

70-404

49

egz 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

A-23

TOM XVII

1979

ZESZ. 3

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XVII

LIPIEC-WRZESIEŃ

Nr 3

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (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

A. SH. TSITSISHVILI

EFFECT OF CIRCULATORY HYPOXIA (ISCHEMIA) ON THE FINE STRUCTURE OF BLOOD CAPILLARIES OF THE RABBIT CEREBRAL CORTEX *)

Laboratory of Neuromorphology, Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, U.S.S.R.

Head of the Laboratory: dr. n. sci J. K. Svanidze

At present electron microscopy has considerably extended our knowledge of structural organization and functional significance of the components of capillary wall. However, these problems have not yet been studied thoroughly, especially that of capillary permeability which plays an important role in the regulation of brain metabolism (Casley-Smith, 1969; Foroglou-Kerameos, Shakhlamov, 1971; Voitkevich, Dedov, 1972; Shea, Bossert, 1973; Mohamed, 1975).

Endothelial cells take an active part in the transcapillary transport. This is determined mainly by the motility of their surface, which morphologically manifests itself as the micropinocytic activity of endothelial cells. Though the role of micropinocytic vesicles is not yet fully understood, direct relation of micropinocytosis to permeability processes is beyond doubt according to the majority of investigators (Palade, Bruns, 1968; Shakhlamov, 1971; Karagonov, 1972; Shea, Bossert, 1973). The basement membrane and pericytes also play a certain role in the capillary permeability (Bogolepov, 1966; Karnovsky, 1967; Shakhlamov, 1971).

For the estimation of the role of endothelial cells, basement membrane and pericytes in the mechanism of transcapillary exchange, it is necessary to investigate their ultrastructure in the normal, as well as in different experimental conditions.

The present study is aimed at elucidating ultrastructural reactive changes in the cerebral capillaries of adult rabbits during a short-term deep ischemia produced by the method described by Mchedlishvili (1973).

The investigation of this problem is of great interest since most of the reported data (Bakay, Lee, 1968, 1972; McGee-Russell, et al., 1970; So-

*) Presented at the 2nd Symposium on Cerebral Ischemia, Tbilisi, September, 1-5, 1976.

botka et al., 1973; Arsenio-Nunes et al., 1973), bear on the study of ultrastructural changes in the cerebral capillaries during more prolonged hypoxia.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out with 12 unanesthetized rabbits. Ischemia in the cerebral cortex was produced by way of ligation of both carotid arteries and lowering systemic arterial pressure level to about 25—30 mm Hg, when collateral blood flow to the cerebral hemispheres through the vertebral arteries was sharply reduced*). Such a method of producing ischemia controlled in respect of depth and duration was described by Mchedlishvili (1973). Three, 7 and 15 minutes after the onset of ischemia the brain was fixed by perfusion with 2.5% solution of glutaraldehyde in a phosphate buffer at pH 7.4 through the carotid artery with the help of the arterial pressure compensator. Control and experimental rabbits were treated likewise (operation, fixation).

Small pieces from the frontal, occipital and parietal regions of the cortex were postfixed in fresh 2% osmium tetroxide in phosphate buffer for 2—3 h. The blocks were dehydrated in graded ethanol and embedded in Araldite. Fine sections of the brain were studied under electron microscope JEM 100 C.

Quantitative analysis was performed. The thickness of the endothelial cells and the basement membrane were measured and the number of pinocytotic vesicles in the cytoplasm of endothelial cells was counted. The thickness of endothelial cells and the basement membrane in every microphotograph was measured in the randomly selected regions separated from each other by about 10 μm . The means of the data were calculated. For the determination of the number of pinocytotic vesicles per 100 μm^2 section of endothelial cell, the number of pinocytotic vesicles in the endothelial cell was counted and the obtained value was divided by the area of this cell. For the determination of the area of the section of endothelial cell square lattice of lines ($d = 5 \text{ mm}$) was used (Weibel, 1969). Measurements for each experiment were made on 60 positive electron micrographs, the final magnification of which equalled to 60 000. All the quantitative data were processed statistically Arithmetic mean and mean error were obtained. Validity of the data obtained was checked by Student's t-test.

*) The experiments were carried out by M. N. Varazishvili in the Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Blood Circulation.

RESULTS AND DISCUSSION

The ultrastructure of the cerebral capillaries in the normal rabbit does not in fact differ from that of other mammals (Bogolepov, 1966; Boletti, Teoni, 1966; Lierse, 1968; Mikeladze, 1968). The capillaries of the cerebral cortex are characterized by the presence of dense endothelium, distinct basement membrane and the absence of pericapillary connective tissue. Their outer surfaces are coated with glial cell processes disposed between the capillaries and nerve cells.

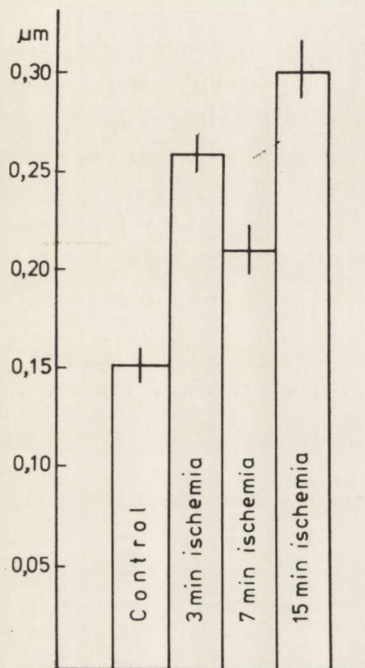


Fig. 1

Fig. 1. Mean values of thickness of endothelial cells in the control and after 3, 7 and 15 min ischemia. Ordinate: thickness of endothelial cells in μm .

Ryc. 1. Średnie wartości grubości komórek śródbłonna w kontroli oraz po 3, 7 i 15 min niedokrwienia. Oś rzędnych — grubość komórek w μm .

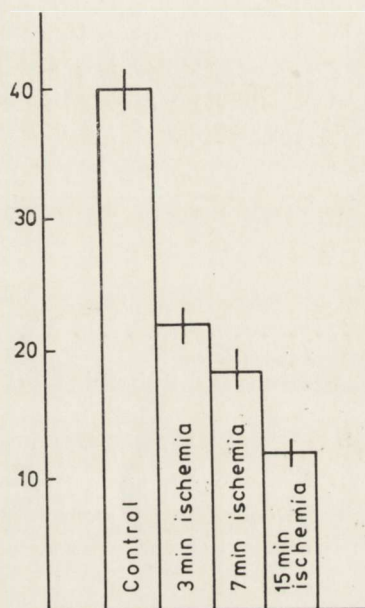


Fig. 3

Fig. 3. Mean values of the number of pinocytotic vesicles in the control and after 3, 7 and 15-min ischemia. Ordinate: the number of pinocytotic vesicles per 100 μm^2 cytoplasm.

Ryc. 3. Średnie wartości liczby pęcherzyków pinocytarnych w kontroli oraz po 3, 7 i 15 min niedokrwienia. Oś rzędnych — ilość pęcherzyków pinocytarnych w 100 μm^2 cytoplazmy.

The endothelial layer is formed by flattened adjacent cells, connected by desmosomes. The mean value of thickness of endothelial cells of the control rabbits equals to $1.50 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 1). The sur-

face of the endothelial cells facing the lumen of the capillary commonly has uneven contours and forms cytoplasmic filaments of various sizes. The surface facing the basal membrane is almost smooth. In the cytoplasm of endothelial cells, the Golgi complex, granular and smooth endoplasmic reticulum, mitochondria and ribosomes are observed (Fig. 2). Pinocytotic vesicles which are the most characteristic submicroscopic component of the cytoplasm of endothelial cells are encountered almost everywhere in the cytoplasm. The number of pinocytotic vesicles per $100 \mu\text{m}^2$ of the cytoplasm of endothelial cells in the control rabbits equals to 41 ± 1.6 ($p \leq 0.001$) (Fig. 3).

Each endothelial cell has an oval or rounded nucleus. The chromatin is evenly distributed in the karyoplasm. The endothelial cells of the cerebral capillaries are always separated from the outside by a basement membrane divided into three layers: medium osmiophilic and two adjacent osmiophobic layers.

The thickness of the basement membrane of capillaries in control rabbit equals on an average to $0.66 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 4). Pericytes are encountered outside the endothelial cells. They are conspicuous and always bordered by branches of the basal membrane. The ultrastructure of pericytes is similar to that of the endothelial cells (Fig. 2).

After 3-min ischemia endothelial cells are thickened and single microvilles are protruding to the lumen of the capillaries. The mean value of thickness of endothelial cells equals to $2.66 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 1). In some parts the inner plasmolemma is projected into the lumen of the capillary (Fig. 5). In the cytoplasm of endothelial cells the number of pinocytotic vesicles and ribosomes, both free and bound, is decreased. After 3-min ischemia the number of pinocytotic vesicles per $100 \mu\text{m}^2$ cytoplasm equals to 22 ± 1.1 ($p \leq 0.001$) (Fig. 3), i.e. their number is decreased almost twice as compared with the control material.

The mitochondria undergo severe changes; the cristae are destructed, the matrix is electron lucent. Though, in the same cells almost unchanged mitochondria are also encountered. The components of endoplasmic reticulum and the Golgi complex are widened (Fig. 5).

The nuclei of endothelial cells acquire uneven shape. Chromatin is more or less moderately aggregated near nuclear envelope. In the perinuclear region of cytoplasm free ribosomes are accumulated. All these changes are of different extent in different endothelial cells.

The basement membrane of the capillaries after 3-min ischemia remains unchanged (Fig. 5) and its thickness equals to $0.66 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 4).

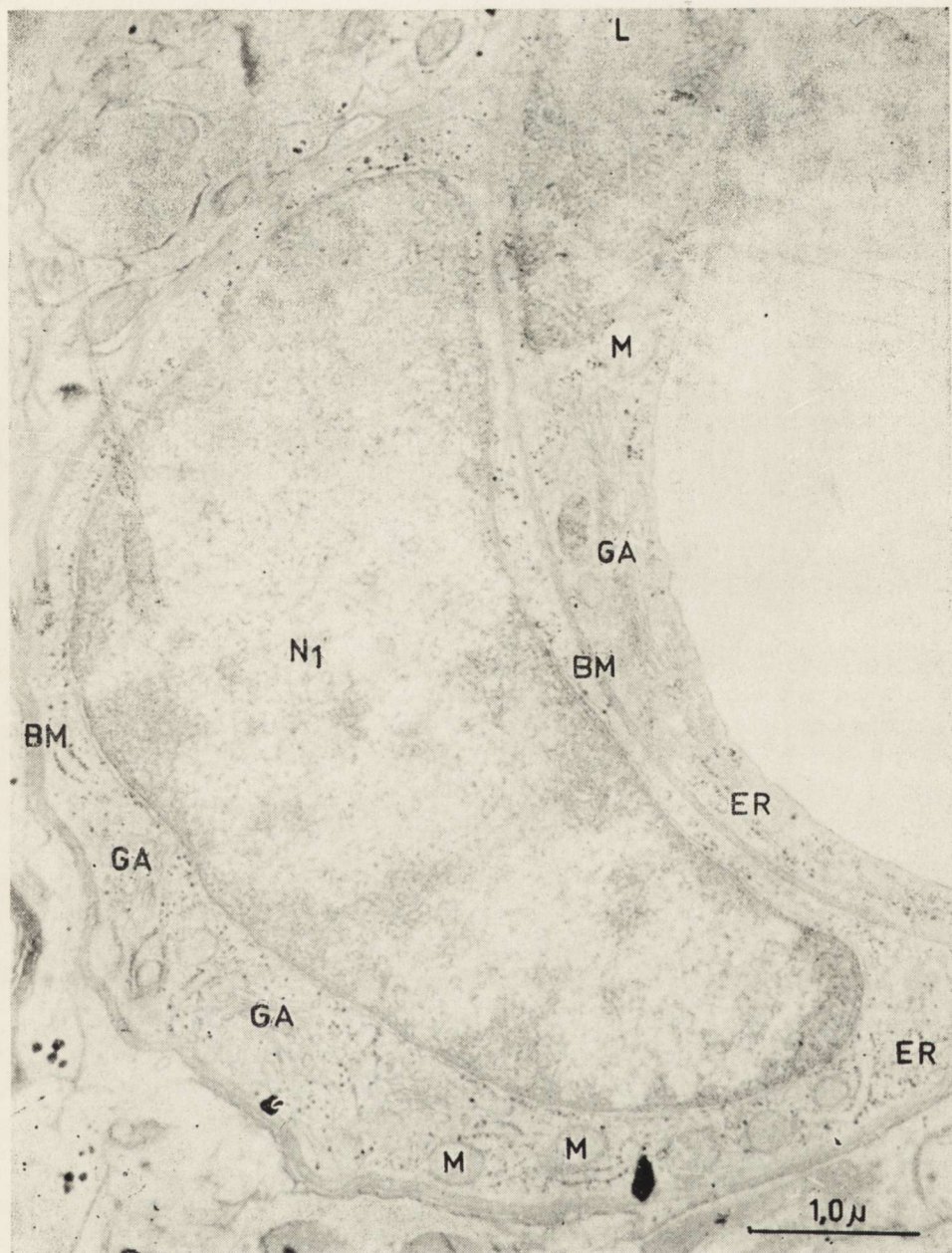


Fig. 2. Capillary wall in a control animal. N — nucleus of endothelial cell, N₁ — nucleus of pericyte, GA — Golgi complex, BM — basement membrane, M — mitochondria, ER — endoplasmic reticulum. × 20 000.

Ryc. 2. Ściana naczynia włosowatego zwierzęcia kontrolnego. N — jądro komórki śródbłonna, N₁ — jądro pericytu, GA — aparat Golgiego, BM — błona podstawna, M — mitochondria, ER — siatka śródplazmatyczna. Pow. 20.000 ×.

In the cytoplasm of pericytes the number of free ribosomes and pinocytic vesicles increases noticeably. The number of mitochondria, some of which undergo the above mentioned changes, also increases. Cisterns of endoplasmic reticulum and components of the Golgi complex are considerably widened. Nuclei of pericytes, like those of endothelial

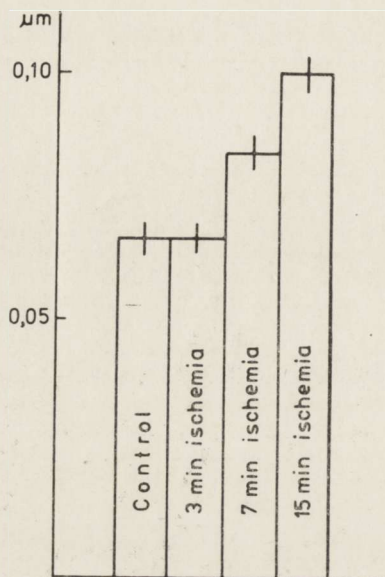


Fig. 4. Mean values of thickness of the basement membrane in the control and after 3, 7 and 15-min ischemia. Ordinate: thickness of basement membrane in μm .

Ryc. 4. Średnie wartości grubości błony podstawnej kontroli oraz po 3, 7 i 15 min niedokrwienia. Oś rzędnych — grubość błony podstawnej w μm .

cells acquire uneven contours. In pericytes there is a considerable rise in the number and size of lysosomes. They are dispersed or accumulated in various regions of the cytoplasm.

After 7-min ischemia ultrastructural changes in the cerebral capillaries are even more pronounced except for the thickness of endothelial cells, which is less than after 3-min ischemia. The mean thickness of endothelial cells after 7-min ischemia equals to $2.33 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 1). Large vacuoles appear in the cytoplasm of endothelial cells (Fig. 6). In some cells almost all the mitochondria are changed. The destruction is more pronounced and there is an increase in the volume due to swelling. Seven-min after the onset of ischemia widening of cisterns and channels of endoplasmic reticulum is observed. The components of the Golgi complex are also widened. The number of pinocytic vesicles is decreased almost twice. They are mostly localized at

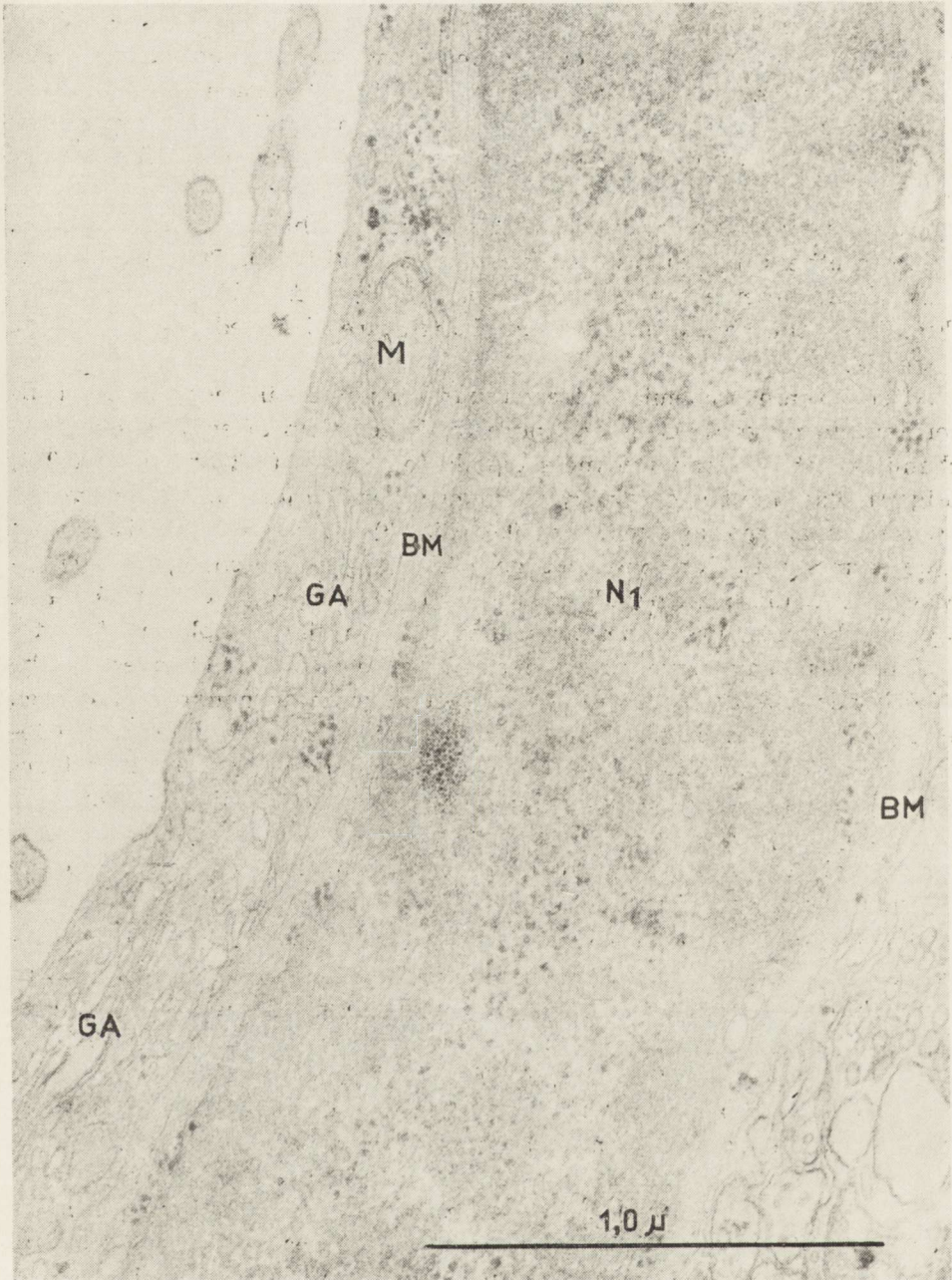


Fig. 5. Capillary wall. Three-min ischemia. See descriptions in Fig. 2. $\times 60\,000$.
 Ryc. 5. Ściana naczynia włosowatego. Niedokrwienie 3-min. Oznaczenia jak na ryc. 2. Pow. $60\,000 \times$.

the basal surface of the endothelial cell (Figs. 6, 7). The number of pinocytotic vesicles per $100 \mu\text{m}^2$ cytoplasm of endothelial cells during 7 min ischemia equals, on an average, to 18 ± 1.1 ($p \leq 0.001$) (Fig. 3). Besides the changed cells, endothelial cells with no or slight alterations are also observed. Owing to invaginations nuclei of endothelial cells acquire uneven contours.

The basement membrane in some places is thickened and swollen, while in others it becomes denser and thinner (Fig. 6). The mean thickness of the basement membrane equals to $1.00 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 4). In the pericytes the same changes are observed as after 3-min ischemia.

After 15-min ischemia ultrastructural changes in endothelial cells continue to progress. Cells are more thickened than after 3 or 7-min ischemia — their mean thickness equals to $2.83 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 1). The number of pinocytotic vesicles per $100 \mu\text{m}^2$ of cytoplasm decreases on an average to 11 ± 0.4 (Fig. 3). In some cases cisterns of endoplasmic reticulum are enlarged. The degree of changes of endoplasmic reticulum varies. The mitochondria undergo evident changes. Myelin-like structures, sometimes observed in the cytoplasm of endothelial cells, may serve as an example of destructive changes in the mitochondria. Such structures in the matrix of mitochondria have been described by other authors in neurons and endothelial cells as well (Bogolepov, 1971; Shakhlamov, 1971). It is worth noticing that ultrastructural changes in endothelial cells observed after 15-min ischemia are more polymorphic in nature than after 3 or 7-min ischemia. Nuclei of endothelial cells acquire uneven contours, chromatin aggregates on the internal membrane of the nuclear envelope.

The changes of the basement membrane are of polymorphic nature as well. In some places the membrane is laminated, thickened and swollen, while in others it is changed only slightly (Fig. 7). The mean thickness of the basement membrane after 15-min ischemia equals to $1.00 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($p \leq 0.001$) (Fig. 4). The thickness of the basement membrane of the cerebral capillaries is different than normal — this abnormality has been also shown to accompany other diseases of the brain (Struck, Wimbach, 1964; Donahue et al., 1967; Shea, Bossert, 1973; Petrov, 1975). The changes of the thickness and structure in the basement membrane of the cerebral capillaries may be considered as an indirect evidence of changes of its permeability. After 15-min ischemia the same changes in pericytes are observed as after 3, and 7-min ischemia.

Thus, in short-lasting deep circulatory hypoxia a marked reaction of all the components of the cortical capillary wall becomes apparent. This is expressed by the above-described ultrastructural abnormalities con-



Fig. 6. Capillary wall. Seven-min ischemia. V — vacuoles, PP — pericytic processes. The arrows point to pinocytotic vesicles, the other descriptions as in Fig. 2. $\times 60\,000$.

Ryc. 6. Sciana naczynia włosowatego. Niedokrwienie 7-min. V — wakuole, PP — wypustki pericytów. Strzałki wskazują pęcherzyki pinocytarne, pozostałe oznaczenia jak na ryc. 2. Pow. 60.000 \times .

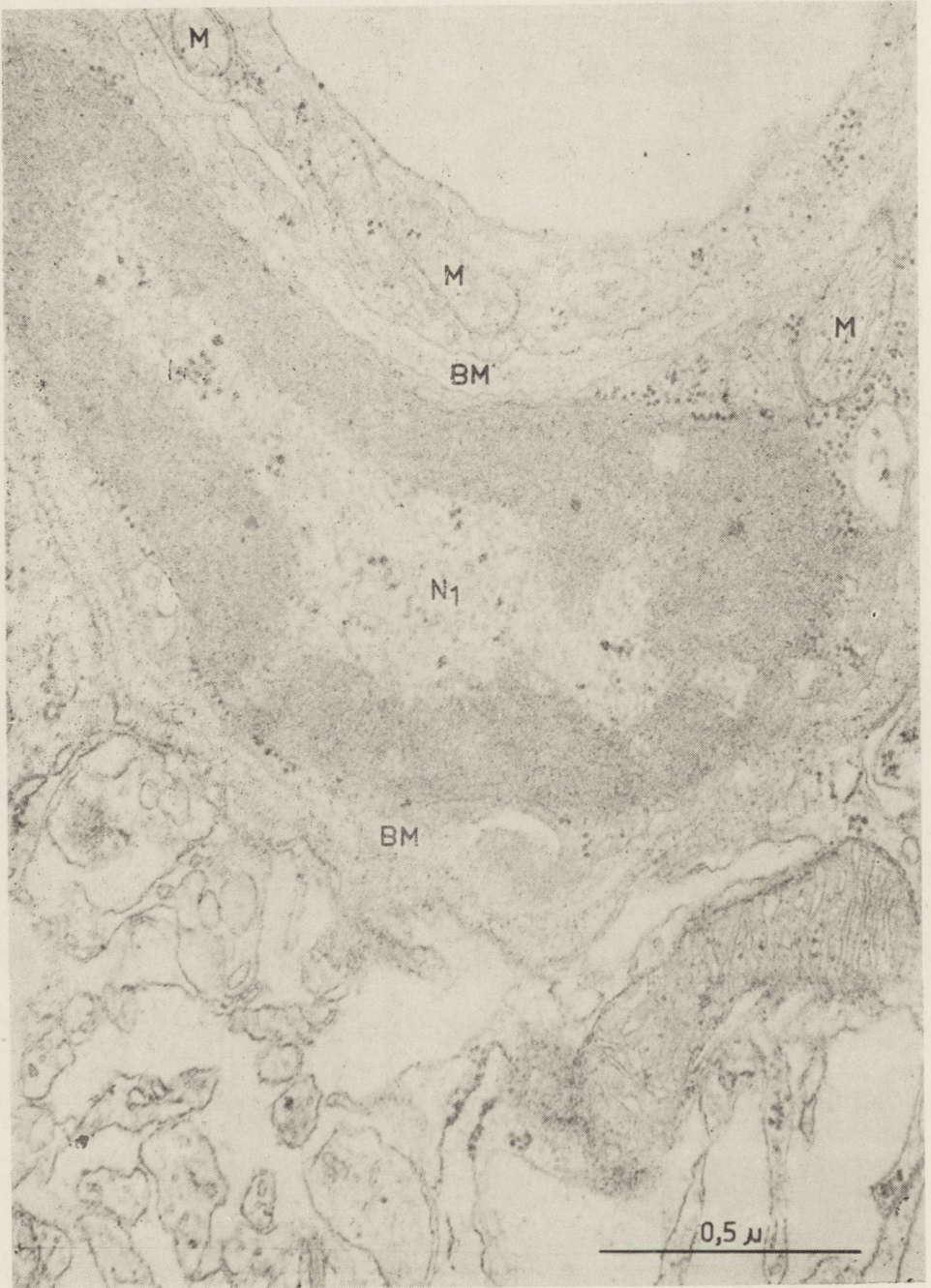


Fig. 7. Capillary wall. Fifteen-min ischemia. For descriptions see Fig. 2. $\times 75\,000$.
Ryc. 7. Ściana naczynia włosowatego. Niedokrwienie 15-min. Oznaczenia jak na ryc. 2. Pow. $75\,000 \times$.

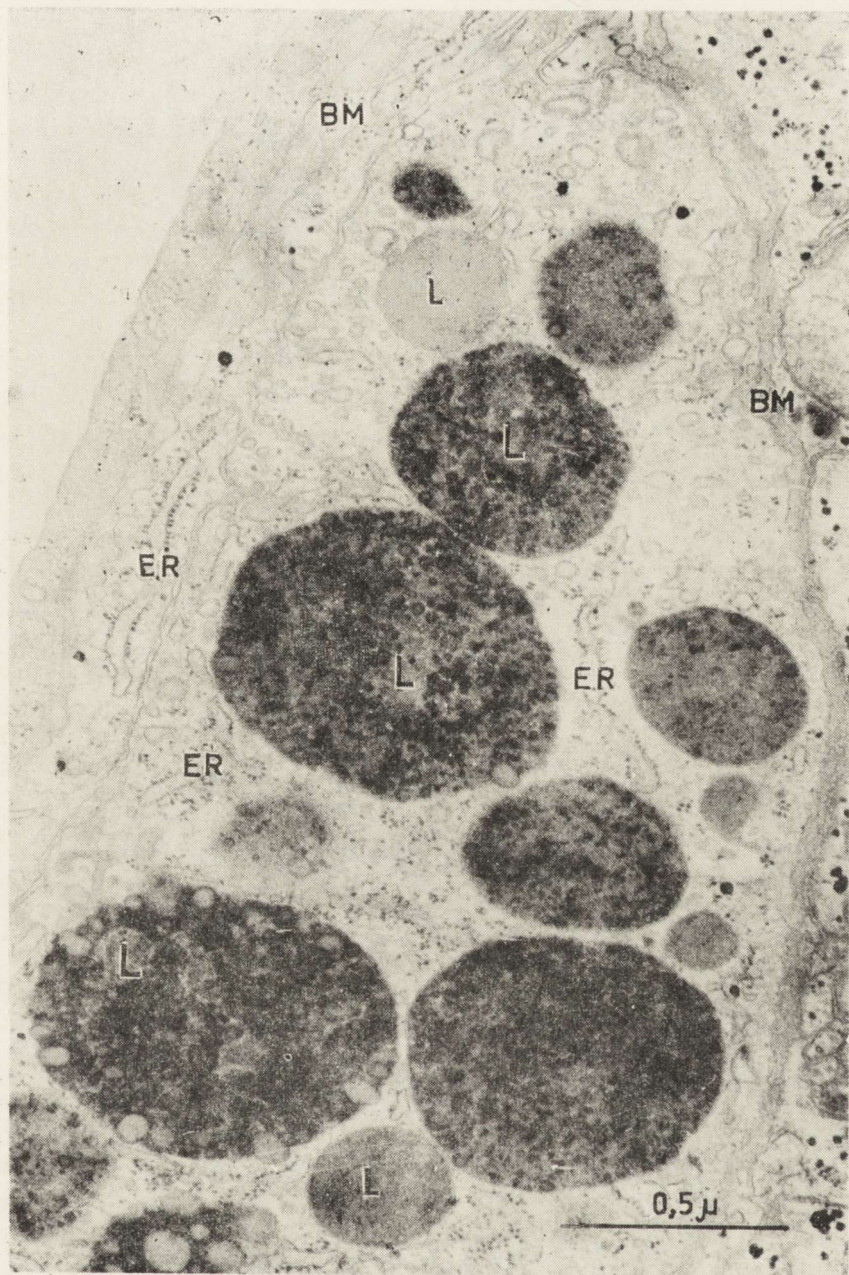


Fig. 8. Capillary wall. Fifteen-min ischemia. L — lysosomes, the other descriptions as in Fig. 2. $\times 60\,000$.

Ryc. 8. Ściana naczynia włosowatego. Niedokrwienie 15-min. L — lizosomy, inne oznaczenia jak na ryc. 2. Pow. 60.000 \times .

sisting in the thickening of the endothelial cells, reduction of the number of pinocytic vesicles and thickening of the basement membrane. However, it should be emphasized that while the number of pinocytic vesicles and the thickness of the basement membrane are changing proportionally to the duration of ischemia, the alterations in thickness of endothelial cells do not show such a direct relationship. The results of the investigation have shown that in the same experimental conditions pericytes and endothelial cells react differently. The increase of the number of lysosomes (Fig. 8) shows that in certain conditions pericytes may exhibit phagocytic activity. This phenomenon has been reported by some other authors (Maxwell, Gruger, 1965; Hager, 1968; Lierse, 1968; Mori, Leblond, 1969).

It may be concluded that the decrease of the number of pinocytic vesicles and ribosomes, a considerable destruction of the mitochondria, the widening of profiles of endoplasmic reticulum and the Golgi complex components in the cytoplasm of endothelial cells, the lamination and thickening of the basement membrane, all may indicate changes in the metabolic activity and disturbances of the capillary permeability during ischemia of a very short duration.

Acknowledgement: The author is indebted to M. N. Varazishvili, Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation for carrying out the experiments on cerebral ischemia in rabbits, and to Miss Ninell Skhirtladze for her help in the preparation of the manuscript.

A. Sh. Tsitsishvili

WPLYW NIEDOTLENIENIA KRAŻENIOWEGO (NIEDOKRWIENIA) NA ULTRASTRUKTURĘ NACZYŃ WŁOSOWATYCH KORY MÓZGU

Streszczenie

Badano ultrastrukturę naczyń włosowatych kory mózgu dorosłych królików po niedokrwieniu 3, 7 i 15-minutowym. Wykazano, że po niedokrwieniu 3-min w cytoplazmie komórek śródbłonka zmniejsza się ilość pęcherzyków pinocytarnych i rybosomów. Cysterny siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego ulegają poszerzeniu. Obok znacznej ilości mitochondriów z prawie całkowicie zniszczonymi grzebieniami i jasną macierzą, stwierdza się występowanie mitochondriów prawie niezmienionych. Jądra komórek śródbłonka przybierają nieprawidłową formę, chromatyna zbija się przy wewnętrznej błonie otoczki jądrowej. Po 7- i 15-min niedokrwieniu zmiany w komórkach śródbłonka narastają. Błona podstawna naczyń włosowatych po niedokrwieniu trwającym 3 i 7 minut pozostaje niezmieniona, po 15-min ulega rozwarstwieniu i pogrubieniu, chociaż nie dotyczy to wszystkich naczyń. W cytoplazmie pericytów, we wszystkich badanych okresach niedokrwienia, zwiększa się ilość mitochondriów. Szczególnie cha-

rakteryistyczne dla pericytów jest zwiększenie ilości i wielkości lizosomów. Obserwowane zmiany elementów ścian naczyń włosowatych po niedokrwieniu wskazują na zmiany ich przepuszczalności.

А. Ш. Цицишвили

ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛЯТОРНОЙ ГИПОКСИИ (ИШЕМИИ) НА ТОНКУЮ СТРУКТУРУ КАПИЛЛЯРОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

Изучена ультраструктура капилляров коры головного мозга взрослых кроликов при 3, 7 и 15-минутной ишемии. Результаты исследования показали, что через 3 мин. после начала ишемии в цитоплазме эндотелиальных клеток уменьшается число пиноцитозных пузырьков и рибосом. Расширяются цистерны эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Наряду с большим числом митохондрий с почти полностью разрушенными кристами и просветленным матриксом, отмечаются почти неизмененные митохондрии. Ядра эндотелиальных клеток приобретают неправильную форму, хроматин агрегируется у внутренней мембраны ядерной оболочки. Через 7 и 15 мин. после начала ишемии изменения в эндотелиальных клетках нарастают. Базальная мембрана капилляров при 3 и 7 минутной ишемии оставалась неизменной, а при 15 минутной ишемии расслаивалась и утолщалась, причем такие изменения характерны не для всех капилляров. В цитоплазме перicyтов при всех сроках ишемии увеличивается количество митохондрий. Особенно характерным для перicyтов является увеличение количества и размеров лизосом. Перечисленные изменения в компонентах капиллярной стенки при ишемии указывают на изменения их проницаемости.

REFERENCES

1. Arsenio-Nunes M. L., Hossmann K. A., Farkas-Bargeton E.: Ultrastructure and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 329—444.
2. Bakay L., Lee J. C.: The effects of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697—707.
3. Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. II. Neuroglia and blood vessels. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 235—244.
4. Bogolepov N. N.: Ultrastructure of the cerebral capillaries. *Zh. Nevropat. Psikhiat. Korsakov*, 1966, 66, 1797—1802.
5. Bogolepov N. N.: Submicroscopic changes in nerve cells in retrograde degeneration. *Zh. Nevropat. Psikhiat. Korsakov*, 1971, 71, 694—703.
6. Bolletti A., Teoni P.: La struttura dei capillari sanguigni della corteccia cerebrale di *Mus rattus albinus*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1966, 42, 1562—1563.
7. Casley-Smith L. R.: An electron microscopical demonstration of the permeability of cerebral and retinal capillaries to ions. *Experientia*, 1969, 25, 845—847.
8. Donahue S., Zeman W., Watanabe I.: Alterations of basement membranes of cerebral capillaries. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 397—411.
9. Foroglou-Kerameos Ch.: Endothelium vasculaire à microscopie optique, ultrastructure et perméabilité aux lipides. *Arch. anat. (Strasb.)* 1969, 52, 391—480.

10. Hager H.: Pathologie der Makro- und Mikroglia im elektronenmikroskopischen Bild. *Acta neuropath. (Berl.)* 1968, 10, 86—97.
11. Karagonov I. L.: Cellular surface of vascular endothelium and its role in the mechanism of transcapillary exchange. *Arkh. anat.* 1972, 1, 15—25.
12. Karnovsky M. J.: The ultrastructure basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* 1967, 35, 213—236.
13. Lierse W.: Die Hirncapillaren und ihre Glia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1968, 10, 40—52.
14. Maxwell D. S., Kruger L.: Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Exp. Neurol.* 1965, 12, 33—34.
15. McGee-Russell S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
16. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
17. Mikeladze A. L.: Current problems of the activity and structure of the central nervous system. "Metsniereba", Tbilisi 1968, 15, 272—282.
18. Mohamed A. H.: Ultrastructural permeability studies in capillaries of rabbit oral mucosa and salivary glands. *Microvasc. Res.* 1975, 9, 287—303.
19. Mori S., Leblond C. P.: Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. comp. Neurol.* 1969, 135, 57—65.
20. Palade G. E., Bruns R. E.: Structural modulation of plasmalemmal vesicles. *J. Cell Biol.* 1968, 37, 633—649.
21. Petrov V. S.: Ultrastructural characteristic of the basal membrane of the cerebral cortex capillaries in the norm and severe nidus diseases. *Arkh. anat.* 1975, 3, 13—17.
22. Shea M., Bossert H.: Vesicular transport across endothelium: a generalized diffusion model. *Microvasc. Res.* 1973, 6, 305—315.
23. Shakhlamov. V. A.: Capillaries. *Medicine, Moscow*, 1971, 62—104.
24. Sobotka P., Jirasek A., Gebert E.: Morphological consequences of prolonged complete brain ischemia. *Brain Res.* 1974, 79, 111—118.
25. Strunck G., Wimbach W.: Vergleichende elektronenoptische Untersuchungen an der menschlichen Hirnrinde vor und nach Odemtherapie. *Virchow. Arch. Path. Anat.* 1964, 337, 317—327.
26. Voitkevich A. L., Dedov I. I.: Ultrastructural bases of vascular permeability. *Progr. Modern Biology*, 1972, 74, 439—460.
27. Weibel E. R.: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* 1969, 26, 235—282.

Author's address: Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, U.S.S.R., Tbilisi, 380060, Gothua Str. 14.

I. L. LAZRIEV, I. K. SVANIDZE, A. SH. TSITSISHVILI, E. I. DZAMOEVA

EFFECT OF CIRCULATORY HYPOXIA (ISCHEMIA) ON FINE
STRUCTURE OF NEURONS AND SYNAPSES OF THE RABBIT
CEREBRAL CORTEX *)

Laboratory of Neuromorphology, Beritashvili Institute of Physiology, Georgian
Academy of Sciences, Tbilisi, USSR
Head of the Laboratory: dr. n. sci J. K. Svanidze

Normal functioning of the central nervous system (CNS) depends on adequate blood supply to the brain, disturbances of which may lead to the development of structural and functional changes, which in certain conditions, may develop into a pathologic process. Therefore, one of the important topics of the current neurology is to elucidate those morphological, biochemical and physiological alterations that evolve in the nerve and glial cells under various experimental conditions, resulting in the disturbance of metabolic processes in the nerve tissue and its function. Of particular interest is the problem of the reaction of the nervous system during circulatory hypoxia (ischemia), when there is a deficit of oxygen and other substances required for a normal function of the brain, as well as an impairment of the transport of metabolites from tissue to blood.

It has recently been demonstrated that during circulatory hypoxia produced by the Mchedlishvili's method (1973) pronounced structural and functional changes develop in the CNS of rabbits. Thus, for instance, ischemia of 15 min duration causes a reduction in the content of biogenic amines in the nerve tissue (Chikvaidze, Melitauri, 1974), drop in the glycogen level (Sikorska, Śmiałek, 1974), diverse changes in the RNA content in the neurons and their satellites (Svanidze, Museridze, 1974) and a decrease of the relative content of polyribosomes (Albrecht, 1974) etc. It has also been shown that during even a 3 min ischemia there occurs fading and in 15 min ischemia, a complete abolishment of dendritic potentials and slow negative potentials (Roitbak, Labakhua, 1974).

In order to elucidate the mechanisms of the above described complex

*) Presented at the 2nd Symposium on Cerebral Ischemia, Tbilisi, September, 1-5, 1976.

processes occurring in the brain during deep ischemia it is necessary to explore these ultrastructural changes in the nerve and glial elements which results from similar experimental procedure. The present investigation aimed at elucidating the reactive changes in the neurons and synapses of the rabbit's cerebral cortex during short-lasting deep ischemia produced by the method of Mchedlishvili (1973). Interest in this investigation was also due to the fact that most of the reported data had been derived from the studies of ultrastructural changes in the CNS during longer lasting hypoxia (from 30 min to a few days) (Bakay, Lee, 1968; McGee-Russel et al., 1970; Bogolepov, 1972; Bogolepov et al., 1972; Yu et al., 1972; Arsenio-Nunes et al., 1973; Smirnov, 1974).

