

43

0922

7c/404

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XVII

1979

ZESZ. 2

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XVII

KWIECIEŃ—CZERWIEC

Nr 2

KOMITET REDAKCYJNY

Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąmbska, Jerzy Dymecki, Andrzej Goncerzewicz, Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Tadeusz Majdecki, Mirosław J. Mossakowski, Janina Rafałowska, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jünisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Környey (Pecs), Jochen Quandt (Bernburg-Saale), Franz Seitelberger (Wiedeń), Istvan Tariska (Budapeszt)

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Mirosław J. Mossakowski*

Sekretarz Redakcji: *Halina Weinrauder*

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-70-18

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

G. I. MCHEDLISHVILI, L. S. NIKOLAISHVILI, M. L. ITKIS

FURTHER STUDIES ON THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF POSTISCHEMIC BRAIN EDEMA DEVELOPMENT

Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation,
I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR
Head of the Laboratory: prof. dr G. I. Mchedlishvili

The brain edema is one of the most dramatic consequences of cerebral ischemia (Waltz, 1973; Klatzo, 1975). It may appear immediately following the postischemic hyperemia (Mchedlishvili et al., 1975, 1976) and is considerably increasing within hours and days following the recovery of blood supply to the brain (Plum, 1963; Meyer et al., 1972; O'Brien, Waltz, 1973; Symon, 1975; Beloborodova, 1976).

In previous detailed studies (Mchedlishvili et al., 1976) the contribution of the circulatory factors into the development of the postischemic brain edema have been elucidated: (a) both the systemic arterial and venous pressures affect the brain edema development, the increase of the systemic venous pressure contributing much more to the rate of the process than the systemic arterial pressure. (b) the cerebrovascular resistance influences the development of brain edema either, and therefore its decrease during the postischemic hyperemia contributes tangibly to the rate of the appearance of edema. (c) the compensation for the development of brain edema may be also accomplished by the circulatory system, since both active decrease of the systemic arterial pressure and increase in the resistance in the major arteries of the brain are probably involved in the process of compensation. All the above-mentioned contributing and compensating effects of the circulatory system upon the brain edema development are probably accomplished by their influences upon both the blood volume in the cerebral vasculature and intravascular pressure in the cerebral capillaries.

The aim of the present work was to evaluate the role of the brain tissue factors in the development of the postischemic brain edema, since it seems evident that the preedemic changes appear primarily in the cerebral tissue during considerable deficiency of blood supply

and the circulatory system may only contribute to, or compensate for, the development of brain edema.

MATERIAL AND METHODS

Thirty six adult rabbits of both sexes weighting 2.5 to 3.5 kg were used in the present study. The rabbits were anesthetized with Hexenalum (ca. 30 mg/kg body weight intravenously) and subsequently immobilized with Tubocurarin chloride (ca. 3 mg/kg intraperitoneally).

Preliminary surgical procedure. An incision was made along the sagittal line of the neck. Following tracheotomy the right common carotid artery, as well as the both external jugular veins were exposed. Then polyethylene catheters of a maximum diameter were inserted in the thoracic direction into these blood vessels: in the artery for recording the systemic arterial pressure and in the veins — for recording the systemic venous pressure and for connection with a pressurized system controlling the latter. Then, one of the external iliac arteries was exposed extraperitoneally and a catheter of maximum diameter was inserted into it for connection with another pressurized reservoir system controlling the systemic arterial pressure.

A large craniotomy hole was made in the parietal region of the cerebral hemispheres. The dura matter was kept intact until the beginning of the experiment. Further, on the animal's back through an incision along the sagittal line below the occiput the fourth ventricle of the brain was opened to drain the cerebro-spinal fluid.

To prevent blood coagulation heparin was injected intravenously (approx. 1,500 units per 1 kg of body weight) at the beginning of the experiment.

Monitored parameters. Blood pressure levels were recorded in the following regions of the circulatory system: (a) the systemic arterial pressure was recorded through a catheter inserted into the common carotid artery, (b) the systemic venous pressure was recorded through another catheter introduced into the jugular vein, (c) the cerebral venous pressure was recorded in the sagittal sinus of the brain through a glass canula inserted into it. The three pressure transducers (type EMT-35) of electromanometers of the Mingograf 81 (Elema, Sweden) were set at the same level as the animal's heart auricle. The mean pressures were recorded by electric integration. Both the systemic arterial and venous pressures were stabilized, or changed, by using two independent pressurized reservoir systems one connected with the iliac artery and the other — with the jugular vein. The reservoir systems were filled with blood-substituting colloids containing fluids —

either Polyglukin or Gelatinine (G. Mukhadze Institute of Hematology and Blood Transfusion, Tbilisi).

Brain volume changes were continuously recorded through a mechanical device consisting of a strain-gauge, one end of which was fastened to the stereotaxic device and the other having a bearing upon the brain surface in the parietal region. The bearing had a form of a plate about 5 mm in diameter. The strain-gauge was switched in a Watson bridge whose signals were amplified by EMT-12 preamplifiers with EMT-16 DC-compensator of Mingograf 81. The device was calibrated before each experiment so that it was possible to evaluate in the record the height of the brain surface expansion above the initial level. The brain expanding from an almost circular craniotomy hole may be considered as a spheric segment, since the pressure causing its expansion should be equal in all directions. The volume changes of such a segment are proportional to changes of its height, the error being less than 10 per cent. Accordingly the recorded brain level changes could be considered to represent „the brain volume changes”.

Because of an effective draining of the fourth ventricle of the brain the volume changes of the latter could not depend upon the changes in the volume of the cerebro-spinal fluid in the ventricles. The brain volume was not influenced by changes of the intrathoracic pressure either, since the lungs were artificially ventilated at a constant rate and volume throughout the experiments. Thus the brain volume changes reflected, first, the blood volume changes in the brain vasculature and, second, the volume changes of the brain tissue which might vary because of accumulation of fluid (during development of edema) or its decrease.

The concentration of sodium and potassium ions in the extracellular fluid was monitored by the use of sodium and potassium ion-selective electrodes which were placed on the surface of the parietal cortex. The pNa electrode (produced by SKB AP, Tbilisi) had a flat selective glass membrane 5—6 mm in diameter and the pK-electrode had also a flat selective valinomycin membrane 3 mm in diameter. The reference electrode was connected with the brain surface through an electrolytic key at ca. 5 mm distance from the indicating electrodes. The latent period of both the pNa and pK recording was less than 1 second. The electrodes were calibrated at 37°C in solutions of artificial cerebro-spinal fluid having the following basic content: K^+ — 1 mM, Na^+ — 148 mM, Ca^{++} — 5 mM, Cl^- — 151.5 mM and HCO_3^- — 14 mM. For calibration the solutions were used in which K^+ was: 1, 10, 25, 50, 75 and 100 mM, pH — 7,3 and Na^+ was changed respectively: 148, 139, 124, 99, 74, and 49 mM, the isoosmolarity, thus, being maintained. The

pK and pNa recording was carried out with the use of pH-meters LPU-01. Simultaneous recording of the DC-potential was performed to make respective corrections.

All the parameters under investigation were recorded on the Mingograf 81 (Elema, Sweden). Since not all the mentioned parameters could be always recorded simultaneously in rabbits, different combinations have been used in individual experiments.

The water content in the brain was determined as percentage of its wet weight. The brain hemispheres were removed from the skull. All free fluid was carefully wiped out of the ventricles with filter paper. After determining the fresh weight of samples of the parietal lobe, including cerebral cortex and the white matter up to the lateral ventricles, the samples were placed in a thermostat for evaporation of water at 100°C until a constant weight was reached.

The results were evaluated statistically and are presented below as mean values and standard errors.

Experimental model of cerebral ischemia. In the present studies the experimental model of controlled ischemia of cerebral hemispheres was used as described elsewhere (Mchedlishvili, 1973). Simultaneously with the occlusion of both common carotid arteries, representing the main pathway supplying the cerebral hemispheres with blood, the collateral blood supply of the latter from the vertebral arteries was restricted by lowering the systemic arterial pressure to about 20 mm Hg by means of an appropriate pressurized reservoir system. By these procedures the cerebral blood flow decreased to about one fourth of its initial rate (Kapuściński, 1974).

Test of brain resistance to development of edema. Since the increase of the systemic venous pressure and, thus of the overfilling of the brain vasculature with blood was found to be a very powerful factor contributing to the development of brain edema (Mchedlishvili et al., 1976), controlled artificial elevation of the systemic venous pressure was used in the present experiments to test to what extent the brain is predisposed to the development of edema. The systemic venous pressure was elevated by aid of an appropriate pressurized reservoir system connected with the external jugular vein by about 15 mm Hg and then returned to its initial level. This procedure, including elevation and drop of the systemic venous pressure, lasted about 3 minutes. The brain volume changes were recorded simultaneously with the venous pressure and the relationship between these two parameters was further elucidated by plotting them on the Cartesian coordinates. In some experiments an X-Y recorder was simultaneously

applied for the same purpose. To determine the comparative magnitude of the hysteresis, irrespective of the height of elevation of the systemic venous pressure and the slope of the curve, the area of the hysteresis was determined and divided into the segment between the crossing-point of the X-Y axes and the bend point of the curve in every test.

The results of the tests were interpreted as follows: (1) Rising of the curve on the plot meant an increase of the blood volume in the brain vasculature and/or an increase in the brain tissue volume caused by development of edema; (2) Lowering of the curve meant the reverse of the above processes; (3) Hysteresis indicated that in spite of a decrease of the intravascular pressure the blood volume in the brain vasculature and/or the brain tissue volume remained increased (the latter indicated the appearance of edema); (4) If the descending curve lowered below the ascending one it meant that some active process had appeared which caused withdrawal of blood from the brain vasculature and/or of water from the cerebral tissue into the blood stream; (5) The slope of the ascending curve indicated the extensibility of the brain tissue.

The criteria of the appearance of a stable edema in the brain at the end of the present experiments were: (a) the increased brain volume under conditions when the systemic venous pressure was no more increased, (b) the increase in water content in the cerebral tissue as compared with the control, (c) a considerable decrease of the slope of the ascending curve of the brain volume changes during the increase of the systemic venous pressure, (d) significant simultaneous increase in the potassium ion concentration and decrease in the sodium ion concentration in the extracellular fluid indicating the disturbance of the cell membrane function in the cerebral cortex.

RESULTS

In the course of the experiments, i.e. before, during and following brain ischemia, the systemic venous pressure was first raised from 4.0 ± 0.5 mm Hg by about 15.0 ± 0.6 mm Hg and then was returned to its initial level, while the systemic arterial pressure was maintained at a constant level. The duration of the increase of the systemic venous pressure was 84.4 ± 5.5 seconds and that of its subsequent recovery was 96.7 ± 9.2 second. The cerebral venous pressure changed simultaneously. The plots of the relationships of these two pressures showed that there was a linear relation between the increase of the venous pressure in the branches of the superior caval vein and in the sagittal sinus of the brain (Fig. 1). The mean correlation coefficient of the relationship was 0.98 ± 0.1 .

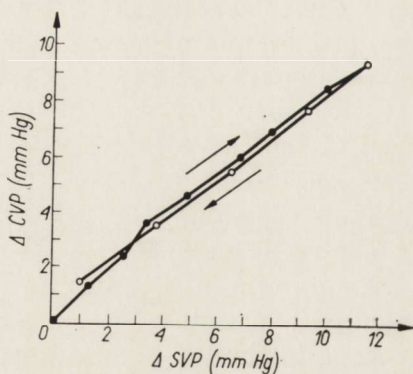


Fig. 1. Linear relationship of the systemic venous pressure (SVP) and the cerebral venous pressure (CVP) in rabbits.

Ryc. 1. Zależność liniowa między obwodowym (SVP) i mózgowym (CVP) ciśnieniem żylnym u królików.

Following the changes of the systemic and cerebral venous pressure the brain expanded from the craniotomy hole by about 1.2 ± 0.1 mm. The latter change reflected the respective change of the brain volume. In the preischemic period, when the brain seemed to be still normal, the brain level (i.e. its volume) changed, as a rule, parallel with the increase and decrease of the systemic venous pressure and there was no hysteresis in the plots of their relationship (Fig. 2, left side)*.

However, ensuing brain ischemia the descending curve in the plots regularly showed a slowing-down related to the ascending one, i.e. a hysteresis appeared in the plots (Fig. 2, right side).

The hysteresis indicated that the recovery of the brain volume became inhibited although the intravascular pressure in the brain returned to its initial level. This meant that either the brain became predisposed to the edema development, or the edema was already evident. In the latter cases the following characteristic features of the brain edema were usually observed: (a) following the tests with the increase of systemic venous pressure the increased brain volume remained unchanged (or almost-unchanged) until the offset of the experiments; (b) the slope of the ascending curve in the plot of the brain level against venous pressure became considerably less than initially (Fig. 3) indicating that the brain became less compliant; (c) the dry weight of the brain tissue decreased, thus showing that the amount of water in the tissue became increased to 82 per cent, while it was about 76.6 per cent in the control experiments, the difference being statistically significant ($P < 0.001$).

*) Only in several cases, in which the brain was predisposed to development of edema, there was a hysteresis in the plots of changes of the brain level (i.e. volume) against the systemic venous pressure from the very beginning of the experiments.

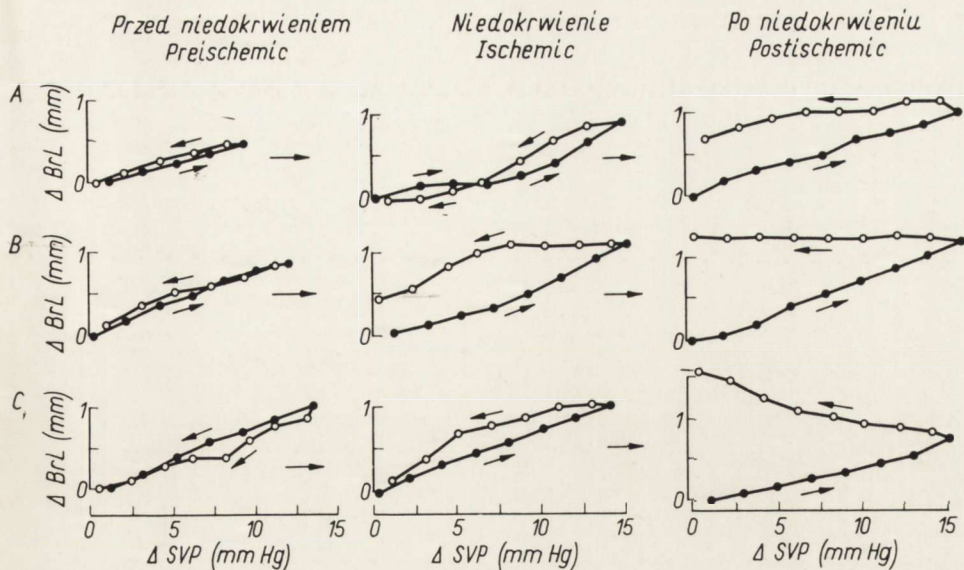


Fig. 2. Three patterns of the relationship of the changes of the systemic venous pressure (Δ SVP) and those of the brain surface level (Δ BrL), the latter expressing brain volume changes, in normal (preischemic), ischemic and postischemic brains of rabbits. For details see the text.

Ryc. 2. Trzy przykłady współzależności między zmianami obwodowego ciśnienia żylnego (Δ SVP) i zmianami w poziomie powierzchni mózgu (Δ BrL), wyrażającymi zmiany objętości mózgu, u królika w normie (przed niedokrwieniem), podczas niedokrwienia i po niedokrwieniu. Objasnienia w tekście.

The water exchange in the brain capillary membranes during the increase of the intravascular pressure was determined by recording pNa and pK, and thus the concentration of sodium and potassium ions, in the extracellular fluid of the cerebral cortex. In the preischemic period, when the brains seemed to be still normal, the increase of the systemic venous pressure caused a regular decrease in the concentration of sodium ions in the extracellular fluid by about -13 ± 1.4 mEq/l ($P < 0.001$), while the concentrations of potassium ions, which are normally about 100 times less than that of sodium, changed only insignificantly by about -0.28 ± 0.44 mEq/l ($P > 0.5$) (Fig. 4). The latter may be considered as an evidence that the ion transport in the protoplasmic membranes of the cells still remained undisturbed. In normal brains these changes were reversible: the sodium concentration returned to the initial value following the decrease of the intravascular pressure.

However, when the brain edema appeared the concentration of sodium and potassium in the extracellular fluid of the cerebral cortex did change considerably: the concentration of Na^+ decreased much more — by 47.0 ± 13.4 mEq/l, i.e. 3.5 times more than during the intra-

vascular pressure increase in normal brains, while the concentration of K^+ increased regularly by 48.5 ± 12.3 mEq/l (Fig. 4). These changes evidenced a drastic disturbance in the function of cytoplasmic membranes of the cellular elements of the cerebral cortex.

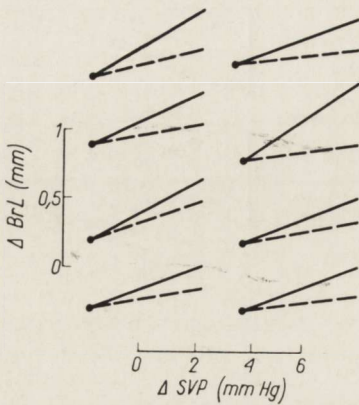


Fig. 3. Patterns of brain surface level changes (ΔBrL) which reflected the brain volume changes during the increase of the systemic venous pressure (ΔSVP) in normal brains (solid lines) and after development of brain edema (dashed lines). In this figure approximated lines from the plots of individual experiments on rabbits are shown. More details in the text.

Ryc. 3. Obrazy zmian poziomu powierzchni mózgu (ΔBrL), odpowiadających zmianom objętości mózgu w normie przy podwyższonym obwodowym ciśnieniu żylnym (ΔSVP) (linie ciągle) i po powstaniu obrzęku mózgu (linie przerywane). Krzywe przybliżone, na podstawie zapisów z poszczególnych doświadczeń na królikach. Szczegóły w tekście.

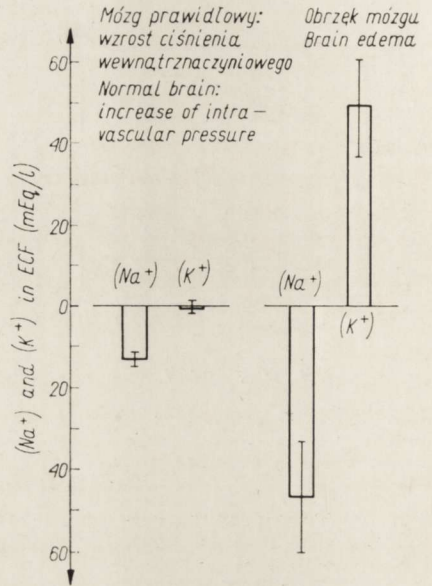


Fig. 4. Changes in the concentration of sodium and potassium ions in the extracellular fluid (ECF) of the cerebral cortex of rabbits: (a) under conditions of increased intravascular pressure in normal brains (left side) and (b) during brain edema (right side). Details in the text.

Ryc. 4. Zmiany stężenia jonów sodu i potasu w płynie zewnątrzkomórkowym (ECF) kory mózgu królika: (a) po lewej prawidłowy mózg przy zwiększonym ciśnieniu wewnątrznaczyniowym, (b) po prawej przy obrzęku mózgu. Szczegóły w tekście.

DISCUSSION

The method applied in the present study made possible to monitor the most important physiological parameters necessary for a better understanding of events related to the development of brain edema. The parameters were as follows: (a) The systemic arterial and venous pressures, as well as the cerebral venous pressure, which could be either changed arbitrarily or stabilized at any necessary level; (b) The intra-

cranial and the intraventricular pressures remained stabilized during the experiments because of a large trephine opening of the skull and effective draining of the fourth ventricle of the brain; (c) The brain volume changes, which were continuously recorded, might reflect alterations, first of the blood volume in the cerebral vasculature and, second, of the water content in the cerebral tissue; the latter was monitored also by continuous recording of pNa and pK, and thus of concentration of these ions, in the extracellular fluid of the cerebral cortex.

In the present experiments the brain was affected by a number of factors promoting the development of postischemic edema: the 15—20 min pronounced ischemia of the cerebral hemispheres, repeated increase of the systemic venous pressure (during the tests) entailing blood stagnation in the cerebral blood vessels and hence cerebral hypoxia, and increase in the blood volume and blood pressure in the cerebral vasculature which are probably the major determinant circulatory factors of the development of brain edema (Mchedlishvili et al., 1976).

It was reasonable to suppose that the increase of the brain volume during each rise of the systemic venous pressure was caused first by an increase in blood volume in the cerebral vasculature (especially in the venous and in the capillary systems) and second, by excessive water filtration into the cerebral tissue spaces. The present studies provided evidence for the occurrence of both these phenomena: (a) a linear increase of the cerebral venous pressure when the systemic venous pressure rose and (b) a decrease in the concentration of the sodium ions with almost no detectable changes in the concentration of the potassium ions (because their amount in the extracellular spaces of the cerebral cortex is under normal conditions considerably lower).

Abundant water filtration from blood into the cerebral tissue might be explained by the fact that water easily penetrates the capillary membranes (Bering, 1952; Renkin, Pappenheimer, 1957). The data obtained in the present experiments allow to calculate the amount of water that passed from blood into the cerebral tissue spaces during the period of the increase of the intravascular pressure.

In accordance with the existing data (Brendel, Reulen, 1967; Shaywitz, 1972) we assume that the extracellular spaces in the brain constitute about 13 per cent of its volume, i.e. 1 cm³ tissue contains about 130 microliters of the extracellular fluid. The decrease of sodium concentration in the fluid detected in the present experiments, under the conditions when the potassium ion contents did not either increase or decrease, indicated that this was a result of the extracellular fluid dilution by water passing from the blood vessels. If this was a result of

sodium ion escape into the cell cytoplasm, as it was observed during the appearance of edema, the potassium ion concentration would have considerably increased at the same time. The concentration of the sodium ions in the extracellular fluid of the cerebral cortex which was initially about 139 mEq/l decreased to 126 mEq/l, i.e. by about 13 mEq/l in the present studies. This means that the amount of the solvent, i.e. of water coming from the blood stream, was increased by about 10 per cent, that is by approximately 0.1 microliter to each microliter of the tissue fluid. Therefore, the amount of the extracellular fluid, i.e. the volume of the extracellular space was also increased by approximately 10 per cent and accordingly the whole volume of the brain increased by about 1.3 per cent. With due regard for the fact that the increase of the brain volume was actually considerably greater during the increase of the systemic venous pressure in the present experiments, we may conjecture that it was an appreciable degree caused by the increase of the blood volume in the cerebral vasculature.

When the brains were still normal (usually at the beginning of the experiment) the brain volume increased and decreased in parallel with the systemic venous pressure and the initial concentration of the sodium ions was recovered in the extracellular fluid of the cerebral tissue. This proved the reversibility of the processes under investigations, i.e. the blood volume in the cerebral vasculature undergoes a decrease because of draining of blood outside the skull and the excess of the extracellular fluid returns into the blood flowing in the capillaries. However, when in the course of the individual experiments the brains became preedematous, i.e. predisposed to development of edema, the hysteresis in the plots of the changes of brain volume against the changes in systemic venous pressure changes (and, thus, the changes in cerebral venous pressure) was detected regularly. This phenomenon is assumed to be dependent on the delay of evacuation of the excess of blood from the extracellular tissue spaces resulting in the development of edema. In addition the water might be transferred into the cytoplasm, since a disturbance in active transport of sodium and potassium ions in the cytoplasmic membranes was evident in this period: a considerable increase in potassium ion concentration in the extracellular fluid was detected in the present experiments. The main source of potassium seems to be in this case the cell cytoplasm, since the potassium ions are passing very poorly from the blood through the capillary membranes (Katzman et al., 1968).

Because of the existence of large channels connecting the intra- and extracranial venous system and the linear relationship of the pressures in them detected in the present experiments, the blood retention in the

cerebral venous system under these conditions may be explained only by changes in the mechanical properties of the cerebral tissue, such as the increase in its compliance and decrease in its elasticity. The contribution of such changes to the development of brain edema has been postulated previously (Mchedlishvili, Akhobadze, 1960; Kvitnitsky-Ryzhov, 1963), but no convincing experimental evidence has been presented so far. Furthermore, the retention of water inside the tissue spaces might also be explained by the above mentioned changes of the mechanical properties of the cerebral tissue, since this would cause a comparative decrease of the pressure inside the tissue spaces under these conditions. On the other hand, the retention of water in the tissue spaces may depend on the increase in osmolarity of the cerebral tissue, i.e. on changes which had been recently mentioned by Hossmann (1976) in the edematous brain.

Consequently, together with the circulatory factors investigated previously (Mchedlishvili et al., 1976) the present study demonstrates an important role of the tissue factors responsible for the development of brain edema. These tissue factors seem to comply with the changes of both the mechanical properties of the cerebral tissue and its osmolarity.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are indebted to Prof. Dr. med. Manfred Kessler, Max-Planck-Institute für Systemphysiologie, Dortmund, Bundesrepublik Deutschland, for kindly supplying the present studies with the potassium ion-selective electrodes.

G. I. Mchedlishvili, L. S. Nikolaishvili, M. L. Itkis

DALSZE BADANIA PATOFIZJOLOGICZNYCH MECHANIZMÓW POWSTANIA OBRZĘKU MÓZGU W NASTĘPSTWIE NIEDOKRWIENIA

Streszczenie

W doświadczeniach przeprowadzonych na dorosłych królikach przed, w czasie i po niedokrwieniu trwającym 15—20 min. badano zmiany objętości mózgu (BrV) przy powtarzającym się, kontrolowanym podwyższeniu (o ok. 15 mm Hg) układowego ciśnienia żylnego (SVP). Zmiany wymienionych parametrów w normie zachodziły na ogół równolegle, natomiast po niedokrwieniu w zapisach pojawiała się histereza. Histereza wskazywała na opóźnienie wypływu krwi z układu żylnego mózgu oraz resorpcji wody z przestrzeni międzykomórkowych tkanek mózgu. Dane dotyczące znacznego przenikania wody z kapilar do tkanek mózgu, towarzyszącego podwyższeniu układowego ciśnienia żylnego (SVP), a co za tym idzie ciśnienia wewnątrznaczyniowego, uzyskano z badania dynamiki jonów Na^+ i K^+ w płynie pozakomórkowym okolicy ciemieniowej kory mózgu. Oznaczenia te wykonywano przy pomocy elektrod jono-selektywnych. W warunkach normy proces ten był odwracalny, natomiast po niedokrwieniu nadmierna filtracja wody pro-

wadziła w rezultacie do powstania obrzęku mózgu. Przypuszcza się, że zmiany przedobrzękowe spowodowane niedokrwieniem są wynikiem zmian mechanicznych właściwości mózgu i/lub zmian osmolarności jego tkanek.

Г. И. Мчедлишвили, Л. С. Николаишвили, М. Л. Иткис

ДАЛЬНЕЙШИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ПОСТИСХЕМИЧЕСКОГО ОТЕКА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

В экспериментах на взрослых кроликах до, во время и после ишемии головного мозга длительностью в 15—20 минут исследовались изменения объема мозга (Обм) при повторяющихся тестах контролируемого повышения (примерно на 15 мм рт.ст.) общего венозного давления (ОВД). Изменения указанных параметров происходили обычно параллельно пока мозг был еще нормальным, но после ишемии в графиках их зависимости появлялся гистерезис. Последний указывал, что при этом наступала задержка дренажа крови из венозной сосудистой системы мозга и задержка резорбции воды из межклеточных пространств мозговой ткани. О значительной фильтрации воды из капилляров в ткань мозга во время повышения ОВД и, следовательно, внутрисосудистого давления, свидетельствовали изменения $[Na^+]$ и $[K^+]$ в экстрацеллюлярной жидкости теменной области коры головного мозга, которую определяли с помощью ион-селективных электродов. Это явление было обратимым в нормальном мозгу, но после ишемии наблюдалась избыточная фильтрация воды в ткань мозга, приводившая в конце концов к развитию ее отека. Предполагается, что предотечные изменения в мозге, возникающие в результате ишемии, заключаются в изменениях механических свойств ткани мозга и (или) в изменениях ее осмолярности.

REFERENCES

1. Beloborodova E. A.: Electric parameters, electric activity and water contents in the cerebral cortex of dogs in the late resuscitation period following the clinical death. (In Russ.) In: „Pathogenesis and Experimental Therapy of the Terminal State”. Ed. V. G. Korpachev, Omsk, 1976, 3—6.
2. Bering E. A.: Water exchange of central nervous system and cerebrospinal fluid. *J. Neurosurg.* 1952, 9, 275—287.
3. Brendel W., Reulen H. J.: Die experimentelle Erforschung des Hirnödems im Liquor and Nervensystem. Herausgeg G. Kienle, Thieme Verlag, Stuttgart, 1967, 207—214.
4. Hossmann K.-A.: Development and resolution of ischemic brain swelling. In: „Dynamics of Brain Edema”. Ed.: H. M. Pappius, W. Feindel, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1976, 219—227.
5. Капуściński A.: Cerebral blood flow under conditions of circulatory hypoxia with particular reference to the retransfusion period. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 563—572.
6. Katzman R., Graziani L., Ginsburg S.: Cation exchange in blood brain and CSF. In: „Brain Barrier Systems”, *Progr. Brain Res.*, Ed. A. Lajtha, D. H. Ford, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1968, 29, 283—296.

7. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. In: „The Nervous System”, Ed.: D. B. Tower, vol. 1: The Basic Neurosciences, Raven Press, New York, 1975, 313—322.
8. Kvitnitsky-Ryzhov Y.: Morphological changes reflecting the relationship of the intracranial pressure and the processes of edema-swelling of the brain. (In Russ.) *Klinitch. Khir.*, 1963, 10, 57—65.
9. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
10. Mchedlishvili G. I., Akhobadze V. A.: Dynamics of changes of the cerebral circulation in traumatic edema of the brain. (In Russ.) *Vopr. Neurokhir.* 1960, 2, 13—19.
11. Mchedlishvili G. I., Kapuściński A., Nikolaishvili L. S.: Role of circulatory changes in the formation of the post-ischemic brain edema. *Intern. Res. Comm. System, Med. Sci.* 1975, 3, 45.
12. Mchedlishvili G. I., Kapuściński A., Nikolaishvili L. S.: Mechanisms of post-ischemic brain edema: contribution of circulatory factors. *Stroke* 1976, 7, 410—416.
13. Meyer J. S., Taraura T., Marx P., Hashi K., Sakamoto K.: Brain swelling due to experimental cerebral infarction: changes in vasomotor capacitance and effects of intravenous glycerol. *Brain* 1972, 95, 833—852.
14. O'Brien M. D., Waltz A. G.: Development and resolution of edema in experimental cerebral ischemia and infarction. *Stroke*, 1973, 4, 329—330.
15. Plum F., Posner J. B., Alvord E. C.: Edema and necrosis in experimental cerebral infarction. *Arch. Neurol.* 1963, 9, 563—570.
16. Renkin E. M., Pappenheimer J. R.: Wasserdurchlässigkeit und Permeabilität der Capillarwände. *Ergebn. Physiol.* 1957, 49, 59—126.
17. Shaywitz B. A.: Brain inulin space in hydrocephalic and hypernatremic kittens using ventriculocisternal perfusion. *Exp. Neurol.* 1972, 34, 16—24.
18. Symon L.: Experimental model of stroke in the baboon. In: „Advances in Neurology”, Ed.: B. S. Meldrum, C. D. Marsden, Raven Press, New York, 1975, 199—212.
19. Waltz A. G.: Pathophysiology of cerebral ischemia. In: „Cerebral Vascular Disease”, Ed.: F. H. McDowell, R. W. Brennan, Grune and Stratton, New York, San Francisco, London, 1973.

Author's address: Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation, Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, 380060 Tbilisi, 14 Gothua str., USSR.

ADDITIONAL COMMENT

In the late 60-ties, a cooperation in the field of brain hypoxia has been initiated between the I. Beritashvili Institute of Physiology of the Georgian Academy of Sciences in Tbilisi and the Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences in Warszawa. The first joint Symposium was held in Tbilisi in 1973. The papers presented at this Symposium were published in a separate number of *Neuropatologia Polska* (no 4, 1974) as „Proceedings of the Soviet-Polish Symposium on circulatory brain hypoxia”. The current number of the quarterly includes a part of the material presented at the 2nd workshop of the cooperating scientists which was held in Tbilisi in September, 1—5, 1976. The remaining papers from this Symposium will be published in the subsequent number of *Neuropatologia Polska*.

D. G. BARAMIDZE

FUNCTIONAL BEHAVIOR OF THE PIAL MICROVASCULAR
MECHANISMS UNDER CONDITIONS OF CEREBRAL ISCHEMIA
AND SUBSEQUENT RECOVERY OF BLOOD SUPPLY
TO THE BRAIN

Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation,
I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR
Head of the Laboratory: prof. dr G. I. Mchedlishvili

The blood supply to the cerebral tissue and hence microcirculation in the latter, depends upon both the perfusion pressure (the difference between the systemic arterial and venous pressures) and the cerebrovascular resistance. The latter, in its turn, is a sum of segmental resistances along the whole way of blood flow in the cerebral arterial system — i.e. along pial and intracerebral arteries — up to the capillaries. The experimental techniques developed mainly in the course of the 1960s made possible to study the functional behavior of all these vascular mechanisms of the brain under different physiological and pathological conditions (Mchedlishvili, 1972). It was demonstrated that under conditions of deficiency of blood supply to the cerebral tissue, which is particularly evident during ischemia, there are the pial arteries, especially the smaller ones, that accomplish compensation for the inadequate blood supply to the cerebral tissue (Mchedlishvili et al., 1974).

In the recent years several microvascular mechanisms have been revealed in the system of the smaller pial arteries. These microvascular mechanisms were found to be specific small portions of the pial arterial ramifications, which appeared to be particularly active under different conditions of regulation of blood supply to the cerebral tissue (Baramidze, Mchedlishvili, 1975; 1977). The microvascular mechanisms are: (a) the sphincters at the site of the right angle offshoots of the smaller pial arterial branches from the larger trunks (SOPA); (b) the precortical arteries (PCA) representing short active segments between

the smallest pial arterial branches and the radial arteries penetrating into the cerebral cortex; (c) the pial arterial microanastomoses (PAMA) between the smallest arterial branches throughout the cerebral surface. These microvascular mechanisms were previously studied under conditions of cerebral ischemia by the use of the technique of their supravital fixation (Mchedlishvili, Baramidze, 1974), but this technique possesses certain limitations and hence the obtained information on the microvascular behavior remained insufficient.

For a better understanding of the functional behavior of the microvascular mechanisms in the pial arterial system another technique was developed recently for their study *in vivo*. The aim of the present work was the study of the SOPA, PAMA and PCA in rabbits with this technique under conditions of 15 minutes long ischemia in the cerebral hemispheres and of the subsequent recovery of blood supply to the brain.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on 23 adult rabbits of both sexes weighing 2.5—3.0 kg. The animals were anesthetized by intravenous administration of either Urethan (approx. 1 g per kg body weight) or Hexenalum (30 mg per kg body weight).

The preliminary surgical procedure was as follows: an incision was made along the sagittal line of the neck, and both common carotid arteries were exposed. Further a catheter of a possible largest diameter was introduced into one (usually the right one) of them in the thoracic direction. The catheter was connected with either a mercury manometer, or with a pressurized reservoir system through a cock permitting to switch arbitrarily one or the other. A thick silk ligature was then administered around the contralateral common carotid artery permitting to occlude it when necessary.

A large craniotomy hole was made in the parietal region of the cerebral hemispheres. After removal of the dura mater close to the beginning of the experiment the brain surface was covered with a thin glass plate, the space under it being filled with artificial cerebrospinal fluid. An incision was made along the sagittal line of the neck under the occiput and the fourth brain ventricle was efficiently drained to maintain pulsation of the cerebral surface during the microscopical study of the pial microvascular mechanisms.

Heparin (approx. 1,500 units per kg body weight) was injected intravenously as soon as the surgical procedure was over.

The studies of the pial microvascular mechanisms were carried out before, during and following the cerebral ischemia lasting 15 minutes. The experimental model of the controllable cerebral ischemia described previously (Mchedlishvili, 1973) was used in the present experiments. It consisted of (a) arrest of blood supply to the cerebral hemispheres by occluding both common carotid arteries (one of them was occluded during the preliminary surgical procedure) and (b) restriction of the collateral blood supply to the cerebral hemispheres by lowering the systemic arterial pressure down to 20—25 mm Hg.

For the *in vivo* study of the functional behavior of the pial microvessels on the surface of the parietal cortex, the rabbits were fastened to a stand easily sliding on a heavy iron table with dampers (to prevent from the influences of fluctuations of the room's floor). The brain surface microvessels were studied under a microscope with the rate of magnification of 80 times and photomicrographed at specified moments. During this procedure the brain surface was illuminated with a lamp supplied with a C3C-7 light blue filter for contrasting the blood vessels. The illuminator was additionally supplied with two C3C-14 heat filters and with an automatic device permitting to increase the lightening during photographing to avoid overheating of the brain surface during the experiment. Following the development of the films the diameters of the chosen microvessels were measured on every frame of the film by projecting them on a screen where the diameter of the microvessels was increased approx. 500 times in comparison with the real ones. By plotting the obtained data on the millimeter paper, the whole dynamics of the diameter changes of the particular microvessels was presented over a given period of time.

Since only microvessels of 15—50 μm were studied in the present work, the mean error of diameter measurements was evaluated. For this purpose the fixed total microscopical preparations of the rabbits' pia mater were used. At first the diameter of a number of pial arteries was determined with the help of an ocular micrometer of the microscope under magnification of 900 times. Then the same blood vessels were photomicrographed under the same conditions as in the *in vivo* experiments, i.e. under magnification of 80 times and on the same film. The latter was further projected on the screen as usually, the blood vessels measured and the mean error of the measurement of their diameter determined. The error appeared to be 5%.

At the beginning of each experiment the pial microvessels were serially photomicrographed on the brain surface in a chosen vascular bed either for 10—15, or 40—50 minutes to determine their functional behavior under steady state conditions. The same blood vessels were

studied further in the course of the cerebral ischemia and of the subsequent postischemic period when the blood supply to the brain was stored. The cerebral ischemia was sometimes produced repeatedly.

The results of the measurements of the pial microvessels were evaluated statistically and are presented below as mean and standard errors.

RESULTS

The microvascular mechanisms of the pial arterial system, i.e. the sphincters at the offshoots of the pial arteries (SOPA), the pial arterial microanastomoses (PAMA) and the precortical arteries (PCA), were studied: (a) under steady state conditions — at the onset of the experiments when during 30—60 minutes, the cerebral circulation remained still unaffected, (b) in the course of the cerebral ischemia lasting 15 minutes and (c) in the postischemic period for about 30—45 minutes following the recovery of blood supply to the brain.

Under steady state conditions the microvascular mechanisms behaved according to their structural and functional peculiarities (Fig. 1).

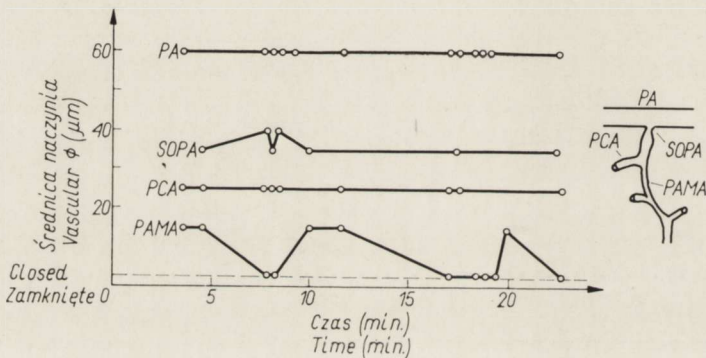


Fig. 1. The patterns of the width of different microvascular mechanisms: sphincter of the offshoot of a pial artery (SOPA), pial arterial microanastomose (PAMA), precortical artery (PCA) and of a small pial artery (PA) under steady state conditions at the beginning of one of the experiments. A schematic design of the microvascular mechanisms under study is given on the right.

Ryc. 1. Średnice różnych mikronaczyń w stałych warunkach przed rozpoczęciem doświadczenia: zwieracz oponowego odgałęzienia tętniczego (SOPA), mikroanastomoza tętnicy oponowej (PAMA), tętnica przedkorowa (PCA), tętniczka oponowa (PA). Po prawej schemat badanych mechanizmów mikronaczyniowych.

The SOPA, representing the initial segments of the branches of the pial arteries which shoot off at right angles from the larger pial arteries, had initial diameter ranging from 20—80 μm in the present experiments. Under steady state conditions active changes of the width of

the SOPA were observed during which their diameter changed approximately by 10—15% of their initial size (which was considered as 100%). The changes appeared seldom — sometimes 2—3 times per hour.

The PCA involving short active vascular segments located immediately before the entering of the radial arteries into the cerebral cortex had a range of the diameter from 20 to 60 μm in the present experiments. The changes of their lumen stand for the control of the blood supply to tissue regions surrounding the individual radial arteries. Under steady state conditions the PCA either did not change their diameter during 30—60 minutes, or changed it independently of the respective SOPA from whose ramifications of the PCA originated. The diameter of the PCA changed by approx. 5—10% with respect to the initial value sometimes with the same frequency as that of SOPA.

The PAMA connected the neighbouring terminal branches of the pial arteries from which the majority of the PCA originated. The range of the caliber of the PAMA was 15—80 μm in the present experiments. The true PAMA may be singled off by the following criteria: (a) their caliber was comparative smaller than of those arterial branches which were connected by the respective PAMA; (b) PCA are never offshooting from the genuine PAMA; (c) the direction of the blood flow in the PAMA may vary and their lumen changes considerably — down to a complete switch off of the microvessel. Thus, the functional behavior of the true PAMA differed tangibly from that of the SOPA and the PCA: while the diameter of the latter microvessels changed comparatively insignificantly (see above) the PAMA showed periodically such a narrowing of their lumina that the microvessels became invisible (Fig. 2). The periods of functioning of the PAMA varied approx. from 2—4 per 5 minutes to 1—5 per hour.

The microvascular mechanisms became much more active in the ischemic and postischemic periods. Following the development of the cerebral ischemia, due to occlusion of both common carotid arteries and the drop of the systemic arterial pressure to approx. 25 mm Hg, the most typical reaction of the smaller pial arteries, the SOPA, the PAMA and the PCA was their dilatation. In different experiments the time of the decrease of the level of the systemic arterial pressure varied from about 30 seconds to three and a half minutes and then the pressure remained at a constant level. The experiments proved that the period in which the microvessels reached the new value of maximal diameter was dependent on the rate of the drop of the systemic arterial pressure, the faster the latter the shorter the period of establishing the new value of the diameter responses of the microvessels (Fig. 3).

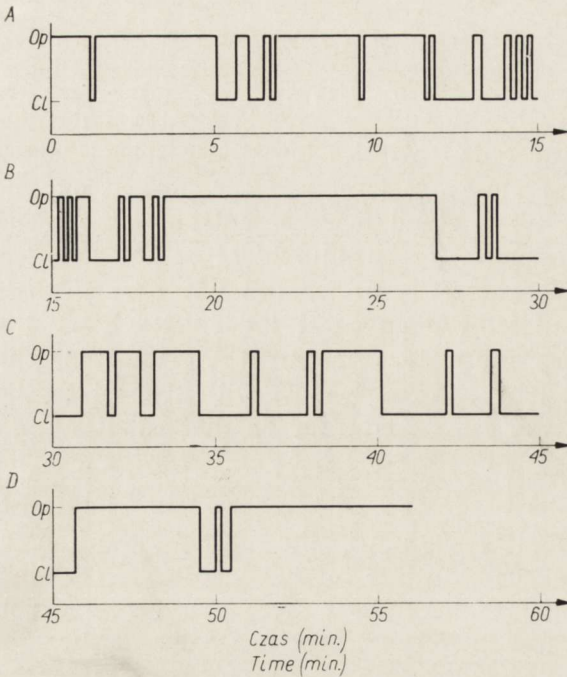


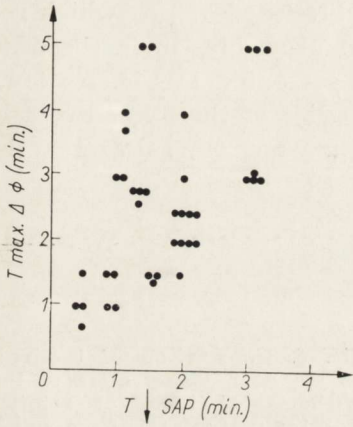
Fig. 2. The fluctuations of the width of a pial arterial microanastomose in one of the experiments; „op” means open and „cl” means closed, i.e. the microvessel disappeared from the field of vision. A, B, C and D are continuation of each other.

Ryc. 2. Zmiany światła mikroanastomozy tętnicy oponowej w jednym z doświadczeń; „op” — otwarte „cl” — zamknięte (zniknięcie mikroanastomozy z pola widzenia). A, B, C, D — kolejne fazy.

The changes of the vascular diameter of the microvessels under the conditions of cerebral ischemia are shown in Fig. 4. The majority of pial arteries, of the SOPA, PAMA and PCA underwent dilatation or remained unchanged. The latter evidenced, in turn, a decrease of the vascular tone, though the vessels were too narrow, since the intravascular pressure dropped in this period. Only few microvessels under investigation underwent constriction. In the course of a 15 minutes long ischemia, in spite of the fact that the hemodynamic conditions remained unchanged, there was a gradual tendency to constriction of both the SOPA and the PCA.

Following the recovery of blood supply to the brain, when the intravascular pressure did rise, the number of the constricted SOPA increased during the first 15 minutes of the postischemic period. The PCA, on the contrary, dilatated throughout the cerebral surface from the very beginning of the recovery of blood supply to the brain, and later (within 30—45 minutes of recovery of cerebral blood flow) they started to constrict (Fig. 4).

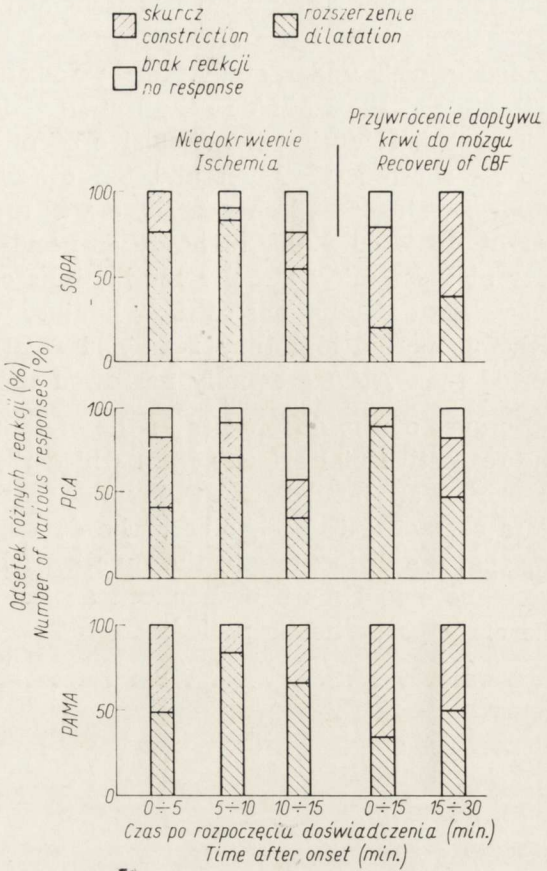
The data outlined in Fig. 4 show that the responses of the SOPA, PAMA and PCA may be not only different, but even oppose each other. This difference in the vascular responses was especially pronounced



Ryc. 3.

Fig. 3. Time of establishment of the maximal response (of the diameter change) of the sphincters of the offshoots of the pial arteries, of the pial arterial microanastomoses and of the precortical arteries ($\Delta T \max \Delta \phi$) relative to the duration of the drop of the systemic arterial pressure ($\Delta T \downarrow SAP$)

Ryc. 3. Czas ustalenia się maksymalnej reakcji (zmiana średnicy) zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych, mikroanastomoz tętnic oponowych i tętnic przedkorowych ($\Delta T \max \phi$) w stosunku do czasu trwania spadku obwodowego ciśnienia tętniczego ($\Delta T \downarrow SAP$).



Ryc. 4.

Fig. 4. The amount of various responses of the sphincters of the offshoots of the pial arteries (SOPA) (upper part), of the precortical arteries (PCA) (middle part) and of the pial arterial microanastomoses (PAMA) (lower part) expressed in percent of all the microvessels under investigation during cerebral ischemia and in the postischemic period following the recovery of blood supply to the brain.

Ryc. 4. Odsetek różnych reakcji zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych (SOPA — część górna), tętnic przedkorowych (PCA — część środkowa) i mikroanastomoz tętnic oponowych (PAMA — część dolna) w stosunku do wszystkich badanych mikronaczyń podczas niedokrwienia mózgu i po przywróceniu dopływu krwi do mózgu.

during the first five minutes of ischemia, as well as in the early post-ischemic state, but the difference might be also observed during other periods which under study. There was a particular difference in the responses of the PAMA in the course of ischemia and in the postischemic period. If during the first five minutes about half of these microvessels showed dilatation and the other half — constriction, in the following stages of ischemia there was a gradual increase in the number of dilatated PAMA. The other peculiarity of the functional behavior of these microvascular mechanisms consisted in a complete disappearance of fluctuations of their lumina, which was evident in the pre-ischemic period and they remained mostly open. In the postischemic period the PAMA gradually narrowed throughout the cerebral surface.

Because of the differences in the vascular response of the SOPA and the respective pial arteries from which they branched off, or which represented an immediate continuation of the offshoots, their response were compared to each other. The data are presented in Fig. 5 showing that the differences in the functional behavior of these microvessels were more and more pronounced as ischemia went on, as well as in the early postischemic period.

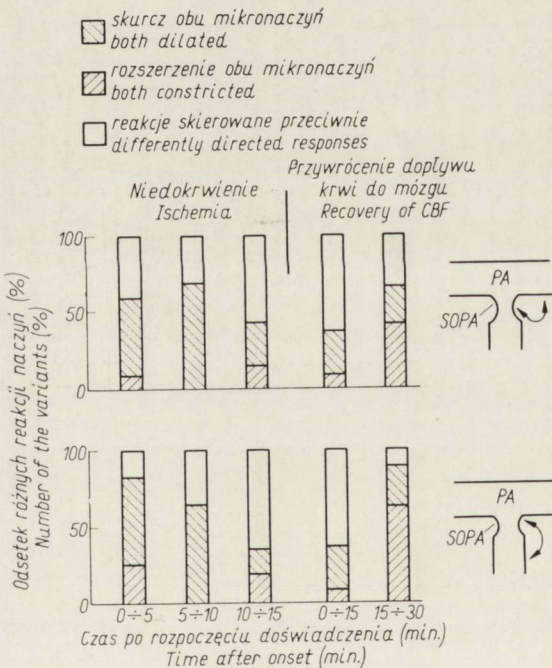


Fig. 5. Comparison of the responses of the sphincters of the offshoots of the pial arteries with the pial arteries from which the respective branches were shot off (upper part) and of the sphincters with the branches at the beginning of which they formed the microvascular mechanisms (lower part). The amount of each variant is presented as a per cent of all the microvessels under investigation.

Ryc. 5. Porównanie reakcji zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych z reakcją tychże odgałęzień (część górna) oraz reakcji zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych z odpowiedzią początkowego odcinka odgałęzień tętniczych, uczestniczącego czynnie w mechanizmach mikrokrążenia (część dolna). Każdy wariant jest przedstawiony w postaci odsetków wszystkich badanych mikronaczyń.

Since the dilatation seems to be the most typical response of all the studied microvessels under conditions of ischemia and in the following postischemic period, the dependence of the magnitude of microvascular responses against the initial vascular diameter was determined. Fig. 6 shows that there was a definite tendency of smaller blood vessels to dilate tangibly in comparison with the larger ones, but the relationship was not very specific.

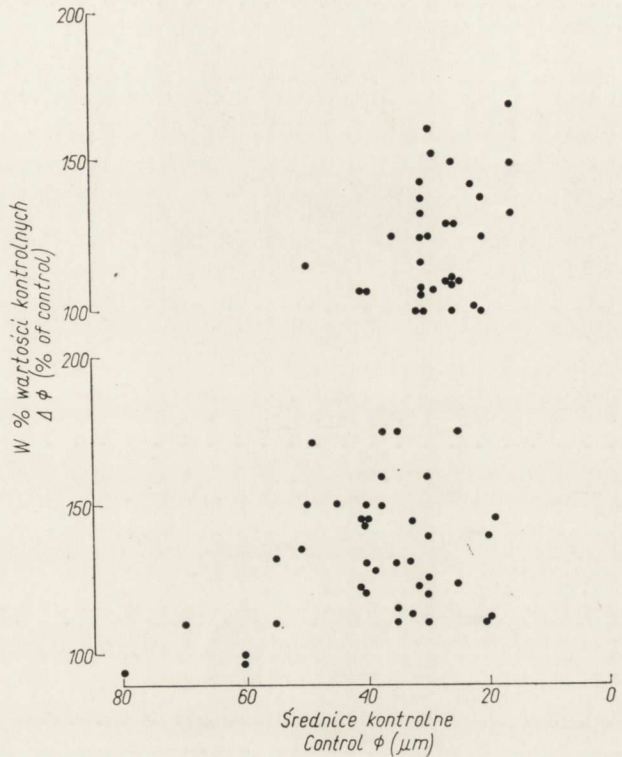


Fig. 6. The percentage of the diameter increase of the sphincters of the offshoots of the pial arteries (upper part) and of the precortical arteries (lower part) (their initial diameter = 100%) depending upon the initial caliber of the respective microvessels.

Ryc. 6. Procentowy wzrost średnicy zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych (część górna) oraz tętnic przedkorowych (część dolna), zależny od początkowego przekroju odpowiednich mikronaczyń (średnica początkowa = 100%).

DISCUSSION

Following the discovery of the active microvascular mechanisms of the pial arterial system in the early 1970s, they have been studied using total microscopical preparations of pia mater fixed *in vivo* under different experimental conditions (Mchedlishvili, Baramidze, 1974; Mchedlishvili et al., 1974, 1975; Baramidze, Mchedlishvili, 1975, 1977). The present studies of the microvascular mechanisms *in vivo*, i.e. of the sphincters at the offshoots of pial arteries (SOPA), precortical arteries (PCA) and pial arterial microanastomoses (PAMA), have considerable advantages. Serial vital photomicrography of the blood vessels with sub-

sequent measurements of the vascular diameters on every film frame described the whole dynamics of the vascular responses. This technique yielded direct and quantitative data. Since the diameter of the same microvessels was measured in the course of the experiments, the obtained data provided the observers with quite satisfactory information on the dynamics of the microvascular behavior.

However, there might be some sources of errors while using this technique. Since there was a large craniotomy hole, the pial arteries were deprived of the external (i.e. of intracranial) pressure. But this was rather an advantage, since the possible influences of any unexpected changes of the latter were excluded and the pial arteries remained under steady state conditions of extravascular pressure during the experiments. On the other hand, it was impossible to see the walls of the pial microvessels and actually only the width of the erythrocyte stream was recorded on films and measured subsequently. But, as it was shown before (Mchedlishvili et al., 1974, 1975) the dependence of the width of the red cell stream and the actual vascular diameter seems to be strictly linear and hence the obtained data on the vascular diameter changes are reliable.

The present experiments in which the functional behavior of the pial microvascular mechanisms was studied under conditions of tangible deficiency of blood supply to the brain tissue and of its subsequent recovery demonstrated that the majority of the microvessels either underwent dilatation or their width remained unchanged. Since the intravascular pressure should drop considerably under the ischemic conditions, these vascular responses may be considered active. It is reasonable to conjecture that these vascular responses are due to the controlling signals that affect the microvessels, as feed-back, regulating the adequate blood supply to the cerebral tissue.

The arrangement of the pial microvascular mechanisms makes it possible to control both the distribution of blood flow in the pial vascular bed and the rate of blood supply to the very small regions of the cerebral cortex surrounding the single radial arteries. Since there were no arterial and arteriolar anastomoses discovered inside the cerebral cortex (Klosovski, 1951), the blood supply to the tissue is completely dependent upon the blood flow in the respective radial arteries (Gan-noushkina, 1958). Every radial artery is supplying a comparatively small tissue area of the cerebral cortex: as it was shown earlier (Mchedlishvili et al., 1974, 1975) 1 mm² of the cerebral surface of rabbits comprises about 5.2 radial arteries. This means that the pial microvascular mechanisms should be able to control microcirculation in very small regions of the cerebral tissue.

