

~~Wojewódzki~~ epz ~~Dotyczy~~ 7/404

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH



NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM XV

1977

ZESZ. 3

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XV

LIPIEC — WRZESIEŃ

Nr 3

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Madejcki* (Warszawa), *Mirostaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Śmiątek* (Warszawa), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmína 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*, *Mirostaw Mossakowski*, *Ewa Osetowska*
Mieczysław Wender

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmína 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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ALICJA PRONASZKO-KURCZYŃSKA,
JACEK RÓZGA, RAFAŁ PALUSZKIEWICZ

WPŁYW α -OKSOGLUTARANU NA ROZWÓJ GLIOPATII
WĄTROBOWEJ U SZCZURÓW Z ZESPOLENIEM
WROTNO-UKŁADOWYM

DONIESIENIE WSTĘPNE

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

W cyklu prac poświęconych gliopatii wątrobowej wykazano, że patologiczne postaci gleju astrocytarnego, charakterystyczne dla choroby Wilsona i encefalopatii pochodzenia wątrobowego rozwijają się w pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej zarówno pod wpływem egzogennych soli miedzi i amoniaku jak i środków hamujących aktywność enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (Mossakowski i wsp. 1970a, Renkawek i wsp. 1973). Równocześnie stwierdzono, że penicylamina, środek stosowany w leczeniu choroby Wilsona, hamuje rozwój gliopatii wywołanej przez zastosowanie surowic od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i egzogennych soli miedzi, pozostając bez wpływu na gliopatie, stanowiące następstwo działania egzogennych soli amoniaku (Mossakowski i wsp. 1976). Glutaminian osłabiał wprawdzie efekt działania wszystkich stosowanych czynników uszkadzających, jednakże działanie jego było niekompletne (Mossakowski i wsp. 1975). Pełny efekt hamujący rozwój gliopatii wątrobowej *in vitro* uzyskano jedynie przy stosowaniu α -oksoglutaranu (Renkawek i wsp. 1973). W oparciu o powyższe obserwacje wysunięto hipotezę, że u podstaw metabolicznego uszkodzenia gleju, niezależnie od rodzaju bezpośredniego czynnika patogenetycznego leży upośledzenie detoksykacji amoniaku, związane ze względnym lub bezwzględnym niedoborem endogenego α -oksoglutaranu, stanowiącego wyjściowe ogniwo metabolizmu amoniaku do glutaminy (Mossakowski 1974).

Celem podjętych badań było sprawdzenie powyższej hipotezy, opartej o spostrzeżenia *in vitro*, na doświadczalnym materiale *in vivo*. Badania

przeprowadzono na modelu doświadczalnej encefalopatii wywołanej przez wytworzenie przetoki między żyłą wrotną i żyłą główną dolną, stanowiącej odpowiednik występującej u ludzi encefalopatii wrotno-układowej (Mc Dermotte, Adams 1954). Model ten opracowany i scharakteryzowany przez Kyu i Cavanagha (1970) wydawał się szczególnie użyteczny, ponieważ występujące w nim strukturalne nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym, ograniczają się do zmian gleju astrocytarnego, wyrażających się występowaniem komórek Alzheimer'a typu II (Cavanagh, Kyu 1971a).

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, 2,5-miesięcznych samcach o ciężarze ciała około 300 g.

U wszystkich zwierząt doświadczalnych, w głębokiej narkozie eterowej wykonywano zespolenie żyły wrotnej z żyłą główną dolną w sposób opisany szczegółowo w pracy Różgi i Paluszkiwicza (w przygotowaniu).

Zwierzęta doświadczalne podzielono na dwie grupy — właściwą grupę doświadczalną (grupa I) i grupę kontrolną (grupa II). Grupa I obejmowała 6 zwierząt, które od 3 dnia po zabiegu operacyjnym, przez okres 7 tygodni, otrzymywały dootrzewnowe iniekcje α -oksoglutaranu w dawce 14,1 mg/100 g ciężaru ciała, rozpuszczonego w 0,5 ml wody destylowanej. Dawkę α -oksoglutaranu opracowano w oparciu o równanie reakcji chemicznej glutaminian- α -oksoglutaran (Caughey i wsp. 1957) oraz o dane dotyczące stężenia α -oksoglutaranu w mózgu zdrowych szczurów (Shorey i wsp. 1967). Iniekcje podawano codziennie. Grupa II składała się z 7 zwierząt, które przez ten sam okres czasu otrzymywały dootrzewnowe iniekcje samego rozpuszczalnika. Wszystkim zwierzętom grupy I oraz 4 zwierzętom grupy II po upływie 7 tygodni wykonano przezsercową perfuzję 10% roztworem formaliny, poprzedzoną krótkotrwałą perfuzją roztworem fizjologicznym soli. Trzy zwierzęta grupy II uśpiono w sposób analogiczny po upływie 10 tygodni od zabiegu operacyjnego. Przedłużenie czasu przeżycia miało na celu ocenę różnicy w nasileniu zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym, uwarunkowanej dłuższym okresem funkcjonowania przetoki żyłnej.

U większości zwierząt grupy I i II bezpośrednio przed perfuzją pobierano próbki krwi, w celu oznaczenia poziomu amoniaku. Krew pobierano wprost z serca, przy użyciu heparynizowanej strzykawki i natychmiast wirowano. Poziom amoniaku w surowicy krwi oznaczano metodą kolorymetryczną w oparciu o testowy zestaw odczynników firmy Hyland (Hyland Blood Ammonia Test — Mondzac i wsp. 1965). Próbki odczytywano na kolorymetrze Specol przy długości fali 630 nm, a wyniki po-

równywno z krzywą wzorcową. Stężenie amoniaku we krwi wyrażano w $\mu\text{g}/100$ ml surowicy.

Materiał doświadczalny uzupełniono 3 zwierzętami, u których nie wykonywano żadnego zabiegu, poza codziennym podawaniem przez okres 7 tygodni dootrzewnowych iniekcji 0,5 ml wody/100 g ciężaru ciała. U zwierząt tej grupy, zabijanych w sposób identyczny jak w grupach doświadczalnych wykonywano również oznaczenie poziomu amoniaku we krwi i badanie histopatologiczne ośrodkowego układu nerwowego.

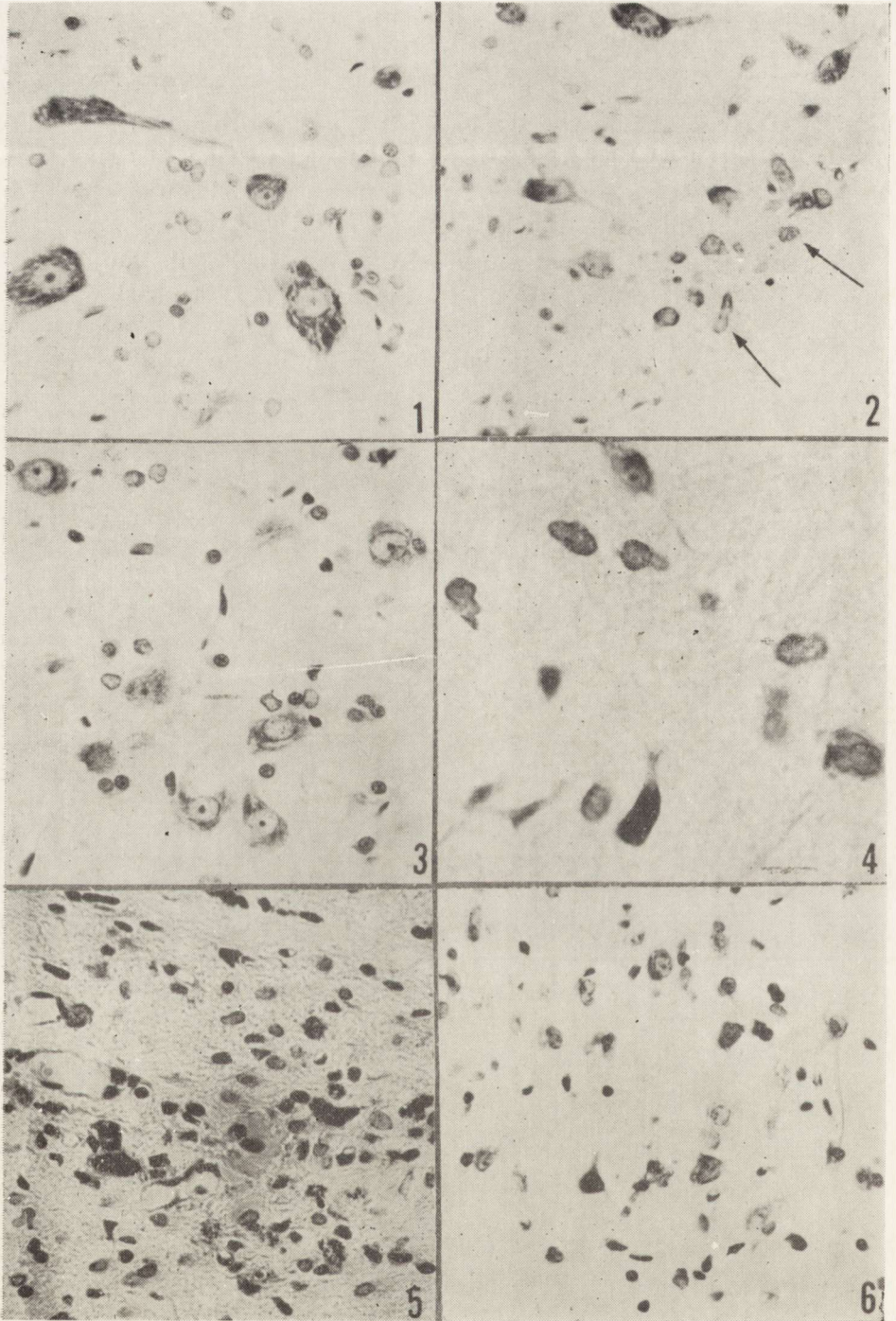
Utrwalone drogą perfuzji mózgi krojono na bloki, obejmujące korę mózgu, istotę białą podkorową oraz różne poziomy jąder podstawy, a ponadto rdzeń przedłużony i mózdzek. Parafinowe skrawki tkankowe barwiono hematoksyliną-eozyną i fioletem krezyłu oraz na osłonki mielino-we według metody Heidenhaina.

WYNIKI

Stężenie amoniaku we krwi u szczurów nie poddanych zabiegowi operacyjnemu wynosiło poniżej 100 $\mu\text{g}/100$ ml surowicy. Obraz morfologiczny mózgu nie wykazywał żadnych nieprawidłowości.

Stężenie amoniaku we krwi zwierząt z wykonaną przetoką żylną, które przez okres 7 tygodni otrzymywały dootrzewnowe iniekcje wody destylowanej wynosiło średnio 325,5 $\mu\text{g}/100$ ml surowicy, a u zwierząt z 10-tygodniowym przeżyciem zamykało się w granicach od 113,5—155,0 $\mu\text{g}/100$ ml surowicy.

W obrazie histopatologicznym mózgu zwracało uwagę nieznaczne zwiększenie liczby jąder komórek glejowych, które w oparciu o ich strukturę morfologiczną identyfikowano jako jądra astrocytów. Liczne spośród nich, zwłaszcza w prążkowie, wzgórzu, jądrze zębatym mózdzku oraz w jądrach ruchowych opuszki były znacznie powiększone i całkowicie lub prawie całkowicie pozbawione ziarnistości chromatynowych (ryc. 1). Swoją strukturą odpowiadały one obrazowi komórek Alzheimer'a typu II. Znaczna część patologicznych jąder glejowych miała nieregularny kształt i obrisy (ryc. 2), do rzadkości jednak należało pofałdowanie błony jądrowej, uznane przez Cavanagha i Kyu (1971) za zjawisko charakterystyczne dla doświadczalnej encefalopatii wątrobowej uzyskanej przez zespolenie żyły wrotnej z żyłą główną dolną. Mniej nasilone zmiany w obrazie jąder astrocytów stwierdzono ponadto w korze mózgu i w zwoju hipokampa. Nieprawidłowościom w obrazie jąder astrocytarnych towarzyszyły delikatne, rozsiane zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych, wyrażające się chromatolizą cytoplazmy dużych neuronów prążkowie i wzgórza, oraz komórek piramidowych kory mózgu. Osłonki



mielinowe i jądra oligodendrogleju nie wykazywały nieprawidłowości strukturalnych.

W mózgach zwierząt usypianych po upływie 10 tygodni od zabiegu operacyjnego, zmiany morfologiczne miały identyczny charakter, były jednak bardziej nasilone. Nieprawidłowe jądra astrocytarne (ryc. 3) występowały obficie nie tylko w prążkowi, wzgórzu, jądrze zębatym i jądrach ruchowych opuszki, lecz także w głębokich warstwach kory, a nawet w podkorowej istocie białej. W przybliżeniu ponad połowę populacji komórek glejowych w wymienionych strukturach mózgu stanowiły ich nieprawidłowe postaci, o obrazie komórek Alzheimer'a typu II lub form do nich zbliżonych, podczas gdy u zwierząt z 7-tygodniowym przeżyciem pooperacyjnym dochodziły one jedynie do około 30%. Jądra astrocytarne z charakterystycznym pofałdowaniem błony jądrowej, aczkolwiek liczniejsze niż w grupie zwierząt z 7-tygodniowym przeżyciem (ryc. 4) nie stanowiły zjawiska dominującego w obrazie neuropatologicznym.

W jednym przypadku, w otoczeniu ogniskowego uszkodzenia mózgu pochodzenia prawdopodobnie urazowego, stwierdzono pojedyncze ko-

Ryc. 1. Liczne komórki Alzheimer'a typu II w jądrze ruchowym opuszki. Szczur z 7-tygodniowym przeżyciem po zespoleniu wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 1. Numerous type II Alzheimer cells in bulbar motor nucleus. Rat's survival 7 weeks after porto-systemic anastomosis. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 2. Pofałdowanie jąder gleju Alzheimer'a typu II (strzałki). Szczur z 7-tygodniowym przeżyciem po zespoleniu wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 2. Foldings of nuclear membranes in Alzheimer type II cells (arrows). Rat's survival 7 weeks after porto-systemic anastomosis. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 3. Liczne nagie jądra we wzgórzu. Szczur z 10-tygodniowym przeżyciem po zespoleniu wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 3. Numerous naked nuclei in thalamus. Rat's survival 10 weeks after porto-systemic anastomosis. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 4. Znaczne pofałdowanie błon jądrowych komórek Alzheimer'a typu II w jądrze zębatym mózdzku. Szczur z 10-tygodniowym przeżyciem po zespoleniu wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 1200 \times .

Fig. 4. Marked foldings of nuclear membranes in Alzheimer type II cells in the dentate nucleus. Rat's survival 10 weeks after porto-systemic anastomosis. Cresyl violet. \times 1200.

Ryc. 5. Komórka Alzheimer'a typu I w bliznie glejowej. Szczur z 10-tygodniowym przeżyciem po zespoleniu wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 5. Alzheimer cell type I in glial scar. Survival of rat 10 weeks after porto-systemic anastomosis. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 6. Pojedyncze komórki Alzheimer'a typu II w jądrze zębatym mózdzku. Szczur z 7-tygodniowym podawaniem α -oksooglutaranu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 6. A few Alzheimer type II cells in dentate nucleus. Administration of α -oxoglutarate for 7 weeks. Cresyl violet. \times 400.

mórki o dużej, jasnej, homogennej, nieregularnej cytoplazmie z obwodowo położonym, pojedynczym jądrem, przypominające komórki Alzheimera typu I (ryc. 5).

Stężenie amoniaku we krwi zwierząt z zespoleniem żylnym, które przez okres 7 tygodni otrzymywały dootrzewnowe iniekcje α -oksoglutaranu wahało się w granicach od 327,0 $\mu\text{g}\%$ do 199,0 $\mu\text{g}\%$. U jednego szczura wynosiło 119,0 $\mu\text{g}/100$ ml surowicy.

W obrazie morfologicznym ośrodkowego układu nerwowego stwierdzono również występowanie nieprawidłowości w strukturze jąder astrogleju. Były one jednak ograniczone wyłącznie do prążkowania, wzgórze, jąder ruchowych opuszki i jądra zębatego mózdzku. Ilość typowych komórek Alzheimera typu II była znacznie mniejsza (ryc. 6). Na ogół występowały one w pojedynczych egzemplarzach. Przy największym nawet nasileniu zmian nie przekraczały około 5 — 7% populacji glejowej zajętych formacji ośrodkowego układu nerwowego. Pozostałe elementy strukturalne tkanki nerwowej były niezmienione.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki badań, ze względu na szczupłość materiału doświadczalnego, ograniczenie obserwacji do jednej wyłącznie grupy czasowej i brak dokładnej analizy ilościowej nie pozwalają na wyciąganie jednoznacznych wniosków co do hamującego wpływu α -oksoglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej w warunkach *in situ*. Mogą one być jedynie traktowane jako spostrzeżenia wstępne, określające kierunek dalszych badań.

Wskazują one jednakże w sposób niewątpliwy, że operacyjne wytworzenie przetoki między żyłą wrotną i główną dolną prowadzi do rozwoju zespołu encefalopatii wątrobowej, w której obrazie morfologicznym dominuje uszkodzenie gleju astrocytarnego. Potwierdza to poprzednie spostrzeżenia uzyskane zarówno na materiale klinicznym jak i w modelach doświadczalnych (Mossakowski 1966 a, 1966b, Mossakowski i wsp. 1970b), wskazujące że u podłoża zespołu encefalopatii pochodzenia wątrobowego leży pierwotne uszkodzenie astrocytów, a zmiany patologiczne innych elementów strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego mają charakter wtórny.

Uzyskany obraz morfologiczny nieprawidłowości strukturalnych jąder astrocytarnych stanowi potwierdzenie spostrzeżeń Cavanagha i Kyu (1971a) mimo pewnych odrębności dotyczących, zarówno charakteru zmian jak i ich rozmieszczenia w ośrodkowym układzie nerwowym. Cavanagh i Kyu (1971a) w oparciu o bardzo dokładne badania planime-

tryczne podkreślają, że najistotniejszym wykładnikiem nieprawidłowości jąder astrocytarnych obok powiększenia ich rozmiarów są zmiany kształtu, wyrażające się policyklicznymi zarysami błony jądrowej i ich płatowatością. Obrazy te występujące również w naszym materiale nie stanowiły elementu dominującego. Przeważało natomiast powiększenie jąder, ich różnokształtność oraz zanik chromatyny jądrowej. Źródło tych różnic jest niejasne, nie wydaje się jednak, że należy je odnieść wyłącznie do odmienności gatunkowej użytych w doświadczeniu zwierząt. Stwierdzany u zwierząt doświadczalnych wzrost zawartości amoniaku we krwi osiągał w naszym materiale wartości tego samego rzędu co w doświadczeniach Cavanagha i Kyu (1971a), ograniczony był natomiast czas przeżycia zwierząt po zabiegu operacyjnym. Nie można więc wykluczyć, że skrócenie czasu obserwacji, wynikające z założenia pracy, może być odpowiedzialne za niewykształcenie się zmian o nasileniu i charakterze, opisanym przez Cavanagha i Kyu (1971a). W materiale naszym nie potwierdziła się bezpośrednia zależność między nasileniem zmian morfologicznych gleju, a stężeniem amoniaku we krwi. U zwierząt z 10-tygodniowym przeżyciem po zabiegu operacyjnym mimo niższego poziomu amoniaku niż u zwierząt z 7-tygodniowym przeżyciem nasilenie nieprawidłowości strukturalnych astrogleju było większe. Na podkreślenie zasługuje natomiast zbieżność naszych obserwacji z innymi spostrzeżeniami Cavanagha i Kyu (1971b), dotyczącymi powstawania komórek glejowych przypominających glej Alzheimera typu I. Zjawiska tego nie obserwowano w żadnym innym doświadczalnym modelu encefalopatii wątrobowej (Mossakowski 1966b, Mossakowski i wsp. 1970b). Należało ono również do rzadkości w doświadczeniach *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970a).

Mimo wyrażonych na wstępie zastrzeżeń co do wyciągania jednoznacznych wniosków z przedstawionych spostrzeżeń, wydaje się, że wskazują one na fakt, że α -okso-glutaran stosowany w doświadczeniu *in vivo*, może podobnie jak w warunkach *in vitro*, wywierać działanie hamujące na rozwój gliopatii wątrobowej. Przemawiają za tym różnice obrazu morfologicznego zwierząt grupy I i II. Brak pełnego efektu osłaniającego być może należy odnieść do zbyt niskiej dawki substancji. Zagadnienie to rozstrzygną doświadczenia ze zróżnicowanym dawkowaniem α -okso-glutaranu. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że przy stosowaniu α -okso-glutaranu, zmiany patologiczne gleju były wyraźnie mniejsze niż w grupie zwierząt kontrolnych, przy jednakowym zasadniczo poziomie amoniaku we krwi. Sugeruje to, że osłaniający wpływ α -okso-glutaranu może wynikać z jego uczestnictwa w metabolizmie amoniaku w tkance nerwowej. W tym też zakresie przedstawione obserwacje mogą potwierdzać wysuniętą poprzednio hipotezę o mechanizmie uszkodzeń tkankowych w encefalopatiach pochodzenia wątrobowego.

М. Я. Моссаковский, А. Пронашко-Курчиньска, Я. Рузга, Р. Палюшкевич
 ВЛИЯНИЕ α -ОКСОГЛУТАРАТА НА РАЗВИТИЕ ГЕПАТОГЕННОЙ ГЛИОПАТИИ
 У КРЫС С ВОРОТНО-СИСТЕМНЫМ АНАСТОМОЗОМ

Резюме

Проведена предварительная оценка влияния α -оксоглутарата на развитие гепатогенной глиопатии у крыс с фистулой между воротной и нижней поллой венами.

Установлено, что экспериментальное образование воротно-системной фистулы приводит в течение 7—10 недель к развитию гепатогенной энцефалопатии, выраженной в морфологической картине мозга наличием многочисленных клеток Альцгеймера типа II, появляющихся в полосатом теле, зрительном бугре, зубчатом ядре мозжечка и в двигательных ядрах луковичы, а в меньшей степени — в коре мозга и подкорковом белом веществе. Уровень аммиака в крови достигал в среднем 325 мкг%. При 7-недельной даче α -оксоглутарата в дозе 14,1 мг на 100 г веса тела изменения в мозгу были значительно менее сильными и ограничивались полосатым телом, зрительным бугром и двигательными ядрами луковичы. Уровень аммиака в крови находился в границах 199,0—327,0 мкг%. Снижение интенсивности патологических изменений астроцитарной глии при использовании α -оксоглутарата указывает на то, что он может оказывать защитное действие при развитии гепатогенной энцефалопатии в условиях *in vivo*. Отсутствие влияния на уровень аммиака в крови позволяет предположить, что защитное действие α -оксоглутарата может быть следствием его участия в метаболизме аммиака в нервной ткани.

M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska, J. Różga, R. Paluszkiwicz

EFFECT OF α -OXOGLUTARATE ON THE DEVELOPMENT OF HEPATOGENIC
 GLIOPATHY IN RATS WITH PORTO-CAVAL SHUNT

Preliminary report

Summary

Preliminary estimation of the effect of α -oxoglutarate on the development of hepatogenic gliopathy in rats with porto-caval shunt was performed.

It was found that experimentally produced porto-systemic anastomosis of 7—10 weeks duration results in the development of hepatogenic encephalopathy expressed morphologically in the brain by the appearance of numerous, type II Alzheimer cells in striatum, thalamus, cerebellar dentate nucleus and in the bulbar motor nuclei, and to a lesser degree in cerebral cortex and in subcortical white matter. Ammonia level in the blood reached mean values 325 $\mu\text{g}\%$. When α -oxoglutarate was administered for 7 weeks in a dose 14.1 mg/100 g of body weight, the cerebral changes were less marked and were limited to striatum, thalamus, bulbar motor nuclei and dentate nucleus. In blood — ammonia level was 327.0 $\mu\%$ — 199.0 $\mu\text{g}\%$. Reduced intensity of pathological changes in astroglia after α -oxoglutarate application points to the possible protective action of the compound against the development of hepatogenic encephalopathy in *in vivo* conditions. Lack of the effects of the drug on the ammonia level in the blood may suggest that the protective effect of α -oxoglutarate can result from its participation in ammonia metabolism in the nerve tissue.

PISMIENICTWO

1. Caughey W. S., Smiley D., Hellerman L.: α -glutamic acid dehydrogenase: structural requirements for substrate competition: effect of thyroxine. *J. Biol. Chem.* 1957, 224, 591 — 607.
2. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: Type II Alzheimer changes experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. neurol. Sci.* 1971a, 12, 63 — 75.
3. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. *J. neurol. Sci.* 1971b, 12, 241 — 261.
4. Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rat. *Brit. exp. Path.* 1970, 51, 217 — 227.
5. Mondzac A., Ehrlich G. E., Seegmiller J. E.: An enzymatic determination of ammonia in biological fluids. *J. Lab. Clin. Med.* 1965, 66, 526.
6. McDermotte W. Y., Adams R. D.: Episodic stupor associated with Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *J. clin. Invest.* 1954, 88, 1 — 9.
7. Mossakowski M. J.: Some aspects of the morphology and histochemistry of the cerebral changes in hepatic coma. *Proc. V. Intern. Congres Neuropath., Zürich 1965*, Elsevier, Amsterdam 1966a, 981 — 986.
8. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.* 1966b, 4, 231 — 304.
9. Mossakowski M. J.: Badania nad patogenezą uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego w chorobach wątroby. Referat na Sesji Plenarnej Wydziału Nauk Medycznych PAN, 1974 (maszynopis).
10. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath. (Berl.)* 1970a, 16, 1 — 16.
11. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970b, 8, 365 — 374.
12. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Effect of sodium glutamate on the morphology and histochemistry of the experimental gliopathy induced in vitro by ammonia and sodium malonate. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 1 — 9.
13. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 57 — 74.
14. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes induced in vitro by the inhibition of succinic dehydrogenase. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 107 — 114.
15. Rózga J., Paluszkievicz R.: Technika operacyjna zespolenia żyły wrotnej i żyły głównej dolnej u szczurów. Praca w przygotowaniu — 1977.
16. Shorey J., McCandless D., Schenker S.: Cerebral α -ketoglutarate in ammonia intoxication. *Gastroenterology* 1967, 53, 706 — 711.

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

KOMUNIKAT

Stowarzyszenie Neuropatologów Polskich uprzejmie zawiadamia, że Towarzystwo Neuropatologów NRD organizuje Sympozjum na temat:

JATROGENNE USZKODZENIA UKŁADU NERWOWEGO.

Sympozjum odbędzie się 1—3 czerwca 1978 w Schwerin. Zgłoszenia udziału w Sympozjum i 10-minutowych referatów w języku niemieckim, angielskim lub rosyjskim są przyjmowane do 15 października 1977. Należy je nadsyłać na adres organizatora:

Dr med. P. Hackenberg,

Abteilung für Neuropathologie der Bezirksnervenklinik Schwerin.

DDR-27, Schwerin,

Wismarsche Str. 393-395.

ZUZANNA KRASNICKA

WPLYW SUROWICY OD CHORYCH Z ZESPOŁEM MOCZNICOWYM,
MOCZNIKA I KREATYNYNY NA ORGANOTYPOWĄ HODOWLĘ
TKANKI NERWOWEJ

I. BADANIA W MIKROSKOPIE SWIETLNYM

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

Zmiany patologiczne występujące w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym w przebiegu mocznicy są znane od dawna (Bodechtel, Erbslöh 1958). Wiadomo, że u ich podstaw leżą złożone zaburzenia metabolizmu komórkowego, stanowiące następstwo ogólnoustrojowych nieprawidłowości metabolicznych, związanych z upośledzeniem czynności nerek. Podstawowe zaburzenia metaboliczne w mocznicy dotyczą przemiany białkowej. Na skutek wypadnięcia czynności nerek dochodzi do zatrzymywania w ustroju szeregu produktów przemiany białkowej. Występuje retencja mocznika i pochodnych guanidyny, do których należy kreatynina. Zmiany ich zawartości w surowicy krwi chorych z niewydolnością nerek uważane są za wykładnik nasilenia zespołu mocznicowego. Nie wyjaśniono jednak dotychczas zależności między retencją mocznika i kreatyniny a zespołem mocznicowym (Wilson 1971). Jeszcze mniej poznany jest związek między ich gromadzeniem się w ustroju a występowaniem i charakterem strukturalnych uszkodzeń układu nerwowego.

Zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym w mocznicy są nieswoiste, a częste współistnienie nieprawidłowości układu naczyniowego i uszkodzeń naczyńpochodnych utrudnia ocenę wpływu zwiększonej zawartości ciał azotowych na stan tkanki nerwowej (Olsen 1961; Osetowska, Mossakowski 1963). Z tego też względu wydawało się uzasadnione zastosowanie modelu hodowli tkankowej, wykluczające udział czynników związanych z uszkodzeniem naczyń krwionośnych i ich funkcją barierową dla badania wpływu czynników zawartych w surowicy krwi chorych z zespołem mocznicowym na obraz morfologiczny tkanki nerwowej.

Bezpośrednim celem badań była ocena wpływu surowicy od chorych z zespołem mocznicowym na poszczególne elementy komórkowe tkanki nerwowej, utrzymywanej w hodowli *in vitro*. Badania te uzupełniono oceną bezpośredniego działania mocznika i kreatyniny, podawanych do standardowego medium hodowlanego w dawkach odpowiadających ich średniej zawartości w surowicy u chorych z mocnicą.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na organotypowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych, które prowadzono wg standardowej metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Układ grup doświadczalnych przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia

Table 1. Scheme of experiment

Grupa Group	Czynnik uszkadzający Damaging factor	Ilość w medium Content in medium
I	Surowica chorych z mocnicą Serum from uremic patients	50%
II	Mocznik Urea	100 mg%, 200 mg%
III	Kreatynina Creatinine	5 mg%, 10 mg%
IV	Surowica od zdrowych dawców Serum from healthy donors	50%
Kontrola Control		

We wszystkich grupach doświadczalnych stosowano hodowle po 3 tygodniach przeżycia *in vitro*. Czas przetrzymywania hodowli doświadczalnych w środowisku odżywczym zawierającym czynnik(i) o przypuszczalnym działaniu uszkadzającym wynosił 3 doby.

Surowice patologiczne stosowane w I grupie doświadczalnej otrzymano od chorych, przebywających w I Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie (kierownik: prof. dr hab. A. Siciński). Pochodziły one od chorych na przewlekłe kłębkowe zapalenie nerek, z wyjątkiem jednej (surowica nr 3) otrzymanej od pacjenta z zespołem Goodpasture'a. Wszyscy chorzy poddawani byli okresowej dializie pozaustrojowej. Próbkę krwi do hodowli pobierano przed dializą, w okresie wzrostu zawartości mocznika i kreatyniny w surowicy. Charakterystykę stosowanych surowic przedstawia tabela 2.

Tabela 2 Charakterystyka surowic pobranych od pacjentów

Table 2. Characteristics of sera obtained from patients

Lp. No.	Płeć pacjenta Patient's sex	Wiek pacjenta Patient's age	Poziom w surowicy Level in serum	
			mocznika urea	kreatyniny creatinine
1	Ż/F	25	210 mg%	15 mg%
2	Ż/F	30	270 mg%	14 mg%
3	M/M	32	294 mg%	20,5 mg%
4	M/M	25	381 mg%	12,4 mg%
5	M/M	32	366 mg%	14,2 mg%
6	M/M	32	307 mg%	12,4 mg%

W grupie II, w której do standardowego medium odżywczego dodawano egzogeny mocznik, wyodrębniono dwie podgrupy, różniące się jego stężeniem, wynoszącym odpowiednio 100 i 200 mg%.

Podobnie zróżnicowano grupę III, z dodatkiem egzogennej kreatyniny (Sigma). W podgrupie pierwszej stężenie kreatyniny wynosiło 5 mg%, w drugiej — 10 mg%.

Hodowle grupy IV, kontrolnej, prowadzono w standardowym medium odżywczym, równoległe do każdej z trzech grup doświadczalnych.

Hodowle wszystkich trzech grup utrwalano i barwiono błękitem toluidyny. Na materiale utrwalonym wykonano ponadto odczyn PAS oraz barwienie Sudanem czarnym. Na materiale nieutrwalonym wykonano odczyny histochemiczne, ujawniające aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, glutaminianowej i glukozy-6-fosforanowej wg metod omówionych w pracy Mossakowskiego i wsp. (1970).

WYNIKI

Grupa I. Hodowle poddane działaniu surowic od chorych z zespołem mocznicowym, w barwieniu przeglądowym wykazują wyraźne nieprawidłowości strukturalne w porównaniu z hodowlami grupy kontrolnej. Nie stwierdza się jednak uchwytnej zależności między intensywnością zmian patologicznych i ich charakterem, a zawartością mocznika i kreatyniny w zastosowanych surowicach.

Najbardziej uchwytłą nieprawidłowością morfologiczną występującą we wszystkich komórkach glejowych i nerwowych jest obrzmienie ich cytoplazmy. Wymiary komórek są powiększone, a ich profile zaokrąglone. Wypustki komórek nerwowych i glejowych są pogrubiłe. Neurony wykazują cechy tigrolizy. Znaczne obrzmienie komórek glejowych utrudnia niejednokrotnie ich zróżnicowanie morfologiczne. Największe obrz-

mienie występuje jednakże w astrocytach, w ich cytoplazmie stwierdzono liczne wodniczki (ryc. 1). Astrocyty i oligodendrocyty, położone w obwodowej strefie wzrostu wykazują większe nasilenie zmian niż w eksplantacie i w jego bezpośrednim otoczeniu. Występują liczne przerosłe komórki mikrogleju, uwidaczniające się dzięki intensywnemu zabarwieniu ich cytoplazmy. Ilość podziałów komórkowych w populacji glejowej strefy wzrostu jest wyraźnie mniejsza niż w hodowlach kontrolnych. W hodowlach barwionych Sudanem czarnym B stwierdza się cechy uszkodzenia osłonek mielinowych włókien nerwowych. Wyrażają się one obrzmieniem osłonek, prowadzącym niekiedy do ich rozpadu i tworzenia kul mielinowych wzdłuż przebiegu włókien nerwowych (ryc. 2). Zmianom w strukturze mieliny towarzyszy nadmierne gromadzenie się substancji sudanofilnych w cytoplazmie neuronów i komórek glejowych. Zarówno komórki nerwowe jak i oba typy makrogleju gromadzą w cytoplazmie perikarialnej obfite ziarnistości substancji PAS-dodatnich, znacznie liczniejsze niż w odpowiednich hodowlach kontrolnych.

Aktywność badanych dehydrogenaz wykazuje również znaczne nieprawidłowości w porównaniu z materiałem kontrolnym. Uderzająco słaby, a często wręcz ujemny jest odczyn histochemiczny ujawniający aktywność hehydrogenazy bursztynianowej. W licznych hodowlach ujaw-

Ryc. 1. Zwyrrodnienie wodniczkowe i obrzmienie komórek hodowanych z surowicą mocznicową. Nissl. Pow. 400 X.

Fig. 1. Vacuolar degeneration and swelling of cellular elements cultured with uremic serum. Nissl X 400.

Ryc. 2. Obrzmienie i fragmentacja osłonki mielinowej. Hodowla z surowicą mocznicową. Sudan czarny B. Pow. 400 X.

Fig. 2. Swelling and fragmentation of myelin sheath. Culture with uremic serum. Sudan black B. X 400.

Ryc. 3. Śladowa aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach tkanki nerwowej hodowanej z surowicą mocznicową. Pow. 200 X.

Fig. 3. Trace succinic dehydrogenase activity in the cells of nervous tissue cultured with uremic serum. X 200.

Ryc. 4. Zwyrrodnienie wodniczkowe w komórkach hodowli pod wpływem mocznika (200 mg%). Sudan czarny B. Pow. 400 X.

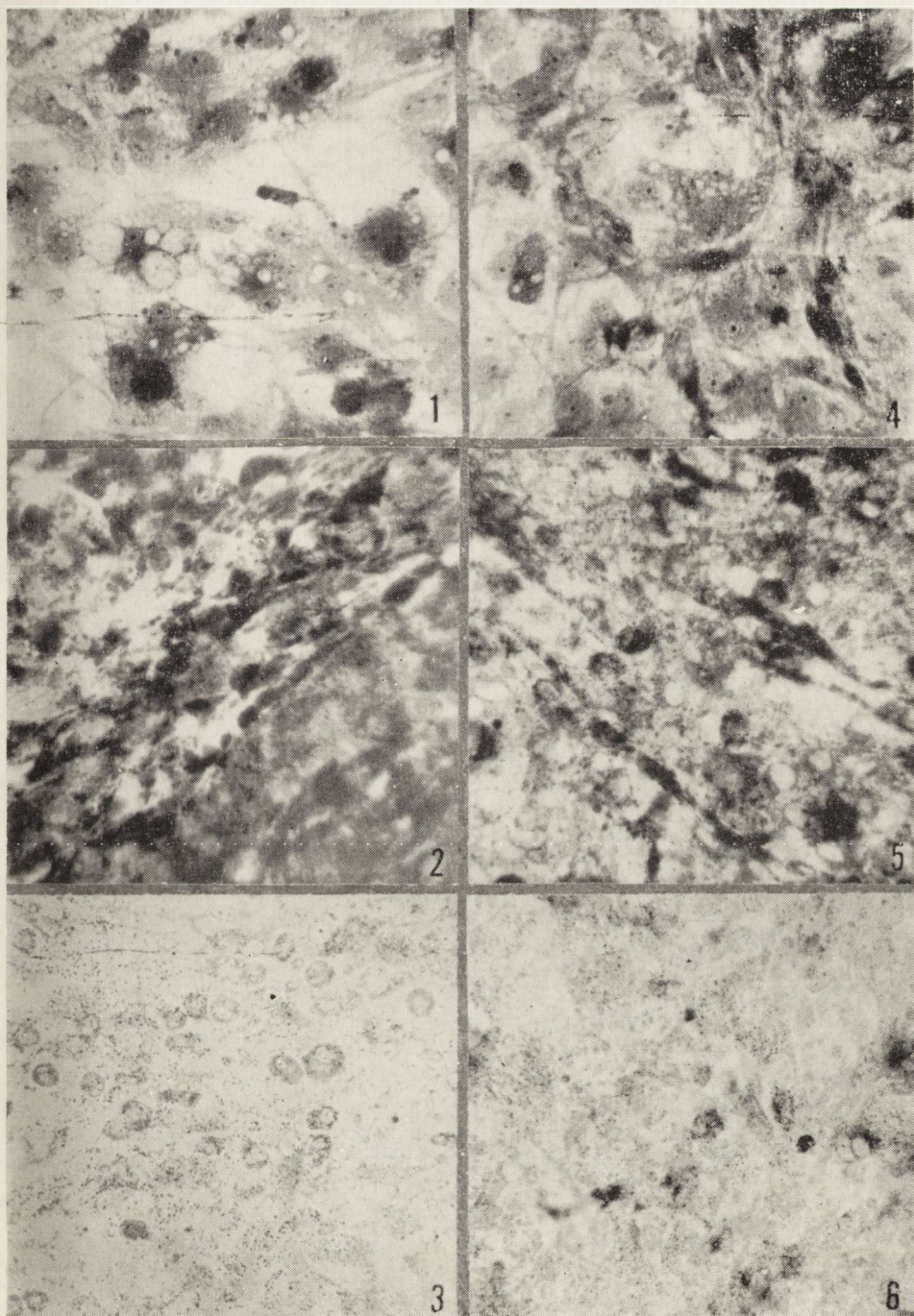
Fig. 4. Vacuolar degeneration in cells cultured with urea (200 mg%). Sudan black B. X 400.

Ryc. 5. Obrzmiałe włókna mielinowe w hodowli z mocznikiem (200 mg%). Pow. 400 X.

Fig. 5. Swollen myelin fibres cultured with urea (200 mg%). X 400.

Ryc. 6. Osłabienie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach tkanki nerwowej hodowanej z mocznikiem (200 mg%). Pow. 400 X.

Fig. 6. Decrease of succinic dehydrogenase activity in the cells of nervous tissue cultured with urea (200 mg%). X 400.



nia się jedynie śladową aktywność tego enzymu zarówno w całej populacji komórek glejowych jak i w neuronach (ryc. 3). Podobnie słaby jest odczyn histochemiczny ujawniający aktywność dehydrogenazy glutaminianowej. Obfite gromadzenie produktów odczynu histoenzymatycznego obserwuje się tylko w pojedynczych komórkach glejowych. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej jest nieznacznie osłabiona. Obrzmiałe komórki glejowe wykazują słabszy odczyn niż komórki nerwowe.

Grupa II. Hodowle poddane działaniu egzogenego mocznika w stężeniu 100 mg% wykazują niewielkie zmiany morfologiczne w stosunku do hodowli kontrolnych. W preparatach barwionych metodą przegładową obserwowano tylko nieznaczne obrzmienie komórek, ograniczone niemal wyłącznie do astrocytów. Nagromadzenie ziarnistości PAS-dodatnich w cytoplazmie komórek glejowych jest znacznie mniejsze niż w grupie I, jakkolwiek większe niż w hodowlach kontrolnych. Barwienie Sudanem czarnym B nie wykazuje nieprawidłowości w strukturze zmielinizowanych włókien nerwowych. Badanie histochemiczne wykazuje osłabienie odczynów ujawniających aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej zarówno w neuronach jak i w gleju. Odczyn na aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej nie wykazuje zmian w stosunku do hodowli kontrolnych.

W hodowlach, w których medium stężenie egzogenego mocznika wynosiło 200 mg% zmiany strukturalne są bardziej nasilone. Wykazują one podobieństwo do nieprawidłowości opisanych w grupie I. Poza obrzmieniem cytoplazmy komórek nerwowych i glejowych stwierdza się liczne komórki ze zwyrodnieniem wodniczkowym. Obfite wodniczki występują przede wszystkim w cytoplazmie astrocytów (ryc. 4). Bardzo obfite jest również gromadzenie ziarnistości PAS-dodatnich w cytoplazmie komórek nerwowych i glejowych. Liczne osłonki mielinowe są odcinkowo obrzmiałe. Często stwierdza się cechy ich rozpadu (ryc. 5).

Odczyny histochemiczne ujawniające aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej są bardzo słabe (ryc. 6). Nieco żywszy odczyn wykazuje aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Intensywność odczynów histoenzymatycznych wydaje się jednak wyższa niż w grupie z surowicą od chorych z zespołem mocznicowym.

Grupa III. Kreatynina podana do medium hodowlanego w stężeniu 5 mg% wywołuje zmiany patologiczne w obrazie morfologicznym hodowli zbliżonym w swoim charakterze i intensywności do nieprawidłowości rozwijających się pod wpływem mocznika w stężeniu 100 mg%. Stwierdza się obrzmienie cytoplazmy komórek glejowych, głównie astrocytów, nieznaczne zwiększenie cytoplazmatycznych ziarnistości PAS-dodatnich, oraz osłabienie intensywności odczynów histochemicznych ujawniają-

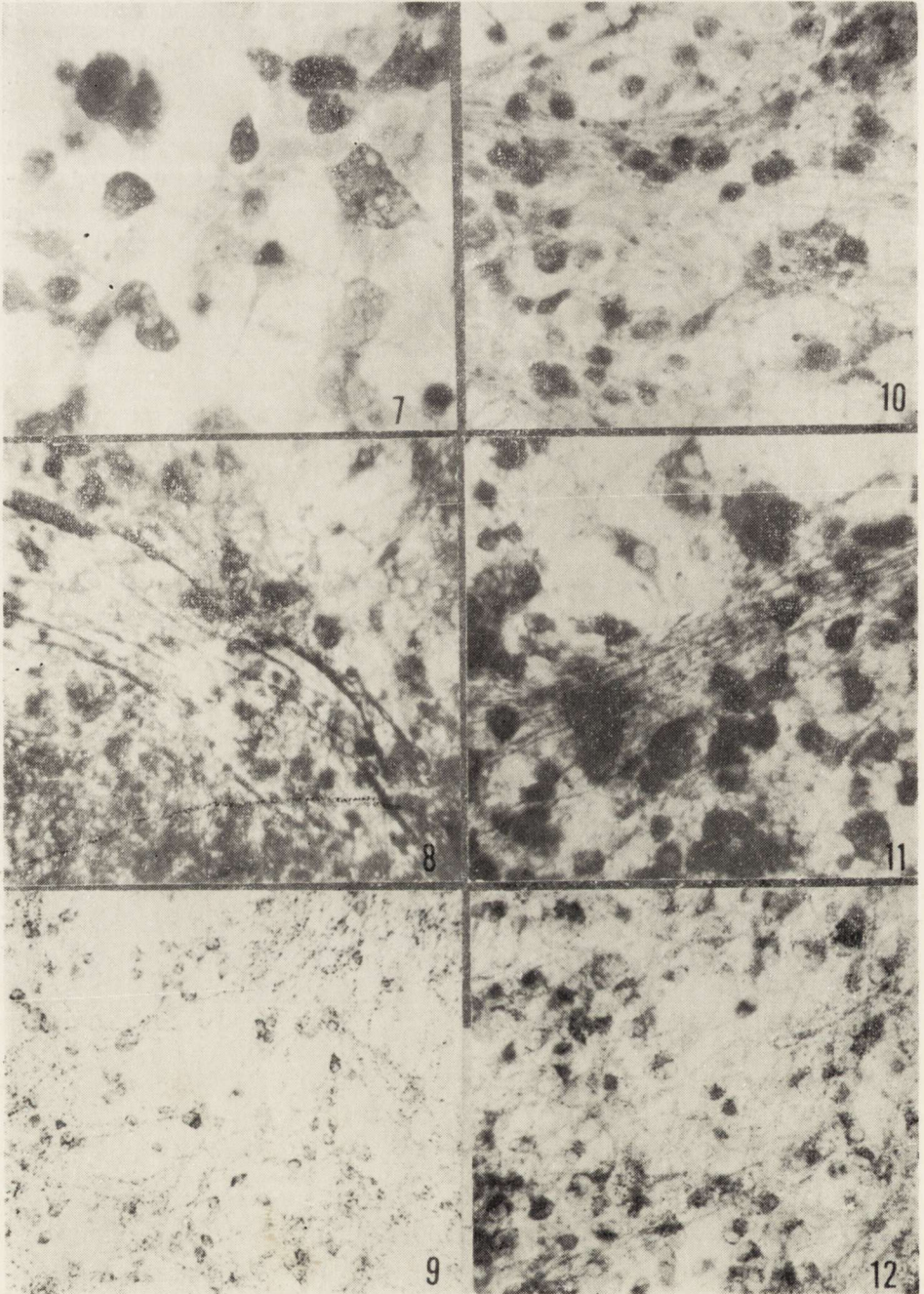
cych aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej. Obraz osłonek mielinowych i aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej nie wykazuje zmian w stosunku do hodowli kontrolnych.

Przy zastosowaniu kreatyniny w stężeniu 10 mg% zmiany patologiczne są bardziej nasilone i zbliżone do nieprawidłowości występujących pod wpływem mocznika w stężeniu 200 mg%. W barwieniu przeglądowym stwierdza się znaczne obrzmienie cytoplazmy komórek nerwowych i glejowych. Cechy zwyrodnienia wodniczkowego występują we wszystkich komórkach, zarówno w gleju (ryc. 7), jak i w neuronach. Ilość cytoplazmatycznych ziarnistości PAS-dodatnich jest większa niż w hodowlach z kreatyniną w stężeniu 5 mg%. Wyraźne jest również uszkodzenie (obrzemie i rozpad) osłonek mielinowych. Komórki glejowe gromadzą obfite ziarnistości sudanofilne (ryc. 8). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminianowej jest wybitnie osłabiona (ryc. 9), podczas gdy odczyn na aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej jest tylko nieznacznie słabszy w porównaniu do kontroli.