MATERIAL AND METHODS

The ultrastructural changes occurring in the neurons and synapses of temporal, occipital and parietal areas of the cortex during 3, 7 and 15 min deep circulatory hypoxia were studied*). Ischemia was produced by ligating the carotid arteries and by decreasing the systemic arterial pressure to 25—30 mm Hg. As controls served analogous regions of the cerebral cortex of sham operated animals without ligation of the carotid arteries and the lowering of blood pressure. The experimental method was described elsewhere (Mchedlishvili, 1973).

The experimental (3, 7 and 15 min after the ligation of the carotid arteries and fall of blood pressure) and control rabbits were perfused with a 2.5% solution of phosphate buffered glutaraldehyde at pH 7.4 (Karls-son, Schultz, 1965). Samples of the brain were then immersed in a 2% solution of osmium tetroxide for 2 — 3 h. After the dehydration the material was embedded in Araldite. Fine sections of 40—60 nm thickness were stained with lead citrate (Reynolds, 1963) and examined in the JEM-100C electron microscope.

RESULTS

Before starting with the description of the experimental data we like to point out the following: 1) Since no regional differences in the fine structure of neurons and synapses were present within the respective groups of animals, we have restricted ourselves to a general description; 2) Our observations have shown that, the structural organization of neurons and interneuronal contacts in the areas in question does not differ in the control and intact rabbits. No marked differences were found either in the ultrastructure of neurons and synapses of the cerebral

*) The experiments were carried out in the Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation at the Institute of Physiology of the Georgian Academy of Sciences.

cortex in rabbits and other mammals. Considering the above observations and the fact that the fine structure of neurons and synapses of the cerebral hemispheres in rabbits, rats, cats and other mammals has comprehensively enough been discussed in the literature (Palay, 1956; Gray, 1959; Van der Loos, 1963; Mikeladze, 1965; Colonnier, 1968; King, 1968; Peters, Kaiserman-Abramoff, 1969, 1970; Jones, Powell, 1970; Lund, Lund, 1970; Peters et al., 1970; Garey, 1971; Peters, 1971; Artyukhina, Ryabinina, 1972; Kaiserman-Abramoff, Peters, 1972; Bogolepov, 1975; Kiknadze, Lazriev, 1975; Lazriev, Kiknadze, 1975) we decided not to focus on the description of control material but only to illustrate the neuropil of the cerebral cortex from the control rabbit (Fig. 1).

After a 3 min ischemia, a few mitochondria in the perikarya (Fig. 2) and processes of nerve cells were swollen. The swelling was manifested by a diminished electron density of matrix and a slight reduction in the number of cristae, while the integrity of their external and internal membranes was not affected. The other structural components of the neurons and synapses remained practically unaltered as was the width of intercellular space.

Seven min ischemia resulted in discernable structural alterations in the cortex. The character of the changes varied in different areas studied. In particular, in some regions of the tissue there occurred shrinkage and a slight rise in the density in almost all components (except for the endothelial cells, pericytes and the basal membrane of the capillaries). As a rule, in such regions the intercellular clefts were widened (Figs 8, 9) and there one could see the most pronounced changes of the nerve cells and interneuronal contacts. Adjacent to these foci there were regions with no changes in either the density of particular structures or the width of intercellular clefts. In these areas most of the tissue components retained normal structure. Moreover, in some regions swelling of the perikarya and processes of astrocytes was observed. The swelling was detected in the areas with widened or unchanged intercellular clefts.

After a 7 min ischemia a more abrupt swelling of mitochondria occurred as compared to 3 min ischemia. The matrix of some mitochondria became lucent, while that of others was filled with amorphous osmiophilic material (Fig. 7). Only a part of the mitochondria were subject to such changes. Changes after 7 min ischemia involved only some neurons. More pronounced reaction was observed in the nuclei. Chromatin was aggregated in clumps and disposed on the periphery. Polymorphic vacuoles confined by the membrane, appeared in the karyoplasm (Figs 3, 4, 5). Nuclear envelope formed more numerous and deeper invaginations than in the neurons of the control animals (Figs 3, 4).

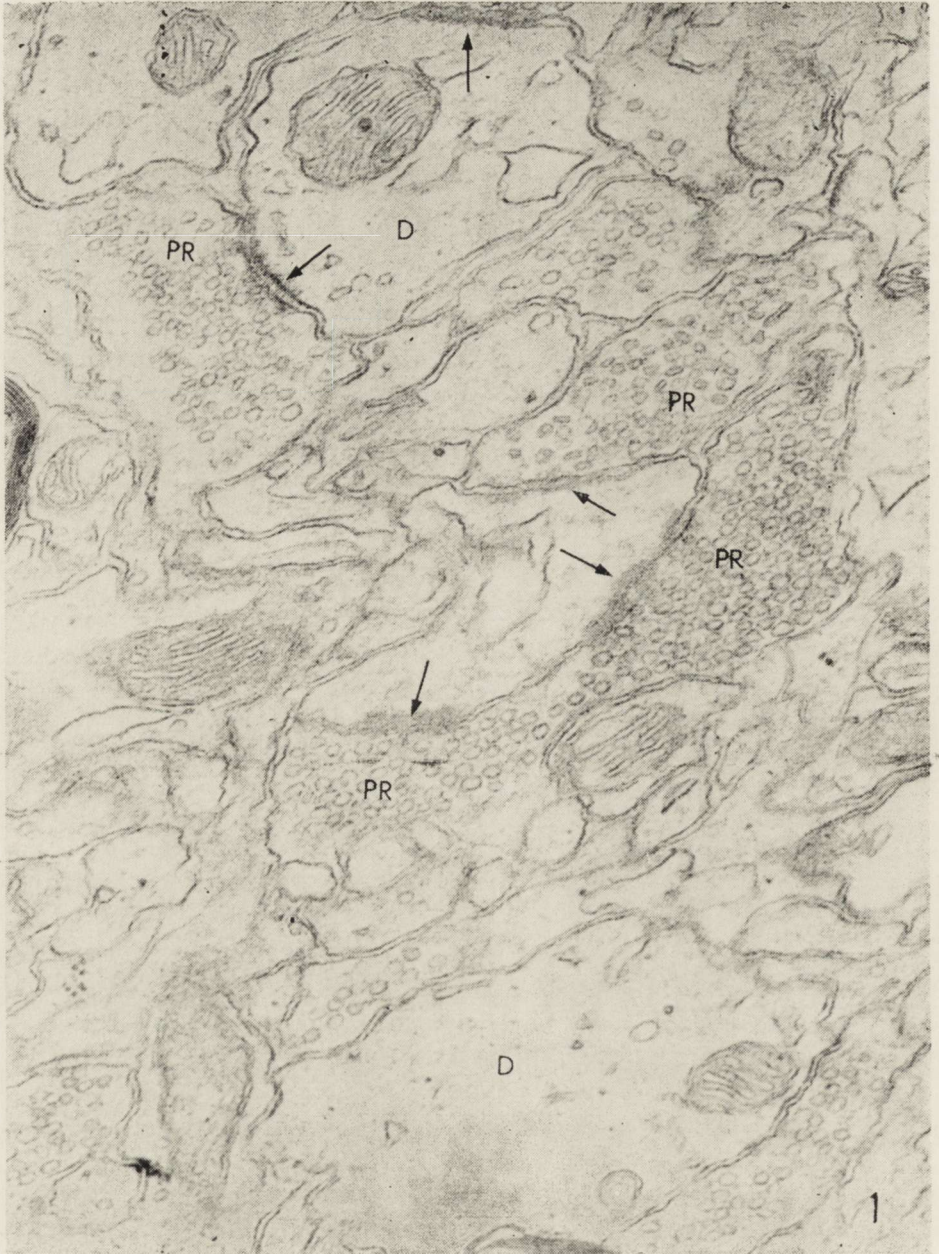


Fig. 1. The area of neuropil of the cerebral cortex in a control animal, D — dendrite, PR — presynaptic terminal. Active zones of synapses indicated by arrows. $\times 48\,000$.

Ryc. 1. Neuropil kory mózgu zwierzęcia kontrolnego. D — dendryt, PR — zakończenie presynaptyczne. Strzałki wskazują aktywne strefy synaps. Pow. 48.000 \times .

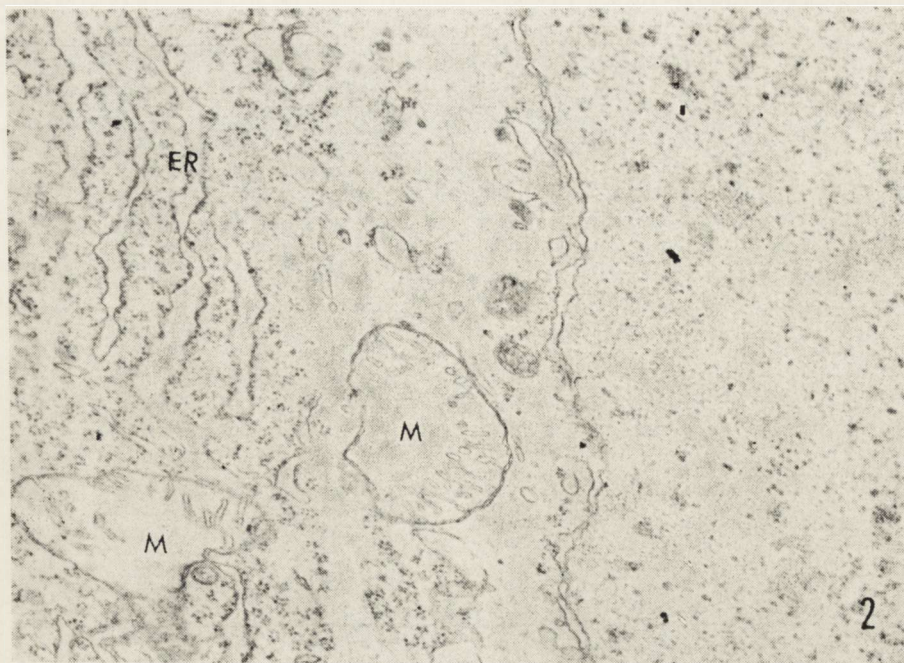


Fig. 2. Three-min ischemia. Fragment of cortical pyramidal cell. M — swollen mitochondria, ER — widened channels of endoplasmic reticulum. $\times 25\,000$.

Ryc. 2. Niedokrwienie 3-min. Fragment piramidowej komórki kory. M — obrzmiałe mitochondria, ER — poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej. Pow. $25.000 \times$.

Frequently the invaginations of the nuclear envelope attained such sizes that in some cases, an impression was gained of the existence of binuclear neurons. In all the invaginated sites of the cytoplasm there was an abundance of free ribosomes and one often encountered profiles of the granular endoplasmic reticulum whose membranes were directly associated with the external membrane of the nuclear envelope.

In some neurons conspicuous hypertrophic changes were seen in the Golgi complex (Figs 5, 6) with frequent accumulation in its vicinity of a large number of lysosomes and dense bodies. As in the other structural components of the nerve tissue, in the neurons some mitochondria were swollen, the matrix was lucent and the cristae disappeared. In contradistinction to other cytoplasmic organelles, the profiles of the endoplasmic reticulum did not undergo noticeable changes during ischemia. It should be pointed out that in some neurons there were regions of cytoplasm where ribosomes were lacking. The same regions included the largest number of swollen mitochondria.

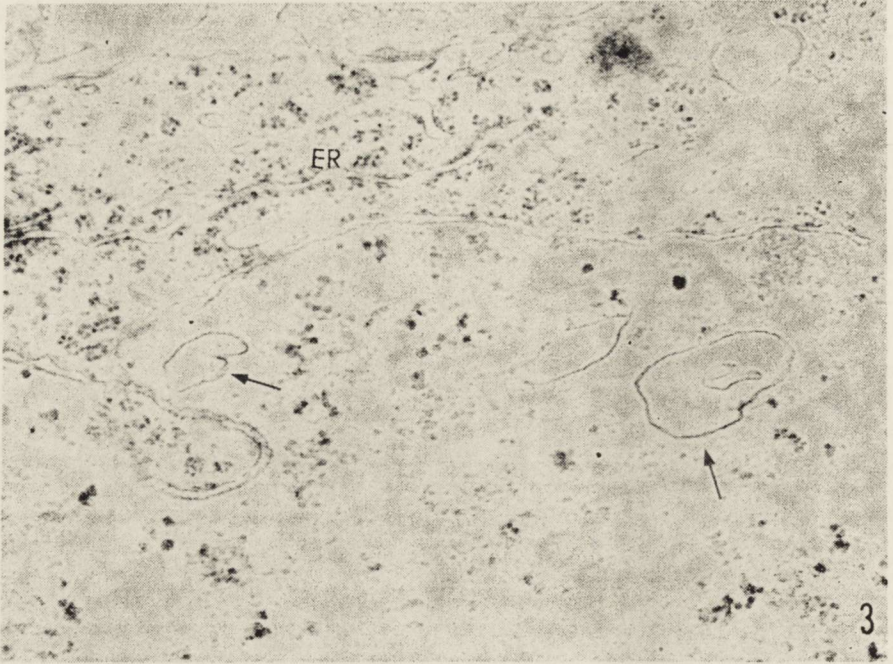


Fig. 3. Seven-min ischemia. Fragment of cortical neuron. Polymorphic vacuoles (indicated by arrows) in the karyoplasm. ER — endoplasmic reticulum. $\times 39\,000$.
Ryc. 3. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuronu kory. Strzałki wskazują polimorficzne wakuole w karioplazmie. ER — siatka śródplazmatyczna. Pow. $39\,000 \times$.

The most striking reaction during a 7 min ischemia was observed in synapses. The changes in the presynaptic terminals were more numerous than in other components of synapses. They consisted of: a) swelling of mitochondria and reduction of their cristae (Fig. 7). b) appearance of a great variability of sizes of the synaptic vesicles (Figs. 8, 9). c) reduction of the number of synaptic vesicles and in some boutons their complete disappearance (Figs. 8, 9). d) aggregation and adhesion of synaptic vesicles and dislocation of such structures from the active zone of synapse (Figs. 8, 9). Similar changes in the presynaptic terminals were also observed in other conditions of hypoxia, as well as in different posthypoxic periods (Williams, Grossman, 1970; Bogolepov, 1972; Yu et al., 1972).

In the postsynaptic dendrites and spines, apart from the changed mitochondria, there appeared some polymorphic vacuoles. Besides the changes described above, in the majority of the altered synapses the layer of dense substance associated with the pre- and postsynaptic membranes was enlarged.

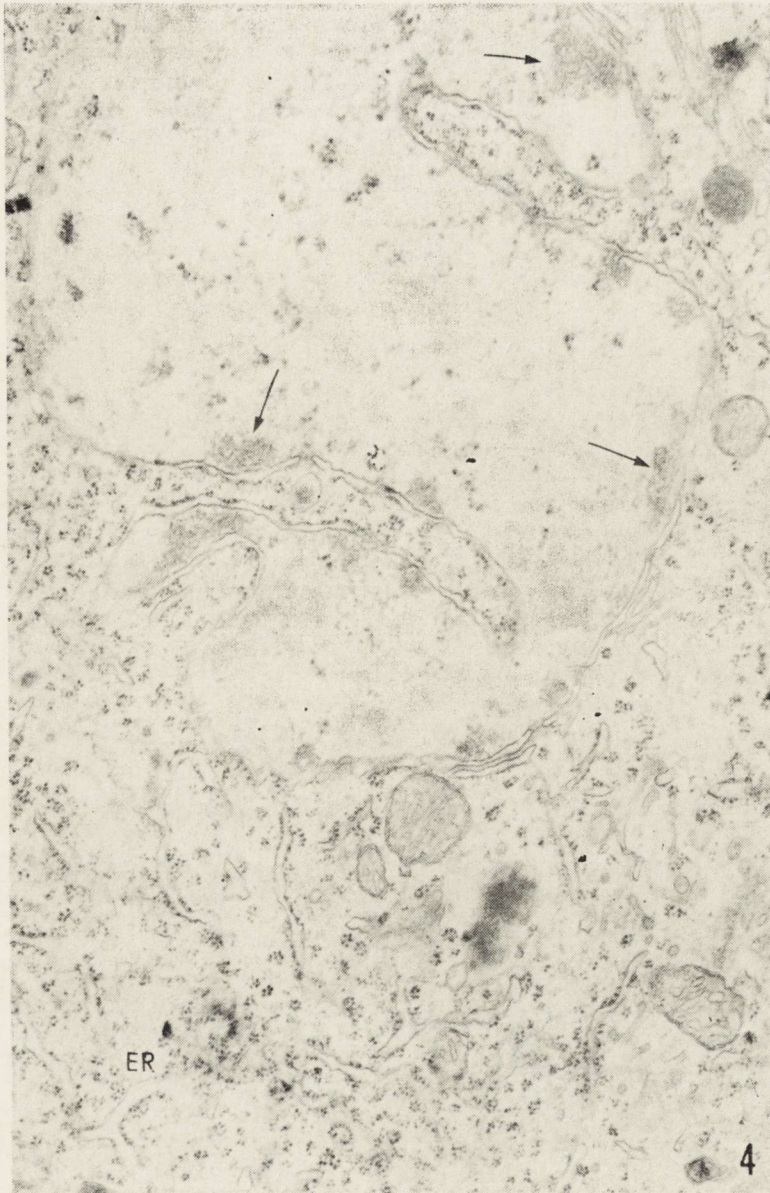


Fig. 4. Seven-min ischemia. Fragment of a cortical pyramidal neuron. Nuclear envelope forms deep invaginations. Clumps of chromatin (indicated by arrows) on the periphery of the nucleus. ER — endoplasmic reticulum. $\times 27\,000$.

Ryc. 4. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuronu piramidowego kory. Otoczka jądrowa tworzy głębokie wgłębienia. Skupienia chromatyny (strzałki) na obwodzie jądra. ER — siatka śródplazmatyczna. Pow. $27\,000 \times$.

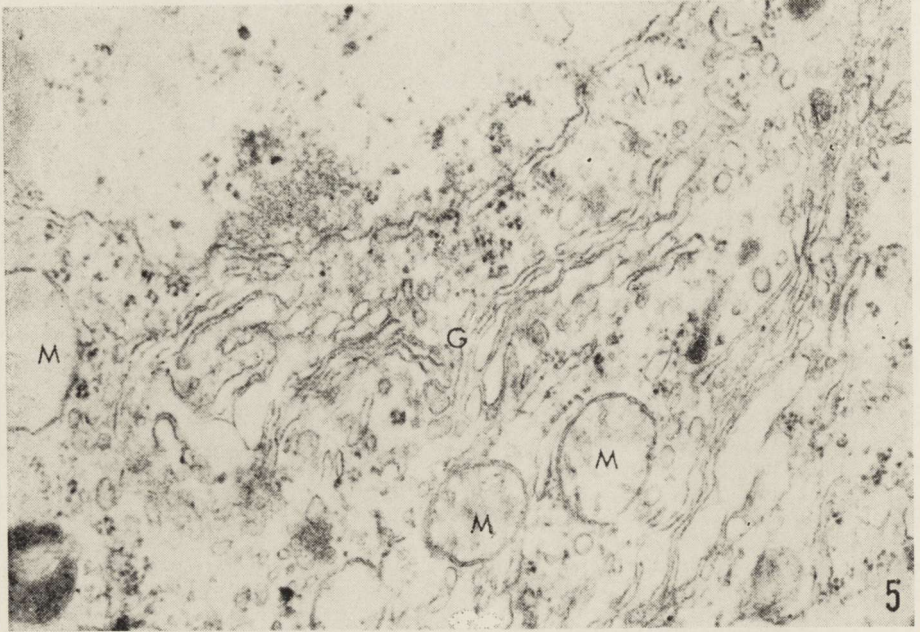
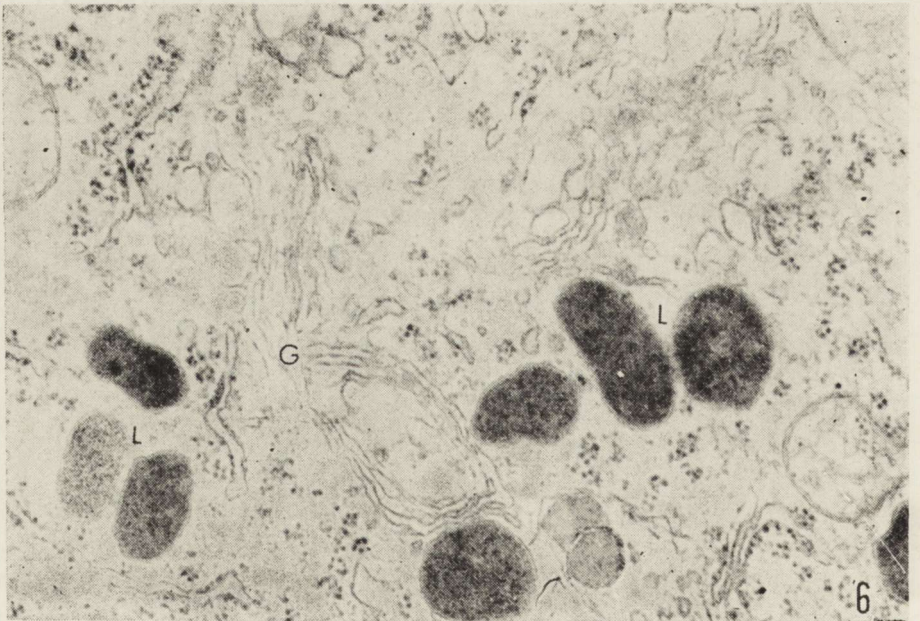


Fig. 5. Seven-min ischemia. Fragment of a cortical pyramidal cell. Hypertrophy of the Golgi complex (G). Swollen mitochondria (M). $\times 39\,000$.

Ryc. 5. Niedokrwienie 7-min. Fragment komórki piramidowej kory. Przerost aparatu Golgiego (G). Obrzmiałe mitochondria (M). Pow. 39.000 \times .



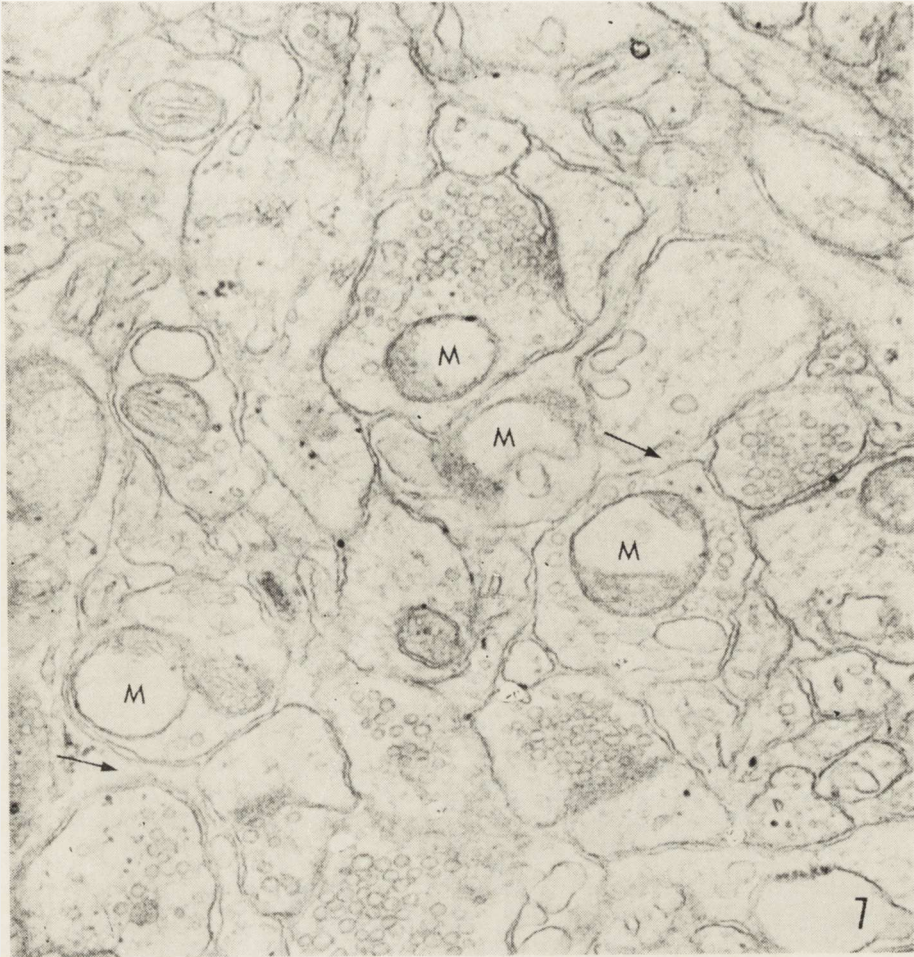


Fig. 7. Seven-min ischemia. Fragment of the cortical neuropil. Swollen mitochondria (M) in axonal terminals. Widened extracellular clefts (arrows). $\times 45\,000$.

Ryc. 7. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuropilu kory. Obrzmiałe mitochondria (M) w zakończeniach aksonalnych. Poszerzone szczeliny pozakomórkowe (strzałki). Pow. 45.000 \times

The synapses with the above listed alterations were frequently observed in the foci with widened intercellular space. However, here as well as in other regions, neuropil contacts were frequently encountered.

Fig. 6. Seven-min ischemia. Fragment of a cortical pyramidal neuron. In the vicinity of the hypertrophied Golgi complex (G) numerous lysosomes (L). $\times 42\,000$.

Ryc. 6. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuronu piramidowego kory. W sąsiedztwie przerośniętego aparatu Golgiego (G) liczne lizosomy (L). Pow. 42.000 \times .

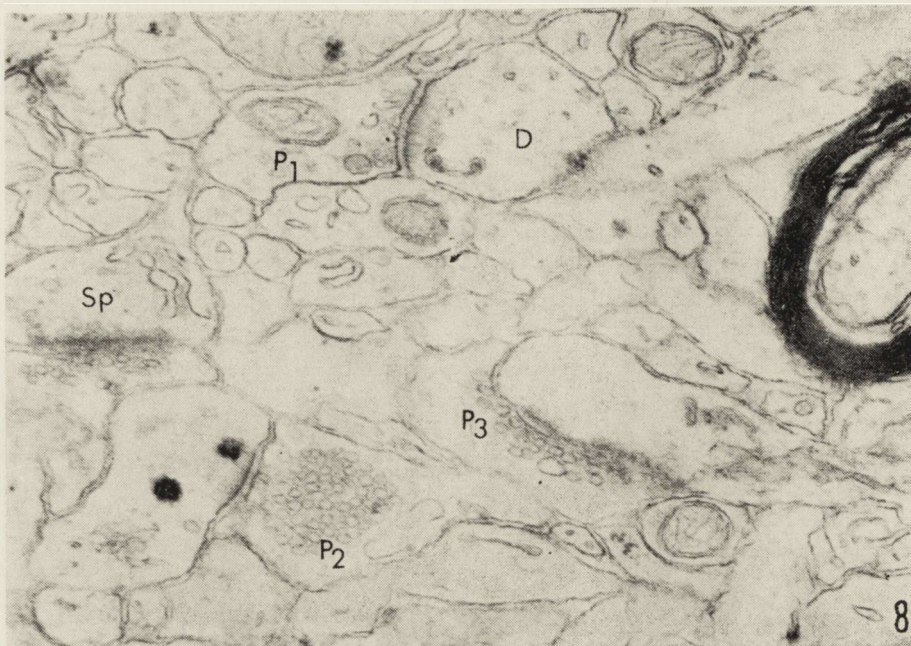


Fig. 8. Seven-min ischemia. Fragment of the cortical neuropil. In some presynaptic terminals (P_1) reduced number of the synaptic vesicles. In others (P_2), their translocation from the active zone, while in others (P_3) polymorphic synaptic vesicles are present. Widening of postsynaptic density in a dendrite (D). Sp — dendritic spine. $\times 45\ 000$.

Ryc. 8. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuropilu kory. W niektórych zakończeniach presynaptycznych (P_1) zmniejszona ilość pęcherzyków synaptycznych. W innych (P_2) przemieszczenie pęcherzyków ze strefy aktywnej oraz (P_3) występowanie pęcherzyków polimorficznych. Poszerzenie zagęszczenia postsynaptycznego w dendrycie (D). Sp — kolec dendrytu. Pow. 45.000 \times .

Their structure did not differ from that of synapses in the control animals.

After 15 min as well as 7 min ischemia, in the neurons, synapses and neuroglial cells of the cortical areas studied there was a pronounced diversity of structural changes. Here, alongside with the regions of nerve tissue where almost all the structural components were changed, sites were also encountered where the reaction was weaker. In others the main mass of profiles maintained a normal ultrastructure.

After 15 min ischemia, in the neuronal bodies and synapses, largely the same changes were observed as after 7 min ischemia (Figs. 10, 11, 12). The only difference was that the alterations were more striking and frequent. For example, in some regions the extracellular space was widened and the shrinkage of different structures was so striking that the density of the matrix markedly increased (Figs. 10, 12). It is worth

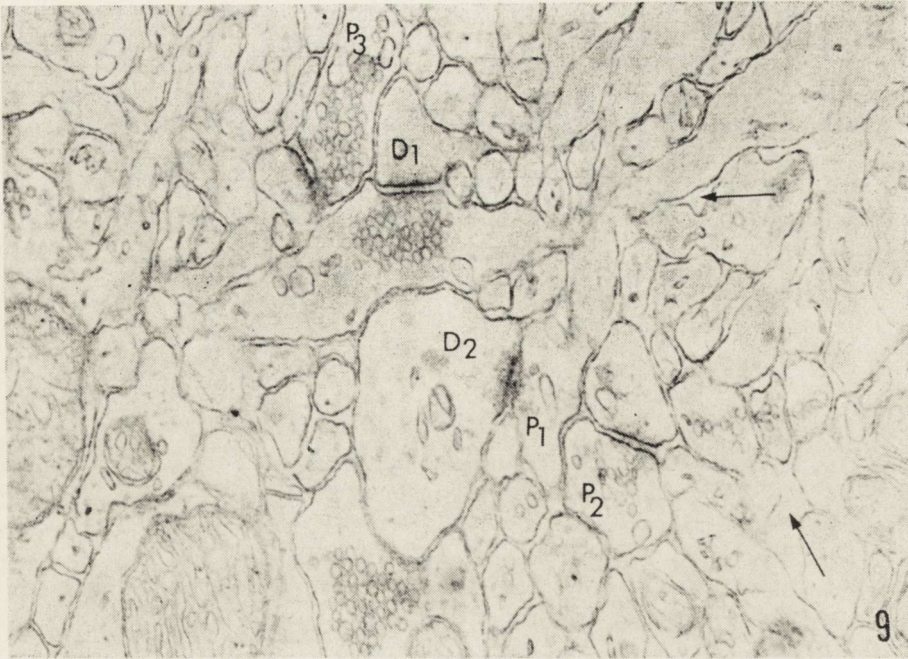


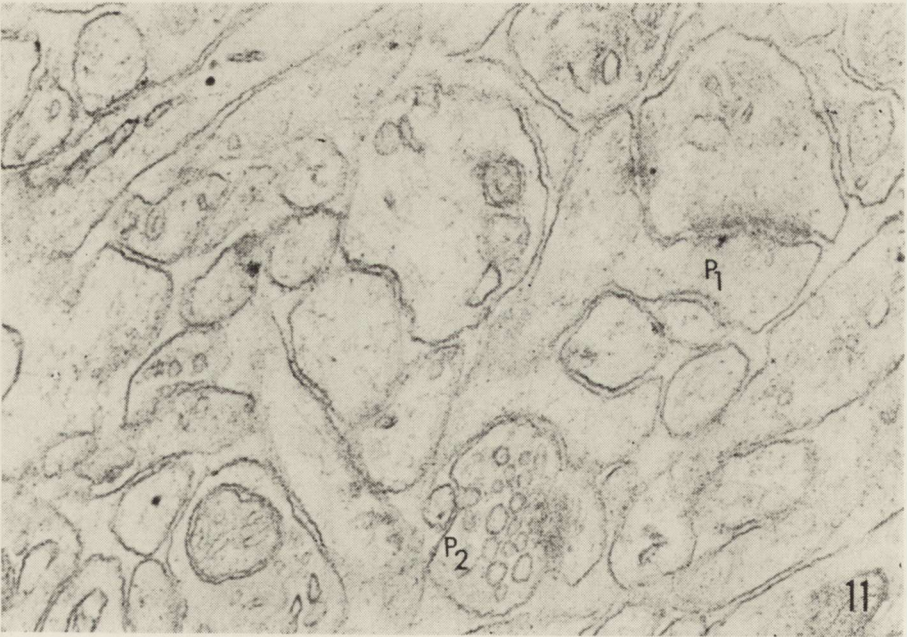
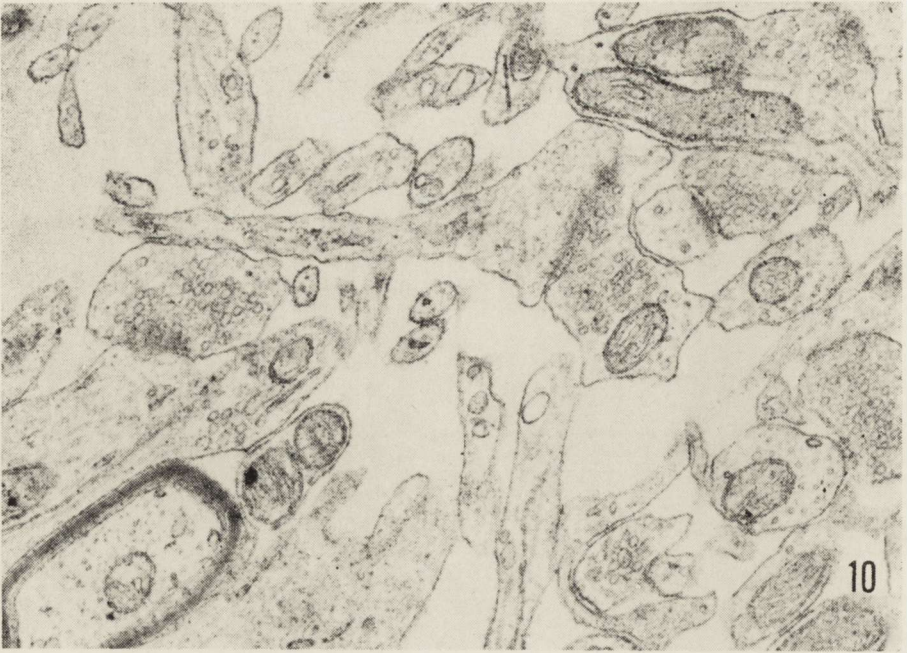
Fig. 9. Seven-min ischemia. Fragment of the cortical neuropil. Decreased number of the synaptic vesicles in the presynaptic terminals (P_1 , P_2). Polymorphic synaptic vesicles in other terminal (P_3). Enlargement of the postsynaptic density in dendrites (D_1 and D_2). Enlargement of the extracellular clefts (arrows). $\times 39\,000$.

Ryc. 9. Niedokrwienie 7-min. Fragment neuropilu kory. Zmniejszona ilość pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach presynaptycznych (P_1 , P_2). W innym zakończeniu (P_3) pęcherzyki polimorficzne. Poszerzenie zagęszczenia postsynaptycznego w dendrytach (D_1 i D_2). Poszerzenie szczelin pozakomórkowych (strzałki). Pow. 39.000 \times .

mentioning that, as distinguished from 7 min ischemia, 15 min after ligation and the lowering of arterial pressure, in some altered neurons, cisterns and of channels endoplasmic reticulum were widened. In the majority of cases such profiles were located in the peripheral regions of the cytoplasm (Fig. 12).

DISCUSSION

It appears from the present investigation that, during a short-lasting circulatory hypoxia produced by the method of Mchedlishvili (1973) considerable ultrastructural alterations develop in the neurons and synapses of the temporal, occipital and parietal areas of the cerebral hemispheres. When the results obtained by us are compared with those reported by other authors (McGee-Russell et al., 1970; Bogolepov et al., 1972; Yu et al., 1972), it becomes obvious that during circulatory hy-



poxia the changes in the nerve tissue are more pronounced and their onset is considerably earlier than during hypoxic hypoxia. This is undoubtedly due to the fact that ischemia leads not only to oxygen deficit, but also to shortage of some other substances required for the normal functioning of the brain and to disturbances of the recurrent transport of metabolites from tissue to blood.

Especially noteworthy is the fact that the structural alterations occurring in the cortical areas examined during a short-term ischemia have a focal character. Namely, in some regions of the tissue all the structural components are subject to considerable changes, in others these changes are less marked, while in some the tissue retains an almost normal structure. All these regions are adjacent and are in general of small sizes. Moreover, the most obvious alterations in the ultrastructure of neurons and synapses occur in the regions where the structure of the capillary wall appears changed. Elucidation of the mechanisms underlying this phenomenon is beset with considerable difficulties. It may be only inferred that this phenomenon is a consequence of non-similarity of branching of the capillary network in different regions of the tissue that in turn, is aggravated by a significant reduction of blood flow in ischemia. The possibility cannot be ruled out that particular neurons or even their groups differ in their susceptibility to the disruption of a normal blood supply.

As has been pointed out above, during ischemia the intercellular clefts are widened in some areas of the cerebral hemispheres, while in others the bodies and processes of astrocytes are swollen. It should be emphasized that the longer the duration of hypoxia the more pronounced are the above events. The accumulation of tissue fluid during long-term hypoxia (from 3 to 5 h) has been indicated by other authors (Bakay, Lee, 1968). We are as yet unaware of what accounts for the considerable enlargement of the extracellular space during ischemia. It may

Fig. 10. Fifteen-min ischemia. Fragment of cortical neuropil with a considerable widening of extracellular clefts. Increased density of the all the structural tissue components. $\times 33\ 000$.

Ryc. 10. Niedokrwienie 15-min. Fragment neuropilu kory ze znacznym poszerzeniem szczelin pozakomórkowych. Wzrost gęstości wszystkich strukturalnych składników tkankowych. Pow. 33.000 \times .

Fig. 11. Fifteen-min ischemia. Fragment of the cortical neuropil with widened extracellular clefts. In some presynaptic terminals (P_1) there are no synaptic vesicles, in other (P_2) polymorphic synaptic vesicles are present. $\times 53\ 000$.

Ryc. 11. Niedokrwienie 15-min. Fragment neuropilu kory z poszerzonymi szczelinami pozakomórkowymi. Niektóre zakończenia presynaptyczne (P_1) nie zawierają pęcherzyków synaptycznych, w innych (P_2) występują pęcherzyki polimorficzne. Pow. 53.000 \times .

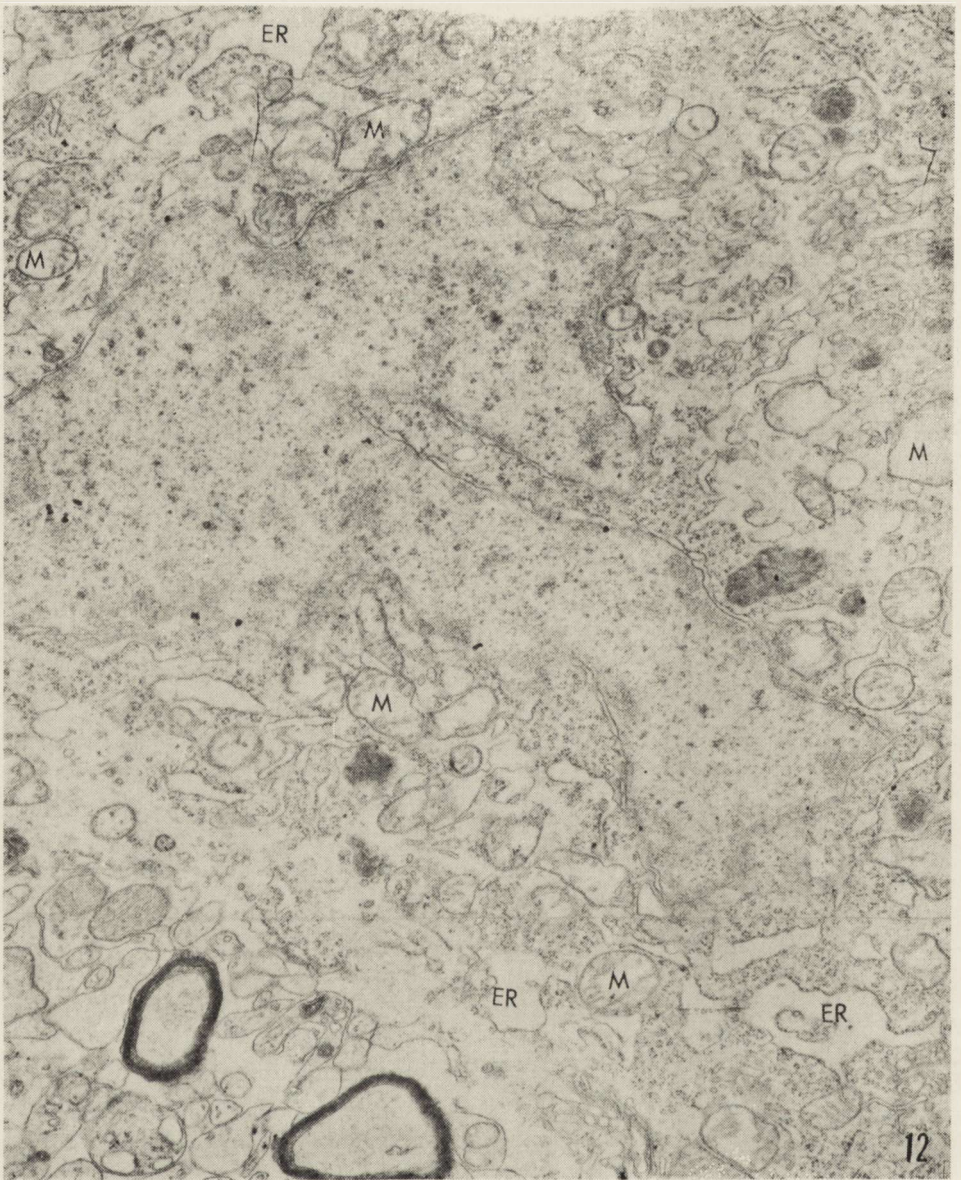


Fig. 12. Fifteen-min ischemia. Severely changed pyramidal neuron. Increased density of the matrix of the nucleus and cytoplasm. Swollen mitochondria (M). The cisterns of the endoplasmic reticulum (ER) are widened at some places. In some regions of cytoplasm the ribosomes are absent, nuclear membrane forms deep invaginations. Widened extracellular clefts in the surrounding neuropil. $\times 20\,000$.