In spite of the fact that the blood supply was deficient throughout the cerebral cortex, a marked variety of the vascular responses of SOPA, PCA and PAMA were observed during all stages of the cerebral ischemia and of the following postischemic recovery of blood supply to the brain. There were considerable differences in the microvascular responses of the SOPA and PCA, on the one hand, and of the PAMA, on the other, even under steady state conditions. In the SOPA and the PCA showed only insignificant fluctuations of the vascular diameter which probably was adjusted to the change of the blood supply to the individual artery, the PAMA showed considerable changes in their width, leading even to their complete disappearance from the field of vision. This does not mean however, that the microvessels did close fully in these periods. It is quite probable that they only narrowed and the erythrocyte flow disappeared from their lumina, that is they transformed into plasmatic blood vessels (Mchedlishvili, 1958). The evidence for such a vascular behavior in the pial arterial system has been demonstrated in a previous study where the plasmatic, but not closed, anastomoses in the pial arterial system were observed in the total microscopical preparations of the pia mater in rabbits (Mchedlishvili, Devdariani, 1964). Along with this, frequent changes were detected in the direction of the blood flow in the PAMA, which in this way might supply different tissue regions with blood. The mentioned peculiarities of the functional behavior of the two types of the pial microvascular mechanisms are probably due to the difference between their main functions. The SOPA and the PCA control mainly the resistance along the way of blood to the individual radial arteries, while the PAMA control primarily the distribution of blood between the neighbouring radial arteries or groups of these arteries.

Besides the dilatatory responses also the constrictory responses of the pial microvessels were observed under the conditions of cerebral ischemia. The latter may represent either passive narrowing in response to a drop of the intravascular pressure or active vasoconstriction. The latter cannot be related to the control of adequate blood flow in the tissue which suffered more and more from the deficiency of blood supply in the course of ischemia. This might be only due to a control of distribution of blood flow to the neighbouring tissue area, if its metabolic demands surpasses others'. It is also quite probable that the mentioned behavior of the pial microvascular mechanisms causes ischemic lesions in a great number of individual small focuses throughout the cerebral cortex. And at last, an active constriction of the microvessels during the cerebral ischemia might be also a manifestation of a regulation

which is directed, for example to a compensation for the development of edemic changes in some locuses of the brain tissue.

During the postischemic period when a recovery of blood supply to the brain became manifested, the behavior of the pial microvascular mechanisms was not uniform. On one hand, the majority of the small arteries, as well as of the PCA, dilatated and this is to be understood a passive response to the increase of the intravascular pressure. On the other hand, other microvascular mechanisms, especially the SOPA, started to constrict or their width remained unchanged, representing an active response of the microvessels' walls. It might be conjectured that the latter was direct, first, to a restriction of the superfluous blood supply to the cerebral tissue and secondly, to a restriction of the edematous changes in it, since the preedemic changes may accompany deficiency of blood supply to the cerebral tissue (Mchedlishvili et al., 1976).

Along with the new data accumulated in the present study demonstrating the functional behavior of the microvascular mechanisms in the pial arterial system, a set of new problems of their behavior arose. Generally speaking, the main problem seems to be the controlling function of the pial microvascular mechanisms in the regulation of an adequate blood supply to the individual radial arteries and hence to very small regions of the cerebral cortex. Another important problem is the role of the pial microvascular mechanisms in the compensation of the brain edema which appears primarily in small regions of the cerebral tissue and is then gradually distributed to the larger areas of the brain. For the solution of the problems a further detailed research of the functional behavior of the microvascular mechanisms in the pial arterial system is necessary.

D. G. Baramidze

FUNKCJONOWANIE MECHANIZMÓW MIKRONACZYNIOWYCH
OPONY MIĘKKIEJ W WARUNKACH NIEDOKRWIENIA
I W OKRESIE PO NIEDOKRWIENIU

Streszczenie

Celem pracy było badanie zachowania się mechanizmów mikronaczyniowych regulujących mikrokrążenie w korze mózgu — małych tętnic opony miękkiej (PA), zwieraczy oponowych odgałęzień tętniczych (SOPA), tętnic przedkorowych (PCA) oraz oponowych anastomoz tętniczych (PAMA) — w warunkach niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu. W okresie niedokrwienia większość badanych małych naczyń ulegała rozszerzeniu, co w warunkach obniżonego ciśnienia wewnątrz-naczyniowego jest zapewne procesem czynnym i prawdopodobnie przeciwdziała-

jącym upośledzeniu ukrwienia tkanek mózgu. Z drugiej strony obserwowano skurcz niektórych drobnych naczyń — szczególnie oponowych odgałęzień tętniczych i tętnic przedkorowych. W okresie po niedokrwieniu, tego rodzaju reakcje oponowych odgałęzień tętniczych były silniej wyrażone. Można sądzić, że reakcja skurczowa naczyń może być odpowiedzialna za uszkodzenie niektórych obszarów kory, ale z drugiej strony może ona prowadzić do redystrybucji krwi do innych obszarów mózgu na zasadzie mechanizmu kompensacyjnego. Czynny skurcz oponowych odgałęzień tętniczych w okresie po niedokrwieniu może być także uważany za kompensacyjną reakcję małych naczyń, prowadzącą do ograniczenia nadmierne go ukrwienia tkanek mózgu, co mogłoby zapobiegać wystąpieniu obrzęku.

Д. Г. Барамидзе

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПИАЛЬНЫХ МИКРОВАСКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ
ПРИ ИСХЕМИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ ПОСТИСХЕМИЧЕСКОМ
ВОССТАНОВЛЕНИИ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

Целью настоящей работы являлось изучение функционального поведения микроваскулярных механизмов, регулирующих микроциркуляцию в коре головного мозга — мелких пимальных артерий (ПА), сфинктеров ответвлений пимальных артерий (СОПА), преко́ртикальных артерий (ПКА) и пимальных артериальных микроанастомозов (ПАМА) — как во время ишемии, так и в постисхемическом периоде. Во время ишемии большинство изученных микрососудов подвергалось дилатации, которая в условиях уменьшения внутрисосудистого давления, очевидно, была активной и направленной на ограничение дефицита кровоснабжения ткани головного мозга. С другой стороны, была отмечена констрикция некоторых микрососудов, особенно СОПА и ПКА, в то время как количество подобных реакций СОПА увеличивалось в постисхемическом периоде. Можно предположить, что при ишемии эти констрикторные реакции являются причиной повреждений некоторых областей коры, но, с другой стороны, они могут быть направлены на ограничение кровотока в одних участках для компенсации ишемических изменений в других областях ткани мозга. Активная констрикция СОПА в постисхемическом периоде может также трактоваться, как компенсаторная микрососудистая реакция, направленная на ограничение избыточного кровоснабжения ткани мозга, препятствующая развитию в нем отека.

REFERENCES

1. Baramidze D. G., Mchedlishvili G. I.: Functional behavior of the microvascular mechanisms in the pial arterial system controlling microcirculation of the cerebral cortex. *Fiziol. Zh. SSSR (In Russ.)*, 1975, 61, 1493—1500.
2. Baramidze D. G., Mchedlishvili G. I.: Functional behavior of microvascular mechanisms in the pial, precortical and cortical arteries under experimental conditions. In: *Brain Blood Supply*, Eds.: G. I. Mchedlishvili, A. G. B. Kovách, I. Nyára, Akademiai Kiado, Budapest, 1977, 55—68.
3. Gannoushkina I. V.: After-effects of closure of vessels of the cerebral cortex. (In Russ.) *Vopr. Neurokhir.*, 1958, 2, 1—6.

4. Klosovski B. N.: The circulation of blood in the brain. (In. Russ.) Medgiz. Moscow, 1951.
5. Mchedlishvili G. I., Devdariani M. G.: Internal mechanisms facilitating collateral circulation in brain. (In Russ.). Patol. Fiziol. Eksp. Terap., 1964, 8, 20—24.
6. Mchedlishvili G. I.: Vascular mechanisms of the brain. Plenum Press, New York — London, 1972.
7. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. Neuropat. Pol., 1973, 11, 249—262.
8. Mchedlishvili G. I., Baramidze D. G.: Functional behavior of microvascular mechanisms controlling blood supply to cerebral cortex under ischemic and early postischemic periods. Neuropat. Pol., 1974, 12, 537—550.
9. Mchedlishvili G. I., Nikolaishvili L. S., Antia R. V.: Cerebral blood flow and arterial behavior during the ischemic and early postischemic periods. Neuropat. Pol., 1974, 12, 551—562.
10. Mchedlishvili G. I., Baramidze D. G., Nikolaishvili L. S., Mamisashvili V. A.: Vascular mechanisms responsible of microcirculation of the cerebral cortex. Bioch. Exp. Biol., 1974—1975, 11, 113—129.
11. Mchedlishvili G. I., Kapuściński A., Nikolaishvili L. S.: Mechanisms of post-ischemic brain edema: contribution of circulatory factors. Stroke 1976, 7, 410—416.

Author's address: Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation, I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, 14 Gothua str, 380060 Tbilisi, USSR.

N. N. MELITAURI, V. N. CHIKVAIDZE

CHANGES IN THE CONTENT OF CYCLIC 3',5'-AMP
IN THE BRAIN OF RABBITS UNDER CIRCULATORY HYPOXIA
(ISCHEMIA)

Department of Neurochemistry,

I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR
Head of the Department: prof. dr P. A. Kometiani

It has been shown earlier that hypoxia of the brain is accompanied by considerable changes in the content of biogenic amines in the cerebral tissue (Chikvaidze, Melitauri, 1974). On the other hand, it is known, that cyclic 3',5'-AMP participates in the effect of biogenic amines (Domin, Fedenko, 1976; Abakumova, Fedorov, 1970; Kometiani, 1974) hence it could be assumed that in the process of hypoxia, the brain metabolism of cyclic 3',5'-AMP may also be considerably changed.

Studying the content of cyclic 3',5'-AMP in the cerebral tissue after decapitation Breckenridge (1974) showed that after 20 seconds it was already twice increased. The increase proceeds for about 1.5 min, and is followed by a gradual decrease. It is of interest that different areas of the brain differ considerably in this respect. The most pronounced increase of the amount of cyclic 3',5'-AMP occurs in the cerebellum, the least — in the cerebral cortex. The cause of this increase under decapitation is unknown. Analogous data were obtained by Schmidt et al. (1971). Other authors (Lust et al., 1975), studying a long-term ischemia in Mongolian gerbils, discovered that a significant increase of cyclic 3',5'-AMP in the cerebral cortex takes place after 2 hr-long ischemia with a subsequent decrease to the control level.

In continuation of our investigations on the biochemical aspects of brain ischemia, the aim of this work was to evaluate changes in the content of cyclic 3',5'-AMP and in the activity of enzymes controlling its level in different areas of the brain.

MATERIAL AND METHODS

Cerebral ischemia of rabbits was induced by the Mchedlishvili method (1973)*. Thin layer chromatography of dansyl-derivative of cyclic 3',5'-AMP was used to determine the amount of cyclic 3',5'-AMP, as well as the activities of adenylyl cyclase and phosphodiesterase, using a modification of the Jaliashvili and Chikvaidze method (1973). For the determination of cyclic 3',5'-AMP, the brain was placed into dry ice and 20 mg of the tissue was homogenized in 0,05 M HCl immediately after the termination of ischemia, then dansyl-chloride was added and the mixture was incubated for 1.5 hr at 30°C.

After dansylation the specimen was concentrated and plotted on a plate. At the end of the two-dimensional thin layer chromatography on silicagel, the plate with fluorescent spot of dansyl derivative of cyclic 3',5'-AMP was photographed under ultraviolet. The amount of cyclic 3',5'-AMP was determined by the thickness of the spot on the film.

The activity of adenylyl cyclase and phosphodiesterase was determined in the homogenate of the tissue. For the determination of the adenylyl cyclase activity incubation was performed according to Krishna et. al. (1968), for phosphodiesterase — according to Butcher and Sutherland (1962). The amount of synthesized cyclic 3',5'-AMP was evaluated from its increase during incubation. The decrease of the added cyclic 3',5'-AMP indicated the activity of phosphodiesterase. A detailed analysis is given in the work of Chilingarov et al. (1975).

Specimens for analysis were taken after 3 min and 15 min of ischemia, as well as after 30 min of recovery period.

RESULTS AND DISCUSSION

In our investigations we have chosen cerebellum and cerebral cortex on purpose, as these two structures differ considerably from each other in the cyclic 3',5'-AMP content and adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities. Our investigations have shown that 3 min ischemia produces an increase in the amount of cyclic 3',5'-AMP both in the cerebral cortex and cerebellum (Table 1). In the former it is increased by 47,46%, whereas in the latter — by 84,46%. During the next 15 minutes, the concentration of cyclic 3',5'-AMP in the cortex is maintained above the normal level. After restoration of the blood supply to the brain the level

* The authors express their gratitude to Z. T. Gordeladze who carried out experiments on animals in the Laboratory of Pathophysiology of Cerebral Blood Circulation of I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences.

of cyclic 3',5'-AMP in the cortex rises even more and in the 30th minute of recovery period it exceeds the norm by 62,0%. An analogous phenomenon is observed in the cerebellum with the difference that in the post-ischemic period the content of cyclic 3',5'-AMP is no more increased, though it is 41,71% above norm.

It is worth mentioning that in our former investigations carried out on the same experimental model (Chikvaidze, Melitauri, 1974), studying the distribution of catecholamines and serotonin in different parts of the rabbit brain, we found a decrease of all studied amines after 15 min ischemia both in the cerebral cortex and in the cerebellum, with the exception of noradrenaline of which the level was not changed in the cortex. Thus, we could not find a direct correlation between the level of biogenic amines and cyclic 3',5'-AMP in the cerebral tissue under ischemia. The decrease in the content of amines was expected to cause a corresponding decrease in the amount of cyclic 3',5'-AMP. Lust et al. (1975), in experiments with 2 hr ischemia in Mongolian gerbils could not find a correlation between the decrease of noradrenaline, dopamine and serotonin and the increase of cyclic 3',5'-AMP. The authors assumed that, despite its decrease, noradrenaline may be the cause of the increase of the cyclic 3',5'-AMP level, since even this amount of amine is above the minimum required for neuroreceptor binding.

The assumption that intensive release of amines from their depots takes place under long-term ischemia is doubtful, since it has been shown in a number of works (Ljunggren et al., 1974a; Roitbak, Labakhua, 1974) that brain ischemia produces a decrease in the electric activity of the brain — opposite to what might be expected to accompany the release of catecholamines.

Since increase of the cyclic 3',5'-AMP is usually related to changes in the activities of adenylyl cyclase and phosphodiesterase, we have undertaken simultaneous studies concerning the activity of both enzymes in the cerebral cortex and cerebellum under conditions of brain ischemia.

Our investigation have shown, that activity of adenylyl cyclase is not significantly changed by ischemia. Only in postischemic period the activity increases by 23,97%. On the other hand our previous investigations have shown that the concentration of noradrenaline in the cerebral cortex under applied type of ischemia is not changed and may be sufficient for the activation of adenylyl cyclase. The methods applied for the determination of the adenylyl cyclase activity could not reveal the ability of the enzyme to be activated under the influence of catecholamines. The activity of adenylyl cyclase was determined in the homogenate of the tissue without adding exoamines and endogenic amines could be easily destructed in the process of incubation.

Table 1. The changes in the cyclic 3', 5'-AMP level and adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities during ischemia and postischemic (period mean value of 5-6 experiments)

Tabela 1. Zmiany poziomu cyklicznego 3', 5'-AMP oraz aktywności cykazy adenylowej i fosfodwuesterazy w czasie niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu (średnie wartości z 5-6 doświadczeń)

		Cyclic 3', 5' -AMP $\mu\text{g/g}$ tissue Cykliczny 3', 5' -AMP $\mu\text{g/g}$ tkanki		Adenylyl cyclase $\mu\text{g/g}$ tissue/min Cyklaza adenylowa $\mu\text{g/g}$ tkanki/min		Phosphodiesterase $\mu\text{g/mg}$ tissue/min Fosfodwuesteraza $\mu\text{g/mg}$ tkanki/min	
		Brain cortex Kora mózgu	Cerebellum Móźdzek	Brain cortex Kora mózgu	Cerebellum Móźdzek	Brain cortex Kora mózgu	Cerebellum Móźdzek
Control Kontrola		15,21 \pm 1,15	15,94 \pm 2,03	4,63 \pm 0,65	4,21 \pm 0,78	0,96 \pm 0,08	0,15 \pm 0,02
Ischemia Niedokrwienie	3 min	22,43* \pm 2,0	29,43* \pm 2,38	5,02 \pm 0,82	5,57 \pm 0,82	0,63* \pm 0,09	0,23* \pm 0,03
Ischemia Niedokrwienie	15 min	20,42* \pm 1,96	23,31* \pm 2,23	4,83 \pm 0,39	6,26 \pm 0,21	0,70* \pm 0,08	0,25 \pm 0,04
Postischemia Okres po nie- dokrwieniu	30 min	24,69* \pm 1,52	22,59* \pm 1,97	5,74 \pm 0,14	4,48 \pm 0,67	0,85 \pm 0,10	0,33 \pm 0,04

* Statistically significant difference from control ($p < 0.05$)

* Różnica statystycznie znamienne ($0 < 0.05$)

It is known that the destruction of membranes by detergents, for instance preincubation with Triton X-100 causes activation of adenylyl cyclase, analogous to that by catecholamines and fluoride ions (Perkins, Moore, 1971). Ischemia by impairing the native structure of the membranes in the cerebral cells, might disturb the interrelation of amine receptors and catalytic centres of enzymes and thus may effect the influence of catecholamines on the adenylyl cyclase activity.

The other factor, which might be the cause of the accumulation of cyclic 3',5'-AMP in the cerebral cortex in the process of ischemia is the decrease of the phosphodiesterase activity. The reduction of the activity of phosphodiesterase was indeed observed in the cerebral cortex under ischemic condition. The recovery period was characterized by the return of the enzyme activity to its initial level.

Studying the changes in the amount of cyclic 3',5'-AMP in the myocardium of dogs under acute ischemia Vollenberger et al. (1972) discovered a sharp increase of this nucleotide on the 10th second and this level was maintained during further 10 minutes. The authors assumed that phosphodiesterase is inhibited during ischemia because of the decrease of pH of the tissue. The change of pH under ischemia is well-known. During ischemia and hypercapnia intracellular and extracellular pH of the brain is decreased by no more than 0.5 unit (Ljunggren et al., 1974b). Taking into account the fact that phosphodiesterase *in vitro* has a pH optimum of 7.5—9.2 (Blecher et al., 1968) and that under ischemia pH decrease to 7.0, such a slight decrease of pH can not cause a sharp inhibition of the activity of the enzyme. Therefore, the increase of cyclic 3',5'-AMP, especially under long-term ischemia, is not a consequence of the decrease of pH only.

In our experiments, changes of the activities of adenylyl cyclase and phosphodiesterase in the cerebral cortex under ischemic conditions are correlated with the change in the amount of cyclic 3',5'-AMP in the same region. Such a direct correlation between the activity of enzymes and the concentration of cyclic 3',5'-AMP is not observed in the cerebellum. The activity of adenylyl cyclase in the cerebellum under ischemia rises insignificantly and returns to the control level in the post-ischemic period. The cerebellar phosphodiesterase activity increases after 3 min of ischemia and on the 30th minute of postischemic period reaches 120% of the control value.

Phosphodiesterase has two forms: free and bound with the membranes (Cheung, 1970). They are characterized by different degrees of substrate affinity. Besides it is represented in the form of 7 isozymic modifications with greatly distinctive features (Campbell, Oliver, 1972). The existence of the membrane-bound form of the enzyme may become

an obstruction for the destruction of locally increased contents of cyclic 3',5'-AMP. There are references in the literature that hormones and amines exert their influence on the activity of some forms of phosphodiesterase. In the lungs of guinea-pigs phosphodiesterase is inhibited by 0.1 mM adrenaline and noradrenaline (Hitchcock, 1973). Dopamine inhibits this enzyme in the brain (Nahorski et al., 1973). The opinions are controversial, however, since 0.05 mM adrenaline or 1 mM of serotonin have been reported not to influence the activity of the enzyme in the cerebral tissue (Roberts, Simonson, 1970), the changes of the phosphodiesterase activity during ischemia can not be explained by the decrease of the concentration of amines. Mg^{++} and Ca^{++} ions have a considerable influence on the enzyme activity. Ca^{++} ions is necessary for phosphodiesterase activation with the help of an albumin regulator (Kakiuchi, Yamazaki, 1970). The impairment in the distribution of ions under ischemia may directly influence the phosphodiesterase activity.

It seems possible that some other factors, besides the above mentioned ones, may cause the change of adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities, as well as that of the concentration of cyclic 3',5'-AMP in the brain. Our present investigations are carried out in this direction. Thus, it can be concluded that the relation between changes in the cyclic 3',5'-AMP content and the activities of the enzymes regulating its cerebral tissue level exists, but this is complicated by quite a number of different factors.

N. N. Melitauri, V. N. Chikvaidze

ZMIANY ZAWARTOŚCI CYKLICZNEGO 3',5'-AMP W MÓZGU KRÓLIKÓW
W WARUNKACH NIEDOTLENIEŃ KRAŻENIOWEGO
(NIEDOKRWIENIA)

Streszczenie

Badano wpływ niedotlenienia krążeniowego w czasie niedokrwienia i w okresie poniedokrwinnym na zawartość cyklicznego 3',5'-AMP, aktywność cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy w korze mózgu i w móżdżku królików. W obu badanych okolicach mózgu po 3-minutowej ischemii stwierdzano wzrost zawartości cyklicznego 3',5'-AMP. W tych samych warunkach aktywność fosfodwuesterazy w korze mózgu obniża się, a w móżdżku wzrasta. 15-minutowe niedokrwienie nie powoduje dalszych zmian w zawartości cyklicznego AMP i w aktywności enzymów.

Okres po niedokrwieniu charakteryzuje wzrost cyklicznego AMP w korze mózgu i wzrost aktywności fosfodwuesterazy w móżdżku. Nie obserwowano wyraźnych zmian w aktywności cyklazy adenylowej, jakkolwiek w okresie po niedokrwieniu stwierdza się tendencję wzrostu aktywności tego enzymu. W korze mózgu zmiany stężenia cyklicznego AMP są skorelowane ze zmianami aktywności enzymów. W móżdżku takiej korelacji nie stwierdzono.

Н. Н. Мелитаури, В. Н. Чикваидзе

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОЙ 3',5'-АМФ
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ

Резюме

Было изучено влияние циркуляторной гипоксии (ишемии) и постишемии на изменение содержания цикл. 3',5'-АМФ, активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в коре и мозжечке головного мозга кроликов. В обоих участках мозга при трёхминутной ишемии обнаружено увеличение содержания цикл. 3',5'-АМФ. В этих же условиях активность фосфодиэстеразы в коре снижается, а в мозжечке увеличивается. Пятнадцатиминутная ишемия не вызывает дальнейших изменений в количестве цикл. 3',5'-АМФ и активности ферментов.

Постипшемический период характеризуется увеличением в коре мозга содержания цикл. 3',5'-АМФ, а в мозжечке активизируется фосфодиэстераза. Аденилатциклаза не выявила достоверных изменений в активности, хотя обнаруживается тенденция к увеличению активности в постишемическом периоде. В коре головного мозга изменение количества цикл. 3',5'-АМФ коррелирует с изменением активности ферментов. В мозжечке такая корреляция не наблюдается.

REFERENCES

1. Abakumowa O. J., Fedorov N. A.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and its biological role. (In Russ.) *Vopr. Med. Chim.* 1970, 16, 3—19.
2. Blécher M., Merlino N. S., Ro'Ane J. T.: Control of metabolism and lipolytic effects of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methyl xanthines and nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 3973—3977.
3. Breckenridge B. M.: The measurement of cyclic 3',5'-AMP in tissue. *Biochemistry* 1964, 52, 1583—1586.
4. Butcher R. W., Sutherland E. W.: Adenosine 3',5'-monophosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.* 1962, 273, 1244—1248.
5. Campbell M. T., Oliver I. T.: 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase in rat tissue. *Europ. J. Biochem.* 1972, 28, 30—37.
6. Cheung W. Y.: Role of cyclic AMP in cell function. Raven Press, New York, 1970, 51—65.
7. Chikvaidze V. N., Melitauri N. N.: Effect of ischemia on the regional distribution of biogenic amines in the brain of rabbits. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 671—682.
8. Chilingarov A. O., Melitauri N. N., Chikvaidze V. N.: The changes produced by amino acids in the level of cyclic 3',5'-AMP in the brain. *Izvestia Acad. Nauk GSSR*, 1975, 1, 160—165.
9. Domin N. N., Fedenko E. P.: Biological role of cyclic AMP. (In Russ.) *Uspechi biologicheskoi chimii*, 1976, 17, 63—101.
10. Hitchcock M.: Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase in guinea pig lung. Properties and effect of adrenergic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 959—969.
11. Jaliashvili T. A., Chikvaidze V. N.: Ultramicrodetermination of cyclic 3',5'-adenosine acid by thin layer chromatography using dansyl chloride. *Bull. Acad. Sci. Georgian SSR*, 1973, 71, 205—207.

12. Kakiuchi S., Yamazaki R.: Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1970, 41, 1104—1110.
13. Kometiani P. A.: Mechanism of the action of cyclic adenosine monophosphoric acid. *Mecniereba*, Tbilisi, 1974.
14. Krishna G., Weiss B., Brodie B.: A simple sensitive method for the assay of adenylyl cyclase. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1968, 663, 379—385.
15. Ljunggren B., Ratcheson R. A., Siesjö B. B.: Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.* 1974, 73, 291—307.
16. Ljunggren B., Schutz H., Siesjö B. B.: Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia. *Brain Res.* 1974, 73, 277—289.
17. Lust D. W., Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Passonneau J. V., Klatzo I.: Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of the cerebral cortex. *Brain Res.* 1975, 98, 394—399.
18. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
19. Nahorski S. R., Rogers K. I., Binns J.: Cerebral phosphodiesterase and the dopamine receptor. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1973, 25, 912—913.
20. Perkins J. P., Moore M. M.: Adenylyl cyclase of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 62—68.
21. Roberts E., Simonson D. G.: Some properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase of mouse brain: Effects of imidazol-4-acetic acid, chlorpromazine, cyclic 3',5'-GMP and other substances. *Brain Res.* 1970, 24, 91—111.
22. Roitbak A. J., Labakhua T. Sh.: Direct cortical responses during circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 683—693.
23. Schmidt M. J., Schmidt D. E., Robinson G. A.: Cyclic adenosine monophosphate in brain areas: Microwave irradiation as a means of tissue fixation. *Science* 1971, 173, 1142—1143.
24. Vollenberger A., Krauze E. G., Kheier G., Gentz S.: Behaviour and role of cyclic adenosinmonophosphate in the myocardium in its acute ischemia. *Path. Physiol. Exp. Ther.* 1972, 2, 13—16.

Author's address: Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation, Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, 380060 Tbilisi, 14 Gothua str., USSR.

ROMAN GADAMSKI

WPLYW NIEDOTLENIENIA HIPOKSYJNEGO
I NIEDOKRWIENIA NA AKTYWNOŚĆ AChE W MÓZGU SZCZURA
I CHOMIKA MONGOLSKIEGO (*MERIONES UNGUICULATUS*)

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

Dostarczenie odpowiedniej ilości tlenu do mózgu jest podstawowym czynnikiem jego prawidłowego funkcjonowania. Intensywność procesów oksydoredukcyjnych zachodzących w tkance nerwowej warunkuje wysoką wrażliwość OUN na niedotlenienie. Obniżenie zawartości O_2 we wdychanym powietrzu uruchamia fizjologiczne mechanizmy regulacji przepływu krwi przez naczynia mózgowe. Zapewniają one prawidłową dostawę tlenu nawet przy znacznych zmianach pO_2 krwi tętniczej. Utrzymanie prawidłowego przepływu krwi w mózgu zależy m.in. od pojemności wyrzutowej serca i układowego ciśnienia krwi. Jednakże niewydolność układu oddechowego i krążenia występuje dopiero w ciężkich stanach hipoksji, w których pO_2 krwi tętniczej spada poniżej wartości krytycznej. Obserwowane w tych drastycznych warunkach zmiany w potencjale energetycznym mózgu są więc skutkiem wtórnie rozwijającego się niedokrwienia (Ridge 1972, Siesjö i wsp. 1974). Pierwsze objawy zaburzeń funkcji mózgu występują już we wczesnych stadiach hipoksji (przy pO_2 krwi tętniczej wyższym od wartości krytycznej) i wyprzedzają zmiany w poziomie związków wysoko energetycznych z wyjątkiem fosfokreatyny (Schmahl i wsp. 1966, Siesjö i wsp. 1974).

Cięższe zaburzenia w OUN w porównaniu z niedotlenieniem wywołuje niedokrwienie. Wynikają one ze znacznego upośledzenia lub zahamowania przepływu krwi uniemożliwiającego zarówno odpływ metabolitów (zakwaszenie) jak też i prawidłową dostawę do mózgu glukozy i choliny oraz innych związków zapewniających prawidłowy metabolizm tkanki nerwowej.

Celem pracy było prześledzenie metodą histochemiczną aktywności AChE w mózgu szczura i chomika mongolskiego w warunkach doświadczalnego niedotlenienia hipoksyjnego i niedokrwienia.

MATERIAŁ I METODY

Zmiany aktywności AChE w OUN badano w modelu doświadczalnego niedotlenienia i niedokrwienia. Ocenę wpływu niedotlenienia hipoksyjnego na obraz histochemiczny AChE przeprowadzono u 36 szczurów rasy Wistar, obu płci. Zwierzęta podzielono na dwie grupy obejmujące po 18 szczurów. Szczury umieszczano (po dwa jednocześnie) w komorze hipoksyjnej o pojemności 3,5 l, przez którą przepuszczano mieszaninę o zmiennej zawartości N₂ i O₂. Procentową zawartość poszczególnych gazów ustalano przy użyciu przepływomierza gazowego oraz sprawdzano w analizatorze O₂. Zwierzęta grupy I poddawano 30 min. ekspozycji w mieszaninie gazowej zawierającej 4% O₂ i 96% N₂. Następnie wyjmowano je z komory hipoksyjnej i pozostawiano na przeżycie w normalnych warunkach zwierzętarnianych. Szczury dekapitowano w podgrupach obejmujących po 3 zwierzęta bezpośrednio po wyjęciu z komory oraz po przeżyciu 2, 4, 6, 24 i 48 godz. po niedotlenieniu. Identycznie postępowano ze zwierzętami grupy II z tą różnicą, że poddawano je 30 min. ekspozycji w mieszaninie zawierającej 8% O₂ i 92% N₂. Materiał do badań pobierano po takich samych okresach przeżycia jak w grupie pierwszej. Wyjęte bezpośrednio po dekapitacji mózgowia, utrwalano przez noc w płynie Backera, a następnie cięto mikrotomem mrozeniowym na skrawki grubości 15 μm. Aktywność AChE oznaczano wg metody El Badawi i Shenka (1967) z użyciem jodku acetylotiocholiny (BDH) jako substratu oraz iso-OMPA (amid kwasu czteroizopropylfosforowego, Koch-Light) jako swoistego inhibitora butyrylocholinerazy. Ocenę wpływu niedokrwienia na aktywność AChE przeprowadzono u 36 chomików mongolskich, którym w pełnej narkozie eterowej zaciskano lewą tętnicę szyjną wspólną na okres 15 min. W trakcie utrzymywania zacisku zwierzęta wybudzały się z narkozy dzięki czemu bezpośrednio po uwolnieniu ich ze stolika operacyjnego miały zdolność swobodnego poruszania się. Do badań pozostawiano wyłącznie te osobniki, które wykazywały przymusowe ruchy obrotowe w tę stronę, po której był założony zacisk. Tak wyselekcjonowane chomiki mongolskie, pozostawiano na przeżycie w standardowych warunkach zwierzętarnianych, a następnie dekapitowano w podgrupach złożonych z 3 zwierząt każda bezpośrednio po zdjęciu zacisku oraz po upływie 2, 4, 6, 24 i 48 godz. Dalsze przygotowanie materiału służącego do oceny histochemicznego odczynu na AChE przebiegało identycznie jak w grupie zwierząt poddanych niedotlenieniu. Materiał kontrolny stanowiły mózgi 3 szczurów nie poddawanych żadnym zabiegom oraz 3 chomików mongolskich dekapitowanych po upływie 15 min. od mo-

mentu wykonania w narkozie eterowej cięcia skórniego i odsłonięcia lewej tętnicy szyjnej wspólnej, na którą nie zakładano zacisku.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

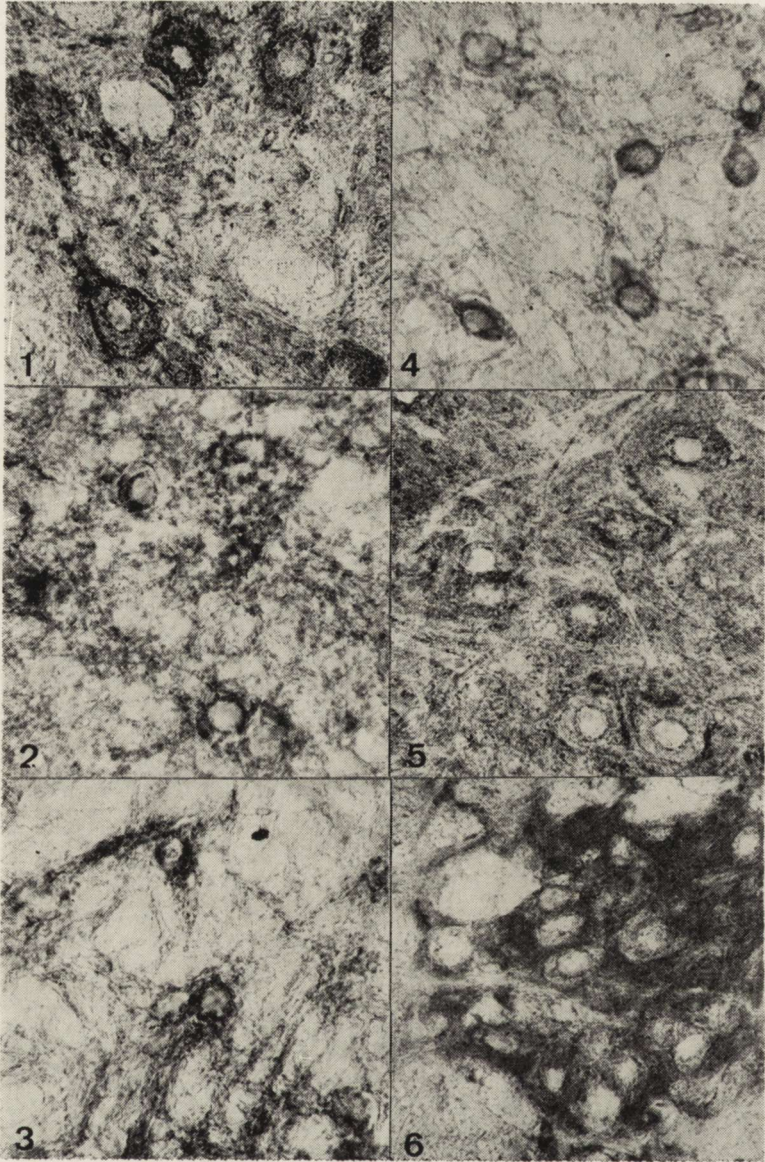
Szczury grupy I (30 min w atmosferze mieszaniny gazowej zawierającej 4% O₂ i 96% N₂) przez pierwsze 5 do 10 min. przebywania w komorze hipoksyjnej, wykazywały pobudzenie ruchowe oraz przyspieszenie akcji serca i oddechu. W ciągu następnych kilku minut objawy te ustępowały i od tego momentu aż do końca ekspozycji w warunkach niedotlenienia, obserwowano całkowite spowolnienie ruchowe, zwolnienie czynności oddechowej oraz bradykardię. Po otwarciu komory zaburzenia te stopniowo ustępowały i po około 5 min. przebywania w naturalnych warunkach atmosferycznych, normalizowała się akcja serca i rytm oddechowy, natomiast spowolnienie ruchowe ustępowało dopiero po upływie następnych kilku minut.

Szczury grupy II (30 min. w atmosferze 8% O₂ i 92% N₂) w trakcie doświadczenia wykazywały podobne, aczkolwiek mniej wyraźne objawy kliniczne, a zwłaszcza znacznie słabiej zaznaczone spowolnienie ruchowe w porównaniu z grupą I. Zaburzenia te, charakterystyczne dla okresu przebywania zwierząt w warunkach niedotlenienia, ustępowały prawie natychmiast po otwarciu komory hipoksyjnej.

W grupie zwierząt poddanych doświadczalnemu niedokrwieniu lewej półkuli mózgowej, jedynym objawem klinicznym obserwowanym bezpośrednio po zdjęciu zacisku z tętnicy szyjnej wspólnej były krótkotrwałe, przymusowe ruchy obrotowe wokół osi ciała lub po obwodzie koła o średnicy nie przekraczającej 30 cm. Ruchy te występowały u około 30% chomików mongolskich poddanych doświadczeniu.

Obserwacje histochemiczne

W OUN zwierząt kontrolnych nie stwierdzono istotnych różnic gatunkowych w lokalizacji oraz intensywności odczynu histochemicznego na AChE. Występowała natomiast znaczna odmienność w stopniu nagromadzenia oraz umiejscowieniu produktu końcowego reakcji w poszczególnych strukturach mózgu. Intensywny odczyn histochemiczny stwierdzano między innymi w neuronach i neuropilu jądra nerwu twarzonego (ryc. 1) i jądra nadwzrokowego (ryc. 2). Umiarkowany odczyn w neuropilu i silny w neuronach stwierdzano w gałce bladej (ryc. 3) oraz w jądrze pasma przekątnego Broca (ryc. 4). Duże nagromadzenie produktu końcowego w neuropilu i umiarkowane w neuronach obser-



Ryc. 1. Intensywny odczyn na AChE w neuronach i neuropilu jądra nerwu twarzowego. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 1. Intensive AChE reaction in neurons and neuropil of facial nerve nucleus. Control rat. × 400.

Ryc. 2. Wysoka aktywność AChE w neuronach i neuropilu jądra nadwzrokowego u kontrolnego chomika mongolskiego. Pow. 400 ×.

Fig. 2. High AChE activity in neurons and neuropil of supraoptic nucleus. Control gerbil. × 400.

wowano w jądrze nerwu podjęzykowego (ryc. 5). W jądrze bezimien-
nym zwracał uwagę bardzo silny odczyn histochemiczny w neuropilu
i słaby w komórkach nerwowych (ryc. 6). Podobnie wysoką aktywność
w neuropilu oraz jej brak w neuronach wykazywało jądro migdałowe
boczne (ryc. 7). Umiarkowany odczyn na AChE w neuronach przy jed-
nocześnie słabej lub śladowej aktywności enzymatycznej w neuropilu
spotykano w jądrze grzbietowym nerwu błędnego (ryc. 8), a także
w niektórych jądrach podwzgórze tj. w jądrze grzbietowo przyśrodko-
wym, brzuszno przyśrodkowym (ryc. 9) oraz w przykomorowym (ryc.
10). Rozkład aktywności enzymatycznej w korze mózgu (ryc. 11)
wyznaczał jej charakterystyczne uwarstwienie. Największe nagromadze-
nie produktu końcowego reakcji wykazywała strefa podoponowa war-
stwy drobinowej oraz niektóre neurony warstwy piramidowej zewnętrz-
nej i wewnętrznej. Brak odczynu histochemicznego na AChE lub jego
formę śladową obserwowano między innymi w spoidle wielkim i spoidle
przednim, w pęczkach włókien torebki wewnętrznej (ryc. 12) oraz w szla-
kach: wężowym bocznym, samotnym, piramidowym i w kolanku ner-
wu twarzowego (ryc. 13).

U zwierząt poddanych niedotlenieniu (30 min. przebywania w atmos-
ferze 4% O₂ i 96% N₂), w żadnym z badanych czasów przeżycia nie
stwierdzono spadku aktywności AChE, obserwowano natomiast zmianę
jej lokalizacji w neuropilu, a także w niektórych jądrach rdzenia prze-
dłużonego, śródmózgowia i międzymózgowia. Zmiany te polegały z re-
guły na spadku intensywności odczynu histochemicznego w cytoplazmie
komórek nerwowych, zwłaszcza w strefie przyjądrowej oraz jego wzro-
ście na błonie neuronów i w neuropilu. Duże nagromadzenie, często
pęcherzykowatych form produktu końcowego reakcji w sąsiedztwie

Ryc. 3. Intensywny odczyn na AChE w neuronach i umiarkowany w neuropilu
gąłki bladej. Chomik mongolski kontrolny. Pow. 350 ×.

Fig. 3. Intensive AChE reaction in neurons and moderate reaction in neuropil
of globus pallidus. Control gerbil. × 350.

Ryc. 4. Jądro pasma przekątnego Broca. Intensywny odczyn histochemiczny
w neuronach i umiarkowany w neuropilu. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

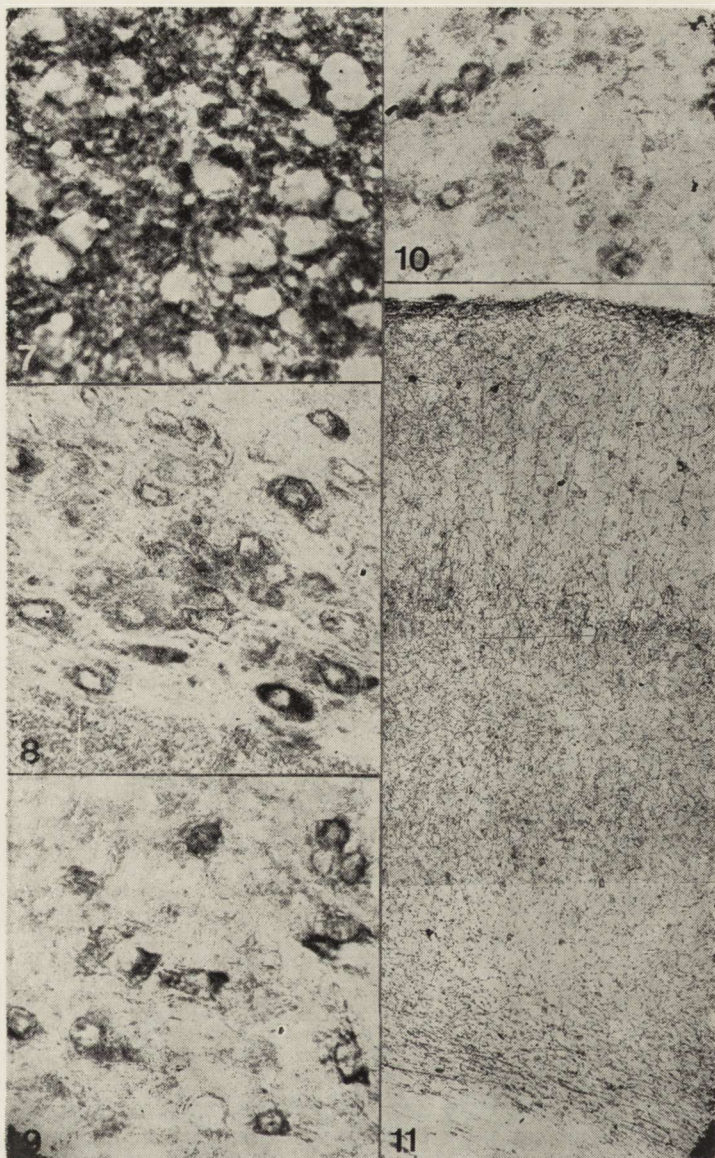
Fig. 4. Nucleus of Broc's diagonal band. Intensive histochemical reaction in neurons
and moderate in neuropil. Control rat. × 400.

Ryc. 5. Intensywny odczyn na AChE w neuropilu i umiarkowany w neuronach
jądra podjęzykowego. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Intensive AChE reaction in neuropil and moderate in neurons of hypo-
glossal nucleus. Control rat. × 400.

Ryc. 6. Jądro bezimienne. Wybitnie silna aktywność AChE w neuropilu i słaba
w komórkach nerwowych. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 6. Innominate nucleus. Very strong AChE reaction in neuropil and weak
reaction in nerve cells. Control rat. × 400.



Ryc. 7. Wybitnie silna aktywność AChE w neuropilu i sładwa w neuronach jądra migdałowego bocznego. Chomik mongolski kontrolny. Pow. 400 X.

Fig. 7. Very strong AChE activity in neuropil and weak reaction in neurons of lateral amygdalous nucleus. Control gerbil. X 400.

Ryc. 8. Jądro grzbietowe nerwu błędnego. Umiarkowana aktywność AChE w neuronach i słaba w neuropilu. Szczur kontrolny. Pow. 400 X.

Fig. 8. Dorsal nucleus of vagus nerve. Moderate AChE activity in neurons and weak reaction in neuropil. Control rat. X 400.

blony komórkowej (ryc. 14) w znacznym stopniu zacierało zarys poszczególnych neuronów. Opisany wyżej obraz odczynu histochemicznego najwyraźniej zaznaczony u szczurów grupy I, dekapitowanych bezpośrednio po niedotlenieniu, utrzymywał się również w drugiej i czwartej godzinie przeżycia, aczkolwiek w tych czasach zaznaczały się już tendencje powrotu do normy (ryc. 15).

W dłuższych badanych okresach przeżycia po niedotlenieniu (6, 24 i 48 godz.) obraz histochemiczny AChE u zwierząt doświadczalnych grupy I był podobny jak w kontroli. Ten sam rodzaj zmian w lokalizacji aktywności badanego enzymu, obserwowano również w OUN szczurów grupy II (30 min. przebywania w atmosferze 8% O₂ i 92% N₂) z tą różnicą, że były one słabiej zaznaczone i występowały jedynie u zwierząt dekapitowanych bezpośrednio po niedotlenieniu (ryc. 16).

W grupie zwierząt poddanych niedokrwieniu zmiany w odczynie histochemicznym występowały w półkuli lewej tzn. po stronie zaciśniętej tętnicy szyjnej wspólnej. Polegały one częściowo na przemieszczeniu, a zwłaszcza osłabieniu aktywności badanego enzymu w wielu strukturach nerwowych międzymózgowia i kresomózgowia. W śródmózgowiu obniżenie intensywności odczynu było znacznie mniej wyraźne, natomiast w mózdzku i rdzeniu przedłużonym nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności badanego enzymu w porównaniu z kontrolą. U chomików mongolskich dekapitowanych bezpośrednio po zdjęciu zacisku dominowały nieprawidłowości polegające na przemieszczeniu odczynu enzymatycznego analogicznym do opisanego w grupie zwierząt poddanych niedotlenieniu. Ustępowały one po 2 godz. przeżycia, a na ich miejsce pojawiało się obniżenie aktywności AChE szczególnie wyraźnie widoczne w strefie podoponowej warstwy drobinowej kory mózgowej, a także w niektórych jądrach międzymózgowia (ryc. 17, 18) i kresomózgowia (ryc. 19, 20). Zmiany te były jeszcze wyraźnie zaznaczone u zwierząt z 4-godz. przeżyciem, natomiast w 6 godz. po

Ryc. 9. Umiarkowany odczyn w neuronach i śladowy w neuropilu jądra brzuszno-przyśrodkowego u kontrolnego chomika mongolskiego. Pow. 400 X.

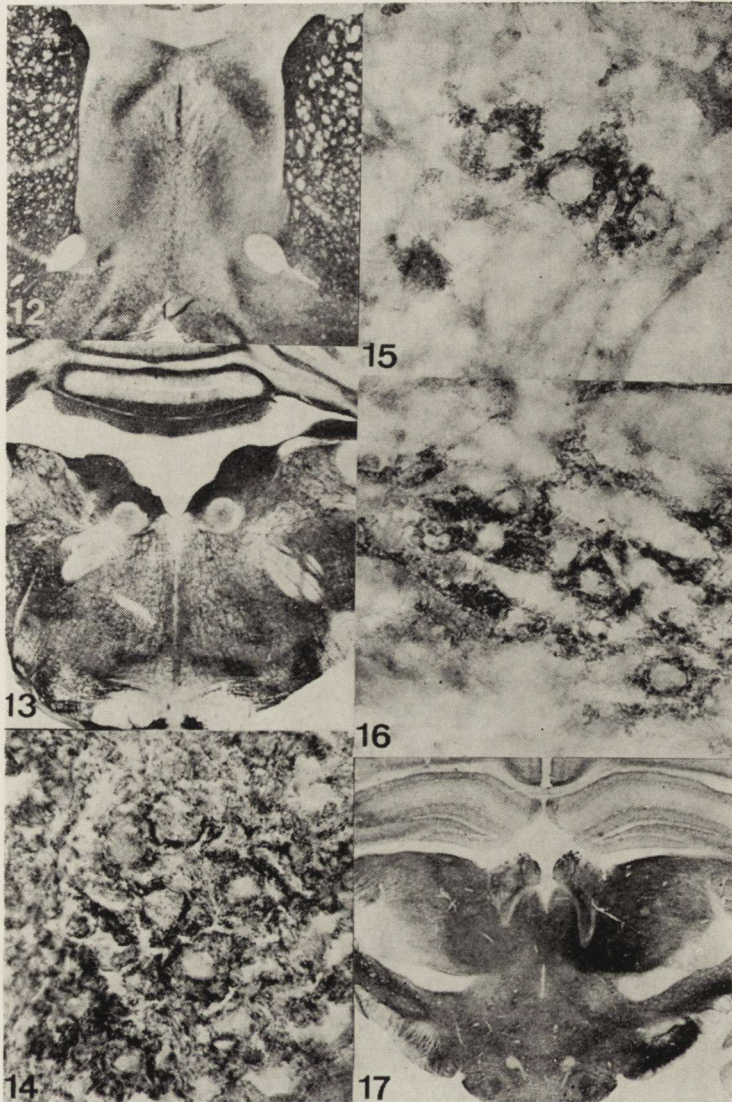
Fig. 9. Moderate reaction in neurons and trace activity in neuropil. Ventral medial nucleus. Control gerbil. X 400.

Ryc. 10. Jądro przykomorowe. W neuronach aktywność zróżnicowana od umiarkowanej do słabej. W neuropilu odczyn śladowy. Chomik mongolski kontrolny. Pow. 400 X.

Fig. 10. Paraventricular nucleus. Neuronal activity ranging from moderate to weak. Trace activity in neuropil. Control gerbil. X 400.

Ryc. 11. Rozmieszczenie aktywności AChE w korze mózgowej. Szczur kontrolny. Pow. 50 X.

Fig. 11. Distribution of AChE activity in cerebral cortex. Control rat. X 50.



Ryc. 12. Przekrój czołowy na wysokości przedniej części pola przegrodowego. Brak aktywności AChE w spoidle wielkim i spoidle przednim oraz w pęczkach włókien torebki wewnętrznej. Chomik mongolski kontrolny. Pow. 20 ×.

Fig. 12. Frontal section on the level of septal area. Absence of AChE reaction in corpus callosum and anterior commissure as well as in fibre bundles of internal capsule. Control gerbil. × 20.

Ryc. 13. Przekrój czołowy rdzenia przedłużonego. Słaba aktywność w kolanku nerwu twarzowego oraz śladowa w szlaku piramidowym. Szczur kontrolny. Pow. 20 ×.

Fig. 13. Frontal section of spinal cord. Weak reaction in genu of facial nerve and trace activity in pyramidal tract. Control rat. × 20.

niedokrwieniu zaznaczała się tendencja powrotu intensywności odczynu do normy.

W 24 i 48 godz. przeżycia obraz histochemiczny aktywności AChE był podobny do spotykanego w grupie zwierząt kontrolnych (ryc. 21).

OMÓWIENIE

Analiza odczynu histochemicznego u badanych zwierząt kontrolnych potwierdziła duże zróżnicowanie jego intensywności i rozmieszczenia w poszczególnych strukturach mózgowych. Obok różnic występujących w obrębie tego samego gatunku, znane są również międzygatunkowe odmienności w rozmieszczeniu struktur cholinergicznycy w OUN (Silver 1974). Fakty te mają istotne znaczenie przy ocenie obrazów histochemicznych dotyczących zmian w aktywności acetylocholinestery w mózgu pod wpływem różnorodnych czynników uszkodzających, w tym również wywołanych niedostatkim tlenu w powietrzu oddechowym oraz niedokrwieniem. W materiale kontrolnym pochodzącym od obu badanych gatunków zwierząt, nie stwierdzono istotnych różnic w intensywności i rozmieszczeniu odczynu histochemicznego. U zwierząt doświadczalnych zwracał natomiast uwagę odmienny charakter

Ryc. 14. Obraz histochemiczny aktywności AChE w jądrze nerwu podjęzykowego szczura poddanego 30 min. hipoksji w mieszaninie gazowej zawierającej 4% O₂. Materiał pobrany w czasie „0”. Por. z ryc. 5. Pow. 400 ×.

Fig. 14. Histochemical picture of AChE activity in nucleus of hypoglossal nerve of a rat subjected to 30 min hypoxia with 4% O₂. Time „0”. Compare to Fig. 5. × 400.

Ryc. 15. Neurony jądra pasma przekątnego Broca. Nagromadzenie produktu końcowego reakcji na błonach komórkowych oraz w pęcherzykowatych tworach przylegających do błon. 2 godz. przeżycia po 30 min ekspozycji w mieszaninie gazowej zawierającej 4% O₂. Pow. 450 ×.

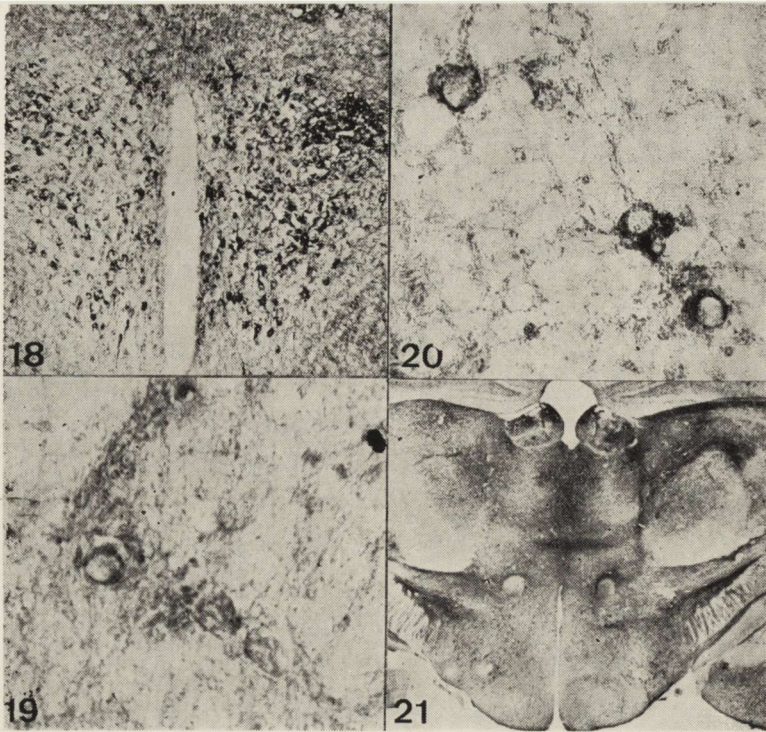
Fig. 15. Neurons of Broca's diagonal band nucleus. Accumulation of the reaction product in cell membranes and in adjacent vesicular bodies. 2 hrs survival after 30 min hypoxia with 4% O₂. × 450.

Ryc. 16. Neurony jądra nadwzrokowego szczura po 30 min. ekspozycji w mieszaninie gazowej zawierającej 8% O₂. Materiał pobrany w czasie „0”. Nieznaczne przemieszczenie odczynu histochemicznego w obrębie komórek nerwowych. Duże nagromadzenie produktu końcowego reakcji w sąsiedztwie neuronów. Pow. 400 ×.

Fig. 16. Neurons of supraoptic nucleus of rat 30 minutes after exposure to 8% O₂. Time „0”. Slight translocation of the histochemical reaction within nerve cells. Marked accumulation of the reaction product in the vicinity of neurons. × 400.

Ryc. 17. Przekrój czołowy na wysokości wzgórza wzrokowego chomik mongolskiego w 2 godz. przeżycia po 15 min. niedokrwieniu. Widoczne osłabienie aktywności AChE w lewej półkuli mózgu. Pow. 20 ×.

Fig. 17. Frontal section on the level of optic thalamus of Mongolian gerbil. 2 hrs survival after 15 min ischemia. Weaker AChE reaction in the left cerebral hemisphere. × 20.



Ryc. 18. Jądro przykomorowe chomika mongolskiego w 4 godz. po 15 min niedokrwieniu. Widoczne osłabienie aktywności AChE po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej wspólnej. Pow. 50 \times .

Fig. 18. Paraventricular nucleus of Mongolian gerbil 4 hrs after 15 min. ischemia. Weaker AChE reaction on the side of the ligated common carotid artery. $\times 50$.

Ryc. 19. Widoczne osłabienie aktywności AChE w komórkach nerwowych i w neuropilu gałki bladej u chomika mongolskiego w 4 godz. przeżycia po niedokrwieniu. Pow. 400 \times .

Fig. 19. Marked weakening of the AChE reaction in nerve cells and neuropil of corpus callosum in Mongolian gerbil 4 hrs survival after ischemia. $\times 400$.

Ryc. 20. Jądro pasma przekątnego Broca chomika mongolskiego w 6 godz. przeżycia po niedokrwieniu. Wyraźne osłabienie aktywności AChE w neuropilu oraz zaznaczająca się tendencja powrotu do normy intensywności odczynu histochemicznego w neuronach. Pow. 400 \times .

