresu międzypodziałowego (Epifanova i wsp. 1969, Kim i wsp. 1968). Przeprowadzone badania wykazały, że lek ten uszkadza komórki hodowanych glejaków. Na plan pierwszy wysuwają się zmiany morfologiczne w jądrach komórkowych polegające na ich powiększeniu, rozproszeniu chromatyny jądrowej oraz zmniejszeniu wymiarów jąderek. Podobne zmiany spostrzegali Kałuża i Stefanicka-Wiechowca (1967) pod wpływem aktynomycyn C i K w jądrach komórkowych hodowanych glejaków a Gazso i Afra (1969) po stosowaniu aktynomycyny D i C. Wilson i Barker (1967) obserwowali podobne zmiany w układzie chromatyny jądrowej pod wpływem mithramycyny w hodowlach glejaków. Zarówno aktynomycyny jak i mithramycyny mają podobny mechanizm działania polegający na trwałym łączeniu się z kwasem dezoksyrybonukleinowym. W związku z tym wydaje się, że zmiany układu chromatyny jądrowej i powiększenie jąder można uzależnić od tego mechanizmu działania. Być może zmiany te zależą od patologicznego układu kwasu dezoksyrybonukleinowego związanego z aktynomycyną D, bądź od powstawania wodniczek w jądrach komórkowych (tzw. wodniczki obrzęku jądra) — oznaki ich uszkodzenia (Palkowits, Fischer 1968). Zmniejszenie jąderek a nawet ich znikanie w komórkach poddanych działaniu aktynomycyny D zależy prawdopodobnie od hamowania przez ten lek syntezy kwasu rybonukleinowego.

Odczyn na kwas dezoksyrybonukleinowy w komórkach hodowanych glejaków, poddanych działaniu aktynomycyny D ujawniał się pod postacią rozproszonych grud tego kwasu oraz nieznacznie słabszego zabarwienia jąder. Jednakże ze względu na powiększenie jąder i ogólnie słabe ich zabarwienie, nie można było ocenić czy zależy ono od rozproszenia kwasu dezoksyrybonukleinowego w powiększonych jądrach czy od rzeczywistego zmniejszenia ilości DNA.

Charakter zmian patologicznych w cytoplazmie glejaków wskazuje na znaczne ich uszkodzenie przez aktynomycynę D. Różnice w nasileniu odczynów na aktywność enzymów oddechowych w komórkach hodowanych glejaków ujawniające się pod wpływem leku mogą być następstwem rzeczywistych zmian aktywności tych enzymów, niejednakowej przepuszczalności błon mitochondrialnych lub oznaką uszkodzenia mitochondriów przez ten lek (Pearse 1962, Presnow 1963, Żydowo 1962). Wodniczki stwierdzone w cytoplazmie po zadziałaniu aktynomycyny D mogą mieć dwojakie pochodzenie. Jedne z tych wodniczek to puste przestrzenie po wyługowanym tłuszczu, o czym świadczy dodatni odczyn po zastosowaniu czerwieni olejowej 0, inne natomiast są właściwymi wodnicz-

kami, ponieważ barwienia na tłuszcz i glikogen wypadły w nich ujemnie. Prawdopodobnie są to powiększone mitochondria, na co wskazywałyby obecność dużych ziaren formazanu w komórkach, a niekiedy nawet pustych przestrzeni (wodniczek) otoczonych niebieskim rąbkiem w odczynach na enzymy oddechowe. Sugestię tę potwierdzają badania Hajdukiewicza (1974), który za pomocą mikroskopu elektronowego ustalił, że w komórkach nowotworu przeszczepialnego NK/Ly pod wpływem aktynomycyny D mitochondria powiększają się do znacznych rozmiarów.

Odczyny ujawniające aktywność kwaśnej fosfatazy nasilały się znacznie pod wpływem działania leku, a przy wyższych stężeniach i dłuższym czasie działania antybiotyku stawały się rozlane w niektórych komórkach. Zjawisko to pozwala przypuszczać, że aktynomycyna D powoduje znaczne uszkodzenie komórek wyrażające się zmianami morfologicznymi nawet w ich organellach (Novicoff 1962).

Kwasochłonne masy w cytoplazmie niektórych komórek hodowanych glejaków spostrzegali również Kałuża i Stefanicka-Wiechowa (1967) w badaniach nad wpływem aktynomycyny C i K, jednakże nie wyjaśnili mechanizmu powstawania tych mas. Również i w moich badaniach nie udało mi się ustalić ich pochodzenia.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w komórkach glejaków hodowanych *in vitro* zmiany patologiczne po zastosowaniu aktynomycyny D są tym większe im wyższe było jej stężenie w hodowli i im dłuższy okres jej działania. Ponadto w badanych hodowlach podczas działania leku w różnych okresach czasu i różnych stężeniach można było zauważyć komórki nieuszkodzone lub uszkodzone w mniejszym stopniu niż większość komórek w preparacie. Może to zależeć od indywidualnej odporności poszczególnych komórek, od różnic w przepuszczalności ich błon komórkowych ewentualnie od etapu cyklu rozwojowego, w którym komórki znajdowały się w chwili rozpoczęcia doświadczenia.

Z obserwacji zmian morfologicznych w badanych hodowlach wynika, że aktynomycyna D powoduje powiększenie wymiarów jąder komórkowych. Według Kuciasa (1966) jednym ze sposobów określenia objętości jąder komórkowych może być pomiar planimetryczny rzutów ich powierzchni. Dlatego też przyjęto jako wskaźnik wielkości jąder, wielkość powierzchni ich rzutu. Ponieważ zmiany wielkości jąder postępowały równocześnie z uszkodzeniem cytoplazmy, jako kryterium oceny wrażliwości hodowli na lek przyjęto zmiany wielkości jąder komórkowych. Z analizy wielkości średnich rzutu powierzchni jąder komórkowych (tabela 1) wynika, że glejaki różnych typów charakteryzują się różnym stopniem wrażliwości na aktynomycynę D. W grupie glejaków anaplastycznych stwierdzono, że mniej złośliwe glejaki (grupy II B) oddziałują słabiej na aktynomycynę D niż glejaki typu III B. Hodowla pochodząca z glejaka zajmującego miejsce pośrednie pomiędzy grupą I B i II B

reagowała na aktynomycynę D słabiej niż hodowle glejaków grupy II B. Natomiast inna hodowla z glejaka typu II/III B oddziaływała nieco silniej niż glejaki typu II B, jednakże słabiej niż hodowle glejaków grupy III B.

Stopień oddziaływania na aktynomycynę D glejaków dysplastycznych jest różny bez względu na ich przynależność do grupy II C, czy III C. I tak jedna hodowla pochodząca z guza typu II C reagowała na aktynomycynę D o wiele słabiej niż inna hodowla z glejaka tego samego typu. Podobne zjawisko obserwowano w glejakach grupy III C. Zależność szybkości reakcji glejaków anaplastycznych na aktynomycynę D od stopnia zróżnicowania guza wiąże się prawdopodobnie z hamowaniem przez ten lek syntezy białek w wyniku blokowania syntezy RNA. Wiadomo, że w komórkach bardziej zróżnicowanych wszelkie przemiany, zwłaszcza przemiana białkowa, przebiegają wolniej niż w komórkach mniej zróżnicowanych. Dlatego też uszkodzenie hodowanych komórek glejaków mniej zróżnicowanych (III B) występuje szybciej niż komórek glejaków II B. Z badań Głuszcza wynika, że komórki glejaków dysplastycznych charakteryzują się bardzo różnym nasileniem przemiany materii i być może dlatego reakcja tych glejaków na aktynomycynę D jest bardzo różnorodna.

WNIOSKI

1. Aktynomycyna D uszkadza komórki hodowanych glejaków złośliwych, przy czym nasilenie zmian patologicznych zależy od stężenia cytostatyku i czasu jego działania.
2. Aktynomycyna D działa bardziej uszkadzająco na hodowle glejaków anaplastycznych o większej złośliwości niż na hodowle glejaków tego samego typu o mniejszej złośliwości.
3. Glejaki dysplastyczne reagują różnorodnie na aktynomycynę D dodaną do środowiska inkubacyjnego hodowli.
4. Poszczególne komórki tego samego guza wykazują dość znaczne różnice w reakcji na lek.

Л. Гернат

ВЛИЯНИЕ АКТИНОМИЦИНА Д НА ГЛИОМЫ КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ IN VITRO

Резюме

Исследовали влияние актиномицина Д на культуру глиом из надпалочной области мозга. Для классификации этих глиом использовали принцип, предложенный Глушцем.

Установлено, что культуры анапластических глиом с невысокой степенью злокачественности реагируют на актиномицин Д слабее, чем культуры глиом той же группы, но с высокой степенью злокачественности.

Установлено, что степень чувствительности культуры диспластических глиом на актиномицин Д различна и не зависит от степени их злокачественности.

L. Giernat

EFFECT OF ACTINOMYCIN D ON GLIOMAS CULTURED IN VITRO

Summary

The study deals with the effect of actinomycin D on the cultures of supratentorial gliomas of brain. The gliomas were classified according to Głuszczyk (1972).

It was found that the cultures of anaplastic gliomas of a lower degree of malignancy are less sensitive to actinomycin D than those of the same group of a higher degree of malignancy. The vulnerability of the cultures of dysplastic gliomas to the drug was observed to be independent of the degree of their malignancy, though differed in various gliomas.

PIŚMIENNICTWO

1. Alwasiak J.: Zmiany mikroskopowe w pooperacyjnych wznowach i pozostałościach glejaków nadnamiotowych mózgu. Rozprawa doktorska, Łódź, 1969.
2. Borstein M. B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue culture on cover slip in Maximov slides and roller tubes. *Lab. Invest.* 1958, 7, 134—237.
3. Chen T. T., Mealey J. Jr.: Microculture of human brain tumors. *Cancer Chemother. Rep.* 1970, 54, 1, 9—14.
4. Epifanova O. I., Smolenskaya I. N., Sevastyanova M. W., Kudryamova A. G.: Effects of actinomycin D and puromycin on the mitotic cycle in synchronised cell culture. *Exp. Cell. Research* 1969, 58, 401—410.
5. Fuller W., Reich E.: X-ray diffraction and molecular model building studies of the interaction of actinomycin with nucleic acids. *Nature* 1963, 198, 538—540.
6. Gazso L. A. and Afra D.: Study on the effect of actinomycins in tissue cultures from human brain tumours. *Acta Neurochir.* 1969, 21, 139—153.
7. Gellhorn A., Peterson E. R., Kells A., Hirschberg E., Murray M. R.: The effects of 6-mercaptopurine, 8-azaguanine and 1,4-dinethanosulfonyloxybutane on an experimental brain tumor: preliminary observations. *Annales New York Academy of Sciences* 1954, 60, 273—282.
8. Głuszczyk A.: Grouping of supratentorial gliomas according to their dominant biomorphological features. *Acta Neuropath.* 1972, 22, 110—126.
9. Głuszczyk A.: Podstawowe zasady tzw. krzyżowego podziału glejaków. *Annales Academiae Medicae Lodziensis* 1969, XI, 7—16.
10. Głuszczyk A., Alwasiak J., Papierz W., Lach B.: Obserwacje morfologiczne glejaków w przebiegu wielokrotnego przeszczepiania na świnki morskie. *Neuropat. Pol.* 1973, XI, 1, 11—21.
11. Głuszczyk A., Giernat L.: The activity of oxidative enzymes in short-term explant cultures of gliomas in vitro. I. Coenzyme I bound dehydrogenases and succinate dehydrogenase. *Folia Histochem. et Cytochem.* 1969, 7, 1, 15—22.
12. Głuszczyk A., Giernat L.: The activity of oxidative enzymes in short-term explant cultures of gliomas in vitro II. Coenzyme I and II bound dehydrogenases and NADPH-diaphorase. *Folia Histochem. Cytochem.* 1969, 7, 4, 417—430.
13. Głuszczyk A., Giernat L.: Cytochemical distribution of the activity of some oxidoreductases in giant-cell gliomas cultured in vitro. *Folia Histochem. Cytochem.* 1970, 8, 191—200.

14. Głuszczyk A., Giernat L., Drab A.: Rozmieszczenie aktywności adenozynotrójfosfatazy w hodowlach *in vitro* glejaków mózgu. *Neuropat. Pol.* 1970, VIII, 1, 87—96.
15. Hajdukiewicz Z.: Informacja ustna. 1974.
16. Hennings H., Smith H. C., Colburn N. H., Boutwell R. K.: Inhibition by Actinomycin D of DNA and RNA synthesis initiated by 7,12-Dimethylbenz (α) anthracene or propiolactone. *Cancer Research* 1968, 28, 543—552.
17. Holt S. J.: Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. *Exp. Cell Res. Suppl.* 1959, 7, 1—27.
18. Kałuża J., Stefanicka-Wiechowa A.: The cytotoxic and cytostatic effect of actinomycins C and K on glia like tumors growing *in vitro*. *Arch. Immun. Ther. Exper.* 1967, 15, 141—147.
19. Kersting G.: *Die Gewebstüchtung menschlicher Hirngeschwülste.* Springer Verlag Berlin 1961, 1—117.
20. Kersting G.: Die Ordnung der Hirngeschwülste und ihr Verhalten *in vitro*. *World Neurology* 1961, 1, 406—415.
21. Kim J. H., Gelbard A. S., Perez A. G.: Inhibition of DNA synthesis by actinomycin D and cycloheximide in synchronized HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 1968, 478—487.
22. Kucias J.: Untersuchungen über die Beziehung der Kern-Plasma-Relation zur Kerngröße. *Biologisches Zentrallblatt* 1966, 85, 6, 759—769.
23. Mungyerova G., Jacz K., Kuzma I., Babusikova O., Kalafut F.: Experiences with malignant brain tumours in clinic and in tissue culture. *Acta Neurochirurgica* 1965, 13/3—4, 393—406.
24. Novicoff A. B.: Lysosomes and the physiology and pathology of cells. *Folia Morph.* 1962, XII, 175—279.
25. Palkowits M., Fischer J.: Karyometric investigation. *Akademiai Kiadó Budapest* 1968.
26. Pearse A. G. E.: Principles of dehydrogenase chemistry. *Folia Morph.* 1962, XII, 281—288.
27. Presnow M. A.: Gistologiczeskije i gistochimiczeskije dannyje o processie regresji eksperimentalnych opucholej. *Materiały VIII Kongresu Przeciwrakowego, Moskwa* 1963.
28. Scarpelli D. G., Hess R., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 747—752.
29. Schwartz H. S., Sternberg S. S., Philips F. S.: Pharmacology of mitomycin. IV. Effects *in vivo* on nucleic acid synthesis comparison with actinomycin D. *Cancer Research* 1963, 23, 8, 1125—1136.
30. Wilson Ch., Barker M.: Relative cytotoxicity of mithramycin and vinblastine in cell culture of human neural tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* 1967, 38, 459—467.
31. Young Ch. W.: Actinomycin and antitumor antibiotics. *Am. J. Clin. Path.* 1969, 52, 130—137.
32. Zeman W., Mealey J.: Drug induced cytochemical changes in a glioblastoma. *Ann. Histochem.* 1965, 10, 61—70.
33. Żydowo M.: Biochemia izolowanych mitochondriów. *Folia Morph.* 1962, 12, 263—274.

Adres autorki: Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Patologii AM, 90-139 Łódź, ul. Narutowicza 96.

PODPISY POD RYCINY

- Ryc. 1.* Komórki z hodowli glejaka typu II B. H.-E. Pow. 300 ×.
Fig. 1. Cells of glioma type II B culture. H.-E. × 300.
- Ryc. 2.* Komórki z hodowli glejaka typu III B. H.-E. Pow. 300 ×.
Fig. 2. Cells of glioma type III B culture. H.-E. × 300.
- Ryc. 3.* Komórki z hodowli glejaka typu II C. H.-E. Pow. 300 ×.
Fig. 3. Cells of glioma type II C culture. H.-E. × 300.
- Ryc. 4.* Komórki z hodowli glejaka typu III C. H.-E. Pow. 300 ×.
Fig. 4. Cells of glioma type III C culture. H.-E. × 300.
- Ryc. 5.* Komórka glejaka pochodząca z grupy porównawczej hodowli. H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 5. Cell of a reference glioma culture. H.-E. × 800.
- Ryc. 6.* Nieznaczne powiększenie jądra, ziarnisty układ chromatyny oraz poszerzenie wypustek. 24-godzinne działanie aktynomycyny D w stężeniu 10,0 µg/ml. H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 6. Slight enlargement of nucleus, granular arrangement of chromatin and dilatation of cell processes. 24 hrs after administration of 10 µg/ml of actinomycin D. H.-E. × 800.
- Ryc. 7.* Powiększenie jądra i ziarnisty układ chromatyny, szerokie i krótkie wypustki oraz obecność wodniczek w cytoplazmie. 48 godzin działania aktynomycyny D w ilości 10,0 µg/ml. H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 7. Enlargement of nucleus and granular arrangement of chromatin, broad and short processes, vacuoles in cytoplasm. 48 hrs after administration of 10,0 µg/ml of actinomycin. H.-E. × 800.
- Ryc. 8.* Duże jądro o nieprawidłowym układzie chromatyny oraz zanik wypustek. 72 godziny działania aktynomycyny D w ilości 1,0 µg/ml H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 8. Large nucleus with abnormal arrangement of chromatin and disappearance of cell processes. 72 hrs after administration of 1.0 µg/ml of actinomycin. H.-E. × 800.
- Ryc. 9.* Kwasochłonne masy w cytoplazmie komórki (strzałka). 72 godz. działania aktynomycyny D w stężeniu 10 µg/ml. H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 9. Acidophilic masses in glioma cell cytoplasm (arrow). 72 hrs following administration of actinomycin in a dose of 10 µg/ml. H.-E. × 800.
- Ryc. 10.* Powiększenie jądra oraz ziarnisty układ chromatyny w komórce. 72 godziny działania aktynomycyny D w ilości 10,0 µg/ml. H.-E. Pow. 800 ×.
Fig. 10. Enlargement of nucleus and granular arrangement of chromatin in a cell of a culture subjected to 72-hour incubation in the presence of 10 µg/ml of actinomycin D. H.-E. × 800.
- Ryc. 11.* Kwas dezoksyrybonukleinowy w jądrach komórek glejaka z grupy porównawczej hodowli. Odczyn wg Feulgena. Pow. 800 ×.
Fig. 11. DNA in nuclei of cells of a reference glioma culture. Feulgen meth. × 800.
- Ryc. 12.* Powiększenie jąder i osłabienie odczynu na DNA. 48 godzin działania aktynomycyny D w dawce 0,1 µg/ml. Odczyn wg Feulgena. Pow. 800 ×.
Fig. 12. Enlargement of nuclei and decrease of DNA reaction in glioma cells. 48 hrs following administration of actinomycin D in a dose of 0.1 µg/ml. Feulgen meth. x 800.

Ryc. 13. Ziarnisty układ DNA w powiększonych jądrach komórek glejaka. 72 godz. działania aktynomycyny D w stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn wg Feulgena. Pow. 800 \times .

Fig. 13. Granular arrangement of DNA in enlarged nuclei of glioma cells. 72 hrs following administration of actinomycin D in a dose of 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Feulgen meth. \times 800.

Ryc. 14. Powiększone jądro o nieprawidłowym układzie chromatyny. 72 godz. działania aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn wg Feulgena. Pow. 800 \times .

Fig. 14. Enlarged nucleus with abnormal arrangement of chromatin after 72-hour treatment with 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Feulgen meth. \times 800.

Ryc. 15. Drobne ziarenka produktu reakcji enzymatycznej w komórce glejaka z grupy porównawczej hodowli. Odczyn na kwaśną fosfatazę Pow. 800 \times .

Fig. 15. Small granules of enzymatic reaction product in a glioma cell from a reference culture. Acid phosphatase reaction. \times 800.

Ryc. 16. Powiększenie ziarn barwnika w komórce z hodowli poddanej działaniu aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 48 godzin. Odczyn na fosfatazę kwaśną. Pow. 800 \times .

Fig. 16. Enlargement of pigment granules in a cell of glioma culture treated for 48 hrs with 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Acid phosphatase reaction. \times 800.

Ryc. 17. Grube zlewające się ziarna produktu reakcji w komórce z hodowli poddanej przez 72 godz. działaniu aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn na kwaśną fosfatazę. Pow. 800 \times .

Fig. 17. Thick fusing granules in acid phosphatase reaction in a cell from glioma culture treated for 72 hrs with 10,0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Acid phosphatase reaction. \times 800.

Ryc. 18. Komórka glejaka z hodowli nie poddanej działaniu leku. Odczyn na diaforazę Co I. Pow. 800 \times .

Fig. 18. Cell from glioma culture not treated with the drug. Diaphorase Co I reaction. \times 800.

Ryc. 19. Powiększenie ziaren formazanu w komórce glejaka z hodowli po 48-godz. działaniu aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn na diaforazę Co I Pow. 800 \times .

Fig. 19. Enlargement of phormasan granules in a cell of glioma culture after 48-hour treatment with 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Diaphorase Co I reaction. \times 800.

Fig. 20. Decrease of staining and empty spaces surrounded by an edge of heavy blue pigment (arrow). 72 hrs after administration of 10,0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Diaphorase Co I reaction. \times 800.

Fig. 20. Decrease of staining and empty spaces surrounded by an edge of heavy blue pigment (arrow). 72 hrs after administration of 10,0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Diaphorase Co I reaction. \times 800.

Ryc. 21. Komórka z grupy porównawczej hodowli złośliwego glejaka. Odczyn na dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową. Pow. 800 \times .

Fig. 21. Cell from reference glioma culture. Glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction. \times 800.

Ryc. 22. Grube ziarna formazanu w komórce z hodowli glejaka po 48-godz. działaniu aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn na dehydrogenazę glukozo-6 fosforanową. Pow. 800 \times .

Fig. 22. Thick phormasan granules in a cell of glioma culture subjected to 48-hour treatment with 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction. \times 800.

Ryc. 23. Osłabienie odczynu na dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową 72 godz. po dodaniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ aktynomycyny D do hodowli. Pow. 800 \times .

Fig. 23. Decrease of glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction 72 hrs after administration of 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. \times 800.

Ryc. 24. Odczyn na dehydrogenazę glutaminianową w komórce glejaka z hodowli nie poddanej działaniu leku. Pow. 800 \times .

Fig. 24. Glutamate dehydrogenase reaction in a cell of glioma culture not treated with the drug. \times 800.

Ryc. 25. Liczne, duże ziarna formazanu w komórce z hodowli glejaka po 48 godz. działania aktynomycyny D w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Odczyn na dehydrogenazę glutaminianową. Pow. 800 \times .

Fig. 25. Numerous large phormasan granules in a cell from glioma culture subjected to 48-hour treatment of 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. Glutamate dehydrogenase reaction. \times 800.

Ryc. 26. Osłabienie odczynu na dehydrogenazę glutaminianową po 72 godz. działania aktynomycyny w stężeniu 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Pow. 800 \times .

Fig. 26. Decrease of glutamate dehydrogenase reaction 72 hrs after administration of 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of actinomycin D. \times 800.

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA, JADWIGA PANKRAC,
ANDRZEJ GONCERZEWICZ

MYELIN LIPIDS IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS *)

Department of Neurology, Institute of Nervous and Sensory Organs Diseases,
Medical Academy, Poznań
Head: Prof. Dr. M. Wender

The immunological response of the nervous tissue to administration of cerebral antigen results in the well known experimental allergic encephalomyelitis (EAE), a pathological process in which, besides morphological alterations in the nervous tissue, there occur widespread and diverse metabolic deviations.

Reports may be found in the literature on disorders in the metabolism of nitrogen components, both micro- and macromolecular ones, and in the turnover of cerebral lipid components in EAE (Adamczewska, 1971; Benetato et al., 1965, Smith, 1965; 1969a; Turský, 1968; Wajda et al., 1969; Wender et al., 1972).

As far as disturbances in the lipid composition and metabolism are concerned, it is not clear, whether they concern solely the myelin lipids or whether other components of the nervous tissue are involved as well. This question is of high significance, since in spite of the obvious injury from which myelin suffers in EAE, almost nothing is known about the mechanisms responsible for myelin decomposition in this as well as in other demyelinating processes. As has been stressed by Wiśniewski et al. (1969), it was impossible to ascertain definitively the role played by cellular infiltrates, by oligodendroglial cells functionally closely related to myelin and, finally, effects of the human factors involved in this pathological process.

The blood serum from animals with EAE possesses, gliotoxic properties causing lysis of myelin sheaths within a few hours of incubation in an *in vitro* culture. It may thus be assumed that the immunologically

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

determined attack is directed to the myelin sheath, and/or on the oligodendrocytes, and structural decomposition of the myelin as well as phagocytosis are secondary effects.

It was believed, that investigations of the myelin lipid composition with special reference to the stage of EAE preceding the onset of encephalitic symptoms may appreciably advance our understanding of these problems. Hence, we have undertaken the here presented study.

MATERIAL AND METHODS

White Wistar rats of either sex, 200—300 g of body weight served as experimental animals. They were immunized by intradermal injection 0.1 ml of encephalitogenic mixture (prepared according to Paterson, 1960) into the pads of the animals' hind legs.

The mixture was prepared as follows: a 40% homogenate of guinea pig spinal cord was emulgated with an equal volume of complete adjuvant, consisting of 8.5 parts of Bayol F, 1.5 parts of Arlcel A and of a solution of mycobacterium tuberculosis H 37 RV (4 mg/ml).

The experiments were performed in two groups, consisting of 6 animals each, at two different stages of the experimental disease: 10 and 12—16 days after immunization, i.e. at the preparalytic stage and at the stage when the clinical syndrome was fully developed. In the latter group the animals were sacrificed, and brain specimens were collected during the first day of occurrence of distinct clinical symptoms.

Histological techniques. The histological preparations were stained with H-E and by the methods of Nissl, Spielmeyer, Woelcke and Klüver-Barrera.

Biochemical techniques. Isolation of the myelin fraction was accomplished essentially according to the method described by Horrocks (1967). The cerebral white matter ca 1.0 g was dispersed in 10 ml of 1.0 M sucrose containing 0.003 M EDTA and homogenized in a tissue grinder equipped with a Teflon pestle. The homogenate was then centrifuged for 1 hr at 40 000 g (ca 30 000 rpm) in the swinging bucket rotor of a VAC 60 centrifuge. The floating fluffy layer was collected by means of a syringe and transferred into 5 ml of 0.8 M sucrose in 0.003 M EDTA and recentrifuged for 1 hr at the same speed. The resulting floating fluffy layer was suspended in bidistilled water and centrifuged at 100 000 g (ca 35 000 rpm) in an angle rotor for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in bidistilled water and then recentrifuged in the same conditions for 25 min. The resulting supernatant was again discarded, and the pellet suspended in 5 ml of 0.8 M sucrose with EDTA (0.003 M) and centrifuged at 40 000 g for 1 hr in a swinging bucket rotor. The floating pellet was resuspended in bidistilled water

and then centrifuged at 100 000 g in the angle rotor. This last washing procedure was repeated 4 times.

The purity of the finally obtained myelin fraction was checked by means of electron microscopy (Fig. 1) according to technique described by Horrocks (1968).

Quantitative lipid determinations. The lipids were extracted from the myelin fraction according to the method of Folch-Pi et al. (1957). The extracted total lipids were further separated by means of combined column and thin-layer chromatography. Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated and estimated by the chromatographic procedure after Svennerholm (1964). Cholesterol was quantitatively determined after elution of the silica gel scrapings, by the method of Sperry and Webb (1950), and cerebrosides as well as sulfatides — by the method of Radin et al. (1955).

Phospholipids were separated by two-dimensional chromatography according to the method described by Singh et al. (1971). The plates were coated with silica gel G (Merck), and developed in the first direction with chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4). After drying the plates were hydrolyzed with 12% hydrochloric acid in methanol. The HCl and methanol were evaporated from the plate with a stream of nitrogen. Thereafter the plates were developed in the second direction with chloroform : acetone : methanol : glacial acetic acid : water (5 : 2 : 1 : 1 : 0.5). The phosphorus content of the so separated, identified and scraped off spots was determined after elution by the method of Bartlett (1959).

RESULTS

The clinical and morphological symptoms of the evoked experimental disease were fully comparable with a typical picture of EAE in white rats as described in our previous paper (Wender et al., 1973). Histologically, the brain preparations exhibited diffuse encephalitis, with infiltrative processes dominating over myelin injury. The inflammatory changes were demonstrable only 12 days following administration of the encephalitogenic mixture.

The results concerning lipid composition of the myelin fraction expressed as percentages of total myelin lipids clearly demonstrate that in both investigated stages of EAE the total glyco- and phospholipid content was considerably decreased, the phospholipids, however, suffering a much larger decline during the preparalytic phase of the illness. The decrease observed in the glycolipid fraction involved both species, i.e. sulfatides and cerebrosides, and as regards the phospholipids — in almost all phospholipid classes, though not in all instances — a statistically significant decrease was observed.

Unlike the phospho-, and glycolipids, cholesterol was present in the experimental myelin fraction in increased relative proportions.

Cholesteryl esters, on the other hand, were virtually absent or present in undeterminable trace amounts. A detailed list of the results is shown in Table 1.

Table 1. Lipid composition of brain myelin in experimental allergic encephalomyelitis (in % of total myelin lipids)

Tabela 1. Skład lipidów mieliny mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (w % ogólnej zawartości lipidów mieliny)

Lipids	Normal animals	Preparalytic period of EAE	Paralytic period of EAE
Lipidy	Norma	Okres przedporażenny EMD	Okres porażenny EMD
Cholesterol	19.9 ± 0.4	<u>33.1 ± 0.8</u>	<u>32.0 ± 0.8</u>
Cholesterol			
Cerebrosides	23.0 ± 1.2	<u>17.7 ± 0.4</u>	<u>17.5 ± 0.6</u>
Cerebrozydy			
Sulphatidos	9.3 ± 0.9	6.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8
Sulfatydy			
Sphingomyelins	4.3 ± 0.5	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.1
Sfingomyeliny			
Phosphatidyl choline	15.3 ± 0.3	<u>12.8 ± 0.2</u>	13.9 ± 0.6
Fosfatydylocholina			
Phosphatidyl serine			
+ phosphoinositides	5.9 ± 0.2	5.6 ± 0.4	6.4 ± 0.3
Fosfatydyloseryna			
+ fosfoinozytol			
Phosphatidyl ethanolamine	6.2 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.2
Fosfatydyloetanolamina			
Plasmalogen	16.1 ± 0.2	15.0 ± 0.4	14.9 ± 0.3
Plazmalogen			
Total Glycolipids	32.3 ± 1.3	<u>24.5 ± 0.7</u>	<u>23.3 ± 0.8</u>
Glikolipidy całość			
Total Phospholipids	47.8 ± 1.0	<u>42.4 ± 0.5</u>	<u>44.7 ± 0.5</u>
Fosfolipidy całość			

Values are expressed as the mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimations in each group : 6

Liczba oznaczeń w każdej grupie : 6

Significant differences underlined

Istotne różnice podkreślono

Since the proportions of individual phospholipid and glycolipid classes constituting the total myelin phosphatides and glycolipids were

essentially unchanged (Table 2 and 3), we may conclude that it is only the ratio between cholesterol and polar lipids of the myelin membrane that is altered by the pathological process.