Ryc. 12. Niedokrwienie 15-min. Znacznie zmieniony neuron piramidowy. Zwiększona gęstość macierzy jądra i cytoplazmy. Obrzmiałe mitochondria (M). Cysterny siatki śródplazmatycznej (ER) odcinkowo poszerzone. Niektóre obszary cytoplazmy pozbawione rybosomów. Głębokie wgłobienia błony jądrowej. Poszerzone szczeliny pozakomórkowe w otaczającym neuropilu. Pow. 20.000 \times .

be only pointed out that according to Mchedlishvili et al. (1974), during ischemia a variation of ionic content of the extracellular liquid occurs, in particular, pH and pK decrease while pNa increases. Apart from the growth of the volume of extracellular space and swelling of astrocytes during ischemia, in the blood capillaries of the same experimental animals thickness of the basal membrane increases in proportion to the duration of ischemia (Tsitsishvili, 1979). The membrane is lucent and in some cases laminated. On the other hand, it has been reported that brain edema is accompanied by swelling of astrocytes, widening of intercellular clefts, rise in the number of pinocytotic vesicles in the endothelial cells of capillaries, and widening and lucidity of the basal membrane (Torack et al., 1959; Gonatas et al., 1963; Hirano et al., 1964, 1965; Bakay, Lee, 1965). The foregoing undoubtedly indicates that in our experiments favourable conditions are created in the cerebral hemispheres of rabbits for the development of edema.

As pointed out, during ischemia the most diverse alterations are observed in synapses, in particular, in the presynaptic terminals. The most remarkable of them is the reduction of the number and, frequently, disappearance of synaptic vesicles. Moreover, the longer the duration of ischemia, the more frequent are such synapses. At this stage of investigation it is yet fairly difficult to understand the causes of these alterations in the synaptic apparatus. They might be due either to a marked reduction of the rate of transmitter synthesis in neurons resulting from metabolic disturbances or to an enhanced utilization of transmitters in synapses. The latter supposition finds support in the fact that during ischemia in many synapses with a reduced number of synaptic vesicles there is an increase of the thickness of dense material associated with the pre- and postsynaptic membranes. On the other hand, the structural alterations perhaps could serve as a morphological evidence for a fast fading and then disappearance of dendritic potentials in the cortex observed by Roitbak and Labakhua (1974) in experimental conditions similar to ours. In this respect our supposition is in consensus with the view of Williams and Grossman (1970) indicating that a reduction in the number and eventually disappearance of synaptic vesicles, as well as their aggregation in the core of a bouton may serve as a structural basis for a rapid alteration of the cortical activity during ischemia.

Acknowledgement: The authors are indebted to M. Varazishvili, Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation, for carrying out the experiments on cerebral ischemia in rabbits, and to Miss Ninell Skhirtladze for her help in the preparation of the manuscript.

I. L. Lazriev, I. K. Svanidze, A. Sh. Tsitsishvili, E. I. Dzamoeva

WPLYW NIEDOTLENIENIA KRAŻENIOWEGO (NIEDOKRWIENIA) NA ULTRASTRUKTURĘ NEURONÓW I SYNAPS KORY MÓZGU KRÓLIKA

Streszczenie

Badano reaktywne zmiany ultrastrukturalne zachodzące w okolicy czołowej, skroniowej i potylicznej kory mózgu królika po głębokim niedotlenieniu krążeniowym (niedokrwieniu) trwającym 3, 7 i 15 minut. W następstwie niedostatku tlenu i innych czynników niezbędnych dla normalnych czynności mózgu oraz na skutek zmniejszenia transportu produktów metabolizmu z tkanek do krwi, w neuronach i synapsach kory zachodzą zmiany ultrastrukturalne, których nasilenie jest proporcjonalne do czasu trwania niedokrwienia. Wszystkie zmiany mają wyraźnie ogniskowy charakter. Szczególnie uwidoczniają się fragmenty tkanki z poszerzonymi szczelinami międzykomórkowymi. W błonie jądrowej neuronów pojawiają się liczne i głębokie wgłobienia, aparat Golgiego ulega przerostowi, a mitochondria obrzmiewają. W synapsach zmniejsza się ilość pęcherzyków synaptycznych, zmienia się ich rozmieszczenie w zakończeniach aksonów, mitochondria ulegają obrzmieniu, a ząszczenia pre- i postsynaptyczne zgrubieniu.

Zmiany te są najwyraźniej ściśle związane ze zmianami czynnościowymi w kore mózgu w warunkach niedokrwienia, a szczególnie z szybkim osłabieniem i zanikaniem potencjałów dendrytów kory.

И. Л. Лазриев, И. К. Сванидзе, А. Ш. Цицишвили, Э. И. Дзамоева

ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛЯТОРНОЙ ГИПОКСИИ (ИШЕМИИ) НА ТОНКУЮ СТРУКТУРУ НЕЙРОНОВ И СИНАПСОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКА

Резюме

Исследованы ультраструктурные реактивные сдвиги, возникающие в лобной, височной и затылочной областях коры головного мозга кролика при 3, 7 и 15 минутной глубокой циркуляторной гипоксии (ишемии). Вследствии дефицита кислорода и других, необходимых для нормального функционирования мозга, веществ, а также из-за ослабления транспорта продуктов метаболизма из ткани в кровь, в нейронах и синапсах коры возникают заметные ультраструктурные сдвиги, степень которых пропорциональна длительности ишемии. Все изменения носят резко выраженный очаговый характер. Особенно выделяются участки ткани с расширенными межклеточными щелями. В нейронах появляются многочисленные и глубокие инвагинации ядерной оболочки, комплекс Гольджи гипертрофируется, митохондрии набухают. В синапсах уменьшается число синаптических пузырьков, меняется их дислокация в аксонной терминали, митохондрии набухают, расположение увеличивается толщина плотного вещества, связанного с пре- и постсинаптическими мембранами. Эти изменения, по видимому, тесно связаны с функциональными сдвигами в коре головного мозга при ишемии, в частности, с быстрым ослаблением и исчезновением дендритных потенциалов коры.

REFERENCES

1. Albrecht J.: Polyribosomes of the rabbit brain in circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 663—669.
2. Arsenio-Nunes M. L., Hossmann K. A., Farkas-Bargeton E.: Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 329—344.
3. Artyukhina N. I. Ryabinina M. A.: On the ultrastructure of the rabbit cerebral cortex synapses during motor dominants. *Cytologia*, 1972, 14, 842—848.
4. Bakay L., Lee J. C.: In: *Cerebral Edema*. Ed. C. Thomas, Springfield, 1965.
5. Bakay L., Lee J. C.: The effects of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697—706.
6. Bogolepov N. N.: Pathomorphological changes of interneuronal contacts in experimental hypoxia. *Zh. Nevropat. Psikhiat. Korsakov*, 1972, 72, 1652—1655.
7. Bogolepov N. N.: Ultrastructure of synapses in the norm and pathology. *Medicina*, Moscow, 1975.
8. Bogolepov N. N., Matveeva T. S., Dovedova E. L., Vorobeyeva T. V.: Changes of the nervous cell ultrastructure in hypoxia. *Zh. Nevropat. Psikhiat. Korsakov*, 1972, 72, 1819—1827.
9. Chikwaidze 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.
10. Colonnier M.: Synaptic patterns of different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res.* 1968, 9, 268—287.
11. Garey L. J.: A light and electron microscopic study of the visual cortex of the cat and monkey. *Proc. Roy. Soc. (Biol.)* 1971, 179, 21—40.
12. Gonatas N. K., Zimmerman H. M., Levine S.: Ultrastructure of inflammation with edema in the rat brain. *Am. J. Path.* 1964, 42, 455—469.
13. Gray E. G.: Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J. Anat.* 1959, 93, 420—433.
14. Hirano A., Zimmerman H. M., Levine S.: The fine structure of cerebral fluid accumulation. III. Extracellular spread of cryptococcal polysaccharides in the acute stage. *Am. J. Path.* 1964, 41, 1—24.
15. Hirano A., Zimmerman H. M., Levine S.: The fine structure of cerebral fluid accumulation. VII. Reactions of astrocytes to cryptococcal polysaccharides implantation. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1965, 24, 386—397.
16. Jones E. G., Powel T. P. S.: Electron microscopy of the somatic sensory cortex of the cat. I. Cell types and synaptic organization. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 1970, 257, 1—11.
17. Kaiserman-Abramoff I. R., Peters A.: Some aspects of the morphology of Betz cells in the cerebral cortex of the cat. *Brain Res.* 1972, 43, 527—546.
18. Karlsson V., Schultz R. L.: Fixation of the central nervous system for electron microscope by aldehyde perfusion. *J. Ultrastruct. Res.* 1965, 12, 160—186.
19. Kiknadze G. I., Lazriev I. L.: Structural organization of pyramidal cells in the cat's cerebral cortex (An electron microscopic study). *Proc. Acad. Sci. Georgian SSR (Biol.)* 1975, 1, 30—38.
20. King J. S.: A light and electron microscopic study of perineuronal glial cells and processes in the rabbit neocortex. *Anat. Rec.* 1968, 161, 111—124.
21. Lazriev I. L., Kiknadze G. I.: On the synapse architectonics of the sincipital and auditory zones of the cat's cortex. *Arch. Anat. (Strasb.)* 1975, 63, 9—12.

22. Lund J. S., Lund R. D.: The termination of callosal fibres in the paraviscual cortex of the rat. *Brain Res.* 1970, 17, 25—45.
23. McGee-Russell S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
24. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
25. Mchedlishvili G. I., Antia R. V., Nikolaishvili L. S.: Dynamics of some metabolic changes in the cerebral cortex during the ischemic and early postischemic periods. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 625—633.
26. Mikeladze A. L.: Electron microscopic study of brain and spinal cord. *Bull. Acad. Sci. Georgian SSR*, 1965, 37, 459—466.
27. Palay S. L.: Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.* 1956, 2, 193.
28. Peters A.: Stellate cells of the rat parietal cortex. *J. comp. Neurol.* 1971, 141, 345—374.
29. Peters A., Kaiserman-Abramoff I. R.: The small pyramidal neuron of the cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z. Zellforsch.* 1969, 100, 487—506.
30. Peters A., Kaiserman-Abramoff I. R.: The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, denrites and spines. *Am. J. Anat.* 1970, 127, 321—356.
31. Peters A., Palay S. L., Webster H. F.: The fine structure of the nervous system. The cells and their processes. *Hoeber Med. Div., Harper, Row, New York*, 1970.
32. Reynolds E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963, 17, 208—212.
33. Roitbak A. I., Labakhua T. Sh.: Direct cortical responses during circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 683—692.
34. Sikorska M., Śmiałek M.: Glycogen level and UDPglucose : glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in the brains of rabbits after experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 655—664.
35. Smirnov A. V.: Influence of different types of hypoxia on the ultrastructure of brain tissue. In: *Neurosurgery and Pathology of Brain Vessels*. Moscow, 1974, 43—53.
36. Svanidze I. K., Museridze D. P.: Changes in cytoplasmic RNA content and nuclear dry mass of the cortical neurons and glia in the postischemic period. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 635—642.
37. Torack R. M., Terry R. D., Zimmerman H. M.: The fine structure of cerebral fluid accumulation. I. Swelling secondary to cold injury. *Am. J. Path.* 1959, 35, 1135—1146.
38. Tsitsishvili A. Sh.: Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on fine structure of blood capillaries of the rabbit cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 337—350.
39. Van der Loos H.: Fine structure of synapses in the cerebral cortex. *Z. Zellforsch.* 1963, 60, 815—825.
40. Williams V., Grossman R. G.: Ultrastructure of cortical synapses after failure of presynaptic activity in ischemia. *Anat. Rec.* 1970, 166, 131—142.
41. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 222—234.

Auhors' address: Institute of Physiology Georgian Academy of Sciences, 14 Gothua Str., 380060 Tbilisi, USSR.

E. I. DZAMOEVA, I. K. SVANIDZE, I. L. LAZRIEV, A. SH. TSITSISHVILI

EFFECT OF CIRCULATORY HYPOXIA (ISCHEMIA) ON FINE
STRUCTURE OF NEUROGLIA OF THE RABBIT CEREBRAL
CORTEX *)

Laboratory of Neuromorphology, I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian
Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

Head of the Laboratory: dr. n. sci J. K. Svanidze

The glial cells, in addition to supporting, restoring, isolating and myelinating functions, participate in metabolic processes and in removing waste products from tissue to blood (Hyden, 1964; Pevzner, 1972). It is also believed that the neuroglial cells take part in producing some slow negative potentials in the brain (Roitbak, 1969).

Considerable functional, structural and biochemical alterations have been reported to occur in the brain during circulatory hypoxia (Mc Gee-Russel et al., 1970; Olsson, Hossman, 1971; Bogolepov, 1972; Yu et al., 1972; Arsenio-Nunes et al., 1973; Domańska-Janik et al., 1974). Particularly, during a short-lasting circulatory hypoxia a fast fading and then abolishment of slow negative potentials (Roitbak, Labakhua, 1974) occurs. Changes of RNA content in neurons and satellite cells have been reported to accompany circulatory ischemia (Svanidze, Museridze, 1974).

MATERIAL AND METHODS

The ultrastructural changes occurring in astrocytes, oligodendrocytes and microgliaocytes of the temporal, occipital and parietal areas of rabbit cerebral cortex (12 animals) during 3, 7 and 15 min deep circulatory hypoxia were studied **. Ischemia was produced by occlusion of the carotid arteries with simultaneous decrease of the systemic arterial pressure to 25—30 mm Hg. The details of the experimental procedure were described by Mchedlishvili (1973). The control animals were subjected to

*) Presented at the 2nd Symposium on Cerebral Ischemia, Tbilisi, September, 1—5, 1976.

**) The experiments were carried out in the Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation of the Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences.

the same procedure as the experimental ones, except occluding the carotid arteries and lowering the blood pressure.

The brains of the experimental and control rabbits were perfused with a warm (37°C) 2.5% glutaraldehyde solution in a phosphate buffer at pH 7.4. The total perfusion procedure took no longer than 15 min. The blocks of the respective cortical areas were postfixated in fresh 2% solution of osmium tetroxide in phosphate buffer for 2—3 h. Then they were dehydrated in graded ethanol and embedded in Araldite. Fine sections of 40—60 nm thick were stained with lead citrate (Reynolds, 1963) and examined under JEM-100 C electron microscope.

RESULTS

Electron microscopic investigations have shown that in different areas of rabbit cerebral cortex during 3, 7 and 15 min deep circulatory hypoxia (ischemia) similar ultrastructural changes in neuroglial cells are observed. Therefore we have restricted ourselves to a general description.

During a 3 min ischemia basic structural changes are commonly seen in the perivascular processes of astrocytes. There is a marked swelling with a considerable increase of glycogen granules in some processes (Fig. 1) and a decrease in others.

Most of the perikarya of the astrocytes remain practically unaltered, but in some of them remarkable structural changes are observed. In the nuclei of these cells chromatin is aggregated in clumps and is disposed on the periphery. The nucleolus is generally well-developed. The cytoplasm of these cells display swelling and there appear vesicles and small vacuoles, while the number of cytoplasmic organelles is considerably reduced. The matrix of some mitochondria becomes electron lucent and their cristae disappear. During a 3 min ischemia oligodendrocytes and microglia do not differ from those of cells in the control animals.

More pronounced reaction of neuroglial cells are being observed during 7—15 min ischemia. However, there is a clearcut diversity of structural changes, and alongside with the cells which undergo changes, normal cells are observed.

During a 7 min ischemia the perivascular processes of astrocytes are swollen, their matrix is electron lucent, and in some regions they are devoid of the cytoplasmic organelles. The degree of swelling of processes of astrocytes varies — in some of them it is hardly discernible while in others it is well pronounced (Fig. 2). At this time, ultrastructural abnormalities in some of the astrocytes resemble those observed after 3 min ischemia. The only difference is that the alterations are more pro-

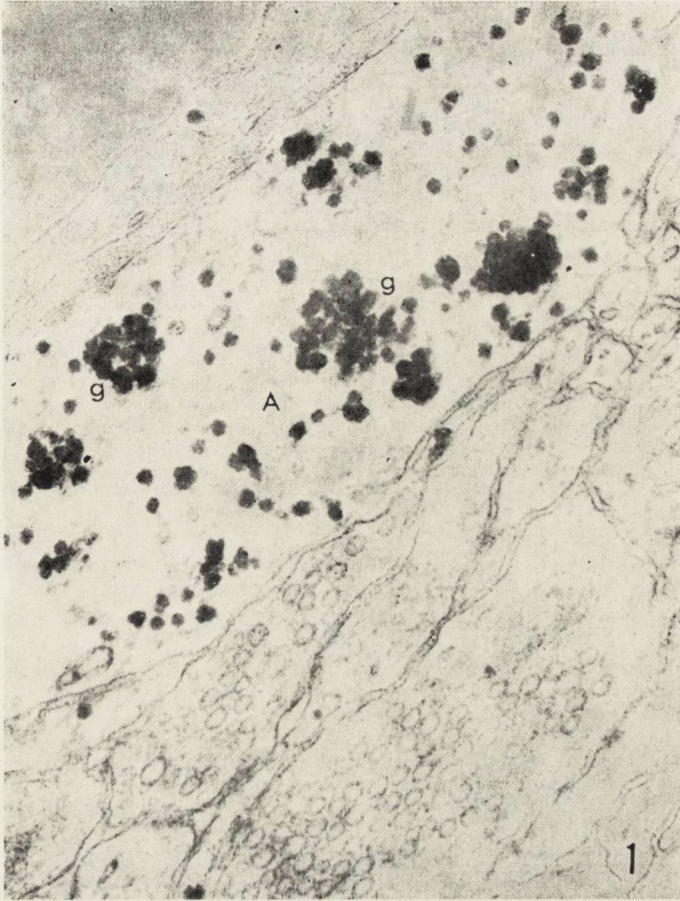


Fig. 1. Three-min ischemia. Perivascular astrocytic process (A) contains numerous glycogen granules (g). $\times 66\ 000$.

Ryc. 1. Niedokrwienie 3-min. Okołonaczyniowa wypustka astrocytu z licznymi ziarnistościami glikogenu (g). Pow. 66.000 \times .

nounced and the number of cells subjected to noticeable changes increases.

During a 15 min ischemia ultrastructural changes in astrocytes continue to progress. Swelling of the perikarya of the astrocytes and their processes is frequently encountered (Fig. 3). A cytoplasmic matrix of such astrocytes becomes electron lucent, the cisterns of endoplasmic reticulum enlarged, there are many small vesicles and vacuoles. The mitochondria are swollen. The Golgi complex is well developed in some cells, and absent from others. The nuclear envelope forms deeper invaginations, and thereby the nuclei acquire a polymorphic pattern. Alongside

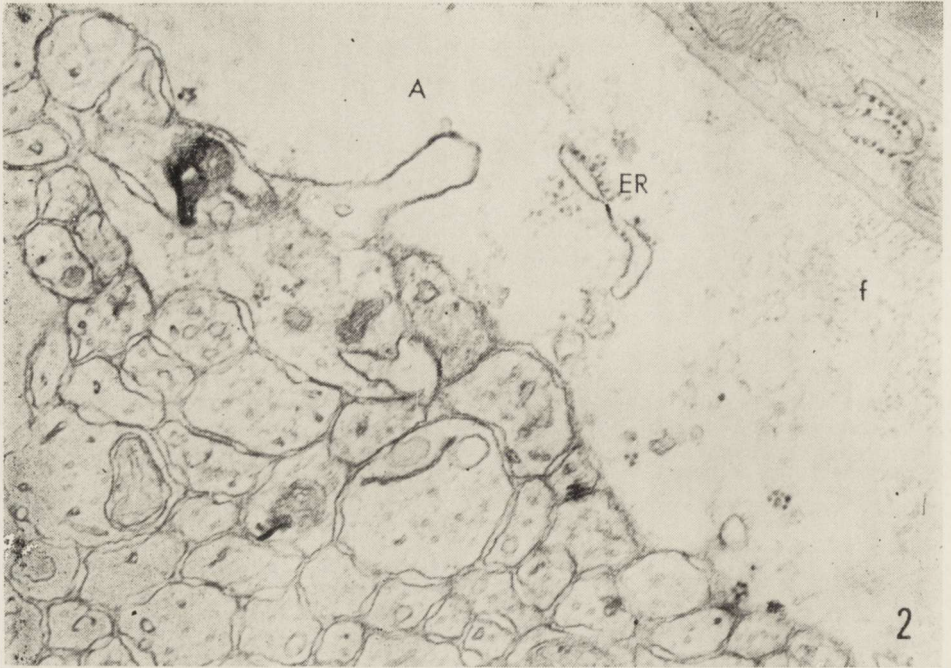


Fig. 2. Seven-min ischemia. Swollen perivascular astrocytic process (A); f — gliofilaments, ER — endoplasmic reticulum. $\times 40\ 000$.

Ryc. 2. Niedokrwienie 7-min. Obrzmiała okołonacyniowa wypustka astrocytu (A), f — gliofilamenty, ER — siatka śródplazmatyczna. Pow. $40.000 \times$.

with the areas of the cerebral cortex where astrocytes and their processes are swollen, there are regions where the intercellular clefts are widened. Different structures shrink considerably so that the density of the matrix, as well as of separate astrocytes markedly increases.

After 7 and 15 min ischemia some oligodendrocytes show hypertrophy of Golgi complex, and lengthening and increase in number of cisterns of endoplasmic reticulum. Dense bodies, microtubules and other cytoplasmic organelles are also present (Fig. 4).

Even a 15 min ischemia produces a slight increase of the number of microgliaocytes. In their cytoplasm the number of cisterns of endoplasmic reticulum and dense bodies increases (Fig. 5).

DISCUSSION

It may be concluded that during a short-lasting circulatory hypoxia produced by the method of Mchedlishvili (1973) considerable ultrastructural alterations develop in the astrocytes, particularly in their peri-

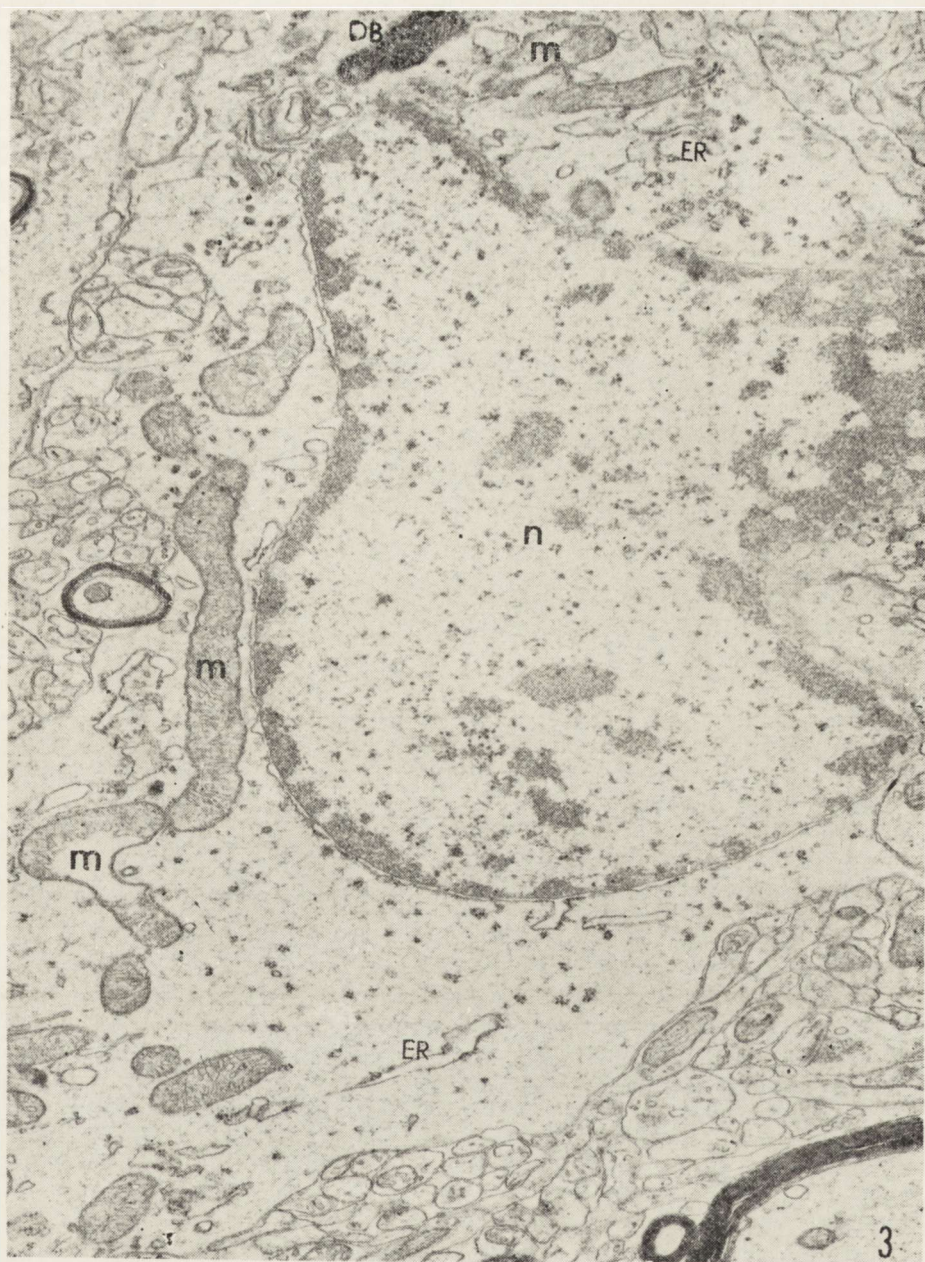


Fig. 3. Fifteen-min ischemia. Astrocyte with swollen cytoplasm. In the nucleus (n) chromatin aggregated in clumps and located on the periphery. m — mitochondria, DB — dense body. The profiles of endoplasmic reticulum (ER) slightly enlarged. $\times 20\ 000$.

Ryc. 3. Niedokrwienie 15-min. Astrocyt z obrzmiąłą cytoplazmą. W jądrze (n) skupienia chromatyny na obwodzie. m — mitochondria, DB — ciało gęste. Profile siatki śródplazmatycznej (ER) nieznacznie powiększone. Pow. 20.000 \times .

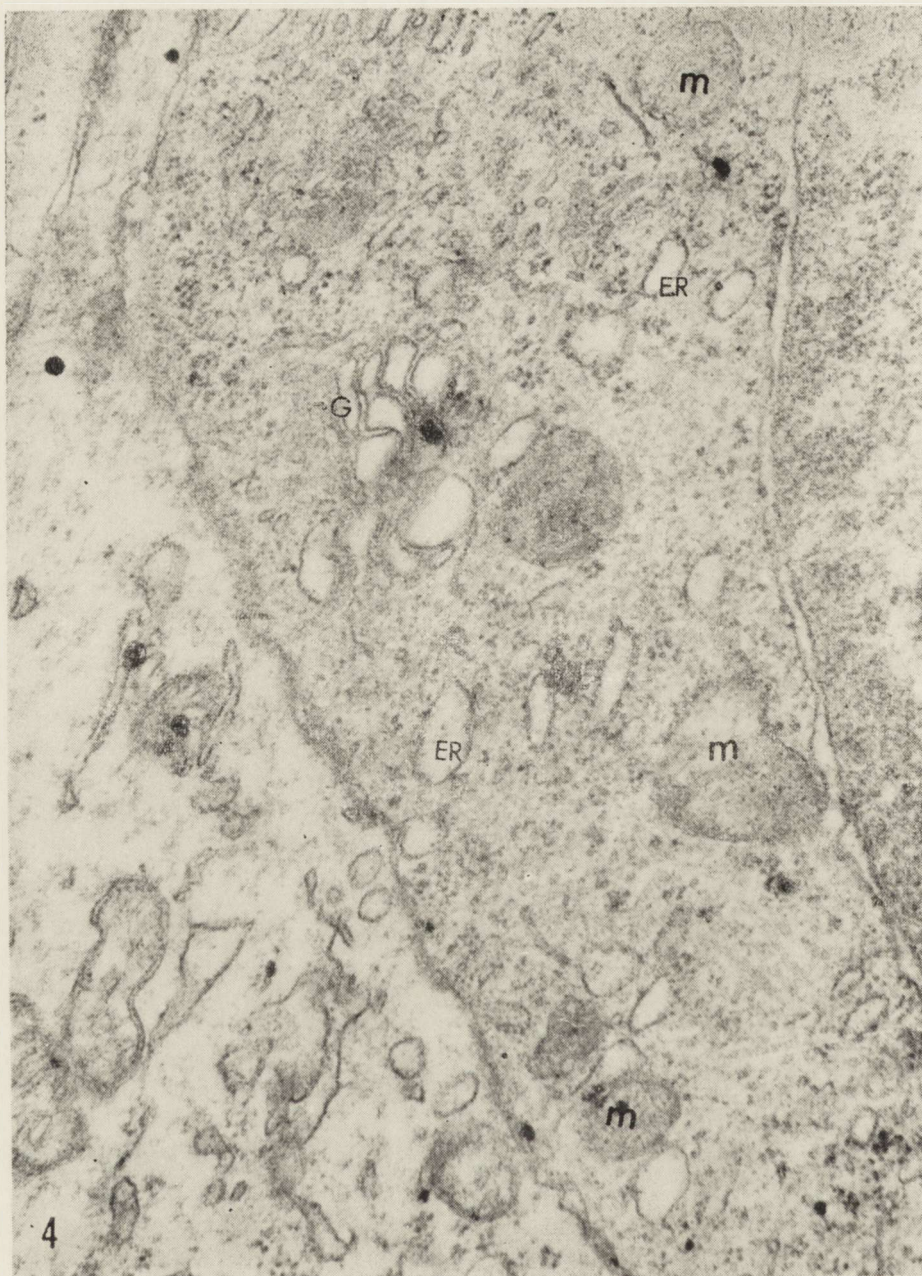


Fig. 4. Fifteen-min ischemia. Perineuronal oligodendrocyte. The cisternae of endoplasmic reticulum (ER) are slightly enlarged; swollen mitochondria (m), G — Golgi complex. $\times 45\ 000$.

Ryc. 4. Niedokrwienie 15-min. Oligodendrocyt okołoneuronalny. Cysterny siatki śródplazmatycznej (ER) lekko powiększone; obrzmiałe mitochondria (m), G — aparat Golgiego. Pow. 45.000 \times .

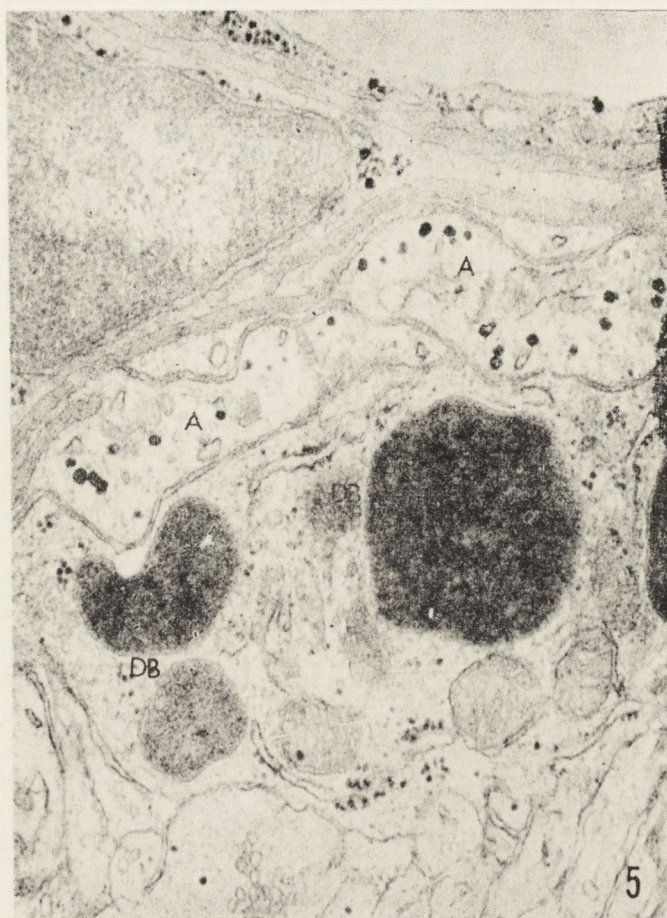


Fig. 5. Fifteen-min ischemia. A fragment of cytoplasm of the perivascular microglial cell. DB — dense body, A — perivascular astrocytic processes. $\times 40\,000$.

Ryc. 5. Niedokrwienie 15-min. Fragment cytoplazmy okołonaczyniowej komórki mikrogleju. DB — ciało gęste, A — okołonaczyniowe wypustki astrocytów. Pow. $40.000 \times$.

vascular processes, while oligodendrocytes and microglial cells hardly differ from those in the control animals.

Reaction of astrocytes during short-term ischemia may be explained by their position in the structural organization of the central nervous system mostly their direct contact with the capillaries. It is known that the astrocytes participate in controlling the water-salt homeostasis and in the transport of metabolites from the blood to neurons (Gerschenfeld et al., 1959; Rubinstein et al., 1962). Therefore the astrocytes, coating 85% of the surface of the capillaries respond in the first place to the drastic circulatory disturbances.

Electron microscopic studies have shown that under various experimental conditions glycogen granules accumulate in cytoplasm and processes of astrocytes (Maxwell, Kruger, 1965; Vaughn, Pease, 1970; Wong-Rilley, 1972). During short-term ischemia, accumulation of glycogen was not observed. However, after 3 min ischemia an increase of glycogen content in some processes and a decrease in others were observed.

According to Yu et al. (1972) during hypoxia there is an increase in the number of gliofilaments, both in the astrocytic processes and perinuclear region. Our experiments, on the contrary, revealed a slight reduction of the number of gliofilaments in altered astrocytes.

The results of the investigation have shown that during a short-lasting circulatory hypoxia the reaction of microgliocytes is only slightly pronounced. Previous studies have shown that more obvious ultrastructural changes appeared in pericytes (Tsitsishvili, 1977).

Some authors (Vaughn, Pease, 1970; Fernando, 1971; Wong-Rilley, 1972) have reported that in various pathological conditions the pericytes and the microgliocytes may transform into phagocytes. The more pronounced reaction of pericytes than that of microgliocytes may be ascribed to the fact that the circulatory hypoxia of the brain disturbs in the first place the capillaries.

Acknowledgement: The authors are indebted to M. Varazishvili, Laboratory of Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation, for carrying out the experiments on cerebral ischemia in rabbits, and to Miss Ninell Skhirtladze for her help in the preparation of the manuscript.

E. I. Dzamoewa, I. K. Svanidze, I. L. Lazriev, A. Sh. Tsitsishvili

WPLYW NIEDOTLENIEŃ KRAŻENIOWEGO (NIEDOKRWIENIA) NA ULTRASTRUKTURĘ KOMÓREK GLEJOWYCH KORY MÓZGU KRÓLIKA

Streszczenie

Badano zmiany ultrastrukturalne zachodzące w gleju kory mózgu królika w warunkach niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia) trwającego 3, 7 i 15 minut. Zmiany w komórkach glejowych mają wyraźnie ogniskowy charakter. Ze wszystkich rodzajów gleju najbardziej labilne wydają się astrocyty. Po niedokrwieniu 3-min zaznacza się obrzmienie zarówno perikarionów jak i wypustek niektórych astrocytów, a także wyraźny wzrost zawartości glikogenu w niektórych wypustkach, a zmniejszenie w innych. Po niedokrwieniu 7- i 15-min zmiany w astrocytach narastają. Reakcja oligodendrocytów i mikrogleju jest wyrażona słabiej i polega na wydłużeniu i zwiększeniu ilości cystern siatki śródplazmatycznej, ciał gęstych oraz innych organelli cytoplazmatycznych.

Э. И. Дзамоева, И. К. Сванидзе, И. Л. Лазриев, А. Ш. Цицишвили

ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛЯТОРНОЙ ГИПОКСИИ (ИШЕМИИ) НА ТОНКУЮ
СТРУКТУРУ НЕЙРОГЛИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКА

Резюме

Изучены ультраструктурные сдвиги, возникающие в нейроглии коры головного мозга кролика при циркуляторной, гипоксии (ишемии) 3, 7 и 15 минутной длительности. Изменения в нейроглиальных клетках носят резко выраженный очаговый характер. Из всех видов глии наиболее лабильными структурами являются астроциты. При 3 минутной ишемии отмечается набухание как сомы, так и отростков некоторых астроцитов, а также резкое возрастание частиц гликогена в одних отростках и уменьшение — в других. При 7 и 15 минутной ишемии изменения в астроцитах нарастают. Реакция олигодендроцитов и микроглиоцитов выражена слабее и проявляется в некотором удлинении и увеличении количества цистерн эндоплазматической сети, плотных тел и других цитоплазматических органелл.

REFERENCES

1. Arsenio-Nunes M. L., Hossmann K. A., Farkas-Bargeton E.: Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 329—344.
2. Bogolepov N. N.: Pathomorphological changes of interneuronal contacts in experimental hypoxia. *Zh. Nevropat. Psykhiat. Korsakov*, 1972, 72, 1652—1655.
3. Domańska-Janik K., Wideman J., Lazarewicz J., Majewska D.: Effect of circulatory hypoxia on some metabolic processes in the brain. *Neuropat. Pol.* 1977, 12, 643—654.
4. Fernando D. A.: The third glial cell in retrograde degeneration of hypoglossal nerve. *Brain Res.* 1971, 27, 365—368.
5. Gerschenfeld H. M., Wald F., Zadunaisky J. A., Robertis E. D.: Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system. *Neurology*, 1959, 9, 412—425.
6. Hyden H.: Biochemical and functional interplay between neuron and glia. *Recent Advances Biol. Psychiat.* 1964, 6, 31—54.
7. Lazriev I. L., Svanidze I. K., Tsitsishvili A. Sh., Dzamoewa E. I.: Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on fine structure of neurons and synapses of the rabbit cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 351—368.
8. Maxwell D. S., Kruger L.: The fine structure of astrocytes in the cerebral cortex and their response to focal injury produced by heavy ionizing particles. *J. Cell Biol.* 1965, 25, 141—156.
9. McGee-Russell S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
10. Mchedlishvili G. J.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
11. Olsson V., Hossmann K. A.: The effect of intravascular saline perfusion on the sequelae of transient cerebral ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 17, 68—79.
12. Pevzner L. Z.: Functional biochemistry of neuroglia. Ed. „Nauka”, 1972.

13. Reynolds T. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963, 17, 208—212.
14. Roitbak A. I.: Hypothese on the mechanism of formation of temporal contacts. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 1969, 187, 1205—1208.
15. Roitbak A. I., Labakhua T. Sh.: Direct cortical responses during circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 683—692.
16. Rubinstein L. Y., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observation on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1962, 21, 116—145.
17. Svanidze I. K., Museridze D. B.: Changes in cytoplasmic RNA content and nuclear dry mass of the cortical neurons and glia in the postischemic period. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 635—642.
18. Tsitsishvili A. Sh.: The influence of ischemia on the ultrastructure of capillaries of the cerebral cortex. *Proc. Acad. Sci. Georgian SSR*, 1977, 3, 141—147.
19. Vaughn I. E., Pease D. C.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. *J. comp. Neurol.* 1970, 140, 175—184.
20. Wong-Rilley M. T.: Terminal degeneration and glial relations in the lateral geniculate nucleus of the squirrel monkey after eye removal. *J. comp. Neurol.* 1972, 144, 61—62.
21. Yu M. G., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 235—244.

Authors' address: Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, U.S.S.R., Tbilisi, 380060, Gothua Str. 14.