Grupa IV. Obraz histologiczny i histochemiczny hodowli kontrolnych nie odbiega od typowego dla organotypowych hodowli pozaustrojowych mózdzku noworodków szczurzych (ryc. 10—12).

OMOWIENIE

Przedstawione obserwacje wskazują, że zarówno surowica od chorych z zespołem mocznicowym jak i egzogeny mocznik i kreatynina, podane do standardowego medium odżywczego, prowadzą do strukturalnych uszkodzeń wszystkich elementów komórkowych pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej. Zwraca uwagę wspólny wzorec zmian morfologicznych we wszystkich grupach doświadczalnych, przy wyraźnym zróżnicowaniu ich nasilenia. Identyeczność zmian patologicznych w hodowlach z egzogenym amoniakiem i kreatyniną i nieprawidłowościami w przypadku stosowania surowic od chorych z zespołem mocznicowym sugeruje patogenetyczną rolę tych właśnie czynników w kształtowaniu uszkodzeń tkanki nerwowej. Największe nasilenie zmian patologicznych w grupie hodowli prowadzonych w surowicach od chorych z mocnicą (stężenie mocznika w medium hodowlanym od 105 mg% do 190 mg%, a kreatyniny 6,2 mg% — 10,2 mg%) może zależeć zarówno od sumującego się działania mocznika i kreatyniny, jak również od uszkadzającego działania innych produktów metabolizmu, występujących w podwyższonym stężeniu w surowicy chorych z mocnicą. Należą do nich w pierwszej kolejności aminy alifatyczne i aromatyczne, peptydy, kwasy organiczne, indole i fenole (Hicks i wsp. 1962; Mütting, Dishuk 1967; Fishman 1970; Gulyassy i wsp. 1970). Na tę możliwość wskazuje brak



zróznicowania nasilenia uszkodzeń tkanki przy stosowaniu surowic o różnej zawartości mocznika i kreatyniny, przy jego obecności w przypadku podawania różnych stężeń samego mocznika lub kreatyniny.

Stwierdzone zmiany patologiczne nie mają charakteru swoistego. Sprowadzają się one do obrzmienia cytoplazmy komórek nerwowych i glijowych, zwyrodnienia wodniczkowego, głównie astrocytów, nadmiernego gromadzenia ziarnistości PAS-dodatnich oraz częściowego rozpadu osłonek mielinowych. Towarzyszy im znaczny spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej oraz mniej nasilone obniżenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Charakter zmian strukturalnych, a przede wszystkim obrzmienie komórek oraz wzmożone gromadzenie ziarnistości PAS-dodatnich w ich cytoplazmie wskazuje na upośledzenie przepuszczalności błon komórkowych (Renkawek 1972; Mossakowski, Gajkowska 1976). Spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej, przy stosunkowo małym upośledzeniu aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej może z kolei być uznany za wykładnik uszkodzenia mitochondriów.

Nieprawidłowości strukturalne dotyczą wszystkich rodzajów komórek występujących w hodowli. O ile jednak zmiany patologiczne w komórkach nerwowych i neurogleju mają charakter zmian wstecznych, o tyle komórki mikrogleju reagowały na działanie zastosowanych czynników uszkadzających transformacją typu progresywnego — przerostem komórkowym. Ta odmienność reakcji mikrogleju znana jest również z neu-

Ryc. 7. Zwyrodnienie wodniczkowe w różnych typach komórek hodowli tkanki nerwowej po podaniu do medium kreatyniny (10 mg%). Nissl. Pow. 400 ×.

Fig. 7. Vacuolar degeneration in various types of cells of nervous tissue cultured in medium with creatinine (10 mg%). Nissl. × 400.

Ryc. 8. Obrzmienie osłonki mielinowej w tkance nerwowej hodowanej z kreatyniną (10 mg%). Sudan czarny B. Pow. 400 ×.

Fig. 8. Swelling of myelin sheath of nervous tissue cultured with creatinine (10 mg%). Sudan black B. × 400.

Ryc. 9. Osłabiona aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w tkance nerwowej po dodaniu do medium kreatyniny (10 mg%). Pow. 200 ×.

Fig. 9. Decreased succinic dehydrogenase activity in nervous tissue cultured in creatinine containing medium (10 mg%). × 200.

Ryc. 10. Hodowla kontrolna. Nissl. Pow. 400 ×.

Fig. 10. Control culture. Nissl × 400.

Ryc. 11. Hodowla kontrolna. Sudan czarny B. Pow. 400 ×.

Fig. 11. Control culture. Sudan black B. × 400.

Ryc. 12. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach tkanki nerwowej hodowanej w warunkach standardowych. Pow. 200 ×.

Fig. 12. Succinic dehydrogenase activity in the cellular elements of nervous tissue cultured in standard condition. × 200.

ropatologii klinicznej i innych modeli doświadczalnych *in vitro*, takich jak między innymi niedotlenienie lub nadotlenienie (Kraśnicka, Renkawk 1969). Obserwacje dotyczące zróżnicowania nasilenia zmian w zależności od stężenia mocznika i kreatyniny w II i w III grupie doświadczalnej wskazują, że komórki neurogleju — astrocyty i oligodendrocyty są uszkodzone wcześniej i głębiej niż komórki nerwowe. Wydaje się przeto uzasadnione wiązać uszkodzenia osłonek mielinowych z pierwotnym uszkodzeniem oligodendrocytów, komórek o wysokim metabolizmie tlenowym. Wybitny spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej może być natomiast uznany za wskaźnik upośledzenia glikolizy tlenowej. Równoczesność uszkodzeń komórek nerwowych każe jednakże wziąć pod uwagę możliwość wtórnego w stosunku do nich rozpadu mieliny. Zagadnienie to powinny rozstrzygać badania mikroskopowo-elektronowe. Na podkreślenie zasługuje jednakże fakt, że zmiany morfologiczne i histochemiczne stwierdzone w przedstawionym materiale są w swoim ogólnym wzorcu zbliżone do nieprawidłowości rozwijających się w hodowli tkanki nerwowej w warunkach niedotlenienia (Kraśnicka, Renkawk 1972; Kraśnicka i wsp. 1976) i w zatruciu cyjankami (Mossakowski, Gajkowska 1976).

Można również przeprowadzić pewne analogie między uszkodzeniem stwierdzonym w hodowli tkankowej a zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym, występującymi u chorych z mocznicą. Do najczęstszych nieprawidłowości neuropatologicznych w mocznicy zalicza się obrzęk mózgu, glejozę, nieswoiste zwyrodnienie neuronów oraz demielinizację, występującą w przypadkach o przebiegu przewlekłym (Knutson, Baker 1945; Olsen 1961; Osetowska, Mossakowski 1963). Ich odpowiednikami *in vitro* jest uogólnione obrzmienie komórek oraz uszkodzenie osłonek mielinowych. Zwyrodnienie wodniczkowe, charakterystyczne dla materiału *in vitro*, w przypadkach klinicznych opisywano jedynie w komórkach nabłonka spłotów naczyniastych (Monakow 1923, cyt. za Bodchtelem i Erbslöh'em 1958). W hodowli pozaustrojowej natężenie uszkodzeń komórkowych jest ogólnie większe niż w materiale klinicznym, co odnieść należy zapewne w pierwszej kolejności do bezpośredniej ekspozycji elementów komórkowych *in vitro* na działanie czynników uszkadzających.

W świetle przedstawionych danych można uznać, że czynnik lub czynniki odpowiedzialne za uszkodzenie tkanek ośrodkowego układu nerwowego w mocznicy znajdują się w surowicy krwi. Ich rolę mogą spełniać zarówno mocznik jak i kreatynina. Poglądy na ich patogenetyczne znaczenie w mocznicy są zróżnicowane. Gilboe i Javid (1964) wiążą występowanie objawów toksycznych w mocznicy z retencją mocznika.

Wykazali oni, że mocznik ulega przemianie w cyjaniany oraz, że zarówno mocznik jak i cyjaniany pogłębiają objawy mocznicowe i przyspieszają zejście śmiertelne u zwierząt doświadczalnych. Mocznik okazał się inhibitorem szeregu układów enzymatycznych, między innymi oksydazy monoaminowej i oksydazy ksyntynowej (Rajagapalan i wsp. 1961; Giordano 1963). Giovannetti i wsp. (1970) oraz Balestri i wsp. (1970) wykazali zależność przyczynową między stężeniem mocznika a zahamowaniem zużycia glukozy w mocznicy.

W chwili obecnej większość autorów podstawowe znaczenie patogenezy przypisuje działaniu pochodnych guanidyny, do których należy kreatynina. Wykazano niewątpliwą korelację między wysokim stężeniem kreatyniny w surowicy krwi a nasileniem objawów mocznicowych (Olsen 1961; Giordano 1963; Giovannetti i wsp. 1969). Wydaje się przeto uzasadnione przyjęcie roli patogenezy mocznika i kreatyniny w uszkodzeniach tkanki ośrodkowego układu nerwowego w mocznicy, na co wskazują przedstawione badania, pomimo że mechanizm działania obu związków pozostaje nadal nie wyjaśniony.

Autorka składa wyrazy podziękowania st. technikowi p. Janinie Zak za pomoc przy technicznym opracowywaniu materiału doświadczalnego.

З. Красьницка

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ С УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, МОЧЕВИНЫ И КРЕАТИНИНА НА ОРГАНОТИПИЧЕСКУЮ КУЛЬТУРУ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Резюме

Исследование влияние сыворотки больных с уремическим синдромом на нервную ткань в культуре *in vitro*. В параллельных экспериментальных группах исследовали непосредственное действие мочевины и креатинина, добавленных к стандартной среде в дозах, отвечающих их среднему содержанию в сыворотке больных уремией.

Выявлена общая картина морфологических и ферментативных изменений во всех экспериментальных группах под действием сыворотки больных с уремиическим синдромом, под действием мочевины и креатинина. Наибольшая интенсивность изменений установлена в группе культур, выращиваемых в среде, содержащей сыворотку больных уремией. Патологические изменения заключались, главным образом, в набухании и вакуолизации нервных и глиевых клеток, чрезмерном скоплении PAS-положительных зернистостей, а также в частичном распаде миелина. Установлено также значительное ослабление активности исследованных ферментов, особенно сукцинат- и глутаматдегидрогеназы. Морфологические и гистохимические изменения, вызванные уремиическими токсинами, подобны тем аномалиям, которые развиваются в культуре нервной ткани в условиях гипоксии и при отравлении цианидом.

Z. Kraśnicka

EFFECT OF HUMAN UREMIC SERUM AND UREA OR CREATININE
CONTAINING SERUM ON ORGANOTYPIC NERVOUS TISSUE CULTURE

Summary

The study on the effect of serum from patients with uremia on the nervous tissue cultured *in vitro* was performed. Parallel experimental groups concerned immediate action of urea and creatinine added to standard medium at the doses corresponding to their mean content in the blood of patients affected with uremia.

Common pattern of morphologic and enzymatic alterations resulting from the action of uremic patients serum and from the addition of urea or creatinine was established. Most intense changes were found in the group of cultures with added human uremic serum. Pathological changes were expressed mainly by the swelling and vacuolar degeneration of neurons and glial cells, excessive accumulation of PAS-positive granules and by partial myelin degeneration. Marked decrease of enzyme activities, in particular of succinic and glutaminic dehydrogenases was also demonstrated. Morphological and histochemical changes caused by uremic toxins are closely related to abnormalities found in the nervous tissue cultured in hypoxic condition and during cyanide intoxication.

PIŚMIENNICTWO

1. Balestri P. L., Biagini M., Rindi P., Giovannetti S.: Uremic toxins. *Arch. Intern. Med.* 1970, 126, 843 — 845.
2. Bodechtel G., Erbslöh F.: Die Veränderungen des Zentralnervensystems bei Nierenkrankheiten. W.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Springer, 1958, XIII, 2B, 1392—1427.
3. Gilboe D. D., Javid M. J.: Breakdown products of urea and uremic syndrome. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964, 115, 633 — 637.
4. Giordano G.: Use of exogenous and endogenous urea for protein synthesis in normal and uremic subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 1963, 62, 231 — 246.
5. Giovannetti S., Biagini M., Balestri P. L., Navalesi Giagnoni P., Matteis A., Ferro-Milone P., Perfitti C.: Uremialike syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine. *Clin. Sci.* 1969, 36, 445 — 452.
6. Giovannetti S., Balestri P. L., Biagini M., Menichini G., Rindi P.: Implications of dietary therapy. *Arch. Intern. Med.* 1970, 126, 900 — 905.
7. Gulyassy P. F., Aviram M., Peters J. H.: Evaluation of amino acid and protein requirements in chronic uremia. *Arch. Intern. Med.* 1970, 126, 855 — 859.
8. Fishman R. A.: Permeability changes in experimental uremic encephalopathy. *Arch. Intern. Med.* 1970, 126, 835 — 837.
9. Hicks J. M., Young D. S., Wootton I. D. P.: Abnormal blood constituents in acute renal failure. *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 623 — 633.
10. Knutson J., Baker A. B.: The central nervous system in uremia. *Arch. Neurol.* 1945, 54, 130 — 140.
11. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397 — 408.

12. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 507 — 518.
13. Kraśnicka Z., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Effect of shortlasting anoxia on *in vitro* culture of cerebellum. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 11 — 22.
14. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Morfologia i histochemia mikrogleju w hodowli tkankowej w warunkach prawidłowych i patologicznych. *Neuropat. Pol.* 1969, 9, 73 — 90.
15. Monakow P.: cyt. za Bodechtel G., Erbslöh F. — poz. 2 piśmien.
16. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1970, 16, 1 — 16.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 441 — 449.
18. Mütting. D., Dishuk B. D.: Free amino acids in serum, cerebrospinal fluid and urine in renal disease with and without uremia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967, 126, 754 — 758.
19. Olsen S.: The brain in uremia. *Acta Psych. Neurol. Scand.* 1961, 36, Suppl. 156, 1 — 126.
20. Osetowska E., Mossakowski M. J.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w stanach mocznicowych. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 101 — 122.
21. Rajagapalan K. V., Fridovich I., Handler P.: Competitive inhibition of enzyme activity by urea. *J. Biol. Chem.* 1961, 236, 1059 — 1065.
22. Renkawek K.: On the histochemical and enzymatic differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307 — 315.
23. Wilson D. M.: Metabolic abnormalities in uremia. *Med. Cl. North. Am.*, 1971, 55, 1381 — 1396.

Adres autorki: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-874 Warszawa.

KRYSTYNA RENKAWEK

SYNTEZA DNA W PROCESIE DOJRZEWANIA I WZROSTU
KOMÓREK GLEJOWYCH W HODOWLI ORGANOTYPOWEJ
MÓZDŻKU SZCZURA *IN VITRO*

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

W dojrzewającym układzie nerwowym występuje znaczna proliferacja komórek glejowych, której wskaźnikiem może być oznaczenie wbudowywania radioaktywnych prekursorów DNA do jąder komórkowych. W pierwszym okresie po urodzeniu synteza DNA w komórkach glejowych jest znacznie nasiloną do 20 dnia życia, po czym liczba komórek dzielących się gwałtownie maleje, co mogłoby świadczyć o uzyskaniu przez nie pełnej dojrzałości (Dalton i wsp. 1968; Gilmore 1971).

Syntezę DNA w komórkach glejowych obserwowano również w dojrzałym układzie nerwowym w procesie odnowy komórkowej oraz w gleju reaktywnym występującym w różnorodnych warunkach patologicznych (Hain i wsp. 1960; Altman 1962; Korr i wsp. 1973; Kraus-Ruppert 1975).

Badanie wbudowywania znakowanej tymidyny przez komórki w organotypowej hodowli tkanki nerwowej *in vitro* daje możliwość obserwacji intensywności podziałów komórkowych, które są charakterystyczne zarówno dla gleju dojrzewającego jak i dla gleju odczynowego.

Celem pracy była ocena syntezy DNA w komórkach glejowych w zależności od wieku hodowli oraz porównanie nasilenia podziałów komórkowych w eksplantacie i w strefie wzrostu hodowli.

MATERIAŁ I METODY

Hodowle tkankowe zakładano z mózdków noworodków szczurzych w komorach Maximova według techniki podanej w pracy Alleraud, Murray (1968). Płyn hodowlany składał się z równych części surowicy cielej, ekstraktu embrionalnego z 9-dniowych zarodków kurzych, płynu wieloelektrolitowego Earle'a i 20% glukozy w stężeniu końcowym

*) Badania autoradiograficzne wykonano w Department of Neuropathology and Neuromorphological Sciences NINDS, NIH, Bethesda, USA.

w medium 600 mg%. Hodowle inkubowano w temperaturze 36°C i obserwowano codziennie od 1 do 35 dnia wzrostu. Medium hodowlane zmieniane było 2 razy w tygodniu po uprzednim wypłukaniu hodowli w płynie wieloelektrolitowym.

Badania autoradiograficzne prowadzone były na hodowlach od 3 dnia do 5 tygodnia wzrostu. Hodowle płukano dwukrotnie w ciągu 10 minut w płynie wieloelektrolitowym (bez dodatku fenolu), a następnie do medium hodowlanego dodano ³H-tymidynę w stężeniu 1 μCi/ml medium (aktywność właściwa — 5000 mCi/mM). Hodowle inkubowano w medium z tymidyną przez 8 godzin w temperaturze 36°C, następnie płukano 5 minut w płynie wieloelektrolitowym i utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego, kwasu octowego lodowatego i formaliny w stosunku 85 : 5 : 10 przez 30 minut. Utrwalone hodowle były pokrywane płynną emulsją (Ilford L4) i po wysuszeniu eksponowane w ciemności w temperaturze 4°C przez 7 dni. Autoradiogramy wywoływano używając roztworu Kodak K-19, a następnie po 5-minutowym płukaniu w wodzie destylowanej preparaty utrwalano w 30% tiosiarczanie sodu. Autoradiogramy barwiono hematoksyliną-eozyną.

W każdej hodowli w eksplantacie i w strefie wzrostu obliczano odsetek komórek nad jądrami których znajdowały się w emulsji fotograficznej ziarna srebra. W każdej hodowli oceniano 400 komórek glejowych zarówno w eksplantacie jak i rosnących na obwodzie.

WYNIKI

Zestawienie porównawcze otrzymanych wyników wbudowania ³H-tymidyny do jąder komórek glejowych w czasie 8-godzinnej inkubacji hodowli z izotopem zamieszczono w tabeli zbiorczej (tabela 1).

W hodowlach 3-dniowych i 1-tygodniowych komórki glejowe w eksplantacie ściśle przylegały do siebie tworząc mniejsze lub większe skupienia między neuronami. Zarówno w eksplantacie jak i w komórkach wyrastających z eksplantowanej tkanki ziarna srebra były obecne wyłącznie nad jądrami komórek glejowych. Odsetek znakowanych komórek glejowych w eksplantacie był niski i wynosił odpowiednio 8% i 7%. W strefie wzrostu hodowli liczba znakowanych jąder glejowych była znacznie wyższa i wynosiła 22% oraz 27% (ryc. 1).

W hodowlach 2-tygodniowych proporcja znakowanych komórek glejowych w eksplantacie była podobna jak w hodowlach młodszych, wynosząc 8% wszystkich liczonych komórek glejowych (ryc. 2). W strefie wzrostu zarówno w bezpośrednim sąsiedztwie eksplantatu jak i w znacznej odległości od niego ilość radioaktywnych jąder glejowych była znacznie wyższa (51%). Liczba znakowanych komórek glejowych znajdujących się w strefie wzrostu była niemal dwukrotnie większa niż w ho-

Tabela 1. Synteza DNA w komórkach glejowych w hodowli organotypowej mózdzku szczura *in vitro*.

Table 1. DNA synthesis in glial cells in organotypic rat cerebellar tissue culture

Wiek hodowli Age of culture	Odsetek komórek znakowanych po 8 godz. inkubacji z ^3H tymidyną % of labelled cells with ^3H thymidine after 8 h incubation	
	Eksplantat Explant	Strefa wzrostu Outgrowth
3 dni 3 days	8	22
1 tydzień 1 week	7	27
2 tygodnie 2 weeks	8	51
3 tygodnie 3 weeks	9	50
4 tygodnie 4 weeks	21	48
5 tygodni 5 weeks	18	56

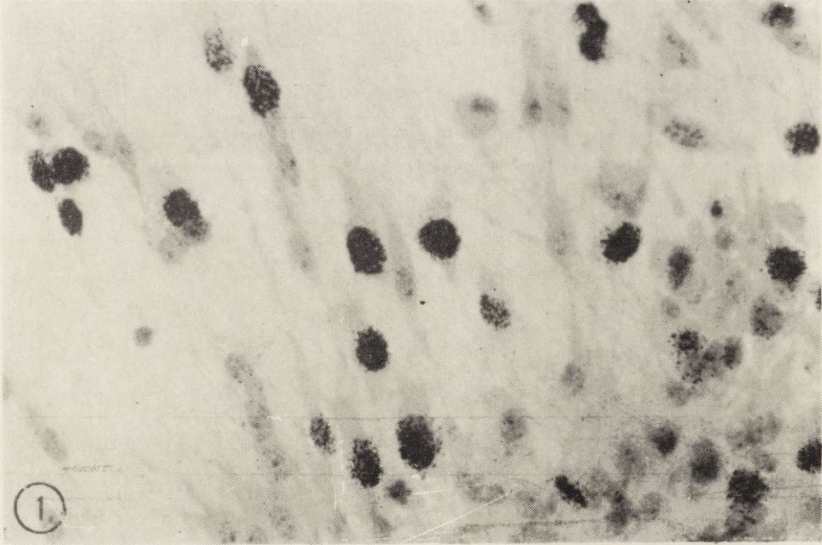
dowlach 1-tygodniowych. Nie obserwowano istotnych różnic między wbudowywaniem tymidyny do jąder astrogleju i oligodendrogleju. Rozproszone ziarna srebra były również widoczne nad jądrami fibroblastów.

W hodowlach 3-tygodniowych ilość znakowanych komórek glejowych w eksplantacie była również niewielka (9%), natomiast w całej strefie wzrostu wbudowywanie tymidyny do jąder glejowych stwierdzono w 50% populacji komórek glejowych. Wydaje się, że komórki oligodendrogleju w większym stopniu wbudowywały izotop do DNA jądrowego, o czym świadczy większe nagromadzenie ziaren srebra w porównaniu z komórkami astrogleju (ryc. 3 i 4).

Hodowle starsze, 4-tygodniowe charakteryzujące się mniejszym zagęszczeniem w eksplantacie zarówno komórek nerwowych jak i komórek glejowych wykazywały znacznie wyższy odsetek znakowania ^3H -tymidyną (21%), niż w hodowlach młodszych, natomiast nie było istotnych różnic w porównaniu z hodowlami 2- i 3-tygodniowymi w strefie wzrostu hodowli (48%). Podobne wartości znakowanych komórek stwierdzono w hodowlach 5-tygodniowych — w eksplantacie 18% i w strefie wzrostu 56%.

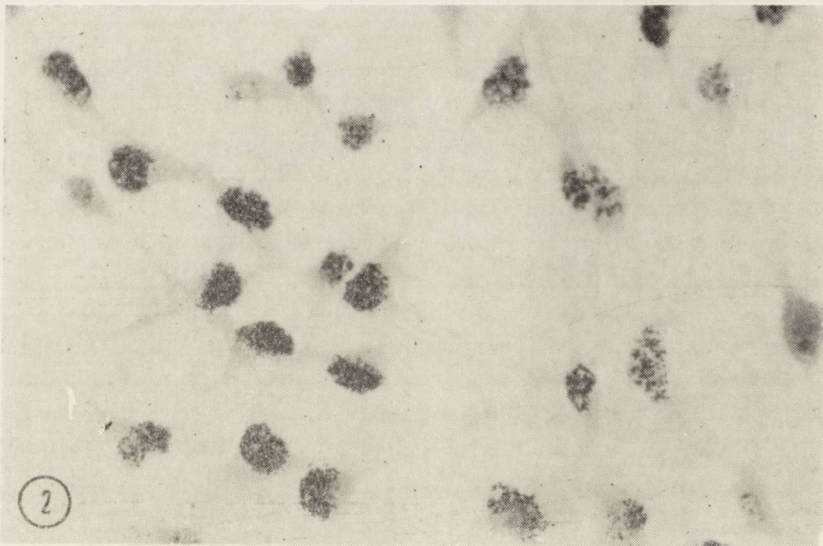
OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wbudowywanie radioaktywnej tymidyny do jąder komórkowych zostało stwierdzone w hodowlach zarówno w eksplantacie, jak i w bezpośrednio otaczającej go strefie wzrostu oraz w znacznej odległości od



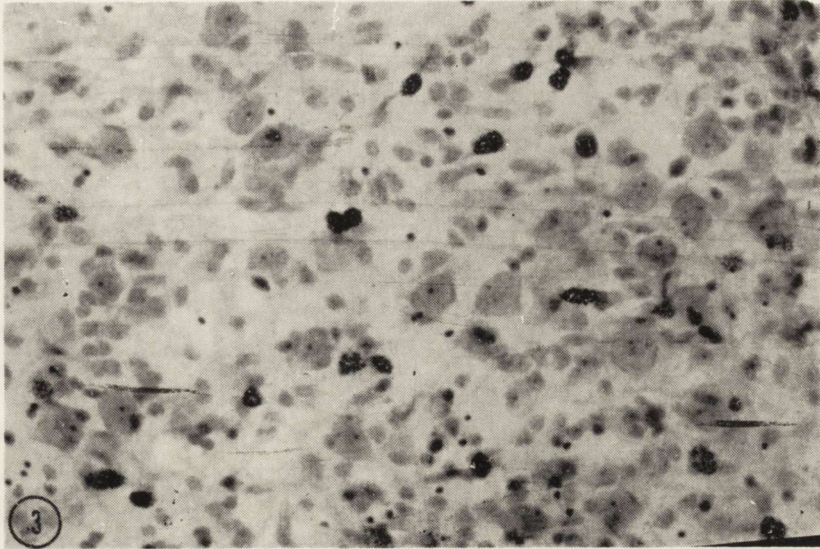
Ryc. 1. Autoradiogram 1 tyg. hodowli po 8 godz. inkubacji z ³H tymidyną. W strefie wzrostu hodowli nieodróżnicowane komórki glejowe wykazują nasiloną syntezę DNA w porównaniu z komórkami w eksplantacie. H. E. Pow. 350 ×.

Fig. 1. Autoradiogram of 1 week old culture. Eight hours incubation with ³H thymidine. Extensive DNA synthesis in poorly differentiated glial cells in the outgrowth in comparison to glial cells in the explant. H. E. × 350.



Ryc. 2. Autoradiogram 2 tyg. hodowli po 8 godz. inkubacji z ³H tymidyną. Ziarna srebra nad większością komórek astrogleju i oligodendrogleju w strefie wzrostu hodowli. H. E. Pow. 350 ×.

Fig. 2. Autoradiogram of 2 week old culture. Eight hours incubation with ³H thymidine. Numerous labelled astroglial and oligodendroglial cells in the outgrowth. H. E. × 350.



Ryc. 3. Autoradiogram 3 tyg. hodowli po 8 godz. inkubacji z ^3H tymidyną. Liczne nieznakowane komórki nerwowe w eksplantacie, pojedyncze komórki glejowe z ziarnami srebra nad jądrami komórkowymi. H. E. Pow. 160 \times .

Fig. 3. Autoradiogram of 3 week old culture. Eight hours incubation with ^3H thymidine. Numerous unlabelled neurons and a few glial cells labelled with thymidine in the explant. H. E. \times 160.



Ryc. 4. Autoradiogram 3 tyg. hodowli po 8 godz. inkubacji z ^3H tymidyną. Znakowana płytka metafazowa w komórce glejowej; liczne ziarna srebra nad jądrami komórek gleju, bardziej rozproszone nad jądrami fibroblastów. H. E. Pow. 350 \times .

Fig. 4. Autoradiogram of 3 week old culture. Eight hours incubation with ^3H thymidine. Glial cell in metaphase stadium labelled with thymidine; abundant silver grains above glial nuclei, more dispersed above fibroblasts nuclei. H. E. \times 350.

eksplantatu. Ziarna srebra były widoczne nad jądrami komórek glejowych, pojedynczymi fibroblastami i makrofagami. W żadnym typie komórek nerwowych (komórki Purkinjego, komórki warstwy ziarnistej) nie stwierdzono wbudowywania tymidyny bez względu na stopień dojrzałości hodowli (3 dni—5 tygodni). Brak znakowania komórek nerwowych przemawia za ukończoną neuronogenezą mózdzku noworodka szczura przy postępującym dalej procesie dojrzewania neuronów *in vitro*. Komórki glejowe wykazują od pierwszych dni wzrostu w hodowli intensywną syntezę DNA. Ilość znakowanych jąder glejowych różni się znacznie w eksplantacie i w strefie wzrostu hodowli. W eksplantatach do 3 tygodnia wzrostu *in vitro* liczba znakowanych komórek glejowych jest niska, natomiast w hodowlach starszych w których ułożenie komórek jest znacznie luźniejsze odsetek komórek znakowanych wzrasta dwukrotnie.

Podobną zależność liczby znakowanych jąder glejowych od zagęszczenia komórek obserwuje się w strefie wzrostu. W hodowlach mózdzku prowadzonych do 7 dnia strefa wzrostu jest stosunkowo wąska; komórki glejowe wzrastające ku obwodowi dość ściśle przylegają do siebie. Odsetek komórek glejowych syntetyzujących DNA w tych hodowlach był w przybliżeniu dwukrotnie niższy niż w hodowlach 2- do 5-tygodniowych, w których komórki glejowe leżą w pojedynczej warstwie w dużym rozproszeniu, łącząc się jedynie wypustkami. Powiązanie pomiędzy stopniem syntezy DNA przez komórki w hodowli, a ich zagęszczeniem może odpowiadać obserwowanemu w hodowlach jednowarstwowych zjawisku „contact inhibition”. Zmniejszenie syntezy DNA przez komórki glejowe *in vitro* w miarę wzrostu zagęszczania komórek zaobserwował Lindgren i Westermarck (1976) w hodowanym gleju ludzkim.

Przedstawione obserwacje wskazują na bardzo znaczną zdolność komórek glejowych do syntezy DNA i podziałów komórkowych, dotyczącą zarówno astrogleju jak i oligodendrogleju. Jednakże nasilenie syntezy DNA w komórkach w hodowlach 1-tygodniowych i w hodowlach po 5 tygodniach wzrostu nasuwa pytanie, czy glej w warunkach *in vitro* ulega stopniowemu dojrzewaniu, czy też utrzymuje cechy gleju niezróżnicowanego w ciągu całego okresu obserwacji *in vitro*.

Z prac prowadzonych nad rozwojem histogenetycznym mózdzku *in vivo* wynika, że intensywna synteza DNA jest charakterystyczna dla dojrzewających komórek glejowych jak również związana jest z mielinizacją układu nerwowego (Fujita i wsp. 1966; Biesold i wsp. 1976). W większości struktur mózgowych różnicowanie gleju zostaje zakończone w pierwszych 3 tygodniach po urodzeniu zwierząt (Dalton i wsp.

1968; Gilmore 1971). Szereg autorów obserwował jednak odnowę gleju również u dorosłych zwierząt w mózdzku i w okolicy podwyściółkowej komór bocznych, wiążąc stwierdzaną proliferację gleju z przetrwaniem komórek macierzy w dojrzałym mózgu lub z zachowaniem prekursorów komórek glejowych (Altman 1966; Korr i wsp. 1973; Kraus-Ruppert i wsp. 1975). Dużą zdolność do syntezy DNA i proliferacji ma również glej reaktywny w uszkodzonym układzie nerwowym (Altman 1962).

Przedstawione obserwacje wskazują, że synteza DNA jest bardzo nasilona również w hodowlach po 3 tygodniach wzrostu hodowli, a więc w tym okresie, w którym dojrzewanie gleju *in situ* jest ukończone. Podziały komórek glejowych są liczne zarówno w eksplantacie jak i w strefie wzrostu. Na podstawie badań autoradiograficznych nie można jednoznacznie rozstrzygnąć, czy glej *in vitro* jest glejem niedojrzałym, czy też ma jedynie cechy gleju reaktywnego. Z uprzednio prowadzonych badań wynika, że tkanka glejowa hodowana *in vitro* ma morfologiczne i histoenzymatyczne właściwości gleju reaktywnego (Kraśnicka, Mossakowski 1965; Renkawek 1972). Podział komórek glejowych i synteza DNA mogą w warunkach *in vitro* być związane zarówno z dojrzewaniem komórek glejowych z ich pierwotnych prekursorów w eksplantowanej tkance, jak i z nabywaniem przez nie właściwości gleju reaktywnego.

К. Ренкавек

СИНТЕЗ ДНК В ПРОЦЕССЕ СОЗРЕВАНИЯ И РОСТА ГЛИЕВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ *IN VITRO*

Резюме

Исследовали синтез ДНК в органоטיפических культурах мозжечка, давая тимидин, меченый тритием в концентрации 1 мккюри/мл среды. Включение изотопа в клеточные ядра глии было отмечено как в эксплантате (7—21%), так и в зоне роста культуры (22—56%). Установлена зависимость синтеза ДНК от возраста культуры и степени концентрации клеток в зоне роста. Результаты работы указывают на значительную способность глиевых клеток к синтезу ДНК, свидетельствующую как о созревании глии, так и о реактивном характере глии *in vitro*.

K. Renkawek

DNA SYNTHESIS DURING DEVELOPMENT AND PROLIFERATION OF GLIAL CELLS IN ORGANOTYPIC RAT CEREBELLAR CULTURE

Summary

DNA synthesis was investigated in glial cells *in vitro* with ^3H thymidine in concentration 1 $\mu\text{Ci/ml}$ medium. Incorporation of isotope into the glial nuclei has been found both in the explant (7—21%) and in the outgrowth (22—56%). DNA

synthesis was dependent on the age of culture and due to the contact inhibition in the outgrowth. Results point out that marked DNA synthesis is a characteristic feature of glia differentiation and of reactive character of glial cells *in vitro*.

PISMIENNICTWO

1. Allerand C. D., Murray M. R.: Myelin formation *in vitro*. Endogenous influences on cultures of newborn mouse cerebellum. *Arch. Neurol.* 1968, 19, 292—301.
2. Altman J.: Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp. Neurol.* 1962, 5, 302—318.
3. Altman J.: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neur.* 1966, 128, 431—474.
4. Biesold D., Brückner G., Mares V.: An autoradiographic study of gliogenesis in the rat lateral geniculate nucleus (LGN). *Brain Res.* 1976, 104, 295—301.
5. Dalton M. M., Hammes O. R., Leblond C. P.: Correlation of glial proliferation with age in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 1968, 134, 397—400.
6. Fujita S., Shimada M., Nakamura T.: ³H thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 1966, 128, 191—208.
7. Gilmore A.: Neuroglial population in the spinal white matter of neonatal and early postnatal rats — an autoradiographic study of numbers of neuroglia and changes in their proliferative activity. *Anat. Rec.* 1971, 171, 283—292.
8. Hain R. F., Rieke W. O., Everett N. B.: Evidence of mitosis in neuroglia as revealed by radioautography employing tritiated thymidine. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1960, 19, 147—148.
9. Korr H., Schultze B., Maurer W.: Autoradiographic investigations of glial proliferation in the brain of adult mice. I. The DNA synthesis phase of neuroglia and endothelial cells. *J. Comp. Neurol.* 1973, 150, 169—176.
10. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—408.
11. Kraus-Ruppert R., Laissue J., Bürki H., Odartchenko N.: Kinetic studies on glial, Schwann and capsular cells labelled with ³H thymidine in cerebrovascular tissue of young mice. *J. Neurol. Sci.* 1975, 26, 555—563.
12. Lindgren A., Westermark B.: Subdivision of the G1 phase human glia cells in culture. *Exp. Cell Res.* 1976, 99, 357—362.
13. Renkawek K.: On the histochemical and enzymo-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307—315.

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

ALEKSANDRA KRYGIER-STOJAŁOWSKA, JERZY KULCZYCKI
MIROŚLAW MADEJ, PRZEMYSŁAW NOWACKI, KRYSZYNA HONCZARENKO

ILOŚĆ DNA W KOMÓRKACH NERWOWYCH I GLEJOWYCH
MÓZGU CZŁOWIEKA OZNACZANA METODĄ
CYTOFOTOMETRYCZNĄ

DONIESIENIE WSTĘPNE

Pracownia Patologii Komórki Zakładu Anatomii Patologicznej
Instytutu Biostruktury Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin
Pracownia Neuropatologii Kliniki Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

W ciągu ostatnich 10 lat zwrócono uwagę na pojawianie się poliploidalnej ilości DNA w jądrach komórek niektórych narządów ludzi i zwierząt. Uprzednio znano występowanie komórek o poliploidalnej ilości DNA w tkance wątroby (Sandritter i wsp. 1963). Inną tkanką, w której stwierdzono występowanie poliploidalnych jąder komórkowych jest mięsień sercowy człowieka (Adler, 1971; Sandritter i Scomazzoni, 1964). Ciekawym spostrzeżeniem jest, że poliploidia pojawia się jako zjawisko fizjologiczne związane z wiekiem.

W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia o występowaniu poliploidii w neuronach ośrodkowego układu nerwowego szczurów, kotów i ludzi (Bregnard i wsp., 1975; Lentz i Lapham 1970; Novakova i wsp. 1970; Sandritter i wsp. 1967). Badania te dotyczyły głównie zmian w ilości DNA w jądrach komórek Purkinjego w okresie perinatalnym. Także Bregnard i wsp. (1975) w krótkim doniesieniu stwierdzili na podstawie badań przy użyciu fluorymetrii przepływowej i cytofotometrii absorbcyjnej w UV, że neurony posiadają zdwojoną ilość DNA w porównaniu z komórkami glejowymi. Autor ten przyznaje jednak, że badania te winny być zweryfikowane.

Ze względu na istniejące nadal wątpliwości co do ilości DNA w jądrach różnych typów komórek ośrodkowego układu nerwowego posta-

Praca wykonana w ramach planu węziowego Nr 10.4.2.02.1.4.

nowiliśmy zająć się tym problemem. Ponadto uważamy, że istnieje potrzeba przeprowadzenia tego rodzaju badań na mózgach ludzkich z różnych grup wieku.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 4 mózgi ludzkie, z których dwa pochodziły od dzieci (5,5 i 6,5 mies.), a dwa od osób starych (71 i 73 lat). W żadnym z tych przypadków nie stwierdzono klinicznie ani sekcyjnie przewlekłych schorzeń bądź procesów rozrostowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Materiał do badań cytochemiczno-ilościowych pobrano w ciągu pierwszych 6 godzin po zgonie z: zakrętu przedśrodkowego, jądra ogoniastego, wzgórza wzrokowego, kory rogu Amona i z kory mózdzku.

Każdy wycinek natychmiast po pobraniu homogenizowano ręcznie w 0,02 M roztworze EDTA w płynie Ringera. Homogenat sączono przez gazę i wirowano przez 3 minuty przy $800 \times g$. Z osadu wykonywano rozmazy, które utrwalano na mokro w mieszaninie 96% etanolu z 40% formaliną w stosunku 9:1. Utrwalone preparaty barwiono metodą Feulgena przy użyciu pararozaniliny. Zastosowano następujące czasy hydrolizy w 1 N HCl w temperaturze 60°C : 2 minuty, 5 minut, 8 minut, 11 minut, 14 minut, 17 minut, 20 minut.

Pomiary cytofotometryczne dotyczyły neuronów, astrogleju i oligodendrogleju. Z uzyskanych wartości pomiarów wykreślono krzywe hydrolizy oraz nukleinogramy (histogramy). Pomiary wykonywano używając mikrodensytometru integrującego F-my Barr and Stroud, Glasgow.

Po pobraniu materiału mózgi utrwalano w formalinie, a następnie dokonywano badań histologicznych dużych skrawków parafinowych barwionych H-E, fioletem krezyłu, czerwienią Kongo, wg następujących metod: Holzera w modyfikacji Kanzlera-Arendta, Heidenhaina, van Gieson i Holmesa.

W badaniach szczególną uwagę zwrócono na cechy zużycia tkanki nerwowej (lipofuscyna, zmiany zanikowe, zmiany barwnikowe gleju) oraz na pojawieniu się zmian starczych.

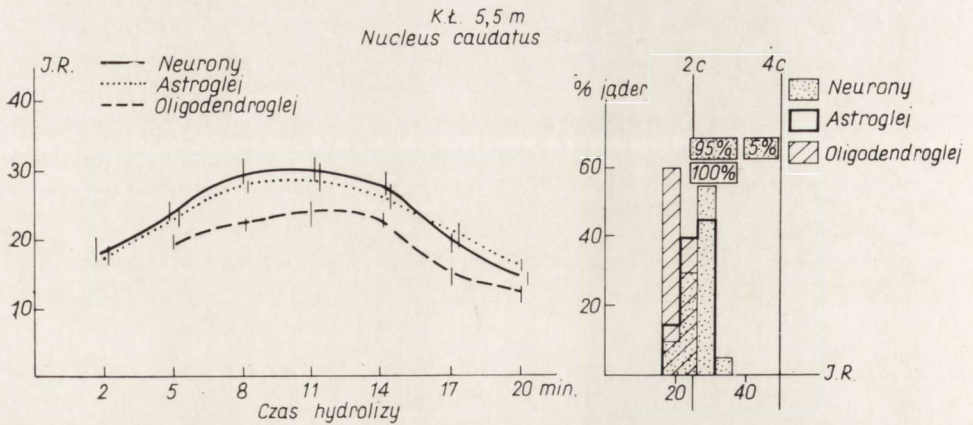
WYNIKI

Wykonując pomiary nasilenia reakcji Feulgena zarówno w neuronach jak i w komórkach glejowych mózgu stwierdziliśmy, że nasilenie to jest najwyższe po zastosowaniu czasu hydrolizy 11–14 minut, wobec tego wykonaliśmy wykresy obrazujące zachowanie się ilości DNA po dokonaniu pomiarów w preparatach hydrolizowanych przez 14 minut. W mózgach obu niemowląt wartości pomiarów cytofotometrycznych dla neuro-

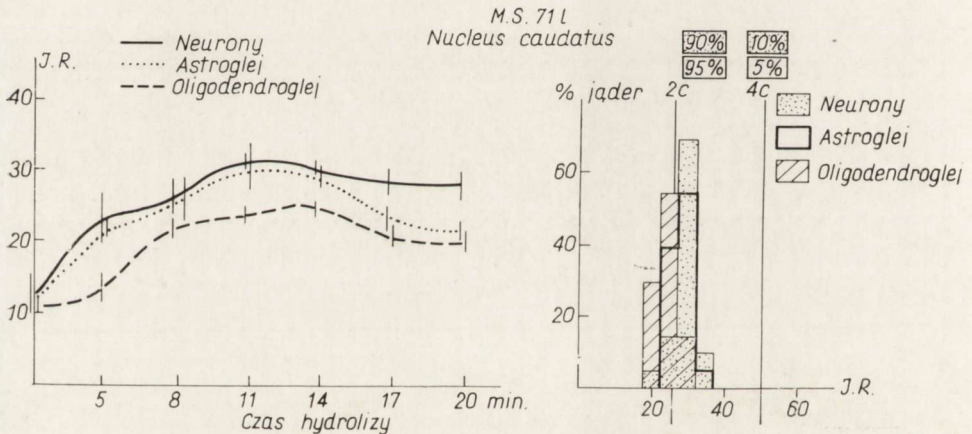
nów były wyższe niż dla komórek oligodendrogleju od 0—5 jednostek roboczych, przy czym nie zawsze różnica ta była statystycznie istotna. Nie stwierdzono natomiast różnic ilościowych pomiędzy komórkami astrogleju i neuronami. W przypadku zmarłego M.S., lat 71, różnice w uzyskanych średnich wartościach pomiarów przedstawiały się podobnie jak w mózgach niemowląt, były jednak nieznacznie wyższe. Różnice te wynosiły dla oligodendrogleju i neuronów od 4 do 7 jednostek i były zawsze statystycznie istotne. Porównując pomiary neuronów i astrogleju uzyskano różnice wahające się między 1 a 5 jednostkami roboczymi, przy czym nie były one zawsze statystycznie istotne. Zupełnie inny wynik uzyskaliśmy w przypadku M.E., lat 73, w którym neurony wykazywały zdecydowanie wyższe wartości pomiarów niż komórki oligodendrogleju (różnica od 9 do 18 jednostek roboczych) i astrogleju (różnica od 3 do 9 jednostek roboczych). Średnie wartości pomiarów, uzyskane dla komórek oligodendrogleju odpowiadały diploidalnej ilości DNA. Na tej podstawie stwierdziliśmy, że jądra komórek oligodendrogleju mózgow niemowlęcych zawierają w około 95% diploidalne wartości DNA, natomiast tylko w około 5% hiperdiploidalne ilości tego składnika (ryc. 1). Komórki astrogleju w 100% posiadały diploidalną ilość DNA.

W przypadku zmarłego w podeszłym wieku M.S. 90% neuronów wykazywało diploidalną ilość DNA, a 10% hiperdiploidalną (ryc. 2). W tym jednak przypadku komórki zakrętu przedśrodkowego zachowywały się inaczej, a mianowicie: 65% neuronów posiadało diploidalną, 30% hiperdiploidalną, a 5% nawet hipertetraploidalną ilość DNA (ryc. 3). Komórki astrogleju aż w około 85—95% zawierały diploidalną ilość DNA, a jedynie w 5—15% hiperdiploidalną ilość tego składnika (ryc. 2 i 3). Znacznie większe różnice odnotowano w przypadku N.E., l. 73, w którym jedynie 5% neuronów jądra ogoniastego zawierało diploidalną ilość DNA, natomiast aż 80% jąder tych komórek znajdowało się w przedziale dla hiperploidii, a 15% dla tetraploidii (ryc. 4). Komórki astrogleju w tym przypadku posiadały w 40% diploidalną ilość DNA.

Wykreślone przez nas krzywe hydrolizy nie różnią się kształtem, jeśli porównujemy poszczególne rodzaje badanych komórek. Różnice dotyczą jedynie średnich wartości pomiarów (ryc. 1, 2, 3). Krzywe te charakteryzują się dość łagodnym wzrostem wartości pomiarów do 8 minut kwaśnej hydrolizy, w którym to okresie zaznacza się wzrost nasilenia reakcji Feulgena. Nasilenie to utrzymuje się po zastosowaniu 20 minut hydrolizy. Taki przebieg krzywej hydrolizy może przemawiać za dość dużą ilością chromatyny mało wrażliwej na kwaśną hydrolizę, a więc chromatyny zbitej, utożsamianej z chromatyną mało czynną genetycznie (Mittermayer i wsp., 1971). Jedynie w części pomiarów, dotyczących



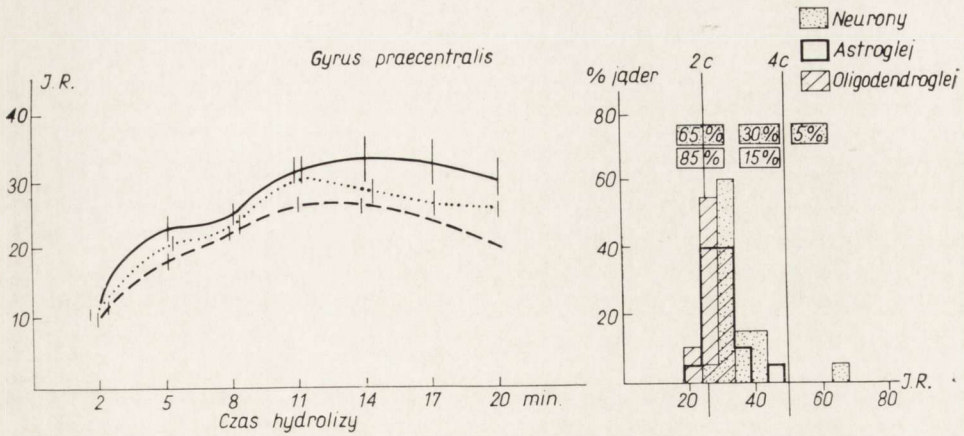
Ryc. 1. Przypadek K. Ł., wiek 5,5 mies. Strona lewa: krzywe hydrolizy jąder komórek mózgu w 1 N HCl w temp. 60°C. J. R.: jednostki robocze wartości pomiarów cytofotometrycznych odpowiadające ilości leukofuksyny związanej z DNA. Strona prawa: nukleino-gram. 2n: diploidalna ilość DNA, 4n: tetraploidalna ilość DNA.
Fig. 1. Case K. Ł., age 5.5 mths. Left side: hydrolysis curves of cerebral cells nuclei in 1 N HCl in temp. 60°C. J. R.: assay entities of cytophotometric values corresponding to the amount of leukofuchsin bound to DNA. Right side: nucleino-gram. 2n: diploid content of DNA, 4n: tetraploid content of DNA.



