

Handwritten signature *epz 2*

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH



NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM XIV

1976

ZESZ. 3

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XIV

Lipiec—Wrzesień

Nr 3

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Mirosław Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Smiatek* (Warszawa), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmina Zelman* (Warszawa)

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), *Werner Jänisch* (Halle), *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*, *Mirosław Mossakowski*, *Ewa Osetowska*,
Mieczysław Wender

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmina Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Halina Kroh*

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

MIECZYŚLAW SMIAŁEK

AKTYWNOŚĆ GLIKOLITYCZNA IZOLOWANYCH NEURONÓW
ÓŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO SZCZURA
PO ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA
(METODA MIKRONURKA KARTEZJUSZA)

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

Różnice ilościowe w oddychaniu komórek izolowanych z OUN w normie oraz w różnych typach niedotlenienia są zjawiskiem znanym (Hydén, Pigoń 1960; Hamberger 1963; Hamberger, Hydén 1963).

Zmiany w aktywności oddechowej izolowanych neuronów OUN stwierdzono również po zatruciu tlenkiem węgla (Śmiałek 1974, 1975). Występujące różnice w zużyciu tlenu przez poszczególne neurony odnoszono do różnego stopnia wrażliwości na działanie CO oraz do różnic w zdolności przejściowego gromadzenia glikogenu.

Celem pracy było określenie aktywności glikolitycznej izolowanych neuronów OUN szczura z uwzględnieniem ich wrażliwości na ostre zatrucie CO i zdolności przejściowego gromadzenia glikogenu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 107 szczurów rasy Wistar, samców, w wieku 6 tygodni, o ciężarze ciała 150—180 g.

Zwierzęta umieszczano w komorze o pojemności 60 l z ciągłym przepływem powietrza 1 litr/min. z dodatkiem 1% tlenku węgla. W tych warunkach zwierzęta przebywały przez 60 min. Następnie wyłączano dopływ CO i przez dalsze 30 min. przetrzymywano szczury w komorze z podłączonym dopływem powietrza. Po 90 min. bezpośredniego działania CO w tzw. czasie „0” zwierzęta przenoszono do warunków, w których oddychały powietrzem atmosferycznym (Korthals i wsp. 1973).

Stopień zatrucia zwierząt kontrolowano przez pomiar stężenia HbCO we krwi przy użyciu metody Whitehead i Worthington (1961). Poziom

HbCO narastał liniźnie do 20 min. od rozpoczęcia przepuszczania CO i od tego czasu do 60 min. przebywania zwierząt w komorze utrzymywał się na poziomie $76,6 \pm 0,9\%$. W momencie wyjęcia zwierząt z komory stężenie HbCO we krwi wynosiło ok. 50%. Szczury dekapitowano w następujących grupach doświadczalnych: kontrola, w czasie „0”, po 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 120 i 240 godz. od wyjęcia zwierząt z komory.

Izolowanie neuronów — natychmiast po dekapitacji mózg oziębiano na lodzie, krajano na skrawki grubości ok. 2 mm i barwiono 2 mM roztworem błękitu metylenowego w 0,25 M roztworze sacharozy (Hydén, Pigoń 1960). Neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzą siatkowatego pnia mózgu, komórki Purkinjego, piramidowe komórki rogu Amona ze strefy Sommera H_4 oraz neurony ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego izolowano przy użyciu mikroskopu za pomocą włókna Kanthal (Szwecja) o grubości 18 μ .

Glikoliza beztlenowa — Aktywność glikolityczną neuronów mierzono metodą Zeuthena (1953) w aparacie ampułkowego mikronurka Kartezjusza w temp. $38^\circ\text{C} \pm 0,002^\circ\text{C}$ i wyrażano w $\mu\text{l CO}_2$ wydzielanego z węglanu medium inkubacyjnego /godz/ neuron. Medium inkubacyjne zawierało: sodowy bufor fosforanowy pH 7,6—0,0024 M, KHCO_3 — 0,025 M, amid kwasu nikotynowego — 0,04 M, K-ATP — 0,00033 M, K-NAD — 0,0002 M, fruktozo-1,6-dwufosforan sodu — 0,002 M, glukoza — 0,01 M, MgCl_2 — 0,0067 M, pirogronian sodu — 0,005 M, KF — 0,01 M, KCl — 0,0154 M, sacharoza — 0,1 M (Hamberger, Hydén 1963). Medium flotacyjne stanowiły zmieszane w równych częściach roztwory 0,025 M KHCO_3 i NaHCO_3 . Stężenie końcowe K^+ w medium inkubacyjnym wynosiło 0,053 M.

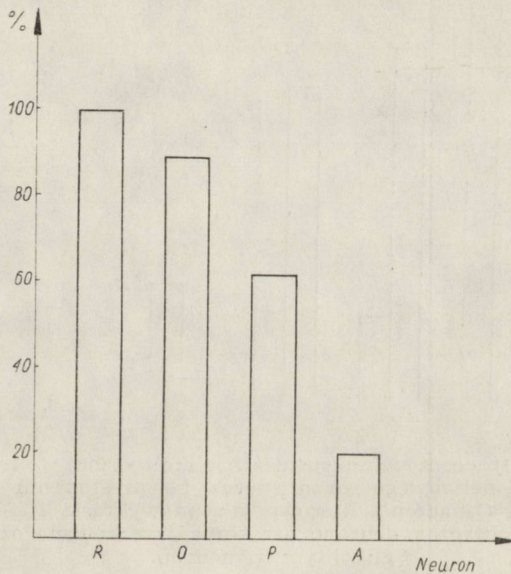
Przed rozpoczęciem pomiarów przepuszczano przez medium inkubacyjne przez okres 30 min. mieszaninę 5% CO_2 w N_2 . Azot oczyszczano przepuszczając go przez nasycony roztwór hydrochinonu. Cały układ manometryczny poddawano przez 20 min. przepływowi mieszaniny CO_2 i N_2 .

Oznaczanie czystości izolowanych neuronów oraz pomiar objętości cytoplazmy neuronów — wyizolowane neurony natychmiast utrwalano w 1,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylanowym o pH 7,4, następnie w 2% roztworze OsO_4 . Neurony zbierano na sączkach z włókna szklanego, przeprowadzano przez szereg alkoholi i acetonów, napyłano węglem i złotem i badano w elektronowym mikroskopie odbiciowym JEOL — Japan JSM-S 1. Zanieczyszczenia nie więcej niż jedną komórką, mogącą stanowić element glejowy obserwowano w mniej niż 5% wyizolowanych neuronów. Objętość komórki bez wypustek w zależności od kształtu oznaczano z wzorów na: elipsoidę obro-

ową $V = \frac{4}{3} ab^2$, odcinek paraboloidy obrotowej całkowity wg wzoru $V = \frac{1}{2} R^2 h$, odcinek paraboloidy prosto ścięty $V = \frac{1}{2} h(R^2 + r^2)$ oraz z wzoru beczki $V = \frac{1}{15} 1(2D^2 + Dd + \frac{3}{4} d^2)$ (Królikowski, Steckiewicz 1956). Obrazy izolowanych neuronów uzyskane w mikroskopie elektronowym odbiciowym przedstawiają ryc. 1, 2, 3, 4. Objętość jądra obliczono z pomiarów dokonanych w mikroskopie elektronowym transmisyjnym z dwóch największych wymiarów elipsy jądra. Różnica objętości całej komórki i jądra stanowiła objętość cytoplazmy neuronu, którą wyrażano w μ^3 .

WYNIKI

Stosunki procentowe objętości cytoplazmy poszczególnych neuronów przedstawia wykres 1.

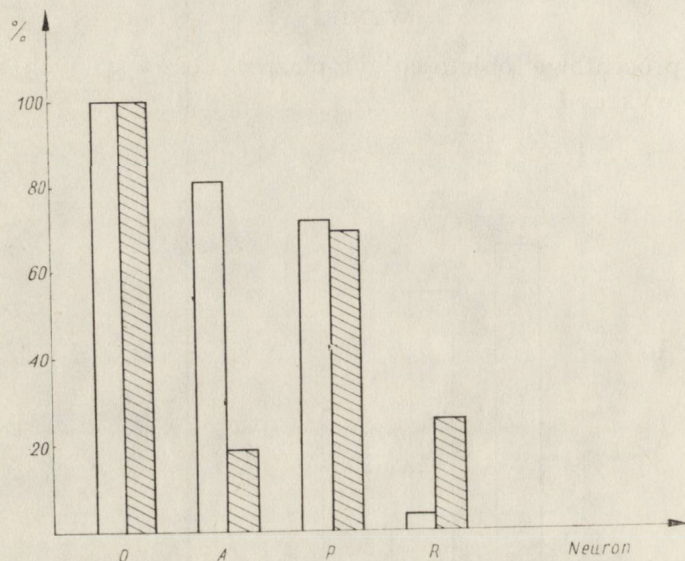


Wykres 1. Stosunki procentowe objętości cytoplazmy neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura. R — neuron ruchowy rogu przedniego rdzenia kręgowego, O — neuron z jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, P — komórka Purkinjego, A — komórka piramidowa rogu Amona.

Diagram 1. Per cent ratios of the cytoplasm volume of the neurons in the central nervous system of the rat. R — motor neuron from the anterior horn of the spinal cord, O — neuron from the gigantocellular nucleus of the brain stem reticular formation, P — Purkinje cell, A — pyramidal cell from the Ammon's horn.

Największą objętość cytoplazmy stwierdzono w neuronach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego. Objętość cytoplazmy tych neuronów wynosiła średnio $75\,200 \mu^3$. Wartość tę przyjęto za 100%. Cytopla-

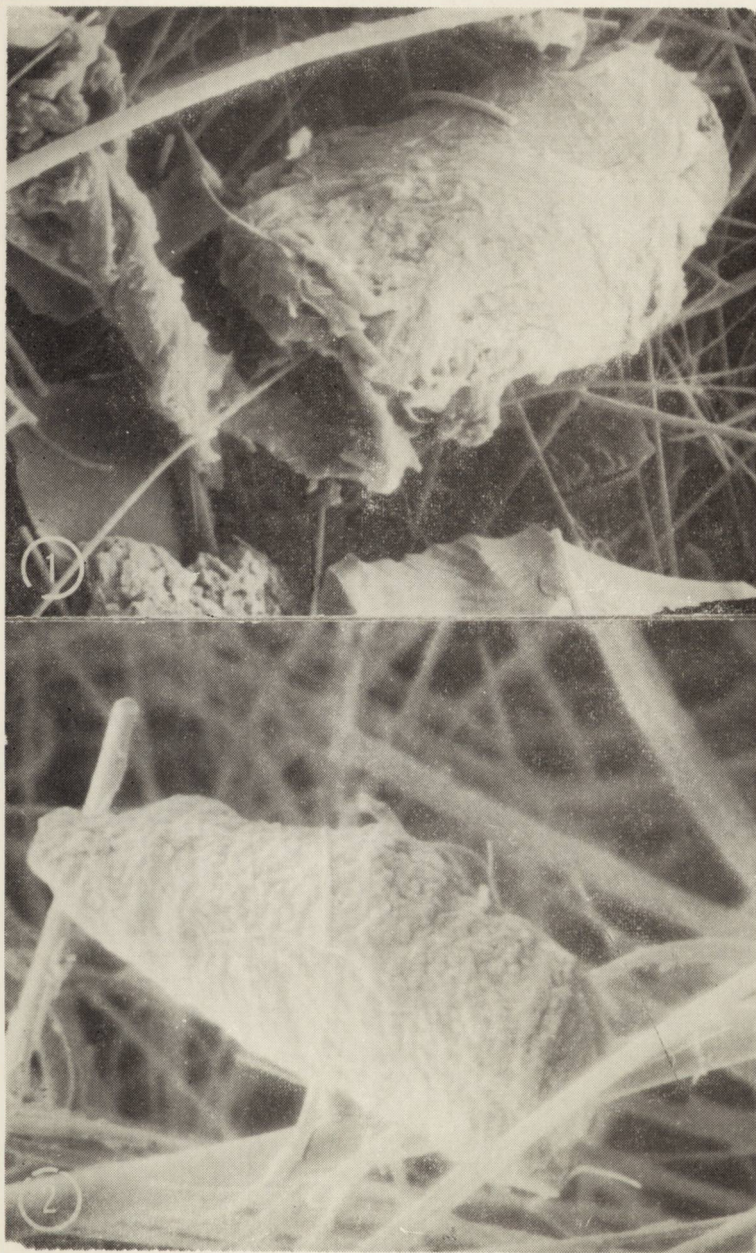
zma neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu miała objętość średnio $66\,800\ \mu^3$, co wynosiło ok. 89% w stosunku do objętości cytoplazmy neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego. W komórkach Purkiniego średnia objętość cytoplazmy wynosiła $47\,300\ \mu^3$, czyli 62% w porównaniu z komórką motoneuronu. Najmniejszą objętość cytoplazmy, ok. 20% w stosunku do komórek największych, posiadały komórki piramidowe rogu Amona — ok. $14\,800\ \mu^3$. Wykres 2 przedstawia procentowe stosunki aktywności glikolitycznej izolowanych neuronów w normie oraz po przeliczeniu uzyskanych wyników na μ^3 cytoplazmy.



Wykres 2. Stosunki procentowe aktywności glikolitycznej izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura oraz po przeliczeniu na objętość cytoplazmy komórki (μ^3). Oznaczenia literowe jak na wykresie 1. Słupki czyste oznaczają aktywność glikolityczną neuronu / μ^3 ; słupki kreskowane oznaczają aktywność glikolityczną/neuron.

Diagram 2. Per cent ratios of glycolytic activity in the isolated neurons from the central nervous system of the rat and in accordance to cytoplasm volume (μ^3). Letter indications like in Diagram 1. Bright columns indicate glycolytic activity of neuron / μ^3 ; columns with diagonal lines indicate glycolytic activity/neuron.

Najwyższą aktywność glikolityczną (wykres 2) $8,69 \pm 0,72 \times 10^{-3}$ $\mu\text{l CO}_2$ /godz./ neuron posiadały komórki jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Tę wartość przyjmowano w obliczeniach porównawczych za 100%. Na poziomie ok. 69% w porównaniu z komórkami tworzącego siatkowatego przebiegała glikoliza beztlenowa w komórkach Purkiniego, w neuronach rdzenia kręgowego — ok. 25%, a tyl-



Ryc. 1. Neuron ruchowy rogu przedniego rdzenia kręgowego szczura. Mikroskop odbiciowy. Pow. 1800 x.

Fig. 1. Motor neuron from the anterior horn of rat spinal cord. Scanning microscope. x 1800.

Ryc. 2. Neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu szczura. Mikroskop odbiciowy. Pow. 2000 x.

Fig. 2. Neuron from the gigantocellular nucleus from the reticular substance of rat brain stem. Scanning microscope. x 2000.



Ryc. 3. Komórka Purkinjego. Mikroskop odbiciowy. Pow. 3000 x.

Fig. 3. Purkinje cell. Scanning microscope. x 3000.

Ryc. 4. Komórka piramidowa rogu Amona. Mikroskop odbiciowy. Pow. 3000 x.

Fig. 4. Pyramidal cell from Ammon's horn. Scanning microscope. x 3000.

ko ok. 18% w komórkach piramidowych rogu Amona. Na podstawie przeliczenia wyników na μ^3 cytoplazmy największą aktywność glikolityczną wykazano w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu (100%), następnie w komórkach piramidowych rogu Amona (81%), a w komórkach Purkinjego wynosiła ok. 71%. W neuronach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego, które zawierały najwięcej cytoplazmy, po przeliczeniu wydzielonego CO_2 przez neuron, uzyskano aktywność glikolityczną na poziomie ok. 3% w stosunku do neuronów jądra olbrzymiokomórkowego.

Tabela 1 zawiera średnie aktywności glikolitycznej badanych neuronów z poszczególnych grup doświadczalnych. W czasie „O” (Tabela 1) tj. natychmiast po okresie działania CO stwierdzono w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego aktywność glikolityczną na poziomie ok. 88% niższym, a w komórkach Purkinjego ok. 61% niższym w stosunku do grupy kontrolnej. Różnice te w obu grupach doświadczalnych były istotne statystycznie. W neuronach rogów przednich rdzenia kręgowego spadek aktywności glikolitycznej, wynoszący ok. 28%, a w komórkach piramidowych kory amonalnej przyrost o ok. 12% nie stanowiły znamienych statystycznie różnic w stosunku do normy.

W następnych przedziałach czasu od godz. 2—72 od zatrucia czynność glikolityczna neuronów jądra olbrzymiokomórkowego utrzymywała się na nieco wyższym poziomie w stosunku do średniej czasu „O”, lecz najwyższa wartość aktywności była jednak obniżona w stosunku do kontroli. Największe zahamowanie (ok. 70%) stwierdzono w 48 godz. od zatrucia. Po 120 godz. aktywność glikolityczna neuronów jądra olbrzymiokomórkowego nie wykazywała statystycznie znamiennej różnicy w stosunku do kontroli.

W komórkach Purkinjego zahamowanie aktywności glikolitycznej w przedziałach czasu od 2—24 godz. od zatrucia było nieco niższe, niż bezpośrednio po wyjęciu zwierząt z komory, lecz największe obniżenie wartości wykazane po 4 i 24 godz. — ok. 47% było statystycznie znamienne. Od 48 godz. uzyskane średnie nie wykazywały istotnych różnic w stosunku do kontroli.

Neurony ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego po 72 godz. od zatrucia wykazywały nieznaczne obniżenie aktywności glikolitycznej (na poziomie zbliżonym do neuronów czasu „O”).

W komórkach piramidowych rogu Amona, które już w czasie „O” wykazywały zwiększenie aktywności glikolitycznej w dalszych przedziałach czasu stwierdzono stopniowy przyrost do ok. 17—129%, przy czym różnice nie były statystycznie istotne w porównaniu z normą. Po 240 godz. od zatrucia wynik $1,54 \pm 0,25 \cdot 10^{-3} \mu\text{l CO}_2 / \text{godz.} / \text{neuron}$ zbliżony był do średniej grupy kontrolnej.

Tabela 1. Aktywność glikolityczna izolowanych neuronów OUN szczura po zatruciu CO (μ^1 CO₂ · 10⁻³/godz/neuron)Table 1. Glycolytic activity in the isolated neurons from the rat CSN following CO intoxication (μ^1 CO₂ · 10⁻³/h/neuron)

Grupa dośw. Exp. group	Neuron j. olbrzymiokomórkowego tworzący siatkowatego		Komórka Purkinjego		Neuron ruchowy rdzenia		Komórka piramidowa rogu Amona		
	Neuron from gigantocellular n. of reticular formation		Purkinje cell		Spinal motor neuron		Pyramidal cell of Ammon's horn		
	$\bar{x} \pm$ S.E.M.	p	$\bar{x} \pm$ S.E.M.	p	$\bar{x} \pm$ S.E.M.	p	$\bar{x} \pm$ S.E.M.	p	
Kontr.	8,69 ± 0,72 (7) ⁿ		5,73 ± 0,89 (5)		2,36 ± 0,43 (6)		1,55 ± 0,28 (6)		
Czas po zatruciu (godz) Time after intoxication (h)	0	1,02 ± 0,26 (5)	≤ 0,001	2,25 ± 0,48 (7)	≤ 0,01	1,70 ± 0,24 (5)	≥ 0,05	1,74 ± 0,45 (5)	≥ 0,05
	1					1,52 ± 0,28 (6)	≥ 0,05		
	2	2,02 ± 0,38 (5)	≤ 0,001	2,55 ± 0,52 (7)	≤ 0,01	1,30 ± 0,31 (5)	≥ 0,05	1,82 ± 0,39 (6)	≥ 0,05
	3					1,49 ± 0,35 (5)	≥ 0,05		
	4	1,53 ± 0,38 (6)	≤ 0,001	3,07 ± 0,39 (5)	≤ 0,05	1,40 ± 0,26 (5)	≥ 0,05	2,59 ± 0,54 (5)	≥ 0,05
	24	2,27 ± 0,29 (5)	≤ 0,001	3,05 ± 0,54 (5)	≤ 0,05	1,44 ± 0,19 (5)	≥ 0,05	2,55 ± 0,60 (5)	≥ 0,05
	48	2,60 ± 0,36 (6)	≤ 0,001	3,30 ± 0,96 (6)	≥ 0,05	1,81 ± 0,28 (6)	≥ 0,05	2,56 ± 0,60 (5)	≥ 0,05
	72	2,57 ± 0,35 (5)	≤ 0,001	4,28 ± 0,39 (5)	≥ 0,05	2,19 ± 0,35 (5)	≥ 0,05	3,01 ± 0,67 (5)	≥ 0,05
120	5,67 ± 0,81 (5)	≥ 0,05	5,35 ± 0,81 (8)	≥ 0,05			3,55 ± 0,96 (7)	≥ 0,05	
240							1,54 ± 0,25 (5)	≥ 0,05	

$\bar{x} \pm$ S.E.M. — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej
arithmetic mean ± S.E.M.

n — liczba neuronów
number of neurons

p — prawdopodobieństwo wg testu t Studenta
probability calculated by the t Student's test

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że aktywność glikolityczna komórek olbrzymich tworzących siatkowatego pnia mózgu oraz komórek Purkiniego ulegała przejściowemu obniżeniu po zatruciu tlenkiem węgla. Szybszy powrót do normy, bo już po 48 godz. obserwowano w komórkach Purkiniego.

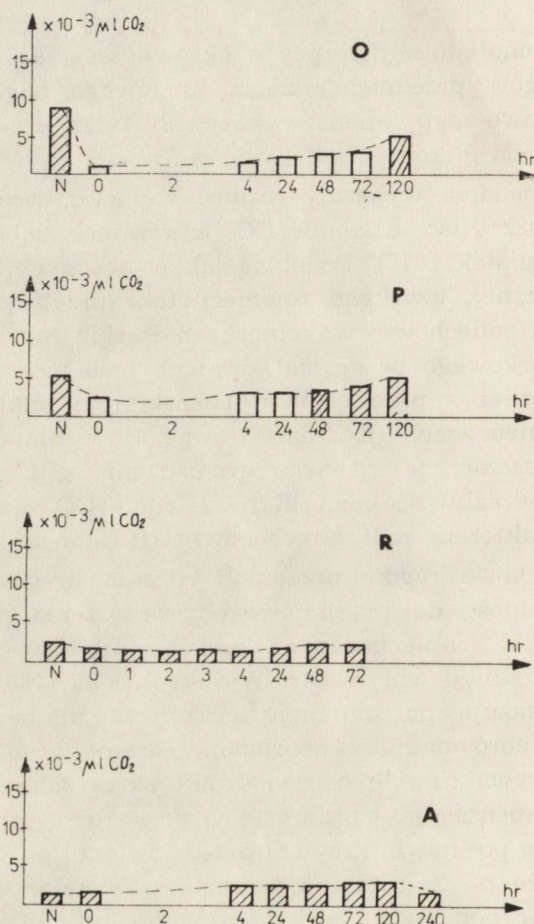
Nie stwierdzono istotnej różnicy w aktywności glikolitycznej neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego po zatruciu CO, komórki piramidowe rogu Amona wykazywały tylko przejściową tendencję wzrostu czynności glikolitycznej (wykres 3).

Poprzednie badania wykazały różnice we wrażliwości poszczególnych neuronów na szkodliwe działanie CO, wyrażające się upośledzeniem ich oddychania (Śmiałek 1975). Podobnie jak w obecnych badaniach aktywności glikolitycznej, uzyskano również efekt przejściowego zahamowania aktywności oddechowej w komórkach Purkiniego i neuronach jądra olbrzymiomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Zmiany te były zgodne również z przejściowym charakterem odkładania się glikogenu w tych neuronach (Korthals i wsp. 1973, Śmiałek i wsp. 1973). Można przypuszczać, że zjawisko gromadzenia glikogenu i równocześnie mniejsza wrażliwość komórki na zatrucie CO są związane z regulacyjnym charakterem puli glikogenowej (Harkonen i wsp. 1969).

Neurony ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego, które również mają zdolność do przejściowego gromadzenia glikogenu wydają się wykazywać w grupie badanych komórek nerwowych największą odporność na szkodliwy wpływ CO. Wyniki Jacoba (1963) w mikroskopie świetlnym wskazują na mniejszą wrażliwość motoneuronów na niedotlenienie w porównaniu z neuronami rdzenia o małych wymiarach. Być może odgrywa tu rolę bardzo krótki okres zahamowania, a następnie hyperkompensacyjny przyrost zużycia tlenu przez komórkę po zatruciu CO. Na podstawie krzywej przedstawionej na wykresie 4 można przypuszczać, że po 2 godz. od zatrucia występuje w neuronie efekt Pasteura. Biorąc pod uwagę niską aktywność glikolityczną tych neuronów w normie po przeliczeniu na objętość cytoplazmy oraz bardzo niski poziom ich przemiany tlenowej (Śmiałek 1975) można sądzić, że wśród neuronów mających zdolność do przejściowego gromadzenia glikogenu komórki nerwowe o najniższym metabolizmie oddechowym są najmniej wrażliwe na szkodliwe działanie CO.

Komórki piramidowe rogu Amona nie miały zdolności do gromadzenia glikogenu. Ta struktura wykazywała również w badaniach *in vivo* selektywną wrażliwość na działanie CO (Környey 1963, Korthals i wsp. 1973). Neurony tej okolicy miały również obniżoną aktywność oddechową.

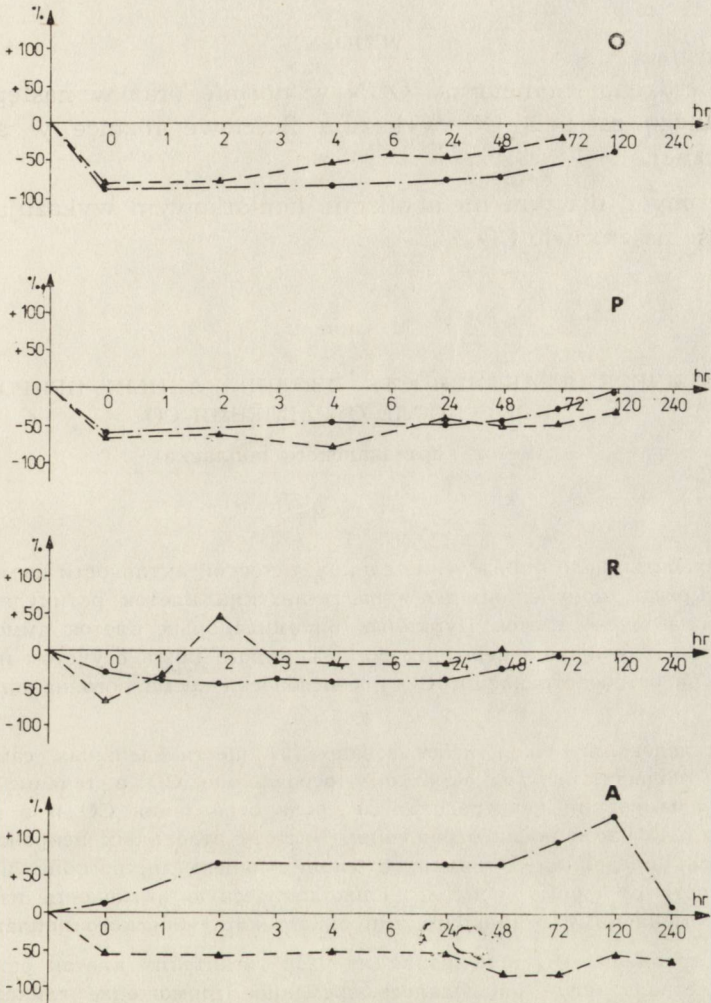
wą po zatruciu CO. Niestwierdzenie glikogenu w rogu Amona po zatruciu tlenkiem węgla może wiązać się z przejściową tendencją do przyrostu aktywności glikolitycznej badanych komórek piramidowych tej struktury.



Wykres 3. Aktywność glikolityczna izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura w normie i po zatruciu tlenkiem węgla. Słupki kreskowane oznaczają średnią arytmetyczną grupy kontrolnej oraz wyniki nieznamiennie statystycznie w stosunku do normy; słupki czyste oznaczają średnie arytmetyczne grup doświadczalnych znamienne statystycznie w stosunku do normy. Oznaczenia literowe jak na wykresie 1.

Diagram 3. Glycolytic activity of the isolated neurons from the rat central nervous system in normal conditions and following carbon monoxide intoxication. Diagonally lined columns indicate arithmetic mean of control group and the results statistically insignificant towards the norm; bright columns indicate arithmetic mean of experimental groups statistically significant towards the norm. Letter indications like in Diagram 1.

Wyniki uzyskane w badaniu aktywności glikolitycznej izolowanych neuronów OUN stanowią uzupełnienie poprzednio stwierdzanych za-



Wykres 4. Różnice procentowe aktywności glikolitycznej i układu askorbinian — cytochrom c izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu tlenkiem węgla. Linia kreskowana oznacza układ askorbinian-cytochrom c; linia kropka-kreska oznacza aktywność glikolityczną. Oznaczenia literowe jak na wykresie 1.

Diagram 4. Per cent differences of glycolytic activity and ascorbate-cytochrome c system of the isolated neurons from the central nervous system of the rat following carbon monoxide intoxication. Dash line indicates ascorbate — cytochrome c system; dot-dash line indicates glycolytic activity. Letter indications like in Diagram 1.

burzeń oddychania komórkowego po zatruciu CO (Śmiałek 1975). Powiązanie zmian różnych szlaków metabolicznych tych samych neuronów może pozwolić na dokładniejsze poznanie patomechanizmu uszkodzeń spowodowanych działaniem tlenu węgla na tkankę nerwową.

WNIOSKI

1. Stwierdzono, że neurony OUN w normie oraz w następstwie doświadczalnego zatrucia CO wykazują ilościowe różnice w aktywności glikolitycznej.

2. Neurony o niższym metabolizmie komórkowym wykazują mniejszą wrażliwość na zatrucie CO.

M. Śmiałek

ГЛИКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ЦНС КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ СО

(метод картезианского поплавка)

Резюме

Целью работы было определение гlikолитической активности изолированных нейронов крысы, полученных из ядра гигантских клеток ретикулярной формации ствола мозга, клеток Пуркинье, пирамидальных клеток аммонова рога, и двигательных нейронов передних рогов спинного мозга с учетом их чувствительности на острое отравление СО и способности временного накопления гликогена.

Для исследований было использовано 107 шестинедельных самцов крыс. Животные подвергались однократному отравлению СО в течение 90 минут. Нейроны изолировали непосредственно после отравления СО и в интервалах времени до 240 часов после отравления. Чистоту отдельных нейронов и объем цитоплазмы определяли с помощью сканирующего микроскопа и формулы в зависимости от формы нейрона. Гликолитическую активность измеряли по методу, применяемому в аппарате ампульного картезианского поплавка.

После отравления СО в нейронах из ядер гигантских клеток ретикулярной формации ствола мозга наблюдалось временное торможение гlikолитической активности в пределах до 72 часов, а в клетках Пуркинье в пределах до 24 часов после отравления. В двигательных нейронах передних рогов спинного мозга была обнаружена тенденция к снижению активности, а в пирамидальных клетках аммонова рога — статистически недостоверное увеличение анаэробного гlikолиза в пределах до 120 часов после отравления.

Различная реакция отдельных нейронов на отравляющее действие СО обусловлена, вероятно, количественной разницей в норме между процессами анаэробного гlikолиза и клеточного дыхания. Можно предполагать, что нейроны с низкой обменяемостью глюкозы окажутся наименее чувствительными к СО

(двигательные нейроны передних рогов спинного мозга). Наиболее чувствительные нейроны аммониевой коры, неспособные накапливать гликоген, отличались очень высокой гликолитической активностью, а также самыми высокими значениями дыхательной активности нейрона.

M. Smialek

THE GLYCOLYTIC ACTIVITY OF ISOLATED NEURONS
FROM RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM FOLLOWING CARBON
MONOXIDE INTOXICATION

(Cartesian microdiver technique)

Summary

The aim of the work was to determine the glycolytic activity of rat neurons isolated from the gigantocellular nucleus of the reticular formation of brain stem, Purkinje cells, pyramidal cells of Ammon horn, as well as motor neurons from spinal cord, including their sensitivity to acute CO intoxication and the ability for glycogen accumulation.

107 male, 6 weeks old rats, were submitted to CO intoxication for 90 min (Korthals et al. 1973). Neurons were isolated according to Hydén and Pigoń (1960) immediately after CO intoxication, as well as in time intervals up to 240 hours after intoxication. The purity of isolated neurons and the volume of the cytoplasm was determined using scanning electron microscope and formulae depending on the shape of the neuron (Królikiewicz, Steckiewicz, 1956). The glycolytic activity was measured according to Hamberger and Hydén (1963) by use of Cartesian microdiver technique (Zeuthen 1953).

The CO intoxication resulted in a transient inhibition of the glycolytic activity in the neurons from the nucleus of the reticular formation up to 72 hours and in Purkinje cells up to 24 hours after intoxication. In the spinal cord motor neurons the glycolytic activity showed a decreasing tendency, while in the pyramidal cells a statistically insignificant increase of anaerobic glycolysis was observed up to 120 hours after intoxication.

A different reaction of particular neurons to CO action depends presumably on the differences in anaerobic glycolysis and in cellular respiration in normal conditions. It may be assumed that the neurons with the lowest glucose metabolism show the smallest sensitivity to CO (spinal cord motor neurons). The most sensitive neurons of Ammon horn, which do not exhibit any ability for glycogen accumulation showed a very high glycolytic activity and the highest respiratory activity.

PISMIENNICTWO

1. Hamberger A.: Differences between isolated neuronal and vascular glia with respect to respiratory activity. *Acta Phys. Scand.* 1963, suppl. 203, 1—58
2. Hamberger A., Hydén H.: Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol.* 1963, 16, 521—525
3. Harkonen M. H. A., Passonneau J. V., Lowry O. H.: Relationships between

- energy reserves and function in rat superior cervical ganglion. *J. Neurochem.* 1969, 16, 1439—1450
4. Hydén H., Pigoń A.: A cytophysiological study of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cells of Deiters nucleus. *J. Neurochem.* 1960, 6, 57—72
 5. Jacob H.: Patterns of CNS vulnerability. CNS tissue and cellular pathology in hypoxaemic states, 1963, 153—164. W: J. Schadé, W. H. McMenemy „Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia”, Blackwell Sc. Publ., Oxford
 6. Korthals J., Mossakowski M. J., Smiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowęglowej u szczura. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 278—300
 7. Królikowski J., Steckiewicz C.: *Matematyka, wzory, definicje i tablice.* 1956, W-wa Wydawnictwa Komunikacyjne str. 84—85
 8. Környey St.: Patterns of CNS vulnerability in CO, cyanide and other poisoning, 1963, 165—176. J. P. Schadé and W. H. McMenemy „Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia”, Blackwell Sc. Publ., Oxford
 9. Smiałek M.: Cytochrome oxidase activity in isolated giant cells of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication (Cartesian micro-diver technique). *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 397—401
 10. Smiałek M.: Respiratory activity of isolated neurons from the rat central nervous system following carbon monoxide intoxication (Cartesian micro-diver technique). *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 381—388
 11. Whitehead T. P., Worthington N.: The determination of carboxyhemoglobin. *Clin. chim. Acta* 1961, 6, 356—358
 12. Zeuthen E.: Growth as related to the cell cycle in single-cell cultures of *Tetrahymena piriformis*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1953, 1, 239—249

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

ROMAN GADAMSKI, GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MACIEJ BORKOWSKI,
BOGDAN RATYŃSKI, JERZY WESOŁOWSKI, HENRYK RYKOWSKI

WPŁYW NIEDOKRWIENIA RDZENIA KRĘGOWEGO U PSÓW NA STAN BARIERY NACZYNIOWEJ I MIKROKRAŻENIE

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Klinika Chirurgii Naczyniowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

Kierownik Kliniki: prof. dr H. Rykowski

Zabiegi chirurgiczne połączone z uniedroźnieniem odcinka piersiowego tętnicy głównej mogą prowadzić do ciężkich powikłań neurologicznych. Występują one zwykle po usunięciu tętniaka i są spowodowane prawdopodobnie nagłym niedokrwieniem rdzenia kręgowego. Nasilenie objawów neurologicznych zależy od czasu trwania niedroźności tętnicy, a także od długości usuniętego odcinka aorty. Stosowanie krążenia pozaustrojowego nie zawsze zapobiega wystąpieniu tych powikłań. W związku z tym zachodzi konieczność poszukiwania ich przyczyny, oceny dynamiki narastania, a zwłaszcza określenia maksymalnego czasu zaciśnięcia zstępującego odcinka aorty, po którym objawy neurologiczne nie występują bądź też mają odwracalny charakter.

Dogodnym modelem doświadczalnym dla tego rodzaju badań jest wyłączenie krwi w tętnicy głównej u zwierząt (Gelfan, Tarlow 1959; Long i wsp. 1972, Schneider, Dralle 1973; Gadamski i wsp. 1976a, b). Niedokrwienie rdzenia kręgowego spowodowane zaciśnięciem aorty prowadzi do wystąpienia zaburzeń strukturalnych i metabolicznych, które najczęściej są zlokalizowane w centralnej i brzeżnej części rogów przednich odcinka lędźwiowego (Blasius, Zimmerman 1957; Gelfan, Tarlow 1959; Long i wsp. 1972; Schneider, Dralle 1973; Gadamski i wsp. 1976a, b). Badania przeprowadzone przez Krogha (1945) wykazały utrzymywanie się minimalnego przepływu w naczyniach krwionośnych odcinka lędźwiowego rdzenia po zaciśnięciu aorty brzusznej. Spostrzeżenia te skłoniły nas do przeprowadzenia serii doświadczeń na psach utrzymanych

przy życiu po podwiązaniu piersiowego odcinka tętnicy głównej. Celem pracy jest: 1) Ocena ciśnienia skurczowego i szybkości przepływu krwi w odcinku aorty poniżej zacisków. 2) Ocena zachowania się bariery naczyniowej rdzenia w stosunku do białek i 3) Ocena stanu mikrokrążenia w rdzeniu kręgowym.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 28 psach obu płci, o ciężarze ciała około 10—12 kg. W znieczuleniu ogólnym wyłączano odcinek piersiowy tętnicy głównej na okres 20 min. przez założenie zacisków — poniżej łuku aorty i powyżej przepony. U 10 psów, w trakcie doświadczenia rejestrowano w odstępach minutowych wysokość ciśnienia skurczowego krwi powyżej i poniżej zacisków, tj. w łuku i odcinku brzuszny tętnicy głównej. Równocześnie dokonywano pomiarów szybkości przepływu krwi w odcinku aorty leżącym poniżej dolnego zacisku. Wysokość ciśnienia skurczowego odczytywano na skali dwóch elektromanometrów Ek-4, wyposażonych w przetworniki ciśnienia, połączone z 2 cewnikami polietylenowymi. Jeden cewnik wprowadzano do łuku aorty przez tętnicę szyjną wspólną, drugi — do części brzusznej aorty przez tętnicę udową.

Szybkość przepływu oceniano za pomocą detektora ultradźwięków UDP-574 (Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN). Głowicę aparatu, działającego na zasadzie zjawiska Dopplera, przykładano do ściany części brzusznej aorty. Między ścianą tętnicy i głowicą aparatu umieszczano ciekłą warstwę sprzęgającą, utworzoną z tkanki tłuszczowej lub żelu kauczukowego. Pomiar wysokości ciśnienia skurczowego i szybkość przepływu krwi, poza okresem 20 minutowej niedrożności odcinka piersiowego tętnicy głównej, prowadzono dodatkowo w czasie 10 minut po zdjęciu zacisków. W tym okresie odczyty rejestrowano w odstępach dwuminutowych.

Rdzenie kręgowe 16 psów stanowiły materiał do oceny bariery naczyniowej oraz stanu mikrokrążenia. Badania wykonano na zwierzętach, które po zdjęciu zacisków przeżyły okres 2, 4, 6, 12, 24 i 48 godzin oraz 4 i 6 dni.

Zachowanie się bariery naczyniowej w stosunku do białek oceniano przy pomocy 2% roztworu błękitu Evansa, który podawano do żyły dostopowej w ilości 3 ml/kg wagi ciała. U zwierząt utrzymywanych przy życiu przez okres od 2 do 24 godzin po niedokrwieniu, znacznik barierowy wprowadzono do łożyska naczyniowego bezpośrednio po zdjęciu zacisków, natomiast u psów, które przeżyły od 48 godz. do 6 dni błękit Evansa podawano na 24 godziny przed uśmierceniem. Wybrane segmenty z odcinka szyjnego, piersiowego i lędźwiowego rdzenia utrwa-

lano w 10% zobojętnionej formalinie i krojono na mikrotomie mroźniowym na skrawki grubości 20 μ . Materiał oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss wyposażonym w lampę rtęciową HBO 200 oraz filtry: BG-12/4 (wzbudzający) i OG-1 (barierowy).

Materiał do badania mikrażenia utrwalano w 10% zobojętnionej formalinie. Skrawki mrozikowe, grubości 40 μ barwiono benzydynamową metodą wg Pickwortha.

Materiał kontrolny stanowiły rdzenie kręgowy dwóch psów, u których wywołano jedynie znieczulenie ogólne. Zwierzęta doświadczalne i kontrolne uśmiercano przez podanie letalnej dawki Morbitalu.

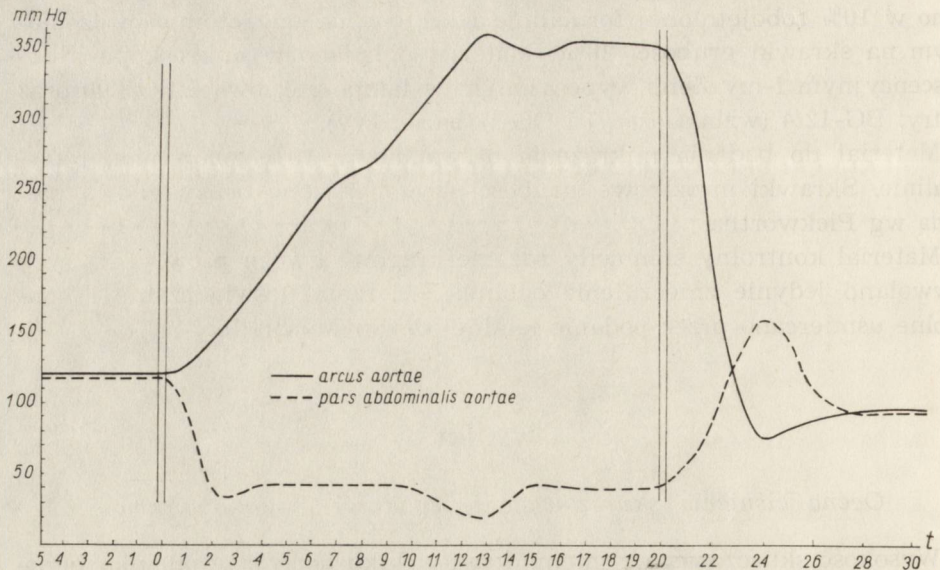
WYNIKI

Ocena ciśnienia skurczowego i szybkości przepływu krwi

Wysokość skurczowego ciśnienia krwi w łuku aorty i w odcinku brzusznej tętnicy głównej ustalano na podstawie pomiarów przeprowadzonych 5 minut przed założeniem zacisków. Wyprowadzona średnia arytmetyczna wskazuje, że w łuku aorty wynosi ono około 120 mm Hg, natomiast w aorcie brzusznej, około 115 mm Hg.

W okresie pierwszych 13 minut po założeniu zacisków, w łuku aorty obserwowano szybki, liniowy wzrost ciśnienia skurczowego do wartości 360 mm Hg. Ciśnienie obniżało się nieznacznie w ciągu następnych 2 minut, po czym ustalało się na poziomie 350 mm Hg utrzymując się na tym poziomie do chwili zdjęcia zacisków. Przywrócenie drożności tętnicy głównej powodowało gwałtowny spadek ciśnienia skurczowego, które w czasie 4 minut po zdjęciu zacisków osiągało wartość 75 mm Hg. Od tego czasu obserwowano łagodny wzrost ciśnienia aż do jego ustalenia się na poziomie około 95 mm Hg. To ciśnienie utrzymywało się do końca wykonywania pomiarów (wykres 1).

Ciśnienie krwi w odcinku brzusznej tętnicy głównej obniżało się gwałtownie, osiągając w 2 minuty po założeniu zacisków poziom 45 mm Hg. Następnie ulegało ono podwyższeniu do 55 mm Hg utrzymując się na tym poziomie do 10 minuty niedrożności. Najniższe ciśnienie skurczowe odnotowano między 12 a 13 minutą. Wynosiło ono w tym czasie 20 mm Hg. Od 13 minuty ciśnienie wzrastało, a następnie ustalało się na poziomie 40 mm Hg. Po zdjęciu zacisków następowało gwałtowne podwyższenie ciśnienia, które w ciągu 4 minut po przywróceniu drożności tętnicy osiągało wartość 160 mm Hg. W dalszych czasach obserwacji ciśnienie spadało do około 95 mm Hg i utrzymywało się na tym poziomie do końca wykonywania pomiarów (wykres 1).



Wykres 1. Ciśnienie skurczowe krwi w tętnicy głównej wyrażone w mm Hg. Linia ciągła oznacza ciśnienie skurczowe krwi w łuku aorty, a linia przerywana w odcinku brzusznej aorty poniżej zacisku dolnego. Linie pionowe po stronie lewej oznaczają czas założenia zacisku górnego i dolnego, a linie pionowe po stronie prawej czas zdjęcia obydwu zacisków.

Diagram 1. Systolic blood pressure in aorta in mm Hg. Continuous line indicates systolic blood pressure in aortal arch, dotted line — systolic blood pressure in abdominal aorta below the lower clamp. Vertical lines on the left indicate the moment of clamping while the vertical lines on the right indicate the moment of both clamps removal.

Zastosowanie detektora ultradźwięków pozwalało na ocenę szybkości przepływu krwi w odcinku tętnicy głównej leżącym poniżej zacisku nadprzeponowego. Głowica tego aparatu wysyła ultradźwięki, które po rozproszeniu i odbiciu od morfotycznych elementów krwi wracają do odpowiednio skonstruowanego urządzenia dającego trzy charakterystyczne tony. Najsilniejszy występuje bezpośrednio po skurczu komór. Drugi, cichszy, przypada na okres pojawienia się wstecznego prądu krwi w aorcie i trzeci, również cichy, związany jest z rozpoczęciem przepływu krwi w kierunku obwodu. Po usłyszeniu trzeciego tonu następuje cisza, która trwa aż do następnej ewolucji serca. Występowanie wszystkich trzech tonów, które są słyszalne po przyłożeniu głowicy do ściany w pełni drożnej tętnicy głównej świadczy, że szybkość płynącej w niej krwi wynosi około 1 m/sek.

Zamknięcie odcinka piersiowego aorty powodowało całkowity brak słyszalności tonów między 1 a 4 oraz między 9 a 15 minutą trwania niedrożności. Przypadająca na te okresy cisza świadczy o przepływie

mniejszym od 2,5 cm/sek, który ze względu na ograniczoną czułość zastosowanej aparatury nie mógł być rejestrowany. Między 4—9 i 15—20 minutą doświadczenia notowano wyłącznie osłabiony ton pierwszy i trzeci.

Wypadanie tonu drugiego oraz zmniejszenie natężenia pozostałych świadczy o bardzo zwolnionym przepływie wynoszącym w przybliżeniu od 2,5 do 3,0 cm/sek. W kilka minut po zdjęciu zacisków pojawiały się wszystkie trzy tony o podobnej sile dźwięku jak w drożnej tętnicy głównej.

Ocena stanu bariery naczyniowej w stosunku do białek

W rdzeniu kręgowym zwierząt, niezależnie od czasu przeżycia, nie stwierdzono wzmożonej przepuszczalności naczyń w stosunku do użytego znacznika barierowego. W obrazie mikroskopowym była widoczna żywo czerwona fluorescencja w świetle licznych naczyń krwionośnych (ryc. 1). Zjawisko to występowało zwłaszcza u zwierząt, które przeżyły 2—12 godz. oraz 48 godz. — 6 dni. W kilku przypadkach obserwowano czerwoną fluorescencję w błonie wewnętrznej tętniczek (ryc. 2, 3). Nie znaleziono jej natomiast w strefie przynaczyniowej ani w innych elementach strukturalnych tkanki nerwowej rdzenia kręgowego.

Ocena mikrokrążenia rdzeniowego

U zwierząt kontrolnych we wszystkich odcinkach rdzenia widoczna była wyraźna sieć naczyniowa. Była ona szczególnie gęsta w istocie szarej (ryc. 4) i nie wykazywała charakterystycznych cech angioarchitektiki ani też różnic w ukrwieniu między rogami przednimi a tylnymi. Unaczynienie istoty białej było znacznie uboższe. Dominowały w jej obrębie naczynia biegnące promieniście od opony miękkiej w kierunku dośrodkowym, tworzące połączenia z brzeżnymi naczyniami istoty szarej (ryc. 5).

Czasowe niedokrwienie rdzenia powodowało wystąpienie zaburzeń w mikrokrążeniu, których jakość oraz nasilenie wykazywały ścisłą zależność od czasu przeżycia i odległości segmentu rdzenia kręgowego od zamkniętej części tętnicy głównej.

U zwierząt z 2 godz. przeżyciem we wszystkich odcinkach rdzenia obserwowano cechy przekrwienia z dominującym wypełnieniem masami krwi naczyń żylnych (ryc. 6). Jednocześnie w istocie szarej spotykano plackowate obszary, w których sieć naczyń tętnicznych i włosowatych była słabo wypełniona. W 4 i 6 godz. po niedokrwieniu cofały się cechy

przekrwienia (ryc. 7, 8). W odcinku szyjnym pojawiały się liczne krwinkotoki (ryc. 9, 10), natomiast w odcinku lędźwiowym zwracało uwagę skąpe wypełnienie krwią naczyń brzeżnej strefy rogów przednich (ryc. 11, 12). Dłuższe czasy przeżycia (12, 24 godz.) cechowało nasilające się zubożenie ukrwienia rdzenia kręgowego (ryc. 13, 14, 15) związane zarówno z mniejszym wypełnieniem krwią sieci naczyń włosowatych i tętnicznych, jak i ze zmniejszeniem się liczby rozszerzonych naczyń żylnych. W brzeżnej warstwie rogów przednich, odpowiadającej położeniu neuronów ruchowych, były widoczne rozległe obszary szczególnie słabego ukrwienia (ryc. 16). Upośledzenie ukrwienia dotyczyło głównie istoty szarej, w której uwidoczniła się sieć naczyńowa była tylko nieznacznie bogatsza niż w istocie białej (ryc. 17). W 48 godz. po niedokrwieniu sieć naczyń krwionośnych była podobna do występującej u zwierząt kontrolnych. W odcinku szyjnym i piersiowym spotykano nieliczne krwinkotoki (ryc. 18, 19), a w odcinku lędźwiowym cechy nieznacznego przekrwienia (ryc. 20). Pełniejszą normalizację ukrwienia wszystkich badanych poziomów rdzenia kręgowego obserwowano w 6 dniu przeżycia. Jednak w istocie szarej odcinka lędźwiowego spotykano nadal pojedyncze, rozszerzone naczynia żyłne wypełnione obficie masami krwi (ryc. 21).

OMÓWIENIE

Zastosowany model doświadczalny, może być uznany za dogodny dla prześledzenia zmian występujących w rdzeniu kręgowym po jego niedokrwieniu. Jednakże uzyskane wyniki badań, a zwłaszcza pomiarów skurczowego ciśnienia krwi nakazują ostrożność w zaszeregowaniu tych zmian do grupy nieprawidłowości związanych wyłącznie z niedokrwieniem przypadającym na okres uniedroźnienia aorty. Niedokrwienie rdzenia spowodowane wyłączeniem przepływu krwi w odcinku piersiowym tętnicy głównej jest ważnym, ale nie jedynym czynnikiem patogenetycznym zarówno przedstawionych zmian jak i poprzednio stwierdzonych zaburzeń w aktywności enzymów oddechowych i hydrolitycznych (Gałamski i wsp. 1976a). Obserwowane nieprawidłowości mikrokrażenia są wykładnikiem zarówno niedokrwienia rdzenia jak i wpływu ogólnoustrojowych zaburzeń wywołanych zaciśnięciem piersiowego odcinka tętnicy głównej.

Zaburzenia w mikrokrażeniu w OUN w następstwie jego niedokrwienia zostały wykazane przez wielu autorów (Ames i wsp. 1968; Hossman, Sato 1970; Olsson, Hossman 1971; Mossakowski 1974). Schneider i Dralle (1973) podkreślają wpływ czynników ogólnoustrojowych na kształtowanie się zaburzeń mikrokrażenia w rdzeniu kręgowym. Pogląd ten popierają również wyniki naszych badań, które wykazały, że ciśnienie skurczowe

we w aorcie zstępującej poniżej zacisków spada do wartości 30 mm Hg tylko na krótki okres (około 2 minuty). Utrzymuje się ono w pozostałym czasie doświadczenia na obniżonym poziomie — około 40 mm Hg. Obniżenie ciśnienia potwierdzają również pomiary przepływu, które oceniano jako przepływ o szybkości 2,5 do 3,0 cm/sek (Nowicki, Brodziński 1975).

Utrzymanie się obniżonego ciśnienia krwi w odcinku brzusznej aorty mimo pełnej niedrożności odcinka piersiowego można tłumaczyć uruchomieniem krążenia obocznego, którego wydolność u psów wydaje się być szczególnie duża. Bardziej oczywisty jest wzrost ciśnienia (do 360 mm Hg) w łuku aorty. Zamknięcie piersiowego odcinka tętnicy głównej stwarza trudności w zaopatrywaniu w krew tętniczą obwodowej części ciała przy prawidłowym odpływie krwi żyłnej z tego obszaru. Przy założeniu, że znieczulenie ogólne i zabieg operacyjny wpływają nieznacznie na pojemność wyrzutową serca, wzrost ciśnienia w łuku aorty jest wynikiem konieczności pomieszczenia krwi krążącej niemal wyłącznie w dogłowej części łożyska naczyniowego. Przebieg krzywej ilustrującej wysokość ciśnienia skurczowego w łuku i odcinku brzusznej tętnicy głównej po zdjęciu zacisków (wykres 1), sugeruje poza zjawiskami mechanicznymi udział wegetatywnych mechanizmów autoregulacji krążenia. Uruchomienie tych mechanizmów potwierdza fakt przecięcia się krzywych w 4 minucie po zdjęciu zacisków. Wykazany w tym okresie spadek ciśnienia skurczowego w górnym odcinku aorty wynika prawdopodobnie ze swobodnego napływu krwi do narządów klatki piersiowej oraz jamy brzusznej. Prowadzi to do kompensacji ukrwienia ważnych narządów, których funkcje uległy zaburzeniu w okresie zaciśnięcia odcinka piersiowego tętnicy głównej. Wyższe ciśnienie skurczowe w dolnym odcinku aorty świadczy o znacznym oporze w odgałęzieniach tętnic lędźwiowych i biodrowych zewnętrznych. Opór ten może być wykładnikiem aktywności mechanizmów autoregulacji krążenia, które przez zwiększony wyrzut adrenaliny z kory nadnerczy prowadzą do skurczu naczyń zaopatrujących mięśnie lędźwi i kończyn dolnych. Dotyczy to głównie czasu zaciśnięcia odcinka piersiowego, ale przy przedłużającym się działaniu adrenaliny, skurcz tych naczyń może utrzymywać się jeszcze po przywróceniu drożności aorty.

Zaburzenia mikrokrążenia występujące u psów po zamknięciu odcinka tętnicy głównej wykazują wyraźną trójfazowość. Faza pierwsza (2, 4 i 6 godz. przeżycia), charakteryzująca się obecnością licznych krwinkotoków w odcinku szyjnym i przekrwieniem w odcinku piersiowym i lędźwiowym, jest prawdopodobnie wynikiem nade ciśnienia w łożysku naczyniowym dogłowej części ciała oraz utrudnionego odpływu krwi z naczyń żylnych odcinka rdzenia położonego poniżej zaciśniętej części

aorty zstępującej. Trudne do wyjaśnienia jest zjawisko pogorszenia ukrwienia rdzenia kręgowego u zwierząt z 12 i 24 godzinnym przeżyciem (druga faza). Być może należy je łączyć z niewydolnością krążenia i zaburzeniem czynności narządów wewnętrznych niedokrwionych w czasie niedrożności aorty. Fazę trzecią należy traktować jako okres powolnego wyrównywania się zaburzeń. W odcinku szyjnym proces ten postępuje szybciej, natomiast w odcinku piersiowym i lędźwiowym cechy nieznacznego przekrwienia utrzymywały się do końca obserwacji.

Brak morfologicznych wykładników uszkodzenia bariery naczyniowej w stosunku do białek potwierdzają częściowo poprzednie spostrzeżenia (Gałamski i wsp. 1976a, b). Wynika z nich, że 20 minutowe zamknięcie odcinka piersiowego aorty nie prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej rdzenia kręgowego. Świadczył o tym również stan kliniczny zwierząt. Tylko u dwóch z szesnastu zbadanych psów wystąpiło spastyczne porażenie kończyn tylnych.

Stwierdzono, że mimo zaciśnięcia piersiowego odcinka tętnicy głównej utrzymuje się w jej części brzusznej znacznie zwolniony przepływ krwi i wyraźnie obniżone ciśnienie skurczowe. Przepływ ten zabezpiecza takie ukrwienie rdzenia, które pozwala na zachowanie jego funkcji i strukturalnej integralności. Stwierdzone po niedokrwieniu zaburzenia metaboliczne (Gałamski i wsp. 1976a) należy odnieść do upośledzenia ukrwienia rdzenia zarówno w okresie zaciśnięcia aorty jak i w okresie poischemicznym. U podłoża tych ostatnich leży zapewne działanie czynników zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych.

R. Gałamski, G. Шуманьска, М. Борковски, Б. Ратыньски, Е. Весоловски,
Г. Рыковски

ВЛИЯНИЕ ИСХЕМИИ СПИННОГО МОЗГА У СОБАК НА СОСТОЯНИЕ СОСУДИСТОГО БАРЬЕРА И МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ

Резюме

Исследования были проведены на 28 собаках, которым под наркозом отключали на 20 минут грудной отрезок аорты путем применения двух зажимов: ниже дуги аорты и выше диафрагмы.

У 10 животных регистрировалось систолическое давление крови (в дуге и в брюшном отрезке главной артерии), а также измерялась скорость проплыва крови (в отрезке, лежащем ниже нижнего зажима). Спинной мозг 16 экспериментальных собак составлял материал для оценки сосудистого барьера (с использованием 2% раствора синего Эванса) и состояния микроциркуляции в спинном мозге (с применением бензидинового метода Пикворта). Эти исследования были проведены на животных, которые после снятия зажимов оставались при жизни 2, 4, 6, 12, 24, 48 часов, а также 4 и 6 дней.

Контролем служил спинной мозг двух собак, у которых вызывался общий наркоз без закрытия просвета главной артерии.

Наблюдалось снижение давления в главной артерии за нижним зажимом и его рост в дуге аорты, замедление проплыва крови, нарушения спинномозговой микроциркуляции и отсутствие показателей увеличенной проницаемости кровеносных сосудов в отношении сложного комплекса альбуминов плазмы с синим Эвансом.

R. Gadamski, G. Szumańska, M. Borkowski, B. Ratyński, J. Wesołowski,
H. Rykowski

THE EFFECT OF ISCHEMIA OF THE SPINAL CORD
ON THE BLOOD BRAIN BARRIER AND SPINAL MICROCIRCULATION
IN THE DOGS

Summary

The study was carried out on 28 dogs whose dorsal part of aorta was closed in general anesthesia for 20 minutes with two clamps: below the arch of aorta and above the diaphragm. In 10 animals the blood pressure was recorded (in the arch and in the abdominal part of aorta), and also the measurements of the blood flow were performed (in the aorta below the lower clamp). Spinal cords of 16 experimental dogs served to estimate blood-brain barrier (with 2 per cent Evans Blue) and spinal microcirculation (Pickworth benzidine method). The investigations were carried out on the animals which survived 2, 4, 6, 12, 24, 48 hours and 4, 6 days after removal of the clamps. The spinal cords of 2 anesthetized, unoperated dogs were used as control material.

The results revealed the decreased blood pressure in the aorta below lower clamp and its increase above aortal arch, decreased blood flow velocity, disturbances in spinal microcirculation and the lack of the exponents of the increased permeability of blood vessels towards own serum albumin conjugated with Evans Blue.

PISMIENICTWO

1. Ames A., Wright L., Kowada M., Thurston J. M., Majno G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am. J. Path.* 1968, 52, 437—453.
2. Blasius W., Zimmermann H.: Vergleichende Untersuchungen über die funktionellen, strukturellen und histochemischen Veränderungen an den Vorderhornanglienzellen des Kaninchenrückenmarks bei zeitlich abgestufter Ischämie. *Pflügers Arch. ges Physiol.* 1957, 264, 618—650.
3. Gadamski R., Rap Z., Borkowski M., Ratyński B., Wesołowski J.: Ocena zmian w rdzeniu kręgowym psów po doświadczalnym zaciśnięciu aorty piersiowej. *Badania histologiczne i histochemiczne.* 1976a (w przygotowaniu do druku).
4. Gadamski R., Szumańska G., Borkowski M., Ratyński B., Wesołowski J.: Zmiany aktywności acetylocholinesterazy (AChE) w rdzeniu kręgowym psów po czasowym zamknięciu aorty piersiowej. *Neuropat. Pol.* 1976b, 14.
5. Gelfan S., Tarlov J. M.: Interneurons and rigidity of spinal origin. *J. Physiol. (Lond.)* 1959, 146, 594—617.