N. N. MELITAURO, V. N. CHIKVAIDZE, L. N. NIKOLAISHVILI

CHANGE IN THE CONTENT OF FREE AMINO ACIDS
IN THE BRAIN OF RABBITS UNDER CIRCULATORY HYPOXIA
(ISCHEMIA) *)

Departments of Neurochemistry and Physiology and Pathology of Cerebral Blood Circulation, Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

Head of Department of Neurochemistry: Prof. dr P. A. Kometiani. Head of Department of Physiology and Pathology of Cerebral Blood Circulation: Prof. dr G. I. Mchedlishvili

Complete discontinuation or reduction of oxygen supply to the brain induces primarily energetic substrate deficiency with subsequent impairment of basic metabolic processes. The rate and character of changes produced by ischemia are determined first of all by its duration. Short-term (30 sec) decapitative brain ischemia in mice is accompanied by a decrease in the amount of ATP and lactate and an increase in the glucose and glycogen content, with invariable phosphocreatine (Gatfield et al., 1966). Ischemia of longer duration (10 min) (Lowry et al., 1964) decreases the content of glucose, G-6-P, ATP and phosphocreatine, with a simultaneous accumulation of lactate. Long-term ischemia (2 hrs) leads to consumption of all energetic substrates (Gercken, Preuss, 1969) followed by irreversible changes of structural elements in the cells. Deficiency of energy in the brain has a considerable effect on the metabolism of amino acids as well.

There are some references to disturbances in the distribution of amino acids in the brain during ischemia (Thompson et al., 1950; Tews et al., 1963).

Our investigations were aimed to elucidate the effect of ischemia on the distribution of 22 free amino acids in the brain of rabbits. Experiments were carried out during ischemia and in postischemic period. Our task was to describe the pattern of changes in the content of amino acids produced by ischemia.

*) Presented at the 2nd Symposium on Cerebral Ischemia, Tbilisi, September, 1-5, 1976.

Table 1. The changes of distribution of amino acids (nmoles/g tissue) in the cortex of rabbit brain during ischemia and postischemia (the mean value is given from 5—6 experiments)

Tabela 1. Zmiany w dystrybucji aminokwasów (nmole/g tkanki) w korze mózgu królika w czasie niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu (wartości średnie obliczone z 5—6 doświadczeń)

Experimental conditions Warunki doświadczenia	Glutamate Glutaminian	Glutamine Glutamina	Aspartate Asparaginian	Asparagine Asparagina	GABA	Alanine Alanina	Glycine Glicyna
Control Kontrola	5.86 ± 0.48	3.75 ± 0.29	2.34 ± 0.88	0.13 ± 0.008	1.67 ± 0.28	1.26 ± 0.28	0.48 ± 0.04
Ischemia 3 min Niedokrwienie	6.71 ± 0.62	2.19 ± 0.5 ⁺	3.19 ± 0.25	0.14 ± 0.009	3.42 ± 0.37 ⁺	3.45 ± 0.46 ⁺	0.43 ± 0.08
Ischemia 15 min Niedokrwienie	8.08 ± 0.64 ⁺	2.39 ± 0.15 ⁺	3.54 ± 0.11 ⁺	0.15 ± 0.008	2.12 ± 0.42	1.67 ± 0.23 [×]	0.35 ± 0.04
Postischemia 30 min Po niedokrwieniu	5.71 ± 0.33 [*]	4.08 ± 0.26 [×]	2.63 ± 0.36 [*]	0.15 ± 0.02	1.95 ± 0.24 [×]	2.16 ± 0.19 ⁺	0.45 ± 0.06

Statistically significant difference from: + — control; × — ischemia 3-min; * — ischemia 15 min.

Różnica statystycznie znamienna w stosunku do: + — kontrola; × — niedokrwienie 3 min; * — niedokrwienie 15 min.

Table 2. The changes of distribution of amino acids (nmoles/g tissue) in the cortex of rabbit brain during ischemia and postischemia (the mean value is given from 5—6 experiments)

Tabela 2. Zmiany w dystrybucji aminokwasów (nmole/g tkanki) w korze mózgu królika w czasie niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu (wartości średnie obliczone z 5—6 doświadczeń)

Experimental conditions	Cystine + Cysteine	Taurine	Proline	Valine	Serine	Threonine	Methionine
Warunki doświadczalne	Cystyna + Cysteina	Tauryna	Prolina	Walina	Seryna	Treonina	Metionina
Control Kontrola	3.15 ± 0.14	0.70 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.73 ± 0.05	0.22 ± 0.008	0.27 ± 0.03
Ischemia 3 min. Niedokrwienie	2.06 ± 0.22 ⁺	1.39 ± 0.08 ⁺	0.45 ± 0.07	0.37 ± 0.05	0.66 ± 0.11	0.21 ± 0.01	0.56 ± 0.03 ⁺
Ischemia 15 min. Niedokrwienie	2.50 ± 0.11 ⁺	0.94 ± 0.08 ^{+×}	0.54 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.53 ± 0.03 ⁺
Postischemia 30 min. Po niedokrwieniu	3.811 ± 0.34 ^{+×} *	0.84 ± 0.05 ⁺	1.02 ± 0.09 ^{+×} *	0.39 ± 0.03	0.81 ± 0.06	0.21 ± 0.01	0.37 ± 0.04 [×] *

Statistically significant difference from: + — control; × — ischemia 3-min; * — ischemia 15 min.

Różnica statystycznie znamienne w stosunku do: + — kontrola; × — niedokrwienie 3 min; * — niedokrwienie 15 min.

MATERIAL AND METHODS

The experiments involved rabbits weighing 2—2.5 kg. Ischemia of the brain was induced by discontinuation of blood flow through carotid arteries with simultaneous reduction of the systemic blood pressure. After 15 min ischemia normal circulation was restored. The used model of ischemia and operation technique were described by Mchedlishvili (1973). Blocks from the cerebral cortex of rabbits were taken for analysis on the third and fifteenth minutes of ischemia and at end of post-ischemic period lasting 30 minutes.

The method of thin-layer chromatography of dansyl-derivatives of amino acids was used for quantitative determination (Chilingarov, Komietiani, 1974).

Assay of amino acids

After operation the brain was frozen with a mixture of dansyl and alcohol, then 150 mg of tissue was homogenized in 1% picric acid. The homogenate was centrifuged at $5\,000 \times g$ for 15 min and the supernatant fraction was transferred to a Dowex 2×8 (200—400 mesh) column. The column was eluted with 3 ml of 0.02 N HCl. The eluate was eva-

Table 3. The changes of distribution of amino acids (nmoles/g tissue) in the cortex of rabbit
Tabela 3. Zmiany w dystrybucji aminokwasów (nmole/g tkanki) w korze mózgu królika w czasie

Experimental conditions		Cystidine	Arginine	Lysine
Warunki doświadczalne		Cystydyna	Arginina	Lizyna
Control Kontrola		0.25 ± 0.02	1.40 ± 0.07	0.33 ± 0.01
Ischemia Niedokrwienie	3 min.	$0.36 \pm 0.02^+$	$2.75 \pm 0.16^+$	0.38 ± 0.03
Ischemia Po niedokrwieniu	15 min.	$0.26 \pm 0.02^\times$	$1.50 \pm 0.12^\times$	0.34 ± 0.03
Postischemia Po niedokrwieniu	30 min.	$0.33 \pm 0.02^{+*}$	$1.52 \pm 0.12^\times$	$0.25 \pm 0.02^{+*}$

Statistically significant difference from: + — control; \times — ischemia 3-min; * — ischemia
Różnica statystycznie znamienne w stosunku do: + — kontrola; \times — niedokrwienie

porated and added to 0.5 ml of 0.4 M NaHCO₃ and 0.5 ml of dansyl/dimethylamino-naphthalin-5-sulfocholin/acetone (6 mg + 1 ml) and the mixture was incubated for 90 min at 30°.

After incubation 3 ml of acetone was added to the mixture and centrifuged at 3 000 × g for 15 min. The supernatant fraction was evaporated and added to 20 μl of mixture of 0.2 N acetic acid and acetone (1 : 1). Four μl of the solution was transferred to a plate with silicagel (Woelm, TLC) for chromatography. The following solution were used: I direction — 0.5% butanol — ammonia (1 : 1); II direction — chloroform — metanol — acetic acid (95 : 5 : 2). After chromatography the dansyl-derivatives of amino acids were densitometered.

RESULTS AND DISCUSSION

Our experimental data are presented in tables 1 to 4.

The metabolism of amino acids in the brain is characterized by a number of peculiarities. First, it is expressed in their metabolic activity. Furthermore, the fact that some of the amino acids play the role of neurotransmitters (glutamate, aspartate, GABA, glycine, proline, tau-

brain during ischemia and postischemia (the mean value is given from 5—6 experiments) niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu (wartości średnie obliczone z 5—6 doświadczeń)

Leucine	Isoleucine	Tryptophan	Phenylalanine	Tyrosine
Leucyna	Izoleucyna	Tryptofan	Fenylolanina	Tyrozyna
0.25 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.003	0.35 ± 0.03	0.25 ± 0.03
0.40 ± 0.04 ⁺	0.25 ± 0.03 ⁺	0.15 ± 0.009	0.42 ± 0.05	0.20 ± 0.03
0.28 ± 0.03 [×]	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.09	0.33 ± 0.04	0.20 ± 0.02
0.30 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.008 ^{+×} *	0.17 ± 0.02 ^{+×} *	0.27 ± 0.01*

15-min

3 min; * — niedokrwienie 15 min.

Table 4. Changes in the $\frac{\text{Glu} + \text{Asp}}{\text{GABA} + \text{Gly} + \text{Tau}}$ ratio under ischemia and postischemia

Tabela 4. Zmiany stosunku $\frac{\text{Glu} + \text{Asp}}{\text{GABA} + \text{Gly} + \text{Tau}}$ w czasie niedokrwienia i w okresie po niedokrwieniu

Control Kontrola	3 min	ischemia niedokrwienia	15 min	ischemia niedokrwienia	30 min	postischemia po niedokrwieniu
		2.88	1.89	3.41		2.57

Results calculated from the data of Tables 1 and 2.

Wyniki obliczone z danych zawartych w Tabelach 1 i 2.

rine) or are the precursors of biogenic amines (tyrosine, tryptophan) is of a great importance. In energetics of the nervous tissue amino acids play also a special role. As known, the major proportions of glucose in the process of oxidation becomes converted into amino acids which in further reductions are used as energetic material. All these facts suggest that disturbances in metabolism of amino acids must affect the functional activity of the brain (Kometiani, 1967).

The first minute of ischemia (Ljunggren et al., 1974 b) is accompanied by α -ketoglutarate consumption, while after 4 min ischemia there is a decrease of pyruvate level, which affects the glutamate and alanine levels, respectively.

Mikhailov (1971) discussing the relation of amino acids to the citric acid circle during hypoxia concluded a great sensitivity of decarboxylation of pyruvate and partially α -ketoglutarate to hypoxia. Inhibition of decarboxylases of these acids during hypoxia certainly applies to amino acids decarboxylases as well. There exists a reference to a considerable effect of ischemia and hypoxia on the activity of dioxyphenylalanine and 5-oxytryptophane decarboxylase (Davis, Carlson, 1973; Roger et al., 1974). Other activities of interest are those of aspartate and alanine aminotransferase (Witten et al., 1970). This fact explains the intensity of α -ketoglutarate consumption in glutamate synthesis (Ljunggren et al., 1974 b).

Some other authors have observed an increase of glutamate content during anoxia (Tews et al., 1963). According to our data (Table 1) glutamate level is the highest by the 15th minute of ischemia. On the third minute only a tendency to its increase is observed. The increase of glutamate content during ischemia may be explained in a number of ways: 1) the utilization of glutamate as oxidation substrate during ischemia may be inhibited, 2) increased production of ammonia from glutamine and nucleotides may stimulate its involvement in the synthesis of glu-

tamate and α -ketoglutarate, 3) glutamate content may be increased as a result of enhanced glutamine decay.

Elliott and Levell (1962) assumed that GABA accumulation observed during anoxia and decapitation may be related to activation of glutamic acid decarboxylase. This enzyme catalyzes GABA formation and its activity is preserved under anaerobic conditions. There exists a contradictory opinion, however, Kometiani et al. (1969) observed a decrease in the amount of GABA during ischemia, which correlated with the changes in the glutamic acid decarboxylase and gamma-aminobutyric- α -ketoglutaric acid transaminase activities.

In our experiments the increase of GABA level by the third minute of ischemia (Table 1) is consistent with the reported enhancement of glutamate decarboxylation. A marked increase of GABA under hypoxia and anoxia has been observed by other authors as well (Levell, Elliott, 1963; Woog et al., 1968; Tews et al., 1963).

The controversy of our data to those of Kometiani and others must be explained by differences in the experimental conditions and applied methods. It is known (Ljunggren et al., 1974b) that ischemia causes increased ammonia production in the cerebral tissue. Glutamine, nucleotide and protein amid groups may be the sources of ammonia. On the ground of our data we may assume that the decrease in the amount of glutamine during 3 min ischemia is conditioned by its deamidation.

Glutamate accumulation could have been expected correspondingly, but was not observed. A statistically insignificant increase of glutamate level noticed in this period of ischemia may be caused by the fact that glutamate obtained from glutamine undergoes decarboxylation with GABA formation. An increase in the amount of taurine was observed, accompanied by the decrease of the amount of cystine + cysteine (Table 2). This result indicates an enhancement of taurine synthesis.

Alanine is an amino acid closely connected with citric acid circle. According to our data, the content of this amino acid increases during 3 min ischemia and decreases thereafter. The possibility of alanine and pyruvate synthesis during hypoxia was suggested by Tews et al. (1963), and Yoshino and Elliott (1970). These authors and Mikhailov (1971) observed an increase in the alanine content. All these facts are indicative of an increased biosynthesis of a number of amino acids in nerve cells during ischemia.

In our experiments ischemia did not produce quantitative changes of amino acids which participate in the synthesis of biogenic amines (Table 3). A marked decrease of tryptophan in the brains of rats during 7.5 min ischemia was observed by Roger et al. (1974). Other investigations have pointed at a decrease or absence of changes in the content

of tyrosine, tryptophan and phenylalanine (Tews et al., 1963; Thompson et al., 1950).

As observed earlier (Chikvaidze, Melitauri, 1974), ischemia produced considerable alterations in the distribution of biogenic amines in the brain, in particular a decrease of adrenaline, dopamine and serotonin content. According to the data obtained in our study the decrease of above mentioned amines does not correlate with the changes of distribution of amino acids which are used in their biosynthesis. Studying the influence of hypoxia on the distribution of amines, Davis and Carlsson (1973) and Roger et al. (1974) observed inhibition of both tyrosine, and tryptophan hydroxylase activities. In the same investigations there are data about the inhibition of monoaminooxidase. Unidirectional changes of the activity of enzymes determining the level of biogenic amines conform to the data of the same authors about the absence of changes in the content of biogenic amines during hypoxia.

The decrease of these compounds discovered by us may be connected with dissimilar inhibition of hydroxylase and monoaminooxidase.

A 15-minute ischemia has only a slight influence on the distribution of amino acids, However, an increasing tendency after 3-minute ischemia is preserved with respect to glutamate and aspartate. The cause of this phenomenon must be sought in the metabolic activity of the above mentioned amino acids.

Changes in the distribution of irreplaceable amino acids are given in Tables 2, 3. The content of a majority of them increases up to the third minute, and thereafter decreases. In the literature there is a reference to the fact that a postmortem increase of the content of some amino acids may be explained partially by non-compensated proteolysis (Lajtha, Toth, 1974). More detailed investigations are needed to prove this explanation.

In the process of restoration of blood circulation after ischemia a retreat of changes in the amino acids takes place. A 30-minute postischemic period was long enough to normalize the levels of the majority of amino acids. Kometiani et al. (1976) considered the rate of changes of the ratio of excitatory and inhibitory amino acids in the brain as a manifestation of the changes of functional condition of the nervous system. The authors studied the change of the ratio of the sum of glutamate and aspartate to that of glycine and GABA. They assumed that the increase of this ratio may express intensification of excitation processes whereas the decrease of the ratio — intensification of inhibition processes.

It is known that the electric activity of the brain is decreased during ischemia (Ljunggren et al., 1974a), which is not fully restored up to the third hour of postischemia. Studying ischemia with the Mchedlish-

vili's model, Roitbak and Labakhua (1974) came to the conclusion that a complete restoration of the rate of biopotentials does not occur within two hours of postischemic period.

As shown in Table 4, 3-minute ischemia produces a decrease of the ratio of the sum of glutamate and aspartate to that of GABA, glycine and taurine. After 15-minute ischemia the increase of the ratio of amino acids takes place, but as has been mentioned above, the bioelectric activity of the brain is not restored. In the postischemic period the ratio reaches the control level.

N. N. Melituari, V. N. Chikvaidze, L. N. Nikolaishvili

ZMIANY ZAWARTOŚCI WOLNYCH AMINOKWASÓW W MÓZGU KRÓLIKÓW W WARUNKACH NIEDOKRWIENIA

Streszczenie

Badano zmiany w dystrybucji 22 aminokwasów w korze mózgu królików w czasie niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia), oraz w okresie po niedokrwieniu. Znaczne zmiany w zawartości aminokwasów stwierdzono w czasie niedokrwienia trwającego 3 min. Przy 15-minutowym niedokrwieniu zmiany te były wyrażone słabiej. Na początku okresu niedotlenienia stwierdzono spadek zawartości glutaminy i cystyny-cysteiny. Natomiast zawartość GABA, alaniny, tauryny, metioniny oraz szeregu aminokwasów egzogennych wzrastała. Stwierdzono korelację między zmianą stężeń glutaminy, glutaminianu i GABA.

W czasie 15-minutowego niedokrwienia wzrasta zawartość glutaminianu, a zmniejsza się zawartość alaniny, leucyny, histydyny i tauryny. Przy końcu okresu powrotu do normy (30 min.) stężenia większości aminokwasów osiągają poziom kontrolny.

Stwierdzono zmianę stosunku sumy glutaminianu i asparaginianu do sumy glicyny, GABA i tauryny. Na początku okresu niedokrwienia stosunek ten zmniejsza się, przy końcu tego okresu wzrasta, natomiast w okresie poniedokrwicznym wraca do wartości kontrolnych. Niedokrwienie wywołuje zahamowanie czynnościowej aktywności mózgu, co objawia się spadkiem wzajemnego stosunku stężeń wymienionych aminokwasów w początkowej fazie niedokrwienia.

Н. Н. Мелитаури, В. Н. Чикваидзе, Л. Н. Николайшвили

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ

Резюме

Было изучено изменение распределения 22 аминокислот в коре головного мозга кроликов при циркуляторной гипоксии (ишемии) и постишемии. Обнаружены существенные изменения в содержании аминокислот при трёхминутной ишемии. При пятнадцатиминутной ишемии эти изменения менее выражены. В начале ишемии наблюдали достоверное уменьшение концентрации глутамина

и цистин + цистеина. ГАМК, аланин, таурин, метионин и ряд незаменимых аминокислот увеличиваются. Была найдена корреляция в изменениях содержания глутамина, глутамата и ГАМК. При пятнадцатиминутной ишемии повышается уровень глутамата а уровень аланина, лейцина, гистидина и таурина уменьшается. К концу восстановительного периода (30 мин.) количество большинства аминокислот нормализуется.

Было прослежено изменение отношения суммы глутамата и аспартата к сумме глицина, ГАМК и таурина. В начале ишемии это соотношение уменьшается, в конце — увеличивается, а в период постишемии приближается к контролю. Ишемия как патологический процесс вызывает торможение функциональной активности головного мозга, что выявляется в уменьшении соотношения указанных аминокислот в начале ишемии.

REFERENCES

1. 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.
2. Chilingarov A. O., Kometiani P. A.: Modification of ultramicroindication of amino acids and biogenic amines in the brain from dansyl derivatives. *Vopr. med. Khim.* 1974, 20, 31—37.
3. Davis J. N., Carlsson A.: Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanaesthetized rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 20, 913—915.
4. Elliott K. A. C., Levell R.: The GABA and factor I content of brain. *Fed. Proc.* 1962, 21, 364.
5. Gatfield P. D., Lowry O. H., Schulz D. W., Passonneau J. V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischemia and anesthesia. *J. Neurochem.* 1966, 13, 185—195.
6. Gercken G., Preuss H.: The effect of breathing oxygen on the metabolism of the rat brain under normal and ischemic conditions. *J. Neurochem.* 1969, 16, 761—767.
7. Kometiani P. A.: Amino acids metabolism in the brain. In: *Amino acids metabolism.* Tbilisi, 1967, 99—121
8. Kometiani P. A., Aleksidze N. C., Klein E. E.: On participation of genetic apparatus in the memory phenomena. *Fiziol. Zh. SSSR Sechenov*, 1967, 62, 10—21.
9. Kometiani P. A., Chikvaidze V. N., Svanidze I. K., Mchedlishvili G. I.: Effect of ischemia on some metabolic processes in the central nervous system. In: *Correlation of the blood supply with the metabolism and function.* Tbilisi, 1969, 201—211.
10. Lajtha A., Toth J.: Postmortem changes in the cerebral free amino acid pool. *Brain Res.* 1974, 76, 546—551.
11. Levell R., Elliott K. A. C.: The gamma-aminobutyric acid and factor I content of brain. *J. Neurochem.* 1963, 10, 479—488.
12. Ljunggren B., Ratcheson R. A., Siesjö B. B.: Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.* 1974a, 73, 291—307.
13. 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.* 1974b, 73, 277—289.
14. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X., Schulz D. W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 18—30.

15. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
16. Mikhailov G. A.: Influence of hypoxia on the amino acids turnover, connected with the Krebs cycle in the brain and the liver. *Bulletin of the University of Leningrad*, 1971, 4, 94—101.
17. Roger M., Brown J., Carlsson A., Ljunggren B., Siesjö B., Sinder S.: Effect of ischemia on monoamines metabolism in the brain. *Acta Physiol. Scand.* 1974, 90, 789—791.
18. Roitbak A. I., Labakhua, T. S.: Direct cortical responses during circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral cortex. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 683—692.
19. Tews J. K., Carter S. H., Roa P. D., Stone W. E.: Free amino acids and related compounds in dog brain. Post-mortem and anoxic changes, effect of ammonium chloride infusion and levels during seizures induced by picrotoxin and by pentulenetetrazol. *J. Neurochem.* 1963, 10, 641—653.
20. Thompson H. T., Schurr P. E., Henderson L. M., Elvehjem C. A.: The influence of fasting and nitrogen deprivation on the concentration of free amino acids in rat tissue. *J. Biol. Chem.* 1950, 182, 47—53.
21. Whitten B. K., Burlington R. F., Posiviata M. A., Sidel C. M., Reeher G. R.: Amino acid catabolism in environmental extremes: effect of high altitude and calories. *Amer. J. Physiol.* 1970, 218, 1346—1350.
22. Woog J. D., Watson W. J., Ducker A. J.: The effect of hypoxia on brain gamma-aminobutyric acid level. *J. Neurochem.* 1968, 15, 603—608.
23. Yoshino Y., Elliott K. A. C.: Incorporation of carbon atoms from glucose into free amino acids in brain under normal and altered conditions. *Canad. J. Biochem.* 1970, 48, 228—235.

Authors' address: Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, U.S.S.R., Tbilisi, 380060, Gothua Str. 14.

GEORGE I. MCHEDLISHVILI

A NOTE ON THE USE OF THE SYSTEM'S APPROACH
IN PLANNING AND COORDINATION OF JOINT STUDIES
OF CEREBRAL ISCHEMIA ***)

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

An increasing tendency of dividing the problems under investigation, possibly due to a growing complexity of the applied methods, seems to emerge in the field of the present biomedical research. Thus, the topics of study by individual researchers are getting more and more specified. This entails a situation when researchers wander off the course while pursuing their basic line. The result is that the choice of the topics to be investigated is actually becoming incidental from the point of view of the solution of the basic problem to be solved. Such a research cannot offer significant results either in fundamental solutions of the scientific problems, or in further applied studies, the results of which could be subsequently introduced into practical medicine.

In such a situation researchers taking up topics for investigations are very often led not by the significance of the problem, as a whole, but by purely arbitrary reasons, e.g. by the availability of techniques in a given laboratory, by traditional methods of a given research group, etc. This probably is the reason for a common and frequently useless doubling of studies on similar problems, vividly reflected in scientific periodicals. This leads to accumulation of results which do not further contribute to the solution of a given problem. At the same time many points being actually vitally important drop out of the focus of the researchers' attention thus becoming unsolved items. There are many examples illustrating tangible slowing-down (for years, sometimes even for decades) in the process of reaching the solution of an important biomedical problem, indicating a low effectivity of individual researchers or scientific groups engaged in the project.

*) Presented at the 2nd Symposium on Cerebral Ischemia, Tbilisi, September, 1—5, 1976.

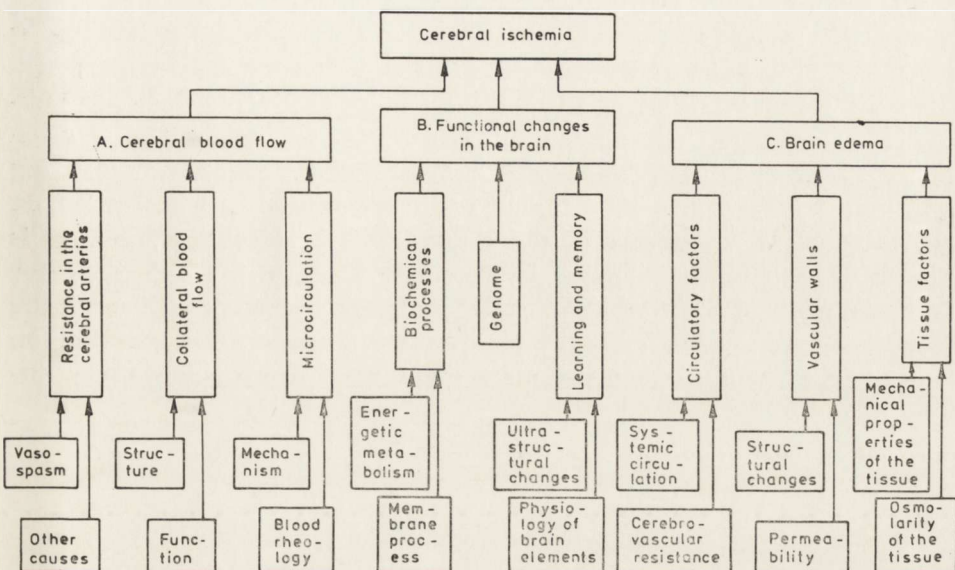
**) The Editors consider a number of ideas presented in this article as highly disputable and would be obliged to the readers for comments and discussion.

The main cause for such a situation is, in our belief, that the world's research in the biomedical field is neither efficiently planned, nor coordinated. This seems to be not a result of the researchers' reluctance to have their works efficiently coordinated, but of the impossibility to obtain such a coordination under conditions when only the traditional approaches remain still universal in the field of research. The only way out in this situation is, in our opinion, the application of the systems' approach (along with traditional ones) which may allow to reach effective planning of the research. This seems to be especially important in the biomedical field where the peculiarity of the subject of the research is that it represents always a more or less complicated system in which, on one hand, the structure and function of the constituents are characterized by an immense variety and, on the other, there is a great complexity in the relations between these constituents. Meanwhile the methods applied in the modern biomedical research make it possible to investigate only isolated processes which, in reality, do not and cannot exist isolated in the actual biological system.

Presently it seems probable that the necessity of using the systems' approach in the biomedical research is largely understood by many outstanding researchers. That it has not been applied yet, probably results from the lack of its definite formalization for practical use in the biomedical research. This problem had been considered earlier by the author's friend, an expert in the systems research, Dr. Furtaz Babunashvili and gradually found a formalized outline. Actually, on the base of the systems' analysis of the problem under investigation a method was developed jointly by both of us. In particular this permits a better understanding of the ways of effective planning and executing the complex investigations of the cerebral ischemia being jointly carried out by the Medical Research Center of the Polish Academy of Sciences and the I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, U.S.S.R.

The use of the systems' approach in the organization of the research means that the individual topics are chosen and planned only with the aim of solving the whole problem. First of all the systems' analysis of the whole problem should be carried out to find out which of the topics are necessarily to be investigated and how they should be reasonably distributed among the laboratories and the researchers participating in the work. The systems' analysis should include the following three stages: First stage: Plotting the general graph of the problem that specifies all its constituents (subproblems) to be elucidated for the solution of the whole problem (Graph 1). The problem — „Cerebral ischemia” in the present case — is indicated in the initial (upper) block.

In the blocks placed below and divided into several levels (I, II, III) the subordinated particular problems (subproblems) are listed. In each case the pointers show which subproblems are to be settled to reach the solution of the problem, or subproblem, of the respective level.



Graph 1. General graph of the problem "Cerebral ischemia" showing which subproblems are to be investigated to reach the solution of the problem as a whole.

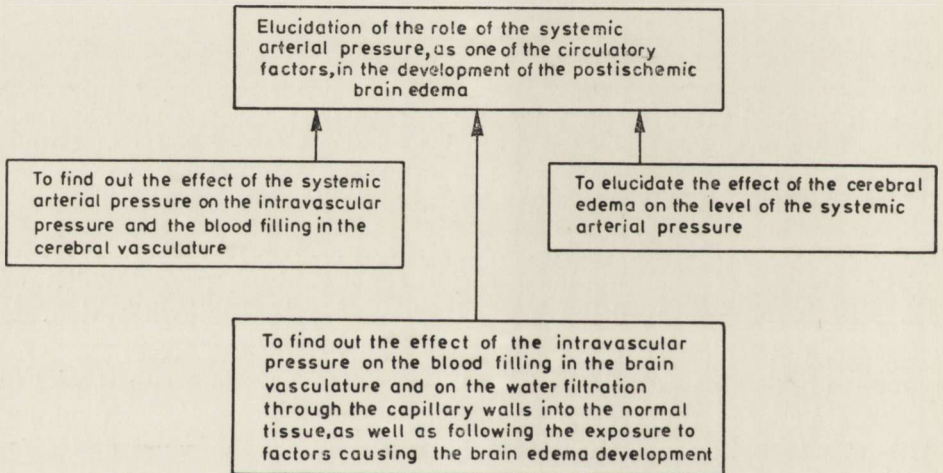
Wykres 1. Zbiorcze przedstawienie problemu „Niedokrwienie mózgu” ze wskazaniem podproblemów, które powinny być badane w celu rozwiązania całości problemu.

The graphs of the problems recall functional diagrams which are often designed for a visual presentation of interrelations which, for example, determine regulation of functions in the organism, or development of some pathological process. However, there is a substantial difference between the graphs of problems and the functional diagrams. Although in both cases, there are pointers showing the cause and effect relations, in the graphs of problems the pointers indicate only the subproblems to be investigated to reach the solution of the respective problem, or subproblem of the upper level. Besides, in the graphs of problems, unlike the functional diagram, the sequence of the links functioning under the real conditions, i.e. in what sequence are the individual subproblems to be studied, is insignificant.

In the complex investigations of a problem such graphs help, in particular, to find out which laboratories may participate in the study of

individual subproblems. On the other hand, they help to find out where the interests of the different laboratories are coincident, i.e. where joint studies may be carried out and where a danger of unnecessary doubling of the same studies exists, and therefore a permanent coordination of their research is needed. A superfluously detailed graph of problems, with an excessive fractionation of the subproblems, is unnecessary, since this interferes with its use for an effective planning of the research.

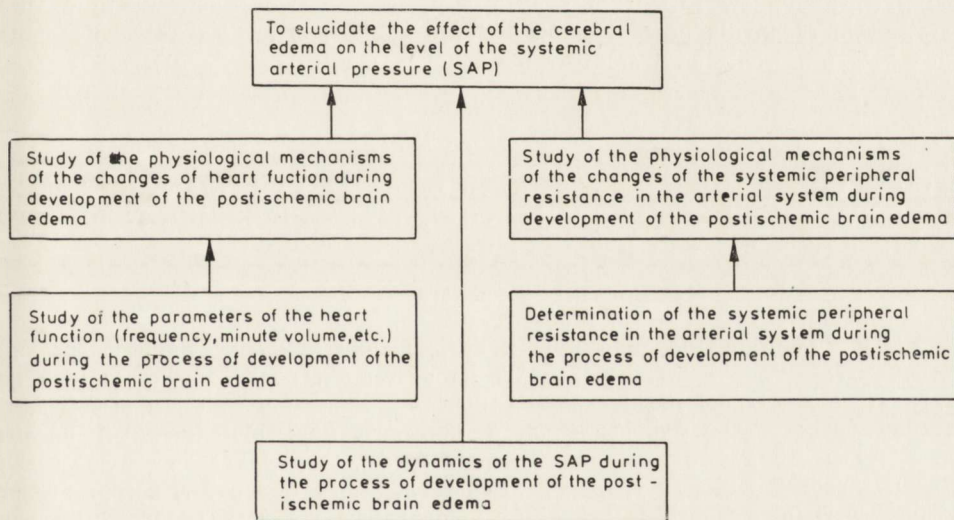
Second stage: Plotting of the graphs of the objectives for each subproblem where the individual objectives to be settled for the solution of the respective subproblems are enumerated (Graph 2). By plotting such graphs one has to ignore how the objectives are to be settled, in particular what methods are to be used for their solution, etc. It is reasonable to enumerate a possibly complete set of the objectives for each subproblem. This will not only contribute to the solution of the respective subproblem, but will also help to estimate the contribution of the particular studies to the understanding of the problem under investigation.



Graph 2. An example of the graph of the objectives for the solution of one of the subproblems of the 3rd level (see Graph 1); The elucidation of the role of the systemic arterial pressure, as one of the circulatory factors, in the development of the postischemic brain edema.

Wykres 2. Przykładowe przedstawienie zadań badawczych, które winny być podjęte w celu rozwiązania jednego z podproblemów 3-ego stopnia (patrz wykres 1); Wyjaśnienie roli układowego ciśnienia tętniczego, jako jednego z czynników krążeniowych, w powstawaniu poniedokrwiennego obrzęku mózgu.

Third stage: Plotting the graphs of the works which are aimed at settling each objective (Graph 3). These graphs should include all the works which are to be carried out, but, unlike the graphs of the problems and the graphs of the objectives, they show the sequence of the works to be carried out. The planning of the experiments is actually nothing but a bond between the graphs of the objectives and the graphs of the works. The latter should contain the following information (adequately detailed): a) what methods are to be used and what experiments are to be carried out; b) what equipment and what number of experimental animals are needed; c) how many and what kind of researchers should participate in the experiments. As a result the graphs of works make possible to establish the personnel, finance and material requirements for the investigations. The graphs of the problems, of the objectives and of the works are to be plotted by specialists who are genuine experts in the field and have respectable knowledge of the principles of the systems' analysis of the scientific problems. To exclude from the graphs elements of involuntary subjectivism of the individual experts, the different opinions may be coordinated by the procedures known in the cybernetics.



Graph 3. An example of the graph of the works for the solution of the objective in the Graph 2; To elucidate the effect of the cerebral edema on the systemic arterial pressure.

Wykres 3. Przykładowe przedstawienie zadań badawczych, które powinny prowadzić do rozstrzygnięcia problemu przedstawionego na wykresie 2; Sposób postępowania przy wyjaśnianiu wpływu obrzęku mózgu na układowe ciśnienie tętnicze.

With the progress in the studies and accumulation of new data, further specification of the graphs will certainly be necessary, and this would entail corrections in the investigation programs. For this purpose regular contacts among the coordinators of the investigations are necessary, as well as their contacts with other experts which would judge how the research is carried out. The organizers of the complex investigations of the cerebral ischemia feel that the systems' approach may contribute considerably to an improvement of the efficiency of the joint investigations and thus increase their quality.

Author's address: Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, U.S.S.R., Tbilisi, 380060, Gothua Str. 14.

G. I. Mchedlishvili

W SPRAWIE WYKORZYSTANIA ANALIZY SYSTEMOWEJ W PLANOWANIU
I KOORDYNACJI BADAŃ NAD NIEDOKRWIENIEM MÓZGU

Streszczenie

Rozpatrzono metodę planowania i koordynacji kompleksowych badań nad niedokrwieniem mózgu, opartą na analizie systemowej i składającą się z trzech etapów, które zapewniają rozwiązanie całości problemu oraz wybór najbardziej obiecujących kierunków badań: a) analiza systemowa całego problemu; b) analiza systemowa zadań dla podproblemów każdego stopnia; c) analiza każdego zadania pod kątem widzenia sił i środków niezbędnych dla ich rozwiązania.

Г. И. Мchedlishvili

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМНОГО ПОДХОДА ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ
И КООРДИНАЦИИ СОВМЕСТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИСХЕМИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА

Резюме

Рассмотрен метод планирования и координации комплексных исследований ишемии головного мозга, основанный на системном подходе и состоящий из трех этапов, которые обеспечивают решение проблемы в целом и выбор наиболее перспективных направлений в исследованиях: а) системный анализ проблемы и составление соответствующего графа, б) составление графов задач для подпроблем каждого уровня и в) составление графов работ, которые дают возможность определить людские и материальные ресурсы, необходимые для проведения соответствующих исследований.

LUBOMIRA DYDYK, BARBARA WAŃKOWICZ, TADEUSZ SZRETER,
JADWIGA PROKOPCZYK

POZIOM KATECHOLAMIN W DOJRZEWAJĄCEJ KORZE MÓZGU KRÓLIKÓW PODDANYCH DZIAŁANIU NORMOBARYCZNEJ HIPEROKSJI

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr med. M. Dąbska
Zakład Farmakologii Instytutu Matki i Dziecka

Kierownik: dr n. biol. J. Prokopczyk
Oddział Intensywnej Terapii i Reanimacji Szpitala Klinicznego

im. Prof. M. Michałowicza w Warszawie
Ordynator: doc. dr med. T. Szreter

Toksyczne działanie hiperoksji jest znane od stu lat (Bert 1878), ale mechanizm uszkadzającego działania nadmiaru tlenu ciągle jeszcze jest nie wyjaśniony. Liczne prace poświęcone temu zagadnieniu wykazały, że w zespole toksycznego działania nadmiaru tlenu uczestniczą różnorodne czynniki, spośród których trzy odgrywają zasadniczą rolę: bezpośrednie działanie nadmiaru tlenu (Haugaard 1965; Lambersten 1965; Kraśnicka i wsp. 1967 a, b; Renkawek 1967; Wood i wsp. 1967; Haugaard 1968), wpływ układu przysadkowo-nadnerczowego (Bean, Smith 1953; Gerschman i wsp. 1954; Taylor 1958; Torbati i wsp. 1971) i wpływ układu nerwowego (Bean, Johnson 1955; Johnson, Bean 1957; Cerchia i wsp. 1957; Jacobs i wsp. 1972).

Prace Browna i Coxa (1966), Beana i wsp. (1966), Mc Sherna i Veitha (1968) sugerowały, że uszkodzenia płuc w hiperbarycznej hiperoksji są spowodowane pobudzeniem układu sympatycznego. Lauweryns i Cokerlaere (1973) stwierdzili w płucach ssaków obecność ciał neuro-epitelialnych (NEB), będących wewnątrzpłucnymi chemoreceptorami, które uzupełniają działanie chemoreceptorów centralnych i obwodowych. Ciała te reagują na hipoksję i wydzielają do układu naczyniowego serotoninę, która powoduje skurcz naczyń płucnych z następowymi zmianami w płucach.

Z prac Dydyk i wsp. (1976 a, b) wynika, że normobaryczna hiperoksja doprowadza w mózgach noworodków króliczych do niedokrwienia spowodowanego przez skurcz naczyń mózgowych. Stan ten rozwija się pod wpływem wysokiego ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi tętniczej i wysokiego poziomu amin katecholowych w mózgu. Brak wykształczonej bariery krew—mózg umożliwia przenikanie katecholamin z krwi do mózgu tych zwierząt. Dla sprawdzenia tych sugestii podjęto badania biochemiczne.

Bezpośrednim celem pracy było wykazanie wpływu normobarycznej hiperoksji na poziom katecholamin w korze mózgu noworodków króliczych, których mózg nie posiada wykształczonej bariery krew—mózg i w korze mózgu królików 20-dniowych, u których bariera krew—mózg jest już wykształcona.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 24 noworodkach króliczych i 24 królikach 20-dniowych. Spośród 24 noworodków, 4 służyły do badań w warunkach prawidłowych, 4 do badań kontrolnych w komorze powietrznej (wyniki badań grup kontrolnych odpowiadały normie), a pozostałe użyto do badań doświadczalnych w komorze tlenowej. W grupie królików 20-dniowych, 7 użyto do badań w warunkach prawidłowych, 4 do badań kontrolnych w komorze powietrznej (wyniki tych badań podobnie jak w grupie noworodków odpowiadały normie), a pozostałe służyły do doświadczeń w komorze tlenowej.

Stężenie tlenu w komorze tlenowej wynosiło średnio 91,5%. Stężenie dwutlenku węgla wahało się około 0,1%. Ciśnienie odpowiadało ciśnieniu barometrycznemu i wynosiło 1010,8—1017,4 hPa. Dokładny opis doświadczenia podano w pracy Dydyk i wsp. (1976 a).