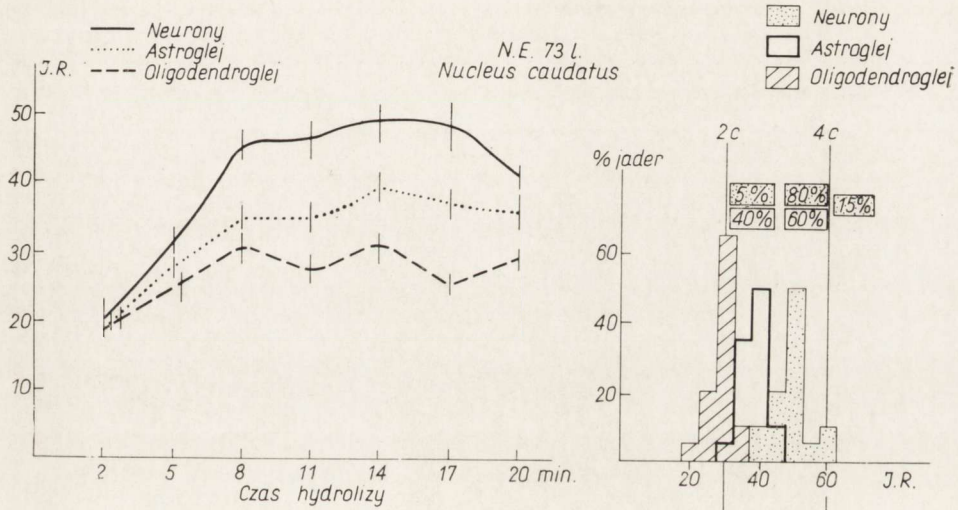
Ryc. 2. Przypadek M. S., wiek 71 lat. Objaśnienia jak pod ryc. 1.
Fig. 2. Case M. S., age 71 yrs. Explanation as under Fig. 1.

neuronów mózgow osób starych, stwierdzano wzrost wartości pomiarów już po 5 minutach kwaśnej hydrolizy (ryc. 2).

Badanie neuropatologiczne dwu mózgow dziecięcych wykazało obrazy typowe dla wieku niemowlęcego, jak obecność cienkiej warstwy ziarnistej zewnętrznej w korze mózdzku, pozostałości komórek macierzy przykomorowej oraz neurony o specyficznej morfologii dla wieku dzie-



Ryc. 3. Przypadek M. S., wiek 71 lat. Objaśnienie jak pod ryc. 1.
 Fig. 3. Case M. S., age 71 yrs. Explanation as under Fig. 1.



Ryc. 4. Przypadek N. E., wiek 73 lat. Objaśnienie jak pod ryc. 1.
 Fig. 4. Case N. E., age 73 yrs. Explanation as under Fig. 1.

cięcego. Poza tym w obu przypadkach zaznaczone były zmiany ischemiczne, w jednym z nich z towarzyszącymi wyraźnymi cechami obrzęku tkanki nerwowej. Lipofuscyny w neuronach nie znaleziono poza niektórymi komórkami wzgórza wzrokowego w jednym przypadku.

W dwu mózgzach starych dominowały zmiany aterosklerotyczne oraz rozsiane uszkodzenia pochodzenia naczyniowego z drobnymi ogniskami rozmiękania, opustoszeniami neuronalnymi i homogenizacją komórek Purkinjego.

W mózgu zmarłej N.E., lat 73 zwracało uwagę maksymalne nagromadzenie barwika zużycia w neuronach wszystkich lipofilnych jąder, a również jego obecność w strukturach uważanych za względnie lipofilne (np. małe komórki jądra ogoniastego, *griseum centrale pontis*). W przypadku zmarłej M.S., lat 71 złoży lipofuscyny były znacznie mniej obfite. Nie wypełniały one cytoplazmy neuronów nawet w tak lipofilnych strukturach jak jądro zębate. W obu przypadkach w warstwie drobnowej kory mózgu znajdowano dość liczne ciała skrobiowate, a nie stwierdzono natomiast obecności płytek starczych ani zmian włóknkowych typu Alzheimera.

DYSKUSJA

Uzyskane przez nas wyniki badań ilościowych wskazują na wyższe wartości DNA w neuronach mózgow starczych osób. Niemniej również u badanych niemowląt stwierdziliśmy nieliczne neurony z hiperdiploidalną ilością DNA. W naszych badaniach nie udało się uzyskać we wszystkich przypadkach dostatecznej liczby komórek Purkiniego, dlatego też nie wypowiadamy się obecnie co do zawartości DNA w tych komórkach. Warto jednak podkreślić, że znalezione przez nas komórki Purkiniego, zarówno u niemowląt jak i u osób starszych, posiadały zawsze hiperdiploidalną lub tetraploidalną ilość DNA. Obserwacja ta byłaby zatem zgodna z wynikami Bregnarada i wsp. (1975), Mittermayera i wsp. (1971) i Sandritter i wsp. (1963). W odróżnieniu od danych uzyskanych przez Bregnarada i wsp. (1975) w naszych badaniach zwiększona zawartość DNA w neuronach odpowiadała hiperdiploidalnej ilości, a nie tetraploidalnej. Nie uzyskaliśmy zatem komórek o cechach tzw. poliploidii, natomiast wykazaliśmy niewątpliwie większą zawartość DNA w neuronach niż w komórkach glejowych.

Wśród astrocytów odnotowaliśmy komórki posiadające hiperdiploidalną ilość DNA. Zjawisko to można tłumaczyć zdolnością komórek astrogleju do rozplemu, a zatem do syntezy DNA. Obecność komórek o hiperdiploidalnej ilości DNA, pojawiającej się zresztą w niedużym odsetku, może przemawiać za syntezą DNA. Nie możemy jednak wykluczyć możliwości błędnego zaszeregowania jąder do typów komórek klasyfikowanych na podstawie morfologicznych cech jąder barwionych metodą Feulgena. W tych warunkach część jąder należących do neuronów mogliśmy rozpoznać jako jądra astrogleju.

Ilość DNA w jądrach komórek oligodendrogleju odpowiadała zawsze wartościom diploidalnym. Możliwe, że komórki te, podobnie jak inne elementy glejowe mają zdolność do rozplemu a więc i do syntezy DNA.

W naszych badaniach nie stwierdziliśmy jednak cech tej syntezy w komórkach oligodendrogleju. Być może jest to wynikiem doboru jąder do pomiarów i eliminowania wszystkich większych jąder wśród których mogły znaleźć się komórki syntetyzujące DNA.

Przyczyna i mechanizm pojawienia się zwiększonej ilości DNA w somatycznych, a nie dzielących się komórkach nie są wyjaśnione. Poza wspomnianą już korelacją tego zjawiska z wiekiem badanych osobników należałoby zwrócić uwagę na związek z obciążeniem funkcjonalnym tkanki, a nawet ze stopniem jej fizjologicznego zużycia. Przypominamy, że zwiększoną ilość DNA stwierdza się zawsze w starszym wieku w komórkach narządów o bardzo dużym obciążeniu czynnościowym, a mianowicie w wątrobie i w sercu (Adler, 1971, Sandritter i wsp., 1967). Nasz materiał jest zbyt mały aby można było wyciągać dalej idące wnioski. Pragniemy jednak zwrócić uwagę na różnice ilościowe DNA neuronów w badanych dwóch mózgach osób starszych. Mózg wykazujący morfologicznie mniej zaawansowane cechy zużycia (M.S., lat 71) w postaci uderzająco małej ilości lipofuscyny w neuronach, zawierał niewielki odsetek neuronów o hiperdiploidalnej i tetraploidalnej ilości DNA. Pod tym względem był on bardziej podobny do mózgow badanych przez nas niemowląt.

Wykonane krzywe dynamiki kwaśnej hydrolizy stosowanej w reakcji Feulgena przebiegają prawie jednakowo dla wszystkich typów komórek. Różnice jakkolwiek nieduże, uzyskaliśmy w przebiegu tych krzywych wykonanych dla neuronów mózgu osób starszych, otrzymując niekiedy wyższe wartości pomiarowe już po upływie 5 minut hydrolizy (ryc. 2). Wskazuje to na większą wrażliwość chromatyny badanych komórek na kwaśną hydrolizę, a pośrednio na obecność większej ilości chromatyny luźnej zwanej również czynną (Krygier-Stojałowska i wsp., 1972, Mittermayer i wsp. 1971).

А. Крыгер-Стояловска, Е. Кульчыцки, М. Мадей, П. Новацки, К. Хончаренко
КОЛИЧЕСТВО ДНК В НЕРВНЫХ И ГЛИЕВЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА,
ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Предварительное сообщение

Резюме

Авторы исследовали цитофотометрическим методом, окрашивая по Фельгену, содержание ДНК в ядрах нервных и глиевых клеток человеческого мозга (2 мозга детских и 2 лиц пожилого возраста). Клетки олигодендроглии во всех мозгах обнаруживали диплоидное количество ДНК, тогда как в ядрах нейронов у старых людей содержание ДНК было чаще всего гиперпloidным, а иногда тетрапloidным.

A. Krygier-Stojalowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowacki, K. Honczarenko

DNA CONTENT IN NEURONS AND GLIAL CELLS OF HUMAN
BRAIN ASSAYED WITH CYTOPHOTOMETRIC METHOD

Preliminary report

Summary

Content of DNA in nuclei of neurons and of glial cells of human brains (2 brains of infants and 2 senile brains) was investigated by the cytophotometric method with use of Feulgen staining.

Oligodendroglial cells exhibited diploid content of DNA in all studied brains whereas the content of DNA in nuclei of nerve cells in senile brains was most frequently hyperploid and sometimes tetraploid.

PIŚMIENNICTWO

1. Adler C. P.: Polyploidisierung und Zellzahl im menschlichen Herzen. Habilitationsschrift, Freiburg i Br. (1971).
2. Bagnard A., Knusel A., Kuenzle C. C.: Are all the neuronal nuclei polyploid? *Histochemistry* 1975, 43, 59—61.
3. Krygier-Stojalowska A., Tessmann D., Schütz, M., Urański I.: Próba zastosowania metody Feulgena dla oceny czynności jądra komórkowego. *Ann. Acad. Med. Stetinensis*. 1972, suppl. 4, 65—70.
4. Lentz R. D., Lapham L. W.: Postnatal development of tetraploid DNA content in rat Purkinje cells: A quantitative cytochemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1970, 29, 43—56.
5. Mittermayer, Ch., Madreiter N., Loderer D., Sandritter W.: Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin. *Biochemical, histochemical and morphological studies. Beitr. Path.* 1971, 143, 157—171.
6. Novakova V., Sandritter, W., Schluster G.: DNA content of neurons in rat central nervous system. *Exp. Cell Res.* 1970, 60, 454—456.
7. Sandritter W., Kiefer G., Rick W.: Über die Stöchiometrie von Gallocyaninchromalaun mit Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie*, 1963, 3, 315—340.
8. Sandritter W., Novakova V., Pilny J., Kiefer G.: Cytophotometrische Messungen des Nukleinsäure — und Proteingehaltes von Ganglienzellen der Ratte während der postnatalen Entwicklung und im Alter. *Z. Zellforsch.* 1967, 80, 145—152.
9. Sandritter W., Scmazzone G.: Desoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (interference microscopy) of normal and hypertrophic heart muscle fibres. *Nature*, 1964, 202, 100—101.

Adres autorów: Pracownia Patologii Komórki Zakładu Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

HALINA KROH

AKTYWNOŚĆ FOSFATAZY ZASADOWEJ W MÓZGU MYSZY
W RÓŻNYCH OKRESACH ŻYCIA POZAPŁODOWEGO
I PO ZASTOSOWANIU ETYLONITROZOMOCZNIKA (ENU)
W OKRESIE PŁODOWYM

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

Friede (1966) podaje, że w ośrodkowym układzie nerwowym fosfataza zasadowa występuje w naczyniach i w tkance mózgu, a szczególnie w neuropilu istoty szarej i w utkaniu zewnętrznych i wewnętrznych powierzchni narządu oraz w splocie naczyniówkowym i w oponach. Porównawcze badania Schimizu (1950) wykazały, że rozmieszczenie fosfatazy zasadowej w mózgu myszy jest zgodne z ogólnym wzorcem lokalizacji tego enzymu u innych zwierząt. Badanie dojrzewającego mózgu myszy dotyczyło tylko krótkiego okresu pomiędzy 1 — 20 dniem życia pozapłodowego (Lierse 1963).

Wielu autorów wiązało obecność fosfatazy zasadowej w ścianach naczyń mózgu z ich czynnością barierową. Badania nad aktywnością enzymu w polach obrzęku mózgu i w stanach przednowotworowych wskazywały na ścisłą łączność pomiędzy zmianami w przepuszczalności układu naczyniowego a zmianami w nasileniu aktywności enzymu w ścianach naczyń (Kroh 1969; 1976 b).

Celem badań było uzupełnienie danych dotyczących aktywności fosfatazy zasadowej w okresie mielinizacji trwającej w mózgu myszy około 8 tygodni i w mózgu dojrzałym oraz ustalenie wpływu ENU na aktywność wymienionego enzymu w ścianach naczyń mózgu. W poprzednich pracach stwierdzono występowanie ognisk demielinizacji pod wpływem ENU (Kroh 1976 b, c). Niejasny patomechanizm tego zjawiska skłania do poszukiwań jego przyczynowego związku z układem naczyniowym.

MATERIAŁ I METODA

Do doświadczenia użyto 12 myszy zdrowych i 12 myszy potomnych samic Swiss, którym w 15 dniu ciąży wstrzyknięto jednorazowo, dożylnie roztwór ENU w dawce 80 mg/kg wagi ciała. Dokładne dane dotyczące

metodyki podano w poprzedniej pracy (Kroh 1976 a). Myszy dekapitowano w 7, 14, 21, 28, 50, 60, 70, 80, 100, 200 i w 300 dniu po urodzeniu. Na skrawkach z mózgu i z mózdzku, o grubości 12 μ , krojonych w kriostacie, przeprowadzono odczyn na fosfatazę zasadową wg metody Burstone (1961). Ponadto skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną oraz wg metody Klüver-Barrera.

WYNIKI

W mózgowiu myszy w 7 dni życia występował silny, dyfuzyjny odczyn na fosfatazę zasadową, zwłaszcza w neuropilu rdzenia przedłużonego. Szczególnie wyraźny odczyn o charakterze rozlanych plam odpowiadał lokalizacyjnie poszczególnym jądom opuszki, przy czym neurony były nieaktywne. Nieco słabsze nasilenie odczynu wykazywał neuropil jąder wzgórza wzrokowego i innych jąder między- i śródmózgowia. W neuropilu kory mózgu obserwowano natomiast ślad dyfuzyjnej reakcji enzymatycznej. Istota biała mózgu i mózdzku nie wykazywała odczynu, podobnie jak cała kora mózdzku (ryc. 1, 2).

Ryc. 1. Mysz 7-dniowa, zdrowa. Mózdzek. Wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w splocie naczyńwłokowym komory IV (strzałka) oraz dyfuzyjny odczyn enzymatyczny w neuropilu wzgórka słuchowego (dwie strzałki). Naczynia w korze niewidoczne. Pow. 60 \times .

Fig. 1. Normal, 7-day old mouse. Cerebellum. High alkaline phosphatase activity in choroid plexus of IV ventricle (arrow) and diffuse enzymatic activity in neuropil of *tuberculum acusticum* (two arrows). Cortical vessels invisible. \times 60.

Ryc. 2. Mysz 7-dniowa, doświadczalna. Mózdzek. Wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w splocie komory IV oraz dyfuzyjny odczyn enzymatyczny w neuropilu jądra przedsionkowego (strzałka) i jądra zębatego (dwie strzałki). Naczynia niewidoczne. Pow. 60 \times .

Fig. 2. Experimental, 7-day old mouse. Cerebellum. High alkaline phosphatase activity in choroid plexus of IV ventricle and diffuse enzymatic reaction in neuropil of *nucleus vestibularis* (arrow) and *nucleus dentatus* (two arrows). Blood vessels invisible. \times 60.

Ryc. 3. Mysz 14-dniowa, zdrowa. Większość naczyń kory mózgu nie ujawnia aktywności fosfatazy zasadowej. Pow. 100 \times .

Fig. 3. Normal, 14-day old mouse. Majority of cortical, cerebral vessels without any alkaline phosphatase activity. \times 100.

Ryc. 4. Mysz 14-dniowa, doświadczalna. Kora mózgu. Większość naczyń nie ujawnia aktywności enzymatycznej. Pow. 100 \times .

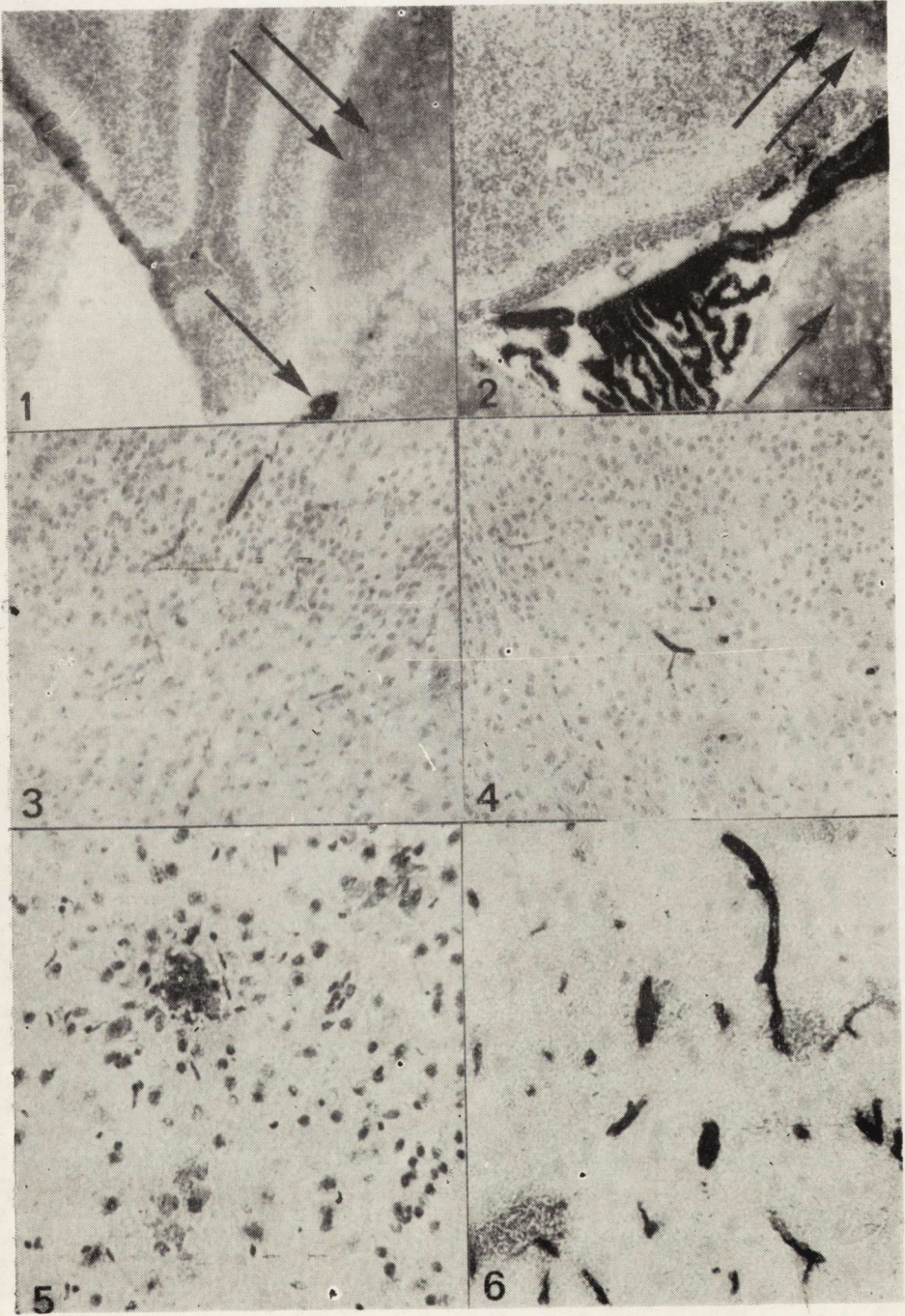
Fig. 4. Experimental, 14-day old mouse. Cerebral cortex. Majority of vascular walls without any alkaline phosphatase activity. \times 100.

Ryc. 5. Mysz 80-dniowa, doświadczalna. Kora mózgu. Skupienia makrofagów w pobliżu naczyń. Skrawek z kriostatu, Klüver-Barrera. Pow. 200 \times .

Fig. 5. Experimental, 80-day old mouse. Cerebral cortex. Accumulation of macrophages in vicinity of blood vessels. Cryostat section, Klüver-Barrera. \times 200.

Ryc. 6. Mysz 80-dniowa, doświadczalna. Kora mózgu. Wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w ścianach naczyń włosowatych. Obok naczyń skupienia makrofagów. Pow. 200 \times .

Fig. 6. Experimental, 80-day old mouse. Cerebral cortex. High alkaline phosphatase activity in the walls of blood vessels. Nearby accumulation of macrophages. \times 200.



W ścianach nielicznych naczyń w rdzeniu przedłużonym i w głębokich szarych strukturach mózgu obserwowano dodatni odczyn, a w korze mózgu tylko pojedyncze włóściczki wnikaające z powierzchni mózgu wykazywały wyraźną aktywność enzymu. Naczynia kory mózdzku nie ujawniały odczynu enzymatycznego, chociaż w barwieniach przeglądowych były widoczne nieliczne naczynia, zwłaszcza w warstwie drobinowej. Najwybitniejsza aktywność fosfatazy zasadowej występowała w pościelisku splotu naczyniówkowego, natomiast nabłonek splotu pozostał nieaktywny. W niektórych komórkach okołokomorowej warstwy rozrodczej oraz w niektórych komórkach wyściółki komór i wodociągu mózgu stwierdzono odczyn enzymatyczny o charakterze ziarnistym. Naczynia opon miękkich a miejscami również opony wykazywały dodatni odczyn.

W 14 dniu życia liczniejsze włóściczki w istocie szarej opuszki, śródmózgowia i międzymózgowia wykazywały aktywność enzymu. W korze mózgu ujawniała się ona również w większej liczbie naczyń niż w poprzednim okresie. Obserwowano leżące obok siebie naczynia o podobnym wyglądzie i średnicy albo z odczynem dodatnim albo też nie wykazujące odczynu (ryc. 3, 4). W ścianach włóściczek w spidle wielkim i w istocie białej płacików mózdzku nie obserwowano aktywności enzymatycznej. Silny dyfuzyjny odczyn utrzymywał się w formach szarych tak jak w poprzednim okresie.

U myszy 3 tygodniowej w większości włóściczek mózgu występował silny odczyn enzymatyczny, o dość równomiernym nasileniu. W strukturach szarych sieć naczyń wykazujących dodatni odczyn była znacznie bogatsza niż u zwierząt 14-dniowych. Wyjątek stanowiła warstwa ziarnista wewnętrzna mózdzku, w której były widoczne tylko pojedyncze aktywne naczynia, w przeciwieństwie do licznych, aktywnych naczyń w warstwie drobinowej. W istocie białej mózgu i mózdzku podobnie jak w poprzednim okresie tylko ściany nielicznych naczyń ujawniały aktywność enzymatyczną.

W neuropilu struktur szarych występował umiarkowany, dyfuzyjny odczyn enzymatyczny, o słabszym nasileniu w jądrach podstawy niż w rdzeniu przedłużonym, nieco niższy niż w poprzednim okresie obserwacji.

Od 4 tygodnia życia myszy dyfuzyjna reakcja enzymatyczna w neuropilu mózgu i rdzenia przedłużonego znacznie zmalała, a od 8 tygodnia przejawiała się jedynie w śladowej postaci. Włóściczki istoty szarej i białej od 4 tygodnia wykazywały silną, równomierną aktywność enzymatyczną, natomiast w warstwie ziarnistej mózdzku naczynia włosowate osiągały pełną aktywność enzymatyczną dopiero po ósmym tygodniu życia.

Opisany powyżej obraz enzymatyczny fosfatazy zasadowej w mózgu myszy zdrowej utrzymywał się do końca badanego okresu.

U myszy, które otrzymały karcinogen w okresie płodowym, przebieg i obraz dojrzewania enzymatycznego włóściczek i tkanki mózgu przebiegał tak samo jak u myszy zdrowych.

U myszy 70, 80, 100 i 200 dniowych stwierdzano liczne makrofagi rozproszone w tkance lub skupione przynacyniowo (ryc. 5). Aktywność pobliskich naczyń włosowatych, ani śladowy odczyn dyfuzyjny w strukturach szarych nie ulegały zmianie (ryc. 6). U zwierząt w wieku 300 dni aktywność enzymatyczna fosfatazy zasadowej we włóściczkach w neuropilu nie różniła się w mózгах myszy zdrowych i poddanych działaniu ENU. W tych ostatnich makrofagi były niewidoczne.

Barwienia przeglądowe nie wykazały ognisk demielinizacji w mózгах zwierząt doświadczalnych.

OMÓWIENIE

Z przedstawionych badań histoenzymatycznych wynika, że aktywność fosfatazy zasadowej w ścianach naczyń mózgu myszy osiąga po 4 tygodniach życia pozapłodowego stopień nasilenia obserwowany u zwierząt dojrzałych. Pojawienie się aktywności w ścianach naczyń w rdzeniu przedłużonym obserwowano w 7 dniu życia. Lierse (1963) przy pomocy metody Gomoriego stwierdzał dodatni odczyn w naczyniach struktur rdzenia przedłużonego już w pierwszym dniu życia, podczas gdy naczynia innych części mózgowia nie uwidoczniały się. W okresie życia płodowego myszy aktywność fosfatazy zasadowej ogranicza się jedynie do tkanki nerwowej i obniża się w miarę jej dojrzewania (Chiquoine 1954). Proces ten postępuje w czasie dojrzewania mózgu i wg opinii Friedego (1966) aktywność fosfatazy zasadowej w neuropilu pozostaje w odwrotnym stosunku do aktywności w ścianach włóściczek, co można prawdopodobnie wiązać ze spostrzeganym przez Gyllenstena (1959) szybkim rozwojem sieci naczyń włosowatych w mózgu myszy między 10—20 dniem po urodzeniu. Podobnie w mózгах szczurów Cohn i Richter (1956) stwierdzili biochemicznie i histochemicznie dwukrotnie wyższy poziom enzymu pomiędzy 10—15 dniem życia niż w wieku 40 dni. Autorzy ci zwrócili również uwagę na wcześniejszy wzrost aktywności enzymatycznej w jądrach podstawy mózgu niż w korze mózgu. W obu tych strukturach nasilenie aktywności wyrównywało się w wieku 40 dni. Shinizu (1950) przypisywał wyższą aktywność istoty szarej jej bogatemu unaczynieniu. Obserwacje własne popierają pogląd o nierównomiernym dojrzewaniu enzymatycznym poszczególnych części mózgowia w miarę jego rozwoju. Aktywność neuropilu ulega zmniejszeniu w miarę

wzmagania się aktywności w ścianach naczyń włosowatych. Aktywność fosfatazy zasadowej w neuropilu istoty szarej jej wyższa niż w istocie białej, a nasilenie aktywności zmniejsza się w kierunku dogłowym. Dojrzewanie enzymatyczne naczyń poszczególnych części mózgowia również podlega tym zasadom z pewnymi wyjątkami jak np. znacznie wcześniejsze pojawienie się aktywności enzymatycznej w warstwie drobinowej kory mózdzku niż w warstwie ziarnistej wewnętrznej, której naczynia najpóźniej dojrzewają enzymatycznie, chociaż warstwa ta jest bardziej unaczyniona niż drobinowa (Friede 1966). Landow i wsp. (1942) również wspominają, że naczynia warstwy drobinowej mózdzku mają wyższą aktywność niż w warstwie ziarnistej. Bannister i Romanul (1963) wykazali, że w mózgu szczura aktywność fosfatazy zasadowej przejawiają śródbłonki tętniczek mózgu o średnicy poniżej 20 μ ; nabierają one właściwości enzymatycznych w miejscu odgałęzienia od większych tętniczek po czym aktywność rozciąga się na sieć włośniczek o średnicy 15—8 μ stopniowo zanikając przy przejściu w małe naczynia żyłne. W większych naczyniach tętnicznych aktywność enzymu występuje w błonie wewnętrznej, niekiedy w przydance (Shimizu 1950). Lierse (1963) podaje, że w pierwszym dniu życia ustalenie strukturalnej lokalizacji aktywności enzymu we włośniczkach mózgu myszy było niemożliwe, natomiast po 10 dniach aktywność występowała w komórkach śródbłonka. W tym okresie tętniczki odoponowe wnikające do mózgu wykazywały odczyn we wszystkich warstwach naczynia.

Badania przy pomocy kontrastu nad unaczynieniem mózgu myszy pomiędzy 1—30 dniem życia wykazały niepełne, ale dobrze rozwinięte unaczynienie kory już bezpośrednio po urodzeniu (Gyllensten 1959), chociaż w naszych badaniach aktywność enzymatyczna naczyń w tej strukturze w 7 dniu życia była nieznaczna, a w 14 dniu sieć naczyń włosowatych wykazywała znaczne zróżnicowanie aktywności enzymu. Dopiero od 4 tygodnia zarówno naczynia włosowate istoty szarej jak i białej osiągały wysokie nasilenie aktywności fosfatazy zasadowej.

Związek między morfologicznym i histochemicznym dojrzewaniem ośrodkowego układu nerwowego a zwłaszcza naczyń i kształtowaniem się bariery mózgowo-naczyniowej nie jest całkowicie wyjaśniony. Dane piśmiennictwa wskazują na różnice przepuszczalności w stosunku do różnych substancji wnikających do ośrodkowego układu nerwowego ze krwi zależnie od stopnia dojrzałości zwierząt. Najpowszechniej stosowany błękit trypanu nie przenika do tkanki mózgu od 10 dnia życia płodowego (Grazer, Clemente 1957), podobnie jak w mózgu dojrzałym, z wyjątkiem tzw. obszarów bezbarierowych. Badania Bakaya (1956) dotyczące przenikania znakowanego fosforu do mózgow królików w okresie embrionalnym i wczesnym pozapłodowym świadczą również o zwiększonej prze-

puszczalności bariery krew-mózg w rozwijającym się układzie nerwowym. Poszukiwania morfologicznych wykładników rozwoju selektywnej bariery w różnych okresach życia szczura wskazują na słaby rozwój błony podstawnej włóściczek kory mózgu do 15 dnia życia (Tani, Ishii 1963) i na postępujące spłaszczenie komórek śródbłonka od 12 dnia życia, równoległe ze zgrubieniem błony podstawnej (Donahue, Pappas 1961). Morfologiczne zmiany zachodzące w rozwijających się naczyniach włosowatych tylko częściowo mogą się wiązać z barierowymi i enzymatycznymi własnościami naczyń. Na podstawie przedstawionych danych można uważać, że istnieje równoległość pomiędzy dojrzewaniem morfologicznym i enzymatycznym włóściczek w korze mózgu, natomiast brak jest tego typu badań dotyczących warstwy ziarnistej kory mózdzku, której naczynia najpóźniej przejawiają aktywność fosfatazy zasadowej.

Okres szybkiego narastania aktywności enzymu przebiega jednocześnie z okresem szybkiej fazy procesu mielinizacji. U szczura ten okres trwa między 10—20 dniem, a w następnych tygodniach postępuje wolniej (Mc Ilwain 1955). U myszy Swiss mielinizacja jest zakończona w 50 dniu życia (Folch Pi 1955). Późniejsza aktywizacja enzymatyczna naczyń w istocie białej niż w szarej może być więc związana z innym zapotrzebowaniem metabolicznym.

Mózdzek jest jedną ze struktur, które najpóźniej osiągają pełną kapilaryzację (Friede 1955) i jak wynika również z przedstawionych badań własnych, włóściczki kory i istoty białej mózdzku myszy najpóźniej dojrzewają enzymatycznie, co również może się wiązać z późną mielinizacją tych struktur. Z obserwacji własnych nie wynika, że aktywność enzymatyczna włóściczek istoty białej myszy ulega obniżeniu po zakończeniu mielinizacji tak jak to stwierdziły u szczura Farkas-Bargeton i Arsenio-Nunes (1970).

Mózgi zwierząt doświadczalnych nie wykazywały zmian w rozmieszczeniu ani nasileniu aktywności enzymatycznej w porównaniu z myszami zdrowymi co świadczy, że podanie ENU w 15 dniu ciąży nie wpłynęło u płodów ani na formującą się sieć naczyń ani na aktywność neuropilu. W badanym materiale nie stwierdzono ognisk demielinizacji, chociaż występowanie makroflagów w mózgach myszy doświadczalnych pomiędzy 80—200 dniem wskazuje na toczący się proces rozbiórki ruchomej. W analogicznym materiale, przynacyniowe skupienia makroflagów zawierających tłuszcze obojętne będące produktem rozpadu mieliny towarzyszyły ogniskom demielinizacji w istocie białej i szarej w tym samym okresie doświadczenia (Kroh 1973, 1976 a). Można uważać, że proces demielinizacyjny przebiegał identycznie w badanych mózgach, ale nie został uwidoczniiony na skrawkach kriostatowych. Co więcej, prawidłowy roz-

wój unaczynienia i dojrzewania enzymatycznego włóściczek w tych móz-
gach wskazuje, że powstawanie ognisk demielinizacji nie jest związane
z układem naczyniowym i że ogniska demielinizacji nie powstają na sku-
tek obrzęku naczyniopochodnego. Ściany naczyń w okołonowotworowych
polach obrzęku w mózгах myszy, podobnie jak pod wpływem substancji
działających toksycznie na układ naczyniowy mózgu wykazują ognisko-
we lub rozległe obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej (Kirsch 1963;
Brun, Brunk 1967; Kroh 1969, 1976 b; Wender i wsp. 1973). Proces
demielinizacyjny przebiegający w mózгах badanych myszy doświad-
czalnych nie wpłynął w sposób widoczny na aktywność enzymatyczną
sieci naczyniowej, podobnie jak w doświadczalnym alergicznym zapale-
niu mózgu i rdzenia z ogniskami demielinizacji u świnki morskiej (de
Sibrik, O'Doherty 1960) i w ogniskach stwardnienia rozsianego u ludzi
(Friede 1961).

Autorka składa serdeczne podziękowanie st. technikowi p. Barbarze Sliwińskiej za
wkład w realizację pracy.

X. Kroh

АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В МОЗГЕ МЫШИ
В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ВНЕЭМБРИОНАЛЬНОЙ ЖИЗНИ
И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ (ЭНМ)
В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Резюме

Исследована активность щелочной фосфатазы в центральной нервной системе
мышы в период миелинизации и в зрелом мозгу, а также после дачи ЭНМ.
Исследования проведены в период между 7 и 300 днем жизни.

Локализация и интенсивность ферментативной реакции в стенках сосудов
и в нейропиле серого вещества были одинаковы в мозгах мышшей обеих опытных
групп в течение всего хода опыта. Установлено возрастание активности фер-
мента в стенках капилляров в период быстрой фазы миелинизации. Фермен-
тативная активация эндотелия капилляров в белом веществе наступала позже,
чем в сером веществе. В мозгах животных, в которых появляются характерные
очаги демиелинизации после применения ЭНМ (Крох, 1976а), отмечено нормаль-
ное развитие сети сосудов и нормальная ферментативная активация эндоте-
лиальных клеток, что указывает на то, что возникновение очагов демиелинизации
не связано ни с сосудистой системой, ни с сосудодпроизводным отеком ткани.

H. Kroh

ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN MOUSE BRAIN IN VARIOUS
PERIODS OF EXTRA-FETAL LIFE AND AFTER ETHYLNITROSOUREA (ENU)
ADMINISTRATION DURING FETAL LIFE

Summary

The study concerns alkaline phosphatase activity in CNS of mice during
myelination period and in mature brain as well as in the brains after ENU admi-

nistration. Investigation was carried out during 7—300 days of life. Localization and intensity of enzymatic reaction in vascular walls and in the neuropil of grey matter corresponded in both groups of animals during entire experiment. There was an increase of enzyme activity in capillary walls all along fast period of myelination. Enzymatic activation of capillary endothelia in the white matter occurred later than in the grey matter.

In mice brains in which characteristic demyelinating foci after ENU administration appear (Kroh 1976 a) there was found correct development of vascular network and correct enzymatic activation of capillary endothelial cells being an indication that the formation of demyelinating lesions is related neither to vascular system nor to vasogenic tissue edema.

PIŚMIENNICTWO

1. Bannister R. G., Romanul F. C.: The localization of alkaline phosphatase activity in cerebral blood vessels. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1963, 26, 333—341.
2. Brun A., Brunk U.: Histochemical studies on brain phosphatases in experimental lead poisoning. *Acta path. microbiol. Scand.* 1967, 70, 531—536.
3. Burstone M. S.: Histochemical demonstration of phosphatases in frozen sections with naphthol AS phosphates. *J. Histochem. Cytochem.* 1961, 9, 146—153.
4. Chiquoine A. D.: Distribution of alkaline phosphomonoesterase in the central nervous system of the mouse embryo. *J. Comp. Neurol.* 1954, 100, 415—439.
5. Cohn P., Richter D.: Enzymic development and maturation of the hypothalamus. *J. Neurochem.* 1956, 1, 166—172.
6. Donahue S., Pappas G.: The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. *Am. J. Anat.* 1961, 108, 331—347.
7. Farkas-Bargeton E., Arsenio-Nunes M. L.: Maturation de l'équipement enzymatique des parois vasculaire du système nerveux. *Acta neuropath. (Berl.)* 1970, 15, 251—271.
8. Folch Pi J.: Composition of the brain in relation to maturation. W: *Biochemistry of the developing nervous system*. Ed.: H. Waelsch, Academic Press Inc., N. Y. 1955.
9. Friede R.: Enzyme histochemical studies in multiple sclerosis. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1961, 5, 433.
10. Friede R.: *Topographic brain chemistry*. Academic Press, N. Y., London 1966.
11. Grazer F., Clemente C. D.: Developing blood-brain barrier to trypan blue. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1957, 94, 758—760.
12. Gyllenstein L.: Influence of oxygen exposure on the postnatal vascularization of the cerebral cortex in mice. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 1959, 2, 289—310.
13. Kirsch W.: Histochemical and quantitative analysis of alkaline phosphatase during the course of experimental intracranial neoplasia. *Neurology (Minneap.)* 1963, 13, 123—134.
14. Kroh H.: Preneoplastic changes in the central nervous system of mice induced by methylcholantrene. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 55—72.
15. Kroh H.: Ethylnitrosourea-induced microcephaly in brains of Swiss mice and Wistar rats. *Ausgewählte Beiträge 4. Donau Symposium für Neuropathologie*. W: *Aktuelle Probleme der Neuropathologie*. Ed.: K. Jellinger, Facultas Verlag, Wien, 1973, 29—35.
16. Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). *Neuropat. Pol.* 1976 a, 14, 115—120.

17. Kroh H.: Cechy morfologiczne i histochemiczne doświadczalnych glejaków mózgu myszy. *Neuropat. Pol.* 1976 b, 14, 127—136.
18. Kroh H.: Multiple demyelinating foci induced with Ethylnitrosourea (ENU) in mouse brain. *Internat. Symp. „Chemical brain injuries and brain tumors”* Warszawa, wrzesień 1976 c.
19. Landow H., Kabat E., Newman W.: Distribution of alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues of the nervous system. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1942, 48, 518—530.
20. Lierse W.: Die alkalische Phosphatase in den Hirngefäßen der Maus (*Mus muris*) während der postnatalen Entwicklung. *Ztschr. mikr.-anat. Forsch.* 1963, 70, 48—61.
21. Mc Ilwain H.: *Biochemistry and the central nervous system*. Ed.: Churchill, London 1955.
22. Shimizu N.: Histochemical studies on the phosphatase of the nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1950, 93, 201—212.
23. Sibrik de I., O'Doherty D.: Phosphatases and phospholipases in the central nervous system. *Am. Arch. Neurol.* 1960, 2, 537—546.
24. Tani E., Ishii S.: Ontogenic studies on the rat brain capillaries in relation to the human brain tumor vessels. *Acta neuropath. (Berlin)* 1963, 2, 253—276.
25. 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 autorki: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.

ZOFIA ZALEWSKA, BOŻENA WOLNA, DARIUSZ SITKIEWICZ,
WŁODZIMIERZ BICZ

EFFECT OF DICHLORVOS ON SOME ENZYME ACTIVITIES OF THE RAT BRAIN DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

II. OXIDOREDUCTASES

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

Head: Assoc. Prof. W. Bicz

Previous studies *in vitro* (Sitkiewicz et al., 1976) and *in vivo* (Sitkiewicz, Zalewska, 1975) have pointed at the disturbances of the activity of mitochondrial enzymes as the consequence of the treatment of adult rats with Dichlorvos. Porcelatti et al. (1971) have shown that organophosphorus inhibitors of acetylcholinesterase are able to produce demyelination of the central nervous system. Another known action of the phosphoroorganic compounds is their neurotoxicity (Johnson, 1974).

Intoxication of pregnant rats with Dichlorvos was found to inhibit markedly their blood plasma cholinesterase without essentially affecting the blood cholinesterase and brain acetylcholinesterase in the offspring at various stages of ontogenesis (Zalewska et al., 1977).

In this work, the succinate dehydrogenase (1.3.99.1.) and cytochrome oxidase (1.9.3.1.) activities of the rat offspring brains were studied in the course of ontogenesis, following intoxication of the mother with Dichlorvos during pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Animals and intoxication model: white pregnant rats weighing about 250 g from isolated bred were used. The animals were given *per os* Dichlorvos*) in 2 and 10% LD₅₀ doses, once a day for 7 days starting on the

This work was supported by a grant from Polish Academy of Sciences (Research Programme No 10.4.2.02.).

*) Dichlorvos (DDVP) — 0.0-Dimethyl-0-(2.2-dichlorovinyl) phosphate 99,2% was obtained from Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences.

14th day of pregnancy (the last trimester of pregnancy). The insecticide was administered in 0,5 ml oil solution. The LD₅₀ dose was taken after Rusiecki (1966) as 56 mg/kg body weight. The control rats received 0.5 ml oil in the respective pregnancy period. The offspring born a day after the last administration of Dichlorvos were decapitated on the 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 and 56 day of life and the brain hemispheres served as a material for preparations and enzyme assays.

Isolation of mitochondrial fractions: the method described by Moore and Jobsis (1970) was followed. The brain hemispheres homogenate in the isolation medium (0,25 M sucrose, 0.5 mM K⁺EDTA, 10 mM HEPES pH 7.4) was centrifuged at 3000 × g for 3 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged again at 30000 × g for 3 min. The supernatant was carefully poured off and a white fluffy layer above the mitochondrial pellet was rejected. The mitochondrial fraction was then washed twice in the isolation medium and spun down at 30000 × g for 3 min. The isolation procedure was performed at 0—4°C and the centrifugations were done in a Janetzki K-70 centrifuge.

Enzyme assays: The cytochrome oxidase activity in the mitochondrial fraction was assayed by a spectrophotometric method of Smith (1954), consisting in measuring the rate of oxidation of ferrocytochrome c at 550 nm. The succinate dehydrogenase activity was determined after King (1963) using the phenazine methasulphate, DCPIP system acting as electron acceptor. Both enzyme activities were assayed directly after solubilization of the mitochondrial fractions in 1% sodium deoxycholate (1 : 1). Protein was determined with biuret method (Layne, 1957).

RESULTS

The changes of cytochrome oxidase activity in the brain of offspring in various periods of ontogenesis following intoxication with Dichlorvos during pregnancy are illustrated in Fig. 1.

In control conditions, the activity was observed to grow steadily up to the 16th day of life, the net increase reaching about 250%. In the period from 16 to 56 days of life the activity did not undergo significant alterations and its level was identical to that previously observed in the adult rat brain (Sitkiewicz, Zalewska, 1975; Sitkiewicz et al., 1976). The effect of Dichlorvos became manifested in the period of the increase of the activity (1st — 16th day). The application of 2% and 10% LD₅₀ doses of Dichlorvos are observed to lead to a decrease of cytochrome oxidase activity by about 20% and 40% respectively; this decrease however, appea-

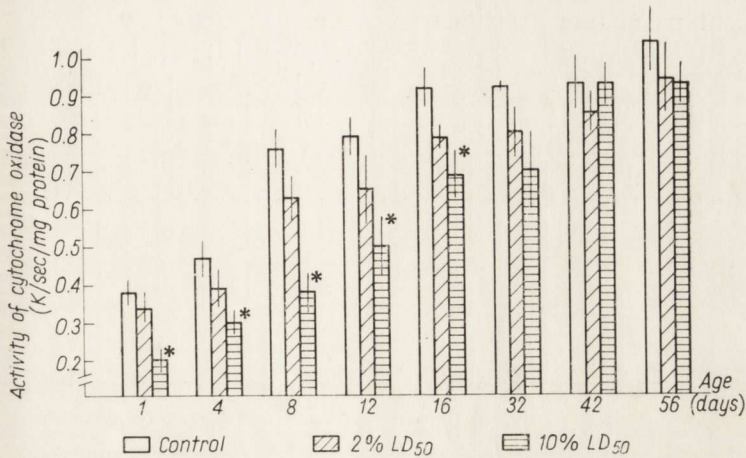


Fig. 1. Variation of cytochrome oxidase activity in the offspring following Dichlorvos intoxication of pregnant rats. Levels shown are mean values \pm standard error of the mean from 6 animals. *) statistical significance $p \leq 0.05$.

Ryc. 1. Zmiany aktywności oksydazy cytochromowej w mózgu szczura w zależności od wieku po zatruciu ciężarnych samic dichlorfosem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 6 szczurów. *) znamienność statystyczna $p \leq 0.05$.

red statistically significant only in the latter case. The inhibitory effect of Dichlorvos was virtually absent in the 42nd and 56th day of life.

The pattern of changes of the succinate dehydrogenase activity during ontogenesis appeared similar to that of cytochrome oxidase. In the early period (1 — 16 day) the activity increased to 1.5 times of the initial value and then stabilized at a level characteristic for the adult rat brain (Sitkiewicz, Zalewska, 1975; Sitkiewicz et al., 1976).

Likewise in the case of cytochrome oxidase, the effect of Dichlorvos on the succinate dehydrogenase activity became apparent in the first days of life. A 10% LD₅₀ dose of the insecticide produced a statistically significant decrease (by $\pm 25\%$) of the enzyme activity in the period from the 1st to 16th day of life. The animals in this group reached the control adult rats activity around the 30th day of life.