6. Hossmann K. A., Sato K.: The effect of ischemia on sensomotor cortex of cat. *Z. Neurol.* 1970, 198, 33—45.
7. Krogh E.: Studies on the blood supply to certain regions in the lumbar part of the spinal cord. *Acta physiol. scand.* 1945, 10, 271—281.
8. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335—347.
9. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 573—581.
10. Nowicki A., Brodziński K.: Pomiary profilu prędkości przepływu krwi in vitro oraz in vivo. XXII Otwarte Seminarium z akustyki, Swieradów Zdrój, wrzesień 1975.
11. Olsson Y., Hossman K. A.: The effect of intravascular saline perfusion on the sequelae of transient cerebral ischemia. Light and electron microscopical observations. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 17, 68—79.
12. Schneider H., Dralle J.: Ultrastructural changes in the rat spinal cord after temporary occlusion of the thoracic aorta. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 301—315.

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

PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Czerwona fluorescencja w świetle naczyń krwionośnych istoty białej. Czas przeżycia 6 godzin. Pow. 100 x.

Fig. 1. Red fluorescence in the lumen of blood vessels in the white matter. Survival time 6 hours. x 100.

Ryc. 2. Przekrój poprzeczny tętniczki z okolicy kanału centralnego rdzenia. Fluorescencja w ścianie naczynia. Czas przeżycia 12 godzin. Pow. 100 x.

Fig. 2. Transverse section of the arteriole near the central canal of the spinal cord. Fluorescence in the vascular wall. Survival time 12 hours. x 100.

Ryc. 3. Przekrój podłużny tętniczki w szczelinie przedniej rdzenia. Czerwona fluorescencja w ścianie naczynia. Pow. 100 x.

Fig. 3. Longitudinal section of the arteriole in the anterior fissure of the spinal cord. Red fluorescence in the vascular wall. x 100.

Ryc. 4. Kontrola. Gęsta sieć naczyń w istocie szarej odcinka szyjnego. Metoda Pickwortha. Pow. 60 x.

Fig. 4. Control. Dense vascular net in the grey matter of cervical spinal cord. Pickworth method. x 60.

Ryc. 5. Kontrola. W istocie białej promienisty układ naczyń w połączeniach z naczyniami leżącymi na obwodzie istoty szarej. Metoda Pickwortha. Pow. 60 x.

Fig. 5. Control. Radial arrangement of the white matter blood vessels which contact the vessels at the periphery of grey matter. Pickworth method. x 60.

Ryc. 6. Odcinek lędźwiowy. Przekrwienie rdzenia w 2 godziny po zdjęciu zacisków. Dominuje przekrwienie żyłne z obecnością plackowatych obszarów słabego ukrwienia. Metoda Pickwortha. Pow. 60 x.

Fig. 6. Lumbar spinal cord. Hyperemia of the cord 2 hours after removal of clamps. Predominance of venous hyperemia; note the patchy regions of poor blood supply. Pickworth method. x 60.

Ryc. 7. Odcinek piersiowy. Pojedyncze krwinkotoki oraz nieznaczne przekrwienie rdzenia w 4 godziny po zdjęciu zacisków. W istocie szarej widoczne obszary słabego ukrwienia. Metoda Pickwortha. Pow. 60 x.

Fig. 7. Dorsal spinal cord. Few hemorrhages and slight hyperemia of the cord 4 hours after removal of clamps. Regions of the poor blood supply in the grey matter. Pickworth method x 60

Ryc. 8. Odcinek piersiowy. Znaczna normalizacja ukrwienia rdzenia w 6 godzin po zdjęciu zacisków. Metoda Pickwortha. Pow. 60 X.

Fig. 8. Dorsal spinal cord. Marked compensation of blood supply in the spinal cord 6 hours after removal of clamps. Pickworth method. X 60.

Ryc. 9. Nieliczne krwinkotoki w istocie szarej odcinka szyjnego rdzenia w 4 godziny po zdjęciu zacisków. Metoda Pickwortha Pow. 60 X.

Fig. 9. Few hemorrhages in the grey matter of cervical spinal cord 4 hours after clamps removal. Pickworth method. X 60.

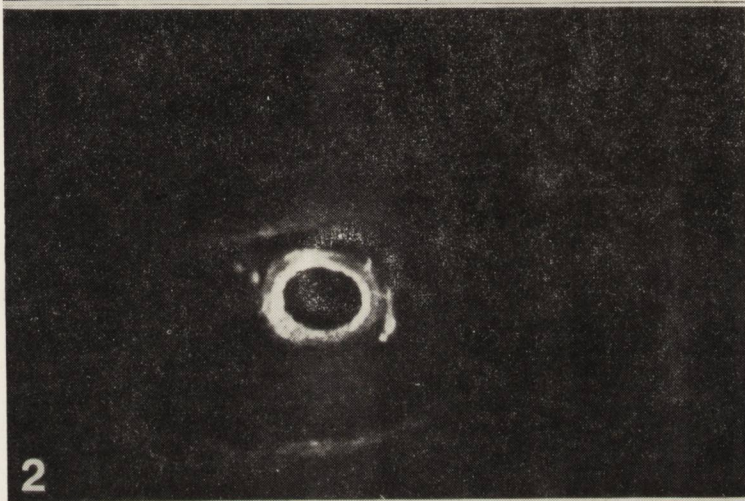
Ryc. 10. Liczne krwinkotoki w odcinku szyjnym rdzenia w 6 godzin po usunięciu zacisków. Metoda Pickwortha. Pow. 60 X.

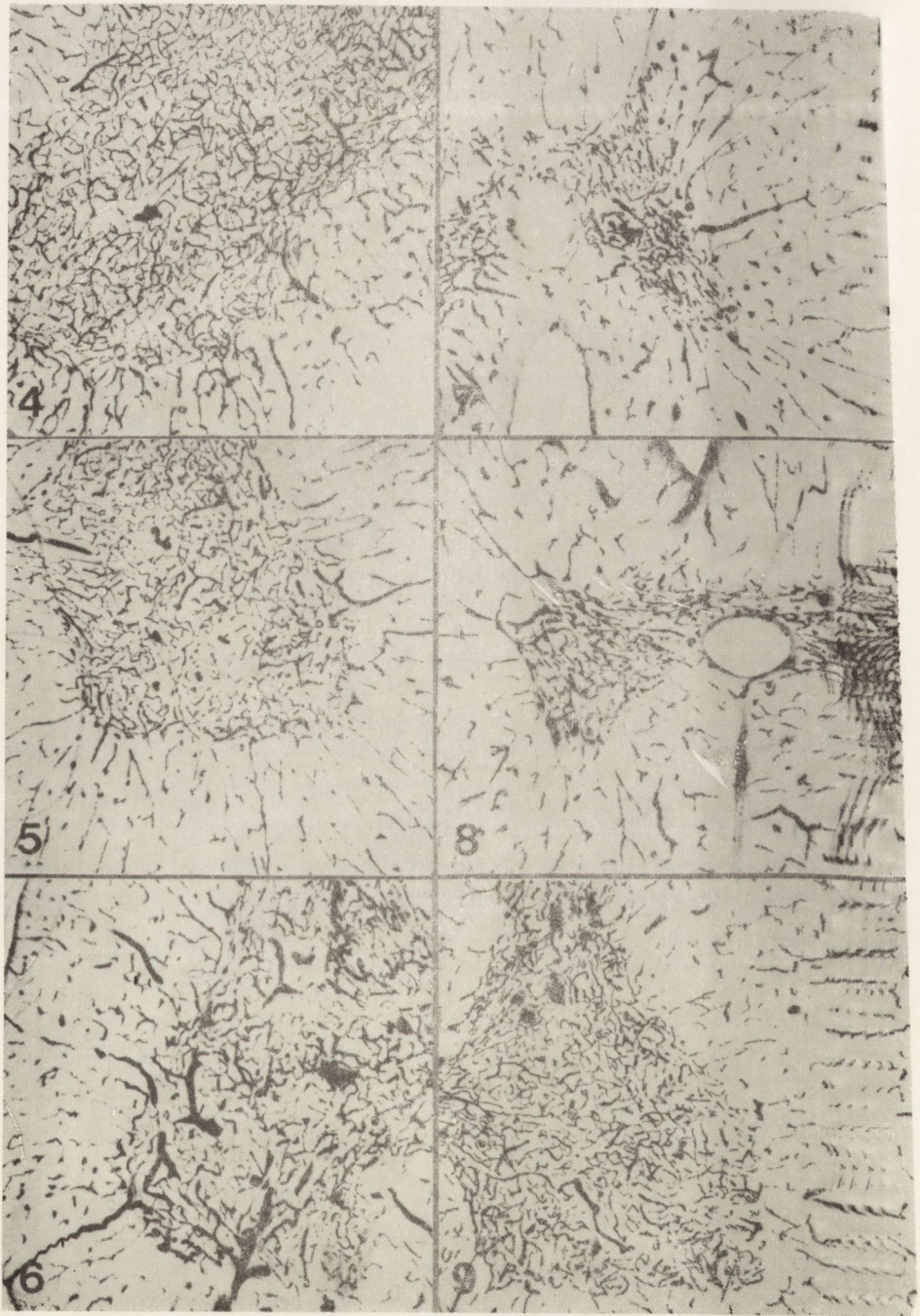
Fig. 10. Numerous hemorrhages in cervical spinal cord 6 hours after removal of clamps. Pickworth method. X 60.

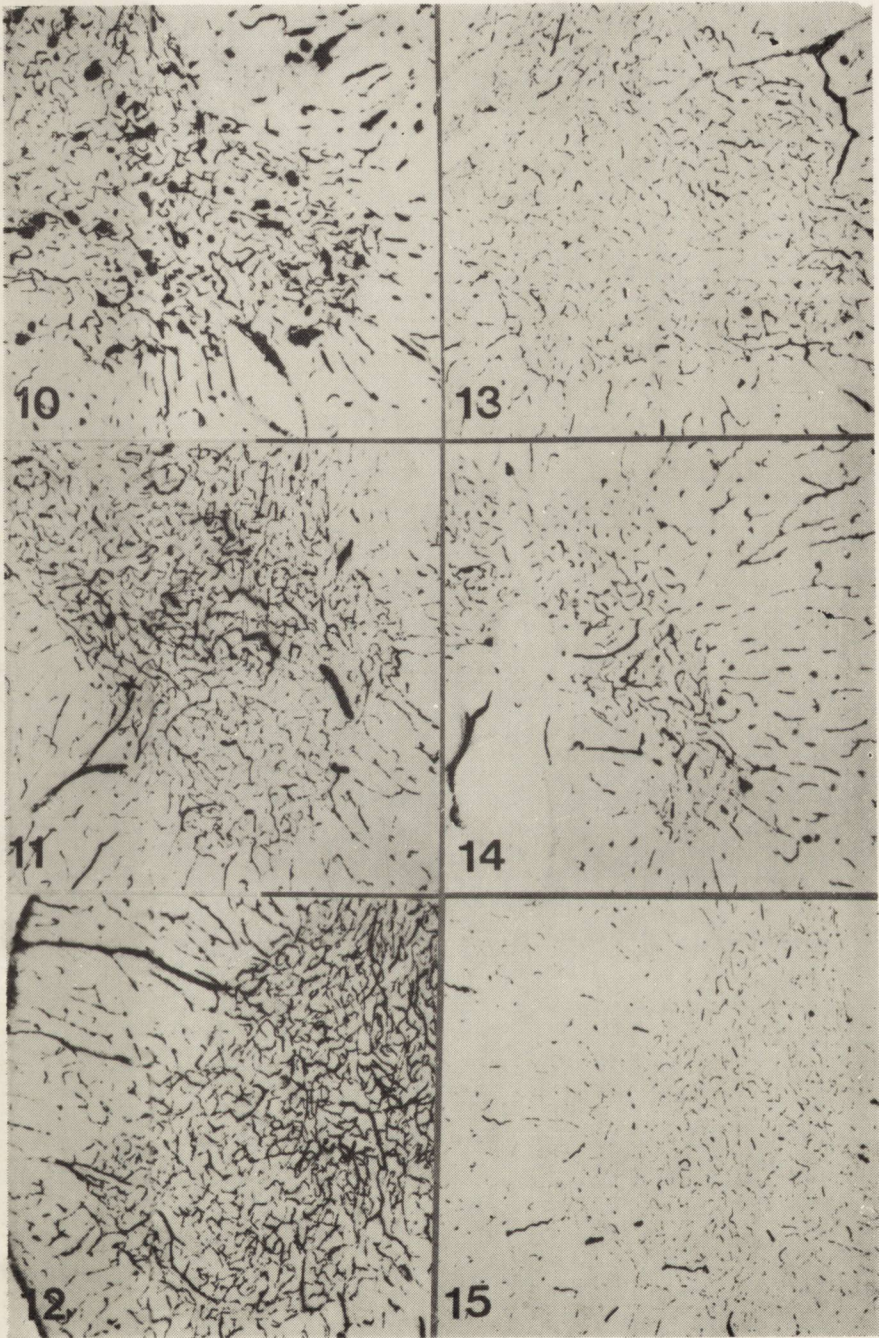
Ryc. 11. Odcinek lędźwiowy w 4 godziny po zdjęciu zacisków. Nieznaczne przekrwienie rdzenia. Ubogie wypełnienie krwią naczyń brzeżnej strefy rogów przednich. Metoda Pickwortha. Pow. 60 X.

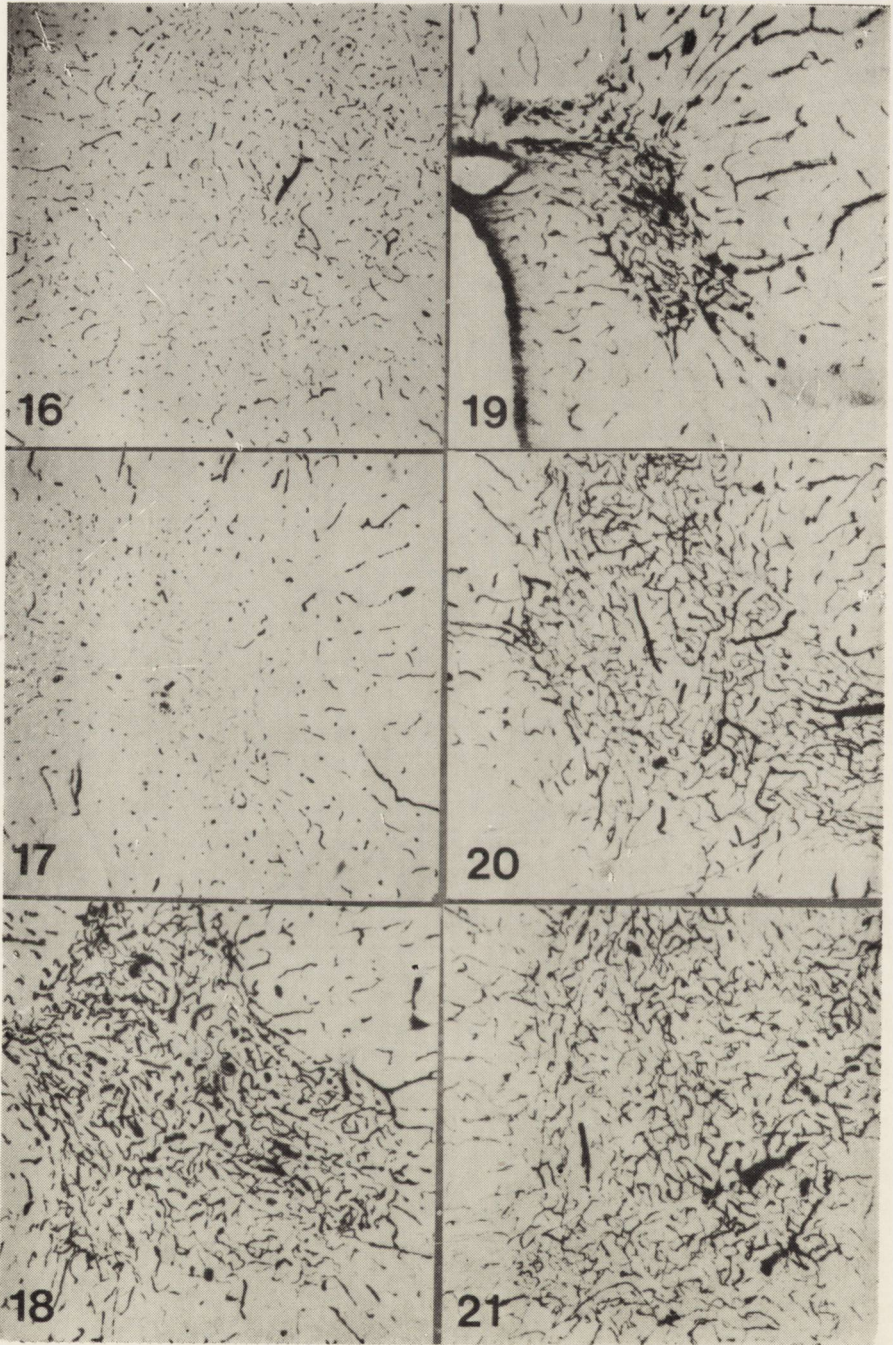
Fig. 11. Lumbar spinal cord 4 hours after removal of clamps. Slight hyperemia. Poor impletion of blood vessels in marginal zone of anterior horns. Pickworth method. X 60.

- Ryc. 12.* Odcinek lędźwiowy w 6 godzin po zdjęciu zacisków. Nieznaczne przekrwienie rdzenia. W porównaniu do grupy poprzedniej (ryc. 11) poprawa ukrwienia brzeżnej strefy rogów przednich. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 12.* Lumbar spinal cord 6 hours after clamps removal. Slight hyperemia. Better blood supply of marginal zone of anterior horns in comparison to the latter group (Fig. 11). Pickworth method. × 60.
- Ryc. 13.* Odcinek szyjny. Nasilające się zubożenie ukrwienia rdzenia w 12 godzin po zdjęciu zacisków. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 13.* Cervical spinal cord. Increasing poor supply of the blood 12 hours after clamps removal. Pickworth method. × 60.
- Ryc. 14.* Odcinek piersiowy. Gorsze wypełnienie krwią naczyń w 12 godzin po usunięciu zacisków. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 14.* Dorsal spinal cord. Poor impletion of blood vessels 12 hours after the removal of clamps. Pickworth method. × 60
- Ryc. 15.* Odcinek szyjny. W porównaniu do grupy poprzedniej (ryc. 13) wyraźniejsze niedokrwienie rdzenia w 24 godziny po zdjęciu zacisków. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 15.* Cervical spinal cord. More evident ischemia of spinal cord 24 hours after removal of the clamps as compared with the latter group (Fig. 13). Pickworth method. × 60.
- Ryc. 16.* Odcinek lędźwiowy w 24 godziny po zdjęciu zacisków. Obszary wyraźnego niedokrwienia w strefie brzeżnej rogów przednich. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 16.* Lumbar spinal cord 24 hours after removal of the clamps. The areas of marked ischemia in the marginal zone of anterior horns. Pickworth metod. × 60.
- Ryc. 17.* Odcinek piersiowy w 24 godziny po usunięciu zacisków. Znacznie uboższe wypełnienie krwią naczyń istoty szarej prowadzące do zatarcia różnicy w ukrwieniu istoty szarej i białej. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 17.* Dorsal spinal cord 24 hours after removal of the clamps. Poorer blood supply in the vessels of the grey matter resulting in blurred difference between blood supply in the grey and the white matter. Pickworth method. × 60.
- Ryc. 18.* Odcinek szyjny w 48 godzin po zdjęciu zacisków. Nieliczne krwinkotoki w istocie szarej. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 18.* Cervical spinal cord 48 hours after clamps removal. Few hemorrhages in the grey matter. Pickworth method. × 60.
- Ryc. 19.* Odcinek piersiowy w 48 godzin po usunięciu zacisków. Pojedyncze krwinkotoki w istocie szarej. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 19.* Dorsal spinal cord 48 hours after removal of the clamps. Few hemorrhages in the grey matter. Pickworth method. × 60.
- Ryc. 20.* Odcinek lędźwiowy w 48 godzin po zdjęciu zacisków. Nieznaczne przekrwienie rdzenia. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 20.* Lumbar spinal cord 48 hours after clamps removal. Slight hyperemia of the spinal cord. Pickworth method. × 60.
- Ryc. 21.* Znaczna normalizacja ukrwienia rdzenia w 6 dni po zdjęciu zacisków. W odcinku lędźwiowym pojedyncze, poszerzone naczynia żyłne wypełnione masami krwi. Metoda Pickwortha. Pow. 60 ×.
- Fig. 21.* Compensation of the spinal cord blood supply 6 days after clamps removal. In the lumbar spinal cord few distended veins overfilled with blood. Pickworth method. × 60.









MICHAŁ WALSKI, DANUTA PIETROW

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE NAD WPŁYWEM
AUDIOGENNYCH NAPADÓW PADACZKOWYCH U MYSZY
NA STAN PŁASZCZA POWIERZCHNIOWEGO
ŚRODBŁONKÓW WŁOSNICZEK MÓZGOWYCH *)

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Kierownik: doc. dr hab. J. Dymecki

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury AM,
Warszawa

Kierownik: dr med. W. Barańska

Ultrastruktura bariery naczyniowo-mózgowej związana jest z jej swoistością fizjologiczną. Układ ten różniący się budową od barier czynnościowych innych narządów organizmu, decyduje o wymianie substancji między mózgiem a środowiskiem naczyniowym (Bailey, Smith 1968; Schultz, Karlsson 1972). Komórki śródbłonkowe włosniczek mózgowych, stanowiące najbliższy światłu naczyniowemu, składnik anatomiczny bariery, tworzą warstwę ciągłą. Połączenia między sąsiadującymi komórkami śródbłonkowymi, typu „połączeń ścisłych”, są nieprzepuszczalne dla cząsteczek ferrytyny, peroksydazy oraz mikroperoksydazy (Gabryel 1973, Gabryel, Biczysko 1973; Reese, Karnovsky 1967). Cytoplazmatyczna błona lipoproteidowa pokrywająca śródbłonki naczyń mózgowych od strony światła naczynia odgrywa ważną rolę w transporcie elektrolitów (Wallach 1972; Whittam, Wheeler 1970). Błona ta jest ściśle zintegrowana z otoczką powierzchniową zwaną płaszczem powierzchniowym — „surface coat” (Groniowski 1970; Ito 1969; Martinez-Palmo 1970; Thoenes i wsp. 1972). Błona plazmatyczna łącznie z płaszczem powierzchniowym stanowi tzw. „wielką błonę” (Lehninger 1968). Wg tej koncepcji w „wielkiej błonie” glikoproteidy i glikozaminoglikany są nadbudowane na białkach strukturalnych powierzchni zewnętrznej. Płaszcz powierzchniowy posiada ujemnie naładowane grupy kwasu sialowego, które

*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.4.1.3

mogą wiązać jony wapnia i sodu oraz są odpowiedzialne za aktywny transport jonów sodu i potasu (Wallach 1972). Lehninger (1968) przypisuje tej otoczce rolę nośnika elektronów w przestrzeniach międzykomórkowych oraz czynnika umożliwiającego zachowanie równowagi elektrostajycznej błony komórkowej. Jak wiadomo naruszenie równowagi elektrostajycznej neuronu może doprowadzić do wyzwolenia napadów padaczkowych (Purpura i wsp. 1972).

W barierach biologicznych płaszcz powierzchniowy wykazuje zmiany zarówno w stanach fizjologicznych jak i pod wpływem czynników patogennych (Groniowski i wsp. 1974; Rosenfeld i wsp. 1973; Santer 1974; Walski 1972). Jednym ze wskaźników ujawniających płaszcz powierzchniowy jest czerwień rutenowa, wyznacznik proteoglikanów i glikozaminoglikanów (Luft 1971; Merker, Günter 1973).

Prowadzone badania miały na celu analizę ultrastrukturalną składników morfologicznych bariery krew-mózg u zwierząt, u których wywoływano napady padaczkowe, a szczególnie ocenę płaszcz powierzchniowy komórek śródcłonkowych, uwidocznionego przy pomocy czerwieni rutenowej.

Zwrócenie uwagi na stan układu naczyniowego wypływa z badań Markiewicz i Ostrowskiej (1975) oraz Markiewicz i Dymckiego (1976), którzy na tym samym modelu doświadczalnym wykazali w mikroskopie świetlnym, że w przebiegu audiogennych napadów padaczkowych u myszy występuje rozlane uszkodzenie układu włósczkowego oraz obrzęk mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 12 myszach (samice 12-tygodniowe) pochodzących z hodowli wsobnej szczepu, obciążonego genetycznie uwarunkowaną padaczką audiogenną. Zwierzęta podzielono na 4 grupy w zależności od ilości wywołanych napadów padaczkowych i ich częstotliwości:

grupa I — wywołano osiem napadów z półgodzienną przerwą pomiędzy dwoma kolejnymi napadami i pobrano materiał w trzydzieści minut od ostatniego napadu. Ta grupa stanowi model napadu gromadnego;

grupa II — przez czterdzieści dni wywoływano po 1 napadzie dziennie i 2—4 godziny po ostatnim napadzie pobierano materiał (model padaczki przewlekłej);

grupa III — wywołano napady padaczkowe podobnie jak w grupie II, materiał pobierano w sześćdziesiąt dni od ostatniego napadu;

grupa IV — kontrolna, obejmująca zwierzęta pochodzące z tego samego szczepu, u których nie wywoływano napadów padaczkowych.

W narkozie dootrzewnowej (Eunarcon w dawce 35—40 mg/kg wagi ciała) otwierano klatkę piersiową, po czym płyn utrwalający podawano do lewej komory serca pod ciśnieniem 40—60 mm Hg, przy jednoczesnym otwarciu prawego przedsionka serca. Płynem utrwalającym był utrwalacz paraformaldehydowo-glutarowy wg metody Karnovskyego (1965), połączony z czerwienią rutenową wg własnej modyfikacji. Utrwalacz w stężeniu końcowym zawierał 2% paraformaldehydu, 0,085M bufor kakodylowy o pH 7,4 i 1,5% czerwieni rutenowej. Po przeprowadzeniu perfuzji pobierano wycinki wielkości 0,5 mm³ z kory płata czołowego oraz skroniowego i utrwalano przez 2 godz. w temperaturze +20°C w płynie, który stosowano do perfuzji. Po inkubacji materiał płukano 4 razy po 15 minut, w 0,1M buforze kakodylowym, zawierającym 0,5% czerwieni rutenowej i dotrwalano przez 3 godz. w 1,8% czterotlenku osmu w buforze kakodylowym, zawierającym 1% czerwieni rutenowej. Materiał po odwodnieniu w szeregach alkoholi i acetonów zatapiano w Eponie 812 i skrawano na ultramikrotomie Reichert OmU 2. Preparaty dobarwiano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, oglądano i wykonano dokumentację w mikroskopie elektronowym JEM-7. Z każdej badanej grupy przeprowadzono 100 pomiarów grubości płaszcza powierzchniowego. Pomiarów wykonywano na elektronogramach w powiększeniu 150 000 x, w miejscach, gdzie błona komórkowa zachowywała strukturę trójwarstwową, a wolna granica płaszcza powierzchniowego była ostro zarysowana (Groniowski i wsp. 1974). Powiększenie mikroskopowe zostało wykalibrowane przy użyciu repliki węglowej posiadającej 1152 linie na 1 mm.

WYNIKI

W grupie kontrolnej, włósniczki od strony światła były wysłane komórkami śródbłonkowymi, które zachodziły na siebie dachówkowato tworząc charakterystyczne układy przestrzenne typu „overlapping”. Przestrzeń zawarta między nimi, ograniczona przez blaszki zewnętrzne błon komórkowych, tworzyła charakterystyczne szczeliny prowadzące niekiedy do błony podstawnej. Przestrzenie te były zamknięte, tworząc ścisłe połączenia — „tight junctions”. Substancja rutenododatnia ujawniła się na całej zewnętrznej powierzchni komórek śródbłonkowych, tworząc integralną strukturę z blaszką zewnętrzną błony cytoplazmatycznej (ryc. 1). Grubość płaszcza łącznie z blaszką zewnętrzną wahała się w granicach 100—150 Å.

W pierwszej grupie doświadczalnej (model napadów gromadnych) powierzchnia komórek śródbłonkowych tworzyła warstwę ciągłą z równoczesnym zachowaniem połączeń międzykomórkowych. Widoczne były

dość liczne pęcherzyki mikropinocytarne. Zwracał uwagę dobrze rozbudowany aparat Golgiego. Wielocukrowcowa warstwa powierzchniowa tworzyła regularny płaszcz o grubości 100—150 Å, powlekający komórki śródbłonkowe (ryc. 2).

W drugiej grupie doświadczalnej (model padaczki przewlekłej) komórki śródbłonkowe miały dość nieregularną, pofałdowaną powierzchnię. Charakterystycznie nałożone na siebie komórki, tworzące układy typu dachówkowatego, w początkowym odcinku nie przylegały ściśle do siebie. Na powierzchni komórek śródbłonkowych widoczne były zagłębienia w błonie, które przechodziły w pęcherzyki mikropinocytarne. Podobne pęcherzyki widywano również w strefie przylegania komórek śródbłonkowych do błon podstawnych. Aparat Golgiego był silnie rozbudowany. Płaszcz rutenododatni był ściśle połączony z blaszką zewnętrzną błony komórkowej. Grubość tego płaszcza wynosiła 300—350 Å (ryc. 3). Nie stwierdzono obecności produktu reakcji w połączeniach ścisłych. Pęcherzyki mikropinocytarne odsznurowujące się od błony komórkowej i znajdujące się w jej pobliżu zawierały materiał rutenododatni, natomiast w pęcherzykach przylegających do błony podstawnej znacznika nie znajdowano (ryc. 4).

Obraz ultrastrukturalny komórek śródbłonkowych w trzeciej grupie zwierząt (model padaczki przewlekłej z dwumiesięcznym przeżyciem) niewiele różnił się od obrazów grupy kontrolnej. Ścisłe połączenia błon plazmatycznych były zachowane. Obserwowało się pojedyncze, uformowane lub tworzące się przy powierzchni pęcherzyki pinocytarne. Płaszcz zewnętrzny na powierzchni komórek śródbłonkowych tworzył litą warstwę o grubości 100—150 Å (ryc. 5). Na błonach komórkowych pozostałych elementów bariery naczyniowej i w poszerzonych szczelinach pomiędzy sąsiadującymi astrocytami nie znajdowano produktu reakcji z czerwienią rutenową.

Ryc. 1. Kontrola. Naczynie włosowate z kory mózgu. Komórki śródbłonkowe regularnie otoczone płaszczem powierzchniowym. Pow. 11.000 ×.

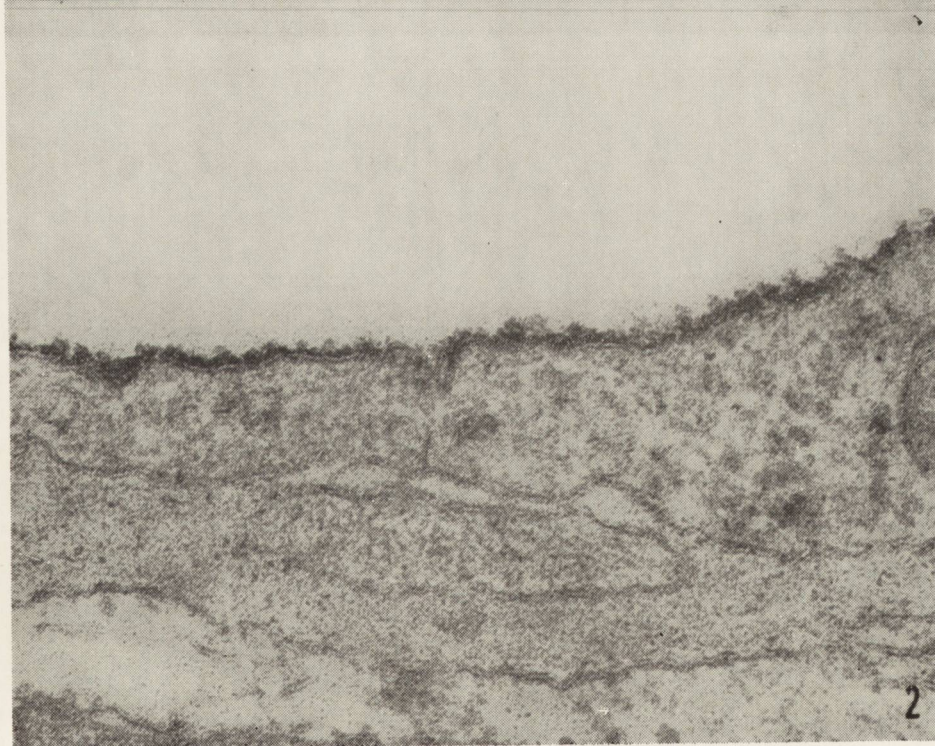
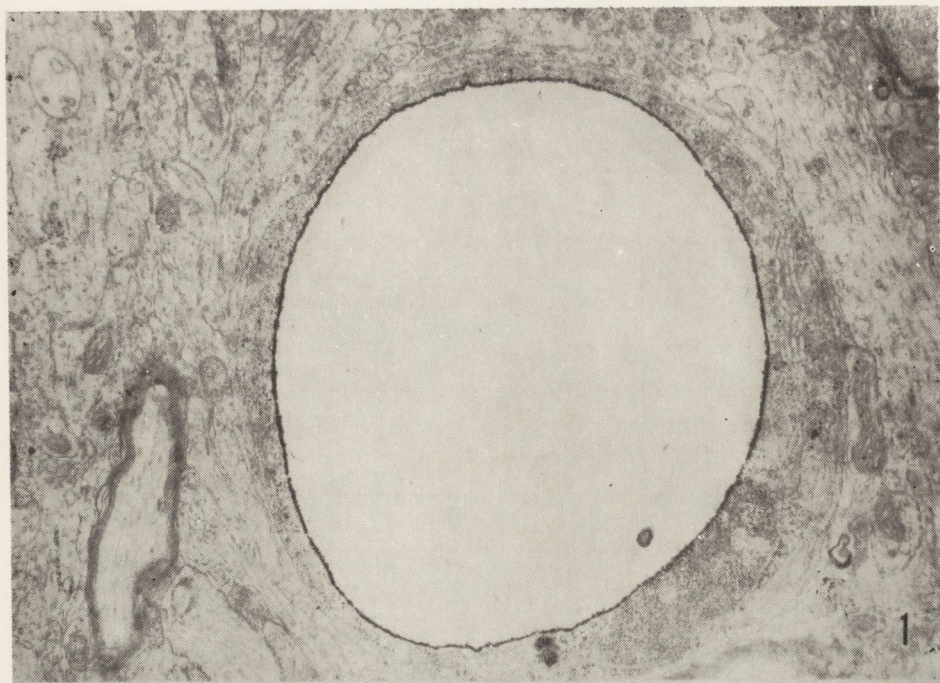
Fig. 1. Control. Capillary vessel from the cerebral cortex. Endothelial cells regularly covered with the surface coat. × 11.000.

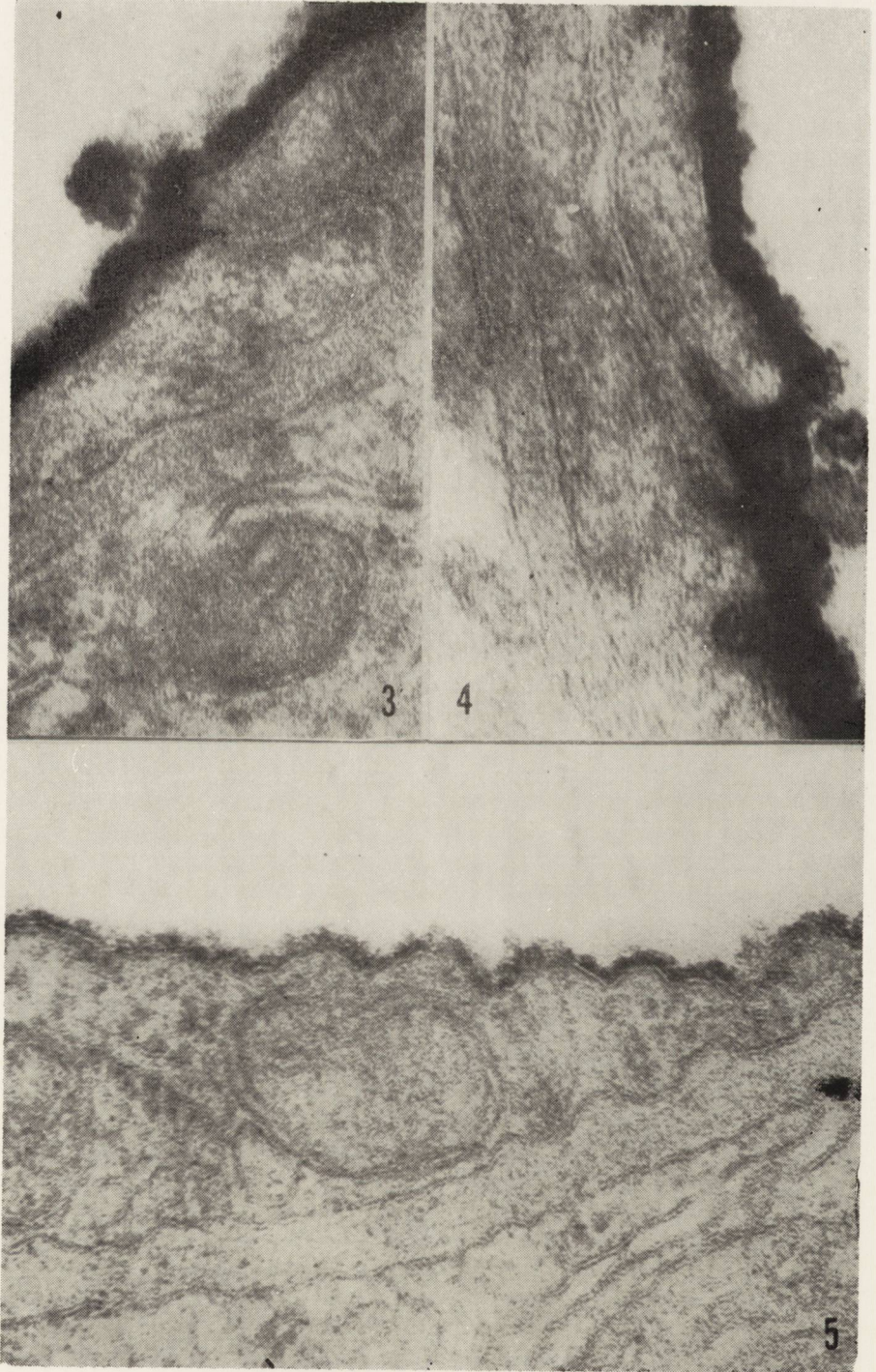
Ryc. 2. Grupa I (napady gromadne). Fragment ściany włosniczki. Reakcja rutenododatnia na powierzchni komórki śródbłonkowej. Pow. 90.000 ×.

Fig. 2. Group I (collective fits). Part of the capillary wall. Ruthenium red-positive reaction on the surface of endothelial cell. × 90.000.

Ryc. 3. Grupa II (1 napad dziennie przez 40 dni). Pogrubiała płaszcz powierzchniowy na komórkach śródbłonkowych. Ścisłe połączenie dochodzi do błony podstawnej i w części bliższej światła naczynia jest wypełnione produktem reakcji. Pow. 90.000 ×.

Fig. 3. Group II (1 fit daily for 40 days). Thickened surface coat on the endothelial cells. Tight junction reaching basal membrane; its part nearest to the lumen filled with the reaction product. × 90.000.





OMÓWIENIE

Dotychczasowe badania mikroskopowo-elektronowe ukazywały zazwyczaj „barierę naczyniowo-mózgową” jako kilkuwarstwowy filtr metaboliczny (Gabryel 1973, Reese, Karnovsky 1967). Zastosowana przez nas technika dla ujawnienia kompleksów wielocukrowcowych potwierdziła wykazane już poprzednio istnienie ciągłej otoczki na powierzchni komórek śródbłonkowych (Groniowski 1970; Lehninger 1968; Rosenfeld i wsp. 1973), która jest uważana za pierwszy i najważniejszy filtr metaboliczny bariery komórkowej, czynny immunologicznie.

Najwyraźniejsze zmiany obserwowano w drugiej grupie doświadczalnej stanowiącej model padaczki przewlekłej. U zwierząt tej grupy w pasmie śródbłonkowym od strony światła włósniczek wzrastała ilość pęcherzyków mikropinocytarnych. System transportu pinocytarnego, analogicznie do systemu mikrokanalików w barierach naczyniowych innych narządów, jest uważany za drogę patologicznego transportu w obręku mózgu (Hirano 1969, 1970, Olędzka-Słotwińska 1972; Gabryel 1973; Gładysz 1974). Czerwień rutenowa zastosowana w naszych badaniach wypełniała bądź „tapetowała” powstające pęcherzyki. Widywano również uformowane wakuole pinocytarne, zawierające czerwień rutenową, odsznurowane od powierzchni błony komórkowej.

Odrębne zagadnienie stanowią ściśle połączenia międzykomórkowe. W stanach fizjologicznych są one przepuszczalne dla znaczników transportu komórkowego takich jak peroksydaza tylko u noworodków, natomiast w organizmach dorosłych stanowią połączenia ściśle (Baker i wsp. 1971; Gabryel, Biczysko 1973; Reese, Karnovsky 1967). W badanym materiale połączenia komórek śródbłonkowych były otwarte tylko w częściach przylegających do światła naczynia, umożliwiając czerwieni rutenowej uwidocznienie substancji powierzchniowo czynnej.

Stan płaszczka powierzchniowego jest ściśle powiązany z czynnością błony komórkowej. Z wykonanych pomiarów wynika, że po przewlekłych napadach drgawkowych grubość płaszczka powierzchniowego zwiększała się niekiedy trzykrotnie w porównaniu do kontroli. Wskazuje to na ist-

Ryc. 4. Grupa II. Błona cytoplazmatyczna komórki śródbłonkowej otoczona płaszczem powierzchniowym. Czerwień rutenowa penetruje na niewielką głębokość w obręb szczeliny międzyśródbłonkowej. Pęcherzyk wypełniony materiałem rutenododatnim. Pow. 90.000 \times .

Fig. 4. Group II. Cytoplasmic membrane of the endothelial cell covered with the surface coat. Ruthenium red penetrates the interendothelial fissure to some depth. Pinocytotic vesicle filled with ruthenium red-positive material. \times 90.000.

Ryc. 5. Grupa III (Dekapitacja w 60 dni po 40 tym napadzie). Płaszcz powierzchniowy otaczający komórkę śródbłonkową nie wykazuje zmian grubości. Pow. 90.000 \times .

Fig. 5. Group III (decapitation 60 days after the 40th fit). Surface coat covering endothelial cell without changes in its thickness. \times 90.000.

nienie zależności pomiędzy jego obrazem morfologicznym a stanem czynnościowym komórek (Groniowski i wsp. 1974; Rosenfeld i wsp. 1973; Santer 1974).

W trzeciej grupie doświadczalnej grubość płaszczka powierzchniowego nie różniła się od normy. Wydaje się, iż okres 60 dni od ostatniego napadu padaczkowego był wystarczający dla wyrównania się zaburzeń wywołanych przez powtarzające się wyładowania drgawkowe. Podobną zależność wykazano dla bariery kłębkowej nerki, gdzie przy zmianach przepuszczalności błony komórkowej podocytów następowało wyraźne pogrubienie płaszczka, natomiast w okresie powrotu do stanu pierwotnego płaszczek wyraźnie zmniejszał swe wymiary (Groniowski i wsp. 1974).

Najmniejsze zmiany w budowie płaszczka powierzchniowego zaobserwowano w pierwszej grupie doświadczalnej, tj. po napadach gromadnych. Połączenia ściśle były dobrze zachowane i nie przepuszczały czerwieni rutenowej. Wg Groniowskiego i wsp. (1974) przy krótkotrwałym działaniu czynnika patogenicznego, nawet o znacznym nasileniu — nie zdążą wykształcić się statystycznie znamienne zmiany w grubości płaszczka powierzchniowego. Ten fakt może tłumaczyć brak zmian grubości płaszczka powierzchniowego w grupie zwierząt po gromadnych napadach padaczkowych.

Bondereff (1967) oraz Tani i Ametani (1970, 1971) stosując imersyjne utrwalanie w roztworze czerwieni rutenowej uwidocznili w przestrzeniach międzykomórkowych pomiędzy wypustkami astrocytów obecność kwaśnych mukopolisacharydów. W przebadanym materiale nie obserwowaliśmy swobodnego przechodzenia użytego znacznika do przestrzeni międzykomórkowych.

WNIOSKI

1. Doświadczalne audiogenne napady padaczkowe u myszy prowadzą do wystąpienia zmian mikroskopowo-elektronowych w obrębie płaszczka powierzchniowego śródbłonek włośniczek mózgowych, wykrywalnych przy użyciu czerwieni rutenowej.

2. Stwierdzone nieprawidłowości mają charakter odwracalny i wyrażają się przede wszystkim zwiększeniem grubości płaszczka powierzchniowego.

3. Seria napadów wywołanych w ciągu jednego dnia nie powodowała zmian, natomiast pojedyncze napady drgawkowe stosowane przewlekłe, prowadzą do zwiększenia grubości płaszczka powierzchniowego, które można traktować jako reakcję na działanie czynnika patogenicznego.

М. Вальски, Д. Петров

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ
АУДИОГЕННЫХ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИПАДКОВ У МЫШЕЙ
НА СОСТОЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЩА ЭПИТЕЛИЯ
МОЗГОВЫХ КАПИЛЛЯРОВ

Резюме

Целью работы являлась оценка изменений в поверхностном плаще эпителия мозговых капилляров под влиянием эпилептических припадков. Исследования были проведены на мышях линии с генетически обусловленной аудиогенной эпилепсией. Поверхностный плащ метили рутениевым красным.

Самые значительные изменения были обнаружены у животных, у которых вызывались припадки каждый день в течение 40 дней (модель хронической эпилепсии). Они сводились к значительному утолщению поверхностного плаща.

У мышей, у которых было вызвано 8 эпилептических припадков с интервалами в $1/2$ часа (модель повторяющихся припадков) не наблюдались изменения в строении и в толщине поверхностного плаща.

У мышей, которые после 40 припадков, вызываемых ежедневно, прожили 60 дней, также было обнаружено утолщение поверхностного плаща. Это указывает на обратимость этих изменений с течением времени.

M. Walski, D. Pietrow

ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATIONS ON THE EFFECT
OF AUDIOGENIC EPILEPTIC FITS ON THE SURFACE COAT OF CEREBRAL
CAPILLARIES ENDOTHELIUM IN MICE

Summary

The aim of the study was to assess the changes in the surface coat of the cerebral capillaries endothelium caused by the epileptic fits. The study was performed on the mice from the strain genetically conditioned with the audiogenic epilepsy. Surface coat was marked with ruthenium red.

In animals with daily evoked epileptic fit for 40 days (chronic epilepsy model) the changes were most prominent. They were expressed by the marked thickening of the surface coat. In mice with eight epileptic fits evoked every half an hour (collective fits model) there were no changes neither in the structure nor concerning the thickness of the surface coat. Mice after one fit evoked daily for 40 consecutive days left to survive for 60 days also did not show any thickening of the surface coat. The observation points out at the possible regression of the changes.

PISMIENNICTWO

1. Bailey G. T., Smith E.: Functions of glial cells. The Central nervous system. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1968.
2. Baker R. N., Cancilla P. A., Frommes S. P.: The movement of exogenous protein in experimental cerebral oedema. J. Neuropath. exp. Neurol. 1971, 30, 668—679.

3. Bondareff W.: An intercellular substance in rat cerebral cortex. Submicroscopic distribution of ruthenium red. *Anat. Rec.* 1967, 157, 527—536.
4. Gabryel P.: Bareira krew-mózg, struktura i funkcja. *Pat. Pol.* 1973, 24, 217—235.
5. Gabryel P., Biczysko W.: The permeability of cerebral capillaries of the newborn rabbits by means of peroxidase as a tracer. *Acta Morph. Hung. Supl.* 1973, 14.
6. Gładysz J.: Wpływ działania promieni X na obraz morfologiczny i stan czynnościowy naczyń ośrodkowego układu nerwowego myszy. *Roczniki Akademii Medycznej w Poznaniu.* 1974, 8, 45—76.
7. Groniowski J.: Extraneous coat of the plasma membrane. W: *Die heutige Stellung der Morphologie in Biologie und Medizin, Int. Symp. H. L. Kettler, Akademie Verl.* 1970, 175—187.
8. Groniowski J., Biczysko W., Walski M.: Electron microscopic studies on the surface coat of renal podocytes in albinic rats. *Lab. Invest.* 1974, 30, 58—63.
9. Hirano A., Becker N. H., Zimmerman H. M.: Pathological alterations in the cerebral endothelial cell-barrier to peroxidase. *Arch. Neurol.*, 1969, 20, 300—308.
10. Hirano A., Dembitzer H. M., Becker N. H., Levine S., Zimmerman H. M.: Fine structural alterations of the blood-brain barrier in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1970, 29, 432—440.
11. Ito S.: Structure and function of glycocalyx. *Fed. Proc. USA*, 1969, 28, 12—25.
12. Karnovsky M. J.: A formaldehydeglutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 1965, 27, 137 A.
13. Karnovsky M. J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studies with peroxidase as a tracer. *J. Cell. Biol.* 1967, 35, 213—226.
14. Lehninger A.: The neuronal membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 1968, 60, 1069—1080.
15. Luft J. H.: Ruthenium red and violet. I Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 1971a, 171, 347—368.
16. Luft J. H.: Ruthenium red and violet. II Fine structural localisation in animal tissues. *Anat. Rec.* 1971b, 171, 369—416.
17. Martinez-Palomo A.: The surface coat of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 1970, 29, 29—71.
18. Markiewicz D., Ostrowska D.: Postictal changes in the brain of mice with the audiogenic epilepsy. *Proc. VII Int. Cong. Neuropath. Budapest*, 1975, 2, 7—10.
19. Markiewicz D., Dymecki J.: Dynamika zmian morfologicznych w mózgu myszy z padaczką audiogeną po wywołanych doświadczalnie gromadnych napadach drgawkowych. *Neuropatol. Pol.* 1976, w druku.
20. Merker H. J., Günter Th.: Die elektronmikroskopische Darstellung von Glycosaminoglykanen im Gewebe mit Rutheniumrot. *Histochemie* 1973, 43, 293—303.
21. Olędzka-Słotwińska H.: Ultrastruktura a przepuszczalność barier tkankowych. Badanie w mikroskopie elektronowym z zastosowaniem wyznaczników cytochemicznych. *Ann. Acad. Med. Stetinensis. Supl.* 1972, 15.
22. Purpura D. P., Penry J. K., Tower D., Woodbury D. M., Walter A.: Audiogenic seizures. W: *Experimental models of epilepsy. Amsterdam North-Holland Publ.* 1972.
23. Reese T. S., Karnovsky M. J.: Structural localisation of D-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 1967, 34, 202—217.

24. Rosenfeld C., Paintrand M., Chaoguet C., Yenaut A. M.: Cyclic variations in the ruthenium red stained coat of cells from a synchronized human lymphoblastoid line. *Exp. Cell. Res.* 1973, 79, 365—417.
25. Santer V.: The surface coat on mouse lymphocytes. *Proc. VIII Int. Congr. on Electron Microscopy, Canberra 1974*, 242—243.
26. Schultz R. L., Karlsson U. L.: Brain extracellular space and membrane morphology variations with preparative procedures. *J. Cell. Sci.* 1972, 10, 181—195.
27. Tani E., Ametani T.: Substructure of microtubules in brain nerve cells as revealed by ruthenium red. *J. Cell. Biol.* 1970, 46, 159—165.
28. Tani E., Ametani T.: Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in cerebral cortex. *J. Ultrastr. Res.* 1971, 34, 1—14.
29. Thoenes W., Langer K. H., Paul B.: In vivo Markierung der Glykokaly des Säugernephrosis mit Meeretichperoxydase. *Cytobiologie* 1972, 6, 487—491.
30. Wallach D. H.: *The plasma membrane: dynamic perspectives, genetics and pathology.* Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1972.
31. Walski M.: Ultrastructure studies on the glomerular barrier in physiologic and pathologic conditions. *Ann. Rep. Inst. Virus Res. Kyoto University*, 1972, 15, 1—8.
32. Whittam R., Wheeler K. P.: Transport across cell membranes. *J. Gen. Phys.* 1970, 21—60.

Adres autorów: Instytut Biostruktury AM, Warszawa, ul. Chałubińskiego 5.

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W roku 1975 odbyło się 9 posiedzeń naukowych SNP. Tematyka ich była następująca:

1) 1975 — dnia 1.II.1975

- P. Kleihues (Max-Planck-Institut für Hirnforschung), Kolonia, RFN.
Chemical carcinogenesis in the nervous system.
- H. Kroh, G. Szumańska (Zespół Neuropatologii CMDiK PAN).
Kwaśne i obojętne mukopolisacharydy w doświadczalnych guzach mózgu u myszy.

2) 1975 — dnia 1.III.1975

- Dyskusja przy mikroskopach, zorganizowana przez Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (omówienie trzech przypadków).

3) 1975 — dnia 20—22.III.1975

- III Konferencja Neuropatologiczna Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich na temat „Patologia mieliny ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego” (Przedstawiono 64 referaty, w tym 44 z ośrodków polskich, 20 z zagranicznych).

4) 1975 — dnia 3.V.1975

- M. Sikorska (Zespół Neuropatologii CMDiK PAN).
Aktywność cyklazy adenylowej w różnych modelach niedotlenienia mózgu szczura.
- A. Jędrzejewska-Iwanowska, J. Orłowska (Zakład Anatomii Patologicznej Szpitala Bielańskiego).
Złośliwy oponiak z przerzutami do narządów wewnętrznych.
- D. Markiewicz (Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa).
Przypadek *mesotheliomatosis meninguum* pochodzenia opłucnowego.

5) 1975 — dnia 17.V.1975

- J. Fankhauser (Instytut Neurologii Porównawczej, Berno, Szwajcaria).
Patologia chorób układu nerwowego zwierząt.

6) 1975 — dnia 31.V.1975

- A. Nieuwonhyzen Kruseman (Pathologisch Laboratory, Leiden, Holandia).
The results of immunoperoxidase technique to demonstrate hormone producing cells in the pituitary gland and in pituitary adenomas.

c.d. na str. 346

LUBOMIRA DYDYK, MARIA DĄMBSKA, TADEUSZ SZRETER

WPLYW HYPEROKSJI NA DOJRZEWAJĄCY MÓZG KRÓLIKA

II. ZMIANY PÓZNIJSZE

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk

Kierownik Zespołu: prof. dr med. M. J. Mossakowski
Oddział Intensywnej Terapii i Reanimacji Szpitala Klinicznego
im. prof. M. Michałowicza w Warszawie

Kierownik Oddziału: doc. dr med. T. Szreter

W poprzednich badaniach wykazano, że krótkotrwała (6-godzinna) hyperoksja (91,5% tlenu) prowadzi u noworodka królika do wystąpienia zmian w mózgu. Po dłuższym (24-godzinnym) działaniu nadmiaru tlenu ujawniają się zmiany w płucach, którym towarzyszy nasilenie nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym (Dydyk i wsp. 1976).

Celem tej pracy jest zbadanie jak kształtują się zmiany w elementach strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego po dłuższym przeżyciu zwierząt poddanych hyperoksji.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 35 noworodkach króliczych, z których 24 poddano w pierwszym dniu życia działaniu 6-godzinnej lub 24-godzinnej hyperoksji (91,5%), a pozostałych 11 stanowiło grupę kontrolną. Dokładny opis doświadczenia podano w poprzedniej pracy (Dydyk i wsp. 1976). W 8 lub 16 dniu po doświadczeniu pobierano wycinki do badań histologicznych i ultrastrukturalnych z kory ruchowej mózgu, z opuszki na poziomie oliw dolnych i z płuc.

Wyniki badania w mikroskopie świetlnym

W mózgach i w płucach zwierząt poddanych 6-cio godzinnej hyperoksji nie obserwowano uszkodzeń ani w 8-mym ani w 16-tym dniu po doświadczeniu.

W mózgach i w płucach zwierząt poddanych 24 godzinnej hyperoksji, w 8 dniu po doświadczeniu nie stwierdzono zmian. W 16 dniu po 24-godzinnej hyperoksji w korze mózgu (głównie w V warstwie), w zwojach podstawy i w pniu mózgu obserwowano rozsiane ubytki neuronalne. Ubytkom towarzyszyły uszkodzenia neuronów, wśród których znajdowano komórki obkurczone lub o różnej barwliwości. W porównaniu z grupą kontrolną liczniejsze były ciemne neurony tzw. „dark neurons” (ryc. 1). Kora mózgu w całości sprawiała wrażenie lekko przerzedzonej (ryc. 2).

W tej grupie w płucach stwierdzono w świetle pęcherzyków obecność płynu i krwinek czerwonych (ryc. 3), nierównomierne, znaczne pogrubienie ścian naczyń i pojedyncze krwotoczki okołonaczyniowe.

Wyniki badań w mikroskopie elektronowym

Grupa po 6 godzinnej hyperoksji. W ósmym dniu po doświadczeniu, w cytoplazmie neuronów i astrocytów stwierdzono małą liczbę wolnych rybosomów i dobrze rozwiniętą siatkę szorstką, której kanały były nieznacznie poszerzone (ryc. 5). Pojedyncze mitochondria były ciemne i obkurczone, większość nie wykazywała zmian. W korze mózgu spotykano nieliczne cienkie osłonki mielinowe, których grubość i układ bla-

Ryc. 1. Kora mózgu 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Liczne ciemne neurony i ubytki komórkowe w V warstwie kory. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Cerebral cortex of 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Numerous dark neurons and loss of cells in the V cortical layer. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 2. Kora mózgu 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Rozsiane ubytki komórkowe. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 2. Cerebral cortex of 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Dispersed cellular loss. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 3. Miąższ płucny 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Wysiłek i krwinki w świetle pęcherzyków. H—E. Pow. 200 ×.

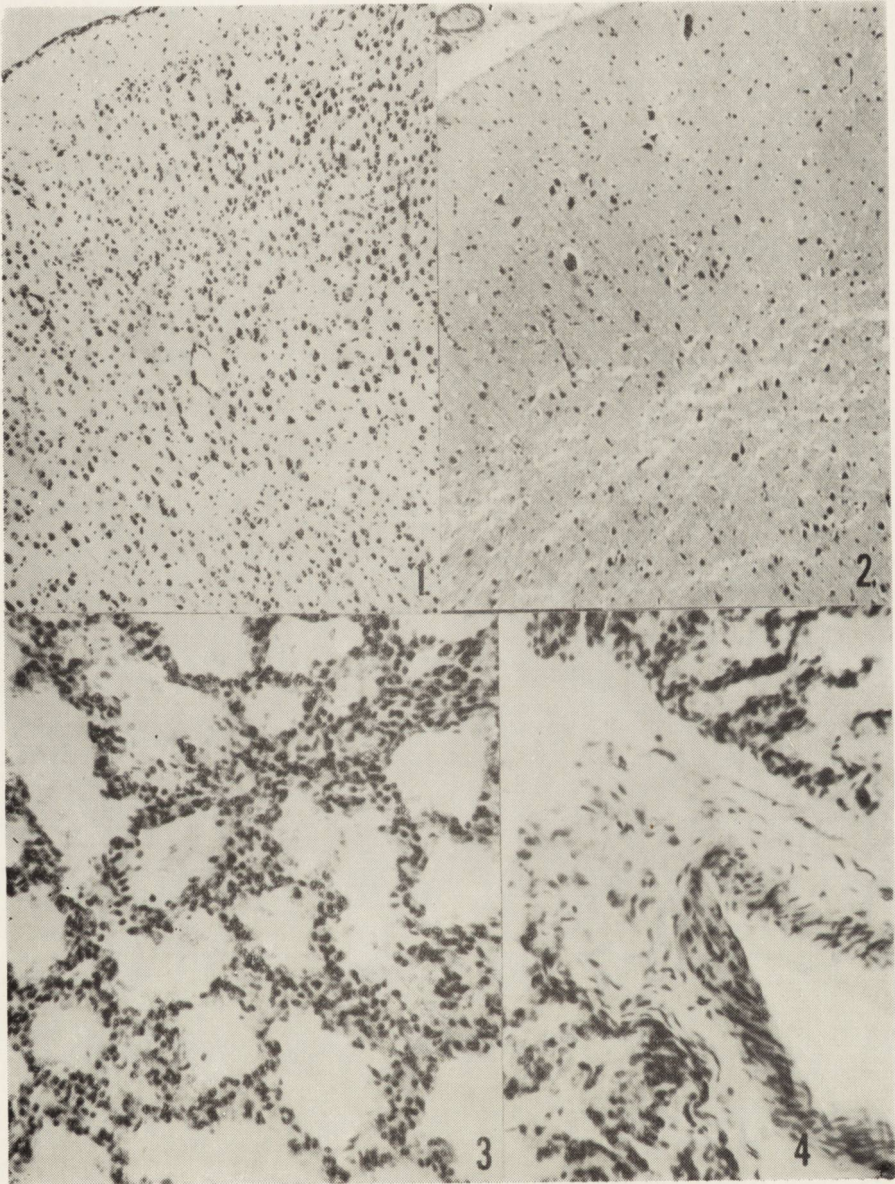
Fig. 3. Pulmonary parenchyma of 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Exudation and red blood cells in the follicles. H—E. × 200.