Table 2. Phospholipid composition of brain myelin in experimental allergic encephalomyelitis (in % of total myelin phospholipids)

Tabela 2. Skład fosfolipidów mieliny mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (w % ogólnej zawartości fosfolipidów mieliny)

Phospholipides	Normal animals	Preparalytic period of EAE	Paralytic period of EAE
Fosfolipidy	Norma	Okres przedporażenny EMD	Okres porażenny EMD
Sphingomyelins	9.0 ± 0.6	7.4 ± 0.3	8.1 ± 0.1
Sfingomieliny			
Phosphatidyl choline	31.6 ± 0.6	30.0 ± 0.4	31.1 ± 2.6
Fosfatydylocholina			
Phosphatidyl serine + phosphoinositides	12.4 ± 0.8	13.2 ± 0.9	14.5 ± 0.8
Fosfatydyloseryna + fosfoinozytol			
Phosphatidyl ethanolamine	13.1 ± 0.4	14.0 ± 0.8	13.2 ± 0.7
Fosfatydyloetanolamina			
Plasmalogen	33.9 ± 0.5	35.4 ± 0.8	33.1 ± 0.4
Plazmalogen			

Values are expressed as the mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimations in each group : 6

Liczba oznaczeń w każdej grupie : 6

Table 3. Glycolipid composition of brain myelin in experimental allergic encephalomyelitis (in % of total myelin glycolipids)

Tabela 3. Skład glikolipidów mieliny mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (w % ogólnej zawartości glikolipidów mieliny)

Glycolipids	Normal animals	Preparalytic period of EAE	Paralytic period of EAE
Glikolipidy	Norma	Okres przedporażenny EMD	Okres porażenny EMD
Cerebrosides	71.0 ± 1.0	72.6 ± 2.5	75.4 ± 2.9
Cerebrozydy			
Sulphatides	29.0 ± 1.0	27.4 ± 2.5	24.6 ± 2.9
Sulfatydy			

Values are expressed as the mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimations in each group : 6

Liczba oznaczeń w każdej grupie : 6

DISCUSSION

In a number of human and experimental pathological processes associated with different kinds of injury to the cerebral white matter, and this not only with demyelination, we are very frequently faced with changes in the lipid composition of the myelin. Such alterations have been described in subacute sclerosing panencephalitis (Norton et al., 1966), in spongy degeneration of myelin (Kamoshita et al., 1968), in GM₁ and GM₂ gangliosidoses (Suzuki et al., 1962), in the Niemann-Pick disease (Kamoshita et al., 1968), in Schilder's disease (Suzuki et al., 1970) and in others. In the apparently normal white matter of MS cases a slightly decreased phosphatide ethanolamine, plasmalogen, cerebroside and sulfatide content has been observed (Cumings, Goodwin, 1968; Clausen, Hansen 1970). The existence of alterations in the apparently normal white matter of MS cases, however, has recently been put in doubt by Suzuki et al. (1973), who claim that the alterations reported by the earlier authors are due to the admixture in the investigated specimens of macroscopically unidentifiable degenerated myelin.

Singh et al. (1971) reported a number of changes in the composition of myelin in the „quaking mouse” — a mouse bearing a genetically determined metabolic failure. Eto et al. (1971) demonstrated quite interesting changes in the myelin composition of rats intoxicated chronically with TET. The myelin of these experimental animals displayed an increased proportion of cholesterol along with a relative decrease of total galactolipids, mainly of cerebrosides, followed by a considerable drop in the phospholipid content, mainly of phosphoethanolamine in the final stage of the experiment.

Changes in the lipid composition of the myelin fraction similar in nature, though slightly different in details, have been observed in our study in EAE, they were: increased percentual content of cholesterol accompanied by a relatively decreased amounts of galactolipids — mainly of cerebrosides, without considerable changes of any particular phospholipid classes. These changes have been observed as early as in the preparalytic stage of the disease, in the period when morphological signs of inflammation in the form of cellular infiltrates and glial reaction were still absent. Thus the obtained evidence seems to indicate that chemical changes, affecting the lipid composition in EAE precede the morphological signs of myelin disintegration.

It appeared from the studies of Wiśniewski et al. (1969) and from those of Prineas et al. (1969) that demyelination occurred only in regions where massive mononuclear infiltrates were seen. In the ultrastructural picture of this stage of the disease there may be seen myelin fragments located inside the macrophages surrounding the stripped bare axons — which otherwise look unimpaired. Sometimes, the macrophage

cells look as if they were tearing off whole fragments of the myelin lamellae. From these observations the authors concluded that immunologically induced phagocytosis constitutes the primary mechanism responsible for the destruction of the theretofore normal myelin.

The results of our study, where considerable changes in the lipid composition of the myelin were seen as early as the prodromal stage of this experimental disease, preceding the appearance of the inflammatory reaction, seem to suggest that some changes in the lipid metabolism of the myelin sheaths are seen before and independently of the structural injury to the myelin sheaths, which is believed to be brought about by the invading cellular infiltrates. Our present observations as well as those reported by Wender and Zgorzalewicz (1972) demonstrating considerable alterations in protein biosynthesis during this early stage of EAE, clearly indicate that one of the effects evoked by the reaction antigen-antibody in the nervous tissue is certainly disturbed metabolism of myelin.

As shown by Smith (1969b), the individual lipid components of myelin incorporate glucose carbons at different rates. It is therefore not unexpected that the pathological process of EAE affects specifically only some of the myelin lipid constituents.

According to our experience cholesterol is the most resistant lipid component of myelin which remains almost unaffected. The observed increase in the proportion of that myelin component can be regarded as being a relative effect resulting from the concomitant drop in other lipid components of myelin in EAE. This relatively high stability of cholesterol as one of the myelin components, might eventually result from its very slow turnover and exchange rate. Recent investigations of Spohn and Davison (1972) have shown that, contrary to the acknowledged opinion, all subcellular fractions of the brain including myelin are capable of incorporating radioactive cholesterol. The rate of exchange, however, for the myelin sheath is many times lower than for other fractions of the nervous system.

M. Wender, Z. Adamczewska, J. Pankrac, A. Goncerzewicz

LIPIDY MIELINY W DOŚWIADCZALNYM ALERGICZNYM ZAPALENIU MÓZGU I RDZENIA

Streszczenie

Doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia wywoływano u szczurów białych przez podanie śródskórne mieszaniny antygenu mózgowego z adjuwantem Freund'a. Frakcje mielinowe wyodrębniano drogą ultrawirowania różnicowego. Zawartość poszczególnych lipidów mózgu określano po rozdziale drogą chromatografii kolumnowej.

Wyniki badań chemicznych wykazały przesunięcia w obrazie lipidowym składników mieliny. Najbardziej wyraźnym odchyleniem było obniżenie zawartości glikolipidów i fosfatydów z równoczesnym względnym podwyższeniem odsetka cho-

lesterolu. Wskazuje to, że najbardziej stabilnym składnikiem lipidowym mieliny w EAE jest cholesterol. Obserwowane zmiany nie są współmierne z morfologicznymi wykładnikami uszkodzenia mieliny.

M. Вендер, З. Адамчевска, И. Панкрац, А. Гонцевич

ЛИПИДЫ МИЕЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ
ВОСПАЛЕНИИ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА

Резюме

Экспериментальное аллергическое воспаление головного и спинного мозга вызывали у белых крыс путем подкожного введения смеси мозгового антигена с вспомогательным лекарственным средством Фрейнда. Миелиновую фракцию выделяли дифференциальным ультрацентрифугированием. Содержание отдельных липидов мозга определяли после разделения на хроматографической колонке.

Химические исследования обнаружили сдвиг в липидной картине компонентов миелина. Наиболее четким отклонением было снижение содержания гликолипидов и фосфатидов с одновременным относительным повышением содержания холестерина. Это указывает на то, что наиболее стабильным липидным компонентом миелина при ЭАВ является холестерин. Наблюдаемые изменения не являются соразмерными с морфологическими показателями повреждения миелина.

REFERENCES

1. Adamczewska Z.: Lipidy mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia. Roczn. Akad. Med. Poznań, 1971, 5, 105—110.
2. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 1959, 234, 466—468.
3. Benetato G., Gabrielescu E., Boros L.: The histochemistry of cerebral proteases in experimental allergic encephalitis. Rev. roum. Physiol., 1965, 2, 379—384.
4. Clausen J., Hansen J.: Myelin constituents of human central nervous system. Acta Neurol. Scand. 1970, 46, 1—17.
5. Cumings J., Goodwin H.: Sphingolipids and phospholipids of myelin in multiple sclerosis. Lancet, 1968, 2, 664—665.
6. Eto Y., Suzuki K., Suzuki K.: Lipid composition of rat brain myelin in triethyl tin-induced edema. J. Lipid Res., 1971, 12, 570—579.
7. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 226, 497—511.
8. Horrocks L.: Composition of myelin from peripheral and central nervous system of the squirrel monkey. J. Lipid Res., 1967, 8, 569—576.
9. Horrocks L.: Composition of mouse brain myelin during development. J. Neurochem., 1968, 15, 483—488.
10. Kamoshita S., Rapin I., Suzuki K., Suzuki K.: Spongy degeneration of the brain: a chemical study of two cases including isolation and characterisation of myelin. Neurology (Minneapolis), 1968, 18, 975—985.
11. Kamoshita S., Aron A., Suzuki K., Suzuki K.: Infantile Niemann-Pick disease. A chemical study with isolation and characterisation of membranous cytoplasmic bodies and myelin. Amer. J. Dis. Child., 1969, 117, 379—394.

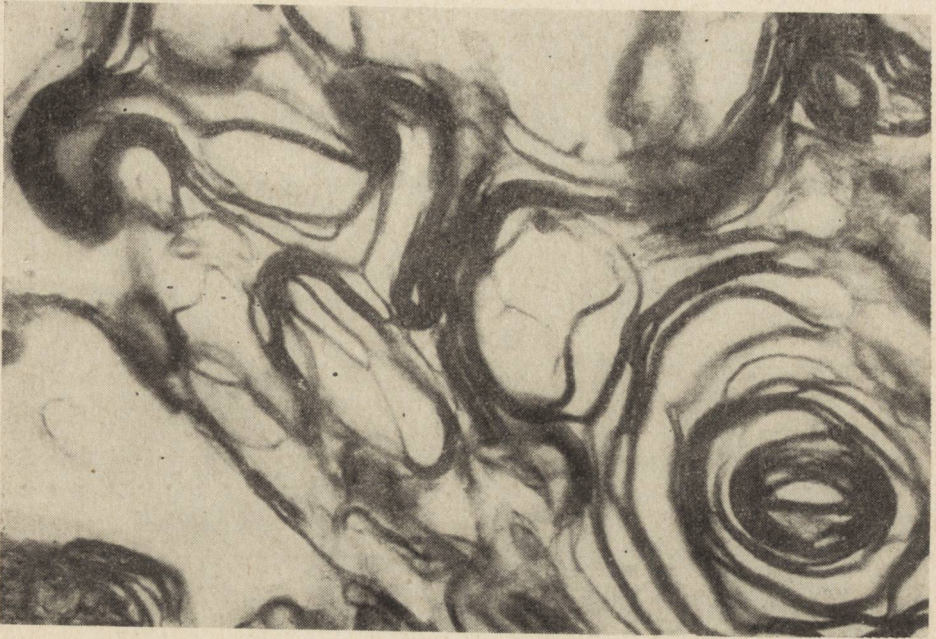


Fig. 1. Myelin fraction in electron microscopy picture. $\times 49\ 000$.

Ryc. 1. Frakcja mielinowa w obrazie mikroskopowo-elektronowym. Pow. $49\ 000 \times$.

12. Norton W., Poduslo S., Suzuki K.: Subacute sclerosing leukoencephalitis. II. Chemical studies including abnormal myelin and abnormal ganglioside patterns. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1966, 25, 582—597.
13. Paterson P.: Transfer of experimental allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.*, 1960, 111, 119—136.
14. Prineas J., Raine C., Wiśniewski H.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. III. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 472—483.
15. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determinations of cerebroside. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
16. Singh H., Spritz N., Geyer B.: Studies of brain myelin in the „quaking mouse”. *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473—481.
17. Smith M.: Lipid biosynthesis in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, 122, 95—103.
18. Smith M.: An in vitro system for the study of myelin synthesis. *J. Neurochem.*, 1969a, 16, 83—92.
19. Smith M.: Myelin metabolism in vitro in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.*, 1969b, 16, 1099—1104.
20. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—106.
21. Spohn M., Davison A.: Cholesterol metabolism in myelin and other subcellular fractions of rat brain. *J. Lipid Res.*, 1972, 13, 569—570.
22. Suzuki K., Kamoshita S., Eto Y., Tourtellotte W., Gonatas J.: Myelin in multiple sclerosis. Composition of myelin from normal-appearing white matter. *Arch. Neurol.*, 1973, 28, 293—297.
23. Suzuki K., Suzuki K., Kamoshita S.: Chemical pathology of G_{M1} — gangliosidosis (generalized gangliosidosis). *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 25—33.
24. Suzuki K., Tucker S., Rorke L., Suzuki K.: Ultrastructural and biochemical studies of Schilder's disease. II. Biochemistry. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1970, 29, 405—419.
25. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839—859.
26. Turský T.: Asparaginase in experimental allergic encephalomyelitis. VII. The rise of asparaginase and proteosynthesis. *Fol. Facult. Med. Univ. Com. Bratisl.*, 1968, 6, 7—36.
27. Wajda I., Lee J., Neidle A.: Transglutaminase levels in brain and reticulo-endothelial cells during allergic encephalomyelitis determined by a radiochemical method. *J. Neurochem.*, 1969, 16, 655—663.
28. Wender M., Piechowski A., Wajgt A.: Soluble cerebral proteins in experimental demyelinating processes. *Exp. Path.*, 1972, 7, 290—297.
29. Wender M., Piechowski A., Wajgt A.: Cerebral proteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.*, 1973, 40, 331—339.
30. Wender M., Zgorzalewicz B.: Activity of sRNA-amino acyl synthetases in the brain during experimental allergic encephalomyelitis. *Z. Neurol.*, 1972, 203, 235—244.
31. Wiśniewski H., Prineas M., Raine C.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. I. Acute experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 105—118.

Authors' address: Department of Neurology, Medical Academy, 49 Przybyszewskiego Str. 60-355 Poznań.

MIECZYŚLAW SOPEK, JÓZEF TARMAS, WIESŁAW JAKUBICZ

BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD NEUROTROPOWYM WPŁYWEM CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Zakład Anatomii Prawidłowej Instytutu Biostruktury A. M.
Białystok

Kierownik Zakładu: prof. dr J. Tarmas

Zakład Mikrobiologii Instytutu Biostruktury A. M. Białystok

Kierownik: prof. dr J. Borowski

W ostatnich latach obserwuje się większe zainteresowanie grzybicami. Wśród wielu drożdżaków patogennych dla ludzi i zwierząt wzrastającą rolę odgrywa grzyb drożdżoidalny *Cryptococcus neoformans*, inaczej zwany *Torula histolytica*, będący czynnikiem etiologicznym kryptokokozy. Jest to grzyb zaliczany do drobnoustrojów oportunistycznych (opportunistic microorganisms), staje się natomiast groźny w sytuacjach związanych z obniżeniem obronnych sił gospodarza i zaburzeniach biocenozy mikroflory (Borowski, 1973). Kryptokokoza u człowieka może występować pierwotnie lub stanowić powikłanie innych schorzeń, szczególnie tych, którym towarzyszy uszkodzenie mechanizmów immunologicznych. Może ona zajmować wiele narządów, jednak uważa się, że ma specjalne powinowactwo do ośrodkowego układu nerwowego i jest najczęstszą grzybicą mózgu (Afek-Kamińska, 1960; Fetter i wsp., 1967; Messina, 1969). Przebiega wówczas pod postacią zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Piśmiennictwo dotyczące kryptokokozy ośrodkowego układu nerwowego jest dotychczas bardzo skromne w porównaniu z piśmiennictwem dotyczącym innych układów i narządów.

Obecna praca przedstawia dynamikę zmian morfologicznych zachodzących w układzie nerwowym po doświadczalnym wszczepieniu *Cryptococcus neoformans* oraz analizę ich rozmieszczenia w poszczególnych częściach mózgowia.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto dojrzałe białe myszy (samce) rasy „Porton”. Materiałem zakażającym były komórki drożdżaka *Cryptococcus neoformans* (szczep własny) zawieszony w jałowym fizjologicznym roztworze chlor-

ku sodu. Myszy zakażono w uśpieniu eterowym podając domózgowo w okolicę płata czołowego 0,05 ml zawiesiny, zawierającej około 500 000 komórek drożdżaka. Myszy w grupach po 5 zwierząt uśmiercano przez dekapitację po 2, 4, 8, 16 godzinach oraz po 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 i 26 dobach od chwili zakażenia. Wypreparowywane mózgowia cięto na trzy części w płaszczyźnie czołowej i utrwalano w płynie Carnoy'a, a następnie zatapiano w zwykły sposób w parafinie z woskiem. Seryjne skrawki grubości 5—8 μ barwiono błękitem alcjanowym wg Mowry'ego z przybarwieniem safraniną lub metodą PAS.

WYNIKI

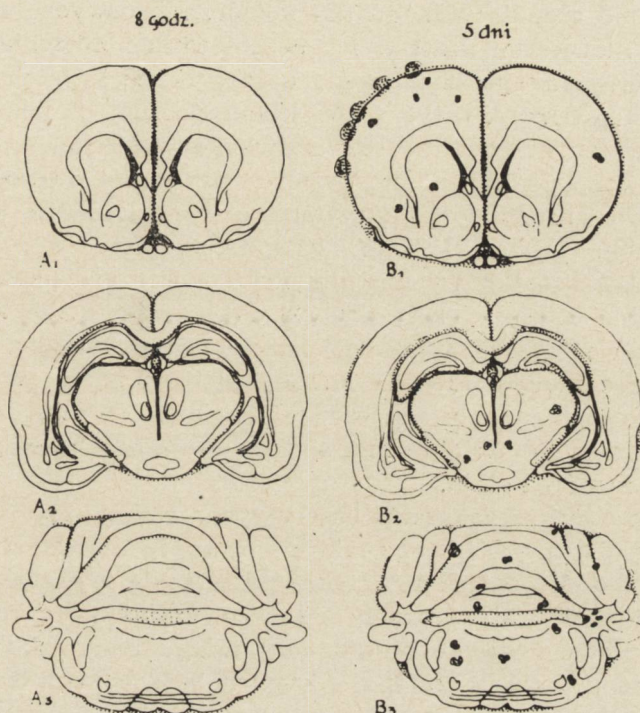
Po upływie 2 i 4 godzin od zakażenia znajdowano pojedyncze komórki *Cryptococcus neoformans* w okolicy szczeliny podłużnej mózgu, w świetle i w sąsiedztwie tętniczek włosowatych i przedwłosowatych opony miękkiej. W przebiegu dalszych okresów zakażenia spostrzegano narastające zmiany w układzie naczyniowym, w oponach i tkance nerwowej mózgowia.

Po 8 godzinach stwierdzano liczniejsze komórki drożdżaka w świetle rozszerzonych tętniczek włosowatych i przedwłosowatych opony miękkiej oraz w przestrzeniach podpajęczynówkowych okolicy szczeliny podłużnej mózgu, skrzyżowania wzrokowego, ciał suteczkowatych, okolicy podstawnej mostu, rdzenia przedłużonego, szczeliny poprzecznej mózgu oraz jego powierzchni grzbietowo-bocznej. Dość liczne komórki drożdżaka były widoczne w świetle komór bocznych i w splocie naczyniówkowym tych komór, mniej liczne w III i IV komorze mózgu (Schemat 1-A₁, A₂, A₃).

Po 16 godzinach od zakażenia dostrzegano rozprzestrzenienie kryptokoków w oponie naczyniowej i w przestrzeniach podpajęczynówkowych na znaczniejszy obszar powierzchni wypukłej i podstawnej mózgu, powierzchni podstawnej mózdzku, powierzchni podstawnej pnia mózgu, głównie jednak w zbiornikach podpajęczynówkowych. W otoczeniu niewielu naczyń opony miękkiej kryptokoki tworzyły na ogół niewielkie skupienia. W ich sąsiedztwie spostrzegano większe lub mniejsze nagromadzenia granulocytów o wielopłatowym jądrze. Najczęściej całkowity brak odczynu granulocytarnego. Na powierzchni wypukłej mózgu oraz na powierzchni półkul mózdzku znajdowano pojedyncze małe obszary, w których nagromadzone drożdżaki odwarstwiały oponę miękką, naruszając jej ciągłość. Kryptokoki ujawniały się również w większej ilości niż poprzednio w świetle komór mózgu, szczególnie w komorach bocznych.

Po 2 dniach stwierdzano większe ilości kryptokoków w zbiornikach podpajęczynówkowych oraz komorach mózgu. Dostrzegano liczniejsze

niż poprzednio rozszerzone, wypełnione erytrocytami i (lub) drożdżakami tętniczki włosowate i przedwłosowate nie tylko w oponie miękkiej okrywającej mózgowie lecz również w głębi w okolicy podstawnej przodomózgowia i śródmózgowia. Oprócz rozszerzonych tętniczek o niezmiennych ścianach, znajdowano tętniczki wykazujące obrzmienie śródbłon-



Schemat 1. Lokalizacja kryptokoków na przekrojach czołowych mózgowia po 8 godzinach i 5 dniach od zakażenia: A₁ i B₁ — na poziomie rogów przednich komór bocznych, A₂ i B₂ — na poziomie ciał suteczkowatych, A₃ i B₃ — na poziomie oliw górnych.

Scheme 1. Localization of *Cryptococcus Neoformans* in the frontal sections of the brain 8 hours and 5 days after infection: A₁ and B₁ — on the level of anterior horns of lateral ventricles, A₂ and B₂ — on the level of corpora mamillaria, A₃ and B₃ on the level of superior olive.

ków a nawet ich złuszczenie. Światło tych naczyń było zwężone wskutek wpuklających się powiększonych nieregularnie jąder komórkowych. Przestrzenie okołonacyniowe były poszerzone. W okolicy podstawnej przodomózgowia pod korą oraz w okolicy szwu w śródmózgowiu stwierdzano pojedyncze małe, nieregularne, pęcherzykowate przestrzenie zawierające komórki drożdżaka i erytrocyty.

Po 3 dniach zwiększała się ilość i powiększały się rozmiary skupień kryptokoków rozwarstwiających i uszkadzających ciągłość opony miękkiej na wypukłej powierzchni przodomózgowia i na powierzchni mózdzku. Pojawiały się również podobne skupienia na powierzchni brzusznej

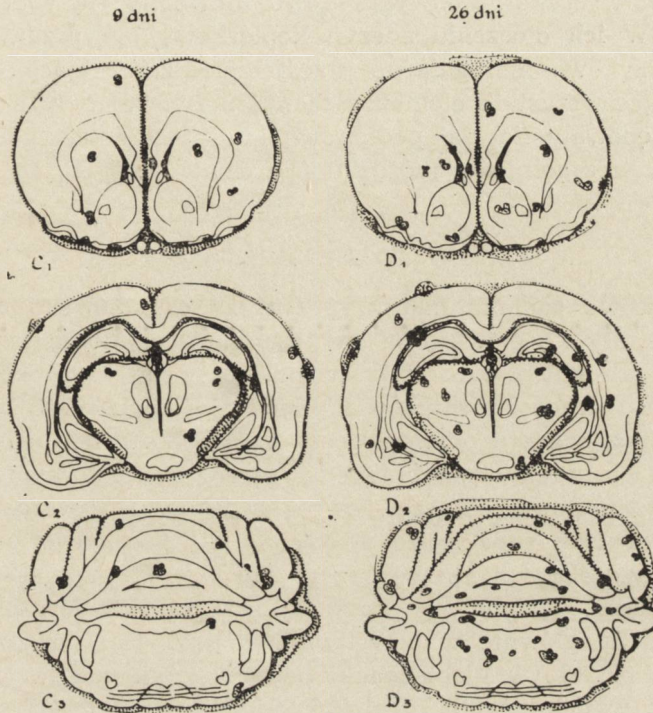
śródmózgowia. W miejscach skupień drożdżaków były niekiedy widoczne miskowate ubytki powierzchniowych warstw kory mózgu lub mózdzku albo powierzchniowych warstw istoty białej śródmózgowia. Ubytki te miały zwykle prawie regularną powierzchnię, rzadziej — nieregularnie pozazębianą. W bezpośrednim sąsiedztwie ubytków na ogół nie stwierdzano granulocytów i (lub) komórek glejowych lub występowały one w niewielkiej ilości w ich bezpośrednim otoczeniu. W komorach i wodociągu mózgu znajdowano bardzo liczne kryptokoki, zwłaszcza w komorach bocznych (ryc. 1). W ścianie bocznej III komory stwierdzano na niewielkim obszarze rozwarstwienie wyściółki, a podwyściółkowo znajdowano po kilkanaście komórek drożdżaka otoczonych nieregularnie nagromadzonymi granulocytami o wielopłatowym jądrze. Opisane poprzednio pęcherzykowate nieregularne jasne przestrzenie, zawierające w świetle lub w otoczeniu kryptokoki, występowały liczniej i były niejednokrotnie większe (ryc. 2). Najczęściej ujawniały się one, jako rozproszone ogniska, w korze i istocie białej mózdzku, mniej często — w korze przodomózgowia, okolicy hipokampa, w jądrze ogonistym, w głębokich strukturach śródmózgowia w pobliżu istoty szarej środkowej i szwu. W ich otoczeniu spotykano na ogół niewiele granulocytów i (lub) komórek gleju.

Po upływie 5 dni od zakażenia obserwowano rozleglejsze rozwarstwienia i uszkodzenia ciągłości opony miękkiej oraz liczniejsze i większe konglomeraty komórek drożdżaka, a także poszerzenie przestrzeni podpajęczynówkowej, w której ujawniały się liczne granulocyty rozsiane i w skupieniach. Powierzchnowe ubytki kory mózgu i mózdzku były nieco większe niż poprzednio i liczniejsze (Schemat 1-B₁, B₂, B₃). Komory mózgu były wypełnione rozsianymi i skupionymi komórkami drożdżaka. Rozwarstwienia i uszkodzenia ciągłości wyściółki z podwyściółkowym rozmieszczeniem kryptokoków znajdowano w bocznej i dolnej ścianie III komory oraz jednostronnie w rogach dolnych komory bocznej. Pęcherzykowate przestrzenie w wymienionych okolicach mózgowia były niewiele liczniejsze, ale większe i wielojamowe (Schemat 1-B₁, B₂, B₃). Podobnie jak w dniach poprzednich zawierały one komórki drożdżaka widoczne niekiedy również w otaczającej tkance.

Po 6 i 7 dobach narastała ilość kryptokoków w oponie miękkiej okrywającej mózdzek oraz śródmózgowie i w przestrzeniach podpajęczynówkowych. W tych okolicach obserwowano rozleglejsze naruszenia ciągłości opony miękkiej. Ilość pęcherzykowatych jam w głębi mózgowia zawierających kryptokoki wzrastała w tym okresie nieznacznie, natomiast powiększały się ich rozmiary (ryc. 3).

Po 8 i 9 dobach od zakażenia obraz zmian był na ogół podobny. Zwracało szczególną uwagę nagromadzenie ogromnej ilości kryptokoków posiadających grubą otoczkę oraz licznych granulocytów o jądrze wielo-

płatowym, zwłaszcza w otoczeniu zmienionych zapalnie tętniczek przedwłosowatych i włosowatych opony miękkiej i w poszerzonych przestrzeniach podpajęczynówkowych, pokrywających powierzchnię podstawną mózgowia i prawie całą powierzchnię mózdzku. Spośród wszystkich komór mózgu wypełnionych obficie komórkami drożdżaka, komory boczne



Schemat 2. Lokalizacja kryptokoków na przekrojach czołowych mózgowia po 9 i 26 dniach od zakażenia: C₁ i D₁ — na poziomie róg przednich komór bocznych, C₂ i D₂ — na poziomie ciał suteczkowatych, C₃ i D₃ — na poziomie oliw górnych.

Scheme 2. Localization of *Cryptococcus Neoformans* in the frontal sections of the brain 9 and 26 days after infection: C₁ and D₁ on the level of anterior horns of lateral ventricles, C₂ and D₂ — on the level of corpora mamillaria, C₃ and D₃ — on the level of superior olive.

i komora IV były poszerzone. Zwiększały się rozmiary wielopęcherzykowych, zawierających kryptokoki, przestrzeni w głębi przodomózgowia, śródmózgowia, mostu, rdzenia przedłużonego, a przede wszystkim mózdzku, uszkadzających w ich obszarze wszystkie elementy tkanki nerwowej (Schemat 2-C₁, C₂, C₃). Stwierdzano niejednakowe nasilenie tych zmian w poszczególnych częściach mózgowia.

Po 26 dobach wszystkie zbiorniki podpajęczynówkowe były poszerzone wskutek ogromnych nagromadzeń kryptokoków i granulocytów o wielopłatowym jądrze. Rozwarstwienia i naruszenia ciągłości opony miękkiej występowały na znaczniejszych obszarach powierzchni mózgo-

wia a szczególnie mózdzku. Powierzchnowe ubytki kory mózgu i mózdzku były liczniejsze i większe, a odczyn komórkowy w sąsiedztwie ubytków niewielki. Poszerzone komory mózgu wypełniały bardzo liczne kryptokoki. W rogach przednich komór bocznych i ścianach bocznych komory III było widoczne na większych niż poprzednio obszarach naruszenie ciągłości wyściółki. Podwyściółkowo ujawniały się większe kolonie drożdżaka. W ich otoczeniu odczyn komórkowy był przeważnie słaby. Wielopęcherzykowe nieregularne przestrzenie, zawierające kryptokoki i uszkadzające wszystkie elementy tkanki nerwowej były znacznie większe i występowały liczniej podkorowo i w głębi poszczególnych części mózgowia a szczególnie w mózdzku (Schemat 2-D₁, D₂, D₃).

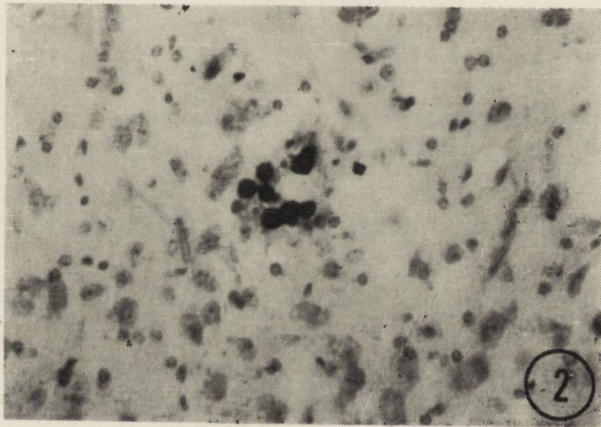
OMÓWIENIE

Dotychczasowe badania nad kryptokokozą ośrodkowego układu nerwowego opierały się głównie na spostrzeżeniach anatomo-patologicznych sekcjonowanych mózgow ludzi zmarłych z powodu kryptokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Badania nad doświadczalną kryptokokozą układu nerwowego są bardzo nieliczne. Jedynie Levine i wsp. (1957) zakażali drożdżakiem *Cryptococcus neoformans* białe myszy drogą domózgową, dootrzewnową i podskórną. Stwierdzili oni największą odpowiedź zapalną ze strony tkanki podskórnej, najmniejszą zaś ze strony układu nerwowego z równoczesnym największym uogólnieniem procesu. Podobnie w naszych badaniach stwierdzono wczesne rozsiane zmiany głównie w przestrzeniach podpajęczynówkowych, a w późniejszym okresie w głębi tkanki nerwowej, głównie w postaci licznych jamek wypełnionych kryptokokami. Zmniejszona reaktywność tkanki nerwowej w stosunku do *C. neoformans* pozwoliła na prześledzenie dróg przenikania tego drożdżaka w obręb mózgu. Pojawienie się jego w pierw w przestrzeniach płynowych, głównie na podstawie mózgu, może wskazywać na istnienie w tej okolicy dogodnych warunków dla jego rozwoju. Littman (1958) twierdzi, że niezbędnym składnikiem do produkcji otoczek grzyba jest tiamina. W płynie mózgowo-rdzeniowym ilość jej znacznie przewyższa poziom, jaki jest niezbędny do syntezy otoczki grzyba. Fakt ten tłumaczy niezwykle łatwość wytwarzania przez komórki *C. neoformans* otoczek po dostaniu się do płynu mózgowo-rdzeniowego. Obecność otoczek wiąże się z ich zjadliwością. Być może, jest to jeden z czynników leżących u podstaw neurotropizmu *C. neoformans* i wyjaśniający pojawienie się kryptokoka w pierw w przestrzeniach oponowych i w układzie komorowym. Po dłuższym przeżyciu myszy, ilość kryptokoków w przestrzeniach oponowych wybitnie narastała. Powodują one odwarstwienie opony miękkiej, jak również uszkadzają powierzchowne warstwy kory mózgu. W tych okolicach zarówno naczynia



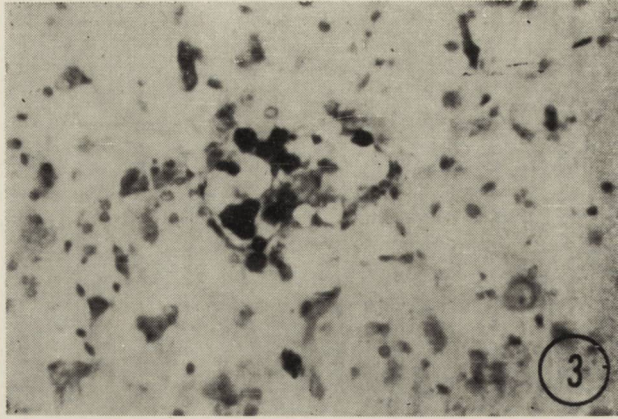
Ryc. 1. Trzy dni po zakażeniu domózgowym. Kryptokoki wypełniają komorę boczną mózgu. Błękit alcjanowy. Pow. $7 \times 6,3$.