Materiał do badań pobierano w narkozie eterowej. Do prowadzenia narkozy posługiwano się maską w kształcie małej komory, którą nakładano na głowę królika w taki sposób, że głowa wraz z szyją znajdowały się wewnątrz maski. Przez maskę przepuszczano tlen z parami eteru. Dopływ tlenu regulowano tak, aby stężenie tlenu w masce odpowiadało stężeniu tlenu stwierdzanemu podczas doświadczenia w komorze. W przypadkach, które służyły do ustalenia normy i w przypadkach kontrolnych, zamiast tlenu stosowano powietrze. Po uzyskaniu narkozy chirurgicznej otwierano czaszkę i pobierano korę mózgu do zimnego 0,4 N kwasu nadchlorowego, w stosunku 1 objętość tkanki w 4 objętościach kwasu.

Oznaczanie noradrenaliny, adrenaliny i dopaminy w korze mózgu, wykonywano według metody opracowanej w National Institute of Health w Bethesda przez A. Cho i M. A. Beavena, na podstawie danych

zawartych w pracach Brodiego i wsp. (1966), Changa (1964) i Udenfrienda (1962).

Zasada metody. Katecholaminy wykazują duże powinowactwo do tlenku glinu w wodnych roztworach. Właściwość tę wykorzystano do wyizolowania amin z zalkalizowanych kwasowych ekstraktów tkankowych. Z tlenku glinu aminy są eluowane rozcieńczonym kwasem octowym. Zawarte w eluacie aminy utleniają się jodem w środowisku obojętnym, a następnie tautomeryzowane silnymi zasadami do hydroksoindoli. Hydroksoindole są niestabilne w roztworze alkalicznym i dlatego dalszą reakcję utleniania hamuje się przez dodanie stabilizatora (siarczyn sodu) i kwasu. W procesie oznaczania katecholamin z jednej próby, wykorzystany jest fakt, że fluorescencja adrenaliny rozwija się od razu, natomiast noradrenaliny i dopaminy dopiero po ogrzaniu. Poszczególne aminy oznacza się na spektrofotofluorymetrycznie Aminco-Bowmana, przy różnych długościach fali:

dla adrenaliny max. aktywacji — 410 nm, max. fluor. — 500 nm

dla noradrenal. max. aktywacji — 382 nm, max. fluor. — 485 nm

dla dopaminy max. aktywacji — 314 nm, max. fluor. — 370 nm.

WYNIKI

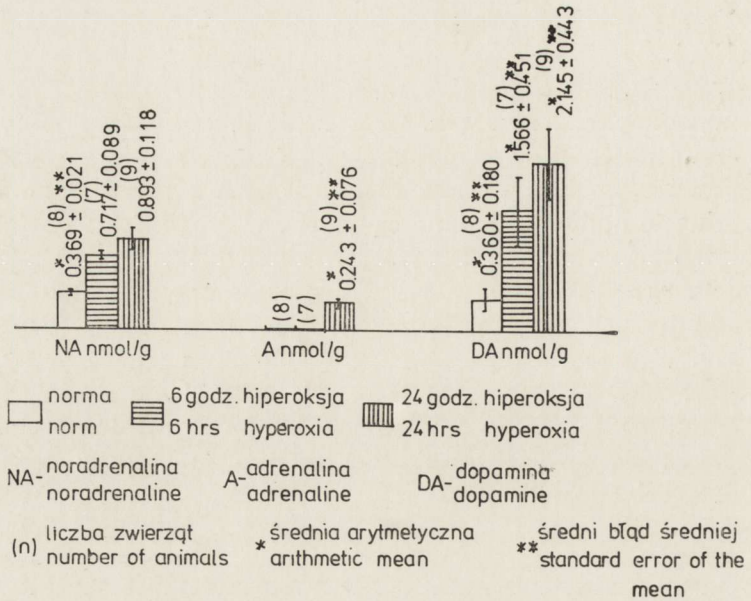
Zmiany poziomu katecholamin w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, przedstawia ryc. 1.

Po 6-godzinnej hiperoksji, poziom noradrenaliny wzrasta znamienne statystycznie o 94,2% w stosunku do normy i kontroli. Obecności adrenaliny, podobnie jak w normie i kontroli, nie stwierdza się. Poziom dopaminy wykazuje znamienny statystycznie wzrost o 327,5% w stosunku do normy i kontroli. (Dopamina występuje w 5 na 7 badanych przypadków).

Po 24-godzinnej hiperoksji, poziom noradrenaliny wzrasta znamienne statystycznie o 141,8% w stosunku do normy i kontroli i wykazuje znamienny statystycznie wzrost o 24,5% w stosunku do grupy po 6-godzinnej hiperoksji. W grupie tej, w 3 na 9 badanych przypadków pojawia się adrenalina. Poziom dopaminy, która występuje w 8 na 9 badanych przypadków, wzrasta znamienne statystycznie o 485,3% w stosunku do normy i kontroli i wykazuje znamienny statystycznie wzrost o 36,9% w stosunku do grupy po 6-godzinnej hiperoksji.

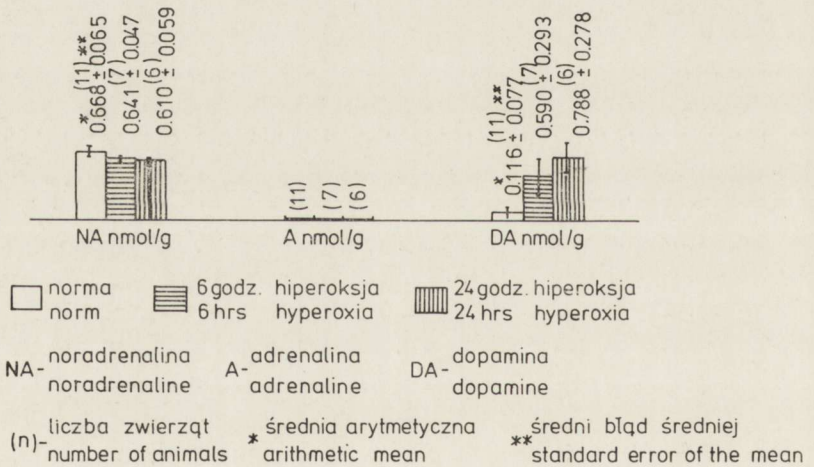
Zmiany poziomu katecholamin w korze mózgu królików 20-dniowych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, przedstawia ryc. 2.

Po 6-godzinnej hiperoksji, poziom noradrenaliny obniża się nieznamienne statystycznie o 3,9% w stosunku do normy i kontroli. Obecności adrenaliny, podobnie jak w normie i kontroli, nie stwierdza się. Poziom



Ryc. 1. Poziom katecholamin w korze mózgu noworodków króliczych w normie i po hiperoksji.

Fig. 1. Level of catecholamines in cerebral cortex of newborn rabbits in the norm and after hyperoxia.



Ryc. 2. Poziom katecholamin w korze mózgu królików 20-dniowych w normie i po hiperoksji.

Fig. 2. Level of catecholamines in cerebral cortex of 20-days old rabbits in the norm and after hyperoxia.

dopaminy wzrasta znamienne statystycznie o 410,4% w stosunku do normy i kontroli. (Dopamina występuje w 3 na 7 badanych przypadków).

Po 24-godzinnej hiperoksji, poziom noradrenaliny obniża się nieznamienne statystycznie o 8,6% w stosunku do normy i kontroli i wykazuje nieznamienne statystycznie obniżenie o 4,8% w stosunku do grupy po 6-godzinnej hiperoksji. Podobnie jak w grupie po 6-godzinnej hiperoksji, nie stwierdza się obecności adrenaliny. Poziom dopaminy wzrasta znamienne statystycznie o 581,8% w stosunku do normy i kontroli i wykazuje znamienny statystycznie wzrost o 33,6% w stosunku do grupy po 6-godzinnej hiperoksji. (Dopamina występuje w 4 na 6 badanych przypadków).

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań wykazują prostą zależność pomiędzy poziomem katecholamin w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, a ciśnieniem cząstkowym tlenu w krwi tętniczej i jego zawartością w tkankach (między innymi w korze mózgu i w części rdzennej nadnerczy).

Wysokie ciśnienie cząstkowe tlenu w krwi tętniczej powoduje wzrost zawartości tlenu w tkankach i związany z tym wzrost syntezy amin katecholowych. Nasze sugestie znajdują potwierdzenie w pracach Browna i wsp. (1974) i Mossakowskiego (1974), którzy wykazali zależność syntezy amin katecholowych od zaopatrzenia tkanki w tlen.

Duży wzrost poziomu noradrenaliny i dopaminy w korze mózgu noworodków króliczych poddanych 6-godzinnemu działaniu hiperoksji sugeruje, że jest on uwarunkowany nie tylko wzrostem syntezy amin katecholowych, lecz również zwiększonym wydzielaniem katecholamin do krwi. W oparciu o teorię Cannona o reakcji obronnej ustroju i teorię Selyego o reakcji adaptacyjnej, można przyjąć, że zwiększone wydzielanie katecholamin do krwi jest odpowiedzią na stres wywołany działaniem hiperoksji. Sugestie te może potwierdzać pojawienie się adrenaliny w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 24-godzinnej hiperoksji.

Brak wykształconej bariery krew—mózg, która u królika rozwija się pomiędzy 12-ym i 18-ym dniem życia (Gabryel 1973), sprawia, że w warunkach normobarycznej hiperoksji, katecholaminy wydzielane w dużej ilości do krwi, swobodnie przenikają do kory mózgu noworodków.

Dodatkowego omówienia wymaga duży wzrost poziomu noradrenaliny i dopaminy stwierdzany w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji, i w porównaniu z nim, znacz-

nie mniejszy wzrost poziomu tych amin po 24-godzinnej hiperoksji. Można to tłumaczyć jako skutek rozwijającego się niedokrwienia mózgu z wtórnym niedoborem tlenu. Stan ten spowodowany jest przez skurcz naczyń mózgowych, w wyniku działania wysokiego ciśnienia cząstkowego tlenu zawartego w krwi tętniczej, a także w wyniku działania wysokiego poziomu noradrenaliny w korze mózgu.

Utrzymujący się stan skurczowy naczyń kory mózgu prowadzi do zmian ultrastrukturalnych opisanych przez Dydyk i wsp. (1976 a, b). Charakter tych zmian odpowiada obrazom mikroskopowo-elektronowym obserwowanym przez Browna i Brierleya (1872) oraz przez Ju i wsp. (1972 a, b), w doświadczalnej hipoksji i ischemii mózgu, z rozwijającym się obrzękiem mózgu.

Reasumując można stwierdzić, że u noworodków króliczych, brak wykształconej bariery krew—mózg, w warunkach niedokrwienia wywołanego działaniem hiperoksji, jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi obrzęku mózgu.

W uzyskanych wynikach badań poziomu amin katecholowych w korze mózgu królików 20-dniowych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, zaznacza się dominacja wpływu niedokrwienia mózgu z wtórnym jego niedotlenieniem, nad bezpośrednim działaniem wysokiego ciśnienia cząstkowego tlenu zawartego w krwi tętniczej. Przemawiają za tym niskowe tendencje w poziomie noradrenaliny zaznaczające się równolegle do czasu trwania hiperoksji. Nasze spostrzeżenia są zgodne z wynikami badań Browna i wsp. (1974), Lusta i wsp. (1975) i Mrsulji i wsp. (1975), którzy w utrzymującej się ischemii stwierdzili obniżenie poziomu noradrenaliny, a także z wynikami badań tych autorów, którzy wykazali hamujący wpływ niedokrwienia mózgu na syntezę amin katecholowych (Brown i wsp. 1974; Chikwaidze, Melitauri 1974; Gadamski i wsp. 1976).

Na szczególną uwagę zasługuje wzrost poziomu dopaminy w korze mózgu królików 20-dniowych, u których wykształcona bariera krew—mózg uniemożliwia przechodzenie katecholamin z krwi do kory mózgu. Wydaje się, że wzrost ten może być tłumaczony w następujący sposób: stres wywołany działaniem hiperoksji powoduje wydzielanie do krwi dużych ilości adrenaliny, która uczestniczy w uwalnianiu aminokwasów z połączeń albuminowych (Davis, Carlson 1973). Między innymi aminokwasami uwalniana jest tyrozyna, która przenika przez barierę krew—mózg i stanowi w korze mózgu substrat do syntezy katecholamin. Niedobór tlenu spowodowany niedokrwieniem kory mózgu sprawia, że synteza noradrenaliny zatrzymuje się na poziomie dopaminy, której zawartość stopniowo wzrasta.

Wyniki badań poziomu amin katecholowych w korze mózgu królików 20-dniowych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, znajdują potwierdzenie w wynikach badań ultrastrukturalnych, które wykazały u tych zwierząt nieodwracalne uszkodzenie komórek glejowych i nerwowych kory mózgu oraz postępujący obrzęk mózgu (Dydyk i wsp., w przygotowaniu do druku).

Dla wykazania zależności pomiędzy poziomem katecholamin w dojrzewającej korze mózgu królików, a zawartością katecholamin w krwi tych zwierząt, podjęto dodatkowe badania. Przedmiotem ich jest wpływ normobarycznej hiperoksji na poziom katecholamin w korze mózgu noworodków króliczych i królików 20-dniowych w warunkach wstrząsu hipowolemicznego.

L. Дыдык, Б. Ванькович, Т. Шретер, Я. Прокопчик

УРОВЕНЬ КАТЕХОЛАМИНОВ В СОЗРЕВАЮЩЕЙ КОРЕ МОЗГА КРОЛИКОВ,
ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПЕРОКСИИ

Резюме

Целью работы было исследование влияния нормобарической гипероксии на уровень катехоламинов в коре мозга кроличьих новорожденных и 20-дневных кроликов, у которых барьер кровь-мозг уже оформлен. Работа была проведена на 24 кроличьих новорожденных и на 24 20-дневных кроликах. Кроликов подвергали воздействию нормобарической гипероксии длящейся 6 часов в первой опытной группе и 24 часа во второй опытной группе. Исследование уровня катехоламинов проводилось спектрофотометрическим методом. Эти исследования обнаружили:

1. увеличение уровня катехоламинов в коре мозга кроличьих новорожденных, подвергнутых действию нормобарической гипероксии обусловлено ростом синтеза катехоловых аминов в коре мозга и в надпочечниках, их усиленной секрецией в кровь и отсутствием сформированного барьера кровь-мозг;
2. изменения уровня катехоламинов в коре мозга 20-дневных кроликов, подвергнутых действию нормобарической гипероксии, зависят от влияния ишемии мозга и высокого уровня адреналина в крови на синтез катехоламинов в коре мозга.

L. Dydyk, B. Wańkiewicz, T. Szeleter, J. Prokopczyk

THE LEVEL OF CATECHOLAMINES IN THE DEVELOPING CEREBRAL
CORTEX OF RABBITS DURING NORMOBARIC HYPEROXIA

Summary

The aim of the work was to evaluate the effect of normobaric hyperoxia on the level of catecholamines in the cerebral cortex of newborn and 20-day rabbits, the latter possessing a completely developed blood-brain barrier. The studies included 24 rabbits in each group. The animals were subjected to normobaric hyperoxia lasting: 6 hrs for the first group and 24 hrs for the second group.

Catecholamines were determined spectrofluorometrically. The results indicated that: 1 — The increase of the catecholamines level in the newborn cortex during normobaric hyperoxia results from their enhanced synthesis in both the cerebral cortex and adrenal gland and their increased secretion to blood, as well as from the absence of fully developed blood-brain barrier. 2 — The changes in the catecholamines content in the cerebral cortex of 20-day rabbits are caused by disturbances in the catecholamines synthesis in the cortex, which in turn are related to cerebral ischemia and to the high adrenaline content in blood.

PIŚMIENICTWO

1. Bean J. W., Smith C. W.: Hypophyseal and adrenocortical factors in pulmonary damage induced by oxygen at atmospheric pressure. *Am. J. Physiol.*, 1953, 172, 169—174.
2. Bean J. W., Johnson P. C.: Epinephrin and neurogenic factors in the pulmonary edema and central nervous system reactions induced by oxygen at high pressure. *Am. J. Physiol.*, 1955, 180, 438—444.
3. Bean J. W., Zea D., Thom B.: Pulmonary changes with convulsions induced by drugs and oxygen at high pressure. *J. Appl. Physiol.*, 1966, 21, 865—872.
4. Bert P.: *Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology*. Paris. 1878. Translated by M. A. Hitchcock and F. A. Hitchcock. Columbus, Ohio: College Book Co., 1943.
5. Brodie B. B., Comez M. S., Costa E., Dlabac A.: The role of brain serotonin in the mechanism of the central action of reserpine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1966, 152, 340—349.
6. Brown J. W., Cox D. G.: Role of the central nervous system and pulmonary damage as cause of respiratory failure in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Proc. III Int. Conf. Hyperbaric Med.*, Washington, 1966, 89—96.
7. Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischaemic cell changes in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. *J. Neurol. Sci.*, 1972, 16, 59—84.
8. Brown R. M., Carlson A., Ljunggren B., Siesjö B. K., Snider S. R.: Effect of ischemia on monoamine metabolism in the brain. *Acta Physiol. Scand.*, 1974, 90, 789—791.
9. Cerchia F., Montegazzini P., Parma M.: Epilepsia iperossica e formaci antiepilettici. *Arch. Sci. Biol.*, 1957, 41, 420—429.
10. Chang C. C.: A sensitive method for spectrophotofluorometric assay of catecholamines. *Int. J. Neuropharmacol.*, 1964, 3, 643—649.
11. Chikvaizde V. N., Melitauri N.: Effect of ischemia on the regional distribution of biogenic amines in the brain of rabbits. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 671—682.
12. Davis J. N., Carlson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 783—790.
13. Dydyk L., Dąbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. I. Zmiany wczesne. *Neuropat. Pol.*, 1976, a, 14, 177—183.
14. Dydyk L., Dąbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. II. Zmiany późniejsze. *Neuropat. Pol.*, 1976, b, 14, 323—330.
15. Dydyk L., Justyna M., Dąbska M.: Effect of the normobaric hyperoxia on the cerebral cortex and luungs of the 20-day-old rabbits. W przygotowaniu do druku.

16. Gabryel P.: Bariera krew-mózg, struktura i funkcja. *Pat. Pol.*, 1973, 14, 217—235.
17. Gadamski R., Szumańska G., Sikorska M.: Badania histochemiczne nad zachowaniem się amin katecholowych w mózgu królika w następstwie hipoksji krążeniowej. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 23—30.
18. Gerschman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Nadig P., Fenn W. O.: Role of adrenalectomy and adrenal cortical hormones in oxygen poisoning. *Am. J. Physiol.*, 1954, 178, 346—350.
19. Haugaard N.: Poisoning of cellular reactions by oxygen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, 117, 736—744.
20. Haugaard N.: Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.*, 1968, 48, 311—373.
21. Jacobs E. A., Alvis H. J., Small S. M.: Hyperoxygenation — a central nervous system activator? *J. Geriatr. Psychiatry*, 1972, 5, 107—121.
22. Johnson B. C., Bean J. W.: Effect of sympathetic blocking agents on the toxic action of oxygen at high pressure. *Am. J. Physiol.*, 1957, 188, 583—598.
23. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. Neuronal alterations. *Acta neuropath. (Berlin)*, 1972 a, 22, 222—234.
24. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. Neuroglia and blood vessels. *Acta neuropath. (Berlin)*, 1972 b, 22, 235—244.
25. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Obraz morfologiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.*, 1967 a, 5, 115—123.
26. Kraśnicka Z., Renkawek K., Mossakowski M.: Aktywność enzymów oksydoredukcyjnych w tkance glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.*, 1967 b, 5, 124—134.
27. Lambertsen C. J.: Effect of oxygen at high partial pressure. W: *Handbook of Physiology Respiration*. Washington D. C. Am. Physiol. Soc., 1965, 1027—1046.
28. Lauweryns J. M., Cokelaere M.: Hypoxia-sensitive neuroepithelial bodies. Intrapulmonary secretory neuroreceptors modulated by the CNS. *Z. Zellforsch.*, 1973, 145, 521—540.
29. Lust W. D., 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.
30. Mc Shern Ch. K., Veith F. J.: The relationship between the central nervous system and pulmonary forms of oxygen toxicity. Effect of THAM administration. *Surg. Forum*, 1968, 19, 33—38.
31. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 573—581.
32. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I.: Action of cerebral ischemia on decreased levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylglycol sulfate, homovanilic acid and 5-hydroxyindoloacetic acid produced by pargyline. *Brain Res.*, 1975, 98, 388—393.
33. Renkawek K.: Aktywność enzymów hydrolitycznych w tkance glejowej hodowanej in vitro w atmosferze o zmiennej zawartości tlenu. *Neuropat. Pol.*, 1967, 5, 135—148.
34. Taylor D. W.: Effects of adrenalectomy on oxygen poisoning in the rat. *J. Physiol. (Lond.)*, 1958, 109, 272—280.

35. Torbati I. D., Harel D., Lavy S.: Influence of adrenalectomy on electrical activity of the brain under high oxygen pressure. *Aerospace Med.*, 1971, 42, 658—660.
36. Udenfriend S.: *Fluorescence assay in biology and medicine*. Academic Press, New York, 1962, 139—157.
37. Wood J. D., Watson W. J., Ducker A. J.: Oxygen poisoning in various mammalian species and the possible role of gamma-amino-butyric acid metabolism. *J. Neurochem.*, 1967, 14, 1067—1074.

Adres autora: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

JANINA RAFAŁOWSKA

SOME PROBLEMS OF THE DEVELOPMENT AND AGING
OF NERVOUS SYSTEM

II. MYELINATION OF SPINAL ROOTS IN THE 2ND HALF
OF FETAL LIFE AND IN EARLY INFANCY *)

Department of Neurology, Medical School in Warsaw
Head: Prof. dr med. I. Hausmanowa-Petrusewicz

The maturation and myelination of human spinal roots and peripheral nerves were given relatively little attention in the first half of 20th century. Introduction of the electron microscopy made possible to develop studies on myelination of both human and animal peripheral nervous system and to establish the successive stages in the development of Schwann cell.

The Schwann cell, in other words the sheath cell of the peripheral nervous system, arises from the neural crest, as it was shown in autoradiographic studies. Labeled cells were also found in the ganglia of cranial nerves.

On the 12th day of development of mouse fetus the Schwann cells are arranged longitudinally, along the roots and nerves (Asbury, 1967).

It appears likely that the „clear, nuclei-free areas in the cut surfaces of developing peripheral nerve” described in 1884 by light microscopy (Kölliker, 1884) represent this stage of the peripheral nerve development. Such an area consists of a band of very small, closely adherent, non-myelinated fibers. The nuclei of Schwann cells are present at the periphery of the band (Peters, Muir, 1958). These data, obtained in studies on animals, seem to correspond to the characteristics of sural nerve in human fetus aged 9 (Ochoa, 1971) and 10 weeks (Gamble, 1966). The perineurium encloses few bands, containing 500—800 very small axons connected with one Schwann cell. Few Schwann cells are in the stage of mitotic division. A narrow cleft, which separates the bands, constitutes the primary endoneural space with longitudinal collagenous fibers (Ochoa, 1971) and fibroblast-like cells (Gamble, 1966). In the

*) This work was supported by the project No 10.4.2.02., Polish Academy of Sciences.

14th week the ulnar nerve and cutaneous nerves of human fetus are similar to the digital nerves of a 20 day rat fetus (Gamble, Breathnach, 1965).

Cord-like orientation of Schwann cells disappears in the 14th week of fetal life (Cravioto, 1965). These cells begin to migrate and to form long, thin bipolar processes situated on the surface of major bundles of axons. In the vicinity of the cell nucleus there appear thick short processes which penetrate between the bundles of axons. Between the 14th and 16th week of fetal life the Schwann cells undergo mitotic division parallelly with the growth of individual axons. Proliferating Schwann cells change their shape during the division (Martin, Webster, 1973) and more numerous cells separate the bundles of axons into smaller groups of 50—150 axons. A better contact of axons with Schwann cell cytoplasm is thus achieved (Martin, Webster, 1973). The division of Schwann cells finally result in achievement of a proportion: 1 cell/1 axon. This ratio „1 Schwann cell/1 axon” is already achieved in the 18th week of fetal life but only in the case of larger axons. Myelin lamellae are sometimes already discernible around the axons, but their number does not exceed 15. The diameter of the majority of axons is above 1.8 μm . Few fibroblasts and blood vessels appear in the endoneurium (Ochoa, 1971). The myelination begins in the stage of formation of premyelin fibers (Friede, Samorajski, 1968) that is at the time when one axon is connected with one Schwann cell (Cravioto, 1965; Gamble, 1966; Ochoa, 1971).

These data allowed to distinguish 4 stages of the development of Schwann cells (Cravioto, 1965): 1) formation of cellular cords along bundles of axons, 2) cell migration, 3) cell division, 4) myelin formation.

On achievement of 1 : 1 ratio of axon — Schwann cell the cell ceases to divide, matures and begins to produce myelin.

In the myelinating sciatic nerve of rat the proportion of proliferating Schwann cells drops from 27% to about 4% after 15 days. In this period fibers are gradually assuming premyelinating stage and then become myelinated (Friede, Samorajski, 1968). Similar phenomena were found in the sciatic nerve of mouse (Asbury, 1967).

Like in the central nervous system myelination begins with formation of internal mesaxon. After approximately 3 loose turns of mesaxon its following turns produce compact myelin sheath. Adjacent Schwann cells form myelin sheath on axon segments. The Ranvier's nodes are formed between the particular segments. The finger-like processes which form with progressing myelination in Ranvier's nodes are typical only of the peripheral nerve fiber (Peters, Vaughn, 1970). They represent an extension of Schwann cell cytoplasm which surrounds from the outside

the last myelin lamella. The basal lamina envelops the entire myelin fiber with Ranvier's node. The length of the internode depends upon the diameter of axon like in the central nervous system (Peters, Vaughn, 1970).

Unlike in the central nervous system, however, Schmidt-Lantermann clefts are present in the internodes. They are formed by oblique bulging of the Schwann cell cytoplasm intervening between the myelin sheath lamellae (Peters, Vaughn, 1970; Webster, 1971).

In all animal species (Matthews, 1968) the increase of axon diameter (Friede, Samorajski, 1968) stimulates myelination. The thinnest mature myelinated nerve fibers in the peripheral nervous system have the diameter of about 1 μm while in the central nervous system even thinner myelinated fibers are present (Matthews, 1968).

With the myelination of fiber the ratio „axoplasm — Schwann cell cytoplasm” rises. At the beginning of myelination the axoplasm accounts for 20% of fiber volume, while in the mature myelinated fibers this value rises to 80% (Friede, Samorajski, 1968).

The myelination which continues after birth in man and animals not only results in thickening of the sheath, but also in an increase in number of myelinated fibers both in the spinal roots (Rexed, 1944), and in the peripheral nerves (Drac, 1977). However, in the anterior root 27% of fibers remain nonmyelinated (Coggeshall et al., 1975). A gradual increase of the diameter of axon and in the number of myelin lamellae in the spinal roots of man result at the age of 5—9 years (Rexed, 1944) in a constant ratio: axon diameter — thickness of myelin sheath — internodal length. The distribution of the axon diameters corresponds to that in the adult.

The sensory and motor conduction velocity are the functional signs of nerve maturation. Already during the developmental period it achieves the values found in adults. This occurs at the age of 3—5 years, first in the ulnar and thereafter median nerves. In the peroneal nerve the conduction velocity typical of adults is found already in children aged 2—3 years (Ryniewicz, 1975).

The information on the myelination of human spinal roots and peripheral nerves is far from complete. Myelination of anterior roots precedes that of the posterior ones (Larroche, 1965). The report of Rexed (1944) is of particular value. His data on the human peripheral nervous system constituted the basis for further studies and have later been confirmed by electron microscopy. However, these studies (Rexed, 1944) dealt only with the postnatal myelination of the peripheral nervous system. The present study was undertaken to complete the data on myelination during fetal development.

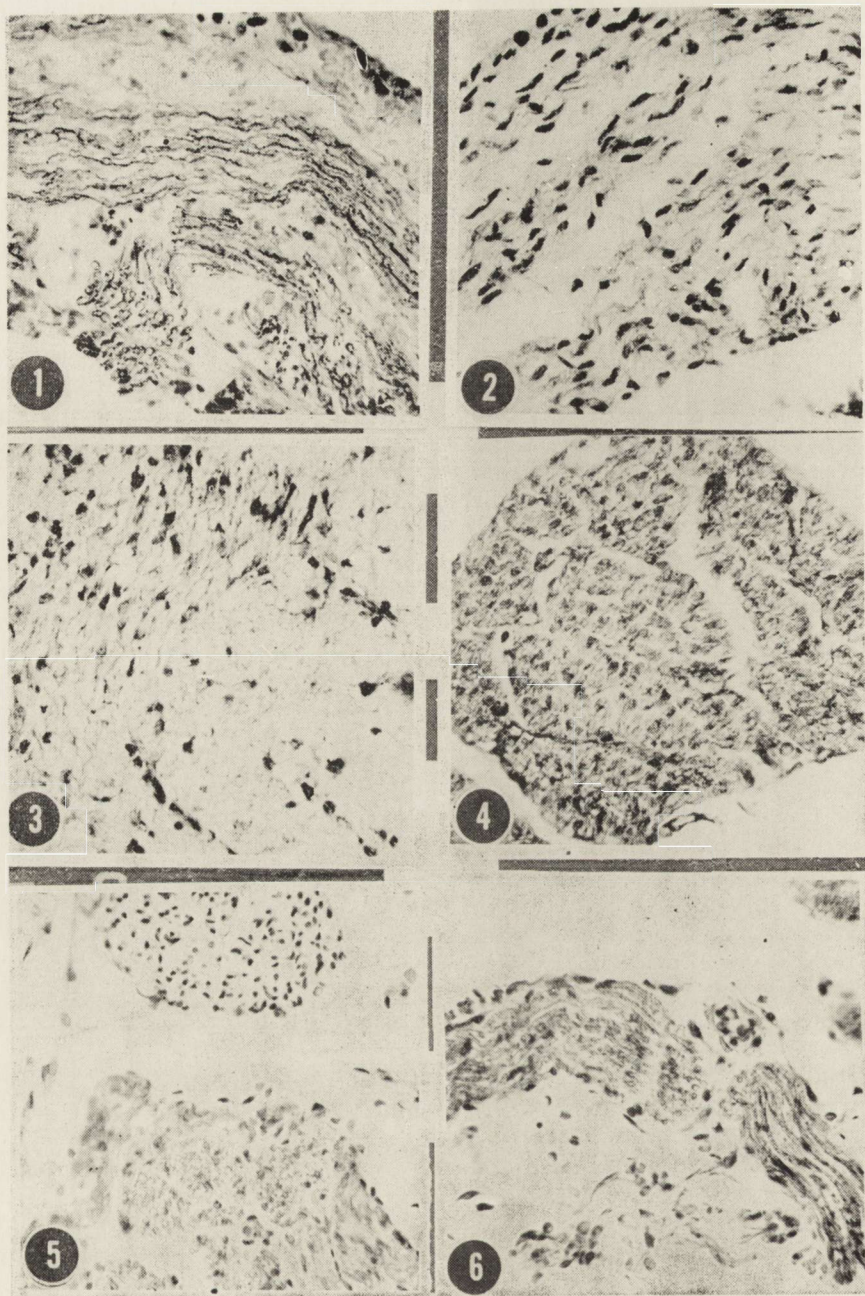


Fig. 1. Case E8, 18th week, C₈. Anterior root. Scant myelinating fibers. Scarce Schwann cells. Klüver-Barrera, $\times 270$.

Ryc. 1. Przyp. E8. 18 tyg. C₈. Korzeń przedni. Niezbyt liczne mielinizujące się włókna. Nieliczne komórki Schwanna. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 \times .

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of 6 human fetuses aged from 16—17 to 34 weeks, and 6 newborns and infants aged from one day to 3 years. Detailed data about the material and methods are described in part I of this paper (Rafałowska, 1979).

RESULTS AND DISCUSSION

Results summarized in table 1 indicate that evident myelination of the anterior spinal roots in the cervical segment was present already in the 18th week of fetal (Fig. 1). At the same time entire cytoplasm of anterior horn motor cells at this level was filled with tigroid, on the contrary to segment S₁, where in most of the motor cells tigroid was situated on the periphery. A distinct myelination of the anterior roots in the lumbo-sacral segment was observed in a 34-week fetus that is, at a time when the appearance of motor cells with respect to tigroid was identical in the cervical and lumbo-sacral segments.

In the period between the 18th and 27th week myelination in the lumbo-sacral segment was seen only in few fibers (Fig. 9). This is in an agreement with observations of others (Larroche, 1965) that the posterior roots myelinated later than the anterior ones (Figs. 5, 6, 7, 10, 11). At the age of 18 weeks only single fibers of the cervical segment possess a very thin myelin sheath (Fig. 2), while in the lumbosacral segment this was observed in the 26th week.

Fig. 2. Case E8, 18th week, C₈. Posterior root. Single myelinating fibers. Rather numerous Schwann cells. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 2. Przyp. E8. 18 tyg. C₈. Korzeń tylny. Pojedyncze mielinizujące się włókna. Dość liczne komórki Schwanna. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 3. Case E8, 18th week, C₈. Early myelination of medial bundle of posterior root. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 3. Przyp. E8, 18 tyg. C₈. Początek mielinizacji włókien wiązki przysrodkowej korzenia tylnego. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 4. Case E8, 18th week, S₁. Division of the posterior root into large bundles. Numerous Schwann cells. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 4. Przyp. E8. 18 tyg. S₁. Podział korzenia tylnego na duże pęczki. Liczne komórki Schwanna. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 5. Case E2. 20th week. Th₁. Contrast between degree of myelination of anterior (lower) and posterior (upper) roots. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 5. Przyp. E2. 20 tyg. Th₁. Kontrast w stopniu mielinizacji korzenia przedniego (od dołu) i korzenia tylnego (od góry). Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 6. Case E10. 27th week. C₈. Anterior root. Marked myelin sheaths of numerous fibers on longitudinal section. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 6. Przyp. E10. 27 tyg. C₈. Korzeń przedni. Wyraźne osłonki mielinowe w licznych włóknach na przekroju podłużnym. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

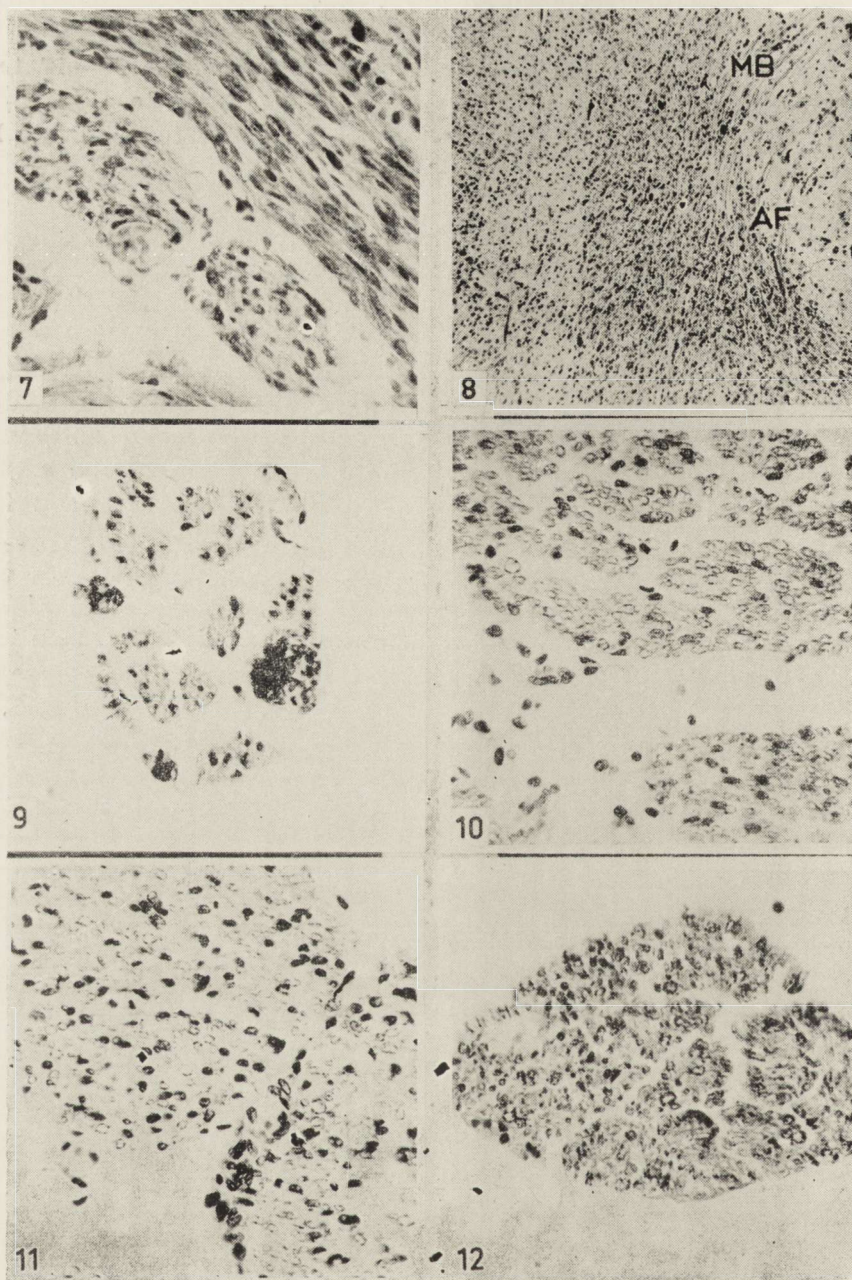


Fig. 7. Case E10. 27th week, C₈. Posterior root. Myelin sheaths almost invisible both on cross- and longitudinal sections. Numerous Schwann cells. Klüver-Barrera. $\times 270$.

Ryc. 7. Przyp. E10. 27 tyg. C₈. Korzeń tylny. Oslonka mielinowa prawie niewidoczna zarówno na przekroju poprzecznym jak podłużnym. Liczne komórki Schwanna. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 \times .

In numerous fibers of posterior roots distinct myelin sheath were visible in the 34th week in both studied segments of the spinal cord (Figs. 11, 12). However, they stained less intensively and were less numerous than in the anterior roots of the cervical segment.

Table 1 indicates that in the cervical segment the anterior roots myelinate earlier and more intensively than the anterior roots in the lumbo-sacral segment and the posterior roots of both segments of the spinal cord.

The great difference of age (7 weeks) between the two fetal cases makes it difficult to determine whether myelination proceeds gradually or rapidly, and when it begins.

To our knowledge, no report has been appeared so far on the development of myelination of human fetal spinal roots. Our material seems to indicate that after the 10th day of extrauterine life myelination involves more or less equally the anterior and posterior roots in the cervical segment and the anterior roots in the lumbo-sacral segment (Figs. 14, 15, 16, 17). The intensity of staining of the sheath probably depends on its thickness, being greatest in the anterior roots of the cervical segment. The myelination of posterior roots of the lumbo-sacral segment seems to be less intensive in all studied cases than in other spinal roots (Figs. 4, 12, 18). These data are compatible with the results of quantitative studies of Rexed (1944).

Fig. 8. Case E10. 27th week. C₈. More advanced myelination of Burdach's than of Goll's tract. Myelination of medial bundle (MB) and ascending fibres (AF) of posterior root. Klüver-Barrera. $\times 65$.

Ryc. 8. Przep. E10. 27 tyg. C₈. Wyraźniejsza mielinizacja pęczka Burdach'a niż Golla. Mielinizacja wiązki przyśrodkowej (MB) oraz włókien wstępujących (AF) korzenia tylnego. Met. Klüvera-Barrery. Pow. $65 \times$.

Fig. 9. Case E10. 27th week, S₂. Anterior root. Very thin myelin sheaths of single fibers. Numerous Schwann cells. Similar appearance of the posterior root. Klüver-Barrera. $\times 270$.

Ryc. 9. Przep. E10. 27 tyg. S₂. Korzeń przedni. Bardzo cienka osłonka mielinowa w pojedynczych włóknach. Liczne komórki Schwanna. Podobny obraz w korzeniu tylnym. Met. Klüvera-Barrery. Pow. $270 \times$.

Fig. 10. Case E5. 34th week, C₈. Anterior root. Numerous myelinating fibers. Klüver-Barrera. $\times 270$.

Ryc. 10. Przep. E5. 34 tyg. C₈. Korzeń przedni. Liczne mielinizujące się włókna. Met. Klüvera-Barrery. Pow. $270 \times$.

Fig. 11. Case E5. 34th week, C₈. Posterior root. Less numerous myelinating fibers, more delicate myelin sheath. Klüver-Barrera. $\times 270$.

Ryc. 11. Przep. E5. 34 tyg. C₈. Korzeń tylny. Mniej liczne mielinizujące się włókna, delikatniejsza osłonka mielinowa. Met. Klüvera-Barrery. Pow. $270 \times$.

Fig. 12. Case E5. 34th week, S₁. Posterior root. Less numerous fibers with myelin sheaths. Klüver-Barrera. $\times 270$.