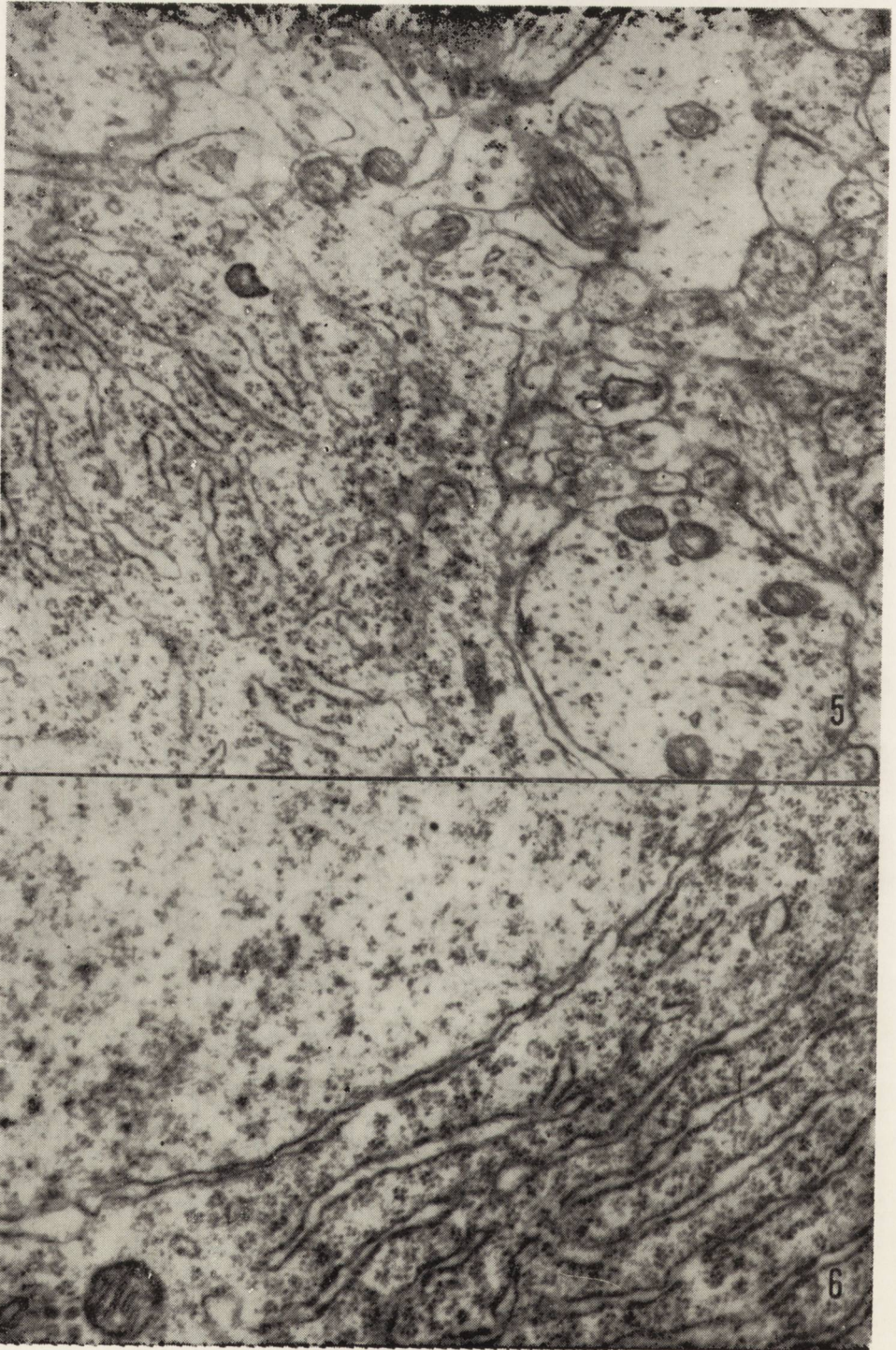
Ryc. 4. Tętnica w miąższu płucnym 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Znacznie pogrubiała przydanka naczyń. H—E. Pow. 200 ×.

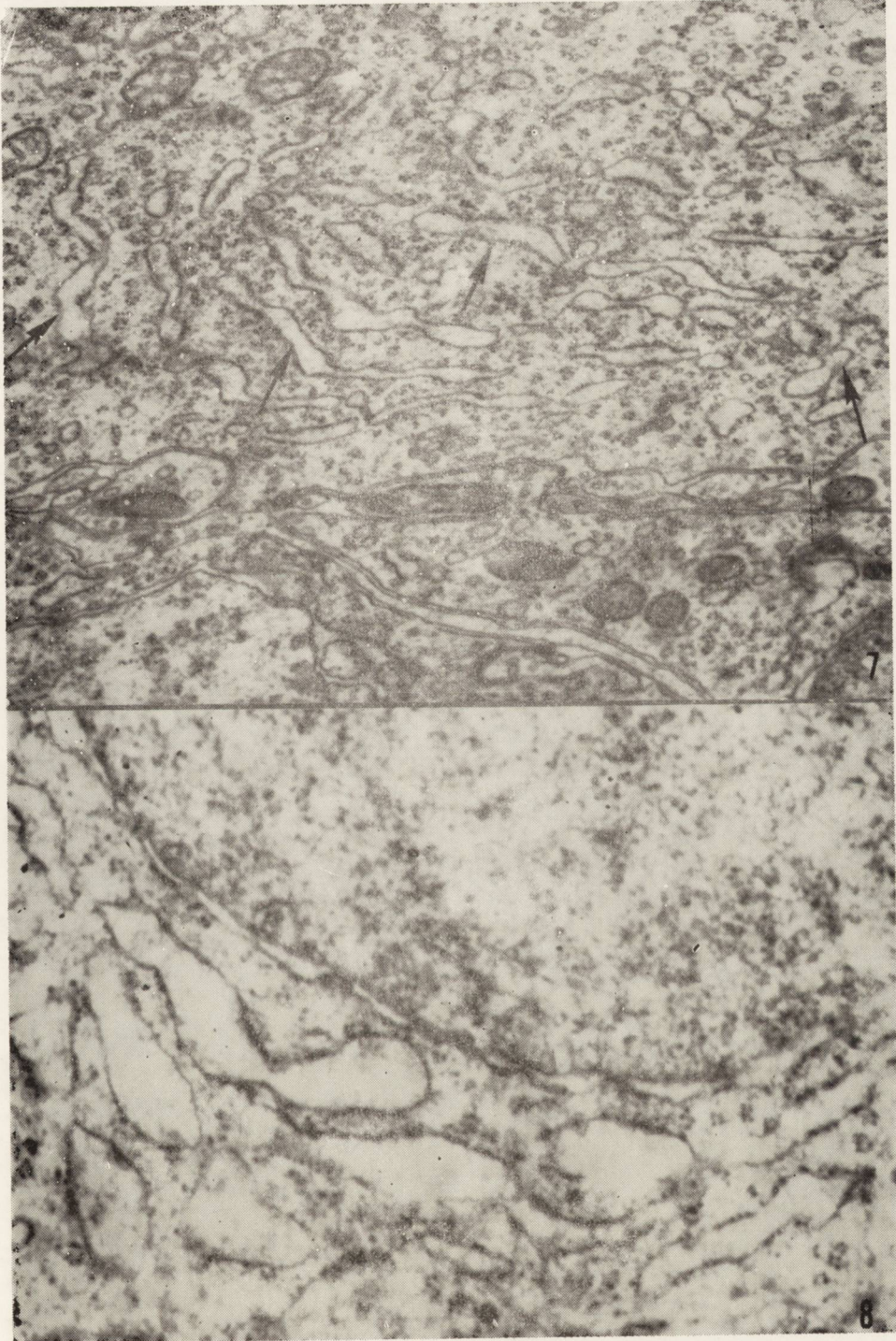
Fig. 4. The artery in the parenchyma of the lungs of 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Marked thickening of adventitia. H—E. × 200.

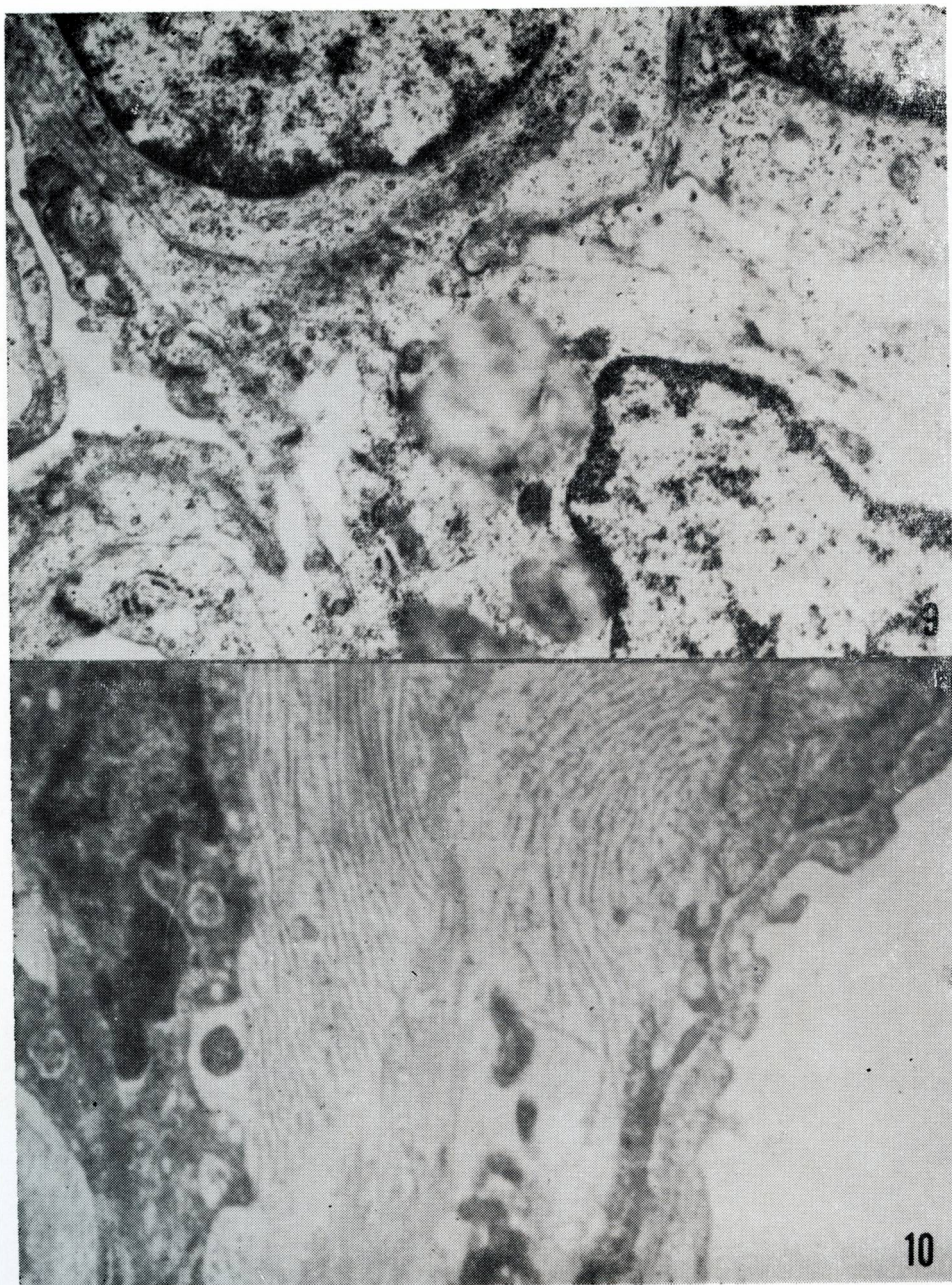
Ryc. 5. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej z dużą liczbą wolnych rybosomów i z dobrze rozwiniętą szorstką siatką śródplazmatyczną, której kanały wykazują nieznaczne poszerzenie. Pień mózgu 8-dniowego królika po 6 godz. hyperoksji. Pow. 24.000 ×.

Fig. 5. Fragment of the neuronal cytoplasm with numerous free ribosomes and well developed rough endoplasmic reticulum; its channels are slightly dilated. Brain stem of 8 days old rabbit after 6 hours hyperoxia. × 24.000.









szek nie odbiegały od normy. W wypustkach komórek astrocytarnych stwierdzano niekiedy obecność ziaren glikogenu.

W 16 dniu po doświadczeniu, stopień dojrzałości komórek nerwowych i glejowych odpowiadał normie. W komórkach tych nie stwierdzono zmian (ryc. 6). Osłonki mielinowe zarówno opuszki jak i kory mózgu ilościowo i jakościowo nie różniły się od normy. Złogów glikogenu nie stwierdzono.

W płucach, zarówno w 8 jak i 16 dniu po doświadczeniu, bariera powietrze-krew i przegrody międzypecherzykowe były niezmienione.

Grupa po 24 godzinnej hyperoksji. W 8 dniu po doświadczeniu obrazy mikroskopowo-elektronowe nie wykazywały różnic w stopniu dojrzałości komórek nerwowych i glejowych w porównaniu z 8-dniową grupą kontrolną. W komórkach nerwowych i komórkach astrogleju stwierdzono rozdęcie kanałów siatki szorstkiej i obrzmienie mitochondriów (ryc. 7). Liczba, grubość i układ blaszek w osłonkach mielinowych w korze mózgu i w opuszce nie odbiegały od normy.

W 16 dniu po doświadczeniu zmiany ilościowe wolnych rybosomów i siatki szorstkiej w cytoplazmie komórek nerwowych i astrocytów odpowiadały zmianom ilościowym tych organelli w komórkach grupy kon-

Ryc. 6. Fragment komórki nerwowej w pniu mózgu 16-dniowego królika po 6 godz. hyperoksji. Bez zmian. Pow. 24.000 ×.

Fig. 6. Fragment of the neuron in the brain stem of 16 days old rabbit after 6 hours hyperoxia. No changes. × 24.000.

Ryc. 7. Pień mózgu 8-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej z dobrze rozwiniętą kolbowato poszerzoną szorstką siatką śródplazmatyczną i obrzmiałymi mitochondriami. Pow. 24.000 ×.

Fig. 7. Brain stem of the 8 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Fragment of the neuron with well developed, locally distended rough endoplasmic reticulum and with swollen mitochondria. × 24.000.

Ryc. 8. Pień mózgu 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Fragment komórki nerwowej z balonowato rozdętymi kanałami szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Pow. 64.000 ×.

Fig. 8. Brain stem of 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. Fragment of the neuron with balloon-like distended channels of rough endoplasmic reticulum. × 64.000.

Ryc. 9. Komórka mezenchymalna z kulami tłuszczu w cytoplazmie w przegrodzie międzypecherzykowej płuca 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Pow. 24.000 ×.

Fig. 9. Mesenchymal cell containing fat in the interfollicular septum of the 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. × 24.000.

Ryc. 10. Liczne włókna kolagenowe pomiędzy wyściółką śródbłonkową i nabłonkową bariery powietrze-krew w płucu 16-dniowego królika po 24 godz. hyperoksji. Pow. 24.000 ×.

Fig. 10. Numerous collagen fibres between endothelial and epithelial layer of the air-blood barrier in the lung of the 16 days old rabbit after 24 hours hyperoxia. × 24.000.

tolnej. W cytoplazmie tych komórek występowało równomierne poszerzenie lub kolbkowate rozdęcia siatki szorstkiej (ryc. 8). Obserwowano w nich liczne obrzmiałe mitochondria. Ilość i grubość osłonek mielino-
wych w korze i opuszce nie różniły się od normy.

W płucach, w przegrodach międzypęcherzykowych stwierdzono obecność komórek mezenchymalnych z kulami tłuszczowymi w cytoplazmie (ryc. 9). Pomędzy wyściółką śródbłonkową a wyściółką nabłonkową bariery powietrze-krew stwierdzono liczne włókna kolagenowe (ryc. 10).

OMOWIENIE

Przedstawione wyniki badań stanowiły podstawę do uzupełnienia wniosków z I części pracy, dotyczących wpływu hyperoksji na rozwijający się mózg królika i potwierdziły uszkadzające działanie hyperoksji na mózg poprzez niedotlenienie.

Charakter ultrastrukturalnych zmian w mózgu, podobnie jak w I-szej części naszej pracy, odpowiadał obrazom mikroskopowo-elektronowym obserwowanym przez Brown'a i Brierley'a (1972) oraz Ju i wsp. (1972a, 1972b) u zwierząt poddanych hypoksji i ischemii.

W mózgach zwierząt poddanych działaniu 6-godzinnej hyperoksji, w 8 dniu po doświadczeniu obserwowano niewielkie zmiany ultrastrukturalne. W 16 dniu po doświadczeniu nie stwierdzono nieprawidłowości ultrastrukturalnych. W tej grupie płuca nie wykazywały zmian.

Po 24-godzinnej hiperoksji, w 8 dniu po doświadczeniu zmiany w mózgu były znacznie bardziej nasilone w porównaniu z grupą poprzednią i w 16 dniu wyraźnie narastały. W tej grupie w płucach występowały zmiany wytwórcze w postaci zwłóknienia przegród międzypęcherzykowych i obecności kolagenu w błonie podstawnej bariery powietrze-krew.

Podobne zmiany w płucach u osobników dorosłych poddanych działaniu przedłużonej hyperoksji obserwowali Cederberg i wsp. (1965), Fuson i wsp. (1965), Joffe i Simon (1969), a u dzieci — Northway i Rosan (1968), Burrows i Edwards (1970), Anderson i Strickland (1971), Anderson i wsp. (1973).

Współzależność zmian w mózgu i w płucach była przedmiotem badań Browna i Coxa (1966) oraz Beana i wsp. (1966), którzy wykazali, że leki wywołujące drgawki (metrazol, picrotoxin) wywołują w płucach zmiany podobne do stwierdzanych w hyperoksji. Badania te sugerowały, że uszkodzenia płuc w następstwie napadów drgawkowych jak i w hyperoksji są spowodowane zaburzeniami czynnościowymi układu wegetatywnego. Do podobnych wniosków doszli Mc Sherrn i Veith (1968), któ-

rzy uważali, że w hyperoksji pobudzenie układu sympatycznego prowadzi do zmian w płucach. Wpływ układu sympatycznego na powstawanie zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w hyperoksji wykazali Kanai i wsp. (1973), którzy podając tlen pod ciśnieniem 2 atmosfer obserwowali zmniejszenie przepływu krwi w tętnicy szyjnej wspólnej, wewnętrznej i zewnętrznej. Hernandez i wsp. (1972) nie stwierdzili zaburzeń autoregulacji krążenia krwi w mózgu zarówno w przypadkach z zachowanym unerwieniem sympatycznym jak i po odnerwieniu. Sugerowało to dominującą rolę CO₂ w procesie autoregulacji krążenia mózgowego. Raichle i Stone (1972) badając wpływ hyperkapnii na krążenie krwi w mózgu stwierdzili, że wysokie pCO₂ w krwi tętniczej prowadzi do zmian pH w otaczającej tkance nerwowej. Według Eklofa i wsp. (1972) wysokie pO₂ w krwi żyłnej w mózgu sprzyja zakwaszeniu otaczającej tkanki nerwowej i zaburza jej metabolizm.

W świetle przedstawionych badań można przyjąć, że uszkodzenia mózgu i płuc stwierdzone w naszym materiale kształtowały się w następujący sposób: u zwierząt po 6-godzinnym podawaniu nadmiaru tlenu brak zmian ultrastrukturalnych w płucach wykluczał wpływ asfiksji na zmiany obserwowane w mózgu i sugerował niedotlenienie ischemiczne spowodowane skurczem naczyń tętniczych. U zwierząt po 24-godzinnym podawaniu tlenu uszkodzenie bariery powietrze-krew w płucach prowadziło do niedotlenienia hypoksemicznego mózgu, które nakładało się na niedotlenienie ischemiczne.

W warunkach, w których działaniu hyperoksji poddano rozwijający się układ nerwowy powstało pytanie, jaki był jej wpływ na przebieg dojrzewania tkanki nerwowej? Badania Grave'a i wsp. (1972) wykazały, że stałe podawanie noworodkom szczurzym przez 9 pierwszych dni życia 70—80% tlenu w warunkach ciśnienia atmosferycznego, powoduje zahamowanie wzrostu mózgu. Autorzy ci stwierdzili, że nagromadzenie DNA, RNA i białek, które towarzyszy procesowi wzrostu, ulegało zmniejszeniu, podczas gdy stosunek RNA/DNA i białko/DNA pozostawał niezmieniony. Obniżenie zawartości DNA przy zachowanych stosunkach RNA/DNA i białko/DNA, świadczyło o hamującym wpływie nadmiaru tlenu na rozwój elementów strukturalnych tkanki nerwowej.

W naszych badaniach, obrazy mikroskopowo-elektronowe kory mózgu i opuszki królików 8-dniowych i 16-dniowych wykazywały prawidłowo postępujący przebieg dojrzewania komórek nerwowych i glejowych mózgu. Ubytki neuronalne obserwowane w 16 dniu po przedłużonej hyperoksji, sugerują jednak możliwość ujawnienia się stwierdzonych uszkodzeń w dalszych okresach rozwoju mózgu.

WNIOSKI

1. Krótkotrwałe podawanie tlenu w nadmiarze prowadzi do niedotlenienia mózgu, bez uszkodzenia bariery powietrze-krew w płucach.

2. Przedłużona hyperoksja uszkadza barierę powietrze-krew w płucach i powoduje niedotlenienie mózgu typu hypoksyjnego.

3. Współistnienie zmian w mózgu i płucach w hyperoksji prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń obu narządów co może wpływać na dalszy rozwój mózgu.

L. Dydyk, M. Dombska, T. Шретер

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРОКСИИ НА СОЗРЕВАЮЩИЙ МОЗГ КРОЛИКА

II. Поздние изменения

Резюме

Работа посвящена изучению патомеханизма гипоксии, которая вызывает нарушения в созревающем организме, подвергнутом воздействию гипероксии. Для исследований было использовано 35 новорожденных кроликов, из которых 24 были подвергнуты кратковременной (6 часовой) или продленной (24 часовой) гипероксии; 11 кроликов составляло контрольную группу. Материал для морфологических исследований (в оптическом и электронном микроскопах) брали из коры мозга, продолговатого мозга и легких на 8-ой и 16 день жизни. Проведенные исследования показали, что:

1) кратковременная гипероксия ведет к гипоксии мозга без нарушения в легких барьера воздух-кровь,

2) продленная гипероксия повреждает в легких барьер воздух-кровь и вызывает гипоксию мозга гипоксийного типа,

3) наличие изменений при гипероксии одновременно в мозге и в легких ведет в конечном итоге к необратимым повреждениям обоих органов,

4) избыток кислорода непосредственно не нарушает динамику развития мозга, но влияет на нее путем необратимых повреждений.

L. Dydyk, M. Dąmbska, T. Szreter

EFFECT OF HYPEROXIA ON THE DEVELOPING RABBIT BRAIN

II. Later Changes

Summary

This work deals with the pathomechanism of anoxia which damages the developing organism, submitted to the action of hyperoxia. From 35 newborn rabbits used to the experiments, 24 were submitted to short (6 hours) or longer (24 hours) hyperoxia during first day of life, while 11 constituted the control group. The material for morphological studies (in light and electron microscope) was collected from the cerebral cortex, medulla and the lungs, on the 8th and 16th day of life. The studies demonstrated the following:

1) Short hyperoxia leads to brain anoxia, without damaging the air-blood barrier in lungs.

2) Prolonged hyperoxia damages the air-blood barrier in lungs and produces brain anoxia of the hypoxic type.

3) The coexistence of brain and lung changes during hyperoxia leads finally to irreversible damage of both organs.

4) Excess of oxygen has no direct altering effect on the dynamics of brain development, but influences it through irreversible damage.

PÍSMIENICTWO

1. Anderson W. R., Strickland M. B., Tsai S. H., Haglin J. J.: Light Microscopic and Ultrastructural Study of the Adverse Effects of Oxygen Therapy on the Neonate Lung. *Am. J. Pathol.* 1973, 73, 327—349.
2. Anderson W. R., Strickland M. B.: Pulmonary Complications of Oxygen Therapy in the Neonate. *Arch. Path.* 1971, 91, 506—514.
3. Bean J. W., Zea D., Thom B.: Pulmonary changes in convulsions induced by drugs and oxygen at high pressures. *J. Appl. Physiol.* 1966, 21, 865—872.
4. Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischaemic cell change in rat brain—light microscopic and fine structural observations. *J. Neurol. Sci. (Amst.)* 1972, 16, 59—84.
5. Brown J. W., Cox D. G.: Role of the central nervous system and pulmonary damage as cause of respiratory failure in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Proc. of the Third Int. Conf. on Hyperbaric Med.* Washington, 1966, p. 89—96.
6. Burrows F. G. O., Edwards J. M.: A pulmonary disease in patients ventilated with high oxygen concentrations. *Br. J. Radiol.* 1970, 43, 848—855.
7. Cederberg A., Hellsten S., Miorner G.: Oxygen treatment and hyaline pulmonary membranes in adults. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1965, 64, 450—458.
8. Dydyk L., Dąbska M., Szreter T.: Wpływ hyperoksji na dojrzewający mózg królika. I. Zmiany wczesne. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 177—183.
9. Eklef B., Mac Millan V., Siesje B. K.: Cerebral energy state and cerebral venous pO_2 in experimental hypotension caused by bleeding. *Acta Physiol. Scand.* 1972, 86, 515—527.
10. Fuson R. L., Saltzman H. A., Smith W. W., Whalen R. E., Osterhout S., Parker R. T.: Clinical hyperbaric oxygenation with severe oxygen toxicity. *The New Engl. J. of Med.* 1965, 273, 415—426.
11. Grave D. G., Kenedy C., Sokoloff L.: Impairment of growth and development of the rat brain by hyperoxia at atmospheric pressure. *J. Neurochem.* 1972, 19, 187—194.
12. Hernandez M. J., Raichle M. E., Stone H. L.: The role of the sympathetic nervous system in cerebral blood flow autoregulation. *Eur. Neurol. (Basel)* 1972, 6, 175—179.
13. Joffe N., Simon M.: Pulmonary oxygen toxicity in the adult. *Radiology* 1969, 92, 460—465.
14. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the Central Nervous System after Prolonged Hypoxia. Neuroglia and Blood Vessels. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 235—244.
15. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the Central Nervous System after Prolonged Hypoxia. I. Neuronal Alterations *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 222—234.

16. Kanai N., Hayakawa T., Mogami H.: Blood flow changes in carotid and vertebral arteries by hyperbaric oxygenation. *Neurology* 1973, 23, 156—159.
17. Mc Sherrn Ch. K., Veith F. J.: The relationship between the central nervous system and pulmonary forms of oxygen toxicity. Effect of THAM administration. *Surg. Forum* 1968, 19, 33—38.
18. Northway W. H., Rosan R. C.: Radiographic features of pulmonary oxygen toxicity in the newborn: Bronchopulmonary dysplasia. *Radiology* 1968, 91, 49—58.
19. Raichle M. E., Stone H. L.: Cerebral blood flow autoregulation and graded hypercapnia. *Eur. Neurol. (Basel)* 1972, 6, 1—5.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 02-093, Warszawa, ul. Pasteura 3.

ANNA TARASZEWSKA,* EWA OSETOWSKA,** WILHELM KRÜCKE

IX. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER INTRAZERE BRALEN VERKALKUNGEN BEI DEM ERBLICHEN PARALYTISCHEN TREMOR DER PT-KANINCHEN

Neuropathologische Abteilung des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung und
Neurologisches Institut der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt a.M.

Direktor: Prof. Dr. W. Krücke

Laboratorium für Vergleichende Neurologie der Polnischen Akademie
der Wissenschaften, Minsk Mazowiecki, Polen

Leiter: Prof. Dr. E. Osetowska

Bei Kaninchen mit paralytischem Tremor (Osetowska, 1967) mit dem Symbol pt/Männchen, pt/pt Weibchen (Lindsey u.Fox, 1974) handelt es sich um eine erbliche degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems mit einer an das X-Chromosom gebundenen Vererbungsweise. Klinisch stehen das Zittern vom Parkinsontyp und eine spastische Parese der Extremitäten im Vordergrund (Osetowska u. Mitarb., 1975).

Bisher liegen nur lichtmikroskopische Untersuchungen vor, die deutliche Veränderungen an den Neuronen wie Chromatolyse, Schwellung oder Schrumpfung der Nervenzellen und Auftreibung von Axonen, eine Aufhellung und eine Auflockerung der Markstruktur, sowie eine mittelstarke Fasergliose ergeben haben. Ausserdem treten, und das ist ein charakteristischer Befund dieser Krankheit, disseminierte Verkalkungen vorwiegend im Hirnstamm und den Basalganglien auf, die keine Beziehung zu den Gefässen haben. Gefässverkalkungen kommen nicht vor (Osetowska, Krücke, 1973; Osetowska u. Mitarb. 1976). In früheren Untersuchungen wurden die Verkalkungen bei 55% der kranken Kaninchen beobachtet und pathogenetisch mit einer neuronalen Schädigung in Verbindung gebracht.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Entstehung dieser Verkalkungen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen aufzuklären.

* Stipendiatin des Max-Planck-Institutes

** U.S.A. Grant, PL-480, N.I.H. agreement 05-035-N.

MATERIAL UND METHODE

Vier pt-Kaninchen im Alter von sechs und acht Wochen und vier Kontrolltiere wurden in Chloralhydratnarkose mit 3,9%igem Glutaraldehyd perfundiert und die aus den betroffenen Regionen des Gehirns entnommenen Gewebsblöcke in Epon eingebettet; ein Teil des Materials wurde vor der Einbettung 3 Tage mit 4,13%igem Disodium EDTA (Ethylenediaminetetraacetat) entkalkt (Warshawsky, Moore, 1967).

ERGEBNISSE

In dieser ersten Darstellung* soll die Frage der Beziehung von Axonaufreibungen und Verkalkungen behandelt werden. Nach unseren bisherigen feinstrukturellen Befunden aus der Region des Globus pallidus und des Striatums fanden sich besonders häufig Axonaufreibungen, die mit grossen Mengen von Mitochondrien und polymorphen elektronendichten Strukturen angefüllt waren. Letztere sind meistens lamellär geschichtet und als degenerierte Organellen zu deuten (Abb. 1). Die Aufreibungen zeigen eine wechselnde Grösse, grössere sind ebenfalls von einer Axonmembran umgeben, zeigen aber eine fortgeschrittene Degeneration der Organellen. Intakte Mitochondrien sind nicht mehr vorhanden. Die membranumgebenen Körperchen besitzen verschiedene elektronendichte, variable Form und weisen Zerfalls- sowie Verklumpungserscheinungen auf (Abb. 2). Als weiteres Stadium im Verlauf des Erkrankungsprozesses wird der Verlust der Axon-Membran aufgefasst. Im Zentrum des nunmehr plaqueförmigen Erkrankungsherdens liegen noch die gleichen Strukturen wie im Axon; die Zerfallerscheinungen der Organellen, aufgelockerte Struktur, kollabierte Membranen und eine Verschmelzung mit feinkörnigen, zwischen den Körperchen gelegenen Substanzen sind fortgeschritten. In dieser Entwicklungsphase kommt eine neue Veränderung hinzu, eine auf das umgebende Neuropil übergreifende wolkenartige, seltener fingerförmige Randzone, deren zum Teil leer erscheinende Räume durch eine Schicht elektronendichten Materials scharf begrenzt werden. Die daran anschliessenden Zellmembranen sind erhalten, haben sich aber in ihrer Form den Ausbuchtungen des Herdes angepasst (Abb. 3). Innerhalb der in Abbildung 3 beschriebenen Strukturen finden sich in weiteren Herdbildungen nadelförmige Kristalle (Abb. 3: Einsatz) die mit einer Länge von etwa 400 Å und ca 40 Å Breite an der unteren

* Nach einem Vortrag auf der Jahrestagung der Vereinigung Deutscher Neuropathologen und Neuroanatomem in Köln vom 2.—4.10.1975.

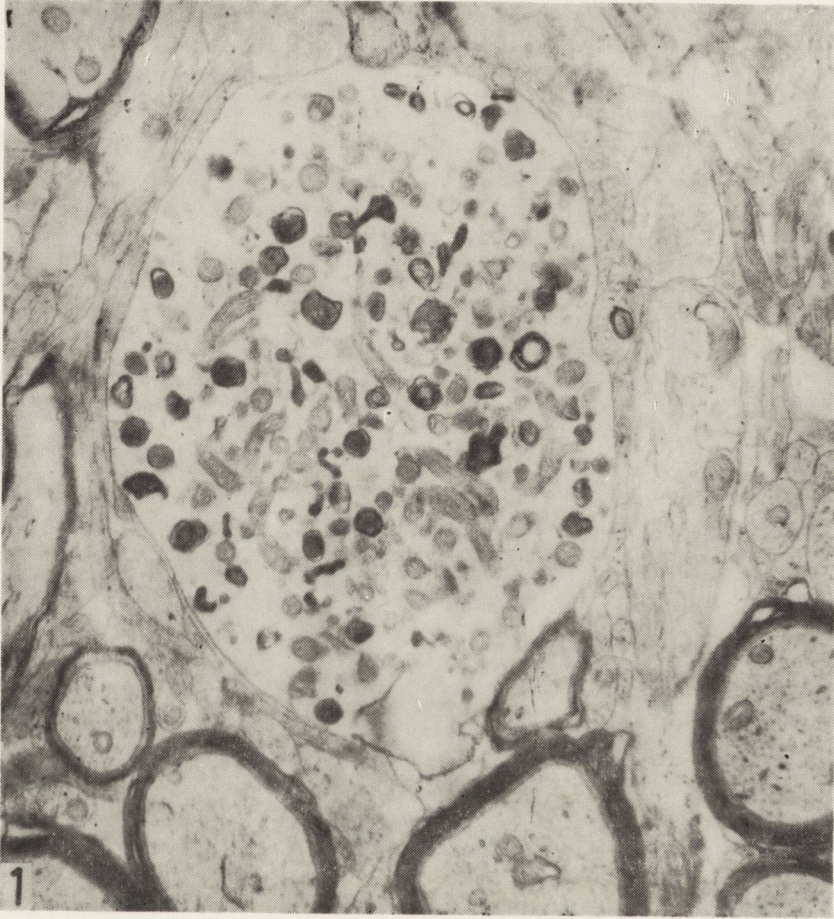


Abb. 1. Anhäufung von Mitochondrien und polymorphen elektronendichten, meistens lamellären Körperchen im aufgetriebenen Axon. Vergr. 20.000 \times .

Ryc. 1. Poszerzony odcinek aksonu. Nagromadzenie mitochondrii i polimorficznych, elektronowo nieprzejrzystych organelli, przeważnie o blaszkowatej budowie. Pow. 20.000 \times .

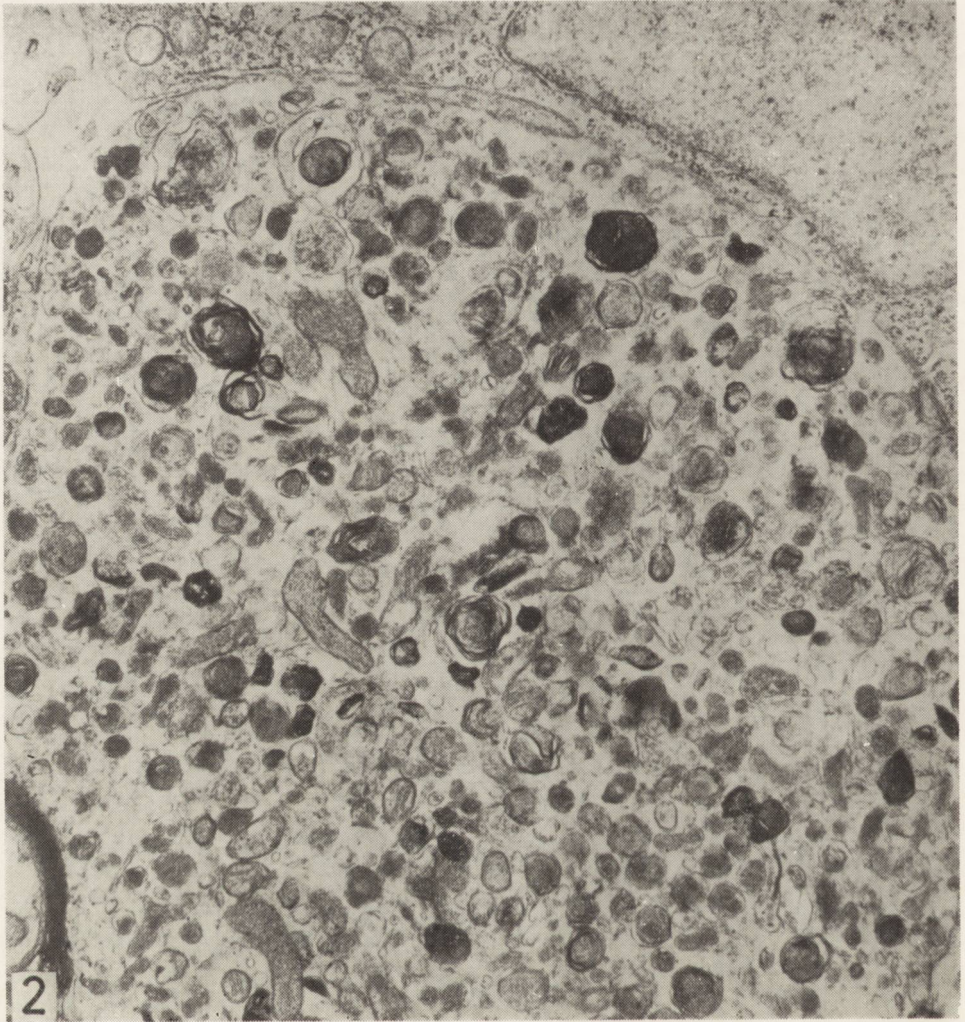


Abb. 2. Ausschnitt von einer grösseren Axonaufreibung. Unterschiedlich elektronendichte, lamelläre, flockige, multivesiculäre und homogene Körperchen und Vesicel zeigen an verschiedenen Stellen Zerfalls- und Verklumpungserscheinungen. Kontur der Axonmembran ist erhalten. Verg. 17.800 \times .

Ryc. 2. Wycinek dużego sferoidu aksonalnego. Liczne polimorficzne struktury wykazujące różne obrazy zwyrodnienia i rozpadu. Pow. 17.800 \times .

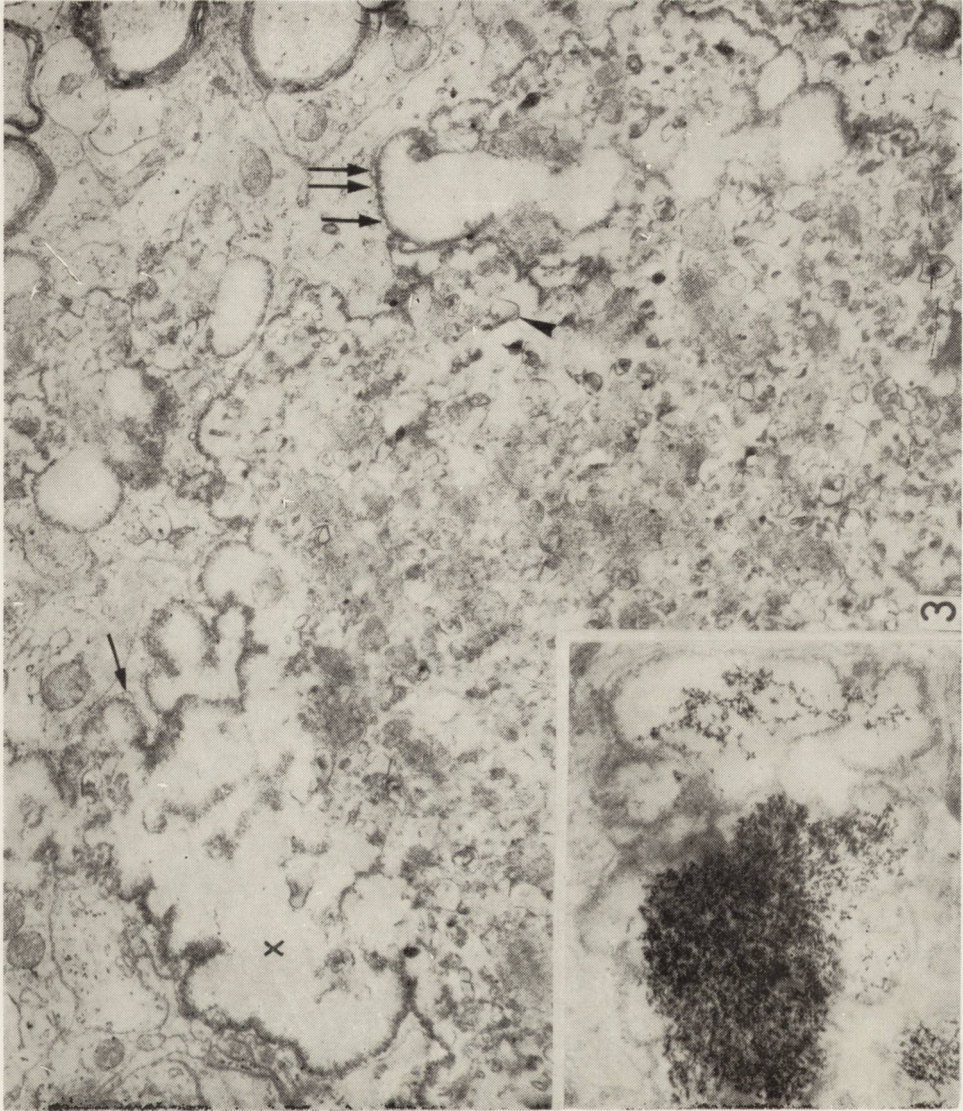


Abb. 3. Fortgeschrittener Zerfall der Organellen. Verschmelzung der feinkörnigen Substanz und kollabierte Membranreste von Körperchen im Zentrum (Pfeilspitze). Verlust der Axonmembran, stattdessen Randzone aus feinkörnigen Substanz, die wolkenförmig auf das umgebene Neuropil übergreift (x). Ausbuchtungen (Pfeile) von benachbarten, meist gut erhalten Zellmembranen. Vergr. 15.000 \times . Einsatz: An anderen Stellen gleichartiger Veränderungen Kalkablagerung in Form nadelförmiger Kristalle. Vergr. 30.000 \times .

Ryc. 3. Zaawansowany rozpad organelli. Zatarcie ziarnistego podłoża i zlewianie się resztek organelli (ostrza strzałek). Utrata błony aksonalnej, na jej miejscu drobnoziarnista substancja przechodząca obłokowato do otaczającego neuropilu (x). Wgłębienia sąsiadujących, najczęściej dobrze zachowanych błon komórkowych (strzałki). Pow. 15.000 \times . Wycinek: w innym miejscu o podobnych zmianach odkładające się złogi wapnia w postaci igiełkowatych kryształów. Pow. 30.000 \times .

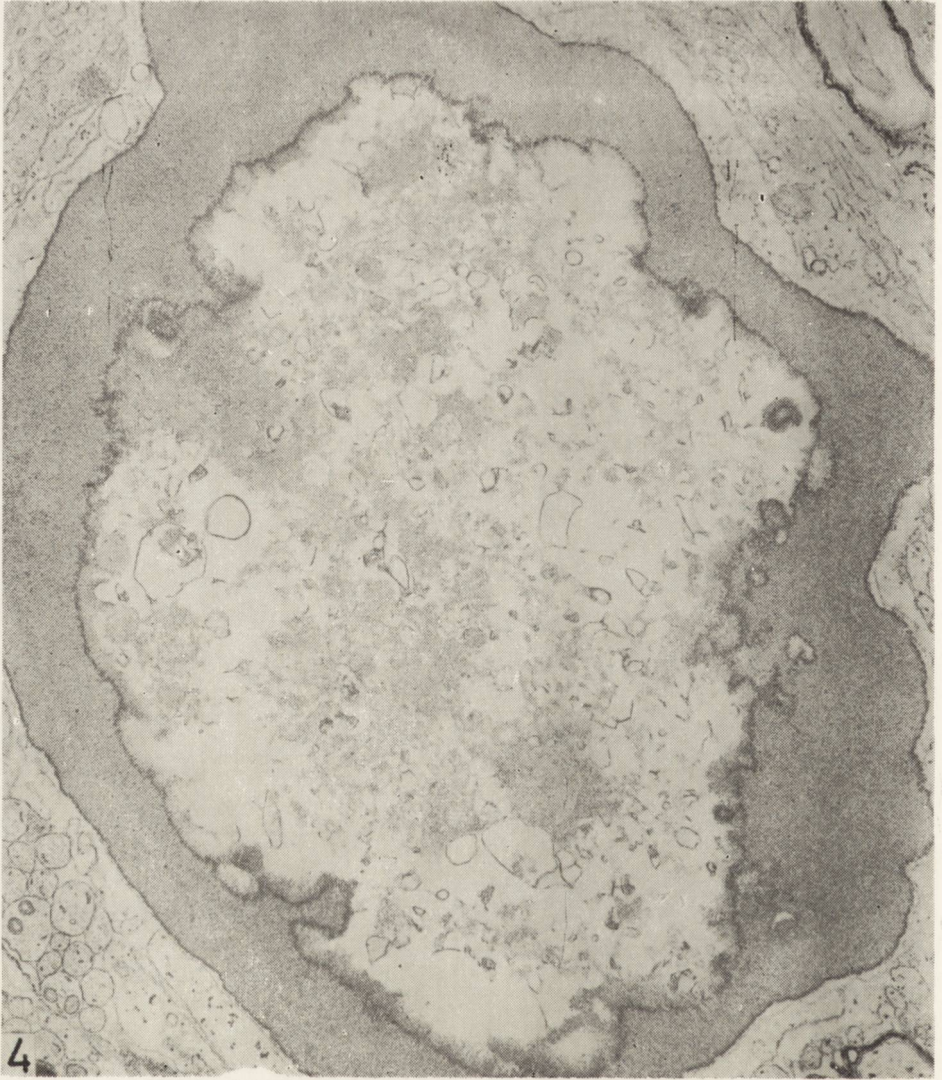


Abb. 4. Breiter Randsaum feinkörnigen Materials mit verdichteten inneren- und äusseren Grenzsichten. Weniger kompakte feinkörnige Ablagerungen im Zentrum zusammen mit membranumgebenen Vacuolen und kollabierten Membranenresten.
Vergr. 14.000 X.

Ryc. 4. Brzeżne nagromadzenie drobnoziarnistego materiału z zagęszczoną warstwą zewnętrzną i wewnętrzną. Mniej zwarte, drobnoziarniste złoża w centrum obok ograniczonych błonami wakuoli i zlewających się resztek błon. Pow. 14.000 X.

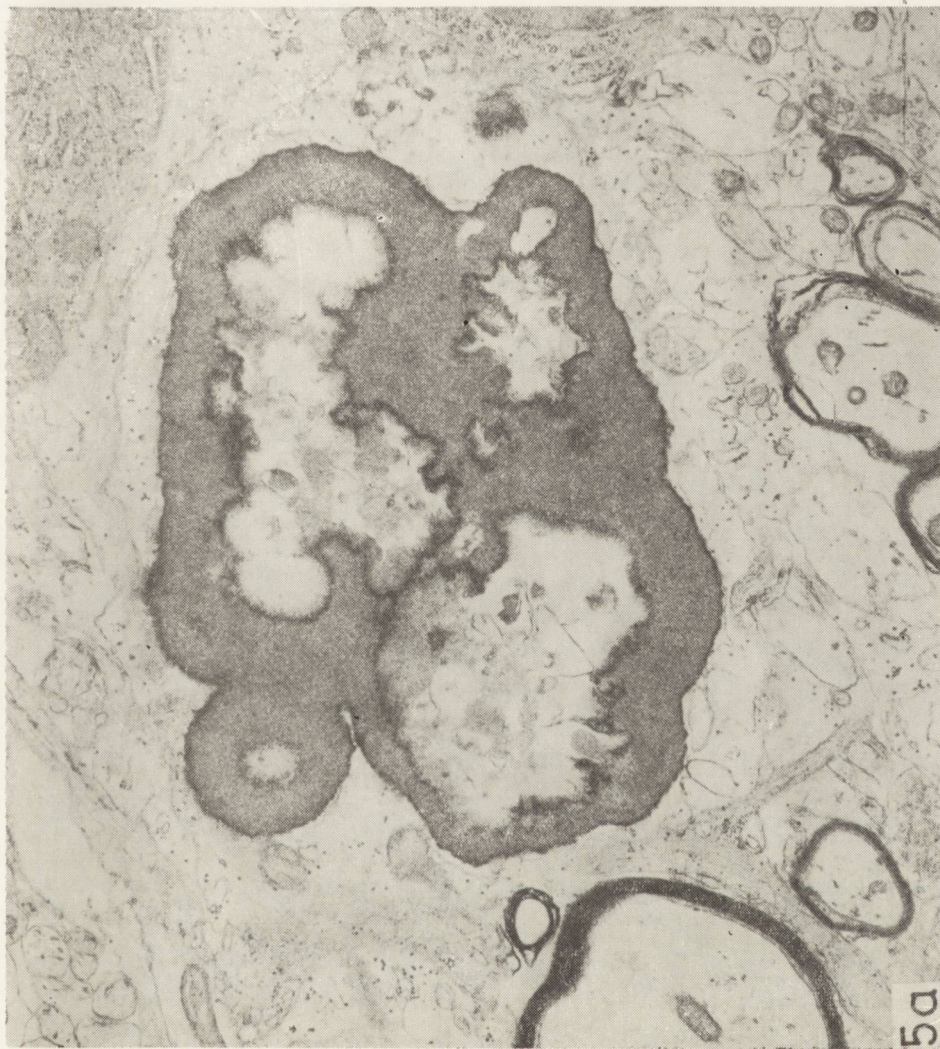


Abb. 5a. Gleichartige Herdbildung wie in *Abb. 4.* mit mehreren wolkenartig begrenzten Kammern ohne morphologisch nachweisbare Kalkablagerung. Vergr. 16.500 \times .

Ryc. 5a. Obraz podobny jak na *ryc. 4.* z liczniejszymi łożyskami o falistym obrzeżeniu, bez widocznych złogów wapnia. Pow. 16.500 \times .



Abb. 5b. Grosse Kalkablagerung mit deutlicher kristalliner Struktur. Form und Grösse der Herde stimmt überein. In Abb. 5a und 5b sind die Zellmembranen des umgebenden Neuropils erhalten. Vergr. 30.000 \times .

Ryc. 5b. Duży konkrement wapniowy o wyraźnej strukturze krystalicznej. Rozmiary i postać ogniska odpowiadają przedstawionym wyżej „łożyskom wapniogennym”. Na ryc. 5a i 5b w otaczającym neuropilu błony komórkowe są zachowane. Pow. 30.000 \times .

Grenze der in der Literatur für Hydroxylapatit beschriebenen Werte liegen (Speckman, Norris, 1957; Hager 1962, Giacomelli u.Mitarb. 1964). Eine davon abweichende Herdbildung, noch ohne morphologisch nachweisbare Kalkablagerung, zeigt breite, feinkörnige Säume unter der elektronendichten Grenzschicht; sie ist auch, allerdings weniger kompakt und zusammenhängend, im Zentrum des Herdes zusammen mit Resten von Organellen und Membranmaterial vorhanden (Abb. 4). Die Zellmembranen des umgebenden Neuropils verhalten sich in der gleichen Weise wie bei der vorhergehenden Herdbildung. Die Abbildung 5a zeigt eine gleichartige Herdbildung mit mehreren wolkenartig begrenzten Kammern ohne morphologisch nachweisbare Kalkablagerung.

Im Lichtmikroskop sind derartige Herde ohne Verkalkung zwar ebenfalls zu sehen, aber in ihrer Feinstruktur nicht aufzuklären. Sie stellen offenbar die „Matrix“ für spätere Verkalkungen dar.

Die grossen Kalkkonkremente mit relativ gleichmässigen kristallinen Strukturen werden als ein Endstadium des Prozesses angesehen (Abb. 5b). Nach der Entkalkung mit EDTA weisen diese Konkreme keine kristallinen Strukturen mehr auf. Es bleibt jedoch eine Matrix mit feingranulierter Substanz und einer deutlichen lamellären Schichtung erhalten.

Die mikroradiographische Untersuchung eines 30 μ dicken Paraffinschnittes weist an den Stellen der Verkalkungen eine starke Absorption der gesamten Röntgenstrahlung auf. Die rechnerische Auswertung des Massenabsorptions-Koeffizienten ergab Sigma-Quotienten, die über 1 lagen und mit zunehmender Strahlenfilterung anstiegen. Sie zeigen damit ein Verhalten, das dem der Calcium-Kontrollprobe ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) entsprach. Die Werte für die Gehirnsubstanz und bei calciumfreien Proben anderer Substanzen lagen unter 1*.

DISKUSSION

Mit unserer elektronenoptischen Untersuchung konnte die Annahme eines Zusammenhanges zwischen Verkalkungen und pathologisch veränderten neuronalen Strukturen am Beispiel der Axonveränderungen bewiesen werden.

Die in ihrer Feinstruktur aufgeklärten Axonaufreibungen mit ihrer charakteristischen Umwandlung und Herdbildung im Neuropil werden als eine Vorstufe des Verkalkungsprozesses angesehen. Gleichartige Herdbildungen sind uns aus der bisherigen Literatur nicht bekannt geworden.

* Herrn Dr. K. Müller-Sievers, Max-Planck-Institut für Biophysik, sind wir für die Durchführung der Mikroradiographie zu besonderem Dank verpflichtet.

Es sei nur darauf hingewiesen, dass eine gewisse histopathologische Analogie mit den von Seitelberger (1968) und Jellinger (1973) beobachteten verkalkten Spheroiden im Axon bestehen könnte. Vereinzelt ultrastrukturelle Untersuchungen anderer intracerebraler Verkalkungen unterscheiden sich von unseren Befunden dadurch, dass der Verkalkungsprozess hier im perivaskulären Raum stattfindet (Guseo u. Mitarb. 1975; Cervós-Navarro, Matakas, 1974). Die Rolle der Mitochondrien für die Bindung von Calcium-Ionen (Sahaphoung, Trump, 1972; Yates u. Yates, 1968; Simkiss 1974) wird sowohl bei der physiologischen wie der experimentellen Verkalkung diskutiert (Caulfield, Schrag, 1965; Bonucci, Sadun, 1973; Martin, Matthews, 1969; Matthews, 1970; Cavallero u. Mitarb. 1974).

Die weiteren Untersuchungen an diesem auch für die menschlichen Pathologie interessanten Modell am pt-Kaninchen sollen zur Klärung der Frage beitragen, wie weit die Mitochondrien und ihre pathologischen Varianten (Mei-Liu u. Mitarb. 1974) pathogenetisch mit dem Verkalkungsprozess in Beziehung stehen.

A. Taraszewska, E. Osetowska, W. Krücke

IX. BADANIA ULTRASTRUKTURALNE ZWAPNIEŃ ŚRÓDMÓZGOWYCH U KRÓLIKA „PT”

Streszczenie

Badania wykonano na 4 królikach pt w wieku od 4 do 6 tygodni z ostrymi objawami klinicznymi oraz na 4 kontrolnych z tej samej rodziny, nieobciążonych genetycznie. Przebadano tkankę pochodzącą z okolicy *globus pallidus* i *striatum*. Przed zatopieniem w Eponie część materiału została odwapniona w 4,13% roztworze Disodium EDTA.

W przebadanym materiale znaleziono poszerzenia aksonalne, przypominające sferoidy, wypełnione mitochondriami oraz strukturami elektronowo-nieprzejrzystymi, niekiedy o częściowo koncentryczno-blaszkowatej strukturze. Zarówno rozpoznawalne mitochondria jak i już zmienione organelle ulegają w dalszych stadiach procesu rozpadowi wytwarzając rodzaj łożysk („beds”), w których wtórnie osadzają się kryształy odpowiadające wymiarami hydroxyapatytowi. Przebadanie skrawka parafinowego z tych okolic wykazało wskaźnik absorpcji dla promieni Rtg, Sigma powyżej wartości 1, co odpowiada związkom $Ca_3(PO_4)_2$. Tego typu ogniska (łożyska) śródkomórkowe wydają się odpowiadać klasycznemu pojęciu „matrix”.

W dotychczasowej literaturze nie znaleziono podobnych odpowiedników ultrastrukuralnych. Dalsze badania posiadane materiału pozwolą prawdopodobnie na prześledzenie wszystkich pośrednich stadiów procesu aż do wytworzenia się rozległych konkrementów wapniowych, których rozmiary wskazywać mogą albo na olbrzymie sferoidy, albo na zajęcie całych neuronów.

А. Тарашевска, Е. Осетовска, В. Крюке

IX. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ
В СРЕДНЕМ МОЗГЕ У КРОЛИКА pt

Резюме

Исследования были проведены на 4 кроликах pt в возрасте от 4 до 6 недель с острыми клиническими симптомами, а также на 4 контрольных, из этого же семейства, генетически неотягощенных. Были исследованы кусочки мозга из области globus pallidus и striatum. Часть материала перед заправкой в эпоне декальцинировали в 4,13% растворе динатриевой соли EDTA. В исследованном материале были найдены аксональные расширения, напоминающие сфероиды, заполненные митохондриями и электроноплотными органеллами, обладающими иногда частично концентрически-пластинчатой структурой. Как распознаваемые митохондрии, так и уже измененные органеллы подвергаются в дальнейших стадиях процесса распаду и размытию структуры, образуя подобие ложа („bed“), в которых вторично осаждаются кристаллы, соответствующие размерами гидроксипатитам. Исследование парафиновых срезов из этих же областей выявило показатель абсорпции для рентгеновских лучей при сигме выше величины I, что соответствует соединениям ($\text{Ca}_3/\text{PO}_4/2$). Этого типа межклеточные очаги (ложа) соответствуют, по-видимому, классическому понятию „матрицы“. В имеющейся до сих пор литературе не было, однако, найдено подобных ультраструктурных эквивалентов. Дальнейшие исследования полученного материала дадут, по-видимому, возможность проследить все промежуточные стадии процесса начиная с первых митохондриальных изменений и до образования обширных кальциевых отложений, размеры которых указывают или на громадные сфероиды, или на захват процессом целых нейронов.

LITERATUR

1. Banucci E., Sadun R.: Experimental calcifications of the myocardium. Ultrastructural and histochemical investigation. Amer. J. Path. 1973, 71, 167—184.
2. Caulfield J. B., Schrag P. E.: Electron microscopic study of renal calcifications. Amer. J. Path. 1965, 44, 365—381.
3. Cavallero C., Spagnoli L. G., Di Tondo U.: Early mitochondrial calcifications in the rabbit aorta after adrenaline. Virchow's Archiv A. Path. Anat. Histol., 1974, 362, 23—39.
4. Cervós-Navarro J., Matakas F.: Struktur und Zusammensetzung von Kalk- und Pseudokalkablagerungen im Gehirn. Verh. Dtsch. Path. 1974, 58, 497.
5. Giacomelli F., Spiro D., Wiener J.: A study of metastatic renal calcifications at the cellular level. J. Cell Biol. 1964, 22, 189—206.
6. Guseo A., Bolditzsar F., Gellert M.: Elektronenoptische Untersuchungen bei „striato-dentaler Calcification“ (Fahr). Acta Neuropath. (Berl.), 1975, 31, 305—313.
7. Hager H.: Die Feinstruktur von Kalkablagerungen in Colliquationsnekrosen des Hirngewebes. Naturwissenschaften 1962, 49, 136—137.
8. Jellinger K.: Neuroaxonal dystrophy: its natural history und related disorders. in: Progress in Neuropathology, Ed. Zimmerman H. M. 1973, V, 2, 129—180.

9. Lindsey J. R., Fox N. R.: *Biology of the laboratory rabbit*. Academic Press, New York — London, 1974, 380—381.
10. Martin J. H., Matthews J. L.: Mitochondrial granules in chondrocytes. *Calc. Tiss. Res.* 1969, 3, 184—193.
11. Matthews J. L.: Ultrastructure of calcifying tissues. *Amer. J. Anat.* 1970, 129, 451—458.
12. Mei Liu S., Larson M., Mizuno Y.: An analysis of the ultrastructural findings in infantile neuroaxonal dystrophy (Seitelberger's disease). *Acta neuropath. (Berl.)* 1974, 27, 201—213.
13. Osetowska E.: Nouvelle maladie héréditaire du lapin de laboratoire. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1967, 8, 331—344.
14. Osetowska E., Krücke W., Wuttke B.: Zerebrale Verkalkungen bei Kaninchen "pt" mit erblichen Erkrankung des ZNS. In: *Aktuelle Probleme der Neuropathologie*. Ed. K. Jellinger, Facultas Verlag, Wien, 1973, 125—129.
15. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Experimental investigations on a hereditary central nervous system disease with the model of pt-rabbit. V. Changes in clinical features in I—IX generations. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1975, 9, 569—578 (Polish text, English summary).
16. Osetowska E., Taraszewska A., Luszawski F.: VI. Neuronal calcifications in pt rabbits dependence on age and clinical course. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 91—103. (Polish text, English summary).
17. Sahaphoung S., Trump B. P.: Mitochondrial matrix densities in cell injury. *Amer. J. Pathol.* 1972, 66, 33a — reprint.
18. Seitelberger F.: Allgemeine Neuropathologie der Alterns- und Aufbrauchkrankheiten des Gehirns. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1968, 52, 32—61.
19. Simkiss K.: Calcium translocation by cells. *Endeavour*, 1974, 33, 119—124.
20. Speckman T. W., Norris W. P.: Bone crystallites as observed by use of the electron microscope. *Science* 1957, 126, 753—754.
21. Warshawsky H., Moore G.: A technique for the fixation and decalcification of rat incisor for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1967, 15, 542—549.
22. Yates R. D., Yates J. C.: The occurrence of intramitochondrial granules in nerve cells. *Zeitschr. Zellforsch.* 1968, 92, 388—393.