DISCUSSION

The development of the brain is accompanied by changes in the activities of several enzymatic systems (Seiler, 1969; Metzler, Humm, 1951; Dahl, Samson, 1959; Brady, 1960; Bonavita et al., 1964; Giacobini, 1972). An essential factor in the maturation of the central nervous system is the process of myelination. Rapid myelinogenesis is taking place in rat

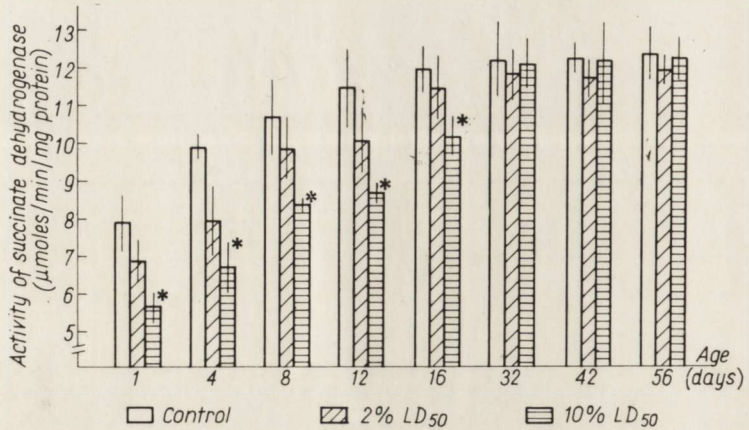


Fig. 2. Succinate dehydrogenase activity in the developing rat following Dichlorvos intoxication of pregnant rats. Levels shown are mean values \pm standard error of the mean from 6 animals. *) statistical significance $p \leq 0.05$.

Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w rozwijającym się mózgu szczura po zatruciu ciężarnych samic dichlorfosem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 6 szczurów. *) znamienność statystyczna $p \leq 0.05$.

between the 10 — 20 day of life (Rappoport et al., 1971), and is accompanied by an fast increase of a number of enzyme activities, among others those of the mitochondrial enzymes (Tewari, Bourne, 1962). Dahl and Samson (1959) observed a marked increase of the mitochondrial proteins and DNA content in the rat brain during the first 20 days of life. The present work revealed a significant rise of cytochrome oxidase (about 2.5 fold) and succinate dehydrogenase (1.5 fold) activities in the rapid myelination period.

The mechanism of myelination is not yet known in detail. Brady and Quarles (1973) have postulated a close relation of the metabolism of gangliosides, glycoproteins and specific basic proteins to myelinogenesis. The decrease of the of the succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in the brains of offspring following intoxication of their mothers with Dichlorvos may lead to changes in myelinogenesis as a consequence of the disturbances in bioenergetic metabolism of the nerve cells. The both enzymes activities in brains of the offspring of intoxicated mothers have reached the control level with a marked delay, i.e. by the end of the 1st month of life. This fact may be indicative of a late termination of the myelination process.

Parallel experiments with the same intoxication mode revealed the absence of essential changes in the blood and brain cholinesterases in offspring of intoxicated mothers (Zalewska et al., 1977) It is hard to

decide however, whether the described changes in the activities of mitochondrial oxidoreductases are due to decreased synthesis or to direct inhibition of the enzymes by Dichlorvos and its metabolites.

The authors wish to thank Mrs Barbara Dyjak for her excellent technical assistance.

Z. Zalewska, B. Wolna, D. Sitkiewicz, W. Bicz

WPLYW DICHLORFOSU NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH UKŁADÓW ENZYMATYCZNYCH MÓZGU SZCZURA PODCZAS ROZWOJU OSOBNICZEGO

II. Oksydoreduktazy

Streszczenie

Badano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej w mózgach potomstwa po zatruciu ciężarnych samic dichlorfosem. Insektycyd podawano *per os* w dawkach 2 i 10% LD₅₀ podczas ostatniego trymestru ciąży. Aktywność enzymów oznaczano we frakcjach mitochondrialnych półkul mózgu potomstwa w 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 i 56 dniu życia.

W grupie kontrolnej podczas pierwszych szesnastu dni życia stwierdzono około 2,5-krotny przyrost aktywności oksydazy cytochromowej i około 1,5-krotny wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. W tym samym okresie w mózgach potomstwa samic zatrutowanych dawką 10% LD₅₀ dichlorfosu obserwowano obniżoną aktywność obu enzymów.

З. Залевска, Б. Вольна, Д. Ситкевич, В. Бич

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРФОСА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ МОЗГА КРЫСЫ ВО ВРЕМЯ ОНТОГЕНЕЗА

II. Оксидоредуктазы

Резюме

Исследована активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в мозгах потомства после отравления беременных самок дихлорфосом. Инсектицид вводили *per os* в дозах 2 и 10% ЛД₅₀ во время последнего триместра беременности. Активность обоих ферментов определяли в митохондриальных фракциях мозговых полушарий потомства в 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 и 56 день жизни.

В контрольной группе в течение первых 16 дней жизни установлено увеличение активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы приблизительно в 2.5 и 1.5 раза соответственно. В этот же самый период в мозгах потомства самок, отравляемых 10% ЛД₅₀ дозой дихлорфоса, наблюдали сниженную активность обоих ферментов.

REFERENCES

1. Bonavita V., Ponte F., Amore G.: Lactate dehydrogenase isozymes in the developing rat brain. *Nature* 1962, 196, 576—577.
2. Brady R. O.: Biosynthesis of fatty acids. II. Studies with enzymes obtained from brain. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 3099—3103.
3. Brady R. O., Quarles R. H.: The enzymology of myelination. *Molec. Cell. Biochem.*, 1973, 2, 23—29.
4. Dahl D. R., Samson F. E.: Metabolism of rat brain mitochondria during postnatal development. *Am. J. Physiol.*, 1959, 196, 470—472.
5. Giacobini G.: Embryonic and postnatal development of choline acyltransferase activity in muscles and sciatic nerve of the chick. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 1401—1403.
6. Johnson M. K.: The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 285—289.
7. King T. E.: Reconstruction of respiratory chain enzyme systems. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
8. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*. Colowick S. P., Kaplan N. O. Ed.: Academic Press, New York, 1957, 3, 447—454.
9. Metzler C. J., Humm D. G.: The determination of cholinesterase activity in whole brains of developing rats. *Science* 1951, 113, 382—383.
10. Moore C. L., Jobsis F. F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 138, 295—305.
11. Porcellati G.: Demyelinating cholinesterase inhibitors: lipid and protein metabolism. *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha A. Ed.: Plenum Press, New York, London, 1971, 6, 457—478.
12. Happort D. A., Fritz R. R., Yamagami S.: Development. *Handbook of Neurochemistry*. Lajtha A. Ed.: Plenum Press, New York, London, 1971, 5, 439—480.
13. Rusiecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. PZWŁ, Warszawa, 1966, 52—69.
14. Seiler N.: Enzyme changes during development. *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha A. Ed.: Plenum Press, New York—London, 1969, 1, 337—355.
15. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 463—469.
16. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzcńska A.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura i kury. *Roczn. PZH*, 1976, 27, 277—286.
17. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 285—298.
18. Tewari H. B., Bourne G. H.: Histochemical studies on the distribution of oxidative enzymes in the cerebellum of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 619—627.
19. Zalewska Z., Rakowska I., Matraszek G., Sitkiewicz D.: Effect of Dichlorvos on some enzymes activity of the rat brain during postnatal development. I. Cholinesterases. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 255—262.

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

MAGDALENA ROSSOWSKA, ZBIGNIEW DĄBROWIECKI

EFFECT OF HYPOXIA AND ISCHEMIA ON THE ACTIVITY
OF PHOSPHATASES IN THE CELLULAR MEMBRANE
FRACTION FROM GUINEA PIG BRAIN

Department of Neurochemistry, Medical Research Centre Polish Academy
of Sciences

Head: Ass. Prof. A. Gromek

In the course of experimental hypoxia, the membranes of the central nervous system cells are subjected to damage, which finds expression in the disturbances of some enzyme activities [$\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{ATPase}$] and in the increase of the free fatty acids content (Rossowska et al., 1976), although the mechanism of these changes is still obscure. It was shown by Waite et al. (1969) that free fatty acids may activate phospholipase causing further destruction of the membrane. In turn, the mechanism of partial inhibition of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{ATPase}$ may presumably be related to conformational changes in the glycoprotein part of the enzyme (Rossowska et al., unpublished).

The present work aimed to analyze the activity of some phosphatases bound with cell and intracytoplasmic membranes in the course of experimental hypoxia and ischemia. A special attention has been focused on the changes in the phospholipids composition of the cellular fractions and on the calcium and magnesium concentration as the possible factors affecting the activity of the phosphatases in question.

MATERIAL AND METHODS

Three hundred guinea pigs, weighing about 250 g, were used in all experiments. In the experimental groups, the animals were treated as follows: 1) The animals were submitted to hypoxia for 30 min in a chamber with constant flow of gas mixture containing 7% O_2 and 93% N_2 ; 2) The animals were decapitated and their heads were left for 5 min at 37° .

In the control group the brains were taken immediately after decapitation. The brain hemispheres were homogenized with a glass-teflon homogenizer in 0.32 M sucrose pH 7.4 at 4°. The microsomal fraction was isolated according to Nyman and Whittaker (1963). The crude fraction of cellular membrane was obtained by the method of Coleman et al. (1967). In order to purify the plasma membrane fraction, sucrose gradient centrifugation was used according to the method of Henn et al. (1972). MSE Magnum centrifuge and MSE 65 ultracentrifuge were used. The activity of 5'-nucleotidase was determined according to Heppel and Hilmo (1965). Glucose-6-phosphatase activity was assayed with 0.08 M glucose-6-phosphate in 0.1 M citrate buffer, pH 6.5 at 37°.

The effect of oleic acid or calcium on the activity of glucose-6-phosphatase was measured after preincubation of the microsomal fraction for 30 min at 4° with oleic acid or CaCl₂ in the absence of glucose-6-phosphate. Oleic acid was dispersed sonically at pH 6.5. Alkaline and acid phosphatases were assayed with 0.08 M sodium β-glycerophosphate. An 0.1 M veronal buffer pH 8.8 was used for the alkaline phosphatase and 0.1 M acetate buffer pH 5.0 for the acid phosphatase. All the enzyme activities were corrected by subtracting P_i present in fraction and substrates at zero time. Inorganic phosphate was estimated by the method of Fiske-Subbarow (1925). Protein was estimated by the method of Lowry et al. (1951).

Total lipids were extracted by the procedure described by Blight and Dyer (1959). A mixture of phospholipids was separated by TLC. The areas containing the individual phospholipids were detected, stripped from plates and analysed for inorganic phosphate by the procedure of Bartlett (1959).

Calcium and magnesium content in the microsomal fractions were determined with a Perkin-Elmet, Model 300 atomic absorption spectrometer according to the method of Reynafarje and Lehninger (1969).

RESULTS

As shown in Table 1, ischemia has led to the decrease of the glucose-6-phosphatase activity both in the microsomal and plasma membrane fraction. The 5'-nucleotidase and the acid- and alkaline phosphatases, in turn, appeared unaffected and this holds to either of the cellular fractions. Treatment of the isolated microsomal and plasma membrane fractions with Triton X-100 resulted in an increase of the glucose-6-phosphatase and acid phosphatase activities by 50%, whereby the former remained lower in the ischemia than in the control brains in the case of glucose-6-phosphatase.

Table 1. The activity of phosphatases in membrane fraction from guinea pig brain in various experimental conditions

Tabela 1. Aktywność fosfataz we frakcjach błon komórkowych uzyskanych z homogenatów mózgow świnek morskich w różnych warunkach doświadczalnych

Fraction Frakcja	Experimental conditions Warunki doświadczalne	5'nucleotidase 5'nukleotydaza	Alkaline phosphatase Alkaliczna fosfataza	Glucose-6-phosphatase Glukoza-6-fosfataza	Acid phosphatase Kwaśna fosfataza
		μmoles of Pi/h/mg p μmole Pi/godz./mg b			
Microsomes Mikrosomy	Control	2.19 ± 0.78 (3)	0.594 ± 0.06 (4)	0.681 ± 0.186 (8) 1.107 ± 0.121* (4)	0.791 ± 0.0121 (4) 1.333 ± 0.146* (3)
	Hypoxia 30 min, 7% O ₂	2.13 ± 0.41 (3)	0.527 ± 0.09 (3)	0.725 ± 0.05 (3) 1.001 ± 0.08* (3)	0.879 ± 0.04 (3) 1.234 ± 0.148* (3)
	Ischemia 5 min, 37°	1.95 ± 0.28 (3)	0.537 ± 0.112 (4)	0.493 ± 0.03 (7) 0.801 ± 0.07* (6)	0.770 ± 0.107 (3) 1.316 ± 0.08 (3)
Plasma membrane	Control	4.33 ± 1.12 (3)	0.746 ± 0.05 (3)	0.489 ± 0.107 (3) 1.184* (2)	0.589 (2) 1.18* (2)
Błony komórkowe	Ischemia 5 min, 37°	3.14 ± 0.29 (4)	0.702 (2)	0.271 (2) 0.462* (2)	0.660 (2) 1.12* (2)

*) The fractions were treated with Triton X-100 (final concentration 0.04%, 30 min, 25°C).

*) Frakcje były traktowane Tritonem X-100 (końcowe stężenie 0.04%, 30 min, 25°C).

Means ± the standard deviations were calculated from the number of determinations indicated in parentheses. To each experiment 6—12 animals were used.

Średnie ± S.D. były obliczane z ilości doświadczeń przedstawionych w nawiasach. Do każdego doświadczenia użyto 6—12 zwierząt.

Experimental hypoxia did not produce a decrease of the phospholipids level in the fractions examined. However, ischemia resulted in a drop of the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine content below the control level (Table 2).

The Ca^{+2} and Mg^{+2} content in the microsomal fractions are presented in Table 3. As shown, both ischemia and hypoxia have led to the increase of Ca^{+2} but not Mg^{+2} level.

Table 2. Content of phospholipids in membrane fraction from guinea pig brain in various experimental conditions

Tabela 2. Zawartość fosfolipidów we frakcjach błon komórkowych uzyskanych z homogenatów mózgu świnek morskich w różnych warunkach doświadczalnych

Fraction Frakcja	Experimental conditions Warunki doświadczalne	Phosphatidylcholine	Phosphatidylethanolamine
		Fosfatydylo-cholina	Fosfatydylo-etanolamina
		nmoles/mg of protein nmole/mg białka	
Microsomes Mikrosomy	Control	181.65 ± 18.55 (6)	128.70 ± 8.05 (5)
	Hypoxia 30 min, 7% O ₂	187.24 ± 17.58 (4)	117.75 ± 4.61 (4)
	Ischemia 5 min, 37°	146.36 ± 9.36 (3) p < 0.05	109.70 ± 7.73 (3) p < 0.05
Plasma membrane Błony komórkowe	Control	185.36 ± 6.66 (3)	174.38 ± 25.61 (4)
	Ischemia 5 min, 37°	(157.30 168.38) 162.84*	141.66 ± 9.29 (3)

*) Mean from particular experiments.

*) Średnie z poszczególnych doświadczeń.

Means ± the standard deviations were calculated from the number of determinations indicated in parentheses. To each experiment 6—12 animals were used.

Średnie ± S.D. były obliczane z ilości doświadczeń przedstawionych w nawiasach. Do każdego doświadczenia użyto 6—12 zwierząt.

Fig 1 shows that there was no effect of either exogenous oleate or exogenous calcium on the glucose-6-phosphatase activity in the microsomal fraction.

DISCUSSION

The results indicate that experimental hypoxia does not affect the activity of the examined phosphatases in the microsomal and plasma membrane fractions of the guinea pig cerebral cortex and the same holds for the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine contents.

Table 3. Content of Ca^{+2} and Mg^{+2} in the microsomal fraction from guinea pig brain cortex.
Tabela 3. Zawartość Ca^{+2} i Mg^{+2} we frakcji mikrosomalnej uzyskanej z kory mózgu świnek morskich

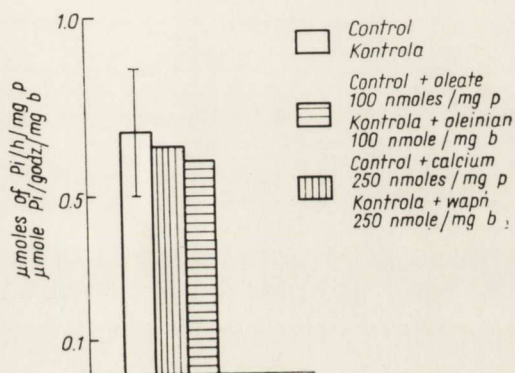
Fraction Frakcja	Experimental conditions Warunki doświadczalne	Ca^{+2}		Mg^{+2}	
		nmole/mg p nmole/mg b		nmole/mg p nmole/mg b	
	Control	14.72 ± 0.58	(3)	68.99 ± 7.69	(3)
Microsomes Mikrosomy	Hypoxia 7% O_2 , 30 min	(18.31 18.87)	18.59*	79.69 ± 7.84	(3)
	Ischemia 5 min, 37°	26.87 ± 5.67		78.23 ± 10.24	(4)
		p < 0.05			

*) Mean from particular experiments.

*) Średnie z poszczególnych doświadczeń.

Means ± the standard deviations were calculated from the number of determinations indicated in parentheses. To each experiment 6—12 animals were used.

Średnie ± S.D. były obliczane z liczby doświadczeń w nawiasach. Do każdego doświadczenia użyto 6—12 zwierząt.



Gig. 1. Effect of calcium and oleate on the activity of glucose-6-phosphatase in the microsomal fraction.

Ryc. 1. Wpływ wapnia i oleinianu na aktywność glukozy-6-fosfatazy w mikrosomalnej frakcji.

The only remarkable change was the increase in the calcium content. Hence, the above results appear to suggest that oxygen deficiency in the central nervous system finds in its earliest phase manifestation in the alterations in the ion balance. With progressing hypoxia and ischemia, these changes may, among others, evoke disturbances in the activity of membrane enzymes, as demonstrated in the case of $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ (Rossowska et al., 1975).

In the conditions of postdecapitative ischemia, a drop in the glucose-6-phosphatase activity was not accompanied by changes in the other phosphatases, but coincided with the decrease in the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine level in both the microsomal and plasma membrane fractions. The latter change is presumably evoked by lytic processes and seems to be responsible for the decrease of the glucose-6-phosphatase activity.

The increase of calcium ions content accompanying postdecapitative ischemia does not seem to be causally related to the decrease of the glucose-6-phosphatase activity, since exogenous Ca^{+2} present in the incubation medium does not influence this enzyme activity.

In conclusion it may be stated that the methods and experimental conditions here applied disclosed the disturbance in the ion balance (Ca^{+2}) as the earliest change in the central nervous tissue hypoxia. These disturbances may on one hand stimulate the intracellular degradation by activating the respective enzymes (phospholipase) and, on the other, they may modify the conformation of enzyme complexes, as shown in the case of $[\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}]/\text{ATPase}$ (Churchill and Hokin, 1976). In this connection, the changes in the activity of the examined phosphatases may be considered as secondary.

M. Rossowska, Z. Dąbrowiecki

WPLYW HIPOKSJI I ISCHEMII NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZ WE FRAKCJI BŁON KOMÓRKOWYCH MÓZGU ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Przebadano wpływ niedoboru tlenowego na aktywność specyficznych i niespecyficznych fosfataz we frakcji mikrosomalnej i frakcji błon komórkowych uzyskanych z homogenatów kory mózgu świnek morskich. Nie stwierdzono zmian w aktywności 5'-nukleotyduazy, kwaśnej fosfatazy oraz alkalicznej fosfatazy. Jedynie w warunkach ischemii dekapitacyjnej obserwowano obniżenie aktywności glukozy-6-fosfatazy, które wydaje się skorelowane z zaburzeniami komponentu fosfolipidowego badanych frakcji. Obserwowany wzrost zawartości jonów wapnia związany z frakcją mikrosomalną świadczy o zaburzeniach w gospodarce mineralnej komórek ośrodkowego układu nerwowego w warunkach procesu niedotlenienia.

М. Россовска, З. Домбровецки

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФАТАЗ ВО ФРАКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН МОЗГА МОРСКОЙ СВИНКИ

Резюме

Исследовано влияние кислородной недостаточности на активность специфических и неспецифических фосфатаз в микросомальной фракции и во фракции клеточных мембран, полученных из гомогенатов мозговой коры морских свинок.

Не установлено изменений активности 5'-нуклеотидазы, кислой и щелочной фосфатаз. Только в условиях декапитационной ишемии наблюдали снижение активности глюкозо-6-фосфатазы, которое по-видимому коррелирует с нарушениями фосфолипидного компонента исследованных фракций. Отмеченное повышение содержания ионов кальция, связанное с микросомальной фракцией, свидетельствует о нарушениях минерального хозяйства клеток центральной нервной системы в условиях процесса гипоксии.

REFERENCES

1. Bartlett G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 466—468.
2. Bligh E. G., Dyer W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911—917.
3. Churchill L., Hokin L. E.: The resceptibility of the glycoprotein from the purified ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) — activated adenosine triphosphatase to tryptic and chymotryptic degredation with and without Na^+ and K^+ . *Biochem. Biophys. Acta* 1976, 343, 258—264.
4. Coleman R., Michell R. H., Finean J. B., Hawthorne J. N.: A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions. *Biochem. Biophys. Acta* 1967, 135, 573—579.
5. Fiske G. H., Subbarow J.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925, 66, 375—400.
6. Heppel L. A., Hilmoer R. J.: In: *Methods in Enzymology*, Ed.: S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Vol. 2, Academic Press N. Y. 1965.
7. Henn F. A., Hansson H. A., Hamberger A.: Preparation of plasma membrane from isolated neurons. *J. Cell. Biol.* 1972, 53, 654—661.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—275.
9. Nyman M., Whittaker V. P.: The distribution of adenosine triphosphate in subcellular fractions of brain tissue. *Biochem. J.* 1963, 87, 248—255.
10. Reynafarje B., Lehninger A. L.: High affinity and low affinity binding of Ca^{++} by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 584—593.
11. Rossowska M.: Effect of ischemia and nembutal anesthesia on the activity of ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase and 5'-nucleotidase in the cellular membrane fraction from guinea pig brain. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* 1975, 23, 655—661.
12. Rossowska M., Lewandowski W., Dąbrowiecki Z.: Effect of ischemia on the activity of ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase in the microsomal fraction of guinea pig brain. *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* 1976, 24.
13. Rossowska M., Rossowski W., Żernik M.: ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase activity and concanavalin A binding properties of the normal, hypoxic and ischemic brain cortex membrane fraction (unpublished).
14. Waite M., Scherphof G. L., Boshouwers F. M. G., van Deenen L. L. M.: Differentiation of phospholipases A in mitochondria and lysosomes of rat liver. *J. Lipid Res.* 1969, 10, 411—417.

Authors address: Department of Neurochemistry, Medical Research Centre, 00-874 Warsaw, 3 Dworkowa Str.

MARIA OSTENDA, ROMAN GADAMSKI

OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY ZŁĄCZA
NACZYNIOWO-TKANKOWEGO W DOŚWIADCZALNYM
UCISKOWYM OBRZĘKU MÓZGU U KOTÓW

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

Badania nad doświadczalnym obrzękiem mózgu, wywołanym przy pomocy nadciężności ucisku półkuli mózgu (Ishii i wsp. 1959) pozwoliły na określenie jego charakteru i dynamiki rozwoju (Gadamski i wsp. 1974, Szumańska i wsp. 1974, Zelman i wsp. 1974). W obserwacjach przeprowadzonych przy użyciu konwencjonalnych znaczników barierowych (Gadamski i wsp. 1974) i metod histochemicznych (Szumańska i wsp. 1974) stwierdzono cechy uszkodzenia bariery krew-mózg, pozwalające na zakwalifikowanie występującego w tych warunkach obrzęku do grupy naczyniopochodnych (Klatzo 1967). Równocześnie dynamika rozwoju zmian patologicznych, ich rozmieszczenie w ośrodkowym układzie nerwowym oraz histochemiczne wykładniki zaburzeń metabolicznych w tkance nerwowej sugerowały ich związek z hemodynamicznymi zaburzeniami krążenia mózgowego, prowadzącymi do upośledzenia ukrwienia mózgu.

W świetle powyższych obserwacji wydawało się celowe przeprowadzenie mikroskopowo-elektronowej oceny stanu złącza naczyniowo-tkankowego we wczesnych stadiach rozwijającego się obrzęku. Proces narastania obrzęku, drogi jego rozprzestrzeniania się oraz lokalizacja gromadzącego się płynu obrzękowego są zjawiskami, dla których oceny mikroskopowa elektronowa jest metodą z wyboru.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 5 dorosłych kotach obu płci, o ciężarze ciała od 2,700 do 3,800 kg, u których wywoływano miejscowy ucisk mózgu przez nadciężnościowo umieszczony balonik lateksowy o pojemności 1 ml na okres od 2 do 12 godzin. Opis zabiegu operacyj-

nego oraz technikę przeprowadzenia ucisku podano w pracy Zelman i wsp. (1974) oraz Gadamskiego i wsp. (1977).

Materiał do badania pobierano przyżyciowo z półkuli uciśniętej po opróżnieniu i usunięciu balonika i powiększeniu otworu trepanacyjnego do średnicy około 1,5 cm. Taki sam otwór trepanacyjny wykonany po stronie przeciwległej służył po zaprzestaniu ucisku, do pobierania tkanki z symetrycznej okolicy półkuli nie uciśniętej. W oparciu o wyniki poprzednio przeprowadzonych doświadczeń wyodrębniono 4 grupy zwierząt, u których ucisk trwał 2, 4, 6 i 12 godzin. Pobrane fragmenty tkanki utrwalano przez imersję w 5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym o pH 7,2 przez 90 min. w temperaturze 4°. Dodatkowe utrwalanie przeprowadzano w 0,5% roztworze OsO₄ w buforze kakodylowym o pH 7,2 w temperaturze 4° przez 1 godz. Bloczki po odwodnieniu w alkoholu o wzrastającym stężeniu, zatapiano w Eponie AB 850 i skrawano na ultramikrotomie LKB III. Skrawki kontrastowano octanem uranylu oraz cytrynianem ołowiu. Obserwacje przeprowadzano i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 500.

Kot, u którego wykonano jedynie otwory trepanacyjne bez ucisku balonikiem, służył jako kontrola.

WYNIKI

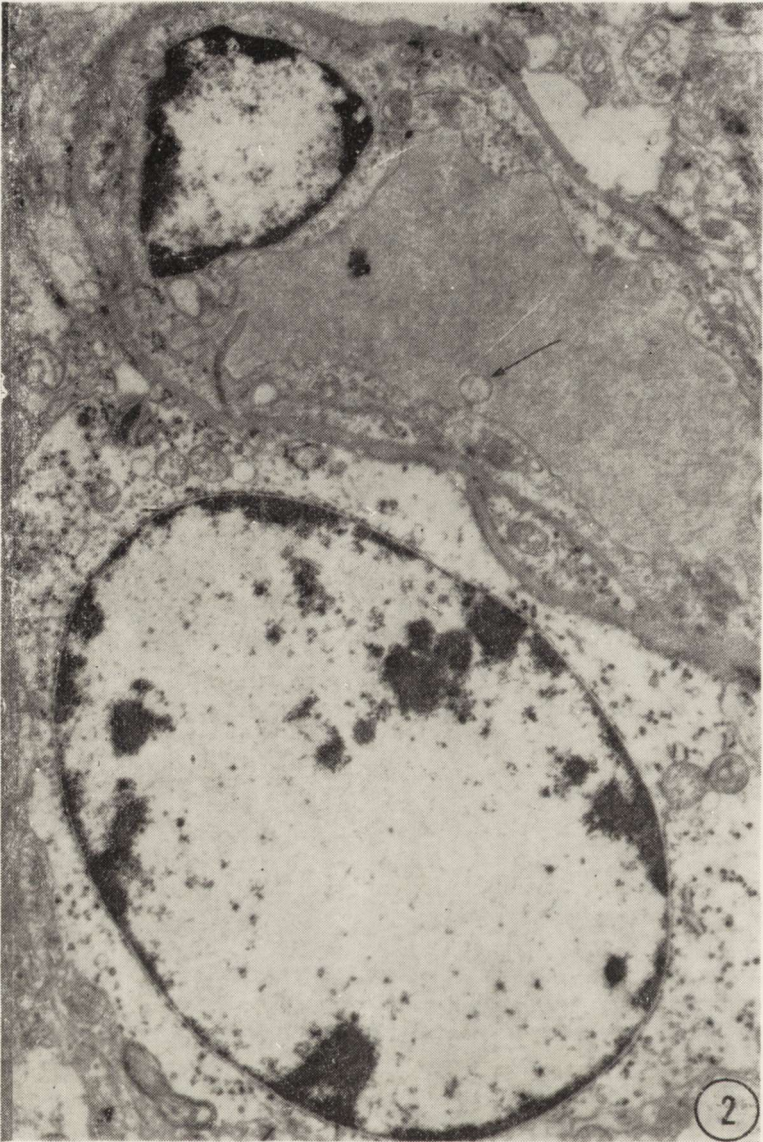
We wczesnych okresach ucisku balonikiem (2—4 godz.) zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym naczyń i przylegającej do nich tkanki były nieznaczne w porównaniu do obrazów kontrolnych (ryc. 1). W niektórych kapilarach spostrzegano niewielkie pogrubienie śródbłonka naczyń oraz zwiększenie ilości pęcherzyków mikropinocytarnych w poszczególnych komórkach śródbłonkowych (ryc. 2, 3). Zespoleń między śródbłonkami pozostawały niezmienione. Astrocyty zarówno przylegające bezpośrednio do naczynia jak i leżące w neuropilu bez związku ze ścianami naczyńniowymi były obrzmiałe. Posiadały one przezierną elektronowo cytoplazmę i były ubogie w organelle (ryc. 2, 4). Obrzmiałe astrocyty stwierdzano w obu półkulach mózgu, przeważnie jednak po stronie uciśniętej. W omawianej grupie często obserwowano występowanie neuronów o elektono-gęstej cytoplazmie, w której znajdowały się liczne poszerzone kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz wakuole (ryc. 4). Oligodendrocyty nie wykazywały uchwytynych odchyień w stosunku do preparatów kontrolnych (ryc. 5).

Po 6 godzinach ucisku rozwinął się obraz typowy dla obrzęku mózgu i utrzymywał się w tej samej postaci do 12 godziny, tj. do końca do-



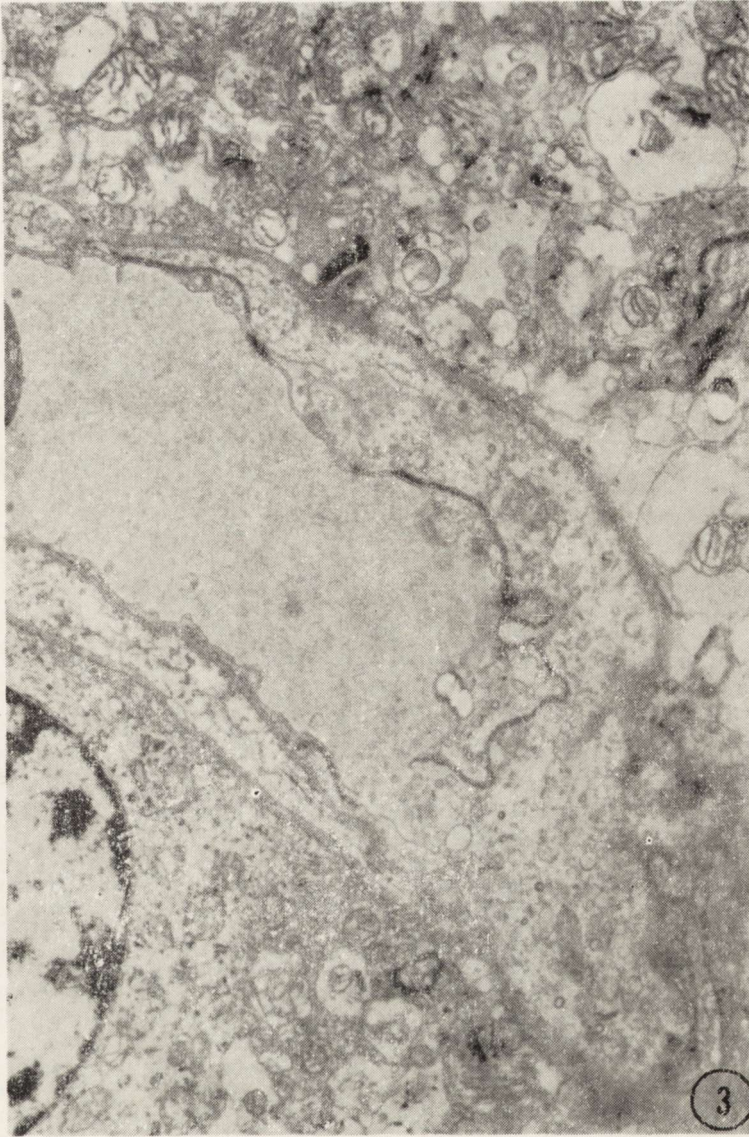
Ryc. 1. Kot kontrolny. Tkanka mózgu pobrana z okolicy ciemieniowej. Prawidłowe naczynia włosowate o cienkiej błonie podstawnej. Zespolecia międzyśródbłonkowe zwarte. W śródbłonku widoczne są niezbyt liczne pęcherzyki mikropinocytarne (strzałki). Pow. 14.000 \times .

Fig. 1. Control animal. The brain tissue from the parietal area. Normal capillary vessel with thin basal membrane. Interendothelial junctions are closed. Within endothelium few micropinocytotic vesicles are visible (arrows). $\times 14\,000$.



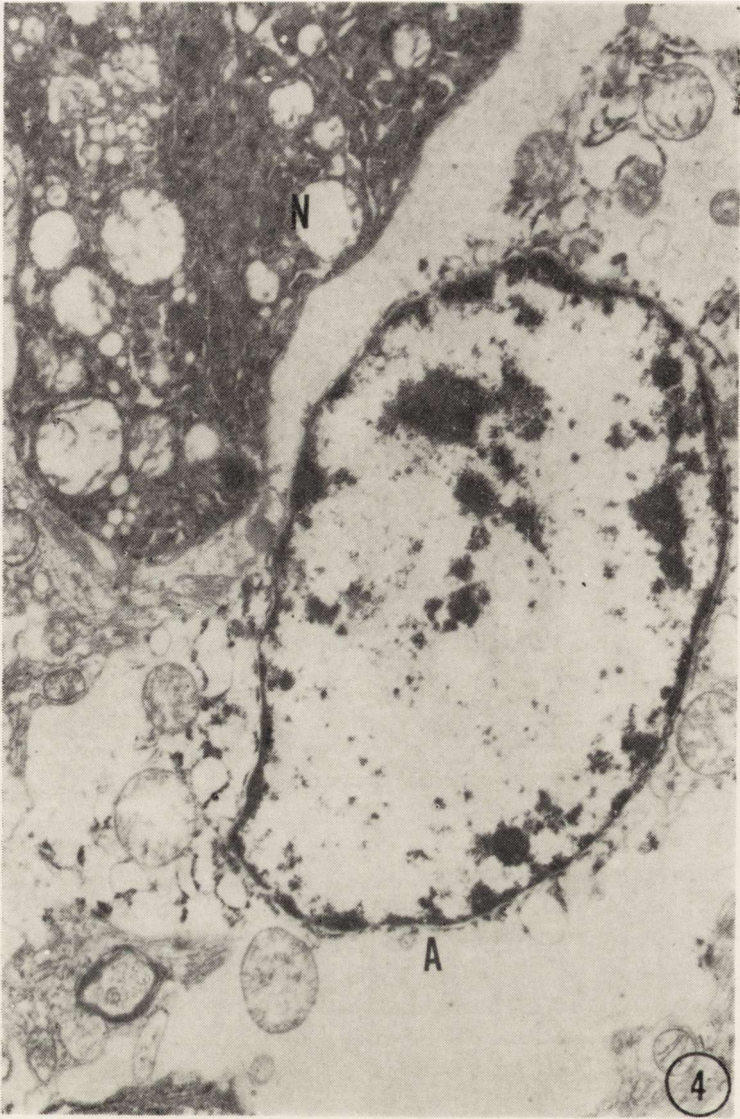
Ryc. 2. Półkula mózgu uciskana przez 2 godz. Włośniczka o pogrubiałym śródbłonku, w którym widoczne są liczne pęcherzyki pinocytarne oraz pojedyncze balonowate wpuklenie cytoplazmy do światła (strzałka). Astrocyt przylegający do naczynia zawiera w elektronowo przeziernej cytoplazmie wakuole i liczne wolne rybosomy. Pow. 14 000.

Fig. 2. Cerebral hemisphere compressed for 2 hrs. Capillary vessel with thickened endothelium, containing increased number of micropinocytotic vesicles and a single vesicular cytoplasmic indentation towards the lumen of the vessel (arrow). Astrocyte, adjacent to the vessel wall, contains in its electron translucent cytoplasm vacuoles and numerous free ribosomes. X. 14 000.



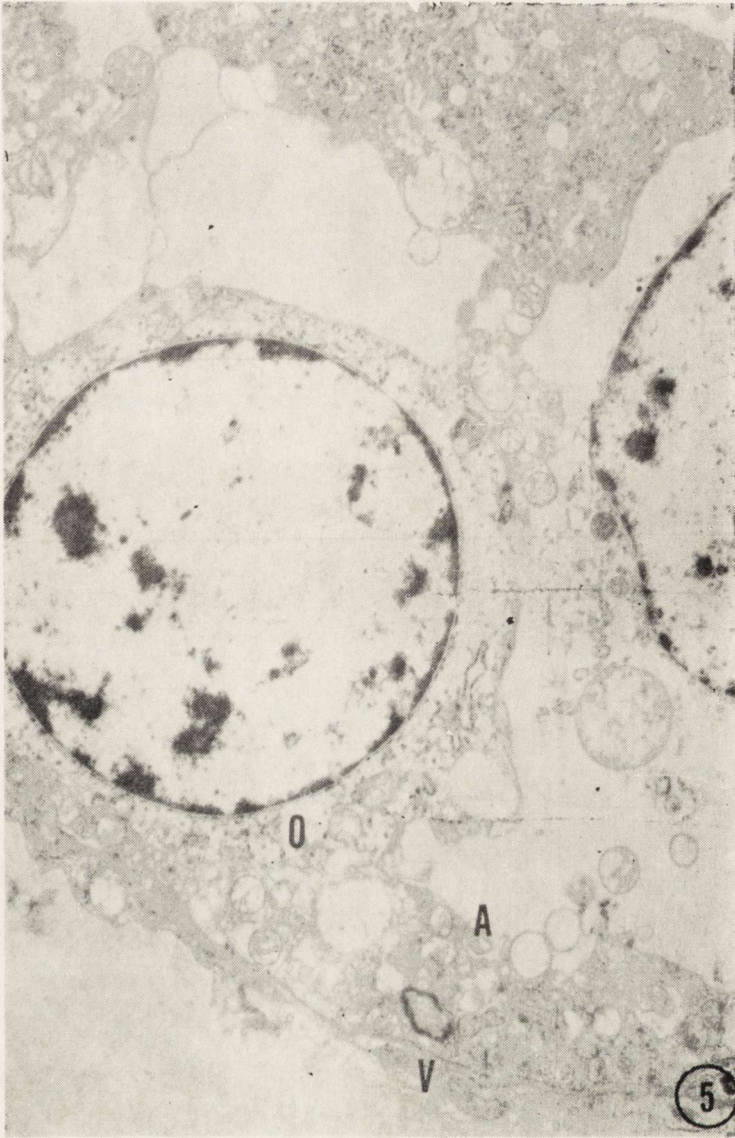
Ryc. 3. Półkula mózgu uciskana przez 2 godz. W śródbłonku naczynia znajdują się liczne pęcherzyki pinocytarne i wakuole. Zspolenie międzysródbłonkowe przecięte stycznie, prawie na całej długości wypełnione materiałem optycznie gęstym.
Pow. 15 000 \times .

Fig. 3. Cerebral hemisphere compressed for 2 hrs. Capillary endothelium contains great number of micropinocytic vesicles and vacuoles. Tangentially cut interendothelial junction filled on almost whole length with electron dense substance.
 \times 15 000.



Ryc. 4. Półkula mózgu uciskana przez 2 godz. Astrocyt (A) o elektrono-optycznie przejrzystej cytoplazmie, w której znajdują się pojedyncze, obrzmiałe mitochondria oraz poszerzone kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Przylegający neuron (N) o elektrono-optycznie gęstej cytoplazmie zawiera poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, wakuole i obrzmiałe mitochondria. Obraz typowy dla tzw. ciemnych neuronów. Pow. 14 000 \times .

Fig. 4. Cerebral hemisphere compressed for 2 hrs. Electron translucent cytoplasm of astrocyte contains single swollen mitochondria and enlarged canals of rough endoplasmic reticulum (A). Adjacent neuron (N) with electron dense cytoplasm, in with enlarged channels of endoplasmic reticulum, swollen mitochondria and vacuoles are seen. The neuron reveals ultrastructural picture typical for so-called dark neurons. \times 14 000.



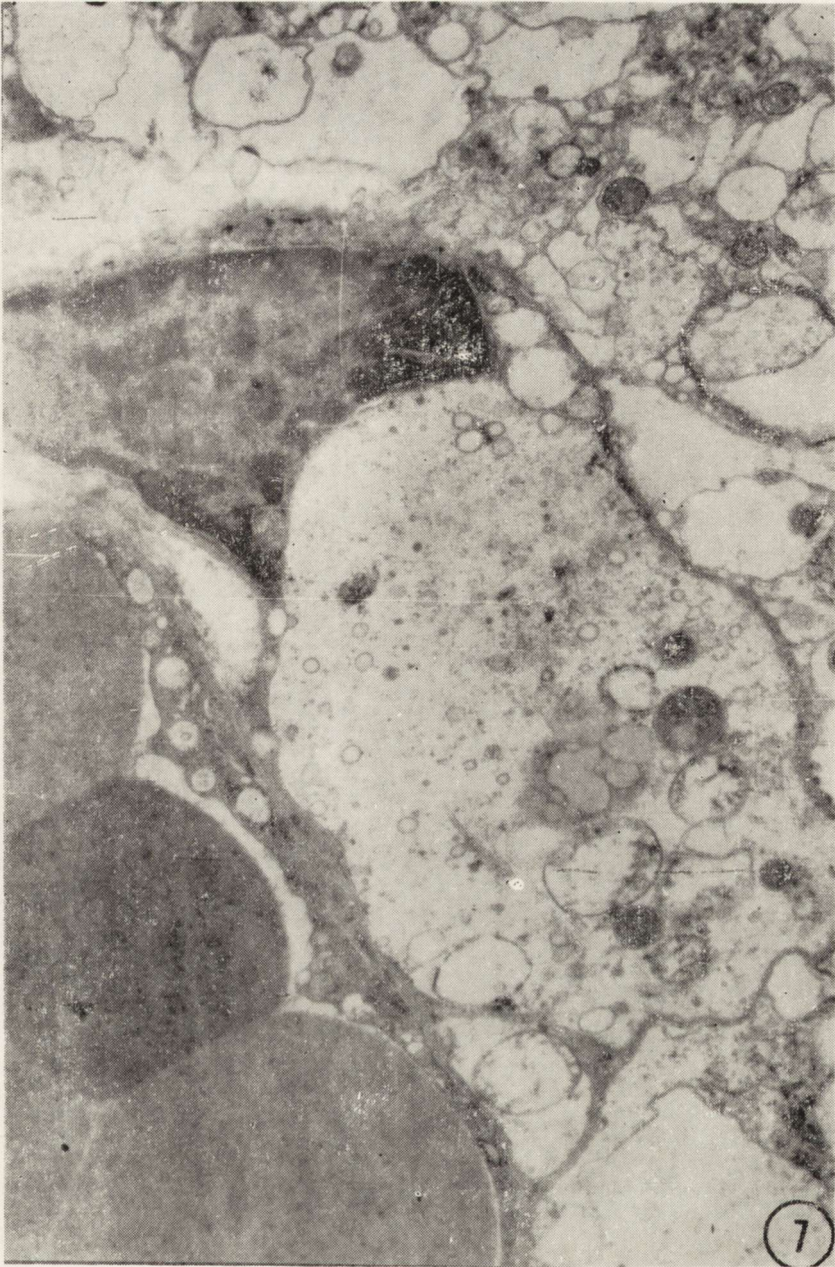
Ryc. 5. Półkula mózgu przeciwna do uciskanej przez 2 godz. W sąsiedztwie niezmienionej ściany naczynia włosowatego (V) astrocyt (A) o elektrono-optycznie przejrzystej cytoplazmie, w której znajdują się nieliczne wakuole i obrzmiałe mitochondria. Do ściany naczyniowej przylega stosunkowo niezmienny oligodendrocyt (O). Pow. 14 000 \times .

Fig. 5. Cerebral hemisphere contralateral to that compressed for 2 hrs. In the neighbourhood of unchanged capillary wall (V) an astrocyte (A) with electron translucent cytoplasm, containing scarce vacuoles and swollen mitochondria. Adjacent oligodendrocyte (o) appears relatively normal. $\times 14\ 000$.



Ryc. 6. Półkula mózgu przeciwna do uciskanej przez 6 godz. Światło włóścizki (L) bardzo znacznie zwężone. Ściężała błona podstawna oddziela obrzmiałe komórki śródbłónka (E) od równie obrzmiałego pericytu (P). W cytoplazmie śródbłónków widoczne pęcherzki mikropinocytarne oraz wakuole. Do naczyń przylegają wypustki astrocytarne o wyraźnych cechach obrzmienia (A). Pow. 6 000 \times .

Fig. 6. Cerebral hemisphere contralateral to that compressed for 6 hrs. Capillary lumen (L) remarkably narrowed. Thin basal membrane separates swollen endothelial cells (E) from equally swollen pericyte (P). Within endothelial cytoplasm micropinocytotic vesicles and vacuoles are seen. The capillary surrounded by swollen astrocytic processes (A). \times 6 000.



Ryc. 7. Półkula mózgu uciskana przez 6 godz. W śródbłonku włóścizki widoczne wakuole. Obrzmienie pericytu. Do naczynia przylegają obrzmiałe wypustki astrocytów. Pow. 21 000 \times .

Fig. 7. Cerebral hemisphere compressed for 6 hrs. In capillary endothelium numerous vacuoles are seen. Swollen pericyte. Adjacent to vascular wall astrocytic processes are also swollen. \times 21 000.

świadczania. W tym okresie największe zmiany obserwowano w naczyniach włosowatych: obrzmienie śródbłonek i pericytów, ścięczenie błony podstawnej (ryc. 6). Bardzo znaczne obrzmienie komórek śródbłonkowych prowadziło do zwężenia światła naczyń włosowatych. W cytoplazmie śródbłonek znajdowały się liczne wakuole, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, ciała gęste oraz obrzmiałe mitochondria. Podkreślić należy, że zespolenia między komórkami śródbłonka były na ogół niezmienione; błony komórkowe przylegały ściśle do siebie (ryc. 6). Podobne zmiany obserwowano w wypustkach pericytów (ryc. 7). W tej grupie doświadczalnej astrocyty miały poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, ich cytoplazma zawierała ciała gęste oraz obrzmiałe mitochondria. Wypustki astrocytarne przylegające do naczyń charakteryzowała znaczna przejrzystość elektronooptyczna. Znajdowano w nich pojedyncze obrzmiałe mitochondria oraz fragmenty siatki śródplazmatycznej (ryc. 6). Wszystkie elementy neuropilu, jak również osłonki mielinowe ulegały w tym okresie zmianom typowym dla mikroskopowo-elektronowego obrazu rozwiniętego obrzęku mózgu. Nie stwierdzano natomiast poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych w żadnej z badanych grup. Zmiany spostrzegane u zwierząt z 6 i 12-godzinnym uciskiem występowały zarówno w uciśniętej jak i nie uciśniętej półkuli mózgu.