Fig. 1. Three days after intracerebral infection. *Cryptococcus Neoformans* fills the lateral ventricle. Alcian blue staining. Magn. $7 \times 6,3$.



Ryc. 2. Trzy dni po zakażeniu domózgowym. Ubytek tkankowy w głębi przedomózgowia. Wewnątrz i na zewnątrz jamki komórki grzyba. Błękit alcjanowy. Pow. $6,3 \times 16$.

Fig. 2. Three days after intracerebral infection. Tissue loss inside prosencephalon. The fungus cells inside and outside of monovesicular space. Alcjan blue. $6,3 \times 16$.



Ryc. 3. Siedem dni po zakażeniu domózgowym. Większy ubytek tkankowy w głębi przedomózgowia. Wewnątrz i na zewnątrz jamki komórki grzyba. Słaby odczyn komórkowy. Błękit alcjanowy. Pow. $6,3 \times 16$.

Fig. 3. Seven days after intracerebral infection. More extensive tissue loss inside the prosencephalon. Inside and outside of the multivesicular space fungus cells are seen. Weak cell reaction. Alcjan blue. Magn. 6.3×16 .

krwionośne jak i przestrzenie okołonaczyniowe są rozszerzone. Może to wskazywać na szerzenie się kryptokoków z opon na mózg przez ciągłość, zaś w samym mózgu drogą przestrzeni okołonaczyniowych. Podobne wyniki obserwacji podaje szereg autorów (Afek-Kamińska, 1960; Kurc i wsp., 1970; Messina, 1969; Rose i wsp., 1958; Zawirska, Bratter, 1958). Z płynem mózgowo-rdzeniowym drożdżaki dostają się do układu komorowego, głównie do komór bocznych, uszkadzają wyściółkę komór i tkankę nerwową okolicy przykomorowej.

Wczesne znalezienie komórek drożdżaka w świetle naczyń przedwłosowatych i włosowatych z równoczesnym rozszerzeniem tych naczyń wskazuje, że drogi krwionośne są miejscem przenikania kryptokoków w głąb tkanki nerwowej. Podobnie Levine i wsp. (1957) już w pierwszym dniu po wszczepieniu znaleźli komórki *C. neoformans* w świetle naczyń włosowatych. Zmiany w obrębie mózgu pojawiają się w następnej kolejności. Pierwsze ogniska w głębi mózgu znaleziono w drugim dniu po zakażeniu w postaci pojedynczych jamek (ubytków tkankowych) o różnym kształcie i różnej wielkości, przeważnie ostro odgraniczonych od otaczających tkanek i zawierających niewielką ilość kryptokoków. Po dłuższym okresie przeżycia myszy, ilość ich wyraźnie narastała i cechował je większy polimorfizm. Czasami występowały one symetrycznie lub prawie symetrycznie w obu półkulach, częściej bliżej podstawy mózgu. Taka lokalizacja może również wskazywać na istnienie krwiopochodnych mechanizmów w szerzeniu się kryptokokozy układu nerwowego. Afek-Kamińska (1960) uważa, że ogniska te są jamkami po rozmiękaniu powstającym prawdopodobnie na skutek działania wytworów przemiany materii grzyba.

Nasze obserwacje wskazują na szczególne zachowanie się odczynu ze strony tkanki nerwowej w bezpośrednim sąsiedztwie ubytków tkankowych i powierzchniowych warstw kory mózgu. Odczynowość ta w stosunku do drożdżaków nie jest duża, o czym świadczy stosunkowo mały odczyn granulocytarny i glejowy, nawet w mózgowiach myszy, które przeżyły 26 dni. Jest on jednak większy w oponach. Levine i wsp. (1957) porównywali odczynowość różnych tkanek w stosunku do *C. neoformans* i stwierdzili, że jest ona najmniejsza właśnie w tkance nerwowej. Podobne zjawisko obserwowali inni autorzy (Dominiczak i wsp., 1965; Kurc i wsp., 1970; Matheis, 1960; Messina, 1969; Rose i wsp., 1958; Zawirska, Bratter, 1958). Kurc i wsp. (1970) uważają, że skąpa odpowiedź zapalna ze strony układu nerwowego jest prawdopodobnie wykładnikiem zaburzeń reaktywności układu siateczkowo-śródbłonkowego. Po dootrzewnowym podaniu kryptokoków Levine i wsp. (1957) znaleźli u myszy duże zmiany w mózgu. Ma to według nich świadczyć o braku odporności ze strony tkanki nerwowej w stosunku do krążących we krwi

komórek drożdżaka. Ponadto znaczne pączkowanie tych komórek w uszkodzonych okolicach mózgowia wskazuje na ich aktywny wzrost w sprzyjającym środowisku.

Podobieństwo uszkodzeń mózgowych u człowieka i w kryptokoziozie doświadczalnej może wskazywać na istnienie dużej wrażliwości ośrodkowego układu nerwowego na zakażenia grzybicze.

M. Sopek, Ю. Тармас, В. Якубич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОТРОПНОГО ВЛИЯНИЯ
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Резюме

Было прослежено влияние заражения *Cryptococcus neoformans* на центральную нервную систему белых мышей. Мозг мышей заражали внутримозговой инъекцией суспензии, содержащей 500000 клеток *C. neoformans*. На срезах, окрашенных альциановым синим и методом PAS, наблюдали локализацию кандидоза и морфологические изменения в различных частях мозга через 2 часа и до 26 дней после инъекции. Уже через 2—4 часа после инъекции можно было заметить клетки кандиды в сосудистой оболочке в области продольной щели мозга. В последующие дни количество клеток кандиды возрастало в субарахноидальном пространстве, прежде всего в цистернах основания мозга и на дорзальной поверхности мозжечка. В больших количествах клетки были также заметны в просвете желудочков. Наблюдалось нарушение непрерывности сосудистой оболочки и повреждение поверхностных слоев коры мозга и мозжечка.

Начиная со второго дня после инъекции в глубоких областях мозга были найдены маленькие пещеристые пространства. Позже они были более многочисленными и многопузырчатыми. Полученные результаты позволили провести анализ неиротропизма кандиды *Cryptococcus neoformans*.

M. Sopek, J. Tarmas, W. Jakubicz

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON THE NEUROTROPIC EFFECT
OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Summary

The influence of *Cryptococcus neoformans* on the central nervous system of white mice has been investigated. The brains of animals were infected by intracerebral injection (500 000 of *Cryptococcus* cells in suspension). Localization of the fungus and morphological changes in particular parts of the brain were studied in the period of 2 hours to 26 days after the infection on the histological sections stained with Alcian blue or PAS method.

Already 2 and 4 hours after infection the fungus cells were seen in pia mater of longitudinal cerebral fissure area. In the subsequent days the amount of *Cryptococcus neoformans* cells increased in subarachnoid space. This increase was usually most pronounced in the cisterns of the brain base and on the dorsal surface of cerebellum. Large quantities of the fungus cells were also visible in lumen of ventricles. In addition discontinuity of pia mater and damage of super-

ficial layers of cerebral and cerebellar cortex were observed. From the second day after infection the small lacunae were found in various deeper areas of the brain. Such lacunae were later more numerous and multivesicular. The obtained results allowed to carry out analysis of neurotropism of *Cryptococcus neoformans*.

PISMIENICTWO

1. Afek-Kamińska M.: Przypadek torulozy u 6-letniego chłopca. *Patol. Pol.*, 1960, 11, 385—393.
2. Borowski J.: Epidemiologia zakażeń wywołanych przez grzyby drożdżoidalne. *Postępy Mikrobiol.*, 1973, 13, 283—291.
3. Dominiczak K., Branicka M., Lewenstam K.: Odosobniona wewnątrzgałkowa kryptokokoza (Toruloza). *Klin. Oczna*, 1965, 35, 463—466.
4. Fetter B. F., Klintworth G. K., Hendry W. S.: *Mycoses of the Central Nervous System*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1967, 89—123.
5. Kurc J., Papierz W., Szabelska K.: Kryptokokoza ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropatol. Pol.*, 1970, 8, 313—320.
6. Levine S., Zimmerman H. M., Scorza A.: Experimental Cryptococcosis (Torulosis). *Am. J. Path.*, 1957, 33, 385—409.
7. Littman M. L., Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. Meeting of the Division of Mycology. The New York Academy of Sciences, 1958, 623—648.
8. Matheis H.: Die Cryptococcose (Torulose) des Nervensystems. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1960, 180, 595—639.
9. Messina C.: La Cryptococcosi del sistema nervoso (Rivista sintetica). *Sist. Nerv.*, 1969, 21, 363—388.
10. Rose F. C., Grand H. C., Jeanes A. L.: Torulosis of the central nervous system in Britain. *Brain*, 1958, 81, 542—555.
11. Zawirska B., Bratter J.: Przypadek kryptokokozy ośrodkowego układu nerwowego rozpoznany jako porażenie postępujące. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.*, 1958, 8, 627—634.

Adres autorów: Zakład Anatomii Prawidł., ul. Kilińskiego 1, 15-952 Białystok 8.

URSZULA RAFAŁOWSKA, ANDRZEJ GROMEK

EFFECT OF OXYGEN DEFICIENCY AND BARBITURATE ANESTHESIA ON CITRATE OXIDATION IN BRAIN CYTOPLASM

Department of Neurochemistry Experimental and Clinical Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences
Head of the Department: Dr. A. Gromek

Citrate, with coparticipation of adenine nucleotides plays the role of regulator of a number of metabolic processes in the cytoplasm (glycolysis, synthesis of fatty acids, acetylcholine and others — Atkinson, 1969; Tuček, 1967 a).

In normal conditions, citrate oxidation in the brain cytoplasm may proceed as in other tissues with the participation of citrate lyase (oxaloacetic ATP/citrate lyase, E.C.4.1.3.8.) (Srere, 1968, Tuček, 1967 b), as well as by conversion of this compound to isocitrate (aconitase — isocitrate hydrolase E.C.4.2.1.3.) and subsequently to α -ketoglutarate (NADP-dependent isocitrate dehydrogenase) and to oxaloacetate and glutamate (aspartate transaminase — 0 aspartate 2 α -ketoglutarate aminotransferase E.C.2.6.1.10) (Gromek, Rafałowska, 1972). A number of authors have shown that significant changes in the substrate levels and energy state of the cells occur in the conditions of hypoxia and anesthesia (Duffy et al., 1972; Goldberg et al., 1966; Dobkin, 1972).

During hypoxia the amount of citrate in the cytoplasm increases as the consequence of enhanced migration of this compound from the mitochondria.

It seemed reasonable to assume that under conditions of hypoxia or anesthesia, the process of citrate oxidation may undergo significant disturbances, which in turn could lead to changes in the mechanism regulating the carbohydrate and energy metabolism in the CNS.

The present study concerns the effect of hypoxia and nembutal anesthesia on citrate oxidation in the brain cytoplasm, in the process mediated by NADP-dependent isocitrate dehydrogenase.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on Wistar rats weighing ca 200 g. The animals were subjected to hypoxia in a chamber containing 7% O₂

(oxygen content being controlled with an oxygen electrode), for 30 min. In decapitative ischemia, the brains were isolated after the heads had been kept for 4 min, at 37°C. A 30 min. anesthesia was produced by intraperitoneal injection of nembutal in a dose of 40 mg/kg body weight.

The cytoplasmic fraction was obtained by homogenization in 0.125 M KCl of various brain structures (hemispheres, brain stem, cerebellum) isolated directly after decapitation. The homogenates (20% w/v) were centrifuged at $25\,000 \times g$ for 30 min in an 4.25 angle rotor of a MSE (69 404) centrifuge. The supernatants were centrifuged at $105\,000 \times g$ for 1 hr in a Janetzky VAC 60 ultracentrifuge. All operations were carried out at 0°C.

The obtained cytosol was tested for the presence of mitochondrial impurities by determining the activities of threo-Ds-isocitrate; NAD oxidoreductase (decarboxylating (E.C.1.1.1.41) and glutamate dehydrogenase (E.C.1.4.1.3). The absence of these enzymes in the cytosol indicated the absence of mitochondrial impurities.

Citrate was enzymatically oxidized at 37°C. The incubation mixture contained: 64 μ moles Tris-HCl, pH 7.4; 22.5 μ moles $MnSO_4$; 0.5 μ mole NADP; 1.0 μ mole citrate, and 2 mg of cytosol protein. Incubation was carried out for 10 min. and the reaction was stopped by addition of TCA to a final concentration of 5%.

Citrate was assayed by the chemical method of Natelson et al. (1948). NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity was determined by the spectrophotometric method of Ochoa (1955). Aconitase was tested by measuring the increase in citrate content. Aspartate aminotransferase was assayed according to Bergmeyer and Bernt (1963 b). A crystalline preparation of malic dehydrogenase previously deprived of $(NH_4)_2SO_4$ by 24 hrs dialysis at 0°C was used.

Glutamate was determined in deproteinized samples according to Bernt and Bergmeyer (1963 a). Determination of threo-Ds-isocitrate; NAD oxidoreductase (E.C.1.1.1.41) was carried out by the method of Plaut and Sung (1955) and glutamate dehydrogenase (E.C.1.4.1.3) was determined by the method of Schmid (1963). The mitochondrial fraction was obtained by the method of Ozawa et al. (1966).

Mitochondria were disrupted by sonification for 1 hr at 18 Hz. Preincubation of the mitochondrial fraction with oleate was carried out at 0°C for 10 min in the presence of 200 μ moles of oleate/mg of protein. Protein was assayed by the method of Layne (1957). The standard curve was prepared using bovine serum albumin fraction V.

Reagents: NADP and ATP were Sigma and NAD Boehringer and Soehne GmbH products, sodium citrate and sodium isocitrate were Polish preparations.

RESULTS

The activity of the cytoplasmic IDH NADP-dependent citrate oxidizing system, measured by the loss of citrate, decreases in hypoxic and ischemic conditions. No changes were observed in the case of anesthesia.

Table 1. Effect of ischaemia, hypoxia and anaesthesia on citrate oxidation by rat brain cytosol

Tabela 1. Wpływ ischemii, hypoksji i anestezji na utlenianie cytrynianiu w cytozolu mózgu szczura

	Control	Ischaemia	Hypoxia	Anaesthesia
	Kontrola	Ischemia	Hypoksja	Anestezja Nembutal Nembutal
Citrate utilization by cytoplasmic fraction in nmol/mg protein/min	13.5	10.4	9.2	13.7
	±0.63 (5)	±2.50 (5)	±0.42 (7)	±0.69 (3)
Zużycie cytrynianiu we frakcji cytoplazmatycznej w nmol/mg białka/min				

Incubation mixture contained: Tris-HCl, pH 7.3, 64 μ moles; $MnSO_4$, 22.5 μ moles; citrate, 1.0 μ mole; NADP, 0.5 μ mole; cytoplasmic protein, 2 mg. Incubation time—10 min. Values are means \pm SE for the number of experiments in brackets.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 64 μ mole; $MnSO_4$, 22.5 μ mole; cytrynian, 1.0 μ mol; NADP, 0.5 μ mola; białko cytoplazmatyczne, 2 mg. Czas inkubacji — 10 min. Wyniki przedstawiają średnią \pm SE. W nawiasach podano liczbę doświadczeń.

The activity of aconitase and aspartate transaminase — enzymes involved in the examined sequence of reactions — was not found to be affected by any of the applied pathological conditions. The NADP — dependent isocitrate dehydrogenase activity increases both in hypoxia and anesthesia.

Measurements of glutamate tissue content in normal conditions, in hypoxia and anesthesia revealed that the level of both endogenous glutamate and that formed in vitro in the citrate oxidation reaction decreases during hypoxia as compared to the control and anesthesia.

The activity of IDH NADP localized in the mitochondrial fraction changes also in hypoxic conditions. Both in the fresh mitochondrial fraction and in that preincubated at 37°C obtained from animals subjected to hypoxia, the IDH NADP activity was not observed. The sonicated mitochondrial fraction also showed a much lower IDH NADP activity after hypoxia as compared with the control.

Table 2. Aconitase, aspartate aminotransferase and NADP — isocitrate dehydrogenase activity in cytosol of rat brain under different conditions

Tabela 2. Aktywność akonitazy, asparaginianowej aminotransferazy i NADP-izocytrynianowej dehydrogenazy w cytozolu mózgu szczura w różnych warunkach doświadczalnych

	μmole/mg protein/min μmole/mg białka/min		
	Control Kontrola	Hypoxia Hypoksja	Anaesthesia Anestezja
I Aconitase Akonitaza	7.3 ±0.04 (3)	7.6 ±0.46 (3)	7.4 ±0.95 (3)
II Aspartate aminotransferase Asparaginianowa aminotransferaza	24.0 0 (3)	23.0 ±0.76 (3)	23.0 ±0.90 (3)
III NADP-isocitrate dehydrogenase NADP-izocytrynianowa dehydroge- naza	10.1 ±0.72 (6)	15.1 ±1.62 (4)	14.2 ±0.87 (9)

I — Incubation mixture contained: Tris-HCl, pH 7.3, 64 μmoles; MnSO₄, 22.5 μmoles; cytoplasmic protein, 2 mg; isocitrate 1.0 μmole. Incubation time — 10 min. The citrate increase was measured.

I — Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 64 μmole; MnSO₄ 22.5 μmola; białko cytoplazmatyczne, 2 mg; izocytrynian 1.0 μmol. Czas inkubacji — 10 min. Mierzono wzrost cytrynianu.

II — Incubation mixture contained in the final volume of 3 ml; 2.3 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 7.6 containing 1.2×10^{-1} M aspartate, 0.1 ml of 0.2 M α -ketoglutarate, 0.05 ml of 1.2×10^{-2} M DPNH, 0.25 mg/ml of MDH. Incubation time — 5 min.

II — Mieszanina inkubacyjna o końcowej objętości 3 ml zawierała: 2.3 ml of 0.1 M fosforanowego buforu pH 7.6 zawierającego 2.5×10^{-1} M asparaginian, 0.1 ml 0.2 M α -ketoglutaran, 0.05 ml 1.2×10^{-2} M DPNH, 0.25 mg/ml MDH. Czas inkubacji — 5 min.

III — Incubation mixture contained: Tris-HCl, pH 7.3, 40 μmoles; MgCl₂, 18 μmoles; isocitrate, 0.6 μmole; NADP, 0.5 μmole, cytoplasmic protein 0.7 mg. Incubation time — 5 min.

III — Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 40 μmoli; MgCl₂, 18 μmoli; izocytrynian, 0.6 μmola; NADP, 0.5 μmola, białko cytoplazmatyczne 0.7 mg. Czas inkubacji — 5 min.

Values are means \pm SE for the number of experiments in brackets.

Wyniki przedstawiają średnią \pm SE. W nawiasach podano liczbę doświadczeń.

Preincubation of mitochondria with oleate (200 μmoles/mg of protein) was found to induce enzyme activity. However, preincubation of mitochondria previously disrupted by sonification does not produce any increase of the IDH NADP activity.

It was observed that in normal conditions the in vitro activity of cytoplasmic IDH NADP is inhibited by ATP in concentrations of 10^{-7} M and higher. Lower ATP concentrations stimulate the enzyme activity.

Table 3. Effect of hypoxia and anaesthesia upon glutamate concentration in cytosol of rat brain

Tabela 3. Wpływ hypoksji i anestezji na stężenie glutaminianu w cytozolu mózgu szczura

Conditions Warunki dośw.	µmole of glutamate in the whole sample µmole glutaminianu w całej próbce			
	endogenous endogenne		after citrate oxidation reaction po reakcji utleniania cytrynianu	
Control Kontrola	0.262		0.890	
	±0.0091	(3)	±0.0037	(3)
Hypoxia Hypoksja	0.221		0.760	
	±0.0069	(3)	±0.0012	(3)
Anaesthesia Anestezja	0.257		0.891	
	±0.0085	(3)	±0.0012	(3)

The citrate oxidation reaction was performed in a mixture containing: Tris-HCl, pH 7.3, 64 µmoles; MnSO₄, 22.5 µmoles; NADP, 0.5 µmole; sodium isocitrate, 1.0 µmole; cytoplasmic protein, 2 mg. Incubation time — 60 min. The glutamate concentration after the reaction was expressed as a difference between the obtained value and the amount of endogenous glutamate. Values are means ± SE for the number of experiments in brackets.

Reakcja utleniania cytrynianu prowadzona była w mieszaninie zawierającej: Tris-HCl, pH 7.3, 64 µmole; MnSO₄, 22.5 µmola; NADP, 0.5 µmola; izocytrynian sodu, 1.0 µmol; białko cytoplazmatyczne, 2 mg. Czas inkubacji — 60 min. Stężenie glutaminianu po reakcji było oznaczane jako różnica między uzyskaną wartością a ilością endogennego glutaminianu. Wyniki przedstawiają średnią ±SE. W nawiasach podano liczbę doświadczeń.

DISCUSSION

The drop in activity of the cytoplasmic citrate-oxidizing system (Gromek, Rafałowska, 1972) observed in ischemic and hypoxic conditions (Table 1) is not related to changes in activity of the enzymes participating in the examined sequence of reactions (Table 2). In normal conditions, aconitase, isocitrate dehydrogenase and aspartate transaminase activities were close to those obtained for the brain tissue by Shephard (1954, 1956) and Balazs et al. (1966). In hypoxia, aconitase and aspartate transaminase activities remained unchanged, while that of IDH NADP increased (Table 2). However, the level of the final product of the examined sequence of reactions—glutamate— was found to decrease under hypoxic conditions (Table 3). Taking into account the above data and the fact that the amount of citrate introduced into the reaction was optimal, one may assume the decrease of aspartate level and accumulation of alpha-ketoglutarate to be the cause of inhibition of citrate oxidation in hy-

Table 4. Effect of storage and sonification on IDH NADP activity in mitochondrial fraction of rat brain under hypoxic conditions

Tabela 4. Wpływ przechowywania i sonifikacji na aktywność IDH NADP we frakcji mitochondrialnej mózgu szczura po hipoksji.

Conditions Warunki	μmole NADPH/mg protein/min μmole NADPH/mg białka/min		
	fresh mitochondrial fraction świeża frakcja mitochondrialna	mitochondrial fraction preincubated at 37° C preinkubowana frakcja mitochondrialna w 37° C	sonificated mitochondrial fraction sonifikowana frakcja mitochondrialna
Control Kontrola	0.52 ±0.12 (6)	3.40 ±0.90 (3)	5.50 ±0.69 (3)
Hypoxia Hypoksja	0 (3)	0 (3)	3.3 ±0.76 (3)

Incubation mixture contained: Tris-HCl, pH 7.3, 40 μmoles; MgCl₂, 18 μmoles; isocitrate, 0.6 μmole; NADP, 0.5 μmole, mitochondrial protein, 1.5 mg; KCN, 1 mM. Values are means ±SE for the number of experiments in brackets.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: Tris-HCl, pH 7.3, 40 μmoli; MgCl₂, 18 μmoli; izocytrynian, 0.6 μmola; NADP, 0.5 μmola, mitochondrialne białko, 1.5 mg; KCN, 1 mM. Wyniki przedstawiają średnią ±SE. W nawiasach podano liczbę doświadczeń.

poxia in the examined sequence of reactions. This suggestion is consistent with the results obtained by Tews et al. (1963) and Duffy et al. (1972), who demonstrated a decrease of aspartate level and an increase of alpha-ketoglutarate content in brain during hypoxia.

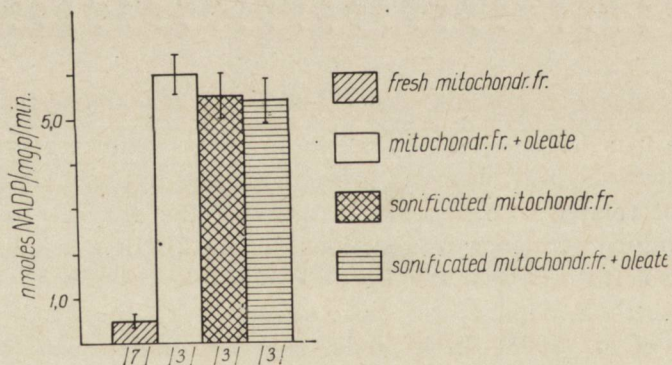


Fig. 1. Effect of oleate and sonification on IDH NADP activity in mitochondrial fraction.

Wykres 1. Wpływ oleinianu i sonifikacji na aktywność IDH NADP we frakcji mitochondrialnej.

The absence of changes in citrate oxidation during anesthesia ensures sufficient amounts of aspartate, which level increases in barbiturate ane-

sthesia (Dobkin, 1972). In brain the mitochondrial fraction contains about 10% of the total amount of IDH NADP (Rafałowska, et al., 1973). In hypoxia, the activity of this enzyme in the mitochondrial fraction decreases (Table 4). Oleate causes appearance of the IDH NADP activity in the fresh mitochondrial fraction, not affecting this activity in mitochondria sonificated prior to the test (Fig. 1). It seems that the increase

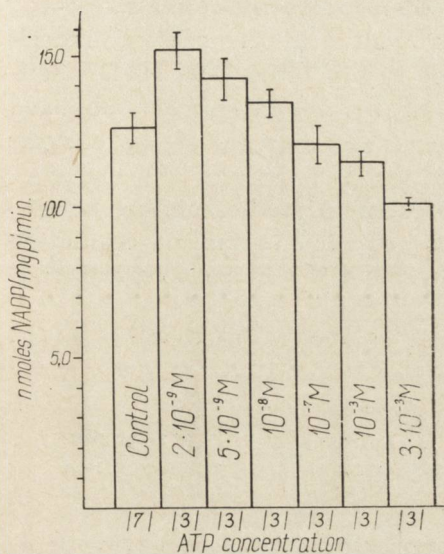


Fig. 2. IDH NADP-dependent activity in cytosol of brain in the presence of ATP. Wykres 2. Aktywność IDH NADP-zależnej w cytozolu mózgu w obecności ATP.

of the IDH NADP activity in the cytoplasmic fraction, with a concomitant decrease of this activity in the mitochondrial fraction observed in hypoxia might be due to the penetration of the enzyme from mitochondria to the cytoplasm. This phenomenon is probably related to structural changes within the mitochondrial membranes in the presence of fatty acids (Wojtczak et al., 1969), which are known to accumulate in conditions of oxygen insufficiency (Bazan et al., 1971a, Strosznajder et al., 1972).

From the works of Bazan (1972 b) and Majewska et al. (1974) it appears that contrary to hypoxia, nembutal anesthesia produces no release of fatty acids in the mitochondria. In addition, anesthetics are known to exhibit a stabilizing effect on the membranes by inhibiting the hydrolytic activity of phospholipase A (Scherphof et al., 1972).

Recent studies (Rossowska, Rafałowska, 1973) revealed that the increase in activity of some enzymes in the cytosol with its parallel drop in the mitochondrial fraction, which is characteristic of hypoxia, is not to be seen in animals in which hypoxia was induced after administration of nembutal.

The results of the above mentioned studies suggest that the increase of IDH NADP activity in cytosol observed during anesthesia could have

not resulted from the penetration of the enzyme from mitochondria. As shown in Fig. 2, low concentrations of ATP (2—50 nmoles) cause an increase of the IDH NADP activity.

Gatfield et al. (1966) demonstrated that the cerebral ATP level in anesthesia is somewhat higher than in control conditions and the decrement of the brain ATP content occurring usually in the course of preparation, is less marked in anesthetized than in control animals.

Possibly the low ATP concentrations applied in the present experiments, which bring about an increase of the in bitho IDH NADP activity, correspond to the ATP level in brain cytosol in animals subjected to nembutal anesthesia and cause the observed increase of the enzyme activity.

The present work represents the first step in studies aiming at elucidation of the sequence of disturbances of the mechanism regulating carbohydrate and energy metabolism in the CNS in pathological conditions.

Acknowledgements: The technical assistance of Mrs. M. Skorupka is greatly appreciated.

U. Rafałowska, A. Gromek

WPLYW NIEDOSTATKU TLENOWEGO I NARKOZY NEMBUTALOWEJ NA UTLENIANIE CYTRYNIANU W CYTOZOLU MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Badano wpływ niedoboru tlenowego i anestezji nembutalowej na aktywność cytoplazmatycznego systemu utleniania cytrynianu w mózgu szczurów.

W warunkach hypoksji obserwuje się obniżenie aktywności układu. Anestezja nembutalowa nie zmienia aktywności cyklu. Inhibicja utleniania cytrynianu w cytoplazmie mózgu szczurów w warunkach hypoksji nie zależy od zmian aktywności enzymów biorących udział w procesie utleniania.

W warunkach hypoksji aktywność akonitazy i transaminazy asparaginianowej nie zmienia się, a dehydrogenazy kwasu izocytrynianowego, NADP-zależnej — wzrasta. Zawartość glutaminianu w mózgu zwierząt poddanych hypoksji ulega obniżeniu. Obniżenie zawartości asparaginianu może być odpowiedzialne za inhibicję aktywności cyklu w warunkach hypoksji, a w warunkach anestezji obserwuje się wzrost asparaginianu, któremu odpowiada normalna aktywność cytoplazmatycznego utleniania cytrynianu. Wzrost w cytoplazmie aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej w warunkach hypoksji, związany jest najprawdopodobniej z przenikaniem enzymu z mitochondriów. Odnośnie podwyższonej aktywności enzymu w warunkach anestezji nembutalowej można uważać za bardzo prawdopodobny udział ATP, którego poziom ulega podwyższeniu.

У. Рафаловска, А. Громек

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И НЕМБУТАЛОВОЙ АНЕСТЕЗИИ НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ОКИСЛЕНИЯ ЦИТРАТА В МОЗГУ КРЫС

Резюме

Было исследовано влияние гипоксии и нембуталовой анестезии на активность цитоплазматической системы окисления цитрата в мозгу крыс. В условиях

гипоксии наблюдается уменьшение активности системы. Нембуталовая анестезия не изменяет активности цикла. Подавление окисления цитрата в цитоплазме мозга крыс в условиях гипоксии не зависит от активности ферментов, участвующих в процессе окисления.

В условиях гипоксии активность аконитазы и аспарат-трансаминазы не изменяется, активность же дегидрогеназы изолимонной кислоты НАДФ-зависимой увеличивается.

Содержание глутамата снижается в мозгу животных, подверженных гипоксии. Уменьшение содержания аспартата может быть ответственным за подавление активности цикла в условиях гипоксии, в условиях анестезии наблюдается увеличение аспартата, которому соответствует нормальная активность цитоплазматического окисления цитрата. Увеличение в цитоплазме активности изолимонной дегидрогеназы в условиях гипоксии по всей вероятности связано с выходом фермента из митохондрий.

Повышенную ферментативную активность можно сопоставить с повышением уровня АТФ, низкие концентрации которого активизируют активность этого фермента.

RECENCES

1. Atkinson, D. E.: The control of Citrate Synthesis and Breakdown. In: Citric Acid Cycle-Control and Compartmentation. Ed. J. M. Lowenstein, 1969, 137—161.
2. Balazs, R., Dahl, D. and Harwood, J. R.: Subcellular Distribution of Enzymes of Glutamate Metabolism in Rat Brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 897—905.
3. Bazan, N. G., Bazan, H. E. P., Kenedy, W. G.: Regional distribution and rate of production of free fatty acids in rat brain. *J. Neurochem.*, 1971a, 18, 1387—1393.
4. Bazan, N. G.: Changes in Free Fatty Acids of Brain by Drug-Induced Convulsions, Electroshock and Anaesthesia. *J. Neurochem.*, 1971 b, 18, 8, 1379—1385.
5. Bergmeyer, H. U., Bernt, E.: Glutamate—Oxaloacetate Transaminase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. by Bergmeyer, 1963 b, 837—845.
6. Bernt, E., Bergmeyer, H. U.: -Glutamate Determination with Glutamic Dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. by H. U. Bergmeyer. Academic Press, New York 1963 a, 384—388.
7. Dobkin, J.: Effects of excitation and anaesthesia on the glutamate content of the rat brain with a reference to the administration of glutamine. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 1195.
8. Duffy, T. E., Nelson, S. R., Lowry, O. H.: Cerebral Carbohydrate Metabolism During Acute Hypoxia and Recovery. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 959—977.
9. Gatfield, P. D., Lowry, O. H., Schulz, D. W., Passonneau, J. V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischemia and anesthesia. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 185—195.
10. Goldberg, N. D., Passonneau, J. V. and Lowry, O. H.: Effects of Changes in Brain Metabolism on the Levels of Citric Acid Cycle Intermediates. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3997—4003.
11. Gromek, A., Rafałowska, U.: Citrate Oxidation in the Cytoplasmic Fraction of Rat Brain. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2687—2695.
12. Layne, E.: Protein estimation with Folin — Ciocalteu Reagent Methods in *Enzymology*. Ed. Colowick P., Caplan N. O. Academic Press, New York 1957, 3, 448—450.