Adresse der Autoren: A. Taraszewska u. E. Osetowska — Laboratorium für Vergleichende Neurologie, Polnische Akademie der Wissenschaften, Warszawska 126, 05-300 Mińsk Mazowiecki, Polen. W. Krücke — Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Deutschordenstrasse 46, 6 Frankfurt/M, BDR

HELMA SOMMER, JOCHEN QUANDT

GEFÄSSVERÄNDERUNGEN NACH TIEREXPERIMENTELLER
LANGZEITBEHANDLUNG MIT L-DOPA
AUS ELEKTRONENOPTISCHER SICHT

Neuropathologisch-Biologische Abteilung des Bezirkskrankenhauses für Psychiatrie
und Neurologie, Bernburg

Leiter: Dr. med. Dr. rer. nat. habil. H. Sommer

Seit den grundlegenden Arbeiten von C. und O. Vogt (1920) über das extrapyramidale System und die neuroanatomischen Ergebnisse über die extrapyramidalen Regelkreise durch Hassler (1938), hat das Parkinsonsyndrom zunehmendes wissenschaftliches und therapeutisches Interesse gefunden. Dabei zeichneten sich seit 1950 zwei entscheidende Etappen ab: einmal die Therapie mit synthetischen Antiparkinsonmitteln und zum anderen seit 1961 (Birkmayer) die Einführung von L-DOPA zur Substitutionstherapie.

Besonders die Entdeckung des gestörten Dopaminstoffwechsel beim Parkinsonismus hat viele neue Fragen aufgeworfen, denn durch diese Therapie mit L-DOPA war es erstmals möglich, mit Zwischenprodukten des intermediären Stoffwechsels eine Funktionsstörung im Zentralnervensystem zu beeinflussen. Während nun die biochemischen Aspekte zumindest in ihren Grundzügen weitgehend geklärt werden konnten, ist die Frage, ob durch biogene Amine nicht nur therapeutisch erwünschte bzw. positive neurophysiologische Effekte zu erzielen oder in bestimmten Dosierungen auch molekularbiologische Veränderungen zu bewirken sind, noch ungeklärt. Soweit diese Fragestellung mit elektronenoptischen Hilfsmitteln experimentell bearbeitet werden kann, ist das Ziel dieser Arbeit.

1911 wurde durch Funk erstmals D,L-DOPA aus einem Racemat von Hippursäure und Carbonyldioxybenzaldehyd synthetisiert. Nach Vereinfachung des Herstellungsverfahrens durch Guggenheim (1913) wurde L-DOPA, nachdem er in Tier- und Selbstversuchen diese Substanz einer eingehenden Untersuchung unterzogen hatte, in die Therapie

eingeführt und zeigte erste Behandlungserfolge. Für seine Experimente verwendete er Kaninchen, denen 1 g/kg L-DOPA oral verabreicht wurde, wobei an den Tieren keinerlei Vergiftungssymptome beobachtet werden konnten. Es folgten aufschlussreiche pathologisch-anatomische Untersuchungen (Lewy 1913, Tretiakoff 1919, C. und O. Vogt 1920), die die schon 1895 von Brissaud geäußerte Vermutung, dass sich die Veränderungen beim Parkinsonismus im striären System befinden müssten, bestätigten. In 1938 wies Hassler durch die systematische Anfertigung von Schnittserien der Gehirne verstorbener Parkinsonpatienten nach, dass wahrscheinlich in einer zellulären Schädigung der Substantia nigra die Ursache des Parkinsonismus zu suchen sei. In den folgenden Jahren wurden die Bemühungen um die Synthetisierung von Antiparkinsonmitteln intensiviert. Anhand von Tierexperimenten wurde der Nachweis erbracht, dass Katecholamine (Euler 1946) einschliesslich des Dopamin in den Gehirnen von Menschen und Säugetieren (Montagu 1957) vorhanden sind. Ausserdem konnte durch Carlsson et al. (1958) sowie Bertler und Rosengren (1959) aufgezeigt werden, dass der Dopamingehalt in viel höheren Konzentrationen in den Basalganglien als in den übrigen Hirnabschnitten vorliegt.

Durch biochemische Untersuchungen an den Gehirnen verstorbener Parkinsonpatienten wurde durch Ehringer und Hornykiewicz (1960) festgestellt, dass der Gehalt an Dopamin in den Basalganglien erheblich vermindert ist.

Birkmayer (1960) wendete als erster L-DOPA in kleinen Dosen zur intravenösen Injektion bei Parkinsonpatienten an. Sehr eindrucksvoll war die Wirkung von L-DOPA auf die Akinese. Birkmayer und Hornykiewicz (1961) konnten ausserdem nachweisen, dass durch Vorbehandlung mit Monoaminoxidasehemmern der L-DOPA-Effekt beim Parkinsonismus verstärkt werden kann. Diese grundlegenden Arbeiten sind in den folgenden Jahren durch zahlreiche Veröffentlichungen bestätigt worden (Umbach und Baumann 1964, Barbeau 1969, Ericson et al. 1970, Kaeser et al. 1970, Völler et al. 1970, u.a.). In der Mehrzahl der Mitteilungen handelt es sich jedoch um Ergebnisse nach einer vorübergehenden, d.h. kurzzeitigen intravenösen oder oralen Behandlung mit L-DOPA, während systematische Untersuchungen nach Langzeitbehandlung mit L-DOPA vonseiten der Klinik erst in letzter Zeit beginnen. Birkmayer (1973), Fischer et al. (1973) haben systematische Verlaufsbeobachtungen in dem Zeitraum von einem Jahr bei Parkinsonpatienten unter einer reinen L-DOPA-Medikation (ohne Einbeziehung anticholinergischer Substanzen) durchgeführt. Sie kommen auf Grund ihrer klinischen, testpsychologischen und neurophysiologischen Untersuchungen zur der Feststellung, dass "die Grenzen der Behandlungsmöglichkeiten nicht durch die Art und

Ausprägung der neurologischen Symptome, sondern auch durch etwaige Nebenwirkungen und das Ausmass einer allgemeinen psychoorganischen Beeinträchtigung gesetzt werden". In tierexperimentellen Arbeiten werden vorwiegend biochemische und autoradiographische Fragestellungen behandelt, während neuropathologische Untersuchungen fast überhaupt nicht vorhanden sind.

Anhand der vorliegenden und zitierten Literatur kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der funktionelle Ausfall der Substantia nigra und der damit verbundene Dopaminmangel in einem wechselseitigen Zusammenhang stehen, denn die Zuführung von Dopamin kompensiert teilweise diesen Ausfall. Wie der Metabolismus sich beim Parkinsonismus verhält, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt; wahrscheinlich liegt die Ursache in einer Störung bei der Umwandlung von L-Tyrosin in L-DOPA, die durch den Mangel an Tyrosin-Hydroxylase bedingt wird. Deshalb muss dem Organismus bzw. dem Gehirn L-DOPA in solch einer Dosierung angeboten werden, dass es nach Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke noch ausreichend zur Verfügung steht. Der Organismus muss sich demnach in der therapeutischen Situation mit bestimmten Dopamin-Konzentrationen auseinandersetzen bzw. ein Zwischenprodukt der enzymatischen Spaltung von L-Tyrosin verarbeiten. Daraus können sich in der molekularbiologischen Struktur des Mesenchyms durchaus neue, noch nicht bekannte Veränderungen oder Schäden ergeben, die bei der Therapie und Beurteilung der Nebenwirkungen bekannt sein müssen. Aus diesen Erwägungen heraus wurden die nachfolgend angeführten Tierexperimente durchgeführt.

MATERIAL UND METHODE

Für unsere Langzeitexperimente (6-monatige, täglich Applikation von L-DOPA) wurden 20 ausgewachsene Kaninchen (Gewicht 3 kg) mit 10 Kontrolltieren verwendet. Die Dosierung wurde wie folgt gestaffelt: 12 mg/kg, 22 mg/kg, 32 mg/kg, 42 mg/kg und 52 mg/kg. Entsprechend der Dosierung wurden 5 Gruppen mit je 4 Tieren und 2 Kontrolltieren angesetzt. Nach Beendigung der Experimente wurde eine 2-monatige Überlebenszeit anberaumt, um reversible Veränderungen nicht für irreversible anzusehen.

Die Entnahme des Hirnmaterials für die elektronenoptische Untersuchung wurde in Narkose vorgenommen. Die weitere Aufarbeitung für die elektronenoptische Analyse erfolgte über eine gepufferte Glutaraldehyd-Lösung, einer Kontrastierung mit Osmiumtetroxyd und anschliessender Einbettung in Epon. Die Ultradünnschnitte wurden an LKB-Ultratomen angefertigt.,

ERGEBNISSE

In der Auswertung des vorliegenden Tiermaterials werden wir uns im Rahmen dieser Arbeit nur auf die ultrastrukturellen Ergebnisse beschränken.

Die elektronenoptische Untersuchung des Hirngewebes entsprechend der unterschiedlichen Dosierung ergab, dass bei 12 mg/kg und auch noch bei 22 mg/kg keine wesentlichen Veränderungen aufzufinden waren. Das Ergastoplasma zeigte die charakteristische lamelläre Anordnung; die Ribosomen waren frei im Zytoplasma liegend und an die endoplasmatischen Membranen gebunden auffindbar. Die in freier Form im Zytoplasma vorkommenden Ribosomen waren grösstenteils rosetten- bzw. gruppenförmig angeordnet. Zellkern, Zellkernmembran sowie auch der Chromatingehalt des Zellkernes waren unauffällig, lediglich die Mitochondrien erschienen aktiviert und vermehrt. In der folgenden Abbildung sind keine Veränderungen an den Zellstrukturen festzustellen (Abb. 1). Die Astrozytenfortsätze zeigen ebenso wie markscheidenhaltigen Nervenfasern keine degenerativen Veränderungen.

Mit dem Ansteigen der Dosis ist eine Aufsplitterung des lamellär angeordneten Ergastoplasma neben einer ausgeprägten Proliferation und Aktivierung der Mitochondrien zu beobachten. Wesentlich eindrucksvoller gestalten sich die Veränderungen an den intrazerebralen Gefässen. Bei einer Dosierung von 22 mg/kg L-DOPA ist eine deutliche Schwellung der Astrozytenfortsätze, die an die Kapillarwand angrenzen, bei einer fast unveränderten Gefässwand festzustellen (Abb. 2).

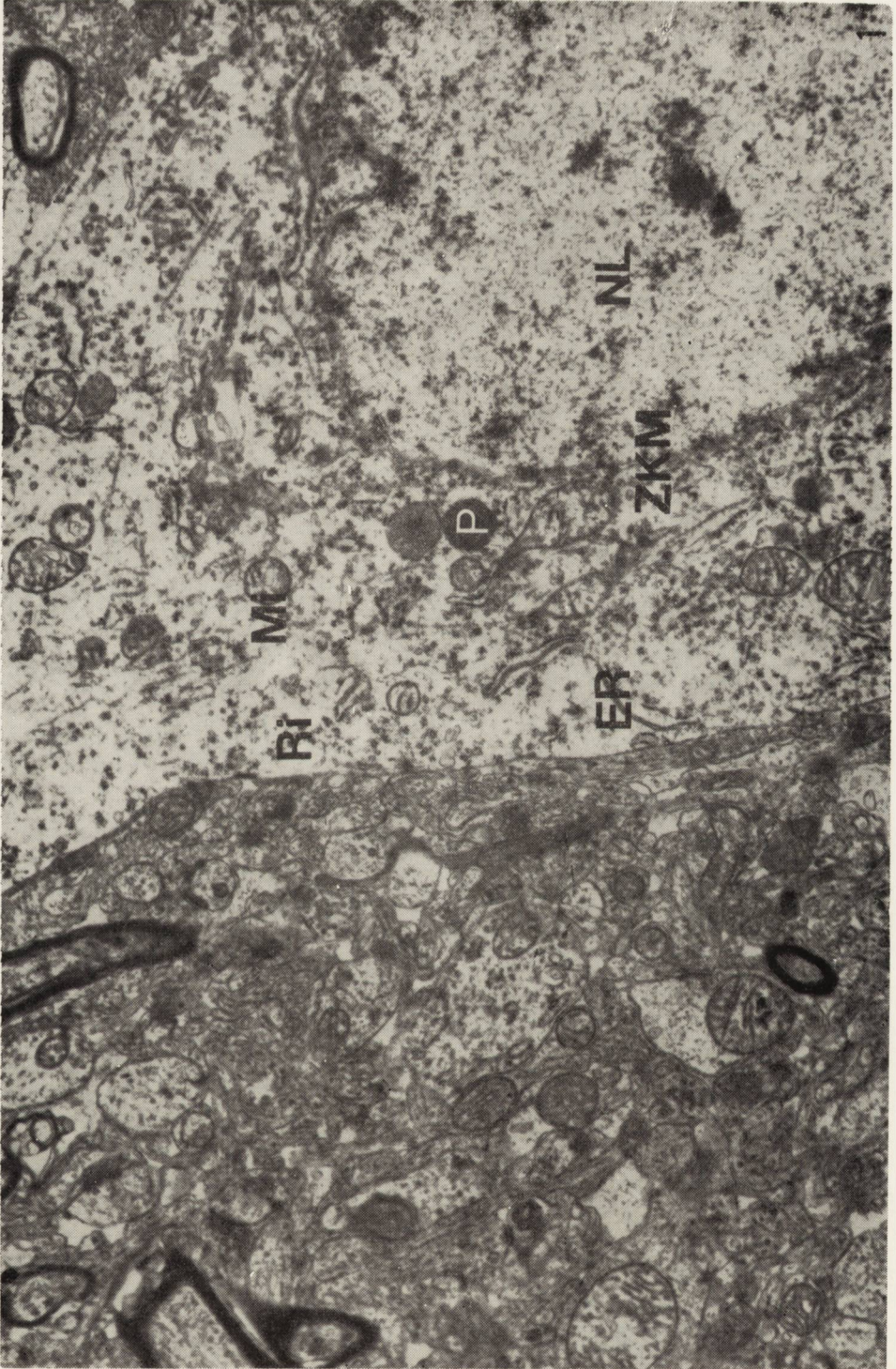
Mit der Erhöhung der Dosierung treten deutliche Veränderungen an der Gefässwand zutage, die vorwiegend durch eine Wucherung der mesenchymalen Zellelemente, in einer Verbeiterung der Muscularis und

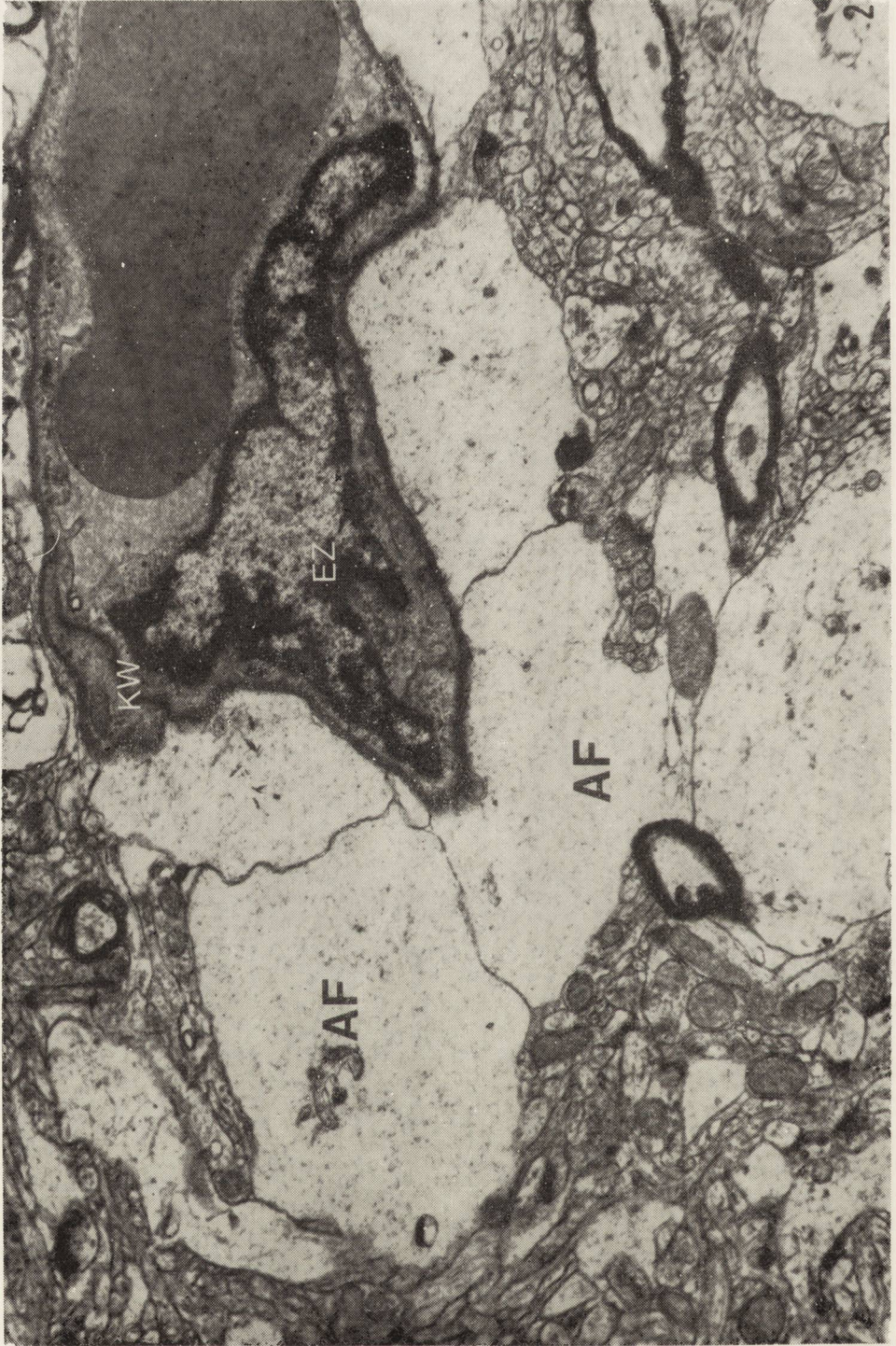
Abb. 1. Ausschnitt einer Nervenzelle mit Nervenzellfortsatz aus der occipitalen Rinde vom Kaninchen (22 mg/kg L-DOPA; 6-monatige Applikation); Ergastoplasma (ER), Mitochondrien (Mi), sowie der Chromatingehalt des Zellkernes (NL) sind unverändert; die doppelte Konturierung der Zellkernmembran (ZKM) ist stellenweise verwaschen; P — Pigment, Ri — Ribosomen. Vergr. 12.000 ×.

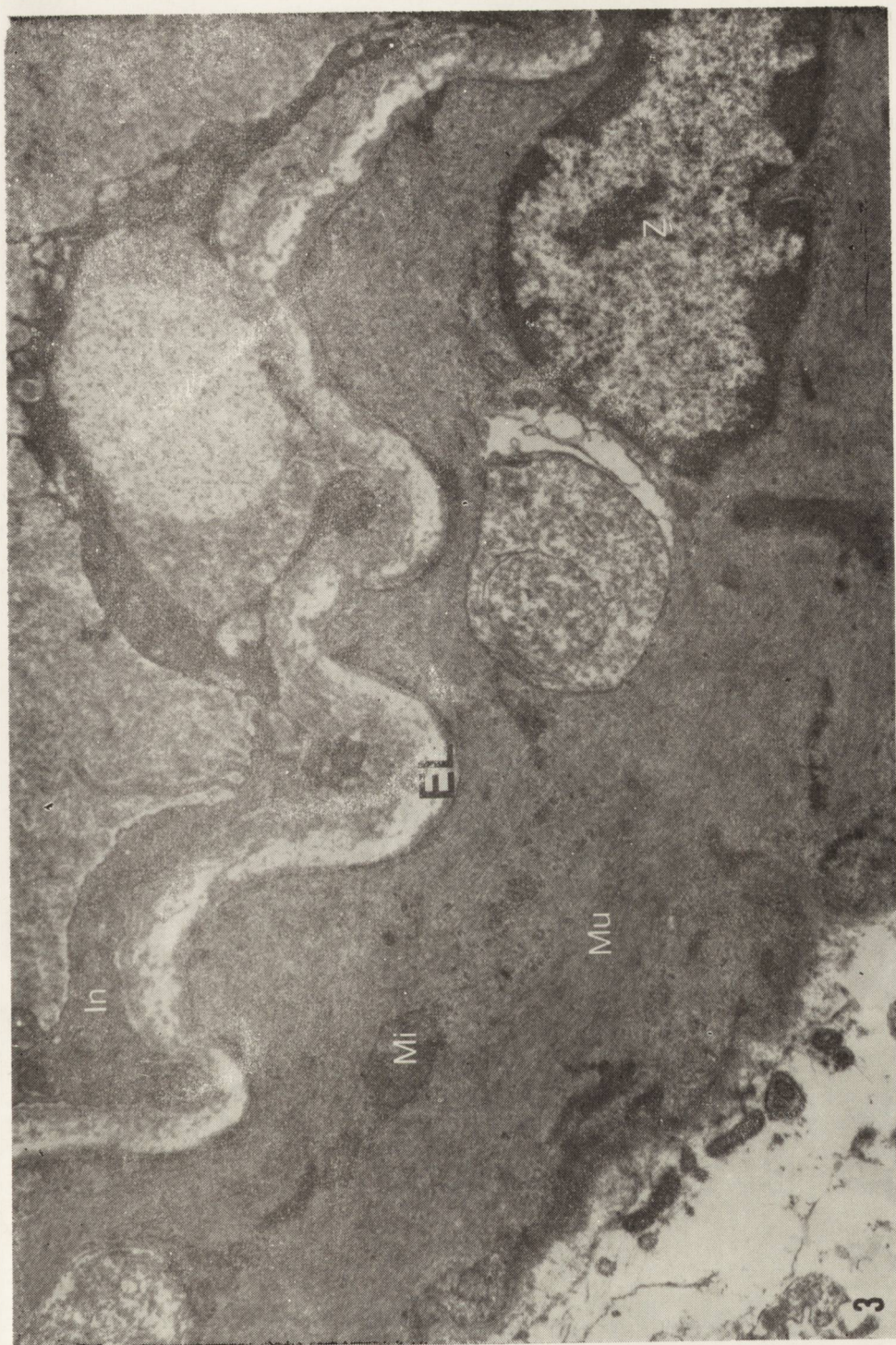
Ryc. 1. Fragment neuronu kory potylicznej królika (22 mg/kg L-DOPA przez 6 m-cy). Siatka śródplazmatyczna (ER), mitochondria (Mi) i chromatyna w jądrze (NL) niezmiennione; ogniskowe zatarcie podwójnego zarysu błony jądrowej (ZKM). P — barwik, Ri — rybosomy. Pow. 12.000 ×.

Abb. 2. Intrazerebrale Kapillare aus der frontalen Hirnrinde vom Kaninchen (22 mg/kg L-DOPA; 6-monatige Applikation); deutlich ist die Quellung der Astrozytenfortsätze (AF), die an die Kapillarwand (KW) ansetzen, erkennbar; die Gefässwand der Kapillare sowie die Endothelzelle (EZ) erscheinen unauffällig. Vergr. 12.000 ×.

Ryc. 2. Naczynie włosowate kory czołowej królika (22 mg/kg L-DOPA przez 6 m-cy); Znaczny obrzęk wypustek astrocytarnych (AF) przylegających do ściany naczynia (KW). Ściana włosniczki i komórki śród błonka (EZ) niezmiennione. Pow. 12.000 ×.









einer Proliferation der Intima zum Ausdruck kommen. Ausser der Aktivierung der Mitochondrien tritt in der Muscularis eine Vacuolenbildung in Erscheinung, die auch in der Intima zu beobachten ist (Abb. 3 und 4). Desweiteren finden sich Ablagerungsprodukte nicht nur in der Gefässwand, sondern auch im perivaskulären Raum.

DISKUSSION

Unter Einbeziehung unserer ultrastrukturellen Untersuchungen und klinischen Ergebnisse nach der Behandlung mit L-DOPA kann festgestellt werden, dass L-DOPA wahrscheinlich schnell absorbiert, rasch verteilt und ausgeschieden wird. Der noch übriggebliebene unveränderte Rest von L-DOPA passiert die Blut-Liquor Schranke bzw. Blut-Hirn-Schranke und wird im Gehirn zu Dopamin decarboxyliert. Wie wir wissen, wirkt Dopamin an den Basalganglien als Neurotransmitter und hat einen inhibitorischen Effekt an bestimmten Synapsen des Zentralkreislaufsystems. Weiterhin ist bekannt, dass es durch eine Verarmung an Dopamin zu einer Störung des vorhandenen Gleichgewichtes zwischen den beiden Überträgersubstanzen Acetylcholin und Noradrenalin im extrapyramidalen System kommt. Durch die Zuführung von L-DOPA und die unmittelbar damit verknüpfte Bildung von Dopamin und Noradrenalin kommt es zu einer Acetylcholin-Hemmung, wodurch eine Antiparkinsonwirkung erzielt wird. Über den eigentlichen Wirkungsmechanismus von L-DOPA bzw. Dopamin wird noch diskutiert; er ist bis heute noch nicht restlos geklärt. In dieser Arbeit wird darauf nicht eingegangen. Vielmehr möchten wir Überlegungen anstellen, wie es zu diesen aufgezeigten ultrastrukturell fassbaren

Abb. 3. Ausschnitt aus einer intrazerebralen Arterie aus dem medialen Abschnitt des Kaninchengehirns (42 mg/kg L-DOPA, 6-monatige Applikation); in der Intima (In) ist neben einer proliferativen Veränderung eine Vakuolenbildung festzustellen; die Muscularis (Mu) die verbreitert ist, enthält Vakuolen und aktive Mitochondrien (Mi); die Elastica (El), Zellkern (Z) sowie die Adventitia erscheinen unverändert. Vergr. 12.000 X.

Ryc. 3. Fragment tętniczki z mózgu królika (42 mg/kg L-DOPA przez 6 m-cy). W warstwie wewnętrznej (In) widoczne zmiany proliferacyjne oraz wodniczki. Poszerzona warstwa mięśniowa (Mu) zawiera wakuole i pobudzone mitochondria (Mi). Warstwa sprężysta (El), jądro komórkowe (Z) i przydanka są niezmiennione. Pow. 12.000 X.

Abb. 4. Ausschnitt aus einer intrazerebralen Arterie aus dem frontalen Abschnitt des Kaninchengehirns (42 mg/kg L-DOPA; 6 monatige Applikation); die Intima (In) erscheint ausgelockert und lässt eine vakuolige Degeneration erkennen; die Muscularis (Mu) ist verbreitert und enthält Vakuolen; Adventitia und Elastica (El) erscheinen unverändert; im Virchow-Robin'schen Raum finden sich zahlreiche Ablagerungsprodukte (AP). Verg. 6.000 X.

Ryc. 4. Fragment naczyńia tętniczego okolicy czołowej mózgu królika (42 mg/kg L-DOPA przez 6 m-cy). Warstwa wewnętrzna naczyńia (In) o rozluźnionej strukturze z licznymi wodniczkami. Przydanka i błona sprężysta (El) są niezmiennione. W przestrzeni okołonacyniowej liczne produkty rozpadu (AP). Pow. 6.000 X.

Veränderungen nach höherer Dosierung von L-DOPA im Tierexperiment kommen kann.

Die Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden. Zunächst wird der grössere Teil des verabreichten L-DOPA in der Leber und den unteren Abschnitten des Gastrointestinaltraktes umgesetzt zu Dopamin, um dann peripher im Organismus abgelagert bzw. gespeichert zu werden. Nur eine relativ kleine Menge L-DOPA gelangt über die Blut-Hirn-Schranke an das Hirngewebe und wird dort zu Dopamin umgesetzt. Da es sich bei den in unseren Experimenten verwendeten Kaninchen um Tiere handelte, deren Dopamingehalt in den Basalganglien unverändert blieb, bedeutet dies, dass die den Nervenzellen über die Hirnkapillaren zugeführte L-DOPA-Menge eine "überschiessende" Wirkung hervorrufen muss. Das verabreichte L-DOPA bewirkt an den synaptischen Membranen eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Neurotransmittersubstanzen. Da die Nervenzelle vorerst unverändert ist, kann durch die noch nicht veränderte Permeabilität der Nervenzellmembran L-DOPA in das Innere der Nervenzelle diffundieren. Durch dieses Überangebot von L-DOPA werden zunächst die interzellulären Stoffwechselforgänge beschleunigt, so dass das funktionell bestehende Gleichgewicht aller Reaktionsvorgänge innerhalb und ausserhalb der Nervenzelle aus dem Gleichgewicht gerät. Die Nervenzelle verbraucht für ihre Stoffwechselforgänge mehr organische Substanzen als ihr von den zugeordneten Zellelementen zur Verfügung gestellt werden können. Durch die weitere L-DOPA-Zuführung kann die Nervenzelle die entstehenden Abweichungen nicht mehr abfangen, so dass daraus einerseits Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse, andererseits ein Missverhältnis in dem Gleichgewicht der Überträgersubstanzen an den synaptischen Membranen resultiert. Anfänglich wird ein Übergewicht auf der Seite des Noradrenalins bestehen, dass, je stärker sich die Permeabilität verändert, zugunsten des Acetylcholin verschoben wird. Die Nervenzelle ist somit fortlaufend Reizen ausgesetzt, denen sie nicht mehr entgegenwirken kann — eine Blockierung ihrer Stoffwechselforgänge ist unabwendbar, d.h., es resultiert ein toxischer Effekt. Von diesen Veränderungen sind nicht nur die Nervenzellen betroffen, sondern auch die nachgeordneten Zellstrukturen, die in enger Beziehung zu den Nervenzellen stehen — Astrozyten und Kapillaren. Die der geschädigten Nervenzelle weiterhin zugeführte L-DOPA-Menge verbleibt in dem ihr vorgeschalteten Zellelement, dem Astrozyten und löst hier eine toxische Quellung in den Astrozytenfortsätzen aus. Durch den Druck, den die angeschwollenen Astrozytenfortsätze auf die Kapillarwand ausüben, kommt es zu einer Komprimierung des Kapillarlumens; zum anderen wird durch den bleibenden Druck auf die Kapillarwand ein Reiz ausge-

löst, der zu einer Änderung des Mesenchymstoffwechsels führt, bevor eine sichtbare Wandschädigung zutage tritt. Allmählich wird durch die initiale unspezifische Mesenchymreaktion eine Störung des extravasalen Stofftransportes eintreten, die gleichbedeutend mit einer langsamen Proliferation der mesenchymalen Zellelemente ist. Es entstehen jene Veränderungen an den Gefäßen, die auf den Abbildungen 3 und 4 zu erkennen sind. Da durch die Störung der Transportwege der reguläre Stoffaustausch unterbunden wird, lagern sich sowohl in der Gefäßwand als auch im perivaskulären Raum Stoffwechselschlacken, Abbauprodukte an, die die bestehende Schädigung der zentralnervösen Strukturen weiterhin negativ beeinflussen.

Diese Befunde bestätigen eindrucksvoll die klinische Erfahrung, dass tägliche Gesamtdosen von 2,5 g und mehr vielen Parkinsonpatienten subjektive und objektive Beschwerden bringen; andererseits sind unsere Ergebnisse eine Bestätigung jener pharmakologischen und klinischen Untersuchungen, die eine geringere Dopakonzentration in der Therapie anstreben. In jüngster Zeit (Völler und Muschard 1973 u.a.) sind Meinungen bekannt geworden, dass durch eine gezielte Gabe von Decarboxylasehemmern in Verbindung mit L-DOPA ein optimaler Effekt zu erreichen ist. Durch diese Kombination wird es möglich, dass die zuführende L-DOPA-Dosis noch weiter zu reduzieren ist, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden, zumindest vonseiten des Dopamin. Wahrscheinlich wird dieser Therapieform beim Parkinsonismus die nächste Zukunft gehören.

H. Sommer, J. Quandt

ULTRASTRUKTURALNE ZMIANY W NACZYNIACH MÓZGU
PO DŁUGOTRWAŁYM PODAWANIU L-DOPA ZWIERZĘTOM
LABORATORYJNYM

Streszczenie

Celem pracy było wykazanie czy długotrwałe podawanie L-DOPA prowadzi do powstania trwałych zmian ultrastrukturalnych w mózгах zwierząt doświadczalnych.

Badania przeprowadzono na królikach, które przez okres 6 miesięcy otrzymywały L-DOPA w dawce od 12 do 52 mg/kg wagi ciała dziennie.

Wykazano, że długotrwałe podawanie L-DOPA powoduje obrzmienie wypustek astrocytarnych oraz zmiany we włóściwkach i drobnych naczyniach mózgu, których nasilenie zwiększa się wraz ze wzrostem dawki stosowanego leku. Autorzy uważają, że L-DOPA powodując zaburzenia w przemianie neurotransmiterów może prowadzić do zmian przepuszczalności błon komórkowych, których następstwem jest obrzmienie elementów strukturalnych tkanki nerwowej. Zmiany w ścianach naczyń i przestrzeniach okołonaczyniowych autorzy traktują jako niespecyficzną reakcję na zaburzenie transportu z układu naczyniowego do tkanki nerwowej.

Г. Соммер, И. Квандт

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СОСУДАХ МОЗГА ПОСЛЕ
ДЛИТЕЛЬНОЙ ПОДАЧИ L-DOPA ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Резюме

Целью работы была проверка, ведет ли длительная подача L-DOPA к возникновению устойчивых ультраструктурных изменений в мозге экспериментальных животных.

Исследования были проведены на кроликах, которые в течение 6 месяцев получали L-DOPA в дозах от 12 до 52 мг/кг веса тела, в день.

Было показано, что длительная подача L-DOPA ведет к отеку астроцитных отростков, а также к изменениям в капиллярах и мелких мозговых сосудах, величина которых растет по мере роста доз применяемого лекарства.

Авторы считают, что L-DOPA вызывая нарушения в обмене нейротрансмиттеров, может вести к изменениям проницаемости клеточных оболочек, следствием которых является отек структурных элементов нервной ткани. Изменения в стенках сосудов и в околососудистых пространствах авторы рассматривают как неспецифическую реакцию на нарушение транспорта из сосудистой системы в нервную ткань.

LITERATUR

1. Barbeau A.: L-DOPA therapy in Parkinson's disease. A critical review of nine years experience. *Canad. Med. Ass. J.* 1969, 101, 791—800.
2. Bertler A., Rosengren E.: Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 1959, 15, 10—11.
3. Birkmayer W., Hornykiewicz Ö.: Der L-3,4-Dioxyphenylalanin-(DOPA)-Effekt bei der Parkinson-Akinese. *Wien. Klin. Wschr.* 1961, 73, 787—788.
4. Birkmayer W.: Longevity in Parkinson's disease treated with Levodopa. *X. Intern. Congr. of Neurology, Barcelona Sept. 10—15, 1973.*
5. Brissaud E.: *Lecons sur les maladie nerveuses (Salpetriere 1893—1894)*, Masson, Paris, 1895.
6. Carlsson A., Lindquist M., Magnusson T.: 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytyramine in brain. *Pharmacol Rev.* 1959, 11, 490—493.
7. Ehringer H., Hornykiewicz O.: Verteilung von Noradrenalin und Dopamin im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.* 1960, 38, 1236—1239.
8. Ericsson A. D., McCann D., Sharpless N., Reveno W.: Metabolism and clinical assesment of L-DOPA in parkinsonism. 22 Annual Meeting of the American Academy of Neurology, 1970.
9. Euler v.U.S.: A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (symphtatin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 1948, 12, 73—97.
10. Fischer P. A., Schneider E., Jacobi P., Maxion H.: Langzeitstudie zur Effektivität der L-DOPA Therapie bei Parkinson-Patienten. *Nervenarzt*, 1973, 44, 128—135.
11. Funk C.: Synthesis of di-3-4-Dihydroxyphenylalanine. *J. Chem. Soc.* 1911, 99, 554—557.

12. Guggenheim M.: Dioxyphenylalanin, eine neue Aminosäure aus *vicia faba*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1913, 88, 276—284.
13. Hassler R.: Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postencephalitischen Parkinsonismus. J. Physiol. Neurol. 1938, 48, 387—476.
14. Kaeser H. E., Ferel D., Wurmser P.: Behandlung des Parkinson-Syndroms mit L-DOPA. Schweiz. med. Wschr. 1970, 100, 805—813.
15. Lewy F. H.: Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1913, 50, 50—55.
16. Montagu K. A.: Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. Nature 1957, 180, 244—245.
17. Tretiakoff C.: Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de Sommering avec quelques deductions relatives a la pathogenic des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. These med. Paris, 1919, No 293.
18. Umbach W., Baumann D.: Die Wirksamkeit von L-DOPA bei Parkinson-Patienten mit und ohne stereotaktischen Hirneingriff. Arch. Psychiat. Nervenkr. 1964, 205, 281—292.
19. Vogt C., Vogt O.: Zur Lehre der Erkrankungen des striären Systems. J. Physiol. Neurol. 1920, 25, Erg. H. 3.
20. Völler G. W., Deze J., Gundlach U.: Ein Beitrag zur Therapie des Parkinson-Syndroms mit L-DOPA. Med. Welt 1970, 21, 409—412.
21. Völler G. W., Muschard F.: Zur Therapie des Parkinson-Syndroms mit einer Kombination zwischen L-DOPA und einem Decarboxylasehemmer. Med. Welt 1973, 24, 705—707.

Anschrift der Verfasserin: Bezirkskrankenhaus f. Psychiatrie und Neurologie,
435 Bernburg-Saale/DDR

dok. ze str. 32?

-- J. Lindenman (Pathologisch Laboratorium, Leiden, Holandia).
The diagnosis of virus infection of the CNS.

7) 1975 — dnia 4.X.1975

— L. Dydyk, M. Rutczyński (Zespół Neuropatologii CMDiK PAN).

Obraz ultrastrukturalny mózgu noworodka królika po tranżożyskowym działaniu luminalu.

— A. Goncerzewicz (Klinika Neurologiczna Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań).

Patologia ultrastrukturalna neurogleju w doświadczalnej demielinizacji wywołanej metodą pompowania płynu mózgowo-rdzeniowego u kotów.

8) 1975 — dnia 8.XI.1975

— K. Renkawek (Zespół Neuropatologii CMDiK PAN).

Właściwości morfologiczne i histoenzymatyczne śródbłonka naczyń mózgowych w hodowli organotopowej in vitro, charakterystyczne dla bariery naczyniowo-mózgowej.

9) 1975 — dnia 6.XII.1975

— L. Iwanowski (Zespół Neuropatologii CMDiK PAN).

Obraz ultrastrukturalny naczyń mózgowych 26-dniowego płodu i noworodka królika.

— T. Majdecki, J. Kulczycki (CMDiK PAN, Warszawa i Klinika Neurologiczna PAM w Szczecinie).

Ultrastruktura przypadku podostrego stwardniającego zapalenia mózgu.

* * *

W dniach 18—20 września 1975 odbyło się w Warszawie Radziecko-Amerykańsko-Polskie Sympozjum na temat patofizjologicznych, biochemicznych i morfologicznych aspektów niedokrwienia mózgu i naciśnienia tętniczego, zorganizowane przez Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

* * *

Z dniem 1 lutego 1976 kol. Jerzy Kulczycki otrzymał nominację na Kierownika Kliniki Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie.

Jerzy Dymecki

MARIA OSTENDA, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ALICJA PRONASZKO-
-KURCZYŃSKA

ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON EXPERIMENTAL HEPATOGENIC ENCEPHALOPATHY

Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy
of Sciences

Head: prof. M. J. Mossakowski, M. D.

Numerous morphological studies on hepatogenic encephalopathy, performed both on human and experimental animal material (Adams, Foley, 1949; Lapham, 1961; Mossakowski, 1966a, 1966b; Shiraki, 1968) point to the primary impairment of astroglia as underlying this pathological process. Mossakowski et al. (1970) have shown, that in experimental hepatogenic encephalopathy, glial changes are accompanied by an increased permeability of brain vessels to silver salts, with unchanged barrier for conventional protein markers.

Insofar, the rich and diversified picture of morphological changes, observed in the light microscope, found but few and incomplete manifestations in the electron microscopic picture. This prompted us to undertake electron-microscopic studies of hepatogenic encephalopathy with the use of an already tested and reproducible experimental model of a known pathomorphological picture and dynamics. In the line with previous observations (Mossakowski et al., 1970) particular attention was devoted to the picture of the blood vessels and glia.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on 24 female Wistar rats, 3-months old at the beginning of the experiment. To produce liver cirrhosis, the experimental animals in the number of 16 were given subcutaneously injections of 50% carbon tetrachloride solution in liquid paraffin in a dosis of 0.5 ml CCl₄ per 100 g of body weight. The injections were

given 3 times a week for a period of 2, 4 and 6 months. The 8 control animals received injections of pure liquid paraffin with the same frequency and for the same period. To avoid possible age-dependent differences in the ultrastructural picture of the brain, the experiment was arranged so as to sacrifice all the animals at the age of 9 months.

After decapitation the brain was removed from the skull as quick as possible. Small tissue blocks were taken from the cortico-subcortical area of the fronto-parietal region and fixed by immersion in 3% glutaraldehyde in Millonig buffer, pH 7.2, for 2 hrs, and thereafter for 1 hr in 2% osmium tetroxide. The samples were dehydrated in ethanol of increasing concentration and embedded in Epon 812. Blocks were cut in a Tesla ultramicrotome. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The observations were made in a JEM 7A electron microscope.

Light microscopic studies of brain and liver tissue were done on formalin-fixed material. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosine, van Gieson's and Gridley's methods.

Fig. 1. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Endothelial cells of cortical capillary vessel contain numerous pinocytic vesicles. Interendothelial junctions form long, tortuous canals. x 4900.

Ryc. 1. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Śródbłonki korowego naczynia włosowatego zawierają liczne pęcherzyki pinocytarne i wodniczki. Zespoleńia międzyśródbłonkowe tworzą wydłużone, kręte kanały. Pow. 4900 x.

Fig. 2. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Endothelium of capillary vessel contains numerous pinocytic vesicles located at different depth of the cell. x 15 000.

Ryc. 2. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Śródbłonki naczynia włosowatego z licznymi pęcherzykami pinocytarnymi położonymi na różnej głębokości komórki. Pow. 15 000 x.

Fig. 3. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Interendothelial junction of the capillary vessel in the form of widened electron-lucide slit. x 14 800.

Ryc. 3. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Zspoleńie międzyśródbłonkowe naczynia włosowatego występuje w postaci poszerzonej optycznie pustej szczeliny. Pow. 14 800 x.

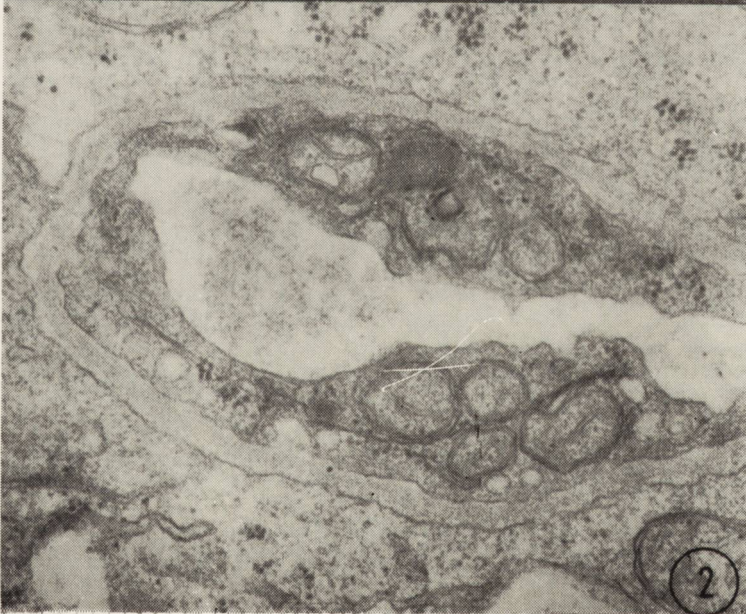
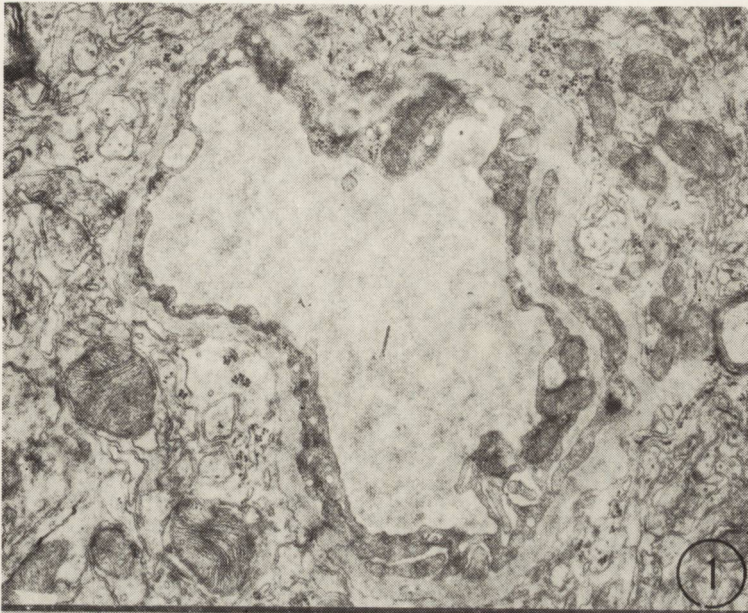
Fig. 4. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Cortical capillary vessel surrounded by entirely disintegrated perivascular astrocytic process. x 7 200.

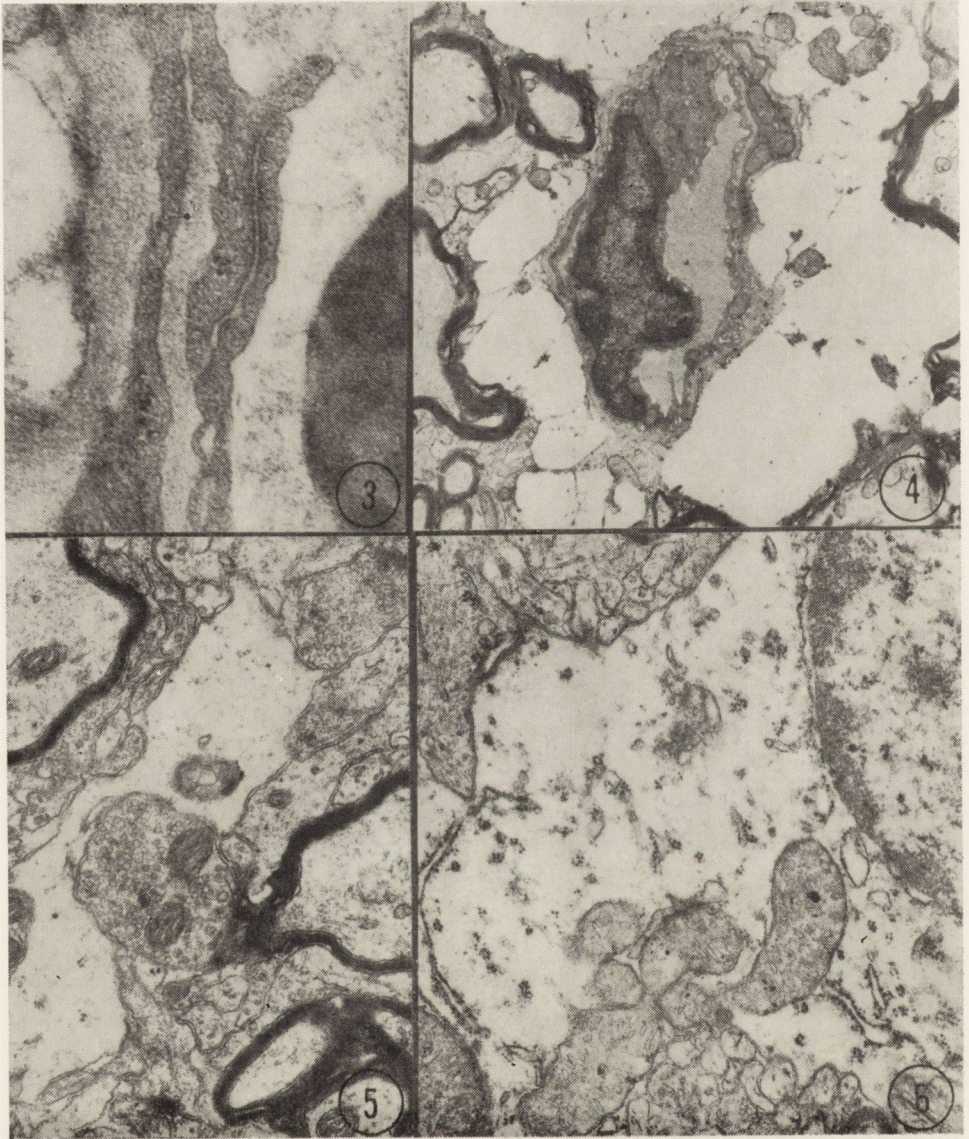
Ryc. 4. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Korowe naczynie włosowate otoczone ciężko uszkodzonymi okolonaczyniowymi wypustkami astrogleju. Pow. 7 200 x.

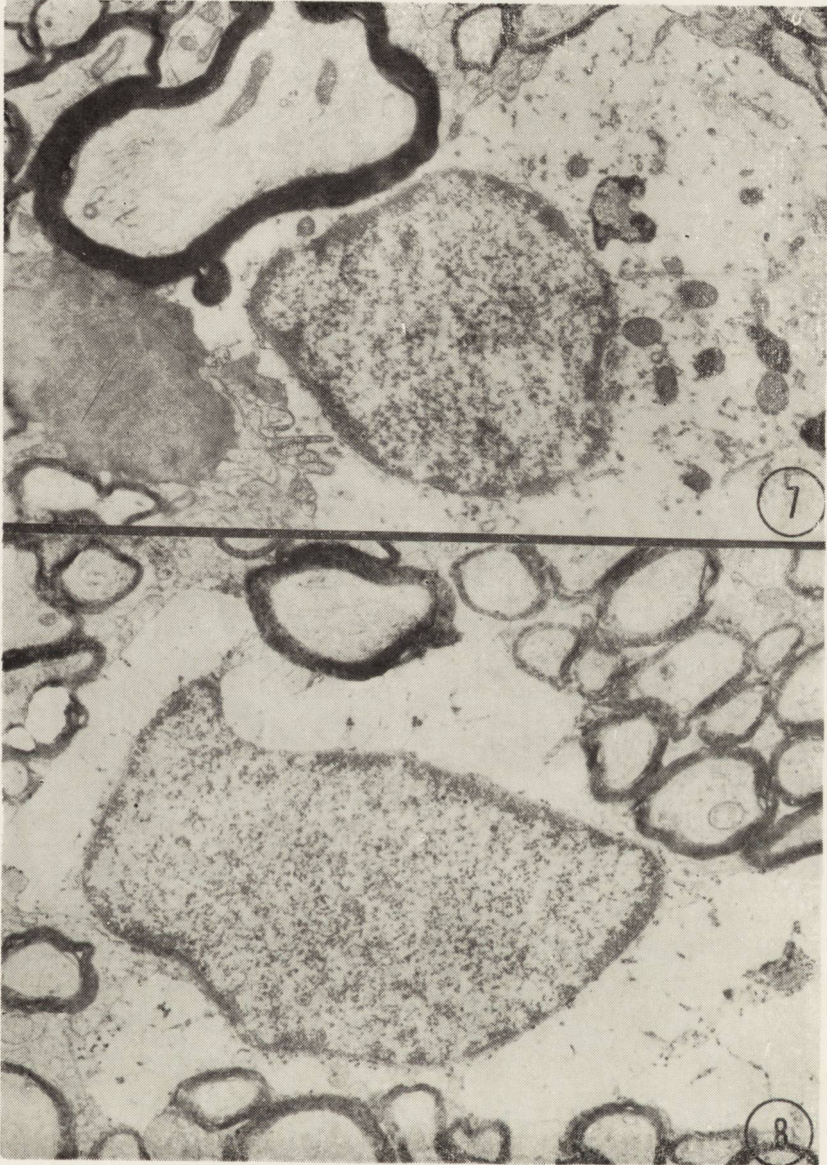
Fig. 5. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Swollen, organelle-free astrocytic process situated among other well preserved structural elements of neuropil. x 13 000.

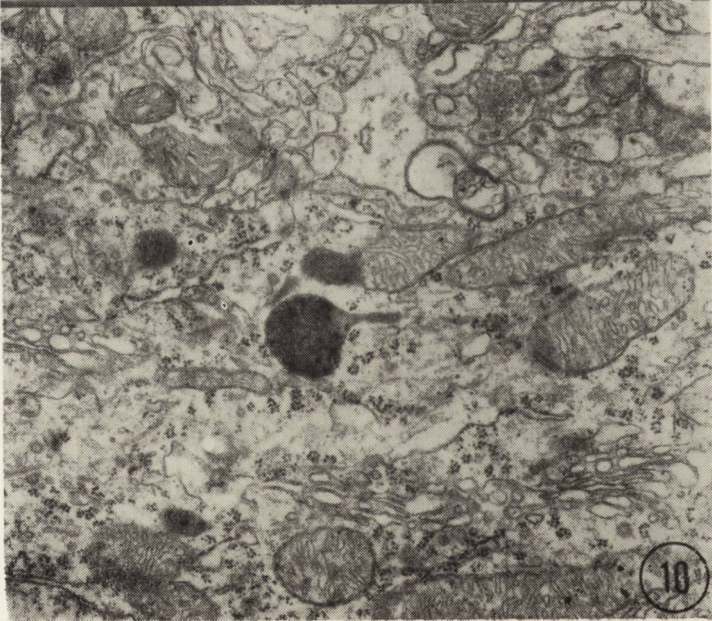
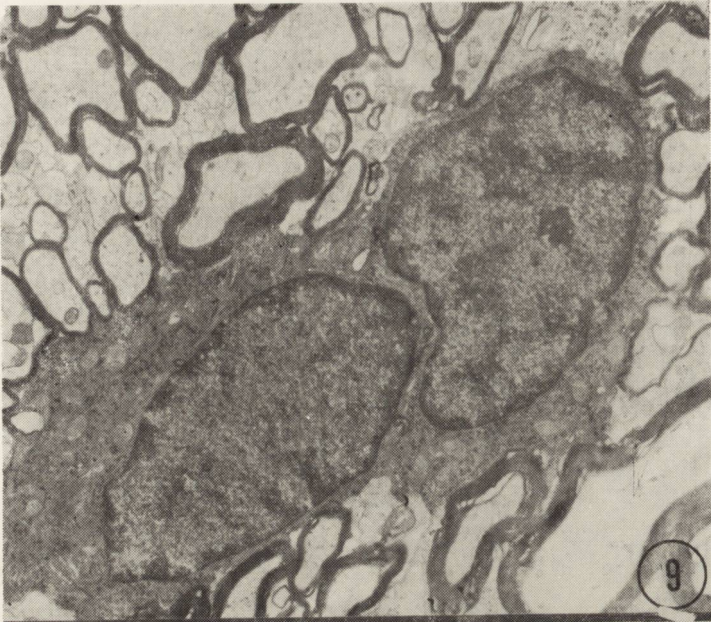
Ryc. 5. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Obrzmiała, pozbawiona organelli subkomórkowych wypustka astrocytarna, położona wśród prawidłowo zachowanych elementów neuropilu. Pow. 13 000 x.

Fig. 6. Hepatogenic encephalopathy of 4-month duration. Astrocyte with swollen, electron lucent cytoplasm containing normal mitochondria, fragments of rough endoplasmic reticulum and scanty free ribosomes. x 9 000.









RESULTS

On the light microscopy the brains of animals sacrificed after 4 and 6 months of experimental treatment revealed the features of hepatogenic encephalopathy, which were similar in their nature and intensity to those described in our previous paper (Mossakowski et al., 1971).

The electron microscopic picture of the brain of the animals decapitated after 2 months of the experiment did not significantly differ from that of the control animals. It should be emphasized that at the time, no features of liver cirrhosis were observed in the experimental animals, but only generalized changes of the character of hepatocytes' steatosis.

In the experimental animals, both after 4 and 6 months of the experiment significant abnormalities of the electron-microscopic picture were noted as compared with control material; the fundamental pattern of tissue lesions being identical in both groups, the only difference appearing in their intensity and range. At that time features of liver cirrhosis were found, much more intensive in animals with 6 months of experimental treatment.

Ryc. 6. Encefalopatia wątrobowa w 4 miesiącu doświadczenia. Astrocyt o obrzmiałej, optycznie przejrzystej cytoplazmie, zawierający prawidłowe mitochondria, fragmenty szorstkiej siatki śródplazmatycznej i skąpe wolne rybosomy. Pow. 9 000 x.

Fig. 7. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Astrocyte with advanced disintegration of cytoplasm. Electron lucent cytoplasm of the cell contains fragments of rough endoplasmic reticulum, some small mitochondria with a dark matrix and heterogenous dense bodies. x 15 000.

Ryc. 7. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Astrocyt z zaawansowaną dezintegracją cytoplazmy, zawierającej nieliczne mitochondria o ciemnej macierzy, fragmenty szorstkiej siatki śródplazmatycznej i heterogenne ciała gęste. Pow. 15 000 x.

Fig. 8. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Astrocyte with completely disintegrated cytoplasm. Large nucleus with diffusely spread, scanty chromatin seems to be located in entirely empty space. x 4 550.

Ryc. 8. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Astrocyt z całkowicie dezintegrowaną cytoplazmą. Duże jądro ze skąpą chromatyną sprawia wrażenie położonego w pustej przestrzeni. Pow. 4 550 x.

Fig. 9. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Two oligodendrocytes localized in subcortical area, with entirely normal ultrastructural picture. x 4 550.

Ryc. 9. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Dwie komórki oligodendrogleju o całkowicie prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. Pow. 4 550 x.

Fig. 10. Hepatogenic encephalopathy of 6-month duration. Fragment of neuronal cytoplasm, containing numerous canals of Golgi complex, among which many coated vesicles are seen, and free ribosomes as well as some dense bodies. x 9 000.

Ryc. 10. Encefalopatia wątrobowa w 6 miesiącu doświadczenia. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej, zawierającej liczne kanały zespołu Golgiego z położonymi wśród nich pęcherzykami obłonionymi, wolne rybosomy i nieliczne ciała gęste. Pow. 9 000 x.

The electron-microscopic tissue changes involved the structure of the capillary vessels and selectively the astrocytic glia. The remaining tissue elements were unchanged or showed only very slight ultrastructural abnormalities.

The ultrastructural changes of the capillary vessel walls found already in the 4-months group, were manifested first of all by a marked enhancement of the pinocytosis in the cells of endothelium (Fig. 1). The endothelial cells were abundantly filled with numerous pinocytic vesicles, found on various depth of their cytoplasm (Fig. 2). This phenomenon was particularly well marked in animals after 6 months of experiment. In the same vessels the myelin-like structures were noted in the endothelial cells, these structures being usually situated in the vicinity of the cell membranes, facing the vessel lumina. The intercellular junctions of endothelium showed a significant extension (Fig. 3). In addition irregularity and folding of the interendothelial junctions was seen.

Already in the 4-months group a significant swelling of perivascular astrocytic processes was observed. Their cytoplasm was characterized by a decrease of electron density and reduction of subcellular elements. At a higher intensity of changes, observed mostly in the 6-months group, the blood vessels were surrounded by wide electron-light spaces of astrocytic processes, which were almost completely deprived of cytoplasmic subcellular elements (Fig. 4). Occasionally, the narrowed lumina of the capillary vessels gave the impression of being compressed by the extended perivascular astrocytic processes. The reduction of subcellular elements was characteristic not only for perivascular astrocytic processes but also for those situated in the neuropil, contrasting with the remaining unchanged elements of nerve tissue (Fig. 5).

Analogical changes concerned the astrocyte perikarya. When their impairment was less extensive, the cell cytoplasm was characterized only by a marked swelling (Fig. 6). More intensive changes proceeded with a significant disintegration of endoplasmic structures, first of all of the endoplasmic reticulum. In these cases, in the electron-light cytoplasm only fragments of the rough and smooth endoplasmic reticulum, some aggregations of free ribosomes and vacuoles of various size, probably originating from the extended endoplasmic reticulum were found to occur (Fig. 7). In some of the cells an increased number of dense bodies and a slightly increased number of glycogen rosettes were observed. The latter appeared both in the perikarya and processes of the astrocytes. At the highest intensity of changes, the enlarged nuclei of astrocytes were situated in an empty, organelle-free cytoplasm (Fig. 8). The nuclei of astrocytes showed relatively slight changes, mostly concerning their

size and distribution of chromatine, being scarcer and more loosely spread out. In some of the astrocytic nuclei the accumulations of small electron-dense grain could be seen, the structure of which differed both from aggregations of the nuclear RNA and cytoplasmic glycogen grains.

Contrary to the massive involvement of astrocytes, oligodendroglia showed practically no ultrastructural changes (Fig. 9). The same was true for the nerve cells in which only occasionally an increased number of dense bodies and insignificant distention of endoplasmic reticulum channels were observed (Fig. 10).