Ryc. 12. Przep. E5. 34 tyg. S₁. Korzeń tylny. Mniej liczne włókna z osłonką mielinową. Met. Klüvera-Barrery. Pow. $270 \times$.

Table 1. Myelination of the spinal roots and medial bundle of the posterior root in fetal life and after birth
 Tabela 1. Mielinizacja korzeni rdzeniowych i wiązki przyśrodkowej korzenia tylnego w rozwoju płodowym i po urodzeniu

Anatomic structure		Age of fetus							Age of infant					
		Wiek dziecka												
Struktura anatomiczna		Wiek płodu												
		weeks	weeks	weeks	weeks	weeks	weeks	day	days	month	month	months	years	
		16	18	20	25	27	34	1	10	1	3	8	8	
		tyg.	tyg.	tyg.	tyg.	tyg.	tyg.	doła	dni	mies.	mies.	mies.	lat	
Radix ant.	C	—	—	++	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	L—S	—	—	±	±	±	±	±	++	+++	++	+++	+++	
Radix post.	C	—	±	±	±	±	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	L—S	—	—	±	±	±	++	++	++	++	++	++	++	
Fasciculus med. rad. post.														
	C	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	L—S	—	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

C — cervical segment

C — odcinek szyjny

L—S — lumbo-sacral segment

L—S — odcinek lędźwiowo-krzyżowy

± — single myelinating fibers

± — pojedyncze mielinizujące się włókna

± — rather numerous myelinating fibers

± — dość liczne mielinizujące się włókna

++ — numerous myelinating fibers

++ — liczne mielinizujące się włókna

+++ — very numerous myelinating fibers

+++ — bardzo liczne mielinizujące się włókna

The studies of the sensory sural nerve of deceased children confirmed also delayed myelination of posterior roots, particularly in the sacral segment (Drac, 1977). In a 6-year child the histogram of the sural nerve was similar to that of the ulnar nerve of a child, aged 8 months, and the thickest fibers were 3 μm thinner than in the ulnar nerve.

The conduction velocity in the sural nerve in 1-month-old children is lower than in the ulnar nerve and rises with age in both nerves (Buchtal et al., 1975).

These data (Buchtal et al., 1975; Drac, 1977; Rexed, 1944) indicate predominance of thin fibers in posterior roots. This predominance is probably related to the slower and longer lasting myelination of posterior roots and sensory nerves as compared to anterior roots and mixed nerves. Myelination in the peripheral nervous system begins in the fibers of about 1 μm diameter (Matthews, 1968) that means thicker than in the central nervous system. Maybe, this is the cause of the rather unexpected values shown in Table 1. It is true that the medial bundle of the posterior root, composed of the centrifugal fibers with respect to the maternal cell, myelinates in the same period as the posterior root in a given segment, but more intensively and rapidly (Table 1, Figs. 3, 7, 8, 13).

The studies on rats (Steer, 1971) indicate that at the site of the entrance of the posterior root into the spinal cord a dome-like glial zone is formed in which the marginal glial cells cover the intraspinal part of the root. Thus, the fibers of the posterior root are present in the zone of influence of oligodendrocytes but not Schwann cells. In the central nervous system myelination involves much thinner fibers than in the peripheral one. The fiber diameter of 0.3 μm (Matthews, 1968) can stimulate the oligodendrocytes to start myelination while this in the extraspinal part of the root begins in the fibers of about 1 μm diameter. The cells of the intervertebral ganglion do not seem to play any role probably since the beginning of myelination manifests its full or almost full maturity.

Our material, as well as that of other authors (Larroche, 1965), indicate that within the spinal cord the reflex arc at the cervical level is the first to myelinate. However, the myelination of the reflex arc both in the cervical and lumbo-sacral segment of the spinal cord is many weeks delayed with respect to the reflectory activity of the fetus.

The first reflexes can be induced in human fetuses in very early stage of development, namely from the 7.5th week of intrauterine life. Thus, myelination of the nervous system is not responsible for the early reflexes of the fetus. The reflexes are related to the development of sensory skin receptors of the trigeminal nerve in the 7.5th week of fe-

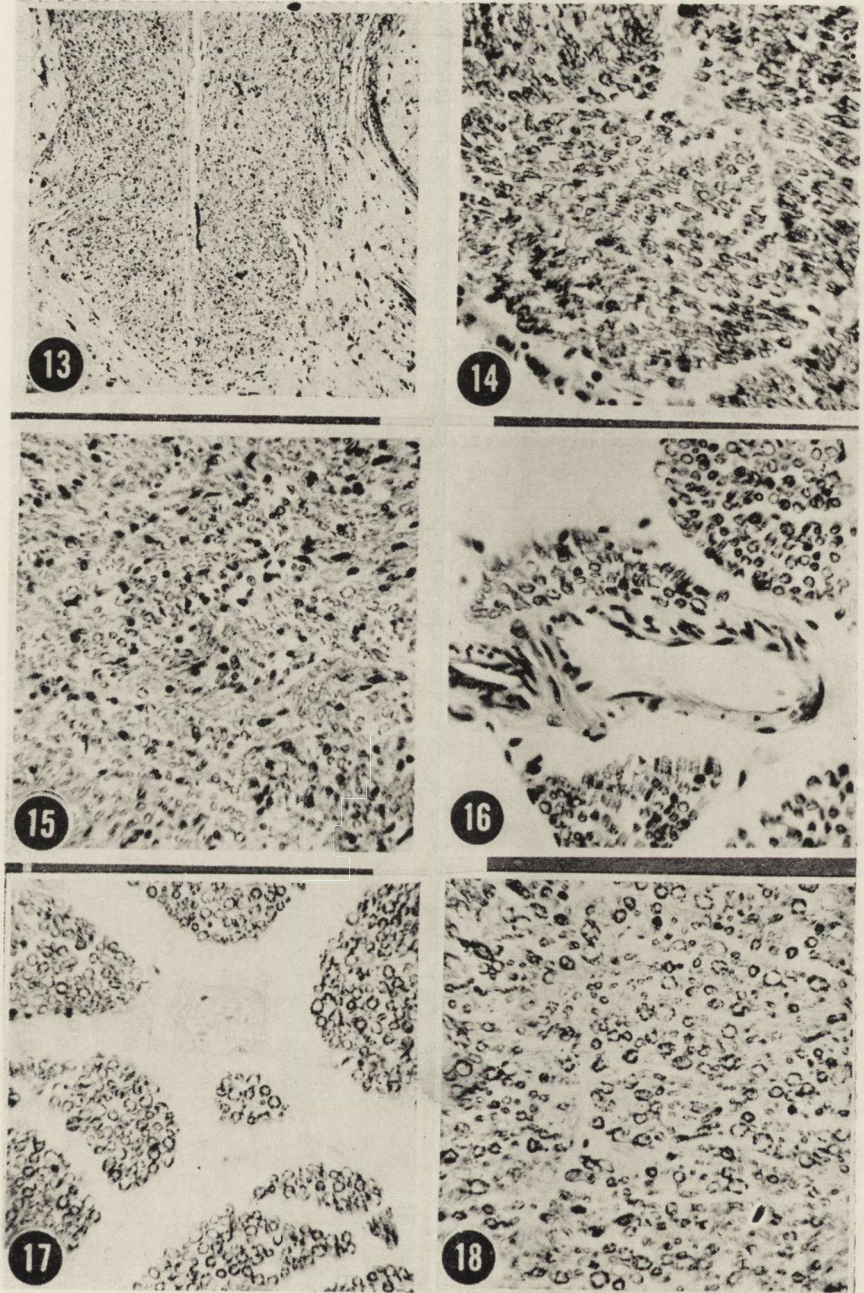


Fig. 13. Case E5. 34th week, S₁. Marked myelination of Goll's tract and ascending fibers of posterior root. Klüver-Barrera. $\times 100$.

Ryc. 13. Przyp. E5. 34 tyg. S₁. Wyraźna mielinizacja pęczka Golla i włókien wstępujących korzenia tylnego. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 100 \times .

tal life (Humprey, 1964) to the presence of muscle spindles in 3-month fetuses (Klishov, 1960), and to the primitive motor endings in the intercostal muscles in the 7th—8th week (Mawrinskaja, 1960), and in other muscles in the 9th (Kamieniecka, 1968) and 10th week (Fidziańska, 1971). Recently, formation of numerous connections between the immature motor plates and myotubes was observed in the muscles of lower extremities in the 9th—13th week (Toop, 1975). It is worth emphasizing that from the 19th week on, two histochemical types of fibers differentiate (Toop, 1975). It results from our observations that this coincides with increasing myelination of anterior roots and motor fibers of peripheral nerves.

Our observations confirm the principle of cranio-caudal and proximal-distal direction of the human ontogenesis as is true in all vertebrates. There are, however, some deviations from this principle e.g. the fingers of man differentiate earlier than the entire hand, the peripheral innervation of limbs can be discerned already in the period when the limbs are not yet differentiated (Poliakow, 1960), the spinal roots myelinate later in the thoracic segment than in the lumbo-sacral segment (Rexed, 1944) and so on. Similar examples exist also in animals. There is an opinion (Anochin, 1964) that the complexes of neurons belonging to various or the same anatomical structures but participating in essential reflectory activity develop simultaneously and early. This

Fig. 14. Case N4. 1 month, C₈. Anterior root. Numerous axons surrounded by evident myelin sheath. Klüver-Barrera, × 280.

Ryc. 14. Przyp. N4. 1 miesiąc. C₈. Korzeń przedni. Liczne aksony otoczone wyraźną osłonką mielinową. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 280 ×.

Fig. 15. Case N4. 1 month, C₈. Posterior root. Myelin sheath of numerous fibers stains less intensively than in anterior root. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 15. Przypadek N4. 1 miesiąc. C₈. Korzeń tylny. Mniej intensywnie barwiąca się osłonka mielinowa licznych włókien w porównaniu z korzeniem przednim. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 16. Case N2. 3 months, C₈. Anterior root. Distinct, thick myelin sheath in loosely arranged axons. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 16. Przyp. N2. 3 miesiące. C₈. Korzeń przedni. Wyraźna gruba osłonka mielinowa w luźno ułożonych aksonach. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 17. Case N2. 3 months, L₄. Anterior root. Uniform marked myelination of fibers of similar thickness. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 17. Przyp. N2. 3 miesiące. L₄. Korzeń przedni. Równomierna, wyraźna mielinizacja włókien, wykazujących podobną grubość. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

Fig. 18. Case N2. 3 months, L₄. Posterior root. Less numerous myelinating fibers. Fibers of variable thickness. Klüver-Barrera. × 270.

Ryc. 18. Przyp. N2. 3 miesiące. L₄. Korzeń tylny. Mniejsza liczba mielinizujących się włókien. Włókna wykazują bardzo różną grubość. Met. Klüvera-Barrery. Pow. 270 ×.

structural-functional system, developing and consolidating in the phylogenesis, plays an adaptative role in the life of man and animals.

CONCLUSIONS

1. The spinal roots myelinate earlier than the central tracts.
2. The anatomical structures which constitute the reflex arc and thus play an essential role in newborn's life myelinate earliest.
3. The anterior roots of the segment $C_8 - Th_1$ are the first to myelinate, followed by the posterior roots $C_8 - Th_1$, and anterior roots $L_5 - S_1$.
4. The myelination in the central nervous system of thinner nerve fiber than in the peripheral one causes, perhaps, that the process is more intensive in the intraspinal portion of the posterior root.

J. Rafałowska

WYBRANE PROBLEMY ROZWOJU I STARZENIA W UKŁADZIE NERWOWYM

II. Mielinizacja korzeni rdzeniowych w II połowie życia płodowego i w okresie wczesno-dziecięcym.

Streszczenie

Ocena mielinizacji korzeni rdzeniowych przednich i tylnych w odcinku szyjnym i lędźwiowo-krzyżowym w 6-ciu przypadkach płodowych (w wieku 16—17 tyg. — 34 tyg.) oraz 6-ciu przypadkach dziecięcych (w wieku 1 dzień — 3 lata) wykazała: Korzenie przednie w odcinku $C_8 - Th_1$ zaczynają się mielinizować najwcześniej; w 18-tym tygodniu życia płodowego wykazują już wyraźną mielinizację. Korzenie tylne w odcinku $C_8 - Th_1$ wykazują w 18-tym tygodniu życia płodowego jedynie pojedyncze mielinizujące się włókna, podobnie do korzeni przednich w odcinku $L_5 - S_1$. W korzeniu tylnym odcinka $L_5 - S_1$ pojedyncze mielinizujące się włókna stwierdza się o 2 tygodnie później. Korzenie przednie i tylne w odcinku szyjnym mielinizują się intensywniej, niż analogiczne korzenie w odcinku lędźwiowo-krzyżowym. Wiązka przyśrodkowa, czyli część wewnątrzrdzeniowa korzenia tylnego mielinizuje się intensywniej, niż część zewnątrzrdzeniowa korzenia tylnego. Dotyczy to zarówno odcinka szyjnego jak i lędźwiowo-krzyżowego. W odcinku szyjnym mielinizacja pojawia się o 2 tygodnie wcześniej.

Я. Рафаловска

ИЗБРАННЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ И СТАРЕНИЯ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

II. Миелинизация спинномозговых корешков во второй половине внутриутробной жизни и в ранний детский период

Резюме

Оценка миелинизации передних и задних спинномозговых корешков в шейном и пояснично-крестцовом отрезке в 6 случаях плодов (возрастом 16—17 до 34 недель), а также в 6 случаях детского периода (в возрасте 1 день — 3 года) показала, что:

Передние корешки в отрезке C_8-T_1 начинают миелинизироваться раньше всего; к 18 неделе внутриутробной жизни обнаруживают уже отчетливую миелинизацию.

Задние корешки в отрезке C_8-Th_1 к 18 неделе внутриутробной жизни обнаруживают лишь отдельные миелинизирующиеся волокна, подобным образом как передние корешки в отрезке L_5-S_1 .

В заднем корешке отрезка L_5-S_1 отдельные миелинизирующиеся волокна обнаруживаются 2 недели позже. Передние и задние корешки в шейном отрезке миелинизируются более интенсивно чем аналогичные корешки в пояснично-крестцовом отрезке. Медиальный пучок, или внутренняя часть заднего корешка, миелинизируется более интенсивно чем наружная часть заднего корешка. Касается это как шейного так и пояснично-крестцового отрезков. В шейном отрезке миелинизация появляется на 2 недели раньше.

REFERENCES

1. Anochin P. K.: Systemogenesis as a general regulator of brain development. In: *The developing brain*. Progr. Brain Res. 1964, 9, 54—86, Eds. W. A. Himwich, H. E. Himwich, Elsevier, Amsterdam, London, New York.
2. Asbury A. K.: Schwann cell proliferation in developing mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 735—743.
3. Buchtal F., Rosenfalck A., Behse F.: Sensory potentials of normal and diseased nerves, In: *Peripheral neuropathy*, Eds. P. J. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert, Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1975, 442—464.
4. Coggeshall R. E., Applebaum M. L., Fazen M., Strubbs T. B., Sykes M. T.: Unmyelinated axons in human ventral roots, a possible explanation for the failure of dorsal rhizotomy to relieve pain. *Brain*, 1975, 98, 157—166.
5. Cravioto H.: The role of Schwann cells in the development of human peripheral nerves. An electron microscopic study. *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, 12, 634—651.
6. Drac H.: Personal communication, 1977.
7. Fidziańska A.: Electron microscopic study of the development of human fetal muscle, motor end-plate and nerve. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1971, 17, 234—247.
8. Friede R. L., Samorajski T.: Myelin formation in the sciatic nerve of rat. A quantitative electron microscopic, histochemical and radioautographic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 546—570.
9. Gamble H.: Further electron microscope studies of human fetal peripheral nerves. *J. Anat.*, 1966, 100, 487—502.
10. Gamble H. K., Breathnach A. S.: An electron microscope study of human fetal peripheral nerves. *J. Anat.*, 1965, 99, 573—584.
11. Humphrey T.: Some correlations between the appearance of human fetal reflexes and the development of the nervous system. *Progr. Brain Res.*, 1964, 4, 93—135. Eds. D. P. Purpura, J. P. Schade, Elsevier, Amsterdam, London, New York.
12. Kamieniecka Z.: The stages of development of human fetal muscle with reference to some muscular diseases. *J. neurol. Sci.*, 1968, 7, 319—329.
13. Klishov A. A.: Embriogistogenez nerwnych elementow somaticzeskoj muskulatury czelowieka. *Arkh. Anat.* 1960, 39, 76—87.

14. Kölliker A.: Grundriss der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Leipzig 1884, cit. after Peters, Muir, 1958.
15. Larroche J. C.: Regional maturation of the central nervous system and associated pathology. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1965, 58, 7—8.
16. Martin J. R., Webster H. F.: Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and relationships. *Develop Biol.*, 1973, 32, 417—431.
17. Matthews M. A.: An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat. Rec.*, 1968, 161, 337—351.
18. Mawrinskaja L. F.: O sootnoszenii rozwitia nerwnych okonczanij skieletnych myszc s wozniknowieniem dwigatielnoj aktiwnosti czelowieczeskogo ploda. *Arkh. Anat.* 1960, 38, 61—68.
19. Ochoa J.: The sural nerve of the human fetus: electron microscope observations and counts of axons. *J. Anat.*, 1971, 108, 231—245.
20. Peters A., Muir A. R.: The relationship between axons and Schwann cells during development of peripheral nerves in the rat. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 1958, 44, 117—130.
21. Peters A., Vaughn J.: Morphology and development of the myelin sheath. In: *Myelination*. Ch. C. Thomas, Springfield, 1970.
22. Poliakow G. I.: O niekotorych onto-filogeneticzeskich sootnoszeniach w razwitii strukturnoj osnovy reflektornych funkcji organizma. *Arkh. Anat.*, 1960, 38, 3—23.
23. Rafałowska J.: Spinal cord in the 2nd half of fetal life and early infancy. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 39—53.
24. Rexed B.: Contributions to the knowledge of the postnatal development of the peripheral nervous system in man. *Acta Psychiat. (Kbh)*. 1944, Suppl. 33.
25. Ryniewicz B.: Szybkość przewodzenia w nerwach obwodowych u zdrowych i chorych dzieci. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1975, 9, 701—704.
26. Steer J. M.: Some observations on the fine structure of rat dorsal spinal nerve roots. *J. Anat.*, 1971, 109, 467—485.
27. Toop J.: The histochemical development of human skeletal muscle and its motor innervation. In: *Recent advances in myology*. Proc. III Intern. Congress on Muscle Diseases. Newcastle upon Tyne, 1974, Eds. W. G. Bradley, D. Gardner-Medwin, J. N. Walton, Excerpta Medica, Elsevier, Amsterdam, New York, 1975, 322—329.
28. Webster H. F.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation growth in rat sciatic nerves. *J. Cell. Biol.*, 1971, 48, 348—367.
29. Webster H. F., Martin J. R., O'Connell M. F.: The relationship between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Develop. Biol.*, 1973, 32, 401—406.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, Oczki 6 Str., 02-007 Warszawa

BARBARA GAJKOWSKA, AGNES LUCIANI, JERZY BOROWICZ

REAKCJA UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO SZCZURA

NA STRES WYWOŁANY UNIERUCHOMIENIEM

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego.

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Kierownik: Prof. dr med. J. W. Borowicz

Dotychczasowy pogląd o regulacji czynności układu podwzgórzowo-przysadkowego w stanie stresu opiera się głównie o wyniki badań biochemicznych i fizjologicznych. W związku z aktualnymi problemami medycyny kosmicznej interesujące wydaje się poznanie rodzaju i zakresu zmian zachodzących w organizmie w warunkach ograniczonej zdolności ruchowej, w zależności od stopnia i czasu trwania czynnika stresogennego.

Wykazano, że długotrwałe unieruchomienie wywołuje zaburzenia metabolizmu i regulacji hormonalnej zarówno u ludzi jak i u zwierząt (Kvetnansky i wsp. 1970; Paul i wsp. 1971; Reklewska i wsp. 1972; Tomaszewska, Poczopko 1972).

Na podstawie badań biochemicznych, prowadzonych na szczurach podanych kilkutygodniowemu unieruchomieniu, stwierdzono obniżenie syntezy białek w wątrobie, nerce, sercu i mięśniu szkieletowym (Fedorov i wsp. 1973; Fedorov 1970, 1973) oraz zmniejszenie całkowitej ilości aminokwasów we wszystkich tkankach o 20% w porównaniu z normą. Opisywano również zmniejszenie zawartości glikogenu w mięśniach (Bergström i wsp. 1967; Barański i wsp. 1975) oraz wykazano zmniejszenie objętości serca i upośledzenie metabolizmu węglowodanowego w komorach serca (Prokhaska i wsp. 1973). Długotrwałe unieruchomienie prowadziło również do zwiększonej diurezy i pobierania wody, czemu jednak nie towarzyszyły zmiany w rozmieszczeniu płynów ustrojowych (Sobocińska 1973 a, b).

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono nieliczne doniesienia na temat reakcji układu podwzgórzowo-przysadkowego na stres wywołany

unieruchomieniem (Andrianova 1971; Sapronov i Ryzhenkov 1974), dlatego też celem naszej pracy była próba uchwycenia zmian cytofizjologicznych w ultrastrukturze układu neurosekrecyjnego podwzgórza szczura, w warunkach stresu spowodowanego krótkotrwałym, lecz całkowitym unieruchomieniem oraz długookresowym, lecz częściowym ograniczeniem zdolności ruchowych.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 28 dwumiesięcznych szczurach, samcach szczepu Wistar, wagi około 200 gramów. W doświadczeniu zastosowano dwie metody unieruchomienia zwierząt:

I. 10 szczurów z całkowitym ograniczeniem ruchów na okres dwóch dni, przez umieszczenie każdego zwierzęcia w ciasnym drucianym pancerzu, całkowicie eliminującym ruch, z wyjątkiem nieznacznych ruchów głowy dla przyjmowania pokarmu.

II. 10 szczurów umieszczonych na okres trzech tygodni w specjalnych małych klatkach zmniejszających ruchliwość zwierząt do maksimum (zwierzęta mogły z trudnością wykonać niepełny obrót).

Obydwie grupy zwierząt dostawały jedzenie i picie *ad libitum*. Pozostałe 8 zwierząt stanowiło kontrolę. Do badań morfologicznych w mikroskopie elektronowym pobrano wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza i części nerwowej przysadki szczura. Materiał utrwalono w 4% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$ przez 1,5 godz., a następnie w 2% OSO_4 przez 2 godz. Odwadniano w alkoholach o wrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie. Ultracienkie skrawki dobarwiano na siatkach octanem urynylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM—7A.

WYNIKI

I. Badania mikroskopowo-elektronowe zwierząt poddanych całkowitemu unieruchomieniu na okres 2 dni

Jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe

Ze względu na podobny charakter i nasilenie obserwowanych zmian podane opisy będą dotyczyły neuronów obydwu jąder sekrecyjnych.

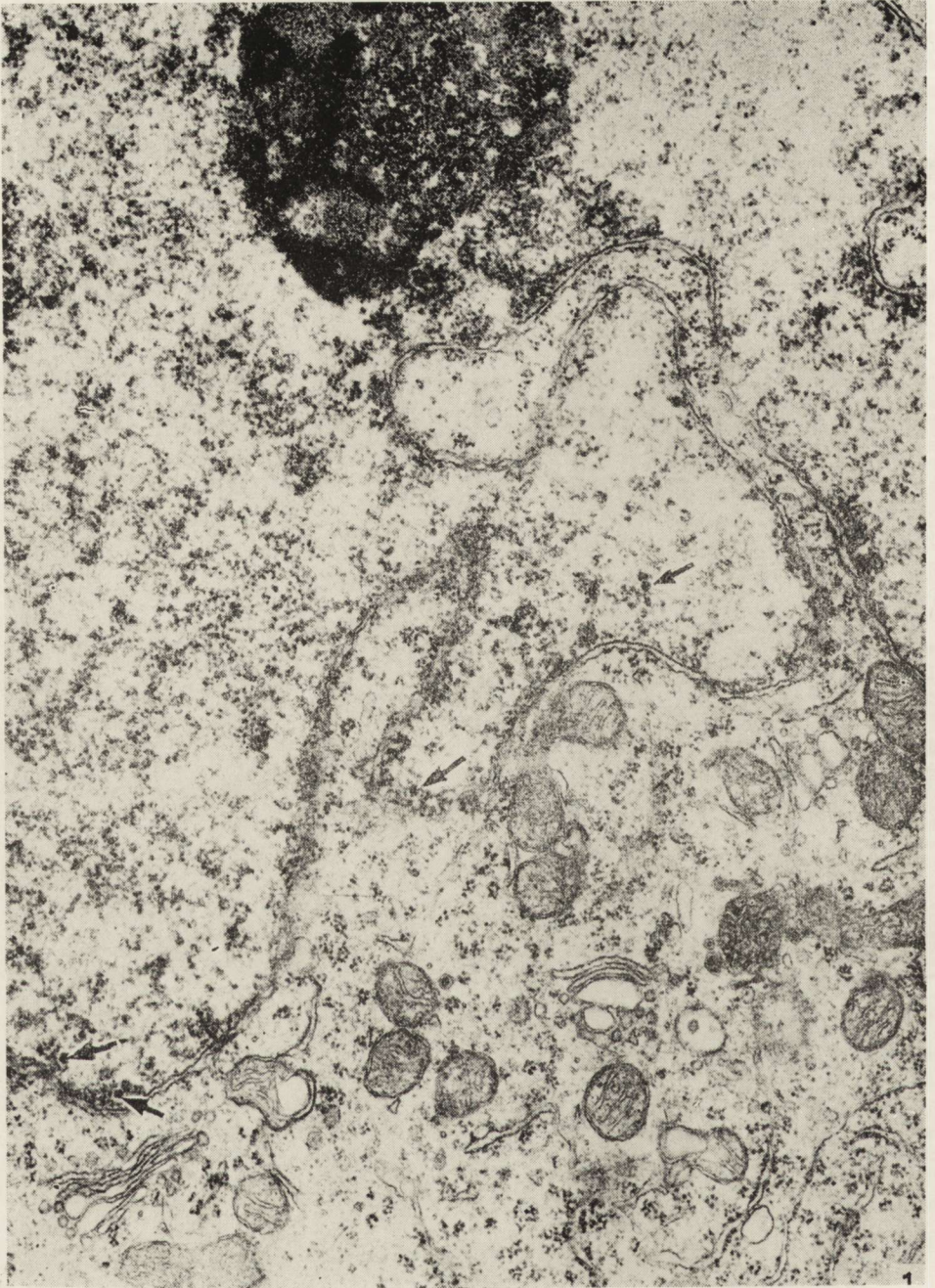
We wszystkich obserwowanych komórkach jąder sekrecyjnych stwierdza się obecność dużych jąder komórkowych o nieregularnym kształcie z głębokimi wgłobieniami (Ryc. 1, 3). Jądra komórkowe wypełnione są chromatyną rozmieszczoną równomiernie, niekiedy tylko tworzącą

większe skupienia tuż przy błonie jądrowej. W nukleoplazmie zwraca uwagę dość duża ilość ziarnistości perichromatynowych i jedno lub dwa jąderka o dużej gęstości elektronowej, w których można wyróżnić część fibrylarną i granularną.

W cytoplazmie neuronów sekrecyjnych obserwuje się charakterystyczne rozmieszczenie organelli komórkowych. W strefie okołojądrowej znajduje się silnie rozwinięty kompleks GERL, z dużą ilością dojrzałych ziarnistości neurosekrecyjnych oraz małych pęcherzyków wypełnionych materiałem o różnej gęstości elektronowej, pozostających w bliskim sąsiedztwie z kanałami aparatu Golgiego (Ryc. 2, 3). Zwraca też uwagę dość duża ilość lizosomów i ciałek gęstych oraz dwa rodzaje ciałek wielopęcherzykowych, jasne i ciemne. (Ryc. 1, 3). W wielu neuronach obserwuje się także poszerzenie kanałów aparatu Golgiego (Ryc. 2, 3) oraz obecność w jego wąskich kanałach substancji bezpostaciowej o niewielkiej gęstości elektronowej. Siatka ergastoplazmatyczna ułożona jest w obwodowych partiach neuronu dość regularnie w postaci wydłużonych, licznych wąskich kanałów pokrytych rybosomami (Ryc. 2). Niekiedy kanały mogą być krótkie i poszerzone, wypełnione niewielką ilością kłaczkowatej substancji oraz pokryte małą ilością rybosomów. W cytoplazmie neuronów zwraca uwagę duża ilość polirybosomów i owalnych lub wydłużonych mitochondriów układających się przeważnie w pobliżu aparatu Golgiego. Znamienna wydaje się być ilość neurotubuli o różnej długości, rozrzuconych w cytoplazmie z pewną regularnością (Ryc. 4).

Część nerwowa przysadki

W przeważającej liczbie zakończeń włókien nerwowych systemu podwzgórzowo-przysadkowego zwraca uwagę duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych — typowych, otoczonych pojedynczą błoną, wypełnionych substancją homogeną o dużej gęstości elektronowej. Obok tych ziarnistości występują jeszcze inne, również otoczone błoną, lecz wypełnione materiałem drobnoziarnistym o mniejszej gęstości elektronowej i trzeci rodzaj ziarnistości — z niewidoczną błoną otaczającą (Ryc. 5). We włóknach spostrzega się zmienną ilość mitochondriów i bardzo liczne neurotubule, doskonale widoczne w przekrojach podłużnych włókien (Ryc. 6). Włókna leżące w pobliżu naczyń krwionośnych zawierają znaczną ilość mikropęcherzyków (Ryc. 7). Spotyka się także włókna, które oprócz wyżej wymienionych struktur zawierają duże ilości ciał lizosomo-podobnych i błoniastych (Ryc. 8). W pituicytach widoczna jest dobrze rozwinięta siatka ergastoplazmatyczna oraz znaczna ilość struktur o charakterze lipidów zajmujących duże obszary cytoplazmy.



II. Badania mikroskopowo-elektronowe zwierząt poddanych częściowemu 3-tygodniowemu unieruchomieniu

Jądro nadwzrokowe i przykomorowe

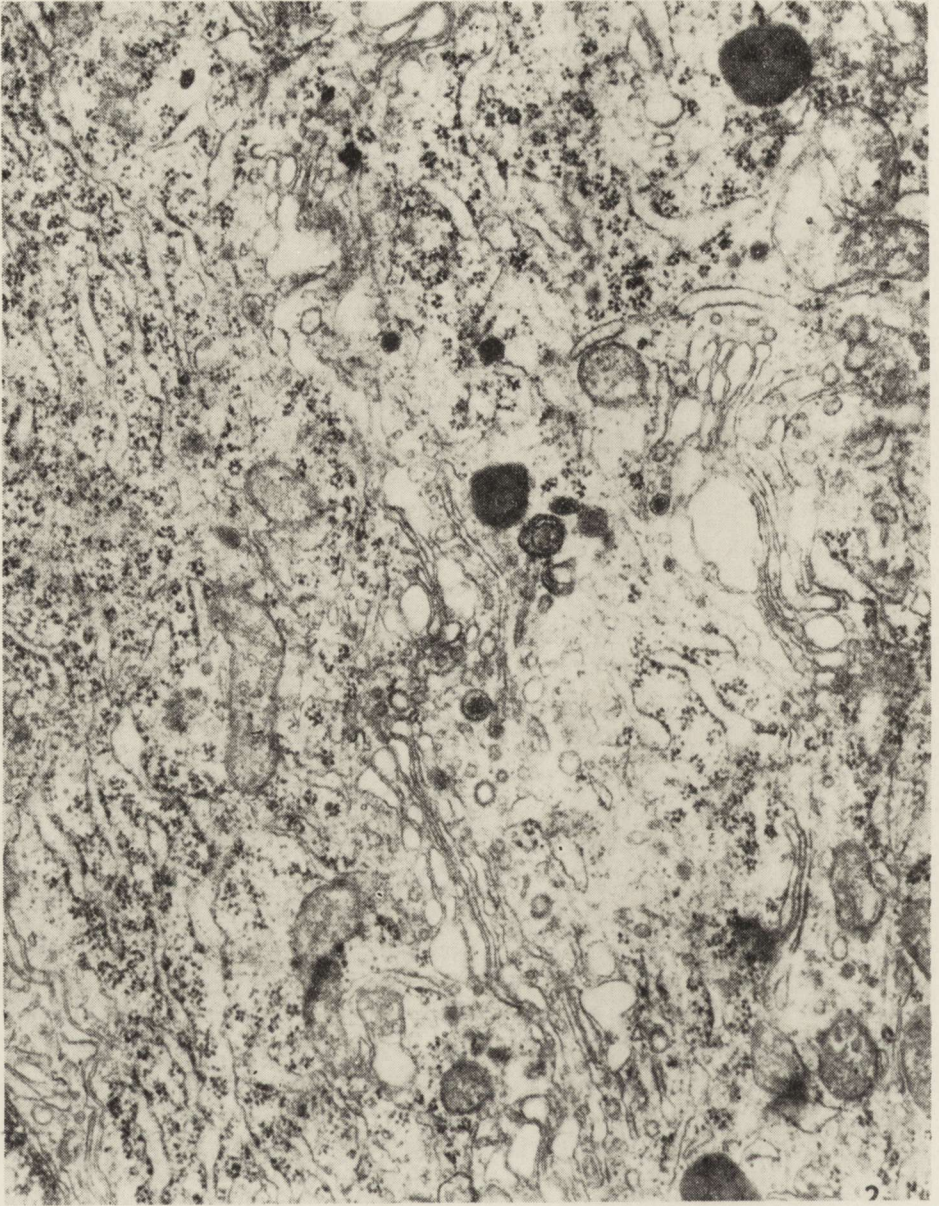
Również w tej grupie doświadczalnej neurony obydwu jąder neurosekrecyjnych wykazują ten sam typ zmian morfologicznych, wobec tego opisano je łącznie. Komórki sekrecyjne leżące blisko obok siebie, posiadają charakterystyczne jądra komórkowe wykazujące nieznaczne tylko inwaginacje błon jądrowych. Chromatyna jądrowa jest równomiernie rozmieszczona, a elektronowo-gęste jąderko jest zwykle pojedyncze. Komplex GERL zlokalizowany jest w strefie okołojądrowej. Zwraca uwagę dobrze rozwinięty aparat Golgiego, w którego okolicy przeważają drobne pęcherzyki i ciała wielopęcherzykowe. Ziarnistości neurosekrecyjne występują tylko pojedynczo, natomiast zwraca uwagę znaczna ilość lizosomów, ciałek gęstych lub tworów lizosomo-podobnych z kropłowatymi przejaśnieniami (Ryc. 9). Siatka ergastoplazmatyczna jest bardzo dobrze rozwinięta, szczególnie w peryferycznych częściach neuronu i regularnie pokryta rybosomami, zaś w cytoplazmie znajduje się duża ilość polirybosomów. Mitochondria występujące w obszarze aparatu Golgiego, są zwykle owalne lub wydłużone, o gęstej macierzy. Ilość neurotubul rozrzuconych przypadkowo w cytoplazmie jest zdecydowanie mniejsza w porównaniu z ilością występującą w grupie opisanej poprzednio. W cytoplazmie spotyka się także luźno leżące tzw. ciała jąderko-podobne.

Część nerwowa przysadki

Zakończenia włókien nerwowych zawierają mniej liczne ziarnistości neurosekrecyjne, w porównaniu z poprzednio opisaną grupą doświadczalną. Obok ziarnistości spotyka się w nich okrągłe mitochondria, mikropęcherzyki i neurotubule oraz pojedyncze ziarnistości glikogenowe. We włóknach znajdujących się obok naczyń krwionośnych ilość mikropęcherzyków wydaje się być zwiększona (Ryc. 10). Wśród włókien o bu-

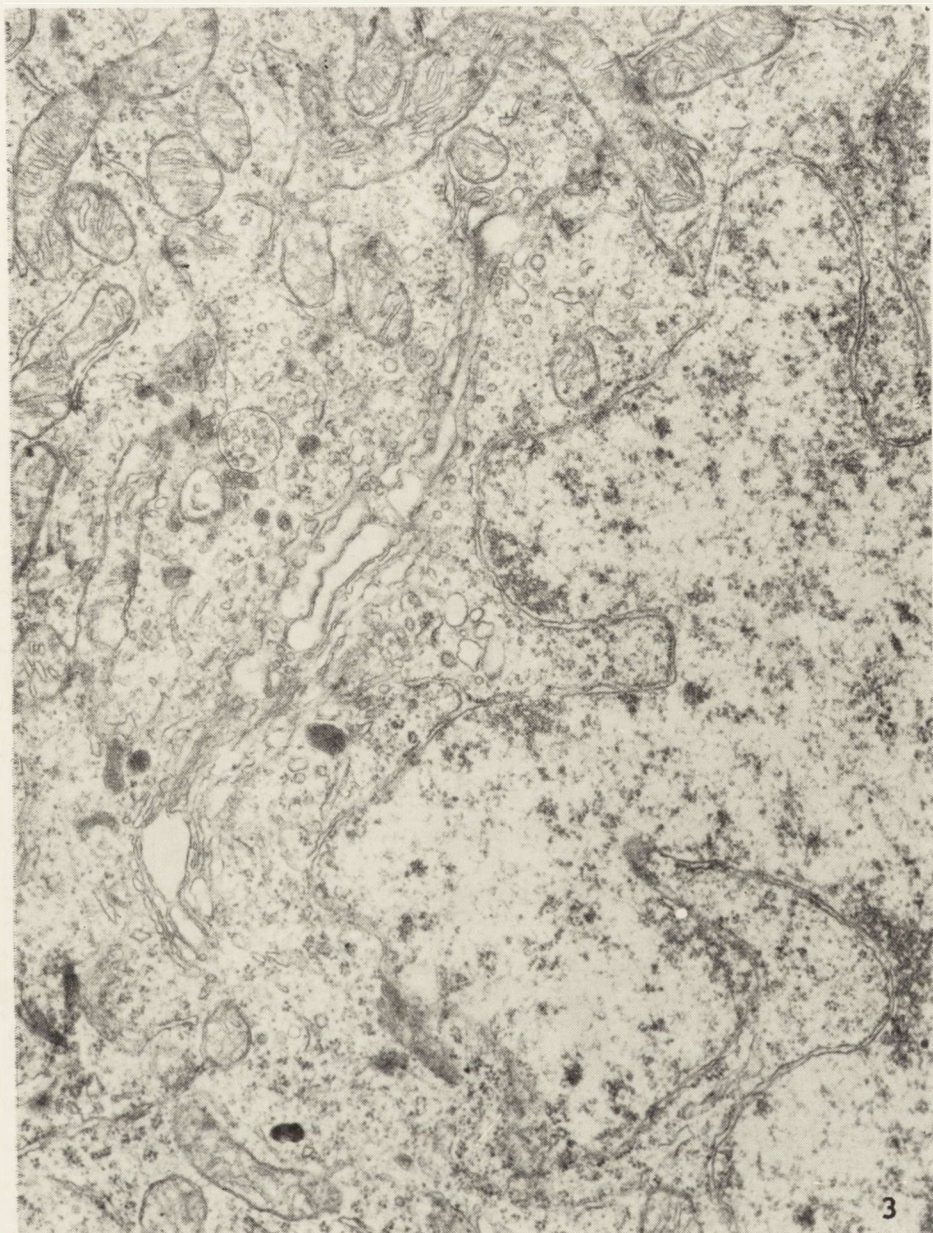
Ryc. 1. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Jądro nadwzrokowe. Fragment jądra komórkowego z głębokimi inwaginacjami. Widoczne elektronowo-gęste jąderko i liczne ziarnistości perichromatynowe (strzałki). W cytoplazmie aparat Golgiego, ziarnistości neurosekrecyjne, ciała wielopęcherzykowe i mitochondria. Pow. 28.800 \times .

Fig. 1. Two-day complete immobilization. Supraoptic nucleus. Fragment of cell nucleus with deep invaginations. Electron dense nucleolus and numerous perichromatin granules (arrows). In cytoplasm Golgi apparatus, neurosecretory granules, multivesicular bodies and mitochondria. $\times 28\ 800$.