13. Majewska, D., Gromek, A., Strosznajder, J.: Properties of brain mitochondria in conditions of ischemia and nembutal anaesthesia in guinea-pigs. *Bull. Acad. Polon. Sci, ser. biol.*, 1974, vol. XXII, 4, 267—273.
14. Natelson, S., Pincus, J. B. and Lugovoy, I. K.: Microestimation of Citric Acid: A New Colorimetric Reaction for pentabromoacetone. *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 745—750.
15. Ochoa, S.: Isocitric Dehydrogenase System (TPN) from pig heart. In: *Methods in Enzymology*. Ed. by Colowick S. P. and Kaplan N. O. Academic Press Inc. New York 1955, vol. 1, 699—704.
16. Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H., Araki, C.: On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem.*, 1966, 59, 501—510.
17. Plaut, G. W. E., Sung, S. C.: Diphosphopyridine Nucleotide Isocitric Dehydrogenase from Animal Tissues. In: *Methods in Enzymology*. Ed. by Colowick S. P. and Kaplan N. O., Academic Press, New York 1955, 1, 710—714.
18. Rafałowska, U., Pastuszko, A., Gromek, A.: Charakterystyka niektórych właściwości izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej w mózgu szczura. *Doniesienie na Zjeździe „VII Neurologii Klinicznej” Łódź 1973.*
19. Rossowska, M., Rafałowska, U.: Zmiany w lokalizacji aminotransferazy alaniinowej i dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej w subfrakcjach komórkowych mózgu w warunkach niedoboru tlenu i anestezji. *XI Zjazd P.T. Bioch., Białystok 1973.*
20. Scherphof, G. L., Scarpa, A., von Toorenbergen, A.: The Effect of Local Anesthetics on the Hydrolysis of Free and Membrane Bound Phospholipids by Various Phospholipases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 270, 226—240.
21. Schmid, E.: Glutamic Dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* Ed. by H. U. Bergmeyer. Acad. Press, New York 1963, 752—756.
22. Shephard, J. A. and Kalnitsky, G.: Intracellular distribution of fumarase, aconitase and isocitric dehydrogenase in rabbit cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 1954, 207, 605—611.
23. Shephard, J. A.: Factors Influencing the Determination of the Intracellular Distribution of Isocitric Dehydrogenase in Rabbit Cerebral Cortex. *J. Histochem. Cytochem.*, 1956, 4, 47—54.
24. Srere, P. A.: Studies on purified citrate-enzymes metabolic interpretation. In: *Metabolic Roles of Citrate*. Ed. by T. W. Goodwin. Academic Press, London 1968, 12—32.
25. Strosznajder, J., Gromek, A., Łazarewicz, J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świń morskich. *Neuropatol. Pol.*, 1972, 10, 447—455.
26. Tews, J. K., Carter, S. H., RCA, P. D. and Stone, W. E.: Free amino and related compounds in dog brain. Post mortem and anoxic changes, effects of ammonium chloride infusion, and levels during seizures induced by picrotoxin and by pentylenetetrazol. *J. Neurochem.*, 1963, 10, 641—653.
27. Tuček, S.: Observations on the Subcellular Distribution of Choline Acetyltransferase in the Brain Tissue of Mammals and Comparisons of Acetylcholine Synthesis from Acetate and Citrate in Homogenates and Nerve Ending Fractions. *J. Neurochem.*, 1967 a, 14, 519—529.

28. Tuček, S.: Subcellular Distribution of Acetyl-CoA Synthetase, ATP Citrate lyase, Citrate synthase, Choline Acetyltransferase, Fumarate Hydratase and Lactate Dehydrogenase in Mammalian Brain Tissue. *J. Neurochem.*, 1967 b, 14, 531—545.
29. Wojtczak, L., Bogucka, K., Sarzała, M. G. and Załuska, H.: Effect of Fatty Acids on Energy Metabolism and the Transport of Adenine Nucleotides in Mitochondria and other Cellular. *FEBS Symposium Acad. Press, London 1969*, 17, 79—82.

Adres autorów: 00-784 Warszawa, Dworkowa 3, Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

ZABURZENIA UKRWIENIA MÓZGU W OSTRYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA U SZCZURÓW

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

Rola zaburzeń krążenia w patogenezie uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego w zatruciu tlenkiem węgla jest powszechnie akceptowana. Szczególnie istotne znaczenie przypisuje się ogólnoustrojowym zaburzeniom hemodynamicznym, występującym zarówno u ludzi jak i w materiale doświadczalnym, a związanym z uszkodzeniem mięśnia sercowego, zwłaszcza komory prawej i prowadzącym do spadku ciśnienia tętniczego i wzrostu ciśnienia żylnego. Zaburzenia te na terenie ośrodkowego układu nerwowego, manifestują się zarówno jego niedokrwieniem jak i przekrwieniem żylnym sprzyjającym rozwojowi obrzęku mózgu (Lehoczky 1949, Romanowa 1959, Környey 1963, Bour i wsp. 1967, Preziosi i wsp. 1970, Korthals i wsp. 1973).

Odrębności unaczynienia poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego, wyrażające się szczególnie ubogą siecią naczyniową lub niekorzystnym z punktu widzenia hemodynamiki odejściem naczyń zaopatrujących daną formację od ich pni macierzystych bądź wreszcie położeniem w obszarze granicznych stref unaczynienia sprawiają, że ogólnoustrojowe zaburzenia hemodynamiczne zostają pogłębione przez miejscowy czynnik angioarchitektoniczny, czego następstwem są trwałe uszkodzenia tkanki nerwowej w tych właśnie obszarach (Brzeziński 1930, Lehoczky 1949, Környey 1963, Korthals i wsp. 1973). Pospolite w zatruciu tlenkiem węgla u ludzi ogniska martwicy w gałce bladej przypisuje się takim właśnie odrębnościom angioarchitektonicznym (Brzeziński 1930), współistniejącym zresztą z jej swoistymi właściwościami metabolicznymi (Pentschew 1958). Specyfice regionalnego unaczynienia rogu Amona i kory ciemieniowej u szczurów, Korthals i wsp. (1973) przypisują częstość występowania ogniskowych uszkodzeń tkankowych w tych obszarach ośrodkowego układu nerwowego w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Przekrwienie żyłne stanowiące stałe następstwo zatrucia tlenkiem węgla, ma z kolei sprzyjać obserwowanym w tych warunkach

uszkodzeniom istoty białej półkul mózgu (Lindenberg 1963, Lapresle, Fardeau 1967, Brucher 1967, Preziosi i wsp. 1970, Korthals i wsp. 1973). Zależność nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych mózgu od współdziałania ogólnoustrojowych i miejscowych zaburzeń hemodynamicznych udokumentował przekonująco Környey (1963), wykazując, że ogniskowe zmiany w jądrze ogoniastym występowały tylko u tych zwierząt, u których zatruciu tlenkiem węgla towarzyszyły zaburzenia krążeniowo-oddechowe, niezależnie od czasu trwania zatrucia.

Jellinger (1966) zwraca uwagę na możliwość występowania miejscowych zaburzeń krążenia w mózgu, niezwiązanych z ogólnoustrojowymi zaburzeniami hemodynamicznymi i regionalnymi właściwościami angioarchitektonicznymi, jako podłoża rozszanych, ogniskowych uszkodzeń tkanki nerwowej.

W materiale doświadczalnym zwraca uwagę zróżnicowanie intensywności, charakteru i umiejscowienia trwałych uszkodzeń tkankowych w osrodkowym układzie nerwowym, opisywanych przez poszczególnych autorów. Wydaje się, że zjawisko to może być związane między innymi z odmiennością angioarchitektoniki mózgu u poszczególnych gatunków zwierząt i wynikającym stąd zróżnicowaniem miejscowych zaburzeń hemodynamicznych. Skłoniło nas to do prześledzenia stanu sieci naczyniowej mózgu szczurów w okresie zatrucia CO i w czasie 48 godzin po zatruciu, stosując ten sam model doświadczalny, w którym Korthals i wsp. (1973) uzyskali powtarzalne nieprawidłowości tkankowe.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 6-tygodniowych szczurach rasy Wistar, płci obojga; 20 zwierząt doświadczalnych poddano zatruciu tlenkiem węgla, wg sposobu opisanego przez Korthalsa i wsp. (1973). Zwierzęta umieszczano w komorze o pojemności 60 l, przez którą przepuszczano z szybkością 1 l/min. powietrze zawierające 1% tlenu węgla uzyskiwanego przez rozkład kwasu szczawiowego. Mieszaninę gazową o powyższym składzie podawano do komory doświadczalnej przez okres 60 min., a następnie wyłączano dopływ tlenu węgla, przepuszczając przez dalsze 30 min. czyste powietrze, co prowadziło do stopniowego zmniejszania zawartości CO w komorze, w której przebywały zwierzęta. Łączny czas przebywania zwierząt w komorze doświadczalnej wynosił 90 min. Poziom hemoglobiny tlenkowej we krwi, oznaczanej metodą Whiteheada i Worthingtona (1961) w 60 min. zatrucia wynosił średnio 65—70%, a w 90 min. spadał zazwyczaj do 50%. Po wyjęciu z komory szczury przebywały w standardowych warunkach zwierzętarnianych przez okres czasu określony planem doświadczenia.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację w 30 i 60 minucie zatrucia, a następnie bezpośrednio po wyjęciu z komory (czas „0”) oraz po upływie 30, 60 min. i 2, 4, 6, 24 i 48 godzin od zatrucia.

Grupę kontrolną stanowiły trzy szczury nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Mózgi po wyjęciu z jamy czaszki utrwalano w 10% zubożonej formalinie, a następnie dzielono na bloki cięciami prowadzonymi w płaszczyźnie czołowej na wysokości skrzyżowania nn. wzrokowych, dołu międzykonarowego i granicy mostu i opuszki. Mrozikowe skrawki opracowywano benzydynową metodą Pickwortha dla uwidocznienia sieci naczyniowej poszczególnych struktur mózgowia. Ze względu na zastosowanie identycznych warunków doświadczalnych, jak w pracy Korthalsa i wsp. (1973), w której przedstawiono dokładną analizę patomorfologiczną materiału, w niniejszym opracowaniu pominięto badanie histopatologiczne.

WYNIKI

U zwierząt kontrolnych układ naczyniowy kory mózgu reprezentowany jest przez gęstą sieć naczyń różnego kalibru, wśród których wyróżnia się wyraźnie poszczególne typy naczyń (ryc. 1). Cechą charakterystyczną jest brak układów angioarchitektonicznych odpowiadających warstwowej strukturze kory i promienisty w stosunku do powierzchni półkul przebieg większych pni tętniczych i żylnych. Sieć naczyniowa, skąpej istoty białej półkul mózgowych jest znacznie uboższa (ryc. 2), zwraca przy tym uwagę równoległy do przebiegu pęczków włókien nerwowych układ naczyń żylnych. Unaczynienie jąder podstawy, a zwłaszcza czołowej części prądkowia i wzgórza jest znacznie bogatsze, nie wykazując przy tym żadnych typowych układów angioarchitektonicznych. W obrazie unaczynienia zawoju hipokampa na podkreślenie zasługuje różnicowanie gęstości sieci kapilarnej w jego poszczególnych częściach, z uformowanym wyraźnie splotem naczyniowym w warstwie komórek piramidowych rogu Amona i zgrupowaniem naczyń żylnych w jego części centralnej (ryc. 3). Angioarchitektonika kory mózdzku charakteryzuje się znacznym zagęszczeniem sieci kapilarnej w warstwie ziarnistej i komórek Purkinjego (ryc. 4) przy znacznie słabszym unaczynieniu warstwy drobinowej i jeszcze uboższym blaszek istoty białej. Mozaikowa angioarchitektonika pnia mózgu swoimi zagęszczeniami wyznacza ugrupowania istoty szarej.

U zwierząt zabijanych w 30 minucie zatrucia spostrzega się wyraźne zubożenie ukrwienia wszystkich struktur ośrodkowego układu nerwowego (ryc. 5), związane w pierwszej kolejności z mniejszym wypełnieniem krwią sieci naczyń włosowatych i tętniczych, przy równoczesnym znacznym wypełnieniu naczyń żylnych masami erytrocytów wybarwionych benzydyną. Większe niż w materiale kontrolnym, wypełnienie krwią naczyń żylnych najwyraźniej zaznacza się w tym okresie w istocie białej półkul (ryc. 6), a zmniejszenie ukrwienia w strukturach rogu Amo-

na, szczególnie w jego warstwach komórkowych (ryc. 7). Sześćdziesiąta minuta zatrucia charakteryzuje się znacznym przekrwieniem wszystkich struktur ośrodkowego układu nerwowego, w tym przede wszystkim istoty białej i kory mózgu (ryc. 8), jąder podstawy, wzgórza i mózdzku (ryc. 9). Elementem dominującym w obrazie mikroskopowym jest przepełnienie krwią naczyń żylnych. Jednakże już w tym okresie zaznacza się znaczna nierównomierność ukrwienia poszczególnych struktur mózgu, szczególnie wyraźna w *neocortex* i wzgórzu wzrokowym (ryc. 10). W momencie zakończenia zatrucia (czas „0”) utrzymują się nadal cechy przekrwienia mózgu z dominującym wypełnieniem masami krwi naczyń żylnych (ryc. 11), jednakże jeszcze wyraźniej niż w grupie poprzedniej zaznacza się nierównomierność ukrwienia kory i wzgórza.

W 30 i 60 minucie po zakończeniu zatrucia cechy przekrwienia mózgu cofają się, choć nadal utrzymuje się znaczne rozszerzenie naczyń żylnych (ryc. 12). Dominuje jednak słabe w porównaniu zarówno z bezpośrednio poprzednią grupą czasową, jak i ze zwierzętami kontrolnymi, wypełnienie sieci naczyń tętniczych i włosowatych, szczególnie znaczne w grupie 60-minutowej. Osłabienie ukrwienia zaznacza się w nowej korze mózgu (ryc. 13), we wzgórzu i w strukturach rogu Amona. Unaczynienie pnia mózgu, formacji węchomózgowia i przedniej części prądkowia jest znacznie lepsze. Skąpe wypełnienie krwią sieci naczyń włosowatych pogłębia się bardzo wydatnie w drugiej godzinie po zatruciu, obejmując wszystkie struktury szare półkul mózgu, zwłaszcza jednak zawój hipokampa (ryc. 14), korę czołową i jądra podstawy (ryc. 15). Sieć naczyniowa w 4 godzinie po zatruciu przypomina obrazy obserwowane u zwierząt kontrolnych (ryc. 16, 17), jednakże nadal spostrzega się nierównomierne ukrwienie poszczególnych formacji ośrodkowego układu nerwowego. Plackowate obszary słabego ukrwienia kory mózgu i wzgórza wzrokowego, położone na tle ich prawidłowego zaopatrzenia w krew, spotyka się również u zwierząt usypianych w 6, a nawet w 24 godzinie po zatruciu (ryc. 18). Pełna normalizacja ukrwienia ośrodkowego układu nerwowego występuje dopiero w 48 godzinie po zatruciu.

OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych powyżej badań wskazują, że ostremu zatruciu tlenkiem węgla towarzyszą uogólnione i regionalne zaburzenia ukrwienia mózgu, co stanowi potwierdzenie poprzednich obserwacji Romanowej (1959), Környeya (1963), Preziosi i wsp. (1970) i innych. Na odrębne omówienie zasługuje charakterystyczna dynamika zmian w ukrwieniu ośrodkowego układu nerwowego, które ze względu na swój morfologiczny charakter i uogólnienie uznać można za wykładniki ustrojowych zaburzeń hemodynamicznych, stanowiących następstwo za-

trucia CO. Zwraca przede wszystkim uwagę ich wielofazowość. Fazę najwcześniejszą, uchwyconą w 30 min. zatrucia, charakteryzuje zubożenie ukrwienia wszystkich struktur ośrodkowego układu nerwowego, z zaznaczonym jednak wyraźnie nadmiernym poszerzeniem naczyń żylnych, szczególnie w istocie białej półkul mózgu. Kolejną fazę, występującą w późniejszym okresie zatrucia znamionuje uogólnione przekrwienie ośrodkowego układu nerwowego, które ze względu na dominujące wypełnienie elementami krwi naczyń żylnych, uznać należy za przekrwienie żyłne, utrzymujące się na tym samym poziomie do 90 min. doświadczenia tj. do wyjęcia zwierząt z komory doświadczalnej. W ciągu pierwszej godziny po zatruciu utrzymuje się nadal przekrwienie żył, przy zmniejszającym się wyraźnie wypełnieniu sieci naczyń tętnicznych i kapilarnych. Obraz morfologiczny sieci naczyń mózgowych w 2 godziny po zatruciu sugeruje wystąpienie wtórnej fazy niedokrwiennej, mimo to że w poszczególnych strukturach układu nerwowego, spotrzega się pojedyncze znacznie wypełnione krwią naczynia żyłne. Zjawisko to zresztą utrzymuje się do końca obserwacji. W 4 godzinie po zatruciu następuje wyraźna poprawa ukrwienia mózgu. Obraz sieci naczyniowej, poza pewnym zróżnicowaniem regionalnym, zbliżony jest do stwierdzanego u zwierząt kontrolnych. W ciągu kolejnych godzin obserwacji postępuje dalsza normalizacja ukrwienia. W przedstawionym materiale zwraca uwagę krótkotrwałość uogólnionych zaburzeń ukrwienia mózgu, zamykających się w przedziale 4 godzin po zatruciu. W przypadkach zatrucia tlenkiem węgla u ludzi, do kilkunastu godzin po zatruciu obserwuje się cechy zmiennego w nasileniu przekrwienia mózgu (Pentschew 1958, Brucher 1967). Podobnie dłużej trwające zaburzenia w ukrwieniu mózgu obserwowali w swoim materiale doświadczalnym Romanowa (1959), Környey (1963) oraz Preziosi i wsp. (1970). Należy jednak zwrócić uwagę na lekkość zatrucia w zastosowanym przez nas układzie doświadczalnym. Stworzone warunki zatrucia odpowiadające IV grupie doświadczalnej wg Korthalsa i wsp. (1973) sprawiają, że w mózgach zwierząt tej grupy nie występują w ogóle nieodwracalne uszkodzenia strukturalne, mimo obecności głębokich zaburzeń metabolizmu tkanki (Albrecht 1973, Śmiałek i wsp. 1973, Sikorska i wsp. 1974). Dla uzyskania nieodwracalnych zmian morfologicznych niezbędne jest pogłębienie zatrucia, wyrażające się między innymi przedłużeniem stanu śpiączki, w której znajdują się zatrutowane zwierzęta (Korthals i wsp. 1973). Nieprzypadkowa wydaje się jednak zbieżność w czasie głębokiego niedokrwienia mózgu, przypadającego na 2 godz. po zatruciu z najsilniej wyrażonymi zaburzeniami metabolicznymi tkanki (Albrecht 1973, Śmiałek i wsp. 1973). Przy rozpatrywaniu różnic w zachowaniu się sieci naczyniowej w doświadczeniach prowadzonych na różnych zwierzętach uwzględnić należy również łatwość dysocjowania tlenku węgla ze

związku z hemoglobina u szczurów. Poziom hemoglobiny tlenkowej u szczurów wynoszący w naszych warunkach doświadczalnych 50% w momencie zakończenia zatruwania, już po dwóch godzinach przebywania w atmosferze powietrza spadał do 20% (Śmiałek i wsp. 1973).

Na tle omówionych uogólnionych zaburzeń ukrwienia układu nerwowego zwraca uwagę ich znaczne zróżnicowanie regionalne. Strukturalnymi wykazującymi najgłębsze cechy niedokrwienia zarówno we wczesnej fazie zatrucia, jak i w okresie dwóch godzin po zatruciu jest kora amonalna, niektóre okolice *neocortex* oraz wzgórze, podczas gdy cechy przekrwienia żylnego występują najwcześniej i utrzymują się najdłużej w istocie białej półkuli mózgu, w spoidle wielkim i niektórych strukturach pnia mózgu. Nieprawidłowości ukrwienia jąder podstawy i mózdzku są stosunkowo słabiej zaznaczone. Regionalne zróżnicowanie zaburzeń ukrwienia mózgu jest zgodne z lokalizacją trwałych nieprawidłowości strukturalnych, stwierdzanych przez Korthalsa i wsp. (1973) w analogicznych warunkach doświadczalnych, przy przedłużonym czasie śpiączki, stanowiącym wykładnik cięższego zatrucia zwierząt.

Trzecią wreszcie grupę nieprawidłowości ukrwienia mózgu, obserwowanych w naszym materiale stanowią rozsiane ogniska niedokrwienia, prowadzące do obrazu nierównomiernego ukrwienia poszczególnych formacji anatomicznych, występujące przede wszystkim w nowej korze i we wzgórzu. Zjawisko to pojawiające się już w fazie przekrwienia biernego w okresie zatrucia występuje aż do uzyskania pełnej normalizacji obrazu morfologicznego sieci naczyniowej mózgu, tj. do 48 godziny po zatruciu. Analogiczne w swoim rozmieszczeniu i charakterze zmiany opisano w okresie poischemicznym w niedotlenieniu krążeniowym (Mossakowski 1974), wiążąc je z zaburzeniami czynności autoregulacyjnych naczyń mózgu. Należy przy tym podkreślić, że w przypadku hipoksji krążeniowej występowały one w okresie pełnej normalizacji układowego ciśnienia krwi. Wydaje się uzasadnione przypisywanie takiego samego charakteru tej grupie nieprawidłowości ukrwienia, obserwowanej u szczurów z zatruciem CO.

М. Я. Моссаковский

НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ
ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Исследования были проведены в условиях, описанных Смялеком и др. (1973). Животных убивали во время действия CO и в различные сроки после отравления. Мозг фиксировали в формалине, срезы, полученные замораживающей техникой, окрашивали по методу Пикворта для проявления сети мозговых сосудов.

Исследования показали, что уже в ходе воздействия CO выступают значительные нарушения в кровообращении мозга. После отравления наблюдалась пассивная гиперемия, а также местная и очаговая ишемия нервной ткани. Полная нормализация кровообращения наблюдалась через 48 часов после отравления.

В работе обсуждается роль кровоснабжения мозга после отравления в возникновении повреждений нервной ткани.

M. J. Mossakowski

CEREBRAL MICROCIRCULATION ABNORMALITIES IN ACUTE CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Summary

The studies were carried out on adult albino rats of both sexes which were submitted to carbon monoxide intoxication according to the method, described by Śmiałek et al. (1973). Brains of animals, sacrificed during intoxication and at various time intervals of post intoxication period were fixed in formalin and frozen section were stained according to Pickworth's method, aiming in visualization of the cerebral vessels network.

The studies showed that the period of intoxication was characterized by significant abnormalities in cerebral circulation. During post intoxication period exponents of both passive hyperemia and regional as well as focal ischemia of brain tissue were present. Full normalization of brain blood vessel picture occurred at 48 hr following intoxication.

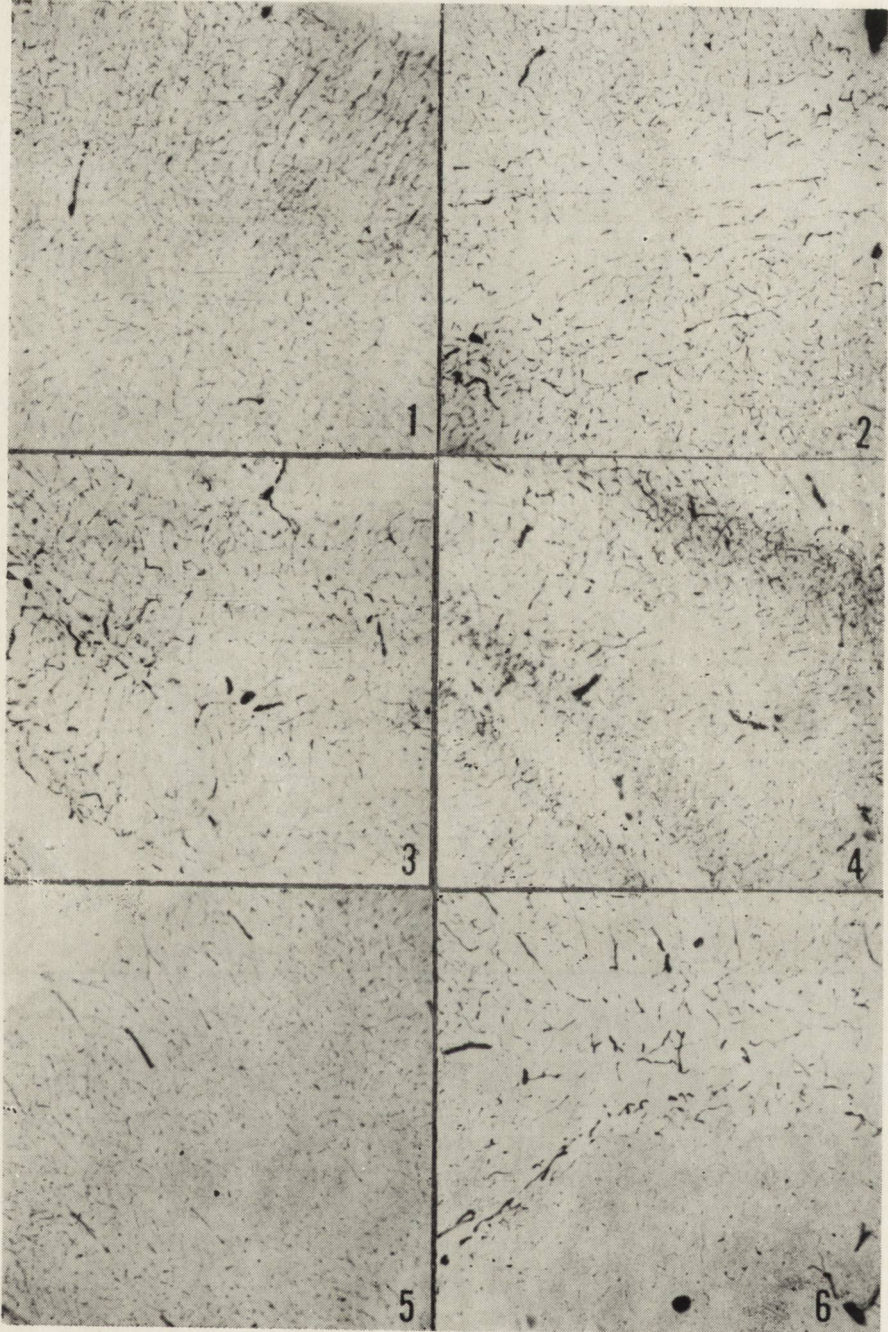
The possible role of brain blood supply disorders during post intoxication period as a factor leading to brain tissue damage is discussed.

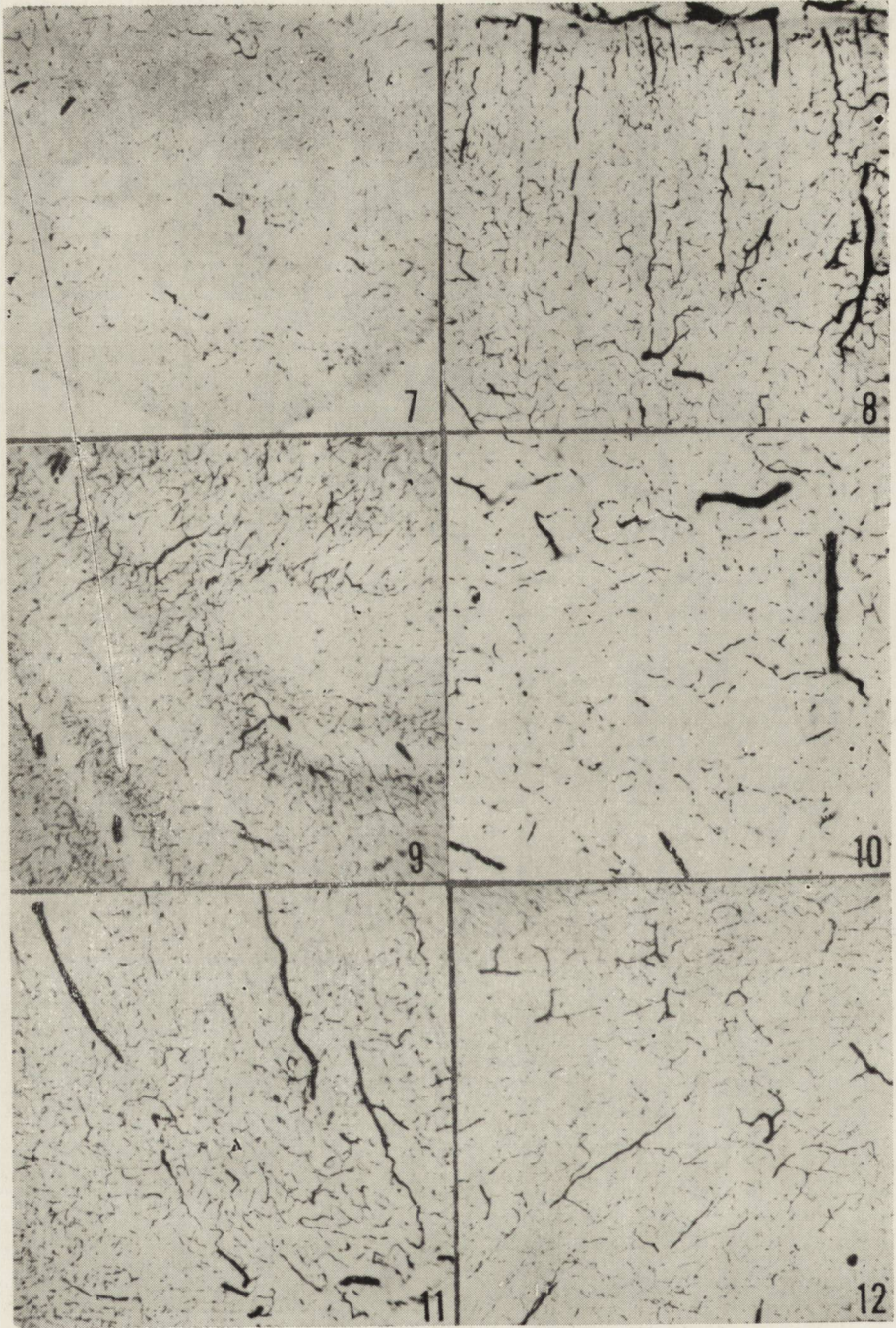
PIŚMIENNICTWO

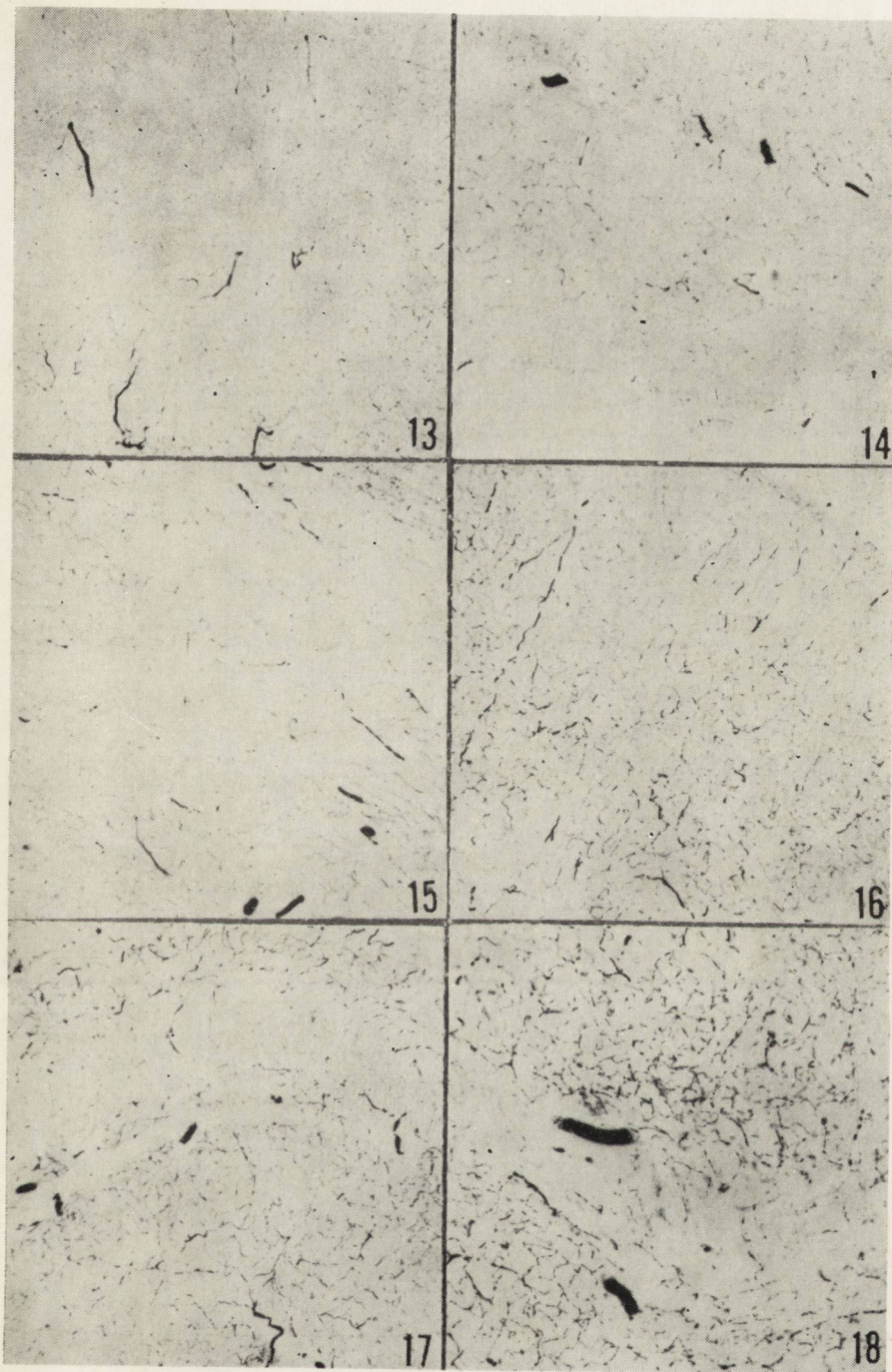
1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
2. Bour H., Tutin M., Paquier P.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. I. Clinical data with reference to 20 fatal cases. *Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour and Mc A. Ledingham. Amsterdam 1967, 24, 1—30.
3. Brucher J. M.: Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. *Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour and Mc A. Ledingham. Amsterdam 1967, 24, 111—127.
4. Brzezicki E.: Zur Frage des Parkinsonismus bei Kohlenoxyvergiftung. *Arbeiten. Neurol. Inst. Wien.* 1930, 30, 148—208.
5. Jellinger K.: Zur Morphologie der Komatöser und postkomatöser Encephalopathien. *Proc. V. Intern. Congress of Neuropath.* Elsevier Med. Found. Amsterdam 1966, 3—20.
6. Környey S.: Patterns of CNS vulnerability in CO, cyanide and other poisoning. *Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxaemia*. Ed. J. P. Schade and W. H. McMenemey, Blackwell, Oxford. 1963, 165—176.
7. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii u szczura. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 278—300.