DISCUSSION

Selective impairment of astroglia, predominating in the electron-microscopic picture of the experimental hepatogenic encephalopathy, is consistent with a number of light-microscopic observations pointing to the primary gliopathic nature of the process. The abnormalities in the ultrastructure of astrocytes found by us resemble those described in humans in hepatogenic encephalopathy (Martinez, 1968), portal systemic encephalopathy (Foncin, Nicolaidis, 1970) and in Wilson's disease (Gruner, quoted by Foncin, 1970). These abnormalities show no specific electron microscopic features. They do not diverge from the ultrastructural picture of astrocytes in cases of severe brain edema (Hirano et al., 1967). These changes may manifest unspecific impairment of glia, predominating in the histological picture of hepatic encephalopathy and leading to disintegration of astrocytic cells. It seems, however, that the pictures of maximal swelling of astrocyte cytoplasm with complete disappearance of endoplasmic cell organelles found by us may constitute the ultrastructural manifestation of the glial changes described as Alzheimer cells, type II. Likewise, the glycogen accumulations correspond to the perinuclear deposits of this polysaccharide described by Shiraki (1967) in human pathology and by Mossakowski et al. (1970) in experimental animals. The character of the small, electron dense grains agglomerations present in the altered nuclei of astrocytes remains unclear. In view of their ultrastructural picture it does not seem possible to consider them as an electron microscopic manifestation of the intranuclear glycogen inclusions, observed in the light microscopy.

No structures corresponding to the Opalski cells were found in our material, this being consistent with the light microscope observations. Neither were ultrastructural manifestations of the progressive changes of astroglia, observed, which were described by Ma Hta Kyn and Cavanagh (1970) and Cavanagh and Ma Hta Kyn (1971) in cases of experimental porto-caval encephalopathy.

The described changes in electron microscopic picture of capillary vessels, particularly the features of intensive pinocytosis, as compared with their absence or insignificance in normal brain vessels (Brightman and Reese 1970) may be the expression of changes in the vessel permeability. They may form the morphological background of the increased blood vessel permeability described by Mossakowski et al. (1971) in cases of experimental hepatogenic encephalopathy.

Our observations do not answer the question concerning the mutual relations between vascular and cellular changes. Both are present in animals after a 4-month experimental period and become enhanced after 6 months of experimental treatment. They do not occur in rats treated for only 2 months. Presumably, studies on animals with an experimental period longer than 2 months and shorter than 4 months would give a picture of the differences in the dynamics of appearance and development of both type of changes.

M. Ostenda, M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Streszczenie

Przeprowadzono badania mikroskopowo-elektronowe mózgów szczurów z encefalopatią pochodzenia wątrobowego, wywołaną przewlekłym stosowaniem czterochlorku węgla.

Najwcześniejsze nieprawidłowości ultrastrukturalne stwierdzono u zwierząt po 4-miesięcznym stosowaniu CCl_4 . Osiągały one maksymalne nasilenie po upływie 6 miesięcy.

Zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym dotyczyły ścian naczyń włosowatych i gleju astrocytarnego. Nieprawidłowości w obrazie naczyń wyrażały się wzmocnieniem aktywności mikropinocytarnej śródbłonek i poszerzeniem złącz międzyśródbłonkowych, które uznano za podłoże zwiększonej przepuszczalności ścian naczyniowych. Zmiany patologiczne gleju astrocytarnego wyrażały się bardzo znacznym obrzmieniem cytoplazmy wypustek i perikariów komórkowych, prowadzącym do jej całkowitej dezintegracji strukturalnej. Powiększone jądra astrocytów, o rozrzedzonym układzie chromatyny, zawieszane w pozbawionej organelli cytoplazmie, uznano za mikroskopowo-elektronowy wykładnik komórek Alzheimera typu II.

M. Остенда, М. Я. Моссаковски, А. Пронашко-Курчиньска

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Были проведены электронно-микроскопические исследования мозга крыс с печеночной энцефалопатией, вызванной применением четыреххлористого углерода.

Самые ранние ультраструктурные нарушения были обнаружены у животных после 4-месячного применения CCl_4 . Наивысшая их интенсивность достигалась по истечению 6 месяцев.

Изменения в электронно-микроскопической картине касались стенок капиллярных сосудов и астроцитной глии. Нарушения в картине сосудов проявлялись увеличением микропиноцитарной активности эпителия и расширением межэпителиальных соединений, которые расценивались как основа увеличенной проницаемости стенок сосудов. Патологические изменения астроцитов выражались значительным отеком цитоплазмы отростков и тела клеток, который приводил к общей структурной дезинтеграции. Увеличенные ядра астроцитов, отличающиеся разреженной системой хроматина, находящиеся в цитоплазме, лишенной оргanelл расценивались как электронно-микроскопический показатель клеток Альцхаймера II типа.

REFERENCES

1. Adams R. D., Foley J. M.: The neurological changes in the more common types of severe liver disease. *Trans. Amer. Neurol. Soc.*, 1949, 74, 217—225.
2. Baker A. B.: The central nervous system in hepatic disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1949, 8, 283—294.
3. Brightman M. W., Reese T. S.: Tight junctions, gaps and fenestrae in the endothelium of normal and abnormal vertebrate brains. *The Proc. Symp. on the Blood-Brain-Barrier. Tmiex. Oxford.* 1970, 5—12.
4. Cavanagh J. B., Ma Hta Kyn: Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. Neurol. Sci.* 1971, 12, 63—75.
5. Foncin J. F.: Pathologie ultrastructurale chez l'homme. *Proc. VI. Internat. Congress Neuropath. Paris. Masson et Cie.* 1970, 371—391.
6. Foncin J. F., Nicolaidis S.: Encephalopathie porto-cave: contribution à la pathologie ultrastructurale de la glie chez l'homme, *Rev. Neurol.* 1970, 123, 81—87.
7. Hirano A., Zimmerman H. M., Levine S.: Fine structure of cerebral fluid accumulation. In *Brain Edema*, ed. Klatzo I., Seitelberger F., Springer. Wien, New York. 1967. pp. 569—589.
8. Lapham L. W.: A study of protoplasmic astrocytes in experimentally produced hepatic encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1961, 20, 305—309.
9. Martinez A.: Electron microscopy in human hepatic encephalopathy. *Acta neuropath. (Berl.)* 1968, 11, 82—86.
10. Ma Hta Kyn, Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomoses in the male rat. *J. exp. Path.* 1970, 51, 217—227.
11. Mossakowski M. J.: Some aspects of the morphology and histochemistry of the cerebral changes in hepatic coma. *Proc. V. Intern. Congress Neuropath. Zürich. Elsevier, Amsterdam.* 1966a, 981—986.
12. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.* 1966b, 4, 231—304.
13. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970, 8, 365—374.

14. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: The blood-brain barrier abnormality in experimental hepatic encephalopathy. *Berichte der I Donau Symposium für Neuropathologie, Wien, 1969. Wiener Med. Akademie 1971, 99—102.*
15. Shiraki H.: The comparative study of various types of hepatocerebral diseases in Japan. In: *The central nervous system. Some Experimental Models of Neurological Diseases.* Ed. O. T. Bailey a. D. E. Smith. The Williams a. Wilkins Co. Baltimore, 1968, 252—272.

Authors' address: Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, 3 Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

KRYSTYNA RENKAWEK

ROLA PIERWIASTKÓW ŚLADOWYCH W PATOGENEZIE GLIOPATII WYWOŁANEJ W POZAUSTROJOWEJ HODOWLI TKANKI GLEJOWEJ

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

Z prac nad patogenezą choroby Wilsona i encefalopatii wątrobowej prowadzonych *in vivo* i *in vitro* wiadomo, że charakterystyczne zmiany morfologiczne i histochemiczne dotyczące głównie astrogleju, powstają w wyniku uszkadzającego wpływu miedzi i amoniaku na komórki glejowe (Mossakowski 1966, Mossakowski i wsp. 1970, 1972).

W badaniach klinicznych chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym stwierdzono upośledzenie wydalania z moczem szeregu pierwiastków śladowych i wzrost ich zawartości w mózgu (Lojko 1968, Coleman i wsp. 1963). Powstaje więc pytanie czy zwiększenie ilości pierwiastków śladowych w tkankach mózgu, poprzez ich bezpośredni wpływ na metabolizm komórek glejowych i nerwowych bierze udział w patogenezie uszkodzeń tkankowych, typowych zarówno dla choroby Wilsona jak i encefalopatii wątrobowej.

Celem pracy jest ocena bezpośredniego wpływu pierwiastków śladowych na obraz morfologiczny i właściwości histoenzymatyczne tkanki glejowej hodowanej *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na hodowlach tkanki glejowej z mózdków noworodków szczurzych rasy Wistar, prowadzonych w warunkach rutynowych we flaszkach Carrela. Dokładny opis metody hodowli tkanki glejowej został podany w pracy Krańnickiej i Mossakowskiego (1965).

W doświadczeniu, do środowiska odżywczego hodowli podawano następujące pierwiastki śladowe: cynk, żelazo, mangan, magnez i miedź

w stężeniach dwukrotnie wyższych od ich prawidłowej zawartości w surowicy krwi ludzi zdrowych.

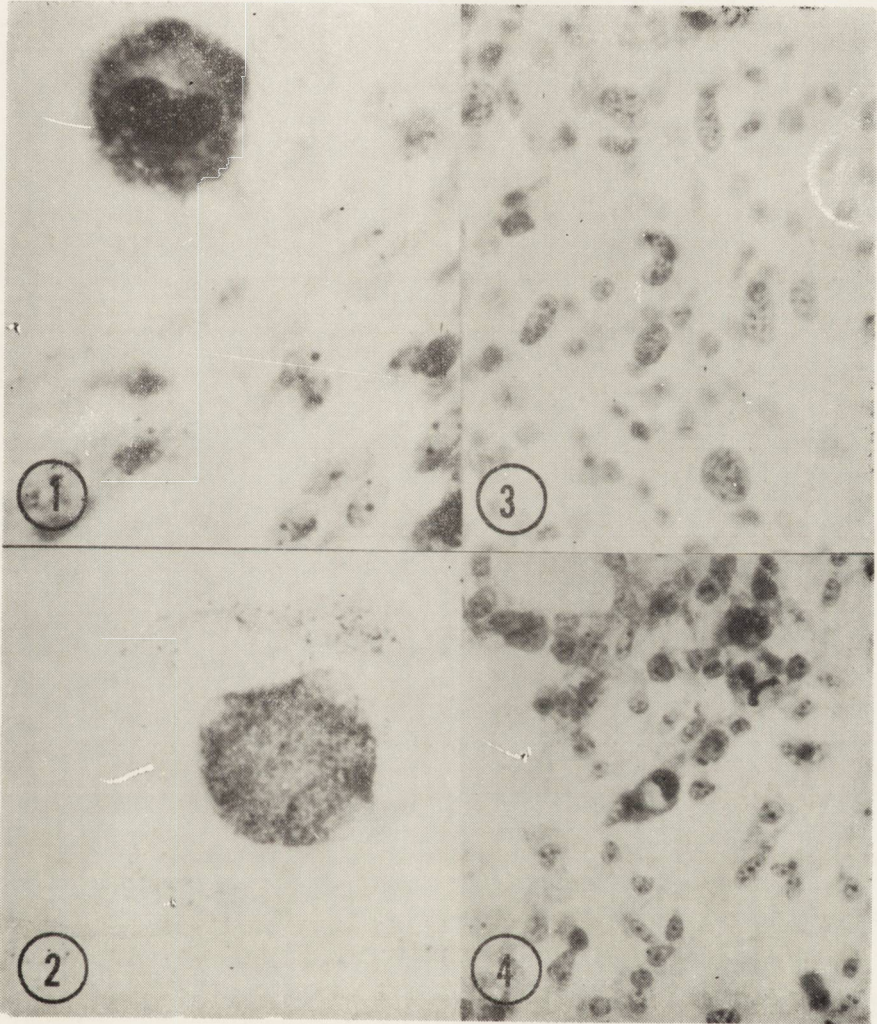
Doświadczenie obejmowało następujące grupy:

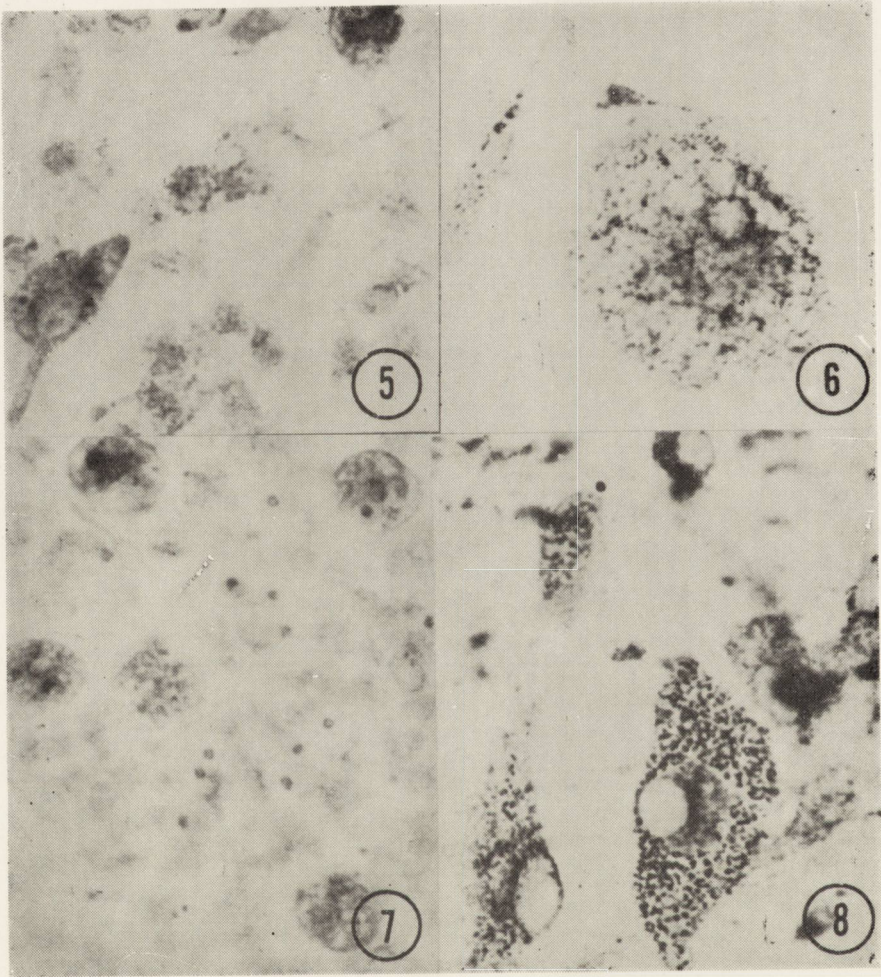
- Grupa I — z dodatkiem octanu cynku ($\text{Zn}/\text{CH}_3\text{COO}/_2$) w stężeniu końcowym 500 i 1000 gamma % cynku,
- Grupa II — z dodatkiem azotanu żelazowego ($\text{Fe}/\text{NO}_3/_3$) w stężeniu końcowym 240 gamma % żelaza,
- Grupa III — z dodatkiem octanu manganawego ($\text{Mn}/\text{CH}_3\text{COO}/_2$) w stężeniu końcowym 258 gamma % manganu,
- Grupa IV — z dodatkiem octanu magnezu ($\text{Mg}/\text{CH}_3\text{COO}/_2$) w stężeniu końcowym 4200 gamma % magnezu,
- Grupa V — z dodatkiem octanu miedzi ($\text{Cu}/\text{CH}_3\text{COO}/_2$) w stężeniu końcowym 4900 gamma % miedzi.

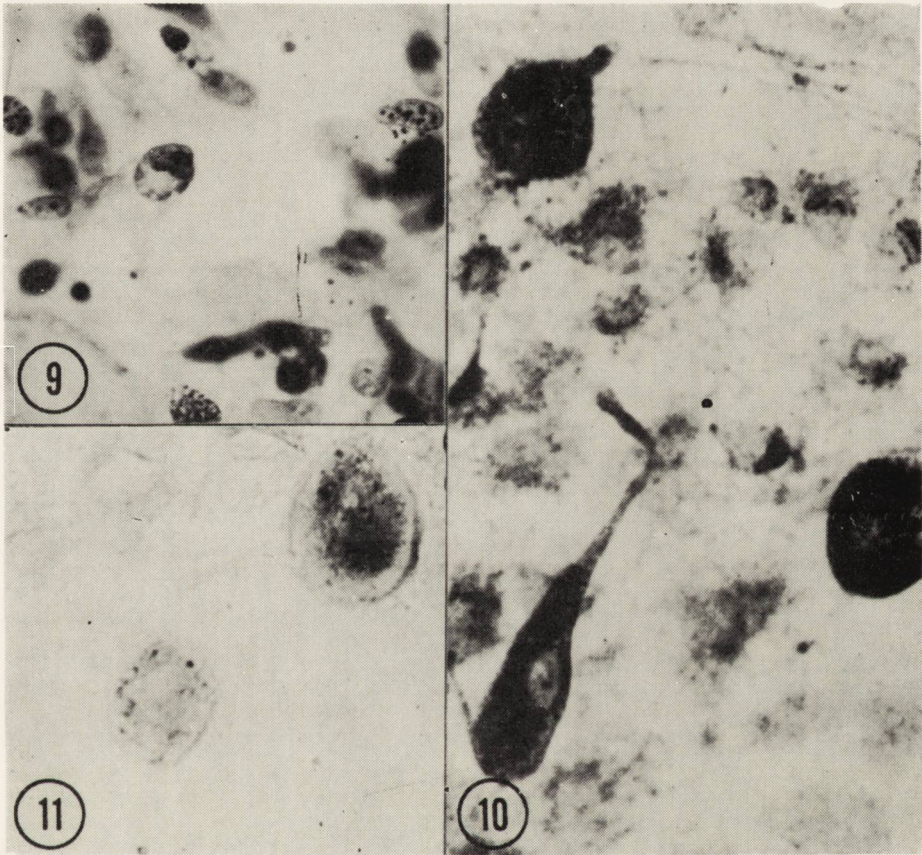
Wymienione powyżej sole pierwiastków śladowych podawano do medium odżywczego 1- i 2-tygodniowych hodowli. Obserwacje w mikroskopie świetlnym prowadzono codziennie. W okresie od 3 do 14 dnia doświadczenia hodowle wszystkich grup doświadczalnych utrwalano i barwiono metodami przeglądowymi: błękitem toluidyny i fioletem krezyłu oraz wykonywano odczyny histochemiczne PAS, Sudan Czarny B i błękit Alcjanu. We wszystkich grupach hodowli określano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, glutaminianowej i glukozy-6-fosforanowej. W grupie I oznaczono dodatkowo aktywność dehydrogenazy alkoholowej, w grupie III — esterazy nieswoistej, a w grupie V — oksydazy cytochromowej. Badania histochemiczne wykonano przy pomocy tych samych metod, które stosowano w poprzednich pracach dotyczących gliopatii wątrobowych *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970, Renkawek 1972). Kontrole każdej grupy doświadczalnej stanowiły hodowle tego samego wieku przetrzymywane w standardowym medium, barwione w tym samym czasie i przy użyciu tych samych metod przeglądowych i histoenzymatycznych.

WYNIKI

Grupa I. Komórki glejowe w hodowli w wieku 1 i 2 tygodni wzrostu *in vitro* wykazują podobne zmiany morfologiczne jak i histoenzymatyczne zarówno w pobliżu eksplantatu jak i w wieńcu wzrostu. Przy stężeniu 500 gamma % cynku w medium, po 24 godzinach doświadczenia większość komórek glejowych traci wypustki. W poszczególnych hodowlach pojawiają się mniej lub bardziej nasilone nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe. Po 3, 7 i 10 dniach doświadczenia w hodowli występują komórki glejowe o obfitej cytoplazmie z krótkimi, obrzmiałymi wypustkami. Są one niekiedy całkowicie bezwypustkowe. Nierzadko spotyka się komórki







Ryc. 1. Hodowla 10-dniowa. 500 gamma % cynku. 7 dni doświadczenia. Komórka Opalskiego z bogatochromatynowym, nerkowatym jądrem. Błękit toluidyny. Pow. 600 x.

Fig. 1. 10 days old culture. 500 gamma % of zinc. 7 days of the experiment. Opalski cell with chromatin-rich, kidney-shaped nucleus. Toluidine blue. x 600.

Ryc. 2. Hodowla 7-dniowa. 1000 gamma % cynku. 4 dni doświadczenia. Liczne, duże jądra glejowe o nieregularnym podłużnym kształcie, z grubymi grudkami chromatyny. Błękit toluidyny. Pow. 400 x.

Fig. 2. 7 days old culture. 1000 gamma % of zinc. 4 days of the experiment. Numerous, large, elongated, irregular glial nuclei with coarse chromatin granules. Toluidine blue. x 400.

Ryc. 3. Hodowla 14-dniowa. 1000 gamma % cynku. 14 dni doświadczenia. Niska aktywność dehydrogenazy alkoholowej w komórce Opalskiego i w otaczającym gleju. Drobne ziarna formazanu równomiernie ułożone w cytoplazmie. Pow. 600 x.

Fig. 3. 14 days old culture. 1000 gamma % of zinc. 14 days of the experiment. Low activity of alcohol dehydrogenase in Opalski cell and in the surrounding glial cells. Fine formazan granules evenly distributed in the cytoplasm. x 600.

Ryc. 4. Hodowla 7-dniowa. 240 gamma % żelaza. 14 dni doświadczenia. Komórki astrogleju ze skąpą cytoplazmą, jasnymi, różnokształtnymi jądrami. Błękit toluidyny. Pow. 200 x.

Fig. 4. 7 days old culture. 240 gamma % of iron. 14 days of the experiment. Astroglial cells with scanty cytoplasm and pale, polymorphic nuclei. Toluidine blue. x 200.

Ryc. 5. Hodowla 7-dniowa. 258 gamma % manganu. 7 dni doświadczenia. Liczne jednojądrzaste komórki Opalskiego z wodniczkami w cytoplazmie. Błękit toluidyny. Pow. 200 x.

Fig. 5. 7 days old culture. 258 gamma % of manganese. 7 days of the experiment. Numerous, mononuclear Opalski cells with intracytoplasmic vacuoles. Toluidine blue. x 200.

Ryc. 6. Hodowla 14-dniowa. 240 gamma % żelaza. 14 dni doświadczenia. Aktywność dehydrogenazy-glukozy-6-fosforanowej w komórce przejściowej. Drobne pyłkowe ziarna skupione wokół jądra i grube ziarna formazanu w cytoplazmie komórkowej. Pow. 400 x.

Fig. 6. 14 days old culture. 240 gamma % of iron. 14 days of the experiment. Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in intermediate cell expressed by dust-like formazan granules around the nucleus and the coarse ones at the periphery of the cytoplasm. x 400.

Ryc. 7. Hodowla 7-dniowa. 4200 gamma % magnezu. 7 dni doświadczenia. Znaczny polimorfizm jąder komórkowych i nasilone zmiany zwyrodnieniowe komórek glejowych. Błękit toluidyny. Pow. 400 x.

Fig. 7. 7 days old culture. 4200 gamma % of magnesium. 7 days of the experiment. Marked polymorphism of the glial nuclei and enhanced degenerative cellular changes. Toluidine blue. x 400.

Ryc. 8. Hodowla 7-dniowa. 240 gamma % żelaza. 14 dni doświadczenia. Liczne, grube ziarna PAS-dodatnie w komórkach przejściowych. Metoda PAS. Pow. 200 x.

Fig. 8. 7 days old culture. 240 gamma % of iron. Numerous, coarse PAS-positive granules in the intermediate cells. PAS method. x 200.

Ryc. 9. Hodowla 14-dniowa. 258 gamma % manganu. 10 dni doświadczenia. Aktywność dehydrogenazy-glukozy-6-fosforanowej w komórce Opalskiego, drobne ziarna formazanu nierównomiernie ułożone w cytoplazmie. Pow. 600 x.

Fig. 9. 14 days old culture. 258 gamma % of manganese. 10 days of the experiment. Activity of glucose-6-phosphate in the Opalski cell; fine formazan granules irregularly distributed in the cytoplasm. x 600.

Ryc. 10. Hodowla 7-dniowa. 4000 gamma % miedzi. 3 dni doświadczenia. Niska aktywność enzymatyczna oksydazy cytochromowej w komórkach Opalskiego, brak aktywności w otaczających komórkach gleju. Pow. 400 x.

Fig. 10. 7 days old culture. 4000 gamma % of copper. 3 days of the experiment. Low activity of cytochrome oxidase in Opalski cells, lack of the activity in surrounding glial cells. x 400.

Ryc. 11. Hodowla 7-dniowa. 4200 gamma % magnezu. 14 dni doświadczenia. Liczne jednojądrzaste komórki ze szczątkowymi wypustkami. W niektórych komórkach wodniczki. Znaczna ilość substancji PAS-dodatnich. Metoda PAS. Pow. 400 x.

Fig. 11. 7 days old culture. 4200 gamma % of magnesium. 14 days of the experiment. Numerous mononuclear cells with residual processes and intracellular vacuoles. Marked accumulation of PAS-positive substances. PAS method. x 400.

wielojądrzaste, przypominają one swoim wyglądem komórki Opalskiego (ryc. 1). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej w populacji komórek glejowych jest niska, zwłaszcza w komórkach Opalskiego. Uderzająco niska jest aktywność dehydrogenazy alkoholowej (ryc. 2). Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej nie wykazuje zmian w stosunku do hodowli kontrolnych.

W stężeniu 1000 gamma % cynku w medium po 3 dniach doświadczenia część jąder glejowych wykazuje dodatkowo cechy obrzmienia. Ich kształt jest często nieregularny, bądź też wyraźnie nerkowaty (ryc. 3). Aktywność wszystkich badanych dehydrogenaz jest w całej populacji bardzo niska w porównaniu z hodowlami kontrolnymi.

Grupa II. Komórki glejowe z hodowli 1- i 2-tygodniowych po krótszym niż 14 dni czasie doświadczenia nie wykazują istotnych nieprawidłowości morfologicznych ani zmian w obrazie odczynów histoenzymatycznych. Po 2 tygodniach doświadczenia w części komórek glejowych stwierdza się powiększenie jąder z wyraźnie widocznym jednym lub dwoma jąderkami. Często występują komórki w różnych stadiach podziału, najczęściej metafazy. Cytoplazma komórkowa w większości astrocytów jest skąpa, często widoczny jest jedynie jej wąski rąbek wokół jąder komórkowych (ryc. 4). Komórki przypominające komórki Opalskiego występują sporadycznie w pojedynczych hodowlach, często natomiast obserwuje się formy przejściowe z krótkimi, szczątkowymi wypustkami bądź bez wypustek. Tak zmienione komórki glejowe gromadzą znaczne ilości ziaren wybarwiających się dodatnio w metodzie PAS i w błękiecie Alcjanu (ryc. 5). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej jest niska zarówno w komórkach Opalskiego jak i w komórkach przejściowych. Obserwuje się natomiast wysoką aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu, zwłaszcza w formach pośrednich (ryc. 6).

Grupa III. W hodowlach 1-tygodniowych po krótkim okresie trwania doświadczenia (3 i 5 dni) pojawia się znaczna liczba jasnych jąder glejowych, pozbawionych otaczającej cytoplazmy. Liczne są również formy podziałów mitotycznych. W hodowlach bardziej zróżnicowanych, po 2 tygodniach wzrostu *in vitro* i po dłuższym okresie doświadczenia, pojawiają się nieliczne komórki Opalskiego, często wielojądrzaste, z licznymi wodniczками śródplazmatycznymi. Po 14 dniach doświadczenia obserwuje się liczne komórki przejściowe i komórki Opalskiego (ryc. 7). Aktywność badanych dehydrogenaz i esterazy nieswoistej jest niższa niż w hodowlach kontrolnych (ryc. 8).

Grupa IV. W hodowlach 1- i 2-tygodniowych po 7 dniach doświadczenia obserwuje się znaczny polimorfizm jąder komórek glejowych (ryc. 9). Są to w większości jądra bogatochromatynowe. Często spotyka

się mitozy, w znacznej części nieprawidłowe. Typowych komórek Opalskiego nie spostrzega się, w niektórych natomiast hodowlach występują formy przejściowe (ryc. 10), bądź też astroglej pozbawiony wypustek. Charakteryzuje je stosunkowo wysoka aktywność badanych dehydrogenaz.

Grupa V. W hodowlach 1- i 2-tygodniowych po 3 i 7 dniach doświadczenia pojawiają się liczne komórki Opalskiego jak i formy przejściowe między prawidłowym astroglejem i komórkami Opalskiego. Aktywność oksydazy cytochromowej w 3 dniu doświadczenia jest niska w obu typach komórek. W 7 dniu doświadczenia większość komórek Opalskiego i komórek przejściowych wykazuje śladową aktywność enzymatyczną. Niektóre z nich charakteryzuje całkowity brak aktywności enzymatycznej. Bardzo niską aktywność oksydazy cytochromowej obserwuje się również w komórkach glejowych nie wykazujących nieprawidłowości morfologicznych (ryc. 11).

CMÓWIENIE

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji, dotyczących wszystkich grup doświadczalnych można wnioskować, że zastosowane metale śladowe, w użytych stężeniach wywierają bezpośredni wpływ uszkodzający metabolizm i strukturę komórek glejowych *in vitro*. Nieprawidłowości morfologiczne i histoenzymatyczne dotyczą przede wszystkim astrocytów, jakkolwiek w 1-tygodniowych hodowlach z nisko zróżnicowaną populacją komórek glejowych, trudno jest niekiedy jednoznacznie ocenić morfogenezę spostrzeganych patologicznych form komórkowych.

Zmiany patologiczne występujące w hodowlach glejowych prowadzonych z dodatkiem egzogennych soli cynku i manganu i rozwijające się w następstwie 1- i 2-tygodniowego działania metalu, przypominają w swoim wzorcu strukturalnym i histoenzymatycznym obraz gliopatii wilsonowskiej lub wątrobowej, występującej u ludzi i w materiale doświadczalnym *in vivo* i *in vitro* (Mossakowski 1965, 1966, Mossakowski i wsp. 1970). Należy jednak podkreślić, że patologiczne formy glejowe, uznane za typowe dla gliopatii pochodzenia wątrobowego występują na tle nasilonych nieswoistych zwyrodnień komórkowych gleju.

W grupach doświadczalnych, w których zastosowano egzogenne sole żelaza i magnezu, właściwości morfologiczne i histoenzymatyczne komórek glejowych nie ulegały istotnym zmianom w porównaniu do hodowli prowadzonych w warunkach standardowych, lub też występujące w nich nieprawidłowości miały nieznaczne nasilenie. W przypadku hodowli z egzogennymi solami żelaza, zjawisko to można by wiązać ze znaną to-

lerancją komórek na zmiany w jego stężeniu, wykazującą zresztą daleko idącą zależność od wieku i stanu zróżnicowania komórek (Morgan, Waters 1963). Nieprawidłowości strukturalne i metaboliczne, stwierdzone w młodych hodowlach z niezróżnicowaną morfologicznie i histoenzymatycznie populacją komórek glejowych, należy raczej uznać za wyraz ich nieswoistego zwyrodnienia.

Zmiany histoenzymatyczne w patologicznych formach komórkowych, w tym zarówno w komórkach Opalskiego jak i w komórkach przejściowych, we wszystkich grupach doświadczalnych, z wyjątkiem hodowli z egzogennymi solami magnezu, wyrażały się obniżeniem aktywności badanych dehydrogenaz, przede wszystkim bursztynianowej i glutaminianowej. W przypadku hodowli z solami cynku dominowało obniżenie aktywności dehydrogenazy etanolu, a w hodowlach z egzogenną miedzią — oksydazy cytochromowej. Spadek aktywności oksydazy cytochromowej w chorobie Wilsona uznany jest zresztą za zjawisko typowe dla tej jednostki chorobowej (Shokeir, Shreffler 1963). Stwierdzone nieprawidłowości odczynów histoenzymatycznych, występujące zarówno w typowych formach patologicznych komórek glejowych, jak i w znacznej części przypadków, w morfologicznie niezmiennych astrocytach, wskazują, że zastosowane metale śladowe, z wyjątkiem magnezu prowadzą do upośledzenia metabolizmu komórek glejowych. Najsilniejsze działanie uszkodzające wywierał mangan, na którego rolę w patomechanizmie szeregu chorób zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego zwrócił uwagę Yase (1972). Nie wyjaśnia to oczywiście patomechanizmu uszkodzeń komórkowych. Podobieństwo charakteru nieprawidłowości strukturalnych i metabolicznych rozwijających się w następstwie działania manganu i cynku, do zmian wywołanych przy użyciu soli miedzi, sugeruje podobny mechanizm uszkodzenia komórek, związany z upośledzeniem metabolizmu w cyklu kwasów trójkarboksylowych (Mossakowski i wsp. 1972).

Podstawowym spostrzeżeniem wynikającym z przedstawionego cyklu doświadczeń jest fakt, że u podłoża uszkodzeń glejowych, typowych dla zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego i nieswoistych encefalopatii pochodzenia wątrobowego może leżeć również, przynajmniej w warunkach hodowli pozaustrojowej, działanie niektórych metali śladowych, takich jak cynk i mangan.

Rola biologiczna metali śladowych, występujących w tkankach i płynach ustrojowych nie jest jednoznacznie wyjaśniona, jakkolwiek coraz częściej podkreśla się ich istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Metale śladowe spełniają ważną i udowodnioną rolę w licznych reakcjach enzymatycznych (Eichhorn 1960). Wia-

domo, że cynk wykazujący wybitne powinowactwo do białek jąderka, uczestniczy w podziałach komórkowych (Studziński 1965), a mangan związany jest z czynnością mitochondriów (Cotzias i wsp. 1960), podczas gdy inne metale śladowe uczestniczą w utrzymaniu stabilności błon lizosomalnych (Brunk, Brun 1971).

W zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym dochodzi do nieprawidłowego odkładania się pierwiastków śladowych w tkankach ośrodkowego układu nerwowego (Łojko 1968). Zjawisko to zapewne należy wiązać z upośledzeniem czynności wątroby, nieprawidłowościami składu białek surowicy krwi i zaburzoną czynnością szeregu układów enzymatycznych oraz z uszkodzeniem naczynio-tkankowych mechanizmów barierowych (Mossakowski i wsp. 1970), jak wreszcie ze znanym powinowactwem metali do białek tkanki nerwowej (Vogel, Evans 1961; Wiśniewski i wsp. 1965). W różnego typu przewlekłych i ostrych nieswoistych uszkodzeniach wątroby może prawdopodobnie dochodzić również do odkładania metali śladowych w mózgu, za czym przemawiają między innymi obserwacje Uzmana (1960) oraz Wendera i wsp. (1973). Powyższe spostrzeżenia w konfrontacji z wynikami naszych doświadczeń *in vitro* sugerują, że zaburzony metabolizm mikroelementów może być jednym z czynników leżących u podłoża zmian morfologicznych w OUN w encefalopatii pochodzenia wątrobowego i w chorobie Wilsona.

K. Renkawek

РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛИОПАТИИ ВЫЗВАННОЙ В ГЛИЯЛЬНОЙ ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

Резюме

Глияльные клетки, культивированные *in vitro*, подвергались воздействию солей цинка, железа, марганца, магния и меди в концентрациях в среде вдвое больших, чем концентрация этих элементов в сыворотке крови у здоровых людей. Морфологические изменения, характерные для энцефалопатии печеночного происхождения *in vitro* выступали после воздействия всех использованных солей микрометаллов за исключением магния. Ферментативная активность сукцинатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, алкогольдегидрогеназы, неспецифической эстеразы и цитохромоксидазы была снижена по сравнению с контрольными культурами.

Самые значительные морфологические и гистозиматические изменения были обнаружены в группе с солями цинка и марганца и зависели они от возраста культуры и продолжительности опыта. Микроэлементы, следовательно, могут оказывать непосредственное, повреждающее влияние на глиальные клетки *in vitro*, по-видимому, вследствие нарушений в цикле трикарбоновых кислот.

K. Renkawek

THE ROLE OF MICROELEMENTS IN THE PATHOGENESIS
OF THE GLIOPATHY OF GLIA CULTURED *IN VITRO*

Summary

Glia cells cultured *in vitro* were submitted to the medium containing zinc, iron, manganese, magnesium and copper salts in double concentration as compared to the normal human serum. Morphological alterations characteristic for hepatic encephalopathy *in vitro* were caused by all used microelements except magnesium. The activity of succinate, glutamate, glucose-6-phosphate and alcohol dehydrogenases, nonspecific esterase and cytochrome oxidase was decreased as compared to that in control cultures.

The intensity of morphological and histoenzymatic changes was most prominent in the group with zinc and manganese salts. They depended on the age of culture and on the duration of the experiment. The results indicate that the microelements may directly damage the glial cells *in vitro*, most likely by the impairment of the Krebs cycle metabolism.

PISMIENNICTWO

1. Brunk U., Brun A.: Histochemical evidence for lysosomal uptake of lead in tissue cultured fibroblasts. *Histochemie* 1972, 29, 140—146.
2. Coleman S. L., Sanders T. E., Field B. D.: Hepatolenticular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 1963, 53, 297—299.
3. Cotzias G. C., Borg D. C., Bertinchamps A. J.: Clinical experiences with manganese. In: *Metal binding in medicine*. Ed. M. J. Seven, Philadelphia 1960, 50—58.
4. Eichhorn G. L.: The role of metal ions in enzymes system. In: *Metal binding in medicine*. Ed. M. J. Seven, Philadelphia 1960, 12—26.
5. Griesser R., Hayes M. G., McCormick D. B., Prijs B., Sigel H.: Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 1:1 complexes with biochemically significant thioether carboxylic acids and some of sulfoxide and sulfone derivates. *Arch. of Biochem. Biophys.* 1971, 144, 628—655.
6. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—408.
7. Lojko E. A.: Izmiennienie sodierzania niekórych mikroelementow (medi, zelaza, cinka, mangania, u molibdienu w syrowodkie krowi i w mocze pri gepato cerebralnoj distrofii. *Zurnal Newropatologii i Psichiatrii* 1968, 68, 188—192.
8. Morgan E. H., Walters M. N. I.: Iron storage in human disease. *J. Clin. Pathol.* 1963, 16, 101—107.
9. Mossakowski M. J.: Some remarks on the morphology and histochemistry of the so-called Opalski cells. *Acta neuropath. (Berl.)* 1965, 4, 659—668.
10. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.* 1966, IV, 231—304.

11. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Smiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath. (Berl.)* 1970, 16, 1—16.
12. Mossakowski M. J., Smiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970, 8, 365—374.
13. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Contribution des etudes des cellules d'Opalski a la connaissance de la pathogenese de lesions du systeme nerveux central dans les maladies hepatocerebrales. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 385—394.
14. Renkawek K.: On the histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307—315.
15. Shokeir M. H., Shreffler D. C.: Cytochrome oxidase deficiency in Wilson's disease: suggested ceruloplasmin function. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1969, 3, 867—872.
16. Studzinski G. P.: Selective binding of zinc by basic proteins of the HeLa cell nucleolus. *J. Hist. Cytoch.* 1965, 13, 365—375.
17. Uzman L. L.: Experience with tissue copper in Wilson's disease and results of treatment. In: *Metal binding in medicine*. Ed. M. J. Seven, Philadelphia 1960, 269—289.
18. Vogel F. S., Evans J. W.: Morphologic alternations produced by copper in neural tissues with consideration of the role of the metal in the pathogenesis of Wilson disease. *J. exp. Med.* 1961, 113, 997—1004.
19. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. *Obraz biochemiczny. Neurol. Neurochir. Pol.* 1973, 23, 177—181.
20. Wiśniewski H., Majdecki T., Wiśniewska K.: Topography of brain lesions after intracerebral, intraventricular and subarachnoidal injection of copper salts. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 391—396.
21. Yase Y.: The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *The lancet* 1972, 12, 292—296.

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

BARBARA GAJKOWSKA, JERZY BOROWICZ

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF THE SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI OF RAT BRAIN IN CHRONIC MORPHINE POISONING AND AFTER DRUG WITHDRAWAL

Electron Microscopy Unit, Experimental and Clinical Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences
Head: Ass. prof. J. W. Borowicz

This study is a continuation of our previous investigations on the effect of acute morphine poisoning on the ultrastructure of the supraoptic and paraventricular nuclei in rat (Borowicz, Gajkowska, 1976). It is well known that in the course of chronic morphine administration tolerance develops to this drug (Clouet, 1971). As a result of tolerance (probably connected with the accelerated drug metabolism) an increased dose is required for the obtaining the same pharmacological effect (Basq 1971).

The aim of this study was to observe the ultrastructural changes in the supraoptic and paraventricular nuclei appearing during morphine addiction, that means the state in which tolerance develops and makes the organism drug dependent.

MATERIAL AND METHOD

The experiment was carried out on 25 Wistar rats. Animals were divided into 3 groups: 1st group: control animals, 5 rats; 2nd group: 10 animals which received morphine (Morphinum hydrochloricum, Polfa) daily for 60 days, in the dose of 5 mg/kg of body weight, subcutaneously in the dorsal region; 3rd group 10 animals, which received daily for 60 days morphine in the dose of 5 mg/kg of body weight subcutaneously, in the dorsal region and then the drug was withdrawn for 3—12 days.

Tissue samples from the supraoptic and paraventricular nuclei were obtained directly after the last morphine injection in group 2, while in group 3 they were obtained after 3 and 12 days since the last morphine

administration. The material was fixed in 5% glutaraldehyde for 1 hour and then in 2% OsO₄ for 1.5 hour and dehydrated in the increasing alcohol and propylene oxide concentrations and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with saturated aqueous uranyl acetate and Reynold reagent. Pictures were taken in JEM A electron microscope with the accelerating voltage 80kV on photographic plates ORWO EU 2.

RESULTS

Group 1: control animals

Neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei show great structural resemblance to those reported in our previous studies (Borowicz, Gajkowska, 1972, Gajkowska, 1974) and also described by others (Enestrom, 1967, Rechard, 1969, Kalimo, 1971, Cannata, Morris, 1973).

Group 2: animals after chronic morphine administration

Fig. 1. Supraoptic nucleus. Dilated channels of the Golgi apparatus, numerous coated vesicles, scanty neurosecretory granules and multivesicular body. Rough endoplasmic reticulum is well developed. Neurotubules and lysosomes are also seen. x 30 600.

Ryc. 1. Jądro nadwzrokowe. Poszerzone kanały aparatu Golgiego, liczne pęcherzyki opłaszczone. Nieliczne ziarnistości neurosekrecyjne i ciało wielopęcherzykowe. Siatka śródplazmatyczna szorstka dobrze wykształcona. W cytoplazmie widoczne neurotubule i lizosomy. Pow. 30 600 x.

Fig. 2. Supraoptic nucleus. Changes in the rough endoplasmic reticulum, its channels form ballon-like dilations. Small number of ribosomes. Increased amount of neurosecretory granules. x 20 000.

Ryc. 2. Jądro nadwzrokowe. Zmieniona siatka śródplazmatyczna szorstka. Kanały jej tworzą balonowate rozdęcia. Ilość rybosomów mała. Zwraca uwagę zwiększona ilość ziarnistości neurosekrecyjnych. Pow. 20 000 x.

Fig. 3. Supraoptic nucleus. Fragment of a blood vessel with distinct swelling of astrocytic processes. x 10 340.

Ryc. 3. Jądro nadwzrokowe. Fragment naczyń krwionośnego z dużym obrzękiem wypustki astrocytarnej. Pow. 10 340 x.

Fig. 4. Supraoptic nucleus. Neurosecretory granules, neurotubules and mitochondria in axons of the supraoptic nucleus. x 24 000.

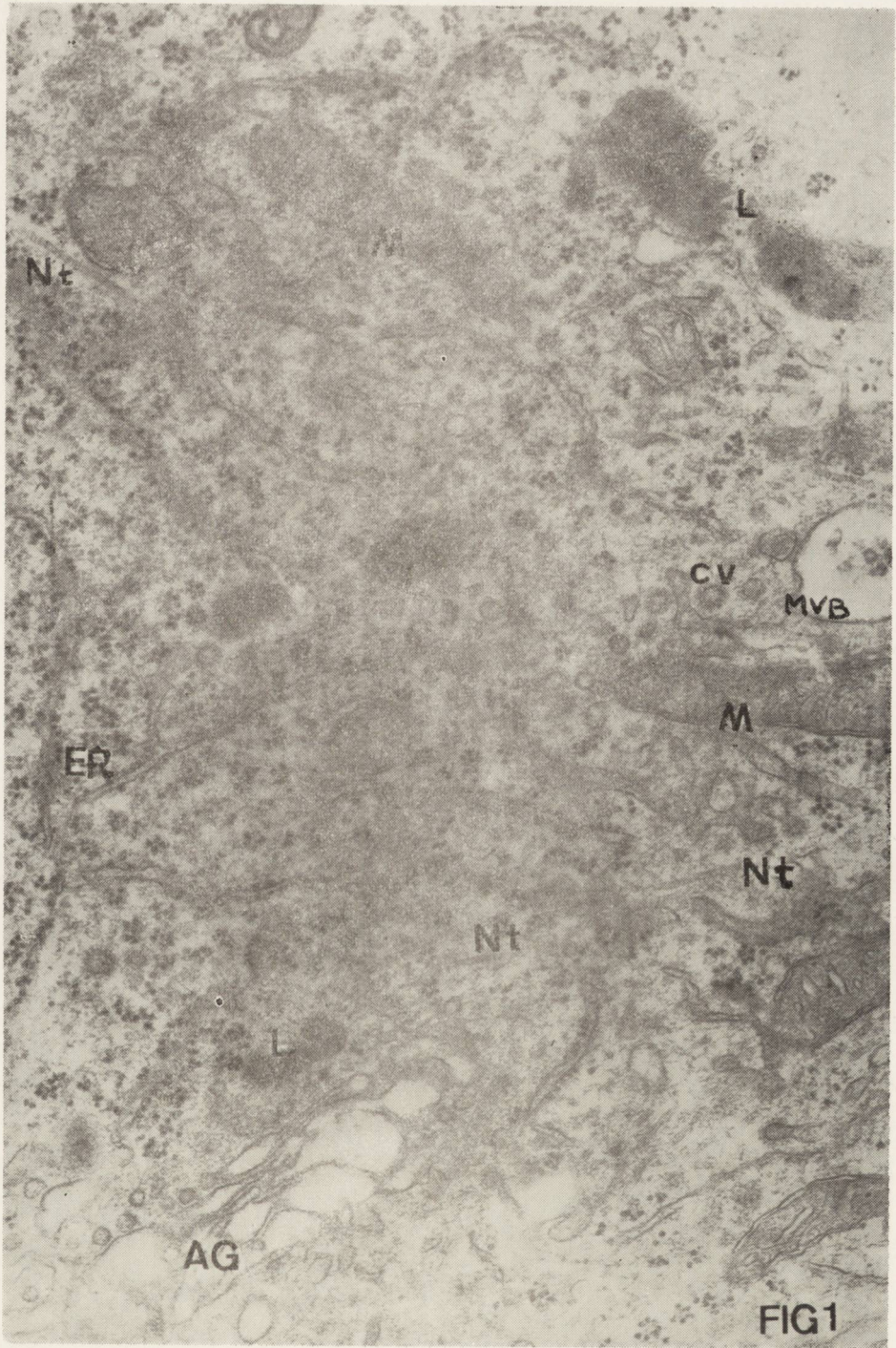
Ryc. 4. Jądro nadwzrokowe. W aksonach jądra nadwzrokowego widoczne ziarnistości neurosekrecyjne, neurotubule i mitochondria. Pow. 24 000 x.

Fig. 5. Paraventricular nucleus. Cell nucleus with deep invaginations of nuclear envelope. Nucleolus of great electron density. x 12 000.

Ryc. 5. Jądro przykomorowe. Jądro komórkowe z głębokimi inwaginacjami otoczki jądrowej. Widoczne jąderko o dużej gęstości elektronowej. Pow. 12 000 x.

Fig. 6. Paraventricular nucleus. Fragments of 3 adjacent neurons. Rough endoplasmic reticulum with dilated channels rather densely covered with ribosomes. Some channels filled with a substance of low electron density. x 10 280.

Ryc. 6. Jądro przykomorowe. Fragmenty trzech neuronów leżących stycznie. Siatka śródplazmatyczna szorstka o kanałach poszerzonych, dość gęsto pokrytych rybosomami. Niektóre kanały wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej. Pow. 10 280 x.



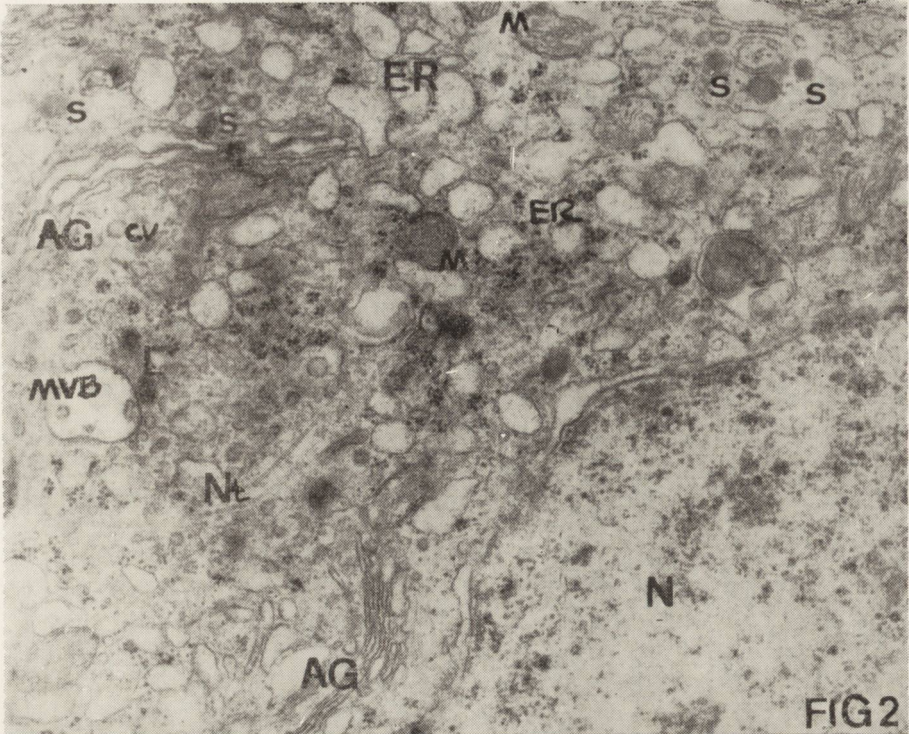


FIG 2

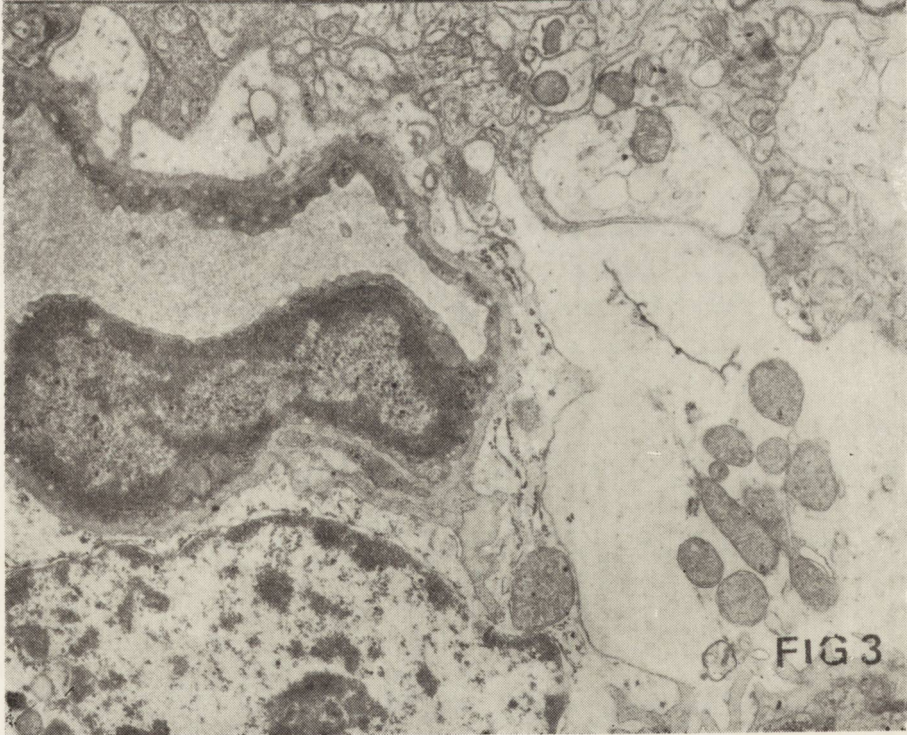


FIG 3

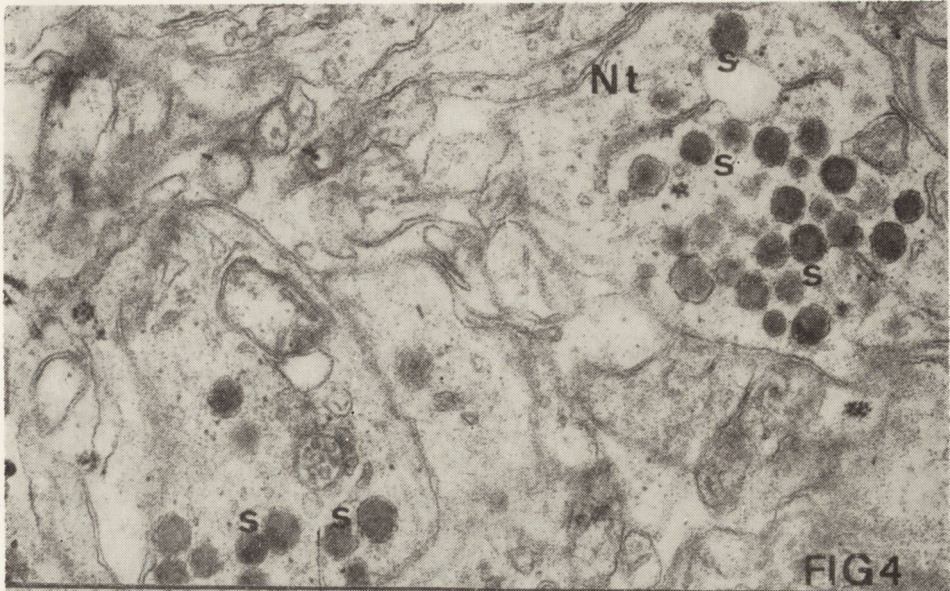


FIG 4

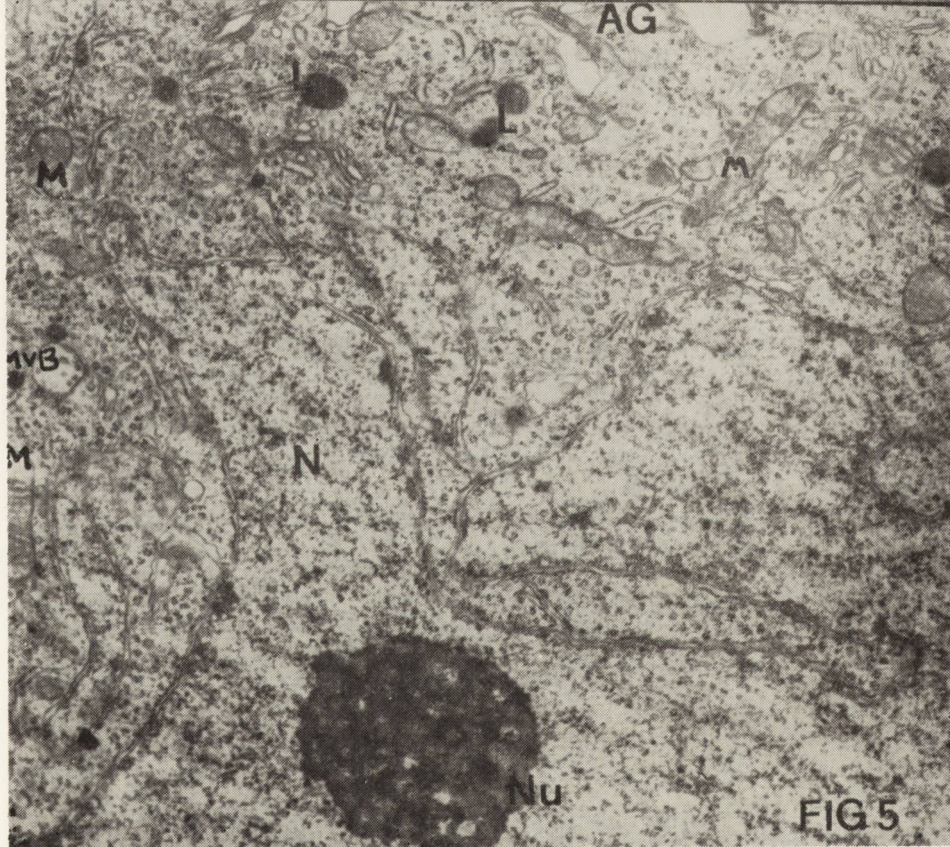


FIG 5

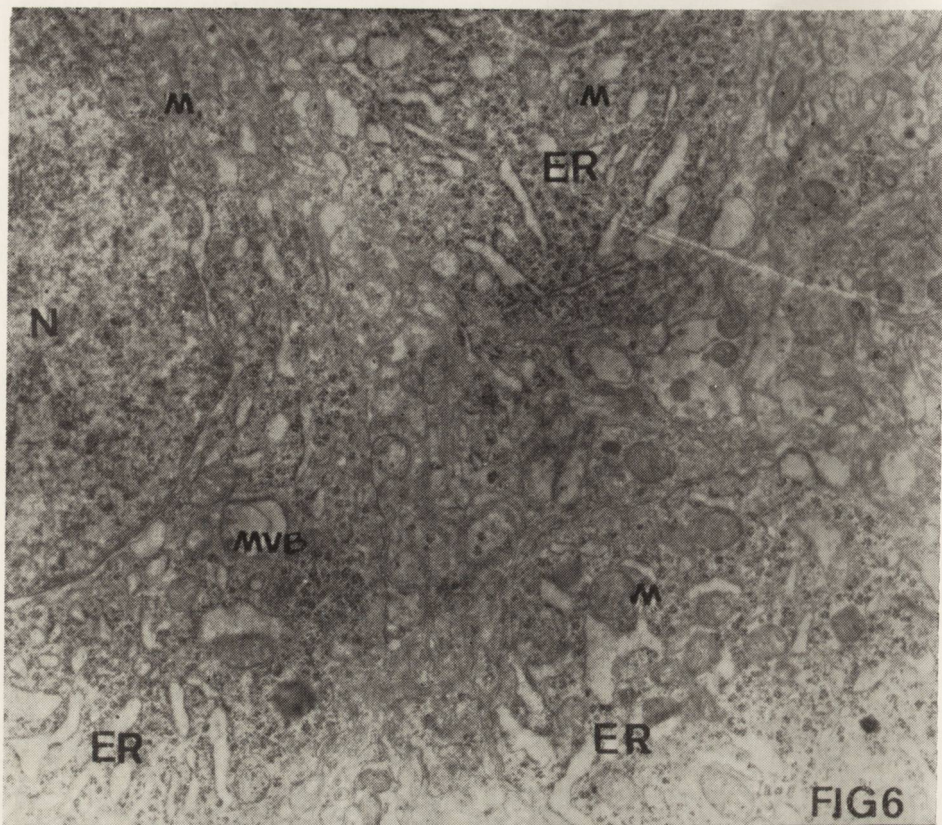


FIG6

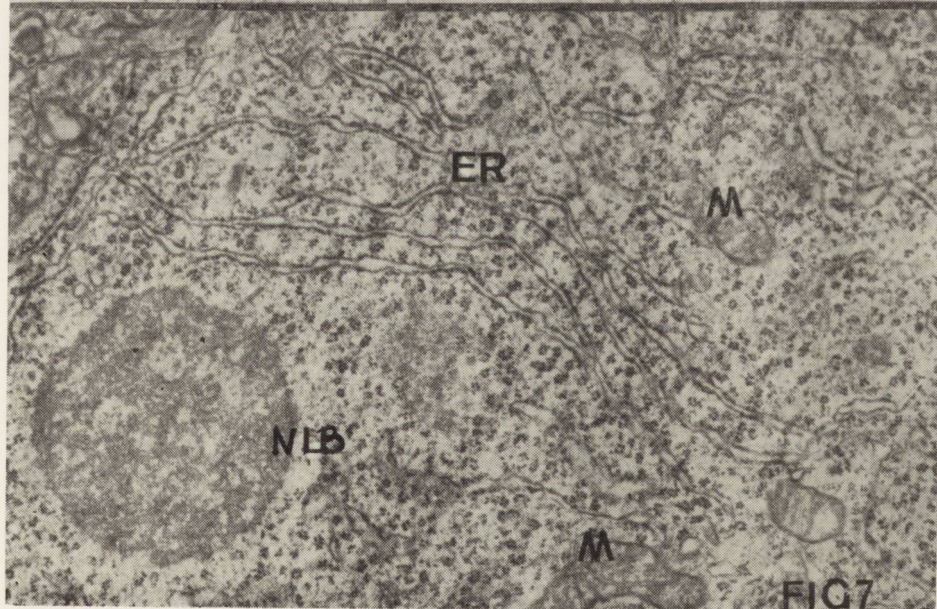
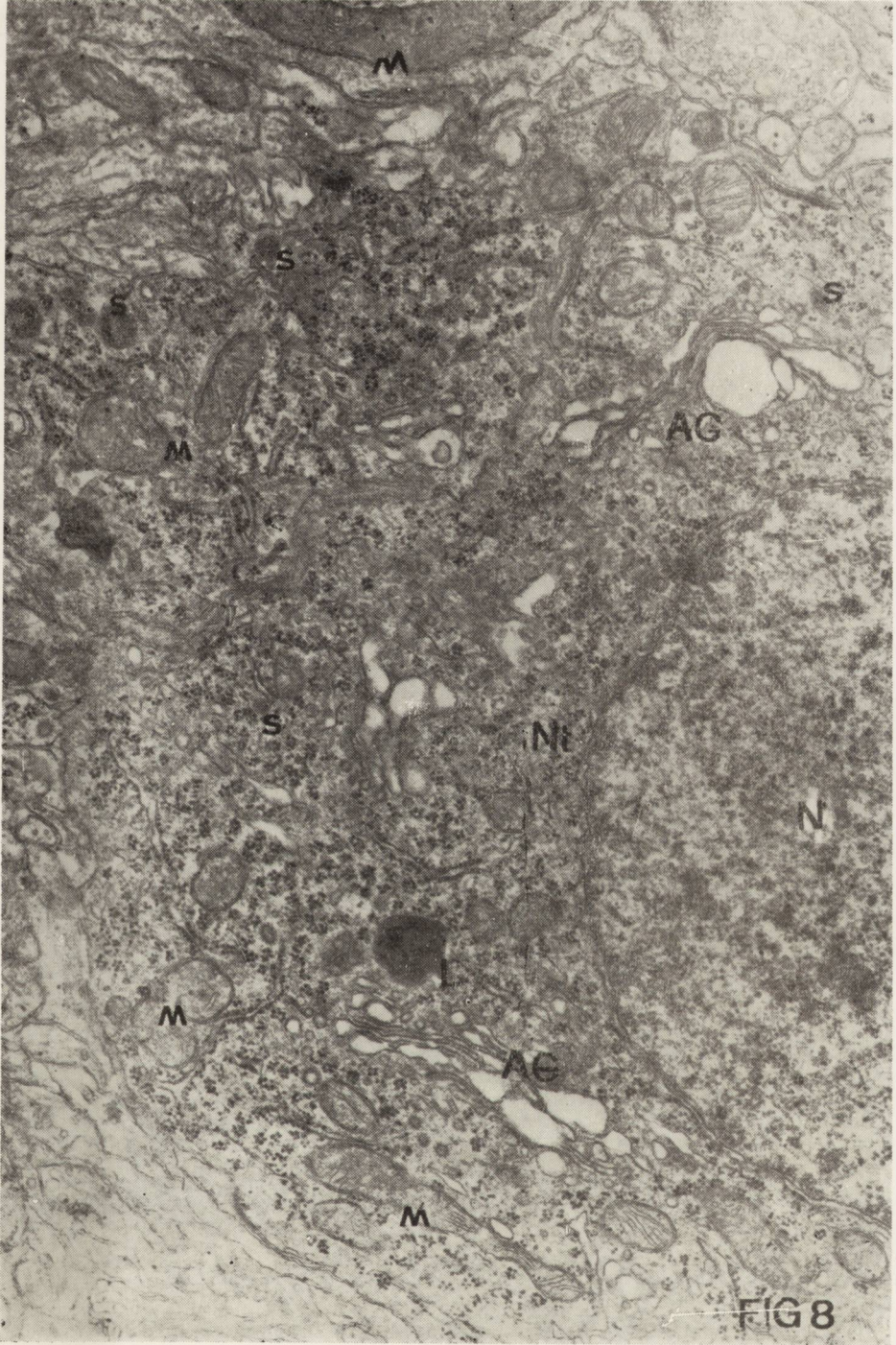
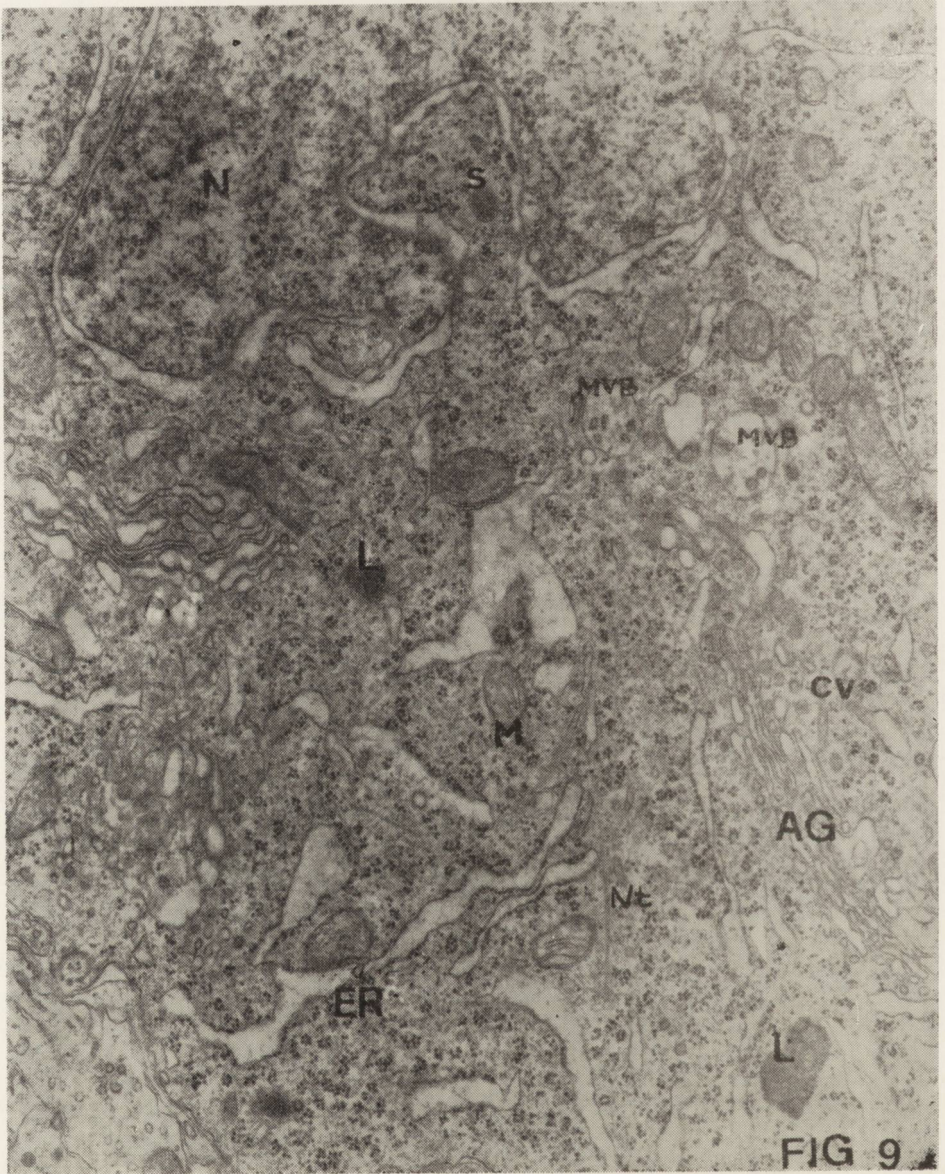


FIG7





Supraoptic nucleus. Numerous neurons of the supraoptic nucleus show prominent changes of some organelles. They have a large nucleus with clear chromatin, well-developed rough endoplasmic reticulum with ribosomes. Numerous polyribosomes, mitochondria and neurotubules are seen between the channels of rough endoplasmic reticulum. Golgi apparatus is well developed and only some of its channels seem to be dilated and empty. Other, numerous and small channels of the Golgi apparatus are filled with an amorphous substance of low electronoptical density and in their vicinity there are rather numerous coated vesicles and multi-vesicular bodies. The amount of neurosecretory granules in these cells is scanty (Fig. 1). The number of neurotubules in the axon hillock is great. Neurons with an altered appearance of the rough endoplasmic reticulum are encountered in the supraoptic nucleus. The channels are dilated and covered with single ribosomes. Inside the channels of rough endoplasmic reticulum there is a small amount of an amorphous substance of low electron density. Between the rough endoplasmic reticulum channels numerous polyribosomes and randomly distributed neurotubules are seen (Fig. 2). The Golgi apparatus situated in the perinuclear region is large, well-developed and consists of elongated and

Fig. 7. Paraventricular nucleus. Nucleolus-like body in the cytoplasm. x 15 000.
Ryc. 7. Jądro przykomorowe. W cytoplazmie widoczne jest ciało jąderkopodobne. Pow. 15 000 x.