Fig. 20. Broc's diagonal band nucleus in Mongolian gerbil 6 hrs survival after ischemia. Weakening of AChE activity in neuropil and marked tendency towards a return to control intensity of the histochemical reaction in neurons. $\times 400$.

Ryc. 21. Przekrój czołowy na wysokości środkowej części podwzgórza. Równomierny rozkład aktywności AChE w półkulach mózgowych. Chomik mongolski w 24 godz. przeżycia po niedokrwieniu. Pow. 20 \times .

Fig. 21. Frontal section on the level of the central part of hypothalamus. Equal distribution of AChE activity in cerebral hemispheres. Mongolian gerbil 24 hrs survival after ischemia. $\times 20$.

zmian w odczynie histochemicznym badanego enzymu w zależności od czynnika uszkadzającego.

Zmniejszenie zawartości tlenu we wdychanej mieszaninie gazowej, powodowało przemieszczenie produktu końcowego reakcji, dające w efekcie charakterystyczne jego nagromadzenie na błonach neuronów oraz w elementach tkanki nerwowej, przylegających do nich. Obniżenie zawartości tlenu do 4 i 8% nie ujawniało zasadniczych różnic w histochemicznym obrazie odczynu na AChE natomiast ich nasilenie było zależne od stopnia niedostatku tlenu. Podobnie, dynamika ustępowania zmian w odczynie histochemicznym w okresie poniedokrwicznym wykazywała zależność czasową od głębokości niedotlenienia. Przemieszczenie produktu końcowego reakcji, stanowiące najistotniejszy wykładnik wpływu niedotlenienia na zachowanie się AChE w mózgu szczura, występowało również, aczkolwiek w znacznie mniej wyraźnej formie u zwierząt poddanych niedokrwieniu. Należy podkreślić, że ten rodzaj nieprawidłowości w obrazie histochemicznym występował wyłącznie u zwierząt dekapitowanych bezpośrednio po niedokrwieniu, natomiast w kolejnych czasach przeżycia (do 6 godz. łącznie) dominowało obniżenie aktywności badanego enzymu. Przedstawione wyniki są na ogół zgodne z doniesieniami innych autorów. Książak (1974), badając wpływ niedoboru tlenowego na metabolizm acetylocholino (ACh) nie stwierdziła w żadnym przypadku obniżenia aktywności acetylocholinesterazy. Burshottam i Ghosh (1975) obserwowali natomiast statystycznie znamienne wzrost aktywności tego enzymu w homogenatach z półkul mózgowych. Rozbieżność ta z przedstawionymi przez nas wynikami może wynikać z odmiennych warunków doświadczalnej hipoksji. Istotą naszych spostrzeżeń są zmiany w lokalizacji odczynu histochemicznego, wywołane niedotlenieniem. Mechanizm tego zjawiska jest niejasny. Nagromadzenie produktu końcowego na błonach neuronów przy jednocześnie zmniejszonej jego ilości w cytoplazmie, może być wynikiem zmniejszenia szybkości syntezy AChE zachodzącej w ciele komórki nerwowej. Z drugiej strony przemieszczenie aktywności badanego enzymu w rejon błony komórkowej może być wynikiem uruchomienia pod wpływem niedostatku tlenowego pewnych mechanizmów kompensacyjnych. Uruchomienie ich mogłoby prowadzić do obniżenia zawartości acetylocholino, obserwowanego przez Welsha (1943) oraz Crosslanda i Richtera (1950) w mózgu zwierząt poddanych niedotlenieniu. Na podstawie objawów klinicznych spostrzeganych u zwierząt I grupy doświadczalnej można sądzić, że w naszym materiale również zmniejsza się nagromadzenie ACh. Przemawia za tym całkowite spowolnienie ruchowe zwierząt, występujące między 5 a 10 min. przebywania w komorze hipoksyjnej, które może być wynikiem hamowania czynności bio-

elektrycznej OUN. Za obniżenie puli acetylocholinyl mogą być odpowiedzialne dwa czynniki. Jednym z nich jest przyspieszona hydroliza tego mediatora (przy udziale AChE), drugim natomiast zwolnienie jego syntezy odbywającej się przy użyciu energii pochodzącej z rozpadu ATP. Na podstawie doniesień innych autorów (Siesjö i wsp. 1974b) wiadomo, że odpowiednio głęboka hipoksja prowadzi do obniżenia puli związków wysokoenergetycznych. Przedmiotem naszych badań była wyłącznie ocena zmian w aktywności AChE pod wpływem określonych warunków niedoboru tlenu. Uzyskane wyniki nie upoważniają zatem do jednoznacznej odpowiedzi, który z wymienionych wyżej czynników, prowadzących do obniżenia zawartości ACh, odgrywa dominującą rolę w stosowanym przez nas modelu doświadczalnej hipoksji. Wobec braku wykładników wzrostu aktywności AChE w obrazie histochemicznym można przypuszczać, że przemieszczenie cytoplazmatycznych rezerw tego enzymu, warunkuje przyspieszenie hydrolizy acetylocholinyl w obrębie synaps przylegających do błon komórek nerwowych. Równocześnie należy brać pod uwagę możliwość zwolnienia syntezy mediatora na skutek wyczerpywania się zasobów związków wysokoenergetycznych. W ocenie nieprawidłowości związanych ze zmianami w lokalizacji badanego enzymu, na uwagę zasługuje zgodność czasowa ich powstawania i cofania się z zaburzeniami w mikrokrążeniu opisanymi w tym samym modelu hipoksji przez Wierzbę (1977).

Odmienny charakter zmian w obrazie histochemicznym AChE w niedotlenieniu i niedokrwieniu świadczy o ich różnym wpływie na funkcje OUN. Różnice te wynikają z zahamowania lub znacznego zmniejszenia przepływu krwi w niedokrwieniu, przy zachowanym, a nawet zwiększonym przepływie w niedotlenieniu (Cohen 1972; Siesjö i wsp. 1974a). Upośledzenie prawidłowego ukrwienia wiąże się z zubożeniem zaopatrywania mózgu w glukozę, cholinę i inne substraty konieczne do prawidłowego metabolizmu tkanki nerwowej. W tych warunkach mózg pozbawiony jest także możliwości odpływu metabolitów. Zaznacza się również różnica w nagromadzeniu końcowych produktów glikolizy. W porównaniu z hipoksją, w ischemii nagromadzenie mleczanu jest większe, natomiast mniejsze pirogronianu (Duffy i wsp. 1972). Różnice te mają zapewne wpływ na przemiany innych związków, uzależnione od podstawowego substratu energetycznego mózgu, w tym także na synteżę acetylocholinyl. Obniżenie puli tego mediatora w ischemii podkapitacyjnej opisali Księżak i wsp. (1974). Można przypuszczać, że do podobnego spadku ACh dochodzi również w warunkach niedokrwienia lewej półkuli mózgowej u chomika mongolskiego. Obserwowany w badanym przez nas materiale spadek aktywności acetylocholinesterazy wiąże się prawdopodobnie z hamowaniem czynności bioelektrycz-

nej OUN warunkowanym zmniejszeniem szybkości syntezy acetylocholiny.

Należy podkreślić, że opisane przez nas nieprawidłowości w obrazie histochemicznym AChE wywołane zarówno niedoborem tlenu i niedokrwieniem były słabo zaznaczone, krótkotrwałe i w pełni odwracalne.

R. Гадамски

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЙНОГО НЕДОСТАТКА КИСЛОРОДА
И НЕДОСТАТОЧНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АХЭ
В МОЗГЕ КРЫСЫ И МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА

Резюме

Влияние гипоксии на активность АХЭ в ЦНС исследовалось на крысах породы Вистар. Животных помещали в гипоксионную камеру, через которую пропускали газовую смесь состава: 4% O₂ и 92% N₂ — первая опытная группа, и 8% O₂ и 92% N₂ — вторая группа. Крыс декапитировали после вынятия из камеры (время „О”) и спустя 2, 4, 6, 24, а также 48 часов после воздействия гипоксии.

Влияние ишемии исследовали на монгольских хомяках, которым подвергали пережатию сонную артерию в течение 15 мин. и проводили их декапитацию в те же часы, что животных подвергнутых гипоксии. Активность АХЭ определялась по методу Эл Бадави и Шенка (1967).

У животных, находящихся в течение 30 мин. в атмосфере 4% O₂, не наблюдали изменений в активности АХЭ. Однако перемещение гистохимической реакции, характеризующееся нагромождением конечного продукта реакции, наблюдали на мембране нейронов, а также в нейропиле, находящимся в соседстве этих мембран. Изменения эти, намечающиеся отчетливее всего во времени „О”, сохранялись до 4 часов выживания. Нарушения гистохимической реакции у животных II группы (30 мин. на атмосфере 8% O₂) имели подобный характер, однако были слабее выражены и имели место исключительно во время „О”.

Пережатие левой сонной артерии вызывало изменения активности АХЭ в левом полушарии головного мозга. Они характеризовались перемещением конечного продукта реакции во время „О” и снижением активности в 2, 4, и 6 часах выживания после ишемии.

R. Gadamski

EFFECT OF HYPOXIA AND ISCHEMIA ON THE AChE ACTIVITY
IN RAT AND GERBIL BRAIN

Summary

The effect of hypoxia on the AChE activity in CNS was studied on Wistar rats. The animals were placed for 30 minutes in a hypoxic chamber with a continuous flow of the mixture of 4% O₂ and 96% N₂ (group I) or 8% O₂ and 92% N₂ (group II). The animals were sacrificed directly (time „0”) and 2, 4, 6, 24 and 48 hrs after the hypoxic exposure. The effect of ischemia was studied on Mongolian gerbils, in which the left common carotid artery was occluded for 15 minutes. The animals were decapitated at time intervals identical to those applied to

the hypoxic rats. The AChE activity was determined with the method of El Badawi and Shenk (1967).

Exposure to 4% oxygen did not produce changes in the enzyme activity; it led, however, to translocation of the histochemical reaction, characterized by an accumulation of the final reaction product in the neuronal membranes and the surrounding neuropil. The changes were most pronounced at time „0”, but could still be observed 4 hrs after the exposure. The histochemical alterations in group II were similar but less marked and occurred exclusively at time „0”.

The changes in the AChE activity following occlusion of the left common carotid artery were localized in the left cerebral hemisphere and included a translocation of the reaction product at time „0” and a decreased enzyme activity after 2, 4 and 6 hrs.

PIŚMIENNICTWO

1. Burshottam T., Ghosh N. C.: Effect of acute hypoxia on the enzymes involved in the metabolic and nervous functioning of rat brain. *Environ. Physiol. Biochem.* 1975, 5, 73—77.
2. Cohen P. J.: The metabolic function of oxygen and biochemical lesions of hypoxia. *Anesthesiology* 1972, 37, 148—177.
3. Crossland J., Richter D.: Relation of functional activity of the brain to its acetylcholine content in anoxia. *Abstr. 18th Int. Physiol. Congr., Copenhagen 1950*, 170—171.
4. Duffy T. E., Nelscn S. R., Lowry O. H.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J. Neurochem.* 1972, 19, 959—977.
5. El Badawi A., Schenk F. A.: Histochemical methods for separate consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephryne cryostat sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1967, 15, 580—588.
6. Księżak H., Zaleska M., Gromek A.: Level of total and bound acetylcholine in conditions of hypoxia, ischemia and barbiturate anesthesia in guinea pig brain. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 1974, 22, 649—656.
7. Ridge J.: Hypoxia and the enzyme charge of cerebral adenylate pool. *Biochem. J.* 1972, 127, 351—355.
8. Schmahl F. W., Betz E., Dettinger E., Hohorst H. J.: Energiestoffwechsel der Grosshirnrinde und Electroencephalogramm bei Sauerstoffmangel. *Pflüegers Arch.* 1966, 292, 46—59.
9. Siesjö B. K., Johannsson H., Ljunggren B., Norberg K.: Brain dysfunction in metabolic disorders. Ed. F. Plum, Raven Press, New York, 1974 a, 53, 75—112.
10. Siesjö B. K., Norberg K., Ljunggren B., Salford L.: Hypoxia and cerebral metabolism. W: A basis and practice of neuroanaesthesia. Ed. E. Gordon, 1974 b, 47—82.
11. Silver A.: The biology of cholinesterases. *Research Monographs Frontiers of Biology*, vol. 36, North-Holland, Amsterdam, Oxford, 1974.
12. Welsh J. H.: Acetylcholine level of rat cerebral cortex under conditions of anoxia and hypoglycemia. *J. Neurophysiol.* 1943, 6, 329—336.
13. Wierzba T.: Wpływ niedotlenienia na mikrokążenie w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 183—191.

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

MARIA OSTENDA

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE SYNAPS
W NIEDOKRWIENIU MÓZGU U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

(*Meriones unguiculatus*)

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

Tętnice podstawy mózgu chomika mongolskiego nie tworzą pełnego koła tętniczego Willisa na skutek braku zespolenia tętniczego tylnego (Kahn 1972, Klatzo 1975), dzięki temu podwiązanie jednej z tętnic szyjnych powoduje jednostronne niedokrwienie mózgu. Chomik mongolski stanowi więc dogodny model do badań zaburzeń w krążeniu mózgowym. Badania tego modelu nasuwają przypuszczenie, że w toku procesów spowodowanych niedokrwieniem ulega uszkodzeniu przede wszystkim neuron (Spatz, Klatzo 1976, Bubis i wsp. 1976). Można przeto sądzić, że zmiany dotyczą również jego wypustek i zakończeń. Stwierdzone zmiany metabolizmu glukozy we frakcji synaptosomalnej oraz spadek poziomu katecholamin po stronie niedokrwionej (Spatz, Klatzo 1976, Mrsulja i wsp. 1976), nasuwają przypuszczenie, że układ synaptyczny może odgrywać pewną rolę w mechanizmie kształtowania procesów ischemicznych w tkance mózgowej. Dlatego też podjęto próbę zbadania obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps mózgu chomików mongolskich w toku niedokrwienia.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 11 chomikach mongolskich, obu płci, wagi 70—80 g. W lekkiej narkozie eterowej podwiązano lewą tętnicę szyjną, po 15 minutach usuwano zacisk. Do badań użyto zwierzęta, u których stwierdzono klinicznie objawy jednostronnego niedokrwienia mózgu (Kahn 1972); uśmiercano je przez dekapitację w następujących odcinkach czasu po zdjęciu zacisku: natychmiast (czas „0”) oraz po upływie 2, 4 i 24 godz. Jako kontrola służył jeden chomik mongolski nie operowany oraz jedno ze zwierząt doświadczalnych, które po zdjęciu

zacisku nie wykazywało objawów niedokrwienia. Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano bloczki tkanki wielkości około 1 mm³ i utrwalano przez imersję. Materiał pobierano z kory ciemieniowej oraz z kory amonalnej, symetrycznie z półkuli lewej i prawej. Pobrane skrawki opracowywano dwiema metodami.

Do badań rutynowych w mikroskopie elektronowym materiał utrwalano 2 godziny w 4% roztworze aldehydu glutarowego w buforze Milloniga o pH 7,2, a następnie w 2% roztworze czterotlenku osmu. Bloczki odwadniano w alkoholach i zatapiano w Eponie 812.

Impregnację pęcherzyków synaptycznych wykonywano metodą Champy-Maillet w modyfikacji Kawany i wsp. (1969). Bloczki utrwalano 3 godziny w 5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze Milloniga o pH 7,2, po czym płukano w płynie o następującym składzie: 3,3 g NaCl; 0,6 g CaCl₂; 0,31 g MgCl₂ · H₂O; 0,605 g Tris o pH 7,4; woda destylowana do 100 ml. Bloczki dzielono na małe kawałki i impregnowano przez 15 godzin w płynie zawierającym 4 ml stężonego roztworu jodku cynku z dodatkiem 4 ml buforu Tris o pH 7,4 i 2 ml 2% OsO₄. Utrwalony materiał płukano dwukrotnie w buforze Tris, a następnie odwadniano i zatapiano jak do rutynowych badań w mikroskopie elektronowym.

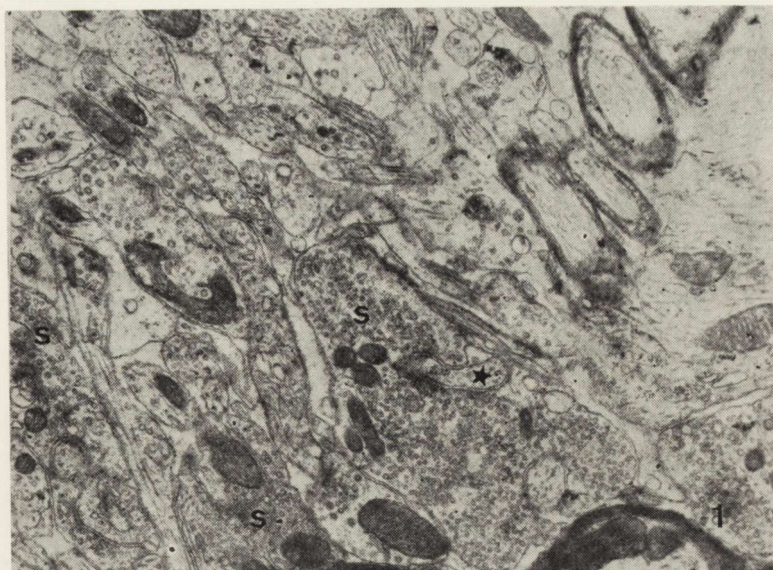
Zatopione bloczki skrawano na ultramikrotomie LKB 8800 III, kontrastowano cytrynianem ołowiu i octanem uranylu; przeprowadzano obserwacje i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 500.

WYNIKI

W korze mózgu, zarówno ciemieniowej jak i amonalnej, chomika mongolskiego zwraca uwagę niezwykła liczebność połączeń synaptycznych. Zawierają one bardzo dużą ilość pęcherzyków. Niekiedy część presynaptyczna błony tworzy wypustki i otacza część zakończenia postsynaptycznego (ryc. 1). Impregnacja jodkiem cynku i osmem wykazuje, że znaczna większość pęcherzyków synaptycznych wypełniona jest gęstą elektronooptycznie zawartością (ryc. 2). Opisany powyżej obraz obserwowano u chomików mongolskich kontrolnych w obu półkulach.

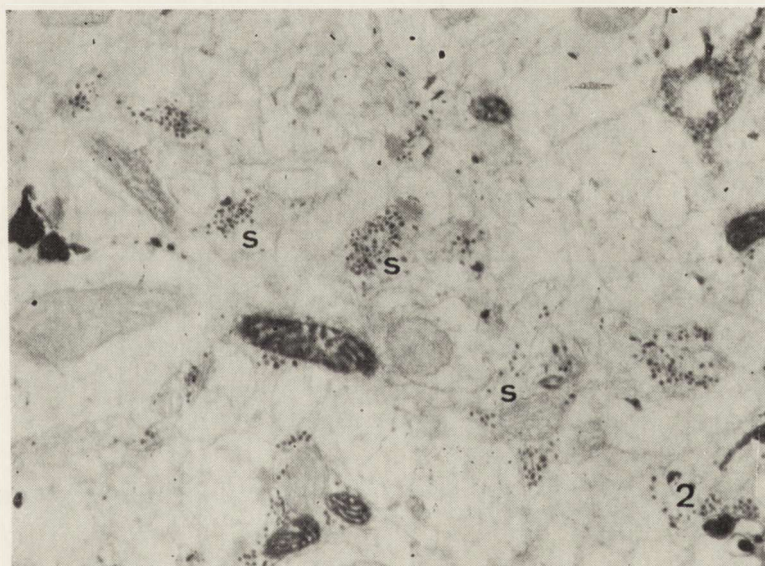
Natychmiast po zdjęciu zacisków (czas „0”) w synapsach obu półkul pojawiła się znaczna ilość pęcherzyków, gromadzących się niekiedy przy błonach synaptycznych; pęcherzyki te są wypełnione zawartością osmofilną.

W okresie 2—4 godziny po zdjęciu zacisku pęcherzyki gromadzą się przy błonach synaptycznych, tworząc niekiedy większe zgrupowania. Poza tym w zakończeniach presynaptycznych pojawiają się wodniczki



Ryc. 1. Róg Amona lewy. Liczne zakończenia synaptyczne, duża ilość pęcherzyków synaptycznych (s), część postsynaptyczna otoczona wypustką presynaptyczną (gwiazdka). Pow. 9.000 \times .

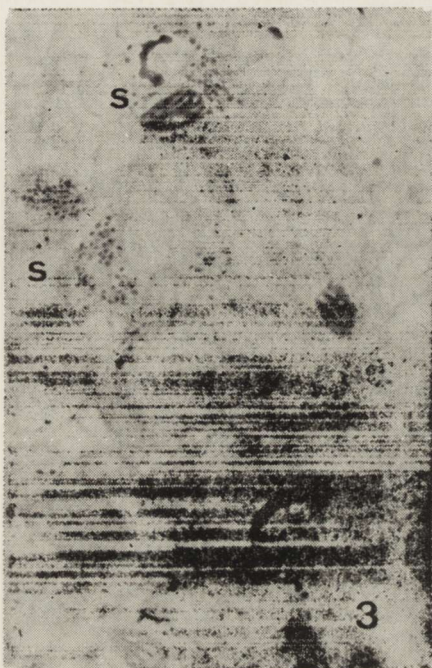
Fig. 1. Left Ammon horn. Numerous synaptic endings, great number of synaptic vesicles (s), postsynaptic part surrounded by presynaptic process (asterix). $\times 9\,000$.



Ryc. 2. Róg Amona prawy. ZIO. Liczne zakończenia presynaptyczne (s), pęcherzyki synaptyczne wypełnione masą osmofilną. Pow. 9.000 \times .

Fig. 2. Right Ammon horn. ZIO. Numerous presynaptic endings (s), synaptic vesicles filled with osmophilic mass. $\times 9\,000$.

oraz ciała wielopęcherzykowe. Zmiany są łatwiej uchwytne w rogu Amona niż w korze ciemieniowej. Występują one w obu półkulach, jednakże znacznie obficie po stronie niedokrwionej. Zawartość osmofilna znika z pęcherzyków po stronie niedokrwionej (ryc. 3, 4).



Ryc. 3. Róg Amona prawy, 4 godz. ZIO. Pęcherzyki synaptyczne wypełnione zawartością osmofilną (s). Pow. 9.000 X.

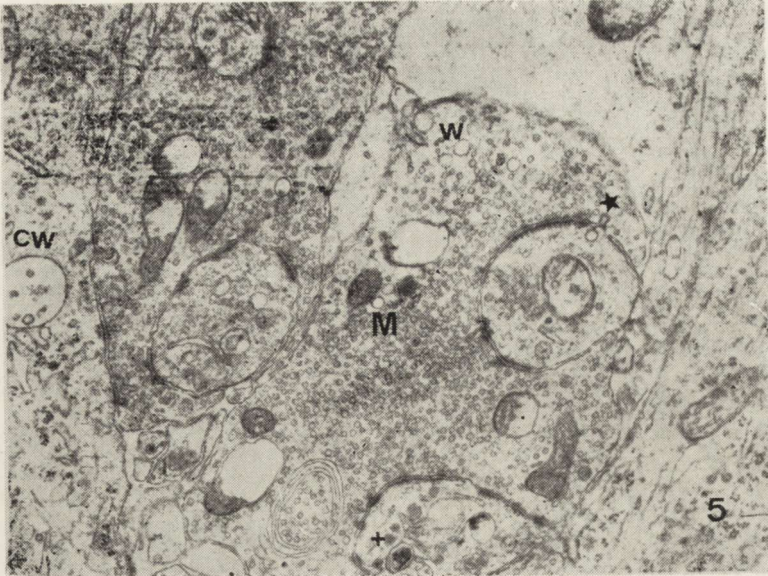
Fig. 3. Right Ammon horn, 4 hours. ZIO. Synaptic vesicles filled with osmophilic content. (s) X 9 000.



Ryc. 4. Róg Amona lewy, 4 godz. ZIO. W części presynaptycznej złącza (gwiazdka) pojedyncze pęcherzyki wypełnione zawartością osmofilną. Pow. 16.000 X.

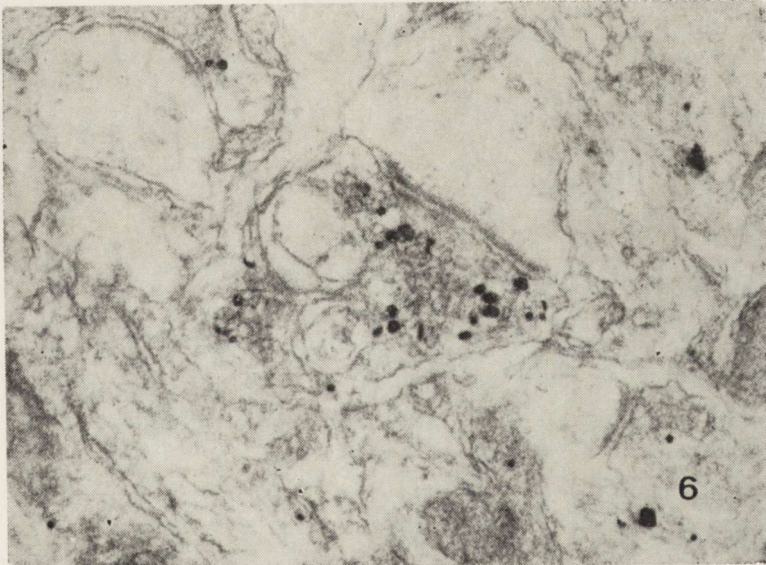
Fig. 4. Left Ammon horn, 4 hours. ZIO. In presynaptic part of the junction (asterix) single vesicles filled with osmophilic content. X 16 000.

Po upływie 24 godzin zmiany są znacznie wyraźniejsze. Wśród pęcherzyków synaptycznych pojawiają się liczne pęcherzyki nieco większych rozmiarów, o średnicy 30 do 50 nm, elektronowo przeziernie. Widoczne są również pęcherzyki opłaszczone oraz ciała wielopęcherzykowe (ryc. 5). Wśród pęcherzyków synaptycznych pojawiają się często grupy mitochondriów o ciemnej macierzy, lub wydłużonych grzebieniach (ryc. 5). Zmiany te występują zarówno po stronie niedokrwionej jak i ukrwionej. Po stronie niedokrwionej występuje znaczne zmniejszenie zawartości osmofilnej w pęcherzykach synaptycznych. Spotykamy liczne sy-



Ryc. 5. Róg Amona prawy, 24 godz. W synapsach liczne drobne wodniczki (w), za-
toka pinocytarna w błonie synaptycznej (gwiazdka), ciało wielopęcherzykowe (cw),
ciało mielinopodobne (+), mitochondria o ciemnej macierzy (M). Pow. 9.000 X.

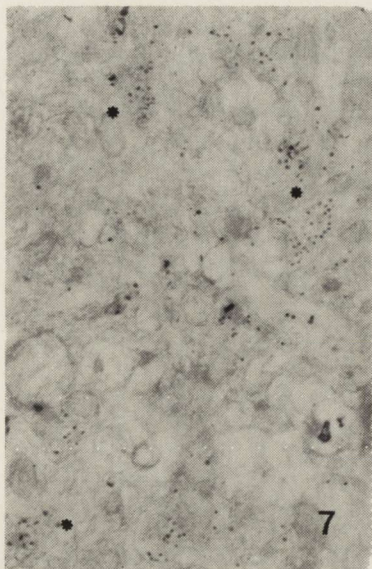
Fig. 5. Right Ammon horn, 24 hours. Numerous small vacuoles (w) in synapses,
pinocytotic sinus in synaptic membrane (asterisk), multivesicular body (cw), myelin-
like body (+), mitochondria with dark matrix (M). X 9 000.



Ryc. 6. Róg Amona lewy, 24 godz. ZIO. Nieliczne pęcherzyki synaptyczne wypeł-
nione zawartością osmofilną. Pow. 16.000 X.

Fig. 6. Left Ammon horn, 24 hours. ZIO. Some synaptic vesicles filled with
osmophilic content. X 16 000.

napsy, w których tylko pojedyncze pęcherzyki zawierają elektronowo gęste masy (ryc. 6, 7). Natomiast po stronie z zachowanym krążeniem w przeważającej ilości pęcherzyków synaptycznych znajduje się zawartość osmofilna (ryc. 8).



Ryc. 7. Kora ciemieniowa prawa, 24 godz. ZIO. W wielu pęcherzykach synaptycznych zawartość osmofilna (gwiazdki). Pow. 9.000 \times

Fig. 7. Right parietal cortex, 24 hours. ZIO. In numerous synaptic vesicles osmophilic content (asterix). $\times 9000$.



Ryc. 8. Kora ciemieniowa lewa, 24 godz. ZIO. Zawartość osmofilna wypełnia nieliczne pęcherzyki synaptyczne. Pow. 16.000 \times .

Fig. 8. Left parietal cortex, 24 hours. ZIO. Osmophilic content fills some synaptic vesicles. $\times 16000$.

OMÓWIENIE

Bezpośrednio po zdjęciu zacisków z tętnicy szyjnej obserwowano w niedokrwionej półkuli mózgu zmiany w synapsach, nieznacznie odbiegające od obrazu obserwowanego u zwierząt kontrolnych. Pęcherzyki gromadzą się przy błonach synaptycznych, podobnie jak w stanach fizjologicznego pobudzenia. Przeważająca ilość pęcherzyków pozostaje w tym okresie wypełniona osmofilnymi produktami reakcji histochemicznej. W okresie od 2 do 24 godzin po przebytych niedokrwieniu pojawiają się nieprawidłowości strukturalne narastające w czasie. W tym okresie znajdujemy w zakończeniach presynaptycznych liczne wodniczki mniejszych i większych rozmiarów, ciała wielopęcherzykowe oraz mielinopodobne. Wymienione struktury opisywano w badanym modelu doświadczalnym również w neuronach, komórkach glejowych i ele-

mentach neuropilu, interpretując je jako zespół objawów rozpoczynającego się obrzęku mózgu stanowiącego następstwo niedokrwienia (Ito i wsp. 1975, Bubis i wsp. 1976). Do tej samej kategorii objawów zaliczyć można występowanie pęcherzyków pinocytarnych w workach presynaptycznych i w synaptycznych błonach. Wydaje się rzeczą godną uwagi, że wyżej wspomniane zmiany spostrzegano w obu półkulach, zarówno niedokrwionej jak i w półkuli z zachowanym krążeniem. Nasuwa się przypuszczenie, że zmiany w gospodarce wodnej, znajdujące morfologiczny wyraz w „wakuolizacji” tkanki mózgowej, są zjawiskiem uogólnionym, mimo że niedokrwienie można określić jako miejscowe. Fakt występowania zmian wodniczkowych dopiero w kilka godzin po przebytym niedokrwieniu pozwala przypuszczać, że mamy tu do czynienia nie z bezpośrednim działaniem czynnika szkodliwego, a raczej z wywołonym przezeń łańcuchem następstw.

Struktura synaps w zasadzie nie uległa zmianom w okresie obserwacji, poza okresowym tworzeniem zgrupowań pęcherzyków synaptycznych. Również ilość pęcherzyków zawartych w zakończeniu nerwowym nie ulega uchwytym zmianom. Zmiany dotyczą natomiast zawartości pęcherzyków: w okresie od 2 do 24 godzin z pęcherzyków synaptycznych strony niedokrwionej ubywa znaczna ilość zawartości osmofilnej.

Występowanie dodatniej reakcji jodowo-osmowej w pęcherzykach synaptycznych może świadczyć o ich cholinergicznym charakterze (Akert i wsp. 1971). Uznanie tej reakcji za swoistą byłoby zbyt pochopne (Kawana i wsp. 1969, Walski 1977), jednakże brak zawartości osmofilnej w pęcherzykach można chyba wiązać z ubytkiem w zakończeniach synaptycznych mediatora (Koelle i wsp. 1971). Obserwacja ta wydaje się istotna zwłaszcza w zestawieniu z faktem, że ilość pęcherzyków synaptycznych nie zmniejsza się — ubywa jedynie ich zawartość. Rzuca to pewne światło na sposób przekazywania mediatora przez błonę pęcherzyka, która we wszystkich obserwowanych synapsach wydaje się być nie uszkodzona. Występowanie zmian w synapsach należy również rozważyć w stosunku do cytowanych już spostrzeżeń Bubisa i wsp. (1976), który stwierdził w niedokrwionej półkuli mózgowej chomika mongolskiego zmiany neuronalne, dotyczące ściśle określonej okolicy mózgu, to znaczy sektora H₃ zawoju hipokampa, szczególnie wrażliwego na niedostatki w ukrwieniu. Charakter zmian zbliżał je do zwyrodnienia osiowego występującego przy pierwotnych uszkodzeniach włókna osiowego na różnych jego poziomach, a więc i w sąsiedztwie zakończenia synaptycznego, względnie w nim samym. Nasuwa się więc przypuszczenie, że zmiany, przynajmniej w niektórych synapsach, mogły wyprzedzać zmiany komórkowe. Można założyć, że złącze nerwowe, jedna

z najbardziej dynamicznych struktur mózgu, oddziałuje na niedokrwienie przynajmniej w takim samym stopniu jak i neuron.

Opisane zmiany świadczą o tym, że okresowe niedokrwienie tkanki mózgowej powoduje zmiany w synapsach, nie pozostające zapewne bez wpływu na czynność przewodzenia.

WNIOSKI

W jednostronnym niedokrwieniu tkanki mózgowej u chomika mongolskiego występują zmiany w złączach nerwowych mózgu, które można podzielić na dwie grupy należące do zjawisk patogenetycznych różnego rzędu:

1) Ubytek osmofilnej zawartości w pęcherzykach synaptycznych świadczy o tym, że okresowe niedokrwienie tkanki mózgowej powoduje zmiany w synapsach, które prawdopodobnie nie pozostają bez wpływu na czynność przewodzenia.

2) Pojawianie się wodniczek w synapsach należy ocenić jako część zjawiska ogólnego, to znaczy obserwowanej w różnych strukturach mózgu wakuolizacji prowadzącej do obrzęku mózgu i uogólniającej się na obie półkule.

M. Ostenda

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПСОВ В ИШЕМИИ МОЗГА У МОНГОЛЬСКИХ ХОМЯКОВ

Резюме

Исследовался морфологический субстрат изменений в синапсах в процессе ишемии, вызываемой односторонним зажатием сонной артерии у монгольских хомяков. Обнаружено появление вакуолей в пресинаптических окончаниях, свидетельствующие о нарушении водного метаболизма, а также уменьшение осмофильного содержания синаптических пузырьков ишемической стороны. Периодическая ишемия ткани мозга вызывает изменения в синапсах не остающиеся, по всей вероятности, без влияния на функцию проведения.

M. Ostenda

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF SYNAPSES IN CEREBRAL ISCHEMIA IN GERBILS

Summary

The study deals with morphological changes in synapses during cerebral ischemia in gerbils, produced by unilateral ligation of the common carotid artery. The observed changes included the appearance of vacuoles in presynaptic

endings, indicating water imbalance and a decreased amount of osmophilic material in synaptic vesicles at the ischemic site.

Temporary ischemia of brain tissue brings about changes in synapses, certainly affecting neural transmission.

PIŚMIENNICTWO

1. Akert K., Kawana E., Sandri C.: ZIO-positive and ZIO-negative vesicles in nerve terminals. W: *Histochemistry of Nervous Transmission*. Ed. O. Eranko, Elsevier, Amsterdam 1971, 305—318.
2. Bubis J. J., Fujimoto J., Ito U., Mrsulja B., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian Gerbils. V. Ultrastructural changes in H₃ sector of hippocampus. *Acta neuropath. (Berl.)* 1976, 36, 285—294.
3. Ito U., Spatz M., Walker I. T., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian Gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta neuropath. (Berl.)* 1975, 32, 209—223.
4. Kahn K.: The natural course of experimental cerebral infarction in the Gerbil. *Neurology (Minneap.)* 1972, 22, 510—515.
5. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc-iodide osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.* 1969, 1, 325—331.
6. Klatzo I.: Pathophysiologic aspects of cerebral ischemia. W: *The Nervous System*. Ed. B. Donald. Vol. I. *The Basic Neurosciences*. N.Y. Raven Press 1975, 313—322.
7. Koelle G. B., Davis R., Smyrl E. G.: New findings concerning the localization by electron microscopy of acetylcholinesterase in autonomic ganglia. W: *Histochemistry of Nervous Transmission*. Ed. O. Eranko. Elsevier, Amsterdam 1971, 371—373.
8. Mrsulja B., Mrsulja B. J., Ito U., Spatz M., Walker J. T. Jr., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian Gerbils. IV. Behaviour of biogenic amines. *Acta neuropath. (Berl.)* 1976, 36, 1—8.
9. Spatz M., Klatzo I.: Pathological aspects of brain transport phenomena. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1970, 9, 479—495.
10. Walski M.: Badania mikroskopowo-elektronowe synaps okolicy hipokampa szczurów obciążonych padaczką audiogenną przy użyciu metody cynkowo-jodowo-osmowej. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 193—207.

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

VIII MIĘDZYNARODOWY KONGRES NEUROPATOLOGII (Waszyngton, 24—29.IX.1978)

Szerokim echem wśród przedstawicieli wielu dyscyplin zajmujących się różnymi aspektami nauk neurologicznych odbił się VIII Międzynarodowy Kongres Neuropatologii (Waszyngton, 24—29.IX.1978). Kongres zorganizowany przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Neuropatologii zosługuje na uwagę, również ze względu na liczący się wkład polskich pracowników naukowych w przygotowanie Kongresu. Wynika to w głównej mierze z faktu, że urzędującym wiceprzewodniczącym Stowarzyszenia jest prof. M. Mossakowski, a oprócz niego jeszcze 2 przedstawiciele Polski znajduje się w Radzie Stowarzyszenia (prof. J. Dymecki i prof. M. Wender). Funkcję wiceprzewodniczącego Kongresu pełnił z ramienia Polski prof. M. Wender.

Tematyka Kongresu była szeroka, obejmując w postaci sympozjów wiele aktualnych problemów neuropatologii, jak neurobiologię nerwów obwodowych rozwojową neuropatologię, starzenie się układu nerwowego oraz neuronalne i glijowe procesy w neuropatologii. Ponadto odbyło się szereg posiedzeń i sesji plakatowych podzielonych tematycznie na następujące zagadnienia: guzy mózgu, anatomia i neuropatologia człowieka, mielina i choroby demielinizacyjne, choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego, choroby naczyniowe mózgu, doświadczalna neuropatologia, choroby obwodowe układu nerwowego, wirusy i choroby wirusowe, choroby mięśni.

Badania przedstawione na sympozjach, jak i na poszczególnych sesjach poświęconych chorobom nerwów obwodowych, charakteryzował duży postęp metodyczny, umożliwiający poznanie tych procesów na poziomie podkomórkowym. Waxman, USA — omówił charakterystykę błon aksonalnych. Schlaepfer, USA — przedstawił aspekty biofizyczne neurofilamentów, Griffin i Price z USA przedyskutowali zagadnienie transportu aksonalnego w patologii neurofibrylnalnej oraz w zjawisku regeneracji, Agnayo z Kanady przedstawił biologię komórek Schwanna, a Rasminsky (Kanada) konsekwencje fizjologiczne nieprawidłowej mielinizacji. Na szczególną uwagę zasługuje wykazanie, że w normalnych włóknach mieliniowych istnieje zróżnicowanie właściwości błon aksonalnych pomiędzy odcinkami węzłowymi i międzywęzłowymi a także udowodnienie obecności w aksoplazmie proteazy aktywowanej przez wapń, która bierze udział w niszczeniu neurofilamentów podczas zwyrodnienia Wallera. Cały szereg prac przedstawionych w tym temacie dotyczył aspektów immunologicznych uszkodzenia obwodowego nerwu, głównie w doświadczalnym zapaleniu nerwów (EAN), co wskazuje, że ten kierunek badań nie stracił na swej aktualności.

Rozwojowa neuropatologia, pomimo swego ogromnego znaczenia dla poznania przyczyn uszkodzeń układu nerwowego wieku dziecięcego, została ograniczona prawie wyłącznie do materiałów sympozjum. Przedstawione na nim referaty dotyczyły zaburzeń neuronalnych w korze mutantów myszy (Caviness, USA), połączeń synaptycznych w doświadczalnie wywołanych zaburzeniach rozwojowych mózdzku (Sotelo, Francja) oraz organizacji kory w przypadkach zaburzeń rozwojowych mózgu u człowieka (Williams, USA).

Duże zainteresowanie wśród uczestników Kongresu wywołało sympozjum na temat starzenia się mózgu, tak ze względu na dużą wagę zagadnienia dla zrozumienia zjawisk inwolucyjnych w organizmie ludzkim jak i z powodu znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w tej dziedzinie. Tomlinson (W. Brytania) w referacie wstępnym podjął próbę powiązania natężenia zmian otepiennych z ilościową oceną odchyłeń patologicznych w starzejącym się mózgu. W kolejnych referatach Scheibel (USA) przedstawił wyniki badań zmian dendrytów, a Wiśniewski (USA) zaprezentował dane wskazujące, że powstanie płytek w starczym mózgu jest wynikiem zaburzeń białek włókienkowych neurocytów uwarunkowanych immunologicznie. Dwa dalsze referaty dotyczyły zjawisk niezwykle istotnych dla zrozumienia zmian biochemicznych zachodzących w mózgu w procesie inwolucji, a mianowicie starzenie się układów neurotransmiterów (Davies, USA) oraz zmian neuro- i gliofilamentów (Shelanski, USA). Pomimo wspomnianego wyżej dużego zainteresowania jakie towarzyszyło sesji, nie przyniosła ona oczekiwanych rewelacji naukowych, przedstawione bowiem zagadnienia były już w dużej części wcześniej opublikowane. Większy postęp zapowiadający zasadniczy przełom, rysuje się natomiast w dziedzinie neuroonkologii, omawianej na następnym sympozjum. Jest godne podkreślenia, że osiągnięcie tego postępu jest wynikiem międzydyscyplinarnej współpracy neuropatologów,

(c.d. na str. 236)

TERESA WIERZBA-BOBROWICZ

WCZESNE ZMIANY STRUKTURALNE W MÓZGU SZCZURA W OSTRYM DOŚWIADCZALNYM NIEDOCUKRZENIU *

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

Wpływ ostrego niedocukrzenia na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) stanowił od dawna przedmiot zainteresowania neuropatologów. Przyczyniło się do tego w dużej mierze zastosowanie insuliny w leczeniu psychiatrycznym i występowanie w przebiegu leczenia trwałych zaburzeń neurologicznych wskazujących na uszkodzenie OUN. Większość wczesnych prac doświadczalnych mających na celu ustalenie wpływu ostrej hipoglikemii na OUN przeprowadzono przy użyciu bardzo dużych, tzw. wstrząsowych dawek insuliny (Weil i wsp. 1938, Winkelman, Moore 1940). Zmiany uzyskane w tych warunkach były zarówno wykładnikiem działania niedocukrzenia jak i niedotlenienia, stanowiącego następstwo ogólnoustrojowych zaburzeń i napadów drgawkowych.

W ostatnim dziesięcioleciu przeprowadzono liczne badania wpływu ostrego niedocukrzenia na przebieg procesów fizjologicznych i rozwój zmian strukturalnych (Brierley i wsp. 1971 a, b; Kahn, Myers 1971; Meldrum i wsp. 1971) oraz na metabolizm OUN (Ferendelli, Chang 1973; Lewis i wsp. 1974 a, b; Norberg, Siesjö 1976), przy czym, stosując duże dawki insuliny starano się tak modelować warunki eksperymentu, żeby wyeliminować wpływ dodatkowych czynników (kwasica, podciśnienie tętnicze, obrzęk mózgu, napady drgawkowe), które mogą powodować uszkodzenie lub nasilać zmiany wywołane niedocukrzeniem. W wyniku tak prowadzonych doświadczeń Brierley i wsp. (1971 a, b) uzyskali w mózgach małą zmianę strukturalną neuronów, które uznali za następstwo „czystej” hipoglikemii, zresztą identyczne ze zmianami rozwijającymi się w przypadku ostrego niedotlenienia i/lub niedokrwienia OUN.

* Problem węzłowy 10.4.2.

Jednym z czynników, odgrywających istotną rolę w kształtowaniu zmian strukturalnych w OUN w różnych typach niedotlenienia, są zaburzenia mikrokrążenia w mózgu, utrzymujące się niekiedy przez długi okres po zadziałaniu czynnika patogennego. Wykazano je między innymi w niedokrwieniu hipowolemicznym u królika (Mossakowski 1974), u szczurów po zatruciu tlenkiem węgla (Mossakowski 1975) oraz poddanych tzw. prostej anoksji (Wierzbą 1977). Uwzględnienie tego czynnika w warunkach hipoglikemii wydawało się tym bardziej celowe, że zarówno kliniczne jak i doświadczalne wyniki badania przepływu krwi w mózgu w przypadkach niedocukrzenia nie są jednoznaczne. Przykładowo Fappenheimer i Setchell (1973) w doświadczalnej hipoglikemii u królików nie obserwowali zmian w przepływie krwi w mózgu, podczas gdy Norberg i Siesjö (1976) wykazali przy użyciu ^{133}Xe -ksenonu dwu- lub nawet trzykrotny wzrost regionalnego przepływu krwi w mózgu szczura, występujący nawet w przypadku izoelektrycznego zapisu EEG.

Celem podjętych badań było ustalenie wpływu ostrego niedocukrzenia na obraz strukturalny OUN oraz skonfrontowanie uzyskanych wyników ze stanem mikrokrążenia w mózgu szczura.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, 2-miesięcznych samcach i samicach. Przed podaniem insuliny odstawiono zwierzętom na okres 24 godzin pokarm stały pozostawiając im swobodny dostęp do wody. Do doświadczeń użyto insuliny krystalicznej (Polfa), którą wstrzykiwano podskórną jednorazowo w dawce 0,5 j.m./100 g ciężaru ciała. Dawka ta przyjęta na podstawie wyników wstępnych badań, powodowała u dorosłych szczurów obniżenie poziomu glukozy we krwi poniżej 10 mg% na okres około 2 godzin i prowadziła do wystąpienia krótkotrwałej śpiączki ustępującej samoistnie u większości zwierząt. Szczury grupy kontrolnej otrzymały podskórną fizjologiczny roztwór soli w takiej samej objętości. U zwierząt grupy doświadczalnej i kontrolnej oznaczano zawartość glukozy we krwi bezpośrednio przed wstrzyknięciem insuliny lub roztworu NaCl oraz w 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 i 48 godzin po iniekcji. Glukozę oznaczano we krwi pobranej z ogona metodą orto-toluidynową. Wyniki odczytywano na spektrokolorymetrze Specol f-my Zeiss.

Badanie mikrokrążenia oraz ocenę zmian morfologicznych przeprowadzono u szczurów uśmiercanych bezpośrednio po podaniu insuliny oraz u zwierząt z 1, 2, 4, 6, 24 i 48 godz. przeżyciem. Każda grupa czasowa obejmowała 3 zwierzęta doświadczalne i 1 zwierzę kontrolne.

Zwierzęta przeznaczone do badania mikrokrążenia dekapitowano. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszkowej utrwalano przez 7 dni w 4% roztworze formaliny i po utrwaleniu dzielono je na bloki w płaszczyźnie czołowej, na wysokości skrzyżowania nerwów wzrokowych, guza popielatego i na granicy mostu i opuszki. Z zamrożonych bloczków sporządzano skrawki grubości 80—100 μ , które barwiono metodą benzydynamową wg Pickwortha.

Szczury przeznaczone do badania morfologicznego uśmiercano, wykonując w płytkiej narkozie eterowej przezsercową perfuzję roztworem formaliny w 0,9% NaCl. Po utrwaleniu szczury dekapitowano i pozostawiano całe głowy zwierząt w płynie perfuzyjnym do następnego dnia, po czym wyjmowano mózgi i pobierano takie same bloczki jak do badania mikrokrążenia. Pobrany materiał przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny. Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem kryzylu oraz wg metody Heidenhaina.

WYNIKI

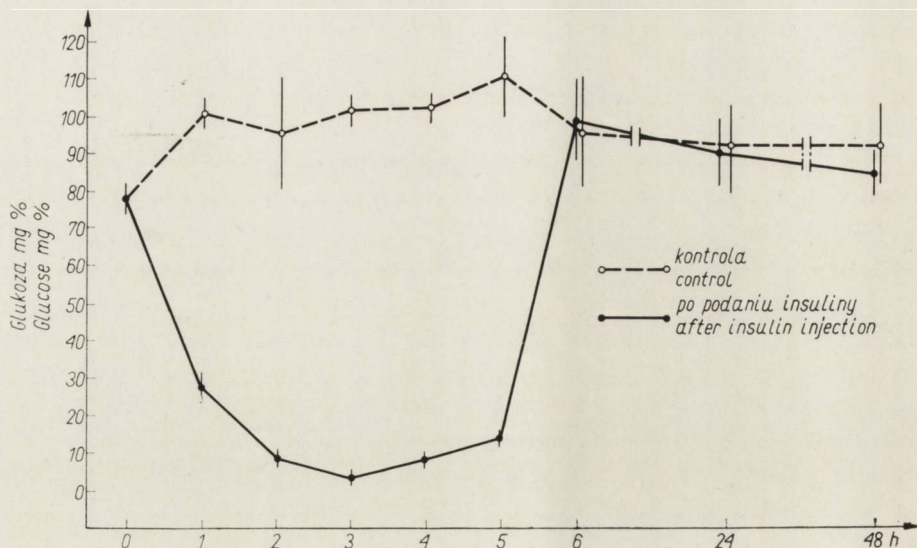
Zawartość glukozy we krwi

U szczurów kontrolnych, pozbawionych przez 24 godz. pokarmu, zawartość glukozy we krwi wahała się w granicach 78—85 mg%, u szczurów nie głodzonych poziom cukru we krwi wynosił 95—105 mg% (ryc. 1).

Po wstrzyknięciu insuliny obserwowano szybki spadek zawartości glukozy we krwi badanych zwierząt. Po jednej godz. stężenie glukozy wynosiło około 28 mg%, po 2 godz. zawartość glukozy była niższa niż 10 mg% i na niższym poziomie niż 20 mg% utrzymywała się przez trzecią i czwartą godzinę po podaniu insuliny. W ciągu następnych 60 minut zwierzęta otrzymywały pokarm, po spożyciu którego poziom glukozy we krwi szybko wracał do normy.

Obserwacje kliniczne

Przez pierwszą godzinę po wstrzyknięciu insuliny szczury nie wykazywały żadnych uchwytnych odchyień od normy. Pierwsze objawy w postaci spowolnienia ruchowego, przyspieszenia oddechu i czynności serca pojawiały się w czasie drugiej godziny po iniekcji. Po upływie dwu do dwu i pół godz., u szczurów występowała krótkotrwała śpiączka, w trakcie której obserwowano ślinotok, zwolnienie oddechu i czynności serca, mimowolne oddawanie moczu i kału oraz obniżenie ciepłoty ciała, u niektórych zwierząt występowały również napady drgawkowe. Szczury pozostawały w stanie śpiączki przez 10—30 minut, po upływie których występowało przeważnie samoistne wybudze-



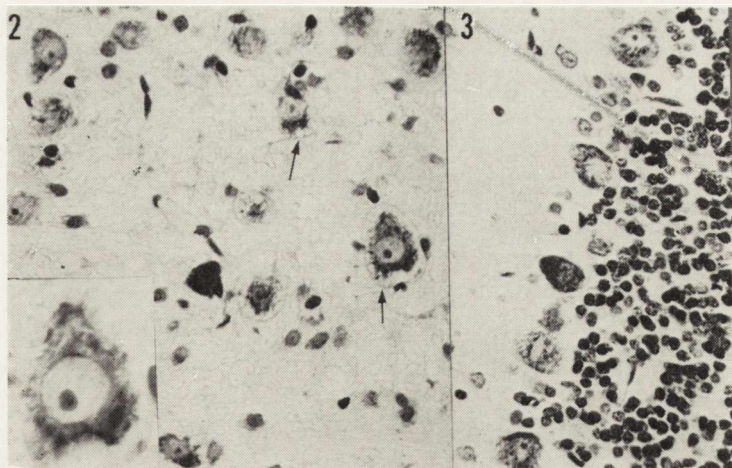
Ryc. 1. Zawartość glukozy we krwi szczurów po podaniu insuliny i w kontroli. Wyniki przedstawiają średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 5 szczurów. $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Glucose content in the blood of hypoglycemic and control rats. The results are shown as mean values \pm standard error of the mean from 5 rats. $p \leq 0.05$.

nie się zwierząt. U niektórych szczurów w trakcie śpiączki pojawiały się objawy ostrej niewydolności krążenia prowadzące do śmierci zwierzęcia. Szczury, które padły, zostały wyeliminowane z doświadczenia. U zwierząt, które przeżyły występował początkowo powolny, a w okresie wzrostu zawartości glukozy we krwi, szybki powrót do normy.

Obserwacje patomorfologiczne

Zmiany patomorfologiczne w mózгах szczurów doświadczalnych ograniczały się zasadniczo do uszkodzenia neuronów. Polegało ono na pojawieniu się w cytoplazmie komórek nerwowych drobnych, nieregularnie rozmieszczonych wodniczek, czasami dostrzegalnych dopiero w większych powiększeniach mikroskopowych. Niekiedy były one wyraźnie ułożone na obwodzie komórki. Ponadto obserwowano neurony z nadbarwliwą, barwiącą się nierówno cytoplazmą i niekiedy ciemnym trójkątnym jądrem (wczesne zmiany ischemiczne neuronów wg Brierleya i wsp. 1971 a). Często oba typy nieprawidłowości występowały w obrębie tej samej komórki. Zmienione neurony występowały w sposób rozsiany w korze półkul mózgowych, zawojach hipokampa, strukturach podkorowych, w obrębie pnia mózgu i w korze mózdzku. Nasilenie uszkodzeń było niewielkie i niejednakowe u poszczególnych zwierząt z tej samej grupy czasowej.

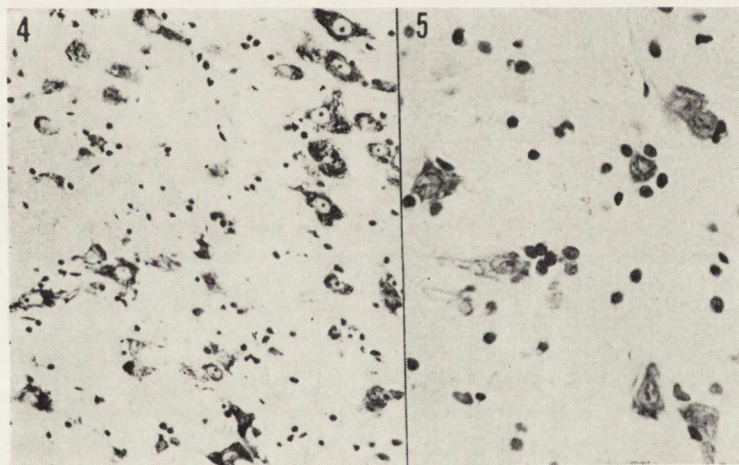


Ryc. 2. Szczur z 2 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Mikrowakuolizacja neuronów w opuszce (strzałki) (600 ×). Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×. W dolnym lewym rogu pojedynczy neuron w większym powiększeniu (600 ×).

Fig. 2. Rat with 2 h survival after insulin injection. Microvacuolization in neurons of the medulla (arrows). Cresyl violet. × 400. In the left lower corner one of them in higher magnification. Insert × 600.

Ryc. 3. Szczur z 2 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Mikrowakuolizacja i częściowa nadbarwliwość cytoplazmy komórek Purkinjego. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 3. Rat with 2 h survival after insulin injection. Microvacuolization and cytoplasm's hyperchromasia of Purkinje cells. Cresyl violet. × 400.



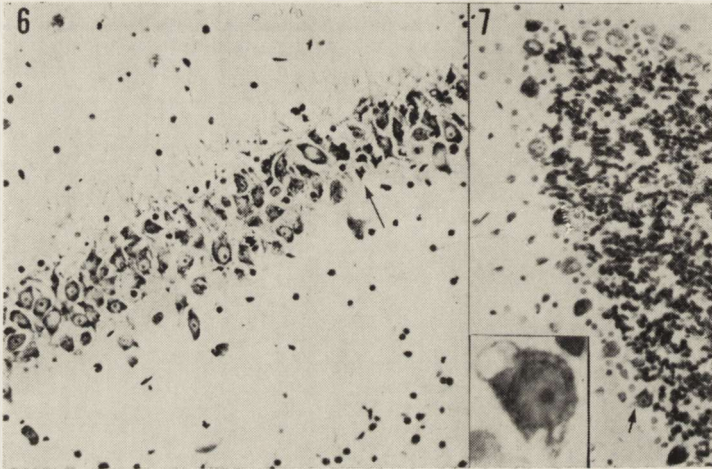
Ryc. 4. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Hiperchromatyczne neurony opuszki z drobnymi wodniczками w cytoplazmie. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×.