OMÓWIENIE

We wczesnych okresach ucisku (2—4 godz.) zmiany obserwowane w tkance mózgowej w okolicach odległych od ucisku osiągają nieznaczne nasilenie. Są to: obrzęk wypustek astrocytarnych, zarówno przylegających do ściany naczyniowej jak i znajdujących się w neuropilu oraz nieznaczne zwiększenie ilości pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonekach włóścików. W okresie 6—12 godz. rozwija się pełny obraz typowego obrzęku zarówno półkuli uciśniętej jak i nie uciśniętej. Zmiany obejmują wszystkie elementy strukturalne mózgu: naczynia krwionośne, neurony, astrocyty, osłonki mielinowe, neuropil. Stosunkowo najmniejsze nieprawidłowości stwierdzano w oligodendrogleju. Najbardziej nasilone zmiany obserwowano natomiast w strukturach tworzących złącze naczyniowo-tkankowe. We włóścikach występuje bardzo znaczne obrzmienie cytoplazmy śródbłonek. Towarzyszy mu również obrzmienie wypustek astrocytów przylegających do naczyń.

Wyraźne nasilenie pinocytozy w śródbłonekach naczyń można by uznać za mikroskopowo-elektronowy odpowiednik przechodzenia substancji białkowych przez ścianę naczynia. Gadamski i wsp. (1974) posługując się

w tym samym modelu doświadczalnym techniką fluoryzujących znaczników barierowych stwierdzili gromadzenie się barwnika sprzężonego z białkiem surowicy w ścianach naczyń oraz wokół naczyń w postaci kulistych tworów. Obserwacje w mikroskopie świetlnym pozwoliły tylko na przybliżoną lokalizację fluoryzujących kul, nie rozstrzygając czy mieszczą się one wewnątrz wypustek komórkowych pericytów lub astrocytów, czy też leżą swobodnie w przestrzeni międzykomórkowej. Obserwacje w mikroskopie elektronowym nie ujawniły poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych, mogą przeto pośrednio przemawiać za gromadzeniem białek w okołonaczyniowych wypustkach komórkowych. Pozostaje to również w zgodności z wynikami uzyskanymi przez Szumańską i wsp. (1974).

Prawidłowo ukształtowane zespolenia międzyśródbłonkowe naczyń włosowatych, nawet w późnych okresach obrzęku, przy równoczesnym stwierdzeniu przechodzenia substancji białkowych poza łożysko naczyniowe, wskazują że przynajmniej w warunkach zastosowanego modelu doświadczalnego obrzęk naczyniopochodny nie wiąże się z uszkodzeniem zespołów ścisłych.

Najwcześniejszym objawem procesów patologicznych toczących się w mózgu było obrzmienie cytoplazmy astrocytów, zwłaszcza ich wypustek przylegających do naczyń. Potwierdza to pogląd wyrażony między innymi przez Hagera (1972) i Longa i wsp. (1974), że obrzęk naczyniopochodny mózgu, nawet spowodowany zmianami hemodynamicznymi zaczyna się od zmian komórkowych. Zmiany te w pierwszej kolejności dotyczą astrocytów, uczestniczących czynnie w regulacji gospodarki elektrolitowo-wodnej tkanki nerwowej.

Przy rozważaniu dróg szerzenia się obrzęku należy wziąć pod uwagę badaną okolicę, gdyż szereg badaczy wypowiada pogląd o odmiennym przebiegu procesu w istocie szarej i białej (Klatzo i wsp. 1967). Badany przez nas materiał był pobierany z kory mózgowej oraz z pogranicza korowo-podkorowego. W obu okolicach, w tym również w istocie białej, stwierdzano wyłącznie śródkomórkowe gromadzenie się płynu obrzękowego. Nie spostrzegano natomiast poszerzenia przestrzeni pozakomórkowych, można więc sądzić, że w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu u kotów w okresach od 2 do 12 godz. ucisku gromadzenie płynu jest wewnątrzkomórkowe. Analogiczną lokalizację płynu obrzękowego dla wczesnych okresów doświadczalnych opisali Long i wsp. (1967), Lee i Bakay (1967) oraz Wechsler i wsp. (1967).

Należy zastrzec się jednak, że obserwacje nasze nie przesądzają o stanie głębiej położonych struktur istoty białej. Badania nasze obejmowały

bowiem wyłącznie obszary podkorowej istoty białej, wyróżniające się od jej pozostałych części zbitym układem włókien nie sprzyjających szerzeniu się obrzęku.

Pojawienie się „ciemnych” neuronów w badanym modelu interpretujemy jako wynik zmienionej przepuszczalności błon komórkowych, prowadzącej do pozakomórkowego przechodzenia płynu. Przy złożonym współdziałaniu wielu czynników patogenetycznych kształtujących obraz doświadczalnego uciskowego obrzęku mózgu trudno jest jednoznacznie wskazać przyczynę obserwowanych zmian neuronalnych.

Sposób szerzenia się obrzęku na nie uciśniętą półkulę okazał się trudny do uchwycenia w wybranych odcinkach czasu. Można jedynie stwierdzić, że zmiany charakterystyczne dla mikroskopowo-elektronowego obrazu obrzęku występowały w obu półkulach — zarówno uciśniętej i przeciwległej — w 6 godzinie działania ucisku. Być może badania w nieco krótszych odstępach czasu pozwoliłyby na dokładniejsze uchwycenie momentu, w którym zmiany obrzękowe występują tylko w uciśniętej półkuli.

Przyjęcie zaburzeń hemodynamicznych prowadzących do niedokrwienia tkanki za podstawowy czynnik patogenetyczny obserwowanych nieprawidłowości ultrastrukturalnych, może wyjaśniać równoczesność rozwoju zmian patologicznych w obu półkulach mózgu (Zelman i wsp. 1974, Ishii i wsp. 1959). Wydaje się bardzo prawdopodobne, że obserwowane zmiany w strukturze złączeń międzykomórkowych, w tym bardzo znaczne obrzmienie śródbłonek naczyń i otaczających naczyń włosowate wypustek astrocytów, może prowadzić wtórnie do zaburzeń mikrokrążenia mózgu i upośledzenia jego wlewienia.

WNIOS.

1. Ograniczony nadtwardówkowy ucisk mózgu prowadzi do uogólnionego obrzęku, obejmującego obie półkule.
2. Zmiany są najwyraźniej uchwytne na poziomie złączeń międzykomórkowych i naczyń włosowatych, stanowiącego anatomiczne podłoże bariery krewno-mózgowej.
3. Astrocyty reagują wcześniej i wykazują większy stopień obrzęku niż śródbłonek naczyń; w śródbłonkach naczyń występuje znaczny wzrost pinocytozy, zespolenia międzyśródbłonkowe i obrzmienie, a nawet przy znacznych uszkodzeniach cytoplazmy.
4. Płyn obrzękowy w warunkach uciskowego obrzęku mózgu do 12 godziny ucisku zlokalizowany jest wewnątrzkomórkowo.

M. Ostenda, P. Gadamski

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ КАРТИНА СОСУДИСТО-ГЛИЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ, ВЫЗВАННОМ НАЖИМОМ ОТЕКЕ МОЗГА
У КОТОВ

Резюме

Опыты проводили на взрослых котах, у которых вызывали местный нажим на мозг при помощи шарика, объемом 1 см³, помещенного надсклерально на 2, 4, 6 и 12 часов. У контрольного кота было сделано только трепанационное отверстие. Материал для исследования брали непосредственно после окончания нажима из полушария, подвергнувшегося нажиму, и из соответствующего района противоположного полушария.

В ранние периоды нажима наблюдали в обоих мозговых полушариях набухание цитоплазмы отростков астроцитов, а также увеличение микропинцитоза.

В более позднее время развивается полная картина внутриклеточного отека со значительным повреждением органелл в элементах сосудисто-тканевого соединения. Показано также, что астроциты реагируют раньше и проявляют большую степень повреждения, чем эндотелий сосудов. Межэндотелиальные анастомозы оставались плотными. Не обнаружено расширения межклеточных пространств.

M. Ostenda, R. Gadamski

ULTRASTRUCTURAL PICTURE OF GLIAL-VASCULAR INTERFACE IN CATS
CEREBRAL EDEMA FOLLOWING EXPERIMENTAL BRAIN COMPRESSION

Summary

Local brain compression was produced in cats by epidural balloon (1 ml) inserted for 2, 4, 6 and 12 hours. In control cats only the burr-hole has been trephined. Immediately after cessation of compression cerebral tissue from the handled hemisphere and corresponding area of contralateral one has been taken for electron microscopy.

In early period of the experiment there was observed in both hemispheres the swelling of the astrocytic processes and enhancement of micropinocytosis. In later periods of the experiment developed full picture of intracellular swelling with features of marked damage to organelles in elements of glial-vascular interface. It was established that the astrocytes react earlier and become more injured than the endothelial cells. Endothelial junctions stay tight. There was no distention of intercellular spaces observed.

PIŚMIENNICTWO

1. Gadamski P., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Stan bariery krew-mózg we wczesnym okresie obrzęku mózgu u kotów. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 435—445.
2. Gadamski P., Czernicki Z., Jurkiewicz J.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawężenia przepływu nerwowej we wczesnym obrzęku doświadczalnym u kotów po podaniu mannitolu. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, w druku.
3. Hager R.: Contributions of electron microscopy to the pathomorphologic characterization of cerebral edemas. *Proc. al III Simp. Nation. de Neuropath.* Bukarest 1975

4. Ishii S., Hayner R., Kelly W. A., Evans P. J.: Studies on cerebral swelling. *J. Neurosurg.* 1959, 16, 152—162.
5. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 1—8.
6. Klatzo I., Wiśniewski H., Steinwall O., Streicher E.: Dynamics of cold injury edema. W: *Brain Edema 1967*, Springer Verlag, pp. 554—563.
7. Lee J. C., Bakay L.: Electron microscopic studies on experimental brain edema. W: *Brain Edema 1967*, Springer Verlag, pp. 590—597.
8. Long D., Hartman J. F., French L. A.: Ultrastructural substrates of experimental brain edema. W: *Brain Edema 1967*, Springer Verlag, pp. 419—444.
9. Szumańska G., Gadamski R., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Tężycka J.: Zmiany histochemiczne w mózgu kota w doświadczalnym ucisku nadtwardówkowym. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 447—459.
10. Wechsler W., Riverson E., Schroeder J. M., Kleihues P., Palmeiro J. F., Hosman K. A.: Electron microscopic observations on different models of acute brain edema. W: *Brain Edema 1967*, Springer Verlag, pp. 598—614.
11. Zelman I. B., Szewczykowski J., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Patomorfologia w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu kotów. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 425—434.

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

ROMAN GADAMSKI, MARIA OSTENDA, GRAŻYNA SZUMAŃSKA

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY ZAKOŃCZEŃ NERWOWYCH ORAZ ZACHOWANIE SIĘ AMIN KATECHOLOWYCH WE WCZESNYM DOŚWIADCZALNYM OBRZĘKU MÓZGU U KOTA

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

Mechaniczny ucisk półkuli mózgu, przy pomocy nadtwardówkowo umiejscowionego elastycznego balonika o dowolnie regulowanej pojemności (Ishii i wsp. 1967) jest często stosowanym modelem doświadczalnym służącym do oceny dynamiki rozwoju obrzęku mózgu i związanych z nim zmian ciśnienia śródczaszkowego. Przeprowadzony poprzednio cykl badań (Zelman i wsp. 1974, Gadamski i wsp. 1974, 1977, Szumańska i wsp. 1974, Ostenda, Gadamski 1977) dostarczył szczegółowej informacji na temat charakteru uszkodzeń strukturalnych tkanki, zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego jak i elektronowego, stanu naczyniowo-tkanekowych mechanizmów barierowych i zaburzeń metabolicznych. Pozwoliły one na przyjęcie poglądu, że u podłoża opisanych zmian, wśród których dominują cechy naczyniopochodnego obrzęku, leżą zaburzenia hemodynamiczne w krążeniu mózgowym, prowadzące ostatecznie do zespołu niedokrwienia mózgu. Zaburzenia hemodynamiczne uwarunkowane są z kolei wzrostem ciśnienia śródczaszkowego oraz zakłóceniem stosunków topograficznych poszczególnych części mózgowia w wyniku nadtwardówkowo umiejscowionego balonika.

W świetle uzyskanych wyników wydawało się celowe prześledzenie stanu struktur związanych z podstawową funkcją tkanki nerwowej, tj. z przekazywaniem bodźców. W tym celu przeprowadzono mikroskopowo-elektronową analizę zachowania się synaps nerwowych łącznie z mikroskopowo fluorescencyjnym badaniem amin katecholowych.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na 15 dorosłych kotach obu płci, o ciężarze ciała od 2,700 do 3,800 kg, u których wywoływano miejscowy ucisk mózgu przy pomocy umieszczonego nadtwardówkowo lateksowego balonika

o pojemności 1 cm³ na okres od 2 do 12 godzin. Opis zabiegu operacyjnego oraz techniki wywoływania ucisku podano w pracy Zelman i wsp. (1974) oraz Gadamskiego i wsp. (1977).

Zwierzęta, w zależności od czasu trwania ucisku, podzielono na cztery grupy. W grupie pierwszej ucisk trwał 2 godziny, w grupie drugiej — 4, w trzeciej — 6, i w czwartej — 12 godzin. Materiał kontrolny stanowiły koty, u których nie wywoływano ucisku nadtwardówkowego. Na mózgach zwierząt doświadczalnych, uśmiercanych w podanych powyżej przedziałach czasowych wykonywano badania mikroskopowo-fluorescencyjne i mikroskopowo-elektronowe.

Materiał do badania mikroskopowo-elektronowego pobierano przyżywcio z półkuli uciśniętej po wycofaniu balonika i powiększeniu otworu trepanacyjnego do średnicy 1,5 cm oraz z półkuli nie uciśniętej po wykonaniu identycznego otworu nad symetryczną okolicą mózgu. Materiał opracowywano identycznie jak w pracy Ostendy i Gadamskiego (1977).

Oznaczanie zawartości katecholamin wykonywano wg metody opisanej przez Lindvalla i Björklunda (1974). U kotów z odpowiednich grup czasowych wykonywano perfuzję 2% roztworem jednowodnego kwasu glioksalowego w buforze dwuwęglanowym Krebsa-Ringera o pH 7,0. Roztwór ten przed użyciem nasycało mieszaniną gazów o składzie: 95% O₂ i 5% CO₂, a następnie ochładzano do temperatury 0—4°C. Czteryście ml płynu perfuzyjnego podawano strzykawką o pojemności 200 ml do obu tętnic szyjnych wspólnych, przy jednoczesnym, obustronnym przecięciu żył jarzmowych. Z mózgow wyjmowanych z jamy czaszki bezpośrednio po perfuzji pobierano 2 mm grubości bloki tkanki z okolicy stycznej do ucisku, obejmujące korę mózgową i istotę białą podkorową. W analogiczny sposób pobierano materiał z symetrycznych pół półkuli nie uciśniętej.

Błoczki tkanki nerwowej zamrażano w ciekłym azocie, przenoszono do kriostatu i cięto na skrawki grubości 20 μ, które naklejało na cienkie szkiełka podstawowe. Preparaty umieszczano na okres 20 minut w 2% roztworze kwasu glioksalowego w buforze Krebsa-Ringera o pH 7,0 i temperaturze 0—4°C. Przez dalsze 20 minut skrawki wysuszano w strumieniu ciepłego powietrza, a następnie celem dalszego odwodnienia umieszczano je w eksykatorze zawierającym pięciotlenek fosforu. Eksykator, po chwilowym podłączeniu do pompy wodnej celem uzyskania próżni, umieszczano w zaciemnionym pomieszczeniu na okres około 14 godzin. Po upływie tego czasu skrawki przebywały przez 6 min. w temperaturze 100°C.

Preparaty zamknięte w oleju parafinowym oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss, wyposażonym w lampę HBO 200 oraz filtry

BG 12/4 (wzbudzający) i OG 1 (barierowy). Zieloną fluorescencją amin katecholowych utrwalano na filmie ORWO UT 16.

WYNIKI

Badania mikroskopowo-elektronowe

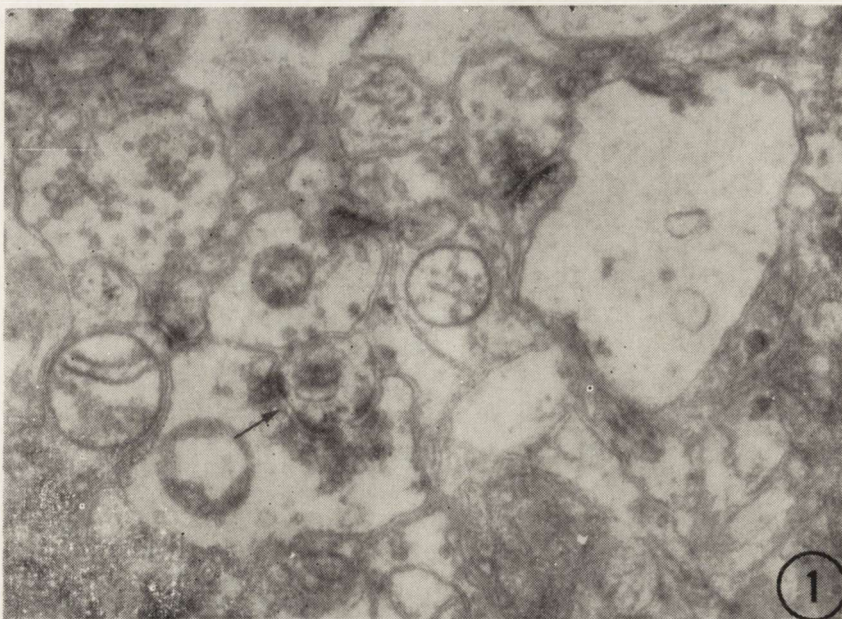
U zwierząt grupy pierwszej po 2-godzinym ucisku, spostrzegano nieznaczne zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym synaps nerwowych. Dotyczyły one głównie zróżnicowania wielkości pęcherzyków synaptycznych leżących w części presynaptycznej złącza nerwowego. Obok pęcherzyków o normalnej, charakterystycznej dla zwierząt kontrolnych wielkości wynoszącej około 430 Å pojawiała się znaczna ilość pęcherzyków o średnicy sięgającej 750 Å. W tym okresie, w kolbkach synaptycznych spotykano pojedyncze pęcherzyki o wymiarach 1200 Å. W niektórych synapsach pojawiały się struktury o charakterze dense core vesicles wielkości około 870 Å. Obok opisanych powyżej nieprawidłowości dominujących w obrazie mikroskopowo-elektronowym spotykano stosunkowo nieliczne rozdęte synapsy o niskiej gęstości elektronooptycznej wykazujące cechy zmian obrzękowych. Zawierały one pojedyncze, często zniekształcone pęcherzyki synaptyczne. Rąbek przy błonie części postsynaptycznej tracił swoją zwykłą strukturę; ulegał znacznemu pogrubieniu, a jego gęstość elektronowa bardzo znacznie wzrastała (ryc. 1).

U zwierząt grupy drugiej (ucisk 4-godz.) liczne złącza synaptyczne wykazywały zmiany podobne do opisanych w grupie poprzedniej, tj. balonowate rozdęcia zakończeń presynaptycznych, elektronowo prawie całkowicie przeziernych, zmniejszenie ilości pęcherzyków synaptycznych z jednoczesnym zróżnicowaniem ich wielkości (ryc. 2, 3).

W grupie trzeciej (ucisk 6-godz.) w korze mózgu kota występowały uogólnione objawy obrzęku, obejmujące również większość synaps. W grupie tej obserwowano znaczne powiększenie (rozdęcie) wypustek pre- i postsynaptycznych z równoczesnym obniżeniem ich elektronooptycznej gęstości. Pęcherzyki synaptyczne w zakończeniach nerwowych występowały w znacznie zmniejszonej liczbie i często były zniekształcone (ryc. 4).

W grupie czwartej (ucisk 12-godz.) nasilały się zmiany poprzednio opisane. W obrzękłym neurcypilu spotykano złącza, w których tylko charakterystyczne zagęszczenia przybłonowe pozwalały rozpoznać synapsy (ryc. 5). Występujące w nich nieliczne i zwykle zniekształcone pęcherzyki wykazywały tendencję do łączenia się w większe skupiska.

Pojedyncze pęcherzyki o ciemnym jądrze (dense core vesicles), pojawiające się w zespoleniach nerwowych zwierząt z krótkim okresem



Ryc. 1. Półkula mózgu uciśnięta przez 2 godz. Widoczne liczne synapsy. Pęcherzyki synaptyczne mają zróżnicowane rozmiary. Nieciągłe zagęszczenia pre- i postsynaptyczne w złączu (strzałka). Pow. 22 500 \times .

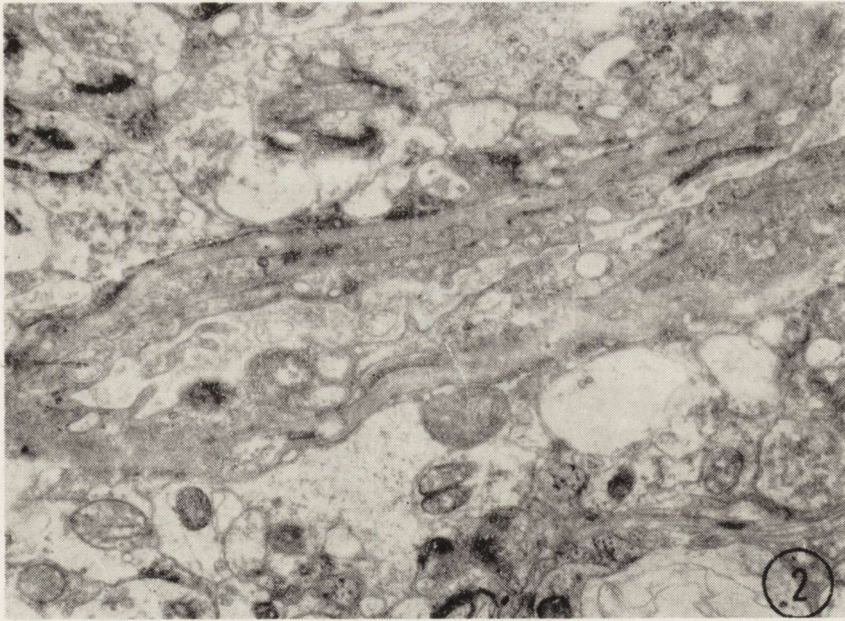
Fig. 1. Cerebral hemisphere compressed for 2 hrs. Numerous synapses are present. Synaptic vesicles show unequal diameter. Discontinuity of pre- and postsynaptic densities (arrow). \times 22 500.

ucisku (2 i 4 godz.), wykazywały dużą różnorodność morfologiczną. Po dłuższym trwaniu ucisku (koty grupy trzeciej i czwartej) nie stwierdzano dense core vesicles w obrębie zakończeń nerwowych.

Badania histochemiczno-fluorescencyjne

W korze mózgu zwierząt kontrolnych widoczne były krótkie fragmenty włókien nerwowych wykazujących obecność paciorkowato rozmieszczonych tworów, wzbudzających zieloną fluorescencję swoistą dla amin katecholowych. Twory te leżące na przebiegu włókien preterminalnych tworzyły często charakterystyczne, siatkowate struktury fibroarchitektoniczne, których rozmieszczenie nie odpowiadało jednak poszczególnym warstwom kory mózgowej.

W neuropilu, obok ziarnistej, nierównomiernie rozmieszczonej zielonej fluorescencji odpowiadającej prawdopodobnie przekrojom poprzecznym włókien nerwowych, spotykano świecenie koloru rdzawego charakterystycznego dla indolamin. Podobne obrazy można było spotkać w niektó-



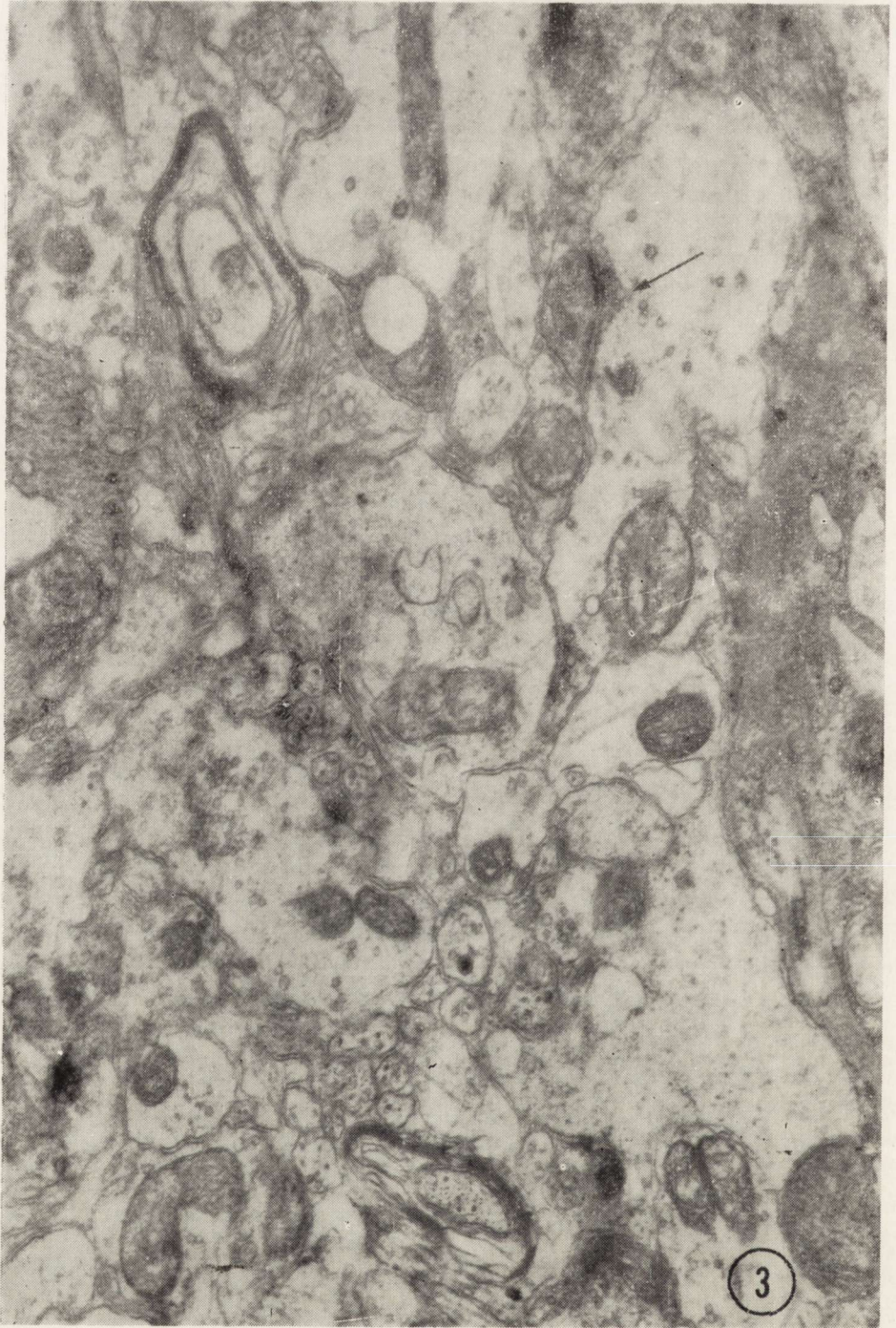
Ryc. 2. Półkula mózgu uciśnięta przez 4 godz. Złącza synaptyczne położone w pobliżu ściany naczyniowej. Kilka synaps wykazuje cechy obrzmienia. Pow. 22 500 X.

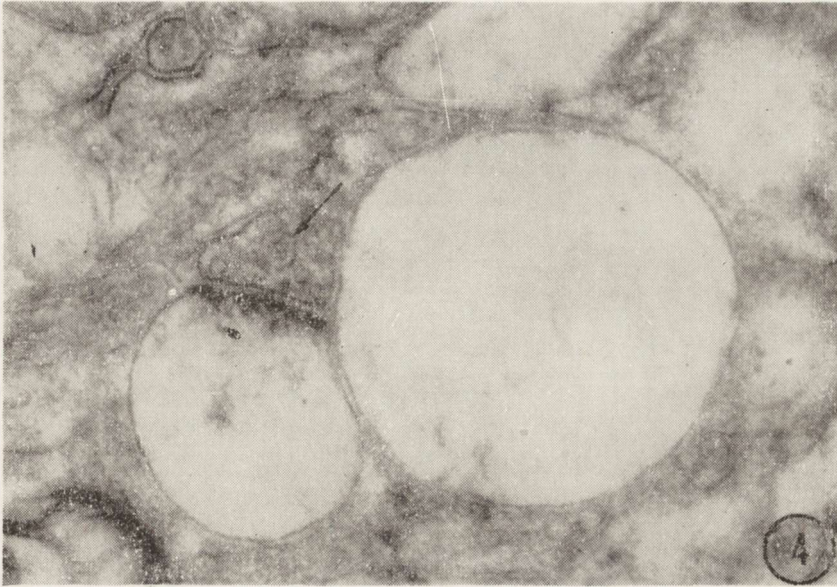
Fig. 2. Cerebral hemisphere compressed for 4 hrs. Synapses situated in the vicinity of vascular wall. Some of them are swollen X 22 500.

rych obszarach podkorowej istoty białej. W tych strukturach paciorkowato rozmieszczona zielona fluorescencja wyznaczała zwykle pojedyncze włókna nerwowe o dłuższym przebiegu niż w korze (ryc. 6).

U zwierząt z 2- i 4-godzinnym uciskiem obrazy mikroskopowo-fluorescencyjne były nieznacznie zmienione. Nadal dostrzegano siatkowatą strukturę włókien w korze mózgu oraz ich linijny przebieg w pasmach istoty białej. Zwraçało jednakże uwagę osłabienie intensywności fluorescencji.

Opisany powyżej obraz mikroskopowy zmieniał się wyraźnie u kotów z 6 i 12-godzinnym uciskiem. W tym czasie dominowało wyraźniejsze niż w grupach poprzednich osłabienie fluorescencji z jednoczesnym pojawieniem się jej dyfuzyjnej postaci. Tego typu zmiany spostrzegano zarówno w materiale z półkuli uciśniętej jak i nie uciśniętej. Osłabienie intensywności fluorescencji, a zwłaszcza często występująca jej dyfuzyjna postać utrudniały lub uniemożliwiały śledzenie charakterystycznych dla zwierząt kontrolnych struktur fibroarchitektonicznych złożonych z preterminalnych fragmentów włókien nerwowych zawierających aminy katecholowe (ryc. 7).





Ryc. 4. Półkula mózgu uciśnięta przez 6 godz. Obrzęk części postsynaptycznych złącza. Wśród pęcherzyków synaptycznych widoczny dense core vesicle o średnicy około 1800 Å (strzałka). Pow. 22 500 ×.

Fig. 4. Cerebral hemisphere compressed for 6 hrs. Swelling of postsynaptic portions. Among synaptic vesicles, large dense core vesicle, measuring around 1800 Å (arrow) is seen. × 22 500.

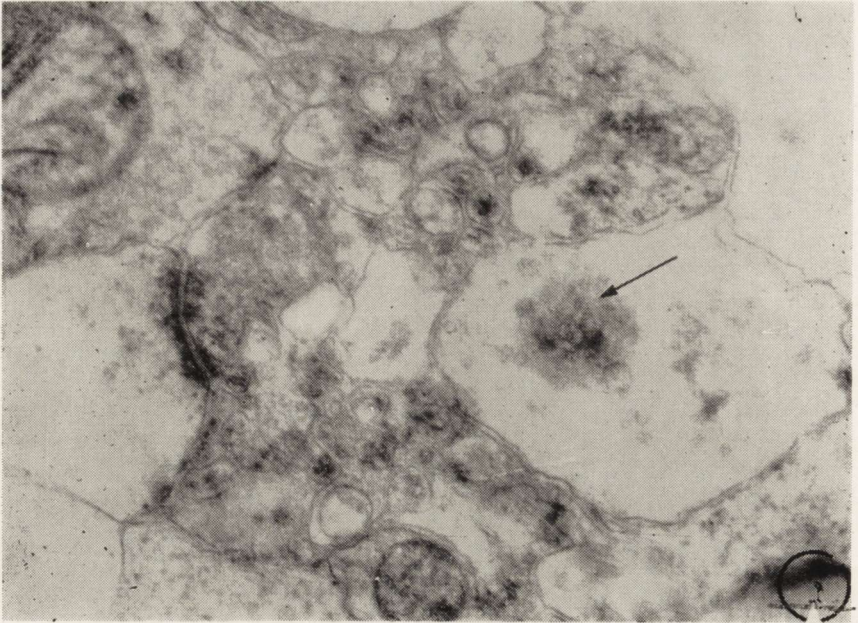
OMÓWIENIE

Przedstawione powyżej obserwacje wskazują, że stwierdzonym poprzednio nieprawidłowościom strukturalnym tkanki nerwowej i jej zaburzeniom metabolicznym, rozwijającym się w następstwie zwiększonego ciśnienia śródczaszkowego (Zelman i wsp. 1974, Szumańska i wsp. 1974, Ostenda, Gadamski 1977) towarzyszą uszkodzenia struktur związanych bezpośrednio z przekazywaniem bodźców nerwowych tj. synaps oraz zmiany w zawartości katecholamin, odgrywających istotną rolę w czynności przekaźnikowej.

Nieprawidłowości te można zatem traktować jako morfologiczne podłoże zaburzonego przewodnictwa nerwowego. Obserwowane zmiany dotyczyły wszystkich elementów złącza nerwowego i występowały zarów-

Ryc. 3. Półkula mózgu uciśnięta przez 4 godz. W sąsiedztwie ściany naczynia widoczne złącza synaptyczne o cechach obrzmienia, zawierające nieliczne pęcherzyki synaptyczne zgromadzone przy błonach (strzałka). Pow. 22 500 ×.

Fig. 3. Cerebral hemisphere compressed for 4 hrs. Synapses situated in the vicinity of vascular wall are swollen (arrow), scarce synaptic vesicles are agglomerated in the neighbourhood of synaptic membrane (arrow). × 22 500.



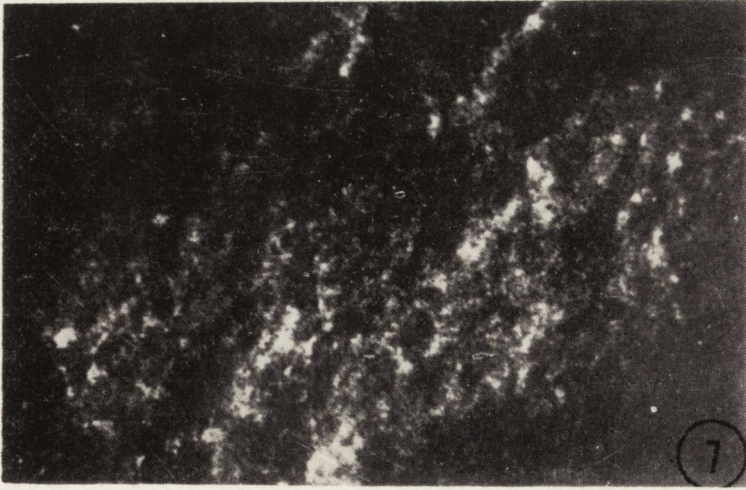
Ryc. 5. Półkula mózgu uciśnięta przez 12 godz. Widoczne synapsy wykazują cechy obrzęku. Nieliczne pęcherzyki tworzą zbite konglomeraty (strzałka). Pow. 22 500 \times .

Fig. 5. Cerebral hemisphere compressed for 12 hrs. Advanced swelling of synapses. Scanty synaptic vesicles forming dense conglomerates (arrow) \times 22 500.



Ryc. 6. Kot kontrolny. Fluorescencja amin katecholowych w postaci paciorkowatych tworów rozmieszczonych wzdłuż przebiegu włókien nerwowych. Pow. 200 \times .

Fig. 6. Control animal. Catecholamine fluorescence in the form of delicate beadings located along the nerve fibres. \times 200.



Ryc. 7. Półkula mózgu uciśnięta przez 12 godz. Dyfuzyjny obraz fluorescencji katecholamin. Pow. 100 \times .

Fig. 7. Cerebral hemisphere compressed for 12 hrs. Diffuse fluorescence of catecholamines. \times 100.

no w nie uciśniętej jak i uciśniętej półkuli. Istnieje pogląd, że pęcherzyki synaptyczne są nośnikami neurotransmiterów, zaś wśród nich dense core vesicles stanowią nośnik katecholamin (Ishii 1971, Baumgarten i wsp. 1972). W oparciu o powyższe stwierdzenia zmniejszenie ilości pęcherzyków synaptycznych, zróżnicowanie ich rozmiarów i kształtów oraz łączenie się w większe skupiska można by uznać za wykładnik zmienionej funkcji synaps. W tych samych kategoriach rozważać należy nieprawidłowości struktury błon pre- i postsynaptycznych oraz obrzmienie kolbek synaptycznych. Obniżenie intensywności fluorescencji swoistej dla katecholamin oraz zmiany w jej rozmieszczeniu, wykazujące zgodność czasową z rozwojem nieprawidłowości w strukturze zakończeń synaptycznych stwierdzonych w mikroskopie elektronowym, mogą stanowić dodatkowy wykładnik zaburzeń w przekazywaniu bodźców.

Zastosowana przez nas technika badań histochemiczno-fluorescencyjnych ujawnia łącznie obecność dopaminy i noradrenaliny (Lindvall, Björklund 1974), a więc katecholamin, którym przypisuje się funkcje mediatorów chemicznych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Odpowiedź na pytanie, który z czynników patogenetycznych występujących w zastosowanym modelu doświadczalnym jest odpowiedzialny za stwierdzone przez nas zmiany, nie jest łatwa. Szczególnie trudne jest zróżnicowanie roli samego obrzęku, jak i leżących u jego podłoża zaburzeń hemodynamicznych, tym bardziej, że w okresie dłuższej trwającego ucisku oba te czynniki nakładają się i wzajemnie pogłębiają.

Wydaje się jednak, że pierwotnym czynnikiem uszkadzającym jest upośledzenie ukrwienia i związane z nim niedotlenienie tkanki. Przemawia za tym między innymi fakt, że pierwsze objawy strukturalnego uszkodzenia złączy nerwowych, jak również osłabienie swoistej fluorescencji katecholamin obecne były już wtedy, gdy cechy obrzęku nie występowały lub były tylko nieznaczne. Masywne uszkodzenie synaps i jakościowe zmiany odczynu histochemiczno-fluorescencyjnego towarzyszyły w pełni rozwiniętym zmianom obrzękowym, pogłębiającym się przy uogólnieniu zaburzeń hemodynamicznych. Za rolę patogenetyczną niedostatku tlenowego, przynajmniej we wstępnym okresie obrzęku mózgu, przemawia podobieństwo wczesnych zmian w złączach nerwowych do opisywanych w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego (Bogolepov 1975). Przemawiać za tym może również obniżenie intensywności fluorescencji katecholamin przypominające obrazy spostrzegane w niedotlenieniu krążeniowym (Gadamski i wsp. 1976), i w zatruciu tlenkiem węgla (Szumańska i wsp. 1977).

Trudno również o jednoznaczną odpowiedź na pytanie, czy obniżenie intensywności fluorescencji, stanowiące jakościowy wykładnik zmniejszonej zawartości katecholamin w tkance, związane jest z upośledzeniem ich syntezy, wykazany w przypadku niedotlenienia przez Davisa i Carlssona (1973), czy też z ich dyfuzją przez błony komórkowe, jak to sugerują Brown i wsp. (1974). Wydaje się, że dyfuzyjny charakter odczynu histochemiczno-fluorescencyjnego obserwowany w 6 i 12 godzinie ucisku sugeruje ten drugi mechanizm, przynajmniej w okresie pełnego rozwoju obrzęku. Za taką możliwością przemawiają również obrazy mikroskopowo-elektronowe, wykazujące obecność zaledwie pojedynczych pęcherzyków w kolbkach synaptycznych, a w szczególności brak w tym okresie dense core vesicles, uznawanych za nośniki katecholamin. Mogą na to również wskazywać zmiany w przepuszczalności błon komórkowych neurocytów, stwierdzone w tym samym modelu doświadczalnym przez Gadamskiego i wsp. (1974).

R. Гадамски, М. Остенда, Г. Шуманьска

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ
И ПОВЕДЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ
ПРИ РАННЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ МОЗГА У КОТА

Резюме

Исследования проведены на 15 взрослых котах, у которых вызывали местный нажим на мозг при помощи помещенного надсклерально шарика, объемом 1 см³. Время нажима составляло 2, 4, 6 и 12 часов. Контролем служили коты, у которых не применяли нажима.

В электронномикроскопических исследованиях наблюдали признаки стека — раздувание пре- и постсинаптических отростков с одновременным снижением их электроннооптической плотности, а также уменьшение количества синаптических пузырьков с одновременной дифференциацией их величины. У животных с коротким периодом нажима в некоторых синапсах наблюдали появление структур о характере dense core vesicles.

Гистохимико-флуоресцентные наблюдения выявили ослабление интенсивности специфичной флуоресценции катехоламинов, а также у животных с более длительным нажимом — появление диффузной флуоресценции. Авторы считают, что в основе изменения функции синапса лежат нарушения кровоснабжения, приводящие к тканевой гипоксии.

R. Gadamski, M. Ostenda, G. Szumańska

ULTRASTRUCTURE OF NERVE ENDINGS AND THE CATECHOLAMINES IN EARLY EXPERIMENTAL BRAIN EDEMA IN CAT

Summary

Experiments were conducted on 15 adult cats which were subjected to local brain compression by an balloon (1 ml volume) inserted epidurally for 2, 4, 6 and 12 hours. In control animals only the burr-hole has been trephined.

Electron microscopic investigations revealed some edematic changes as: dilation of pre- and postsynaptic processes, decrease of their electronoptic density, and also synaptic vesicles decreased in number and of varying size. Some synapses of the animals after short-lasting brain compression contained the structures of dense core vesicles type, whereas histochemical — fluorescence observations showed the diminution of the fluorescence specific for catecholamines.

Diffuse fluorescence has been found in the tissue of animals subjected to the brain compression of longer duration.

The authors express the opinion that the changed functioning of synapses depends on the disorder of blood supply leading to the ischemia of nerve tissue.

PISMIENNICTWO

1. Baumgarten H. G., Björklund A., Holstein A. F., Nobin A.: Organization and structural identification of the catecholamine nerve terminals in the normal lobe and pars intermedia of the rat pituitary. *Z. Zellforsch.* 1972, 126, 483—517.
2. Bogolepow N. N.: Ultrastruktura sinapsow w normie i patologii. *Akademia Medicynskich Nauk SSSR, Moskwa, „Medicina”, 1975, 1—95.*
3. Brown R. M., Carlsson A., Ljunggren B., Siesjö B. K., Snider S. R.: Effect of ischemia on monoamine metabolism in the brain. *Acta physiol. scand.* 1974, 90, 789—791.
4. Davis J. N., Carlsson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 1973; 21, 783—790.
5. Gadamski R., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Stan bariery krew-mózg we wczesnym doświadczalnym obrzęku mózgu u kotów. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 435—445.
6. Gadamski R., Szumańska G., Sikorska M.: Wpływ hipoksji krążeniowej na zachowanie się amin katecholowych w mózgu królika. *Badania histochemiczno-fluorescencyjne. Neuropat. Pol.* 1976, 14, 23—30.

7. Gadamski R., Czernicki Z., Jurkiewicz J.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartości wody w tkance nerwowej we wczesnym obrzęku doświadczalnym u kotów przed i po podaniu mannitolu. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, w druku.
8. Ishii S., Tsuji H., Ozawa K., Kondo Y., Evans I. P.: Brain edema. Some clinical and experimental correlations. *Brain Edema*, Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer Verlag, Vienna, New York 1967.
9. Ishii S.: Morphological studies on the mechanism of adrenergic transmission in the central nervous system. W: *Progress in Brain Research. Histochemistry of Nervous Transmission*. Ed. O. Eränkő, 1971, 34, 187—192.
10. Lindvall O., Björklund A.: The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: A detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry*, 1974, 39, 97—127.
11. Ostenda M., Gadamski R.: Obraz ultrastrukturalny złącza naczyniowo-glejowego w doświadczalnym, uciskowym obrzęku mózgu u kotów. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 381—394.
12. Szumańska G., Gadamski R., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Tężycka J.: Zmiany histochemiczne w mózgu kota w doświadczalnym ucisku nadtwardówkowym. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 447—459.
13. Szumańska G., Sikorska M., Gadamski R.: Wpływ ostrego zatrucia tlenkiem węgla na zachowanie się amin katecholowych w mózgu szczura. *Badania histochemiczno-fluorescencyjne i biochemiczne. Neuropat. Pol.* 1977, 15, 75—84.
14. Zelman I., Szewczykowski J., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Patomorfologia w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu u kota. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 425—434.

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

EWA OSETOWSKA, RIKA VERHEYDEN, ANNA TARASZEWSKA

WPLYW MUTACJI *pt* NA RÓŻNE OGNIWA „ZAMKNIĘTYCH” OBWODÓW RUCHOWYCH*)

II. METABOLITY DOPAMINY W MOCZU KRÓLIKA *pt* **)

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

Kierownik Ośrodka: prof. dr med. E. Osetowska
Instytut Patofizjologii Wolnego Uniwersytetu, Bruksela
Dyrektor: prof. dr med. A. Lowenthal

Jakiegokolwiek różnice zarysowały się pomiędzy klasycznym parkinsonizmem a modelem porównawczym królika *pt*, uzyskanie danych dotyczących metabolizmu dopaminy u tego ostatniego uważaliśmy za niezbędne ogniwo naszych dalszych badań. Przejrzyste zestawienie wzorów chemicznych ilustrujących powstawanie i przemiany endogenne amin katecholowych czytelnik polski znajdzie w pracy Kądziaławy (1972).

W porównaniu z dużą ilością badań oderwanych, przeprowadzonych dla różnych gatunków zwierząt w skomplikowanych warunkach laboratoryjnych, można przeciwstawić: sporadyczne doniesienia dotyczące przemian amin katecholowych u królika poza ośrodkowym układem nerwowym oraz zupełny brak doniesień określających metabolizm dopaminy *in vivo*, w płynach ustrojowych królika, w warunkach kliniki porównawczej, pozwalających na ewentualne zadziałania terapeutyczne.

Obserwacjom Barbeau i wsp. (1961) i Barbeau (1968) zawdzięczamy poznanie odwróconej korelacji pomiędzy obniżonym poziomem dopaminy w mózgu, a podwyższonym poziomem jej bezpośredniego metabolitu i metabolitów pośrednich w moczu. W dalszych swoich badaniach Barbeau (1972) wniósł pewne zastrzeżenia co do wartości tego wykładnika w późnych okresach daleko posuniętego parkinsonizmu. Zastrzeżenia te nie są istotne w stosunku do królika *pt*, u którego badania moczu przeprowadzono w jednym stadium choroby, początkowym, a zarazem najostrej-

*) Prolem węzłowy: 10.4.2.02.2.

**) Praca wykonana przy częściowej pomocy finansowej USA. Agreement 05-035-1, N.H.I. PL 480.

szym; ponadto otrzymane wyniki zostały ocenione przez odniesienie do wyników u królików zdrowych genotypowo i fenotypowo oraz u samic nosicielek, przebadanych równolegle w tym samym czasie.

MATERIAŁ I METODY

W okresie pobierania moczu do badania, kryterium doboru właściwego materiału i grup kontrolnych stanowiły: 1) objawy kliniczne; 2) genotyp, jeżeli dał się ustalić jednoznacznie na podstawie typu kojarzenia; 3) analogiczne grupy wieku. Określenie płci nasuwało większe trudności, znane dobrze w przypadku królików w wieku poniżej 2 miesięcy (Osetowska, Wiśniewski, 1967). Dane jakimi rozporządzamy w chwili obecnej pozwoliły na odpowiednie uzupełnienia. Króliki z objawami ostrymi, które z powodu nasilenia choroby, zostały nieco później uspione, weszły wszystkie w skład materiału neuropatologicznego, wykorzystanego w I pracy tego cyklu. Inne dane potwierdziły się po późniejszym wprowadzeniu zwierząt bezobjawowych do reprodukcji. Charakterystyka materiału, którą przedstawiamy poniżej, oparta jest zarówno na danych wstępnych, jak i uzupełniających.