Fig. 8. Supraoptic nucleus. Fragment of a neuron with a well-developed Golgi apparatus. Rough endoplasmic reticulum covered with ribosomes. Abundant neurosecretory granules. x 17 000.

Ryc. 8. Jądro nadwzrokowe. Fragment neuronu z dobrze wykształconym aparatem Golgiego, siatką śródplazmatyczną szorstką pokrytą licznymi rybosomami. Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych dość duża. Pow. 17 000 x.

Fig. 9. Paraventricular nucleus after chronic administration of morphine and its withdrawal. Attention is called to rough endoplasmic reticulum with dilated channels filled with a low electron density substance. Well-developed Golgi apparatus and many coated vesicles and multivesicular bodies. x 29 000.

Ryc. 9. Jądro przykomorowe. Zmieniona siatka śródplazmatyczna szorstka o poszerzonych kanałach wypełnionych substancją o małej gęstości elektronowej. Dobrze rozwinięty aparat Golgiego i duża ilość pęcherzyków opłaszczonych i ciał wielopęcherzykowych. Pow. 29 000 x.

Abbreviations Oznaczenia

N — nucleus	MVB — multivesicular body
jądro	ciało wielopęcherzykowe
Nu — nucleolus	CV — coated vesicles
jąderko	pęcherzyki opłaszczone
AG — Golgi apparatus	S — neurosecretory granules
aparat Golgiego	ziarnistości neurosekrecyjne
ER — rough endoplasmic reticulum	NLB — nucleolus-like body
szorstka siatka śródplazmatyczna	ciało jąderko-podobne
L — lysosomes	Nt — neurotubules
lizosomy	neurotubule
M — mitochondria	

narrow channels. In the Golgi apparatus area numerous coated vesicles are encountered and small vacuoles and vesicles filled with a material of low electron density. Neurosecretory granules, lysosomes and multivesicular bodies are also seen. Prominent swelling of astrocytes and their processes was observed in neuropil surrounding the supraoptic nucleus neurons, particularly in the vicinity of some small blood vessels (Fig. 3). The amount of neurosecretory granules in axons of the supraoptic nucleus neurons seems to be close to the norm (Fig. 4).

Paraventricular nucleus. Numerous neurons of the paraventricular nucleus do not display any prominent morphological changes as compared with the control. Sometimes, these neurons with a large nucleus and dense nucleolus, show deep invaginations of the nuclear envelope (Fig. 5). Well-developed Golgi apparatus consisting of numerous channels and cisterns and small vesicles is usually localized in the prinnuclear region. Single neurosecretory granules, multivesicular bodies and lysosomes may be encountered in the vicinity of the Golgi apparatus. The rough endoplasmic reticulum is well-developed in form of elongated narrow channels covered with ribosomes. Numerous polyribosomes are found between the channels of endoplasmic reticulum. In the cytoplasm there are round or oval and elongated numerous mitochondria with many cristae and clear matrix.

Besides these almost normal neurons, there are some neurons characterized by the presence of altered rough endoplasmic reticulum. Its channels are very wide in some areas and contain scanty amount of the material of low electron density. The endoplasmic reticulum is covered with many ribosomes, numerous polyribosomes are between its channels. The other cellular elements do not differ from the norm (Fig. 6). The presence of the so-called nucleolus-like bodies was observed in the cytoplasm of many neurons of the paraventricular nucleus (Fig. 7). The amount of neurosecretory granules in axons of the paraventricular nucleus seemed comparable with the norm. Astrocytic processes were characterized by abundance of glycogen granules.

Group 3: Animals after chronic treatment with morphine and the drug withdrawal.

Following morphine withdrawal animals displayed prominent motoric excitability, anxiety and aggressiveness.

Supraoptic nucleus. Neurons of the supraoptic nucleus examined after 3 and 12 days since the last morphine injection do not show any significant changes as compared with the norm (Fig. 8). Nuclei of the cells are large, round or oval with evenly distributed light nuclear chromatin. The rough endoplasmic reticulum is well developed with many ribosomes and polyribosomes. Numerous round or oval and elon-

gated mitochondria with clear matrix and numerous transversal cristae are seen in the cytoplasm of neurons. The Golgi apparatus is well developed and situated in the perinuclear area; some of its channels are dilated. In the vicinity numerous coated vesicles and neurosecretory granules are present in normal amounts. In axons neurosecretory granules, numerous neurotubules and elongated mitochondria are seen.

Paraventricular nucleus. Some neurons of the paraventricular nucleus examined after 3 days since the last injection of morphine show changes consisting of slightly dilated channels of the rough endoplasmic reticulum. The channels are filled with an amorphous substance of low electron density (Fig. 9). Great amount of multivesicular bodies and coated vesicles is present in the cells. The Golgi apparatus is well developed. The amount of neurosecretory granules is close to the norm. The remaining, more numerous neurons do not differ much from the neurons observed in the control. After 12 days since the last injection of morphine, ultrastructural appearance of the neurons of the paraventricular nucleus is comparable with the norm.

DISCUSSION

Following chronic administration of morphine some structural changes are observed in the neurons of the supraoptic and paraventricular nucleus. These changes indicate slight inhibition or impairment of neurosecretory granules synthesis in the cells of neurosecretory nuclei. A decline of neurosecretory function seems to be more prominent in neurons of the paraventricular nucleus. In the supraoptic nucleus only some neurons show a decline of neurosecretory function, in the remaining ones it is close to the norm. The changes in ultrastructure of the neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei under the effect of acute morphine poisoning (Borowicz, Gajkowska, 1976) permit to assume that probably due to hypoxia there are disorders of protein synthesis which may explain a diminished secretory activity in neurons of both nuclei. The intensity of the observed morphological changes appearing after chronic morphine administration is much less pronounced in the supraoptic and in the paraventricular nucleus than in the neurons of both nuclei after acute morphine poisoning. Smaller intensity of these changes in chronic morphine intoxication is probably due to developing tolerance, that is an increased metabolism of morphine with a consecutive decrease of the effective dose affecting the neurosecretory cells.

Our observations confirm experimental data of many authors indicating that normal RNA and protein synthesis is required for the development of tolerance to narcotic drugs (Clouet, Ratner, 1967; Clouet 1971).

Application of RNA synthesis inhibitors, such as actinomycin D (Cohen et. al. 1965, Cox, 1968), 6-mercapto-purin and 5-fluorouracil (Cox, Osman, 1969), and application of protein synthesis inhibitors: puromycin, cycloheximid (Fenberg, Cochin, 1969), cyclophosphoramid (Feinberg, Cochin, 1968) blocks or delays development of tolerance to morphine.

In several neurons of the supraoptic nucleus and in some neurons of the paraventricular nucleus was noted a slight increase of the amount of neurosecretory granules comparable with the norm. Attention is called to minor changes in the rough endoplasmic reticulum with dilated channels filled with an amorphous substance of low electron density. These changes were also observed by Morris and Dyball (1974) in the neurons of neurosecretory nuclei after experimentally induced hypersecretion.

The observed morphological changes in neurons of the supraoptic and paraventricular nucleus under the effect of chronic morphine administration indicate more rapid development of tolerance in neurons of the supraoptic nucleus, which also in acute morphine poisoning displayed smaller reactivity as compared with neurons of the paraventricular nucleus. Considering the results of our previous studies of the hypothalamo-hypophyseal system in various experimental conditions, such as dehydration (Borowicz, Gajkowska, 1972), adrenalectomy (Gajkowska, 1974), and acute morphine poisoning (Borowicz, Gajkowska 1976), it may be assumed that the paraventricular nucleus may play a more significant role in regulation of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal system than the supraoptic nucleus.

After chronic morphine administration the changes were also observed in neuropil of the hypothalamic region. Prominent swelling of astrocytes and their processes was noted mainly in the vicinity of some small blood vessels. Increased amount of glycogen was also observed. These changes may indicate discrete hypoxia of the central nervous system under the effect of chronic morphine administration (Klatzo et al. 1970). Neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei examined after 3 and 12 days since morphine withdrawal did not display any changes as compared with the norm. Most probably after period of time neurosecretory cells of both nuclei have undertaken a normal secretory cycle.

CONCLUSIONS

1. Chronic morphine administration causes a decline of secretory activity in the supraoptic and paraventricular nuclei, however, it is more pronounced in neurons of the paraventricular nucleus.

2. Since the 3rd day after morphine withdrawal there is a gradual return to normal neurosecretory activity.

B. Gajkowska, J. Borowicz

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE JĄDRA NADWZROKOWEGO
I JĄDRA PRZYKOMOROWEGO PODWZGÓRZA MÓZGU SZCZURA
PO PRZEWLEKŁYM STOSOWANIU MORFINY
I PO ODSTAWIENIU LEKU

Streszczenie

Autorzy badali ultrastrukturę neuronów sekrecyjnych jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza szczura po przewlekłym zatruciu morfiną (60 dni w dawce 5 mg/kg wagi ciała) i po odstawieniu leku. Wykazano, że przewlekłe stosowanie morfiny powoduje nieznaczne obniżenie aktywności sekrecyjnej neuronów obydwu badanych jąder podwzgórza oraz obserwowano zmiany morfologiczne wskazujące na szybsze wytwarzanie się tolerancji w neuronach jądra nadwzrokowego niż w neuronach jądra przykomorowego. Po 12 dniach od odstawienia leku nie spostrzegano żadnych zmian w ultrastrukturze neuronów sekrecyjnych obydwu badanych jąder.

Б. Гайковска, Е. В. Борович

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
СУПРАОПТИЧЕСКОГО И ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДЕР КРЫСЫ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ МОРФИЯ
И ПОСЛЕ ОТСТРАНЕНИЯ ЛЕКАРСТВА

Резюме

Авторы исследовали ультраструктуру секреторных нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер крысы после хронического отравления морфием (60 дней по 5 мг/кг веса тела) и после отстранения лекарства. Было показано, что хроническое применение морфия вызывает незначительное снижение секреторной активности нейронов обоих исследуемых ядер гипоталамуса. Наблюдались также морфологические изменения, указывающие на более быстрое образование толерантности в нейронах супраоптического ядра, чем в нейронах паравентрикулярного ядра. Через 12 дней после отстранения лекарства никаких изменений в ультраструктуре секреторных нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер не было замечено.

REFERENCES

1. Bacq Z.: Fundamentals of Biochemical Pharmacology, Pergamon Press, 1971, 571—609.
2. Borowicz J., Gajkowska B.: Zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego szczura w wyniku odwodnienia organizmu. Pat. Pol., 1972, 23, 247—261.
3. Borowicz J., Gajkowska B.: Electron microscopic studies of the supraoptic and paraventricular nuclei of rat in acute morphine poisoning. Neuropat. Pol., 1976, 14, 209—215.
4. Clouet D., Ratner M.: The effect of morphine administration on the incorporation of C¹⁴ — leucine into the protein of rat brain in vivo. Brain Res., 1967, 4, 33—43.

5. Clouet D.: The effects of narcotic analgesics on protein and RNA metabolism. In „Narcotic Drugs: Biochemical Pharmacology” D. Clouet, ed., New York, 1971.
6. Clouet D.: Effect of narcotic analgesics on brain function. In ”Biology of Brain Dysfunction”, ed. G. Gaul, 1973, 115—149.
7. Cannata M., Morris J.: Changes in the appearance of hypothalamo-hypophyseal neurosecretory granules associated with their maturation. *J. Endocrinol.*, 1973, 57, 531—538.
8. Cox B., Osman O.: The role of protein synthesis inhibition in the prevention of morphine tolerance. *Brit. J. Pharmacol.* 1969, 35, 373—378.
9. Cox B., Ginsburg M., Osman H.: Acute tolerance to narcotic analgesics in rats. *Brit. J. Pharmacol.* 1968, 33, 245—256.
10. Cohen M., Keats W., Krivoy, Ungar G.: Effect of actinomycin D on morphine tolerance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, 119, 381—383.
11. Enestrom S.: Nucleus supraopticus. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 1967, 186, 1—99.
12. Feinberg M., Cochin J.: Effect of weekly doses of cycloheximide on tolerance to morphine in the rat. *The Pharmacologist*, 1969, 11, 256—260.
13. Feinberg M., Cochin J.: Effect of cyclophosphoramide on tolerance to morphine. *The Pharmacologist*, 1968, 10, 188—193.
14. Gajkowska B.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego szczura w niedoczynności nadnerczy. *Neuropatol. Pol.*, 1974, 12, 329—343.
15. Kalimo H.: Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Z. Zelforsch.*, 1971, 122, 283—300.
16. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miguel J., Olson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. IV Internat. Congress Neuropath., Masson et Cie, Paris 1970, 351—365.
17. Morris J., Dyball R.: A quantitative study of the hypothalamo-neurohypophyseal system during and after experimentally induced hypersecretion. *Cell. Tiss. Res.*, 1974, 149, 525—535.
18. Rechard L.: Electron microscopic and histochemical observations on the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 1969, 329, 1—19.

Authors' address: Electron Microscopy Unit, Experimental and Clinical Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 00-784 Warszawa, ul. Dworcowa 3, Poland.

MIROSLAW B. KOZIK, EWA OZARZEWSKA, ALEKSANDER PIECHOWSKI

WBUDOWYWANIE DL-METIONINY ^3H DO MÓZGU SZCZURA W PRZEBIEGU ZATRUCIA SIARCZANEM TRÓJETYLKU CYNY

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
AM w Poznaniu

Kierownik: doc. dr med. M. B. Kozik

Klinika Neurologiczna AM w Poznaniu

Kierownik: prof. dr med. M. Wender

W encefalopatiach toksycznych spowodowanych zatruciem siarczanem trójetylku cyny (TET) stwierdzono zarówno uszkodzenie biochemiczne mieliny (Eto i wsp. 1971) jak i zmiany w aktywności szeregu enzymów (Ibrahim 1965, Wender i wsp. 1971, 1973). Zaburzenia aktywności enzymatycznej pociągają za sobą zmiany w przemianie białkowej. Szczególnie istotne znaczenie wydaje się mieć wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej (FK), pyrofosfatazy tiaminowej (TPP-azy) i adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy) w astrogleju zaobserwowany w ostrym zatruciu TET (Wender i wsp. 1971). Zmiana aktywności ATP-azy w ostrym zatruciu trójetylkiem cyny może przemawiać za zaburzeniami czynnego transportu przez błony komórkowe, związanego z układem określonym jako bariera krew-mózg.

Z badań autoradiograficznych wiadomo, że prekursorzy białkowe w postaci aminokwasów znakowanych izotopami promieniotwórczymi dość trudno wbudowują się do mózgu przy nieuszkodzonej barierze krew-mózg. (Sloper i wsp. 1960, Tsukada i wsp. 1962, Kozik 1971, Kozik, Ożarzevska, 1974b). Wśród szeregu aminokwasów wchodzących w skład białek mózgowych istotną rolę odgrywa metionina będąca najważniejszym nośnikiem grup metylowych. Badania autoradiograficzne nad inkorporacją metioniny ^3H do mózgu szczurów wykazały, że aminokwas ten nie wbudowuje się do komórek glejowych (Kozik, Ożarzevska 1974a).

Wobec zaburzeń czynnego transportu przez błony komórkowe w zatruciu trójetylkiem cyny, należałoby wyjaśnić proces wbudowywania me-

tioniny do mózgu w tych zmienionych doświadczalnie warunkach. Poznanie tego zjawiska może przyczynić się do bliższego zrozumienia patogeny demielinizacji występującej w toksycznych gliopatiach.

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na szczurach, samicach i samcach, rasy Wistar, o ciężarze ciała 150—200 g. Zwierzętom podano jednorazowo do jamy brzusznej siarczan trójetylku cyny (TET) w dawce 20 mg/kg ciężaru ciała. Po upływie pięciu godzin wprowadzano wszystkim szczurom dootrzewnowo DL-metioninę ^3H (produkcji Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Science) o aktywności właściwej 44,36 mCi/mmol, w dawce 5 $\mu\text{Ci/g}$ ciężaru ciała. Zwierzętom kontrolnym podawano dootrzewnowo znakowaną metioninę z pominięciem uprzedniego zatrucia TET. Po wprowadzeniu dootrzewnowym DL-metioniny ^3H zwierzęta uśmiercano w narkozie eterowej przez dekapitację po 10 i 20 minutach oraz po 1, 10, 24 i 48 godzinach.

Do badań autoradiograficznych pobierano mózgowie, które utrwalano w alkoholu absolutnym z kwasem octowym lodowatym w stosunku 95:5 przez 1 godzinę, a następnie w czystym alkoholu absolutnym przez 12 godzin. Po odwodnieniu materiał zatapiało w parafinie, potem cięto skrawki grubości 7 μ , które po odparafinowaniu pokrywano emulsją

Ryc. 1. Silne zacernienie emulsji nad splotami naczyniastymi i wyściółką komór bocznych. Grupa kontrolna. Autoradiogram niebarwiony. Pow. 220 \times .

Fig. 1. Intense blackening of the emulsion covering plexus choroideus and ependyma of lateral ventricles. Control group. Autoradiogramm unstained. \times 220.

Ryc. 2. Wyraźne wbudowywanie izotopu do cytoplazmy neuronów, do ścian naczyń krwionośnych i do neuropilu. Grupa kontrolna. Autoradiogram niebarwiony. Pow. 220 \times .

Fig. 2. Evident incorporation of isotope into the neuronal cytoplasm, blood vessel walls and neuropil. Control group. Autoradiogramm unstained. \times 220.

Ryc. 3. Silne wbudowywanie izotopu do komórek Purkiniego, nieco słabsze do warstwy ziarnistej oraz najsłabsze do warstwy drobinowej. Grupa kontrolna. Autoradiogram barwiony hematoksyliną. Pow. 220 \times .

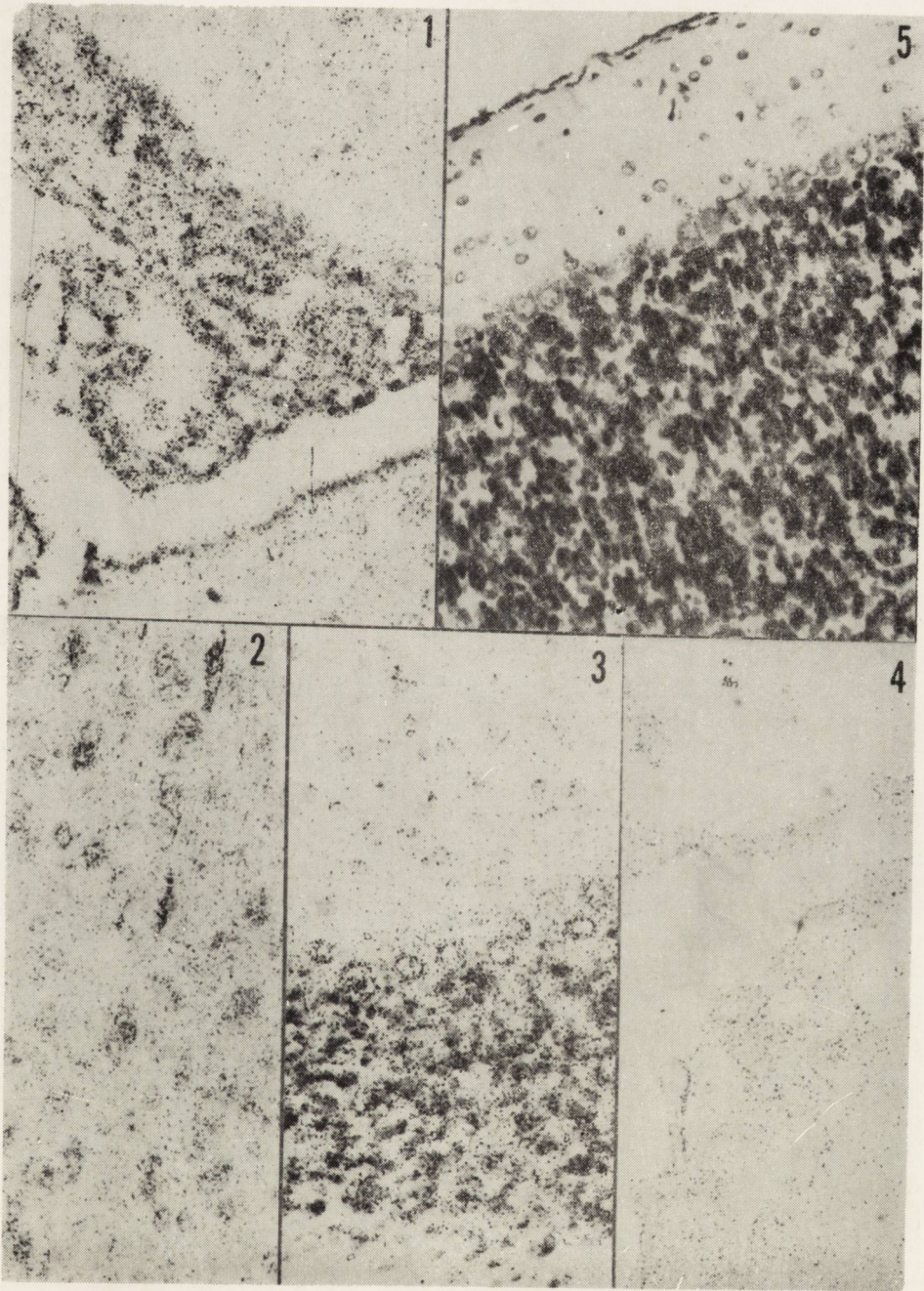
Fig. 3. Strong incorporation of the isotope into the Purkinje cells, weaker into granular layer, the weakest into the molecular layer. Control group. Autoradiogramm stained with hematoxylin. \times 220.

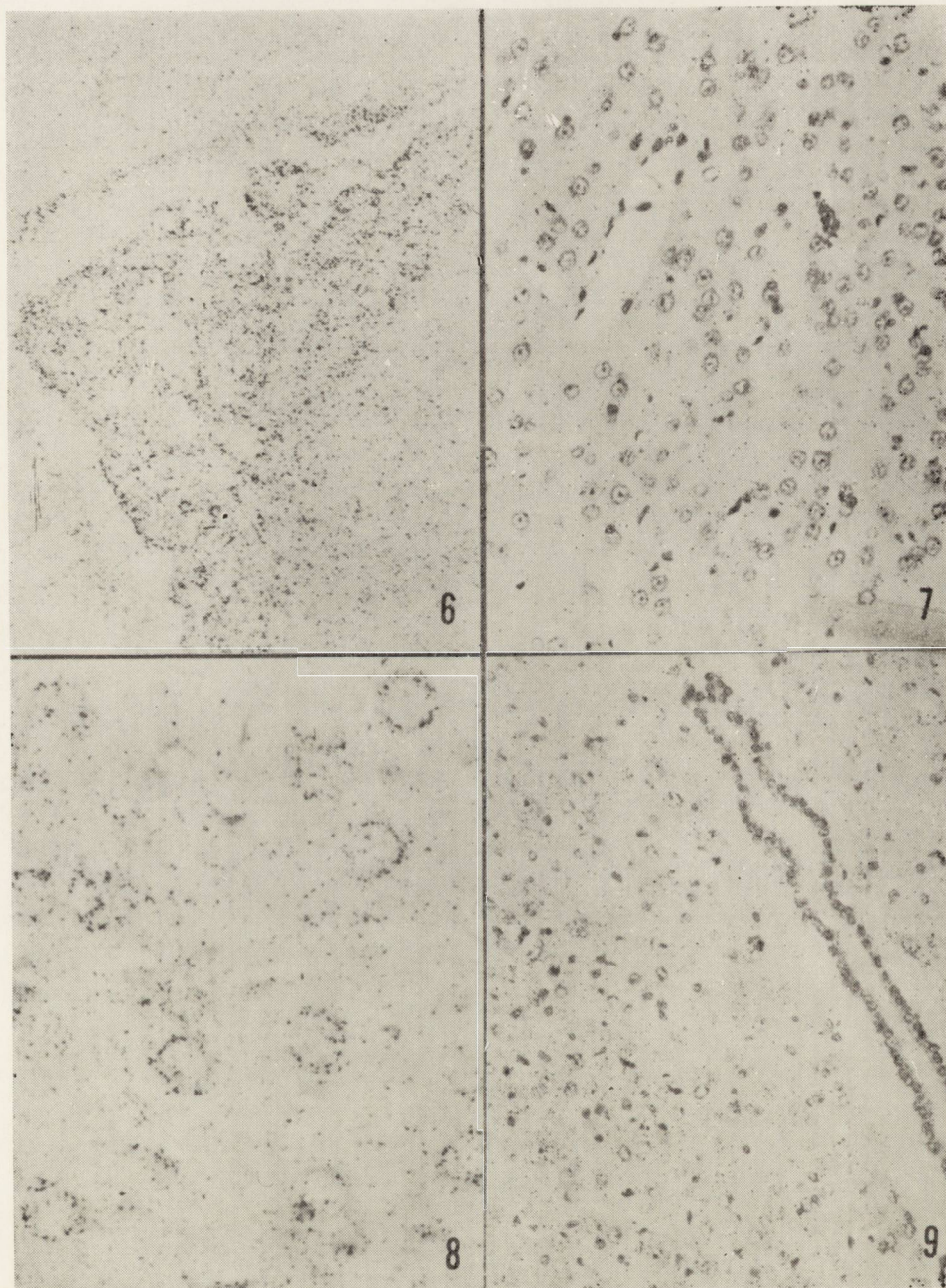
Ryc. 4. Wbudowywanie DL-metioniny ^3H do splotów naczyniastych i wyściółki komór u zwierząt zatrutych TET. Autoradiogram niebarwiony. Pow. 220 \times .

Fig. 4. Incorporation of DL-methionine ^3H into the choroid plexus and ependyma in TET intoxicated animals. Autoradiogramm unstained. \times 220.

Ryc. 5. Bardzo słabe wbudowywanie znakowanego aminokwasu w korze mózdzku po upływie 1 godz. od podania szczurom zatrutym TET. Autoradiogram barwiony hematoksyliną. Pow. 220 \times .

Fig. 5. Very weak incorporation of amino acid into the cerebellar cortex 1 h after its injection into the TET intoxicated rat. Autoradiogramm stained with hematoxylin. \times 220.





płynną firmy Kodak, typ NTB-3 i ekspozowano w lodówce w temp. 4°C przez 21 dni. Autoradiogramy wywoływano przez 5 min. w wywołyvaczu Kodak 19D. Część autoradiogramów podbarwiano hematoksyliną, część natomiast pozostawiano bez podbarwienia.

W wykonanych autoradiogramach oceniano intensywność wbudowywania badanego izotopu porównując stopień zaczernienia emulsji nad badanym obiektem z gęstością ziaren zredukowanego srebra poza skrawkiem w obrębie tzw. tła.

WYNIKI

Grupa kontrolna. Po 10 i 20 min. od chwili wstrzyknięcia do otrzewnowego DL-metioniny ^3H u szczurów kontrolnych zaobserwowano dość wyraźną obecność izotopu w wyściółce komór bocznych, spłotach naczyńsiastych oraz w obrębie pojedynczych dużych neurocytów podwzgórza i wzgórze wzrokowe.

Po upływie 1 godziny od wprowadzenia znakowanego aminokwasu występuje stosunkowo intensywne zaczernienie emulsji nad poszczególnymi układami strukturalnymi mózgu. Najwięcej ziaren zredukowanego srebra w autoradiogramach jest widoczne w szyszynce, spłotach naczyńsiastych (ryc. 1), wyściółce komór, podwzgórzu, części bocznej wędmożgowia i w korze amonalnej oraz w neuropilu kory mózgu. Wyraźną inkorporację DL-metioniny ^3H wykazują też komórki piramidowe kory

Ryc. 6. Wbudowywanie DL-metioniny ^3H do spłotów naczyńsiastych komór bocznych po upływie 10 godz. od chwili wstrzyknięcia izotopu szczurom zatrutym TET. Autoradiogram niebarwiony. Pow. 220 X.

Fig. 6. Incorporation of DL-methionine ^3H into the plexus choroideus of lateral ventricle 10 h. after the isotope injection into the rat intoxicated with TET. Autoradiogramm unstained. X 220.

Ryc. 7. Słabe wbudowywanie izotopu do neuropilu kory mózgu, bez wyraźniejszej lokalizacji w perikarionie. Autoradiogram zabarwiony hematoksyliną. Pow. 220 X.

Fig. 7. Low incorporation of isotope in the neuropil of the cortex. Localization of isotope in the perikaryon of cells uncertain. Autoradiogramm stained with hematoxylin. X 220.

Ryc. 8. Jądro grzbietowe n. ślimaka. Izotop w cytoplazmie neuronów oraz w neuropilu. Autoradiogram zabarwiony hematoksyliną. Pow. 460 X.

Fig. 8. Dorsal nucleus of n. cochlearis. The isotope present in the cytoplasm of neurons and in the neuropil. Autoradiogramm stained with hematoxylin. X 460.

Ryc. 9. Wyściółka komory III i podwzgórze. Równomiernie rozproszone ziarna zredukowanego srebra bez lokalizacji cytostrukturalnej; 48 godz. po wstrzyknięciu metioniny ^3H w przebiegu zatrucia TET. Autoradiogram zabarwiony hematoksyliną. Pow. 200 X.

Fig. 9. Ependyma of IIIrd ventricle and hypothalamus. Granules of reduced silver regularly dispersed without any cytological localization 48 h. after the injection of methionine ^3H into TET intoxicated animal. Autoradiogramm stained with hematoxylin. X 200.

mózgu (ryc. 2) oraz jąder ruchowych rdzenia przedłużonego. W mózdku wyraźnie wbudowują izotop komórki Purkiniego, w nieco mniejszym stopniu warstwa ziarnista, a najslabiej warstwa drobinowa (ryc. 3). Nie udaje się natomiast zaobserwować wbudowywania metioniny ^3H do włókien mielinowych i do komórek glejowych.

Opisane rozmieszczenie izotopu oraz stopień zaczernienia emulsji autoradiograficznej utrzymują się w mózgu na prawie jednakowym poziomie przez 10 godzin. Po 24 i 48 godz. zagęszczenie ziaren zredukowanego srebra stopniowo maleje. Szczegółowy opis wbudowywania DL-metioniny ^3H do mózgu jest podany w pracy Kozika i Ożarzewskiej (1974a).

Grupa doświadczalna. Po 10 minutach od chwili dootrzewnowego wstrzyknięcia DL-metioniny ^3H u szczurów z uprzednio wstrzykniętym TET daje się zaobserwować pojedyncze ziarna zredukowanego srebra w obrębie spłotów naczyniastych, narządu podspoidłowego oraz w odcinku h_3 kory amonalnej. W mózdku inkorporację metioniny ^3H widać tylko w oponach miękkich.

Okres 20 minutowy od momentu wprowadzenia izotopu pozwala na wykazanie jego obecności również w neuropilu kory oraz w wyściółce komór. W mózdku część komórek Purkiniego wykazuje obecność znakowanej metioniny.

Autoradiogramy wykonane po okresie jednogodzinnej obecności izotopu w ustroju charakteryzują się bardziej rozległym zaczernieniem emulsji fotograficznej. W tych warunkach doświadczalnych wyraźną inkorporację DL-metioniny ^3H widać w spłotach naczyniastych, wyściółce komór (ryc. 4), w dużych neurocytach jąder podwzgórza i jąder pola przegrodowego. Umiarkowaną liczbę ziaren zredukowanego srebra obserwuje się w neuropilu kory mózgu. Nie udaje się ujawnić obecności badanego aminokwasu w zwojach podstawy i w istocie białej. W porównaniu z grupą kontrolną zwraca uwagę brak wyraźniejszej lokalizacji izotopu w perikarionie neurocytów kory mózgu. Stopień zaczernienia emulsji nad spłotami naczyniastymi i wyściółką komór jest również znacznie mniejszy niż u zwierząt prawidłowych (ryc. 1 i 4). W mózdku poza nielicznymi komórkami Purkiniego wyraźne wbudowywanie aminokwasu wykazują komórki warstwy ziarnistej (ryc. 5) oraz istota biała blaszek rdzennych kory mózdku. W rdzeniu przedłużonym tylko nad komórkami jądra n. trójdzielnego można zauważyć niewielkie zagęszczenie ziaren. W moście natomiast niewielka liczba ziaren widoczna jest w dendrytach zlokalizowanych głównie w części grzbietowej, a ponadto w cytoplazmie neurocytów jądra grzbietowego n. ślimaka. W neurocytach jądra brzuszego n. ślimaka nie obserwuje się wbudowywania DL-metioniny ^3H .

Po upływie 10 godzin od podania metioniny ^3H obserwuje się nieco większe zaczernienie emulsji niż w autoradiogramach wykonanych po upływie 1 godziny. Ogólnie jednak gęstość ziaren zredukowanego srebra w preparatach pochodzących od szczurów poddanych działaniu TET jest mniejsza niż w grupie kontrolnej. W tym okresie obserwacji dość duże zaczernienie wykazują sploty naczyniaste komór bocznych (ryc. 6) oraz komory III i IV, wyściółka komór bocznych i neurocyty jądra nadwzrokowego. Średniego stopnia wbudowywanie można zaobserwować w korze amonalnej oraz w jądrach przegrody przezroczystej. W korze mózgu udaje się wykazać umiarkowaną liczbę ziaren w neuropilu bez wyraźniejszej lokalizacji komórkowej (ryc. 7).

W mózdzku w omawianym okresie doświadczenia ma miejsce wbudowywanie DL-metioniny ^3H do wszystkich trzech warstw. Najwięcej ziaren zredukowanego srebra widać w warstwie komórek Purkiniego i warstwie ziarnistej, a znacznie mniej w warstwie drobinowej. Na uwagę zasługuje obecność izotopu w neurocytach jąder nerwów czaszkowych zarówno w moście jak i w rdzeniu przedłużonym (ryc. 8). Stopień zaczernienia emulsji nad wspomnianymi neurocytami jest jednak mniejszy niż w autoradiogramach zwierząt kontrolnych.

Zdecydowanie słabsze zaczernienie autoradiogramów występuje po 24 godz. od wstrzyknięcia DL-metioniny ^3H . W tym czasie widać niewielką liczbę ziaren w neuropilu kory mózgu oraz w splotach naczyniastych i w wyściółce komór. Niewielka liczba ziaren widoczna jest także w obrębie zwojów podstawy. Tylko pojedyncze duże neurocyty jąder podwzgórza zawierają izotop w perikarionie. W pozostałych okolicach mózgowia nie udaje się prześledzić lokalizacji badanego aminokwasu w ciele neuronu.

Dalsza 48 godzinna obserwacja pozwala jeszcze na wykrycie izotopu w mózgu. Obraz autoradiograficzny w tym okresie doświadczenia przedstawia niewielką liczbę ziaren zredukowanego srebra rozrzuconych równomiernie w neuropilu kory i zwojów podstawy bez jakiegokolwiek lokalizacji cytostrukturalnej (ryc. 9). Podobnie jak w poprzednich okresach, również po 48 godz. nie udaje się wykazać obecności izotopu w istocie białej i w komórkach glejowych. W mózdzku, moście i rdzeniu przedłużonym ma miejsce także niewielkie i równomierne wbudowywanie DL-metioniny ^3H w neuropilu bez jakiegokolwiek zagęszczenia nad strukturami komórkowymi istoty szarej.

OMÓWIENIE

Wyniki badań autoradiograficznych nad wbudowywaniem DL-metioniny ^3H do mózgu w przebiegu ostrego zatrucia TET są szczególnie interesujące. Na uwagę zasługuje przede wszystkim zjawisko zmniejszenia

szzonego wbudowywania znakowanej metioniny do tkanki nerwowej w ostrym obrzęku wywołanym trójetylką cyny w porównaniu z grupą kontrolną. W świetle badań morfologicznych oraz histoenzymatycznych nad ostrym zatruciem TET (Hirano i wsp. 1968, Wender i wsp. 1971) wskazujących na wzrost aktywności ATP-azy w astrogleju, należałoby przypuszczać, że zaburzenia czynnego transportu przez błony komórkowe spowodowane zatruciem doprowadzą do łatwiejszego przenikania DL-metioniny ^3H do mózgu. Przypuszczenia takie mogły nasuwać również badania biochemiczne wskazujące na zwiększone przenikanie w obrzęku mózgu nie tylko wody ale również białek tak do tkanki nerwowej jak i glejowej (Mase i wsp. 1962, Vrba, Gaitonde 1962, Klatzo 1967).

Wcześniejsze badania własne dotyczące ostrego obrzęku komórki nerwowej w zatruciu TET (Kozik 1970, 1972) pozwoliły na stwierdzenie, że w procesie tym obok zaburzeń aktywności enzymatycznej występuje również zwiększone wbudowywanie niektórych aminokwasów.

Uzyskane wyniki dotyczące wbudowywania metioniny ^3H do mózgu podczas zatrucia TET okazały się odmienne od oczekiwanych. Być może ostry obrzęk wywołany działaniem TET, powodujący zaburzenie czynnego transportu przez błony komórkowe hamuje równocześnie przenikanie DL-metioniny ^3H do tkanki nerwowej, podczas gdy inne aminokwasy przenikają łatwiej. Za taką interpretacją wydaje się również przemawiać zmiana dynamiki wbudowywania DL-metioniny ^3H do mózgu w przypadku zatrucia TET. W przebiegu encefalopatii toksycznej wywołanej trójetylką cyny maksymalne zaczerwienie autoradiogramów ma miejsce po 10 godzinach od chwili wprowadzenia izotopu, podczas gdy u szczurów prawidłowych zjawisko to występuje po upływie 1 godziny. Przesunięcie szczytu inkorporacji DL-metioniny ^3H może być spowodowane rozpoczynającym się cofaniem objawów zatrucia TET po 15 godzinach od chwili podania tego związku. Z obserwacji poczynionych w innych badaniach (Kozik 1970) wynika, że najbardziej nasilone objawy kliniczne zatrucia po dootrzewnowym wstrzyknięciu siarczanu trójetylki cyny występują u zwierząt doświadczalnych po upływie 3—5 godzin. Dlatego zarówno zmiana dynamiki inkorporacji DL-metioniny ^3H do mózgu jak i zmniejszone wbudowywanie się tego aminokwasu do tkanki nerwowej i glejowej może być wykładnikiem wybiórczego hamującego działania TET na przenikanie badanego aminokwasu do ośrodkowego układu nerwowego.

Na podkreślenie zasługują także spostrzeżenia histotopograficzne poczynione w omawianych badaniach. W zatruciu TET zwraca przede wszystkim uwagę brak wbudowywania DL-metioniny ^3H do ciała neuronu w korze mózgu oraz pojawienie się izotopu w blaszkach rdzennych istoty białej mózdzku. W warunkach prawidłowych przy stosowanej daw-

ce izotopu wynoszącej 5 $\mu\text{Ci/g}$ ciężaru ciała (Kozik, Ożarzevska 1974a) nie obserwowano wbudowywania DL-metioniny ^3H do istoty białej, natomiast w korze mózgu ziarna zredukowanego srebra widoczne były nie tylko w neuropilu, ale również w perikarionach.

Wyjaśnienie przyczyny tych zmian nie jest łatwe. Być może w encefalopatii cynowej dochodzi nie tylko do zmian ilościowych i dynamiki inkorporacji DL-metioniny ^3H , ale występują również zmiany jakościowe w składzie aminokwasowym białek. Wyjaśnienie tego zagadnienia przekracza ramy badań autoradiograficznych. Spostrzeżenie to jednak jako niezmiernie interesujące zasługuje naszym zdaniem na podkreślenie.

WNIOSKI

1. Zatrucie siarczanem trójetylku cyny zmniejsza wbudowywanie DL-metioniny ^3H do mózgu.
2. Proces wbudowywania DL-metioniny ^3H do mózgu zwierząt po zatruciu TET jest wolniejszy niż u zwierząt prawidłowych.
3. Maksymalne zaciemnienie autoradiogramów w encefalopatii toksycznej spowodowanej zatruciem TET ma miejsce po upływie 10 godzin od chwili wprowadzenia DL-metioniny ^3H , podczas gdy u zwierząt kontrolnych występuje po upływie 1 godziny.
4. Zatrucie TET nie powoduje wbudowywania DL-metioniny ^3H do komórek glejowych.
5. Zmiany histotopograficzne inkorporacji DL-metioniny ^3H po zatruciu TET są niewielkie. Dotyczą one głównie kory mózgu oraz blaszek rdzennych istoty białej mózdzku.

М. Козик, Е. Ожажевска, А. Пеховски

ВКЛЮЧЕНИЕ DL-МЕТИОНИНА В МОЗГ КРЫСЫ ВО ВРЕМЯ ОТРАВЛЕНИЯ СЕРНОКИСЛЫМ ТРИЭТИЛОВЫМ ОЛОВОМ

Резюме

Авторы провели автордиографические исследования включения DL-метионина ^3H в мозг крыс при остром отеке, вызванном серноокислым триэтиловым оловом (ТЭТ).

В результате исследований было обнаружено, что отравление ТЭТ вызывает снижение включения меченного метионина в мозг крыс, по сравнению с нормальными животными. Показано также изменение динамики включения DL-метионина ^3H после отравления ТЭТ. Максимальное почернение автордиограмм было обнаружено у экспериментальных животных через 10 часов после введения изотопа, в то время как у контрольных животных наблюдалось оно через час.

В работе обсуждаются возможные механизмы патогенеза.

M. B. Kozik, E. Ożarowska, A. Piechowski

INCORPORATION OF DL-METHIONINE ^3H INTO THE RAT BRAIN
IN THE COURSE OF TRIETHYL TIN SULPHATE INTOXICATION

Summary

The authors investigated by the method of autoradiography the incorporation of DL-methionine ^3H into the rat brain in the course of acute edema caused by the triethyl tin sulphate (TET).

The results indicated that TET intoxication effects in lower incorporation of methionine into the experimental rat brain in comparison to that in normal animals. The authors demonstrated also the changes in dynamics of DL-methionine ^3H incorporation after TET intoxication. The greatest blackening of the autoradiograms was demonstrated in experimental rats 10 hours after isotope administration, whereas in control rats it was brought about after 1 hour.

The authors discuss possible pathogenetic mechanism of the observed changes.

PISMIENICTWO

1. Eto Y., Suzuki K., Suzuki K.: Lipid composition of rat brain myelin in triethyl tin-induced edema. *J. Lipid. Res.* 1971, 12, 570—579.
2. Hirano A., Zimmerman H., Levine S.: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyl tin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 571—580.
3. Ibrahim M.: Neuroglia and demyelination. W: *Neurohistochemistry*, ed: C. Adams, Elsevier, Amsterdam 1965.
4. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 36, 1—14.
5. Kozik M.: Histochemical studies on degenerative lesions in neurocytes. *Annals of the Medical Section of the Polish Academy of Sciences*, 1970, 15, 71—97.
6. Kozik M.: Degenerative changes of neurocytes in the light of autoradiographic investigation. *Pathol. Europea* 1971, 6, 137—151.
7. Kozik M.: Doświadczalny obrzęk neuronu w świetle badań histoenzymatycznych. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 1—15.
8. Kozik M., Ożarowska E.: Autoradiographic studies on methionine- ^3H incorporation into rat brain. *Exp. Path.* 1974a, 9, 274—279.
9. Kozik M., Ożarowska E.: Inkorporacja DL-feniloalaniny do mózgu szczura. *Badania autoradiograficzne. Neuropat. Pol.* 1974b, 12, 461—468.
10. Mase K., Takahashi Y., Ogata K.: The incorporation of (C^{14}) glycine into the protein of guinea pig brain cortex slices. *J. Neurochem.* 1962, 9, 282—288.
11. Sloper J. C., Armott D. J., King B. C.: Sulphur metabolism in the pituitary and hypothalamus of the rat: A study of radioisotope uptake after the injection of ^{35}S DL-Cysteine, methionine and sodium sulphate. *J. Endocrin.* 1960, 20, 9—23.
12. Vrba R., Gaitonde M. K.: Enzymic systems converting into protein in brain and other organs. *Acta Neurol. Scand.*, 1962, 38, 17—18.

13. Tsukada Y., Hirano S., Matsutan T.: Active transport of amino acid in brain slices. *Acta Neurol. Scand.* 1962, 38, 13—14.
14. Wender M., Kozik M., Piechowski A.: Enzymmorphological studies od the Brain Oedema Produced with Triethyl Tin. *Folia Histochem. Cytochem.* 1971, 9, 217—226.
15. Wender M., Kozik M., Piechowski A.: Effect of chronic triethyl tin intoxication on the morphological and histoenzymic pattern of rat brain. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 323—330.

Adres autorów: Samodzielna Pracownia Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów A. M., 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

BARBARA BICZOWA, MARIANNA SIKORSKA, ZOFIA ZALEWSKA,
WŁCZDZIMIERZ BICZ

EFFECT OF A THIOPHOSPHORIC INSECTICIDE — FENCHLORPHOS
ON THE GLYCOGEN LEVEL, GLYCOLYSIS
AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY
IN RAT BRAIN *)

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy,
Warszawa

Lead: Assist. Prof. W. Bicz PhD.

Previous studies have demonstrated that intoxication of rats with phosphoorganic insecticides — dichlorvos (DDVP) or trichlorphon (Dipterex) results in an increase of the brain glycogen level, while the glycolytic activity remains unchanged (Biczowa et al. 1975, Sikorska et al. 1975). A correlation of the chemical structure (insecticide and its metabolites) and the effect on the nerve tissue metabolism has been emphasized. In recent toxicological investigations much attention has been focused on the thiophosphoorganic compounds which find application as insecticides. These compounds are in animal organisms metabolized to the respective oxygen analogues (Plapp et al. 1958, Hitchcock et al. 1971), which are more toxic than the sulfur-containing precursors.

The aim of the work was to determine the glycogen level and the glycolytic and glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) activities in rat brain following intoxication with an thiophosphoroorganic insecticide — fenchlorphos.

MATERIAL AND METHODS

The albino rats of 200 g body weight, from isolated cultures without any selection were used. During experiment the animals were fed

*) The work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No 09.4.1.3).

a standard diet and received water ad libitum. Fenchlorphos (syn.: Tro-len; 0,0-dimethyl-0-/2,4,5-trichlorphenyl) phosphorothioate, obtained from Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences — Warszawa) was administered *per os* in 1 ml oil solution. The assumed LD₅₀ dose (Malinowski, 1967) was 1250 mg/kg body weight. Two intoxication models were used. In model I, the insecticide was administered in one single 2%, 5%, 10% or 50% LD₅₀ dose. The animals were sacrificed by decapitation after 2 or 24 hrs. In model II, fenchlorphos was given during 14 subsequent days in 2%, 5% or 10% LD₅₀ doses. The rats were decapitated 24 hrs after the last administration. The control animals received 1 ml oil *per os*.

Glycogen determinations were made on cerebral hemispheres. Samples (500 mg) of frozen tissue were boiled in 30% KOH for 45 min. Glycogen was precipitated with 96% ethanol. The precipitate was washed with a mixture of chloroform and methanol and subsequently hydrolyzed in acid medium. The glucose content in neutralized hydrolysate was assayed colorimetrically after Nelson (1944).

The glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was tested in the postmitochondrial fractions after Löhr et al. (1970). Before decapitation the brains were perfused with 0,9% NaCl solution. Cerebral hemispheres were homogenized in cold isolation medium (0,9% NaCl, 0,66 mM EDTA) in a glass—Teflon homogenizer. The homogenates were centrifuged for 20 min at 10 000 x g and 0—4°C. The enzyme activity in the supernatant was assayed spectrophotometrically in a medium containing 50 mM triethanolamine buffer (pH 7,6), 40 mM glucose-6-phosphate and 30 mM NADP. Protein was determined by the biuret method (Layne 1957).

The glycolytic activity of brain homogenates was evaluated by measuring glucose consumption and lactate production in aerobic conditions. The composition of the incubation medium ensured maximum glycolytic activity (Utter et al. 1945, Racker et al. 1945, Reiner 1947). Glucose was determined by means of glucose oxidase (Hugget, Nixon 1957). Lactate was assayed spectrophotometrically with the use of lactate dehydrogenase (Horn, Bruns 1956). Further experimental details concerning the glycogen and glycolytic activity determinations were described elsewhere (Biczowa et al. 1975). Statistical analysis was performed with the t-Student's test.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 demonstrates the results of glycogen determinations.

In the brains of rats examined 2 hrs after single administration of a 50% LD₅₀ dose of fenchlorphos, a statistically significant decrease of

Table 1. The glycogen level in rat brain following fenchlorphos intoxication

Tabela 1. Poziom glikogenu w mózgach szczurów po zatruciu fenchlorfosem

Model of intoxication Model zatrucia	Dose of pesti- cide Dawka pes- tycydu %LD ₅₀	Glycogen level (mg glucose/100 g wet tis- sue) Poziom glikogenu (mg glukozy/100 g wil- gotnej tkanki)					
		$\bar{x} \pm S_x^-$	n	p			
Single intoxication Zatrucie jednorazowe	Control Kontrola	2 hrs godz.	77,3	5,5	6		
		2	73,2	3,9	6	$\geq 0,05$	
		10	64,3	3,7	6	$\leq 0,05$	
		50	55,2	10,1	6	$\leq 0,05$	
	Control Kontrola	24 hrs godz.	72,6	4,3	6		
		2	69,6	4,7	6	$\geq 0,05$	
		10	68,1	4,5	6	$\geq 0,05$	
		50	71,8	3,5	6	$\geq 0,05$	
	Multiple intoxication Zatrucie wielokrotne	Control Kontrola	14 days dni	81,2	3,6	6	
			2	67,5	7,9	6	$\leq 0,05$
			10	67,5	5,8	6	$\leq 0,05$

$\bar{x} \pm S_x^-$ — arithmetic mean \pm mean error of the mean

— średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n — number of animals

liczba zwierząt

p — probability

prawdopodobieństwo

glycogen level (about 28% below control) was observed. Also the 10% LD₅₀ dose produced a decrease by about 17%. The lowest dose applied (2% LD₅₀) was ineffective. Twenty four hours after application of either of the doses, the brain glycogen level did not differ from control. Repeated administration of fenchlorphos (model II) in both 2% and 10% LD₅₀ doses led to a decrease of glycogen content in cerebral hemispheres by about 17%, the decrease being statistically significant and independent of the dose. Table 2 presents the results of glycolysis determinations in brain homogenates in analogical intoxication models. With the exception of increased lactic acid production observed 24 hrs after single administration of 10% LD₅₀ dose, no other difference with respect to the control was noted in any experimental condition and this held to both glucose consumption and lactate production. However, further experiments are needed for statistical evaluation of the results observed 24 hrs after insecticide administration.

Table 2. The glycolysis in aerobic conditions of rat brain homogenates following fenchlorphos intoxication

Tabela 2. Glikoliza w warunkach tlenowych homogenatów mózgow szeszurów po zatruciu fenchlorfosem

Model of intoxication Model zatrucia		Dose of pesticide Dawka pestycydu % LD ₅₀	Lactate production (μ moles/hr/mg protein) Produkcja mleczanu		Glucose consumption (μ moles/hr/mg protein) Zużycie glukozy				
			(μ mole/godz./mg bialka)	(μ mole/godz./mg bialka)	(μ mole/godz./mg bialka)	(μ mole/godz./mg bialka)			
			$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n			
Single intoxication zatrucie jednorazowe	Time after insecticide administration Czas po podaniu insektycydu	2 hrs godz.	Control Kontrola	4,58	0.08	6	3,11	0.11	6
			2	4.58	0.10	5	2.99	0.08	5
			10	4.52	0.07	6	2.99	0.08	6
		24 hrs godz.	50	4.58	0.18	5	3.11	0.28	5
			Control Kontrola	5.31		2	3.08		2
			2						
	14 days dni	10	6,95		2	2.80		2	
		50	5.29		2	2,74		2	
		Multiple intoxication Zatrucie wielokrotne	Control Kontrola	4.20	0.31	5	2.82	0.06	4
			2	4.20	0.20	5	2.96	0.14	5
			10	4.40	0.31	5	2.94	0.05	5

Explanation in Table 1
Objaśnienia w tabeli 1

As shown in Table 3, the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity remained unchanged after single administration of 2%, 5% or 50% LD₅₀ doses as well as after repeated administration of 2% and 5% LD₅₀ doses.