Fig. 4. Rat with 4 h survival after insulin injection. Hyperchromatic neurons of medulla with fine vacuoles in cytoplasm. Cresyl violet. × 200.

Ryc. 5. Szczur z przeżyciem 6 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Uszkodzone neurony skorupy i zwiększona satelitoza. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Rat with 6 h survival after insulin injection. Damaged striatal neurons with increased glial satellitosis. Cresyl violet. × 400.

Pojedyncze neurony z mikrowakuolizacją znajdowano w korze nowej już w 1 godz. po podaniu insuliny. U szczurów z 2 i 4 godzinnym przeżyciem liczba uszkodzonych neuronów zwiększała się. Spotykano je również w jądrach podkorowych, opuszce (ryc. 2) i w mózdku (ryc. 3). U szczurów z 4 godz. przeżyciem komponent ischemiczny często przeważał nad mikrowakuolizacją, przy czym w obkurczonych ciemno barwiących się neuronach widoczne były często pojedyncze drobne wodniczki (ryc. 4). W 6 godzin po podaniu insuliny zmiany ischemiczne przeważały nad mikrowakuolizacją, chociaż spotykano nadal mieszany typ zmian oraz komórki wykazujące wczesne stadia uszkodzenia. Sporadycznie obserwowano zwiększoną satelitozę (ryc. 5) oraz rozpad komórek nerwo-



Ryc. 6. Szczur z 6 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Uszkodzenie i rozpad neuronów w zawoju hipokampa (strzałka). Fiolet krezyłu. Pow. 200 \times .

Fig. 6. Rat with 6 h survival after insulin injection. Severe damage to hippocampal neurons (arrow). Cresyl violet. $\times 200$.

Ryc. 7. Szczur z przeżyciem 6 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Mikrowakuolizacja, zmiany ischemiczne i mieszane komórki Purkinje. W dolnym lewym rogu pojedynczy neuron z dużą wodniczką. Fiolet krezyłu. Pow. 200 \times . Wycinek pow. 600 \times .

Fig. 7. Rat with 6 h survival after insulin injection. Microvacuolization, ischemic and mixed changes of Purkinje cells. In the left lower corner neuron with large vacuole in higher magnification. Cresyl violet. $\times 200$. Insert $\times 600$.

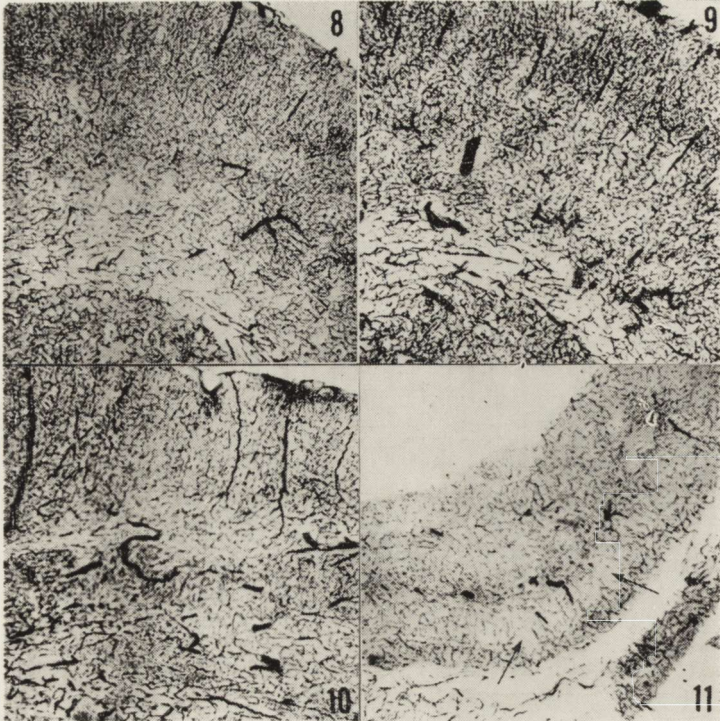
wych (ryc. 6). Komórki Purkinje w mózdku wykazywały zmiany o różnym charakterze i nasileniu (ryc. 7). U niektórych szczurów z 4 i 6 godz. przeżyciem widoczne było obrzmienie tkanki z porozsuwaniem elementów strukturalnych i obrzękiem oligodendrocytów. W żadnej z grup czasowych nie stwierdzono zmian w osłonkach mielinowych jak również okołonaczyniowych ubytków komórkowych czy ognisk opustoszenia.

Wynik badania sieci naczyń krwionośnych i układu włóściczek

Skrawki z mózgow kontrolnych szczurów przedstawiały charakterystyczne zróżnicowanie układu i gęstości sieci naczyniowej kory i istoty białej w półkulach mózgu (ryc. 8), zawoju hipokampa i w obrębie pnia mózgu. U zwierząt dekapitowanych po 1 godz. od wstrzyknięcia insuliny obserwowano zmniejszenie różnicy gęstości sieci naczyniowej kory i istoty białej. W obu strukturach występowały liczne naczynia małego i średniego kalibru, niekiedy o wężykowatym przebiegu, obficie wypełnione krwią (ryc. 9). Po 2 godz. sieć naczyń włosowatych wydawała się jeszcze obficie wypełniona krwią. U zwierząt z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny obserwowano utrzymujące się nadal przepełnienie krwią włóściczek oraz większych naczyń i zatarcie różnicy w gęstości sieci naczyniowej kory i istoty białej (ryc. 10). W tym okresie w zawojach hipokampa pojawiały się drobne pólka gorszego ukrwienia, których obecność obserwowano również u zwierząt z 6 godz. przeżyciem od podania insuliny (ryc. 11). W 24 godz po iniekcji spostrzegano tylko pojedyncze naczynia większego kalibru nadmiernie wypełnione krwią. Zasadniczo już w tym okresie, podobnie jak u szczurów z 48 godz. przeżyciem, obraz sieci naczyniowej mózgu szczurów doświadczalnych był taki sam jak u zwierząt kontrolnych.

OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że ostre niedocukrzenie z obniżeniem zawartości glukozy we krwi poniżej 10 mg% na okres 1,5—2,5 godz. powoduje u szczurów uszkodzenie neuronów OUN o typie mikrowakuolizacji i schorzenia ischemicznego, uznanych przez Brierleya i wsp. (1971 a) za charakterystyczne wczesne następstwo niedostatku tlenowego (niedotlenienia i/lub niedokrwienia OUN). Tego samego typu nieprawidłowości Brierley i wsp. (1971 b) obserwowali również u małp poddanych ostrej hipoglikemii. Większe nasilenie uszkodzeń u małp można tłumaczyć między innymi znacznie wyższą dawką insuliny oraz ich większą wrażliwością na niedotlenienie. Inny rodzaj zmian uzyskali Jones i Smith (1971) u noworodków szczurzych, którym podawano insulinę w okresie pierwszych 10 dni życia. Zmiany ischemiczne neuronów obserwowano dopiero u szczurów 10 dniowych, natomiast u młodszych zwierząt występował ostry obrzęk komórek nerwowych, przy czym nasilenie uszkodzeń zwiększało się wraz z wiekiem zwierząt. Zarówno inny charakter uszkodzeń, jak i ich narastanie u zwierząt starszych, wiążą się z odrębnością metaboliczną niedojrzałej tkanki nerwowej i jej zwiększającą się w miarę rozwoju wrażliwością na niedotlenienie.



Ryc. 8. Szczur kontrolny. Charakterystyczny układ i zróżnicowanie gęstości sieci naczyniowej w korze i istocie białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 8. Control rat. Typical arrangement of vascular network within cerebral cortex and subcortical white matter. Pickworth × 60.

Ryc. 9. Szczur dekapitowany w 1 godz. po podaniu insuliny. Przekrwienie sieci włócnickowej kory i istoty białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 9. Rat with 1 h survival after insulin injection. Hyperemia of cortical and white matter vascular network. Pickworth × 60.

Ryc. 10. Szczur dekapitowany 4 godz. po podaniu insuliny. Zatarcie różnicy gęstości sieci włócnickowej pomiędzy korą i istotą białą, utrzymujące się nadal przekrwienie sieci włócnickowej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 10. Rat with 4 h survival after insulin injection. Persisting hyperemia of cortical and white matter vascular network, leading to obliteration of differences between both cerebral matters. Pickworth × 60.

Ryc. 11. Szczur dekapitowany w 6 godz. po podaniu insuliny. Widoczne jeszcze drobne pólka gorszego ukrwienia w zawoju hipokampa (strzałki). Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 11. Rat with 6 h survival after insulin injection. Still visible small areas of poorer vascularisation within hippocampal cortex (arrows). Pickworth × 60.

W naszym materiale, w żadnej z badanych grup nie stwierdzono zależności pomiędzy lokalizacją uszkodzeń i unaczynieniem mózgu, co wskazuje na brak udziału czynnika naczyniowego w rozwoju nieprawidłowości strukturalnych. Występowanie ogniskowych uszkodzeń i nasilenie zmian komórkowych na pograniczu unaczynienia dużych pni

tętnicznych w warunkach ostrego niedocukrzenia u małp, Brierley i wsp. (1971 b) obserwowali tylko u tych zwierząt, u których występował znaczny spadek ciśnienia krwi. Powodował on dodatkowo niedokrwienie OUN znajdujące wykładnik w akcentacji zmian patomorfologicznych w obszarach tzw. ostatniej łąki.

Patomechanizm rozwoju zmian w OUN w następstwie ostrej hipoglikemii jest dotychczas nie wyjaśniony. Najwcześniejsze zmiany w neuronach w postaci mikrowakuolizacji znajdują odpowiednik ultrastrukturalny w uszkodzeniu mitochondriów (McGee-Russel i wsp. 1970). Jednakże badania biochemiczne pomimo znacznego obniżenia zawartości glukozy w mózgu nie wykazują spadku zawartości związków wysokoenergetycznych — ATP i fosfokreatyniny — przy obniżeniu zawartości glukozy we krwi poniżej 20, a nawet 10 mg% (Ferendelli, Chang 1973). Norberg i Siesjö (1976) uważają, że spadek wysokoenergetycznych związków węglowodanowych jest kompensowany przez utlenianie endogennych substratów. Dopiero wyczerpanie możliwości kompensacyjnych lub zadziałanie czynników powodujących dodatkowe upośledzenie przemiany OUN prowadzi do rozleglejszych i trwałych uszkodzeń strukturalnych.

W okresie hipoglikemii obserwowano u naszych zwierząt nadmierne wypełnienie krwią włosniczek i większych naczyń OUN. Wydaje się, że stwierdzone przekrwienie sieci naczyniowej stanowi zjawisko kompensacyjne, zapewniające zwiększenie transportu glukozy z krwi do tkanki nerwowej. Brak zaburzeń mikrokrażenia w zastosowanym modelu doświadczalnym pozwala na wykluczenie ich udziału w rozwoju zmian strukturalnych i na odniesienie stwierdzonych nieprawidłowości do uszkodzającego działania hipoglikemii.

Т. Вежба-Бобрович

РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЦНС
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ У КРЫСЫ

Резюме

Исследовано влияние острой гипогликемии на морфологию ЦНС и на состояние микрокровообращения.

Опыты ставили на взрослых крысах, которым однократно впрыскивали кристаллический инсулин в дозе 0,5 м.ед./100 г веса тела. Наблюдения проводили в пределах от 1 до 48 часов после впрыскивания инсулина.

Показано, что гипогликемия с временным снижением содержания глюкозы в крови ниже 10 мг% вызывает в мозгах крыс развитие структурных изменений, характерных для раннего периода гипоксии и ишемии. Они заключаются в появлении микровакуолизации и ишемического заболевания нервных клеток,

причем их интенсивность обусловлена продолжительностью гипогликемии. Изменения в нервных клетках носят рассеянный характер и локализованы в коре мозговых полушарий, в подкорковых структурах, в области мозгового ствола и коры мозжечка. Отсутствие существенных нарушений микрокровообращения в использованных экспериментальных условиях позволяет исключить как непосредственное, так и опосредованное участие сосудистого фактора в развитии структурных изменений, которые в связи с этим можно рассматривать как показатель действия чистой метаболической гипоксии на нервную ткань.

T. Wierzba-Bobrowicz

EARLY CEREBRAL CHANGES IN EXPERIMENTAL HYPOGLYCEMIA IN THE RAT

Summary

The effect of acute hypoglycemia on the brain morphology and cerebral microcirculation was investigated.

The experiments were carried out on adult rats which were given single insulin injection in a dose of 0.5 IU/100 g of body weight. The observation period lasted from 1 up to 48 hours after insulin injection.

It was shown that acute hypoglycemia in the rat with temporary decrease of blood sugar content below 10 mg% is accompanied by the development of brain abnormalities characteristic for the early period of hypoxia or ischemia. These abnormalities consisted in microvacuolization and ischemic changes of nerve cells. Diffuse neuronal changes occurred in the cerebral cortex, in the Ammon's horn, in subcortical structures as well as in the brain stem and cerebellar cortex.

The lack of significant disturbances of the cerebral microcirculation permits to exclude an influence of vasogenic factor on the development of structural changes, which thus may be considered as an effect of pure metabolic hypoxia on the nerve tissue.

PIŚMIENNICTWO

1. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The nature and time course of the neuronal alterations resulting from oligoemia and hypoglycaemia in the brain *Macaca Mulatta*. *Brain Res.* 1971 a, 25, 483—499.
2. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The neuropathology of insulin-induced hypoglycaemia in a Primate (*M. Mulatta*). Topography and cellular nature. W: Brain hypoxia. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books Ltd. Philadelphia* 1971 b, 225—230.
3. Ferendelli J. A., Chang M. M.: Brain metabolism during hypoglycaemia. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 173—177.
4. Jones E. L., Smith W. T.: Hypoglycaemic brain damage in the neonatal rat. W: Brain hypoxia. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum, *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books Ltd. Philadelphia* 1971, 231—241.
5. Kahn K. J., Myers R. E.: Insulin-induced hypoglycaemia in the nonhuman Primate. I. Clinical consequences. W: Brain hypoxia. Red.: J. B. Brierley,

- B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books Ltd. Philadelphia 1971, 185—194.*
6. Lewis L. D., Ljunggren B., Ratcheson R. A., Siesjö B. K.: Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycaemia related to blood glucose and to EEG. *J. Neurochem.* 1974 a, 23, 673—679.
 7. Lewis L. D., Ljunggren B., Norberg K., Siesjö B. K.: Changes in carbohydrate substrates, amino acids and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycaemia. *J. Neurochem.* 1974 b, 23, 659—671.
 8. McGee-Russel S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
 9. Meldrum B. S., Horton R. W., Brierley J. B.: Insulin-induced hypoglycaemia in the Primate: Relationship between physiological changes and neuropathology. W: *Brain hypoxia. Red.: J. B. Brierley, B. S. Meldrum. Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books Ltd. Philadelphia 1971, 207—224.*
 10. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 573—581.
 11. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—248.
 12. Norberg K., Siesjö B. K.: Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycaemia. *J. Neurochem.* 1976, 26, 345—352.
 13. Pappenheimer J. R., Setchell B. P.: *J. Physiol.* 1973, 223, 529—551. Cyt. wg Norberg i Siesjö. *J. Neurochem.* 1976, 26, 345—352.
 14. Weil A., Liebert E., Heilbrunn G.: Histopathologic changes in the brain in experimental hyperinsulinism. *Arch. Neurol. Psychiat.* 1938, 39, 467—481.
 15. Wierzba T.: Wpływ niedotlenienia na mikrokążenie w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 183—191.
 16. Winkelman N. W., Moore M. T.: Neurohistopathologic changes with metrazol and insulin shock therapy. An experimental study in the cat. *Arch. Neurol. Psychiat.* 1940, 43, 1108—1131.

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

specjalistów medycyny nuklearnej i biochemików. Mowa tu o możliwości oceny stopnia złośliwości a nawet typu histopatologicznego guzów śródczaszkowych bez konieczności pobierania materiału biopcytowego. Perspektywy takie i to już bardzo realne stwarza komputerowa tomografia osiowa połączona z techniką izotopową (Di Chiro, USA). Rozwój tej techniki, niestety niezwykle kosztownej, stworzy również warunki dla przyżyciowej oceny procesów metabolicznych w tkance nerwowej mózgu.

Bardzo istotny problem jednolitej w skali międzynarodowej klasyfikacji guzów mózgu, został przedstawiony na sympozjum przez Barnarda z Wielkiej Brytanii. Jak wynika z jego referatu zagadnienie nie zostało do tej pory rozwiązane. Pomimo bowiem powołania pod egidą Światowej Organizacji Zdrowia, międzynarodowej grupy roboczej z siedzibą w Kolonii (prof. Zülch), zaproponowana przez nią klasyfikacja nadal znajduje się jeszcze w ogniu szerokiej dyskusji, w której dotychczas nie ma zgodności stanowisk.

Ostatnie sympozjum zostało zorganizowane przez Amerykańskie Stowarzyszenie Neuropatologów z tematyką podstawowych procesów patologicznych w neuronach i gleju. W sympozjum omówiono rozwój połączeń dendrytycznych i synaptycznych (Purpura, USA), zdolność adsorpcyjną błon cytoplazmatycznych neuronów (Gonatas, USA), powiązania funkcjonalne oligodendroglu i mieliny (Lampert, USA) oraz patologię astroglu (Ikuta, Japonia). Sympozjum zakończył wykład prezydencki (presidential address) Asao Hirano, przewodniczącego Amerykańskiego Stowarzyszenia Neuropatologów. Sympozjum stanowiło dobry przegląd współczesnego stanu wiedzy w zakresie podstawowych zjawisk cytologicznych występujących w tkance nerwowej w chorobach ośrodkowego układu nerwowego.

Omówienie nawet w wielkim skrócie olbrzymiego dorobku kilkuset doniesień wygłoszonych w czasie poszczególnych konferencji jak i zaprezentowanych na sesjach plakatowych nie wydaje się możliwe. Należy jedynie podkreślić, że w coraz większym stopniu neuropatologia tak doświadczalna jak i kliniczna korzysta z szerokiego wachlarza metod biochemicznych i biofizycznych, stając się z nauki morfologicznej neurobiologią patologiczną.

Z polskich uczestników kongresu Mossakowski (Warszawa), przedstawił doniesienie wspólne z Kapuścińskim, w którym wysunął dobrze udowodnioną, na podstawie dziesiątków badań szczegółowych, tezę, że różne stany patologiczne, które można ująć pod wspólnym mianem hipoksji prowadzą do niedokrwienia mózgu, stanowiącego podstawowy mechanizm w patologii naczyniowej. Główną przesłanką dla tej niezwykle interesującej tezy są dane wskazujące, że niedotlenienie niezależnie od natury czynnika wywołującego powoduje zaburzenia krążenia krwi w mózgu. Dymecki (Warszawa) przedstawił na sesji plakatowej doniesienie wspólne z Walskim na temat dynamiki zmian synaps typu S i F w doświadczalnej padaczce audiogennej u szczurów. Autor niniejszego sprawozdania wygłosił doniesienie opracowane wspólnie z zespołem pracowników Kliniki Neurologicznej AM w Poznaniu na temat wpływu zatrucia związkami alkilowymi nitrozomocznika na białka mieliny.

Na Kongresie ogłoszono, że nowym przewodniczącym Międzynarodowego Stowarzyszenia Neuropatologów został wybrany J. Corsellis, a sekretarzem J. Adams, obaj z W. Brytanii. Kolejny IX Kongres Neuropatologii odbędzie się za 4 lata w Sztokholmie.

Mieczysław Wender

DANUTA MAŚLIŃSKA, MARIA DĄMBSKA, SŁAWOMIR MAŚLIŃSKI

DICHLORVOS PENETRATION THROUGH RABBIT PLACENTA

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw

Head of Laboratory: Doc. dr med. M. Dąmbska

Laboratory of Biogenic Amines, Institute of Physiological Sciences,
Medical Academy of Warsaw

Head of Laboratory: S. Maśliński, M.D.

The question how dichlorvos affects the health of fetuses and newborns is still a matter of controversy. This pesticide has been reported not to influence the weight and vitality of the progeny of females to which dichlorvos was administered in their gestation period (Casida et al. 1962, Vogin, Carson 1971, Thorpe et al. 1972, Siers 1974, Dąmbska et al. 1978). Potter et al. (1973) who fed pregnant sows with labelled dichlorvos preparations was not able to detect this pesticide or its metabolites in the tissues of the progeny. On the other hand, dichlorvos was shown to diminish the activity of certain mitochondrial enzymes that are important for the proper functioning of the cellular metabolism (Maślińska, Zalewska 1978 a). The changes occurred in brain, i.e. in the organ which is highly sensitive to alterations of this type. It was observed that acetylcholinesterase (AChE) activity decreased in the progeny of rats treated with dichlorvos during the gestation period (Zalewska et al. 1976 a, b). Similar investigations, performed on rabbits showed a reduction of this enzyme activity as well (Maślińska, Zalewska 1978 b). It was suggested that in both cases the reduction of the AChE activity resulted from the direct dichlorvos action.

The aim of the present work was to establish whether dichlorvos penetrates placenta in rabbits.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried out on 38 rabbit fetuses derived from 5 experimental and 2 control litters. Dichlorvos was administered orally to pregnant animals, in a single dose of 6 mg/kg of body weight on the

expected day of delivery. To control females only a corresponding amount of sunflower oil, used as a dichlorvos solvent, was administered.

Fetuses were brought out by means of cesarean section 5, 10, 20, 30 and 120 minutes after the pesticide administration and decapitated. For DDVP estimations generally a method described in „Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples” was followed (Thompson 1974). One ml of mixed blood was collected and immediately extracted with n-hexan. Five μl of the solution was injected onto a chromatographic glass column (152 cm length and 4 mm diameter). The columns were filled with 1.5% OV — 17 + 1.95% OF-1 on WHP Chromosorbent (100—120 mesh). The temperature of the tube was 165°C . Determinations were made on a Pye Unicam 104 gas chromatograph with ^{63}Ni E.C. detector, the temperature of which was 250°C during the nitrogen flow of 60 ml/min. For fortification, 0.22—0.45 $\mu\text{mol/l}$ of dichlorvos was used (DDVP-0,0-Dimethyl-0-/2,2-dichlorvinyl/phosphate 99.2% produced by the Institute of Physical Chemistry of Polish Academy of Sciences in Warsaw).

RESULTS

Females and fetuses did not show any symptom of dichlorvos poisoning. Chromatographic analysis showed the presence of dichlorvos in the fetal blood. Figure 1 presents chromatograms of: A — control blood samples, B — blood of a treated fetus, C — blood investigated

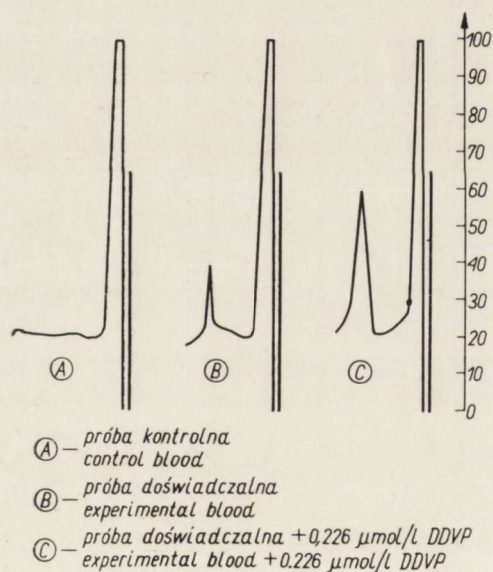


Fig. 1. Chromatograms of dichlorvos.

Ryc. 1. Rozdziały chromatograficzne dichlorfosu.

after *in vitro* addition of a standard dose of dichlorvos (fortification). Chromatograms B and C show peaks which correspond to the pesticide that is looked for. After the fortification, the pesticide present in the B sample and the amount added *in vitro* summed up (chromatogram C).

Table 1 presents data of chromatographic determinations. The amount of the pesticide that penetrated to the fetus ranged from 0.542 ± 0.113 to 7.692 ± 0.583 $\mu\text{mol/l}$. The blood pesticide level in the fetus gradually increased; the increase being the highest 20 minutes after administration to the pregnant female. Thereafter, dichlorvos concentration in the fetal blood rapidly diminished and was very low after 2 hours.

Table 1. DDVP concentration in fetal blood after single administration of DDVP to females (6 mg/kg of total body weight per os) (Chromatographic determinations)

Tabela 1. Stężenie DDVP we krwi płodów po jednorazowym podaniu DDVP samicom (6 mg/kg wagi ciała doustnie) (Oznaczenia chromatograficzne)

Fetuses Płody	Number of fetuses Liczba płodów	Time of blood collection Czas pobrania krwi min	DDVP concentrations in $\mu\text{mol/l}$ Stężenie DDVP w $\mu\text{mol/l}$ $\bar{X} \pm \text{SD}$
Litter 1 Miot 1	5	5	0.814 ± 0.090
Litter 2 Miot 2	5	10	4.072 ± 0.361
Litter 3 Miot 3	6	20	7.692 ± 0.583
Litter 4 Miot 4	5	30	5.429 ± 0.407
Litter 5 Miot 5	7	120	0.542 ± 0.113

DISCUSSION

The presence of dichlorvos in blood of rabbit fetuses after single administration to the pregnant female proves placental penetration of this pesticide. The dynamics of the penetration was, in our investigations, a matter of secondary importance. However, the increase of the concentration of the pesticide in fetal blood 20 minutes after administration to the pregnant female is in accordance with Pachecka et al. (1977) who observed the most pronounced reduction of the cholinesterase activity in the plasma of the adult animals to occur at the same time. The pesticide concentration decrease in the fetal blood is rapid and after 2 hours its level is merely 0.54 $\mu\text{mol/l}$. Therefore, it may be assumed that the reason why Potter et al. (1973) did not find dichlorvos in blood and in the tissues of the piglets was the lapse of over 24 hours between the dichlorvos administration to the pregnant fe-

male and the collection of the progeny material for the estimations. The authors, however, using labelled dichlorvos in their experiments, stated the presence of radioactive elements (but not metabolites) in the tissues of fetuses and newborns.

It remains to be established whether dichlorvos penetrating through placenta is metabolized already in the fetal tissues or later, after its return to mother's blood.

It seems that the previously observed reduction of the acetylcholinesterase activity in the brain tissue of the newborn and young rabbits (Maślińska, Zalewska 1978b) represented a direct effect of the pesticide. The activities of mitochondrial enzymes in the progeny of females poisoned in the gestation period (Maślińska, Zalewska 1978a) are also likely to be affected by dichlorvos itself.

Dichlorvos is commonly used in agriculture, sanitary precautions and in veterinary medicine; therefore its penetration through placenta and its influence upon the brain tissue during maturation period may become a particularly important problem in human pathology.

D. Maślińska, M. Dąmbska, S. Maśliński

PRZECHODZENIE DICHLORFOSU PRZEZ ŁOŻYSKO KRÓLIKA

Streszczenie

Określono przechodzenie dichlorfosu (DDVP) przez łożysko. Ciężarnym królicom w dniu spodziewanego porodu podawano doustnie 6 mg/kg DDVP rozpuszczonego w oleju słonecznikowym.

Stężenie DDVP we krwi płodów oznaczano metodą chromatografii gazowej po 5, 10, 20, 30 i 120 minutach od podania preparatu ciężarnym samicom.

We wszystkich badanych próbach stwierdzono obecność pestycydu. Największe stężenie DDVP (7,692 $\mu\text{mol/l}$) zaobserwowano po 20 minutach, po czym następował stopniowy jego spadek. Wyniki badań wskazują na możliwość uszkadzającego działania pestycydu na płód w następstwie jego przejścia przez łożysko.

Д. Маслиньска, М. Домбска, С. Маслиньски

ПРОНИКНОВЕНИЕ ДИХЛОРФОСА ЧЕРЕЗ ПЛАЦЕНТУ КРОЛИКА

Резюме

Исследовано проникновение дихлорфоса (DDVP) через плаценту кролика. Беременным самкам за день до родов вводили *per os* распущенный в подсолнечном масле DDVP в количестве 6 мг/кг веса тела.

Методом газовой хроматографии измеряли у плодов концентрацию DDVP в крови через 5, 10, 20, 30 и 120 минут после подачи препарата беременным

самкам. Во всех исследованных образцах было обнаружено присутствие пестицида. Самая большая концентрация (DDVP 7.692 $\mu\text{M}/\text{л}$) была определена через 20 минут после воздействия препарата, после чего наступало постепенное снижение его концентрации. Полученные данные указывают на возможность воздействия пестицида на плод через плаценту.

REFERENCES

1. Casida J. E., Mc Bride L., Niedermeier R. P.: Insecticide, metabolism, metabolism of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate in relation to residue in milk and mammalian tissues. *J. Agr. Food Chem.*, 1962, 10, 370—377.
2. Dąbwska M., Maślińska D., Rakowska I., Rutczyński M.: Ocena wpływu zatrucia dichlorfossem królików i szczurów w czasie ciąży na stan i rozwój potomstwa. *Bromat. Chemia Toksykol.* 1978, 11, 355—357.
3. Maślińska D., Zalewska Z.: Effect of Dichlorvos, Administered to the Pregnant Rabbits on the Cholinesterases Activity in the Progeny. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1978, 16, 335—342.
4. Maślińska D., Zalewska Z.: Activity of Some Mitochondrial Enzymes in the Progeny of Rabbits Treated with Dichlorvos in the Gestation Period. *Folia Histochem. Cytochem.* 1978, 16, 139—146.
5. Pachecka J., Suliński A., Traczykiewicz K.: The effect of acute intoxication by dichlorvos and trichlorophan on the activities of some rat brain esterases. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 85—92.
6. Potter J. C., Boyer A. C., Marxmiller R. L., Young R., Loeffler J. E.: Radioisotope residues of dichlorvos and its metabolites in pregnant sows and their progeny dosed with dichlorvos- ^{14}C or dichlorvos- ^{36}Cl formulated as PVC pellets. *J. Agr. Food Chem.* 1973, 21, 734—738.
7. Siers D. G.: Late gestation feeding of dichlorvos: A physiological characterization of the neonate and growth survival response. *J. Anim. Sci.*, 1974, 42, 381—393.
8. Thompson J. F.: *Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples.* Ed. J. F. Thompson, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, 1974.
9. Thorpe E., Wilson A. R., Dix R. M., Blair D.: Teratological studies with dichlorvos vapour in rabbits and rats. *Arch. Toxikol.*, 1972, 30, 29—38.
10. Vogin E. E., Carson S.: Teratology studies with dichlorvos in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1971, 19, 377—378.
11. Zalewska Z., Rakowska I., Matraszek G., Sitkiewicz D.: Effect of dichlorvos on some enzyme activities of the rat brain during postnatal development. I. Cholinesterases. *Neuropat. Pol.*, 1976a, 15, 255—262.
12. Zalewska Z., Wolna B., Sitkiewicz D., Bicz W.: Effect of dichlorvos on some enzyme activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases. *Neuropat. Pol.*, 1976b, 15, 367—372.

Authors address: Laboratory of Developmental Neuropathology Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, Poland.

KOMUNIKATY

W dniach od 14 do 16 września odbędzie się w Essen (RFN) zjazd Niemieckiego Towarzystwa Neuropatologów i Neuroanatomów. Tematem zjazdu będą odchylenia immunologiczne, defekty immunologiczne i supresja immunologiczna a zapalenia mózgu.

*
* * *

Komisja Neurochemii i Komisja Chorób Nerwowo-Mięśniowych Komitetu Nauk Neurologicznych PAN oraz Sekcja Neurochemii Polskiego Towarzystwa Neurologicznego organizują w dniach 12—13 października 1979 r. w Puławach XIV Dzień Neurochemii Klinicznej na temat biochemii mięśni i nerwów obwodowych.

Termin zgłaszania referatów i doniesień oraz uczestnictwa upływa 1 maja 1979 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Prof. dr hab. *Mieczysław Wender*,
Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów AM w Poznaniu,
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

*
* * *

Sekcja Neurologii Rozwojowej przy krakowskich oddziałach Polskiego Towarzystwa Neurologicznego i Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego oraz Instytut Pediatryi AM organizują w Krakowie w dniu 19 listopada 1979 r. Konferencję Naukową w ramach dorocznego Dnia Neurologii Dziecięcej.

Program Konferencji:

— Dyskusja „okrągłego stołu” na temat padaczki z napadami zgięciowymi u niemowląt.

— Podostre twardniejące zapalenie mózgu u dzieci (SSPE).

Termin zgłaszania doniesień na temat SSPE i przesłania streszczeń upływa 1 maja 1979 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Specjalistyczny Zespół Matki i Dziecka,
Poradnia Neurologiczna,
31-503 Kraków, ul. Strzelecka 2/4.

*
* * *

W dniu 3 października 1979 odbędzie się w Saint Louis, Missouri, (USA) IX Międzynarodowe Sympozjum Towarzystwa im. Fultona poświęcone problemowi neuropeptydów w mózgu.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Prof. dr Victor Soriano,
Calle Buenos Aires 363
Montevideo, Uruguay.

*
* * *

W okresie od 3 do 6 października 1979 odbędzie się w Budapeszcie Sympozjum Neurologii i Psychiatrii Dziecięcej.

Tematy Sympozjum z zakresu neurologii obejmą:

— znaczenie nowych metod neurofizjologicznych w badaniu neurologicznym dzieci,

— choroby metaboliczne układu nerwowego u dzieci,

— doniesienia wolne.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

A. Mátyus, M.D.
Heim Pal Hospital for Children,
Neurological Department
H 1089 Budapest,
Üllői ut. 86.

Jerzy Dymecki

ZUZANNA KRAŚNICKA, BARBARA GAJKOWSKA

WPŁYW DICHLORFOSU (DDVP) NA TKANKĘ NERWOWĄ
HODOWANĄ IN VITRO.

(BADANIA W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM I ELEKTRONOWYM)

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik Pracowni: doc. dr J. Borowicz

Dichlorfos należy do fosforoorganicznych związków owadobójczych powszechnie stosowanych w rolnictwie. Toksyczne działanie insektycydów fosforoorganicznych dotyczące przede wszystkim procesów utleniania komórkowego wykazane zostało w badaniach biochemicznych (Heidker, Pardini 1972; Pachecka i wsp. 1975; Sikorska i wsp. 1975; Sitkiewicz, Zalewska 1975; Biczowa i wsp. 1975) i histoenzymatycznych w postaci osłabienia aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej (Szumańska, Gadamski 1977) oraz zahamowania aktywności acetylocholinesterazy (Lancaster 1972; Gadamski, Szumańska 1977).

W badaniach doświadczalnych przeprowadzanych na zwierzętach przy podawaniu związków fosforoorganicznych przez przewód pokarmowy należy liczyć się z toksycznym wpływem nie tylko samych związków lecz również produktów ich przemiany. Zastosowanie modelu organotypowych hodowli tkankowych, wykluczające metaboliczną rolę wątroby, jak również udział naczyniowych układów barierowych pozwala na ocenę bezpośredniego wpływu dichlorfosu na obraz morfologiczny tkanki nerwowej.

Celem badań była ocena zmian strukturalnych i ultrastrukturalnych w poszczególnych elementach tkankowych ośrodkowego układu nerwowego w hodowli pozaustrojowej, stanowiących następstwo bezpośredniego działania dichlorfosu. Badania uzupełniono analizą wpływu pestycydu na aktywność wybranych enzymów oksydacyjno-redukcyjnych i acetylocholinesterazy.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na organotypowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych, które prowadzono według standardowej metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Do wyselekcjonowanych 3-tygodniowych hodowli podawano dichlorfos (0,0-dwumetylo-0/2,2-dwuchlorowinylo/fosforan — otrzymany z Instytutu Chemii Fizycznej PAN). Badania prowadzono w trzech grupach doświadczalnych różniących się stężeniem pestycydu. W grupie I podawano 10 μg dichlorfosu rozpuszczonego w 0,01 ml 96% etanolu/1 ml medium. W grupie II zastosowano dawkę zwiększoną dwukrotnie (20 μg w 0,01 ml 96% etanolu/1 ml medium), a w grupie III dawkę dziesięciokrotną w stosunku do grupy I (100 μg w 0,01 ml 96% etanolu/1 ml medium). Ze względu na alkoholowy roztwór podawanego pestycydu wykonano także badania na hodowlach, którym dodawano do medium 96% etanol w ilości 0,01 ml/1 ml medium i 0,1 ml/1 ml medium. Okres działania dichlorfosu i etanolu na hodowle wynosił 3 dni. Grupę kontrolną stanowiły 3 tygodniowe hodowle prowadzone w standardowych warunkach równoległe do wszystkich grup doświadczalnych.

Do badań w mikroskopie świetlnym zastosowano metody histologiczne (Nissla — przy użyciu błękitu toluidyny i Bodiana), histochemiczne (Sudan czarny B, PAS, PAS-dimedon) oraz histoenzymatyczne (oznaczano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH), dehydrogenazy glutaminowej (GDH) i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6-PDH), a także acetylocholinesterazy (AChE).

Badaniom mikroskopowo-elektronowym poddano hodowle z grupy II (dichlorfos w dawce 20 μg /1 ml medium) oraz z grupy kontrolnej. Materiał utrwalano w 1,6% roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz w 1% czterotlenku osmu. Utrwalone hodowle odwadniano w alkoholu etylowym o wzrastającym stężeniu i zatapiało w eponie 812. Ultracienkie skrawki krojono na ultramikrotomie Reicherta OmU 2 i kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał przeglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM 7 A.

WYNIKI

Badania w mikroskopie świetlnym

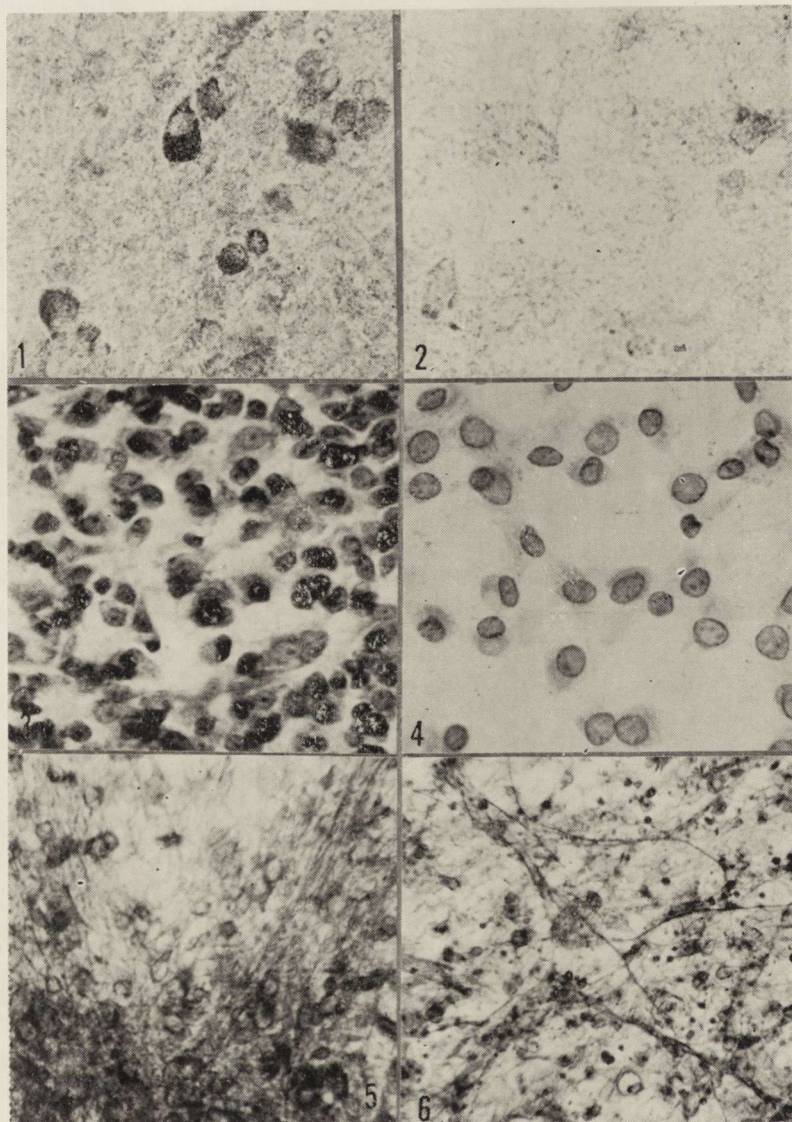
Podanie do hodowli 96% etanolu w obu stosowanych stężeniach (0,01 ml/1 ml medium i 0,1/1 ml medium) nie powoduje odchyłań w strukturze tkanki nerwowej ani w aktywności badanych enzymów w porównaniu z hodowlami prowadzonymi w warunkach standardowych.

Hodowle z grupy I z najniższą dawką dichlorfosu, w obrazach histologicznych i histochemicznych, nie wykazują również nieprawidłowości. Struktura komórek nerwowych i glejowych jak również osłonek mielinowych nie różni się od obrazów z hodowli kontrolnych. Podobnie nie obserwuje się różnicy w obrazie aktywności enzymatycznej hodowli z I grupy doświadczalnej i z grup kontrolnych.

Hodowle grupy II z podwójną dawką dichlorfosu nie wykazują zmian w barwieniach przeglądowych ani w preparatach barwionych metodą Bodiana i Sudanem Czarnym B. Porównanie preparatów grupy II i grup kontrolnych barwionych metodą PAS nie uwidacznia także istotnych różnic w zawartości substancji PAS-dodatnich. Zarówno kontrolne jak i doświadczalne hodowle barwione metodą PAS-dimedon nie wykazują obecności glikogenu.

Badanie końcowych produktów reakcji enzymatycznych wykazuje nieznaczne osłabienie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej jedynie w komórkach glejowych strefy wzrostu. Odczyn na dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową wydaje się zbliżony do normy. Najistotniejsze zmiany w tej grupie doświadczalnej dotyczą aktywności acetylocholinesterazy. W hodowlach kontrolnych większość komórek nerwowych wykazuje wysoką aktywność enzymu (ryc. 1). Natomiast hodowle traktowane dichlorfossem wykazują wyraźne osłabienie jego aktywności (ryc. 2).

Największe zmiany patologiczne spostrzega się w hodowlach grupy III, w której zastosowano najwyższą dawkę dichlorfosu. Zmiany o charakterze zwyrodnieniowym dotyczą zarówno komórek eksplantatu jak i strefy wzrostu. W preparatach barwionych metodą Nissla stwierdza się rozluźnienie struktury hodowli ze zmniejszeniem ilości komórek w polu widzenia (ryc. 3, 4). Jądra komórek są jasne, ograniczone wyrażną błoną, szczątkowa cytoplazma wybarwia się słabo. Komórki nerwowe i glejowe tracą wypustki. W barwieniu metodą PAS zawierają one substancje PAS-dodatnie, zlokalizowane w pobliżu jąder lub rozproszone w podłożu hodowli. Nie wykrywa się jednak obecności ziaren glikogenu. Barwienie metodą Bodiana potwierdza znaczne uszkodzenie struktury tkanki nerwowej w porównaniu z hodowlami kontrolnymi (ryc. 5, 6). Prawie wszystkie komórki są bezwypustkowe. W preparatach barwionych Sudanem Czarnym B nie spostrzega się włókien otoczonych osłonkami mielinowymi, w zachowanych komórkach stwierdza się duże ilości ziaren sudanofilnych. Odczyn histochemiczny ujawniający aktywność badanych dehydrogenaz jest wybitnie osłabiony lub negatywny we wszystkich prawie komórkach hodowli. Dotyczy to zarówno aktywności wszystkich dehydrogenaz jak również odczynu na



Ryc. 1. Hodowla z grupy kontrolnej. Wysoka aktywność acetylocholinesterazy w komórkach nerwowych mózdzku. Pow. 400 ×.

Fig. 1. Control culture. High acetylcholinesterase activity in nerve cells of cerebellum. × 400.

Ryc. 2. Grupa II. Osłabiona aktywność acetylocholinesterazy w neuronach mózdzku. Pow. 400 ×.

Fig. 2. Group II. Decreased acetylcholinesterase activity in cerebellar neurons. × 400.

Ryc. 3. Obraz hodowli z grupy kontrolnej w barwieniu błękitem toluidyny. Pow. 400 ×.

Fig. 3. Control culture stained with toluidine blue. × 400.

acetylocholinesterazę. Obrazy przedstawione na kolejnych rycinach 7—12 wykazują wyraźne różnice w aktywnościach badanych enzymów w hodowlach kontrolnych i poddanych działaniu dichlorfosu.

Badania mikroskopowo-elektronowe

Dla wyjaśnienia ultrastrukturalnej lokalizacji i charakteru wczesnych zmian powstających pod wpływem działania dichlorfosu wydawało się celowe przebadanie w mikroskopie elektronowym hodowli z II grupy doświadczalnej nie wykazujących w mikroskopie świetlnym zmian strukturalnych i niewielkie stosunkowo odchylenia w aktywności badanych enzymów. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe wykazały zmiany morfologiczne w komórkach nerwowych i glejowych, przy czym charakter i nasilenie nieprawidłowości były zróżnicowane w zależności od typu komórki.

W hodowlach poddanych działaniu dichlorfosu tylko niektóre neurony wykazują zmiany w obrazie ultrastrukturalnym. Obok obfitej szorstkiej siatki śródplazmatycznej i dobrze rozwiniętego aparatu Golgiego (ryc. 13) widoczne są w cytoplazmie liczne ciała tłuszczowe oraz pojedyncze uszkodzone mitochondria. Mitochondria są duże, o jasnej macierzy, często pozbawione grzebieni.

Większość aksonów zarówno znajdujących się w początkowych stadiach mielinizacji (ryc. 14) jak i z wykształconą osłonką mielinową (ryc. 15) wykazuje znaczne zmiany zwyrodnieniowe. Włókna osiowe często są pozbawione organelli, a zawierają jedynie niewielką ilość kłaczkowatej substancji. W aksonach o większej średnicy stwierdza się również brak organelli, a oprócz substancji kłaczkowatej jest w nich obecny drobnoziarnisty materiał rozproszony lub zawarty w pęcherzykach (ryc. 14, 15). Koncentryczny układ blaszek mielinowych jest wyraźnie zaburzony. Widoczne są rozwarstwienia i znaczne porozsuwanie blaszek lub ogniskowe zatarcie budowy osłonek (ryc. 15).

Wśród komórek glejowych największe zmiany w obrazie ultrastrukturalnym wykazują oligodendrocyty. W ich cytoplazmie stwierdza się obfite nagromadzenie ciał tłuszczowych, wyraźnie większe niż w oligodendrocytach hodowli kontrolnych (ryc. 16). Zawierają one lizosomy

Ryc. 4. Grupa III. Zmiany zwyrodnieniowe w komórkach hodowli. Nissl. Pow. 400 ×.

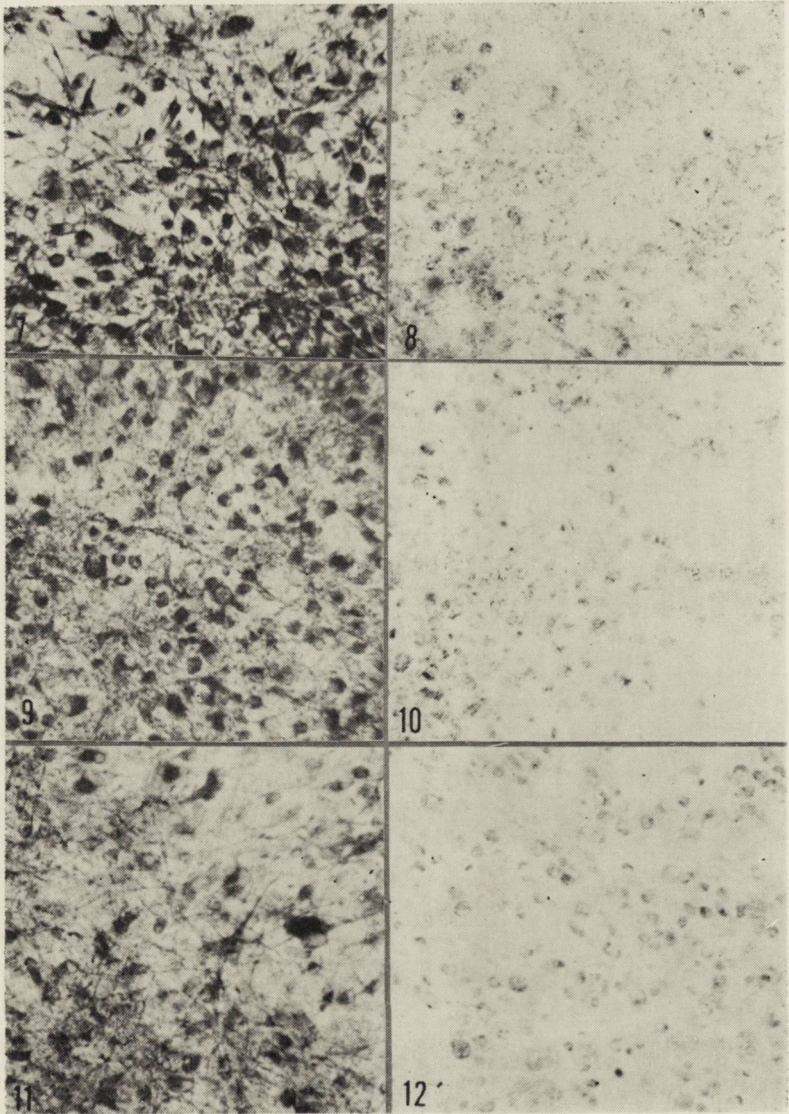
Fig. 4. Group III. Degenerative changes in culture cells. Nissl. × 400.

Ryc. 5. Hodowle grupy kontrolnej barwione metodą Bodiana. Pow. 200 ×.

Fig. 5. Control culture. Bodian staining. × 200.

Ryc. 6. Grupa III. Zmniejszenie ilości włókien nerwowych. Bodian. Pow. 200 ×.

Fig. 6. Group III. Decrease in number of nerve fibres. Bodian. × 200.



Ryc. 7. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w hodowli grupy kontrolnej. Pow. 200 \times .

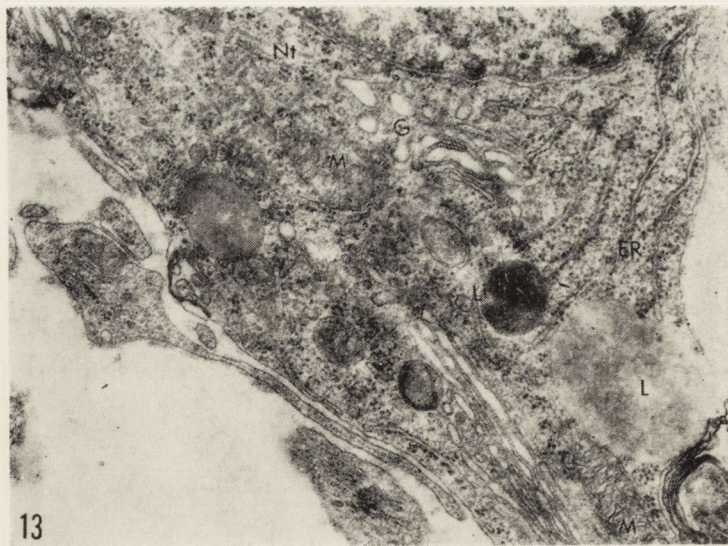
Fig. 7. Succinate dehydrogenase activity. Control culture. $\times 200$.

Ryc. 8. Grupa III. Znaczne osłabienie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Pow. 200 \times .

Fig. 8. Group III. Marked decrease of succinate dehydrogenase activity. $\times 200$.

Ryc. 9. Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej w hodowli kontrolnej. Pow. 200 \times .

Fig. 9. Glutamate dehydrogenase activity in control culture. $\times 200$.



Ryc. 13. Grupa II. Fragment neuronu z dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego (G), z normalnie wykształconą siatką ergastoplazmatyczną (ER). W cytoplazmie widoczne mitochondria (M), neurotubule (Nt), lizosomy (Li) i ciała tłuszczowe (L). Pow. 20 000 \times .

Fig. 13. Group II. Fragment of neuron with well developed Golgi apparatus (G) and ergastoplasmic reticulum (ER). In cytoplasm discernable mitochondria (M), neurotubules (Nt), lysosomes (Li) and lipid bodies (L). $\times 20\,000$.

oraz nieliczne obkurczone mitochondria, a także obfite gliotubule (ryc. 17). Podobne zmiany, ale o mniejszym nasileniu spostrzega się w komórkach astrogleju (ryc. 18).

OMÓWIENIE

Dichlorfos podany bezpośrednio do płynu odżywczego hodowli powoduje uszkodzenia strukturalne w komórkach hodowanej tkanki nerwowej. Stwierdzone nieprawidłowości histoenzymatyczne stanowić mogą wykładniki zaburzeń metabolicznych. Przedstawione wyniki wskazują na wyraźną zależność nasilenia nieprawidłowości od stężenia insek-

Ryc. 10. Grupa III. Wyraźne osłabienie aktywności dehydrogenazy glutaminianowej. Pow. 200 \times .

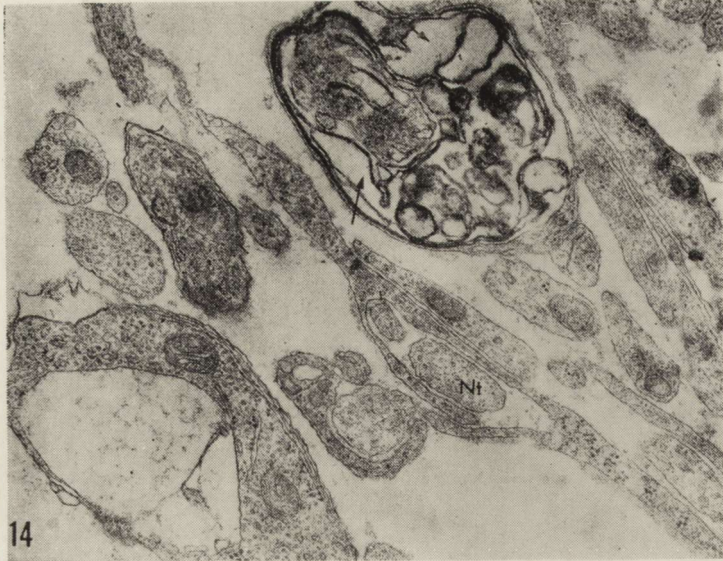
Fig. 10. Group III. Marked decrease of glutamate dehydrogenase activity. $\times 200$.

Ryc. 11. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w hodowli grupy kontrolnej. Pow. 200 \times .

Fig. 11. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in control culture. $\times 200$.

Ryc. 12. Grupa III. Osłabiona aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Pow. 200 \times .

Fig. 12. Group III. Decreased glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. $\times 200$.



Ryc. 14. Grupa II. Liczne uszkodzone aksony w początkowych stadiach mielinizacji. Widoczne rozwarstwienie blaszek mielinowych (strzałki). W większości aksonów zatarta struktura aksoplazmy, w niektórych widoczne neurotubule (Nt). Pow. 28 000 \times .

Fig. 14. Group II. Numerous damaged axons in the initial stages of myelination. Separation of myelin lamellae (arrows). In most axons obliterated axoplasm structure, in some neurotubules (Nt). $\times 28\ 000$.

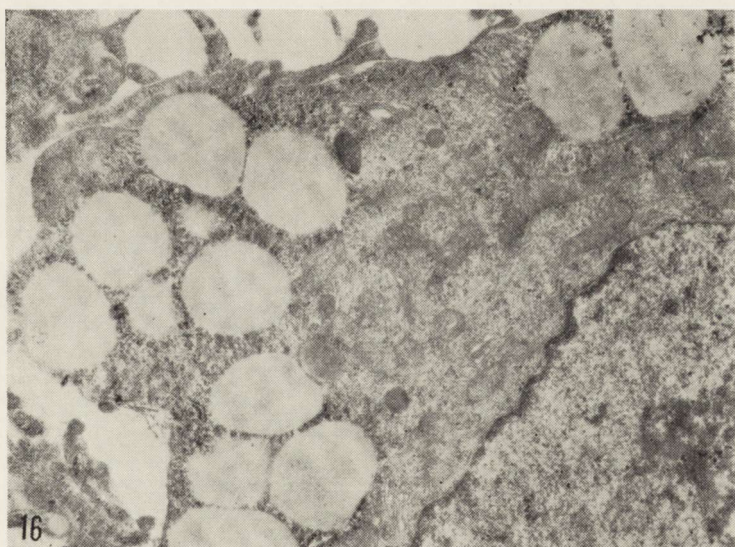
tycydu fosforoorganicznego. Dawkę dichlorfosu zastosowaną w I grupie doświadczałnej obliczono w stosunku do zawartości białka w skrawku tkanki nerwowej przypadającej na jedną hodowlę. Dawka ta okazała się niewystarczająca dla wywołania uchwytynych zmian w obrazie morfologicznym hodowli. Przy podwójnej dawce insektycydu (grupa II) stwierdzono wyraźny efekt antycholinesterazowy oraz nieznaczne osłabienie aktywności enzymów oksydoredukcyjnych w komórkach glejowych. Nieprawidłowości stwierdzone w tej grupie zbliżone są do zmian występujących w doświadczalnym zatruciu *in vivo*. Jednorazowe podanie dichlorfosu w dawce 50% LD₅₀ powodowało osłabienie aktywności acetylocholinesterazy w komórkach nerwowych warstwy ziarnistej kory mózdzku szczura (Gadamski, Szumańska 1977). Ta sama dawka prowadziła do uogólnionego osłabienia aktywności enzymów oddechowych w mózgu (Szumańska, Gadamski 1977).