8. Lapresle J., Fardeau M.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. II. Anatomical study of brain lesions following intoxication with carbon monoxide (22 cases). *Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour and Mc. A. Ledingham. Amsterdam 1967, 24, 96—110.
9. Lehoczy T.: Le mecanisme physiologique des lesions central de l'intoxication oxycarbonée. *Acta Neurol. Belg.* 1949, 49, 488—495.
10. Lindenburg R.: Paterns of CNS vulnerability in acute hypoxaemia, including anaesthesia accidents. Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Ed. J. Schade and McMenemey. Blackwell. Oxford 1963, 189—209.
11. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropath. Pol.* 1974, 12,
12. Pentschew A.: Gasformige Gifte. *Handbuch des Spez. path. Anat. u. Histol.* Ed. O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle. Springer, Berlin 1958. 13/2 B, 2107—2149.
13. Preziosi J. M., Lindenberg R., Levy D., Christensen M.: An experimental investigation in animals of the functional and morphologic effects of a single and repeated exposures to high and low concentrations at carbon monoxide. *Ann. New York Acad. Sci.* 1970, 174, 369—384.
14. Romanowa H. P.: Patologiczeskije izmienenija w głównom mozgu sobak posle terminalnych sostojanii wyzwaných ostroj krowopotierej i otrawlenijem okislju uglewoda. Autoreferat dla uzyskania stopnia kandydata nauk medycznych. Moskwa, 1959.
15. Sikorska M., Bicz W., Śmiałek M., Mossakowski M. J.: ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 387—398.
16. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose glycogen alfa-4-glucosyltransferase activity in rat brain in experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 22—31.
17. Whitehead T. P., Worthington N.: Ahe determination of carboxyhemoglobin. *Clin. Chir. Acta* 1961, 6, 356—358.

Adres autora: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.







PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Sieć naczyniowa kory mózgu, z charakterystycznym prostopadłym do powierzchni przebiegiem tętnic i żył. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 1. Vascular network of cerebral cortex with a characteristic-perpendicular arrangement of arteries and veins. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 2. Ubogie unaczynienie istoty białej w porównaniu z siecią naczyniową kory i jąder podstawy (prążkowie). Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 2. Poor vascularization of white matter as compared to cortex and basal ganglia (striatum). Pickworth meth. X 60.

Ryc. 3. Sieć naczyniowa kory Ammona; zagęszczenie naczyń w warstwie komórkowej i obecność większych żył w centralnej części zawoju. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 3. Vascular network of Ammon cortex. Great density of vessels in cellular layers and the presence of larger veins in the central part of the gyrus. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 4. Naczynia kory mózdzku. Bogata sieć naczyniowa w warstwie ziarnistej, uboższa w warstwie drobinowej i najuboższa w blaszkach istoty białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 4. Rich vascular network in granular layer, poorer in molecular layer and poorest in white matter of cerebellum. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 5. Zubożenie sieci naczyniowej kory mózgu w 30 minucie zatrucia. Nieznaczne poszerzenie naczyń żylnych. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 5. Reduced vascular network in cerebral cortex in the 30th minute of intoxication. Slight dilatation of veins. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 6. Zubożenie sieci naczyniowej kory i jąder podstawy przy równoczesnym wypełnieniu naczyń żylnych istoty białej, a w mniejszym stopniu formacji szarych w 30 min. zatrucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 6. Reduced vascular network of cortex and basal ganglia and a concomitant enlargement of venous vessels of white matter and in a lesser degree in grey formation in the 30th minute of intoxication. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 7. Osłabione ukrwienie kory amonalnej, zwłaszcza warstwy komórek dwupiramidowych w 30 min. zatrucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 7. Reduced blood supply in hippocampal cortex, in particular in pyramidal cells layer in the 30th minute of intoxication. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 8. Bardzo znaczne przekrwienie kory mózgu w 60 min. zatrucia. Wybitne poszerzenie naczyń żylnych. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 8. Very significant hyperemia of cerebral cortex in the 60th minute of intoxication. Marked dilatation of venous vessels. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 9. Znaczne przekrwienie kory mózdzku z dominującym rysunkiem żył w 60 min. zatrucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 9. Marked hyperemia of cerebellar cortex with predominating enlargement of veins of 60th minute of intoxication. Pickworth meth. X 60.

Ryc. 10. Nierównomierne ukrwienie wzgórza w 60 min. zatrucia. Met. Pickwortha. Pow. 100 X.

Fig. 10. Uneven blood supply in thalamus in the 60th minute of intoxication. Pickworth meth. X 100.

Ryc. 11. Przekrwienie kory mózgu w momencie zakończenia doświadczenia. Dominuje przekrwienie żyłne, z obecnością pól słabszego ukrwienia. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 11. Hyperemia of cerebral cortex at the end of the experiment. Predominating venous hyperemia with the presence of fields of weaker blood supply. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 12. Mniej wyrażone niż na *ryc. 11* cechy przekrwienia żylnego wzgórza w 30 min. po zatruciu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 12. Features of venous hyperemia of thalamus 30 min. after intoxication, less expressed than in *Fig. 11*. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 13. Słabe ukrwienie kory mózgu, przy utrzymującym się poszerzeniu naczyń żylnych w 60 min. po zatruciu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 13. Weak blood supply in cerebral cortex and persisting dilatation of venous vessels 60 min. after intoxication. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 14. Niedokrwienie kory amonajnej w 2 godz. po zatruciu. Nadal poszerzone duże naczynia żyłne. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 14. Ischemia of Ammon's horn 2 hrs after intoxication. Large venous vessels still dilatated. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 15. Niedokrwienie jąder podstawy w 2 godz. po zatruciu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 15. Ischemia of basal ganglia 2 hrs after intoxication. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 16. Normalizacja ukrwienia kory mózgu w 4 godz. po zatruciu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 16. Normalization of blood supply 4 hrs after intoxication. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 17. Niemal całkowita normalizacja ukrwienia kory amonajnej w 4 godz. po zatruciu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 17. Almost complete normalization of blood supply in Ammon's horn 4 hrs after intoxication. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 18. Ogniskowe niedokrwienie wzgórza w 24 godz. po zatruciu. Pojedyncze pnie żyłne znacznie rozszerzone. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 18. Focus of reduced blood supply in the thalamus 24 hrs after intoxication. Single veins show a marked dilatation. Pickworth meth. × 60.

JAN ALBRECHT

NIEKTÓRE ETAPY BIOSYNTETY BIAŁKA I RNA W MÓZGU SZCZURA PO WIELOKROTNYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA

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

Upřednio wykazano, że jednorazowe, ostre zatrucie tlenkiem węgla powoduje częściowe i odwracalne zahamowanie syntezy białka w mózgu szczura, przy czym na spadek włączania aminokwasu do mózgu składa się zarówno obniżenie jego transportu przez barierę krew-mózg jak i jego zmniejszone wykorzystanie w syntezie (Albrecht 1973). Zjawiskom tym towarzyszy między innymi spadek zawartości polirybosomów w mózgu, związany ze zmniejszonym transportem RNA z jąder do cytoplazmy. Świadczy to o wybiórczej wrażliwości na działanie CO procesów poprzedzających syntezę aktywnych polirybosomów (Albrecht 1973, 1974). Stwierdzono ponadto, że zahamowanie syntezy białek było znaczniejsze w populacji komórek nerwowych niż w komórkach gleju (Albrecht, Śmiałek 1974). W niniejszej pracy postanowiono zbadać zachowanie się niektórych etapów syntezy RNA i białek w mózгах szczurów poddanych wielokrotnemu działaniu tlenku węgla w odstępach 24-godzinnych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na stopień odwracalności zmian stwierdzanych po zatruciu jednorazowym.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczury dwumiesięczne rasy Wistar, obu płci. Zwierzęta oddychały powietrzem zawierającym 1% CO w komorze ze stałym przepływem mieszaniny gazów przez okres jednej godziny, czterokrotnie w odstępach 24-godzinnych. Szczegóły dotyczące warunków doświadczenia opisano w pracy Korthalsa i wsp. (1973).

Transport ⁷⁵Se-selenometioniny do mózgu oraz jej włączanie do frakcji białkowej: Bezpośrednio po ostatnim zatruciu, szczurom wstrzykiwano dożylnie ⁷⁵Se-selenometioninę (3,2 Ci/mmol) w dawce 20 μCi. Po 10 minutach zwierzęta dekapitowano, mierzono radioaktywność mózgu oraz krwi, a następnie izolowano frakcję białkową mózgu i również mierzono jej radiaaktywność (Albrecht 1972).

Zawartość polirybosomów w puli rybosomów mózgowych oznaczano metodą ultrawierowania frakcji postmitochondrialnej mózgu w gradencie stężeń sacharozy i mierzono ekstynkcję poszczególnych frakcji gradientu przy 260 nm w sposób uprzednio opisany (Albrecht 1973).

Znakowanie RNA jądrowego i cytoplazmatycznego *in vivo*: Zwierzętom wstrzykiwano dożylnie na 1 godzinę przed uśmierceniem ($5\text{-}^3\text{H}$)-urydynę ($2,5\text{ Ci/mmole}$) w dawce $50\text{ }\mu\text{Ci}/100\text{ g}$ wagi ciała. Po dekapitacji, z półkul mózgowych izolowano frakcje wzbogacone w jądra neuronalne (frakcja A) i glejowe (frakcja B) oraz frakcję postmitochondrialną, a następnie z poszczególnych frakcji wytrącano RNA oraz mierzono jego radioaktywność w sposób opisany w poprzedniej pracy (Albrecht 1974). Radioaktywność RNA frakcji jądrowych przeliczano na mg DNA, a RNA cytoplazmatycznego na jednostkę gęstości optycznej przy 260 nm, będącej miernikiem jego stężenia.

Synteza RNA *in vitro*: Badano aktywność polimeraz RNA magnezoo- i manganozależnej frakcji A i B w warunkach jonowych optymalnych dla obu enzymów. Mieszaniny inkubacyjne w objętości 0,3 ml zawierały: (w nawiasach różnice w przypadku polimerazy magnezowej) Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 300 mM; (KCl, 120 mM); MnCl_2 , 2,7 mM (MgCl_2 5 mM); nieradioaktywne ATP, CTP i GTP, 1 mM; $^3\text{H}/\text{UTP}$ (30 mCi/mmole), 15, μCi ; NaF, 1 mM; frakcję jądrową A lub B 7–30 μg DNA jądrowego. Inkubacje prowadzono w temperaturze 37°C przez 15 minut. Reakcje zatrzymywano dodając równe objętości zimnego 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Osady sączono przez sączki z włókna szklanego a RNA z sączków ekstrahowano gorącym 5% TCA. W ekstraktach oznaczano DNA, a następnie mierzono radioaktywność ekstraktów. Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951), a DNA wg Burtona (1956).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki uzyskane w doświadczeniach przeprowadzonych w modelu wielokrotnego zatrucia zestawiono w poszczególnych tabelach razem z wynikami doświadczeń w ostrym zatruciu CO.

W tabeli 1 stosunek radioaktywności właściwych mózgu i krwi obrazuje przechodzenie aminokwasu przez barierę krew-mózg, a stosunek radioaktywności frakcji białkowej do radioaktywności całkowitej mózgu stopień wykorzystania aminokwasów w syntezie białek. Jak wynika z tabeli 1, znaczne obniżenie zarówno transportu aminokwasu do mózgu jak i jego udziału w syntezie białek mózgowych, stwierdzone w zatruciu ostrym, nie wystąpiło u zwierząt poddanych zatruciu czterokrotnemu. Wyniki uzyskane dla obu parametrów po kilkakrotnym zatruciu CO praktycznie nie odbiegały od wartości kontrolnych.

Tabela 1. Względna radioaktywność mózgu oraz białek mózgu szczura po dożylnym wstrzyknięciu ^{75}Se -selenometioniny w następstwie jedno- i wielokrotnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 1. Relative radioactivity of brain and brain proteins of rat after intravenous injection of ^{75}Se -selenomethionine following one-time and repeated intoxication by carbon monoxide

Model zatrucia Intoxication model	Radioaktywność		Radioactivity	
	Mózg/krew Brain/blood		Białka mózgu/cały mózg Brain proteins/total brain	
Jednorazowe One-time	58,6 ± 6,0	(5)*	76,0 ± 8,2	(5)
Czterokrotne Four times	97,1 ± 10,0	(5)	91,7 ± 7,7	(5)

Wyniki wyrażono w procentach kontroli.

*) Wartości średnie ± odchylenie standardowe.

W nawiasach liczba doświadczeń.

Results expressed as percentage of control and are the means ± S.D. with number of experiments in brackets.

Pewnych informacji co do istoty mechanizmu adaptacyjnego na poziomie biosyntezy białka dostarczyły wyniki doświadczeń przedstawione w tabeli 2. Stosunek ilościowy polirybosomów do całkowitej puli rybosomalnej w tkance stanowi powszechnie uznany wykładnik względnej szybkości tworzenia aktywnych polirybosomów a więc tym samym inicjacji biosyntezy białka (Albrecht 1973). Podczas gdy jednorazowa ekspozycja na tlenek węgla wywoływała znaczną dezagregację polirybosomów w mózgach zwierząt doświadczalnych, po czwartym kolejnym zatruciu procentowa zawartość polirybosomów w stosunku do całej frakcji rybosomalnej mózgu była nieznacznie, ale statystycznie znamienne wyższa niż u zwierząt kontrolnych, co świadczyć może o niewielkim pobudzeniu procesu inicjacji biosyntezy białek.

Przedstawione w tabeli 3 wyniki badań nad syntezą RNA *in vivo* i *in vitro* stanowią dodatkowe potwierdzenie hipotezy o cofaniu się zaburzeń inicjacji syntezy białek przy zatruciu wielokrotnym. Charakterystyczny dla jednorazowego zatrucia spadek włączania trytowanej urydyny do cytoplazmatycznego RNA (kolumna 3) świadczący o zaburzeniu jednego z etapów pomiędzy syntezą RNA na terenie jądra, a jego włączaniem w cykl polirybosomalny (Albrecht 1974), nie ujawnił się przy zatruciu wielokrotnym. Sam proces syntezy RNA we frakcjach jądrowych również nie odbiegał od normy (kolumny 1 i 2).

W doświadczeniach *in vitro* przebadano aktywność dwóch polimeraz RNA: manganozależnej, zlokalizowanej w nukleoplazmie i odpowiedzial-

Tabela 2. Stopień agregacji rybosomów mózgu szczura w następstwie jedno- i wielokrotnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 2. Degree of aggregation of rat brain ribosomes following one-time and repeated intoxication by carbon monoxide

Model zatrucia Intoxication model	Względna zawartość polirybosomów (w % całkowitej frakcji rybosomalnej) Relative content of polyribosomes (in % of total ribosomal fraction)		p
Kontrola Control	59,7 ± 0,5	(5)*	
Jednorazowe One time	52,9 ± 0,1	(5)	0,001
Czterokrotne Four times	61,3 ± 0,7	(5)	0,05

Wyniki dotyczące kontroli oraz jednorazowego zatrucia pochodzą z pracy opublikowanej (Albrecht 1973).*) Wartości średnie ± odchylenia standardowe. W nawiasach — liczba doświadczeń. Znamienność statystyczną oceniano przy pomocy testu t Studenta.

The results concerning the control and one-time intoxication are quoted from a previous work (Albrecht, 1973).*) Values are the means ± S.D. with number of experiments in brackets. Statistical significance evaluated by means of the t — Student's test

nej za syntezę przekaźnikowego RNA (mRNA) oraz magnezozależnej, jąderkowej, kierującej syntezą strukturalnego, rybosomalnego RNA (Roeder, Rutter 1970). Na uwagę zasługuje niewielki, ale istotny wzrost aktywności polimerazy manganozależnej we frakcji wzbogaconej w jądra glejowe. Można założyć, że związany z tym wzrost syntezy mRNA w komórkach glejowych może stymulować syntezę polirybosomów w gleju. Zjawisko to nie ujawniło się w doświadczeniach *in vivo* w postaci wzmożonego znakowania RNA frakcji cytoplazmatycznej, której otrzymywanie nie było poprzedzone rozfrakcjonowaniem tkanki na poszczególne typy komórek; mogło jednak partycypować w zaobserwowanej w następstwie wielokrotnego zatrucia nieznacznej agregacji rybosomów (tabela 2). Obserwacja, że aktywacja polimerazy miała miejsce w jądrach komórek glejowych, w pewnym sensie potwierdza wynik badań morfologicznych wykonanych na tym samym modelu przez Korthalsa i wsp. (1973). Autorzy ci zaobserwowali, że wielokrotne zatrucie tlenkiem węgla prowadzi do znacznego rozrostu elementów glejowych.

Przedstawione wyniki, jakkolwiek wskazują na znaczną adaptację układu biosyntezy białka mózgu szczura na wielokrotne zatrucie tlenkiem węgla, nie pozwalają ocenić roli poszczególnych etapów jego syntezy w samym mechanizmie adaptacji. Wyjaśnienie związku przyczynowego pomiędzy pobudzeniem syntezy RNA oraz innymi szlakami metabolicznymi w elementach komórkowych tkanki nerwowej, a czynnikami ogólnoustrojowymi wymaga dalszych wielokierunkowych badań.

Tabela 3. Włączenie ^3H urydyny *in vivo* oraz ^3H UTP *in vitro* do frakcji wzbogaconych w jądra neuronalne (frakcja A) i glejowe (frakcja B) mózgu szczura w następstwie jedno- i wielokrotnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 3. Incorporation of ^3H uridine *in vivo* and of ^3H UTP *in vitro* into fractions enriched in neuronal nuclei (fraction A) and glial nuclei (fraction B) of rat brain following one-time and repeated intoxication by carbon monoxide

Model zatrucia Intoxication model	Radioaktywność RNA			Radioactivity of RNA			
	in vivo			in vitro			
	Frakcja A Fraction A	Frakcja B Fraction B	Cytoplazma Cytoplasm	w obecności in the presence of	Mg	w obecności in the presence of	Mn
Jednorazowe One time	124,9 ± 15,2 (8)*	123,7 ± 19,0 (8)	61,2 ± 5,5 (8)	95,0 ± 8,8 (6)	79,4 ± 4,6 (6)	99,7 ± 3,5 (6)	99,9 ± 8,7 (6)
Czterokrotne Four times	98,7 ± 13,2 (5)	104,8 ± 5,4 (5)	92,2 ± 10,2 (5)	94,1 ± 6,3 (6)	100,4 ± 9,2 (6)	99,9 ± 5,8 (5)	125,7 ± 17,3 (5)

Wyniki wyrażono w procentach kontroli. Dane dotyczące zatrucia jednokrotnego pochodzą z pracy poprzedniej (Albrecht 1974).*) Wartości średnie ± odchylenia standardowe. W nawiasach liczba doświadczeń.

Results expressed as percentage of control. The data concerning one-time intoxication are quoted from a previous paper (Albrecht 1974).*) Means ± S.D. with number of experiments in brackets.

Я. Альбрехт

НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ СИНТЕЗА БЕЛКА И РНК В МОЗГЕ
КРЫСЫ ПОСЛЕ МНОГОКРАТНОГО ОТРАВЛЕНИЯ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Была прослежена динамика некоторых этапов синтеза РНК и белка в мозге взрослых крыс после четырехкратного отравления окисью углерода с интервалов в 24 часа. Полученные данные сравнивались с изменениями, наблюдаемыми ранее при однократном отравлении. Исследования касались: а) транспорта радиоактивной аминокислоты из крови в мозг и её включения в белковые фракции мозга, б) относительного содержания рибосомальных резервов мозга, являющихся показателем скорости образования активных полирибосом, а также в) синтеза РНК *in vivo* и *in vitro* во фракциях, обогащенных ядрами нервных и глиальных клеток, а также связанного с ним транспорта РНК из ядер в цитоплазму. Результаты, полученные при многократном отравлении, свидетельствуют в общем о исчезновении на отдельных этапах синтеза белков изменений, характерных для однократного отравления.

По-видимому, наблюдаемый приспособительный механизм основывается в частности на усиленном синтезе быстрометающейся РНК (в том числе и-РНК) в ядрах нервных клеток, что приводит к обогащению клеток активными рибосомами.

J. Albrecht

SOME STEPS OF RNA AND PROTEIN BIOSYNTHESIS IN ADULT RAT
BRAIN AFTER REPEATED CARBON MONOXIDE
INTOXICATION

Summary

The activities some steps of RNA and protein biosynthesis in adult rat brain following 4-times repeated carbon monoxide intoxication were compared with those previously observed in one-time acute intoxication. The study has dealt with the following parameters: a) the transport of radioactive amino acid from blood to brain and its incorporation into the brain proteins; b) the ratio of polyribosomes to the total pool of brain ribosomes, being the measure of the rate of formation of active polyribosomes and c) the RNA synthesis *in vivo* and *in vitro* in the fractions enriched in neuronal and glial cell nuclei and the transport of the newly-synthesized RNA from nuclei to cytoplasm. In general, the results are indicative of the recession in the course of repeated intoxication of changes in protein synthesis that are known to follow one-time exposure to CO. The observed mechanism of adaptation seems to consist a.o. in the increased synthesis of rapidly metabolizing RNA (including mRNA) in the nuclei of nerve cells, leading to the enrichment of the cells in active polyribosomes.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białka w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 3, 457—469.
2. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
3. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on RNA biosynthesis in two nuclear classes of rat brain. W przygotowaniu.

4. Albrecht J., Śmiałek M.: Effect of ischemia, hypoxia and carbon monoxide intoxication on in vivo protein synthesis in neuron- and glia cell enriched fractions in rat brain. *Acta Neuropath.* 1975, 31, 257—262.
5. Burton K.: A study of the conditions and mechanism of the dipheny amine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 1956, 62, 315—323.
6. Korzhals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 3, 279—300.
7. Lowry O. H., Rosenbrough U. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—275.
8. Roeder R. G., Rutter W. J.: Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 1970, 65, 675—682.

Adres autora: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

KOMUNIKATY

W ROKU 1975 ODBĘDĄ SIĘ NASTĘPUJĄCE ZJAZDY I KONGRESY

W okresie od 18 do 20 września 1975 odbędzie się w Warszawie Międzynarodowe Sympozjum na temat: Patofizjologia, Biochemia oraz Aspekty Morfologiczne Niedotlenienia Mózgu i Nadciśnienia Tętniczego.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Prof. dr hab. Mirosław J. Mossakowski, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.

*
*
*

W dniach od 23 do 25 października 1975 r. odbędzie się w Wiedniu Dunajskie Sympozjum Neurologii, Neuropatologii i Neurologii Dziecięcej z następującą tematyką:

1. Demencje,
2. Patologia rdzenia (z wyłączeniem guzów i urazów rdzenia)
3. Mioklonie (konferencja okrągłego stołu)

Termin nadsyłania streszczeń upływa 16 sierpnia 1975 r.

Adres: Prof. dr F. Gerstenbrand, c/o Wiener Medizinische Akademie — DFN Adres Strasse 4, A-1090 Wien, Austria.

*
*
*

W okresie od 20 do 24 października 1975 r. odbędzie się w Budapeszcie XXVIII Narodowy Kongres Węgierskiego Towarzystwa Neurologii i Psychiatrii. Głównymi tematami Kongresu będą:

1. Zaburzenia przytomności,
2. Urazowe uszkodzenia układu nerwowego (mózgu, rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych).

Adres Sekretariatu Węgierskiego Towarzystwa Neurologii i Psychiatrii: Dr G. Gereby, H-1281 Budapest, P.O.B. 1.

*
*
*

W dniu 20 października 1975 r. odbędzie się w Katowicach X Sympozjum Polskiego Towarzystwa Neurochirurgów. Tematem Sympozjum będą postępy w rozpoznawaniu i leczeniu chorób kanału kręgowego.

Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego jest dr med. A. Maciejak, Sekretarzem — lek. med. J. Pieniążek.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Szpital Górniczy, Oddział Neurochirurgii, 41-902 Bytom, Roosevelta 10.

*
*
*

W dniu 22 września 1975 r. odbędzie się w Łodzi IV Sympozjum Sekcji Cybernetyki Medycznej Towarzystwa Internistów Polskich poświęcone metodyce zbierania, przetwarzania i wykorzystywania danych medycznych.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Doc. T. Bogdanik, I Klinika Chorób Wewnętrznych AM 90-153 Łódź.

*
*
*

W okresie od 2 do 6 września 1975 r. odbędzie się w Barcelonie V Międzynarodowy Kongres Neurochemii.

*
*
*

W dniach od 14 do 19 września 1975 odbędzie się w Dublinie VI Konferencja Międzynarodowej Ligi Towarzystw Niedorozwoju Umysłowego.

BARBARA BICZOWA, MARIANNA SIKORSKA, WŁODZIMIERZ BICZ,
JAN PACHECKA, ANDRZEJ SULIŃSKI

POZIOM GLIKOGENU, GLIKOLIZA, ODDYCHANIE
ORAZ STĘŻENIA ATP, ADP, AMP W MÓZGU SZCZURA
W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA FOSFOROORGANICZNYM
INSEKTYCYDEM DICHLORFOSEM (DDVP) *

Pracownia Metabolizmu Leków Instytutu Biofarmacji AM w Warszawie
Kierownik: doc. dr W. Bicz

Pestycydy fosforoorganiczne znajdują coraz większe zastosowanie w rolnictwie. Wiadomo, że związki te hamują aktywność acetylocholinesterazy. Istnieją także dane wskazujące na możliwość występowania zaburzeń w procesach utleniania komórkowego w ośrodkowym układzie nerwowym w następstwie działania fosforoorganicznych środków owadobójczych. Z poprzednich naszych badań *in vitro* wynika, że fosforoorganiczne insektycydy — dichlorfos (DDVP) oraz trichlorfon (diptereks) powodują zmiany w aktywności niektórych oksydoreduktaz mitochondrialnych (Sitkiewicz i wsp. 1975a) z równoczesnym obniżeniem aktywności oddechowej homogenatów niektórych narządów zwierzęcych (Pachecka i wsp. 1975, Sitkiewicz i wsp. 1975b). Związki tej grupy hamują także proces oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów wątroby szczura (Syrowatka 1969) oraz obniżają zawartość białka w komórkach zarodków mysich podczas wzrostu *in vitro* (Piekarski i wsp. 1971).

Celem pracy było zbadanie zachowania się aktywności glikolitycznej i oddechowej oraz poziomu glikogenu i nukleotydów adeninowych w mózgu szczura w następstwie zatrucia dichlorfosem, insektycydem fosforoorganicznym szeroko stosowanym w rolnictwie. Dichlorfos jest także jednym z pośrednich produktów przemiany trichlorfonu (Metcalf i wsp. 1959, Sawicki 1973) i prawdopodobnie metabolit ten odpowiedzialny jest *in vivo* za działanie trichlorfonu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczurów białych, samców o średniej wadze 200 g z hodowli zamkniętej, kojarzonych losowo. W okresie 2 tygodni poprze-

* Praca częściowo subsydiowana z problemu węzłowego PAN 09.4.1.3.

dzających cykl doświadczeń a także przez cały okres podawania insektycydu szczury otrzymywały standaryzowaną paszę granulowaną oraz wodę w dowolnej ilości. Badania obejmowały trzy grupy doświadczalne, które odpowiadały trzem modelom zatrucia. W grupie I szczurom podawano jednorazowo dichlorfos (0,0-dwumetylo-0-dwuchlorowinylofosforan — z Instytutu Chemii Fizycznej PAN) w dawkach 2, 10 lub 50% LD₅₀ i badano po 2 godzinach od momentu podania insektycydu. Zwierzętom grupy II podawano dichlorfos przez 14 dni codziennie z wyjątkiem niedziel w takich samych dawkach jak w grupie I. Grupę III stanowiły zwierzęta, którym insektycyd podawano przez 90 dni (z wyjątkiem niedziel i świąt) tylko w jednej dawce, stanowiącej 2% LD₅₀. Zwierzętom grupy II i III nie podawano insektycydu w dniu pobierania materiału do badań. Dichlorfos podawano dożołądkowo sondą w roztworze oleju jadalnego w ilości 0,5 ml. Dawkę LD₅₀ dla dichlorfosu w stosunku do szczurów samców przyjęto jako równą 80 mg/kg ciężaru ciała (Rusiecki 1973). Dla każdego modelu zatrucia kontrolę stanowiły szczury, którym przez odpowiedni okres wprowadzano sondą dożołądkowo po 0,5 ml oleju jadalnego. Zwierzęta zabijano przez dekapitację, nie stosując narkozy.

Poziom glikogenu i stężenia nukleotydów adeninowych oznaczano w półkulach mózgu po dekapitacji i całkowitym zamrożeniu głowy w ciekłym azocie.

Oznaczanie glikogenu. Zawartość glikogenu w mózgu określano na podstawie pomiaru stężenia glukozy uwolnionej po hydrolizie z wyizolowanego i oczyszczonego glikogenu. Około 500 mg tkanki umieszczano w roztworze 30% KOH i ogrzewano przez okres 45 minut we wrzącej łaźni wodnej. Z roztworu wytrącano glikogen 96% etanolem. Wyizolowany glikogen oczyszczano mieszaniną chloroform/metanol 1:4 v/v a następnie przeprowadzano hydrolizę w 1 N HCl ogrzewając przez 3 godziny we wrzącej łaźni wodnej. Roztwór zobojętniano a glukozę oznaczano kolorymetrycznie (Nelson 1944). Pomiary ekstynkcji dokonywano w spektrofotometrze „Specol” przy 540 nm.