Pobrane próbki moczu odpowiadają ilościom dobowym, ponieważ małe króliki oddają jednorazowo bardzo małe ilości moczu. Zgodnie ze wskazówkami naszego konsultanta neurochemicznego*), dla każdego przypadku zebrano ± 10 ml moczu. Wiek królików zarówno w grupach chorych, jak i kontrolnych kształtował się poniżej 2 miesięcy, z wyjątkiem jednej próbki pobranej od „pewnej” 7-miesięcznej zdrowej samicy.

Ustawienie całej badanej grupy podyktowane zostało aktualnych stanem posiadania przypadków w Klinice w dniu pobierania moczu, równocześnie u wszystkich zwierząt.

Zbiór moczu przeprowadzono w prowizorycznych skonstruowanych *ad hoc* klatkach metabolicznych (kuwety plastikowe, obciążone plastikową siatką przeciwko muchom, nakryte od góry dopasowaną klatką z siatki drucianej), zaaprobowanych przez naszego konsultanta.

Z 22 próbek z moczem przesłanym do badania, 5 uległo uszkodzeniu w trakcie transportu lub podczas manipulacji laboratoryjnych.

Badania przeprowadzono w 5 grupach:

grupa I — trzy samice zdrowe;

*) Dr hab. Sciences Denice Karcher z Laboratorium Neurochemicznego Instytutu BUNGE w Antwerpii. Konsultowała ona także wybór metody, postępowanie techniczne i ocenę wyników. Autorzy pracy składają jej serdeczne podziękowanie za okazaną pomoc i zainteresowanie tematem.

Całość badań chemicznych, zastosowane metody, terminologia i uzyskane ektomatogramy zostały dodatkowo przekonsultowane przez prof. Dr A. Lowenthala.

grupa II — cztery samice ciężko chore z drżeniami i niedowładami; u trzech przeżycie z wtórną poprawą i okresowymi zaostrzeniami oraz czwarta z utrwalonymi niedowładami kończyn przednich, używana do krycia sprawdziła się genetycznie i klinicznie, dając ciężko objawowe potomstwo w odpowiednich kojarzeniach;

grupa III — pięć ciężko chorych samców;

grupa IV — trzy samice nosicielki;

grupa V — jeden samiec pewny, zdrowy.

W sumie w skład grupy kontrolnej wchodzi 7 zwierząt (3 samice zdrowe, 3 nosicielki, jeden zdrowy samiec) — przeciwstawionych 9 królikom ciężko chorym (w tym 4 chore samice i pięć chorych samców*).

Mocze w obrębie każdej grupy badane były oddzielnie.

Zastosowano metodę dwuwymiarowej cienkowarstwowej chromatografii (Lhermitte i wsp., 1973; Ebinger i wsp.; 1975), z oceną jakościową, bez obliczeń kolorymetrycznych wobec uzyskanego wyniku ostatecznego.

1. Kwasy fenyłowe

Z moczu badanych królików wyizolowano kwasy fenyłowe, zakwaszając moczu HCl oraz wysycając NaCl. Ekstrakcję przeprowadzono octanem etylu, z wysuszeniem Na_2SO_4 w oksykatorze (prąd powietrza w łaźni wodnej o temperaturze 40°). Otrzymaną substancję rozpuszczono w 0,5 ml octanu etylu i przeniesiono na celulozowe płytki chromatograficzne. Zastosowano 2 układy mieszanin rozpuszczających: 1. Izopropanol — amoniak — woda (80:10:10) i 2. Benzen — kwas octowy — woda (62,5:36:1,5).

Otrzymane chromatogramy zostały opylone dwuazowaną p-nitroaniliną. Analogiczną próbę przeprowadzono dla kontroli z pustymi płytkami chromatograficznymi. Uzyskane chromatogramy wykazały duże ilości kwasu 3-hydroksyfenylooctowego oraz kwasu 4-hydroksyfenylooctowego, duże ilości kwasu wanilinomlekowego, ślady kwasu homowanilinowego, obecność kwasu wanilinowego. Wobec możliwości połączeń kwasu izo-homowanilinowego oraz wanilinomlekowego z kwasem siarkowym (związek określony jako kwas siarkowy — „sulfuric acid”) lub glukuronowym, przeprowadzono dekonjugację gluzulazami, sulfatazą arylową i glukuronidazą (sulfataza aryłowa i glukuronidaza są hydrolazami; nazwa „gluzulazy” jest nazwą komercyjną stosowaną powszechnie w Belgii i zapobiegającą możliwym nieporozumieniom).

* Określenie „chory” stosujemy do zwierząt o odpowiednim genotypie (*pt*/samiec, *pt* /*pt* samica) oraz z pełnym zespołem klinicznym fenotypowym *pt*.

2. Glikol 3-metoksy, 4-hydroksyfenylowy

Po inkubacji próbek moczu z pięciu grup z gluzulazą, przy pH 7, glikol został wyekstrahowany przy pomocy octanu etylu. Dalsze postępowanie takie jak dla kwasów fenylowych, łącznie z dekonjugacją, ponieważ glikol ten pozostaje zawsze w postaci związanej.

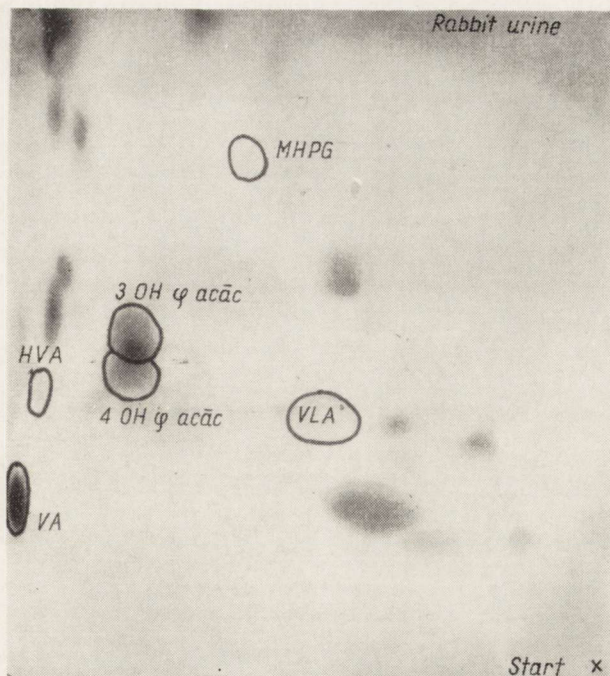
WYNIKI

W moczach wszystkich 5 grup otrzymano jednakowe chromatogramy, ujawniające obecność dużych ilości kwasu 3- i 4-hydroksyfenyloctowego, produktów tyrozyny; duże ilości kwasu wanilinomlekowego — metabolitu końcowego DOPA, ślady kwasu homowanilinowego, właściwego metabolitu dopaminy; we wszystkich moczach stwierdzono obecność glikolu 3-metoksy-4-hydroksyfenylowego — metabolitu noradrenaliny; stwierdzono także obecność kwasu wanilinowego (ze względu na jego możliwe pochodzenie egzogenne nie można interpretować jego występowania). Nie stwierdzono obecności kwasu izohomowanilinowego, izometoksywanilinowego oraz izo-wanilinomlekowego. Wszystkie wymienione związki występują bez uchwytnych różnic w chromatogramach moczów królików chorych, zdrowych i nosicieli. Wyniki uzyskane w 5 grupach ilustruje rycina 1.

OMÓWIENIE

Jeżeli otrzymane wyniki potraktujemy jako decydujące dla wykluczenia niedoboru dopaminy w zespole *pt* (Verheyden, 1977), nie jest to dla nas niespodzianką. Wieloletnie leczenie kliniczne parkinsonizmu przy pomocy L-DOPA, wpływa tylko na objawy akinezji i rigiditas, pozostawiając bez poprawy drżenia, niekiedy wręcz nasilając je, względnie „wzbogaca” obraz chorobowy o inne typy ruchów przymusowych (Boudin i wsp., 1974; Presthus i Holmsen, 1974, Dowżenko i wsp., 1975). Również McKenzie i wsp. (1972) już wcześniej zwrócili uwagę na bezskuteczność terapii L-DOPA w takich chorobach jak płasawica Huntingtona i choroba Gilles de la Tourette. Na występowanie nowych ruchów mimowolnych po leczeniu L-DOPA zwracali także uwagę Lhermitte i wsp. (1973).

Zestawienie powyższych danych z literatury i naszych własnych obserwacji skłania nas do przyjęcia wyraźnej granicy pomiędzy drzzeniami „parkinsonopodobnymi” i innymi składnikami zespołu parkinsonizmu. Takie ujęcie nie po raz pierwszy zostało sformułowane w literaturze parkinsonizmu od czasu, kiedy Hornykiewicz (1966) przypisał cały ten ze-



Ryc. 1. Chromatogram, odpowiadający wynikom badania moczu na metabolity katecholaminowe u królików *pt*: chorych samców, chorych samic, nosicieli, zdrowych samic, zdrowego samca. Skróty: 3-OH-φ acac: kwas 3-hydroksyfenyloctowy, 4-OH-φ acac: kwas 4-hydroksyfenyloctowy, VLA: kwas wanilinomlekowy, HVA: kwas homowanilinowy, MHPG: glikol-3-metoksy-4-hydroksyfenyloctowy, VA: kwas wanilinowy.

Fig. 1. Urinary acid and alcoholic metabolites of the catecholamines in the 5 groups of the *pt*-rabbits: the healthy females, the carriers, one healthy male, the symptomatic females and the symptomatic males (the two last groups examined in the acute phase of the *pt*-disease). TCL results. Abbreviations: 3-OH-φ acac. 3 hydroxyphenylacetic acid, 4-OH-φ acac. 4 hydroxyphenylacetic acid, VLA: Vanillic acid, HVA: Homovanillic acid, MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-glycol.

spół objawowy niedoborowi endogennej dopaminy mózgowej (Kitai i wsp., 1976). Narabayashi (1974) stawia pytanie jednoznacznie: „Axial symptom for parkinsonism: tremor, rigidity or akinesia becomes again our problem?” Kandel i wsp. (1974) charakteryzując różne typy drżeń („tremor in posture maintenance”, „tremor in purposeful movements”, „resting tremor”) uważają, że mogą one pojawiać się i poza kręgiem klasycznego parkinsonizmu, „but in all Parkinsonian patients there is an increase of the thresholds speed at which continuous activity (tremor — E. O.) appears”.

Wykazując w przebiegu choroby wszystkie typy drżeń wymienione przez Kandela, królik *pt* jest wolny od objawów akinetyczno-hipertonicznych typu rigiditas.

Współobecność niedowładów spastycznych i zaburzeń wzrokowych w zespole *pt* sugeruje pewne nowe analogie z zespołem opisanym po raz pierwszy przez Barré (1926), w którym występuje „syndrome parkinsonien avec signe de Babiński bilatéral”. Zespół analogiczny zostaje opisany ponownie w 34 lata później przez van den Eecken'a, Adams'a i van Eogaerta (1960) pod nazwą „dégénérescence strio-pallido-nigrale”. Lata ostatnie przynoszą nowy napływ kazuistyki tego zespołu (Borit i wsp., 1975; Buonanno i wsp., 1975). Pełne zestawienie ogłoszonych przypadków podaje Boudin i wsp. (1976), których praca wzbogaca literaturę tego zespołu o dwie własne obserwacje autorów.

Zwyrodnienie strio-pallido-nigralne nie będąc pełnym odpowiednikiem zespołu *pt*, zbliża się do niego dwoma komponentami klinicznymi: objawami spastycznymi, bądź tylko w postaci obustronnego objawu Babińskiego, bądź współistniejących wyraźnych niedowładów spastycznych („*spasticitas*” — w przeciwstawieniu do „*rigiditas*”) (Michel i wsp., 1975; Takei i Mirra, 1973, Boudin i wsp., 1976) oraz zaburzeniami w układzie wzrokowym i okoruchowym, sygnalizowanym poza zestawieniem Boudin'a, także i w doniesieniu Buonanno i wsp. (1975). Niektórzy z wymienionych autorów poszukują dla tego obrazu chorobowego także odniesień rodzinnych i dziedzicznych. W niektórych opisanych przypadkach drżenia są objawem uderzającym, w poszczególnych brakuje ich zupełnie. Boudin stwierdza często wyraźne współistnienie zwyrodnień układowych oliwkowo-mostkowo-mózdkowych. Buonanno, zwracając uwagę na wzmocniony napływ tych obserwacji w ostatnich latach, podkreśla możliwość przyjęcia bezskuteczności terapii L-Dopa jako podstawę do życiowego rozpoznania różnicowego zespołu zwyrodnienia strio-nigro-pallidalnego i „prawdziwego” parkinsonizmu.

Stwierdzając już obecnie różnice i podobieństwo zwyrodnienia strio-nigro-pallidalnego i zespołu *pt*, korzystamy z podobieństw, ażeby zaplanować kolejne etapy badań. Poprzez stopniowe eliminacje innych komponentów zespołu *pt* i ich odpowiedników anatomicznych, mamy nadzieję zrealizować główny cel tej serii badań: ustalić podłoże anatomiczne, a być może i równoległy współczynnik metaboliczny, odpowiedzialnych za występowanie zrytmizowanych drżeń, jako objawu wiodącego w obrazie zespołu *pt*.

WNIOSKI

1. Badanie moczu w 5 grupach królików (zdrowe, nosicielki, chore samce i chore samice) wykazało brak różnic jakościowych i ilościowych dla kwasów fenylowych i metabolitów alkoholowych amin katecholowych pomiędzy wszystkimi przebadanymi grupami.

2. Stwierdzenie tego faktu, obok innych składników klinicznych zespołu *pt* zbliża go do zespołu zwyrodnienia strio-nigro-pallidalnego, uważanego u niektórych zwierząt za jednostkę dziedziczną w dominancie.

3. Do zwyrodnień strio-nigro-pallidalnych zbliża królika *pt*: komponent niedowładów spastycznych, zaburzenia wzrokowe, podłoże genetyczne, brak zmian dla metabolitów dopaminy w moczu.

To ostatnie zjawisko traktowane jest przez klinicystów zespołu parkinsonoidalnego i zespołów podobnych, jako jednoznaczne z odpornością na leczenie L-DOPA i podstawowy czynnik różnicujący zwyrodnienie strio-nigro-pallidalne od „prawdziwego” parkinsonizmu. Królik *pt* wydaje się być idealnym modelem dla wszechstronnego różnicowania obu zespołów.

E. Osetowska, P. Verheyden, A. Tarashevska

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *pt* НА РАЗНЫЕ ЗВЕНЬЯ „ЗАМКНУТЫХ”
ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ

II. Метаболиты допамина в моче кролика

Резюме

Исследование методом тонкослойной хроматографии мочи 5 групп кроликов из семейства *pt*: больных самцов, больных самок, носительниц, здоровых самок и здорового самца — не выявило количественных и качественных различий феноливых кислот и алкогольных метаболитов катехоламинов у исследованных групп. Большие количества 3-гидроксифенилуксусной, 4-гидроксифенилуксусной и ванилиново-молочной кислот, 3-метокси-4-гидроксифенилового гликоля, ванилиновой кислоты и следовых количеств гомованилиновой кислоты, обнаружены у каждой из исследованных групп. Эти данные сближают симптоматический синдром *pt* с многосистемными вырождениями типа стриопаллидо-нигральных, с компонентом спастических неполных параличей, а также повреждениями зрительной и глазодвигательной системы, не поддающихся лечению L-допamiном.

E. Osetowska, R. Verheyden, A. Taraszewska

EFFECTS OF THE *pt* MUTATION ON VARIOUS LINKS OF „CLOSED”
MOTORIC CIRCUITS

II. Dopamine metabolites in urine of the *pt*-rabbits

Summary

In urine of the *pt*-symptomatic male and female rabbits, the carriers, the healthy females and one healthy male no quantitative and qualitative differences were detected with thin layer chromatography method concerning acid and alcoholic metabolites of catecholamines. The large quantities of 3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, vanillic acid, the presence of 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-glycol, the traces of homovanilic acid and the presence of vanilic acid

were established in each of the examined groups. These results give an approach of the *pt*-syndrome to the multi-systemic striatonigral degenerations with the spastic hemiparesis as well as optic and oculomotoric lesions, resistant to L-Dopa therapy.

PISMIENNICTWO

1. Barbeau A., Murphy G. F., Sourkes T. L.: Excretion of dopamine in diseases of basal ganglia. *Science* 1961, 133, 1706—1707.
2. Barbeau A.: Dopamine and dopamine metabolites in Parkinson's disease. *Proc. Aust. Ass. Neurol.* 1968, 5, 95—100.
3. Barbeau A.: Corrélation biochimique et clinique dans la maladie de Parkinson. *Rev. Neurol.* 1972, 127, 253—264.
4. Barré J. A., Reys L.: Syndrome parkinsonien avec signe de Babinski bilatéral. Lésions symétriques des putamen. *Rev. Neurol.* 1926, 45, 971—975.
5. Borit J. A., Rubinstein L. J., Urich H.: The striatonigral degeneration. *Brain* 1975, 98, 101—112.
6. Boudin G., Pepin B., Guillard A., Godlewski S., Fabiani J. M., Haguenaux M.: Résultat après trois à cinq ans de traitement de 19 cas de syndrome parkinsonien, traité par la L-DOPA et l'association L-DOPA et inhibiteur de la décarboxylase. *Rev. Neurol.* 1974, 130, 274—284.
7. Boudin G., Guillard A., Mikol J., Galle P.: Dégénérescence striato-nigrique. *Rev. Neurol.* 1976, 132, 137—156.
8. Buonanno F., Nardelli E., Onnis L., Rizuto N.: Striatonigral degeneration. *J. neuropath. Sci.* 1975, 26, 545—553.
9. Dowżenko A., Buksowicz Cz., Kuran W.: Leczenie parkinsonizmu L-DOPA i inhibitorem dekarboksylazy obwodowej. *Neurol. Neuroch. Pol.* 1975, 9, 487—493.
10. Ebinger G., Verheyden R., Maurus A.: Thin layer chromatography for diagnosis of secreting neuroblastoma. *Europ. J. Pediatrics* 1975, 121, 63—69.
11. Hornykiewicz O.: Dopamine (3-hydroxy-tyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 1966, 18, 925—964.
12. Kandel E. I., Aizerman M. A., Andreera E. A., Tenenbaum L. A., Shafranowa E. I.: Interrelation of resting, postural and action tremor in Parkinsonian patient before and after surgery. *Confin. Neurol.* 1974, 36, 356—359.
13. Kądziaława K.: Aktualne poglądy na powstawanie i inaktywację biologiczną endogennych amin katecholowych. *Acta Physiol. Pol.* 1972, 23, Suppl. 4, 7—22.
14. Kitai S. T., Sugimori M., Kocsis J. D.: Excitatory nature of dopamine in the nigro-caudate pathway. *Exp. Brain Res.* 1976, 24, 351—363.
15. Lhermitte F., Rosa A., Comoy E., Bohuon C.: Mouvements anormaux provoqués par la L. Dopa et anomalies du métabolisme de la dopamine. *Rev. Neurol.* 1973, 129, 313—324.
16. McKenzie G. M., Gordon R. J., Viik K.: Some biochemical and behavioural correlations of a possible animal model of human hyperkinetic syndromes. *Brain Res.* 1972, 47, 439—456.
17. Michel D., Tommasi M., Laurent B., Trillet M., Schott B.: Dégénérescence striato-nigrique. *Rev. Neurol.* 1975, 131, 409—426.
18. Narabayashi H.: Possible role of cerebellar circuits in Parkinson symptoms. *Confin. Neurol.* 1974, 36, 292—301.

19. Osetowska E., Wiśniewski H.: Królik-interseks w rodzinie z dziedziczną drżącą porażną. *Zwierz. Lab.* 1967, 5, 24—34.
20. Presthus J., Holmsen R.: Appraisal of long-term Levodopa treatment of Parkinsonism with special references to therapy limiting factors. *Acta neurol. Scand.* 1974, 50, 774—790.
21. Takei Y., Mirra S. S.: Striatonigral degeneration: A form of multiple system atrophy with clinical Parkinsonism. W: *Progress in Neuropathology*. Ed. Zimmerman, Grune and Stratton, New York 1973, vol. II. 217—251.
22. Van der Eecken H., Adams R. D., van Bogaert L.: Striopallidalnigral degeneration. An hitherto underscribed lesion in paralysis agitans. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1960, 19, 159—161.
23. Verheyden R.: Konsultacja korespondencyjna w sprawie biochemicznych interpretacji zwyrodnienia strio-pallido-nigralnego. 1977, list z dn. 5.I.1977 r.

Adres prof. dr med. E. Osetowskiej: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 05-300 Mińsk Mazowiecki, ul. Warszawska 126.

ANDRZEJ BRZECKI, ANDRZEJ GRUSZKA, JAN KORNOBIS

PRZYMUSOWE RUCHY PIONOWE OCZU
(„OCULAR BOBBING”)

Klinika Chorób Nerwowych Instytutu Chorób Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów AM, Wrocław

Kierownik Kliniki: doc. dr hab. A. Brzecki

Zakład Medycyny Sądowej AM, Wrocław

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. B. Popielski

Podkorowy ośrodek spojrzenia w osi poziomej jest umiejscawiany w moście, tuż przy jądrze nerwu odwodzącego. Ośrodek spojrzenia (zwany *nucleus parabrucens*) składa się, zdaniem Crosby'ego (1951) z drobnych komórek kojarzeniowych. Wysyłają one neuryty przez pęczek podłużny przyśrodkowy (*fasciculus longitudinalis medialis*) do homolateralnego jądra n. VI oraz heterolateralnego jądra n. III dla mięśnia prostego wewnętrzznego. W przypadku jednostronnego uszkodzenia gałki ocznej nie zwracają się w stronę homolateralną. Obustronne uszkodzenie powoduje porażenie poziomego zwrotu oczu w obie strony (Crosby, 1951). Bender i Shanzer (1964) nie przyjmują istnienia *nucl. parabrucens* i ściśle umiejscowionego ośrodka spojrzenia poziomego. W istocie szarej środkowej otaczającej jądro n. odwodzącego oraz znajdującej się dogłównie od tego jądra leżą drobne skupiska komórek, które mogą uczestniczyć w integracji ruchów oczu, nie ma jednak podstawy by lokalizować ośrodek poziomego spojrzenia wyłącznie w tej okolicy. Integracja ruchów gałek ocznych odbywa się w wielu obszarach pnia mózgu i półkul. Biorą w niej udział jądra tworzącego siatkowatego, zwłaszcza części mostowej, jądra podkorowe oraz istota szara półkul (pola adwersyjne). Nie można mówić o „ośrodku”, ale o „układzie czynności gałko-ruchowej”. Podobne rozważania dotyczą ośrodka spozierania pionowego. Przyjmuje się, że mieści się on w obrębie wzgórków czworaczących przednich. Ważne znaczenie dla tej czynności posiadają również jądra Darkszewicza oraz Cajala, które mają pełnić czynność podkorowych ośrodków ruchów pionowych (Pasik i wsp., 1966; Markham, 1972). Jądro Darkszewicza zawiaduje ruchem oczu w górę, natomiast jądro Cajala — w dół. Oba jądra otrzymują ponadto niespecyficzne impulsy z układu wzrokowego (podkorowego) i kierują je przez twór siatkowaty do układu przedmiotowo-gałkoruchowego. Ją-

dro Darkszewicza przesyła tą drogą impulsy hamujące oczopląs poziomy, a jądro Cajala — impulsy pobudzające (Markham, 1972). Spełniają więc one rolę „ośrodków” dla ruchów pionowych oraz kierują w pewnym stopniu odruchowymi zwrotami poziomymi oczu.

Hassler (1956) lokalizuje mechanizm koordynacyjny ruchów gałek w górę w przednio-brzuszej części śródmózgowia, dogłównie do jądra Cajala (*nucl. interstitialis ventralis*). Natomiast strukturą koordynującą ruch gałek w dół ma być jądro przedspoidłowe (*nucl. praecommissuralis*), które leży grzbietowo, nad wodociągiem, tuż przed spoidłem tylnym.

Dwa mechanizmy zabezpieczające skojarzony ruch gałek w osi poziomej i pionowej działają niezależnie od siebie. Obustronne uszkodzenie (w moście) uniemożliwia skojarzone spojrzenie poziome, przy czym ruchy pionowe są zachowane, a nawet mogą wówczas wystąpić samoistne ruchy gałek ku górze i dołowi („ocular bobbing”).

Zstępujące, korowo-pniowe drogi dla skojarzonych pionowych i poziomych ruchów gałek ocznych, czyli drogi nadjądrowe nie tworzą zbitego pęczka, ale przebiegają w istocie białej półkul prawdopodobnie jako włókna rozproszone. Dlatego z reguły nie ma zaburzeń ruchów oczu w przypadku uszkodzenia tych dróg w półkulach mózgu.

Włókna nadjądrowe dla spojrzenia pionowego kończą się homo- i heterolateralnie w układzie okoruchowym śródmózgowia i ostatecznie pobudzają jądro nerwu błoczkowego i część jądra nerwu okoruchowego. Włókna nadjądrowe kierujące ruchem poziomym gałek ocznych schodzą niżej i kończą się w obrębie jądra nerwu odwodzącego (Crosby i wsp., 1965). Zapewne nie ma włókien nadjądrowych, które by osiągały bezpośrednio jądra nerwów zabezpieczających ruch poziomy. Ruch ten dochodzi do skutku dzięki pobudzeniom biegnącym w pęczku podłużnym przyśrodkowym do odpowiednich jąder nerwów gałkoruchowych. Zarówno pobudzenia korowe jak i przedsionkowe, których następstwem jest ruch poziomy działają przez pęczek podłużny przyśrodkowy (Bender, Shanzer, 1964; Cohen i wsp., 1968).

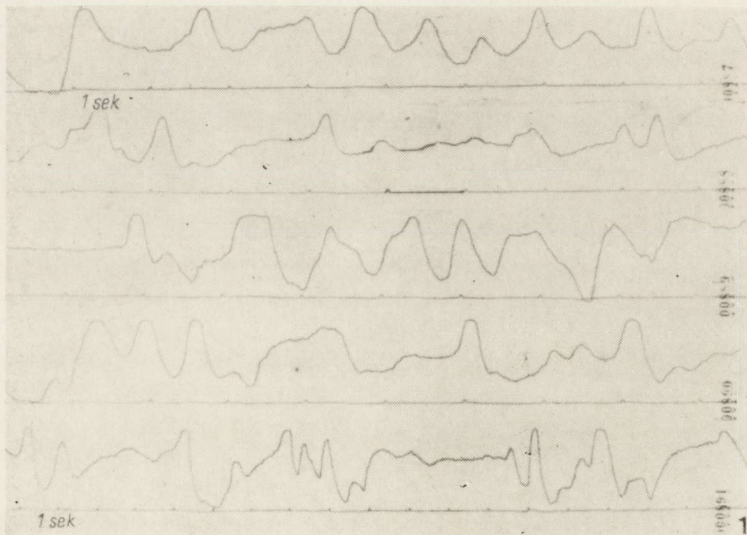
Uszkodzenie mostu stwarza możliwość dysocjacji ruchów gałek ocznych w osi poziomej i pionowej. Izolowane zniesienie poziomych ruchów dowolnych lub prowokowanych, z zachowanym ruchem pionowym jest dobrze znanym objawem uszkodzenia mostu, występującym u chorych w stanie śpiączki lub czuwania.

OPIS PRZYPADKU

Mężczyzna Z.K., l. 44 (Nr hist. chor. 239/74), z zawodu rzeźnik, od wielu lat nadużywał alkoholu. W ostatnim tygodniu przed chorobą pił nieustannie dzień i noc. Dnia 29.II.1974 wystąpił nagle niedowład pra-

wych kończyn z zaburzeniami mowy. Przewieziony do Kliniki w stanie głębokiej śpiączki, nie reagował na żadne bodźce. Ucisk na gałki oczne wywoływał napady odmóżdzeniowe. Niedowład obejmował wszystkie cztery kończyny z przewagą po prawej stronie. Objaw Babińskiego był obustronnie dodatni. Oddech niewydolny, płytki, nieregularny. Ciepłota ciała podwyższona, czynność serca przyspieszona. Wyniki rutynowych badań, w tym dna oczu i płynu mózgowo-rdzeniowego oraz angiografia tętnic szyjnych były prawidłowe. W EEG wystąpiło spłaszczenie zapisu nad lewą półkulą bez innych istotnych zmian.

Oczy chorego były otwarte, sprawiały wrażenie jakby spozierał on świadomie. Gałki oczne symetrycznie ustawione, wykonywały stałe ruchy w osi pionowej. Były to ruchy powolne o dużej, nierównomiernej amplitudzie, symetryczne nierytmiczne; raz drobne i szybkie, kiedy indziej wydatne i wolniejsze. Częstotliwość wychyleń wynosiła od kilku do kilkudziesięciu na minutę. Hiperkinezy te pojawiały się seriami po kilka do kilkunastu, po czym ustępowały na okres jednej do kilkunastu sekund. W fazie spokoju oczy były zwrócone ku dołowi lub na wprost (ryc. 1). Ruchy mimowolne gałek utrzymywały się stale aż do końca obserwacji. Nie było odruchowych zwrotów oczu (objaw „głowy lalki” ujemny). Nie udało się uzyskać wodzenia gałek za bodźcem świetlnym.



Ryc. 1. Zapis elektrookulograficzny przymusowych pionowych ruchów gałek ocznych w przeciągu 50 sek. Średnia częstość ruchów 1/sek. Widoczne przerwy trwające 2—3 sek., w czasie których nieruchome gałki skierowane są wprost lub ku dołowi.

Fig. 1. Electrooculographic record of compulsory vertical eyeballs movement during 50 sec. Mean frequency of movements is 1/sec. During 2—3sec. interruptions eyeballs are fixed straight or downward.

Próba pobudliwości kalorycznej błędników (woda o temp. 27°C) nie wywołała oczopląsu ani zwrotu gałek ocznych. Żrenice dość wąskie, równe, reagowały leniwie na światło.

Ze względu na niewydolność oddechową chory przebywał przez trzy tygodnie w Zakładzie Anestezjologii i Reanimacji AM we Wrocławiu. Wykonano tracheostomię, nie stwierdzono jednak konieczności stosowania oddechu kontrolowanego. Stan ogólny chorego nie uległ w tym czasie zmianie, utrzymywały się zaburzenia przytomności, cechy sztywności odmóżdzeniowej, objawy piramidowe z przewagą po prawej stronie. Utrzymujące się ruchy gałek ocznych, stale otwarte oczy i brak istotnych zmian w EEG przypominały obraz śpiączki określanej mianem „locked-in syndrome”, charakterystycznej dla obustronnego uszkodzenia brzusznej części mostu. Utrzymywały się pionowe ruchy gałek ocznych. W ostatnich dniach życia pacjenta dołączyły się objawy rozkojarzenia wegetatywnego. Zmarł dnia 24.III.1974 wskutek ustania czynności serca i oddechu.

Zespół objawów klinicznych uzasadniał rozpoznanie uszkodzenia pnia mózgu. W różnicowaniu uwzględniono dwie możliwości: Udarowy początek choroby wskazywał na naczyniowe pochodzenie zmian. W związku z przewlekłym alkoholizmem chorego i końcowym wielodniowym opilstwem brano również pod uwagę proces zwyrodnieniowo-toksyczny (*myelinolysis centralis pontis*).

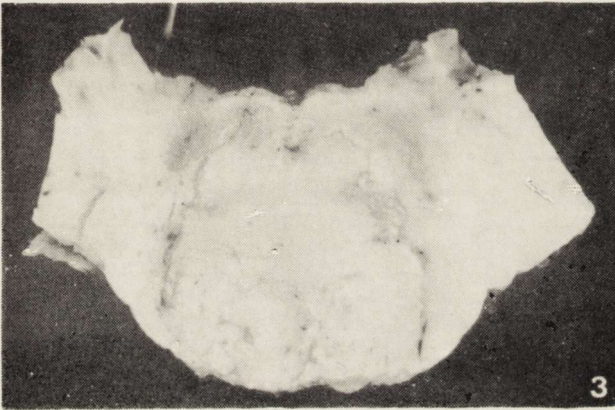
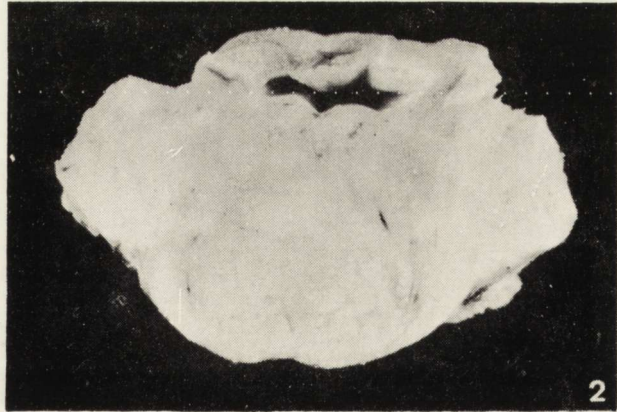
Sekcja ogólna (Zakł. Med. Sądowej AM we Wrocławiu, nr protokołu 115/74) wykazała obrzęk płuc i śluzowo-ropny nieżyt oskrzeli, stan po tracheostomii, stan po wygojonym pęknięciu wrzodu dwunastnicy, płyn przesiąkowy w jamach opłucnowych i jamie brzusznej, odleżyny w okolicy krzyżowej, krętarzy i pięt.

Badanie neuropatologiczne

Makroskopowo: nieduży symetryczny obrzęk półkul mózgu przy niezmienionym rysunku istoty szarej i białej. Układ komorowy prawidłowej wielkości, bez przemieszczenia. W obrębie mostu stwierdzono zatarcie struktury i mniejszą spistość. Zmiana ta miała charakter jednoogniskowy, bardzo rozległy; obejmowała symetrycznie część podstawną mostu, penetrowała dość głęboko w część środkową, zaoszczędzając nakrywkę i struktury położone bezpośrednio pod dnem komory IV-tej. Ku przodowi ognisko sięgało do górnej części dołu równoległobocznego, ku tyłowi dochodziło do poziomu trójkąta n. podjęzykowego (ryc. 2, 3). Pozostałe części pnia, tj. śródmózgowie, rdzeń przedłużony oraz rdzeń kręgowy nie wykazywały zmian makroskopowych.

Ryc. 2. Przekrój przez ramiona spajające i przednią część mostu. W części podstawnej i środkowej rozległe ognisko rozmiękania.

Fig. 2. Section through brachia conjunctiva and anterior part of the pons. In its basal and anterior part a vast focus of malacia.



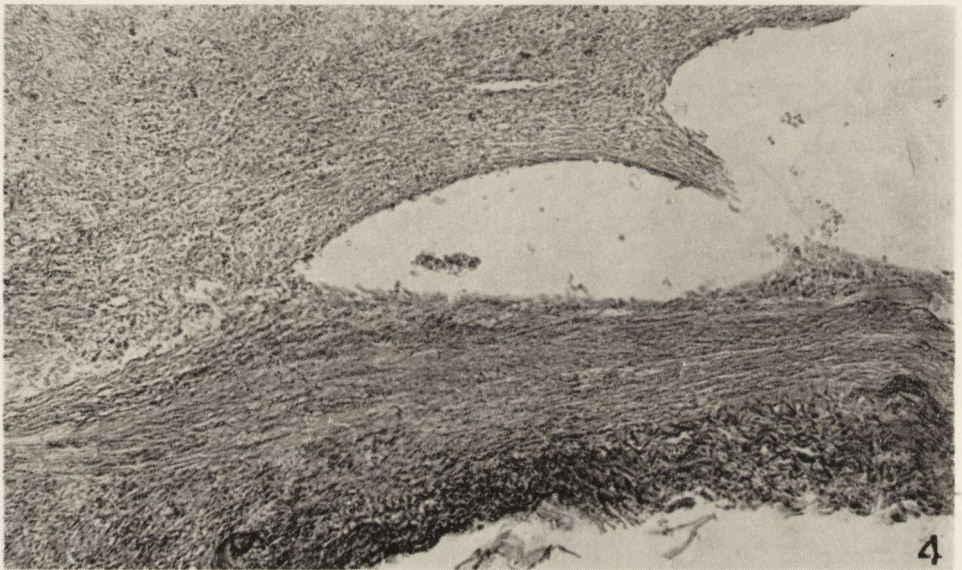
Ryc. 3. Przekrój przez środkową część mostu. Dalsza część ogniska rozmiękania w części podstawnej i środkowej mostu.

Fig. 3. Section through middle part of the pons. Focus of malacia spreads in basal and middle part of the pons.

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z płata czołowego, jąder podstawy oraz płata potylicznego lewej półkuli mózgu i wykonano seryjne skrawki pnia mózgu. Metody barwienia hematoksyliną-eozyną według Heidenhaina, Holzera, van Gieson.

W półkulach mózgu stwierdzono jedynie nieduży obrzęk i pomnożenie jąder oligodendrogleju. Zmiany w obrębie pnia miały charakter martwicy rozplywnej z całkowitym zniszczeniem włókien nerwowych i rozpadem neurocytów. W obszarach dotkniętych martwicą widoczne były bardzo liczne komórki żerne. Odczyn ze strony gleju był wyraźnie drugoplanowy i ustępował miejsca wczesnej tzw. ruchomej rozbiórce. W barwieniu metodą Heidenhaina wykazano w miejscu ogniska rozległą demielinizację. Barwienie metodą Holzera nie wykazało rozplemu gleju włóknistego. W zakresie jąder nerwów czaszkowych oraz dróg nerwowych stwierdzono stosunkowo nieduże zmiany w obrębie jąder nerwu III i IV. Tylko niektóre komórki wykazywały hiperchromatyczne zabarwienie jąder. Natomiast jądra n. VI znajdujące się blisko ogniska roz-

miękania charakteryzowały ciężkie zmiany komórkowe wyrażające się ostrym obrzękiem neuronów. Jądra przedsionkowe leżące w bocznych częściach nakrywki były prawie zupełnie nie uszkodzone. Część górna tworzącego siatkowatego znajdująca się w śródmózgowiu oraz część tworzącego siatkowatego w rdzeniu przedłużonym była niezmienną; natomiast zniszczeniu uległy struktury środkowego odcinka mostu, zwłaszcza w części podstawnej, a także środkowej w okolicy szwu. Pęczek podłużny przyśrodkowy leżący powyżej ogniska rozmiękania nie wykazywał poza obrzękiem, wyraźnego uszkodzenia. W szeregu skrawków wykonanych z uszkodzonego odcinka mostu znaleziono fragmenty tętnicy podstawnej. Większą część jej światła wypełniał zakrzep częściowo zorganizowany (ryc. 4).



Ryc. 4. Tętnica podstawna wypełniona częściowo zorganizowanym zakrzepem. H. E. Pow. 70 \times .

Fig. 4. Basilar artery filled with partly organized thrombus. HE. \times 70.

OMÓWIENIE

Ze względu na dane kliniczne i lokalizację zmian brano pod uwagę możliwość mielinolizy środkowej męstu. Jednakże stwierdzenie martwicy rozplywnej przemawiało przeciwko temu rozpoznaniu. Demielinizacja była jedynie wyrazem wtórnego rozpadu włókien nerwowych z uprzątnieniem ich resztek przez makrofagi. Niedrożność tętnicy podstawnej ostatecznie rozstrzygnęła o naczyniowym pochodzeniu ogniska w moście.

W opisanym przypadku na szczególną uwagę zasługuje objaw gałko-ruchowy polegający na przymusowych pionowych ruchach oczu, tj. „ocular bobbing”. Jest on kliniczną oznaką obustronnego uszkodzenia struktur mostu, zwłaszcza końcowego odcinka korowo-jądrowego drogi spozierania poziomego oraz pęczka podłużnego przyśrodkowego. Objaw ten pierwszy opisał Fisher (1964, 1967). Polega on na skojarzonym ruchu gałek ocznych ku dołowi z następowym wolniejszym powrotem do położenia wyjściowego, o częstości od 2 do kilkudziesięciu, maksymalnie 90/min., niezbyt regularnym, nie przypominającym oczopląsu, z którym należy go różnicować (Yap i wsp., 1968). Ruchy te bywają rytmiczne lub nierytmiczne, czasami są asymetryczne, tzn. wychylenia jednej gałki ocznej są większe niż drugiej. Fisher rozróżnia przypadki typowe i nietypowe. W typowych przypadkach ruchy występują w rytmie 2—12/min. i nie zmieniają się pod wpływem bodźca kalorycznego. Do nietypowych należą ruchy asymetryczne lub jednostronne, wywołane jedynie przez bodziec kaloryczny i skojarzone z ruchami źrenicy (*hippus*). Objaw ten występuje w przypadkach zakrzepu tętnicy podstawnej lub krwotoku do mostu. Daroff i Waldmann (1965) opisali „ocular bobbing” u dziecka z nowotworem zajmującym cały przekrój mostu. Objaw ten źle rokuje, większość przypadków kończy się śmiertelnie. Wyjątkowo obserwowano pomyślne zejście (Susac i wsp., 1970; Newman i wsp., 1971).

Częstość tych niezwykłych ruchów jest zgodna niekiedy z aktywnością pnia mózgu. Jednostronne drażnienie struktur pnia przez pobudzenie kaloryczne błędniaka, może przyspieszyć pionowy ruch gałek, w żadnym przypadku natomiast nie wyzwala poziomych ruchów oczu. Może to mieć znaczenie praktyczne. Jeśli jednostronna próba kaloryczna nie wywołuje u nieprzytomnego chorego poziomych ruchów gałek, wyzwala natomiast pionowe, to można z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, że istnieje pierwotne uszkodzenie mostu. Wynika to z analizy wszystkich dotychczas opublikowanych przypadków. Typowy „ocular bobbing” występujący u chorego w stanie śpiączki wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na pierwotne uszkodzenie mostu (Nelson, Johnston, 1970).

А. Бжецки, А. Грушка, Я. Корнобис

ПРИНУДИТЕЛЬНЫЕ ВЕРТИКАЛЬНЫЕ ДВИЖЕНИЯ ГЛАЗ
(„OCULAR BOBBING”)

Резюме

Рассмотрен случай 44-летнего мужчины-алкоголика, у которого имела место непроходимость основной артерии. Зафиксирована спячка, двусторонний неполный паралич конечностей, приступы децеребрации и непрерывные принуди-

тельные движения глазного яблока по вертикали. Этот последний симптом и явился предметом анализа.

Секция установила обширный очаг размягчения, охватывающий основание и середину моста. Ядра III и IV нервов не изменились, тогда как нейроны ядер VI нерва обнаруживали тяжелые изменения в форме острого отека.

Авторы считают, что принудительные вертикальные движения глаз („ocular bobbing”) являются симптомом, указывающим на первичное повреждение моста. Двусторонний очаг в этой области создает возможность диссоциации движений глазных яблок по вертикали и горизонтали, так как механизмы, обеспечивающие эти движения, действуют независимо друг от друга. Паралич сопряженных боковых движений может сопровождаться независимым движением глазных яблок вверх и вниз.

A. Brzecki, A. Gruszka, J. Kornobis

COMPULSORY VERTICAL EYEBALLS MOVEMENTS („OCULAR BOBBING”)

Summary

A 44 year old man, heavy drinker, developed thrombosis of basilar artery resulting in coma, tetraparesis, decerebration fits and so-called „ocular bobbing”. This syndrome, i.e. compulsory, incessant, vertical eyeballs movements is the object of the study.

Post-mortem examination demonstrated a vast focus of malacia in basal and medial part of the pons. The nuclei of the III and IV cranial nerves were well preserved whereas the neurons of the VI cranial nerves nuclei displayed acute swelling.

The authors express the opinion that so-called „ocular bobbing” is a syndrome of the primary pontine damage. Bilateral focus in this region may cause the dissociation of vertical and horizontal eyeballs movements because the mechanisms protecting these movements act separately. Paralysis of conjugated lateral movements can be accompanied by spontaneous eyeball movements upwards and downwards.

PISMIENNICTWO

1. Bender M., Shanzer S.: Oculomotor pathways defined by electric stimulation and lesions in the brain stem of monkey. W.: The oculomotor system. Ed.: Bender M., Harper, Row, New York, Evanston, London, 1964.
2. Cohen B., Komatsuzaki A., Bender M.: Electrooculographic syndrome after pontine reticular formations lesions. Arch. Neurol., 1968, 18, 18, 78—92.
3. Crosby E.: Relations of brain centers to normal and abnormal eye movements in the horizontal plane. J. Comp. Neurol., 1951, 99, 437—480.
4. Crosby E., Humphrey T., Laver E.: Correlative anatomy of the nervous system. Macmillan Co, New York, 1965.
5. Daroff R., Waldman A.: Ocular bobbing. J. Neurol. Neurosurg. Psych., 1965, 28, 4, 375—377.
6. Fisher M.: Ocular bobbing. Arch. Neurol., 1964, 11, 543—546.
7. Fisher M.: Some neuro-ophthalmological observations. J. Neurol. Neurosurg., Psych. 1967, 30, 5, 383—392.

8. Hassler R.: Die zentralen Apparate der Wendebewegungen. I. Ipsiversiven Wendungen durch Reizung einer direkten vestibulothalamischen Bahn im Hirnstamm der Katze. Arch. Psych., 1956, 194, 456—480.
9. Nelson J., Johnston C.: Ocular bobbing. Arch. Neurol., 1970, 22, 348—356.
10. Newman N., Gay A., Heilbrun P.: Disjugate ocular bobbing. Its relations to midbrain, pontine and medullary functions in a surviving patient. Neurology (Minneap.), 1971, 21, 633—637.
11. Markham C.: Descending control of the vestibular nuclei: physiology. W: Basic aspects of central vestibular mechanisms. Ed.: Brodal A., Pompejano G., Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1972.
12. Pasik T., Pasik P., Bender M.: The superior colliculi and eye movements. Arch. Neur. (Chic.), 1966, 15, 420—436.
13. Susac J., Hoyt W., Daroff R., Lawrance W.: Clinical spectrum of ocular bobbing. J. Neurol. Neurosurg. Psych., 1970, 33, 771—775.
14. Yap C., Mayo C., Barron K.: Ocular bobbing in palatal myoclonus. Arch. Neurol., 1968, 18, 304—310.

Adres autorów: Klinika Chorób Nerwowych Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, 50-420 Wrocław, ul. Traugutta 118.

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO

OBRAZ MORFOLOGICZNY MÓZDŻKU W PRZEBIEGU PIERWOTNYCH NOWOTWORÓW PÓŁKUL MÓZGU

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

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że zmiany w mózdku w przebiegu choroby nowotworowej badano głównie w przypadku nowotworów złośliwych rozwijających się poza układem nerwowym (Parker, Kernohan, 1933; Brouwer, Schlesinger, 1947; Zülch, 1948, 1954; Osetowska, 1963 i inni). Główną uwagę skupiono w tych pracach na zagadnieniu toksycznego działania metabolitów danego nowotworu, zwłaszcza na warstwę ziarnistą kory mózdku, której uszkodzenie naśladowało schorzenie zwyrodnieniowe ośrodkowego układu nerwowego. Zmianom morfologicznym mózdku w przebiegu pierwotnych nowotworów nadmiotowych c.u.n. nie poświęcono większej uwagi, traktując tę strukturę raczej marginesowo (Choróbski, 1950; Zülch, 1952, 1956 i inni), bądź uważając ją za mało wrażliwą na obrzęk (Jaburek, 1936).

W pracach szkoły Spielmeyera i późniejszych autorów (Bodechtel, Döring, 1938; Bernsmeier, Siemons, 1954; Lindenberg, 1956; Gänshirt, 1958 i innych) podkreślano pogorszenie ukrwienia mózgowia w przebiegu wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego dopatrując się uzależnienia zmian również od przyczyny, która doprowadziła do wzrostu ciśnienia śródczaszkowego.

Zadaniem pracy była ocena zmian strukturalnych i topografii uszkodzeń mózdku w przebiegu pierwotnych nowotworów półkul mózgu w celu ustalenia obrazu zmian spowodowanych między innymi wzrostem ciśnienia śródczaszkowego.