Hodowle z grupy III, potraktowane dawką pięciokrotnie większą w stosunku do grupy II, wykazują cechy bardzo znacznego uszkodzenia, prowadzącego do nieodwracalnych zmian zarówno komórek nerwowych jak i glejowych w hodowli.



Ryc. 15. Grupa II. Włókno osiowe pozbawione prawie całkowicie organelli, wypełnione niewielką ilością materiału włóknistego lub drobnoziarnistego zawartego w pęcherzykach (strzałka). Zaburzony koncentryczny układ blaszek mieliny. Pow. 27 000 \times .

Fig. 15. Group II. Axon almost completely depleted of organelles, filled with small amount of flake-like and microgranular material contained in vesicles (arrow). Disturbed concentric arrangement of myelin lamellae. $\times 27\ 000$.



Ryc. 16. Grupa II. W oligodendrocyte obecna duża ilość ciał tłuszczowych i liczne małe mitochondria. Pow. 12 000 \times .

Fig. 16. Group II. Large quantities of lipid bodies and small mitochondria in oligodendrocyte. $\times 12\ 000$.



Ryc. 17. Grupa II. Oligodendrocyt z dużą ilością gliotubuli (Gt), lizosomów (Li) i ciał tłuszczowych (L). Pow. 22 000 ×.

Fig. 17. Group II. Oligodendrocyte with large number of gliotubules (Gt), lysosomes (Li) and lipid bodies (L). × 22 000.



Ryc. 18. Grupa II. Fragment niezmienionej komórki astrocytarnej z niewielką ilością ciał lizosomopodobnych. Pow. 22 000 ×.

Fig. 18. Group II. Fragment of unaltered astrocytic cell with a few lysosome-like bodies. × 22 000.

Badania mikroskopowo-elektronowe hodowli z grupy II pozwoliły na uwidocznienie nieprawidłowości ultrastrukturalnych, których nie wykazano w obrazach z mikroskopu świetlnego. Najistotniejsze zmiany ultrastrukturalne wyrażały się uszkodzeniem aksoplazmy i osłonki mielinowej oraz nagromadzeniem substancji tłuszczowych w cytoplazmie oligodendrocytów, a także nieprawidłowościami mitochondriów w glej skąpowypustkowym. W przeciwieństwie do zmian w wypustkach, perikaria komórek nerwowych wykazywały znacznie mniejsze uszkodzenia. Podobnie w odróżnieniu od oligodendrocytów, glej gwiaździsty wykazywał nieznaczne zmiany patologiczne.

Zarówno w mikroskopie świetlnym jak i w mikroskopie elektronowym nie stwierdzono obecności złogów glikogenu w żadnym typie komórek hodowli, w przeciwieństwie do badań prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych, u których metodami biochemicznymi i histochemicznymi wykazano przejściowe nagromadzenie wielocukru w mózgach (Biczowa i wsp. 1975; Szumańska, Gadamski 1977). Gromadzenie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym stanowi częste następstwo niedotlenienia tkanki nerwowej (Mossakowski i wsp. 1968; Kraśnicka 1969; Kraśnicka i wsp. 1974, 1976). Pachecka i wsp. (1975), Sitkiewicz i wsp. (1975), Biczowa i wsp. (1975) na podstawie wyników badań biochemicznych przypuszczają również, że wzrost zawartości glikogenu w mózgach zwierząt doświadczalnych po zatruciu dichlorofosem jest skutkiem niedotlenienia wywołanego działaniem pestycydu na układy enzymatyczne łańcucha oddechowego mitochondriów komórkowych mózgu. Wydaje się, że brak glikogenu w naszym materiale można tłumaczyć przedłużonym działaniem dichlorofosu (3 doby) na hodowle mózdzku i przeprowadzeniem odczynów histochemicznych w okresie, w którym zmiany mogą być już niewykrywalne.

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące zahamowania aktywności acetylocholinesterazy i zaburzeń w aktywności enzymów oksydoredukcyjnych w następstwie działania fosforoorganicznych insektycydów. Charakter morfologiczny zmian sugeruje również uszkadzające działanie dichlorofosu na struktury błonowe komórek. Uszkodzenie osłonek mielinowych wiązać należy zapewne z ciężkimi zmianami w oligodendrocytach. Podobnego charakteru nieprawidłowości w ultrastrukturze komórek odpowiedzialnych za procesy mielinizacji stwierdzono również w wielu innych układach doświadczalnych, charakteryzujących się występowaniem uszkodzeń osłonek mielinowych (Korthals i wsp. 1973; Kraśnicka i wsp. 1974, 1976; Mossakowski, Gajkowska 1976).

З. Красницка, Б. Гайковска

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРФОСА (DDVP) НА НЕРВНУЮ ТКАНЬ,
КУЛЬТИВИРОВАННУЮ *IN VITRO*
(ИССЛЕДОВАНИЯ В СВЕТОВОМ И ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПАХ)

Резюме

Целью работы была оценка структурных и ультраструктурных изменений в отдельных тканевых элементах центральной нервной системы в культуре ткани *in vitro*, являющихся следствием непосредственного воздействия дихлорфоса. Исследования были дополнены анализом влияния пестицида на активность некоторых окислительно-восстановительных ферментов и ацетилхолинэстеразы.

Обнаружена четкая зависимость степени нарушений от концентрации пестицида в питательной среде. Подача дихлорфоса в количестве 20 μg на 1 мл среды вызывала во всех типах клеток значительное ослабление активности ацетилхолинэстеразы и незначительное снижение активности исследованных окислительно-восстановительных ферментов. Исследованные в электронном микроскопе культуры этой экспериментальной группы обнаружили изменения в ультраструктуре, заключающиеся в повреждениях аксоплазмы и миелиновой оболочки.

В противоположность изменениям, наблюдаемым в отростках, в перикарионах нервных клеток повреждения были незначительными. В глиальных клетках более значительные повреждения были обнаружены в олигодендроцитах и выражались скоплением жировых тел и нарушением митохондриальной структуры.

Культуры экспериментальной группы с дозой 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ обнаруживали черты значительных повреждений, ведущих к необратимым изменениям как нервных клеток, так и глиальных.

Z. Kraśnicka, B. Gajkowska

EFFECT OF DICHLORVOS (DDVP) ON NERVE TISSUE CULTURED *IN VITRO*.
(STUDIES IN LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPE)

Summary

The aim of the work was to evaluate the structural and ultrastructural changes in particular tissue elements of the central nervous system in tissue culture, following direct administration of Dichlorophos. In addition, the effect of the pesticide on the activity of some oxidoreducing enzymes and acetylcholinesterase was analyzed.

The intensity of changes was observed to depend upon the pesticide concentration in the medium. Administration of 20 $\mu\text{g}/1$ ml medium of Dichlorvos produced a marked decrease of the acetylcholinesterase activity and only a slight drop in the activity of oxidoreducing enzymes in all cell types. Electron-microscopic studies revealed ultrastructural changes consisting in the damage of axoplasm and myelin sheath. Contrary to changes in the processes, the perikarya of nerve cells showed only minor alterations. Among glial cells, oligodendrocytes

showed more pronounced lesions consisting in accumulation of lipid substances and damage of mitochondria.

Cultures grown in the presence of 100 µg/ml of Dichlorvos showed features of a marked damage leading to irreversible changes in both nerve and glial cells.

PIŚMIENNICTWO

1. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenie ATP, ADP, AMP w mózgu szczurów w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem — dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 259—272.
2. Gadamski R., Szumańska G.: Wpływ zatrucia fosforoorganicznym insektycydem — dichlorfosem (DDVP) na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 537—544.
3. Heidker J. C., Pardini R. S.: Inhibition of mitochondrial electron transport by guthion, some related insecticides and degradative products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1972, 8, 141—146.
4. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 315—322.
5. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1975, 3, 397—408.
6. Kraśnicka Z.: Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju zarodkowym. *Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 395—434.
7. Kraśnicka Z., Konowałow H., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje czuciowe hodowane in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 357—370.
8. Kraśnicka Z., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Effect of shortlasting anoxia on in vitro culture of cerebellum. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 11—22.
9. Lancaster R.: Inhibition of acetylcholinesterase in the brain and diaphragm of rats by a tertiary organophosphorus anticholinesterase and its quaternary analogue, in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2587—2597.
10. Mossakowski M. J., Long M., Myers R. E., de Curet H. R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1968, 3, 500—516.
11. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 441—449.
12. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach in vitro. *Roczniki PZH*, 1975, 26, 347—356.
13. Sikorska M., Biczowa B., Bicz W., Skonieczna M.: Glycogen content, glycolytic and respiratory activity, and ATP, ADP and AMP concentrations in rat brain following trichlorophon (Dipterex) intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 447—454.

14. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 463—469.
15. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Skonieczna M., Śliwińska W.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na utlenianie bursztynianu i aktywność oksydazy cytochromowej wątroby szczura. *Roczniki PZH*, 1975, 26, 357—364.
16. Szumańska G., Gadamski R.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w zatruciu fosforoorganicznym pestycydem Dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 523—535.

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

STANISŁAW KRAJEWSKI

BADANIA IMMUNOMORFOLOGICZNE
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO
W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY POSUROWICZEJ U KRÓLIKÓW

DONIESIENIE WSTĘPNE

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

Choroby kompleksów immunologicznych, których klasycznym przykładem jest choroba posurowicza, są częstym schorzeniem spotykanym w patologii ludzkiej i zwierzęcej (Oldstone, Dixon 1971). Przyczyną zmian chorobowych jest deponowanie w naczyniach i otaczających je tkankach kompleksów antygen-przeciwciało, aktywizujących dopełniaczowo-zależne mechanizmy lityczne (Cochrane, Henson 1970). Z powodu fizjologicznej funkcji filtracyjnej, nerka i sploty naczyniówki okazały się strukturami narażonymi w pierwszej kolejności na patogenne działanie kompleksów. Kompleksy immunologiczne lokalizowano w tych tkankach w postaci ziarnistych złogów immunoglobulin i komponentu C3 dopełniacza (w badaniu immunofluorescencyjnym) lub elektronowo-gęstych tworów (w mikroskopie elektronowym), u chorych z toczeniem układowym rumieniowatym (SLE) (Atkins i wsp. 1972), w autoimmunizacyjnym zapaleniu nerek w zespole Goodpastura (McIntosh i wsp. 1975) oraz u zwierząt doświadczalnych w ostrej chorobie posurowiczej (Koss i wsp. 1973) i w przewlekłych zakażeniach wirusowych (Lampert, Oldstone 1974; Morgan i wsp. 1977).

W przebiegu przewlekłej choroby posurowiczej dochodzi do ciężkiego uszkodzenia nerek, przyjmującego postać przewlekłego zapalenia kłębuszkowego nerek typu rozplemowego, prowadzącego do wystąpienia zespołu mocznicowego. W związku z powyższym postanowiono wykorzystać ten model doświadczalny do oceny uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego związanego z mocnicą.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy była wstępna ocena zmian strukturalnych i immunomorfologicznych występujących w układzie nerwowym w przebiegu przewlekłej choroby posurowiczej.

Celowość badań wydawała się tym bardziej uzasadniona, ponieważ w dostępnym piśmiennictwie nie spotkano danych dotyczących neuropatologii tego doświadczalnego zespołu chorobowego.

MATERIAŁ I METODY

Trzydzieści królików białych, rasy nowozelandzkiej, o wadze 2,5—3,0 kg immunizowano codziennie (6 razy w tygodniu), iniekcjami dożylnymi albuminy wołowej (BSA firmy BDH), zawieszanej w roztworze fizjologicznym soli, zbuforowanym buforem fosforanowym o pH 7,6 (PBS), i wyjałowionej przez sączenie miliporowe (Dixon i wsp. 1961). W pierwszym tygodniu wstrzykiwano codziennie 20 mg roztworu białka. W każdym z kolejnych 5 tygodni dawkę dzienną podnoszono o 10 mg aż do osiągnięcia dawki maksymalnej wynoszącej 50 mg, którą utrzymywano do końca doświadczenia trwającego 13 tygodni.

Cotygodniowo pobierano próbki krwi, w których oznaczano poziom mocznika i kreatyniny (w autoanalyzerze SMA 6/60 i 12/60 firmy Technicon) oraz miano przeciwciał przeciwko albuminie wołowej metodą podwójnej immunodyszki w żelu agarowym wg metody Ouchterlony (1948).

Króliki skrwawiano przez nakłucie serca i pobierano materiał do badań morfologicznych i immunofluorescencyjnych. Badania obejmowały mózg, nerw kulszowy, nerki, śledzionę i węzeł chłonny pachowy. Z ośrodkowego układu nerwowego pobierano wycinki z półkul mózgu na wysokości jąder podstawy, spłotu naczyńiówkowego oraz mózdzku z pniem mózgu i tętnicą podstawną.

Materiał przeznaczony do badań histopatologicznych utrwalano w 10% formalinie, zatapiano w parafinie, a parafinowe skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną. Preparaty z układu nerwowego barwiono dodatkowo wg metody Klüvera. Hematoksyliną i eozyną barwiono również skrawki kriostatowe lustrzane w stosunku do skrawków używanych do badań immunomorfologicznych.

Część materiału przeznaczoną do badań immunofluorescencyjnych zamrażano w eterze naftowym, oziębionym do temperatury -80°C w mieszaninie acetonu i suchego lodu, a następnie skrawano w kriostacie na skrawki o grubości 4 μm . Stosowanymi odczynnikami były globuliny surowic zwierząt immunizowanych frakcjami osocza królika: immunoglobulinami G (kozia immunosurowica f-my Biomed), składnikiem C3 dopełniacza oraz włóknikiem (surowica immunizowanych kaczek). Globuliny kacze znakowano izotiocjanianem fluoresceiny (FITC), metodą dializy wg Clark'a i Shepardta (1963). Odczynnik przeciwko

BSA otrzymywano znakując FITC roztwór globulin królika o najwyższym mianie przeciwciał anti-BSA.

W celu oznaczenia białek związanych z tkanką, wykonywano porównawczo odczyny immunologiczne na skrawkach kriostatowych, nie płukanych i płukanych przez okres 1 godz. w roztworze fizjologicznym soli (PBS) na mieszadle magnetycznym. Po wstępnej ocenie stosowano rutynowo godzinne płukanie w PBS, nie utrwalonych, dokładnie wysuszonych skrawków kriostatowych, które następnie po utrwaleniu w acetonie inkubowano w komorze wilgotnej przez 30 min., z wyżej wymienionymi odczynnikami immunohistochemicznymi.

Jednemu z immunizowanych królików (nr 14) wstrzyknięto dożylnie na 3 godziny przed skrwawieniem wodny 2% roztwór błękitu Evansa w ilości 2 ml/kg. Po tygodniowym utrwaleniu w 10% formalinie bloki tkankowe skrawano na mikrotomie mrozeniowym.

Ocenę odczynów immunologicznych i umiejscowienia błękitu Evansa przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym „Ortholux” firmy Leitz.

Kontrolę doświadczenia stanowiły 3 króliki tej samej rasy i wieku nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

WYNIKI

Dane kliniczne

Dane kliniczne dotyczące badanych królików przedstawiono w tabeli 1. U 11 zwierząt, w 2—3 tygodniu od rozpoczęcia doświadczenia, stwierdzano podwyższenie poziomu mocznika we krwi od 47,1 mg% do 299 mg% (średni poziom przed rozpoczęciem doświadczenia 39,7 mg%) i kreatyniny od 1,2 mg% do 4,7 mg% (średnio u zwierząt kontrolnych — 0,9 mg%) oraz pojawienie się przeciwciał anti-BSA o różnych mianach (od 1 : 4 do 1 : 64). U dwóch królików, postępująca niewydolność nerek doprowadziła do śmierci w piątym tygodniu doświadczenia (nr 2, nr 3). Około 8 tygodnia wykładniki biochemiczne uszkodzenia nerek (mocznik, kreatynina), jak również miano przeciwciał anti-BSA, obniżały się na okres 2 tygodni, aby po 10 tygodniu ponownie wzrosnąć. W momencie zakończenia doświadczenia wszystkie króliki miały podwyższony poziom mocznika, w tym 4 powyżej 100 mg%. W przeważającej liczbie przypadków kreatynina wzrastała nieznacznie w trakcie trwania immunizacji; tylko w surowicy jednego królika osiągała wartość 12,9 mg% (nr 3). Najwyższe miano przeciwciał anti-BSA wynosiło 1 : 256 (nr 4). Przeciwciał anti-BSA nie stwierdzono w surowicy królika nr 5, który nie wytworzył ich w ogóle podczas przeprowadzanego doświadczenia.

Tabela 1. Dane kliniczne
Table 1. Clinical data

Nr królika Rabbit no	Czas immunizacji (tyg.)* Immunization duration (wk)	Mocznik (mg %) Urea		Kreatynina (mg %) Creatinine		Miano końcowe przeciwciał anti- -BSA Titre of anti- BSA antibody at time of sa- crifice
		Poziom najwyższy w trakcie doświadczenia The highest level during the experiment	Poziom przy za- kończeniu do- świadczenia At time of sacrifice	Poziom najwyższy w trakcie do- świadczenia The highest level during the ex- periment	Poziom przy za- kończeniu do- świadczenia At time of sacrifice	
1	13	102,72	102,72	1,9	1,8	1 : 64
2**	5	134,82 (3 tydz) (3 wk)	132,68	2,5	2,5	1 : 32
3**	5	213,00	213,00	12,9	12,9	1 : 32
4***	11	104,86 (5 tydz) (5 wk)	83,46	3,0	1,4	1 : 256
5	13	77,04 (7 tydz) (7 wk)	52,50	1,4	1,3	brak przeciwciał lack of antibody
6	13	76,90 (7 tydz) (7 wk)	49,22	1,6	1,1	1 : 32
7	13	59,90 (7 tydz) (7 wk)	49,30	1,4	1,0	1 : 128
8	13	143,38	143,38	2,2	2,2	1 : 128
9	13	124,12 (3 tydz) (3 wk)	77,04	4,7	1,2	1 : 16
10**	11	140,30 (7 tydz) (7 wk)	53,50	1,6	1,1	1 : 128
12***	9	92,02	92,02	1,4	1,4	1 : 32
14	13	179,76 (3 tydz) (3 wk)	47,08	4,1	1,3	1 : 4
16***	5	299,06 (3 tydz) (3 wk)	83,46	3,6	1,4	1 : 8

* — Maksymalna dawka dzienna podczas immunizacji w powyższych czasach — 50 mg BSA
Maximum daily dose during immunization — 50 mg BSA

** — Króliki, które zginęły w śpiączce mocznicowej. Rabbits dead in uremic coma.

*** — Króliki, które zginęły w szoku anafilaktycznym. Rabbits dead in anaphylactic shock.

Obraz histopatologiczny

Zmiany morfologiczne w nerkach odpowiadały obrazom przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek typu rozplemowego, o różnym stopniu nasilenia. W kłębkach obserwowano proliferację komórek nabłonka i śródbłonka, pogrubienie błony podstawnej włósniczek, zwłóknienie torebki Bowmana oraz zmiany bliznowate. Często (10 królików) spostrzegano nacieki limfocytarne w tkance śródmiąższowej otaczającej kłębki (ryc. 1), jak również w części rdzennej nerek (7 przypadków).

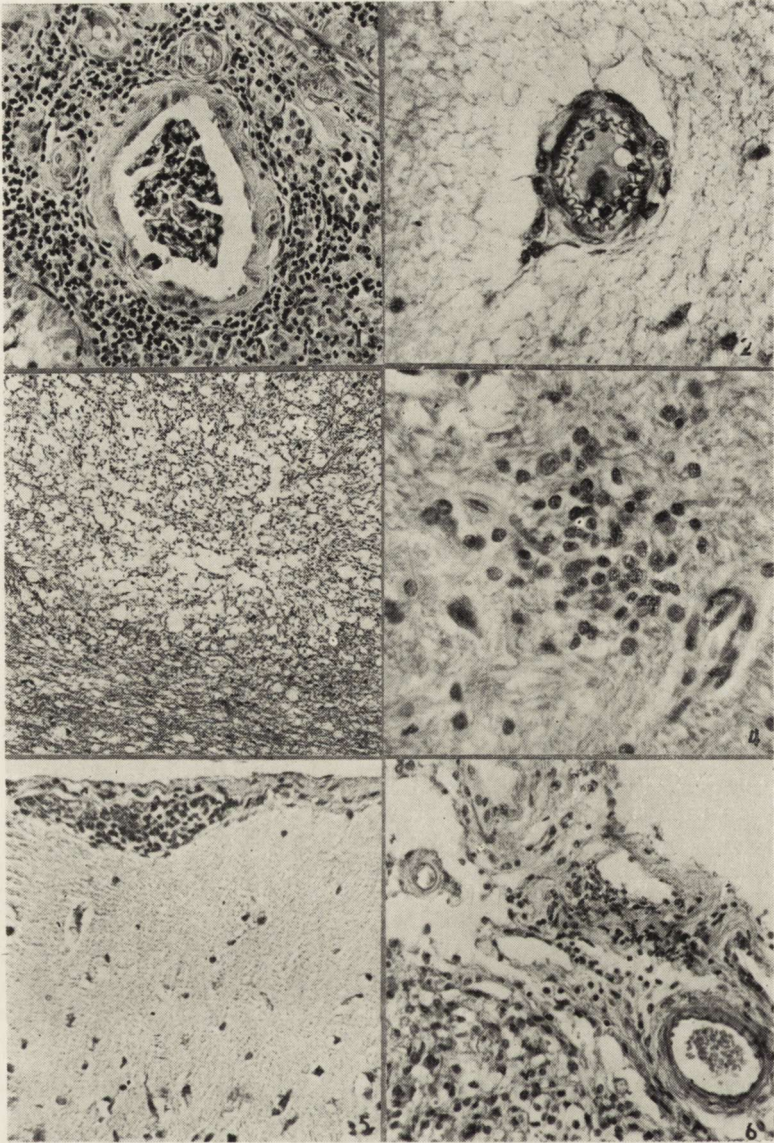
U wszystkich zwierząt w preparatach półkul mózgu i mózdzku stwierdzano wykładniki obrzęku mózgu, szczególnie nasilone wokół naczyń zawoju hipokampa (ryc. 2). Obserwowano różnego stopnia zgęszczenie warstwy podwysięłkowej, z rozplemem gleju podwysięłkowego i wysięłki. W jednym przypadku rozrzedzenie istoty białej mózdzku miało charakter wykształconego stanu gąbczastego (ryc. 3). W jego sąsiedztwie stwierdzono ponadto małe ognisko martwicy.

U wszystkich zwierząt w istocie białej mózgu stwierdzono rozplem gleju w postaci paciorkowatych nagromadzeń oligodendrocytów wzdłuż przebiegu włókien nerwowych. Stwierdzono również uogólnione zwiększenie ilości komórek mikrogleju, niekiedy przerosłych, najwyraźniejsze w warstwie drobinowej kory mózgu i mózdzku. W tej ostatniej strukturze często spotykano tzw. krzaczkę glejową. W 2 przypadkach (nr 7, nr 8), w śródmózgowiu i w opuszcze znaleziono grudki mikroglejowo-limfocytarne, położone w pobliżu naczyń krwionośnych (ryc. 4).

W korze mózgu i jądrach podstawy często spotykano komórki nerwowe wykazujące cechy nieswoistych zwyrodnień oraz opustoszenia okolonaczyniowe. Przeważały komórki o cechach tzw. schorzenia przewlekłego (ryc. 5). Neurony zawoju hipokampa charakteryzowały zmiany o cechach schorzenia ostrego i niedokrwienego. Obserwowano ponadto ubytki komórek Purkiniego i ich zwyrodnienie.

W naczyniach krwionośnych występowało obrzmienie komórek śródbłonka (ryc. 2), pobudzenie i rozplem elementów ściany naczyniowej, a niekiedy zatarcie jej budowy. Wokół naczyń spotykano często pojedyncze limfocyty. Tętnice podstawne były niezmiennione. Opony we wszystkich przypadkach były pogrubiałe. Stwierdzano w nich różnego stopnia nasilenie nagromadzenia komórek limfocytarnych i plazmatycznych (ryc. 5). U 3 królików nacieki oponowe były masywne (nr 7, nr 8, nr 14).

W splotach naczyniówkowych często spotykano limfocytarne nacieki umiejscowione w zrębie w pobliżu naczyń krwionośnych, których ściany nosiły cechy zwłóknienia lub rozpadu. Okolicą, w której najczęściej obserwowano nacieki była podstawa splotu (ryc. 6). Zrąb łącznotkankowo-



Ryc. 1. Królik Nr 8. Zwłóknienie torebki Bowmana. W tkance otaczającej intensywny naciek limfocytarny. H-E. Pow. 200 \times .

Fig. 1. Rabbit no 8. Fibrosis of Bowman capsula. In surrounding tissue intensive lymphocytic infiltration. H-E. \times 200.

Ryc. 2. Królik nr 10. Zgębczenie tkanki wokół tętniczki okolicy zakrętu hipokampa. Obrzęk śródbłónka. H-E. Pow. 400 \times .

Fig. 2. Rabbit no 10. Spongy degeneration of tissue around an arteriole of the hippocampal gyrus region. Swollen endothelium. H-E. \times 400.

Ryc. 3. Królik Nr 1. Stan gąbczasty w substancji białej mózdzku. H-E. Pow. 100 \times .

Fig. 3. Rabbit no 1. Spongy state in cerebellar white matter. H-E. \times 100.

wy splotów bywał nierzadko rozluźniony, a niekiedy zwłókniały. Cytoplazma komórek nabłonkowych u 5 zwierząt była obrzmiała i silnie zwakuolizowana. Miejscami stwierdzano ubytki nabłonka splotów.

W nerwach kulszowych stwierdzano niewielkie obrzmienie osłonek mielinowych oraz nacieki z komórek limfocytarnych wokół naczyń odżywiających nerw, położonych głównie w onerwiu. W jednym przypadku (nr. 8) w nacieku występowały liczne komórki plazmatyczne.

Sledziony i węzły chłonne pachowe wykazywały cechy pobudzenia charakterystycznego dla procesów zapalnych.

Badanie fluorescencyjne

W kłębkach nerek, w barwieniach na obecność immunoglobuliny G, komponentu C3 dopełniacza i albuminy wołowej, stwierdzano różne ilości złogów, począwszy od niewielkich liniowych, położonych na szczycie pętli (nr 1, nr 6, nr 7, nr 10), do masywnych, gruboziarnistych, umiejscowionych w śródbłonku naczyń krwionośnych i w mezangium (ryc. 7, 8, 9). Złogi obserwowano również w tkance śródmiaższowej, gdzie towarzyszyły naciekom zapalnym. Włókniak przepajał intensywnie tkankę śródmiaższową i często widoczny był w kłębkach, na ścianach torebki Bowmana oraz w pętlach o rysunku i lokalizacji zbliżonej do immunoglobuliny G i komponentu C3 dopełniacza.

W skrawkach pochodzących z mózgu i mózdzku, immunoglobulinę G stwierdzano głównie w świetle naczyń krwionośnych. W mózgach 5 królików (nr 1, 3, 8, 9, 12) stwierdzono pojedyncze naczynia, w ścianach których umiejscowione były gruboziarniste złogi IgG. Niekiedy spotykano niewielkie odnaczyniowe przepojenia tkanki. Występowały one również w warstwie molekularnej kory, wykazując związek z naczyniami opon. W oponowych naciekach limfocytarnych i plazmatycznych stwierdzano intensywną fluorescencję w barwieniu na IgG (ryc. 10). Składnik C3 dopełniacza oraz albumina występowały w ilościach śladowych w świetle naczyń krwionośnych, natomiast w kilku przypad-

Ryc. 4. Królik Nr 7. Grudka mikroglejowo-limfocytarna w pobliżu naczynia krwionośnego w pniu mózgu. H-E. Pow. 400 X.

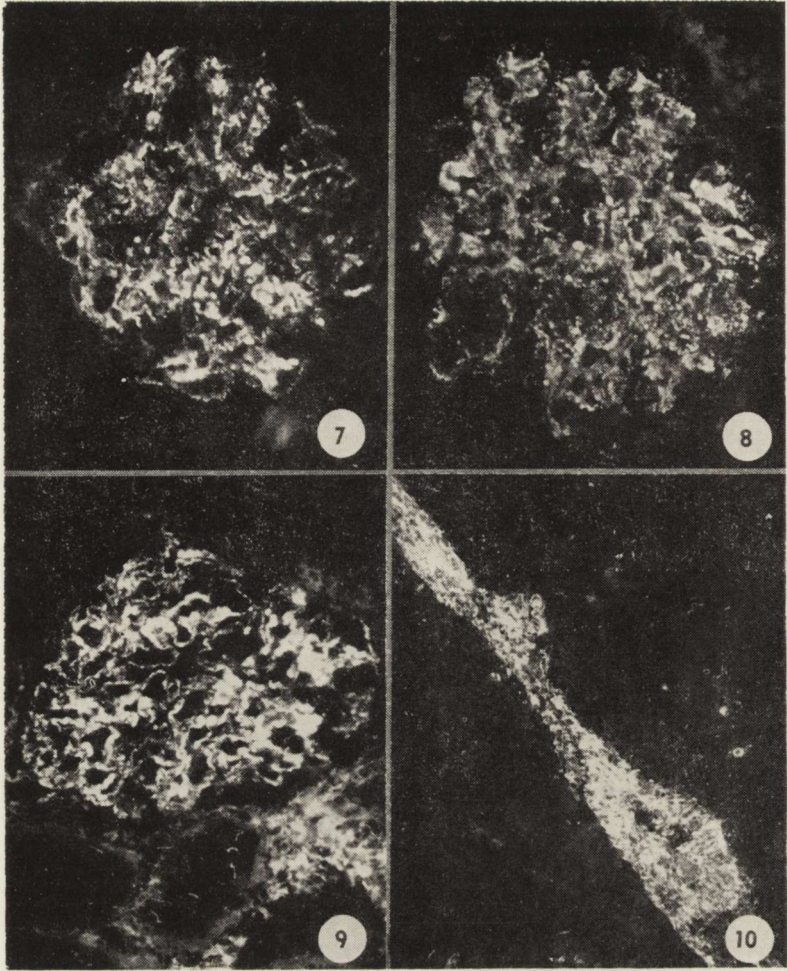
Fig. 4. Rabbit no 7. Microglial-lymphocytic nodule in the vicinity of blood vessel in brain stem. H-E. X 400.

Ryc. 5. Królik Nr 7. Obfity naciek limfocytarny w oponach. Schorzenie przewlekłe neuronów kory. H-E. Pow. 200 X.

Fig. 5. Rabbit no 7. Abundant lymphocytic infiltration in meninges. Chronic disease of cortical neurons. H-E. X 200.

Ryc. 6. Królik Nr 1. Naciek limfocytarny w ścianie naczynia krwionośnego i tkance śródmiaższowej nasady splotu. H-E. Pow. 200 X.

Fig. 6. Rabbit no 1. Lymphocytic infiltration in blood vessel wall and in intraparenchymatous tissue of the base of choroid plexus. H-E. X 200.



Ryc. 7. Królik Nr 9. Ziarniste i miejscami bryłkowate złogi IgG, zlokalizowane odcinkowo w ścianach pętli włosniczek i w mezangium kłębka. Pow. 400 ×.

Fig. 7. Rabbit no 9. Granular and occasionally corpuscular IgG deposits, located segmentally in capillary loop walls and glomerular mesangium. × 400.

Ryc. 8. Królik Nr 9. Ziarniste złogi komponentu C3 dopełniacza w kłębku nerki, o charakterze i lokalizacji podobnej do IgG. Pow. 400 ×.

Fig. 8. Rabbit no 9. Granular deposits of C3 component of complement in renal glomerulus. Location similar to IgG. × 400.

Ryc. 9. Królik Nr 9. Obfite ziarniste i bryłkowate złogi BSA, zlokalizowane w ścianach pętli włosniczek; nieliczne w mezangium. Pow. 400 ×.

Fig. 9. Rabbit no 9. Abundant granular and corpuscular BSA deposits located in capillary loop walls; only a few in mesangium. × 400.

Ryc. 10. Królik Nr 14. Naciek limfocytarno-plazmatyczny w oponach w barwieniu na IgG. Pow. 200 ×.

Fig. 10. Rabbit no 14. Lymphocytic-plasmatic infiltration in meninges. Staining for IgG. × 200.

kach (króliki nr 3, 8, 9, 10, 12) spotykano złogi w ścianie naczyń o umiejscowieniu i charakterze podobnym do IgG (ryc. 11a, b, c). Analogiczne złogi w ścianach naczyń krwionośnych stwierdzano w barwieniu na włóknik, przy czym często towarzyszyły im przepojenia okolicznej tkanki (ryc. 12a, b).

Swoista fluorescencja badanych frakcji osocza królika w tętnicach podstawnych nie przekraczała granic śródbłonna. W spłotach naczyńniówkowych złogi IgG, komponentu C3 dopełniacza i włóknika były śladowe i umiejscowione w śródbłonku naczyń, a tylko w pojedynczych przypadkach w zrębie (nr 3, 8, 9, 12, 16).

W ścianie naczynia położonego w nasadzie spłotu, pochodzącego od królika nr 12, znaleziono złogi identyczne co do charakteru i umiejscowienia w barwieniach na IgG i komponent C3 dopełniacza (ryc. 13a, b).

W nerwach kulszowych złogi IgG, dopełniacza i włóknika obserwowano głównie w świetle i na śródbłonku naczyń krwionośnych. Tylko w jednym przypadku (nr 7) znaleziono złogi IgG i komponentu C3 dopełniacza w śródbłonku naczynia biegnącego w pniu nerwowym (ryc. 14a, b), a w 3 przypadkach w naczyniach nerwia (nr 8, 9, 12).

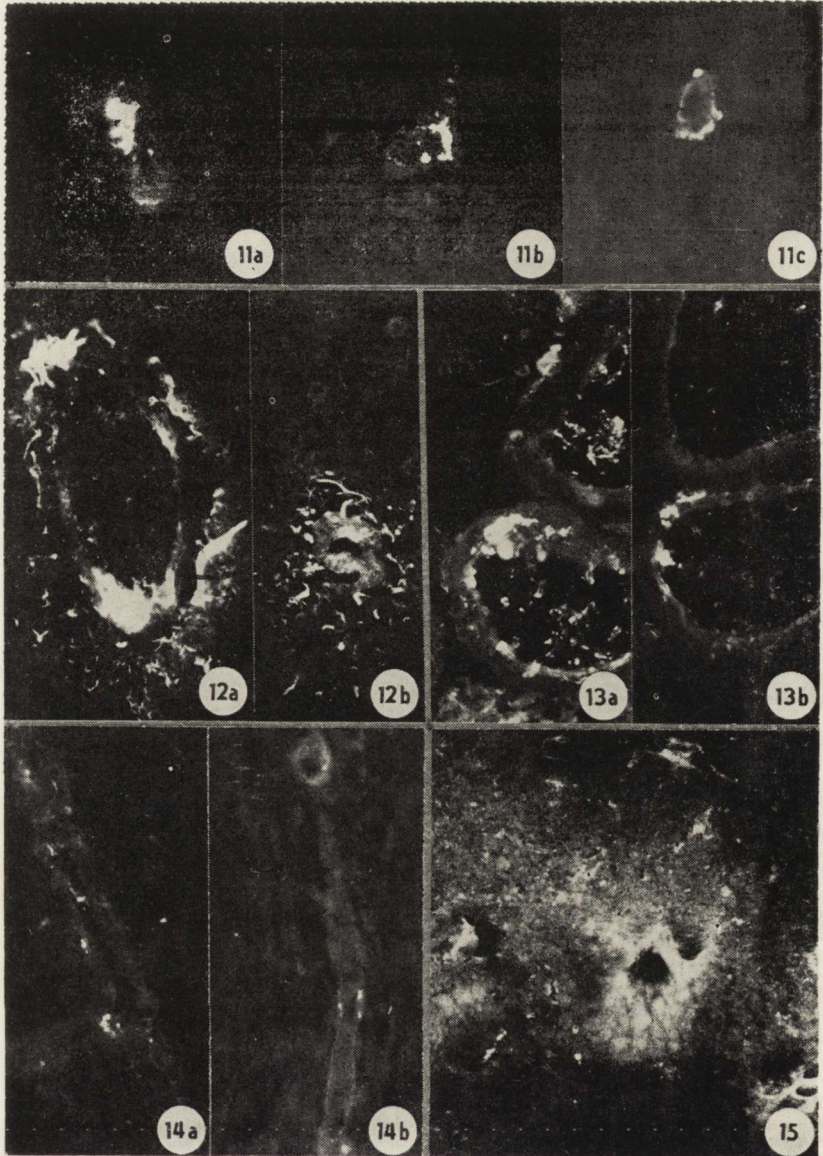
W ośrodkach rozmnażania grudek chłonnych śledziony i węzłów limfatycznych spostrzegano złogi IgG i dopełniacza, które obecne były również w ścianach naczyń krwionośnych tych narządów.

W narządach królików kontrolnych złogów nie stwierdzano. We wszystkich barwieniach śladową fluorescencję spostrzegano jedynie w świetle naczyń krwionośnych.

W preparatach z mózgu królika, któremu na 3 godziny przed skrważeniem podano błękit Evansa, stwierdzono przechodzenie barwnika przez naczynia położone w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Pozanaczyniowa obecność barwnika była najwyraźniejsza w zawoju hipokampa (ryc. 15).

OMÓWIENIE

W grupie immunizowanych królików znalazły się cztery, u których obserwowano znaczne podwyższenie poziomu mocznika i kreatyniny w surowicy krwi oraz wysokie miano przeciwciał anti-BSA. Dawka immunizacyjna BSA, wynosząca 50 mg/dzień okazała się wystarczająca dla uzyskania ciężkiego uszkodzenia nerek, prowadzącego w tych przypadkach do zespołu mocznicowego. U królików z najwyższą odpowiedzią immunologiczną, podczas podawania BSA obserwowano objawy rozpoczynającego się szoku anafilaktycznego, który w kilku przypadkach doprowadził do śmierci zwierząt.



Ryc. 11a. Królik Nr 3. Bryłowaty zióg w ścianie naczynia tętniczego. Delikatne przepojenie IgG otaczającej tkanki nerwowej. Pow. 400 X.

Fig. 11a. Rabbit no 3. Corpuscular deposit in arterial wall. Subtle imbibition of IgG of surrounding nerve tissue. X 400.

Ryc. 11b. Królik Nr 3. Gruboziarniste ziógi komponentu C3 dopełniacza w ścianie naczynia w jądram podstawy. Pow. 400 X.

Fig. 11b. Rabbit no 3. Coarse granules of deposits of C3 component of complement in vessel wall in basal ganglia. X 400.

U królika, u którego w ogóle nie stwierdzono przeciwciał anti-BSA (non responder), zmiany histopatologiczne w narządach, jak również ilości złogów ujawnianych we wszystkich odczynach immunomorfologicznych, były minimalne.

W badaniu immunomorfologicznym nerek u większości zwierząt stwierdzano zmiany charakterystyczne dla przewlekłego zapalenia kłębuszkowego nerek typu rozplemowego; w pojedynczych przypadkach miały one cechy *glomerulonephritis membranoproliferativa*. Natężenie zmian immunomorfologicznych wykazywało korelację ze stanem klinicznym zwierząt oraz poziomem przeciwciał anti-BSA. Charakter zmian morfologicznych i immunofluorescencyjnych w nerkach, śledzionie i węzłach chłonnych był podobny do spostrzeganych przez Germuth'a (1953), Dixona i wsp. (1961) oraz Brentjensa i wsp. (1974).

Doświadczalna choroba posurowicza jest uznanym modelem odpowiadającym kłębuszkowemu zapaleniu nerek u ludzi, które w większości

Ryc. 11c. Królik Nr 7. Ziarniste i linijne złogi BSA w ścianie naczynia w jądrach podstawy. Pow. 400 X.

Fig. 11c. Rabbit no 7. Granular and linear deposits of BSA in vessel wall in basal ganglia. X 400.

Ryc. 12a. Królik Nr 3. Bryłowate złogi włóknika w ścianie naczynia żylnego oraz otaczającej tkance nerwowej. Pow. 400 X.

Fig. 12a. Rabbit no 3. Corpuscular deposits of fibrin in venous wall and surrounding nerve tissue. X 400.

Ryc. 12b. Królik Nr 12. Gruboziarniste złogi włóknika w tętniczce. Przepojenie włóknikiem tkanki nerwowej. Pow. 400 X.

Fig. 12b. Rabbit no 12. Coarse granules of fibrin deposit in arteriole. Imbibition of nerve tissue by fibrin. X 400.

Ryc. 13a. Królik Nr 12. Bryłowate złogi IgG w ścianie naczynia nasady spłotu naczyniówkowego. Pow. 400 X.

Fig. 13a. Rabbit no 12. Corpuscular IgG deposits in vessel wall of the base of choroid plexus. X 400.

Ryc. 13b. Królik Nr 12. Złogi dopełniacza w tym samym naczyniu o identycznym charakterze i lokalizacji jak IgG. Pow. 400 X.

Fig. 13b. Rabbit no 12. Complement deposits in the same vessel. Type and location identical to IgG deposits. X 400.

Ryc. 14a. Królik Nr 7. Złogi IgG w śródbłonku naczynia w tkance nerwu kulszowego. Pow. 400 X.

Fig. 14a. Rabbit no 7. IgG deposits in endothelium of ischiatic nerve vessel. X 400.

Ryc. 14b. Królik Nr 7. Drobne złogi komponentu C3 dopełniacza w śródbłonku naczynia w nerwie kulszowym. Pow. 400 X.

Fig. 14b. Rabbit no 7. Fine deposits of C3 component of complement in endothelium of ischiatic nerve vessel. X 400.

Ryc. 15. Królik Nr 14. Intensywna, gruboziarnista i rozlana fluorescencja błękitu Evansa w tkance otaczającej naczynia zakrętu hipokampa. Pow. 200 X.

Fig. 15. Rabbit no 14. Intensive, coarse-granular and diffuse fluorescence of Evans blue in a tissue surrounding vessels of hippocampal gyrus. X 200.

przypadków rozwija się na skutek deponowania kompleksów immunologicznych w kłębkach, rzadziej w wyniku bezpośredniego działania przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom nerek (zespół Good-pasteura) (Michael i wsp. 1971). W patologii ludzkiej antygeny wchodzące w skład kompleksów są poznane dokładnie tylko w niektórych jednostkach chorobowych, np. w toczniu układowym rumieniowatym (Koffler i wsp. 1971), w wirusowym zapaleniu wątroby typu B (Nowosławski i wsp. 1972), ostrym paciorkowcowym zapaleniu kłębków nerkowych (Schacht i wsp. 1976).

Ośrodkowy układ nerwowy w chorobie kompleksów immunologicznych może być uszkodzony na drodze dwóch podstawowych mechanizmów. Deponowanie w ścianie naczyń kompleksów antygen-przeciwciała prowadzi do uszkodzenia naczyń, a następnie naczyniopochodnych zmian w tkance nerwowej (Cochrane, Henson 1970; Atkins i wsp. 1972). Drugim czynnikiem może być bezpośrednie działanie produktów toksycznych, związanych z postępującą niewydolnością nerek, na elementy tkanki nerwowej (Simenhoff 1975, Kraśnicka 1977). Uszkodzenie naczyń związane z upośledzeniem mechanizmów barierowych, którego wykładnikiem jest przenikanie białkowych składników osocza krwi poza łożysko naczyniowe do mózgu, stwierdzone w badaniach immunofluorescencyjnych, a także w doświadczeniach z użyciem błękitu Evansa, może stanowić czynnik sprzyjający przechodzeniu tych substancji z krwi do tkanki.

Zmiany w obrazie morfologicznym i immunomorfologicznym, stwierdzone w ośrodkowym układzie nerwowym, nacieki zapalne limfocytar-no-plazmatyczne w oponach, splocie naczyniówkowym oraz w nerwie obwodowym, sugerują ich związek z ogólnym procesem immunopatologicznym. Mechanizm patogenetyczny uszkodzeń elementów tkankowych ośrodkowego układu nerwowego jest trudny do jednoznacznego wyjaśnienia. Ograniczony materiał, a w szczególności mała ilość zwierząt z wykształconym zespołem mocznicowym, nie pozwala na jednoznaczne odnoszenie uszkodzeń tkankowych do bezpośredniego działania czynników toksycznych związanych z postępującą niewydolnością nerek. Podobieństwo uszkodzeń komórek nerwowych i glejowych oraz osłonek mielinowych do zmian stwierdzonych przez Kraśnicką (1977) w pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej, prowadzonej w medium z surowicą chorych z zespołem mocznicowym, z egzogennym mocznikiem i kreatyniną, implikuje jedynie patogenną rolę toksycznych substancji zawartych we krwi. Udział obrzęku mózgu, związanego z uszkodzeniem mechanizmów barierowych krew-mózg, w patogenezie uszkodzeń tkanek ośrodkowego układu nerwowego wydaje się również oczywisty.

Przedstawiony materiał doświadczalny, ze względu na swoją szczupłość i jednostronność nie pozwala na próbę analizy porównawczej z encefalopatią mocznicową opisywaną u ludzi. Na podkreślenie zasługuje jednakże podobieństwo obrazów morfologicznych stwierdzanych w materiale doświadczalnym, do zmian występujących w ośrodkowym układzie nerwowym u ludzi zmarłych na mocznicę.

С. Краевски

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ХРОНИЧЕСКОЙ ПОСЛЕСЫВОРОТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У КРОЛИКОВ

Резюме

В течение экспериментально вызванной, хронической послесывороточной болезни у кроликов, повышение уровня мочевины, креатинина и антител анти-BSA в сыворотке крови, наблюдалось начиная со второй недели опыта. Изменения в почках, определяемые иммуноморфологическими методами, соответствовали картине хронического клубочкового нефрита, разной степени выраженности.

В полушариях головного мозга и мозжечка у всех животных обнаруживались: отек мозга, обобщенный глеиоз, лимфоцитно-плазматические инфильтраты в оболочках мозга и сосудистых сплетениях, а также вокруг отдельных измененных кровеносных сосудов. Этим изменениям в иммунофлуоресцентном исследовании соответствовали периваскулярные образования коллагенных волокон, IgГ и Эванс-блю в нервной ткани. Кроме того, в стенках отдельных сосудов наблюдались отложения IgГ, компонента СЗ комплемента, коллагена, а также BSA.

Изменения в морфологической и иммуноморфологической картине, обнаруженные в центральной нервной системе, указывают на их связь с общим иммунопатологическим процессом и на участие иммунологических комплексов в патогенетическом механизме повреждений. Работа является попыткой сравнительного анализа экспериментальной модели с мочевиной энцефалопатией, описываемой у людей.

S. Krajewski

IMMUNOMORPHOLOGIC STUDIES ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN CHRONIC SERUM SICKNESS IN RABBITS

Summary

The aim of the study was to compare uremic encephalopathy observed in human material and induced in experiment.

In the course of the experimental chronic serum sickness, increasing levels of urea, creatinine and antibodies anti-BSA were observed from the second week of the experiment. On immunomorphological examination typical proliferative

changes of chronic glomerulonephritis were visible. All animals showed generalized gliosis, perivascular and interstitial edema and severe infiltration of vessels in cerebral and cerebellar hemispheres. Extensive inflammatory reaction was also present in the meninges and choroid plexus. In immunofluorescent examination it corresponded to perivascular imbibition of the nervous tissue with IgG, fibrin and Evans Blue. Besides, deposits of IgG, C3 component of the complement, fibrin and BSA were present in the walls of individual vessels, having the same character and localization in all of these reactions.

Morphological and immunological changes in the central nervous system suggest the brain tissue damage by the immune complexes occurring in generalized immunopathological process.

PIŚMIENICTWO

1. Atkins Ch. J., Kondon J. J., Quismorio F. P., Friou G. J.: The choroid plexus in Systemic Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 1972, 76, 65—72.
2. Brentjens J. R., O'Connell D. W., Pawlowski I. B., Andres G. A.: Extraglomerular lesions associated with deposition of circulating antigen-antibody complexes in kidneys of rabbits with chronic serum sickness. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1974, 3, 112—126.
3. Clark M. F., Shepard C. C.: A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 1963, 20, 642—644.
4. Cochrane C. G., Henson P. M.: Experimental immune complex disease. *Proc. Intern. Symposium on Immune Complex Diseases*. Ed.: Bonomo L., Turk J. L., Carlo Erba Fund., Milan, 1970, 11—14.
5. Dixon F. J., Feldman J. D., Vazquez J. J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 1961, 113, 899—919.
6. Germuth F. G.: A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J. Exp. Med.* 1953, 97, 257—282.
7. Koffler D., Agnello V., Thoburn R., Kunkel H. G.: Systemic lupus erythematosus: prototype of immune complex nephritis in man. *J. Exp. Med.* 1971, 134, 169—179.
8. Koss M. N., Chernack W. J., Griswold W. R., McIntosh R. M.: The choroid plexus in acute serum sickness. Morphologic, ultrastructural and immunohistologic studies. *Arch. Path.* 1973, 96, 331—334.
9. Kraśnicka Z.: Wpływ surowicy od chorych z zespołem mocznicowym, moczownika i kreatyniny na organotypową hodowlę tkanki nerwowej. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 327—339.
10. Lampert P. W., Oldstone M. B. A.: Pathology of choroid plexus in spontaneous immune complex disease and chronic viral infection. *Virchov Arch. Path. Anat. Hist.* 1974, 363, 21—32.
11. McIntosh R. M., Copack P., Chernack W. B., Griswold W. R., Weil R., Koss M. N.: The human choroid plexus and autoimmune nephritis. *Arch. Path.* 1975, 99, 48—51.
12. Michael A. F., Westberg N. G., Fish A. J., Vernier R. L.: Studies on chronic membrano-proliferative glomerulonephritis with hypocomplementemia. *J. Exp. Med.* 1971, 134, 208—227.

13. Morgan K. T., Gardiner A. C., Angus K. W.: A choroid plexus lesions in lambs with mesangiocapillary glomerulonephritis. *J. comp. Path.* 1977, 87, 15—25.
14. Nowosławski A., Krawczyński K., Brzosko W., Madaliński K.: Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Amer. J. Path.* 1972, 63, 31—55.
15. Oldstone M. B. A., Dixon F. J.: Immune complex disease in chronic viral infection. *J. Exp. Med.* 1971, 134, 32—40.
16. Ouchterlony Ö.: In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1948, 25, 186—191.
17. Schacht R. G., Melvin G., Gluck C., Gallo G. R., Baldwin D. S.: Progression to uremia after remission of acute poststreptococcal glomerulonephritis. *New Engl. J. Med.* 1976, 298, 977—981.
18. Simenhoff M. L.: Metabolism and toxicity of aliphatic amines. *Kidn. Intern.* 1975, 7, 314—317.

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

WYKAZ CZASOPISM

PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU WYDAWNICTW LECARSKICH NA ROK 1979

Lp.	Tytuł czasopisma	Rodzaj czaso- pisma	Cena prenumeraty			Cena poj. n-ru zł
			kwart. zł	pólr. zł	roczna zł	
1	Acta Haematologica Polonica	kwart.	—	60.—	120.—	30.—
2	Acta Medica Polona	kwart.	—	50.—	100.—	25.—
3	Acta Physiologica Polonica	dwum.	—	75.—	150.—	25.—
4	Acta Poloniae Pharmaceutica	dwum.	—	105.—	210.—	35.—
5	Anestezja, Reanimacja, Intensywna Terapia	kwart.	—	100.—	200.—	50.—
6	Archiwum Historii Medycyny	kwart.	—	50.—	100.—	25.—
7	Archiwum Med. Sądowej i Kryminologii	kwart.	—	80.—	160.—	40.—
8	Bromatologia i Chemia Toksykologiczna	kwart.	—	90.—	180.—	45.—
9	Bulletin of the Inst. of Marit. and Trop. Med. in Gdynia	kwart.	—	—	—	—
10	Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska	dwum.	—	120.—	240.—	40.—
11	Czasopismo Stomatologiczne	mies.	90.—	180.—	360.—	30.—
12	Diagnostyka Laboratoryjna	dwum.	—	105.—	210.—	35.—
13	Dziennik Urzędowy Min. Zdrowia i Opieki Społecznej	dwutyg.	9.—	18.—	36.—	1.50
14	Endokrynologia Polska	dwum.	—	60.—	120.—	20.—
15	Farmacja Polska	mies.	75.—	150.—	300.—	25.—
16	Folia Morphologica	kwart.	—	40.—	80.—	20.—
17	Ginekologia Polska	mies.	75.—	150.—	300.—	25.—
18	Kardiologia Polska	dwum.	—	90.—	180.—	30.—
19	Klinika Oczna	mies.	150.—	300.—	600.—	50.—
20	Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia	kwart.	—	60.—	120.—	30.—
21	Medycyna Pracy	dwum.	—	90.—	180.—	30.—
22	Medycyna Wiejska	kwart.	—	50.—	100.—	25.—
23	Neurologia i Neurochirurgia Polska	dwum.	—	150.—	300.—	50.—
24	Neuropatologia Polska	kwart.	—	50.—	100.—	25.—
25	Nowotwory	kwart.	—	60.—	120.—	30.—
26	Otolaryngologia Polska	dwum.	—	105.—	210.—	35.—
27	Opiekun Społeczny	kwart.	—	—	—	3.50
28	Patologia Polska	kwart.	—	40.—	80.—	20.—
29	Pediatrica Polska	mies.	90.—	180.—	360.—	30.—
30	Pneumonologia Polska	mies.	75.—	150.—	300.—	25.—
31	Pielęgniarka i Położna	mies.	15.—	30.—	60.—	5.—
32	Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy	dwum.	—	60.—	120.—	20.—
33	Polski Przegląd Chirurgiczny	mies.	105.—	210.—	420.—	35.—
34	Polski Przegląd Radiologii i Medycyny Nuklearnej	dwum.	—	135.—	270.—	45.—
35	Polski Tygodnik Lekarski	tyg.	195.—	390.—	780.—	15.—
36	Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej	mies.	90.—	180.—	360.—	30.—
37	Postępy Fizyki Medycznej	kwart.	—	20.—	40.—	10.—
38	Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej	dwum.	—	75.—	150.—	25.—
39	Problemy Rodziny	dwum.	—	48.—	96.—	16.—
40	Problemy Techniki w Medycynie	kwart.	—	60.—	120.—	30.—
41	Problemy Szkolnictwa i Nauk Medycznych	kwart.	—	60.—	120.—	30.—
42	Protetyka Stomatologiczna	dwum.	—	90.—	180.—	30.—
43	Przegląd Dermatologiczny	dwum.	—	135.—	270.—	45.—
44	Przegląd Epidemiologiczny	kwart.	—	90.—	180.—	45.—
45	Przegląd Lekarski	mies.	90.—	180.—	360.—	30.—
46	Przegląd Pediatryczny	dwum.	—	75.—	150.—	25.—
47	Psychiatria Polska	dwum.	—	105.—	210.—	35.—
48	Reumatologia	kwart.	—	—	—	—
49	Roczniki PZH	dwum.	—	105.—	210.—	35.—
50	Służba Zdrowia	tyg.	26.—	52.—	104.—	2.—
51	Twoje Dziecko	mies.	12.—	24.—	48.—	4.—
52	Urologia Polska	kwart.	—	70.—	140.—	35.—
53	Wiadomości Lekarskie	dwutyg.	120.—	240.—	480.—	20.—
54	Zdrowie Publiczne	mies.	75.—	150.—	300.—	25.—
55	Żyjmy Dłużej	mies.	—	—	60.—	5.—
56	Żywnienie Człowieka	kwart.	—	60.—	120.—	30.—

HALINA WEINRAUDER, STANISŁAW KRAJEWSKI

IMMUNOFLUORESCENCYJNA LOKALIZACJA
NARZĄDOWO-SWOISTYCH ANTYGENÓW W MÓZGU
PRZY UŻYCIU SUROWIC HOMO- I HETEROLOGICZNYCH *)

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

Znaczne zainteresowanie perspektywami zastosowania swoistych antygenów układu nerwowego w badaniach neurobiologicznych, doprowadziło w ostatnich latach do scharakteryzowania pewnej liczby swoistych antygenów glejowych i neuronalnych (Moore 1965, Warecka 1970, Eng i wsp. 1971, van Nieuw Amerongen i wsp. 1972, Weinrauder, Lach 1975, 1977, Lach, Weinrauder 1978). Niemal wszystkie z nich odznaczają się brakiem swoistości gatunkowej — w mózgach wielu gatunków zwierząt i człowieka antygeny te występują w formach immunologicznie identycznych lub wykazujących częściową identyczność. W poprzednich badaniach (Weinrauder, Lach 1976) stwierdzono, że jeden ze swoistych antygenów glejowych mózgu szczura charakteryzuje się podwójną swoistością — narządową i gatunkową. Drugi ze swoistych antygenów występował w mózgu szeregu gatunków. Stosowane do badania surowice odpornościowe przeciwko mózgom małym reagowały bardzo silnie z antygenem homologicznym oraz z antygenem z mózgu ludzkiego (Weinrauder 1978), natomiast reakcje z mózgami innych gatunków, w tym także i szczura, były znacznie słabsze. Nie dotyczyło to jednak odczynu immunofluorescencji na mózgu szczura, którego intensywność była tylko niewiele słabsza niż odczyn na mózgu ludzkim. Postanowiono zatem przeprowadzić badania lokalizacji antygenów mózgowych przy użyciu swoistych, homo- i heterologicznych surowic, krzyżowo absorbowanych mózgami obcogatunkowymi.