Oznaczanie nukleotydów adeninowych. Stężenia ATP, ADP, AMP oznaczano spektrofotometrycznie w oparciu o metody enzymatyczne. ATP oznaczano przy użyciu kinazy fosfoglicerynianowej (E.C. 2.7.2.3) oraz dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego (1.2.1.12) (Adam 1962). W oznaczeniach ADP/AMP posługiwano się kinazą pirogronianową (E.C. 2.7.1.40), kinazą adenylową (E.C. 2.7.4.3) oraz dehydrogenazą mleczanową (E.C. 1.1.1.27) (Adam 1962a). Zamrożoną w ciekłym azocie półkulę mózgu (około 500 mg) homogenizowano w 1,5 M kwasie nadchlorowym. Homogenat wirowano przy 15000 obr./min przez 30 minut w temperaturze +2°C. Supernatant zobojętniano 2 M roztworem węgla potasu zawierającym 0,5 M chlorowodorek trójetanoloaminy i uzupełniano do odpowiedniej objętości buforem trójetanoloaminowym o pH

7,5. Mieszaninę pozostawiano w lodzie na 10 min i wirowano ponownie przy 1500 obr/min. Do oznaczeń używano nadsączu. Pomiaru ekstynkcji wykonywano w spektrofotometrze Spectromom 202 przy 340 nm. Enzymy pochodziły z f-my Boehringer.

Pomiary oddychania i glikolizy. Oddychanie i glikolizę badano w homogenatach z półkul mózgowych. Bezpośrednio po dekapitacji izolowano mózgi, oddzielano półkule mózgowie, z których sporządzano 20% homogenaty w roztworze 80 mM buforu fosforanowego pH 7,4 zawierającego 100 mM KCl. Homogenizację prowadzono w młynku Pottera z łokiem teflonowym w temp. około 4°C.

Zużycie tlenu oznaczano bezpośrednią metodą manometryczną w aparacie Warburga (Umbreit i wsp. 1957). Zużycie tlenu w obecności glukozy oznaczano w mieszaninie inkubacyjnej o końcowej objętości 3 ml i składzie: 70 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 8 mM MgCl₂, 1 mM ATP (Ośrodek Nauk. Bad. AM Łódź), 1 mM NAD (Boehringer), 24 mM amid kwasu nikotynowego, 20 mM glukoza, 0,1 mM bursztynian potasowy, 0,06 mM cytochrom c (Biomed Kraków) i 2,5 mM fruktozo-1,6-dwufosforan (Reanal, Węgry). Do każdego naczynka dodawano homogenat w ilości odpowiadającej około 4 mg białka. Zużycie tlenu w obecności bursztynianu oznaczano w mieszaninie reakcyjnej o składzie: 70 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 8 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 24 mM amid kwasu nikotynowego, 20 mM bursztynian potasowy, 0,06 mM cytochrom c oraz około 4 mg białka homogenatu. Skład stosowanych mieszanin inkubacyjnych odpowiadał optymalnym warunkom dla homogenatów mózgow (Reiner 1947, Racker, Krimsky 1945). Odczyty na respirometrach dokonywane były co 15 minut. Zużycie tlenu wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{mg białka}$.

Aktywność glikolityczną oceniano przez pomiar produkcji mleczanu i zużycie glukozy przez badane homogenaty. Inkubację homogenatów prowadzono w naczynkach w aparacie Warburga podczas ustawicznego wytrząsania w ciągu 1 godziny. Środowiskiem inkubacyjnym był roztwór zapewniający maksymalną aktywność glikolityczną homogenatów mózgow (Utter, Wood, Reiner 1945, Racker, Krimsky 1945, Reiner 1947), zawierający w końcowej objętości 2,5 ml następujące składniki (o końcowych stężeniach): 70 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 8 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM NAD, 24 mM amid kwasu nikotynowego, 20 mM glukoza, 2,5 mM fruktozo-1,6-dwufosforan. Stężenie homogenatu w naczynku reakcyjnym odpowiadało około 4 mg białka. Fazę gazową naczynek reakcyjnych w przypadku badania glikolizy w warunkach tlenowych stanowiło powietrze, a w przypadku glikolizy beztlenowej azot. Mleczan oznaczano spektrofotometrycznie metodą enzymatyczną przy pomocy dehydrogenazy mleczanowej (Boehringer) (Horn, Bruns 1956). Pomiaru ekstynkcji wykonywano w spektrofotometrze Spectromom 202

przy 340 nm. Glukozę oznaczano przy pomocy oksydazy glukozowej (E.C. 1.1.3.4) (Fermognost NRD) spektrofotometrycznie (Hugget, Nixon 1957). Ekstynkcję mierzono w spektrofotometrze Specol przy 530 nm. Białko homogenatów mózgow oznaczano metodą Kjeldahla (Tomaszewski 1970). Statystyczną analizę wyników przeprowadzono testem t Studenta (Szyszko 1971).

WYNIKI

W tabeli 1 podano wyniki przedstawiające zachowanie się poziomu glikogenu w mózgach szczurów w następstwie zatrucia dichlorfosem. W mózgach zwierząt, którym podawano jednorazowo dichlorfos, w dawkach 2, 10 lub 50% LD₅₀ nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w zawartości glikogenu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.

Tabela 1. Poziom glikogenu w mózgach szczurów w następstwie zatrucia dichlorfosem (DDVP)

Table 1. The glycogen level in rat brain following dichlorvos (DDVP) intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Poziom glikogenu (mg glukozy/100 g wilgotnej tkanki)				
Okres podawania pestycydu Period of pesticide administration	Dawka pestycydu Dose of pesticide % LD ₅₀	Glycogen level (mg glucose/100 g wet tissue)				
		\bar{x}	\pm	S \bar{x}	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	92,5	\pm	4,7	(6)	
	2	99,8	\pm	6,7	(7)	$\geq 0,05$
	10	99,2	\pm	9,9	(7)	$\geq 0,05$
	50	92,8	\pm	4,0	(7)	$\geq 0,05$
14 dni days	Kontrola Control	78,1	\pm	0,6	(7)	
	2	99,3	\pm	3,8	(7)	$\leq 0,05$
	10	113,8	\pm	4,2	(6)	$\leq 0,05$
	50	118,5	\pm	2,6	(5)	$\leq 0,05$
90 dni days	Kontrola Control	91,1	\pm	0,7	(6)	
	2	116,8	\pm	3,3	(9)	$\leq 0,05$

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe średniej arytmetycznej
arithmetic mean \pm error of the mean

n liczba doświadczeń p prawdopodobieństwo
number of experiments probability

Tabela 2. Aktywność glikolityczna w warunkach tlenowych: homogenatów mózgow szczyrów w następstwie zatrucia dichlorfosem (DDVP)

Table 2. The glycolytic activity in aerobic conditions of rat brain homogenates following dichlorvos (DDVP) intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Produkcja mleczanu ($\mu\text{mole/godz./mg}$ białka) Lactate production ($\mu\text{moles/hr/mg}$ protein)					Zużycie glukozy ($\mu\text{mole/godz./mg}$ białka) Glucose consumption ($\mu\text{moles/hr/mg}$ protein)				
Okres podawania pestycydu Period of pesticide administration	Dawka pestycydu Dose of pesticide % LD ₅₀	\bar{x}	\pm	S \bar{x}	(n)	p	\bar{x}	\pm	S \bar{x}	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	3,14	\pm	0,13	(9)		2,22	\pm	0,12	(9)	
	2	3,06	\pm	0,07	(6)	$\geq 0,05$	2,01	\pm	0,20	(6)	$\geq 0,05$
	10	3,17	\pm	0,07	(6)	$\geq 0,05$	2,11	\pm	0,07	(6)	$\geq 0,05$
	50	3,07	\pm	0,11	(6)	$\geq 0,05$	2,23	\pm	0,14	(6)	$\geq 0,05$
14 dni days	Kontrola Control	3,30	\pm	0,19	(9)		2,28	\pm	0,07	(9)	
	2	3,05	\pm	0,26	(7)	$\geq 0,05$	2,15	\pm	0,19	(7)	$\geq 0,05$
	10	3,10	\pm	0,24	(7)	$\geq 0,05$	2,49	\pm	0,19	(7)	$\geq 0,05$
	50	2,95	\pm	0,25	(7)	$\geq 0,05$	2,27	\pm	0,14	(6)	$\geq 0,05$
90 dni days	Kontrola Control	3,99	\pm	0,21	(8)		2,29	\pm	0,13	(7)	
	2	3,74	\pm	0,12	(9)	$\geq 0,05$	2,21	\pm	0,14	(8)	$\geq 0,05$

Objaśnienia w tabeli 1.

For explanations see Table 1.

W mózgach zwierząt badanych po 14 dniach podawania dichlorfosu w dawce 2% LD₅₀ poziom glikogenu był średnio większy o około 27% w stosunku do kontroli. Różnica ta jest znamienna statystycznie ($p \leq 0,05$). Znamienny statystycznie ($p \leq 0,05$) przyrost poziomu glikogenu o około 46% w stosunku do kontroli stwierdzono także po podawaniu dichlorfosu w dawce 10% LD₅₀. Podobnie po zastosowaniu dawki 50% LD₅₀ zaobserwowano wyższe stężenie glikogenu w mózgach zwierząt doświadczalnych w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla zwierząt kontrolnych. Przyrost ten wynosi około 52% i jest znamienny statystycznie ($p \leq 0,05$). W III grupie doświadczalnej stężenie glikogenu w mózgach zwierząt doświadczalnych było wyższe średnio o około 28% od stężenia glikogenu w mózgach zwierząt kontrolnych. Różnica ta jest znamienna statystycznie.

Tabela 3. Glikoliza beztlenowa homogenatów mózgow szczerów w następstwie zatrucia dichlorfosem (DDVP)

Table 3. Anaerobic glycolysis of rat brain homogenates following dichlorvos (DDVP) intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Produkcja mlecza- Lactate production ($\mu\text{mole/hr/mg protein}$)				
Okres podawania pestycydu Period of pesticide administration	Dawka postycydu Dose of pesticide % LD ₅₀	\bar{x}		$S\bar{x}$	(n)	p
		\bar{x}	\pm			
1 dzień day	Kontrola Control	3,45	\pm	0,14	(9)	
	2	3,43	\pm	0,14	(6)	$\geq 0,05$
	10	3,39	\pm	0,11	(6)	$\geq 0,05$
	50	3,62	\pm	0,16	(6)	$\geq 0,05$
14 dni days	Kontrola Control	3,42	\pm	0,24	(9)	
	2	3,18	\pm	0,13	(7)	$\geq 0,05$
	10	3,26	\pm	0,19	(7)	$\geq 0,05$
	50	3,28	\pm	0,22	(7)	$\geq 0,05$
90 dni days	Kontrola Control	3,97	\pm	0,17	(8)	
	2	4,03	\pm	0,15	(9)	$\geq 0,05$

Objaśnienia w tabeli 1.

For explanations see Table 1.

Nie stwierdzono istotnych różnic w produkcji kwasu mlekowego w warunkach tlenowych (tabela 2) przez homogenaty mózgow szczerów w następstwie jednorazowego oraz wielokrotnego podawania dichlorfosu w dawkach 2%, 10% lub 50% LD₅₀. W tych samych warunkach doświadczalnych nie zaobserwowano istotnych różnic w zużyciu glukozy przez badane homogenaty mózgow.

Także w warunkach beztlenowych nie stwierdzono istotnych różnic w produkcji kwasu mlekowego (tabela 3) przez homogenaty mózgow zwierząt w następstwie jednorazowego oraz wielokrotnego zatrucia dichlorfosem (14- i 90-dniowy model) dawkami stanowiącymi 2%, 10% lub 50% LD₅₀ dla modelu 1- i 14-dniowego oraz 2% LD₅₀ w przypadku modelu 90-dniowego. Równolegle z badaniem glikolizy wykonano ocenę aktywności oddechowej homogenatów mózgow szczerów w następstwie zatrucia dichlorfosem. Wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Zużycie tlenu w obecności glukozy przez homogenaty mózgow szczerów po 2 godzinach od momentu jednorazowego podania pestycydu w dawce 50% LD₅₀ jest nieznacznie większe w porównaniu z grupą kontrolną. Różnica ta nie jest jednak statystycznie znamienne. Nie obserwuje się również istotnych różnic pomiędzy wartościami oddychania homogenatów mózgow zwierząt kontrolnych a grupami szczerów, którym jednorazowo podano pestycyd w dawce 10% lub 2% LD₅₀. Podawanie dichlorfosu w odpowiednich dawkach przez okres 14 lub 90 dni nie powoduje także istotnych zmian w oddychaniu badanych homogenatów.

Wyniki przedstawione w tabeli 4 wskazują, że zużycie tlenu przez homogenaty mózgow szczerów (w obecności bursztynianu) w następstwie jednorazowego i wielokrotnego (14-dniowego) zatrucia nie różni się znamienne od wartości kontrolnych, aczkolwiek średnie wartości zużycia tlenu przez homogenaty mózgow szczerów po jednorazowym zatruciu dawkami 2%, 10% lub 50% LD₅₀ są nieco wyższe od wartości kontrolnej. W przypadku zwierząt, którym dichlorfos podawano przez okres 90 dni wykazano nieznaczny (około 10%) lecz statystycznie znamieny efekt stymulacji oddychania homogenatów mózgow (w porównaniu do układu kontrolnego).

W mózgach zwierząt po jednorazowym podaniu pestycydu nie zaobserwowano znamienych statystycznie zmian w stężeniach ATP, ADP i AMP niezależnie od stosowanej dawki dichlorfosu.

Podobnie w następstwie podawania dichlorfosu przez 14 dni w dawkach 2%, 10% lub 50% LD₅₀ nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach ATP, ADP i AMP w mózgach szczerów w porównaniu z grupą kontrolną. W mózgach zwierząt, którym podawano dichlorfos przez 90 dni w dawce 2% LD₅₀ zaobserwowano niewielki (około 11%) znamieny statystycznie wzrost poziomu ATP. Stężenia ADP i AMP nie zmieniały się.

Tabela 4. Oddychanie homogenatów mózgow szczerów w następstwie zatrucia dichlorfosem (DDVP)

Table 4. The respiration of rat brain homogenates following dichlorvos (DDVP) intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Zużycie tlenu ($\mu\text{l O}_2/\text{godz./mg}$ białka) Oxygen uptake ($\mu\text{l O}_2/\text{hr/mg}$ protein)									
Okres podawania pestycydu Period of pesticide administration	Dawka pestycydu Dose of pesticide % LD ₅₀	Substrat: Glukoza Substrate: Glucose					Bursztynian Succinate				
		\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p	\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	19,9	\pm	1,1	(6)		27,5	\pm	1,7	(6)	
	2	18,7	\pm	1,0	(6)	$\geq 0,05$	30,0	\pm	1,5	(6)	$\geq 0,05$
	10	18,8	\pm	0,8	(6)	$\geq 0,05$	29,3	\pm	1,3	(6)	$\geq 0,05$
	50	22,3	\pm	1,0	(6)	$\geq 0,05$	28,1	\pm	1,3	(6)	$\geq 0,05$
14 dni days	Kontrola Control	18,2	\pm	0,9	(8)		25,2	\pm	2,4	(8)	
	2	15,6	\pm	1,1	(6)	$\geq 0,05$	25,5	\pm	3,8	(7)	$\geq 0,05$
	10	16,9	\pm	0,7	(7)	$\geq 0,05$	24,3	\pm	0,8	(7)	$\geq 0,05$
	50	19,5	\pm	1,1	(8)	$\geq 0,05$	25,2	\pm	1,1	(7)	$\geq 0,05$
90 dni days	Kontrola Control	23,8	\pm	1,4	(8)		29,0	\pm	0,9	(8)	
	2	24,1	\pm	1,4	(9)	$\geq 0,05$	32,4	\pm	1,0	(9)	$\geq 0,05$

Objaśnienia w tabli 1.

For explanations see Table 1.

<http://rcin.org.pl>

Tabela 5. Stężenia ATP, ADP, AMP w mózгах szczurów w następstwie zatrucia dichlorfosem (DDVP)

Table 5. ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following dichlorvos (DDVP) intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Stężenia nukleotydów (μmole/g wilgotnej tkanki) Nucleotides concentrations (μmoles/g wet tissue)														
Okres podawania pestycydu Period of pesticide administration	Dawka pestycydu Dose of pesticide % LD ₅₀	ATP					ADP					AMP				
		\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p	\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p	\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	6,18	\pm 0,09	(6)			1,99	\pm 0,09	(6)			0,62	\pm 0,03	(6)		
	2	6,55	\pm 0,20	(6)	$\geq 0,05$		2,05	\pm 0,07	(6)	$\geq 0,05$		0,56	\pm 0,04	(6)	$\geq 0,05$	
	10	6,53	\pm 0,15	(6)	$\geq 0,05$		1,92	\pm 0,08	(6)	$\geq 0,05$		0,56	\pm 0,01	(6)	$\geq 0,05$	
	50	6,53	\pm 0,13	(6)	$\geq 0,05$		1,94	\pm 0,07	(6)	$\geq 0,05$		0,58	\pm 0,03	(6)	$\geq 0,05$	
14 dni days	Kontrola Control	6,09	\pm 0,12	(6)			2,12	\pm 0,05	(6)			0,57	\pm 0,02	(6)		
	2	5,82	\pm 0,22	(5)	$\geq 0,05$		2,00	\pm 0,07	(5)	$\geq 0,05$		0,54	\pm 0,01	(5)	$\geq 0,05$	
	10	6,01	\pm 0,14	(5)	$\geq 0,05$		1,92	\pm 0,04	(5)	$\geq 0,05$		0,58	\pm 0,01	(5)	$\geq 0,05$	
	50	5,91	\pm 0,22	(5)	$\geq 0,05$		1,85	\pm 0,09	(5)	$\geq 0,05$		0,60	\pm 0,02	(5)	$\geq 0,05$	
90 dni days	Kontrola Control	6,29	\pm 0,15	(6)			2,12	\pm 0,02	(6)			0,61	\pm 0,03	(6)		
	2	6,99	\pm 0,16	(9)	$\leq 0,05$		2,10	\pm 0,06	(9)	$\geq 0,05$		0,54	\pm 0,03	(9)	$\geq 0,05$	

Objaśnienia w tabeli 1.

For explanations see Table 1.

DYSKUSJA

Zastosowane trzy modele zatrucia pozwalały na prowadzenie obserwacji zachowania się metabolizmu ośrodkowego układu nerwowego w następstwie jednorazowego (krótkotrwałego) oraz wielokrotnego (długotrwałego) podawania dichlorfosu. Stosowane dawki pestycydu (2%, 10% lub 50% LD₅₀) dały możliwość oceny stopnia wrażliwości badanego fragmentu metabolizmu na stężenie trucizny. W następstwie zatrucia dichlorfosem dochodzi do wzrostu poziomu glikogenu w mózgach szczurów. Wzrost poziomu glikogenu zaobserwowano w mózgach zwierząt, którym podawano pestycyd przez 14 i 90 dni. W modelu jednorazowego zatrucia nie zaobserwowano wzrostu poziomu glikogenu. Przyrost polisacharydu jest zależny od dawki dichlorfosu i jest tym większy im wyższa dawka pestycydu. Te same dawki dichlorfosu, które powodują wzrost poziomu glikogenu, pozostają bez wpływu na aktywność glikolityczną jak również nie zmieniają w zasadniczy sposób intensywności zużycia tlenu przez homogenaty mózgow. Podobnie, poza bardzo nieznacznym wzrostem poziomu ATP w przypadku zatrucia 90-dniowego, nie zaobserwowano zasadniczych ilościowych zmian w układzie ATP/ADP/AMP w mózgach zwierząt w następstwie jednorazowego lub wielokrotnego zatrucia dichlorfosem.

Zjawisko przejściowego gromadzenia się glikogenu w mózgu obserwowane było w różnych modelach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego. Mossakowski i wsp. (1968) zaobserwowali gromadzenie się glikogenu w mózgu w następstwie asfiksji okołoporodowej u mały Macacca mulata. Późniejsze badania wykazały, że poziom glikogenu wzrastał w mózgach zwierząt w następstwie ischemii (Pronaszko i wsp. 1972, Śmiałek i wsp. 1971) oraz w następstwie zatrucia tlenkiem węgla (Śmiałek i wsp. 1973). Powyższe wyniki sugerują, że zjawisko przejściowego wzrostu poziomu glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym może być charakterystyczną reakcją tkanki nerwowej na jej niedotlenienie. Z drugiej strony, wyniki prac Pachecki i wsp. (1975), Sitkiewicza i wsp. (1975), wskazują, że insektycydy fosforoorganiczne obniżają aktywność oddechową homogenatów niektórych narządów zwierzęcych. Istnieją także dane, wskazujące, że fosforoorganiczne środki owadobójcze mogą upośledzać sprawność łańcucha oddechowego komórek zwierzęcych (Sitkiewicz i wsp. 1975, Syrowatka 1969). Fakty te dają podstawę do przypuszczenia, że stwierdzony wzrost poziomu glikogenu w mózgach szczurów w następstwie zatrucia dichlorfosem może być skutkiem niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, wywołanego przez działanie pestycydu na układy enzymatyczne łańcucha oddechowego mitochondriów komórki nerwowej. Mechanizm gromadzenia się glikogenu w mózgu w następ-

stwie niedotlenienia a także w następstwie zatrucia dichlorfossem nie jest wyjaśniony. Oprócz niedotlenienia, w próbach tłumaczenia przyczyn zwiększania się poziomu glikogenu w mózgu należy brać pod uwagę możliwość występowania zaburzeń w hormonalnym układzie regulującym insulina-adrenalina lub w innych odcinkach przemiany komórki nerwowej.

W badaniach aktywności glikolitycznej homogenatów mózgow zwrócono uwagę na produkcję kwasu mlekowego i zużycie glukozy, w pierwszym rzędzie w warunkach tlenowych. W tych warunkach aktywność glikolityczna badanych homogenatów pozostawała bez zmian w trzech modelach zatrucia. Również w tych samych układach doświadczalnych nie uległa zmianie produkcja kwasu mlekowego mierzona w warunkach beztlenowych (N_2). Na podstawie porównania glikolizy (produkcja kwasu mlekowego) w warunkach tlenowych i beztlenowych wynika, że w badanych układach homogenatów mózgow szczurów nie występował efekt Pasteura, co zgodne jest z danymi z pracy Reintera (1947). W poprzednich naszych badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że dichlorfos nie ma wpływu na glikolizę homogenatów mózgow szczura i kury (Pachecka i wsp. 1975).

Równolegle z badaniami glikolizy, wykonywano także pomiar zużycia tlenu przez homogenaty mózgowe. Poza bardzo nieznaczną stymulacją zużycia tlenu przez homogenaty mózgow szczurów w następstwie przewlekłego (90-dniowy układ) podawania pestycydu, zasadniczo oddychanie homogenatów nie ulegało zmianie.

Analizując wyniki dotyczące zachowania się poziomu nukleotydów adeninowych w mózgu zwierząt w następstwie zatrucia dichlorfossem należy zwrócić uwagę, że jedynie w przypadku podawania dichlorfosu w dawce 2% LD_{50} przez okres 90 dni zanotowano nieznaczny wzrost poziomu ATP. Być może, że wzrost poziomu ATP w modelu przewlekłego zatrucia jest przyczynowo powiązany ze zwiększeniem zużycia tlenu przez homogenaty mózgow zwierząt tej samej grupy. Przyczyny tych zmian pozostają nie wyjaśnione.

Uzyskane wyniki sugerują, że w następstwie zatrucia fosforoorganicznymi środkami owadobójczymi, oprócz hamowania aktywności acetylocholinoesterazy, mogą występować także zaburzenia w metabolizmie węglowodanowo-energetycznym ośrodkowego układu nerwowego.

Autrzy składają podziękowanie Paniom: Teresie Bok, Barbarze Dyjak, Hali-
nie Nowickiej, Ewie Ohde, Teresie Pańkowskiej i Krystynie Podwójcik za pomoc
techniczną przy wykonywaniu badań.

Б. Бичова, М. Сикорска, В. Бич, И. Пахецка, А. Сулиньски

УРОВЕНЬ ГЛИКОГЕНА, ГЛИКОЛИЗ, ДЫХАНИЕ, А ТАКЖЕ КОНЦЕНТРАЦИЯ АТФ, АДФ, АМФ В МОЗГЕ КРЫСЫ ВСЛЕДСТВИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФООРГАНИЧЕСКИМ ИНСЕКТИЦИДОМ ДИХЛОРФОСОМ

Резюме

Были проведены биохимические исследования мозга крыс после отравления *per os* дихлорфосом. Животные были разделены на 3 группы: Крысы I группы отравлялись дихлорфосом в дозах 2%, 10% или 50% ЛД₅₀. Крысы II группы получали те же дозы пестицида в течение 14 дней. Животным III группы давали пестицид в дозе 2% ЛД₅₀ в течении 90 дней.

Уровень гликогена определялся колориметрически. Гликолитическая активность гомогенатов мозга в кислородных и безкислородных условиях оценивалась на основе образования молочной кислоты и потребления глюкозы. Дыхание измеряли манометрически. АТФ, АДФ и АМФ определялись с помощью энзиматических методов.

Уровень гликогена не менялся после однократного отравления дихлорфосом. После 14- и 19-дневного введения пестицида наблюдался рост уровня гликогена, зависящий от дозы дихлорфоса. Гликолиз гомогенатов мозга в кислородных и безкислородных условиях не менялся. Потребление кислорода, исследуемое в присутствии глюкозы или янтарной кислоты, не менялось после однократного и 14-дневного введения пестицида. В случае 90-дневного отравления дихлорфосом в дозе 2% ЛД₅₀ наблюдалась незначительная стимуляция потребления кислорода гомогенатами, но только в присутствии янтарной кислоты. Не были обнаружены принципиальные изменения в концентрациях АТФ, АДФ и АМФ после однократного и 14-дневного отравления животных. Наблюдался незначительный рост содержания АТФ после 90-дневного введения дихлорфоса.

Отмеченные изменения указывают, что дихлорфос может приводить к нарушению углеводного обмена в нервной ткани.

B. Biczowa, M. Sikorska, W. Bicz, J. Pacheczka, A. Sulinski

THE GLYCOGEN LEVEL, GLYCOLYSIS, RESPIRATION AND ATP, ADP, AMP CONTENT IN RAT BRAIN FOLLOWING ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDE DICHLORVOS (DDVP) INTOXICATION

Summary

Biochemical studies were carried out on the brains of rats intoxicated *per os* by dichlorvos. The animals were divided into 3 groups: the rats of the first group were intoxicated by a single administration of dichlorvos in doses 2%, 10% or 50% LD₅₀. The rats of the second group were intoxicated by identical dose of pesticide in the period of 14 days. The animals of the third group were intoxicated in the period of 90 days by the 2% LD₅₀ of dichlorvos daily.

The glycogen level (glycose after glycogen hydrolysis) was determined colorimetrically. Glycolytic activity of the brain homogenates in the anaerobic and aerobic conditions was estimated on the basis of measurements of lactate production and glucose consumption. For the determination of respiratory activity the manometric technique was used. ATP, ADP and AMP content was estimated by enzymatic methods.

The glycogen level remained unchanged following one-time dichlorvos administration. An increase of the glycogen level was observed after 14 and 90 days of pesticide administration. A correlation between the increase of glycogen content and the dichlorvos doses was observed. There were no changes in aerobic and anaerobic glycolysis of rat brain homogenates following either single or chronic dichlorvos intoxication.

The oxygen uptake by the brain homogenates in the presence of glucose or succinate did not change after a single and 14-days administration of DDVP. Chronic poisoning (90 days) in a 2% LD₅₀ dose stimulated oxygen consumption in the presence of succinate only. There were no significant changes in ADP and AMP content following either single or chronic intoxication. A small rise in ATP level was stated after 90-days administration of dichlorvos.

The observed changes indicate that DDVP may disturb carbohydrate metabolism in the nerve tissue.

PIŚMIENNICTWO

1. Adam H.: „Adenosin-5'-triphosphat Bestimmung mit Phosphatglycerat-Kinase". W: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim 1962, 539—543.
2. Adam H.: „Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat". W: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim 1962a, 573—577.
3. Horn H. D., Bruns F. H.: Quantitative Bestimmung von L(+) Milchsäure mit Milchsäuredehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 378—380.
4. Hugget A. S. G., Nixon D. A.: Enzymic Determination of Blood Glucose. *Biochem. J.* 1957, 66, 12P.
5. Metcalf R. L., Fukuto T. R., March R. B.: Toxic action of Dipterox and DDVP to the House Fly. *J. Econ. Entomol.*, 1959, 52, 44—49.
6. Mossakowski M. J., Long D. N., Meyers R. E., De Curet H. H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
7. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach in vitro. *Roczniki PZH*, 1975, 26, 347—356.
8. Piekarski L., Fitak B., Karliński S., Sawicki J.: Toksyczność fosforanu 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksymetylowego (diptereksu) dla komórek zwierzęcych w hodowli. *Bromat. Chemia Toksykol.* 1971, 4, 307—314.
9. Pronaszko-Kuczyńska A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Changes in the glycogen content of the brain during experimental ischemia. *Pol. Med. J.* 1972, 11, 991—1003.
10. Racker E., Krimsky I.: Effect of nicotinic acid amide and sodium on glycolysis and oxygen uptake in brain homogenates. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 453—461.
11. Reiner J. M.: Carbohydrate Metabolism in Tissue Homogenates. *Arch. Biochem.* 1947, 12, 327—338.
12. Rusiecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. PZWL Warszawa 1973, 75—103.
13. Sawicki J.: Drogi metabolizmu i produkty rozpadu 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylofosfonianu (diptereks) i 2,2-dwuchloro winylodwumetylofosforanu (DDVP). *Bromat. Chemia Toksykol.* 1973, 6, 197—205.

14. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzcińska A.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura i kury. *Roczniki PZH w druku.*
15. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Skonieczna M., Śliwińska W.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na utlenianie bursztynianu i aktywność oksydazy cytochromowej wątroby szczura. *Roczniki PZH*, 1975, 26, 357—364.
16. Syrowatka T.: Wpływ niektórych insektycydów fosforoorganicznych na fosforylację oksydacyjną i regulację oddychania mitochondriów wątroby szczura. *Roczniki PZH* 1969, 20, 557—562.
17. Szyszko E.: Instrumentalne metody analityczne. PZWL, Warszawa 1971, 445—460.
18. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDPglucose : Glycogen α -4-Glucosyltransferase (EC. 2.4.1.11) and α -1,4-Glucan : Orthophosphate Glucosyltransferase (EC. 2.4.1.1) Activity in Rat Brain in Experimental Ischemia, *Acta Neuropath. (Berl.)* 1971, 19, 242—248.
19. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The Glycogen Content and Its Topography and UDPglucose : Glycogen α -4-Glucosyltransferase (EC. 2.4.1.11.) Activity in Rat Brain after Experimental Carbon Monoxide Intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1973, 24, 222—231.
20. Tomaszewski L.: Mikrometody biochemiczne w laboratorium klinicznym. PZWL, Warszawa 1970, 127—131.
21. Umbreit W.W., Burris R. H., Stauffer J. F.: W: *Manometric Techniques.* Burgess Publ. Co., Minneapolis 1957, 64—78.
22. Utter M. F., Wood H. G., Reiner J. M.: Anaerobic glycolysis in nervous tissue. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 197—217.

Adres dr Barbary Biczowej: Pracownia Metabolizmu Leków Instytutu Biofarmacji AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa.

DARIUSZ SITKIEWICZ, ZOFIA ZALEWSKA

AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ
I DEHYDROGENAZY BURSZTYNIANOWEJ W MÓZGU SZCZURA
PO ZATRUCIU FOSFOROORGANICZNYMI INSEKTYCYDAMI
DICHLORFOSEM I TRICHLORFONEM *

Pracownia Metabolizmu Leków Instytutu Biofarmacji AM w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab. W. Bicz

Szereg pestycydów, w tym także związki fosforoorganiczne, wykazują działanie cytotoksyczne (Piekarski i wsp. 1971), neurotoksyczne (Szczurek, Sośnierz 1970) oraz szkodliwy wpływ na rozwój potomstwa (Rybak 1973). Insektycydy fosforoorganiczne poza hamowaniem aktywności acetolicholinoesterazy powodują także zmiany w utlenianiu komórkowym (Heidker, Pardini 1972, Syrowatka 1969, Beskid i wsp. 1973). W poprzednich naszych pracach wykazano, że trichlorfon i dichlorfos powodują *in vitro* zmiany aktywności niektórych oksydoreduktaz mitochondrialnych (Sitkiewicz i wsp. 1975a), którym towarzyszy obniżenie zdolności oddechowych homogenatów tkanek zwierzęcych (Pachecka i wsp. 1975, Sitkiewicz i wsp. 1975b). Obserwacje te sugerują możliwość występowania zaburzeń w procesach oksydoredukcyjnych w komórkach środkowego układu nerwowego w następstwie działania insektycydów fosforoorganicznych *in vivo*.

Celem pracy było zbadanie aktywności oksydazy cytochromowej (E.C. 1.9.3.1.) oraz dehydrogenazy bursztynianowej (E.C. 1.3.99.1) w mózgu szczurów poddanych zatruciu dichlorfosem (DDVP) lub trichlorfonem (dipterex).