MATERIAŁ I METODA

Materiał obejmował 70 przypadków sekcyjnych (35 kobiet i 35 mężczyzn) w wieku od 9 do 84 lat. Średnia wieku dla całej grupy wynosiła 58,6 lat. Czas trwania choroby wahał się od 1 miesiąca do 11 lat. Za-

leżność między rodzajem nowotworu (po weryfikacji mikroskopowej) a czasem trwania choroby przedstawiono w tabeli 1.

W obrazie klinicznym dominowały objawy wynikające z miejscowego uszkodzenia tkanki mózgowej, spowodowanego przez nowotwór, a tylko w 4 przypadkach obserwowano w pierwszym okresie choroby zespół mózdkowy (ataksję lokomocyjną i statyczną). W 14 przypadkach występowały napady padaczkowe duże i w 5 przypadkach — napady ogniskowe, jacksonowskie. W 13 przypadkach przeprowadzono operację neurochirurgiczną. Przyczyną zgonu w 57 przypadkach była śpiączka mózgowa, w pozostałych przypadkach zator tętnicy płucnej (6 przyp.), bądź niewydolność krążenia w przebiegu zapalenia płuc (7 przyp.). Klinicznie rozpoznano w 50 przypadkach pierwotny nowotwór o.u.n., w pozostałych bądź naczyniopochodne uszkodzenie mózgu (12 przyp.), bądź psychiczę (8 przyp.).

Do badania mikroskopowego pobrano skrawki z utkania nowotworowego oraz wycinki w płaszczyźnie czołowej przez półkule mózdku z robakiem. Preparaty barwiono fioletem krezyłu, hematoksyliną-eozyną, metodą Spielmeyera, Kanzler-Arendta i Bielschowsky'ego.

WYNIKI

Makroskopowo we wszystkich przypadkach stwierdzono spłaszczenie zakrętów z zaciśnięciem rowków z objawami wklonowania haka zakrętu hipokampa (58 przyp.), zakrętu obręczy (43 przyp.), migdałków (48 przyp.) i robaka mózdku (24 przyp.) oraz zaciśnięciem układu komorowego (52 przyp.). Współistniejące zmiany zanikowe mózgu obserwowano w 7 przypadkach, a zmiany miażdżycowe w naczyniach podstawy w 24 przypadkach.

Lokalizacja nowotworu przeważała w półkuli lewej (39 przyp.), najczęściej zajęty był płat czołowy (40 przyp.) bądź ciemieniowy (34 przyp.). W 15 przypadkach zajęte były obie półkule. Pierwotny wieloogniskowy glejak wielopostaciowy stwierdzono w 4 przypadkach. Rozpoznanie mikroskopowe przypadków przedstawiono w tabeli 1. Glejaki mózgu były zlokalizowane w przeważającej liczbie przypadków w istocie białej, w 27 przypadkach naciekały spoidło wielkie, a w 29 przypadkach jądra podstawy. Wtórne krwotoki do pnia mózgu w przebiegu narastającego obrzęku stwierdzono w 16 przypadkach.

W mózdku we wszystkich badanych przypadkach obserwowano rozsiane ubytki komórek Purkiniego. Nasilenie opustoszeń było jednak różne, od niewielkiego przerzedzenia do ubytków obejmujących 1/3 liczby komórek Purkiniego w obrębie badanego zakrętu aż do całkowitego ich braku. W przypadkach z niewielkim nasileniem zmian, ubytk-

Tabela 1. Czas trwania choroby a rodzaj nowotworu

Table 1. Duration of illness and type of neoplasm

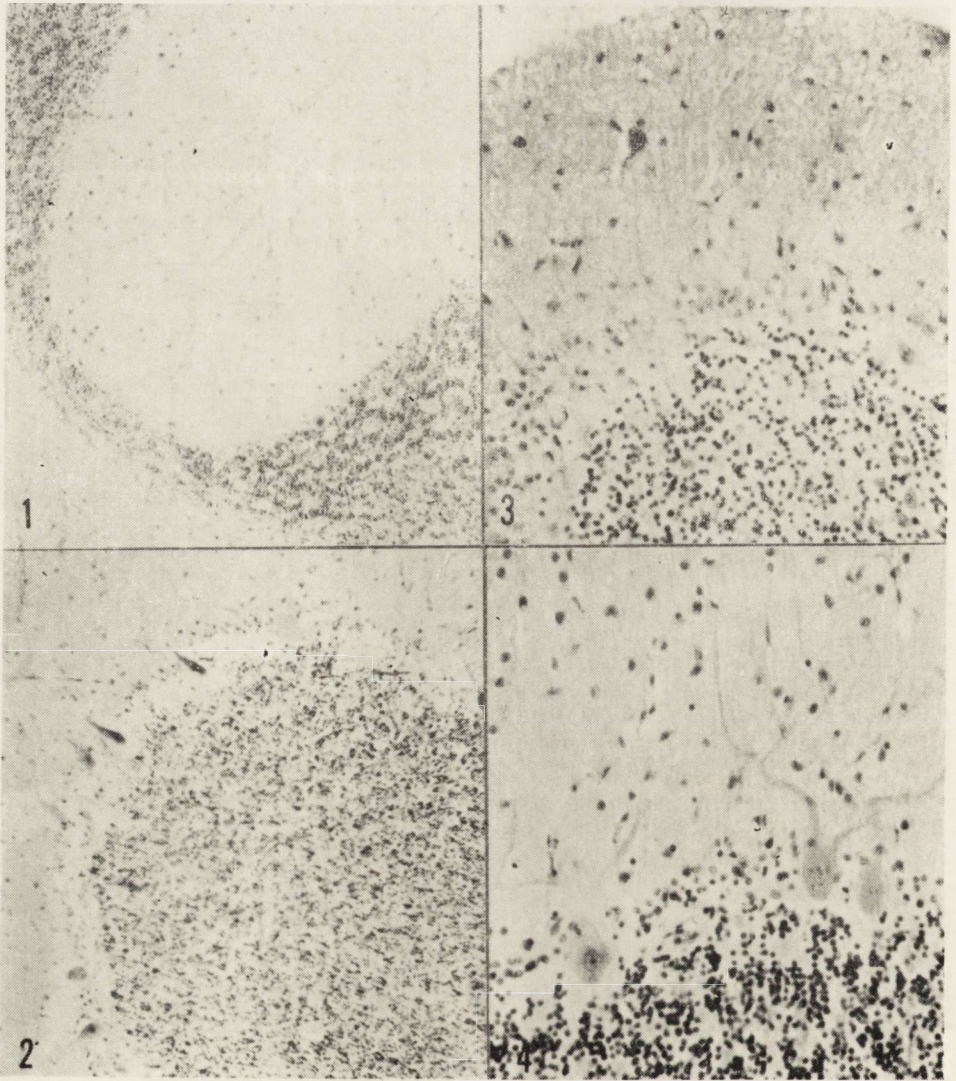
Rodzaj nowotworu Type of neoplasm	Czas trwania choroby Duration of illness							Razem Total
	0-3 mies. 0-3 mth.	3-6 mies. 3-6 mth.	6-12 mies. 6-12 mth.	1-2 lata 1-2 years	2-5 lat 2-5 years	powyżej 5 lat more than 5 years		
<i>Glioblastoma multiforme</i>	24	17	6	1	—	—	48	
<i>Astrocytoma</i>	2	3	—	1	1	1	8	
<i>Oligodendroglioma</i>	—	—	—	1	—	—	1	
<i>Ependymoma</i>	—	—	—	—	—	1	1	
<i>Meningeoma</i>	—	—	1	5	3	3	12	
Razem Total	26	20	7	8	4	5	70	

ki komórek Purkiniego występowały na ogół w obrębie dna rowków. Stopniowo przy dużych ubytkach w obrębie dna rowków i przylegających częściach zakrętów (ryc. 1), spostrzegano przerzedzenie komórek Purkiniego na wypukłości zakrętów, zgębczenie warstwy ziarnistej głównie na wypukłości (ryc. 2) i plackowate ubytki jej komórek (ryc. 3). Często też przy stosunkowo niewielkim nasileniu ubytków, obserwowano przesunięcie komórek Purkiniego do warstwy drobinowej.

Zachowane komórki Purkiniego, w przypadkach o dużym nasileniu zmian, były dosyć blade o poszerzonych, obrzękłych dendrytach (ryc. 4). Sporadycznie obserwowano również w tych przypadkach tzw. torpedy aksonalne. Często wśród zmienionych homogenizacyjnie komórek Purkiniego obserwowano również komórki lekko obkurczone o ciemno-barwiącej się cytoplazmie i jądrze z niewidocznym jąderkiem (ryc. 2). Warstwa ziarnista w pojedynczych tylko przypadkach była zwężona, i to głównie w obrębie dna rowków, wtedy jej komórki wybarwiały się niejednolicie ciemno, czasami ich zarys był lekko kanciasty. Komórki gleju Bergmanna były często pobudzone zwłaszcza na wypukłości zakrętów, wybarwiały się jasno, tworzyły wielorzędowe skupienia i krzaczkowe (ryc. 5).

Ubytki komórek Purkiniego i zwężenie warstwy ziarnistej dotyczyło przede wszystkim listeczków położonych w pobliżu istoty białej, u nasady płacików. Najczęściej w tych obszarach mózdzku całe partie listeczków pozbawione były komórek Purkiniego.

Ubytki jak i zgębczenie tkanki częściej obserwowano na wypukłości płacików w obrębie migdałków niż w obrębie robaka mózdzku. Nie



Ryc. 1. Ubytki komórek Purkinjego w dnie rowków i w przylegających częściach zakrętów. Pobudzenie gleju Bergmanna. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×.

Fig. 1. Loss of Purkinje cells at the bottom of sulci and in the adjacent parts of gyri. Slight hyperplasia of Bergmann's glia. Cresyl violet. × 100.

Ryc. 2. Zgąbczenie warstwy ziarnistej na wypukłości zakrętu. Zachowane komórki Purkinjego blade, wydłużone lub ciemne, obkurczone. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×.

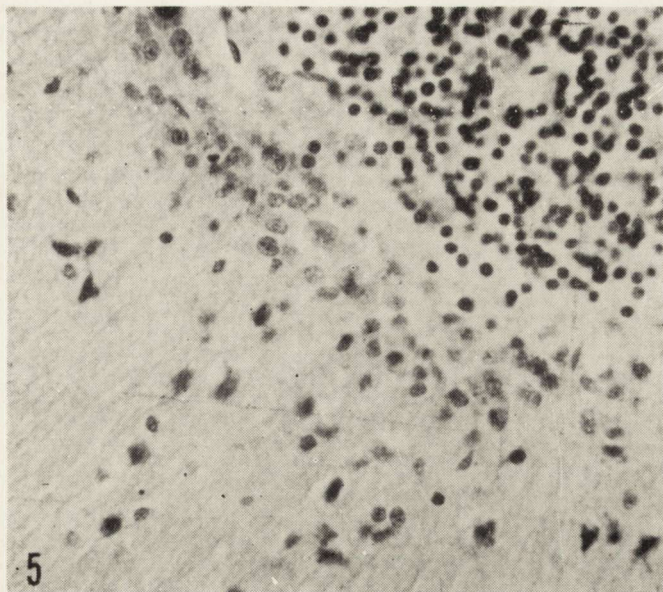
Fig. 2. Spongiosis of granular layer in the convexity of gyrus. Preserved Purkinje cells either pale, elongated or dark, shrunken. Cresyl violet. × 100.

Ryc. 3. Plackowate ubytki komórek warstwy ziarnistej. H. E. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Focal loss of cells in granular layer. H. E. × 200.

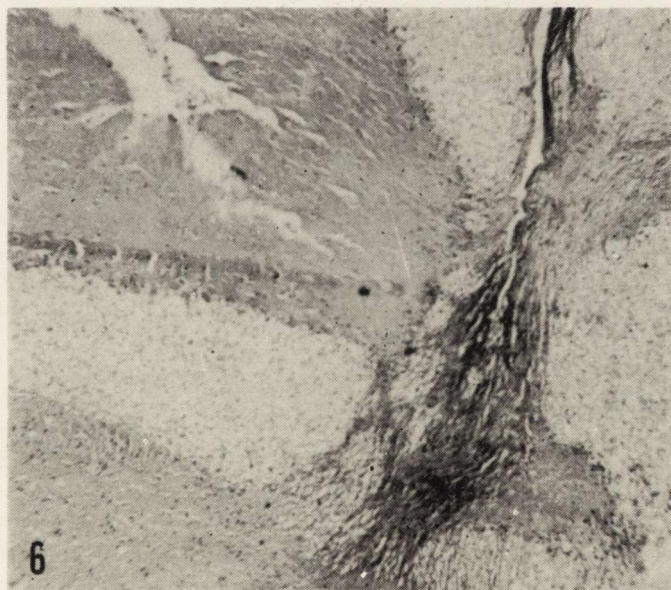
Ryc. 4. Poszerzone, obrzękłe dendryty komórek Purkinjego. H. E. Pow. 200 ×.

Fig. 4. Broad, swollen dendrites of Purkinje cells. H. E. × 200.



Ryc. 5. Pobudzenie gleju gwiaździstego Bergmanna. H. E. Pow. 400 \times .

Fig. 5. Hyperplasia of Bergmann's stellate glia. H. E. \times 400.



Ryc. 6. Izomorficzna blizna glejowa na pograniczu robaka z półkulą mózdzku.
Kanzler-Arendt. Pow. 60 \times .

Fig. 6. Isomorphic glial scar at the border of vermis and cerebellar hemisphere.
Kanzler-Arendt. \times 60.

znaleziono większych różnic w nasileniu ubytków komórek Purkinjego między powierzchnią grzbietową i brzusznią półkul mózdzku. W niektórych przypadkach ubytki komórek były większe na powierzchni grzbietowej, w innych na brzusznej.

W istocie białej, głównie w partiach centralnych, we wnętrzu jądra zębatego, obserwowano prawie we wszystkich przypadkach poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych i drobne jamki, a w obrazie Spielmeiera pas demielinizacji okołonaczyniowej z makrofagami tworzącymi drobne skupienia. W pojedynczych przypadkach (6) na pograniczu robaka i półkuli, w obrębie krawędzi dolnej półkuli mózdzku były obecne drobne korowo-podkorowe rozmięknięcia bądź izomorficzne blizny glejowe (ryc. 6).

W obrębie migdałków i robaka mózdzku, w przypadkach z makroskopowo widocznym wklonowaniem tych struktur, obserwowano zagęszczenie naczyń, zwłaszcza włóściczek.

Glejoza okołonaczyniowa była czasami wzmożona. Komórki nerwowe jądra zębatego były wybitnie stłuszczałe. W 25 przypadkach stwierdzono zmiany stwardnieniowe o niewielkim nasileniu w naczyniach śródmiaższowych mózdzku. W pojedynczych przypadkach (8) były obecne kłęбки naczyniowe.

Przeprowadzona korelacja między rodzajem nowotworu nadnamiotowego a nasileniem opisanych zmian ujawniła większe nasilenie ubytków komórek Purkinjego w przypadkach glejaków, zwłaszcza w glejaku wielopostaciowym. Obrzęk istoty białej półkuli w tych przypadkach, był również bardziej nasilony. W przypadkach operowanych glejaków wielopostaciowych, opisane zmiany były najbardziej nasilone, mimo stosunkowo niewielkiego czasu trwania zespołu chorobowego.

OMOWIENIE

Przebadany materiał obejmował 70 przypadków pierwotnych, nadnamiotowych nowotworów o.u.n. Nasza uwaga była skierowana na charakter i topografię zmian w mózdzku, strukturze anatomicznej nie zajętej przez toczący się proces rozrostowy.

Jak wiadomo z przeglądu piśmiennictwa wzrost ciśnienia śródczaszkowego w przestrzeni nadnamiotowej w przebiegu rozrostu nowotworowego wywiera między innymi niekorzystny wpływ na dopływ krwi do mózdzku przez jego główne pnie tętnicze. Najbardziej wrażliwą na niedokrwienie okazała się w naszym materiale warstwa komórek Purkinjego nie posiadająca swojej własnej siateczki włóściczek (Uchimura, 1929) i tym gorzej znosząca wszelkie zaburzenia w ukrwieniu. Z drugiej

strony utrudnienie odpływu żylnego w przebiegu narastającego obrzęku w przestrzeni nadnamiotowej, a później i w przestrzeni podnamiotowej, nasila niedokrwienie mózdzku. Uszkodzeniu i ubytkom komórek Purkiniego zaczynają towarzyszyć zmiany obrzękowe w otoczeniu naczyń w istocie białej oraz uszkodzenie warstwy ziarnistej kory według schematu typowego dla niedokrwienia (Scholz, 1949). Najbardziej uszkodzone są listeczki w centralnie położonych płacikach.

Uszkodzenie mózdzku było większe w przypadkach glejaków wielopostaciowych niż w przypadkach oponiaków. Szczególnie duże zmiany stwierdzono w materiale pochodzącym od chorych operowanych, mimo stosunkowo krótkiego czasu (3 m-ce) trwania zespołu klinicznego. Im gwałtowniej narastał zespół wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego czy to ze względu na rozmiary utkania nowotworowego czy też ze względu na szybkość rozwijającego się obrzęku, tym gwałtowniej rozwijały się objawy niedokrwienia mózdzku. Wtedy też pojawiały się drobne ogniska rozmiękania korowo-podkorowego. Nie znaleziono różnic w nasileniu zmian zależnych od lokalizacji nowotworu. Guzy nadnamiotowe były w naszym materiale zlokalizowane przeważnie w płacie czołowym (40 przyp.), bądź czołowo-ciemieniowym (34 przyp.). Uszkodzeniu tych okolic towarzyszy zawsze olbrzymi, gwałtownie rozwijający się obrzęk i „pogotowie obrzękowe” jest w tych okolicach największe (Jaburek, 1936; Zülch, 1952, 1956).

W naszym materiale nie znaleźliśmy cerebellopatii opisywanej w przebiegu narządowych nowotworów złośliwych, naśladujących chorobę zwyrodnieniową (Greenfield, 1936; Brouwer, Schlesinger, 1947; Osetowska, 1963; Uhle, 1954 i inni). Nie obserwowaliśmy rozległego zaniku komórek warstwy ziarnistej ani też największego nasilenia ubytków komórek Purkiniego w obrębie robaka i płacików czworokątnych jak również typowego dla zespołu zwyrodnieniowego, wzmożonego rozplemu gleju. Miejscowe pobudzenie gleju gwiaździstego Bergmanna oraz przesunięcie komórek Purkiniego do warstwy drobinowej obserwowane w naszych przypadkach ma prawdopodobnie charakter obrzękopochodny (Jaburek, 1936).

WNIOSKI

Uszkodzenie mózdzku w przebiegu pierwotnych, nadnamiotowych nowotworów mózgu są prawdopodobnie następstwem niedokrwienia tej struktury. Różnice w nasileniu zmian wydają się zależne od rodzaju guza i struktury anatomicznej pierwotnie uszkodzonej (opona, istota biała, kora) oraz od szybkości rozrostu utkania nowotworowego i od tempa rozwoju obrzęku mózgu.

E. Тарновска-Дзидушко

МОРФОЛОГИЯ МОЗЖЕЧКА
В ПРОЦЕССЕ ПЕРВИЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЗГОВЫХ ПОЛУШАРИЙ

Резюме

Исследована топография и структура изменений в мозжечке, появляющихся в процессе первичных надпалаточных новообразований центральной нервной системы, с целью установления влияния повышенного внутричерепного давления на их формирование.

Материал включал 70 случаев в возрасте от 9 до 84 лет. Продолжительность болезни была от 1 месяца до 11 лет. В клинической картине преобладали симптомы, являющиеся следствием местного повреждения мозговой ткани, в 4 случаях наблюдали мозжечковый синдром.

Во всех случаях установлен отек мозга. Преобладали новообразования левого мозгового полушария. Наиболее часто была затронута лобная или теменная доля. Во всех случаях обнаружены рассеянные потери клеток Пуркинье, от небольшого изреживания до почти полного их отсутствия в области данной извилины, а также губчатость и пятнистые потери клеток в зернистом слое. Сохранившиеся клетки Пуркинье проявляли признаки гомогенного или хронического заболевания. Потери клеток Пуркинье и изменения в зернистом слое преобладали у основания долек. Чаще были затронуты дольки в области миндалин, чем в области червячка. В белом веществе наблюдали скелососудистую демиелинизацию, а на границе червячка и полушария — мелкие очаги кортико-субкортикальной маляции или глиозные шрамы.

E. Tarnowska-Dziduszko

MORPHOLOGY OF CEREBELLUM IN THE COURSE OF PRIMARY
NEOPLASMS OF CEREBRAL HEMISPHERES

Summary

Investigation concerns the topography and structure of changes in cerebellum in the course of primary, supratentorial neoplasms of central nervous system. The study was performed to establish histological changes caused by increased intracranial pressure.

Material consisted of 70 cases, their age ranging from 9 to 84 years. Duration of illness was 1 month — 11 years. Clinically predominated the symptoms resulting from local destruction of nerve tissue, only 4 cases displayed cerebellar syndrome.

Brain edema was present in all cases. Neoplasms of left cerebral hemisphere were more frequent. Mostly affected were frontal and parietal lobes. Author demonstrated in all cases the dispersed loss of Purkinje cells. The degree of changes varied from slight rarefaction to almost complete loss. Granular layer exhibited sponginess and patchy loss of cellular elements. Preserved Purkinje cells presented the features of homogenic or chronic neuronal disease. The loss of Purkinje cells and changes in granular layer dominated in deeper folia at the base of lobuli. Lobular convexity was affected more often in tonsils than in vermis. Perivascular demyelination of white matter and small foci of cortico-subcortical malacia or glial scars were encountered at the border zone of vermis and cerebellar hemisphere.

PIŚMIENNICTWO

1. Bernsmeier A., Siemons K.: Gesamtkreislauf und Hirndruckblutung bei intrakraniellen Angiomen und Aneurysmen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1954, 169, 421—426.
2. Bodechtel G., Döring G.: Zirkulationsstörung bei Hirngeschwülsten. *Z. Neurol.*, 1938, 161, 166—177.
3. Brouwer B., Schlesinger F. G.: Carcinoma ovarii and cerebellar degeneration. *Proc. K. Acad. Web. Am.*, 1947, 5, 1329—1936.
4. Choróbski J.: Guzy śródczaszkowe. PZWL, Warszawa 1950.
5. Gänshirt H.: Die Störung der Sauerstoffversorgung des Gehirns im Hirndruck. *Nervenarzt* 1958, 29, 127—132.
6. Greenfield J. G.: Subacute spino-cerebellar degeneration occurring in elderly patients. *Brain* 1936, 57, 161—176.
7. Jaburek L.: Hirnödeme und Hirnschwellung bei Hirngeschwülsten. *Arch. Psychiat.*, 1936, 104, 518—548.
8. Lindenberg R.: Die Bedeutung der Gefäßversorgung des Gehirns für Art und Ort kreislaufbedingter Gewebsschäden. W.: *Handbuch der spez. path. Anatomie und Histologie*, Springer, Berlin 1957, XIII/1B, 1128—1160.
9. Osetowska E.: Zaniki kory mózdzku w przebiegu raka narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.*, 1963, 1, 91—101.
10. Parker H. L., Kernohan J. W.: Parenchymatous cortical cerebellar atrophy (chronic atrophy of Purkinje cells). *Brain*, 1933, 56, 191—211.
11. Scholz W.: Histologische und topische Veränderungen und Vulnerabilitätsverhältnisse im menschlichen Gehirn bei Sauerstoffmangel, Ödem und plasmatischen Infiltrationen. *Arch. Psychiat. Z. Nervenheilk.*, 1949, 181, 621—631.
12. Uchimura Y.: Über die Blutversorgung der Kleinhirnrinde und ihre Bedeutung für die Pathologie des Kleinhirns. *Z. ges. Neurol. Psychiat.*, 1929, 20, 774—783.
13. Uhle G.: Die gekreuzten und andere sekundäre Kleinhirnatrophien. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.*, 1954, 127, 5—6.
14. Zülch K. J.: Über die anatomische Stellung der Kleinhirnrindenatrophie und ihre Beziehung zur Nonne-Marieschen Krankheit. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1948, 159, 501—518.
15. Zülch K. J.: Die primäre Kleinhirnrindenatrophie. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.*, 1954, 127, 3—4.
16. Zülch K. J.: Über die Pathologie und Biologie der Hirngeschwülste. *Wien. med. Wschr.* 1952, 711—715.
17. Zülch K. J.: *Geschwulst und Hirn. W: Pathologische Anatomie der raumbeengenden intrakraniellen Prozesse.* Ed.: H. Olivecrona, W. Tonniss. Springer-Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.

Adres autorki: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

BOGNA SCHMIDT-SIDOR, DANUTA OSTROWSKA,
MARIA AFEK-KAMINSKA, ARKADIUSZ STAŃCZYK

ENCEPHALOMENINGITIS TRICHINOTICA

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego

Kierownik: doc. dr hab. J. Dymecki

Pracownia Anatomopatologiczna Szpitala Zakaźnego Nr 1 w Warszawie

Kierownik: dr med. M. Afek-Kamińska

Oddział VII Miejskiego Szpitala Zakaźnego Nr 1 w Warszawie

Ordynator: dr med. A. Stańczyk

Powikłania neurologiczne w przebiegu zakażenia *Trichinella Spiralis* występują w około 10—17% ogółu przypadków (Escobar i wsp. 1972). Larwy włośni w mózgu pacjenta zmarłego z powodu ostrej włośnicy opisał po raz pierwszy Channing w 1906 r. (cyt. za Fischerem 1955). Od tego czasu objawy neurologiczne włośnicy wiązane są z zajęciem przez pasożyty ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.).

W piśmiennictwie polskim Filiński (1952) opisał przypadek ostrej trychinozy powikłany zakrzepami zatok żylnych opon mózgowych, nie stwierdził jednak trychin w mózgu. Skąpa liczba opracowań neuropatologicznych dotyczących włośnicy z zajęciem o.u.n. skłoniła nas do przedstawienia własnej obserwacji.

OPIS PRZYPADKU

Chora L.Cz., lat 23, zachorowała w końcu grudnia 1954. Wśród pełnego zdrowia wystąpiło osłabienie, bóle łydek, trudności w chodzeniu, podwyższenie ciepłoty ciała do 38°. Po 2 tygodniach do powyższych objawów dołączył się szczykościsk, przykurcz w stawach łokciowych, obrzęk nóg, odleżyna w okolicy krzyżowej. W 3 tygodniu choroby pacjentka została skierowana do Szpitala Zakaźnego z podejrzeniem choroby Heinego-Medina. W czasie obserwacji w oddziale stan pacjentki był ciężki, ciepłota ciała w granicach 37,6° do 38,8°, tętno do 130/min., RR 110/70. Stwierdzono bolesność samoistną i uciskową mięśni kończyn, przykurcz stawów łokciowych, szczykościsk, uogólnione obrzęki. Z odchyień w stanie neurologicznym stwierdzono sztywność karku na 2 palce,

objaw Kerniga dolny, nierówność szpar powiekowych, brak odruchów ścięgnowo-okostnowych w kończynach dolnych, brak odruchów brzusznych. W 4 tygodniu choroby wystąpiło powiększenie wątroby, stan podżółtaczkowy oraz zaburzenia świadomości w postaci majaczenia. Pacjentka zmarła pod koniec 4 tygodnia choroby wśród objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej.

Badania dodatkowe: Leukocytoza 22000/mm³ z eozynofilią 2%. Hipoalbuminemia i hipoglobulinemia. Próby wątrobowe patologiczne. Bilirubina w surowicy krwi 4,8 mg%. Mocz — białko 165 mg%, obecne barwiki żółciowe, urobilinogen wzmożony, w osadzie obecne wałeczki szkliste. Ekg — cechy uszkodzenia i niedotlenienia mięśnia sercowego. Płyn m.rdz. badany na 2 dni przed zgonem nie wykazywał zmian.

Rozpoznanie kliniczne: *Hepatitis parenchymatosa. Myocarditis acuta. Encephalomyelitis acuta? Morbus Heine-Medina?*

Wynik sekcji ogólnej: *Trichinosis gradu majoris cum myositide acuta systematis musculorum. Dilatatatio cordis dextri. Venostasis et steatosis myocardii. Venostasis pulmonum et renum. Hydrothorax bilateralis. Anasarca universalis. Infarctus haemorrhagicus parvus lobi inferioris pulmonis dextri. Enterocolitis catarrhalis. Steatosis diffusa hepatis.*

Materiał do badania neuropatologicznego pobrano wg schematu obowiązującego w czasie epidemii choroby Heinego-Medina w 1954 r., tzn. ze wszystkich okolic kory mózgowej, zwojów podstawy, pnia mózgu, mózdzku i rdzenia kręgowego. Poza tym pobrano oponę twardą, zwoje przykręgowe, splot trzewny, splot barkowy, nerwy obwodowe, mięśnie kończyn, przeponę, mięśnie międzyżebrowe i mięśnie klatki piersiowej. Materiał utrwalony w alkoholu, zatopiony w celoidynie, barwiono metodami: H-E, Nissla, Spielmeyera, Bielschowsky'ego, van Gieson.

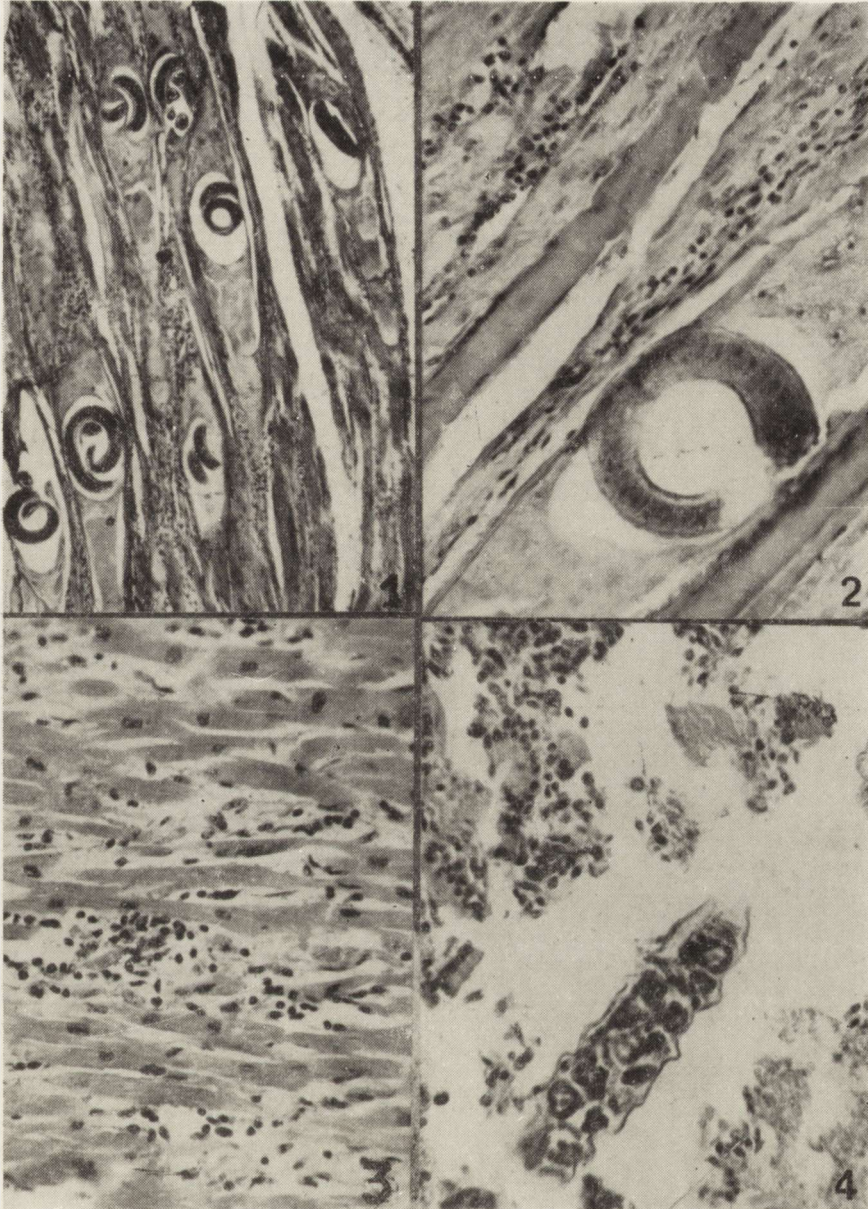
Badanie mikroskopowe: we wszystkich wycinkach mięśniowych stwierdzono bardzo liczne włóśnie. W niektórych polach przy powiększeniu 100 × znajduje się do 10 pasożytów (ryc. 1). Włókna mięśniowe są obrzękłe, blade, o zatartym prążkowaniu, z dużymi jasnymi jądrami i wyraźnym jąderkiem. Między włóknami mięśniowymi widoczne są nacieki z limfocytów, plazmocytów, histiocytów i pojedynczych komórek kwasochłonnych (ryc. 2). W mięśniu sercowym stwier-

Ryc. 1. Liczne larwy w mięśniu poprzecznie prążkowanym. Zeszklwienie włókien mięśniowych, nacieki złożone z komórek jednojądrzastych. H. E. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Numerous larvae of *Trichinella* in striated muscle. Hyalinosis of affected muscle fibres, infiltrations composed of mononuclear cells. H. E. × 60.

Ryc. 2. Trychina w uszkodzonym włóknie mięśniowym o zatartym prążkowaniu i jasnych jądrami. H. E. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Larva in muscle fibre. The fibre displays blurred striation and light nuclei. H. E. × 200.



Ryc. 3. Nacieki limfocytarno-plazmocytarne w mięśniu sercowym. H. E. Pow. 200 \times .
 Fig. 3. Infiltrations of lymphocytes and plasma cells in heart muscle. H. E. \times 200.

Ryc. 4. W świetle jelita cienkiego widoczna część ciała samicy wypełniona młodymi larwami. H. E. Pow. 200 \times .

Fig. 4. In the lumen of small intestine visible a part of female *Trichinella* body filled with young larvae. H. E. \times 200.

dzono obfite nacieki z dużą ilością komórek kwasochłonnych (ryc. 3). W wycinkach z jelit, wśród złuszczonej nabłonków i nacieków zapalnych znaleziono część ciała samicy włośnia wypełnioną larwami trychin (ryc. 4).

Obraz neuropatologiczny: w oponach miękkich mózgu stwierdzono obfite nacieki z limfocytów, plazmocytów, histiocytów oraz dużej ilości komórek kwasochłonnych (ryc. 5). Nacieki o podobnym składzie otaczały naczynia w śródmózgowiu, ściany tych naczyń miały zartartą budowę. Często widoczne było przechodzenie nacieku na otaczającą tkankę nerwową (ryc. 6). Oprócz nacieków okołonaczyniowych w tkance nerwowej występowała rozlana glejoza komórkowa z licznymi grudkami glejowymi, oraz glejowo-mezodermalnymi. W niektórych naciekach okołonaczyniowych i grudkach glejowych znaleziono larwy włośni. Są one wężykowate, tępo zakończone z wyraźnym ciemnym nakrapianiem (ryc. 7, 8). Pojedyncze larwy włośni znaleziono w tkance bez nacieku (ryc. 9).

Nacieki okołonaczyniowe i grudki glejowe były umiejscowione głównie w istocie białej półkuli mózgu, zwojach podstawy, torebce wewnętrznej, nakrywce śródmózgowia, moście, istocie białej mózdzku. Liczba nacieków była mniejsza w opuszce, w rdzeniu kręgowym stwierdzono jedynie niewielki odczyn zapalny w oponach.

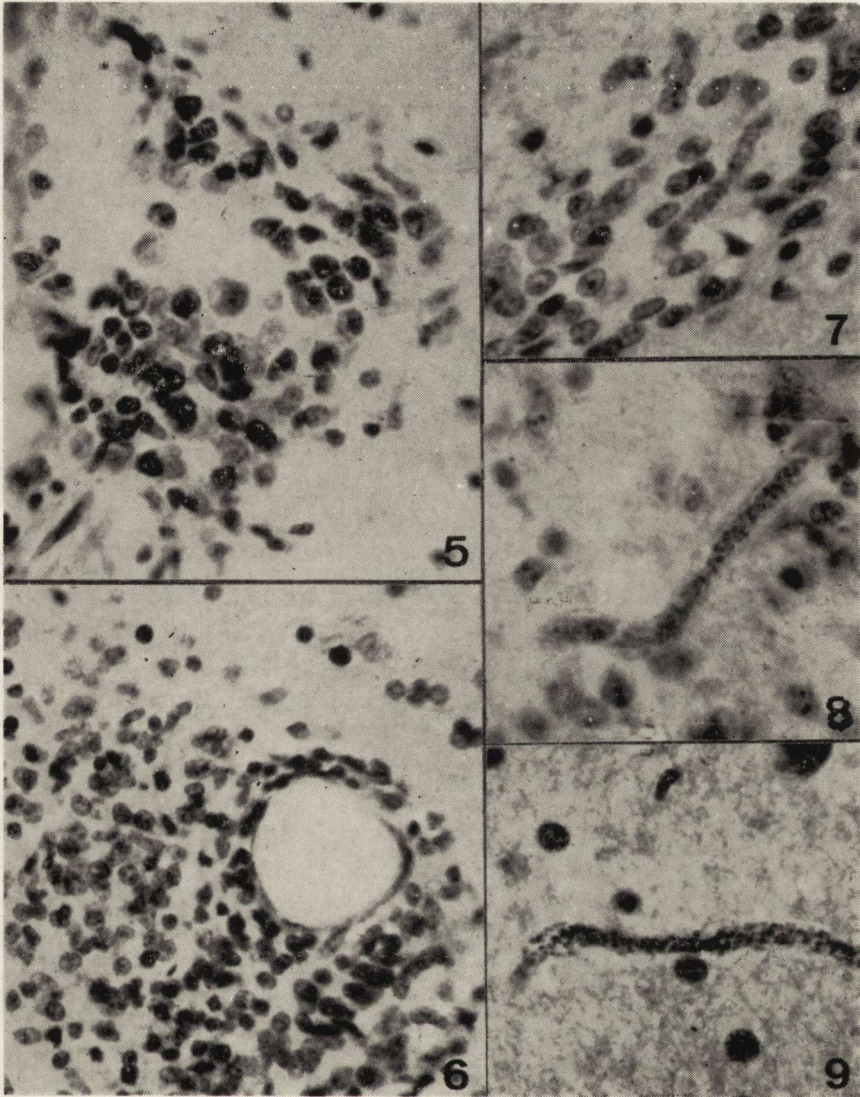
W strukturach szarych stwierdzono ponadto znaczne rozlane uszkodzenie komórek nerwowych w postaci schorzenia ciężkiego, przewlekłego, cieni komórkowych, czasami z objawami neuronofagii.

OMÓWIENIE

Objawy neurologiczne w przebiegu włośnicy występują w okresie migracji larw, tzn. między 2 a 7 tygodniem choroby. Obraz kliniczny może być bardzo różny, zależnie od zajętej okolicy ośrodkowego czy obwodowego układu nerwowego (Dowgiałło i wsp. 1963; Migdalska-Kassurowa i wsp. 1966). Dowgiałło i wsp. (1963) podają, że eozynofilia towarzyszy 97% przypadków włośnicy, w 3% przypadków o szczególnie ciężkim przebiegu i często śmiertelnym zejściu, eozynofilii nie stwierdzono. Płyn mózgowo-rdzeniowy może nie wykazywać żadnych zmian nawet w przypadkach, w których wykryto w nim larwy włośni (Dalessio i wsp. 1961).

Ryc. 5. Naciek w oponach sklepienia półkul mózgu złożony z limfocytów, plazmocytów i histiocytów. H. E. \times 400.

Fig. 5. Infiltration in meninges of cerebral convexity composed of lymphocytes, plasma cells and histiocytes. H. E. \times 400.



Ryc. 6. Naciek okołonaczyniowy rozpraszający się w tkance. Istota biała półkuli mózgu. H. E. Pow. 200 \times .

Fig. 6. Perivascular infiltration scattered towards the periphery. Cerebral white matter. H. E. \times 200.

Ryc. 7, 8. Larwy trychin otoczone grudkami mikrogleju. Istota biała półkuli mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Figs. 7, 8. Larvae of *Trichinella* surrounded by microglia nodules. Cerebral white matter. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 9. Larwa trychiny w tkance mózgu bez towarzyszącego nacieku. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 9. Larva of *Trichinella* free in cerebral tissue without any cellular reaction. Cresyl violet. \times 400.

Dość dokładne opisy neuropatologiczne włośnicy o.u.n. podali w 1926 r. Hassing i Diamond oraz w 1937 r. Most i Abeless (cyt. za Escobarem i wsp. 1972). Podobnie jak w naszym przypadku stwierdzili oni nacieki w oponach składające się z komórek limfocytarnych, plazmatycznych, fibroblastów, makrofagów i eozynofiliów. W mózgu stwierdzono dwojakiego rodzaju grudki — wyłącznie mikroglejowe bez pasożytów, oraz grudki astro- i mikroglejowe, z udziałem komórek krwiopochodnych — w tych grudkach znajdowano larwy włośni.

W naszym przypadku w grudkach zawierających trychiny przeważał mikrogleję. Trzecim elementem obrazu neuropatologicznego były nacieki okołonaczyniowe o składzie podobnym do nacieków oponowych, ale bez komórek kwasochłonnych. Nacieki te miały różne nasilenie (od pojedynczych komórek do zbitych jednorzędowych mufek), i często, tak jak w przedstawionym przypadku, przechodziły na otaczającą tkankę. W naszym przypadku nacieki dotyczyły głównie małych żył w istocie białej półkul mózgowych i mózdkowych. Obserwowano obrzęk śródbłonek naczyń otoczonych naciekiem, natomiast nie obserwowano wynaczynień czy ognisk martwicy.

Zmianom o cechach zapalenia towarzyszy na ogół znaczne uszkodzenie komórek nerwowych; opisywano uszkodzenie neuronów w otoczeniu ognisk zawierających włośnie lub, podobnie jak w naszym przypadku, zmiany rozlane w postaci opustoszeń komórkowych w korze, schorzenia ciężkiego i przewlekłego neuronów oraz cienie komórkowe z towarzyszącą satelitozą i neuronofagią.

Zmiany zapalne nie wykazują szczególnej predylekcji topograficznej. Występują one zarówno w strukturach szarych jak i białych półkul mózgowych, mózdku i pnia. W literaturze nie znaleźliśmy danych odnośnie obecności larw włośni w rdzeniu. W przedstawionym przypadku stwierdziliśmy jedynie niewielki odczyn zapalny w oponach rdzenia i niespecyficzne uszkodzenie komórek ruchowych rogów przednich rdzenia bez obecności larw.

Przedstawiając nasz przypadek chcemy zwrócić szczególną uwagę na występowanie w mózgu młodych larw włośni, których morfologia znacznie odbiega od dobrze znanego obrazu trychin w mięśniach szkieletowych. Młode larwy trychin stwierdzone w mózgu mają obły kształt, zakończone są półokrągło, ciało mają zagięte na jednym końcu lub wężykowato skręcone, nigdy jednak nie są skręcone spiralnie.

Długość larwy wynosi 100—160 μ , szerokość 6—9 μ . Cechą charakterystyczną jest ciemne nakrapianie ciała widoczne we wszystkich wykonanych przez nas barwieniach. Larwy leżące w tkance bez nacieku miały dobrze zachowaną strukturę, natomiast larwy otoczone naciekiem miały mniej wyraźną budowę, co prawdopodobnie wiąże się z ich de-

strukcją. Identyczną budowę jak larwy opisane w mózgu miały larwy znalezione przez nas w jelitach z tą różnicą, że w jelitach stwierdzono skupienia larw otoczone błoną będącą prawdopodobnie częścią macicy dorosłej samicy włośnia.

Б. Шмидт-Сидор, Д. Островска, М. Афек-Каминьска, А. Станьчык

ТРИХИНЕЛЛЕЗНЫЙ ЭНЦЕФАЛОМЕНИНГИТ

Резюме

Представлен случай воспаления мозга и оболочек в ходе трихинеллеза у 23-летней женщины. Характерной чертой было наличие молодых личинок трихин в мозгу. Строение их было иным, чем строение трихин в мышцах — они были меньше, слегка искривленными с одного конца или изогнутыми наподобие змейки, с телом, покрытым черными пятнами. Наибольшая часть личинок была окружена глиозно-мезодермальным инфильтратом, отдельные личинки лежали в неизменившейся ткани.

B. Schmidt-Sidor, D. Ostrowska, M. Afek-Kamińska, A. Stańczyk

ENCEPHALOMENINGITIS TRICHINOTICA

Summary

Reported case concerns 23-year old woman who developed encephalomeningitis in course of trichinosis. A special feature was the presence of young larvae of *Trichinella* in the brain. Larvae exhibited different structure than those found in the muscles; they were smaller, slightly curved at one end or wavy flexed, they had dark-spotted body. The majority of larvae was surrounded by glial-mesodermal infiltration, single larvae were found in unchanged tissue.

PIŚMIENNICTWO

1. Dalessio D. J., Wolff H. G.: *Trichinella spiralis*. Infection of the central nervous system. *Arch. Neurol.* 1961, 4, 407.
2. Dowgiałło M., Puciłowska K., Pawlak Z.: Dwa przypadki włośnicy ośrodkowego układu nerwowego. *Neurol. Neurochir. Psychiat. Pol.* 1963, 13, 369—371.
3. Escobar A., Nieto D.: Parasitic disease. W: *Pathology of the Nervous System*. Ed. Minckler J. McGraw-Hill Book Company, New York, 1972, vol. 3, 2518—2519.
4. Filiński W.: W sprawie zmian w ośrodkowym układzie nerwowym we włośnicy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1932, 10, 451—459.
5. Fischer W.: Die parasitären Erkrankungen des Zentralnervensystems. W: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle, Springer Verl. Berlin, 1955, 13/3, 375—378.
6. Migdalska-Kassurowa B., Obodowska-Zysk W.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu włośnicy. *Wiad. Lek.* 1966, 19, 509—513.

Adres dr B. Schmidt-Sidor: Instytut Psychoneurologiczny, Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9.

EUGENIUSZ SOSIŃSKI

GRANULOMATYCZNE ZAPALENIE MÓZGU TYPU CERVÓS-NAVARRO

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
Akademii Medycznej w Poznaniu
Kierownik: doc. dr hab. med. M. B. Kozik

Mezenchymalne pochodzenie mikrogleju warunkuje jego żywą reaktywność w różnych procesach chorobowych centralnego układu nerwowego (Bagiński, 1963; Feigin, 1969). W procesach zapalnych a zwłaszcza o domniemanej etiologii wirusowej czy immunologicznej, masywny ogniskowy rozplm komórek mikrogleju nastęrcza szereg wątpliwości w ocenie i kwalifikacji sprawy jako zapalnej czy zdecydowanie nowotworowej (Rubinstein, 1964; Osetowska, 1974). Spośród odczynów zapalnych mikrogleju Cervós-Navarro (1957) wyodrębnił jednostkę chorobową, charakteryzującą się odpowiednim obrazem histopatologicznym, jako zapalenie mózgu granulomatyczne.

Pojęcie *microgliomatosis* pod którym rozumiemy pierwotne schorzenie mikrogleju (Russel i wsp., 1948), dla poszczególnych autorów jest równoznaczne z *reticulum cell sarcoma* (Adams i wsp., 1966; Schaumburg i wsp., 1972).

Przebieg kliniczny przy ogniskowym rozplmie mikrogleju jest niecharakterystyczny, przeważnie z objawami zależnymi od umiejscowienia zmiany, rzadziej z wysuwającymi się na pierwszy plan wykładnikami wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Czas trwania schorzenia wynosi przeciętnie od kilku tygodni do kilkunastu miesięcy a niezadkie są przypadki z kilkuletnim przebiegiem (Dymecki i wsp., 1966; Schaumburg i wsp., 1972; Gruszka i wsp., 1974).