MATERIAŁ I METODY

Surowice odpornościowe. Do badań użyto 4 królicze surowice odpornościowe: 1) surowica przeciwko homogenatowi mózgu

*) Część pracy przedstawiono na IV Konferencji Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, Poznań 1978.

szczura (uodpornianie domięśniowe z IFA *), 2) surowica przeciwko wyciągowi z mózgu szczura (uodpornianie domięśniowe z IFA i CFA oraz dożylnie), 3) surowica przeciwko mózgowi pawiana (uodpornianie domięśniowe z IFA), 4) surowica przeciwko homogenatowi mózgu małpy *Cercopithecus etios* (uodpornianie domięśniowe z IFA).

Absorpcje surowic: Surowice odpornościowe absorbowano surowicą normalną oraz homogenatami narządów (wątroba, nerka, śledziona) szczura i małpy oraz liofilizowanym wyciągiem z mózgu ludzkiego. Ilość antygeny niezbędna do absorpcji ustalano każdorazowo doświadczalnie. Absorpcje przeprowadzano przez 1 godz. w temp. 37°C oraz przez noc w temp. 4°, powtarzając je aż do całkowitego wyabsorbowania niepożądanych przeciwciał. Skuteczność absorpcji kontrolowano w odczynie immunodyfuzji (ID) oraz w odczynie immunofluorescencji (IF) na skrawkach z narządów używanych do absorpcji i powtarzano aż do całkowitego zahamowania obu odczynów.

Odczyn immunodyfuzji. Odczyn podwójnej dyfuzji wg metody Ouchterlony wykonywano w 1% żelu agarowym (agar Noble, Difco). Szczegóły metody opisano poprzednio (Weinrauder 1969).

Odczyn immunofluorescencji. Zastosowano pośrednią metodę immunofluorescencji. Badania przeprowadzono na mózgu dorosłego szczura oraz na mózgu ludzkim, pobranym 12 godz. po śmierci, od chorego zmarłego na mocznicę. Tkanki zamrażano w eterze naftowym, oziębionym do -80°C w mieszaninie suchego lodu z acetonem. Z zamrożonych bloków tkankowych wykonywano skrawki kriostatowe o grubości 4 μ , które dokładnie suszono i utrwalano w zimnym acetonie. Jako pierwszą warstwę stosowano surowice odpornościowe, odpowiednio wyabsorbowane i rozcieńczone PBS. Każdą z surowic używano w trzech rozcieńczeniach; optymalne wynosiło 1:30. Skrawki z nakroploną surowicą odpornościową inkubowano w komorze wilgotnej, 45 min. w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w trzech zmianach ciepłego PBS (3×10 min.), nakraplano drugą warstwę, którą stanowiły globuliny kozie przeciwko gamma globulinom króliczym, znakowane izotiocjanianem fluoresceiny (Biomed, Warszawa), absorbowane polimerem z ludzkich gamma globulin i pudrem acetonowym z wątrób mysich. Czas inkubacji 30 min., rozcieńczenie optymalne 1:10, warunki inkubacji jak przy pierwszej warstwie. Ocenę preparatów przeprowadzano w mikroskopie Orthoplan f-my Leitz. Fotografowano na filmie barwnym Agfa.

*) Skrót używany w pracy: IFA — niekompletny adjuwant Freund; CFA — kompletny adjuwant Freund; ID — odczyn immunodyfuzji; IF — odczyn immunofluorescencji; PBS — zbuforowany roztwór soli fizjologicznej.

Kontrole swoistości IF.

1. Zastosowanie jako pierwszej warstwy normalnej surowicy króliczej lub PBS.
2. Negatywne odczyny na skrawkach z narządów użytych do absorpcji surowic odpornościowych.
3. Zahamowanie odczynu po absorpcji surowic odpornościowych antygenem mózgowym.

WYNIKI

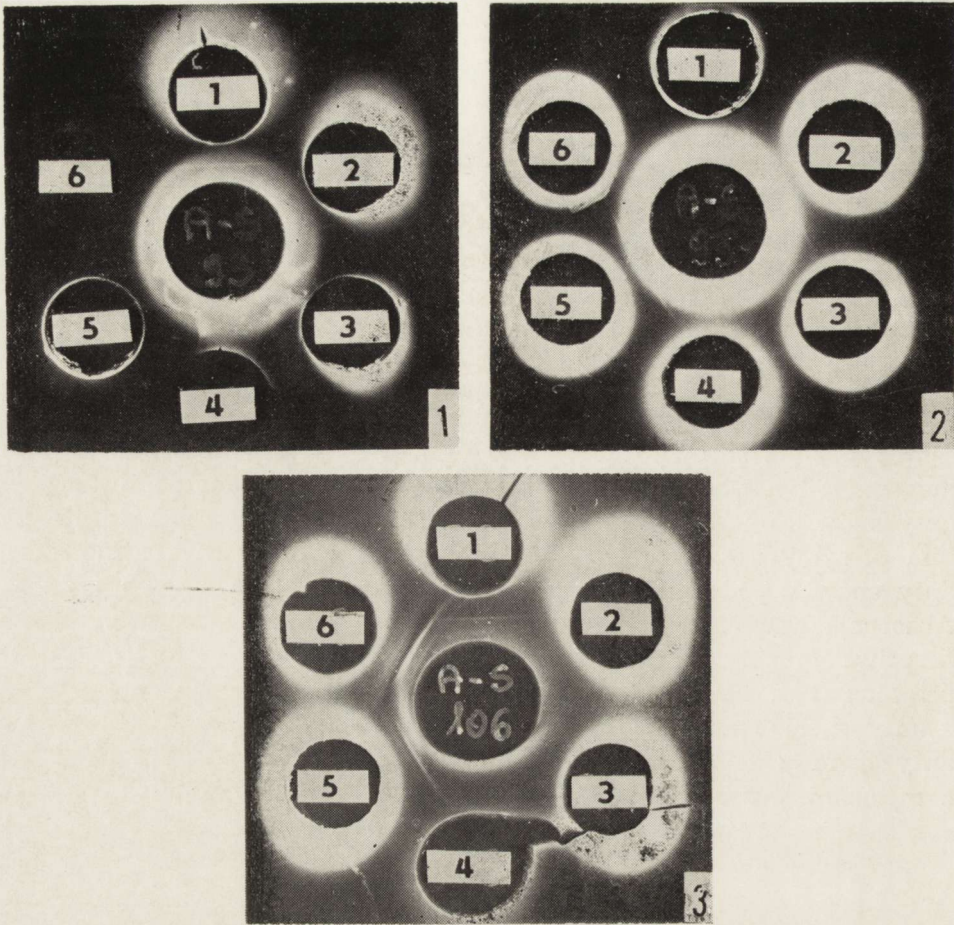
Odczyn immunodyszfuzji

W reakcji z surowicą przeciwko mózgowi szczura absorbowaną homogenatami narządów i normalną surowicą były widoczne dwie linie antygenów swoistych dla mózgu. Po absorpcji surowicy mózgiem ludzkim otrzymywano w reakcji jedno pasmo precypitatu odpowiadające antygenowi o podwójnej swoistości — narządowej i gatunkowej (ryc. 1). Absorpcja antygenem z mózgu ludzkiego usuwała z surowicy także przeciwciała skierowane przeciwko mózgowi pawiana i małpy *Cercopithecus* (ryc. 2). Surowica przeciwko mózgowi tej małpy reagowała z antygenem z mózgu szczura (ryc. 3), natomiast jej wyabsorbowanie antygenem z mózgu ludzkiego powodowało zahamowanie reakcji ID z mózgiem wszystkich badanych gatunków (człowiek, małpa, szczur).

Odczyn immunofluorescencji

Surowice odpornościowe przeciwko wyciągowi oraz przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu szczura, wyabsorbowane surowicą normalną i homogenatami narządów, nie różniły się jeśli chodzi o lokalizację i intensywność odczynu IF. Wyabsorbowana surowica przeciwko mózgowi pawiana dawała również silny, dodatni odczyn w neuropilu, na skrawkach ze wszystkich badanych okolic zarówno mózgu szczura jak i mózgu ludzkiego.

Odczyn IF z surowicą anty mózgu szczura na skrawkach z mózgu szczura przedstawiono na rycinach 4—8. W korze mózgu i jądrach podstawy obserwowano intensywne świecenie neuropilu oraz szczególnie wyraźnie zaznaczoną fluorescencję występującą w postaci pierścieni otaczających ciemne jądra komórek, które na podstawie ich umiejscowienia i charakteru można było uznać za oligodendrocyty. Neurony kory były zawsze negatywne (ryc. 4). Ujemna reakcja neuronów i silne świecenie neuropilu było szczególnie wyraźnie widoczne na skraw-



Ryc. 1. Odczyn ID z surowicą odpornościową przeciwko mózgowi szczura absorbowaną surowicą normalną, homogenatami narządów szczura i liofilizowanym wyciągiem z mózgu ludzkiego. 1. Mózg szczura, 2. Wątroba szczura, 3. Nerka szczura, 4. Surowica szczura, 5. Mózg ludzki, 6. Nerw kulszowy szczura. Środek — surowica odpornościowa.

Fig. 1. ID test with rat brain antiserum absorbed with normal serum, rat organ homogenates, and lyophilized extract of the human brain. 1. Rat brain, 2. Rat liver, 3. Rat kidney, 4. Rat serum, 5. Human brain, 6. Rat ischiatic nerve. Center: immune serum.

Ryc. 2. Odczyn ID z surowicą odpornościową przeciwko mózgowi szczura, absorbowaną jak wyżej. 1. Mózg pawiana, 2. Mózg szczura, 3. i 6. Mózg małpy *Cercopithecus*, 4. Mózg ludzki, 5. Mózg szczura. Środek — surowica odpornościowa.

Fig. 2. ID test with rat brain antiserum absorbed as in Fig. 1. 1. Baboon brain, 2. Rat brain, 3. and 6. Brain of *Cercopithecus* monkey, 4. Human brain, 5. Rat brain. Center: immune serum.

Ryc. 3. Odczyn ID z nieabsorbowaną surowicą przeciwko mózgowi małpy *Cercopithecus*. 1. Mózg szczura, 2. Nerka szczura, 3. Wątroba szczura, 4. Surowica małpy, 5. Wątroba małpy, 6. Mózg małpy. Środek — surowica odpornościowa.

Fig. 3. ID test with nonabsorbed *Cercopithecus* monkey brain antiserum. 1. Rat brain, 2. Rat kidney, 3. Rat liver, 4. Monkey serum, 5. Monkey liver, 6. Monkey brain. Center: immune serum.

kach z półkul mózdzku oraz mostu (ryc. 5, 6, 7). W formacjach białych była widoczna ujemna reakcja wypustek nerwowych. Było to widoczne zarówno na poprzecznych (ryc. 5), jak i na podłużnych przekrojach włókien (ryc. 8). Surowice te dawały również dodatnią, podobnie umiejscowioną reakcję na skrawkach z mózgu ludzkiego (jądra podstawy, mózdzek, pień).

Surowica przeciwko mózgowi szczura, wyabsorbowana dodatkowo mózgiem ludzkim, dawała na skrawkach z mózgu szczura odczyn immunofluorescencyjny zlokalizowany tak samo jak w przypadku surowicy nieabsorbowanej. Różnice dotyczyły jedynie stopnia intensywności świecenia — było ono nieco słabsze. W jądrach podstawy było widoczne wyraźne świecenie neuropilu (ryc. 9). W mózdzku obserwowano swoistą fluorescencję nieco słabszą, ale o tej samej lokalizacji i charakterze (ryc. 10). Reakcja na mózgu ludzkim była zahamowana (ryc. 11).

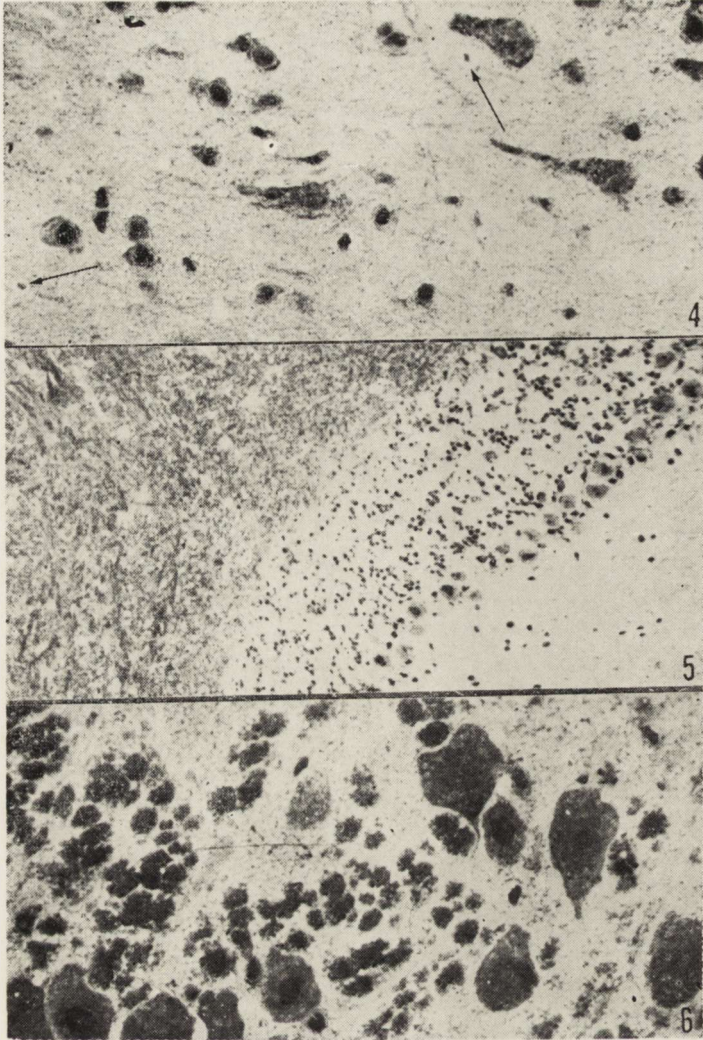
Surowica przeciwko mózgowi pawiana absorbowana surowicą i narządami małpy oraz homogenatem nerki szczura dawała dodatni, swoisty odczyn zarówno na skrawkach mózgu szczura jak i mózgu ludzkiego. Charakter świecenia i jego lokalizacja w neuropilu, z wyraźnie negatywnymi neuronami, były bardzo podobne do reakcji, w których stosowano surowicę przeciwko mózgowi szczura. Obraz fluorescencji na mózdzku szczura przedstawiono na rycinie 12. Absorpcja surowicy mózgiem ludzkim powodowała całkowite zahamowanie odczynu na skrawkach z mózgu szczura i człowieka (ryc. 13).

Wszystkie zastosowane odczyny kontrolne były całkowicie ujemne, co świadczy o swoistości dodatniej fluorescencji. Rycina 14 przedstawia jeden z odczynów kontrolnych na mózdzku szczura, z normalną surowicą króliczą zamiast surowicy odpornościowej.

OMÓWIENIE

Zastosowane w badaniach surowice przeciwko mózgowi szczura, oraz dwu gatunków małp, zawierają przeciwciała skierowane przeciwko antygenom mózgowym o swoistości narządowej i prawdopodobnie gło-
jowej lokalizacji. Surowice te reagują z antygenami z mózgu szeregu gatunków w odczynie ID i dają dodatnią reakcję IF na mózgu ludzkim. Uzyskane wyniki wskazują na występowanie w mózgu badanych gatunków przynajmniej jednego, wspólnego antygeny narządowo swoistego.

Po wyabsorbowaniu surowicy anty mózg szczura heterologicznym mózgiem ludzkim nie otrzymano dodatniej reakcji IF na jego skrawkach. Wygaszenie fluorescencji świadczyło o zahamowaniu odczynu spowodowanym całkowitym wyabsorbowaniem przeciwciał narządowo



Ryc. 4. Odczyn IF. Surowica przeciwko mózgowi szczura absorbowana surowicą normalną i narządami szczura. Skrawek z kory mózgu szczura. Silna reakcja dodatnia w neuropilu oraz w cytoplazmie oligodendrocytów (strzałki). Negatywne neurony. Pow. 250 ×.

Fig. 4. IF test with rat brain antiserum absorbed with rat normal serum and organs. Section of the rat cerebral cortex. Strong positive reaction in the neuropil and in the oligodendrocyte cytoplasm (arrows). Neurons negative. ×250.

Ryc. 5. Odczyn IF. Surowica jak na ryc. 4. Mózdzek szczura. Silne świecenie neuropilu. Negatywna reakcja komórek ziarnistych i komórek Purkinjego kory mózdzku oraz poprzecznie i podłużnie przeciętych włókien nerwowych. Pow. 60 ×.

Fig. 5. IF test with serum same as in Fig. 4. The rat cerebellum. Brilliant fluorescence of the neuropil. The reaction negative in the granular cells and Purkinje cells of the cerebellar cortex, and in the nervous fibers cut longitudinally or transversally. ×60.

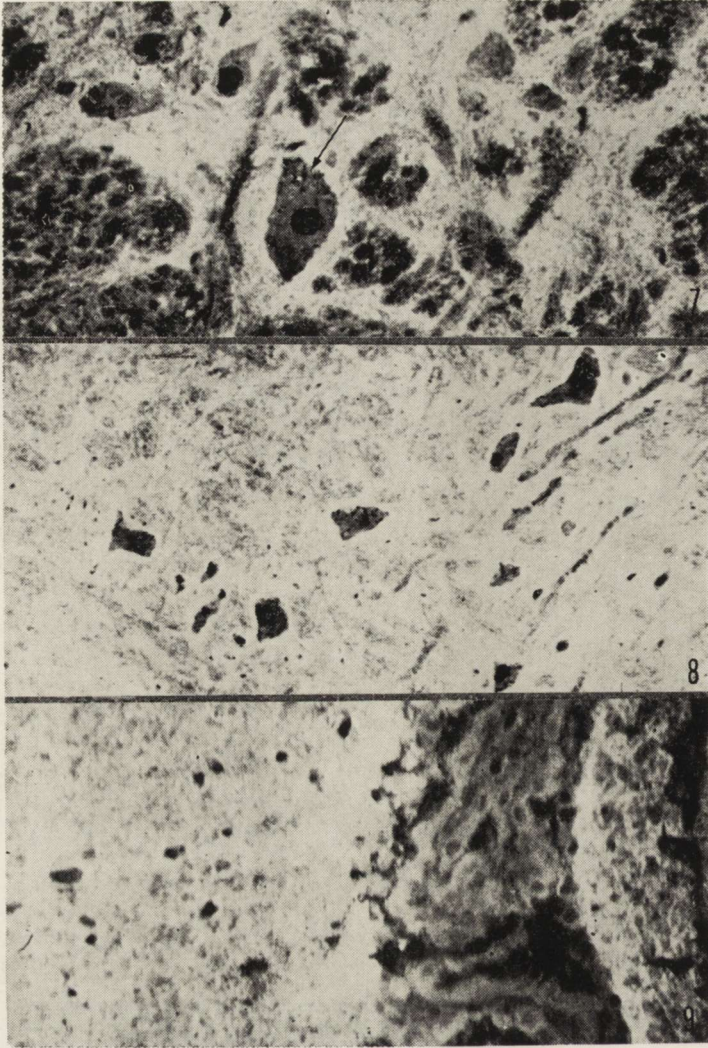
swoistych, pozbawionych swoistości gatunkowej. Natomiast reakcja na mózgu szczura była zachowana. Wskazuje to na występowanie w mózgu szczura antygeny o podwójnej swoistości, narządowej i gatunkowej. Na taką możliwość wskazywały wyniki uzyskane uprzednio w odczynie ID. Lokalizacja antygeny o podwójnej swoistości nie różni się od lokalizacji antygeny narządowego wspólnego dla kilku gatunków. Podobnie jak poprzednio (Weinrauder, Lach 1975, 1977), tak i obecnie stwierdzono występowanie tego antygeny we wszystkich badanych okolicach mózgu szczura i człowieka. Podobna była również lokalizacja komórkowa i charakter fluorescencji.

Na istnienie w układzie nerwowym antygenów o swoistości narządowo-gatunkowej zwróciły po raz pierwszy uwagę MacPherson i Liakopoulou (1966). W dalszych badaniach stwierdzono występowanie dwóch takich antygenów w mózgu bydła (Hatcher, MacPherson 1970) oraz trzech w mózgu szczura (MacPherson, Liakopoulou 1970). Antygeny mózgu szczura nie cechowały się swoistością regionalną — występowały w nowej korze, w zakręcie hipokampa, mózdzku, rdzeniu i nerwie kulszowym. Pojawiały się one w różnych okresach rozwoju osobniczego i różniły zawartością w mózgu. Badania te były prowadzone jedynie przy użyciu metod immunochemicznych i dlatego porównanie naszych wyników uzyskanych przy pomocy metody immunohistochemicznej jest trudne. Prac, których przedmiotem byłaby lokalizacja tkankowa antygenów o „podwójnej swoistości”, w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono. Uzyskane przez nas wyniki wskazujące, że antygen ten jest zlokalizowany podobnie jak antygen mózgowy nieswoisty gatunkowo, są pierwszymi danymi tego rodzaju.

Zbliżone badania podjęli w swojej pracy Delpuch i wsp. (1976). Autorzy ci, stosując surowice przeciwko mózgowi ludzkiemu stwierdzili, że w odczynach immunochemicznych reagują one tylko z antygenem z mózgu naczelnych. Jedynie pośrednio, na podstawie krzyżowych absorpcji surowic, można było wnosić o występowaniu tego antygeny w mózgu szczura. Antygen ujawnił się natomiast w odczynie IF na mózgu gryzoni (szczur, mysz), a charakter świecenia i jego lokalizacja były identyczne jak w mózgu pawiana. Na podstawie uzyskanych obrazów autorzy ci sugerują oligodendroglejową lokalizację antygeny. Należy sądzić, że chodzi tu o antygen narządowo-swoisty, gatunkowo-nie-

Ryc. 6. Odczyn IF. Surowica jak na ryc. 4. Mózdzek szczura w większym powiększeniu. Negatywne komórki Purkinjego i małe neurony warstwy ziarnistej. Pow. 250 X.

Fig. 6. Higher magnification of IF test of Fig. 4. Purkinje cells and small neurons of the granular layer negative. X 250.

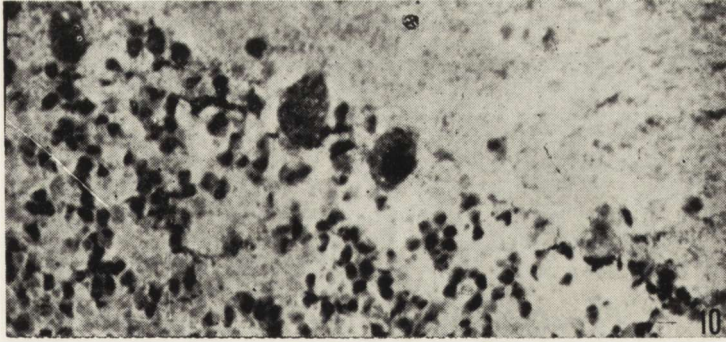


Ryc. 7. Odczyn IF. Surowica jak na ryc. 4. Mózg szczura. Przekrój poprzeczny przez część podstawną mostu. W centrum zdjęcia negatywny neuron ruchowy (strzałka). Pow. 250 ×.

Fig. 7. IF test with serum same as in Fig. 4. Rat brain cross section of the basal part of the pons. Negative motor neuron in the center (arrow). × 250.

Ryc. 8. Odczyn IF. Surowica przeciwko homogenatowi mózgu szczura. Jądro ruchowe mostu szczura. Negatywne perikaria komórek nerwowych oraz podłużne przekroje wypustek. Pow. 250 ×.

Fig. 8. IF test with rat brain homogenate antiserum. Rat motor nucleus of the pons. Negative perikaryons of the nerve cells and longitudinal sections of the processes. × 250.



Ryc. 10. Odczyn IF. Surowica jak na ryc. 9. Mózdzek szczura. Reakcja o takiej samej lokalizacji jak na ryc. 5, intensywność świecenia nieco słabsza. Pow. 130 X.

Fig. 10. IF test rat cerebellum. Antiserum as in Fig. 9. The reaction localized as in Fig. 5, but less intense. X 130.



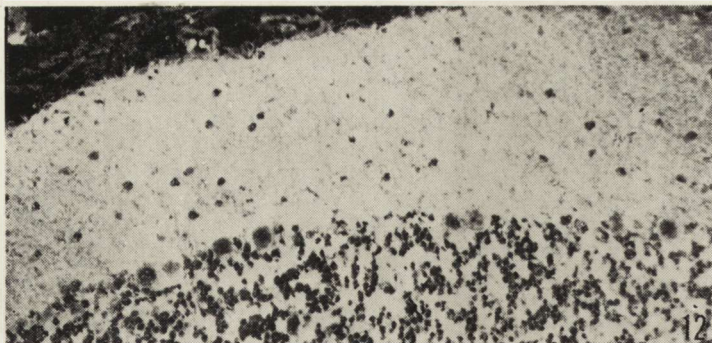
Ryc. 11. Odczyn IF. Surowica jak na ryc. 9. Mózdzek ludzki. Zahamowanie reakcji immunofluorescencyjnej widoczne nieswoiste świecenie ziaren lipofuscyny. Pow. 130 X.

Fig. 11. IF test human cerebellum. Antiserum as in Fig. 9. Inhibition of the immunofluorescence reaction. Unspecific fluorescence of the lipofuscin granules. X 130.

swoisty, zbliżony do tego, którego występowanie stwierdziliśmy w mózgu człowieka, pawiana i małpy *Cercopithecus*. Antygen ten jest prawdopodobnie identyczny z antygenem narządowym mózgu szczura. Jego stężenie w mózgu tego gatunku jest stosunkowo niskie (MacPherson,

Ryc. 9. Odczyn IF. Surowica przeciwko mózgowi szczura absorbowana surowicą normalną i nerką szczura oraz mózgiem ludzkim. Okolica okołokomorowa jąder podstawy mózgu szczura. Dodatnia reakcja w tkance mózgu, wyściółka i splot naczyniówkowy negatywne. Pow. 60 X.

Fig. 9. IF test with rat brain antiserum absorbed with rat normal serum, rat kidney and human brain. Periventricular region of the basal ganglia of the rat brain. Positive reaction in the brain cells, the ependyma and the choroid plexus negative. X 60.



Ryc. 12. Odczyn IF. Surowica przeciwko mózgowi pawiana absorbowana surowicą normalną i wątrobą małpy *Cercopithecus*, oraz nerką szczura. Mózdzek szczura. Silne świecenie neuropilu, negatywne małe neurony warstwy ziarnistej i komórki Purkiniego oraz wyraźnie widoczne opony wraz z naczyniami. Pow. 130 ×.

Fig. 12. IF test with baboon brain antiserum absorbed with normal monkey serum, monkey liver, and rat kidney. Rat cerebellum. Brilliant fluorescence of the neuropil. Purkinje cells, small neurons of the granular layer and clearly visible meninges with blood vessels all negative. × 130.

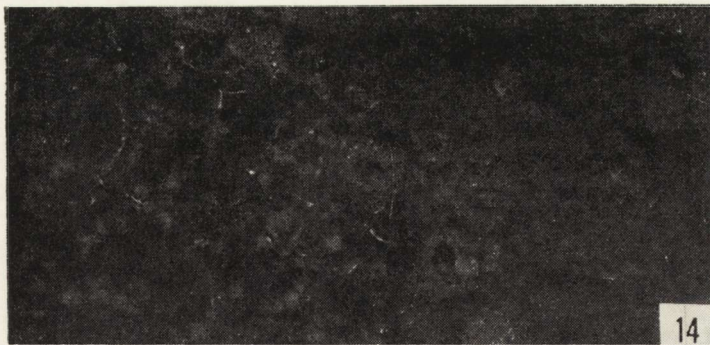


Ryc. 13. Odczyn IF. Surowica przeciwko mózgowi pawiana absorbowana dodatkowo mózgiem ludzkim. Mózdzek szczura. Zahamowanie reakcji immunofluorescencyjnej. Nieswoiste świecenie nielicznych ziaren lipofuscyny. Pow. 130 ×.

Fig. 13. IF test with baboon brain antiserum additionally absorbed with human brain. Rat cerebellum. Inhibition of the reaction, unspecific fluorescence of scarce lipofuscin granules. × 130.

Liakopoulou 1966) co może być przyczyną trudności w uzyskiwaniu dodatnich wyników ID.

Większość izolowanych dotychczas antygenów układu nerwowego cechuje występowanie u licznych, często bardzo odległych od siebie gatunków zwierząt. Sądzi się, że antygeny te mogą pełnić funkcje bardziej uniwersalne, ze względu na ich „konserwatywne” zachowanie się w przebiegu ewolucji. Funkcje antygenów o swoistości ograniczonej do jednego gatunku są nieznane, a same antygeny poznane w stopniu nie-



Ryc. 14. Kontrola swoistości odczynu IF. Mózdzek szczura. Surowica odpornościowa zastąpiona normalną surowicą króliczą. Całkowite zahamowanie odczynu.
 Fig. 14. Specificity control of IF test. Rat cerebellum, immune serum replaced by normal rabbit serum. Complete inhibition of the reaction.

wielkim. Antygeny o podwójnej swoistości stwierdzono dotychczas tylko w mózgu szczura i bydła, ale można się spodziewać ich występowania także w układzie nerwowym innych gatunków. Zasługują one niewątpliwie na bliższe zainteresowanie, gdyż funkcja białka o „podwójnej swoistości” może być łatwiejsza do ustalenia, a jego funkcje w aktywności układu nerwowego bardziej kluczowe.

Autorzy dziękują dr Tomaszowi Michalakowi z Zakładu Immunopatologii PZH za koleżeńską pomoc w opracowaniu materiału tkankowego.

Г. Вейнраудер, С. Краевски

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОРГАНО-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ В МОЗГЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГОМО- И ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

Резюме

Используя сыворотки против мозга крысы и обезьян провели исследования локализации специфических антигенов в мозге крысы и человека посредством непрямого метода иммунофлуоресценции. Эти сыворотки, абсорбированные нормальной сывороткой и гомогенатами органов, давали сильные специфические реакции на срезах из обоих мозгов. После абсорбции сыворотки против мозга крысы через человеческий мозг положительная реакция наблюдалась только на мозге крысы. Как результаты реакции иммунодиффузии так и иммунофлуоресценции указывают на наличие в мозге крысы антигена с двойной специфичностью — органно-видовой. Локализация этого антигена идентична с локализацией органного антигена, не обладающего видовой специфичностью.

Положительные реакции обнаруживались в нейропиле и цитоплазме глиальных клеток (по всей вероятности олигодендроцитов), в то время когда нейроны всегда были отрицательны.

H. Weinrauder, S. Krajewski

LOCALIZATION OF ORGAN-SPECIFIC BRAIN ANTIGENS
WITH HOMO- AND HETEROLOGOUS ANTISERA
BY IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE

Summary

The localization of rat and human brain-specific antigens was studied with the indirect immunofluorescence method using antisera against rat and monkey brain. Sera absorbed with normal serum and organ homogenates gave strong reactions in brain slices of both species. After absorption of anti rat brain serum with human brain, positive reaction was observed with rat brain only. The results of both the immunodiffusion and immunofluorescence reaction are indicative of the occurrence in rat brain of an antigen with both organ- and species-specificity. The localization of this antigen is identical to that of the species-nonspecific antigen. Positive reactions were found in the neuropil and cytoplasm of glial cells, while neurons were as a rule negative.

PIŚMIENNICTWO

1. Delpech B., Vidard M. N., Delpech A.: Caractérisation immunochimique et immunologique d'une glycoprotéine associée au système nerveux. *Immunochemistry*, 1976, 13, 113—116.
2. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971, 28, 351—354.
3. Hatcher V. B., MacPherson C. F. C.: Studies on brain antigens. III. Purification and characterization of a water soluble bovine antigen specific for nervous tissue (α -BASNT). *J. Immunol.* 1970, 104, 633—640.
4. Lach B., Weinrauder H.: Glia-specific antigen in the intracranial tumors. Immunofluorescence study. *Acta neuropath. (Berl.)* 1978, 41, 9—15.
5. Liakopoulou A., MacPherson C. F. C.: Studies on brain antigens. IV. Isolation and partial characterization of a rat species-restricted antigen of nervous tissue (SRANT). *J. Immunol.* 1970, 105, 512—520.
6. MacPherson C. F. C., Liakopoulou A.: Studies on brain antigens. I. Water soluble antigenic proteins of rat brain. *J. Immunol.* 1966, 97, 450—457.
7. Moore B. W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1965, 19, 739—744.
8. van Nieuw Amerongen A., van den Eijnden D. H., Heijlman J., Roukema P. A.: Isolation and characterization of a soluble glucosecontaining sialoglycoprotein from the cortical grey matter of calf brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 2195—2205.
9. Warecka K.: Isolation of brain-specific glycoprotein. *J. Neurochem.* 1970, 17, 829—830.
10. Weinrauder H.: Studies on cat brain antigens. I. Soluble precipitation protein antigens. *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. VI.* 1969, XVII, 423—426.
11. Weinrauder H., Lach B.: Immunofluorescence studies on the localization of the brain specific antigens in the central nervous system of the rat. *Proc.*

VIIth Intern. Congress Neuropath., Budapest, Ed. St. Környey, St. Tariska, G. Gosztonyi. Amsterdam, *Excerpta Medica* 1975, 115—118.

12. Weinrauder H., Lach B.: Studies on glia-specific antigen of rat brain. Proc. Intern. Symposium „Functions of Neuroglia”. Tbilisi 1976.
13. Weinrauder H., Lach B.: Localization of organ-specific antigens in the nervous system of the rat. *Acta neuropath. (Berl.)* 1977, 39, 109—114.
14. Weinrauder H.: Antibodies against organ-specific brain antigens in heterologous antisera. *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. VI.* 1978, XXVI, 221—224.

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

ADRESY KSIĘGARNI „DOMU KSIĄŻKI”,

w których można kupić lub zamówić za zaliczeniem pocztowym
wydawnictwa PZWL:

- 15-062 Białystok — ul. Warszawska 39
- 43-300 Bielsko Biała — ul. Zamkowa 2
- 85-005 Bydgoszcz — ul. 1 Maja 5
- 41-902 Bytom — Pl. Kościuszki 10
- 42-200 Częstochowa — Al. N.M.P. 27
- 80-239 Gdańsk-Wrzeszcz — ul. Miszewskiego 16
- 44-100 Gliwice — ul. Zwycięstwa 47
- 40-009 Katowice — ul. Warszawska 11
- 25-005 Kielce — ul. Sienkiewicza 37
- 75-007 Koszalin — Pl. Bojowników PPR 1
- 31-027 Kraków — ul. Mikołajska 3
- 20-076 Lublin — ul. Krakowskie Przedmieście 62
- 90-004 Łódź — ul. Piotrkowska 102a
- 10-102 Olsztyn — Pl. Wolności 2/3
- 45-020 Opole — Rynek 19/20
- 05-400 Otwock — ul. Warszawska 27
- 61-805 Poznań — ul. Czerwonej Armii 26
- 05-800 Pruszków — ul. Kościuszki 42
- 26-600 Radom — ul. 1 Maja 28
- 35-030 Rzeszów — ul. 3 Maja 2/II
- 27-600 Sandomierz — Rynek 16/17
- 76-200 Słupsk — Pl. Zwycięstwa 11
- 70-414 Szczecin — Pl. Lotników SDM
- 87-100 Toruń — Rynek Staromiejski 30
- 58-300 Wałbrzych — ul. Słowackiego 1
- 00-524 Warszawa — ul. Marszałkowska 74
- 00-068 Warszawa — ul. Krakowskie Przedmieście 7
- 01-882 Warszawa — ul. Żeromskiego 81
- 50-068 Wrocław — Księgarnia Centralna, ul. Świdnicka 28
- 50-369 Wrocław — ul. C. Skłodowskiej 39
- 41-800 Zabrze — ul. Wolności 288
- 65-066 Zielona Góra — ul. Żeromskiego 16
- 68-200 Żary — ul. Rosenbergów 1

Ośrodek Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN
00-110 Warszawa — Pałac Kultury i Nauki

WOJCIECH HILGIER, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ I-GLUTAMINO-AMIDOHYDROLAZY
W MÓZGU SZCZURÓW
W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

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

W piśmiennictwie neurologicznym i neuropatologicznym od dawna zwracano uwagę na rolę patogenetyczną amoniaku w zespole encefalopatii wątrobowej, stanowiącej następstwo nieswoistych uszkodzeń wątroby (Adams, Foley 1953, McDermott, Adams 1954, Bessman, Bessman 1955). Poglądy oparte na analizie klinicznych przypadków śpiączki wątrobowej znalazły swoje późniejsze potwierdzenie w badaniach doświadczalnych z wytwarzaniem przetoki między żyłą wrotną i żyłą główną dolną (Kyu, Cavanagh 1970, Cavanagh, Kyu 1971). Hyperamonemia stanowiąca następstwo zespolenia żylnego współprzebiegała z charakterystycznym zespołem nieprawidłowości tkankowych spotykanych w klinicznych przypadkach encefalopatii wątrobowej. Podobieństwo morfologiczne uszkodzeń mózgu w encefalopatii wątrobowej i w chorobie Wilsona zwróciło uwagę na możliwą patogenetyczną rolę miedzi w kształtowaniu zespołu encefalopatii wątrobowej. Wzrost poziomu miedzi w mózgu stwierdzono w przypadkach ostrej encefalopatii wątrobowej u ludzi (Śmiałek, Mossakowski 1974) oraz w encefalopatii wrotno-układowej (Wender, Kozik 1973), a ponadto w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej u szczurów, stanowiącej następstwo marskości wątroby wywołanej czterochlorkiem węgla (Hilgier, Lipska 1979). W oparciu o całokształt spostrzeżeń uzyskanych w badaniach na pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej (Mossakowski i wsp. 1970a, 1975, 1977a, Renkawek i wsp. 1973) wysunięto przypuszczenie, że w patogenezie encefalopatii wątrobowej podstawową rolę odgrywa upośledzenie detoksykacji amoniaku w mózgu, związane z względnym lub bezwzględny niedoborem α -ketoglutaranu w ośrodkowym układzie nerwowym. Patogenetyczna rola miedzi polegałaby na upośledzeniu pro-

dukcji endogennego α -ketoglutaranu w następstwie zaburzenia metabolizmu komórkowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

W związku z powyższym wydawało się celowe określenie aktywności l-glutamino-amidohydrolazy (stanowiącej pośredni wykładnik poziomu amoniaku) w mózgu oraz stężenia amoniaku w surowicy krwi u szczurów z doświadczalną encefalopatią wątrobową.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 34 szczurach rasy Wistar, samcach. U 19 szczurów marskość wątroby wywoływano przez podskórne wstrzykiwanie, co drugi dzień, roztworu czterochlorku węgla w płynnej parafinie w dawce 0,1 ml na 100 g ciężaru ciała, wg metody opisanej przez Georgijewa i wsp. (1968). Zwierzęta kontrolne w liczbie 14 otrzymywały podskórne iniekcje płynnej parafiny w objętości identycznej w przeliczeniu na ciężar ciała, jak zwierzęta doświadczalne.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację bez stosowania narkozy, w grupach po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od rozpoczęcia doświadczenia. W chwili zakończenia doświadczenia, niezależnie od okresu jego trwania, wiek zwierząt wynosił 8 miesięcy. Do badań pobierano mózgi oraz surowicę krwi. Poziom amoniaku w homogenatach mózgu oznaczano pośrednio poprzez pomiar aktywności glutaminazy (EC 3.5.1.2- α -glutamino-amidohydrolaza) i wyrażano w $\mu\text{M NH}_3/\text{mg}$ białka/godz. (Mardaszew i wsp. 1967, Tweit i wsp. 1970). Mieszanina inkubacyjna w objętości 1 ml zawierała 20 mM glutaminy, 50 mM Na_2HPO_4 , 0,2 mM EDTA (pH 8,0) i około 1 mg białka. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 37°C przez okres 30 minut. Reakcję przerywano przez dodanie 0,5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego oziębionego do temp. około $+4^\circ\text{C}$. Próby wirowano przez 10 min przy 4.000 obr./min. Następnie zbierano po 0,25 ml nadsącza, dodawano 4,75 ml wody i 0,5 ml odczynnika Nesslera. Wolny amoniak oznaczano przy użyciu fotokolorymetru Spekol, przy długości fali 420 nm.

Poziom amoniaku w surowicy krwi określano przy użyciu standardowych testów „Blood Ammonia Test” f-my Hyland. Zawartość białka w homogenatach mózgu oznaczano wg metody Lowry'ego i wsp. (1951).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu t-Studenta i Q-Dixona.

WYNIKI

Aktywność l-glutamino-amidohydrolazy w mózgach zwierząt kontrolnych i doświadczalnych, ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Aktywność glutaminazy w μmol ach NH_3/mg białka/godz.
 Table 1. Activity of glutamine-amidohydrolase $\mu\text{mol}/\text{NH}_3/\text{mg}$ protein/h

Czas zatrucia Intoxication time	Kontrola Control animals		Zwierzęta doświadczalne Experimental animals		p
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	
2 miesiące months	$2,26 \pm 0,04$	(4)	$2,38 \pm 0,09$	(4)	$\geq 0,01$
4 miesiące months	$2,81 \pm 0,23$	(5)	$4,02 \pm 0,26$	(6)	$\leq 0,01$
6 miesięcy months	$2,96 \pm 0,18$	(5)	$5,94 \pm 0,13$	(7)	$\leq 0,01$

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej
 arithmetic mean \pm standard error of the mean

n — liczba zwierząt
 number of animals

p — prawdopodobieństwo
 probability

Z uzyskanych danych wynika, że w grupie zwierząt z 2-miesięcznym podawaniem czterochlorku węgla nie zachodzą zmiany w aktywności glutaminazy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Po 4 miesiącach obserwuje się wzrost aktywności enzymu, wynoszący około 43% wartości kontrolnych. U zwierząt z 6-miesięcznym okresem doświadczenia wzrost aktywności wynosił około 100% w stosunku do zwierząt kontrolnych.

Poziom amoniaku w surowicy zwierząt kontrolnych i doświadczalnych przedstawiono w tabeli 2. Stężenie amoniaku w surowicy zwierząt doświadczalnych w żadnym okresie doświadczenia nie różniło się w sposób istotny od stwierdzanego u zwierząt kontrolnych.

Tabela 2. Zawartość NH_3 w surowicy krwi w $\mu\text{g}/\text{dl}$
 Table 2. NH_3 content in blood serum $\mu\text{g}/\text{dl}$

Czas zatrucia Intoxication time	Kontrola Control animals		Zwierzęta doświadczalne Experimental animals		p
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	
2 miesiące months	$159,7 \pm 0,33$	(3)	$167,2 \pm 7,78$	(5)	$\geq 0,01$
4 miesiące months	$94,6 \pm 5,76$	(4)	$83,3 \pm 6,59$	(6)	$\geq 0,01$
6 miesięcy months	$123,8 \pm 1,25$	(4)	$116,3 \pm 3,54$	(8)	$\geq 0,01$

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej
 arithmetic mean \pm standard error of the mean

n — liczba zwierząt
 number of animals

p — prawdopodobieństwo
 probability

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że w przebiegu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, stanowiącej następstwo marskości wątroby wywołanej czterochlorkiem węgla, dochodzi do wzrostu aktywności glutaminazy w mózgu. Wzrost aktywności glutaminazy jest wykładnikiem zwiększonego poziomu glutaminy w mózgu, która jest jednym z podstawowych metabolitów na szlaku detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Hindfelt (1975) wykazał, że ostre zatrucie amoniakiem prowadzi do znacznego przyspieszenia syntezy glutaminy i wzrostu jej zawartości w mózgu. Stężenie glutaminy w mózgu jest funkcją zawartości amoniaku i wzrasta proporcjonalnie do wzrostu jego poziomu (Duffy i wsp. 1974). W związku z powyższym na podstawie aktywności glutaminazy można pośrednio sądzić o zachowaniu się amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym.

W naszych badaniach stwierdzono, że po upływie 2 miesięcy nie występują statystycznie znamienne zmiany w aktywności glutaminazy. Natomiast w grupach 4- i 6-miesięcznych obserwowano znaczny, statystycznie znamienny wzrost aktywności enzymu. Można przypuszczać, że stężenie amoniaku podlegało tym samym zmianom. Zwraca przy tym uwagę fakt zbieżności czasowej zmian w aktywności glutaminazy z pojawianiem się i narastaniem nieprawidłowości morfologicznych astrogleju, stwierdzonych w tym samym modelu doświadczalnym przez Mossakowskiego i wsp. (1970b). Dynamika procesu jest analogiczna jak w przypadku gromadzenia się miedzi w mózgu (Hilgier, Lipska 1979). W grupie zwierząt, którym roztwór czterochlorku węgla podawano przez 2 miesiące, zarówno stężenie miedzi jak i aktywność enzymu nie odbiegały od wartości kontrolnych. U zwierząt z 4-miesięcznym przebiegiem doświadczenia 11% przyrostowi stężenia miedzi towarzyszył 43% przyrost aktywności glutaminazy, a przy 6-miesięcznym trwaniu doświadczenia 43% wzrost zawartości miedzi przebiegał z dwukrotnym wzrostem aktywności enzymu. Można przeto przyjąć, że w zastosowanym modelu doświadczalnym encefalopatii wątrobowej występuje równoczesny wzrost poziomu miedzi i amoniaku w mózgu, a uszkodzenie strukturalne tkanki jest wypadkową działania obu czynników. Nie przesądza to oczywiście wzajemnych związków przyczynowych w patogenezie uszkodzeń tkankowych. Fakt niezmienionego stężenia amoniaku w surowicy krwi może jedynie implikować pierwotność uszkadzającego działania miedzi. Według koncepcji Mossakowskiego (1973) patogenetyczna rola miedzi w śpiączce wątrobowej polega na upośledzeniu produkcji endogennego α -ketoglutaranu, stanowiącego pierwotne ogniwo detoksykacji amoniaku do glutaminy. Znajduje ona swoje po-

twierdzenie w spostrzeżeniach Bessmana i Bessman (1955), którzy stwierdzili, że w śpiączce wątrobowej toksyczne działanie amoniaku ujawnia się przy obniżeniu stężenia α -ketoglutaranu w mózgu. W nowszych badaniach wykazano, że wzrostowi poziomu amoniaku w mózgu towarzyszy wzrost stężenia α -ketoglutaranu (Shorey i wsp. 1967, Hindfelt, Siesjö 1971, Duffy i wsp. 1974). Wydaje się jednak, że wzrost ten może być zjawiskiem kompensacyjnym zależnym od fazy rozwojowej encefalopatii wątrobowej oraz od jej typu. Można więc przypuszczać, że występuje on przede wszystkim w encefalopatii wątrobowej przebiegającej z hyperamonemią.

Hindfelt (1975) w badaniach doświadczalnych, prowadzonych na modelu zespolenia żyły wrotnej z żyłą główną dolną u szczurów, już w drugim tygodniu od założenia przetoki żyłnej stwierdzał dwukrotny wzrost stężenia amoniaku w mózgu. Podobny wzrost stężenia amoniaku w naszych doświadczeniach występował dopiero po 6 miesiącach trwania doświadczenia. Różnicę w dynamice procesu odnieść należy zapewne do powolności hepatotoksycznego działania czterochlorku węgla w zastosowanej dawce. Mimo postępującego uszkodzenia wątroby (Mossakowski i wsp. 1970b) jej funkcje były utrzymane do końca doświadczenia, o czym świadczył zarówno stan kliniczny zwierząt (żadne zwierzę nie zginęło w śpiączce wątrobowej) jak i brak zmian w stężeniu amoniaku w surowicy krwi. W przypadku encefalopatii wrotno-układowej, przy wytworzeniu przetoki między żyłą wrotną i główną dolną dochodzi do znacznej hyperamonemii już we wczesnym okresie doświadczenia (Cavanagh, Kyu 1971, Mossakowski i wsp. 1977b).

В. Гильгер, М. Я. Моссаковски

АКТИВНОСТЬ 1-ГЛУТАМИН-АМИДОГИДРОЛАЗЫ В МОЗГЕ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Было проведено исследование активности глутаминазы в мозгах и содержание аммиака в плазме крови у крыс, у которых вызывалось повреждение печени посредством подкожных инъекций четыреххлористого угля. Инъекции проводили через день в течение 2, 4 и 6 месяцев.

Наблюдали усиливающийся во времени рост активности энзима. После 2 месяцев активность глутаминазы не отличалась существенным образом от активности этого энзима у контрольных животных. После 4 месяцев обнаруживали около 43%, а после 6 месяцев около двухкратное приращение активности энзима. Не наблюдали изменений в содержании аммиака в плазме крови.

Выдвигается заключение, что в применяемой экспериментальной модели имеет место увеличение уровня аммиака в мозге.

W. Hilgier, M. J. Mossakowski

THE 1-GLUTAMINE-AMIDOHYDROLASE ACTIVITY IN RAT BRAIN
IN EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The brain glutaminase activity and serum ammonia content were determined in rats in which liver damage was produced by subcutaneous injections of carbon tetrachloride. The injections were performed every other day for 2, 4 and 6 months. The enzyme activity was observed to increase gradually; it was not different from the control level after 2 months, but was elevated by 43% after 4 months and about twice after 6 months. The serum ammonia content remained unchanged throughout.

The results are indicative of an increase of ammonia level in the brain in this experimental model.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams R. D., Foley J. M.: The neurological changes associated with liver disease. *Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis.* 1953, 32, 198—237.
2. Bessman S. P., Bessman A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanism of hepatic coma. *J. Clin. Inv.* 1955, 36, 622—628.
3. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. *J. neurol. Sci.* 1971, 12, 241—261.
4. Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfafetoglutaramate in hepatic encephalopathy. *Brain dysfunction metabolic disorders*. Ed. F. Plum, *Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis.* Vol. 53. Raven Press, New York 1974.
5. Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu CCl_4 na wątrobę prawidłową i regenerującą. *Pat. Pol.* 1968, 19, 179—187.
6. Hilgier W., Lipska M.: Topografia ilościowa miedzi w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 145—153.
7. Hindfelt B., Siesjö B. K.: Cerebral effects of acute ammonia intoxication: the effect upon energy metabolism. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1971, 28, 365—374.
8. Hindfelt B.: On mechanism in hyperammonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975, 252, 116—123.
9. Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rats. *Brit. J. exp. Path.* 1970, 51, 217—227.
10. Lowry C. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—270.
11. Mardaszew S. R., Nikolajew A., Ewsieju A. P.: Indukcja asparginaznoy i glutaminaznoy aktywnostiej u *Pseudomonas sp. asparginowoj* i glutaminowej kwasotami. *Biochimija* 1967, 32, 1093—1098.
12. McDermott W. V., Adams R. B.: Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *J. Clin. Invest.* 1954, 33, 1—9.
13. 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.

14. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970b, 8, 365—374.
15. Mossakowski M. J.: The role of copper in the pathogenesis of Wilsonian gliopathy. II. Inter. Symp. on Wilson's Disease. Paris, 1973.
16. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ glutaminianu sodu na obraz gliopatii wywołanej przez amoniak i malonian sodu w warunkach hodowli in vitro. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 1—9.
17. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ d-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.* 1977a, 15, 58—74.
18. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Rózga J., Paluszkiewicz R.: Wpływ α -oksooglutaranu na rozwój encefalopatii wątrobowej u szczurów z zespołem wrotno-układowym. *Neuropat. Pol.* 1977b, 15, 317—325.
19. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes in vitro induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 107—114.
20. Shorey J., Mc Candless D. W., Schenker S.: Cerebral α -ketoglutarate in ammonia intoxication. *Gastroenterology* 1967, 53, 706—711.
21. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Morphological changes on quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma due to acute liver impairment. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 259—268.
22. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. Obraz biochemiczny. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1973, 7, 177—181.
23. Tweit B., Svenneby G. S., Krame E.: Kinetic properties of glutaminase from pig renal cortex. *Eur. J. Bioch.* 1970, 14, 337—344.

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

SKRÓTY BIBLIOGRAFICZNE POLSKICH CZASOPISM LEKARSKICH

- Acta Haematologica Polonica = Acta Haemat. Pol.
 Acta Medica Polona = Acta Med. Pol.
 Acta Physiologica Polonica = Acta Physiol. Pol.
 Acta Poloniae Pharmaceutica = Acta Polon. Pharm.
 Anestezja i Reanimacja = Anest. Reanim.
 Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis = Arch. Immun. Therap. Exp.
 Archiwum Historii Medycyny = Arch. Hist. Med.
 Archiwum Medycyny Sądowej, Psychiatrii Sądowej i Kryminalistyki = Arch. Med. Sąd.
 Biuletyn Informacyjny „Cefarm” = Biul. Cefarm.
 Biuletyn Informacyjny Optyka = Optyka
 Biuletyn Instytutu Medycyny Morskiej = Biul. Inst. Med. Morsk.
 Biuletyn Wojskowej Akademii Medycznej = Biul. WAM
 Bromatologia i Chemia Toksykologiczna = Brom. Chem. Toksykol.
 Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska = Chir. Narz. Ruchu i Ortop. Pol.
 Czasopismo Stomatologiczne = Czas. Stomat.
 Diagnostyka Laboratoryjna = Diagn. Lab.
 Dissertationes Pharmaceuticae et Pharmacologicae = Dissert. Pharm.
 Endokrynologia Polska = Endokr. Pol.
 Epidermiological Review = Epid. Rev.
 Experimental Medicine and Microbiology = Exp. Med. Microbiol.
 Farmacja Polska = Farm. Pol.
 Folia Histochemica et Cytochemica = Folia Hist. Cytochem.
 Folia Morphologica = Folia Morph. (Warsz.)
 Ginekologia Polska = Gin. Pol.
 Gruźlica i Choroby Płuc = Gruźlica
 Kardiologia Polska = Kard. Pol.
 Klinika Oczna = Klin. Oczna
 Lekarz Wojskowy = Lek. Wojsk.
 Materia Medica Polona = Mat. Med. Pol.
 Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia = Med. Dośw. Mikrobiol.
 Medycyna Pracy = Med. Pracy
 Medycyna Wiejska = Med. Wiejska
 Neurologia i Neurochirurgia Polska = Neur. Neurochir. Pol.
 Neurologia, Neurochirurgia i Psychiatria Polska = Neur. Neurochir. Psych. Pol.
 Neuropatologia Polska = Neuropat. Pol.
 Nowotwory = Nowotwory
 Otolaryngologia Polska = Otolaryng. Pol.
 Patologia Polska = Pat. Pol.
 Pediatria Polska = Ped. Pol.
 Pneumonologia Polska = Pneum. Pol.
 Polish Endocrinology = Pol. Endocr.
 Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy = Pol. J. Pharmacol. Pharm.
 Polish Medical Journal = Pol. Med. J.
 Polish Review of Radiology and Nuclear Medicine = Pol. Rev. Rad. Nucl. Med.
 Polski Przegląd Chirurgiczny = Pol. Przeg. Chir.
 Polski Przegląd Radiologii i Medycyny Nuklearnej = Pol. Przeg. Rad. Med. Nukl.
 Polski Tygodnik Lekarski = Pol. Tyg. Lek.
 Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej = Pol. Arch. Med. Wewn.
 Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej = Post. Hig. Med. Dośw.
 Postępy Okulistyki = Post. Okul.
 Problemy Techniki w Medycynie = Probl. Techn. Med.
 Protetyka Stomatologiczna = Prot. Stom.
 Przegląd Epidemiologiczny = Przeg. Epid.
 Przegląd Lekarski = Przeg. Lek.
 Psychiatria Polska = Psychiat. Pol.
 Przegląd Dermatologiczny = Przeg. Derm.
 Reumatologia = Reumatologia
 Roczniki Państwowego Zakładu Higieny = Roczn. PZH
 Wiadomości Lekarskie = Wiad. Lek.
 Wiadomości Parazytologiczne = Wiad. Parazyt.
 Zdrowie Publiczne = Zdrowie Publ.