Intoxication with fenchlorphos — a thiophosphoroorganic insecticide — leads to a decrease of brain glycogen level, without affecting either the glycolytic activity, measured as glucose consumption and lactate production in aerobic conditions, or the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Data have accumulated indicating that some of the thiophosphoroorganic insecticides are metabolized to respective oxygen analogues, which are more toxic than the parental compounds (Plapp et al. 1958, Palut et al. 1969). Since the analogues readily undergo further degradation, the detectability of their effects depends upon the dose of sulphur precursor and the time after administration. Twenty four hours after single administration of the insecticide, no decrease of glycogen level was to be observed, irrespective of the applied dose. Presumably, the changes that became apparent shortly after administra-

Table 3. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat brain postmitochondrial fraction following fenclorphos intoxication

Tabela 3. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej frakcji postmitochondrialnej mózgow szczyrów po zatruciu fenclorfosem

Model of intoxication Model zatrucia		Dose of pesticide Dawka pestycydu % LD ₅₀	G-6-P dehydrogenase activity (μ moles/min/mg protein)			
			Aktywność dehydrogenazy G-6-P (μ mole/min./mg białka)			
			$\bar{x} \pm S_x$	n	p	
Single intoxic. Zatrucie jednorazowe	Time after insecticide administration Czas po podaniu insektycydu	Control Kontrola	10.1	0.32	6	
		2	10.5	0.25	6	≥ 0.05
		5	10.2	0.26	6	≥ 0.05
		50	9.8	0.26	6	≥ 0.05
		2 hrs godz.				
Multiple intoxication Zatrucie wielokrotne	14 days dni	Control Kontrola	7.7	0.27	6	
		2	8.2	0.32	6	≥ 0.05
		5	7.8	0.25	6	≥ 0.05

Explanation in Table 1
Objaśnienia w tabeli 1

tion were compensated for in later periods. However, on repeated administration of fenclorphos, the nerve tissue was found to lose the ability to completely restore the glycogen level, which 24 hrs after the 14-th intoxication was decreased by about 17% with respect to control. Fenclorphos and its oxygen analogue are known to inhibit *in vitro* the oxygen consumption by brain or liver homogenates and also the activity of a number of brain mitochondrial oxidoreductases (Sitkiewicz et al. 1975). It was also been shown that the oxygen analogue interferes with oxidative phosphorylation in brain mitochondria, producing changes characteristic of uncoupling agents (Sitkiewicz 1975). It may thus be assumed that the observed decrease of glycogen level could be a result of the inhibition of its synthesis, due to the reduction of the ATP pool.

Previous studies revealed that, contrary to fenclorphos, two other phosphoroorganic insecticides — dichlorvos and trichlorphon produce an increase of the brain glycogen level (Biczowa et al. 1975, Sikorska et al. 1975). This discrepancy may be related to the following two phenomena:

1. Dichlorvos and trichlorphon do not cause disturbances in oxidative phosphorylation in brain mitochondria and thus probably do not reduce the ATP level (Jurkiewicz 1975, Wenzel 1975).

2. The two insecticides studied inhibit the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zalewska et al. 1975).

Obviously, further investigations concerning the adenine nucleotides and glucose-6-phosphate levels and the activities of enzymes involved in glycogen biosynthesis and phosphorolysis are needed to clarify the mechanism underlying the changes in brain glycogen level induced by the insecticides.

The authors wish to thank Mrs. Mrs.: Teresa Bok, Barbara Dyjak, Sławomir Januszewski, Halina Nowicka, Teresa Pańkowska, Krystyna Podwójcik and Tatiana Rychła for excellent technical assistance.

B. Biczowa, M. Sikorska, Z. Zalewska, W. Bicz

WPŁYW TIOFOSFOROWEGO INSEKTYCYDU FENCHLORFOSU NA POZIOM
GLIKOGENU, GLIKOLIZĘ I AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY
GLUKOZO-6-FOSFORANU W MOZGU SZCZURA

Streszczenie

Wykonano badanie biochemiczne mózgów szczurów poddanych jednorazowemu i wielokrotnemu zatruciu fenchlorfosem, należącym do tiofosforoorganicznych insektycydów. W półkulach mózgowych oznaczano poziom glikogenu metodą kolorymetryczną i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej metodą spektrofotometryczną. Aktywność glikolityczną homogenatów mózgowych oceniano na podstawie zużycia glukozy i produkcji mleczaanu w warunkach tlenowych stosując metody enzymatyczne.

Stwierdzono obniżenie poziomu glikogenu w mózgu po jednorazowym i wielokrotnym (14 dni) zatruciu fenchlorfosem, podczas gdy aktywność glikolityczna i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej pozostawały bez zmian. Wyniki wskazują na inny mechanizm działania fenchlorfosu na metabolizm glikogenu w mózgu w porównaniu z działaniem insektycydów fosforoorganicznych dichlorfosu lub trichlorfonu.

Б. Бичова, М. Сикорска, З. Залевска, В. Бич

ВЛИЯНИЕ ТИОФОСФОРНОГО ИНСЕКТИЦИДА ФЕНХЛОРФОСА
НА УРОВЕНЬ ГЛИКОГЕНА, ГЛИКОЛИЗ
И АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА В МОЗГЕ КРЫСЫ

Резюме

Были проведены биохимические исследования мозга крыс, подвергаемых однократному и многократному отравлению фенхлорфосом, принадлежащим к тиофосфоорганическим инсектицидам. В мозговых полушариях определяли калориметрическим методом уровень гликогена и активность дегидрогеназы

глюкозо-6-фосфата спектрофотометрическим методом. Гликолитическая активность мозговых гомогенатов оценивалась энзиматическими методами на основе потребления глюкозы и образования лактата в аэробных условиях. Было обнаружено снижение уровня гликогена в мозге после одноразового и многократного (14 дней) отравления фенхлорфосом, в то время как гликолитическая активность и активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата оставались без изменений. Результаты указывают на иной механизм действия фенхлорфоса на обмен гликогена в мозге, по сравнению с действием фосфоорганических инсектицидов дихлорфоса или трихлорфона.

REFERENCES

1. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenia ATP, ADP, AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 259—272.
2. Hitchcock M., Murphy S. D.: Activation of parathion and guthion by mammalian, avian and piscine liver homogenates and cell fractions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1971, 19, 37—45.
3. Horn H. D., Bruns F. H.: Quantitative Bestimmung von L(+) 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. Jurkiewicz G.: Działanie fosforoorganicznego insektycydu diptereksu na proces oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego. M. Sc. thesis, Warszawa 1975.
6. Layne E.: Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. In: *Methods in Enzymology*, Colowick S. P., Kaplan N. O., (eds) Acad. Press, New York 1957, 447—454.
7. Löhr G. W., Waller H. D.: Glukose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bergmeyer H. U., Acad. Verlag, Berlin, 1970, 599—606.
8. Malinowski R., Sledziński B.: Tionofosforan 0,0-dwumetylo-0-2,4,5-trójchlorofenylowy — ważny insektycyd o niskiej toksyczności. *Pestycydy*, 1967, 1, 1—14.
9. Nelson N.: The photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944, 153, 375—380.
10. Palut D.: Badanie mechanizmów detoksykacyjnych insektycydów fosforoorganicznych i karbaminianowych. *Roczniki PZH*, 1973, 24, 649—665.
11. Plapp F. W., Casida J. E.: Bovine metabolism of organophosphorus insecticides. Metabolic fate of 0,0-dimethyl 0-(2,4,5-trichlorophenyl) phosphorothioate in rats and cow. *J. Agr. Food Chem.* 1958, 6, 662—667.
12. Racker E., Krinsky I.: Effect of nicotinic acid amide and sodium on glycolysis and oxygen uptake in brain homogenates. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 453—461.
13. Reiner J. M.: Carbohydrate metabolism in tissue homogenates. *Arch. Biochem.* 1947, 12, 327—338.
14. Sikorska M., Biczowa B., Bicz W., Skonieczna M.: Glycogen content, glycolytic and respiratory activity and ATP, ADP and AMP concentrations in rat brain following trichlorophon (dipterex) intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 447—454.

15. Sitkiewicz D.: Procesy utleniania w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego i wątroby szczura w następstwie działania insektycydów tiofosforoorganicznych. Ph.D. thesis, Warszawa, 1975.
16. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: Effect of trofen and its oxygen analogue on the succinate oxidation by brain and liver homogenates and mitochondria. In preparation, 1975.
17. Utter M. F., Wood H. G., Reiner J. M.: Anaerobic glycolysis in nervous tissue. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 197—217.
18. Wenzel E.: Zachowanie się utleniania bursztynianu i oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach mózgu szczura w następstwie działania dichlorfosu (DDVP). M.Sc thesis, Warszawa, 1975.
19. Zalewska Z., Jurkiewicz G., Wenzel E.: Fosforylacja oksydacyjna i aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem i dichlorfosem. In preparation, 1975.

Authors' address: Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 1 Banacha Str. 02-097 Warszawa.

HALINA WEINRAUDER, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

WZBOGAONA FRAKCJA GLEJOWA Z MÓZGU SZCZURA JAKO IMMUNOGEN I ANTYGEN

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

W dziedzinie badań nad białkami układu nerwowego nastąpił w ostatnich latach znaczny postęp, umożliwiony dzięki opracowaniu szeregu nowoczesnych metod, m. in. otrzymywania wzbogaconych frakcji komórkowych i frakcji subkomórkowych z mózgu. Szczególną uwagę zwrócono na antygeny swoiste dla układu nerwowego, ponieważ występowanie substancji o narządowej lub narządowo-gatunkowej swoistości sugeruje, że specyficzne funkcje danej tkanki mogą być związane z występowaniem w niej tego rodzaju białek. Zidentyfikowanie swoistych antygenów może pomóc w wyjaśnianiu procesów wzrostu i różnicowania tkanek układu nerwowego, a także patogenezy niektórych chorób.

Wiadomo, że surowice pochodzące od zwierząt z EAE, a także od tych, które uodporniano pełnym homogenatem mózgu, zawierają szereg przeciwciał wykazujących szerokie działanie biologiczne, m. in. wywołujących cytolizę komórek glejowych w hodowli (Berg i Källen 1962) lub hamujących procesy różnicowania oligodendrogleju (Bornstein i Raine 1970). Funkcje swoistych antygenów glejowych nie są dotychczas znane, a nie ulega wątpliwości, że poznanie roli jaką pełnią one w układzie nerwowym jest niezbędne dla uzyskania pełnego obrazu immunogennych i antygenowych właściwości mózgu.

W poprzednich badaniach wykazano, że całkowicie wyabsorbowana (surowicą, nerką i śledzioną) odpornościowa surowica królicza przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu szczura reaguje z wzbogaconą frakcją glejową uzyskaną na drodze ultrawierowania (Weinrauder i Lach, 1976). Lokalizację glejową antygeny narządowo-swoistego wykazano także w badaniach immunofluorescencyjnych (Weinrauder i Lach 1975).

Przytoczone powyżej wyniki, a także dane z piśmiennictwa skłoniły nas do podjęcia próby immunizacji zwierząt frakcją glejową, która jest materiałem bardziej jednorodnym niż pełny homogenat mózgu. W pracy przedstawione są wyniki badań immunochemicznych przy użyciu surowicy odpornościowej pochodzącej od królika wielokrotnie uodpornianego wzbogaoną frakcją komórek glejowych.

MATERIAŁ I METODY

Otrzymywanie frakcji wzbogaconych. Wzbogacone frakcje: glejową, neuronalną i mielinową otrzymywano posługując się metodą Blömstrand i Hambergera (1969), w modyfikacji opisanej uprzednio (Weinrauder i Śmiałek 1974). Oczyszczoną mielinę otrzymywano stosując metodę opisaną przez Gregsona i wsp. (1971). Wszystkie frakcje bezpośrednio po ich uzyskaniu zamrażano w temp. -20° .

Przygotowanie immunogenu i immunizacja królików. Osad komórek glejowych po odmrożeniu homogenizowano w buforze fosforanowym o pH 7,3 i emulgowano z równą objętością niepełnego adjuwantu Freund (Difco). Jeden ml emulsji wstrzykiwano domięśniowo królikom (samce, albinosy, wagi 2,5—3 kg). Surowice pobierano w trzy tygodnie po każdym szczepieniu i kontrolowano w odczynie immunodyfuzji z liofilizowanymi wodnymi wyciągami z mózgu i nerek szczura oraz z surowicą szczurzą.

Do badań użyto surowicę dającą większą ilość pasm precypitacyjnych w reakcji z liofilizowanym wyciągiem z mózgu; królik został skrwawiony z serca po 5 miesiącach od rozpoczęcia uodporniania. Dla porównania z surowicą antyglejową użyto także surowicę przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu szczura. Metodę otrzymywania takich surowic oraz absorpcji przeciwciał nieswoistych narządowo opisano poprzednio (Weinrauder 1969).

A n t y g e n y. 1. Surowica szczura. 2. Liofilizowane wyciągi z mózgu i nerki dorosłych szczurów przygotowane wg metody opisanej poprzednio (Weinrauder 1969). 3. Frakcje: glejowa, neuronalna i mielinowa uzyskane na drodze ultrawierowania w gradiencie Ficoll-sacharoza. 4. Oczyszczona mielina.

Przygotowanie antygenów i surowic odpornościowych do odczynu immunodyfuzji i immunoelektroforezy. Antygeny liofilizowane rozpuszczano w wodzie destylowanej — nerkę w ilości 10 lub 20 mg/ml, a mózg 20 lub 40 mg/ml. Wzbogacone frakcje komórkowe i mielinę homogenizowano w buforze fosforanowym o pH 7,3. Część frakcji poddawano trzykrotnemu cyklowi zamrażania-odmrażania w mieszaninie suchego lodu z alkoholem i na łaźni wodnej o temperaturze 37° . Frakcję

glejową poddawano ponadto działaniu szoku osmotycznego w następujący sposób: po odmrożeniu do frakcji dodawano 1 objętość wody destylowanej i dejonizowanej i krótko homogenizowano w szklanym homogenizatorze na łaźni lodowo-wodnej. Zawiesinę rozbitych komórek pozostawiano na noc w temperaturze 4°, następnie odwirowywano przy szybkości 16 tys. obrotów/min. i supernatant zagęszczano trzykrotnie w stosunku do objętości wyjściowej w workach dializacyjnych umieszczonych w Aquacide II (Calbiochem).

Surowicę antyglejową absorbowano liofilizowanym wyciągiem z nerki szczura w ilości 10 mg na 1 ml surowicy, oraz w jednym przypadku oczyszczoną mieliną w ilości 1 ml na trzy ml surowicy. Absorpcję przeprowadzano przez 1 godz. w 37° i przez noc w 4°. Absorbowaną surowicę kontrolowano w odczynie immunodyfuzji z liofilizowaną nerką i z surowicą szczura. W miarę potrzeby zagęszczano surowicę przy pomocy Aquacide II.

Immunodyfuzja. Immunodyfuzję przeprowadzano wg metody Ouchterlony (1948), w 1% żelu agarowym (Agar Noble, Difco), w buforze fosforanowym o pH 7,2, z dodatkiem 0,1 M NaCl i 0,01 M Na₂EDTA. Po zastygnięciu żelu wycinano zbiorniki na antygeny o objętości ok. 0,12 ml, w odległości 7 mm od zbiornika centralnego i zbiornik na surowicę odpornościową o objętości ok. 0,18 ml. Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24—48 godz. (w wyjątkowych wypadkach dłużej), płukano 6 dni w zbuforowanym 0,1 NaCl i 24 godz. w wodzie destylowanej, suszono, barwiono w roztworze czerni amidowej 10 B 16—24 godz. i odbarwiano mieszaniną alkoholu i kwasu octowego.

Immunoelektroforeza. Immunoelektroforezę przeprowadzano na szkiełkach podstawowych, pokrytych 0,8% agarozą (BDH) w buforze weronalowym z HCl o pH 8,2 i sile jonowej 0.025. Rozdział przeprowadzano przy napięciu 70 V przez 90 min. Po zakończeniu elektroforezy wypełniano surowicą odpornościową rowek odległy od zbiorniczka z antygenem o 3 mm i inkubowano w temperaturze pokojowej 24—48 godz. Płytki płukano, suszono i barwiono tak samo jak w odczynie immunodyfuzji.

WYNIKI

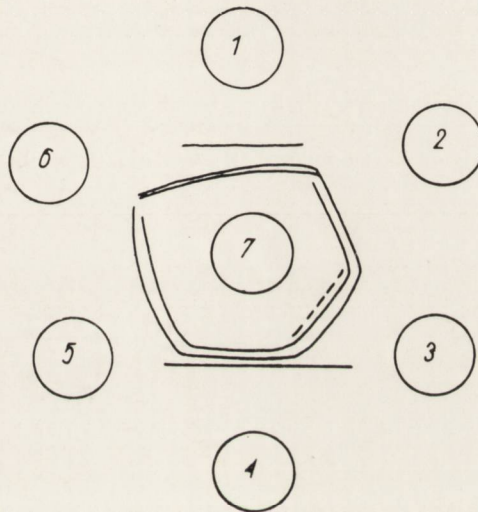
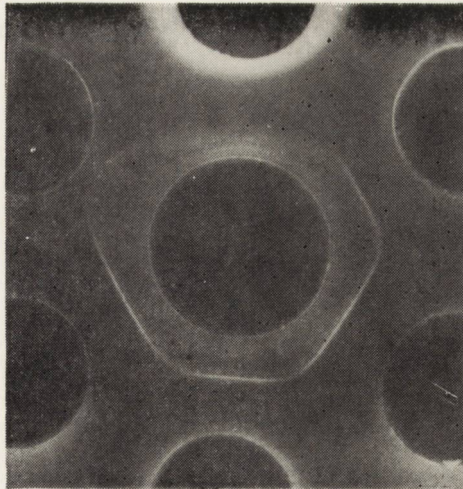
W surowicy antyglejowej pochodzącej od królika szczepionego pięciokrotnie w odstępach miesięcznych stwierdzono obecność przeciwciał reagujących z wyciągiem wodnym z mózgu i nerki szczura oraz z normalną surowicą. Reakcję dodatnią uzyskano zarówno w odczynie immunodyfuzji jak i w immunoelektroforezie, przy czym liczba pasm precypitacyjnych była różna w zależności od stopnia zagęszczenia surowicy odpor-

nościowej i stężenia antygenów. Przeciwciała te są skierowane przede wszystkim przeciwko wspólnym antygenom narządowym i dają szereg wyraźnych pasm w odczynie immunodyfuzji z antygenami rozpuszczalnymi z mózgu i nerki, oraz z homogenatami wzbogaconej frakcji glejowej i frakcji mielinowej. Jedno z pasm odpowiadających antygenowi gatunkowo-swoistemu w wyraźny sposób zagina się przy zbiorniku z oczyszczoną mieliną, wskazując na występowanie w tej frakcji śladów wspólnego antygeny tkankowego (ryc. 1).

Reakcję immunoelektroforezy nieabsorbowanej surowicy antyglejowej z mózgiem i nerką przedstawia ryc. 2. Dodatni wynik immunoelektroforezy z frakcją glejową jako antygenem uzyskano dopiero po poddaniu komórek glejowych szokowi osmotycznemu i trzykrotnym zagęszczeniu supernatantu. Dwa łuki precypitacyjne zlokalizowane są w strefie α , co jest przedstawione na ryc. 3. W reakcji trzykrotnie zagęszczonej surowicy i tak samo zagęszczonego antygeny pojawiają się trzy łuki precypitacyjne (ryc. 4). Wskazuje to na występowanie we frakcji glejowej używanej do immunizowania zwierząt szeregu antygenów o swoistości gatunkowej w bardzo niskich stężeniach. Odpowiadające im przeciwciała w surowicy glejowej ujawniają się dopiero po znacznym jej zagęszczeniu.

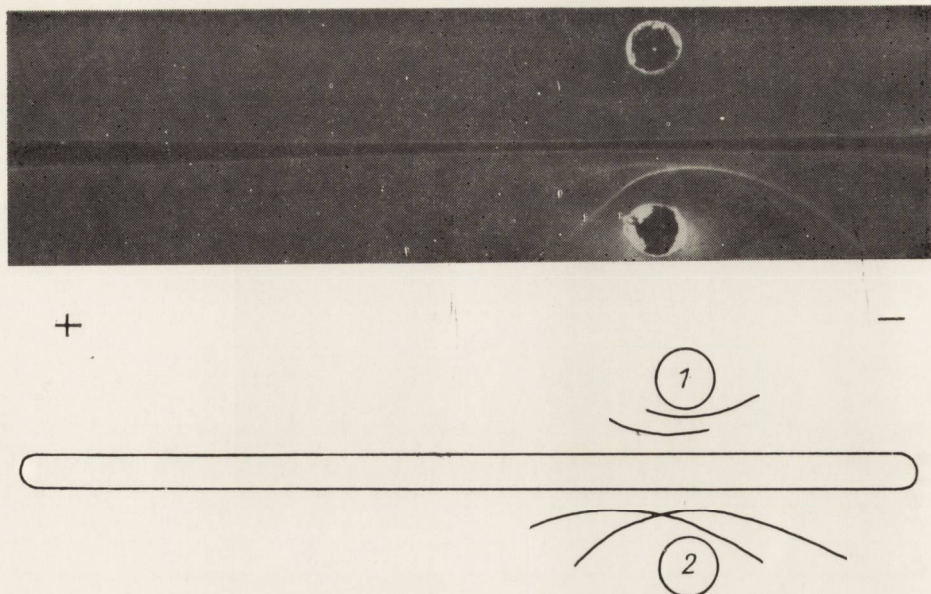
Po wyabsorbowaniu nieswoistych przeciwciał liofilizowanym wyciągiem z nerki, surowica antyglejowa reaguje z antygenami swoistymi narządowo (ryc. 5). Widoczne jest wyraźne pasmo precypitacyjne przy zbiorniku z antygenem glejowym, łączące się z pasmem tworzącym się przy zbiorniku z frakcją mielinową. Z antygenami tej frakcji tworzy się często dodatkowe pasmo precypitacyjne. Pasma wspólne dla frakcji glejowej i mielinowej przedłuża się sięgając do zbiornika z antygenem mózgowym — jednak nawet przy zwiększeniu stężenia do 40 mg/ml, pasmo to widoczne jest tylko na barwionych i niewysuszonych płytkach. Z mieliną oczyszczoną, nerką i frakcją neuronalną reakcja jest ujemna. Trzykrotny cykl zamrażania i odmrażania frakcji glejowej i mielinowej nie wpływa na zmianę obrazu linii precypitacyjnych, nie ujawniają się nowe ani też nie znikają antygeny reagujące z absorbowaną surowicą.

W celu ewentualnego wykrycia większej ilości swoistych antygenów oraz stwierdzenia ich identyczności immunologicznej z antygenami zawartymi w wodnym wyciągu z mózgu dorosłego szczura, użyto surowicy antyglejowej absorbowanej nerką i zagęszczonej trzykrotnie, frakcji glejowej poddanej szokowi osmotycznemu i również trzykrotnie zagęszczonej oraz liofilizowanego wyciągu wodnego z mózgu w stężeniu 40 mg/ml. Trójkątny układ zbiorników pozwala na ocenę identyczności badanych antygenów. Reakcja jest przedstawiona na ryc. 6. Przy zbiorniku z an-



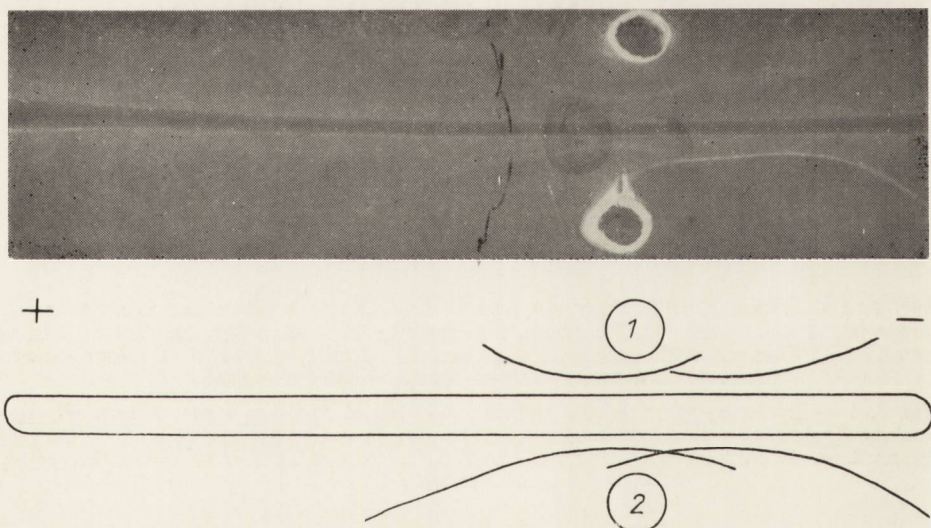
Ryc. 1. 1 — Mózg liofilizowany, 40 mg/ml. 2 — Frakcja glejowa (zamrażana-odmrażana), 3 — Nerka liofilizowana, 20 mg/ml, 4 — Frakcja mielinowa (zamr. odmr.), 5 — Nerka liofilizowana, 20 mg/ml, 6 — Mielina oczyszczona (zamr.-odmr.), 7 — Surowica antyglejowa, nieabsorbowana.

Fig. 1. 1 — Brain (lyophilized, 40 mg/ml), 2 — Glial fraction (frozen-thawed), 3 — Kidney (lyophilized, 20 mg/ml), 4 — Myelin fraction (frozen-thawed), 5 — Kidney (lyophilized, 20 mg/ml), 6 — Purified myelin (frozen-thawed), 7 — Antigial serum, unabsorbed.



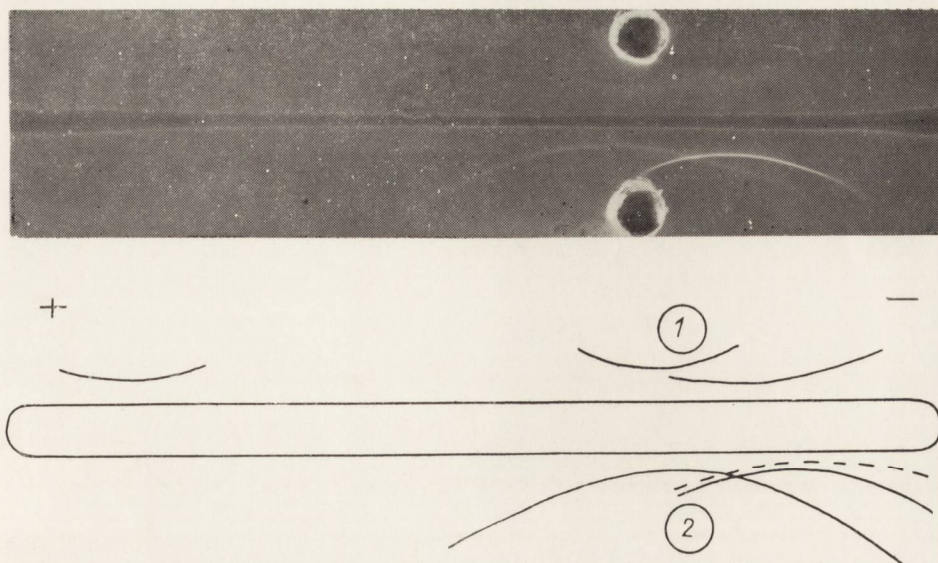
Ryc. 2. 1 — Nerka liof., 20 mg/ml, 2 — Mózg liof., 40 mg/ml, Rowek: Surowica antyglejowa, nieabsorbowana, 3 × zagęszczona.

Fig. 2. 1 — Kidney (lyophil., 20 mg/ml), 2 — Brain (lyophil. 40 mg/ml) Trough — antiglial serum, unabsorbed, 3 × concentrated.



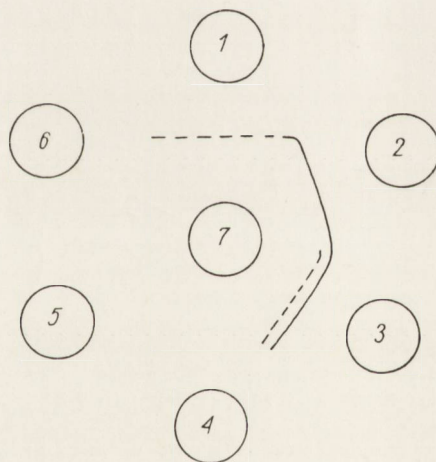
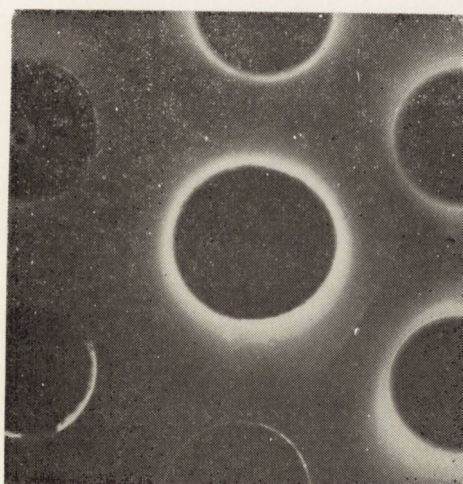
Ryc. 3. 1 — Frakcja glejowa po szoku osmotycznym, 3 × zagęszczona, 2 — Mózg liof. 40 mg/ml, Rowek — Surowica antyglejowa, nieabsorbowana.

Fig. 3. 1 — Glial fraction after osmotic shock, 3 × concentrated, 2 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), Trough — antiglial serum, unabsorbed.



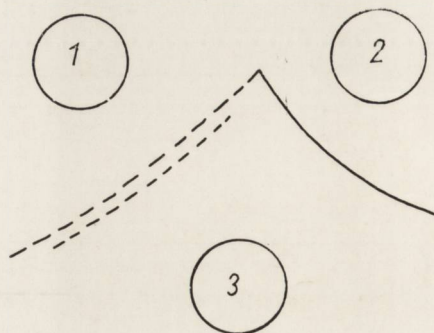
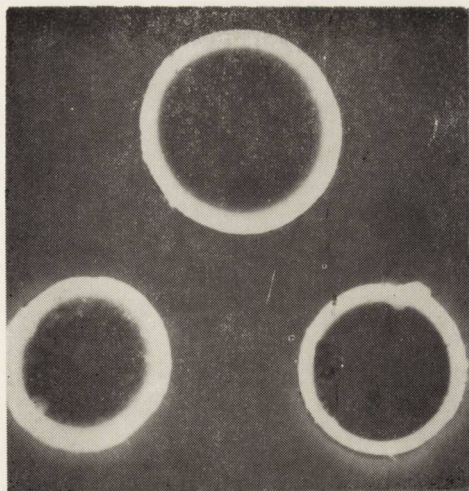
Ryc. 4. 1 — Frakcja glejowa po szoku osmotycznym, 3 × zagęszczona, 2 — Mózg liof. 40 mg/ml, Rowek: Surowica antyglejowa, nieabsorbowana, 3 × zagęszczona.

Fig. 4. 1 — Glial fraction after osmotic shock, 3 × concentrated, 2 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), Trough — Antigial serum, unabsorbed, 3 × concentrated.



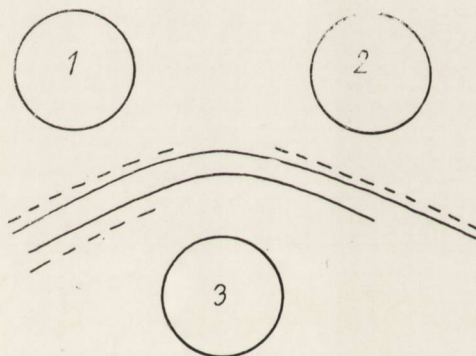
Ryc. 5. 1 — Mózg liof. 20 mg/ml, 2 — Frakcja glejowa, 3 — Frakcja mielinowa, 4 — Mielina oczyszczona, 5 — Frakcja neuronalna, 6 — Nerka liof. 10 mg/ml, 7 — Surowica antyglejowa absorbowana nerką.

Fig. 5. 1 — Brain (Lyophil. 20 mg/ml), 2 — Glial fraction, 3 — Myelin fraction, 4 — Purified myelin, 5 — Neuronal fraction, 6 — Kidney (lyophil. 10 mg/ml), 7 — Antigial serum absorbed with kidney.



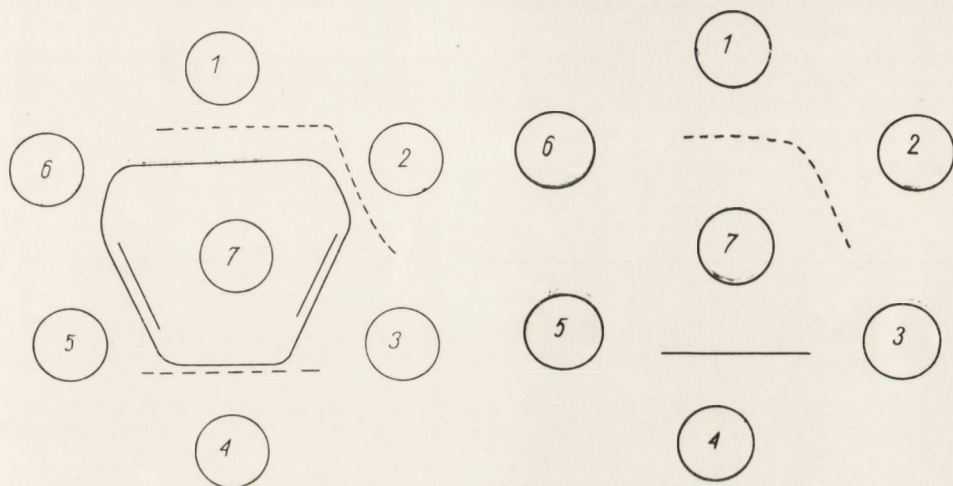
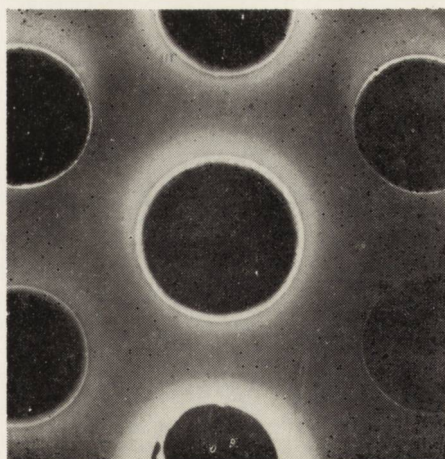
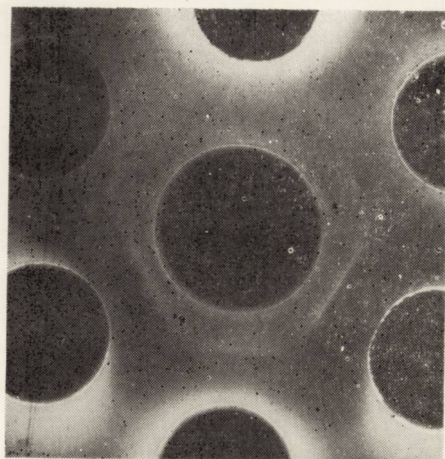
Ryc. 6. 1 — Mózg liof. 40 mg/ml, 2 — Frakcja glejowa po szoku osmotycznym, 3 × zagęszczona. 3 — Surowica antyglejowa, absorbowana nerką, 3 × zagęszczona.

Fig. 6. 1 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), 2 — Glial fraction after osmotic shock, 3 × concentrated, 3 — Antigial serum absorbed with kidney, 3 × concentrated.



Ryc. 7. Schemat. 1. Mózg liof — 40 mg/ml, 2 — Frakcja glejowa po szoku osmotycznym, 3 × zagęszczona, 3 — Surowica przeciwko mózgowi szczura absorbowana surowicą i nerką.

Fig. 7. Scheme. 1 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), 2 — Glial fraction after osmotic shock, 3 × concentrated. 3 — Anti rat brain serum absorbed with rat serum and kidney.



Ryc. 8. 1 — Mózg liof. 40 mg/ml, 2 — Frakcja glejowa (zamr.-odmr.), 3 — Nerka liof. 20 mg/ml, 4 — Frakcja mielinowa (zamr.-odmr.) 5 — Nerka liof. 20 mg/ml, 6 — Mielina oczyszczona (zamr.-odmr.), 7 — Surowica antyglejowa absorbowana mieliną oczyszczoną.

Fig. 8. 1 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), 2 — Glial fraction (frozen-thawed), 3 — Kidney (lyophil. 20 mg/ml), 4 — Myelin fraction (frozen-thawed), 5 — Kidney (lyophil. 20 mg/ml), 6 — Purified myelin (frozen-thawed), 7 — Antiglial serum absorbed with purified myelin.

Ryc. 9. 1 — Mózg liof. 40 mg/ml, 2 — Frakcja glejowa (zamr.-odmr.), 3 — Nerka liof. 20 mg/ml, 4 — Frakcja mielinowa (zamr.-odmr.), 5 — Nerka liof. 20 mg/ml, 6 — Mielina oczyszczona (zamr.-odmr.), 7 — Surowica antyglejowa, absorbowana nerką.

Fig. 9. 1 — Brain (lyophil. 40 mg/ml), 2 — Glial fraction (frozen — thawed), 3 — Kidney (lyophil. 20 mg/ml), 4 — Myelin fraction (frozen-thawed), 5 — Kidney (lyophil. 20 mg/ml), 6 — Purified myelin (frozen-thawed), 7 — Antiglial serum absorbed with kidney.

Schematy dołączone do zdjęć były wykonywane przy bezpośredniej obserwacji płytek. Linia przerywaną oznaczono linie precypitacyjne słabo widoczne na zdjęciach.

All schemes were drawn by direct observation of the plates and then photographed.
Dash lines represent precipitin bands poorly visible on the photograms.

tygenem mózgowym tworzą się dwa pasma, z których jedno wykazuje reakcję identyczności z pojedynczym pasmem glejowym, zlokalizowanym blisko zbiornika z antygenem i pojawiającym się dopiero po 4 dniach inkubacji. Należy zaznaczyć, że pełne rozwinięcie odczynu wymagało 6 dni inkubacji, podczas gdy na ogół wystarczający był okres 24—48 godzin. Wskazuje to na bardzo niskie stężenie swoistego antygeny w tak otrzymanej frakcji glejowej lub na niski poziom przeciwciał antyglejowych w surowicy odpornościowej.

Natomiast w reakcji z surowicą przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu (absorbowanej surowicą i nerką), tworzą się dwa pasma odpowiadające swoistym antygenom frakcji glejowej i łączące się z pasmami powstającymi przy zbiorniku z antygenami rozpuszczalnymi z mózgu. Pojawiają się także dodatkowe, znacznie słabsze pasma przy obu zbiornikach z antygenami, co może wskazywać na istnienie większej liczby swoistych antygenów (ryc. 7).

W reakcji z surowicą antyglejową wyabsorbowaną nerką powstaje zawsze pasmo precypitacyjne przy zbiorniku z frakcją mielinową. Wydaje się, że jest to wynikiem zanieczyszczeń mieliny komórkami lub fragmentami komórek glejowych. Aby się przekonać w jakim stopniu zanieczyszczenia te mogą wpływać na obraz precypitacji wykonano odczyn z surowicą antyglejową absorbowaną mieliną oczyszczoną (ryc. 8). Absorpcja powoduje zniknięcie niektórych pasm odpowiadających antygenom wspólnym i niewielkie zmniejszenie intensywności pozostałych. Reakcja z nerką jest w dalszym ciągu dodatnia. Oczyszczona mielina nie absorbuje także przeciwciał przeciwko antygenom swoistym — tworzą się pasma przy zbiornikach z mózgiem i frakcją glejową (wskazane na schemacie linią przerywaną). Pozostaje także wyraźnie widoczna, charakterystyczna cienka linia przy zbiorniku z frakcją mielinową (ryc. 9).

OMÓWIENIE

Kilkakrotne wstrzyknięcie królikowi wzbogaconej frakcji glejowej z niepełnym adjuwantem Freund'a powoduje powstanie przeciwciał przeciwko całej grupie antygenów — zarówno gatunkowo- jak i narządowo-swoistych. Frakcja glejowa, jak to stwierdzono poprzednio (Weinrauder i Śmiałek 1974) zawiera zanieczyszczenia naczyniami włosowatymi, które mogą być źródłem antygenów tkankowych wspólnych oraz zaabsorbowanych na ścianach naczyń białek surowicy. Sprawa pochodzenia antygenów gatunkowo swoistych, wykrywanych przez wszystkich autorów, którzy immunizowali zwierzęta homogenatami bądź wyciągami z całych mózgów, nie jest całkowicie jasna. Nie można, jak się wydaje wykluczyć, że antygeny te nie są tylko zanieczyszczeniami pochodzącymi z naczyń

lub tkanki łącznej ale stanowią składnik antygenowy struktur nerwowych. MacPherson i wsp. (1973) stwierdzili występowanie we frakcji mikrosomalnej z mózgu szczura antygenów gatunkowo-swoistych, a MacPherson i Shek (1970) opisali wpływ immunizacji szczurów mikrosomami otrzymanymi z wątroby na procesy uczenia się i treningu tych zwierząt. Występowanie wspólnych antygenów w mielinie i mitochondriach wątroby stwierdzili McMillan i wsp. (1971). Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że antygeny gatunkowo-swoiste są silniejszymi immunogenami — surowica antyglejowa reaguje znacznie silniej z antygenami wspólnymi niż ze swoistymi. Należy wziąć również pod uwagę możliwość występowania antygenów swoistych w bardzo niskich stężeniach.

Próbie immunizacji zwierząt frakcją glejową podjęto, mając na uwadze uzyskanie surowic odpornościowych najbardziej przydatnych do badania antygenów glejowych. Stwierdzono, że surowice takie są znacznie łatwiejsze do absorpcji. Jednorazowa absorpcja nerką była wystarczająca do wyabsorbowania przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom tkankowym wspólnym i antygenom surowicy. Ponadto uodpornianie frakcją nie zawierającą mieliny lub zanieczyszczoną nią w niewielkim stopniu, zmniejsza możliwość powstawania przeciwciał antycerebrozydowych, które jak stwierdzili ostatnio Tremblay i wsp. (1974) mogą reagować z antygenami lipidowymi dając obraz „fałszywego swoistego białka mózgowego”.

Surowica przeciwko homogenatowi pełnego mózgu jest jednak, jak się wydaje, bardziej przydatna w badaniach prowadzonych nad antygenami swoistymi. Należy wszakże wziąć pod uwagę, że okres immunizacji królików pełnym homogenatem był znacznie dłuższy. Wyniki naszych badań, podobnie jak i innych autorów. (Bock i wsp. 1971) wskazują, że liczba tworzących się pasm precypitacyjnych z surowicą odpornościową wzrasta przy przedłużeniu okresu immunizacji do 9 i więcej miesięcy. Nie można również pominąć faktu, że pełny homogenat mózgu, ze względu na wysoką zawartość lipidów może odgrywać rolę dodatkowego adjuwantu. Być może użycie do szczepień adjuwantu kompletnego, zawierającego prątki gruźlicy, zmiana schematu immunizacji i jej przedłużenie wpłynie na zwiększenie „aktywności antyglejowej” surowic odpornościowych.

Absorbowana nerką surowica antyglejowa reaguje z nieoczyszczoną frakcją mielinową. Zagadnienie pokrewieństwa antygenowego mieliny i innych elementów tkanki nerwowej zasługuje na zainteresowanie. W piśmiennictwie spotyka się dane świadczące o występowaniu wspólnych antygenów. Mickey i wsp. (1971) stwierdzili istnienie wspólnych antygenów w mielinie i błonach synaptycznych, a także opisali występowanie pasma elektroforetycznego odpowiadającego mielinie w agre-

gatach błon glejowych niezmielinizowanych mózgow noworodków szczurzych. Możliwość występowania w błonach komórek glejowych antygeny częściowo identycznego z zasadowym białkiem mieliny rozważają Wahlström i wsp. (1973). Używana w naszych badaniach surowica antyglejowa wyabsorbowana nerką reaguje tylko z nieoczyszczoną frakcją mielinową, natomiast nie tworzy linii precipitacyjnej z oczyszczoną mieliną. Absorpcja mieliną oczyszczoną nie usuwa, jak się wydaje, swoistego antygeny glejowego z surowicy odpornościowej. Przy użyciu dotychczas zastosowanych metod nie można wyciągnąć ostatecznych wniosków. Nie można jednak wykluczyć istnienia swoistych antygenów wspólnych dla gleju i mieliny, biorąc pod uwagę proces mielinogenezy i udziału w nim komórek oligodendrogleju.

G. Vайнраудер, M. Смялек

ОБОГАЩЕННАЯ ГЛИЯЛЬНАЯ ФРАКЦИЯ КАК ИММУНОГЕН И АНТИГЕН

Резюме

В работе представлены результаты иммунохимических исследований, проведенных с использованием иммунологической сыворотки, полученной у животных, иммунизированных обогащенной глиальной фракцией из мозга крыс.

В сыворотке иммунизированных животных было обнаружено присутствие антител против специфических видовых, тканевых антигенов, белков сыворотки, а также антител, направленных против глиально-специфического антигена. Этот антиген обнаруживается данной сывороткой как в глиальной фракции, так и в водном экстракте мозга крысы. Антиглиальная сыворотка после абсорбции почкой крысы не образует преципитационных полос с нейрональной фракцией и с очищенным миелином. Присутствие специфического глиального антигена в неочищенной миелиновой фракции, по всей вероятности, вызвано наличием в этой фракции загрязнений глиальными элементами.

H. Weinrauder, M. Smialek

ENRICHED GLIAL CELL FRACTION FROM THE RAT BRAIN AS AN IMMUNOGEN AND ANTIGEN

Summary

The study presents the results of the immunological investigations performed with immune serum from the animals immunized with an enriched glial fraction from the rat brain. In the serum from immunized animals there were found the antibodies against species-specific tissue antigens, against serum proteins and the antibodies against glia-specific antigen. Glial antigen was detected with the serum in the glial cell fraction as well as in the aqueous extract from the rat brain. Antigial serum absorbed with the rat kidney does not form any precipitation bands neither with neuronal fraction nor with the purified myelin. The presence of specific glial antigen in not purified myelin fraction results most probably from the contamination of this fraction with the glial elements.

PIŚMIENICTWO

1. Berg O., Källen B.: An in vitro gliotoxic effect of serum from animals with experimental allergic encephalitis. *Acta path. microbiol. scand.* 1962, 54, 425—433.
2. Blömstrand C., Hamberger A.: Protein turnover in cell-enriched fractions from rabbit brain. *J. Neurochem.* 1969, 16, 1401—1407.
3. Bock E., Møllerup E. T., Rafaelsen O. J.: Antigen-antibody crossed electrophoresis of water soluble rat brain antigens. Production of antibodies and preparation of antigens. *J. Neurochem.* 1971, 18, 2435—2440.
4. Bornstein M. B., Raine C. S.: Experimental Allergic Encephalomyelitis. Antiserum inhibition of myelination in vitro. *Lab. Invest.* 1970, 23, 536—542.
5. Gregson N. A., Kennedy M. C., Leibowitz S.: Immunological reactions with lysolecithin-solubilized myelin. *Immunology* 1971, 20, 501—512.
6. MacPherson C. F. C., Shek R. P. N.: Effect of brain iso-antibodies on learning and memory in the rat. *Exp. Neurol.* 1970, 29, 1—15.
7. MacPherson C. F. C., Shek R. P. N., Pay P.: Immunochemical analysis of rat brain microsomes. *Immunochemistry* 1973, 10, 409—415.
8. McMillan P. N., Mickey D. D., Kaufman B., Day E. D.: The specificity and cross-reactivity of antimyelin antibodies as determined by sequential adsorption analysis. *J. Immunol.* 1971, 107, 1611—1617.
9. Mickey D. D., McMillan P. N., Appel S. H., Day E. D.: The specificity and cross-reactivity of antisynaptosome antibodies as determined by sequential adsorption analysis. *J. Immunol.* 1971, 107, 1599—1610.
10. Ouchterlony Ö.: In vitro method for testing the toxin producing capacity of diptheria bacteria. *Acta path. microbiol. scand.* 1948, 25, 186—191.
11. Tremblay J., Simon M., Barondes S. H.: Cerebroside may be falsely identified as a soluble "brain specific protein". *J. Neurochem.* 1974, 23, 315—318.
12. Wahlström T., Linder E., Saksela E.: Glia-specific antigens in cell cultures from rabbit brain, human foetal and adult brain, and gliomas. *Acta path. microbiol. scand. Section B.* 1973, 81, 768—774.
13. Weinrauder H.: Studies on cat brain antigens. I. Soluble precipitation protein antigens. *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. VI*, 1969, XVII, 423—426.
14. Weinrauder H., Smialek M.: Ocena immunologiczna wzbogaconych frakcji komórkowych z mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 469—476.
15. Weinrauder H., Lach B.: Localization of organ-specific antigens in the nervous system of rat. *Acta Neuropath. w druku.*
16. Weinrauder H., Lach B.: Immunofluorescence studies on the localization of the brain-specific antigen(s) in the central nervous system of the rat. *Proc. VIIth Intern. Congr. Neuropath. Budapest, 1975, 1, 115—118.*

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

JOLANTA FINOWICKA-WALCZYNA

OSOBLIWOŚĆ MORFOLOGII MIĘŚNIA PROSTOWNIKA KRÓTKIEGO PALCÓW STOPY *

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. I. Hausmanowa-Petrusewicz

W latach 1970—1971 McComas i wsp. zakwestionowali przyjęty dotychczas pogląd o pierwotnym uszkodzeniu komórki mięśniowej w dystrofii rzekomoprzerostowej Duchenne'a i dystrofii miotonicznej. W oparciu o wyniki elektrofizjologicznej oceny liczby jednostek ruchowych w obrębie mięśnia prostownika krótkiego palców stopy (*extensor digitorum brevis* — EDB) wysunęli oni hipotezę o neurogennej patogenezie tych schorzeń. Stwierdzili mianowicie obniżenie liczby jednostek ruchowych u pacjentów z wyżej wymienionymi schorzeniami w porównaniu z osobnikami zdrowymi.

Wyłoniło się pytanie, czy wyniki wyżej wymienionych autorów nie są spowodowane jakąś osobliwością tego mięśnia, dlatego też wydaje się ważnym jego dokładne przebadanie histologiczne i histochemiczne. Wycinki z EDB nigdy nie były pobierane przyżyciowo, jednakże w oparciu o doniesienia Susheeli i Waltona (1969) okazało się, że materiał autopsyjny również pozwala na histochemiczne przebadanie mięśnia; zróżnicowanie włókien mięśniowych na typy jest najwyraźniej widoczne przy oznaczaniu aktywności ATP-azy miofibrylarnej.

Celem obecnej pracy jest morfologiczna ocena EDB pobranego od osób bez objawów uszkodzenia układu nerwowo-mięśniowego i wykazanie, czy jego budowa histologiczna jest podobna do innych przebadanych uprzednio mięśni szkieletowych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał sekcyjny pochodził od 13 osobników płci męskiej w wieku 9—65 lat, u których zgon nastąpił nagle. Przyczyną śmierci był w 4

* Praca wykonana w ramach umowy polsko-amerykańskiej z NIH, Bethesda nr 05-002-1.

przypadkach zawał serca, w 3 — stłuczenie pnia mózgu, w 2 — zator tętnicy płucnej, a ponadto (po 1 przypadku) wylew podpajęczynówkowy, zatrucie tlenkiem węgla, pęknięcie tętniaka rozwarstwiającego aorty, zadzierzgnięcie. Dostępna dokumentacja lekarska, dotycząca tych zmarłych (kliniczne historie chorób, wyniki badania anatomopatologicznego) pozwoliła z dużym prawdopodobieństwem na wyłączenie schorzeń układu nerwowo-mięśniowego, a także przewlekłych schorzeń ogólnoustrojowych.

Wycinki pobrano ze środkowej części wspólnego brzuśca EDB. Podstawowe dane anatomiczne EDB przedstawiają się następująco: mięsień ten położony jest w obrębie bocznej części grzbietu stopy, spoczywa bezpośrednio na kościach śródstopia i przykryty jest częściowo przez ścięgna prostownika długiego palców. Cienki i płaski brzusiec rozpoczyna się na kości piętowej i po krótkim przebiegu (± 2 cm) dzieli się zwykle na 3 części, które następnie przechodzą w ścięgna dla 2, 3 i 4 palca stopy. Przebiegający przyśrodkowo prostownik krótki palucha uważany jest z reguły za odrębny mięsień. Palec piąty otrzymuje swe krótkie ścięgno prostujące z mięśnia strzałkowego krótkiego. EDB unerwiony jest przez gałązkę nerwu strzałkowego głębokiego. Gałązka ta dzieli się na 2—3 części, które wnikają do EDB od strony jego tylno-dolnej powierzchni. Lambert (1969) opisał niestałą (w 20%) gałązkę ruchową od nerwu strzałkowego powierzchniowego, biegnącą do bocznej krawędzi tego mięśnia. W dwóch przypadkach (nr 8 i 9) pobrano jednocześnie z tej samej nogi wycinek z mięśnia piszczelowego przedniego, który jest, jak wiadomo również zaopatrywany przez gałązkę nerwu strzałkowego głębokiego.

Materiał pobierano w okresie do 24 godzin po zgonie ze względu na ograniczony czas utrzymywania się aktywności ATP-azy miofibrylarnej. Wycinki zamrażano w izopentanie, chłodzonym suchym lodem, a następnie krojono w kriostacie w temperaturze -23°C na skrawki o grubości $10\ \mu$, prostopadle do przebiegu włókien mięśniowych. Część skrawków z każdego wycinka barwiono hematoksyliną-eozyną (H—E) oraz metodą van Gieson, a w pozostałych oznaczano aktywność ATP-azy miofibrylarnej, zarówno w środowisku zasadowym o pH 9,4 (Padykula, Herman, 1955), jak i po preinkubacji kwaśnej w środowisku $10\ \text{mM}$ EDTA o pH 4,3.

W skrawkach barwionych HE i metodą van Gieson oceniano średnicę włókien mięśniowych oraz wzajemny układ w preparacie włókien zanikłych i przerosłych (rozproszenie ich w preparacie lub zgrupowanie w pęczki). Oceniano też strukturę poszczególnych włókien mięśniowych. Z preparatów histochemicznych wykonano zdjęcia fotograficzne o powiększeniu $120\times$. Na ich podstawie oceniano rozkład włókien poszczególnych typów histochemicznych, liczone maksymalną liczbę jednolitych

histochemicznie włókien leżących obok siebie oraz rozpatrywano, jakiego typu włókna ulegają w danym preparacie zanikowi, szczególnie zanikowi pęczkowemu. Z każdego wycinka następnie wykonano histogramy 1000 leżących obok siebie włókien mięśniowych z uwzględnieniem ich typu histochemicznego. W przypadku nr 11 rozpatrywano tylko 720 włókien (gdyż pozostałe włókna w preparacie zostały przekrojone zbyt skośnie). Jako średnicę pojedynczego włókna mięśniowego przyjmowano średnią wartość najdłuższego i najkrótszego wymiaru włókna, przechodzącego przez jego środek, w płaszczyźnie prostopadłej do jego podłużnego przebiegu.

Histogramy wykonano na podstawie zdjęć z preparatów, w których oznaczano aktywność ATP-azy po preinkubacji kwaśnej, gdyż w tej właśnie metodzie wyraźnie zaznaczają się obok włókien I i II typu również włókna pośrednie. W badaniu tym włókna typu I wykazują dużą aktywność ATP-azy, a włókna typu II — małą.

WYNIKI

Makroskopowo stwierdzono, że grubość EDB wahała się w dość znacznych granicach: u młodych osób (przypadek nr 2 i 3) dochodziła ona do 12 mm, brzusiec mięśnia był wtedy wyraźnie widoczny przez skórę. Natomiast u osób powyżej 50 roku życia dość często obserwowaliśmy zmniejszenie się pionowego wymiaru mięśnia do 5—7 mm. Podobnym wahaniom podlegał wymiar boczno-przyśrodkowy. Długość mięśnia była względnie stała i wynosiła około 7—8 cm. Badaniem histologicznym (Tabela 1) w 10 na 13 przebadanych przypadków stwierdzono zanik włókien mięśniowych z tym, że wyraźne grupowanie zanikłych włókien w pęczki obserwowano w 7 przypadkach, a włókna o mniejszej średnicy rozrzucone między prawidłowymi włóknami — w 3 przypadkach. Włókna przerosłe znaleziono w 7 przypadkach, najczęściej były one pojedyncze i leżały rozrzucone w preparacie, rzadziej grupowały się w pęczki.

Zmiany zwyrodnieniowe były niezbyt nasilone, najczęściej dotyczyły włókien przerosłych i miały zwykle charakter szkliwienia, rzadziej rozszczepienia się włókien. Włókna przerosłe traciły swój prawidłowy wieloboczny kształt, stawały się okrągłe lub owalne. W kilku przypadkach stwierdzono nieliczne włókna z centralnie położonymi jądrami. W 2 przypadkach (nr 8 i 10) obserwowano pojedyncze włókna okrężne.

Włókna zanikłe wykazywały bardziej wielokątny kształt lub były to (w bardziej nasilonych zmianach) jedynie grupy jąder otoczonych sarkolemą. Włókna te miały z reguły ciemne, pyknotyczne jądra, czasami stwierdzano rozpad włókien. Innych zmian wstecznych w nich nie stwierdzono.