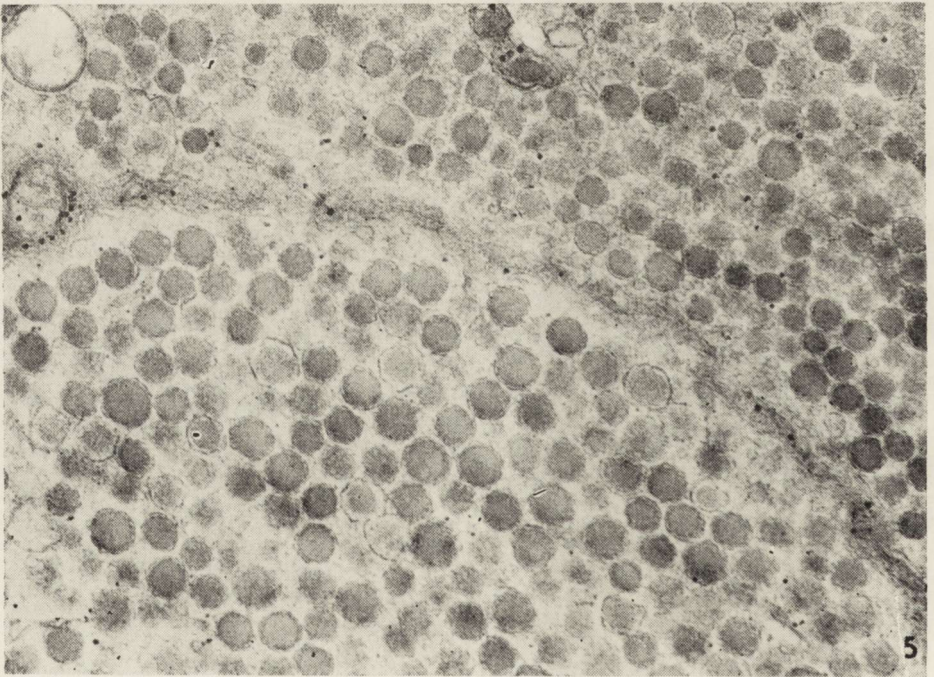
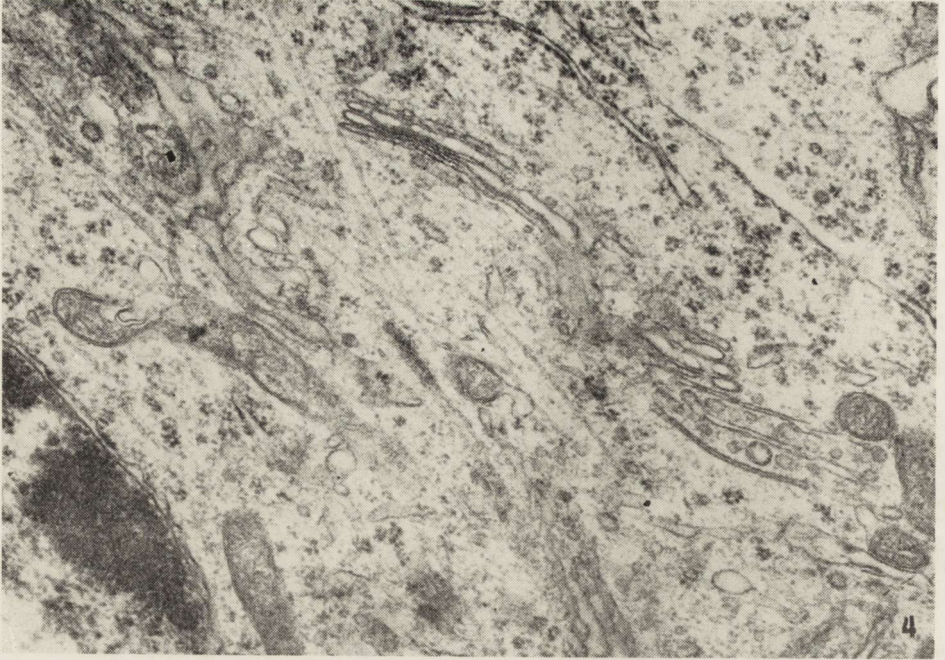
Ryc. 2. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Jądro przykomorowe. We fragmencie cytoplazmy dobrze rozwinięty aparat Golgiego i liczne ziarnistości neurosekrecyjne, ciała gęste i lizosomy oraz dobrze rozwinięta siatka ergastoplazmatyczna. Pow. 28.800 \times .

Fig. 2. Two-day complete immobilization. Paraventricular nucleus. In a fragment of cytoplasm — well developed Golgi apparatus, numerous neurosecretory granules, dense bodies, lysosomes and well developed ergastoplasmic reticulum. \times 28 800.



Ryc. 3. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Jądro nadwzrokowe. Jądro komórkowe z głębokimi inwaginacjami. W cytoplazmie dobrze rozbudowany aparat Golgiego, niektóre jego kanały poszerzone, liczne ziarnistości neurosekrecyjne, ciała gęste, lizosomy i ciała wielopęcherzykowe oraz mitochondria. Pow. 18.900 X.

Fig. 3. Two-day complete immobilization. Supraoptic nucleus. Nucleus with deep invaginations. In cytoplasm — well developed Golgi apparatus, some of its channels dilated, numerous neurosecretory granules, dense bodies, lysosomes, multivesicular bodies and mitochondria. X 18 900.



dowie zbliżonej do normy spotyka się także pojedyncze włókna zawierające liczne lizosomy oraz figury mielinowe, występujące obok ziarnistości neurosekrecyjnych, pojedynczych mitochondriów i dość licznych neurotubul (Ryc. 11). Natomiast spotykane pituicyty charakteryzują się obecnością dużego jądra, często o kształcie nieregularnym, oraz posiadają bardzo rozwinięty aparat Golgiego. W ich cytoplazmie znajduje się dość znaczna liczba ciał tłuszczowych i niekiedy ziarnistości przypominające swoją budową ziarnistości neurosekrecyjne (Ryc. 12).

OMÓWIENIE

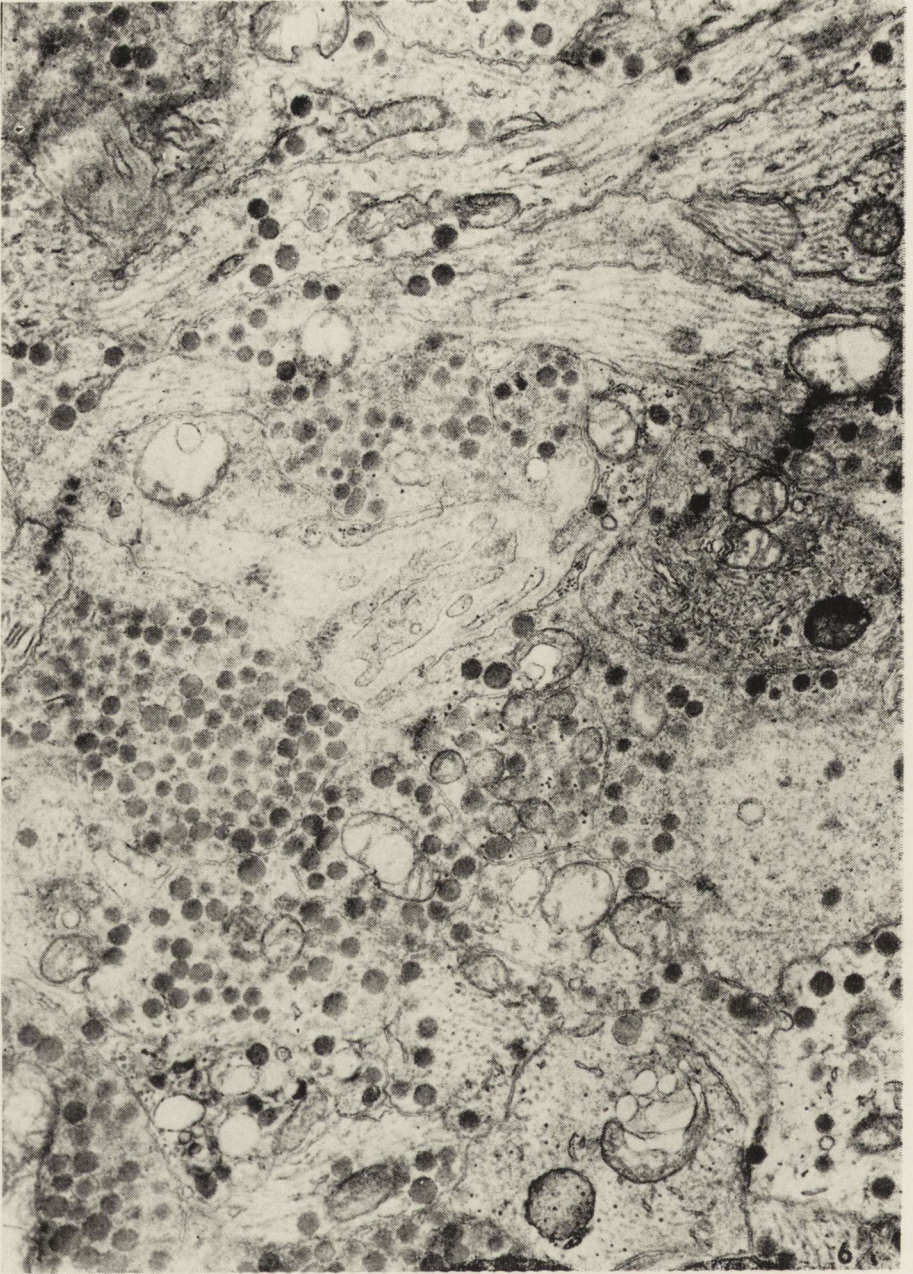
Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że w warunkach działania czynnika stresogennego, jakim było w naszym doświadczeniu unieruchomienie zwierząt, następuje stymulacja układu podwzgórzowo-przysadkowego. Reakcja badanego układu — produkcja i uwalnianie hormonu antydiuretycznego lub innych hormonów, w odpowiedzi na użyty czynnik stresogeny — jest dość trudna do oceny przy użyciu jedynie metod morfologicznych. Na podstawie zaobserwowanych zmian można tylko pośrednio sądzić o aktywacji badanych neuronów sekrecyjnych, której towarzyszy produkcja i uwalnianie hormonów podwzgórzowych. Do tej pory uważano, że jądro nadwzrokowe jest odpowiedzialne za produkcję hormonu antydiuretycznego, a jądro przykomorowe wytwarza oksytocynę (Thorn 1970), natomiast na podstawie ostatnich doniesień (Tasso i wsp. 1976) można sądzić, że wazopresyna i oksytocyna są wytwarzane zarówno w jądrze nadwzrokowym jak i przykomorowym, lecz w odrębnych neuronach. Niezależnie od rodzaju hormonu wydaje się, że hormony te, oraz ich białka nośnikowe — neurofizyny — syntetyzowane są w centrach neurosekrecyjnych i zostają przemieszczone do nerwowego płata przysadki, czego potwierdzeniem mogą być zgrupowania ziarnistości neurosekrecyjnych w okolicy błony presyraptycznej (Green 1966). Charakter białkowy produkowanych przez komórki sekrecyjne hormonów pozwala przypuszczać, że o stanie czynnościowym neuronu może świadczyć aktualny stan syntezy białka. Szybkość i intensywność tej syntezy może być wykładnikiem stanu czyn-

Ryc. 4. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Jądro przykomorowe. We fragmencie cytoplazmy zwraca uwagę duża ilość neurotubuli. Pow. 26.100 X.

Fig. 4. Two-day complete immobilization. Paraventricular nucleus. Numerous neurotubules in a fragment of cytoplasm. X 26 100.

Ryc. 5. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Nerwowa część przysadki. We włóknach widoczne obficie gromadzące się ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 23.800 X.

Fig. 5. Two-day complete immobilization. Neurohypophysis. Abundant neurosecretory granules in fibers. X 23 800.



Ryc. 6. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Nerwowa część przysadki. Przekroje poprzeczne i podłużne włókien. Oprócz ziarnistości neurosekrecyjnych widoczne mikropęcherzyki i neurotubule. Pow. 13.500 X.

Fig. 6. Two-day complete immobilization. Neurohypophysis. Transverse and longitudinal sections of fibers. Beside neurosecretory granules, microvesicles and neurotubules. X 13 500.

nościowego układu neurosekrecyjnego. O stanie syntezy białek w komórce można sądzić na podstawie badań morfologicznych w mikroskopie elektronowym, oceniając zachowanie się ultrastruktur z nią związanych (jądro komórkowe, kompleks GERL, ergastoplazma), na podstawie histochemicznych badań enzymów będących markerami poszczególnych struktur, jak również stosując badania autoradiograficzne. Porównując tempo wbudowywania znakowanego izotopem promieniotwórczym aminokwasu do neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego, można sądzić o szybkości syntezy białka, a co za tym idzie — neurosekretu. Zaletą tych badań jest możliwość obserwowania przemieszczenia wyznakowanego materiału z miejsca syntezy do nerwowej części przysadki (Kwarecki 1973; Heap i wsp. 1975).

Badania prowadzone nad pobudzaniem lub hamowaniem syntezy białek w układzie podwzgórzowo-przysadkowym są bardzo liczne. Stosowane czynniki stresogenne można ogólnie podzielić na trzy grupy:

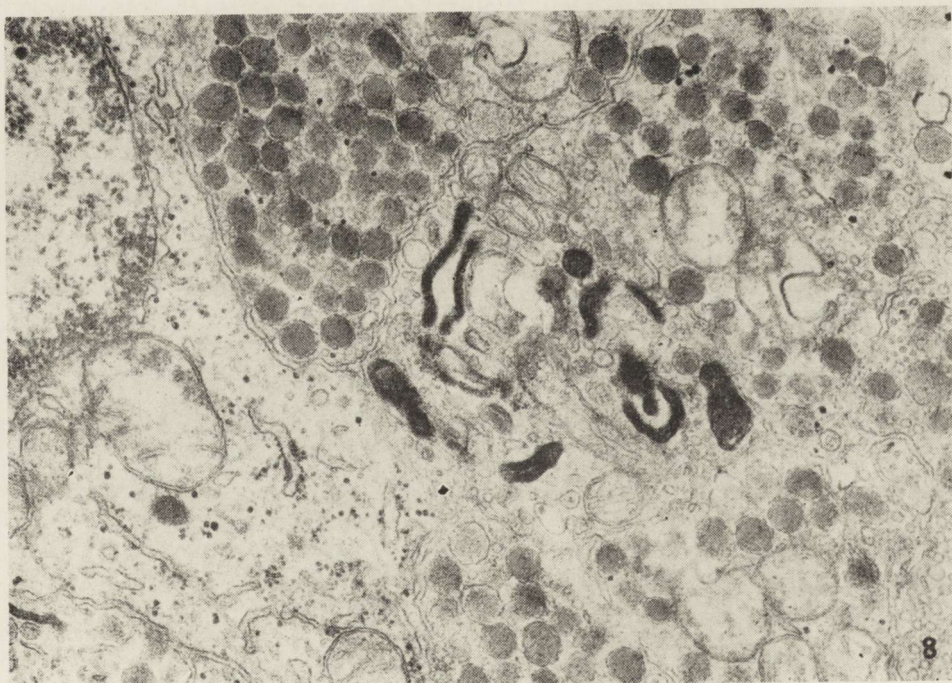
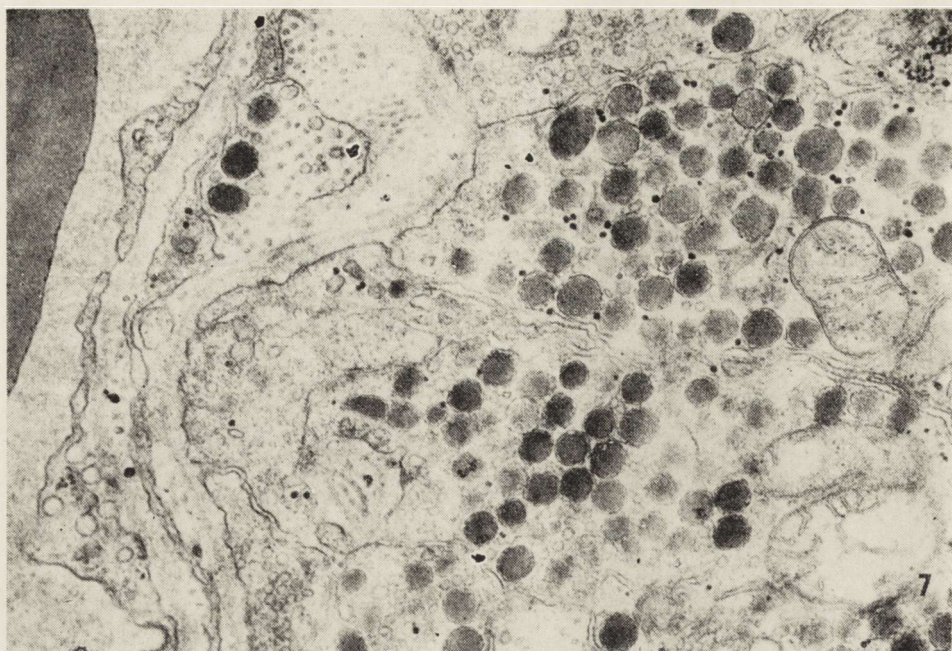
I hormonalne,

II antymetabolity chemiczne,

III czynniki fizyczne.

Badania eksperymentalne czynników należących do pierwszej grupy dotyczą najczęściej hormonu antydiuretycznego, CRF, hormonów przysadki i kory nadnercza (Stark i wsp. 1974; Lymangrover, Brodish 1974, Gajkowska 1975, 1976; Danielewicz 1975). Do często stosowanych antymetabolitów chemicznych należą: morfina, alkohol, aktynomycyna D, kolchicyna, cykloheximid, vinblastyna itp. (Boudier 1973; Santolaya, Echandia 1975, Gajkowska, Borowicz 1976; Borowicz, Gajkowska 1976; Borowicz i wsp. 1977). Stosowano również czynniki fizyczne takie jak: podwyższona temperatura, odwodnienie wywołane przez niepodawanie wody lub podanie NaCl, głodzenie, przecięcie szypuły lejka i ostatnio stosowane unieruchamianie zwierząt (Borowicz, Gajkowska 1972; Norström, Sjöstrand 1972; Vladimirov, Ivanova 1976).

W naszym doświadczeniu wszystkie zaobserwowane zmiany morfologiczne w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego, jądra przykomorowego i nerwowej części przysadki wskazują na stymulację układu neurosekrecyjnego u zwierząt unieruchomionych całkowicie na okres dwóch dni. Zmiany świadczące o wzmożonej syntezie białka, która zawsze poprzedzana jest przez syntezę m-RNA, obserwujemy już w ultrastrukturze jądra komórkowego badanych neuronów sekrecyjnych. Jąderko wykazuje wyraźny wzrost objętości, zaś w nukleoplazmie, w sąsiedztwie włókien chromatynowych widoczne są liczne ziarnistości perichromatynowe, które prawdopodobnie i w tych warunkach stresowych biorą udział w transporcie prerybosomalnego RNA z jądra do cytoplazmy (Gajkowska, Puvion 1977). Ewidentne zmiany wykazuje także kom-



pleks GERL. Rozbudowane są silnie kanały aparatu Golgiego, niekiedy widoczny jest w nich materiał o średniej gęstości elektronowej, który ulega odłączeniu od błon gładkich aparatu Golgiego, zachowując lamelarną osłonkę, pochodzącą prawdopodobnie z tych błon. W jego okolicach widoczna jest duża ilość drobnych pęcherzyków przypominających niedojrzały neurosekret i wreszcie liczne ziarnistości neurosekrecyjne, oraz ciała wielopęcherzykowe. Takie obrazy opisywane były w innych układach doświadczalnych przez wielu autorów i interpretowane jako przejaw aktywności neuronów (Flamand-Durand, Dustin 1972; Borowicz, Gajkowska 1972; Gajkowska 1975).

Nieprzypadkowe wydaje się być także występowanie licznych neurotubuli, których rola i znaczenie jest w ostatnich latach szeroko dyskutowane.

Przypuszczano, że odgrywają one rolę w różnych zjawiskach cyklu komórkowego, związanych z ruchem cytoplazmy (Rebhun 1972) lub wewnątrzkomórkowym ruchem organelli i innych wtęretów komórkowych (Warchoła i wsp. 1974). Ostatnie badania Graingera i Slopera (1971) wykazały, że w układzie podwzgórzowo-przysadkowym są one odpowiedzialne za transport polipeptydów. Potwierdzają to również nasze spostrzeżenia, bowiem obserwowane przez nas znaczne zwiększenie liczby neurotubuli w ciałach neuronów, a także na całym przebiegu włókien nerwowych i nawet w ich zakończeniach, świadczy o wzmożonej szybkości przepływu ziarnistości neurosekrecyjnych do nerwowej części przysadki.

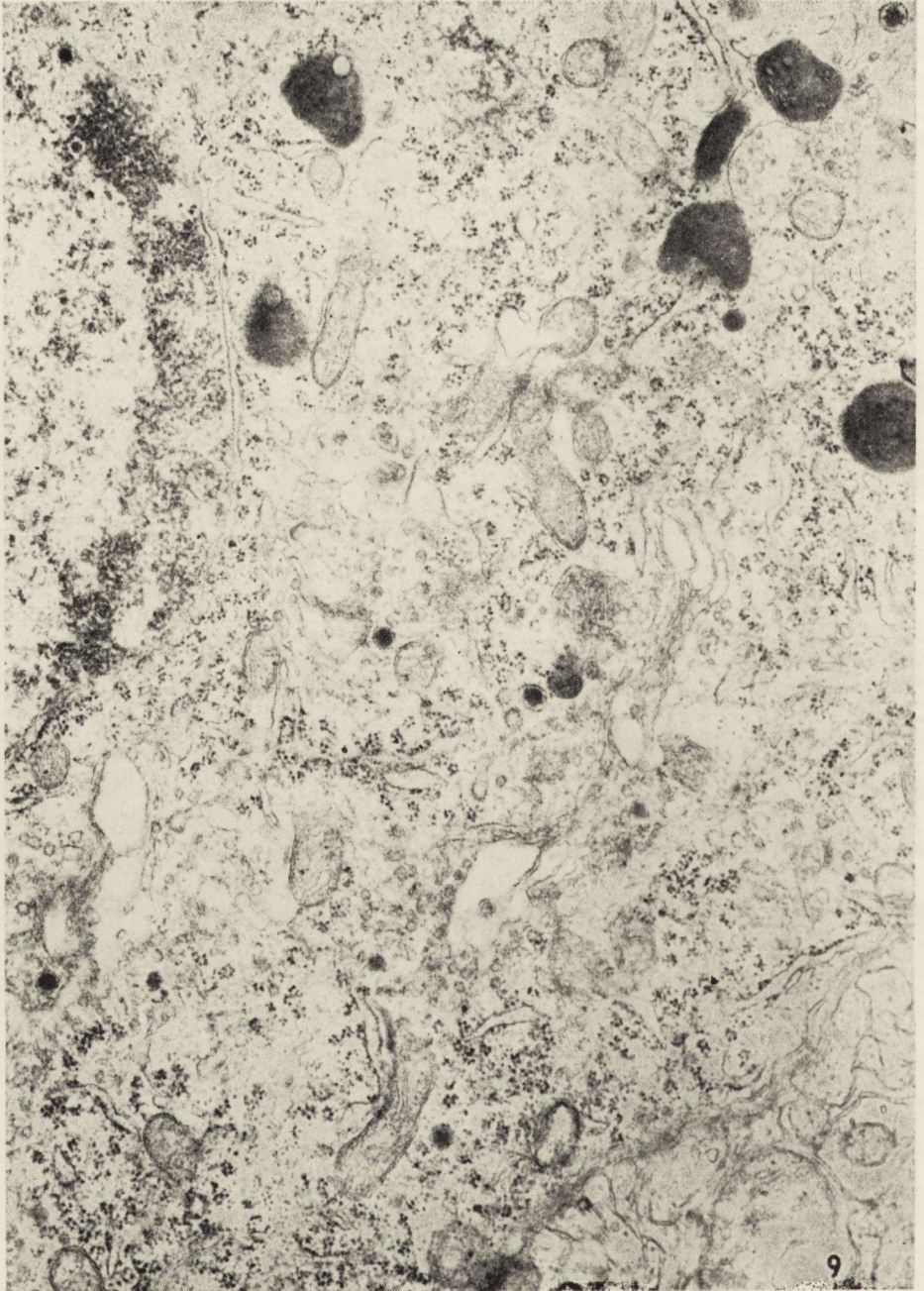
Interesującym także wydaje się obecność w cytoplazmie badanych neuronów ciał jąderkopodobnych. Na podstawie dość już obszernego na ten temat piśmiennictwa, można stwierdzić ich pojawianie się, zawsze w warunkach stymulacji badanych neuronów (kastracja, odwodnienie, adrenalektomia). Ich dokładne pochodzenie oraz znaczenie fizjologiczne jest ciągle kontrowersyjne. Ostatnie badania (Hindelang-Gertner i wsp. 1974) sugerują, że są one zbudowane z rybonukleoprotein i mają

Ryc. 7. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Nerwowa część przysadki. Włókna nerwowe w pobliżu naczynia krwionośnego. Widoczne ziarnistości neurosekrecyjne, mikropecherzyki i mitochondria. Pow. 28.800 \times .

Fig. 7. Two-day complete immobilization. Neurohypophysis. Nerve fibers in the vicinity of blood vessel. Neurosecretory granules, microvesicles and mitochondria. \times 28 800.

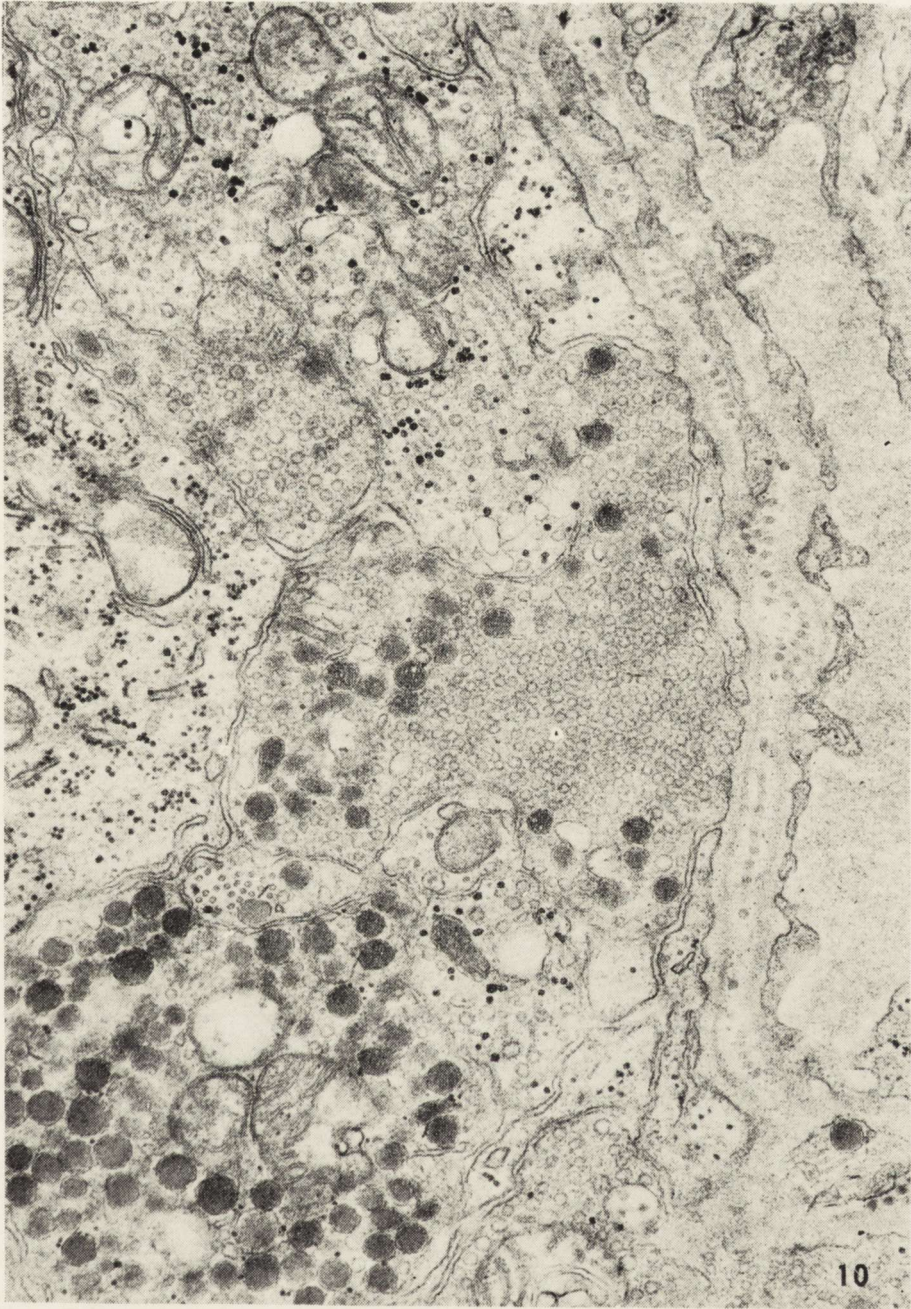
Ryc. 8. Unieruchomienie całkowite-dwudniowe. Nerwowa część przysadki. W niektórych włóknach widoczne figury mielinowe oprócz ziarnistości neurosekrecyjnych i mitochondriów. Pow. 28.800 \times .

Fig. 8. Two-day complete immobilization. Neurohypophysis. In some fibers myelin figures, beside neurosecretory granules and mitochondria. \times 28 800.



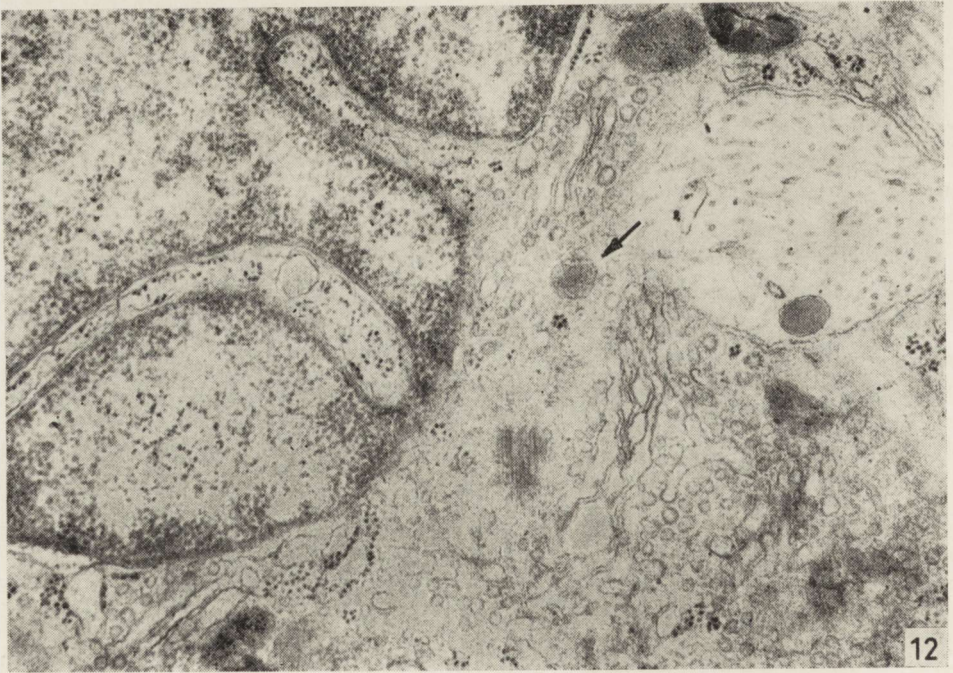
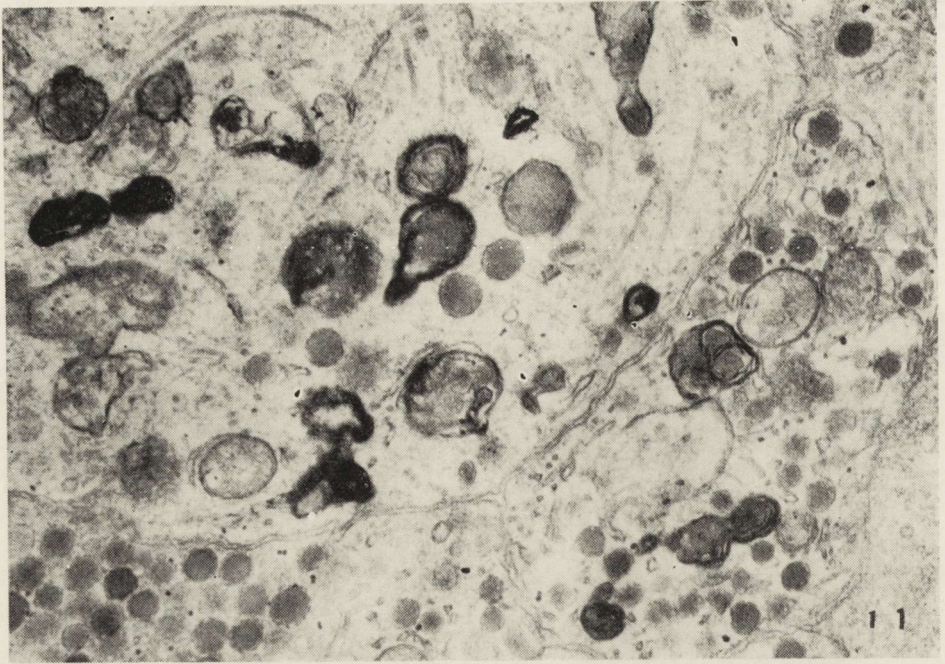
Ryc. 9. Unieruchomienie częściowe-trzytygodniowe. Jądro przykomorowe. We fragmencie neuronu zwraca uwagę duża ilość ciałek gęstych, lizosomy i pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 28.800 \times .

Fig. 9. Three-week partial immobilization. Paraventricular nucleus. In a fragment of a neuron numerous dense bodies, lysosomes and single neurosecretory granules. \times 28 800.



Ryc. 10. Unieruchomienie częściowe-trzytygodniowe. Nerwowa część przysadki. We włóknach przylegających do naczyń krwionośnych liczne mikropęcherzyki oraz niewielka ilość ziarnistości neurosekrecyjnych. Pow. 28.800 \times .

Fig. 10. Three-week partial immobilization. Neurohypophysis. Numerous microvesicles and a small number of neurosecretory granules in fibers adjacent to blood vessels. \times 28 800.



pochodzenie jąderkowe. Ponieważ spotyka się je nie tylko w cytoplazmie komórki ale również w aksonach, można przypuszczać, że reprezentują one materiał prerybosomalny.

W grupie zwierząt o ograniczonej zdolności poruszania się, trwającej trzy tygodnie, obserwowaliśmy w ultrastrukturze badanych neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego i w płacie nerwowym przysadki zmiany o mniejszym nasileniu i nieco innym charakterze.

Na podstawie stwierdzonych zmian ultrastukturalnych (przerost jądra i jąderka, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, wytwarzający jednak w tym układzie raczej ciała gęste i lizosomy niż ziarnistości neurosekrecyjne, to znaczy uczynniający swoją stronę „dojrzewania” (Picard i wsp. 1972) — należy przypuszczać, że w początkowym okresie tego niecałkowitego unieruchomienia, układ podwzgórzowo-przysadkowy być może reagował podobnymi zmianami, jakie stwierdzono w układzie podwzgórzowo-przysadkowym zwierząt poddanych krótkotrwałemu, całkowitemu unieruchomieniu, lecz przedłużający się stres polegający na ograniczonej zdolności ruchowej zwierząt, stworzył możliwość dostosowania się organizmu do zmienionych warunków. Obecność licznych struktur lizosomalnych — zarówno w ciele neuronów jak i we włóknach płąta nerwowego przysadki, jest być może związana z regulacją nadmiaru ziarnistości sekrecyjnych (Boudier, Picard 1976) syntetyzowanych, jak przypuszczamy, w początkowym okresie stresu.

Na podkreślenie zasługuje również fakt występowania małej ilości neurotubul w neuronach obydwu jąder sekrecyjnych tej grupy doświadczalnej, oraz niewielkiej ilości mikrotubul we włóknach nerwowej części przysadki. Opierając się na ostatnich doniesieniach z piśmiennictwa, można sądzić o zmniejszeniu szybkości przepływu ziarnistości neurosekrecyjnych z neuronów podwzgórza do nerwowej części przysadki w grupie zwierząt pozostających w unieruchomieniu częściowo przez okres trzech tygodni.

Ryc. 11. Unieruchomienie częściowe-trzytygodniowe. Nerwowa część przysadki. Przekrój poprzeczny włókna z dużą ilością figur mielinowych i nielicznymi ziarnistościami neurosekrecyjnymi i neurotubulami. Pow. 28.800 \times .

Fig. 11. Three-week partial immobilization. Neurohypophysis. Transverse section. Fibers with numerous myelin figures and small number of neurosecretory granules and neurotubules. \times 28 800.

Ryc. 12. Unieruchomienie częściowe-trzytygodniowe. Nerwowa część przysadki. Fragment pituicyta z dużym jądrem o kształcie nieregularnym, w cytoplazmie dobrze rozwinięty aparat Golgiego i widoczne ziarnistości przypominające neurosekret (strzałka). Pow. 28.800 \times .

Fig. 12. Three-week partial immobilization. Neurohypophysis. Fragment of pituicyte with large, irregularly shaped nucleus. In cytoplasm — well developed Golgi apparatus and granules resembling neurosecret (arrow). \times 28 800.

WNIOSKI

Stres wywołany przez unieruchomienie zwierząt powoduje stymulację układu podwzgórzowo-przysadkowego mózgu szczura.

1. Całkowite unieruchomienie zwierząt trwające dwa dni powoduje w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego:

— zwiększoną produkcję ziarnistości neurosekrecyjnych, czego objawem morfologicznym jest:

- a) przerost jądra i jąderka,
- b) mocno rozwinięta siatka ergastoplazmatyczna,
- c) silnie rozbudowany aparat Golgiego,
- d) duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych.

— przyspiesza transport ziarnistości neurosekrecyjnych z ciał neuronów do ich zakończeń w nerwowej części przysadki, czego objawem morfologicznym jest zwiększona ilość neurotubul.

— powoduje zwiększone wydzielanie gromadzących się obficie ziarnistości neurosekrecyjnych w zakończeniach włókien nerwowej części przysadki, czego odpowiednikiem morfologicznym mogą być spostrzegane ziarnistości o różnej gęstości elektronowej i duża ilość mikropęcherzyków we włóknach przylegających do naczyń krwionośnych.

2. Częściowe unieruchomienie zwierząt trwające trzy tygodnie powoduje wystąpienie zmian w układzie podwzgórzowo-przysadkowym o nieco innym charakterze i słabym nasileniu, co może być wyrazem adaptacji tego systemu i całego organizmu do zmienionych warunków.

B. Gajkowska, A. Лючиани, Е. Борович

РЕАКЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ НА СТРЕСС, ВЫЗВАННЫЙ ИММОБИЛИЗАЦИЕЙ

Резюме

На основании результатов морфологических исследований, проведенных на электронном микроскопе, обнаружено стимуляцию гипоталамо-гипофизарной системы крысы в ответ на стресс, вызванный иммобилизацией. Полная иммобилизация животных в течение двух дней вызывает изменения в нейронах супра-орбитального и перивентрального ядер, а также в волокнах нервной доли гипофиза, указывающих на увеличенную нейросекрецию, и ее увеличенную секрецию до системы кровообращения.

Частичное же обездвижение животных в течение 3 недель вызывает изменения в гипоталамо-гипофизарной системе немного другого характера и более слабо выраженные, что — может быть — свидетельствует об адаптации этой системы и всего организма к измененным условиям.

B. Gajkowska, A. Luciani, J. Borowicz

REACTION OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSEAL SYSTEM OF RAT
TO STRESS PRODUCED BY IMMOBILIZATION.

Summary

Electron microscopic morphological studies revealed a stimulatory response of the hypothalamo-hypophyseal system of the rat brain to stress produced by immobilization. Total immobilization for two days resulted in changes in the neurons of the supraoptical and paraventricular nuclei and in the fibers of neurohypophysis indicating an increased production of neurosecretory granules, their rapid flow and enhanced secretion to blood. Partial immobilization of the animals for 3 weeks produced, in turn, changes of somewhat different character and weaker intensity, which may be considered as a manifestation of the adaptation of the system and the whole organism to the changed conditions.

PIŚMIENNICTWO

1. Andrianova L. A.: Effect of hypokinesia on the hypothalamic—hypophyseal neurosecretory system in rats. *Kosm. Biol. Med.* 1971, 5, 26—29.
2. Barański S., Edelwejn E., Wojtkowiak M.: Hemodynamic and bioelectric disturbances in striated muscles of rat, subjected to accelerative forces after a period of hypokinesia. *Space Life Sci.* 1970, 2, 400—403.
3. Bergström J., Hermansen L., Hultman E., Saltin B.: Diet muscle glycogen and physical performance. *Acta physiol. Scand.* 1967, 150, 71—140.
4. Borowicz J., Gajkowska B.: Zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego szczura w wyniku odwodnienia organizmu. *Pat. Pol.* 1972, 23, 247—261.
5. Borowicz J., Gajkowska B.: Electron microscopic studies on the supraoptic and paraventricular nuclei of rat in acute morphine poisoning. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 209—216.
6. Borowicz J., Danielewicz-Kotowicz A., Maryniak R.: Electron microscopic changes in rat hypophysis induced by morphine. II. Neurohypophysis. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 47—56.
7. Boudier J. A.: Etude ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide dans le noyau supraoptique du rat après retention du neurosecrétat induite par la colchicine. *C. R. Soc. Biol.* 1973, 167, 1165—1169.
8. Boudier J. A., Picard D.: Granulolysis in neurosecretory neurons of the rat supraoptico-posthypophyseal system. *Cell Tiss. Res.* 1976, 172, 39—58.
9. Danielewicz-Kotowicz A.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w przysadce szczura po adrenalektomii i po podaniu ACTH. *Płat nerwowy przysadki.* *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 49—59.
10. Fedorov I. V.: Dynamic of changes in protein metabolism in rate during prolonged hypokinesia. *Kosm. Biol. Med.* 1970, 4, 18—21.
11. Fedorov I. V.: Free amino acid in animal tissues during hypodynamics. *Kosm. Biol. Med.* 1973, 7, 35—39.
12. Fedorov I. V., Vinogradov U. N., Milov J., Grishanina A.: Sintezy proteinow w tkani zivotnych pri gipokinezji. *Kosm. Biol. Med.* 1973, 7, 35—38.