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO

BADANIA NAD MORFOLOGICZNYM PODŁOŻEM OSTREGO MAJACZENIA ALKOHOLOWEGO

Z Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego
Kierownik Zakładu: prof. dr J. Dymecki

Od dawna toczy się dyskusja nad etiopatogenezą ostrego majaczenia alkoholowego. Dąży się do ścisłego sprecyzowania etiologii schorzenia, traktując je jako wyraz toksycznego działania alkoholu i/lub jego produktów przemiany w połączeniu z niedoborem odżywczym (Neubürger 1931; Pentschew 1958; Seitelberger, Gross 1962 i inni), bądź też jako zespół stanowiący skutek odstawienia alkoholu (Isbell i wsp. 1955; Scheid, Huhn 1958 i inni). Ponadto w badaniach epidemiologicznych (Jellinek 1960; Nielsen i wsp. 1965; Whitwell 1975 i inni) poszukuje się czynników związanych z częstością występowania ostrego majaczenia alkoholowego.

W badaniach morfologicznych dyskutuje się zarówno lokalizację procesu chorobowego jak i charakter zmian strukturalnych (Gamper 1928; Okhuma 1930; Wichert, Dreszer 1931; Zahnd 1953; Huber 1954; Neubürger 1957; Liss 1958; Löken 1971 i inni). Czasami odrzuca się istnienie morfologicznie uchwytanych uszkodzeń (Colmant 1965), a przyczynę ostrego majaczenia alkoholowego upatruje się w zakłóceniach biochemicznych (Meyer 1963) często odwracalnych. Na ogół podkreśla się nasilenie zespołu psychoorganicznego i otępienie po przebytych ostrym majaczeniu alkoholowym (Courville 1955; Bilikiewicz 1960; Colmant 1965; Löken 1971 i inni).

Ta zmienność poglądów, która stale przewija się w piśmiennictwie neuropatologicznym skłoniła nas do podjęcia niniejszych badań.

Zadaniem pracy była szczegółowa ocena struktury i topografii zmian morfologicznych w przypadkach śmiertelnego ostrego majaczenia alkoholowego.

*) Praca finansowana w ramach Funduszu Celowego dla Badań nad Alkoholizmem.

MATERIAŁ I METODY

Materiał pochodzi ze zbiorów Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego i obejmuje 20 przypadków sekcyjnych, chorych nadużywających przewlekłe alkoholu, u których w przebiegu nałogu wystąpiło ostre majaczenie alkoholowe. Chorzy ci zmarli w przebiegu ostrego majaczenia alkoholowego w różnych szpitalach psychiatrycznych. W doborze materiału kierowano się wiekiem chorych, biorąc pod uwagę tylko chorych do 55 roku życia, celem wyłączenia możliwości zmian związanych ze starzeniem się mózgu. Z oceny wyłączono również wszystkie te przypadki, w których weryfikacja mikroskopowa ujawniła inne procesy chorobowe.

Do badania histopatologicznego pobrano metodą dużych skrawków wycinki czołowe mózgowia ze wszystkich okolic reprezentatywnych. Wycinek z międzymózgowia obejmował ciała suteczkowate. Materiał zatapiano w parafinie. Skrawki barwiono fioletem krezyłu, HE, met. van Gieson, Spielmeyera, Bielschowsky'ego, Kanzler-Arendta.

WYNIKI

Dane kliniczne

W grupie 20 przypadków było 17 mężczyzn i 3 kobiety, zmarłych w wieku od 28 do 52 lat. Średnia wieku wynosiła 41 lat. W wywiadzie u 15 chorych ustalono okres nadużywania alkoholu. Wahał się on od 3 do 29 lat. Pozostali chorzy nadużywali alkoholu od „wielu lat”. Ilość jednorazowo spożywanego alkoholu, jak i częstość nadużywania przez tego samego chorego była zmienna: „kilka kieliszków do 1 litra — kilka razy w miesiącu, okresami codziennie” itp. W przebiegu nałogu u 6 chorych wystąpiło ostre majaczenie alkoholowe dwa razy, a u jednego chorego cztery razy. Większość chorych przebywała w szpitalu psychiatrycznym dwa lub więcej razy. U wszystkich stwierdzono charakteropatię alkoholową z mniej lub bardziej nasilonym zespołem psychoorganicznym; u 4 chorych stwierdzono również ciężkie otępienie. W stanie neurologicznym u 9 chorych obecne były rozsiane objawy uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, zespół mózdkowy obserwowano w 5 przypadkach, a polineuropatię alkoholową u 1 chorego. Napady padaczkowe typu „grand mal” obserwowano u 3 chorych. U 8 chorych ostre majaczenie alkoholowe wystąpiło w okresie abstinencji trwającej od 9 dni do 2 tygodni, u 1 było poprzedzone urazem czaszki bez utraty przytomności, u pozostałych 10 pojawiło się w czasie nadużywania alkoholu. Czas trwania ostrego śmiertelnego majacze-

nia wahał się od 3 do 12 dni, w 1 przypadku rozwinęła się psychoza Wer-
nickego— zgon nastąpił w 23 dniu trwania choroby.

Badanie makroskopowe

Badaniem sekcyjnym w 13 przypadkach stwierdzono stłuszczenie i marskość wątroby, u 9 chorych zapalenie płuc, w 6 przypadkach uszkodzenie miąższu nerek, w 17 zmiany zwyrodnieniowe mięśnia sercowego oraz owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy w 7 przypadkach.

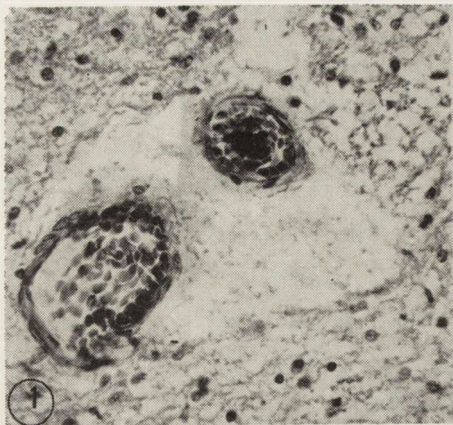
Badanie makroskopowe mózgu w 13 przypadkach wykazało uogólnione zmiany zanikowe mózgu (zwężenie zakrętów, zwężenie kory, istoty białej i spoidła wielkiego — zwłaszcza w części przedniej i środkowej, poszerzenie rogów czołowych i skroniowych komór bocznych). Obrzęk mózgu makroskopowo stwierdzono w 11 przypadkach. Niewielkie blaszki miażdżycowe w naczyniach podstawy zwężające tylko minimalnie ich światło obserwowano w 2 przypadkach (u chorego 50- i 51-letniego).

Badanie mikroskopowe mózgu

We wszystkich przypadkach na czoło procesu patologicznego wysuwały się objawy bardzo znacznego zastojów w całym układzie naczyniowym. Śródbłonki naczyń, czasem i cała ściana naczyń, były obrzękłe, rysunek warstw był zatarty. Wokół naczyń gromadziły się jeziora włóknika, erytrocyty i leukocyty w skupieniach, pojedynczo makrofagi. Tkanka otaczająca naczynia była zgęszczona (ryc. 1). Obserwowano drobne kuliste krwotoki przynaczyniowe i nie wykazujące związku z naczyniami (ryc. 2).

Szczególne zagęszczenie maksymalnie wypełnionych krwią naczyń i drobnych krwotoków obserwowano w otoczeniu komory III — we wzgórzu i podwzgórzu, zwłaszcza w ciałach suteczkaty (ryc. 3), w części nakrywkowej śródmózgowia i mostu, w istocie białej i w korze zakrętu hipokampa, zwłaszcza w rogu Amona.

W obrazie uszkodzenia komórek nerwowych dominowało ich stłuszczenie. Masy lipofuscyny rozpychały i zniekształcały często komórkę nerwową, uciskały i spychały na obwód ścięzające włóknienka nerwowe (ryc. 4). Było ono wybitne w ugrupowaniach masy przyśrodkowej wzgórza, gdzie w 14 przypadkach bardzo liczne komórki nerwowe były obciążone lipofuscyną (przy powiększeniu mikr. 400 × prawie 2/3 spostrzeganych komórek w polu widzenia było zmienionych). Ponadto znaczne stłuszczenie komórek nerwowych występowało w korze amonalnej, w zakręcie obręczy, w ciałach suteczkaty, w korze



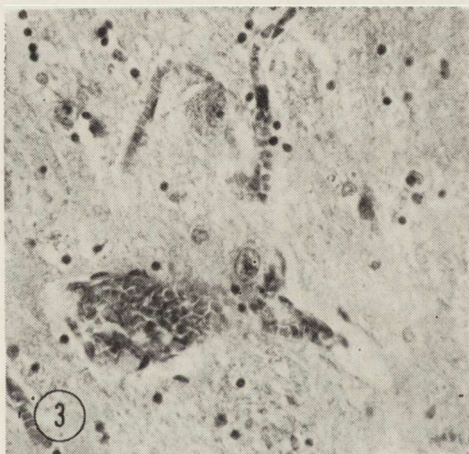
Ryc. 1. Zatarcie rysunku ściany naczyń, zgębczenie struktury okołonaczyniowej. H-E. Pow. 400 X.

Fig. 1. Desintegration of vascular wall. Spongy degeneration of perivascular tissue. H-E. X 400.



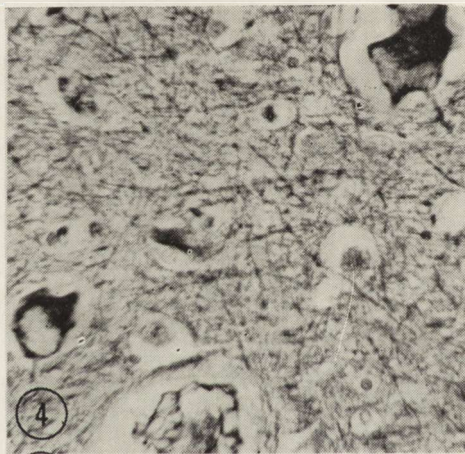
Ryc. 2. Drobne kuliste krwotoki w otoczeniu komory IV. H-E. Pow. 100 X.

Fig. 2. Small spherical hemorrhages around IVth ventricle. H-E. X 100.



Ryc. 3. Zagęszczenie naczyń i drobne krwotoczki w ciałach suteczkowatych. H-E. Pow. 400 X.

Fig. 3. Condensation of vessels and small hemorrhages in mamillary bodies. H-E. X 400.

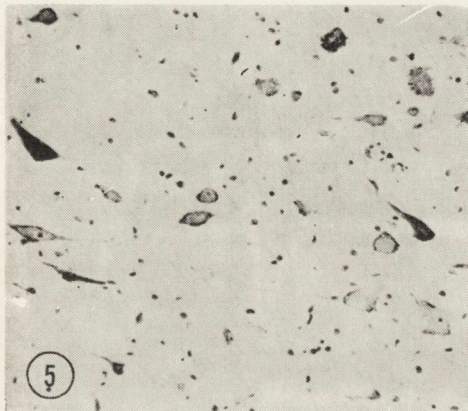


Ryc. 4. Masy lipofuscyny zniekształcające komórkę nerwową i włókienka nerwowe. Bielschowsky. Pow. 400 X.

Fig. 4. Lipofuscin masses deforming nerve cells and neurofibrilles. Bielschowsky. X 400.

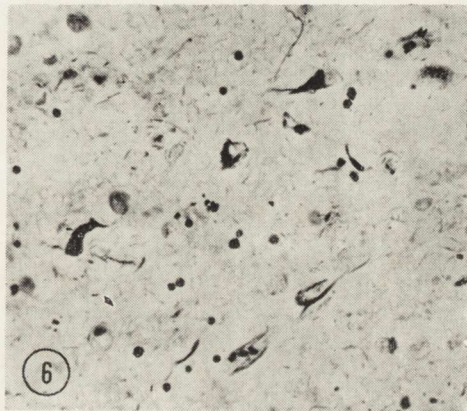
czołowej, skroniowej, w jądrach własnych mostu, w tworze siatkowatym pnia mózgu, a w 3 przypadkach nawet w komórkach Purkiniego były widoczne skupienia lipopigmentu. Obrazy centralnej chromatolizy

komórki nerwowej, ostrego obrzęku i schorzenia ciężkiego Nissla-Spielmeiera spostrzegano w zmiennym nasileniu głównie w otoczeniu komory III, w jądrach wegetatywnych podwzgórza, w ciałach suteczkowych, w pniu mózgu, często w ugrupowaniach jądra przedsionkowego i dwuznacznego (ryc. 5) oraz w strukturach amonalnych. We wszystkich przypadkach występowało w zmiennym nasileniu schorzenie przewlekłe, ischemiczne oraz zwyrodnienie ziarniste Spielmeiera głównie w korze. W 7 przypadkach obserwowano również obrzęk dendrytów komórek Purkinjego. Prawie we wszystkich przypadkach z makroskopowym obrzękiem mózgu spostrzegano wydłużone, ciemno barwiące się komórki nerwowe o zatartej strukturze cytoplazmy i jądra. Występowały one w korze zakrętu hipokampa na wysokości bruzdy po wklonowaniu. Były one niemal przecinkowate, uciśnięte przez obrzęk.



Ryc. 5. Obrazy centralnej chromatolizy, ostrego obrzmienia, schorzenia ciężkiego i przewlekłego komórek nerwowych. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×.

Fig. 5. Pictures of central chromatolysis, acute swelling and severe and chronic disease of nerve cells. Cresyl violet. × 200.

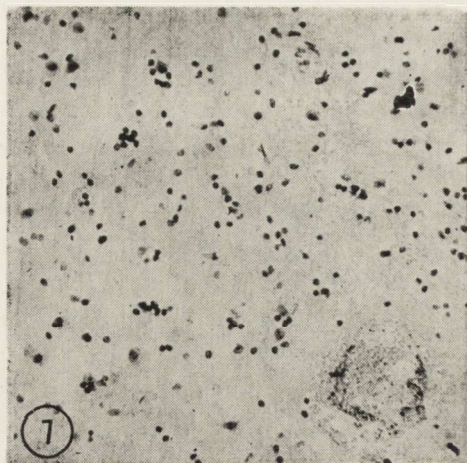


Ryc. 6. Zdeformowane włókienka nerwowe w komórkach kory hipokampa. Bielschowsky. Pow. 400 ×.

Fig. 6. Deformed neurofibrilles in hippocampal cortex cells. Bielschowsky. × 400.

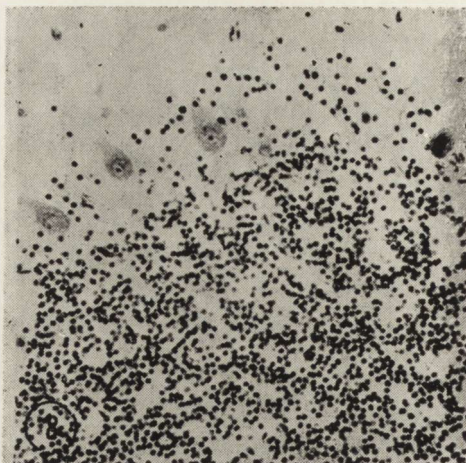
W licznych komórkach nerwowych w obrazie Bielschowsky'ego obserwowano pogrubiałe i wrzecionowato rozdęte włókienka nerwowe (ryc. 6), przypominające zmiany alzheimerowskie. Stwierdzano je w ugrupowaniach jądra migdałowego, w korze amonalnej (13 przyp.), rzadziej w korze czołowej i skroniowej. Obserwowano je także w ciałach suteczkowych, pojedynczo w tworze siatkowatym pnia mózgu i jądrach własnych mostu (1 przyp.).

Schorzeniu komórek nerwowych towarzyszy dosyć żywy odczyn rozplemowy gleju. Wzmoczoną satelitozę, neuronofagię i grudki glejowe



Ryc. 7. Grudki glejowe, krwotoczek w ciałach suteczkowatych. H-E. Pow. 200 X.

Fig. 7. Glial nodules. Small hemorrhage in mamillary bodies. H-E. X 200.



Ryc. 8. Pobudzenie rozplemowe gleju Bergmanna. Fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

Fig. 8. Proliferation of Bergmann glia. Cresyl violet. X 200.

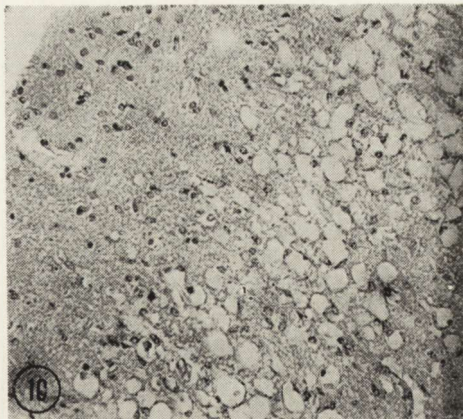
(ryc. 7) obserwowano w 18 przypadkach. Reakcja rozplemowa gleju była najwybitniejsza w korze zakrętu obręczy, w dolnych warstwach kory czołowej, skroniowej, w korze amonalnej, w nakrywce śródmózgowia i mostu. Obserwowano ją w polach jądrowych n. VIII, IX i X w opuszcze, w ciałach suteczkowatych oraz w otoczeniu komory III, a w zmiennym nasileniu w innych okolicach mózgu. W pniu mózgu liczne były komórki pałeczkowate. W mózdzku głównie w obrębie robaka stwierdzono rozplem gleju Bergmanna (ryc. 8).

Kolejnym elementem uszkodzenia tkanek mózgu były ubytki komórek nerwowych. W 3 przypadkach doprowadziły one do zgąbczenia i zupełnego zatarcia warstw w obrębie kory amonalnej (ryc. 9) i odcińkowo zwłaszcza na dnie rowków w korze czołowej i ciemieniowej. W 4 przypadkach zgąbczenia występowały w górnych warstwach kory czołowej i potylicznej (ryc. 10), a w obrazie Kanzler-Arendta towarzyszyła im wzmoczona brzeżna glejoza włóknista (ryc. 11). Wysepkowate zblednięcie i wypadnięcia komórek nerwowych spostrzegano we wszystkich przypadkach z największym ich nasileniem w korze amonalnej (ryc. 12), w III warstwie kory zakrętu obręczy, zakrętu F₁ i F₂. W korze mózdzku ilość komórek Purkiniego uległa zmniejszeniu. Często całe listeczki robaka były pozbawione komórek Purkiniego. Poza tym ubytki tych komórek występowały w obrębie głębokich listeczków wokół bruzd (8 przyp.). Przerzedzenia komórek nerwowych warstwy ziarnistej obecne były tylko w 4 przypadkach i to głównie w obrę-



Ryc. 9. Zgąbczenie i zatarcie warstw w obrębie kory amonalnej. Bielschowsky. Pow. 100 \times .

Fig. 9. Spongy degeneration and disturbed layer arrangement within amonal cortex. Bielschowsky. $\times 100$.



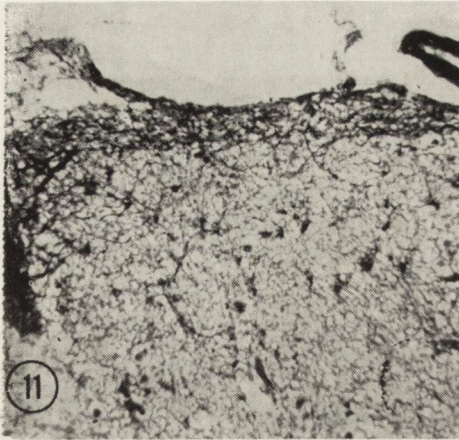
Ryc. 10. Zgąbczenie w górnych warstwach kory czołowej. Van Gieson. Pow. 200 \times .

Fig. 10. Spongy degeneration in upper layers of frontal cortex. Van Gieson. $\times 200$.

bie listeczków migdałka (ryc. 13). W jądrach podkorowych ogniska zblednieć z niewielkimi wysepkowatymi opustoszeniami komórkowymi obserwowano głównie w ugrupowaniach jądra migdałowego (10 przyp.), w ciałach suteczkwatych (8 przyp.), w podobnej ilości przypadków w tworze siatkowatym pnia mózgu i w jądrach własnych mostu. W jądrach przykomorowych wzgórza i podwzgórza występowały drobne ogniska zgąbczeń w 3 przypadkach.

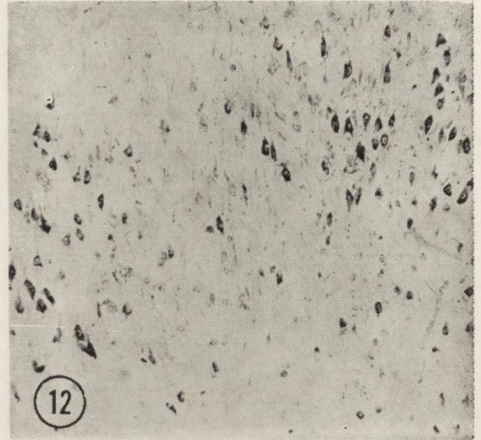
Płytki starcze, najczęściej amorficzne (ryc. 14), pojedynczo lub w skupieniach po 4—5 co kilka pól widzenia, obserwowano w 7 przypadkach w ugrupowaniach jądra migdałowego oraz w korze amonalnej zarówno u osób młodych (28, 38, 42-letnich) jak i starszych. W korze zakrętu obręczy, w korze skroniowej i czołowej obecne były tylko w pojedynczych polach. Zagęszczenie pilśni nerwowej przypominające amorficzną płytkę starczą spostrzegano w ciałach suteczkwatych w 4 przypadkach.

W obrazie mielinowym, otoczki włókien promieniowych wykazywały gorszą barwliwość (10 przyp.), podobne zmiany oraz obrazy rozpadu osłonek mielinowych obserwowano w częściach brzusznych, czasami i środkowych, spoidła wielkiego (8 przyp.) — (ryc. 15) oraz przedniej części sklepienia, w przypadkach z makroskopowo już widocznym zwężeniem spoidła, we włóknach poprzecznych mostu, w osi zawojów listeczków mózdzku głębiej położonych oraz w sposób rozsiany około-naczyniowo. Ponadto spłowienie mieliny obserwowano w obrębie isto-



Ryc. 11. Podoponowa glejoza brzeżna. Kanzler-Arendt. Pow. 100 X.

Fig. 11. Submeningeal marginal gliosis. Kanzler-Arendt. X 100.



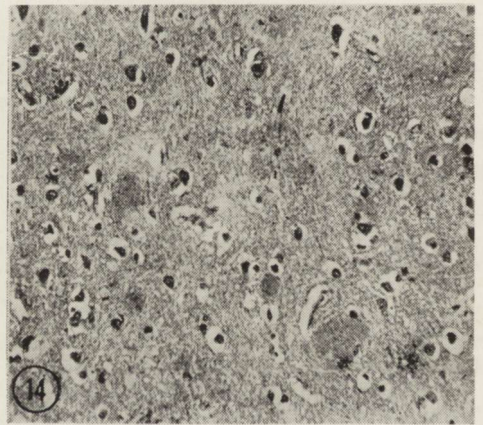
Ryc. 12. Wysepkowate zblednięcie i ubytki komórek nerwowych w korze amonalnej. Fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

Fig. 12. Focal pallor and loss of neurons in amnion cortex. Cresyl violet. X 200.



Ryc. 13. Ubytek komórek Purkinje, znaczne przerzedzenie komórek warstwy ziarnistej mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 200 X.

Fig. 13. Purkinje cells loss. Marked rarefaction of cerebellar granular layer. Cresyl violet. X 200.

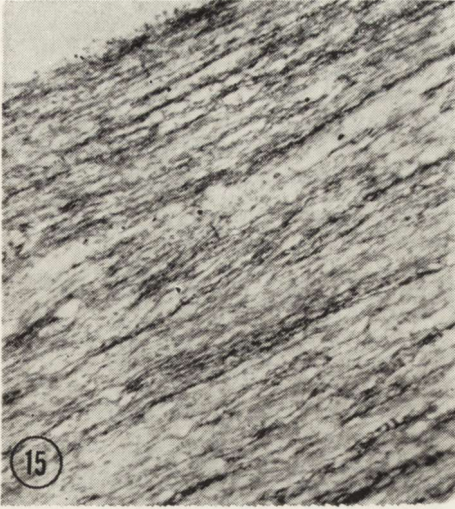


Ryc. 14. Płytki starcze najczęściej amorficzne w jądrze migdałowatym. Bielschowsky. Pow. 200 X.

Fig. 14. Senile plaques, mostly amorphous, in amygdaloid nucleus. Bielschowsky. X 200.

ty białej płata skroniowego — głównie formacji amonalnej, we wnęce oliwki dolnej i jądra zębatego.

Wykładnikiem makroskopowego zaniku mózgu były kłębki naczyniowe (ryc. 16). Stwierdzono je w 17 przypadkach w największej ilo-



Ryc. 15. Deformacja i rozpad osłonek mielinowych w spoidle wielkim. Spielmeyer. Pow. 200 \times .

Fig. 15. Deformation and degradation of myelin sheaths in corpus callosum. Spielmeyer. 200 \times .

ści w obrębie kory amonalnej i czołowej. W pojedynczych przypadkach obecne były w pniu mózgu.

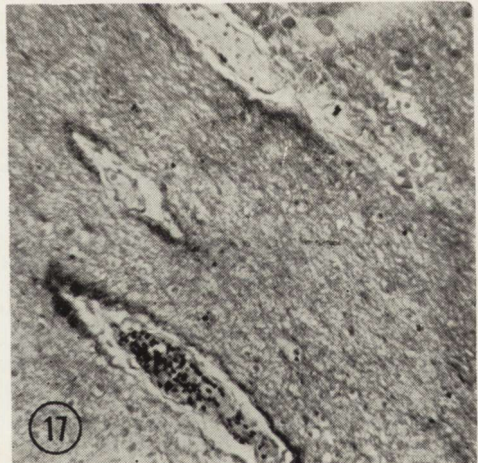
W okolicach przykomorowych, zwłaszcza w otoczeniu rogu skroniowego, spostrzegano ciała amyloidowe występujące w zmiennym nasileniu.

Naczynia śródmiąższowe tylko w pojedynczych przypadkach wykazywały cechy stwardnienia. Nie obserwowano jednak pełnego zeszkli-



Ryc. 16. Kłębki naczyniowe w korze czołowej. Van Gieson. Pow. 400 \times .

Fig. 16. Vascular glomeruli within frontal cortex. Van Gieson. \times 400.



Ryc. 17. Wzmocniona glejoza okołonaczyniowa. Kanzler-Arendt. Pow. 200 \times .

Fig. 17. Enhanced perivascular gliosis. Kanzler-Arendt. \times 200.

wienia ściany naczyniowej. W korze występowały liczne zwłókniałe drobne tętniczki i włosniczki. Wokół naczyń częsta była wzmożona glejoza brzeżna (ryc. 17).

W przypadku rozpoznanej klinicznie psychozy Wernickego, obok typowego dla tej choroby nasilenia zmian w międzymózgowiu, w formacjach amonalnych i pniu mózgu, obserwowano w tych strukturach nacieki zapalne okołonaczyniowe. Ze względu na rzadkość spostrzeganych zmian przypadek będzie przedmiotem odrębnego doniesienia kazuistycznego.

OMÓWIENIE

Jak wynika z przytoczonych danych, tylko u 8 chorych okres abstynencji alkoholowej mógł się, w naszym materiale, przyczynić do wystąpienia psychozy. Löken (1971), powołując się na Himwicha (1951), przypisuje wystąpienie ostrego majaczenia alkoholowego w okresie abstynencji tym obszarom mózgu, które się już do jego toksycznego działania zaadaptowały, nie precyzuje jednak lokalizacji zaburzeń.

Ocena zmian mikroskopowych naszego materiału pozwala na wyodrębnienie kilku zespołów uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego.

Pierwszy zespół uszkodzenia tkanki, to obrazy centralnej chromatolizy komórek nerwowych, ostrego obrzęku i schorzenia ciężkiego Nissla-Spielmeyera, obserwowanego w zmiennym nasileniu w poszczególnych przypadkach, głównie w otoczeniu komory III, w jądrach wegetatywnych podwzgórza, ciałach suteczkatych oraz w istocie szarej nakrywki śródmózgowia i mostu, w mniejszym nasileniu w opuszce i w korze amonalnej. Zmianom tym towarzyszy żywy rozplem makrogleju i przerost mikrogleju. Zespół zmian mógłby odpowiadać nagłemu załamaniu metabolizmu komórki nerwowej pod wpływem intoksykacji, opisywanemu przez Spielmeyera (1922), Sterna (1939) i innych zarówno w ostrych majaczeniach alkoholowych, jak i w chorobie Wernickego (Aleksander 1940; Meyer 1963 i inni).

Drugi zespół zmian, to uszkodzenie układu naczyniowego; zastój w całym systemie naczyniowym ośrodkowego układu nerwowego, uszkodzenie ściany naczyniowej, wzmożona jej przepuszczalność (jeziorka włóknika, krwinkotoki i drobne krwotoczki) sugerujące zaburzenia funkcjonowania bariery naczyniowo-mózgowej. Obserwuje się w tych przypadkach pewną akcentację zmian w otoczeniu komory III, wodociągu mózgu, komory IV, w korze amonalnej oraz w ciałach suteczkatych. Patogeneza zmian nie jest łatwa do wyjaśnienia. Podkreśla się bądź pierwotne uszkodzenie komórek śródbłonna naczyń (Scholz 1949; Löken 1971), bądź też wypadanie funkcji sterującej jąder

wegetatywnych wzgórze i podwzgórze szczególnie wrażliwych na niedobór tiaminy (Pentschew 1958, Meyer 1963 i inni). Zmiany zwyrodnieniowe mięszu nerek i wątroby, obserwowane m.in. w poszczególnych przypadkach, mogły również przyczynić się do uszkodzenia ścian naczyń w mózgowiu. Dowodem na przewlekłe zakłócenia w funkcjonowaniu bariery naczyniowo-mózgowej w naszym materiale mogą być: wzmożona okołonaczyniowa glejoza włóknista, lokalizacja zgąbceń w korze mózgu i rozkład ubytków komórek Purkiniego i neuronów warstwy ziarnistej kory mózdzku, jak również zachowanie się osłonek mielinowych w osi zawojów mózdzku i w pobliżu naczyń.

Przytoczona w naszym materiale topografia szczególnego nasilenia zmian komórkowych ostrej intoksykacji, jak i zachowanie się układu naczyniowego w tych strukturach (w otoczeniu komory III, wodociągu mózgu, komory IV, ciałach suteczkowatych i w formacji amonalnej) może przemawiać na korzyść poglądu Hubera (1954), traktującego ostre majaczenie alkoholowe jako pierwszy etap psychozy Wernickego. Można by zresztą zagadnienie odwrócić przyjmując stanowisko Meyera (1963) twierdzącego, że u podłoża ostrego majaczenia alkoholowego leżą tylko odwracalne zakłócenia biochemiczne i te przypadki ostrego majaczenia alkoholowego, w których istnieją zmiany strukturalne, typowe dla psychozy Wernickego ale słabiej wyrażone, potraktować jako wczesne fazy szybko przebiegającej psychozy Wernickego. Jednakże ani wiek chorych, ani zespół objawów klinicznych nie zezwala na obecnym etapie badań na taki pogląd. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia leży być może w zakresie cytochemii.

Trzeci zespół zmian wydaje się być związany z przewlekłym zakłóceniem metabolizmu komórki nerwowej spowodowanym długotrwałym działaniem alkoholu i/lub jego produktów przemiany oraz niedoborem odżywczym, prowadzącymi do zagłady komórki. Wyrazem tego są wybitne stłuszczenia komórek nerwowych, zmiany deformacyjne włókienek nerwowych odpowiadające zmianom alzheimerowskim, schorzenie przewlekłe, schorzenie ziarniste Spielmeyera jako wstępna, odwracalna faza schorzenia ciężkiego, ubytki komórek nerwowych, zwężenie spoidła wielkiego i sklepienia, obecność płytek starczych, a więc zespół uszkodzeń typowych dla starzenia się układu nerwowego. Zwłaszcza na niską średnią wieku naszych chorych (41 lat), musimy opierając się na danych z piśmiennictwa (Simchowicz 1913; v. Braunmühl 1957 i inni) uznać starzenie za przedwczesne. Proces zanikowy jest szczególnie zaakcentowany w ugrupowaniach jądra migdałowatego, w korze amonalnej, w korze zakrętu obręczy, w ciałach suteczkowatych, a więc w całym układzie limbicznym. Układ ten, jak wiadomo z piśmiennictwa (Uhle 1951; Penfield i Milner 1958; Störning i wsp. 1962),

ma szczególne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania pamięci. Uszkodzenie tego zespołu ośrodków, uchwytnie morfologicznie, znalazło w naszym materiale również odbicie kliniczne. We wszystkich przypadkach stwierdzono mniej lub bardziej nasilony zespół psychoorganiczny oraz u pojedynczych chorych głębokie otępienie. Należy podkreślić, że zmiany ubytkowe komórek oraz zgąbczenia korowe występowały zwłaszcza w tych przypadkach, w których powtarzały się w przebiegu klinicznym ostre majaczenia alkoholowe. W tych też przypadkach (7) zespół psychoorganiczny był wybitniejszy.

Reasumując należy podkreślić, że w obrazie morfologicznym ostrego majaczenia alkoholowego występują obrazy schorzenia komórek nerwowych typowe dla zespołu ostrej intoksykacji oraz uszkodzenie bariery naczyniowo-mózgowej o lokalizacji typowej dla psychozy Wernickego, przy czym nasilenie tych zmian jest mniejsze w ostrym majaczeniu alkoholowym. Zmiany te rozwijają się na podłożu przedwczesnej inwolucji ze szczególnym zaakcentowaniem zmian w układzie limbicznym.

WNIOSKI

Wykładnikiem morfologicznym ostrego zespołu intoksykacyjnego jest centralna chromatoliza komórki nerwowej, „ostry obrzęk” i schorzenie ciężkie Nissla-Spielmeiera oraz uszkodzenie bariery naczyniowo-mózgowej.

Podłożem anatomicznym toczących się ostro zmian są struktury w otoczeniu komory III, wodociągu mózgu, komory IV, ciała suteczki oraz formacje amonalne.

Ostre majaczenie alkoholowe rozwija się na podłożu chronicznego, rozlanego uszkodzenia bariery naczyniowo-mózgowej oraz przedwczesnej inwolucji tkanki nerwowej szczególnie nasilonej w układzie limbicznym wywołanych przewlekłym nadużywaniem alkoholu.

Э. Тарновска-Дзидушко

ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СУБСТРАТА БЕЛОЙ ГОРЯЧКИ

Резюме

Задачей работы была подробная оценка структуры и топографии морфологических изменений в случаях острой смертельной белой горячки.

Материал охватывал 20 секционных случаев больных в возрасте до 52 года жизни, злоупотребляющих хронически алкоголем (в среднем 16,3 года), у которых в течение навыка имела место один или несколько раз острая белая горячка — первая или последняя, ведущая к смерти длящаяся от 3 до 12 дней. У всех

больных обнаруживалась алкогольная характеропатия с психоорганическим синдромом.

В секционном исследовании чаще всего (13 случаев) имело место ожирение и цирроз печени, дегенеративные изменения сердечной мышцы и аплазия мозга.

Микроскопическое исследование мозга проводилось методом больших срезов со всех репрезентативных районов с особым учетом промежуточного мозга. Это исследование позволило выделить несколько типов повреждений центральной нервной системы.

Первый тип повреждений ткани — это острый интоксикационный синдром, проявляющийся центральным гемолизом нервной клетки, „острым отеком” и тяжелым заболеванием Ниссля-Шпильмаера.

Второй синдром изменений — это повреждение сосудистой системы, высшей степени стаз всей сосудистой системы с усиленной проницаемостью сосудистой стенки. Топография спонгиозов в мозговой коре, дефектов клеток Пуркиньи и зернистого слоя в мозжечке, как и поведение краевого периваскулярного глеиоза указывает на хроническое повреждение сосудисто-мозгового барьера.

Третий синдром изменений, как кажется, связан с нарушенным метаболизмом нервной клетки, вызванным хроническим действием алкоголя и/или продуктов его метаболических превращений и трофическим недостатком, и является типичным для старения центральной нервной системы, с особо выраженными изменениями в лимбической системе. Большое выражение инволюционных изменений наблюдалось в случаях с повторяющейся белой горячкой.

Морфологическим субстратом остро протекающих изменений являются образования вблизи III желудочка, водопровода мозга, IV желудочка, мамиллярных телец и амональных телец.

Как топография так и структура остро развивающихся изменений, как клеточных так и в стенке сосудов, может рассматриваться в качестве основания для предположения, на актуальном этапе исследования, что белая горячка является вступительной фазой психоза Вернике.

E. Tarnowska-Dziduszko

STUDIES ON THE MORPHOLOGICAL BASIS OF ACUTE DELIRIUM TREMENS

Summary

The aim of the work was to evaluate in detail the structure and topography of morphological changes in cases of acute delirium tremens.

The material comprised 20 autopsy cases of patients up to 52 years of age, who had abused alcohol chronically (in average for 16.3 years) and manifested once or several times acute delirium tremens — the first or the last one, which led to death, lasted from 3 to 12 days. Alcohol characteropathy with psychoorganic syndrome was observed in all patients.

Autopsy most frequently revealed liver steatosis and cirrhosis, degenerative changes in heart muscle and brain atrophy (13 cases). Microscopic examination was performed on large slices of all representative regions, with a special consideration of diencephalon. The examination allowed to distinguish a number of syndromes of CNS impairment:

— Acute intoxication syndrome manifested by central chromatolysis of nerve cell, „acute swelling” and severe Nissl-Spielmeyer disease.

— Impairment of vascular system, with stasis throughout and increased permeability of vascular wall. The topography of spongy degeneration in cerebral cortex, loss of Purkinje cells and in cerebellar granular layer as well as marginal perivascular gliosis, all are indicative of chronic impairment of the blood-brain barrier.

— The third syndrome seemed to be related to disturbed metabolism of nerve cell caused by chronic action of alcohol and/or its metabolites and by undernutrition and is typical of aging of CNS. The syndrome is particularly pronounced in the limbic system. The involutionary changes were more advanced in cases with repeated acute delirium tremens.

The morphological basis of the acute changes includes structures around the IIIrd ventricle, cerebral aqueduct, IVth ventricle, mamillary bodies and ammonal formations.

Both the topography and structure of acute cellular and vessel wall changes allow at this stage of investigations to consider acute delirium tremens as an initial phase of Wernicke's psychosis.

PIŚMIENICTWO

1. Aleksander L.: Wernicke's disease. *Am. J. Path.* 1940, 16, 61—72.
2. Bilikiewicz T.: *Psychiatria kliniczna*. PZWL, Warszawa 1960, 402—404.
3. Braunmühl v. A.: Alterserkrankungen des Zentralnervensystems. W: *Hdb. der spez. path. Anatomie und Histologie*. Henke, Lubarsch, J. Springer Berlin 1957, 13/IA, 337—539.
4. Colmant H. J.: Encephalopathien bei chronischem Alkoholismus. *Forum der Alkoholiker. Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1928, 102, 122—129.
5. Courville C. B.: *Effects of alcohol on the nervous system of man*. San Lucas Press, Los Angeles 1955.
6. Gamper E.: Zur Frage der Polioencephalitis haemorrhagica der chronischen Alkoholiker. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1928, 102, 122—129.
7. Himwich E. H.: *Alcoholism. Basic Aspects and Treatment*. Am. Assoc. Advanc. Sci. Washington 1957, 47 (cyt. za Lökenem).
8. Huber G.: Zur pathologischen Anatomie des Delirium tremens. *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 1954, 192, 356—368.
9. Isbell et al.: An experimental study into the etiology of „rum fits” and delirium tremens. *Quart. J. Stud. Alcohol* 1955 (cyt. za Whitwellem).
10. Jellinek E. M.: *The disease concept of alcoholism*. Hillhouse Press, New Haven 1960.
11. Liss L.: Histopathology of the mamillary bodies in alcoholic psychosis. *Neurology*, 1958, 8, 832—838.
12. Löken A. Ch.: *Ethyl alcohol. W: Pathology of the nervous system*. J. Minckler, Mc Graw-Hill, New York 1971, 2, 1671—1678.
13. Meyer A.: *Nutritional deficiencies and disorders*. W: *Greenfield's Neuropathology*, Ed. E. Arnold, London 1963, 288—302.
14. Neubürger K. T.: Über Hirnveränderungen bei Alkoholmissbrauch. *Ztsch. Ges. Neurol. Psychiat.* 1931, 135, 159—209.
15. Neubürger K. T.: The changing neuropathologic picture of chronic alcoholism. *A.M.A. Arch. Path.*, 1957, 63, 1—6.
16. Nielsen et al.: *Acta Psych. Scand. Suppl.* 1963, 187 (cyt. za Whitwellem).

17. Okhuma T.: Zur pathologischen Anatomie des chronischen Alkoholismus. Ztsch. Ges. Neurol. Psychiat. 1930, 12, 94—128.
18. Penfield W., Milner B.: Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) 1958, 79, 475—497.
19. Pentschew A.: Aethylalkohol Vergiftung. W: Hdb. der spez. path. Anatomie und Histologie. Henke, Lubarsch. J. Springer Berlin 1958, 13 (2b), 2214—2261.
20. Scheid W., Huhn A.: Zur Klinik und Therapie des Alkoholdelirs. Dtsch. Med. Wschr. 1958, 83, 2193—2199.
21. Scholz W.: Histologische und topische Veränderungen und Vulnerabilitätsverhältnisse im menschlichen Gehirn bei Sauerstoffmangel, Ödem und plasmatischen Infiltrationen. Arch. Psychiat. Z. Neurol. 1949, 181, 621—650.
22. Seitelberger F., Gross H.: Zur Neuropathologie des Alkoholismus. W. Arbeitstagung über Alkoholismus. Wien, 1962, 12—30.
23. Simchowicz T.: Badania nad anatomią patologiczną otępienia starczego. Pam. W-wskiego Tow. Lek. 1913, 109, 16—96, 240—287.
24. Spielmeyer W.: Histopathologie des Nervensystems. J. Springer. Berlin 1922.
25. Stern K.: Severe dementia associated with bilateral symmetrical degeneration of the thalamus. Brain 1939, 62, 157—171.
26. Störing G. E., Hauss K., Uhle G.: Zur topischen Diagnostik des amnestischen Symptomen Komplexes. Psychiat. Neurol. Basel 1962, 143, 161—177.
27. Uhle G.: Korsakov-Psychose nach doppelseitiger Ammonshornzerstörung mit transneuronaler Degeneration der Corpora mamillaria. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1951, 165, 446—456.
28. Wichert F., Dreszer R.: Histopatologia ośrodkowego układu nerwowego w alkoholizmie. Rocznik Psychiatryczny, 1931, 16, 51—64.
29. Whitwell F. D.: A study into the etiology of delirium tremens. Brit. J. Addict. 1975, 70, 156—161.
30. Zahnd G.: Über die Hirnbefunde bei Delirium tremens. Mschr. Psychiat. Neurol. 1953, 125, 103—125.

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

OCENA KSIĄŻKI

Pineal Tumors. Ed. H. H. Schmidek. Masson Publishing USA Inc. New York, Paris, Barcelona, Milan (Abacus Press Limited. Abacus House, Tunbridge Wells), 1977. str. 138. Ryc. 50.

Prezentowana czytelnikowi monografia, wydana pod redakcją H. H. Schmideka, profesora neurochirurgii w Hahnemann Medical College w Filadelfii, stanowi pierwszą pozycję z zaplanowanej serii pod zbiorczym tytułem „Cancer Management” redagowanej przez L. W. Brady’ego i V. T. de Vita Jr. Książka składa się z 7 rozdziałów poświęconych kolejno: patologii guzów okolicy szyszynki (U. De Girolami), ich symptomatologii neuro-okulistycznej i neurologicznej (S. H. Wray), towarzyszącym im zaburzeniom wewnątrzwydzielniczym (L. Axelrod), diagnostyce neuroradiologicznej (Ch. B. Grossman, C. F. Gonzalez), postępowanie chirurgicznemu w przypadkach guzów okolicy szyszynki (H. H. Schmidek) oraz znaczeniu napromieniowania w ich terapii (L. W. Brady). Odrębny rozdział dotyczy zagadnienia tzw. ektopowych szyszyniaków (H. H. Schmidek). Szczegółowe omówienie problematyki biologii, symptomatologii klinicznej, diagnostyki oraz leczenia guzów okolicy szyszynki zawarte w poszczególnych rozdziałach, poprzedzone jest syntetycznym wprowadzeniem przygotowanym przez dr R. J. Wurmana.

Już sama prezentacja treści książki, odzwierciedlona tytułami jej rozdziałów wskazuje na wszechstronność ujęcia zagadnienia oraz na jej adresatów. Monografia przeznaczona jest zarówno dla klinicystów-neurologów, neurochirurgów, onkologów jak i dla neuroradiologów, neuropatologów i neuroendokrynologów. Autorzy kolejnych rozdziałów monografii przedstawiają krytyczny przegląd stanu wiedzy w zakresie zagadnień stanowiących ich przedmiot, uzupełniony własnymi doświadczeniami, wskazują na luki w poznaniu poszczególnych zagadnień oraz na kierunki dalszych badań.

W rozdziale poświęconym patologii guzów okolicy szyszynki szczególnie cenna jest jasna i jednoznaczna klasyfikacja oraz omówienie stosunku nowotworów wywodzących się z elementów mięszkowych szyszynki do atypowych potworkińców w ujęciu D. Russell i L. Rubinsteina. To samo dotyczy rozdziału poświęconego tzw. szyszyniakom ektopowym. Rozdział dotyczy symptomatologii klinicznej guzów, obok jej bardzo szczegółowego omówienia, zawiera bardzo cenną część poświęconą neuroanatomicznemu oraz patofizjologicznemu podłożu dominujących w zespole klinicznym guzów objawów ocznych. W tym zakresie dr S. H. Wray daje bardzo szeroki przegląd wyników doświadczeń prowadzonych na prymatach. Istotnym walorem rozdziału poświęconego zaburzeniom wewnątrzwydzielniczym występującym u chorych z guzami okolicy szyszynki i tzw. szyszyniakami ektopowymi jest zwrócenie uwagi na bardzo szeroki wachlarz zespołów endokrynologicznych, związanych przede wszystkim z uciskiem bądź naciekaniem struktur podwzgórzowych. Znaczna część rozdziału poświęcona jest patogenezie hypergonadyzmu, znajdującego swój wyraz w przedwczesnym dojrzewaniu płciowym oraz znacznie rzadziej występującego zespołu hypogonadyzmu. Wiele uwagi zwrócono na fizjologię szyszynki u kręgowców, a przede wszystkim u ssaków i prawdopodobną funkcję melatoniny, jej syntezę i mechanizmy regulujące jej uwalnianie. Rozdział dotyczący diagnostyki neuroradiologicznej zarówno guzów zlokalizowanych w okolicy szyszynki jak i tzw. szyszyniaków ektopowych poza konwencjonalnymi metodami diagnostycznymi takimi jak rentgenografia przeglądowa, wentrykulografia, arteriografia i kontrastowa mielografia wykonywana w poszukiwaniu odległych ognisk rozsiewu płynowego, uwzględnia również zróżnicowane metody skaningowe i tomograficzne. W rozdziałach poświęconych leczeniu guzów, ich autorzy — wybitny neurochirurg i onkolog przedstawiają krytyczny przegląd stosowanych metod chirurgicznych i radioterapeutycznych.

Istotną zaletą książki jest jej nowoczesność, syntetyczność i wszechstronność ujęcia zagadnienia, a także oparcie się autorów na bardzo bogatym piśmiennictwie, obejmującym zarówno pozycje klasyczne jak i najbardziej współczesne oraz własnym bogatym doświadczeniu. Treść monografii wzbogaca bardzo obfity materiał ilustracyjny oraz własna lub zaczerpnięta z piśmiennictwa dokumentacja kazuistyczna.

Bardzo pożyteczna książka. Z tym większą niecierpliwością należy oczekiwać na dalsze pozycje z serii Cancer Management.

Prof. dr hab. M. J. Mossakowski

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, IRMINA B. ZELMAN, TADEUSZ MAJDECKI

RABIES ENCEPHALITIS WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ULTRASTRUCTURE OF NEGRI BODY

Department of Neuropathology, Medical Research Centre
Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland
Head of the Department: Prof. dr M. J. Mossakowski

Pathomorphology of rabies encephalitis has been extensively elaborated. It consists of diffuse inflammatory process, including hematogenic and microglial elements with a characteristic, but not pathognomonic distribution within central nervous system, degenerative changes of neurons and neuronal loss and cytoplasmic inclusion bodies, bearing the names of Negri bodies and lyssa bodies. Non-specific nature of both inflammatory and degenerative processes caused that uptill introduction of immunological and virological diagnostic tests, Negri bodies had been considered as the major pathognomonic indication of rabies infection, although their occurrence was limited to 70 per cent of cases (Dupont, Earle, 1965).

Longlasting discussion concerning the nature of Negri bodies, their relationship with intracellular virus replication as well as identity or distinct character of Negri and lyssa bodies was forejudged by electron microscopic studies on both experimental and human material (Matsumoto, 1962, 1963; Roots, Schultze, 1963; Miyamoto, Matsumoto, 1965; Garcia-Tamayo et al., 1972; De Brito et al., 1973; Joo To Sung et al., 1976).

What inclined us to present our own case were some peculiarities of its clinical and neuropathological picture as well as different ultrastructural appearance of the cytoplasmic inclusion bodies.

CASE REPORT

The case concerned 13 year old country boy, who was entirely healthy, except head injury, which had happened several months prior to the beginning of his final disease. Head trauma had no immediate

clinical consequences. Two months before hospitalization the boy was scratched by a fox. Animal was killed, but not examined. No attention was paid to this accident.

The disease started with fever, headaches, abdominal and back pains and aches of the left hip joint. This was followed by psychomotor excitation and difficulties in drinking. The patient was admitted to the hospital on the fourth day of the disease. Neurological examination revealed nystagmus, anisocoria, and paresis of the left lower extremity with decreased deep tendon reflexes and hypesthesia. Due to worsening general condition, extensive salivation and difficulties in breathing the boy was transferred to the University Pediatric Clinic in Warsaw where he was put on artificial respiration. The patient was stuporous, irritated and showed only very superficial contact with personnel. There was flaccid paralysis of the left inferior extremity, bowel and bladder disturbances, difficulties in deglutition and extensive salivation, requiring constant suction. No meningeal symptoms were present. CSF examination revealed 0.16 mg% of protein and cytositis 11/1 ml. Eeg showed no focal abnormality, although the basic bioelectric activity was very low. Ocular fundi were normal. Due to the presence of the right-sided skull fracture and appearance of left sided neurological symptoms, bilateral drill hole exploration was performed. Right-sided hydrocephalus was found and 100 ml of yellowish fluid were evacuated. Despite that the boy was downgoing. Due to the information concerning the accident of fox bite the possibility of rabies infection was taken into consideration. Fluorescent antibody test of the brain tissue samples taken through the trepanation hole showed a strongly positive reaction. The boy died in deep coma and areflexia, with bradycardia and hypothermia on the 20th day of his illness.

General autopsy findings were irrelevant, except bilateral pneumonia. Brain autopsy revealed features of edema and generalized hyperemia.

Light microscopy of the central nervous system showed moderate mostly lymphocytic infiltration of leptomeninges, being most intense in the vicinity of small pial vessels. Within the brain tissue rich perivascular infiltrations, composed mostly of lymphocytes with some admixture of plasma cells were present in all gray and white structures (Fig. 1). The intensity of perivascular infiltration ranged from single layer of hematogenous cells, to thick multilayer cuffs. In most instances perivascular accumulation of lymphocytes was surrounded by perivascular microglial proliferation (Fig. 2). Diffuse spread of perivascular microglial proliferation was a common feature. In many areas diffuse microglial proliferation, with numerous rod-cells involved a great pro-

portion of a given gray structure. Numerous microglial nodules, laying either on the background of otherwise unchanged tissue or diffuse microglial proliferation were seen (Fig. 3). The intensity of inflammatory process showed remarkable regional differences. In the cerebral cortex frontal, insular and occipital areas were most severely involved. Among subcortical structures thalamus was most affected. In the brain stem substantia nigra, locus coeruleus and inferior olives were the sites of intense inflammatory process (Fig. 4). The gray matter of the spinal cord was also severely involved.

The inflammatory process was accompanied by profuse non-specific degeneration of neurons and neuronal loss. They were present in the cerebral cortex, mostly in frontal temporal and occipital areas. Intense lesions of melanin-bearing neurons were worth noting (Fig. 5). There was an almost total loss of Purkinje cells, accompanied by diffuse proliferations of Bergmann's glia (Fig. 6). The spinal cord gray matter was characterized by great loss of motoneurons, with numerous neurophagic nodules (Fig. 7). Dorsal root ganglia showed both perivascular and diffuse lymphocytic infiltration, loss of ganglion cells and nodular proliferation of amphicytes (Fig. 8). Spinal roots and peripheral nerves showed lymphocytic infiltration of varying intensity.

Great number of nerve cells in all parts of the central nervous system contained in their cytoplasm small, homogenous, eosinophilic inclusions (Fig. 9). Inclusions, as a rule, did not show any internal structure, although in some of them fine basophilic granules could be noticed. The number of inclusions varied; most often they were single, however, in some neurons they occurred as multiple structures (Fig. 10). They were located in various portions of the cytoplasm, including axonal and dendritic conuses. They were most numerous in bipyramidal cells of Ammon's horn, in numerous cells of inferior olives and dorsal root ganglia. The second in range as far as their frequency is concerned, were cortical neurons, those of globus pallidus, lenticular nucleus and tegmental nuclei of the brain stem. They were rare in thalamus and pontine nuclei.

The electron microscopic studies were performed on tissue samples taken either from paraffin blocks, prepared for EM examination according to Morecki and Becker techniques (1968) or from formalin fixed material. Due to formalin fixation and preceding embedding in paraffin the fine structure of tissue was severely damaged. Therefore the only element studied were intracytoplasmic inclusions.

On the ultrastructural level the intracytoplasmic inclusions varied a great deal in shape and size. Most of them were round or oval. They

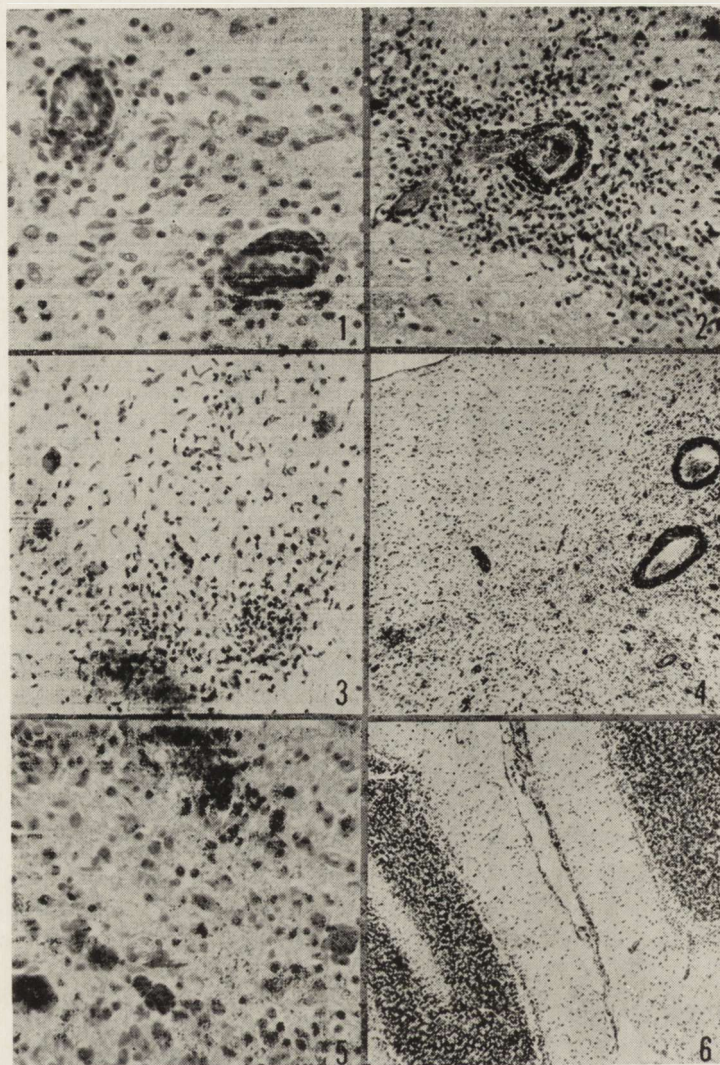


Fig. 1. Perivascular lymphocytic infiltration in the area of diffuse proliferation of microglia. Midbrain. Cresyl violet. $\times 400$.

Ryc. 1. Okołonaczyniowe nacieki limfocytarne w obszarze rozlanego rozplemu mikrogleju. Śródmózgowie. Fiolet krezyłu. Pow. $400\times$.

Fig. 2. Lymphocytic-microglial perivascular infiltration in basal pons. H-E. $\times 200$.

Ryc. 2. Limfocyтарно-микроглевой naciek okołonaczyniowy w podstawnej części mostu. H-E. Pow. $200\times$.

Fig. 3. Microglial nodules in the inferior olive. Cresyl violet. $\times 200$.

Ryc. 3. Grudki mikroglejowe w oliwie dolnej. Fiolet krezyłu. Pow. $200\times$.

Fig. 4. Massive inflammatory process involving locus coeruleus. Cresyl violet. $\times 60$.