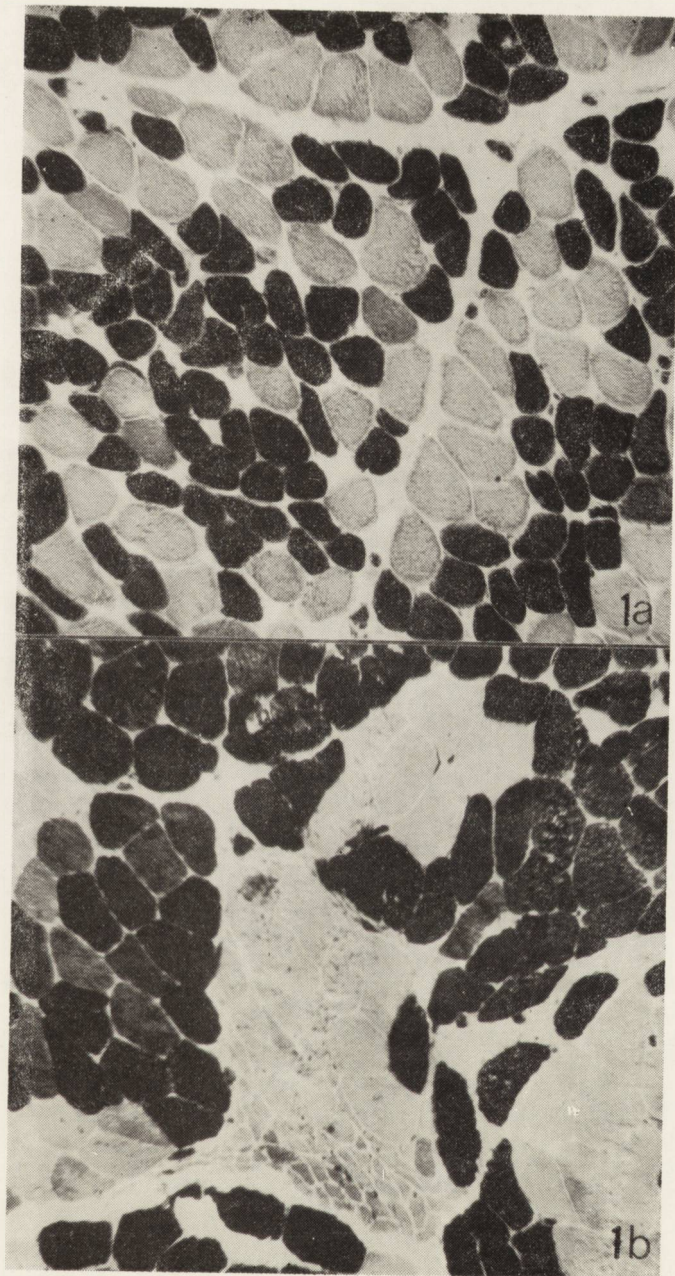
Tabela 1. Badania histologiczne i histochemiczne mięśnia EDB
 Table 1. Histological and histochemical examination of EDB muscle

Nu- mer Num- ber	Wiek Age	Włókna I typu Type I fibres %	Włókna II typu Type II fibres %	Włókna pośrednie Intermediate fibres %	Układ zanik- łych włókien Atrophy pattern	Typ zanik- łych włókien Type of atro- phic fibres	Włókna przerosłe Hypertroph. fibres	Układ mo- zaikowy Mosaic pattern	Grupowanie Type group- ing	Największa liczba włókien w grupie Maximal number of grouped fibres
1	9	41,0	57,5	1,5	—	—	—	+	—	15
2	28	32,6	67,4	—	p ^x	II	—	+	—	17
3	35	38,0	62,0	—	p	II	—	—	+	105
4	36	57,4	32,6	—	—	—	—	—	+	200
5	40	39,1	38,4	22,5	r ^{xx}	I + pośr. I + inter- mediate	—	+	+	19
6	45	80,4	16,5	3,1	r	I	+	+	+	30
7	50	40,6	59,4	—	p	II	—	+	+	30
8	51	50,5	49,5	—	p	I	+	—	+	300
9	53	33,5	56,6	9,9	p	II	+	—	+	70
10	57	52,5	41,9	5,6	p	I	+	—	+	40
11	60	ujednolicenie aktywności enzymatycznej — uniform enzymatic activity			p	pośredni intermediate	+	ujednolicenie aktywności enzymatycznej — uniform enzymatic activity		—
12	60	50,6	49,4	—	—	—	+	—	+	40
13	65	15,1	82,8	2,1	r	II	+	—	+	X ^x

x_p — włókna zanikłe skupione w pęczki
 atrophic fibres grouped in bundles

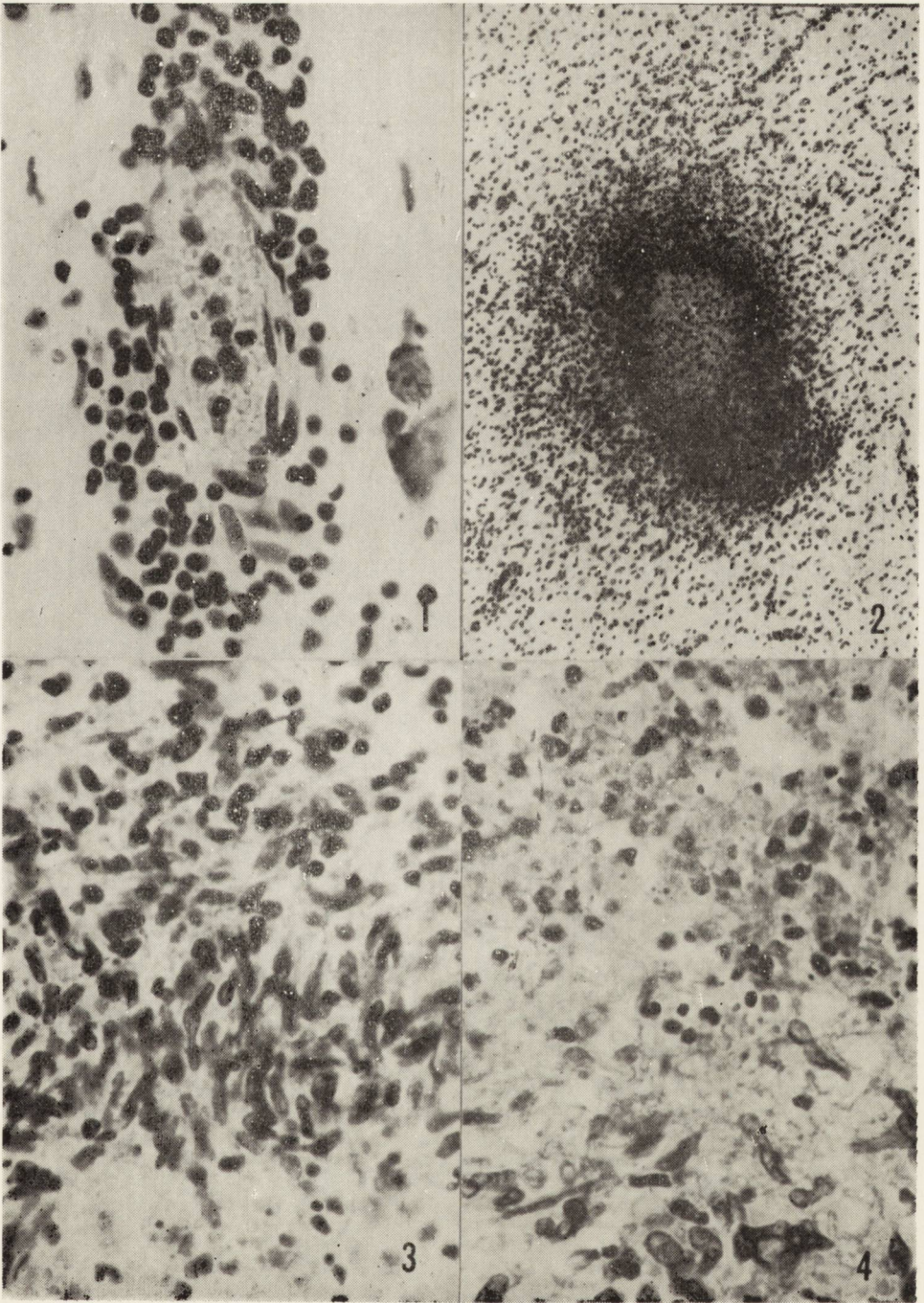
xx_r — włókna zanikłe rozproszone w preparacie
 atrophic fibres dispersed

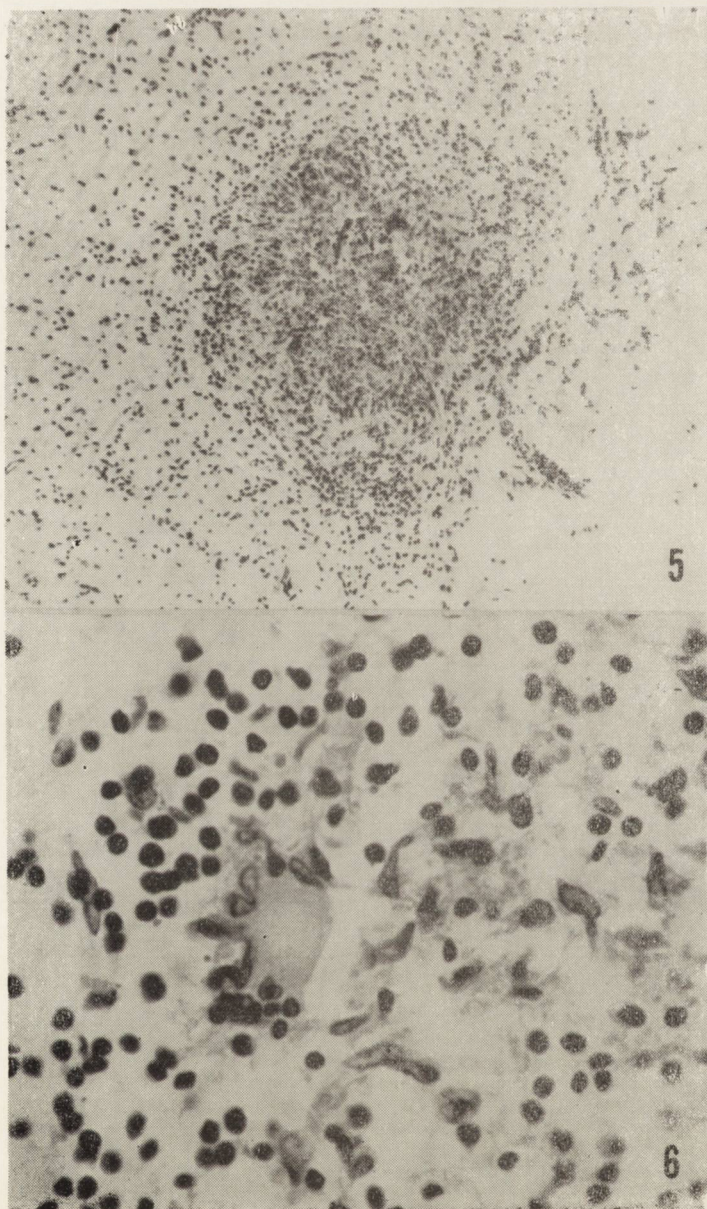
xx — na tle włókien II typu, grupy I po 60—100 włókien
 large groups of type I fibres on the background of type II fibres



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez EDB. Aktywność adenzynotrójfosfatazy miofibrylarnej po preinkubacji kwaśnej Pow. 120 ×. a. Przypadek nr 5: niewielkie zgrupowania włókien jednolitych histochemicznie na tle mozaikowego układu włókien poszczególnych typów. b. Przypadek nr 3: grupowanie włókien jednolitych histochemicznie. Włókna zanikłe skupione w pęczki.

Fig. 1. Cross section of EDB. Myofibrillary ATP-ase activity after acid preincubation. × 120. a. Case No 5: Grouping of muscle fibres showing the same intensity of enzyme activity and normal mosaic pattern of particular types of muscle fibres. b. Case No 3: Grouping of muscle fibres showing the same intensity of enzyme activity. Atrophic fibres arranged in bundles.

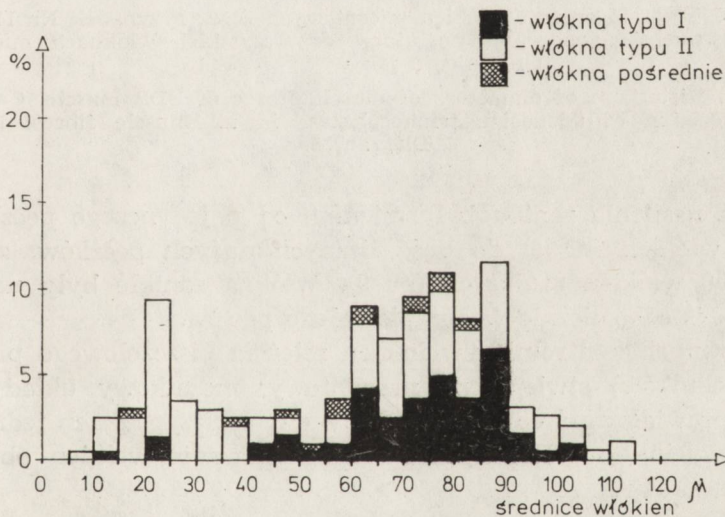




Badaniem histochemicznym stwierdzono prawidłowy, mozaikowy układ włókien obu typów w 5 przypadkach, jednakże w 3 spośród nich na tle mozaiki występowały pojedyncze grupy włókien, jednolitych histochemicznie (ryc. 1a). W przypadku nr 11 nie stwierdzono wyraźnego zróżnicowania włókien na typy (ryc. 1b). W pozostałych 7 przypadkach dominowały w preparacie duże grupy włókien zarówno I jak i II typu. Szczególnie duże skupienie jednolitych włókien obserwowano w przypadkach nr 3, 4, 8, a zwłaszcza nr 13, gdzie na tle ogromnych grup włókien typu II (do 500—600) widoczne były mniej liczne grupy włókien typu I, obejmujące około 80—90 włókien.

Porównując ogólną liczbę włókien poszczególnych typów w przebadanych wycinkach stwierdzono, że w 6 przypadkach włókna typu II były liczniejsze niż typu I, w 4 przypadkach liczba włókien obu typów była podobna, w 2 przypadkach przeważały włókna typu I.

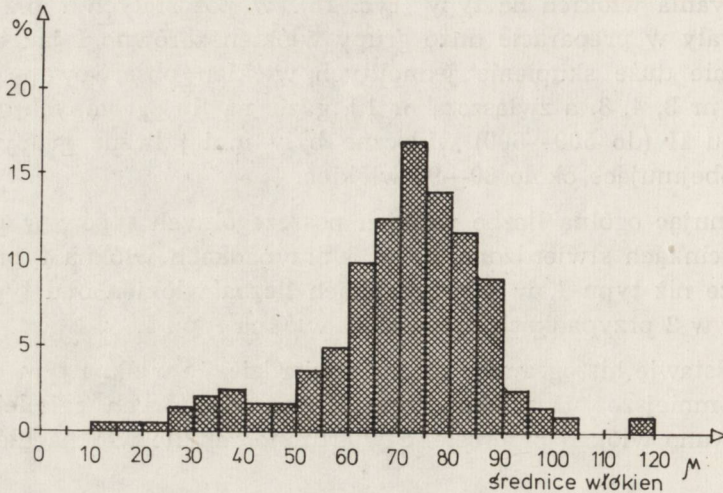
Na podstawie histogramów można stwierdzić, że włókna typu I z reguły były mniejsze niż włókna typu II, wśród których z kolei częściej obserwowano włókna przerosłe. Stwierdzono zanikłe włókna głównie ty-



Wykres 1. Histogram średnic włókien mięśniowych EDB. Przypadek Nr 9. Włókna mięśniowe prawidłowo zróżnicowane histochemicznie na typy w zależności od aktywności adenosynotryfosfatazy po preinkubacji kwaśnej. Słupki kratkowane oznaczają aktywność włókien pośrednich, słupki czarne — aktywność włókien typu I, słupki białe — aktywność włókien typu II.

Diagram 1. Histogram of diameters of muscle fibres of EDB muscle. Case No 9. Muscle fibres normally differentiated into histochemical types depending on adenosine triphosphatase activity after acid preincubation. Checkered columns indicate the activity of intermediate fibres, black columns — activity of type I fibres, white columns — type II fibres.

pu I w 4 przypadkach, a typu II — w 5 przypadkach (wykres 1.). W przypadku nr 11 nie można było ocenić, jakiego typu włókna zanikają ze względu na ujednoczenie aktywności enzymatycznej (wykres 2.).



Wykres 2. Histogram średnic włókien mięśniowych EDB. Przypadek Nr 11. Ujednoczenie aktywności adenozynotrójfosfatazy we wszystkich włóknach mięśniowych. Objaśnienie jak w wykresie 1.

Diagram 2. Histogram of diameters of muscle fibres of EDB muscle. Case No 11. Uniform reaction of adenosine triphosphatase in all muscle fibres. Legend in Diagram 1.

Stopień nasilenia zaniku był zmienny, od pojedynczego pęczka liczącego 12 włókien (nr 3) do dość licznych dużych pęczków, złożonych z około 50 włókien zanikłych (nr 9). Włókna zanikłe były najczęściej jednolite histochemicznie w obrębie całego pęczka.

W pobranych kontrolnie wycinkach mięśnia piszczelowego przedniego (od 2 osobników) stwierdzono prawidłowy, mozaikowy układ włókien oraz ich prawidłową średnicę. W obydwu tych przypadkach jednocześnie pobrane wycinki z EDB wykazywały grupowanie włókien obu typów i zanik pęczkowy.

OMÓWIENIE

Klasycznym histologicznym objawem uszkodzenia neurogennego jest zanik pęczkowy włókien mięśniowych. Wg Edstöma i Kugelberga (1968) jednostka ruchowa jest jednorodna pod względem metabolicznego charakteru włókien mięśniowych. Typowy układ mozaikowy na przekroju poprzecznym mięśnia wynika z faktu przemieszania się włókien, należą-

cych do kilku sąsiednich jednostek. Engel (1965) twierdzi, że największa liczba włókien tego samego typu, leżących obok siebie wynosi w warunkach fizjologicznych 15—25.

Uszkodzenie neuronu obwodowego prowadzi do odnerwienia włókien mięśniowych należących do danej jednostki ruchowej. Sąsiednie nieuszkodzone aksony przejmują zadanie reinerwacji, zwiększając w ten sposób terytorium własnej jednostki. Wzrasta wtedy prawdopodobieństwo wystąpienia dużej grupy włókien jednolitych histochemicznie, ponieważ reinerwowane włókna mięśniowe uzyskują aktywność enzymatyczną typową dla reinerwującej jednostki (Dubowitz 1970). Reinerwacja wyraża się więc grupowaniem włókien tego samego typu (Engel 1970). W wypadku ponownego odnerwienia takiej powiększonej grupy włókien mięśniowych dochodzi do zaniku grupowego.

W przebadanym materiale zwraca uwagę fakt, że u wszystkich osobników z wyjątkiem najmłodszego, 9-letniego spotyka się zaznaczone w większym lub mniejszym stopniu takie objawy uszkodzenia neurogennego, jak zanik pęczkowy, grupowanie włókien, dość dużą liczbę włókien pośrednich oraz w jednym przypadku ujednoczenie aktywności enzymatycznej włókien mięśniowych. Obecność włókien przerosłych oraz włókien z dyskretnymi zmianami strukturalnymi, a także (w niektórych przypadkach) rozproszenie włókien zanikłych wśród włókien prawidłowej szerokości to zasadniczo cechy uszkodzenia pierwotnie mięśniowego, chociaż wiadomo, że obraz taki widuje się także w przewlekłe postępujących procesach neurogennych.

Obraz histologiczny i histochemiczny EDB mógłby więc świadczyć o toczących się w tym mięśniu procesach odnerwienia i reinerwacji nawet u osobników bez innych cech uszkodzenia układu nerwowo-mięśniowego. Stanowi to pewną odrębność w porównaniu z innymi mięśniami. Zastanawiano się nad przyczyną tej morfologicznej osobliwości EDB. W grę może wchodzić między innymi ucisk włókien nerwowych przez elementy łącznotkankowe w obrębie stopy. Na sekcji często zwracano uwagę na uciśnięcie nerwu przez naciągnięte ścięgna prostownika długiego palców stopy, jak również przez nadmiernie pogrubiały troczek prostowników, który jest częścią aparatu powięziowego na wysokości stawu skokowego. Nasuwałaby się tu analogia z zespołem cieśni nadgarstka (Johnson i wsp., 1973).

Należy wziąć również pod uwagę możliwość niewygodnego obuwia jako przyczyny przewlekłych mikrourazów włókien nerwowych, zaopatrujących EDB. Możliwością istnienia takich właśnie mikrourazów tłumaczyli Gairns i wsp. (1960) mniejszą gęstość włókien mielinowych w zakończeniach nerwowych w obrębie palucha w porównaniu z podobnymi nerwami w pozostałych palcach stopy.

Zbliżone dane dotyczące morfologii EDB podali wcześniej Jennekens i wsp. (1971, 1972) oraz Johnson i wsp. (1973). Stwierdzili oni, że w mięśni tym nawet u osób młodych dość często spotykany jest duży rozrzut średnicy włókien oraz zanik pęczkowy i grupowanie włókien jednolitych histochemicznie w skupienia liczące 60—100 włókien mięśniowych. Zmian takich nie obserwowano w innych mięśniach szkieletowych. U ludzi starszych (60—90 lat) pojawiały się wprawdzie podobne zmiany również w niektórych innych mięśniach, jednakże były one znacznie mniej nasilone niż w EDB w tym samym wieku.

W naszym materiale, podobnie jak w przytoczonych powyżej doniesieniach, istnieje tendencja do nasilania się zmian w EDB wraz z wiekiem (u dwóch najmłodszych osobników obserwowano wyłącznie układ mozaikowy bez grupowania, najmłodszy osobnik nie miał również włókien zanikłych).

Zarówno wymienione powyżej prace morfologiczne, jak i elektrofizjologiczne (Roselle, Stevens, 1973) wykazują, że prawie w każdym wieku, z wyjątkiem najwcześniejszych lat życia, w EDB pojawiają się cechy typowe dla uszkodzenia neurogennego. Wobec tego McComas i wsp. chyba niezbyt trafnie wybrali ten właśnie mięsień do badań nad ewentualną neuralną patogenezą niektórych schorzeń uważanych dotychczas za pierwotnie mięśniowe.

Przeprowadzone badania wskazują, że w mięśni EDB stwierdza się znacznie częściej niż w innych mięśniach zmiany świadczące o uszkodzeniu neurogennym. Zmiany te wyrażają się przede wszystkim obecnością zanikłych włókien mięśniowych, zwykle grupujących się w pęczki oraz skupianiem się włókien jednolitych histochemicznie. Na uwagę zasługuje fakt, że zmiany powyższe widoczne są nie tylko u osobników starszych, ale i u młodych. W mechanizmie powstania tych zmian zasadniczą rolę odgrywają, jak się wydaje, czynniki miejscowe.

И. Финовичка-Вальчина

ОСОБЕННОСТЬ МОРФОЛОГИИ КОРОТКОГО РАЗГИБАТЕЛЯ СТОПЫ

Резюме

У 15 лиц, внезапно скончавшихся, брались вырезки короткого разгибателя пальцев стопы (EDB). Препараты окрашивались гематоксилином у эозинном и по методу Ван Гисона, а также определялась активность мисфибриллярной АТФ-азы. В 10 случаях была обнаружена атрофия мышечных волокон (в 7 случаях это была пучковая атрофия). При гистохимическом исследовании правильное мозаичное расположение волокон обоих типов было обнаружено лишь в 2 случаях, в остальных в меньшей или в большей степени наблюдалось

группирование гистохимически однородных волокон. Гистологическое и гистохимическое исследование берцовой передней мышцы (у 2 из этих 13 лиц) не выявило отклонений от нормы.

J. Finowicka-Walczyńska

PECULIAR MORPHOLOGY OF THE MUSCULUS EXTENSOR DIGITORUM BREVIS

Summary

Specimens from the extensor digitorum brevis (EDB) muscle were obtained from 13 individuals who died suddenly and did not suffer from neuromuscular diseases. The material was stained with hematoxylin-eosin and according to van Gieson method; the activity of myofibrillary adenosinetriphosphatase (ATP) was investigated. In 10 cases muscle fibres atrophy was seen (in 7 cases it was bundles atrophy). Histochemical examination showed normal chessboard pattern of two types of muscle fibres only in 2 cases. In 10 cases it was seen to greater or lesser degree the grouping of muscle fibres showing the same intensity of enzymatic activity. Histological and histochemical examination of tibial anterior muscle taken from 2 of those 13 individuals was normal.

PISMIENICTWO

1. Dubowitz V.: The role of chemistry in muscle diseases. W: D. Williams (Ed.) "Modern Trends in Neurology", vol. 5, Butterworths London, 1970.
2. Edström L., Kugelberg E.: Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle in rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1968, 31, 424—433.
3. Engel W. K.: Histochemistry of neuromuscular diseases, significance of muscle fibre types. In: "Proceedings of the 8th International Congress of Neurology, Vienna, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie 1965, 67—74.
4. Engel W. K.: Selective and nonselective susceptibility of muscle fibre types. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1970, 22, 97—117.
5. Cairns F. W., Garven H. S. D., Smith G.: The digital nerves and the nerve endings in progressive obliterating vascular disease of the leg. *Scott. Med. J.*, 1960, 5, 382—391.
6. Jennekens F. G. I., Tomlinson B. E., Walton J. N.: Data on the distribution of fibre types in five human muscles. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, 1971, 14, 245—257.
7. Jennekens F. G. I., Tomlinson B. E., Walton J. N.: Histochemical aspects of five muscles in old age. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, 1971, 14, 259—276.
8. Jennekens F. G. I., Tomlinson B. E., Walton J. N.: The sizes of the two histochemical fibre types in five limb muscles in man. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, 1971, 13, 281—292.
9. Jennekens F. G. I., Tomlinson B. E., Walton J. N.: The extensor digitorum brevis: histological and histochemical aspects. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1972, 35, 124—132.

10. Johnson M. A., Polgar J., Weightman D., Appletown D.: Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 18, 111—128.
11. McComas A. J., Campbell M. J., Sica R. E. P.: Electrophysiological study of dystrophia myotonica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 132—139.
12. McComas A. J., Fawcett P. R. W., Campbell M. J., Sica R. E. P.: Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 121—131.
13. McComas A. J., Sica R. E. P., Currie S.: Muscular dystrophy evidence for a neural factor. *Nature*, 1970, 226, 1263.
14. McComas A. J., Sica R. E. P., Campbell M. J.: Functional compensation in partially denervated muscles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 456.
15. Padykula H., Herman E.: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, 3, 170—183.
16. Roselle N., Stevens A.: Unexpected incidence of neurogenic atrophy of the ED3 muscle in young normal adults. W: *New developments in electromyography and clinical neurophysiology*. red. J. E. Desmedt, Karger, Basel, 1973, vol. 1.
17. Susheela A. K., Walton J. N.: Note on the distribution of histochemical fibre types in some normal human muscles; a study on autopsy material. *J. Neurol. Sci.*, 1969, 8, 201—207.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 6.

JERZY KULCZYCKI, CEZARY FRYZE

PRZYPADEK SARKOIDOZY UKŁADU NERWOWEGO ZE SZCZEGÓLNYM ZAJĘCIEM RDZENIA KRĘGOWEGO

Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik: prof. dr med. M. Jarema

Obraz kliniczny sarkoidozy układu nerwowego (UN) zależy od bardzo wielu różnych czynników. Istotne znaczenie ma umiejscowienie i stosunek ziarniny sarkoidowej do tkanki nerwowej, tj. czy proces rozwija się naciekając opony, tkankę nerwową lub naczynia, czy uciskając tkankę nerwową lub naczynia. Jeżeli nacieki ziarninowe rozwijają się w kilku miejscach UN, znajduje to swoje odzwierciedlenie w bogatszej symptomatologii klinicznej. Wydaje się, że pewne objawy neurologiczne zależą od wpływów toksycznych lub niedomogi niektórych narządów wewnętrznych, w których toczy się proces chorobowy. Wymienione czynniki dały podstawę do wyodrębnienia różnych zespołów klinicznych sarkoidozy UN, których wiele opublikowano od czasu pierwszego opisu przez polskich autorów Lenartowicza i Rotfelda w 1930 r. Jedne z nich występują często, inne zdarzają się sporadycznie. Przypadek obserwowany w naszej Klinice pod wieloma względami odbiega od opisywanych w piśmiennictwie.

OPIS PRZYPADKU

Chory M. W., lat 18 (nr h. ch. 381/73) został przyjęty do Kliniki z powodu niedowładu kończyn dolnych. Osłabienie kończyn pojawiło się przed tygodniem, początkowo dotyczyło stóp, stopniowo obejmując inne odcinki kończyn. W 3 dni później zaczęły słabnąć kończyny górne. Z wywiadu oraz bogatej dokumentacji lekarskiej wiadomo, że chory od 3-go roku życia leczył się z powodu sarkoidozy. Rozpoznanie zostało ustalone w 1965 roku na podstawie histopatologicznego badania węzła chłonno-

szy podczas pobytu chorego w Instytucie Reumatologii w Warszawie. Stwierdzono wówczas typowe zmiany w płucach, w skórze oraz objawy zapalenia stawów, zapalenia błony naczyniowej oczu oraz powiększenie wątroby i śledziony. Od początku leczony był glikokortykoidami. Stosunkowo wcześniej ustąpiły zmiany skórno-stawowe, następnie cofnęły się zmiany w płucach. Utrzymywało się powiększenie wątroby i śledziony oraz zmiany oczne. Próby odstawienia hormonów powodowały zaostrzenie procesu chorobowego, które manifestowało się występowaniem zmian ocznych, skórno-stawowych, płucnych. Jednocześnie wzrastały biochemiczne wykładniki procesu zapalnego. Ze względu na nasilenie się zmian ocznych od 1970 roku obok leczenia hormonalnego podawano również środki immunosupresyjne (immuran i purinetol), a w 1971 roku usunięto prawą gałkę oczną. W kilka tygodni po zabiegu nastąpiła remisja i od tego czasu pacjent otrzymywał tylko podtrzymujące dawki encortonu. Czuł się dobrze, a kontrolne badania dodatkowe wykazywały tylko nieznaczny wzrost wskaźników procesu zapalnego.

Do Kliniki Neurologii przyjęty był w stanie ogólnym dosyć dobrym. Chory był budowy drobnej, infantylnej (wzrost 146 cm), ale o zachowanych proporcjach ciała. W narządach wewnętrznych poza powiększeniem wątroby oraz śledziony odchyień nie wykryto. W stanie neurologicznym stwierdzono osłabienie ostrości wzroku lewego oka ($V = 0,6$) oraz niedowład spastyczny wszystkich kończyn, bardziej wyrażony w kończynach dolnych, bez zaburzeń czucia. Z wykonanych badań dodatkowych na uwagę zasługuje badanie krwi, a mianowicie Hb 52%, krwinki czerwone 3.600.000, krwinki białe 15.530, OB 76/108 mm, obraz Schillinga: wielojądrzaste 83%, limfocyty 15%, monocyty 2% oraz płyn mózgowo-rdzeniowy: ciśnienie 180/140 mm H₂O, próba Queckenstedta i Stookey'a

Ryc. 1. Naciek limfocytarny wokół małego naczynia tętniczego w opuszcze. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 1. Lymphocytic infiltration around the small, bulbar arterial vessel. Cresyl violet. × 400.

Ryc. 2. Gruzełek o dużym zagęszczeniu elementów komórkowych w płacie skroniowym. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×.

Fig. 2. Densely cellular granulomatous nodule in the temporal lobe. Cresyl violet. × 100.

Ryc. 3. Fragment strefy komórek nabłonkowatych gruzelka sarkoidozy. Centralna część gruzelka w dolnej części ryciny. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 3. The zone of the epithelioid cells of the sarcoid granulomatous nodule. Central part of the nodule in lower part. Cresyl violet. × 400.

Ryc. 4. Martwica skrzepowa w środkowej części gruzelka. W dolnej części ryciny pojedyncze komórki nabłonkowate. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 4. Coagulation necrosis in the centre of the granulomatous nodule. A few epithelioid cells in lower part. Cresyl violet. × 400.

prawidłowe. Białko 100 mg%, cytoza 4 limf./1 mm³. Osad płynu badany metodą Sayka: granulocyty obojętnochłonne 34%, komórki limfocytarne 16%, monocyty 50% — w tym liczne formy przejściowe. Elektroforeza płynu mózgowo-rdzeniowego: białko 6,44 g%, frakcje białkowe: albuminy 59,50%, globuliny alfa₁ 5,40%, alfa₂ 9,10%, beta 11,50%, gamma 14,50%.

Od początku pobytu pacjent otrzymywał duże dawki encortonu oraz środki objawowe i antybiotyki. Niedowład kończyn narastał. W 16-tym dniu pobytu nagle wystąpiła duszność i mimo reanimacji chory zmarł wśród objawów obrzęku płuc i objawów niewydolności krążenia.

Wynik badania anatomo-patologicznego: *morbis basalis: Sarcoidosis (secundum informationem clinici). Causa mortis: Oedema pulmonum. Foci calcificati multiplices pulmonum (et renum). Oedema pulmonum. Bronchopneumonia incipiens ambilateralis. Amyloidosis hepatis et renum et lienis et lymphonodorum colli. Status post enucleationem bulbi oculi dextri olim factam. Inanitio.*

Sekcja mózgu makroskopowo nie wykazała odchyień. Na przekrojach rdzenia kręgowego na różnych wysokościach rysunek istoty szarej był niewyraźny, istota biała miejscami o różowo-szarym zabarwieniu. Do badania mikroskopowego pobrano liczne wycinki ze wszystkich płatów mózgu, jąder podstawy, pnia mózgu, mózdzku oraz z odcinka szyjnego, piersiowego, lędźwiowego i krzyżowego rdzenia kręgowego. Materiał utrwalono w formalinie, skrawki parafinowe barwiono H-E, fioletem krezyłu, wg metody van Gieson, Heidenhaina, Holzera (w modyfikacji Kanzlera Arendta) oraz Ziehl-Neelsena.

W preparatach z mózgowia stwierdzono miernego stopnia obrzęk tkanki nerwowej i tendencję do tworzenia się leukocytarnych zakrzepów w świetle naczyń kory i istoty białej. Dookoła licznych naczyń krwionośnych, głównie w płatach skroniowych i pniu mózgu znajdowały się nacieki składające się z komórek limfoidalnych o różnym stopniu zagęszczenia (ryc. 1). Ściany rogów dolnych komór bocznych wykazywały pojedyncze grudki rozplemu wyściółki i gleju podwyściółkowego. W mór-

Ryc. 5. Gruzełek o miernym zagęszczeniu komórek w powrózku bocznym rdzenia kręgowego. Nacieki limfocytarne w przylegającej oponie miękkiej. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×.

Fig. 5. Granulomatous nodule of moderate cellular density in funiculus lateralis of the spinal cord. Lymphocytic infiltrations in adherent pia mater. Cresyl violet. × 100.

Ryc. 6. Luźno utkany gruzełek w rdzeniu kręgowym. Obok limfocytów i komórek nabłonkowatych komórka olbrzymia typu Langhansa. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 6. Loosely cellular nodule in the spinal cord. Besides lymphocytes and epithelioid cells one giant cell of Langhans type. Cresyl violet. × 400.

gu jedynie w korze amonalnej znaleziono ognisko nacieku komórkowego pod postacią gruzelka średnicy ok. 800 mikronów, utworzonego z pierścienia gęsto leżących komórek nabłonkowatych i otaczających je szeroką warstwą limfocytów. Centrum gruzelka wypełniały masy martwiczo zmienionej tkanki z niewielką ilością granulocytów obojętnochłonnych (ryc. 2, 3, 4). W obrębie rdzenia przedłużonego natrafiono na dwa podobne gruzelki umiejscowione 3—4 mm pod dnem komory IV. W rdzeniu kręgowym ilość gruzelków była tak znaczna, że stwierdzano je w każdym niemal wycinku pobranym do badania. Nierzadko w płaszczyźnie jednego przekroju poprzecznego rdzenia natrafiano na 2—3 gruzelki. Były one najczęściej zlokalizowane w sznurach istoty białej, w głębi lub bezpośrednio pod oponą miękką (ryc. 5). Zazwyczaj nie wykazywały tak dużego zagęszczenia komórek nabłonkowatych jak opisane wyżej ognisko w płacie skroniowym i miały również tendencję do rozpadu w części środkowej. Poza masami martwiczymi niektóre gruzelki zawierały 1—3 komórki olbrzymie typu Langhansa (ryc. 6). Preparaty barwione metodą Kanzlera-Arendta nie wykazywały wyraźnego udziału astrogleju w budowie gruzelków, ani znacniejszego odczynu w ich otoczeniu. Nie udało się stwierdzić w żadnym z preparatów obecności prątków kwasoodpornych.

OMÓWIENIE

W opisanym przypadku zarówno przebieg kliniczny, jak i badanie neuropatologiczne pozwalają na rozpoznanie sarkoidozy. Potwierdza to również badanie bakteriologiczne, które nie ujawniło obecności prątków gruźlicy w żadnym z badanych wycinków tkanek. Nasza obserwacja kliniczna potwierdza zdanie niektórych autorów (Szemraj, Burchard 1966; Douglas, Maloney 1973; Hulanicka 1974), że zajęcie w tym schorzeniu O.U.N. wybitnie pogarsza rokowanie, w odróżnieniu od przypadków, w których sarkoidoza uszkadza jedynie nerwy obwodowe (Wiedersholt, Siekert 1965; Cendrowski 1966; Rinne 1967; Douglas, Maloney 1973; Hulanicka 1974). Zwraca uwagę fakt, że u naszego pacjenta zespół objawów neurologicznych rozwinął się dopiero po 15 latach trwania choroby, a ostatnie 3 lata były okresem remisji, w czasie której stosowano podtrzymujące dawki encortonu. Od chwili stwierdzenia pierwszych objawów ze strony O.U.N. postęp schorzenia był bardzo szybki, mimo stosowania intensywnego leczenia. Musimy przyjąć, że był on związany z ogniskami sarkoidozy w O.U.N., ponieważ szczegółowe badanie anatomo-patologiczne nie wykazało zmian w innych narządach, wystarczających do potwierdzenia rozpoznania klinicznego.

Rdzeniowa postać sarkoidozy występuje bardzo rzadko. W materiale Hulanickiej i Niewiadomskiej (1974) wśród 16 przypadków sarkoidozy

U.N. tylko u jednego chorego miało miejsce uszkodzenie rdzenia kręgowego. W materiale Vogta (1950) również tylko w jednym z dziewięciu przypadków sarkoidozy U.N. stwierdzono objawy rdzeniowe. W zestawieniu Silversteina i wsp. (1965), obejmującym 120 przypadków sarkoidozy U.N. zebranych z piśmiennictwa, objawy uszkodzenia rdzenia stwierdzono u 8 chorych (w tym w 2 przypadkach wątpliwe) manifestujące się jedynie porażeniem pęcherza moczowego. Wielu autorów podkreśla, że w przypadkach sarkoidozy U.N. z objawami rdzeniowymi dochodzi zwykle do ucisku rdzenia. Na podstawie analizy zmian neuropatologicznych w naszym przypadku możemy powiedzieć, że nacieki zapalne w obrębie opon nie były nigdzie tak masywne, aby mogły powodować objawy uciskowe; rozwijające się niedowłady były bezpośrednim wynikiem licznych gruzełków sarkoidozy, rozsianych w całym rdzeniu kręgowym. Obraz morfologiczny tych gruzełków przeczy poglądom, spotykanym jeszcze niekiedy w literaturze, że nacieki sarkoidozy różnią się od zmian gruczliczych brakiem centralnego ogniska martwicy. Cecha ta nie może stanowić podstawy różnicowania tych dwu schorzeń. Większe znaczenie może posiadać — w świetle naszej obserwacji — obecność lub brak prątków gruczlicy w ogniskach zapalnych, szczególnie, jeśli nie stosowano uprzednio leczenia przeciwprątkowego.

Е. Кульчицки, Ц. Фризе

СЛУЧАЙ САРКОИДОЗА НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
СО ЗНАЧИТЕЛЬНЫМ ЗАХВАТОМ СПИННОГО МОЗГА

Резюме

Приводится случай саркоидоза нервной системы. Изменения выступали во всем спинном мозге. На некоторых срезах был обнаружен некроз в средней части узелка. Отсутствие некроза до недавнего времени расценивалось как черта отличающая саркоидную грануляцию от туберкулезного инфильтрата. Болезнь началась на 3 году жизни изменениями в коже, в глазу, скелетно-суставной системе и во внутренних органах. На протяжении 15 лет продолжительности болезни рецидивы повторялись многократно, но без симптомов захвата нервной системы. Быстро прогрессирующий парез всех конечностей появился в последние три недели жизни, после ремиссии, продолжающейся почти три года.

J. Kulczycki, C. Fryze

CASE OF SARCOIDOSIS OF THE NERVOUS SYSTEM
WITH PARTICULAR INVOLVEMENT OF THE SPINAL CORD

Summary

Presented is the case of sarcoidosis of the nervous system in which the lesions were localized along the spinal cord. In some cross sections the necrosis of the central part of the granulomatous nodule was found. The lack of the necrotic

centre until recently was considered to be a feature differing sarcoid granuloma from the tuberculous infiltration. The malady began when the patient was only 3 years old with the development of lesions in the dermis, eye, in osseo-articular system and in the internal organs. During 15 years of duration there were many recurrences of the disease but the signs of the nervous system involvement were not observed. The fast progressing tetraparesis developed only in the last 3 weeks of life after almost 3 years lasting remission.

PISMIENICTWO

1. Cendrowski W.: Kliniczna, epidemiologiczna i genetyczna charakterystyka sarkoidozy układu nerwowego i mięśniowego. *Neur. Neurochir. i Psych. Pol.* 1966, 16, 827—832.
2. Douglas A. C., Maloney A. F. J.: Sarcoidosis of the central nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1973, 36, 1024—1033.
3. Hulanicka K.: Niektóre zagadnienia kliniczne sarkoidozy układu nerwowego. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1974, 8, 79—73.
4. Hulanicka K., Niewiadomska S.: Zmiany w układzie nerwowym w przebiegu sarkoidozy. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1974, 8, 13—18.
5. Lenartowicz A., Rotfeld A.: Cyt. za Hulanicką i Niewiadomską, 1974.
6. Rinne U. K.: Sarkoidose und progressive spinale Muskelatrophie. *Nervenarzt* 1967, 38, 417—419.
7. Silverstein A., Feuer M., Siltzbach L. S.: Neurologic sarcoidosis. *Arch. Neurol.* 1965, 12, 1—11.
8. Szemraj J., Burchard Z.: Sarkoidoza mózgu. *Pol. Tyg. Lek.* 1966, 29, 1117—1119.
9. Vogt H.: *Morbus Besnier-Boeck-Schaumann*. Benno Schwabe and Co Verlag, Basel, 1950.
10. Wiedersholt W. C., Siekiert R. G.: Neurological manifestations of sarcoidosis. *Neurology (Minneapolis)* 1965, 15, 1147—1154.

Adres autora: Instytut Psychoneurologiczny, 02-957 Warszawa, al. Sobieskiego 1/9.

MARIA OSTENDA

STAN ZŁĄCZA NACZYNIOWO-GLEJOWEGO
W NAPROMIENIONEJ TKANCE MÓZGOWEJ

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Tkanka mózgowa nie barwi się podanymi dożylnie barwnikami przyżyciowymi w przeciwieństwie do tkanek innych narządów. Na tym spostrzeżeniu oparto tezę o istnieniu systemu ograniczającego wymianę między krwioobiegami a tkanką mózgową nazwanego „bariera krew-mózg”. Przyjęto pogląd, że struktury regulujące transport z krwi do mózgu znajdują się w ścianach naczyń włosowatych i w ich bezpośrednim sąsiedztwie (Gabryel 1973). Pogląd ten jest uzasadniony szczególnie budową włósniczek mózgu, których śródbłonek tworzy warstwę ciągłą pozbawioną fenestracji, a zespolenia między śródbłónkami stanowią wąskie szczeliny typu zespolen ścisłych. Ścisłość połączeń międzyśródbłonkowych oraz ubóstwo pinocytozy jest uważane za morfologiczny substrat bariery (Brightman, Reese 1970; Gabryel 1973). Z drugiej zaś strony okołonaczyniowe wypustki astrocytów otaczają włósniczki ścisłą otoczką obejmującą 85% powierzchni naczyń (Farquhar, Hartman 1957), dzięki czemu transport z włósniczki może pozostawać pod kontrolą astrogleju (Wolff 1970, Friede 1970). Pappenheimer (1970) mierząc transport glukozy przez błony doszedł do wniosku, że włósniczki odpowiadają za bierne właściwości transportu, którego czynna komponenta może znajdować się w astrocycie.

Dla wyświetlenia funkcji spełnianej przez każdą z wymienionych struktur w transporcie czynnym przeprowadzono szereg doświadczeń, w których czynnikiem wywołującym zmiany były promienie jonizujące. Panuje opinia, że ten rodzaj energii powoduje zmiany przepuszczalności błon komórkowych, co prowadzi do zmian w funkcji bariery (Bacq, Alexander 1961; Miquel, Haymaker 1967, Bloomstrand i wsp. 1975). Dobierając odpowiednie warunki napromieniania można otrzymać z dużą

stałością uszkodzenie bariery krew-mózg bez znacznych zmian tkankowych (Miquel, Haymaker 1967). W obecnych badaniach stosowano niskie dawki promieniowania, ponieważ celem pracy było badanie funkcji biologicznej w uszkodzonej ale żywej komórce. Badania te są próbą wyjaśnienia współzależności zdarzeń prowadzących do uszkodzenia bariery oraz powiązania obrazów morfologicznych z niektórymi zmianami czynnościowymi. W tym celu podjęto próbę analizy ustrukturalnego obrazu uszkodzeń bariery krew-mózg spowodowanych promieniowaniem jonizującym, uwzględniając ich zmiany w czasie. Dla oceny ilościowych zmian transportu zastosowano metody izotopowe. Badania skoncentrowano na następujących zagadnieniach:

- 1) Zmiany ultrastrukturalne na poziomie złącza włóściczka-gleju
- 2) Zmiany ultrastrukturalne w astrocytycznym izolowanym od krążenia (*in vitro*)
- 3) Transport znaczników barierowych przez włóściczki mózgu
- 4) Lokalizacja ultrastrukturalna enzymów przyjmujących udział w transporcie czynnym.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 250 dorosłych szczurach szczepu Wistar, wagi 180—220 g, obu płci oraz na 580 hodowlach tkanki mózgowej. Źródłem promieniowania była bomba kobaltowa typu Eldorado A, o średniej wydajności 100 r/min. W doświadczeniu wstępnym ustalono dawkę promieniowania, która powoduje w okresie od kilku godzin do kilku dni występowanie w mózgu zmian uchwytnych w mikroskopie świetlnym. Dawka wynosiła 800 r podanych jednorazowo na całe ciało. Tkanekę mózgową pobierano do badań w 3, 6, 12, 24, 48, 72, 125 i 168 godz. po ekspozycji. Dla hodowli tkankowych dawkę ustalono na podstawie wskaźnika mitotycznego. Wybrana dawka wynosiła 5.000 r podanych jednorazowo i powodowała spadek wskaźnika mitotycznego do 3—4‰.

Stosowano następujące metody: obserwacje w mikroskopie elektronowym mózgu *in situ* (technika klasyczna), badanie przy pomocy peroksydazy chrzanowej podawanej dożylnie (Reese, Karnovsky 1967, w modyfikacji Westergaarda 1973), badania izotopowe (⁷⁵Se-selenometionina i ¹³¹J-albumina), obserwacje hodowli tkankowych w mikroskopie elektronowym oraz obserwacje odczynów histochemicznych w mikroskopie świetlnym (Barka, Anderson 1965) i wreszcie badania ustrukturalnej lokalizacji fosfataz hydrolizujących estry fosforanowe (Torack, Barnett 1964).

WYNIKI

W najwcześniejszym okresie obserwacji (3 godz.) po ekspozycji nie stwierdzano uchwytnych zmian morfologicznych we włóściczkach mózgu. W astrocytach natomiast, zarówno *in vitro* jak *in situ*, stwierdzano poszerzenie kanałów zespołu Golgi i liczne małe pęcherzyki w ich sąsiedztwie, znaczne ilości wolnych rybosomów oraz gromadzenie ziaren glikogenu w cytoplazmie. W astrocytach *in vitro* zmniejszyły się w tym okresie objawy pinocytozy. Po 6 godz. stwierdzano wybitne zwiększenie ilości pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonkach włóściczek oraz poszerzenie szczelin międzyśródbłonkowych (do 300 Å), tworzących kanały elektonocptycznie puste. W tym samym okresie obniżył się transport do mózgu ⁷⁵Se-selenometioniny, a wchłanianie peroksydazy chrzanowej przez pęcherzyki pinocytarne uległo spowolnieniu. Produkt reakcji fosfataz hydrolizujących estry fosforanowe zniknął z błony podstawnej wielu naczyń włosowatych.

Po 24 godz. niektóre z opisanych zmian cofnęły się: zniknęły złogi glikogenu w cytoplazmie astrocytów, zmniejszyła się ilość pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonkach włóściczek, transport selenometioniny powrócił do wartości prawidłowych; równocześnie narastały zmiany w cytoplazmie astrocytów, obniżyła się jej gęstość optyczna, pojawiły się resztki rozpadłych organelli, narosła liczba ciał gęstych, wodniczek, kul lipofuscynowych.

W grupie 48-godzinnej stwierdzano peroksydazę chrzanową w przestrzaniach pozakomórkowych przylegających do naczyń. Pomimo to nie obserwowano przechodzenia peroksydazy chrzanowej przez poszerzone zespolenia międzyśródbłonkowe, produkt reakcji zatrzymywał się zwykle na mostku zespolenia ścisłego. W tej samej grupie czasowej obserwowano nasilenie zmian w lokalizacji ultrastrukturalnej fosfataz hydrolizujących estry fosforanowe: produkt reakcji pojawiał się w śródbłonku naczyń, rozsiany lub skupiony na jego błonach granicznych oraz na błonach pęcherzyków pinocytarnych. Błona podstawna tych włóściczek pozostawała pusta. Produkt reakcji znajdowano często na błonach komórkowych astrocytów przylegających do naczyń.

W później obserwowanych grupach (72—168 godz. po ekspozycji) obserwowano narastanie zmian wstecznych w astrocytach. Badania histochemiczne wykazały w astrogleju wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej; w mikroskopie elektronowym obserwowano liczne komórki z cytoplazmą wypełnioną przez ciała gęste, wodniczki, ciała mielinopodobne i ciała wielopęcherzykowe. W naczyniach zmiany cofały się. Poszerzonych szczelin między śródbłonkami nie obserwowano, liczba pęcherzyków pinocytarnych zmniejszyła się w porównaniu z wcześniej obserwowanymi

grupami. Przenikanie peroksydazy chrzanowej do pęcherzyków pinocytarnych nadal było spowolnione. Transport selenometioniny powrócił do wartości prawidłowych. Produkty reakcji hydrolaz swoistych były zlokalizowane, podobnie jak w 48-godzinnej grupie, w śródbłonkach włosniczek oraz na błonach wypustek astrocytów przylegających do naczyń.

W żadnej grupie czasowej nie stwierdzono przenikania J-albuminy poza naczynia.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zmiany w mózgu szczurów napromienionych dawką 800 r promieni gamma na całe ciało dotyczyły zarówno naczyń krwionośnych jak i astrocytów, jednakże czas pojawiania się odczynu, jego charakter i zejście przebiegały w obu badanych strukturach odmiennie. Odczyn w astrocytach pojawiał się już w 3 godz. po ekspozycji: w cytoplazmie gromadziły się znaczne ilości glikogenu zarówno *in vitro* jak *in situ*. W astrocytach rosnących w warunkach hodowli nastąpiło zahamowanie pinocytozy. Oba te objawy świadczą o pogorszeniu funkcji życiowych astrocytu, a w szczególności o zahamowaniu procesów glikolitycznych (Klatzo 1962). Równocześnie obserwowano obniżone przenikanie do tkanki mózgowej selenometioniny, związku przenoszonego na drodze transportu czynnego. W późniejszych okresach (72—125 godz.) po ekspozycji narastające zmiany w astrocytach prowadzą do znacznego zniszczenia cytoplazmy, zarówno w warunkach hodowli jak *in situ*, zwłaszcza w wypustkach okołonaczyniowych. Nasuwa się wniosek, że w badanym modelu doświadczalnym astrocyty reagują na czynnik uszkodzający, niezależnie od naczynia, wcześniej i głębiej.

Zmiany we włosniczkach zaczynają być uchwytne w późniejszych okresach obserwacji: 6—48 godz. po napromienieniu. Znaczny wzrost ilości pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonkach naczyń przy równoczesnym zmniejszeniu wchłaniania peroksydazy chrzanowej przemawia za spowolnieniem transportu pęcherzykowego. Nieco później (48 godz.) dają się uchwycić zmiany lokalizacji hydrolaz swoistych. Znikanie produktu reakcji z błony podstawnej a pojawianie się go w śródbłonkach włosniczek świadczy o zmianach w aparacie enzymatycznym regulującym procesy transportu czynnego. W tej samej grupie czasowej (48 godz.) obserwowano przechodzenie peroksydazy chrzanowej pozanaczyniowo. Droga przejścia znacznika pozostaje niejasna. Nie mamy dowodu, że odbywa się ono przez poszerzone szczeliny międzyśródbłonkowe. Wchłanianie drogą pinocytozy wydaje się bardziej prawdopodobne. Dla innego znacznika, J-albuminy, bariera pozostaje we wszystkich grupach doświad-

czalnym nieprzenikalna, pozostaje to zapewne w związku ze znaczną różnicą ciężaru cząsteczkowego obu stosowanych substancji (peroksydaza 40.000, albumina 120.000).

W późniejszych okresach obserwacji (72—168 godz.) zmiany w naczyniach cofają się, a w astrocytach narastają, prowadząc zapewne do obumierania części komórek.

Sądzymy, że odmienna reakcja obu komponent bariery jest związana z ich odmiennymi zadaniami spełnianymi w transporcie.

WNIOSKI

1. W mózgach szczurów napromienionych dawką 800 r promieni gamma, jednorazowo na całe ciało, stwierdzono zmiany na poziomie złącza naczyniowo-glejowego świadczące o zaburzeniach w transporcie przez barierę.

2. Obserwacje w mikroskopie elektronowym łącznie z badaniami izotopowymi wskazują na obniżenie transportu czynnego równocześnie z występowaniem zmian wstecznych w cytoplazmie astrocytów w okresie 3 godz. po ekspozycji.

3. Przenikanie peroksydazy chrzanowej pozanaczyniowo oraz zmiany lokalizacji odczynów na hydrolazy swoiste w ścianach włóścińek występujące w 48 godz. po ekspozycji przemawiają za zwiększeniem przepuszczalności bariery w tym okresie.

4. Kształtowanie zmian przepuszczalności bariery w tym modelu doświadczalnymi zależy w pierwszym rzędzie od zaburzeń czynności astrocytów, których wykładnikiem jest najpierw zahamowanie transportu, a później krótkotrwałe i nieznaczne zwiększenie przepuszczalności bariery.

PIŚMIENNICTWO

1. Barka T., Anderson P.: *Histochemistry. Theory, practice, bibliography.* Hoeber, New York 1965.
2. Bacq Z. M., Alexander P.: *Fundamentals of Radiobiology.* Pergamon Press, London 1961.
3. Bloomstrand Ch., Johansson B., Rosengren B.: Blood-brain barrier lesions in acute hypertension in rabbits after unilateral x-ray exposure in brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1975, 31, 97—102.
4. Brightman M. W., Reese T. S.: Tight junctions, gaps and fenestrae in the endothelium of normal and abnormal vertebrate brains. *Proc. Symp. Blood-Brain Barrier*, July 1970. Truex Press Oxford 1970, pp. 5—12.
5. Farquhar M. G., Hartman J. F.: Neuroglial structure and relationship. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1957, 16, 18—26.

6. Friede R. L.: The role of glial footplates in cerebral electrolytic balance. *Triangle* 1970, 9, 165—169.
7. Gabryel P.: Bariera krew-mózg, struktura i funkcja. *Pat. Pol.* 1973, 24, 218—235.
8. Klatzo I.: Effects of oxygen deprivation on the blood-brain barrier. In: *Proc. Symp. Blood-Brain Barrier*, July 1970. Truex Press Oxford 1970, pp. 13—22.
9. Miquel J., Haymaker W.: Uses of ionizing radiation in experimental neuropathology. *Scientia* vol. 102, ser. 7.
10. Pappenheimer J. R.: On the location of the blood-brain barrier. In: *Proc. Symp. Blood-Brain Barrier*, July 1970. Truex Press Oxford 1970, pp. 66—83.
11. Reese T. S., Karnovsky M. J.: Fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 1967, 34, 207—210.
12. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1964, 23, 46—59.
13. Westergaard E., Brightman M. W.: Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J. Comp. Neurol.* 1973, 152, 17—44.
14. Wolff J. R.: The astrocyte as a link between capillary and nerve cell. *Triangle* 1970, 9, 153—165.

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

T R E S C

M. Smiałek: Aktywność glikolityczna izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu tlenkiem węgla (metoda mikro-nurka Kartezjusza)	289
R. Gadamski, G. Szumańska, M. Borkowski, B. Ratyński, J. Wesołowski, H. Rykowski: Wpływ niedokrwienia rdzenia kręgowego u psów na stan bariery naczyniowej i mikrokrążenie	301
M. Walski, D. Pietrow: Badania mikroskopowo-elektronowe nad wpływem audiogennych napadów padaczkowych u myszy na stan płaszcza powierzchniowego śródbłonek włóścinek mózgowych	313
L. Dydyk, M. Dąbska, T. Szreter: Wpływ hyperoksji na dojrzewający mózg królika. II. Zmiany późniejsze	323
A. Taraszewska, E. Osetowska, W. Krücke: IX. Badania ultrastrukturalne zwąpień śródmózgowych u królika pt	331
H. Sommer, J. Quandt: Ultrastrukturalne zmiany w naczyniach mózgu po długotrwałym podawaniu L-DOPA zwierzętom laboratoryjnym	337
M. Ostenda, M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska: Obraz ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	347
K. Renkawek: Rola pierwiastków śladowych w patogenezie gliopatii wywołanej w pozaustrojowej hodowli tkanki glejowej	355
B. Gajkowska, J. W. Borowicz: Badania mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza mózgu szczura po przewlekłym stosowaniu morfiny i po odstawieniu leku	363
M. B. Kozik, E. Ożarzevska, A. Piechowski: Wbudowywanie DL-metioniny ³ H do mózgu szczura w przebiegu zatrucia siarczanem trójetylku cyny	371
B. Biczowa, M. Sikorska, Z. Zalewska, W. Bicz: Wpływ tiofosforowego insektycydu fenchlorfosu na poziom glikogenu, glikolizę i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu w mózgu szczura	381
H. Weinrauder, M. Smiałek: Wzbogacona frakcja glejowa z mózgu szczura jako immunogen i antygen	389
J. Finowicka-Walczyna: Osobliwość morfologii mięśnia prostownika krótkiego palców stopy	397
J. Kulczycki, C. Fryze: Przypadek sarkoidozy układu nerwowego ze szczególnym zajęciem rdzenia kręgowego	407
M. Ostenda: Stan złącza naczyniowo-glejowego w napromienionej tkance mózgowej (streszczenie pracy habilitacyjnej)	413
Dział Kroniki i Informacji	322, 346

C O D E R Ж A N I E

M. Смялек: Гликолитическая активность изолированных нейронов цнс крысы после отравления СО (метод картезианского поплавка)	289
P. Гадамски, Г. Шуманьска, М. Борковски, Б. Ратыньски, Е. Весоловски, Г. Рыковски: Влияние ишемии спинного мозга у собак на состояние сосудистого барьера и микроциркуляции	301
M. Вальски, Д. Петров: Электронно-микроскопические исследования влияния аудиогенных эпилептических припадков у мышей на состояние поверхностного плаща эпителия мозговых капилляров	313
Л. Дыдык, М. Домбска, Т. Шретер: Влияние гипероксии на созревающий мозг кролика. II. Поздние изменения	323
A. Тарашевска, Е. Осетовска, В. Крюке: IX. Ультраструктурные исследования кальциевых отложений в среднем мозге у кролика pt	331
Г. Соммер, И. Куандт: Ультраструктурные изменения в сосудах мозга после длительной подачи L-DOPA лабораторным животным	337
M. Остенда, М. Я. Моссаковски, А. Пронашко-Курчиньска: Электронно-микроскопическая картина экспериментальной печеночной энцефалопатии	347
K. Ренкавек: Роль микроэлементов в патогенезе глиопатии вызванной в глиальной тканевой культуре	355

Б. Гайковска, Е. В. Борович: Электронно-микроскопические исследования супраоптического и паравентрикулярного ядер крысы при хроническом применении морфия и после отстранения лекарства	363
М. Козик, Е. Ожажевска, А. Пеховски: Включение DL-метионина в мозг крысы во время отравления сернохлорным триэтиловым оловом	371
Б. Бичова, М. Сикорска, Э. Залевска, В. Бич: Влияние тиофосфорного инсектицида фенхлорфоса на уровень гликогена, гликолиз и активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата в мозге крысы	381
Г. Вайнраудер, М. Смялек: Обогащенная глиальная фракция как иммуноген и антиген	389
И. Финовицка-Вальчина: Особенность морфологии короткого разгибателя стопы	397
Е. Кульчицки, Ц. Фризе: Случай саркоидоза нервной системы со значительным захватом спинного мозга	407
М. Остенда: Содержание диссертации на звание доцента	413
Отдел хроники и информации	322, 346

CONTENTS

M. Smiałek: The glycolytic activity of isolated neurons from rat central nervous system following carbon monoxide intoxication (Cartesian microdiver technique)	285
R. Gadamski, G. Szumańska, M. Borkowski, B. Ratyński, J. Wesołowski, H. Rykowski: The effect of ischemia of the spinal cord on the blood — brain barrier and spinal microcirculation in dogs	301
M. Walski, D. Pietrow: Electron microscopic investigations on the effect of audiogenic epileptic fits on the surface coat of cerebral capillaries endothelium in mice	313
L. Dydik, M. Dąbska, T. Szreter: Effect of hyperoxia on the developing rabbit brain. II. Later changes	323
A. Taraszewska, E. Osetowska, W. Krücke: IX. Elektronenmikroskopische Untersuchung der intrazerebralen Verkalkungen bei dem erblichen paralytischen Tremor der pt-Kaninchen	331
H. Sommer, J. Quandt: Gefässveränderungen nach tierexperimenteller Langzeitbehandlung mit L-DOPA aus elektronenoptischer Sicht	337
M. Ostenda, M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy	347
K. Renkawek: The role of microelements in the pathogenesis of the gliopathy of glia cultured <i>in vitro</i>	355
B. Gajkowska, J. W. Borowicz: Electron microscopic observations of the supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal	363
M. B. Kozik, E. Ożarzevska, A. Piechowski: Incorporation of DL-methionine ³ H into rat brain in the course of triethyl tin sulphate intoxication	371
B. Biczowa, M. Sikorska, Z. Zalewska, W. Bicz: Effect of thiophosphate insecticide — fenchlorphos on the glycogen level, glycolysis and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain	381
H. Weinrauder, M. Smiałek: Enriched glial cell fraction from the rat brain as an immunogen and antigen	389
J. Finowicka-Walczyzna: Peculiar morphology of the <i>musculus digitorum brevis</i>	397
J. Kulczycki, C. Fryze: A case of sarcoidosis of the nervous system with particular involvement of the spinal cord	407
M. Ostenda: Relationship between glia and blood vessels in irradiated cerebral tissue (summary of Doc. thesis)	413
Chronicles and Information	322, 346

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Neuropatologia Polska zamieszcza prace z zakresu neuropatologii klinicznej i doświadczalnej oraz dziedzin pokrewnych (neuroonkologii, neuroanatomii, neurochemii itp.).

Redakcja pisma przyjmuje do druku prace oryginalne i doniesienia kazuistyczne; prace poglądowe — przygotowane wyłącznie na zaproszenie Redakcji.

Neuropatologia Polska przyjmuje do druku prace w języku polskim, angielskim, francuskim i niemieckim.

Warunkiem przyjęcia pracy jest oświadczenie autora, że praca nie była drukowana w innym czasopiśmie oraz pisemna zgoda kierownika placówki/ek na jej opublikowanie.

Objętość pracy oryginalnej nie powinna przekraczać wraz z pełną dokumentacją (streszczenie, piśmiennictwo, tabele, wykresy, ryciny itp.) 20 stron, pracy kazuistycznej — 10 stron.

Prace należy przysyłać w 2 egzemplarzach w znormalizowanym maszynopisie (4-cm margines z lewej strony, 30 wierszy na stronę z zachowaniem podwójnego odstępu, bez odręcznych poprawek i podkreśleń).

Wykaz piśmiennictwa, ułożony alfabetycznie, powinien obejmować wyłącznie pozycje cytowane w pracy. W wykazie piśmiennictwa podaje się nazwiska i inicjały wszystkich autorów, tytuł pracy, nazwę czasopisma, rok, tom, pierwszą i ostatnią stronę publikacji. W przypadku źródeł książkowych — nazwisko(a) i inicjał(y) autorów, tytuł książki (ew. rozdziału), wydawcę, miejsce i rok wydania. W tekście należy podać nazwisko autora(ów) oraz rok publikacji. W przypadku, gdy autorów cytowanej pozycji jest więcej niż dwóch, należy podać nazwisko pierwszego autora ze skrótem „i wsp.”.

Ryciny ograniczone do niezbędnych powinny być oznaczone kolejnymi numerami. Wskazane jest zestawianie rycin w tablice zbiorcze o wymiarach 12,5 × 19 cm.

Redakcja prosi o nadsyłanie objaśnień i podpisów do tabel, schematów i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania koniecznych poprawek stylistycznych i zmniejszania ilości rycin bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca maszynopisów nadesłanych prac.

Redakcja prosi autorów o dokładne sprawdzenie tekstów apelując o zwięźłość, przejrzysty układ pracy oraz staranne przygotowanie materiału ilustracyjnego.

Autorzy otrzymują pierwszą korektę pracy. W korekcie Redakcja uwzględni jedynie błędy literowe oraz poprawki pomyłek drukarskich.

Autorzy prac zamieszczonych w *Neuropatologii Polskiej* otrzymują honorarium wg ustalonych stawek oraz 25 odbitek na koszt autora.

WARUNKI PRENUMERATY

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

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele — w terminach:

- do 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny
- do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienie w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy i instytucje w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

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 36668

404 - 21 1/2 1/2