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto samce szczurów białych Wistar (z hodowli zamkniętej, kojarzone losowo) o wadze około 200 g. Przez okres doświadczenia szczury karmiono standardową dietą hodowlaną. Insektycydy podawano sondą dożołądkowo — dichlorfos w roztworze oleju jadalnego a trichlorfon w roztworze wodnym w dawkach 2%, 10% i 50% LD₅₀.

* Praca częściowo subsydiowana z problemu węzłowego PAN 09.4.1.3.

Objętość podawanego roztworu dichlorfosu wynosiła 0,5 ml a trichlorfonu 4 ml. Przyjęto następujące dawki LD_{50} dla szczurów samców: 80 mg/kg wagi ciała w przypadku dichlorfosu i 630 mg/kg ciężaru ciała dla trichlorfonu (Rusiecki 1966). Dichlorfos (DDVP) 0,0-dwumetylo-0/2,2,2-dwuchlorowinylo/ fosforan 99,6% oraz trichlorfon (dipterex) 0,0-dwumetylo (1-hydroksy-2,2,2-trójchloroetylo) fosfonian 99,9% pochodziły z Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

Zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne, które stanowiły 3 modele zatrucia. W grupie I dichlorfos lub trichlorfon podawano jednorazowo w dawkach 2%, 10% i 50% LD_{50} . Zwierzęta zabijano po dwóch godzinach od momentu podania pestycydu. W grupie II insektycydy podawano w tych samych dawkach codziennie przez okres 14 dni (z wyjątkiem niedziel i świąt). W grupie III insektycydy podawano tylko w dawce 2% LD_{50} przez okres 90 dni (z wyjątkiem niedziel i świąt). Badania biochemiczne w grupie II i III wykonywano następnego dnia po ostatnim podaniu pestycydu. Kontrolę stanowiły zwierzęta, którym podawano sondą dożołądkowo 0,5 ml oleju lub 4 ml wody w okresach czasu odpowiadających modelom doświadczalnym. Szczury zabijano przez dekapitację. Do badań pobierano obie półkule mózgowe.

Fracje mitochondrialne otrzymywano metodą opisaną przez Clarka i Nicklasa (1970). Pobrane półkule mózgowe przemywano oziębionym medium izolacyjnym o składzie: 0,25 M sacharoza, 0,5 mM K^+EDTA , 10 mM tris/HCl o pH 7,4. Tkanekę homogenizowano w homogenizatorze Pottera-Elvehjema z tłokiem teflonowym. Homogenat wirowano 3 min. przy $2000 \times g$. Osad odrzucano a supernatant wirowano 15 min przy $12\,500 \times g$. Osad frakcji mitochondrialnej zawieszano w 2,5 ml medium o składzie: 3% ficoll, 0,12 M mannitol, 0,03 M sacharoza, 25 μM K^+EDTA o pH 7,4. Zawiesinę ostrożnie nawarstwiano na 10 ml medium o składzie: 6% ficoll, 0,24 M mannitol, 0,06 M sacharoza, 50 μM K^+EDTA o pH 7,4 i wirowano 30 min. przy $11\,500 \times g$. Supernatant odrzucano a pozostały osad dwukrotnie przemywano medium izolacyjnym. Frakcję mitochondrialną izolowano przez wirowanie 10 min przy $11\,500 \times g$. Końcowy osad zawieszano w 2 ml medium izolacyjnego (4—5 mg białka/ml) i przechowywano w lodzie. Frakcje mitochondrialne izolowano w temperaturze $0-4^\circ$ stosując wirówkę K-70 f-my Janetzki (NRD).

Aktywność oksydazy cytochromowej oznaczano metodą spektrofotometryczną (Smith 1954) w środowisku zawierającym 20 mM bufor tris/HCl pH 7,4 oraz 125 mM KCl. Cytochrom C (Biomed, Kraków) zredukowano $Na_2S_2O_4$ i odsalano na kolumnie o wymiarach 2×16 cm wypełnionej Sephadexem G-25 fine (Yonetani, Ray 1965). Ferrocycyochrom C eluowano z kolumny roztworem o składzie: 10 mM tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA. Aktywność enzymu wyrażano jako stałą szybkości reakcji I-go rzędu w przeliczeniu na 1 mg białka (Smith 1955).

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej oznaczano metodą spektrofotometryczną (King 1963) w środowisku zawierającym: 0,1 M bufor fosforanowy pH 7,4, 1,5 mM cyjanek potasu, 20 mM bursztynian potasu, 0,05 mM 2-6-dwuchlorofenoloindofenol, 1,8 mM metasarczan fenazyny. Miarą aktywności enzymu była zmiana ekstynkcji akceptora elektronów w czasie 1 min. powodowana przez 1 mg białka. Białko mitochondrialne oznaczano metodą biuretową (Layne 1957). Białko oraz aktywności obu enzymów oznaczano bezpośrednio po solubilizacji 1% roztworem dezoksycholanu sodu.

WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono aktywność oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczura po zatruciu trichlorfonem lub dichlorfosem.

Trichlorfon podany szczurom jednorazowo w dawkach 2%, 10% lub 50% LD₅₀ nie powoduje zmian w aktywności oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu. W tych samych warunkach dichlorfos powodował obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej. Hamowanie aktywności enzymu w około 30% zaobserwowano po jednorazowym zatruciu szczurów dawką 10% LD₅₀ dichlorfosu. Zatrucie dawkami 2% lub 50% LD₅₀ insektycydu nie powodowało istotnych zmian w aktywności oksydazy cytochromowej. Po podawaniu trichlorfonu przez okres 14 dni w dawce 2% LD₅₀ stwierdzono podwyższenie aktywności oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu. Dawki 10% i 50% LD₅₀ trichlorfonu nie powodowały zmian aktywności enzymu. W analogicznych warunkach doświadczalnych dichlorfos powodował obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej we wszystkich stosowanych dawkach, przy czym nie zaobserwowano korelacji między wielkością dawki insektycydu a stopniem zahamowania aktywności enzymu. Najwyższy efekt hamujący, wynoszący 45% stwierdzono po 14-dniowym podawaniu dichlorfosu w dawce 10% LD₅₀. Zatrucie dawkami 2% i 5% LD₅₀ powodowało zahamowanie aktywności oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu wynoszące odpowiednio 12% i 30%.

Wielokrotne podawanie małych dawek trichlorfonu (2% LD₅₀) przez okres 90 dni nie powodowało zmian aktywności oksydazy cytochromowej.

W tabeli 2 przedstawiono aktywność dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczurów po zatruciu trichlorfonem lub dichlorfossem.

Po jednorazowym zatruciu szczurów trichlorfonem lub dichlorfossem w dawkach 2%, 10% i 50% LD₅₀ nie stwierdzono zmian aktywności dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu. Również w następstwie wielokrotnego podawania insektycydów w tych sa-

Tabela 1. Aktywność oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem lub dichlorfosem

Table 1. Activity of cytochrome oxidase in rat brain mitochondria following trichlorphon or dichlorvos intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Aktywność oksydazy cytochromowej K(sec ⁻¹ /mg białka) Activity of cytochrome oxidase K(sec ⁻¹ /mg protein)									
Okres podawania insektocydu Period of insecticide administration	Dawka insektocydu Dose of insecticide (% LD ₅₀)	Trichlorfon Trichlorphon					Dichlorfos Dichlorvos				
		\bar{x}	±	S _x	(n)	p	\bar{x}	±	S _x	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	1,75	±	0,14	(8)		1,54	±	0,14	(7)	
	2	1,43	±	0,09	(8)	≥0,05	1,50	±	0,12	(6)	≥0,05
	10	1,65	±	0,12	(6)	≥0,05	1,06	±	0,09	(6)	≤0,05
	50	1,66	±	0,12	(6)	≥0,05	1,49	±	0,09	(5)	≥0,05
14 dni days	Kontrola Control	1,28	±	0,09	(8)		1,66	±	0,14	(6)	
	2	1,59	±	0,07	(8)	≤0,01	1,47	±	0,12	(5)	≤0,05
	10	1,30	±	0,09	(7)	≥0,05	0,91	±	0,07	(6)	≤0,01
	50	1,12	±	0,08	(7)	≥0,05	1,14	±	0,11	(6)	≤0,01
90 dni days	kontrola Control	1,79	±	0,11	(5)						
	2	1,71	±	0,05	(5)	≥0,05					

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ — średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe średniej arytmetycznej
— arithmetic mean ± mean error of the mean

n — liczba zwierząt
number of animals
p — prawdopodobieństwo
probability

Tabela 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem lub dichlorfosem

Table 2. Activity of succinate dehydrogenase in rat brain mitochondria following trichlorphon or dichlorfos intoxication

Model zatrucia Model of intoxication		Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej $\Delta E/mg$ białka/min. Activity of succinate dehydrogenase $\Delta E/mg$ protein/min.									
Okres podawania insektycydu Period of insecti- cide administration	Dawka insektycy- du Dose of insecticide (% LD ₅₀)	Trichlorfon Trichlorphon					Dichlorfos Dichlorvos				
		\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p	\bar{x}	\pm	$S_{\bar{x}}$	(n)	p
1 dzień day	Kontrola Control	0,29	\pm	0,02	(6)		0,28	\pm	0,01	(8)	
	2	0,29	\pm	0,02	(6)	$\geq 0,05$	0,26	\pm	0,01	(8)	$\geq 0,05$
	10	0,27	\pm	0,02	(6)	$\geq 0,05$	0,27	\pm	0,01	(8)	$\geq 0,05$
	50	0,25	\pm	0,02	(6)	$\geq 0,05$	0,27	\pm	0,01	(8)	$\geq 0,05$
14 dni days	Kontrola Control	0,28	\pm	0,04	(8)		0,30	\pm	0,01	(7)	
	2	0,26	\pm	0,07	(8)	$\geq 0,05$	0,28	\pm	0,01	(7)	$\geq 0,05$
	10	0,25	\pm	0,01	(7)	$\geq 0,05$	0,28	\pm	0,01	(8)	$\geq 0,05$
	50	0,24	\pm	0,01	(7)	$\geq 0,05$	0,27	\pm	0,01	(6)	$\geq 0,05$
90 dni days	Kontrola Control	0,28	\pm	0,02	(6)		0,27	\pm	0,02	(7)	
	2	0,26	\pm	0,02	(6)	$\geq 0,05$	0,27	\pm	0,02	(7)	$\geq 0,05$

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ — średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe średniej arytmetycznej
— arithmetic mean \pm mean error of the mean

n — liczba zwierząt
number of animals

p — prawdopodobieństwo
probability

mych dawkach przez okres 14 dni oraz przez okres 90 dni w dawce 2% LD₅₀ nie zaobserwowano zmian aktywności dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu.

OMÓWIENIE

Zastosowane modele doświadczalne pozwalały na ocenę jednorazowego i przedłużonego działania pestycydów na aktywność badanych układów oksydoredukcyjnych. Zarówno po jednorazowym jak i wielokrotnym zatruciu zwierząt trichlorfonem nie zaobserwowano zmian w aktywności oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu. Zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy w mózgu po 2 godzinach od momentu podania pestycydu (Pachecka i wsp. 1975) wskazuje, że oba insektycydy w czasie wykonania badań znajdują się w ośrodkowym układzie nerwowym. Dlatego też wydaje się, że brak efektu hamowania aktywności oksydazy cytochromowej po zatruciu dichlorfossem może być powodowany przez ograniczenie jego penetracji do wnętrza mitochondrionu bądź jego szybkim metabolizowaniem w żywym ustroju. Obserwowane znaczne zmniejszenie aktywności enzymu w mózgowej frakcji mitochondrialnej w następstwie zatrucia dichlorfossem może świadczyć, że trichlorfon nie jest metabolizowany *via* dichlorfos, co było sugerowane przez Arthura i Casida (1957), lub że nie dochodzi do gromadzenia tego metabolitu w organizmie.

W poprzednich naszych badaniach *in vitro* dichlorfos powodował stymulację aktywności oksydazy cytochromowej w mózgowej frakcji mitochondrialnej (Sitkiewicz i wsp. 1975). Konfrontacja wyników badań *in vitro* i *in vivo* sugeruje, że obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej w następstwie zatrucia dichlorfossem nie jest bezpośrednim efektem działania dichlorfosu lecz spowodowane jest przez jego metabolity. Na działanie pośrednie wskazuje brak korelacji pomiędzy dawką insektycydu i stopniem hamowania aktywności oksydazy cytochromowej. Podobny brak zależności pomiędzy dawką insektycydu i stopniem hamowania aktywności acetylocholinoesterazy a występowaniem zmian w procesach oksydoredukcyjnych i aktywności katepsyn obserwowano w różnych tkankach szczura w przypadku zatruc fenchlorfossem (Panek i wsp. 1973) oraz trichlorfonem (Wiśniewski i wsp. 1973). Autorzy ci sugerują, że istnieją pewne optymalne dawki związków fosforoorganicznych wywołujące maksymalne zaburzenia metabolizmu tkankowego, co związane jest prawdopodobnie z różnokierunkowym działaniem tych preparatów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że dichlorfos wykazuje znacznie większą toksyczność niż trichlorfon w stosunku do badanych układów oksydoredukcyjnych w mózgu. Trudno obecnie wiązać różnice w toksy-

czności obu insektycydów z ich różną strukturą chemiczną. Dichlorfos znacznie lepiej rozpuszczalny w tłuszczach od trichlorfonu może oznaczać się większym powinowactwem do bogatej w lipidy tkanki nerwowej, może wiązać się również z błonami mitochondrialnymi, co może prowadzić do zaburzeń aktywności metabolicznej tych organelli. Różnice w szybkości wchłaniania a także w szybkości metabolizowania dichlorfosu i trichlorfonu mogą być przyczynowo związane z różnicami w toksyczności obu preparatów.

Autorzy dziękują Pani Barbarze Dyjak za pomoc techniczną przy wykonywaniu badań.

Д. Ситкевич, З. Залевска

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ И ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФООРГАНИЧЕСКИМИ ИНСЕКТИЦИДАМИ ДИХЛОРФОСОМ И ТРИХЛОРФОНОМ

Резюме

Исследовалась активность цитохромоксидазы и дегидрогеназы янтарной кислоты в мозге крыс после однократного и многократного введения трихлорфона или дихлорфоса в дозе 2%, 10% и 50% ЛД₅₀. Было также исследовано влияние введения трихлорфона в дозе 2% ЛД₅₀ в течении 90 дней. Активность обоих ферментов определялась спектрофотометрически в митохондриальной фракции мозга, солюбилизированной раствором дезоксихолата натрия.

Было обнаружено, что трихлорфон, введенный однократно, не вызывает изменений активности цитохромоксидазы и дегидрогеназы янтарной кислоты. В этих же условиях дихлорфос в дозе 10% ЛД₅₀ ведет к понижению активности цитохромоксидазы примерно на 30% и не оказывает влияния на активность дегидрогеназы янтарной кислоты. После отравления крыс трихлорфоном в течение 14 дней повышение активности цитохромоксидазы наблюдалось только под влиянием дозы 2% ЛД₅₀. В аналогичных экспериментальных условиях дихлорфос во всех применяемых дозах вызывал снижение активности этого фермента. Активность дегидрогеназы янтарной кислоты была неизменной. Введение трихлорфона в дозе 2% ЛД₅₀ не вызывало изменений обеих исследуемых оксидоредуктаз.

По-видимому, снижение активности цитохромоксидазы после отравления дихлорфосом не является непосредственным результатом действия самого инсектицида, а его метаболитов, или же следствием нарушения нейрогормональной регуляции. Из приведенных исследований следует, что дихлорфос проявляет большую токсичность, чем трихлорфон по отношению к исследуемым оксидоредукционным системам мозга.

D. Sitkiewicz, Z. Zalewska

THE ACTIVITY OF CYTOCHROME OXIDASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA FOLLOWING TRICHLORPHON AND DICHLORVOS INTOXICATION

Summary

This study deals with cytochrome and succinate dehydrogenase activities in rat brain mitochondria after trichlorphon and dichlorvos intoxication. Insecticides

were administered to rats *per os* in doses 2, 10 and 50 per cent of LD₅₀. The effects of all doses of both insecticides on the enzymes activities following one-time and multiple (14 days) intoxication were assayed. In longer experiment (90 days) only one dose (2 per cent of LD₅₀) was examined. Activities of both enzymes in rat brain mitochondria after solubilization by natrium deoxycholate were determined spectrophotometrically.

Trichlorphon applied one-time in 2, 10 and 50% of LD₅₀ doses did not change the cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities in rat brain mitochondria. In the same conditions dichlorvos in 10% LD₅₀ dose caused a decrease of cytochrome oxidase activity by about 30%, remaining without influence on the succinate dehydrogenase activity.

Following repeated trichlorphon intoxication in a 2% of LD₅₀ dose during 14 days, an increase of cytochrome oxidase activity was stated. In the same experimental condition dichlorvos intoxication in all doses inhibited the cytochrome oxidase activity, while the succinate dehydrogenase activity was unchanged. Dichlorvos and trichlorphon had no effect on the succinate dehydrogenase activity when administered for 90 days in small doses (2 per cent of LD₅₀).

The results indicate that dichlorvos is more toxic for rat brain mitochondrial enzymes than trichlorphon.

PIŚMIENNICTWO

1. Arthur B. W., Cassida I. E.: Metabolism and Selectivity of 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl Phosphonate and its Acetyl and Vinyl Derivatives. *J. Agr. Food Chem.*, 1957, 5, 186—191.
2. Beskid M., Kłos H., Suwała Z., Szyszkowska A., Wójcik J.: Wpływ malationu na niektóre odczynny enzymów oddechowych i ultrastrukturę mitochondriów wątroby szczura. *Roczn. PZH*, 1973, 24, 741—748.
3. Clark J. B., Nicklas W. J.: The Metabolism of Rat Brain Mitochondria Preparation and Characterisation. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4724—4731.
4. Heidker J. C., Pardini R. S.: Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Guthion, Some Related Insecticides and Degradative Products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1972, 8, 141—146.
5. King T. E.: Reconstruction of Respiratory Chain Enzyme Systems. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
6. Layne E.: Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. W: *Methods in Enzymology*, Colowick S. P., Kaplan N. O., eds. Academic Press, New York 1957, 3, 447—454.
7. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach *in vitro*. *Roczn. PZH*, 1975, 26, 347—356.
8. Pachecka J., Suliński A., Ziółkowska G.: Aktywności wybranych esteraz mózgu w następstwie zatrucia insektycydami fosforoorganicznymi dichlorfosom i trichlorfonem. *Neuropat. Pol.*, w druku.
9. Panek R., Wiśniewski K., Sarosiek W., Danieluk J., Szymański A.: Badania nad właściwościami farmakologicznymi i mechanizmem działania fenchlorfosu. *Brom. Chem. Toksykol.*, 1973, 6, 153—160.
10. Piekarski L., Fitak B., Karliński S., Sawicki J.: Toksyczność fosfonianu 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylowego (Dipterexu) dla komórek zwierzęcych w hodowli. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1971, 4, 307—314.

11. Rusiecki W.: Toksykologia Środków Ochrony Roślin. PZWL, Warszawa, 1966, 51—69.
12. Rybak M.: Wpływ foschloru podawanego w wodzie na rozwój osobniczy szczura białego i jego potomstwa. Roczn. PZH, 1973, 24, 465—475.
13. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzczińska A.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura i kury. Roczn. PZH, 1975, w druku.
14. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Skonieczna M., Śliwińska W.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na utlenianie bursztynianu i aktywność oksydazy cytochromowej wątroby szczura. Roczn. PZH, 1975, 26, 357—364.
15. Smith L.: A Study of Some Oxidative Enzymes of Bakers Yeast. Arch. Biochem Biophys., 1954, 50, 285—298.
16. Smith L.: Cytochromes a, a₁, a₂ and a₃. W: Methods in Enzymology, Colowick S. P., Kaplan N. O., eds. Academic Press, New York 1955, 2, 732—740.
17. Szcurek Z., Sośnierz M.: Zmiany patomorfotyczne w zatruciu pestycydami fosforoorganicznymi u szczurów. Materiały V Zjazdu Naukowego P.T. Anatomopatologów, Katowice, 1970, 87—88.
18. Syrowatka T.: Wpływ niektórych insektycydów fosforoorganicznych na fosforylację oksydacyjną i regulację oddychania mitochondriów wątroby szczura. Roczn. PZH, 1969, 20, 557—562.
19. Wiśniewski K., Szymański A., Panek R.: Badania nad właściwościami farmakologicznymi i mechanizmem działania trichlorfonu. Bromat. Chem. Toksykol., 1973, 6, 145—152.
20. Yonetani T., Ray G. S.: Studies on Cytochrome Oxidase Kinetics of the Aerobic Oxidation of Ferrocyclochrome c by Cytochrome Oxidase. J. Biol. Chem., 1965, 240, 3392—3398.

Adres autorów: Pracownia Metabolizmu Leków, Instytutu Biofarmacji AM w Warszawie, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

KOMUNIKATY

W okresie od 6 do 10 października 1975 odbędzie się w Toronto I Międzynarodowy Kongres Neurologii Dziecięcej.

*

*

*

W dniach od 12 do 17 października 1975 będzie miał miejsce w Mexico City IV Ogólnoamerykański Kongres Neurologiczny.

*

*

*

W roku 1976 odbędą się następujące kongresy i zjazdy:

W dniach od 26 do 28 maja 1976 r. odbędzie się w Poznaniu XIV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików z następującą tematyką:

1. Zmiany cytochemiczne i histochemiczne w zatruciach przemysłowych i rolniczych.
2. Nowe metody cytochemiczne i histochemiczne.
3. Aparat Golgiego.

Termin zgłaszania uczestnictwa i doniesień upływa z dniem 31.XII.1975 r.

Adres: Doc. dr hab. M. Kozik, Zakład Neuropatologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań, Przybyszewskiego 49.

*

*

*

W okresie od 29 sierpnia do 3 września 1976 r. odbędzie się w Bukareszcie V Międzynarodowy Kongres Histochemii i Cytochemii.

*

*

*

W roku 1977 odbędą się następujące zjazdy:

Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego odbędzie się w Białymstoku (dokładny termin zostanie ustalony później).

Tematami głównymi będą:

1. Postępy w leczeniu neurologicznym z uwzględnieniem rehabilitacji,
2. Postępy w diagnostyce neurologicznej.

Adres Komitetu Organizacyjnego: doc. dr hab. Eleonora Jankowicz, Klinika Neurologiczna, AM, Białystok, ul. Marii Curie-Skłodowskiej 24a.

*

*

*

XI Światowy Kongres Neurologii odbędzie się w okresie od 11 do 18 września 1977 r. w Amsterdamie (Holandia) pod auspicjami Światowej Federacji Neurologii.

Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego został prof. dr W. A. den Hartog/Jager, sekretarzem generalnym — dr G. W. Bruyn.

Tymczasową siedzibą sekretariatu jest: University Clinic of Neurology, Paviljoen 2, Wilhelmina gasthuis, Amsterdam the Netherland.

ANNA TARASZEWSKA, EWA OSETOWSKA

IV. ZMIANY W MÓZGU KRÓLIKA „PT” W OKRESIE PRZEDOBJAWOWYM *

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki
Kierownik Ośrodka: prof. dr med. E. Osetowska

Badania nad korelacją objawów klinicznych i zmian morfologicznych w mózgu królika „pt” wykazały, że w pierwszym dniu uchwytnych klinicznie drzeń zmiany w mózgu u różnych zwierząt wykazywały rozmaity stopień zaawansowania (Osetowska i wsp. 1975). Stwierdzenie tego faktu skłoniło nas do podjęcia systematycznych badań morfologicznych u noworodków „pt” od 1-go do 10-go dnia życia, tj. w okresie przed wystąpieniem objawów klinicznych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiło 50 noworodków pt; 38 noworodków (grupa I) pochodziło od rodziców chorych (z kojarzenia chorego samca z chorą samicą, czyli chorych genetycznie), a 12 noworodków (grupa II — kontrolna) pochodziło od rodziców z następujących kojarzeń: zdrowej samicy z chorym samcem, z którego wybrano do badania samce (możliwe potomstwo — zdrowe samce i samice nosicielki) oraz chorej samicy ze zdrowym samcem i zdrowej samicy z chorym samcem, z których pobrano do badania samice nosicielki. W grupie I przebadano 24 samce i 14 samic, w grupie II (kontrolnej) — 3 samce i 9 samic.

Noworodki usypiano przez dosercowe lub doopłucnowe podanie Eunarconu (f-my Ridel Dhoen, AG Seelze, Hannover) w 1 i 2 dniu życia narconu (f-my Ridel Dhoen, AG Seelze, Hannover) w 1 i 2 dniu życia: i 6 dniu życia: 8 chorych i 2 zdrowe, w 7 i 8 dniu życia: 7 chorych i 2 zdrowe oraz w 9 i 10 dniu życia: 7 chorych i 3 zdrowe.

Płęć określano sekcyjnie wg gonad. Mózgi utrwalone w 10% formalinie przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny i krojono na skraw-

* Praca wykonana z pomocą finansową: agreement N.H.I. PL 480, 05-035-1.

ki grubości 4 mikronów. Metody barwienia: fiolet krezyłu ,H.-E., wg Heidenhaina, wg Holzera w modyfikacji Kanzler-Arendta oraz impregnacja srebrowa met. Holmesa.

WYNIKI

W grupie królików genetycznie chorych w 19 przypadkach tj. w 50% stwierdzono obecność zmian komórkowych, które dotyczyły najczęściej jąder nerwów czaszkowych (III, IV, VI, VII, V, VIII, XII), istoty siateczkowej śródmózgowia, mostu i opuszki, jąder głębokich mózdzku, oliw i jądra barwikowego mostu. Najwcześniejsze zmiany stwierdzono w 2 dniu życia w postaci obrzęku neuronów z tigrolizą w części centralnej komórki, zbitego tigroidu na obwodzie, odśrodkowego przesunięcia jądra i silnego przerzedzenia chromatyny jądrowej (ryc. 1 a,b). Niektóre przypadki wykazywały wybitne nasilenie uszkodzeń komórkowych z balonowatym rozdęciem protoplazmy niemal pozbawionej tigroidu i jasnym jądrem z niewidoczną siateczką chromatynową. (ryc. 1c). W dużych neuronach ruchowych istoty siateczkowej obserwowano zacieranie struktury komórkowej przez obrzękłe bryłki tigroidu i stopniowe homogenne rozplywanie komórek w podłożu (ryc. 1d), — obraz spotykany często u królików w pełni objawów klinicznych. Występowały także obrazy całkowitego rozpadu komórek z resztkami tigroidu, bez błony komórkowej i bez jądra (ryc. 2a, b). Stosunkowo rzadziej napotymano wakuole niszczące większą część neuronu (ryc. 2c). W impregnacji met. Holmesa obok zmian w strukturze komórkowej, można było stwierdzić fragmentację, obrzęk i korkociągowate odkształcenia włókien nerwowych (ryc. 2d).

Mielinizację włókien nerwów czaszkowych obserwowano już u noworodków w 1 i 2 dniu życia, ale nie we wszystkich przebadanych przypadkach. U noworodków w 7, 8 i 9 dniu życia obserwowano najwięcej włókien zmielinizowanych w szlakach wzrokowych, we włóknach poprzecznych mostu i szwu, w konarach mózdzku i w korzonkach nerwów czaszkowych. W strukturach tych na ogół nie stwierdzano ani przerzedzenia włókien ani spłowienia mieliny, które jest tak bardzo charakterystyczne w późniejszym okresie rozwoju choroby. Tylko w pojedynczych przypadkach (Z-31/73) spostrzegano bądź to opóźnienie mielinizacji, bądź już zaczynającą się demielinizację oraz brak włókien mielinowych, nawet w pniu i korzonkach nerwów czaszkowych, z obecnością minimalnie zaznaczonej glejozy włóknistej. W innych strukturach, wybitnie uszkodzonych u królików „pt” z nasilonymi objawami klinicznymi, praktycznie nie stwierdzano zmian. Tylko w pojedynczych neuronach *stratum* występowało przerzedzenie chromatyny jądrowej, w dużych komórkach zaczynające się zatarcie rysunku tigroidu. We wzgórzu pojedyncze

Tabela 1. Nasilenie zmian komórkowych u królika „pt” w okresie przedklinicznym (grupa I)

Table 1. Intensity of cellular changes in the preclinical course in „pt” rabbit (group I)

Dzień życia Day of life	Niecharakterystyczne lub brak zmian Lack or unspecific changes		Pojedynczo charaktery- styczne zmiany Single typical changes		Zmiany w niektórych jądrach Changes in some cellular nuclei		Zmiany w licznych strukturach Changes in a number of structures	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	2	1						
2	1	2		1	2		1	
3	1	1					1	
4		1		2				
5	2	1	1	1				
6	2		1					
7		1	1				1	
8	2		2					
9		1	1			1		
10	1		1	1			1	
Razem Total	11	8	7	5	2	1	4	0

obrzękle oligodendrocyty zachodzące na protoplazmę neuronów tworzyły pseudo-wakuole. Zmiany te, widoczne tylko przy specjalnym poszukiwaniu, spostrzegano u noworodków w wieku 6—10 dni. Najbardziej zaawansowane zmiany w *striatum* i we wzgórzu wykazywał 9-dniowy królik (Z-56/72). W pozostałych przypadkach grupy I zmiany komórkowe, rozsiane we wszystkich strukturach, ograniczały się do ledwo uchwytniej tigrolizy, bez zmian w jądrze oraz niecharakterystycznych zmian barwliwości. Zmiany tego typu obserwowano również w grupie II kontrolnej. Zmiany te zinterpretowano jako nieswoiste, być może pośmiertne, dające się bez trudu różnicować z charakterystycznym obrazem tigrolizy nasilającej się do homogenizacji komórkowej, rozplływania się struktury jądrowej i ostrego obrzęku neuronów. Wyniki badania grupy I zestawiono w tabeli 1.

OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezę roboczą, że zmiany w mózgu u królika „pt” poprzedzają w pewnej liczbie przypadków wystąpienie objawów klinicznych. Lokalizacja zmian zgodna jest z obserwacjami poczynionymi w grupie królików z poronnym przebiegiem klinicznym, w której również najbardziej zaawansowane uszkodzenia komórkowe spostrzegano w jądrach nerwów czaszkowych i w istocie siateczkowatej pnia mózgowego we wczesnym okresie objawowym. W przypadkach, w których objawy kliniczne cofały się po kilku dniach obserwowano w tych samych strukturach bądź to objawy odnowy czy też reparacji zmian, analogiczne do obserwowanych w poronnych zakażeniach wirusowych (Bodian 1949), bądź też uszkodzenia nieodwracalne w postaci „chronicznego” przebarwienia i obkurczenia neuronu.

Wydaje się interesujący fakt, że uszkodzenia morfologiczne wczesnego okresu nie odpowiadają najwcześniejszym objawom klinicznym. Lokalizacja zmian w pniu, mózdzku i śródmózgowiu (choć zgodna z rozwojem ontogenetycznym królika) jest wspólna z lokalizacją zmian u królika amerykańskiego (O’Leary i wsp. 1972), u którego jednakże równocześnie z objawami ataksji występują ciężkie objawy ze strony nerwów czaszkowych. Tymczasem u królika „pt” praktycznie nie obserwujemy uszkodzenia nerwów czaszkowych, poza zaburzeniami w układzie wzrokowym. Natomiast charakter pierwszych zaburzeń ruchowych jest wyraźnie różny od ataksji, natomiast przypominający lub identyczny (z niezbędnymi zastrzeżeniami ze względu na specyfikę gatunkową „pacjenta”) z drzeniami typu parkinsonoidalnego. Również wyniki przeprowadzonych badań wykazują wyraźną zgodność „negatywną” z kliniką: przed wystąpieniem drzeń nie stwierdza się uszkodzeń w układzie nigro-strio-pallidalnym, tak wyraźnie zajęтым u królików w okresie

nasilonych objawów choroby. Pierwsze drżenia obserwujemy u naszych królików pomiędzy 10-tym a 19-tym dniem życia. W badanym materiale króliki 10-ciodniowe były jeszcze bezobjawowe. Natomiast jeden z królików 9-cio dniowych (Z-56/72) zaczął wykazywać pierwsze drżenia i u niego właśnie spostrzegano wyraźnie bardziej zaawansowaną tigrolizę i pseudo-wakuolizację w *striatum* i we wzgórzu.