Ryc. 4. Masywne zmiany zapalne w jądrze miejsca sinawego mostu. Fiolet krezyłu. Pow. $60\times$.

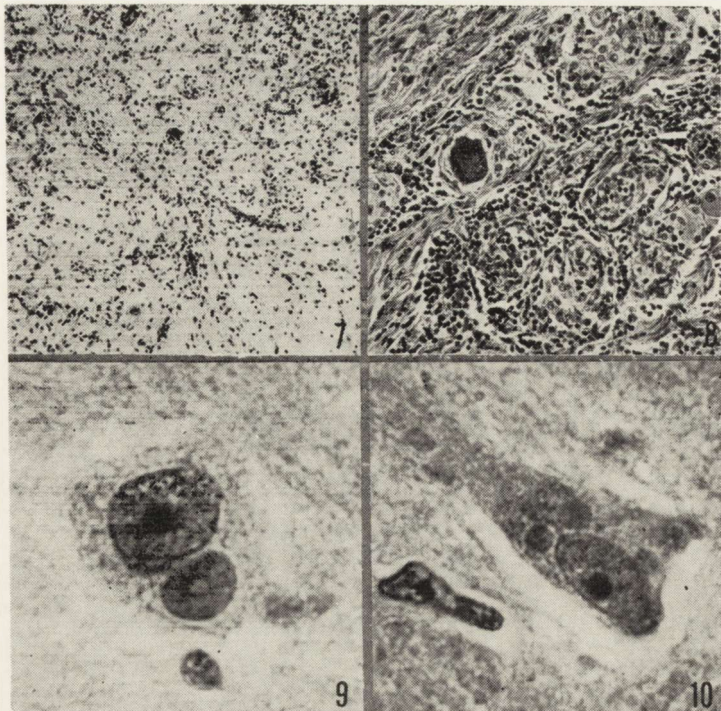


Fig. 7. Diffuse inflammatory process involving anterior horn of the cervical spinal cord. Neuronal loss and neurophagic nodules. Cresyl violet. $\times 100$.

Ryc. 7. Rozległe zmiany zapalne w rogu przednim rdzenia kręgowego. Ubytek komórek ruchowych, grudki neurofagiczne. Fiolet krezyłu. Pow. $100 \times$.

Fig. 8. Dorsal root ganglion — neuronal loss with nodular proliferation of amphicytes, degeneration of the remaining neurons and interstitial lymphocytic infiltration. H-E. $\times 200$.

Ryc. 8. Ubytek komórek nerwowych z grudkowym rozplemem amficytów, zwyrodnienie zachowanych neuronów oraz śródmiąższowe nacieki limfocytarne w zwoju międzykręgowym. H-E. Pow. $200 \times$.

Fig. 9. Negri body in the cytoplasm of Ammon's horn neuron. H-E. $\times 1000$.

Ryc. 9. Ciało Negriego w cytoplazmie komórki piramidowej rogu Amona. H-E. Pow. $1.000 \times$

Fig. 10. Several eosinophilic inclusions in the cytoplasm of Ammon's horn neuron. H-E. $\times 900$.

Ryc. 10. Kilka kwasochłonnych ciał wtępowych w cytoplazmie komórki nerwowej rogu Amona. H-E. Pow. $900 \times$.

Fig. 5. Loose melanine deposits in locus coeruleus. H-E. $\times 400$.

Ryc. 5. Luźno położone ziarna melaniny w jądrze miejsca sinawego mostu. H-E. Pow. $400 \times$.

Fig. 6. Loss of Purkinje cells with proliferation of Bergmann's glia. Slight lymphocytic infiltration in leptomeninges. Cresyl violet. $\times 60$.

Ryc. 6. Zanik komórek Purkinjego oraz towarzyszący rozplem gleju Bergmanna. Dyskretny nacieki zapalny w oponach. Fiolet krezyłu. Pow. $60 \times$.

were not membrane bound. All of them had a similar fine structure. They consisted of matrix of a moderate electron density and coarse granules of a higher density (Fig. 11). The distribution of granular osmophilic material was either equal throughout the whole inclusion body, or showed areas of a greater condensation. In some instances they were densely packed on the inclusion periphery, in others their accumulation was greater in the central part. In another group, central portion of the inclusion body was rarefied, leading to its annular appearance (Fig. 12). In no case we were able to find features of virus replications within inclusion bodies. Neither we found the places of virus replication outside the inclusions as described by Morecki and Zimmerman (1969). In some cells we were able to notice single profiles, which with all reservations could be reminiscent of virion structures. However, due to their rarity and poor preservation of the ultrastructural organization, we do not feel authorized to comment on this phenomenon. The other feature had attracted our attention. This was the relationship of the inclusion bodies with neuronal nuclei (Fig. 13). In great number of instances inclusion bodies, as seen in electron microscopy, were located in the direct vicinity of the neuronal nuclei. In some cases nuclear membrane seemed to be discontinuous at the site adjacent to the inclusion (Fig. 14).

DISCUSSION

From the clinical point of view our case is characterized by a relatively long clinical course, lasting 19 days. Similar or even longer disease duration was observed by Dupont and Earle (1965) in those cases in which during the incubation period full antirabies vaccination was given. In our case vaccination was not applied due to neglect of fox bite accident. The second distinguishing element of our case is the presence of posttraumatic hydroma which complicated the clinical picture.

Both these factors could influence the neuropathology of the case, characterized by extensive cortical degenerative changes and neuronal loss, almost total disappearance of Purkinje cells, extensiveness of inflammatory process and neuronal cytoplasmic inclusion bodies.

Homogenously eosinophilic cytoplasmic inclusion bodies, could be classified in their great majority as lyssa bodies. Only small proportion of them contained, difficult of visualize, minute basophilic granules typical for actual Negri bodies. However, it is worth to mention that Matsumoto (1970), Leech (1971) and Joo Ho Sung et al. (1976) on the ground of electron microscope studies consider Negri bodies and lyssa

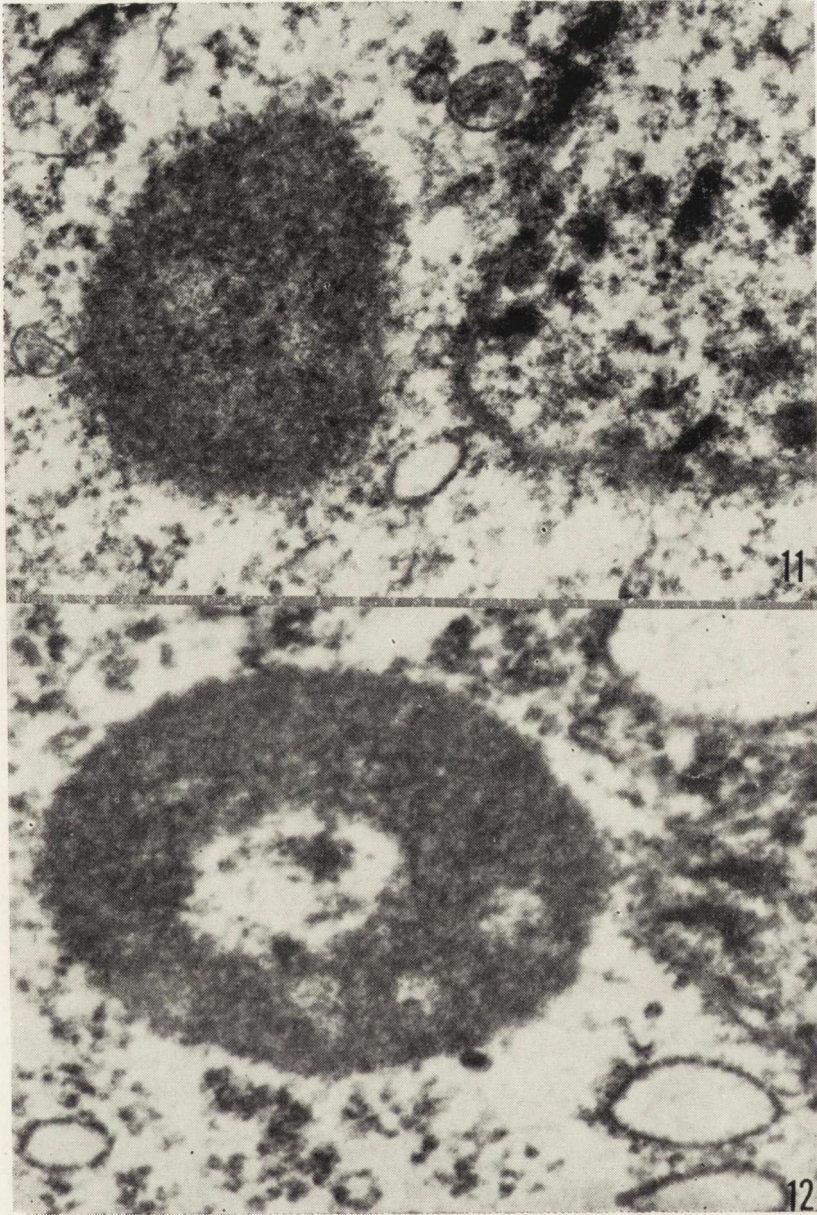


Fig. 11. Intracytoplasmic inclusion body with an equal distribution of osmophilic granular material. $\times 9.000$.

Ryc. 11. Śródplazmatyczne ciało wtrętowe o równomiernym rozkładzie materiału osmofilnego. Pow. $9.000 \times$.

Fig. 12. Intracytoplasmic inclusion body with a large central rarefaction of its structure. $\times 16.000$.

Ryc. 12. Śródplazmatyczne ciało wtrętowe z rozległym centralnym rozrzedzeniem materiału osmofilnego. Pow. $16.000 \times$.

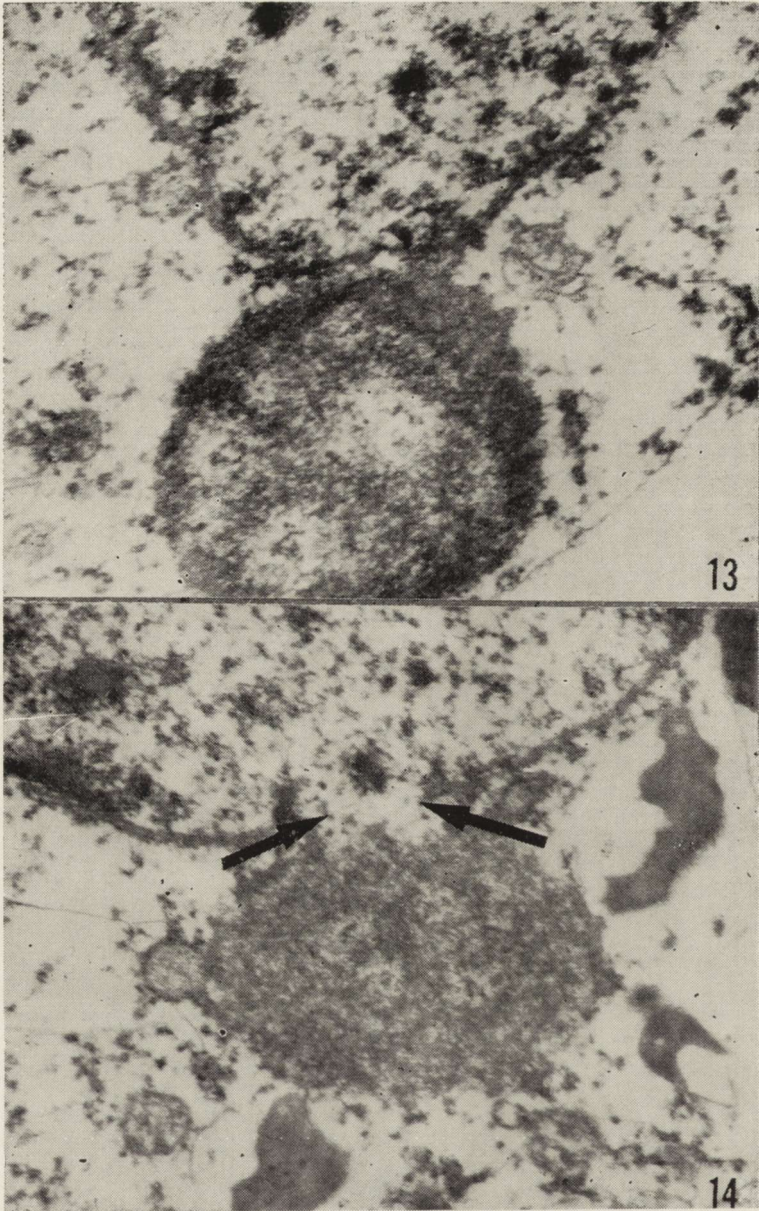


Fig. 13. Perinuclear localization of inclusion body with unequal distribution of granular osmophilic material. $\times 7.000$.

Ryc. 13. Okołojądrowe położenie ciała wtrętowego z nierównomiernym rozkładem ziarnistego materiału osmofilnego. Pow. 7.000 \times .

Fig. 14. Nuclear membrane disrupted (arrows) in the immediate vicinity of the neighbouring intracytoplasmic inclusion body. $\times 5.000$.

Ryc. 14. Uszkodzenie otoczki jądrowej (strzałki) w bezpośrednim sąsiedztwie ciała wtrętowego. Pow. 5.000 \times .

bodies as principally identical structures, the only difference consisting in the amount of viral particles. The structure responsible for the presence of cytoplasmic inclusions according to Matsumoto (1970) is fibrillary matrix, being the site of virus replication. Typical Negri body is composed of matrix aggregations within neuronal cytoplasm, on the background of which there occur typical buller-shaped virions and/or tubular structures opened on both ends toward the matrix (Miyamoto, Matsumoto, 1965; Garcia-Tamayo et al., 1972; De Brito et al., 1973; Joo Ho Sung et al., 1976). In addition, Leech (1971) described within the structure of Negri body, filamentous rod-like and microtubule-like profiles, which he considered to correspond to viral nucleoprotein, analogues to that found by Hummler et al. (1968) in their virological study.

Structures found in our case distinguish from those described above by their inner structure and lack of viral particles. They are identical in their nature with the structures observed in experimental material by Hottle et al. (1951) and Lépine and Croissant (1951) as well as in human case by Morecki and Zimmerman (1969). They are also similar, except the lack of evident viral particles, to those presented by Leech (1970). It is worth of being noted, that in all those cases, the material for electron microscope studies was originally fixed in formalin and in the majority of instances embedded in paraffin. Therefore it would seem acceptable to consider structures found in our case as Negri or lyssa bodies, altered due to improper fixation and processing. Such an interpretation is weakened by simultaneous occurrence of structures identical with ours with typical matrix aggregations containing viral particles found in the case of Morecki and Zimmerman (1969). Moreover, the authors insisted that only the former structures correspond to Negri bodies seen in the light microscope, the latter being not visualized. They support their view point by emphasizing the lack of Negri bodies in experimental animals infected with fixed strain of virus.

In the light of these discrepancies the question arises as to the nature of structures seen in our case. They were found (similar as in a case of Morecki and Zimmerman, 1969) in a case with immunologically confirmed rabies infection, and with no doubt they correspond to cytoplasmic inclusions, seen in the light microscope. Several possibilities are to be taken into consideration. They may represent structures entirely independent of Negri and lyssa bodies, they can correspond to lyssa bodies being different in nature from Negri bodies, or finally they may be considered as altered Negri bodies due to improper fixation and processing. The latter possibility seems to be supported by their general similarity to the structures described by Leech (1971), as accurate ultra-

structure of virions in his material is difficult for interpretation. The possibility that they represent a certain stage in Negri body evolution cannot be excluded. This concept finds its support in a prolonged disease duration in our case, as compared with all those human cases in which fine structure of inclusions was identical with that observed in experimental animals.

M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, T. Majdecki

PRZYPADEK WŚCIEKLIZNY. OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY
CIAŁEK NEGRIEGO

Streszczenie

Przedstawiono przypadek wścieklizny, rozpoznanej przyżyciowo na podstawie badań immunopatologicznych i wirusologicznych biopsyjnego materiału mózgowego.

Przypadek wyróżniał się 20-dniowym przebiegiem klinicznym, a w obrazie patomorfologicznym rozległością procesu zapalnego obejmującego praktycznie wszystkie struktury ośrodkowego układu nerwowego, zwoje międzykręgowce i nerwy obwodowe. Cechą znamioną przypadku była niezwykle obfitość pojedynczych i mnogich ciał wtętotowych, występujących w neuronach kory mózgu, pnia mózgowego, rdzenia kręgowego i zwojów międzykręgowych. Ciała te na podstawie cech histologicznych uznano za typowe ciała Negriego i ciała wścieklizny.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym składały się one z macierzy o umiarkowanej gęstości elektronowoptycznej i gęstych ziarnistości osmofilnych. Ciała te nie miały błony otaczającej, a ich strukturę wewnętrzną charakteryzowało znaczne zróżnicowanie rozkładu ziarnistego materiału osmofilnego, prowadzące niekiedy do występowania struktur obrączkowatych. Zwracał uwagę ścisły kontakt ciał wtętotowych z jądrami komórkowymi. Zarówno w obrębie ciał wtętotowych jak i poza nimi nie spostrzegano obecności wirionów.

М. Я. Моссаковский, И. Б. Зельман, Т. Майдецкий

СЛУЧАЙ БЕШЕНСТВА.
ЭЛЕКТРОН-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ТЕЛЕЦ НЕГРИ

Резюме

Представлен случай бешенства, установленный прижизненно на основании иммунопатологических и вирусологических исследований биопсийного материала мозга.

Случай отличался 20-дневным клиническим течением, а в патоморфологическом плане — обширностью воспалительного процесса охватывающего практически все структуры центральной нервной системы, межпозвоночные ганглии и периферические нервы. Характерным свойством случая было необычайное изобилие отдельных и многочисленных включений, находящихся в нейронах коры мозга, ствола мозга, спинного мозга и межпозвоночных ганглиев. Эти

тельца, на основании гистологических свойств, оказались типичными тельцами Негри и тельцами бешенства.

В электрон-микроскопической картине они представляли матрикс с умеренной электрон-оптической плотностью и густой осмофильной грануляцией. Эти тельца не содержали окружающей оболочки, а их внутренняя структура характеризовалась значительной дифференциацией распределения зернистого осмофильного материала, ведущей иногда к образованию перстневидных структур. Обращал внимание плотный контакт телец включений с клеточными ядрами. Как в составе телец включений так и вне их не наблюдали наличия вирионов.

REFERENCES

1. Brito de T., de Fatima Aranjó M., Tiriba A.: Ultrastructure of the Negri body in human rabies. *J. Neurobiol. Sci.* 1973, 20, 363—372.
2. Dupont C. J. R., Earle K. M.: Human rabies encephalitis. A Study of forty-nine fatal cases with a review of the literature. *Neurology (Minn.)* 1965, 15, 1023—1034.
3. Garcia-Tamayo J., Avila-Mayor A., Anzola-Perez E.: Rabies virus neuronitis in humans. *Arch. Path.* 1972, 94, 11—15.
4. Hottle G. A., Morgan C., Peers J. H., Wyckoff R. W. G.: The electron microscopy of rabies inclusion (Negri) bodies. *Proc. Soc. Exp. Med.* 1951, 77, 721—723.
5. Hummler K., Tomassini M., Sokol F.: Morphological studies on the nucleoprotein component of rabies virus. *J. Virol.* 1968, 2, 1191—1195.
6. Joo Ho Sung, Hayano M., Mastri A. R., Akagaki T.: A case of human rabies and ultrastructure of the Negri body. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1976, 35, 541—559.
7. Leech R. W.: Electron microscopic study of the inclusion body in human rabies. *Neurology (Minn.)* 1971, 21, 91—94.
8. Lépine P., Croissant O.: Microscopie électronique des corps de Negri dans la rage des rues. *Ann. Inst. Pasteur* 1951, 81, 1—8.
9. Matsumoto S.: Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology* 1962, 17, 198—202.
10. Matsumoto S.: Electron microscopic studies of rabies virus in mouse brain. *J. Cell Biol.* 1963, 19, 565—592.
11. Matsumoto S.: Rabies virus. In: *Advances in Virus Research*. Ed. K. M. Smith, M. A. Lauffer, F. B. Bang, Academic Press, New York 1970, 16, 257—301.
12. Miyamoto K., Matsumoto S.: The nature of the Negri body. *J. Cell Biol.* 1965, 27, 677—682.
13. Morecki R., Becker N.: Human herpes virus infection. Its fine structure identification in paraffin-embedded tissue. *Arch. Path.* 1968, 86, 292—296.
14. Morecki R., Zimmerman H. M.: Human rabies encephalitis. Fine structure study of cytoplasmic inclusions. *Arch. Neurol.* 1969, 20, 599—604.
15. Roots E., Schultze I. M.: Neuere elektronenmikroskopische Befunde an Gehirn nach Infection mit Tollwutvirus. *Zbl. Bact. Parasitenk. Infektionskrh. Hyg.* 1963, 188, 159—173.

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

TADEUSZ MAJDECKI

UTRASTRUKTURA CIAŁ WTRĘTOWYCH W GANGLIOZYDOZACH I CEROIDOLIPOFUSCYNOSIE

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Gangliozydozy i ceroidolipofuscynoza należą do metabolicznych chorób OUN. Charakteryzują się one genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem przemiany lipidów, które prowadzi do ich nieprawidłowego gromadzenia się w komórkach nerwowych. Wspólny dla obydwu zespołów chorobowych proces spichrzenia lipidów sprawił, że do połowy lat sześćdziesiątych bieżącego stulecia gangliozydozy i ceroidolipofuscynoza były uważane za różne zespoły i postaci rodzinnej idiocji amaurotycznej. Dopiero badania biochemiczne pochodzące z lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych pozwoliły na wyodrębnienie gangliozydoz i ceroidolipofuscynozy.

W zależności od rodzaju spichrzanego gangliozydu wyróżnia się gangliozydozy G_{M2} i G_{M1} , z których pierwsza uwarunkowana jest niedoborem aktywności heksozaminidazy A, druga zaś beta-galaktozydazy. W ceroidolipofuscynozie w spichrzanym materiale zidentyfikowano ceroid i lipofuscynę, nie wykazano natomiast zmian w zawartości i składzie lipidów OUN. Przyczyna i patomechanizm odkładania lipopigmentu są nie wyjaśnione. Wspólnym wykładnikiem patomorfologicznym dla gangliozydoz i ceroidolipofuscynozy jest występowanie w cytoplazmie komórek OUN ciał wtrętowych charakteryzujących się znacznym różnicowaniem ultrastruktury.

Pomimo istotnego znaczenia diagnostycznego badań biochemicznych, w poznaniu patogenyzy neuropatologii podstawowe znaczenie ma badanie mikroskopowo-elektronowe. Szereg zaś zagadnień o istotnej wartości praktycznej i poznawczej pozostał nadal nie wyjaśniony.

Celem pracy była ocena przydatności diagnostycznej mikroskopowo-elektronowego badania kory mózgu w przypadkach gangliozydoz i ce-

roidolipofuscynozy, próba wyodrębnienia istotnych cech ultrastrukturalnych dla ich przyżyciowego różnicowania oraz określenie wartości tego badania dla oceny zaawansowania procesu chorobowego. Poza tym wytyczono sobie za cel określenie udziału elementów pozaneuronalnych OUN w procesie spichrzania i określenie morfogenezy wtrętów cytoplazmatycznych w komórkach mózgu w przypadkach gangliozydoz i ceroidolipofuscynozy.

MATERIAŁ I METODY

Biopsyjny materiał ludzki: Do badań wykorzystano pobrane przyżyciowo drogą biopsji wycinki kory mózgu w 17 przypadkach dzieci, u których rozpoznano genetycznie uwarunkowaną chorobę metaboliczną OUN. Na podstawie obrazu klinicznego, wyników badań biochemicznych i rutynowego badania neuropatologicznego rozpoznano w 7 przypadkach gangliozydozę G_{M2} , w 3 przypadkach gangliozydozę G_{M1} oraz w 7 przypadkach ceroidolipofuscynozę.

Materiał doświadczalny: Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, którym przez okres 6 miesięcy podawano Arechin (*chloroquinum diphosphoricum*), po czym z mózgu zwierząt doświadczalnych pobierano bloki tkankowe do badania w mikroskopie elektronowym.

Materiał do badań mikroskopowo-elektronowych, tak biopsyjny u ludzi, jak i doświadczalny, przeprowadzano i barwiono w sposób rutynowy. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JAM 7A.

WYNIKI

Biopsyjny materiał ludzki

W przypadkach gangliozydozy G_{M2} i G_{M1} charakterystyczną cechą cytoplazmy komórek nerwowych było występowanie licznych, regularnych, okrągłych lub owalnych ciał wtrętowych wypełnionych strukturami błoniastymi i gęstym elektronowo materiałem drobnoziarnistym. Wyróżniono następujące rodzaje ciał wtrętowych: typ I — wtręty okrągłe zbudowane z koncentrycznie ułożonych struktur błoniastych, otoczone miejscami widoczną pojedynczą błoną. Poszczególne blaszki tych wtrętów składały się z błon elementarnych; typ IA — rzadziej występujące owalne wtręty wypełnione strukturami błoniastymi o układzie błon zbliżonym do prostoliniowego; IB — wtręty mieszane, zawierające równocześnie struktury błoniaste o przebiegu okrężnym lub prostoliniowym; typ IC — wtręty zawierające oprócz struktur błoniastych jednorodny materiał drobnoziarnisty; typ II — wtręty o cechach typ-

wych ciał gęstych, najczęściej umiejscowione na obwodzie dużych skupisk cytoplazmatycznych ciał wtrętowych.

W wypustkach nerwowych obserwowano niekiedy wtręty ze strukturami błoniastymi o okrężnym lub prostoliniowym przebiegu. Takie same ciała wtrętowe sporadycznie występowały w synapsach. W astrocytach obserwowano wtręty najczęściej wypełnione strukturami pęcherzykowymi, czasem zawierały one chaotycznie rozłożone struktury błoniaste lub o układzie zbliżonym do okrężnego lub prostoliniowego. Rzadziej występowały ciała lipofuscynopodobne i typowe ciała gęste. W cytoplazmie komórek śródbłonka i pericytów naczyń włosowatych obserwowano ciała lipofuscynopodobne, ciała zawierające struktury pęcherzykowe i błoniaste o okrężnym lub prostoliniowym układzie.

Ustalono, że w przypadkach gangliozydozy G_{M2} i G_{M1} stałym i najliczniejszym typem ciał wtrętowych w cytoplazmie komórek nerwowych, niezależnie od czasu trwania procesu chorobowego, są błoniaste ciała cytoplazmatyczne o okrężnym układzie błon. Wtręty z materiałem mieszanym i z prostoliniowym układem błon oraz wtręty w wypustkach komórek nerwowych i w synapsach występowały częściej w przypadkach starszych dzieci, z dłuższym przebiegiem choroby. U tych pacjentów liczniej występowały również wtręty w cytoplazmie astrocytów, komórek śródbłonka i pericytów naczyń włosowatych.

W przypadkach ceroidolipofuscynozy znamioną cechą cytoplazmy komórek nerwowych była obecność licznych, wielopostaciowych, różnej wielkości wtrętów cytoplazmatycznych. Na podstawie cech ultrastrukturalnych wyróżniono następujące typy wtrętów: 1) wtręty skrzętnolinijne zbudowane ze splecionej sieci błon; 2) wtręty zawierające delikatne struktury błoniaste tworzące obraz linii papilarnych; 3) wtręty zawierające materiał drobnoziarnisty lub jednorodny gęsty elektronowo.

We wszystkich wymienionych powyżej wtrętach, otoczonych miejscami widoczną pojedynczą błoną, obserwowano różnie liczne wodniczki wypełnione jednorodnym materiałem o małej gęstości elektronicznej. W odróżnieniu od gangliozydoz, w których wszystkie rodzaje charakterystycznych dla nich ciał wtrętowych występowały w każdym przypadku, w ceroidolipofuscynozie poszczególne przypadki charakteryzowała obecność jednego, dwóch, a bardzo rzadko trzech rodzajów wtrętów nagromadzonych w cytoplazmie komórek nerwowych.

W niektórych przypadkach ceroidolipofuscynozy obserwowano ponadto błoniaste ciała cytoplazmatyczne o okrężnym lub prostoliniowym układzie błon, podobne do występujących w gangliozydozach. Obserwowano je zawsze pojedynczo, wśród wtrętów typowych dla ceroido-

lipofuscynozy. Dodatkowy rodzaj wtrętów reprezentowały typowe ciała gęste.

W wypustkach komórek nerwowych ciała wtrętowe obecne były w przypadkach ceroidolipofuscynozy bardzo rzadko, znacznie rzadziej niż w przypadkach gangliozydoz. Charakteryzowało je podobieństwo do wtrętów występujących w perikariach neurocytów. W synapsach nie obserwowano wtrętów.

Wtręty w cytoplazmie astrocytów w przypadkach ceroidolipofuscynozy zawierały materiał o obrazie mikroskopowo-elektronowym podobnym do występującego we wtrętach cytoplazmy neurocytów, tak samo jak w cytoplazmie komórek śródbłonka i pericytów naczyń włosowatych. Przeważał wśród nich materiał lipofuscynopodobny.

Materiał doświadczalny

Charakterystyczną cechą doświadczalnej fosfolipidozy było występowanie wtrętów w cytoplazmie komórek nerwowych. Były to różnokształtne, zazwyczaj okrągłe twory z jednorodną, drobnoziarnistą macierzą, bardzo często zawierające zmienną ilość pojedynczych lub zgrupowanych struktur błoniastych zbudowanych z błon elementarnych. Wtręty zawierające struktury błoniaste o okrężnym układzie przypominały błoniaste ciała cytoplazmatyczne występujące w przypadkach gangliozydoz. Rzadko obserwowano wtręty lipofuscynopodobne.

Skupiska materiału błoniastego o układzie zbliżonym do prostoliniowego spotykano sporadycznie w zbiornikach siatki śródplazmatycznej, natomiast znacznie częściej leżał on wolno w cytoplazmie komórki nerwowej. W wypustkach nerwowych ani w synapsach nie stwierdzono obecności wtrętów.

Astrocyty często wykazywały cechy obrzmienia i rzadko zawierały materiał lipofuscynopodobny. Materiał taki sporadycznie obserwowano w cytoplazmie komórek śródbłonka i pericytów naczyń włosowatych.

OMÓWIENIE

Analiza ultrastruktury złogów występujących w cytoplazmie komórek kory mózgu w dwu różnych typach chorób spichrzeniowych OUN wykazała pełną odrębność obrazu mikroskopowo-elektronowego gangliozydoz i ceroidolipofuscynozy, pozwalającą na diagnostyczne różnicowanie obydwu procesów. Przypadki gangliozydozy G_{M2} i G_{M1} różniące się od siebie zarówno rodzajem spichrzanego gangliozydu jak i enzymem niedoborowym mają zasadniczo podobny obraz mikroskopowo-elektronowy.

Obydwa rodzaje gangliozydów charakteryzują się znaczną jednorodnością ultrastruktury ciał wtrętowych w neuronach i znaczną różnorodnością wtrętów astrocytarnych. Natomiast dla ceroidolipofuscynozy znamieną jest różnorodność ultrastrukturalnych ciał wtrętowych występujących w komórkach nerwowych i glejowych kory mózgu.

Wiodącą cechą ultrastrukturalną przypadków gangliozydów było występowanie w cytoplazmie wtrętów zbudowanych z okrężnych struktur błoniastych. Twory te tym różnią się od ciał reszkowych opisanych przez De Duve'go (1963), że w przeważającej większości zawierają struktury zbudowane z błon elementarnych o regularnym układzie. Podczas gdy w ciałach reszkowych zawarty jest materiał różnorodny pod względem chemicznym i morfologicznym, to w błoniastych ciałach cytoplazmatycznych dominuje gangliozyd, który jako jednorodna substancja lipidowa ma charakterystyczną postać wieloblaszkową. Fakt, że budowa taka odpowiada gangliozydom wykazał *in vitro* Samuels i wsp. (1964). Gromadzenie się w lizosomach substancji chemicznych w formie niestrawionej uwarunkowane jest niedoborem określonego enzymu hydrolitycznego.

Prześledzenie różnych postaci wtrętów występujących w komórkach nerwowych w przypadkach gangliozydów pozwoliło na określenie morfogenezy błoniastych ciał cytoplazmatycznych. W stadiach początkowych są to twory otoczone pojedynczą błoną, wypełnione materiałem drobnoziarnistym. Stopniowo ich macierz wypełniają struktury błoniaste nawarstwiający się od obwodu wtrętu. Taki tok tworzenia się błoniastych ciał cytoplazmatycznych potwierdza centralne położenie ziarnistego „jądra” oraz okrężny układ błon, które we wtrętach z nielicznymi strukturami błoniastymi są najczęściej umiejscowione na obwodzie. Podobny tok tworzenia się błoniastych wtrętów cytoplazmatycznych wykazano w doświadczalnej fosfolipidozie wywołanej dwufosforanem chlorochinoliny.

Przyjmując lizosomalny rodowód błoniastych wtrętów cytoplazmatycznych należy oczekiwać pierwotnego gromadzenia się lipidu w siatce śródplazmatycznej i w aparacie Golgiego. W materiale własnym sporadycznie tylko stwierdzano w bliskim sąsiedztwie strefy Golgiego rozszerzone zbiorniki otoczone pojedynczą błoną cytoplazmatyczną zawierające delikatne struktury błoniaste z cechami spichrzanego materiału. Brak innych związków między spichrzanym materiałem i siatką śródplazmatyczną można wiązać z faktem, że wszystkie przypadki znajdowały się w zaawansowanym okresie procesu patologicznego. W doświadczalnej fosfolipidozie u szczurów, która może stanowić model wczesnego stadium procesu spichrzanania lipidów również tylko wyjątkowo obserwowano materiał błoniasty o układzie zbliżonym do prostoli-

nijnego, otoczony odcinkowo błoną cytoplazmatyczną. Wobec sporadycznie spotykanych cech morfologicznych mogących wskazywać na wczesne gromadzenie się złogów w zbiornikach siatki śródplazmatycznej nie można uznać tej drogi tworzenia się wtrętów za jedyną. Przemawiają za tym obserwacje wskazujące na znacznie częstsze gromadzenie się spichrzanego materiału w postaci wolno leżącej w cytoplazmie komórki, przemawiające za powstawaniem w tych miejscach ciał wtrętowych *de novo*.

Poza wspólnymi cechami w przypadkach gangliozydoz zaobserwowano różnice dotyczące przede wszystkim ilości poszczególnych typów wtrętów cytoplazmatycznych w komórkach kory mózgu. Stwierdzono, że mniej dynamiczny przebieg procesu patologicznego wyrażający się dłuższym przeżyciem chorego znajduje wykładnik morfologiczny w częstszym występowaniu „niedojrzałych” wtrętów cytoplazmatycznych zawierających oprócz struktur błoniastych materiał drobnoziarnisty. Niedojrzałe wtręty przeważały także w doświadczalnej fosfolipidozie, charakteryzującej się również małą dynamiką procesu patologicznego.

Stosunkowo mała liczba ciał wtrętowych w wypustkach i wręcz znikoma w synapsach w porównaniu z ich obfitością w cytoplazmie neurocytów sugeruje, że są one „transportowane” z okolic perikarialnych. Nagromadzenie ciał wtrętowych w wypustkach komórek nerwowych w przypadkach gangliozydozy G_{M2} zwiększało się wraz z wiekiem chorych i czasem trwania procesu patologicznego, stanowiąc wykładnik zaawansowania tego ostatniego.

W przypadkach gangliozydoz mimo podobieństw ultrastrukturalnych niektórych wtrętów cytoplazmy astrocytów i neurocytów w zdecydowanej większości różniły się one między sobą. Porównanie ultrastruktury spichrzanego materiału w cytoplazmie neurocytów i komórek glejowych sugeruje, że wtręty cytoplazmatyczne astrocytów stanowią sfagocytowany materiał pochodzący z komórek nerwowych. Wskazuje na to między innymi największe nagromadzenie ciał wtrętowych w tzw. astrocytach satelitarnych jak również fakt, że ilość wtrętów w astrocytach jest zawsze mniejsza niż w cytoplazmie komórek nerwowych. Podstawowym elementem wskazującym na odrębność mechanizmu gromadzenia się wtrętów w astrocytach i neurocytach jest ich odmienna ultrastruktura. Cechą charakterystyczną, właściwą tylko glejowym ciałom wtrętowym w gangliozydozach, była ich tendencja do łączenia się ze sobą w większe konglomeraty oraz występowanie złogów lipofuscynopodobnych.

Ultrastruktura i wyniki biochemicznych badań wtrętów cytoplazmatycznych astrocytarnych wskazują na ich lizosomalny rodowód. Wydaje się, że układ lizosomalny astrocytów spełnia w sposób pośredni

wspomagającą rolę w procesie rozkładu gangliozydów nagromadzonych w cytoplazmie komórek nerwowych z niewydolnym układem enzymatycznym lizosomów. Wykładnikiem wtórnej czynności trawiennej komórek glejowych może być obecność w ich wtrętach materiału z resztkami struktur błoniastych.

Materiał lipofuscynopodobny w astrocytach częściej obserwowano w przypadkach o bardziej dynamicznym przebiegu choroby. Jego obecność prawdopodobnie nie ma bezpośredniego związku z pierwotnym zaburzeniem metabolizmu, ale jest morfologicznym wyrazem wyrodnienia komórki. Odnosi się to również do ciał wtrętowych w cytoplazmie komórek śródbłonna i pericytów naczyń włosowatych.

Przypadki ceroidolipofuscynozy charakteryzowało występowanie neuronalnych wielopostaciowych ciał wtrętowych, zawierających materiał o zróżnicowanej budowie ultrastrukturalnej. Obserwowano w tym samym przypadku, w pojedynczej komórce nerwowej, a nawet we wtręcie różne typy złogów. Przemawia to za brakiem swoistości mikroskopowo-elektronowych cech spichrzanego materiału dla poszczególnych przypadków ceroidolipofuscynozy, jak również za morfologicznym, a prawdopodobnie również morfogenetycznym, pokrewieństwem wtrętów neuronalnych w ceroidolipofuscynozie.

Niezależnie od różnic ultrastrukturalnych, we wszystkich wtrętach występowały, w różnym stopniu zaznaczone, wspólne cechy. Wszystkie ciała wtrętowe były otoczone pojedynczą błoną, często zawierały „kropki tłuszczu”, a macierz wtrętów wypełniał materiał gęsty elektronowo, jednorodny, ziarnisty lub błoniasty. Wymienione cechy wskazują na morfologiczny związek wtrętów z ceroidem lub lipofuscyną i równocześnie przemawiają za ich lizosomalnym pochodzeniem. Potwierdzają to badania Siakotosa (1972), który ujawnił obecność hydrolaz lizosomalnych w wyizolowanych wtrętach w przypadkach ceroidolipofuscynozy. Obraz mikroskopowo-elektronowy wtrętów w przypadkach ceroidolipofuscynozy sugeruje, że powstają one w następstwie łączenia się ze sobą typowych ciał gęstych. Ten rodzaj morfogenezy decyduje o jednej z podstawowych cech ultrastrukturalnych, różniących wtręty neuronalne w ceroidolipofuscynozie od błoniastych ciał cytoplazmatycznych występujących w gangliozydozach.

Porównanie ultrastruktury materiału spichrzanego w poszczególnych przypadkach ceroidolipofuscynozy pozwala wątpić w istnienie ścisłych zależności między cechami mikroskopowo-elektronowymi wtrętów i klinicznym przebiegiem choroby. O zróżnicowaniu ultrastruktury wtrętów w ceroidolipofuscynozie może decydować szereg czynników związanych z typem spichrzającej komórki i jej właściwościami metabolicznymi. Natomiast obecność pojedynczych wtrętów typowych dla

gangliozydoz należy uznać za zjawisko bez istotnego znaczenia diagnostycznego, za wyraz nieswoistych, wtórnych zaburzeń przemiany komórkowej.

Mechanizm gromadzenia ciał wtętotowych w wypustkach komórek nerwowych jest prawdopodobnie taki sam w ceroidolipofuscynozie i w gangliozydozach, podobnie jak pochodzenie ciał wtętotowych w gleju oraz w komórkach śródbłonna i pericytach naczyń włosowatych. Jednakże uogólniony charakter procesu patologicznego nie pozwala jednoznacznie wyłączyć możliwości, że stanowią one wyraz pierwotnie zaburzonego metabolizmu.

Obecność neuronalnych wtętotów, podobnych do błoniastych ciał cytoplazmatycznych, obserwowano u szczurów po podawaniu dwufosforanu chlorochinoliny. Ze względu na odmienny patomechanizm, doświadczalna fosfolipidoza nie jest jednak modelem gangliozydoz, ani ceroidolipofuscynozy, ale stwarza najdogodniejsze warunki dla mikroskopowo-elektronowej oceny morfogenezy wtętotów w neurolipidozach.

WNIOSKI

1. Wartość diagnostyczna mikroskopowo-elektronowego badania materiału biopsyjnego polega na możliwości zdecydowanego odróżnienia obydwu postaci neurolipidoz. Mimo możliwości wykorzystania do celów diagnostycznych łatwiej dostępnych tkanek, korzyści wynikające z badania ultrastruktury mózgu wiążą się z największym nasileniem procesu spichrzania w OUN.

a) Przypadki gangliozydozy G_{M2} i G_{M1} mają bardzo podobne cechy ultrastrukturalne i nie dają się zróżnicować wyłącznie na podstawie badania mikroskopowo-elektronowego. Występujące w tych przypadkach błoniaste ciała cytoplazmatyczne neurocytów nie są patognomiczne dla gangliozydoz. Sporadycznie mogą one występować również w ceroidolipofuscynozie, przy czym w tych przypadkach nie mają istotnego znaczenia diagnostycznego.

b) Mimo zróżnicowania ultrastruktury wtętotów w ceroidolipofuscynozie, które może wskazywać na odmienny typ zaburzeń, zawsze mają one różnie wyrażone cechy mikroskopowo-elektronowe lipofuscyny. Obecność w cytoplazmie neurocytów licznych wtętotów z materiałem skrętnoliniowym i/lub o wzorze linii papilarnych stanowi cechę decydującą o rozpoznaniu ceroidolipofuscynozy.

2. Występowanie w przypadkach gangliozydoz „niedojrzałych” form błoniastych wtętotów cytoplazmatycznych oraz obecność wtętotów w wypustkach komórek nerwowych i w synapsach stanowi wykładnik stopnia zaawansowania choroby. Natomiast w przypadkach ceroidolipofus-

cynozy cechy ultrastrukturalne wtrętów neuronalnych są niezależne od fazy procesu patologicznego.

3. Wtręty w cytoplazmie astrocytów w przypadkach gangliozydoz i ceroidolipofuscynozy uznać należy za efekt fagocytozy materiału pochodzącego z neurocytów, a nie przejaw pierwotnego zaburzenia metabolizmu komórek glejowych. Udział układu naczyniowego w procesie spichrzania w gangliozydozach polega na gromadzeniu się zewnątrz-pochodnego materiału lipidowego w cytoplazmie komórek ścian naczyń włosowatych. Takie samo jest prawdopodobnie pochodzenie złogów w komórkach śródbłónka i pericytów w przypadkach ceroidolipofuscynozy, chociaż istnieje możliwość, że stanowią one wyraz pierwotnie uogólnionego procesu chorobowego.

4. Błoniaste ciała cytoplazmatyczne w gangliozydozach powstają przez nawarstwianie się struktur błoniastych od zewnątrz ku środkowi ciała gęstego. Taka sama jest morfogeneza podobnych wtrętów w neuronach w doświadczalnej fosfolipidozie wywołanej długotrwałym podawaniem dwufosforanu chlorochinoliny. W przypadkach ceroidolipofuscynozy wtręty cytoplazmy komórek nerwowych powstają na drodze łączenia się ze sobą ciał gęstych.

145 pozycji piśmiennictwa u autora.

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniu 24 września 1978 r. w przededniu Międzynarodowego Kongresu Neuropatologicznego odbyło się w Waszyngtonie posiedzenie Rady Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologii.

Zebrani minutą ciszy uczcili pamięć zmarłej w bieżącym roku prof. Ewy Osetowskiej.

Po udzieleniu absolutorium ustępującemu Zarządowi dokonano wyboru nowych władz towarzystwa na okres 4 lat, w następującym składzie:

Prezydent	— prof. J. A. N. Corsellis (Wielka Brytania),
Vice-prezydenci	— prof. M. Finlayson (Kanada), doc. G. Gosztanyi (Węgry), (ponadto vice-prezydentami są nadal wybrani przed 2 lata prof. M. J. Mossakowski (Polska), prof. J. Moossy (USA),
Sekretarz Generalny	— prof. J. H. Adams (Wielka Brytania),
Skarbnik	— prof. J. Ulrich (Szwajcaria),
Członkowie	— prof. A. Escobar (Meksyk), prof. R. Escourolle (Francja), doc. M. Haltia (Skandynawia), prof. W. Wechsler (RFN), (ponadto członkami pozostali nadal wybrani przed 2 lata — prof. B. Bednarz (Czechosłowacja); prof. T. Yamamoto (Japonia).

Na członków Komitetu Nomenklaturowego wybrani zostali: dr K. Earle, prof. M. Mossakowski, prof. F. Steitelberger, prof. O. Stochdorph.

Na posiedzeniu ustalono, że następny Międzynarodowy Kongres Neuropatologiczny odbędzie się w Wiedniu w okresie od 5 do 10 września 1982 r.

Jako miejsce kolejnego Kongresu, którego termin przypada w r. 1986, wybrano Sztokholm.

W posiedzeniu z ramienia Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich uczestniczyli prof. M. Mossakowski i prof. J. Dymecki.

*
* *

W czasie trwania Kongresu odbyła się sesja specjalna, poświęcona przeszłości, teraźniejszości i przyszłości neuropatologii. Organizatorzy sesji, prof. J. A. N. Corsellis (Wielka Brytania) i prof. P. Sourander (Szwecja) podsumowali wyniki przeprowadzonej wcześniej wśród członków Rady, reprezentujących poszczególne państwa, ankiety na ten temat.

Uczestnicy sesji mówili o sytuacji kadrowej, metodach szkolenia, statusie prawnym neuropatologii jako specjalności oraz trudnościach w naborze nowych kadr i prowadzeniu badań neuropatologicznych w krajach, które reprezentowali. Sytuację neuropatologii w Polsce przedstawił prof. M. Mossakowski.

*
*
*

W okresie przedwakacyjnym odbyły się dwa posiedzenia Zarządu Głównego PTN.

Na posiedzeniu w dniu 27 maja 1978 omówiono sprawy organizacyjne, dotyczące Polsko-Węgierskiej Konferencji Neuropatologicznej, która ma się odbyć we wrześniu 1979 w Krakowie oraz planowanego na maj 1980 r. Polsko-Niemieckiego Sympozjum Neuropatologicznego w Berlinie.

Następnie ustalono plan pracy Zarządu w obecnej kadencji. Przewiduje on, że:

— na comiesięcznych zebraniach Stowarzyszenia przedstawiane będą prace doświadczalne oraz kliniczno-morfologiczne, a dwa razy do roku odbywać się będą sesje diagnostyczne. Konferencja ogólnokrajowa z udziałem gości zagranicznych planowana jest na rok 1981,

— kontynuowane będą starania o poprawę stanu diagnostyki neuropatologicznej w skali krajowej, tzn. o tworzenie nowych placówek neuropatologicznych, rozwój kadry, powołanie specjalisty krajowego,

— organ Stowarzyszenia „Neuropatologia Polska” powinien, zdaniem Zarządu, ukazywać się w całości w językach kongresowych. Oddany do druku z inicjatywy Stowarzyszenia pierwszy polski podręcznik neuropatologii wypełni dotkliwą lukę w dziedzinie dydaktyki neuropatologicznej,

— rozszerzana będzie współpraca naukowa z Międzynarodowym Towarzystwem Neuropatologii oraz systematycznie rozwijane będą formy współpracy bilateralnej z różnymi towarzystwami krajowymi, głównie w formie wspólnych sympozjów i konferencji naukowych.

Na posiedzenie dnia 24 czerwca 1978 zaproszona została jako delegat Polskiego Towarzystwa Patologów, prof. M. Kobuszewska-Farynowa.

Tematem dyskusji był problem aktualnego statusu prawnego neuropatologii jako specjalności w Polsce, którego właściwe rozwiązanie stanowi istotny aspekt konkretnych działań, zmierzających do rozwoju kadry neuropatologicznej w skali krajowej. Prof. J. Dymecki przedstawił stanowisko Instytutu Psychoneurologicznego w tej kwestii stwierdzając, że w styczniu 1977 r. opracował dla Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej propozycję, która sprowadzała się do umożliwienia specjalistom I stopnia z neurologii, neurochirurgii i patomorfologii zdobycia specjalizacji neuropatologicznej po zrealizowaniu programu szkolenia w dwu odrębnych wariantach (jeden dla neurologów i neurochirurgów, drugi dla patomorfologów). Jednakże założenia tej propozycji nie zostały uwzględnione w rozesłanych przez Departament Szkolnictwa i Nauki MZiOS we wrześniu 1977 projekcie nowych zasad uzyskiwania specjalizacji.

Prof. Kobuszewska-Farynowa, omawiając wydarzenia związane z nieuznaniem przez MZiOS specjalizacji z zakresu neuropatologii kilku członków SNP pomimo zdanego przez nich w CMKP formalnego egzaminu, poparła projekt przedstawiony przez Instytut Psychoneurologiczny i zaproponowała dalsze konsultacje z Departamentem Szkolnictwa i Nauki MZiOS w celu doprowadzenia do jego akceptacji. Jej zdaniem konsultacje powinny objąć również sprawę zapewnienia warunków pracy i etatów dla neuropatologów oraz sprawę uwzględnienia w odpowiednich przepisach, stanowiska i zakresu kompetencji kierownika pracowni neuropatologicznej.

Po dyskusji Zarząd ustalił następujące wytyczne, precyzujące stanowisko Stowarzyszenia wobec problemu statusu prawnego specjalizacji z neuropatologii:

„Wobec znacznego deficytu krajowej kadry neuropatologicznej konieczne jest zniesienie administracyjnych barier, hamujących napływ młodych adeptów medycyny, pragnących poświęcić się pracy w tej specjalności, przy zachowaniu stałej troski o jakościowo wysoki poziom ich wykształcenia. Dlatego Zarząd akceptując koncepcję jednoetapowości specjalizacji neuropatologicznej postuluje, aby specjalizacja I stopnia z neurologii, neurochirurgii lub patomorfologii uwzględniana była przy zaliczaniu stażu specjalizacyjnego. Celem zapewnienia właściwego poziomu szkolenia Zarząd proponuje akceptację programu przedstawionego przez Instytut Psychoneurologiczny. Aby zapewnić prawidłową realizację programu szkolenia, Zarząd postuluje utrzymanie stanowiska kierownika specjalizacji, a ponadto proponuje powołanie specjalisty krajowego z zakresu neuropatologii ze ściśle sprecyzowanymi kompetencjami”.

Jerzy Dymecki

T R E Ś C

G. I. Mchedlishvili, L. S. Nikolaishvili, M. L. Itkis: Dalsze badania patofizjologicznych mechanizmów powstawania obrzęku mózgu w następstwie niedokrwienia	165
D. G. Baramidze: Funkcjonowanie mechanizmów mikronaczyniowych opony miękkiej w warunkach niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu	179
N. N. Melitauri, V. N. Chikvaidze: Zmiany zawartości cyklicznego 3',5'-AMP w mózgu królików w warunkach niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia)	193
R. Gadamski: Wpływ niedotlenienia hipoksyjnego i niedokrwienia na aktywność AChE w mózgu szczura i chomika mongolskiego (<i>Meriones unguiculatus</i>)	201
M. Ostenda: Badania mikroskopowo-elektronowe synaps w niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich (<i>Meriones unguiculatus</i>)	215
T. Wierzba-Bobrowicz: Wczesne zmiany strukturalne w mózgu szczura w ostrym doświadczalnym niedokrwieniu	225
D. Maślińska, M. Dąbmska, S. Maśliński: Przechodzenie dichlorfosu przez łożysko królika	237
Z. Kraśnicka, B. Gajkowska: Wpływ dichlorfosu (DDVP) na tkankę nerwową hodowaną <i>in vitro</i> . (Badania w mikroskopie świetlnym i elektro-nowym)	243
S. Krajewski: Badania immunomorfologiczne ośrodkowego układu nerwowego w przewlekłej chorobie posurowiczej u królików	257
H. Weinrauder, S. Krajewski: Immunofluorescencyjna lokalizacja narządowo-swoistych antygenów w mózgu przy użyciu surowic homo- i heterologicznych	273
W. Hilgier, M. J. Mossakowski: Aktywność l-glutamino-amidohydrolazy w mózgu szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	287
E. Tarnowska-Dziduszek: Badania nad morfologicznym podłożem ostrego mąjaczania alkoholowego	295
M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, T. Majdecki: Przypadek wścieklizny. Obraz mikroskopowo-elektronowy ciała Negriego	311
T. Majdecki: Ultrastruktura ciał wrętowych w gangliozydozach i ceroidolipofuscynozie. Streszczenie pracy habilitacyjnej	323
J. Dymecki: Dział Kroniki i Informacji	332

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Г. И. Мchedlishvili, Л. С. Николаишвили, М. Л. Иткис: Дальнейшие исследования патофизиологических механизмов развития постисхемического отека головного мозга	165
Д. Г. Барамидзе: Функционирование пиальных микровакулярных механизмов при ишемии и последующем постисхемическом восстановлении кровоснабжения головного мозга	179
Н. Н. Мелитаури, В. Н. Чикваидзе: Изменение содержания циклической 3',5'-АМФ в головном мозгу кроликов в условиях ишемии	193
Р. Гадамски: Влияние гипоксического недостатка кислорода и недостаточного кровообращения на активность АХЭ в мозге крысы и монгольского хомяка	201
М. Остенда: Электронномикроскопические исследования синапсов в ишемии мозга у монгольских хомяков	215
Т. Вежба-Бобрович: Ранние изменения в ЦНС при экспериментальной острой гипогликемии у крысы	225
Д. Маслинска, М. Домбска, С. Маслински: Проникновение дихлорфоса через плаценту кролика	237
З. Красницка, Б. Гайковска: Влияние дихлорфоса (DDVP) на нервную ткань, культивированную <i>in vitro</i> . (Исследования в световом и электронном микроскопах)	243
С. Краевски: Иммуноморфологические исследования центральной нервной системы в хронической послесывороточной болезни у кроликов	257
Г. Вейнраудер, С. Краевски: Иммунофлуоресцентная локализация органо-специфических антигенов в мозге при использовании гомо- и гетерологических сывороток	273
В. Гильгер, М. Я. Моссаковски: Активность l-глутамин-амидогидролазы в мозге крыс в экспериментальной печеночной энцефалопатии	287
Э. Тарновска-Дзидушко: Исследования морфологического субстрата белой горячки	295
М. Я. Моссаковски, И. Б. Зельман, Т. Майдецки: Случай бешенства. Электрон-микроскопическая картина телец Негри	311
Т. Майдецки: Ультраструктура включенных телец в ганглиозидозах и в цероидолипофусцинозе. Резюме докторской диссертации	323
Е. Дымецки: Хроника и информация	332

CONTENTS

G. I. Mchedlishvili, L. S. Nikolaishvili, M. L. Itkis: Further studies on the pathophysiological mechanisms of postischemic brain edema development	165
D. G. Baramidze: Functional behavior of the pial microvascular mechanisms under conditions of cerebral ischemia and subsequent recovery of blood supply to the brain	179
N. N. Melitauri, V. N. Chikvaizde: Changes in the content of cyclic 3',5'-AMP in the brain of rabbits under circulatory hypoxia (ischemia)	193
R. Gadamski: Effect of hypoxia and ischemia on the AChE activity in rat and gerbil brain	201
M. Ostenda: Electron microscopic studies of synapses in cerebral ischemia in gerbils	215
T. Wierzba-Bobrowicz: Early cerebral changes in experimental hypoglycemia of the rat	225
D. Maślińska, M. Dąmbska, S. Maśliński: Dichlorvos penetration through rabbit placenta	237
Z. Kraśnicka, B. Gajkowska: Effect of Dichlorvos (DDVP) on nerve tissue cultured in vitro. (Studies in light and electron microscope)	243
S. Krajewski: Immunomorphologic studies on the central nervous system in chronic serum sickness in rabbits	257
H. Weinrauder, S. Krajewski: Localization of organ-specific brain antigens with homo- and heterologous antisera by immunofluorescence technique	273
W. Hilgier, M. J. Mossakowski: The l-glutamine-amidohydrolase activity in rat brain in experimental hepatic encephalopathy	287
E. Tarnowska-Dziduszko: Studies on the morphological basis of acute delirium tremens	295
M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, T. Majdecki: Rabies encephalitis with special reference to the ultrastructure of Negri body	311
T. Majdecki: Ultrastructure of inclusion bodies in gangliosidoses and ceroidlipofuscinose. Summary of the Ph. D. Thesis	323
J. Dymecki: Chronicle and Informations	332

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

półrocznie	— zł 50.—
rocznie	— zł 100.—

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

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

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

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

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, 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