Do kręgu ogniskowych odczynów zapalnych mikrogleju wyodrębnionych przez Cervós-Navarro należy niecodzienny przypadek przedstawiony poniżej.

OPIS PRZYPADKU

Chory T.J., lat 27, przyjęty do Kliniki z powodu trwającego od 4 dni stanu padaczkowego. Z wywiadu wiadomo, że od kilku lat choruje na padaczkę i z tego powodu był kilkakrotnie leczony w szpitalu. Napady

drgawkowe pojawiają się kilkadziesiąt razy na dobę (od 50 do 80). Między napadami chory nie odzyskuje przytomności. W czasie napadu obserwuje się wyraźnie silniejsze drgawki po stronie lewej.

Napady drgawek często rozpoczynały się od lewej kończyny górnej, następnie dolnej, skręcenie gałek ocznych i głowy w stronę lewą i skurczu mięśni mimicznych twarzy po stronie lewej. Tętno 80—100/min. ciśnienie tętnicze krwi w granicach 140/90 — 120/95, temperatura 36,3—38°C.

W stanie neurologicznym stwierdzono wąskie źrenice, brak reakcji źrenic na światło, brak odruchów głębokich. Nie stwierdzono objawów ogniskowego uszkodzenia układu nerwowego. Na dnie oka naczynia żyłne szerokie, tarcza żywoczerwona, granice ostre.

Płynu mózgowo-rdzeniowego nie badano. Zdjęcia przeglądowe czaszki wykazały w okolicy ciemieniowej prawej, śródczaszkowo, dwa tuż przy sobie leżące ogniska dość litego uwapnienia, jedno o średnicy około 2 mm, a drugie 6 mm.

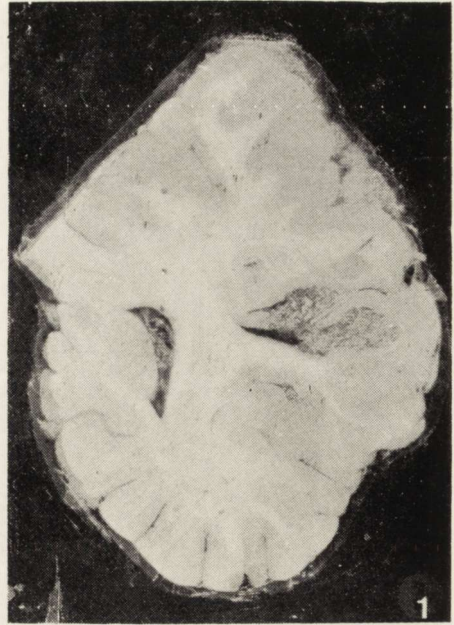
Mimo intensywnego leczenia następowało stopniowe pogarszanie się stanu ogólnego, wzrost temperatury do 42°C i w końcu ustanie czynności serca a następnie oddychania.

Badanie sekcyjne. W czasie sekcji ogólnej stwierdzono przekrwienie bierne wszystkich narządów, w naczyniach krew płynną i punkcikowate wybroczyny krwotoczne w błonie śluzowej żołądka. Ponadto ograniczone krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego i ogniskowe proste stłuszczenie wątroby. Sekcja mózgowia wykazała w obrębie płacika ciemieniowego dolnego prawej półkuli powierzchowny ubytek opon miękkich i kory o wym. 2×1 cm, krwisto podbarwiony, wypełniony szarawymi bezpostaciowymi masami. W obrębie ścian tętnic podstawy pojedyncze blaszki miażdżycowe. Na przekrojach czołowych w obrębie płacika ciemieniowego prawego widoczna była dość ostro odgraniczona tkanka, barwy szarawej, o ziarnistej powierzchni przekroju, zawierająca szczelinowatą jamkę wypełnioną galaretowatą treścią (ryc. 1). Zmiany te obejmowały zarówno korę płacika ciemieniowego jak również i istotę białą podkorową. Podobne nieco mniejsze ogniska występowały w korze zakrętu skroniowego górnego.

Badanie mikroskopowe. W obrębie zmian widocznych makroskopowo stwierdzono rozległy gęstokomórkowy naciek, obejmujący zarówno korę jak i istotę białą oraz częściowo opony przylegające do kory. Naciek składał się z 3 rodzajów komórek. Najliczniej występowały komórki z jasnymi, pęcherzykowatymi jądrami okrągłego i wydłużonego kształtu. Jądra z wyraźną błoną jądrową, zawierały kilka grudek chro-

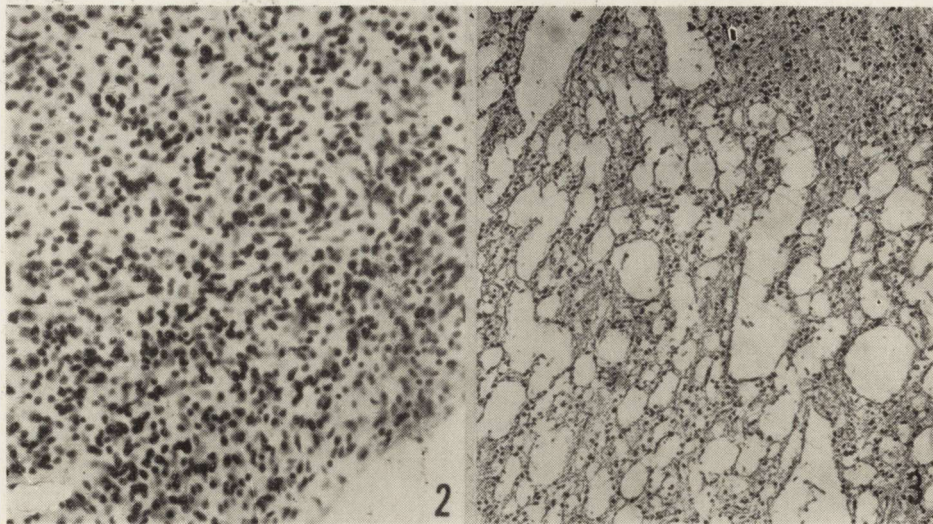
Ryc. 1. Przekrój czołowy przez prawą półkulę. Naciek w płaciku ciemieniowym dolnym ze szczelinowatą przestrzenią wypełnioną galaretowatą treścią.

Fig. 1. Frontal section of right hemisphere. Infiltrated inferior parietal lobe contains a fissure filled with gelatinous substance.



matyny i 1—2 jąderka. W metodzie impregnacyjnej (Kelemen, 1973) komórki te bardzo rzadko uwidaczniały wąski rąbek cytoplazmy. Mniej licznie występowały komórki z okrągłymi, ciemnymi jądrami o gęstej chromatynie i niewidocznej cytoplazmie, podobne do limfocytów (ryc. 2). Najrzadziej spostrzegano duże komórki o pęcherzykowatych, przeważnie okrągłych jądram z drobnoziarnistą, rozproszoną chromatyną i dość obfitą słabo eozynofilną cytoplazmą. Ponadto występowały nieliczne komórki plazmatyczne oraz komórki żerne. Miejscami nacieki te tworzyły ogniskowe zagęszczenia, a miejscami wśród wspomnianych komórek obserwowano małe jamiste przestrzenie (ryc. 3). Zwraçało ponadto uwagę wyraźne zagęszczenie komórek wokół drobnych naczyń, szczególnie dobrze widoczne na obwodzie ognisk lub w obszarach o mniejszym skupieniu elementów komórkowych. W tych okolicach komórki tworzyły rozetowate lub promieniste układy okołonaczyniowe (ryc. 4). Na obwodzie zmian naciekowych spostrzegano liczne przerosłe astrocyty oraz delikatną glejową włóknistą.

W oponach miękkich objętych naciekiem przeważały komórki o wydłużonych kształtach z pałeczkowatymi, jasnymi jądrami i niewybarwiającej się cytoplazmie. Odpowiadały one pałeczkom mikrogleju. Drugi obfity komponent w oponach stanowiły komórki o owalnych lub okrągłych hyperchromatycznych jądram i wąskiej obwódce cytoplazmy (ryc. 5). Występowały tu także nieliczne komórki wielojądrzaste o ską-

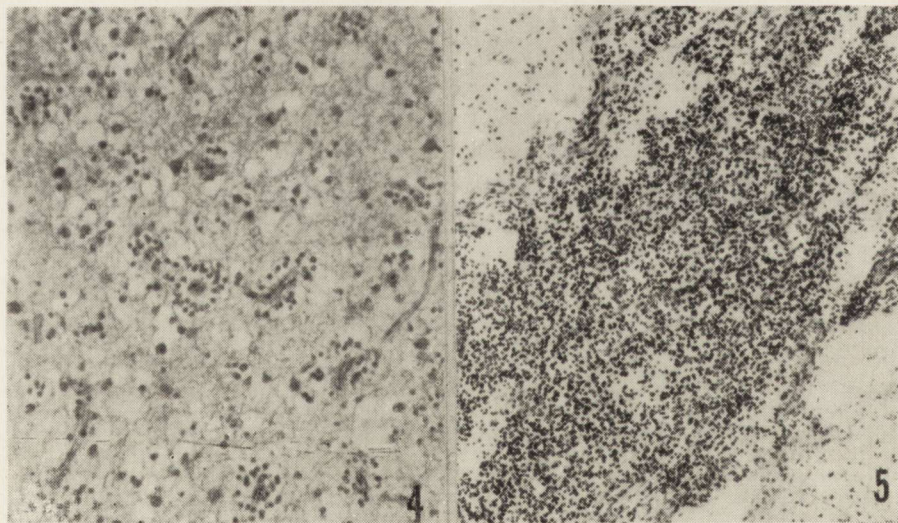


Ryc. 2. Naciek komórek drobnoziarnistych w korze płacika ciemieniowego dolnego. H. E. Pow. 130 \times .

Fig. 2. Cortical infiltration of inferior parietal lobule composed of small granular cells. H. E. \times 130.

Ryc. 3. Drobne jamiste przestrzenie w obrębie nacieku komórkowego. H. E. Pow. 80 \times .

Fig. 3. Small cystic spaces among cellular infiltration. H. E. \times 80.



Ryc. 4. Okołonaczyniowy układ komórek na obrzeżu nacieku. H. E. Pow. 80 \times .

Fig. 4. Perivascular arrangement of cells at the periphery of infiltration. H. E. \times 80

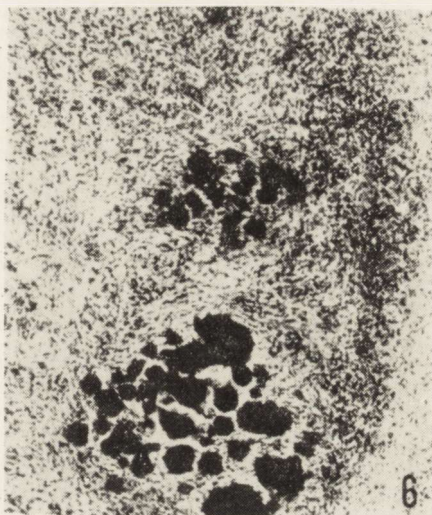
Ryc. 5. Naciek w oponach miękkich. H. E. Pow. 80 \times .

Fig. 5. Infiltration of leptomeninges. H. E. \times 80.

pej, słabo wybarwiającej się cytoplazmie oraz komórki żerne. Ponadto w części centralnej nacieku opon miękkich stwierdzono drobne ogniska zwapnień (ryc. 6).

Ryc. 6. Ogniska zwapnień w oponach miękkich objętych naciekiem. H. E. Pow. 80

Fig. 6. Foci of calcification in the infiltrated leptomeninges. H. E. $\times 80$.



OMÓWIENIE

Granulomatyczne zapalenie mózgu wyodrębnione przez Cervós-Navarro (1957), a następnie opisane przez Osetowską (1966) charakteryzuje się występowaniem pojedynczego ogniska lub zmian nieciągłych o charakterze wyspowym. W przypadku procesu wielogniskowego zajęte są głównie okolice przykomorowe, podwzgórze, lejek i komora IV. Dalszą cechą jest nieostre odgraniczenie zmian, z rozpraszaniem się nacieku na obwodzie i wyjście z okolic okołonaczyniowych mózgu. Zmiany występują wyłącznie w mózgu, brak natomiast zmian układowych poza ośrodkowym układem nerwowym. W obrazie mikroskopowym na plan pierwszy wysuwają się komórki o jasnym pęcherzykowatym jądrze z wyraźną błoną jądrową, drobnogrudkową chromatyną i wąskim rąbkiem cytoplazmy. Wywodzą się one z układu siateczkowo-śródbłonkowego. Obok tych komórek występują nacieki złożone z komórek limfocytarnych, plazmatycznych, nielicznych komórek olbrzymich i wielojądrazystych. Naciekom tym towarzyszyła obfita domieszka włókien retikuliny.

Pojęcie *microgliomatosis* zostało wprowadzone w 1948 r. przez Dorothy Russel. *Microgliomatosis* charakteryzuje się okołonaczyniowymi naciekami złożonymi z komórek nieregularnego kształtu, zawierających ciemne, okrągłe lub owalne jądra z nielicznymi figurami mitotycznymi oraz pojedynczych komórek olbrzymich wielojądrzastych. Mało jest natomiast włókien retikuliny.

W świetle doniesień Adamsa i wsp. (1966), Fishera (1969) i Schaumburga i wsp. (1972), przypadki w których występuje różna ilość włókien retikuliny, brak lub słabe wysrebrzenie się cytoplazmy komórek w naciekach w mózgowiu, niezależnie od istniejących zmian układowych, traktowane są jako *reticullumcell sarcoma*.

W przedstawionym przypadku polimorfizm komórkowy, umiejscowienie nacieków i ich wyspowy charakter, odpowiada kryteriom stawianym przez Cervós-Navarro (1957) i Osetowską (1966) dla zapalenia granulomatycznego mózgu. Do cech wyróżniających powyższy przypadek od przedstawionych w dostępnym piśmiennictwie, należy widoczna makroskopowo szczelinowata jama wypełniona galaretowatą treścią oraz drobne, jamiste przestrzenie widoczne mikroskopowo w poszczególnych ogniskach nacieku.

Naciekanie opon miękkich, ogniska zwapnień oraz występowanie komórek żernych, wzbogacają obraz morfologiczny granulomatycznego zapalenia mózgu typu Cervós-Navarro.

E. Сосиньски

ГРАНУЛОМАТОЗНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ МОЗГА ТИПА СЕРВОС-НАВАРРО

Резюме

Представлен случай 27-летнего пациента, который умер во время эпилептического припадка.

В мозгу обнаружены воспалительные инфильтраты, занимающие кору и белое подкорковое вещество нижней теменной доли, а также верхней височной извилины правого полушария. Инфильтраты островкового характера связывались между собой краями. Клеточный состав инфильтратов, а также их локализация позволили отнести этот случай к категории грануломатозного воспаления мозга типа Сервос-Наварро. Морфологическую картину этой болезни в представленном случае дополняют инфильтраты мягких оболочек, очаги кальцификации, а также наличие фагоцитов.

E. Sosiński

GRANULOMATOUS ENCEPHALITIS OF CERVÓS-NAVARRO TYPE

Summary

Presented is the case of 27-year old patient who passed away during status epilepticus.

Inflammatory infiltration occupied the cortex and white subcortical matter of inferior parietal lobule and of superior temporal gyrus of the right cerebral hemisphere. Infiltrations had an insular character and were connected at their margins. Cellular composition of infiltrations and their localization permit to diagnose a granulomatous encephalitis of Cervós-Navarro type. Morphological picture of this entity is enriched in demonstrated case by infiltration of leptomeninges, foci of calcification and the presence of macrophages.

PISMIENNICTWO

1. Adams J. H., Jackson M.: Intracerebral tumors of reticular tissue. The problem of microgliomatosis and reticuloendothelial sarcomas of the brain. *J. Path. Bact.* 1966, 91, 369—383.
2. Bagiński S.: Histofizjologia neurogleju. *Neuropat. Pol.* 1963, 2, 167—188.
3. Cervós-Navarro J.: Beitrag zur Cytopathologie der Entzündung in ZNS. III-e Congres International de Neuropathologie Bruxelles. *Acta Med. Belg.* 1957, 161—166.
4. Dymecki J., Wald I., Gadomska B.: Granulomatous encephalitis with multifocal demyelination. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, Supl. 729—734.
5. Feigin J.: Presidential address. Mesenchymal tissues of the nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1969, 28, 6—24.
6. Fisher D., Mantell B. S., Ulrich H.: The clinical diagnosis and treatment of microgliomatosis: report of a case. *J. Neurosurg. Psychiat.* 1969, 32, 474—478.
7. Gruszka A., Brzecki A., Hulanicka K.: Zapalenie mózgu granulomatyczne typu Cervós-Navarro a microgliomatosis. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 63—68.
8. Kelemen J.: Neue Möglichkeiten der Darstellung der Mikroglia in Gefrier-Paraffin- und Celloidinschnitten. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1973, 23, 254—259.
9. Osetowska E.: Modalites et significations des reactions encephalitiques du type granulomateux. *J. Neurol. Sci.*, 1966, 3, 382—398.
10. Osetowska E.: Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych, PZWL, Warszawa, 1974, 203—216.
11. Rubinstein L. J.: Microgliomatosis. Classifications of brain tumours. *Acta Neurochir., Suppl.*, X, Springer-Verlag Viena, 1964, 200—211.
12. Russel D., Marshal A. H., Smith F. B.: Microgliomatosis; A form of reticulosis affecting the brain. *Brain*, 1948, 71, 1—15.
13. Schaumburg H. H., Plank C. R., Adams R. D.: The reticulum cell sarcoma — microglioma group of brain tumours. A consideration of their clinical features and therapy. *Brain*, 1972, 95, II, 199—212.

Adres autora: Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Akademii Medycznej, 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

ANDRZEJ SZUTOWICZ

FIZJOLOGICZNA ROLA LIAZY CYTRYNIANOWEJ
ATP-ZALEŻNEJ W BIOSYNTYZIE ACETYLOCHOLINY
I KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MÓZGU SZCZURA

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Zakład Biochemii Klinicznej Instytutu Patologii AM w Gdańsku

Kierownik: prof. dr hab. S. Angielski

Acetylocholina jest jedną z substancji przekąźnikowych układu nerwowego. Synteza acetylocholin odbywa się głównie w cytoplazmie cholinergicznym zakończeń presynaptycznych (synaptosomów). Reakcję syntezy acetylocholin z acetylo-CoA i cholin katalizuje specyficzny enzym układu cholinergicznego — acetylotransferaza cholinowa (EC 2.3.1.6.) (Hebb 1972). Stwierdzono, że glukoza oraz końcowy produkt glikolizy pirogronian są głównymi prekursorami reszt acetylo-CoA do syntezy acetylocholin i kwasów tłuszczowych w dorosłym mózgu (Tuček, Cheng 1974). Acetylo-CoA powstaje jednak w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę pirogronianową (EC 1.2.4.1.) wewnątrz mitochondriów, których błona jest nieprzepuszczalna dla tego metabolitu. Dlatego też acetylo-CoA może być transportowany do cytoplazmy za pośrednictwem metabolitów zdolnych penetrować błonę mitochondrialną, takich jak cytrynian, octan lub acetylokarnityna (Srere 1965). Znane są również enzymy katalizujące reakcje regeneracji acetylo-CoA w cytoplazmie. Jednym z nich jest liaza cytrynianowa ATP zależna (EC 4.1.3.8.) katalizująca reakcję rozbicia cytrynianu wg wzoru: $MgATP^{2-} + \text{cytrynian} + CoA \rightarrow MgADP^1 + Pi + \text{acetylo-CoA} + \text{szczawiooctan}$.

W wątrobie, tkance tłuszczowej i gruczołach mlecznych wymienione mechanizmy transportu acetylo-CoA, jak również współzależności pomiędzy nimi, są dobrze poznane i udokumentowane. W mózgu jednak wykazano, że przy preferencyjnym wbudowywaniu glukozy i pirogronianu do acetylocholin, potencjalne przENOŚniki reszty acetylowej wbudowywały się bardzo słabo do puli tego neurotransmitera (Tuček, Cheng 1974). Dane te są zgodne z innymi wykazującymi, że aktywności liazy cytrynianowej i syntetazy acetylo-CoA (EC 6.2.1.1.) w mózgu są tak niskie, że nie są w stanie zapewnić adekwatnej do potrzeb syntezy acety-

io-CoA w cytoplazmie (Tuček 1967a, b). Karnityna z kolei hamowała biosyntezę acetylocholinę z pirogronianu. Nie znaleziono, jak dotąd, żadnego innego mechanizmu transportu reszt acetylowych do syntezy acetylocholinę. Z drugiej jednak strony wykazano, że cytrynian i octan bardzo dobrze wbudowują się do lipidów w mózgu, co z kolei byłoby sprzeczne z niską aktywnością omawianych enzymów (D'Adamo, D'Adamo 1968; Tuček, Cheng 1974).

Celem mojej pracy było wyjaśnienie tych rozbieżności poprzez: a) szczegółowe zbadanie lokalizacji subkomórkowej liazy cytrynianowej w mózgu szczura i innych zwierząt, b) oznaczenie jej aktywności w różnych rejonach mózgu i w różnych stadiach rozwoju osobniczego, c) porównanie lokalizacji i aktywności liazy z lokalizacją i aktywnościami innych enzymów metabolizmu acetylo-CoA, biosyntezy acetylocholinę i kwasów tłuszczowych, d) oznaczenie parametrów kinetycznych liazy, e) zbadanie roli liazy w metabolizmie pirogronianu w synaptozomach.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na dorosłych szczurach płci męskiej, rasy Wistar o wadze 200 — 250 g i świnkach morskich o wadze ok. 500 g. Doświadczenia dotyczące zachowania liazy cytrynianowej w rozwoju osobniczym wykonano na szczurach rasy Wistar w wieku od 0 do 20 dni i zarodkach kurzych rasy Leghorn.

Dane dotyczące metodyki: a) izolacji frakcji subkomórkowych mózgu, b) oczyszczania i badań kinetycznych liazy cytrynianowej, c) oznaczeń aktywności enzymów, d) oznaczeń poziomu substratów podano w pracach Szutowicza i wsp. (1974 a, b, 1975, 1976 a, b, 1977).

WYNIKI I DYSKUSJA

Wykazano, że aktywność liazy cytrynianowej w homogenacie mózgu szczura wynosi 30,7 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki, a aktywność syntetazy acetylo-CoA 18,9 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki. Wartości te są odpowiednio 20 i 10 razy wyższe od podawanych w literaturze (Tuček 1967a b). Są one przy tym kilkakrotnie wyższe od aktywności acetylotransferazy cholinowej, wynoszącej 7,4 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki. Niskie aktywności tych enzymów, o których donoszono w poprzednich pracach, wynikają ze stosowania procedury przygotowawczej powodującej inhibicję tych enzymów, oraz warunków inkubacji nie zapewniających właściwego pomiaru powstających produktów reakcji (Reinierse i wsp. 1975). Aktywność liazy jest niższa od aktywności dehydrogenazy pirogronianowej (74,4 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki) i syntazy cytrynianowej (EC 4.1.3.7.) (3900 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki).

Aktywności innych enzymów biosyntezy alternatywnych przenośników reszt acetylowych są natomiast dużo niższe od aktywności syntazy cytrynianowej. I tak aktywność hydrolazy acetylo-CoA (EC 3.1.2.1.) była równa 21.2 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki, a acetylotransferazy karnitynowej (EC 2.3.1.7.) 157 $\mu\text{moli/godz/tkanki}$. Wskazuje to, że droga transportu acetylo-CoA za pośrednictwem cytrynianu może spełniać istotną rolę w mózgu pod warunkiem, że: a) aktywność liazy *in vivo* nie jest hamowana przez ewentualne fizjologiczne inhibitory, b) znajduje się w odpowiedniej ilości w kompartmentcie gdzie odbywa się biosynteza acetylocholin, c) mitochondria synaptyczne są zdolne zsyntetyzować i wydzielić do synaptoplazmy dostateczne ilości cytrynianu.

Badania kinetyczne oczyszczonych preparatów liazy cytrynianowej z mózgu szczura (Szutowicz i wsp. 1974 a, 1975) wykazały, że istnieją dwie formy molekularne tego enzymu o wysokim ($K_{m1} = 0.13 \text{ mM}$) i o niskim ($K_{m2} = 2.5 \text{ mM}$) powinowactwie do cytrynianu i o podobnym powinowactwie do MgADP^{2-} ($K_m = 0,40 \text{ mM}$) i CoA ($K_m = 0,0007 \text{ mM}$). Produkty reakcji MgADP^{1-} i Pi okazały się inhibitorami liazy kompetytywnymi w stosunku do MgATP^{2-} . Również niektóre kwasy organiczne, takie jak izocytrynian, cis-akonitan, α -katoglutaran i pirogronian wykazywały słabe działanie inhibicyjne ($K_i = 4.8 - 45 \text{ mM}$). Porównanie tych parametrów kinetycznych liazy z wartościami stężeń odpowiednich metabolitów w mózgu wskazuje, że enzym ten *in vivo* działa przy nasycających stężeniach ATP i CoA, a stężenia jego potencjalnych inhibitorów są zbyt niskie by istotnie hamowały jego aktywność. Stężenie cytrynianu w mózgu (0.2 mM) (Angielski i Szutowicz 1967) jest zbliżone do wartości K_{m1} i kilkunastokrotnie niższe od K_{m2} . Wskazuje to, że czynnikami regulującymi aktywność liazy cytrynianowej *in vivo* byłyby: stężenie enzymu w tkance oraz dostępność cytrynianu.

Badania subkomórkowej lokalizacji liazy cytrynianowej różnych gatunków zwierząt (szczur, świnka morska, kurczak) wykazały, że jest ona preferencyjnie zlokalizowana w cytoplazmie synaptosomalnej, a więc w kompartmentcie, w którym odbywa się biosynteza acetylocholin (Szutowicz i wsp. 1976 a, d, Fonnum 1957). Względna aktywność specyficzna tego enzymu w synaptoplazmie jest około 2.5 razy wyższa niż w homogenacie lub cytolozu z perikarionów komórek nerwowych i glejowych (S_3). Świadczy to o tym, że aktywność liazy jest wyższa w neuronach niż w glejocytach i prawdopodobnie wyższa w synaptoplazmie niż w cytoplazmie ciała neuronu. Aktywność całkowita liazy w synaptosomach mózgu szczura (6.4 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki) jest 2.5 razy wyższa niż aktywność acetylotransferazy cholinowej 2,6 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki). i Drugi enzym resyntezy acetylo-CoA syntetaza acetylo-CoA jest zlokalizowana

głównie w mitochondriach glejocytarnych. Jej aktywność specyficzna w synaptozolu jest czterokrotnie niższa niż w cytoplazmie (S_3), a aktywność całkowita w synaptozomach ($1,4 \mu\text{mola/godz/g}$ tkanki) niemal dwukrotnie niższa niż aktywność acetylotransferazy cholinowej (tabela 1). Acetylotransferaza karnitynowa jest w 96% związana z mitochondriami, co zgodne jest z mechanizmem jej działania (Srere 1965). Aktywność tego enzymu ($28 \mu\text{moli/godz/g}$ tkanki) w synaptozomach jest co prawda ponad 4 razy wyższa niż aktywność liazy, jednak jej udział w transporcie acetylo-CoA może być ograniczony przez bardzo wysoką aktywność syntazy cytrynianowej ($600 \mu\text{moli/godz/g}$ tkanki). Wydaje się więc, że przy dobrej, w warunkach fizjologicznych, podaży szczawiooctanu w mózgu, mitochondrialny acetylo-CoA będzie metabolizowany głównie do cytrynianu (Łysiak i wsp. 1976).

Należy jednak pamiętać, że tylko około 10% puli synaptozomów mózgu (bez mózdzku) stanowią synaptozomy cholinergiczne (Iversen, Schon 1973), skupiające całą aktywność acetylotransferazy cholinowej. Dla syntezy acetylocholin istotna jest tylko aktywność enzymów transportu acetylo-CoA, zlokalizowana w synaptozomach cholinergicznych. Do obliczenia ich zawartości w tym typie synaptozomów posłużono się faktem, że mózdzek ma znikomą, praktycznie pomijalną w obliczeniach ilość zakończeń cholinergicznych (Kuhar i wsp. 1973). W związku z tym powinien on różnić się do mózgu aktywnością acetylotransferazy cholinowej i tego enzymu, który spełnia istotną rolę w transporcie reszt acetylo-CoA do syntezy acetylocholin (przy założeniu, że metabolizm podstawowy jest w różnych typach neuronów podobny).

Aktywność dehydrogenazy pirogronianowej, syntetazy cytrynianowej, syntetazy acetylo-CoA, hydrolazy acetylo-CoA, acetylotransferazy karnitynowej w mózdzku i w mózgu nie różniły się istotnie. Stąd też można obliczyć, że tylko 10% ich aktywności we frakcji synaptozomalnej będzie zlokalizowane w synaptozomach cholinergicznych (tabela 1). Aktywności acetylotransferazy cholinowej w mózgu ($1,3 \text{ nmola/min/mg}$ białka) i liazy cytrynianowej ($6,2 \text{ nmola/min/mg}$ białka) były odpowiednio 13 i 2,5 raza wyższe niż w mózdzku (odpowiednio $0,1$ i $2,4 \text{ nmoli/min/mg}$ białka). Z danych tych można wyliczyć, że tylko 40% aktywności liazy będzie zlokalizowane w synaptozomach niecholinergicznych mózgu a 60% w cholinergicznych. Tak więc obliczone aktywności całkowite poszczególnych enzymów w synaptozomach cholinergicznych wynoszą odpowiednio: dla dehydrogenazy pirogronianowej $0,96$; syntazy cytrynianowej $60,0$; hydrolazy acetylo-CoA $0,43$; acetylotransferazy karnitynowej $2,8$; syntetazy acetylo-CoA $0,15$; liazy cytrynianowej $3,9$ i acetylotransferazy cholinowej $2,6 \mu\text{mola/godz/g}$ tkanki (tabela 1). Dane te wskazują na ścisły

Tabela 1. Aktywności enzymów metabolizujących acetylo-CoA we frakcjach subkomórkowych mózgu szczura

Table 1. The activities of enzymes of acetyl-CoA metabolism in subcellular fractions of rat brain

Enzym Enzyme	Homogenat Homogenate	Synaptozomy Synaptosomes	Synaptozomy*) cholinergiczne Cholinergic synap- tosomes
	μmole/godz/g tkanki μmoles/h/g of tissue		
Dehydrogenaza pirogronianowa Pyruvate dehydrogenase	74,4 ± 4.9	9.6	0.96
Syntaza cytrynianowa Citrate synthase	3900 ± 200	600	60.0
Hydrolaza acetylo-CoA Acetyl-CoA hydrolase	21.2 ± 3.9	4.3	0.43
Acetylotransferaza karnitynowa Carnitine acetyltransferase	157 ± 2.0	28.0	2.80
Liaza cytrynianowa ATP-zależna ATP-citrate lyase	30.7 ± 3.3	6.4	3.90
Syntetaza acetylo-CoA Acetyl-CoA synthetase	18.9 ± 1.1	1.4	0.14
Acetylotransferaza cholinowa Choline acetyltransferase	7.4 ± 0.8	2.6	2.60

Podane liczby są wartościami średnimi z 3—7 pomiarów ± średni błąd średniej (SEM). Względne wartości rozrzutu wyników w synaptozomach są podobne jak w homogenatach. The values are means from 3—7 experiments ± standard error of mean (SEM).

Relative values of SEM in synaptosomes are similar to those in homogenate.

*) Wartości wyliczone.

*) Values calculated.

związek liazy cytrynianowej z układem cholinergicznym. Niska w porównaniu z acetylotransferazą cholinową, aktywność dehydrogenazy pirogronianowej może tłumaczyć stwierdzoną przez innych badaczy wrażliwość syntezy acetylocholin na inhibicję tego enzymu w mózgu (Gibson i wsp. 1975).

Wiadomym jest, że cytrynian poprzez reakcję liazy cytrynianowej dostarcza reszty acetylowe do syntezy lipidów w mózgu (D'Adamo, D'Adamo 1968). W rozwijającym się mózgu, aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych obniżyła się o około 65% (z 2.1 do 0.7 nmola/min/mg białka), a aktywność acetylotransferazy wzrastała kilkunastokrotnie (z 0,11 do 1.3 nmola/min/mg białka). Przedstawione zmiany aktywności tych enzymów są skorelowane, ze zmniejszeniem szybkości biosyntezy kwasów tłuszczowych i zwiększeniem szybkości biosyntezy acetylocholin w róż-

wijającym się mózgu (D'Adamo, D'Adamo 1968, Patel, Tonkonow 1974). W mózdzku natomiast aktywność acetylotransferazy cholinowej nie ulegała zmianie (0.19—0.14 nmola/min/mg białka), a aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych obniżała się podobnie jak w mózgu. Aktywności liazy cytrynianowej w mózgu i w mózdzku nowonarodzonych szczurów były podobne (7.9 i 7.2 nmola/min/mg białka). Podczas dojrzewania aktywność tego enzymu w mózgu nie uległa istotnej zmianie (spadek o 15%), w mózdzku natomiast obniżyła się o 65%. Tę różnicę w spadku aktywności liazy między dojrzewającym mózgiem i mózdzkami można więc przypisać różnicom w rozwoju układu cholinergicznego w obu częściach mózgowia.

Przedstawione dane wskazują, że reakcja liazy cytrynianowej w synaptozomach cholinergicznym nie stanowi etapu ograniczającego szybkość syntezy acetylocholin, pod warunkiem, że mitochondria synaptyczne będą w stanie zsyntetyzować adekwatne ilości cytrynianu z pirogronianu jako substratu. Z kolei aktywacja liazy w synaptoplazmie powinna spowodować spadek a jej inhibicja wzrost szybkości akumulacji cytrynianu. W celu sprawdzenia tej hipotezy, opracowano własną metodykę izolacji frakcji synaptozomalnej, nie zawierającej zanieczyszczeń mitochondriami glejowymi, opartą na flotacji frakcji surowych mitochondrii przez nieciągły gradient ficollu w mannitolu. Wykazano, że głównymi produktami przemiany pirogronianu z jabłczanem w synaptozomach były cytrynian i α -ketoglutaran. Aktywacja liazy przez $MgATP^{2-}$ powodowała spadek szybkości akumulacji cytrynianu z 2.6 do 0.5 nmola/min/mg białka. Z kolei 100% inhibicja zaktywowanej liazy przez jej specyficzny inhibitor, (—)hydroksycytrynian (Szutowicz i in. 1976 b), powodowała 3.5-krotny wzrost szybkości akumulacji cytrynianu do 1.8 nmola/min/mg białka (Szutowicz i wsp. 1976 c, 1977). Dodanie hydroksycytrynianu nie wpływało na szybkość akumulacji cytrynianu w mitochondriach glejowych, zawierających jedynie śladową aktywność liazy cytrynianowej. Wzrost szybkości akumulacji cytrynianu o 1.3 nmola/min/mg białka, po podaniu hydroksycytrynianu do synaptozomów, jest miarą maksymalnej wydajności drogi metabolicznej liazy cytrynianowej w wytwarzaniu synaptoplazmatycznego acetylo-CoA z pirogronianu. Wartość ta jest 8 razy większa od maksymalnej zdolności synoptozomów do syntezy acetylocholin, wynoszącej 0.15 nmola/min/mg białka (Guyenet 1975). Wynika z tego, że wydajność drogi liazy cytrynianowej zapewnia adekwatną do potrzeb podaż cytoplazmatycznego acetylo-CoA.

Dane przedstawione w pracy wykazały więc:

- a) wysoką aktywność liazy cytrynianowej w mózgu szczura,
- b) preferencyjną lokalizację liazy w synaptoplazmie, jak również:

- c) w rejonach mózgu bogatych w neurony cholinergiczne,
- d) zależność aktywności liazy od zmiennego zapotrzebowania, rozwijającego się mózgu na reszty acetylowe,
- e) jej istotną rolę w metabolizmie cytrynianu powstającego z pirogrogianu w synaptozomach.

Pozwalają one postulować, że liaza cytrynianowa może spełniać istotną rolę w transporcie reszt acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy w różnych kompartmentach mózgu, a w szczególności w kompartmentcie cholinergicznym.

PIŚMIENNICTWO

1. Angielski S., Szutowicz A.: Tissue content citrate and citrate cleavage enzyme activity during starvation and refeeding. *Nature*, London, 1967, 213, 1252—1253.
2. D'Adamo A. F., D'Adamo A. P.: Acetyl transport mechanisms in the nervous system. The oxoglutarate shunt and fatty acid synthesis in the developing brain. *J. Neurochem.* 1968, 15, 315—323.
3. Gibson G. E., Jope R., Blass J. P.: Decreased synthesis of acetylcholine accompanying impaired oxidation of pyruvic acid in rat brain minces. *Biochem. J.* 1975, 148, 17—23.
4. Guyenet P. G., Lefresne P., Beaujouan J. C., Glowinski J.: The role of newly taken up choline in the synthesis of acetylcholine in rat striatal synaptosomes. In „Cholinergic Mechanisms” (ed. Waser P. G.), Raven Press, New York, 1975, pp. 137—144.
5. Hebb C.: Biosynthesis of acetylcholine in nervous system. *Physiol. Rev.* 1972, 52, 918—956.
6. Iversen L. L., Schon F. C.: The use of radiographic techniques for the identification and mapping of transmitter specific neurons in CNS. In „New Concepts in Neurotransmitters Regulation” (ed. Mandel A. J.), Plenum Press, New York, 1973, pp. 153—193.
7. Kuhar M. J., Sethy V. H., Rothe R. H., Agajanian G. K.: Choline: selective accumulation by central cholinergic neurones. *J. Neurochem.* 1973, 20, 581—593.
8. Łysiak W., Szutowicz A., Angielski S.: Pyruvate metabolism in rat brain mitochondria. *Acta Biochim. Polon.* 1976, 23, 325—333.
9. Patel M. S., Tonkonow B. L.: Development of lipogenesis in rat brain cortex, the differential incorporation of glucose and acetate into brain lipids in vitro. *J. Neurochem.* 1974, 23, 309—313.
10. Srere P. A.: The molecular physiology of citrate. *Nature*, London, 1965, 205, 766—770.
11. Reinierse L. A., Weldstra H., Van den Berg C. J.: Short-chain fatty acid synthases in brain. *Biochem J.* 1975, 152, 477—484.
12. Szutowicz A., Frazier W. A., Bradshaw R. A.: Subcellular localization of nerve growth factor receptors. Thirteen-day chick embryo brain. *J. Biol. Chem.* 1976 a, 251, 1516—1523.
13. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S.: The role of ATP-citrate: oxaloacetate lyase in synaptosomal metabolism of pyruvate. *Abstr. First Meet. Europ. Soc. Neurochem. Bath, England.* 1976 c, p. 86 P.

14. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S.: Enzymy metabolizmu acetylo-CoA w mózgu szczura i świnki morskiej. Streszcz. ref. XI Dzień Neurochem. Klin., Zielona Góra 1976 d, str. 7.
15. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S.: The effect of (—)hydroxycitrate on pyruvate metabolism in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 1977, (w druku).
16. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S.: The activity of ATP-citrate: oxaloacetate lyase from rat brain and liver under various physiological conditions. *Acta biochim. Polon.* 1974 r. 21, 331—338.
17. Szutowicz A., Stępień M., Angielski S.: The inhibition of rat brain ATP-citrate oxaloacetate lyase by l-glutamate. *J. Neurochem.* 1974 b. 22, 85—91.
18. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S.: Purification and kinetic properties of ATP-citrate: oxaloacetate lyase from rat brain. *J. Neurochem.* 1975, 25, 11—20.
19. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S.: Effect of (—)hydroxycitrate on the activities of ATP citrate lyase and the enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *Acta biochim. Polon.* 1976 b, 23, 227—234.
20. Tuček S.: Subcellular distribution of acetyl-CoA synthase, ATP-citrate lyase, citrate synthase, choline acetyltransferase, fumarate hydrolase and lactate dehydrogenase in mammalian brain tissue. *J. Neurochem.* 1967 a, 14, 519—529.
21. Tuček S.: Use of choline acetyltransferase for measuring the synthesis of acetyl-cenzyme A and its release from brain mitochondria. *Biochem. J.* 1967 b, 104, 749—756.
22. Tuček S., Cheng S. C.: Provenance of the acetyl group of acetylcholine and compartmentation of acetyl-CoA and Krebs cycle intermediates in rat brain *in vivo*. *J. Neurochem.* 1974, 22, 893—914.

Adres autora: Zakład Biochemii Klinicznej Instytutu Patologii AM, 80-211 Gdańsk, Dębinki 7.

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 przesyłać 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 zestawienie 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.

T R E Ś Ć

M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska, J. Różga, R. Paluszkiewicz: Wpływ α -oksooglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym	317
Z. Kraśnicka: Wpływ surowicy od chorych z zespołem mocznicowym, mocznika i kreatyniny na organotypową hodowlę tkanki nerwowej	327
K. Renkawek: Synteza DNA w procesie dojrzewania i wzrostu komórek glejowych w hodowli organotypowej mózdzku szczura <i>in vitro</i>	341
A. Krygier-Stojałowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowacki, K. Honczarenko: Ilość DNA w komórkach nerwowych i glejowych mózgu człowieka oznaczana metodą cytofotometryczną. Doniesienie wstępne	349
H. Kroh: Aktywność fosfatazy zasadowej w mózgu myszy w różnych okresach życia pozapłodowego i po zastosowaniu etylnitrozomocznika (ENU) w okresie płodowym	357
Z. Zalewska, B. Wolna, D. Sitkiewicz, W. Bicz: Wpływ dichlorofosu na aktywność niektórych układów enzymatycznych mózgu szczura podczas rozwoju osobniczego. II. Oksydoreduktazy	367
M. Rossowska, Z. Dąbrowiecki: Wpływ hipoksji i ischemii na aktywność fosfataz we frakcji błon komórkowych mózgu świnki morskiej	373
M. Ostenda, R. Gadamski: Obraz ultrastrukturalny złącza naczyniowo-tkanekowego w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu u kotów	381 ✓
R. Gadamski, M. Ostenda, G. Szumańska: Obraz mikroskopowo-elektronowy zakończeń nerwowych oraz zachowanie się amin katecholowych we wczesnym doświadczalnym obrzęku mózgu u kota	395 ✓
E. Osetowska, R. Verheyden, A. Taraszewska: Wpływ mutacji <i>pt</i> na różne ogniwa „zamkniętych” obwodów ruchowych. II. Metabolity dopaminy w moczu królika <i>pt</i>	407
A. Brzecki, A. Gruszka, J. Kornobis: Przymusowe ruchy pionowe oczu („ocular bobbing”)	417
E. Tarnowska-Dziduszko: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu pierwotnych nowotworów półkul mózgu	427
B. Schmidt-Sidor, D. Ostrowska, M. Afek-Kamińska, A. Stańczyk: Encephalomeningitis trichinotica	437
E. Sosiński: Granulomatyczne zapalenie mózgu typu Cervós-Navarro	445
A. Szutowicz: Fizjologiczna rola liazy cytrynianowej ATP-zależnej w biosyntezie acetylocholin i kwasów tłuszczowych w mózgu szczura. Streszczenie pracy habilitacyjnej	453

СО Д Е Р Ж А Н И Е

М. Я. Моссаковский, А. Пронашко-Курчиньска, Я. Рузга, Р. Палюшкевич: Влияние α -оксоглутарата на развитие гепатогенной глиопатии у крыс с воротно-системным анастомозом	317
З. Красьницка: Влияние сыворотки больных с уремическим синдромом, мочевины и креатинина на органотипическую культуру нервной ткани	327
К. Ренкавек: Синтез ДНК в процессе созревания и роста глиевых клеток в органотипической культуре мозжечка крысы <i>in vitro</i>	341
А. Крыгер-Стойловска, Я. Кульчыски, М. Мадей, П. Новацки, К. Хончаренко: Количество ДНК в нервных и глиевых клетках мозга человека, определяемое цитофотометрическим методом. Предварительное сообщение	349
Х. Крох: Активность щелочной фосфатазы в мозге мыши в разные периоды внеэмбриональной жизни и после применения этилнитрозомочевины (ЭНМ) в эмбриональном периоде	357
З. Залевска, Б. Вольна, Д. Ситкевич, В. Бич: Влияние дихлорфоса на активность некоторых ферментных систем мозга крысы во время онтогенеза. II. Оксидоредуктазы	367
М. Россовска, З. Домбровецки: Влияние гипоксии и ишемии на активность фосфатаз во фракции клеточных мембран мозга морской свинки	373
М. Остенда, Р. Гадамски: Ультраструктурная картина сосудисто-глиевого соединения в экспериментальном, вызванном нажимом отеке мозга у котов	381
Р. Гадамски, М. Остенда, Г. Шуманьска: Электронномикроскопическая картина нервных окончаний и поведение катехоламинов при раннем экспериментальном отеке мозга у kota	395
Е. Осетовска, Р. Верхейден, А. Тарашевска: Влияние мутации <i>pt</i> на разные звенья „замкнутых” двигательных цепей. II. Метаболиты допамина в моче кролика	407
А. Бжески, А. Грушка, Я. Корнобис: Принудительные вертикальные движения глаз („ocular bobbing”)	417
Е. Тарновска-Дзидушко: Морфология мозжечка в процессе первичных новообразований мозговых полушарий	427
Б. Шмидт-Сидор, Д. Островска, М. Афек-Каминьска, А. Станьчък: Трихинеллезный энцефаломенингит	437
Е. Сосиньски: Грануломатозное воспаление мозга типа сервос-наварро	445
А. Шутович: Физиологическая роль зависимой от АТФ лиазы лимонной кислоты в биосинтезе ацетилхолина и жирных кислот в мозге крыс. Содержание диссертации на звание доцента	453

CONTENTS

M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska, J. Rózga, R. Paluszkiewicz: Effect of α -oxoglutarate on the development of hepatogenic gliopathy in rats with porto-caval shunt	317
Z. Kraśnicka: Effect of human uremic serum and urea or creatinine con- taining serum on organotypic nervous tissue culture	327
K. Renkawek: DNA synthesis during development and proliferation of glial cells in organotypic rat cerebellar culture	341
A. Krygier-Stojalowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowacki, K. Honczarenko: DNA content in neurons and glial cells of human brain assayed with cytophotometric method. Preliminary report	349
H. Kroh: Activity of alkaline phosphatase in mouse brain in various periods of extrafetal life and after ethylnitrosourea (ENU) administration during fetal life	357
Z. Zalewska, B. Wolna, D. Sitkiewicz, W. Bicz: Effect of Dichlorvos on some enzyme activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases	367
M. Rossowska, Z. Dąbrowiecki: Effect of hypoxia and ischemia on the acti- vity of phosphatases in the cellular membrane fraction from guinea pig brain	373
M. Ostenda, R. Gadamski: Ultrastructural picture of glial-vascular interface in cats cerebral edema following experimental brain compression	381
R. Gadamski, M. Ostenda, G. Szumańska: Ultrastructure of nerve endings and the catecholamines in early experimental brain edema in cat	395
E. Osetowska, R. Verheyden, A. Taraszewska: Effects of the <i>pt</i> mutation on various links of „closed” motoric circuits. II. Dopamine metabolites in urine of the <i>pt</i> rabbits	407
A. Brzecki, A. Gruszka, J. Kornobis: Compulsory vertical eyeballs movements („ocular bobbing”)	417
E. Tarnowska-Dziduszko: Morphology of cerebellum in the course of primary neoplasms of cerebral hemispheres	427
B. Schmidt-Sidor, D. Ostrowska, M. Afek-Kamińska, A. Stańczyk: Encephalo- meningitis trichinotica	437
E. Sosiński: Granulomatous encephalitis of Cervós-Navarro type	445
A. Szutowicz: Physiological role of ATP-dependent citric liase in biosynthesis of acetylcholine and fatty acids in the rat brain. Summary of the Ph. D. Thesis	453

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 społecznej, 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”, Centrala 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