Brak zmian w okresie przedobjawowym w układzie nigro-striatalnym u królika „pt” nie byłby tak interesujący, gdyby nie spostrzeżenia poczynione w latach ostatnich nad dojrzewaniem endogennego metabolizmu dopaminy u królika. Według badań Tennyson i wsp. (1972) najwyższe poziomy endogennej dopaminy stwierdza się u królika w jądrze ogoniastym pomiędzy 10 a 30 dniem życia pozapłodowego. Czas ten odpowiada dość dokładnie pojawieniu się i narastaniu drżeń parkinsonoidalnych u królika „pt” nieco później stwierdza się występowanie i ewentualne utrwalanie niedowładów spastycznych. Uszkodzenia komórkowe obserwowane w jądrach nerwów czaszkowych i istocie siateczkowatej zarówno u noworodków jak i królików objawowych, aczkolwiek tak ewidentne, a często utrwalane w późniejszych okresach choroby w postaci zwąpień neuronalnych, nigdy nie doprowadzają do zniszczenia całej struktury jądrowej i prawdopodobnie wyrównywane są czynnościowo przez nieuszkodzone neurony. Podobne zjawisko obserwuje się stosunkowo często w patologii mózgowej człowieka (Osetowska, Kraśnicka 1959).

Nasuwa się wreszcie pytanie związane ze stosunkami liczbowymi noworodków ze zmianami w mózgu i z brakiem zmian, mimo że wszystkie króliki grupy I pochodziły od rodziców podwójnie obciążonych genetycznie. Jest to zjawisko, z którym spotykamy się w całej populacji królika „pt” na przestrzeni pokoleń, a którego dotychczas nie możemy jednoznacznie wyjaśnić. Jest jednak faktem stwierdzonym przez nas na licznych pokoleniach, że króliki pochodzące z miotów genetycznie w 100% chorych przedstawiają na ogół lżejszy przebieg kliniczny, a przypadki z pełnym obrazem chorobowym trafiają się w takich miotach prawie sporadycznie w porównaniu z pierwszymi krzyżówkami nosicielkami ze zdrowymi samcami, z których połowa chorych samców wyjątkowo dożywała do wieku reprodukcji i poprawiała się do stanu możliwości reprodukcyjnej. Zjawiskiem tym zajmiemy się szczegółowo w następnym doniesieniu, w tym miejscu stwierdzając tylko, że stosunki liczbowe (wśród 38 chorych noworodków przebadanych 19 zwierząt z wyraźnymi zmianami neuronalnymi, w tym 3 ze zmianami zaawansowanymi i 4 z ciężkimi), odpowiadają w przybliżeniu obserwacjom nad stosunkiem liczbowym przypadków z ciężkim przebiegiem w miotach mieszanych i w miotach obciążonych podwójnie.

Być może nie bez znaczenia jest także fakt wyraźnej przewagi uszkodzeń cięższych u samców niż u samic. Wobec stosunkowo małej liczby

przypadków w grupach z niewątpliwymi objawami trudno byłoby wykazać znamienność statystyczną tego zjawiska. Powrócimy do tego zagadnienia również na materiale obszerniejszym.

Reasumując w punktach powyższe spostrzeżenia można stwierdzić:

1. U 50% przebadanych noworodków (u 19 na 38) chorych genetycznie zmiany w mózgu wyprzedzają wystąpienie objawów klinicznych i pozwalają na różnicowanie morfologiczne królika „pt” od królika zdrowego.

2. W pojedynczych przypadkach obserwuje się zmiany neuronalne o znacznym nasileniu już w drugim i trzecim dniu życia pozapłodowego.

3. Zmiany zlokalizowane są głównie w pniu mózgu i dotyczą jąder nerwów czaszkowych i istoty siateczkowatej. Ta lokalizacja występuje również wyraźnie u królików objawowych i z przebiegiem ciężkim, nie daje natomiast odpowiedników klinicznych.

4. Objawy kliniczne, z których najbardziej charakterystyczne jest drżenie, pojawiają się wraz ze zniszczeniem struktur układu nigro-striatalnego, związanego z metabolizmem endogennym dopaminy i osiągają największe nasilenie pomiędzy 10—30 dniem życia pozapłodowego, równocześnie z najwyższymi wartościami dopaminy w jądrze ogoniastym.

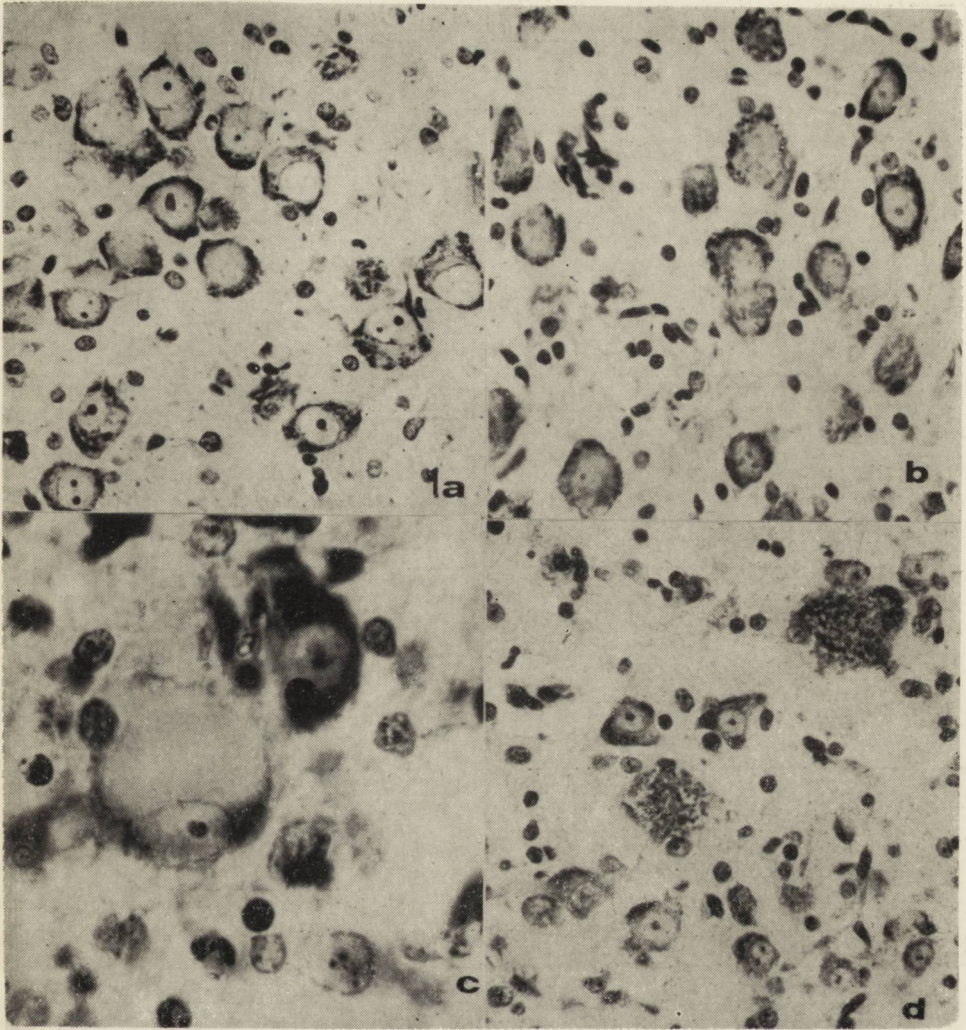
5. W okresie przedobjawowym nie stwierdzono w żadnym przypadku wyraźnie nasilonych uszkodzeń *neostriatum*, istoty czarnej i wzgórza.

A. Тарашевска и Е. Осетовска

IV. ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ КРОЛИКА „пт” В ПРЕДКЛИНИЧЕСКИЙ ПЕРИОД

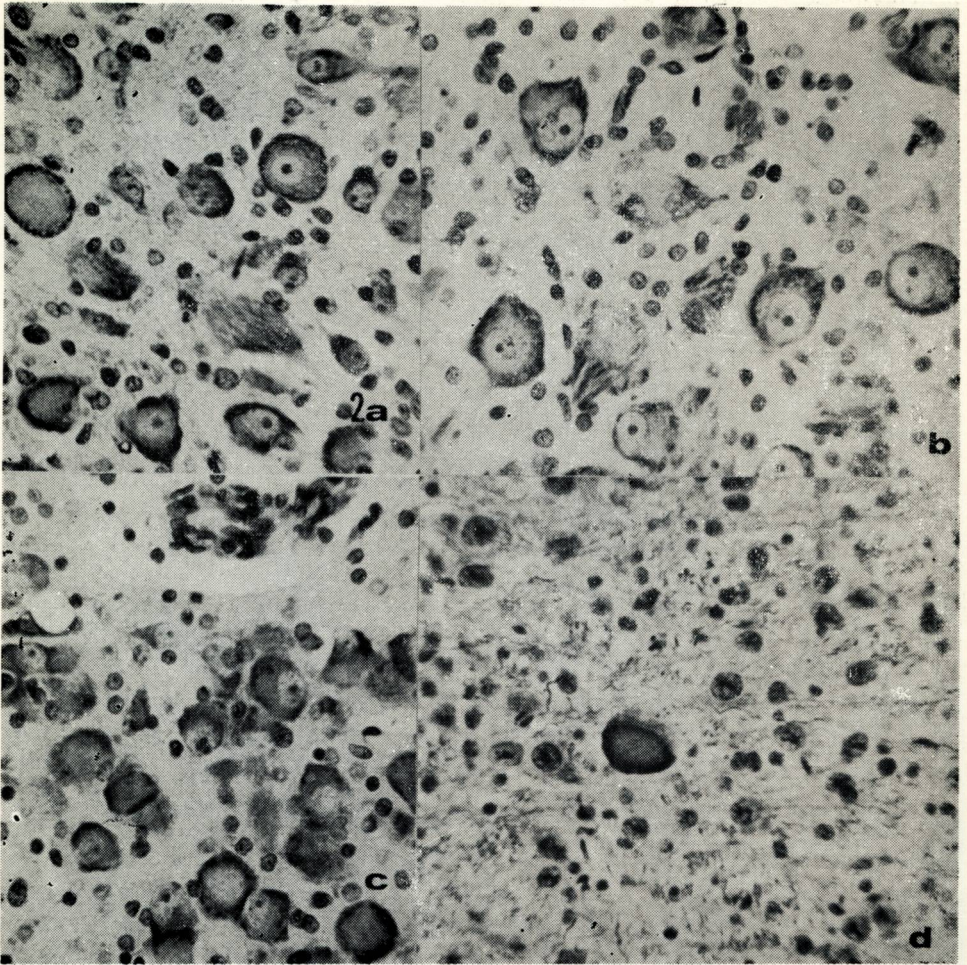
Резюме

Было исследовано нейропатологическими методами (оптический микроскоп, парафиновая техника) 50 новорожденных „пт”: в группе I — 38 кроликов от родителей вдвойне отягощенных, то-есть новорожденных, заведомо больных генетически. В группе II, контрольной, исследовалось 12 новорожденных, здоровых самцов или носительниц, из соответственно подобранных сочетаний. Кроликов усыпляли „Эунарконом”, который вводился в сердце или в плевру в период с 1-го по 10 день жизни. В 19 случаях (50%) группы I были найдены нейронные повреждения в виде отека, тигролиза, приводящего к гомогенизации, хроматолиза и клеточного распада главным образом в ядрах черепно-мозговых нервов и в ретикулярной формации среднего и продолговатого мозга. В отдельных случаях заметные клеточные изменения были обнаружены уже со II-го дня жизни. Ни в одном из случаев этой группы не было обнаружено тяжелых повреждений в нигрострио-паллидальной системе и в таламусе, типичных для кроликов „пт” в симптоматический период. В остальных случаях группы I, а также в контрольной группе не было обнаружено характерных изменений. Количество кроликов с четко обнаруженными клеточными изменениями вообще, а также кроликов с многочисленными и тяжелыми клеточными изменениями соответствуют приблизительно количеству случаев с тяжелым клиническим течением, выступающим в пометах вдвойне отягощенных (в пометах



Ryc. 1: a). Królik z przeżyciem dwudniowym (Z-195/72). *Nucleus ambiguus*. Tigroliza w protoplazmie neuronów i chromatoliza w jądrach. W podłożu rozplywające się, wolno leżące bryłki trigroidu. Fiolet krezylu. Pow. 400 \times . b) Przeżycie 2 dni (Z-192/72). *Nucleus n. VII*. Tigroliza i chromatoliza, w części środkowej widoczne cienie dwóch rozpadłych neuronów. Fiolet krezylu. Pow. 400 \times . c) Przeżycie 5 dni (Z-41/73). Obrzękły neuron z typową tigrolizą w jądrze n. IV. Fiolet krezylu. Pow. 1000 \times . d) Przeżycie 10 dni (Z-42/72). Istota siateczkowata opuszki. Rozplywanie się w podłożu dużych neuronów ruchowych, w małych komórkach chromatoliza i zbijanie się tigroidu w nierównomierne skupiska. Fiolet krezylu. Pow. 400 \times .

Fig. 1: a). Two days old rabbit (Z-195/72). *Nucleus ambiguus*. Tigrolysis and chromatolysis in the neurons. In the middle tigroid lumps undergoing complete liquefaction. Cresyl — violet. \times 400. b). Two days old rabbit (Z-192/72). *Nucleus facialis*. Tigro- and chromatolysis, „ghost” neurons. Cresyl violet \times 400. c). Five days old rabbit (Z-41/73). Edematous nerve cell with typical tigrolysis in *nucleus trochlearis*. Cresyl violet. \times 1000. d). Ten days old rabbit (Z-42/72). *Substantia reticularis medullae*. Tigrolysis proceeding to complete lysis of the large motorneurons. Cresyl violet. \times 400.



Ryc. 2: a, b, c. Króliki z przeżyciem 10 dniowym (Z-42/72 i Z-34/73). *Nucleus mesencephalicus et motorius n. V.* a). Centralna tigroliza neuronów. b). Chromatoliza i tigroliza, prowadząca do rozplywania się komórek. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times . c). Kompleks jądrowy n. III. Poza obrzękiem i centralną tigrolizą widoczny w lewej górnej części ryciny neuron zniszczony przez wakuole, której kontury dają się różnicować z małym „halo” obrzękowym sąsiedniego oligodendrocytu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times . d). Przeżycie 9 dni (Z-20/73). Obok znajdującego się w środku ryciny neuronu z centralną tigrolizą widoczne liczne fragmenty włókien nerwowych, korkociągawato poskręcanych i nierównej grubości. „Met. Holmesa”. Pow. 400 \times .

Fig. 2: a, b and c. Ten days old rabbits (Z-42/72 and Z-34/73). a). Central tigrolysis and b). Chromatolysis leading to liquefaction of the nerve cell in *nucl. mesencephalicus et motorius n. V.* Cresyl violet. $\times 400$. c). *Nucleus n. III.* Beside the neurons with central tigrolysis (left upside) a vacuole with distinct borderline which could be differentiated from edematous „halo” of the oligodendroglia. Cresyl violet. $\times 400$. d). Nine days old rabbit (Z-20/73). *S. reticularis medullae.* Beside the neuron with central tigrolysis, contorted and uneven fragments of axonal fibers. Holmes meth. $\times 400$.

от родителей с различным генетическим отягощением тяжелой клинической картина выступает чаще). Основываясь на анализе материала, исследованного в данной работе, на исследованиях, опубликованных ранее, а также на литературных данных (Теннисон и др. 1972), авторы выдвигают рабочую гипотезу, что основной клинический симптом — паркинсоноидальное дрожание появляется у кролика „пт” только вследствие повреждения структур, связанных с эндогенным обменом допамина, совпадает во времени с самым высоким уровнем допамина в хвостатом ядре (10—30 день жизни).

A. Taraszewska, E. Osetowska

IV. CHANGES IN BRAIN OF „PT” RABBITS IN THE PRECLINICAL COURSE

Summary

Fifty newborn „pt” rabbits were examined neuropathologically (light microscope) in two following groups: group I — 38 rabbits genetically ill and group II — 12 newborn healthy rabbits. The rabbits were anesthetized by intarcadiac or intrapleural administration of Eunarcon in the period from 1st — 10th day of life. In 19 cases of group I (50%) neuronal impairment in the form of edema, tigrolysis leading to homogenization, chromatolysis and cell desintegration were observed mainly in the cranial nerves nuclei (Figs. 1a, b, c) and in the reticular formation of mesencephalon and medulla (Figs. 1d and 2d). In the particular cases intensive cellular changes could be observed already in the 2nd day of life. In none of the cases of this group could be observed severe changes in the nigro-striato-pallidal system and thalamus, which were characteristic of the symptomatic period of „pt”. In the remaining cases of group I and in the control group no typical changes were noticed. The number of rabbits with distinct cellular changes in general and with numerous and severe changes in particular, approximately correspond to the number of cases with severe clinical course appearing in the genetically ill rabbits (dramatic clinical courses are known to be more frequent in offsprings from mixed litters). Basing on this and previous works as well as on literature data (Tennyson et al., 1972) the authors put forward a working hypothesis that fundamental clinical symptom, parkinsonoidal tremor, appears in „pt” rabbits together with the impairment of structures related to endogenous metabolism of dopamine, coinciding in time with the highest dopamine level in nucleus caudatus (10th — 30th day of life).

PIŚMIENICTWO

1. Bodian D.: Histopathologic Basis of Clinical Findings in Poliomyelitis. Amer. J. M. 1949, 6, 563—578.
2. O’Leary J. L., Fox R. R., Smith J. M., Inukai J.: Ultrastructural Alterations in Vestibular and Cerebellar Nuclei of the Ataxic Rabbit. J. Comp. Neur. 1972, 145, 307—352.
3. Osetowska E., Kraśnicka Z.: Sur le syndrome sous-bulbaire d’Opalski avec une étude anatomique. Rev. Neurol. 1961, 104, 314—320.

4. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: II. Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 71—85.
5. Tennyson V. M., Barret R. E., Cohen G., Gôté L., Heikkila R., Mytilineou C.: The developing neostriatum of the rabbit: corelation of fluorescence histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels, and (3H) Dopamine uptake. *Brain Res.* 1972, 46, 251—285.

Adres autorek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej PAN, ul. Warszawska 126, 05-300 Mińsk Mazowiecki.

Lucien S. Rubinstein M.D. Tumours of the Cerebral Nervous System Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C. 20—305, 1972, str. 400.

Jest to atlas nowotworów ośrodkowego układu nerwowego zawierający ponad 400 znakomych ilustracji oraz 15 tablic barwnych. Dążeniem autora było zawarcie w liczącej 400 stronic monografii nie tylko opisów i obrazów nowotworów, lecz również zwięzłe przedstawienie całokształtu zagadnień onkologicznych interesujących klinicystę oraz patologa. Zgodnie z tym na początku znajdziemy dane statystyczne, rozważania na temat patogenezy nowotworów oraz zasad klasyfikacji. Ze zrozumiałych względów najwięcej miejsca poświęcono nowotworom pochodzenia glejowego. Mimo różnych zastrzeżeń porusza się autor w ramach klasyfikacji Bailey'a i Cushinga. System stopniowania, wprowadzony przez Kernohana uważa za bardziej zawodny jako podstawa do przewidywania losu chorego.

Większość przedstawionych w atlasie glejaków jest na pewno bezdyskusyjna i na podstawie kryteriów morfologicznych mieści się w ramach przyjętej klasyfikacji. Dyskusyjna jest przynależność olbrzymiokomórkowego gąbczaka wielopostaciowego, który przez niektórych autorów traktowany jest jako mięsak. Dyskusyjny jest również guz opisany jako podwyściółkowy gwiazdziak olbrzymiokomórkowy, którego komórki posiadają duże jądra z jąderkami, nasuwając skojarzenie z guzami dysembriogenetycznymi.

Okłonaczyniowe promieniste skupienia „gemistocytów” spotyka się w innych atlasach jako typowy obraz guza zwanego *astroblastoma*.

Przytoczyłem tych kilka przykładów żeby uwypuklić trudności klasyfikacyjne niektórych guzów, a co za tym idzie niemożność stworzenia atlasu, który pogodziłby wszystkich we wszystkim. Każdy atlas, prócz tak zwanych form typowych, czyli statystycznie najczęstszych i bezdyskusyjnych zawiera opis i obrazy rzadkich postaci, które z tej racji skupiły zainteresowanie autora i dzięki temu znalazły w jego atlasie poczesne miejsce, na które jako rarytasy napewno nie zasługują. Każda klasyfikacja guzów ośrodkowego układu nerwowego usiłuje uwzględnić rodowód embriogenetyczny, który jest odniesieniem do listka zarodkowego oraz stopień zróżnicowania komórek guza. O wątpliwościach w tej dziedzinie rozstrzygają wielokrotnie sposoby impregnacyjne, które niestety w atlasie nie zostały w pełni wykorzystane. Brak również, podobnie jak w innych atlasach, morfologii pogranicza nowotworu, a opis sposobu szerzenia się jest bardzo niewyczerpujący. Wspominam o tym, gdyż ma to szczególne znaczenie dla neurochirurga. Dużo miejsca poświęcono nowotworowi, który pod nazwą *medulloblastoma desmoplasticum* niedawno wzbogacił poczet anaplastycznych guzów mózdzku lecz przynależność jego do neuroektodermalnych guzów jest dyskusyjna.

Omówienie guzów mezodermalnych obejmuje oponiaki i mięsaki, wśród których szczegółowo omówiono tak zwany *mikroglioma* lub *reticulum cell sarcoma*, nowotwór o niezupełnie wyjaśnionym pochodzeniu.

Nowotwory i wady rozwojowe układu naczyniowego, splotów naczyniastych oraz inne rzadkie nowotwory znalazły wyczerpujące uwzględnienie i stanowią cenną inwentaryzację guzów nieczęsto spotykanych w codziennej praktyce.

Bardzo wartościowym dodatkiem do patologii tkanki nowotworowej jest opis zmian zachodzących w mózgu i rdzeniu kręgowym pod wpływem nowotworu. Znajdziemy tu omówienie patogenezy i mechanizmu obrzęku mózgu, przemieszczeń wewnątrzczaszkowych, zmian widzianych w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

W ostatnim rozdziale przedstawiono zmiany popromienne w nowotworach i w mózgu oraz najmłodszy dział rozpoznawczy jakim jest cytodiagnostyka płynu mózgowo-rdzeniowego.

Wielką zaletą omówionej monografii jest zwięzłość i jasność wykładu, doskonałe ilustracje oraz uwzględnienie również rzadkich form guzów. Monografia ta stanowi pozycję o dużej wartości dla wszystkich, którzy w swej działalności lekarskiej lub naukowej stykają się z neuroonkologią.

prof. dr Adam Kunicki

V. Dubowitz, M. H. Brooke. Muscle Biopsy. A Modern Approach. W. B. Saunders Company Ltd, London 1973, str. 475.

Książka omawia choroby układu nerwowo-mięśniowego w aspekcie badań morfologicznych wycinków mięśniowych i stanowi drugi tom z serii „Major Problems in Neurology”. Autorami jej są wybitni specjaliści z zakresu histochemii mięśni — twórcy wielu poglądów w tej dziedzinie wiedzy.

Dzieło charakteryzuje się bardzo bogatym materiałem ilustracyjnym (679 rycin) oraz zwięzłe przedstawioną częścią opisową, zawierającą zarówno podstawowe jak i najbardziej nowoczesne poglądy na temat chorób mięśni.

Książka składa się z 3-ch części. W pierwszej autorzy omawiają technikę pobierania biopsji mięśniowych, histologiczne i histochemiczne metody badań wycinków mięśniowych, przedstawiają dane dotyczące prawidłowego mięśnia oraz rodzaje zmian chorobowych spotykanych w biopsjach mięśniowych. Zagadnienia metodyczne omówione są szczegółowo; na uwagę zasługują stosowane przez autorów metody badań morfometrycznych, nieczęsto dotąd używane w badaniach histologicznych mięśni. W rozdziale tym znajdujemy ponadto podstawy histopatologii i histochemii mięśni i ocenę zakresu ich przydatności w różnicowaniu chorób nerwowo-mięśniowych oraz w głębszym poznaniu procesów chorobowych toczących się w mięśniu. Obserwacje przedstawione przez autorów przekonują nas, że znaczenie badań histologicznych ogranicza się do różnicowania uszkodzeń pierwotnie mięśniowych i neurogennych oraz identyfikacji pewnych zmian miopatycznych, natomiast badania histochemiczne posiadają znacznie większą wartość. Podstawę dla oceny zjawisk patofizjologicznych zachodzących w mięśniu stanowią dwie obserwacje histochemiczne, a mianowicie różnorodność metaboliczna włókien mięśniowych oraz histochemiczna jednolitość jednostek ruchowych. Autorzy uważają, że wyodrębnienie 2 metabolicznych typów włókien mięśniowych tj. pierwszego i drugiego, z rozbięciem tego ostatniego na dwie podgrupy A i B jest wystarczające dla oceny najistotniejszych zjawisk patofizjologicznych. W oparciu o badania własne Dubowitz i Brooke definiują histochemiczne kryterium reinerwacji, którym jest grupowanie się włókien jednego typu histochemicznego, zwracają uwagę na pozor-

nie neurogenne obrazy histologiczne (grupy zanikłych włókien) gdy w istocie chodzi o zanik pierwotnie mięśniowy jednego typu włókien (uważają oni, że nie istnieje wybiórcze uszkodzenie motoneuronów jednego typu), prezentują wreszcie szereg jednostek chorobowych należących do grupy miopatii, których wyodrębnienie stało się możliwe dzięki zastosowaniu badań histochemicznych. Klasyfikacja histochemiczna włókien mięśniowych wprowadzona przez Dubowitza i Brooke'a jest prosta, a zarazem dostarczająca tak wiele nowych informacji, że wydaje się słusznym szerokie jej rozpowszechnienie.

W drugiej części książki przedstawione są poszczególne zespoły chorobowe. Spół sposób prezentacji jest jednolity: po krótkiej charakterystyce choroby zilustrowanej historią choroby następuje dokładny opis zmian histologicznych i histochemicznych dopełniony szeregiem rycin oraz wynikami badań histometrycznych.

W części tej omówione są:

1. Choroby obwodowego neuronu ruchowego
2. Postępujące dystrofie mięśniowe
3. Miopatie wrodzone
4. Miopatie metaboliczne i hormonalne
5. Miopatie zapalne
6. Miastenia
7. Inne, rzadkie zespoły zaburzeń mięśniowych.

Trzecia część książki poświęcona jest obserwacjom mikroskopowo-elektronowym i opracowana została przez Neville'a, bliskiego współpracownika Brooke'a.

W rozdziale tym autor omawia zmiany występujące w przebiegu chorób nerwowo-mięśniowych w poszczególnych organellach komórki mięśniowej i na zakończenie stwierdza, że wszystkie te zmiany mają charakter nieswoisty.

W sumie książka wydaje mi się niezwykle cenna i pożyteczna dla lekarzy zainteresowanych chorobami nerwowo-mięśniowymi, a w szczególności dla osób zajmujących się histopatologią i histochemią mięśni.

doc. dr *Hanna Jędrzejowska*

TREŚĆ

E. Osetowska: Choroba Rosenthala czy glej Rosenthala?	153
M. B. Kozik: Zmiany histoenzymatyczne w mózgu w przypadku cardiac arrest	163
S. Kasperek, C. Ważna-Boguńska, Z. Gralewski: Skórzak śródczaszkowy i podwojenie rdzenia kręgowego w przypadku z wieloletnimi objawami psychotycznymi	175
I. Rybarska: Immunogenne właściwości antygenów glejakowych mózgu ludzkiego na podstawie oceny surowic królików w odczynie wiązania dopełniacza	183
L. Giernat: Wpływ aktynomycyny D na glejaki hodowane in vitro	195
M. Wender, Z. Adamczewska, J. Pankrac, A. Goncerzewicz: Lipidy mieliny w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia	209
M. Sopek, J. Tarmas, W. Jakubicz: Badania doświadczalne nad neurotropowym wpływem <i>Cryptococcus Neoformans</i>	219
U. Rafałowska, A. Gromek: Wpływ niedostatku tlenowego i narkozy nembutalowej na utlenianie cytrynianów w cytozolu mózgu szczura	229
M. J. Mossakowski: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla	241
J. Albrecht: Niektóre etapy biosyntezy białka i RNA w mózgu szczura po wielokrotnym zatruciu tlenkiem węgla	251
B. Biczowa, M. Sikorska, W. Bicz, J. Pachecka, A. Suliński: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenia ATP, ADP, AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem, dichlorfosem (DDVP)	259
D. Sitkiewicz, Z. Zalewska: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mózgu szczura po zatruciu fosforoorganicznymi insektycydami dichlorfosem i trichlorfonem	273
A. Taraszevska, E. Osetowska: IV. Zmiany w mózgu królika „pt” w okresie przedobjawowym	283

СОДЕРЖАНИЕ

Э. Осетовска: „Болезнь Розенталя” или „Глия Розенталя”?	153
М. Б. Козик: Гистоэнзиматические изменения в мозге при остановке деятельности сердца	165
С. Касперек, Ч. Важна-Богуньска, З. Гралевски: Внутрочерепной дермоид и раздвоение спинного мозга с многолетними психотическими явлениями	175
И. Рыбарска: Иммуногенные свойства глиоматозных антигенов лечебного мозга на основании оценки сывороток кроликов в реакции связывания комплемента	183
Л. Гернат: Влияние актиномицина Д на глиомы культивируемые <i>in vitro</i>	195
М. Вендер, З. Адамчевска, И. Панкрац, А. Гонджевич: Липиды миеллина при экспериментальном аллергическом воспалении головного и спинного мозга	209
М. Сопек, Ю. Тармас, В. Якубич: Экспериментальные исследования нейротропного влияния <i>scurltosoccus neofomans</i>	219
У. Рафаловска, А. Громек: Влияние гипоксии и нембуталовой анестезии на активность цитоплазматической системы окисления ситрата в мозгу крыс	229
М. Я. Моссаковский: Нарушения мозговой микроциркуляции при остром отравлении окисью углерода	241
Я. Альбрехт: Некоторые параметры синтеза белка и РНК в мозге крысы после многократного отравления окисью углерода	251
Б. Бичова, М. Сикорска, В. Бич, И. Пахецка, А. Сулиньски: Уровень гликогена, гликолиз, дыхание а также концентрация АТФ, АДФ, АМФ в мозге крысы вследствие отравления фосфоорганическим инсектицидом дихлорфосом	259
Д. Ситкевич, З. Залевска: Активность цитохромоксидазы и дегидрогеназы янтарной кислоты мозга крысы после отравления фосфоорганическими инсектицидами дихлорфосом и трихлорфоном	273
А. Тарашевска, Е. Осетовска: IV. Изменения в мозге кролика „пт” в предклинический период	283

CONTENTS

- E. Osetowska: „Rosenthal disease” or „Rosenthal glia”?
- M. B. Kozik: Histoenzymic changes in the brain in a case of cardiac arrest
- S. Kasperek, C. Ważna-Boguńska, Z. Gralewski: Intracranial dermoid and duplication of spinal cord in a case with many-years psychotic symptoms
- I. Rybarska: Immunogenic properties of human brain gliomas antigens evaluated with rabbit sera in the complement-fixation test
- L. Giernat: Effect of actinomycin D on gliomas cultured in vitro
- M. Wender, Z. Adamczewska, J. Pankrac, A. Goncerzewicz: Myelin lipids in experimental allergic encephalomyelitis
- M. Scepik, J. Tarmas, W. Jakubicz: Experimental investigations on the neurotropic effect of *Cryptococcus neoformans*
- U. Rafałowska, A. Gromek: Effect of oxygen deficiency and barbiturate anesthesia on citrate oxidation in brain cytoplasm
- M. J. Mossakowski: Cerebral microcirculation abnormalities in acute carbon monoxide intoxication
- J. Albrecht: Some steps of RNA and protein biosynthesis in adult rat brain after repeated carbon monoxide intoxication
- B. Biczowa, M. Sikorska, W. Bicz, J. Pachecka, A. Suliński: The glycogen level, glycolysis, respiration and ATP, ADP, AMP content in rat brain following organophosphate insecticide dichlorvos intoxication
- D. Sitkiewicz, Z. Zalewska: The activity of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase in rat brain mitochondria following trichlorphon and dichlorvos intoxication
- A. Taraszewska, E. Osetowska: IV. Changes in brain of „pt” rabbits in the preclinical course

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie — zł 100.—

półrocznie — zł 50.—

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

Prenumeratory indywidualni w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty mogą opłacać prenumeratę w urzędach pocztowych i u listonoszy. lub dokonywać wpłat na konto PKO Nr 1-6-100020 — 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 Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

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

*

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 36910/36668

Zak. Graf. „Tamka”. Z. 2. Zam. 7. Pap. powlekany kl. V. 70 g. B1
Nakład 507 + 23 egz. Ark. druk. 9,0 + 1,375. B-34.