13. Flament-Durand J., Dustin P.: Studies on the transport of secretory granules in the magnocellular hypothalamic neurosis. *Z. Zellforsch.* 1972, 130, 440—84.
14. Gajkowska B.: Electron microscopic lesions of supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus in adrenal insufficiency. *Pol. Med. Sci.* 1975, 15, 5—6.
15. Gajkowska B.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza mózgu szczura po podaniu ACTH. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 1—9.
16. Gajkowska B., Borowicz J.: Electron microscopic observation of the supra-optic and paraventricular nuclei of rat brain in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 363—373.
17. Gajkowska B., Puvion E.: Unusual perinuclear accumulation of RNA granules induced by camptothecin in isolated liver cells. *J. Ultrastruct. Res.* 1977, 60, 335—347.
18. Grainger F., Stoper J. C.: Correlation between microtubular number and transport activity of hypothalamo-hypophyseal system. *Cell Tiss. Res.* 1974, 153, 101—113.
19. Green J. C.: Microanatomical aspects of the formation of neurohypophyseal hormones and neurosecretion. W: *Pituitary Gland*, Eds. Harris, G. W., Donovan B. T., Butterworth, London, 1966, V. 5, 240—258.
20. Heap P. F., Jones C. W., Morris J. F., Pickering S. T.: Movement of neurosecretory product through the anatomical compartments of the neural lobe of the pituitary gland. An electron microscopic autoradiographic study. *Cell Tiss. Res.* 1975, 156, 483—497.
21. Hindelang-Gertner C., Stoeckel M. S., Porte A., Dellman M. D., Madarasz B.: Nematosomes or nucleous-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adeno-hypophyseal cells of the rat. *Cell Tiss. Res.* 1974, 155, 211—219.
22. Kvetnansky R., Gerwitz G. P., Weiss K. W., Kopin S. J.: Effect of hypophysectomy on immobilization-induced elevation of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase in the rat adrenal. *Endocrinology* 1970, 87, 1323—1329.
23. Kwarecki K.: Regulacja czynności układu podwzgórzowo-nadnerczowego w warunkach podstawowych i w stresie. W: *I. M. L. Warszawa*, 1973, 1—40.
24. Lymangrover J. Z., Brodish A.: Physiological regulation of tissue — CRF. *Neuroendocrinology* 1974, 13, 234—245.
25. Norström A., Sjöstrand A. J.: Effect of salt-loading, thirst and waterloading on transport and turnover of neurohypophysial protein of the rat. *J. Endocr.* 1972, 52, 87—105.
26. Paul M. I., Kvetnansky R., Cramer H., Silbergeld S., Kopin I.: Immobilization stress induced changes in adrenocortical and medullary cyclic AMP content in the rat. *Endocrinology* 1971, 88, 338—343.
27. Picard D., Michel-Béchet N., Athouel A., Rus S.: Granules neurosécrétoires, lysosomes et complexes GRL dans le noyau supra-optique du rat. Bipolarité des complexes golgiens. *Exp. Brain Res.* 1972, 14, 331—353.
28. Prokhaska I., Kharkina I., Barbaskowa Z.: Effect of prolonged hypokinesia on the heart muscle of rats. *Fiziol. Zh. SSSR Sechenov.* 1973, 59, 1237—1241.
29. Rebhun L. J.: Polarized intracellular particle transport. Saltatory movements and cytoplasmic streaming. *Int. Rev. Cytol.* 1972, 32, 93—137.

30. Reklewska S., Tomaszewska L., Kaciuba-Uściłko H., Kozłowski S.: Changes in the thyroid and adrenal glands during prolonged immobilization of rats. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 1972, 20, 685—689.
31. Santolaya R. C., Rodriguez E. L., Echandia: Reversible ultrastructural changes of arcuate neurons after vinblastine injection into median eminence of the rat. *Cell Tiss. Res.* 1975, 158, 339—353.
32. Sapronov M., Ryzynkov S.: Aktivnost gipofizarno-nadpoczecznikowej sistemy pod wlianiem wjeszczestw mjedjatornowo tipa. *Arkh. Anat.* 1974, 61, 38—43.
33. Sobocińska J.: The effect of prolonged immobilization on diuresis and water intake in rats. *Space Life Sci.* 1973 a, 4, 200.
34. Sobocińska J.: The effect of immobilization on body fluid volume in the rat. *Space Life Sci.* 1973 b, 4, 304.
35. Stark E., Makara C. M., Marton J., Palkowits M.: ACTH release in rats after removal of medial hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1974, 13, 224—233.
36. Tasso F., Picard D., Dreifuss J. J.: Ultrastructural identification of granules containing oxytocin and vasopressin. *Nature* 1976, 260, 5552—5553.
37. Thorn N. A.: Mechanism of release of neurohypophysial hormones. W: *Aspects of neuroendocrinology*. Eds. Bargmann W., Scharrer B., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, 140—159.
38. Tomaszewska L., Poczopko P.: The effect of restriction of physical activity in the metabolic rate, deep body temperature and live weight of rats. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 1972, 20, 742—745.
39. Vladimirov S. V., Ivanova G. N.: Izmienienia aktivnosti supraopticeskich jader gipotalamusa i distalnych otdjelow gipotalamo-gipofizarnej nejrosekretornej sistjemy morskich swinok pod wlianiem vysokoj temperatury wnieszej srjedy. *Arkh. Anat.* 1976, 71, 9—11.
40. Warchoł J. S., Herbert D. C., Rennels E. C.: Localization of microfilaments in prolactin cells of the rat anterior pituitary gland. *Cell Tiss. Res.* 1974, 155, 193—199.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

IRMINA B. ZELMAN, TADEUSZ MAJDECKI

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W MÓZGACH SZCZURÓW PO ZATRUCIU FOSFOROORGANICZNYM INSEKTYCYDEM DICHLORFOSEM (DDVP)

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

Przeprowadzone uprzednio badania morfologiczne, histochemiczne i histoenzymatyczne mózgow szczurów, którym podawano jednorazowo i wielokrotnie DDVP wykazały szereg nieprawidłowości, wskazujących na toksyczne działanie tego związku na ośrodkowy układ nerwowy (Zelman 1977; Szumańska, Gadamski 1977). Stwierdzono, że stosowanie dużych dawek insektycydu prowadzi do powstania rozsianych ognisk mikrowakuolizacji w tkance nerwowej i do wystąpienia przejściowych, odwracalnych zaburzeń w aktywności enzymów oddechowych i hydrolytycznych, a ponadto do krótkotrwałego odkładania się glikogenu.

Rozsiane zmiany gąbczaste w oun stanowią następstwo nadmierne go gromadzenia się wody w elementach strukturalnych tkanki nerwowej stanowiąc wykładnik jej cytotoksycznego obrzęku. Zarówno etiologia jak i patomechanizm tego typu zaburzeń są zróżnicowane, a ich wykładniki morfologiczne w postaci mikrowakuoli znajdowano pomiędzy blaszkami osłonki mielinowej, w aksonach, dendrytach, w wypustkach astrocytarnych a także w zakończeniach synaptycznych (Gonatas 1970). Ustalenie umiejscowienia mikrowakuoli jest możliwe tylko w badaniu mikroskopowo-elektronowym. Wydawało się więc w pełni uzasadnione przeprowadzenie badań ultrastrukturalnych na modelu podostrego zatrucia dichlorfossem celem ustalenia miejsca pierwotnych zaburzeń.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 2-miesięcznych szczurach rasy Wistar, samcach i samicach, którym podawano sondą dożołądkowo dichlorfos w dawce 50% LD₅₀. Dawkę LD₅₀ dla szczura przyjęto jako równą 80 mg/kg ciężaru ciała (Rusiecki 1973). Zwierzęta otrzymywały przez 10,

14 i 21 kolejnych dni (z wyjątkiem niedziel) DDVP w postaci roztworu w 0,5 ml oleju jadalnego. Kontrolę stanowiły szczury tej samej rasy i wieku, którym podawano dożołądkowo, przez odpowiedni okres czasu, 0,5 ml oleju bez dodatku insektycydu.

W momencie kończenia doświadczenia 3 szczurom doświadczalnym i szczurowi kontrolnemu w każdej grupie, wykonywano w narkozie eterowej perfuzję roztworem aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym. Z mózgow wyjętych z jamy czaszkowej pobierano wycinki z kory, podkorowej istoty białej i spoidła wielkiego oraz z kory i istoty białej mózdzku. Wycinki dotrwalano w roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym i po odwodnieniu w szeregu alkoholi i w tlenku propylenu zatapiano w Eponie 812. Bloczki krojono na ultramicrotomie LKB. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Siatki oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

Po pobraniu wycinków do badań ultrastrukturalnych, pozostały materiał przeprowadzano do bloczków parafinowych. Skrawki do kontroli w mikroskopie świetlnym barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu i wg metody Heidenhaina.

WYNIKI

Kontrolne badanie w mikroskopie świetlnym wykazało obecność rozsianych drobnych ognisk zgąbczenia występujących różnie licznie u poszczególnych zwierząt. Zmiany w nasileniu nieprawidłowości były mało uchwytnie ze względu na znaczne różnice indywidualne, występujące u szczurów zatrutowanych przez taki sam okres czasu. Rozluźnienie struktury tkanki obserwowano najczęściej w okolicach przykomorowych, w bocznej części spoidła wielkiego, w pęczkach włókien w zwojach podstawy, rzadziej w układach długich dróg oraz w podkorowej istocie białej mózdzku. Nie stwierdzono wyraźnych cech uszkodzenia osłonek mieliniowych, z wyjątkiem nieznacznego ogniskowego zblednięcia, ani żadnych nieprawidłowości w zakresie neuronów, gleju komórkowego i układu naczyniowego.

Badanie mikroskopowo-elektronowe

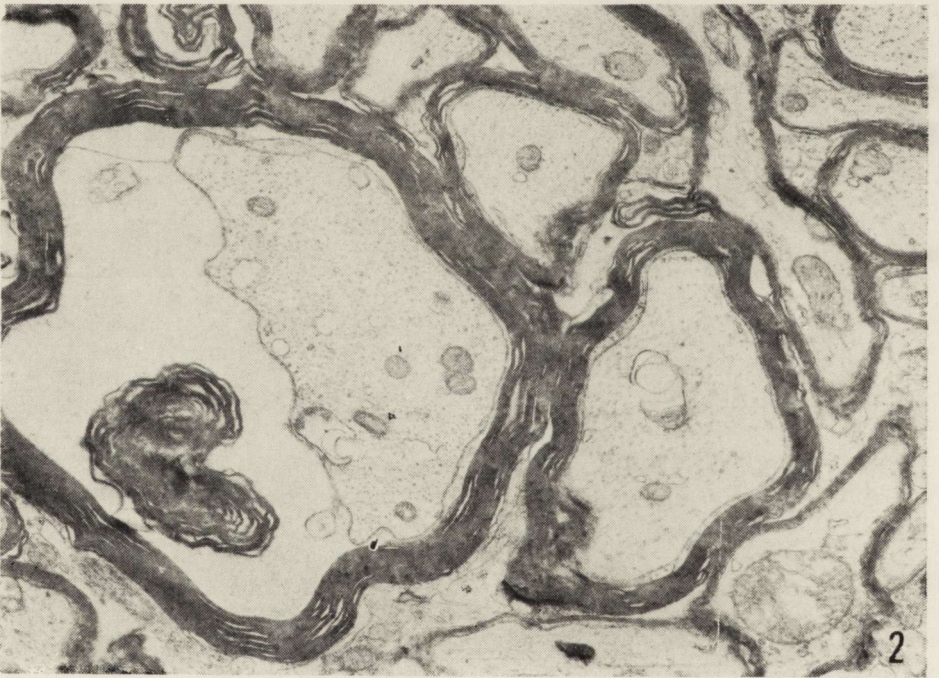
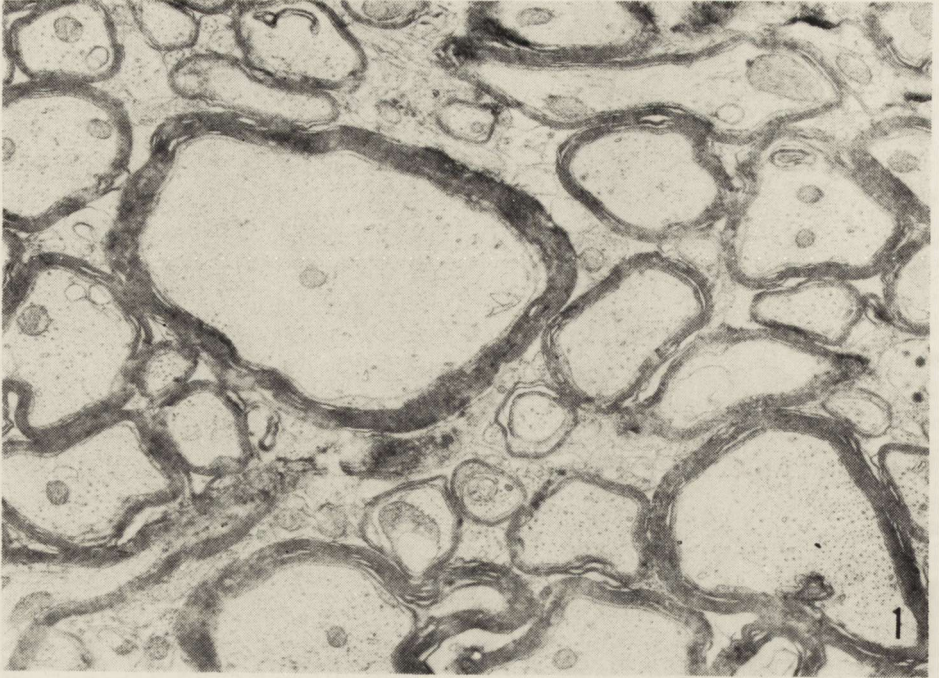
Nieprawidłowości ultrastrukturalne we wszystkich trzech grupach doświadczalnych dotyczyły przede wszystkim wypustek nerwowych. Polegały one na obrzmieniu wypustek oraz występowaniu w obrębie aksoplazmy pól przeredzeń i ubytków neurofilamentów i neurotubul. Na przekrojach poprzecznych wypustek nerwowych w aksoplazmie spoty-

kano często struktury błoniaste o nieregularnym kształcie (ryc. 1). Czasami w dużych powiększeniach można było wykazać, że te struktury są zbudowane z naprzemiennie ułożonych warstw o małej i dużej gęstości elektronowej, typowych dla błon elementarnych (unit membrane). Stosunkowo często obserwowano występowanie poszerzonych przestrzeni pomiędzy aksonem i wewnętrzną blaszką osłonki rdzennej. W przestrzeniach tych znajdowano niekiedy odwarstwione, często porzywane blaszki mielinowe lub grzybkowato wpuklone fragmenty osłonki mielinowej (ryc. 2).

W porównaniu ze zmianami w wypustkach nerwowych osłonki mielinowej były stosunkowo dobrze zachowane. Tylko sporadycznie obserwowano pełną destrukcję osłonki. Częściej spotykane nieprawidłowości dotyczyły wewnętrznych blaszek osłonki mielinowej. Obserwowano pełne oddzielenie kilku wewnętrznych blaszek, ich obkurczenie i przesunięcie w kierunku środkowej części włókna (ryc. 3). Niekiedy odwarstwione blaszki wewnętrzne wpuklały się do aksoplazmy zachowując jednak łączność z osłonką mielinową (ryc. 4). Po całkowitym odłączeniu się od osłonki, odsznurowane blaszki wewnętrzne tworzyły często błoniaste struktury leżące wolno w aksoplazmie (ryc. 5). Wnętrze powstałych w ten sposób tworów charakteryzowała przeważnie mniejsza gęstość elektronowa niż otaczającej aksoplazmy. Przypominały one wyglądem zbiorniki otoczone błoną. Mitochondria obecne w aksoplazmie były przeważnie prawidłowe. Wyjątkowo tylko obserwowano zniszczenie grzebieni mitochondrialnych, zmniejszenie gęstości elektronowej macierzy mitochondriów i sporadycznie obecność w macierzy nieregularnie ułożonych struktur błoniastych. Synapsy nie wykazywały istotnych zmian ultrastrukturalnych.

Komórki nerwowe kory mózgu i mózdzku w większości były niezmiennione. Rzadko obserwowano wpuklenia i pofałdowania otoczki jądrowej (ryc. 6). U szczurów doświadczalnych obserwowano więcej lizosomów w porównaniu z materiałem kontrolnym. Mitochondria neurocytów i komórek glejowych miały niekiedy macierz o małej gęstości elektronowej i zniszczone grzebienie mitochondrialne. Podobne zmiany obserwowano u szczurów grupy kontrolnej, dlatego skłonni jesteśmy uznać je za uszkodzenie związane z techniczną obróbką materiału. Wygląd siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego był prawidłowy. Pojedyncze astrocyty wykazywały cechy obrzmienia. Oligodendrocyty przedstawiały się prawidłowo. Nie stwierdzono żadnych wykładników naczyniopochodnego obrzęku ani zmian w śródbłonkach naczyń włosowatych. Połączenia ściśle pomiędzy komórkami śródbłonka były prawidłowe.

Nie zaobserwowano wyraźnych różnic w nasileniu i umiejscowieniu zmian ultrastrukturalnych zależnych od czasu trwania doświadczenia.



OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że toksyczne działanie dichlorofosu powoduje rozwój nieprawidłowości przede wszystkim w wypustkach komórek nerwowych. Nieprawidłowości te polegały na zubożeniu i opustoszeniu neurofilamentów i neurotubul w aksoplazmie oraz na obkurczaniu się aksoplazmy, prowadzącym do powstawania wolnych przestrzeni pomiędzy włóknem nerwowym i wewnętrznymi blaszkami osłonki mielinowej. Największe zmiany w osłonkach dotyczyły z reguły jej wewnętrznych blaszek, z ich rozwarstwieniem, całkowitym odsznurowaniem i przemieszczeniem do aksoplazmy. Odwarstwienie wewnętrznych blaszek osłonki mielinowej, zapadających się do wnętrza włókna lub tworzących grzybiaste wypuklenia występuje prawdopodobnie na skutek obkurczenia się aksoplazmy. Kim i Rizutto (1975) obserwowali wybitnie nasilone zapadanie się osłonek, poprzedzone obrzękiem aksonów w neuronach poddanych w hodowli tkankowej działaniu dwuetylodwutiokarbaminianu sodu. Kraśnicka i Gajkowska (1979), które badały wpływ dichlorofosu na tkankę nerwową w warunkach hodowli tkankowej, stwierdziły również największe zmiany w aksonach przy współistniejącym znacznym uszkodzeniu osłonek mielinowych.

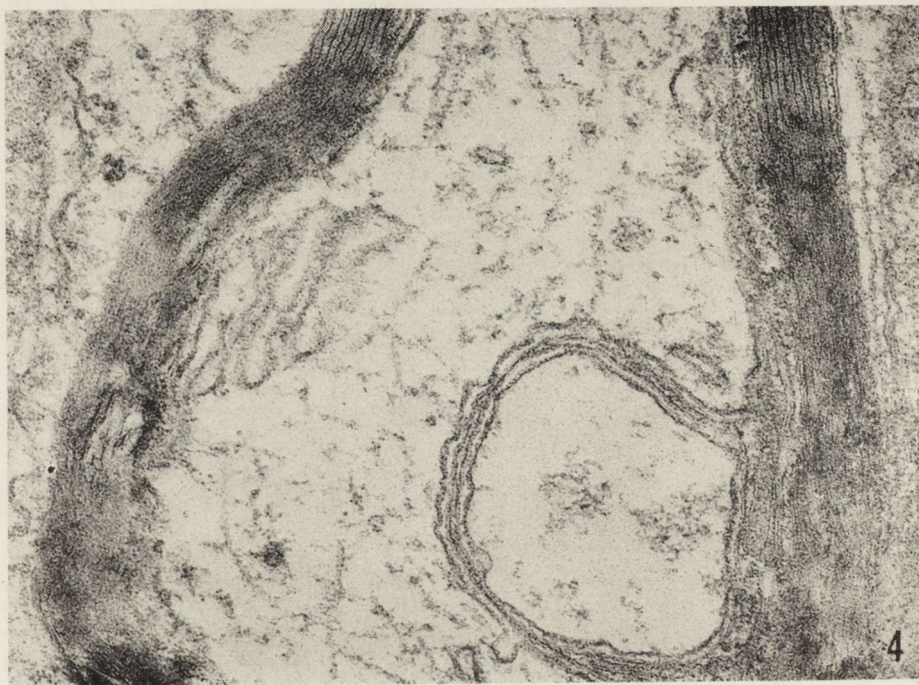
Z badań doświadczalnych nad skutkami zatrucia różnymi związkami fosforoorganicznymi wiadomo, że powodują one uszkodzenie aksonów i demielinizację w nerwach obwodowych (Cavanagh 1969, 1973), czasami również w rdzeniu, a nawet wyżej położonych strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Różnice w działaniu poszczególnych związków znajdują wykładnik w odmiennej topografii uszkodzeń układu nerwowego, ich nasileniu, a niekiedy nawet średnicy włókien wykazujących nieprawidłowości. Według Cavanagha (1973) mechanizm działania związków fosforoorganicznych i fosforonieorganicznych na tkankę nerwową polega na ich bezpośrednim toksycznym działaniu na metabolizm komórki, prowadzącym do zaburzenia procesów syntezy, zużycia sub-

Ryc. 1. Szczur po 10 dniach podawania DDVP. Mózdzek — w niektórych włóknach widoczne zmiany w aksoplazmie w postaci przerzedzenia lub zaniku neurofilamentów i neurotubuli. Widoczne również struktury błoniaste o nieregularnym kształcie. Pow. 6.000 X.

Fig. 1. Rat after 10 days of DDVP administration. Cerebellum. In some nerve fibers rarefaction and loss of neurofilaments and neurotubules. Membraneous structures of irregular shape are also seen. X 6.000.

Ryc. 2. Szczur po 10 dniach podawania insektycydu. Istota biała. W poszerzonej przestrzeni pomiędzy aksonem i wewnętrzną blaszką osłonki mielinowej grzybkowato wpuklony fragment osłonki. Pow. 15.000 X.

Fig. 2. Rat after 10 days of insecticide administration. White matter. In the enlarged space between axoplasm and inner myelin lamellae fungiform protrusion of myelin sheath is seen. X 15.000.



stratów metabolicznych lub transportu. Prowadzi ono do rozwoju zmian strukturalnych w obrębie tych elementów komórkowych i struktur anatomicznych, których udział w procesie zaburzonej przemiany jest największy.

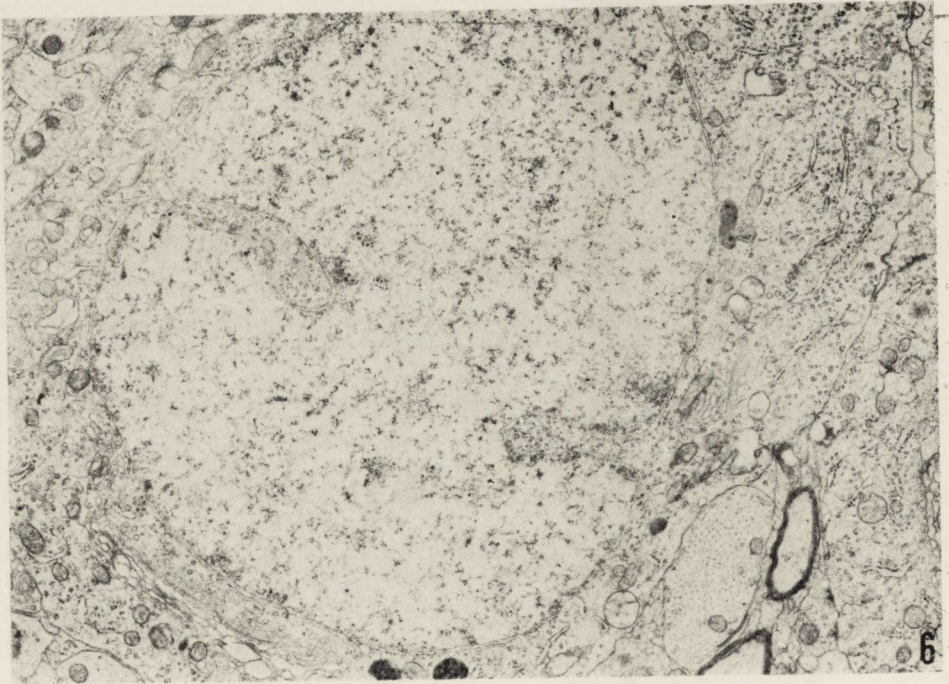
W przeprowadzonych badaniach nie wykazano zależności pomiędzy nasileniem zmian mikroskopowo-elektronowych i okresem zatruwania szczurów. Wydawało się nam nawet, że u zwierząt z dłuższym przeżyciem zmniejsza się nasilenie nieprawidłowości. Cavanagh i wsp. (1968) stwierdzili w doświadczeniach z trójortofosforanem krezylu, zanik wrażliwości badanych zwierząt po wielokrotnym podawaniu tego związku *per os*. Przy biochemicznej ocenie skutków działania różnych fosforoorganicznych środków owadobójczych wielokrotnie stwierdzano brak korelacji pomiędzy wielkością dawki i nasileniem zaburzeń przemiany. Wiśniewski i wsp. (1973), a także Panek i wsp. (1973) sugerują w związku z tym, że istnieją pewne optymalne dawki związków fosforoorganicznych, wywołujące maksymalne zaburzenia metabolizmu tkankowego. Gajkowska i Borowicz (1976) obserwowali u szczurów zatrutowanych morfiną, większe zmiany ultrastrukturalne po ostrym zatruciu niż po długotrwałym zatruciu zwierząt, a więc tego typu adaptacja w stosunku do użytego czynnika uszkadzającego jest znana w patologii układu nerwowego. Występowanie tego typu reakcji adaptacyjnej w przypadku związków fosforoorganicznych może tłumaczyć obserwowany przez nas brak zależności pomiędzy nasileniem uszkodzeń i czasem zatruwania zwierząt doświadczalnych. W przeciwieństwie do naszych wyników, Finkiewicz-Murawiejska (1978), która badała w mikroskopie świetlnym zmiany w rdzeniu szczurów spowodowane podostрым zatruciem trichlorfonem, również fosforoorganicznym środkiem owadobójczym, stwierdziła większe zmiany patomorfologiczne u zwierząt, u których zastosowano wyższą dawkę insektycydu. Uszkodzenie aksonów obserwowano dopiero po użyciu najwyższej dawki insektycydu, natomiast uszkodzenia osłonek mielinowych występowały przy zastosowaniu

Ryc. 3. Szczur po 14 dniach podawania DDVP. Całkowite odwarstwienie i obkurczenie 4 blaszek osłonki mielinowej. W obrębie osłonki otaczającej włókno widoczne odcinkowe rozwarstwienie blaszek. Pow. 16.000 \times .

Fig. 3. Rat after 14 days of DDVP administration. Separation and shrinkage of four myelin lamellae. Segmented splitting of the myelin sheath is also visible. \times 16.000.

Ryc. 4. Szczur po 10 dniach podawania insektycydu. Wpuklenie wewnętrznych blaszek mielinowych do aksoplazmy z zachowaną łącznością z osłonką. Pow. 16.000 \times .

Fig. 4. Rat after 10 days of insecticide administration. Protrusion of inner myelin lamellae into axoplasm with their preserved continuity with myelin sheath. \times 16.000.



niższych dawek trichlorfonu. W patomechanizmie uszkodzeń mieliny autorka uwzględnia działanie zaburzonych mechanizmów barierowych i to zarówno bariery krew—mózg jak i bariery płyn—tkanka, wyróżniając zmiany w osłonkach spowodowane zaburzeniem przepuszczalności naczyń, wywołane działaniem płynu mózgowo-rdzeniowego w następstwie uszkodzenia wyściółki oraz nieprawidłowości spowodowane toksycznym działaniem insektycydu na osłonki mielinowe. W naszym doświadczeniu nie wykazano uszkodzenia śródbłonek naczyń i wykładników zwiększonej przepuszczalności układu naczyniowego, podobnie jak nie stwierdzono istotnych zmian w komórkach nerwowych i gleju. Uszkodzenie motoneuronów rdzenia obserwowała Finkiewicz-Murawiejska w swoim materiale doświadczalnym, a Sośnierz i wsp. (1973) opisali je w innych strukturach mózgu u szczurów zatrutowanych przedziorkofosem. Wyniki naszych badań i ich konfrontacja z danymi uzyskanymi przez innych autorów wskazują na szeroki zakres zmian strukturalnych, wywołanych działaniem różnych związków fosforoorganicznych. Różnorodność stosowanych modeli doświadczalnych i technik badawczych oraz ocenianych struktur uniemożliwia ustalenie, który z tych elementów ma decydujący wpływ na kształtowanie się odrębności morfologicznych.

И. Б. Зельман, Т. Майдечки

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В МОЗГЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНОФОСФАТНЫМ
ИНСЕКТИЦИДОМ ДИХЛОРФОС (DDVP)

Резюме

Были проведены электронмикроскопические исследования мозговой ткани крыс, подвергнутых интоксикации дихлорфосом (ДДФР). Опыты были проведены на взрослых крысах породы Вистар, которым вводили *per os* раствор DDVP в дозе 50% LD₅₀ в течение 10, 14 и 21 дней.

Самые выдающиеся отклонения касались отростков нервных клеток, которые обнаруживали фокусы отсутствия нейрофиламентов и нейроканальцев, а также

Ryc. 5. Szczur po 14 dniach podawania DDVP. W obrębie wypustki nerwowej widoczna w aksoplazmie błoniasta struktura utworzona przez odwarstwione blaszki wewnętrzne osłonki mielinowej. Pow. 15.000 ×.

Fig. 5. Rat after 14 days of DDVP administration. In axoplasm of the nerve process membraneous structure composed of separated inner myelin lamellae is visible. × 15.000.

Ryc. 6. Szczur po 10 dniach podawania insektycydu. W jądrze komórki nerwowej kory widoczne głębokie wpuklenia w otoczce jądrowej. Pow. 4.800 ×.

Fig. 6. Rat after 10 days of insecticide administration. In nerve cell of cerebral cortex invaginations in the nuclear membrane are seen. × 4.800.

увеличение пространства между аксоплазмой и внутренними пластинками миелиновой оболочки. Изменения миелина были менее выражены и касались, почти исключительно, внутренних пластинок, вызывая полную деструкцию миелиновых оболочек. Зависимость между интенсивностью изменений и временем интоксикации не была обнаружена.

Кажется, что первичная аксонная дегенерация со вторичными отклонениями миелиновых оболочек вызывает губчатое разрыхление ткани, наблюдаемое в световом микроскопе.

I. B. Zelman, T. Majdecki

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN RAT BRAIN FOLLOWING ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDE DICHLORVOS (DDVP) INTOXICATION

Summary

Electron microscopic studies on brain tissue of rats subjected to Dichlorvos (DDVP) intoxication were performed. Experiments were carried out with adult Wistar rats which were given *per os* DDVP solution in a dose of 50 percent LD₅₀ during 10, 14 and 21 consecutive days.

The most prominent abnormalities concerned nerve cell processes, which showed focal deprivation of neurofilaments and neurotubules and enlargement of space between axoplasm and inner lamellae of myelin sheath. The changes of myelin were less pronounced and concerned almost exclusively inner lamellae, exceptionally causing full destruction of myelin sheaths. The dependence of intensity of changes on the intoxication time was not discovered.

It seems likely that the primary axonal degeneration with the secondary myelin sheaths abnormalities caused the spongy tissue loosening, observed in the light microscope.

PISMIENNIC TWO

1. Cavanagh J. B.: Toxic substances and the nervous system. *Brit. Med. Bull.* 1969, 25, 268—273.
2. Cavanagh J. B.: Peripheral neuropathy caused by chemical agents. *CRC critical review in toxicology* 1973, 2, 365—417.
3. Cavanagh J. B., Chen F. C., Kyn M. H., Ridley A.: The experimental neuropathy caused in rats by p-bromophenylacetylurea. *J. Neurol. Neurosurg Psychiat.* 1968, 31, 471—478.
4. Finkiewicz-Murawiejska L.: The influence of subacute poisoning with the organophosphate insecticide trichlorfon on morphology of the spinal cord in white rats. *Folia Morphol. (Warsz.)* 1978, 37, 135—150.
5. Gajkowska B., Borowicz J. W.: Electron microscopic observations of the supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 363—370.
6. Gonates N. K.: Comparative study of status spongiosus in human and experimental toxic encephalopathies. *Proc. Internat. Congress of Neuropathol., Pa-ryż,* 1970.

7. Kim S. U., Rizutto N.: Neuroaxonal degeneration induced by sodium diethyldithiocarbamate in cultures of central nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1975, 34, 531—541.
8. Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ dichlorfosu (DDVP) na tkankę nerwową hodowaną *in vitro*. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 243—256.
9. Panek R., Wiśniewski K., Sarosiek W., Danieluk J., Szymański A.: Badania nad właściwościami farmakologicznymi i mechanizmem działania fenchlorfosu. *Brom. Chem. Toksykol.* 1973, 6, 153—160.
10. Rusiecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. PZWL, Warszawa 1973.
11. Sośnierz M., Ważna-Boguńska Cz., Szczurek Z.: Zmiany neuropatologiczne u szczurów zatrutowanych przedziorkofosem. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 109—115.
12. Szumańska G., Gadamski R.: Obraz histochemiczny mózgu szczura po zatruciu fosforoorganicznym pestycydem dichlorfossem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 523—535.
13. Wiśniewski K., Szymański A., Panek R.: Badania nad właściwościami farmakologicznymi i mechanizmem działania fenchlorfosu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1973, 6, 145—152.
14. Zelman I. B.: Patomorfologia mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu fosforoorganicznym pestycydem dichlorfossem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 515—522.

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

JERZY DYMECKI

W SPRAWIE ZALEŻNOŚCI MIĘDZY PRZEWLEKŁYM
ALKOHOLIZMEM
A MIAŻDŻYCĄ TĘTNIC PODSTAWY MÓZGU *)

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego
Kierownik Zakładu: prof. dr Jerzy Dymecki

Sprawa zależności między rozwojem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu jest przedmiotem kontrowersyjnych opinii od wielu lat.

Do 1900 r. chroniczny alkoholizm był traktowany jako jedna z przyczyn miażdżycy (Parrish, Eberly 1961). Cabot w 1904 roku przeciwstawił się pierwszy temu pogładowi, a w r. 1931 Leary ogłosił pracę zatytułowaną „Terapeutyczna wartość alkoholu”, w której pisze: „Jeżeli u człowieka 60-letniego aorta w obrazie sekcyjnym odpowiada wiekowi lat 40 i stwierdza się u niego w wywiadzie przewlekły alkoholizm — to daje wiele do myślenia”.

W I wydaniu dużej monografii Cowdry'ego o miażdżycy z roku 1933, wysunięta została również sugestia, że używanie napojów alkoholowych opóźnia rozwój miażdżycy. Ten sam pogląd reprezentują Hall i wsp. (1953). Wszyscy oni swoje opinie na ten temat opierali na badaniach aorty.

Wśród autorów zajmujących się naczyniami mózgowymi, mniejszą intensywność miażdżycy w grupie chorych cierpiących na przewlekły alkoholizm stwierdzili Majdecki (1964) oraz Klassen i wsp. (1973).

Wielu jednak autorów, opierając się na zestawieniach dużego materiału sekcyjnego zarówno z zakładów anatomii patologicznej jak i medycyny sądowej (pacjentów zmarłych śmiercią gwałtowną), nie znalazło znamiennych różnic w nasileniu miażdżycy między grupą pacjentów z przewlekłym alkoholizmem i grupą nie nadużywającą alkoholu (Ruffer, 1921; Lake i wsp. 1942; Wilens 1947; Hirst i wsp. 1965; Viel i wsp. 1968; Hognestad, Teisberg 1973; Rissanen 1974). W drugim wydaniu Cow-

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

dry's Arteriosclerosis z r. 1967 również pogląd o hamującym wpływie alkoholizmu na rozwój miażdżycy został oceniony krytycznie. Przegląd piśmiennictwa na ten temat podano w zestawieniu.

Zestawienie poglądów różnych autorów na temat zależności między alkoholizmem przewlekłym a rozwojem miażdżycy

A. Materiał sekcyjny ludzki

A. Ruffer 1921	Nie ma różnic natężenia miażdżycy między grupą mahometan — abstynentów i Europejczyków używających alkohol
T. Leary 1931	W przewlekłym alkoholizmie miażdżycy mniejsza. Koncepcja terapeutycznego działania alkoholu
M. Lake i wsp. 1942	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy, a nadużywaniem alkoholu.
S. L. Wilens 1947	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu.
H. M. Parrish A. L. Eberly 1961	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu (dane statystyczne są łudzące).
T. Majdecki 1964	Miażdżycy u alkoholików mniejsza niż w populacji ogólnej (badano tętnice mózgowe).
A. E. Hirst i wsp. 1965	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu. Obniżenie stopnia miażdżycy w naczyniach wieńcowych znaleziono tylko w przypadkach marskości wątroby.
B. Viel i wsp. 1968	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu (i paleniem).
A. C. Klassen i wsp. 1973	Miażdżycy u alkoholików mężczyzn nieco mniej nasilona. (Badano koło tętnicze Willizjusza).
J. Hognestad P. Teisberg 1973	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu (badano naczynia wieńcowe).
V. Rissanen 1974	Nie znaleziono zależności między nasileniem miażdżycy a nadużywaniem alkoholu.

B. Materiał doświadczalny zwierzęcy

T. P. Eberhard 1936	Alkohol opóźnia rozwój miażdżycy
C. W. Nichols i wsp. 1956	Alkohol nie ma wpływu na rozwój miażdżycy wywołanej działaniem stilbestrolu
L. S. Gottlieb i wsp. 1959	Cholesterolemia po alkoholu wyższa niż po samym cholesterolu, a w aorcie większa sudanofilia. Wysoki poziom magnezu w diecie obniża odkładanie się lipidów. Zahamowanie miażdżycy u szczurów zależne od wysokiego poziomu magnezu. Alkohol zwiększa zapotrzebowanie na magnez.
Y. Goto i wsp. 1974	U królików na diecie cholesterolowej miażdżycza doświadczalna mniejsza po alkoholu
M. Rosnowska i wsp. 1976	Miażdżycza u królików karmionych cholesterolem wyraźnie mniej nasiloną po alkoholu.

Parrish i Eberly (1961) sugerują, że opinie o opóźniającym wpływie alkoholizmu na rozwój miażdżycy są wynikiem błędnej oceny statystycznej na skutek porównywania nierównych liczebnie i niejednorodnych grup, między którymi istniało znacznie więcej różnic niż tylko czynnik nadużywania alkoholu. Po znormalizowaniu grup autorzy nie znaleźli statystycznie istotnych korelacji między alkoholizmem a miażdżycą.

Biorąc pod uwagę przedstawione rozbieżności w poglądach na zależność między przewlekłym alkoholizmem a rozwojem miażdżycy, za cel pracy postawiono sobie porównanie nasilenia zmian miażdżycowych u chorych dotkniętych alkoholizmem przewlekłym z intensywnością tych zmian u ludzi nie nadużywających alkoholu.

MATERIAŁ I METODY

Przeanalizowano pod kątem nasilenia miażdżycy w kole tętniczym mózgu materiał sekcyjny Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, zebrany w latach 1961—1978, liczący łącznie 2600 przypadków. Ponadto w latach 1974—1976 zebrano dodatkowo 142 przypadki z dwu różnych szpitali w tym 69 przypadków ze szpitala wielospecjalistycznego (tabela 1).

Tabela 1. Źródła materiału

Table 1. Sources of material

Źródło materiału Source of material	ALC+		ALC-		Razem Total
	M	K	M	K	
Instytut Psychoneurologiczny i Szpital Psychiatryczny w Pruszkowie Psychoneurological Institute, Warszawa, Psychiatric Hospital, Pruszków	73	8	693	891	1665
Szpital Psychiatryczny w Choroszczy Psychiatric Hospital Choroszcza	5	2	27	39	73
Szpital Wielospecjalistyczny w Warszawie General Hospital, Warszawa	5	—	32	32	69
Razem Total	83	10	752	962	1807

ALC+ — 93 mężczyzn — M — 83
males

kobiet — K — 10
females

ALC- — 1714 mężczyzn — M — 754
males

kobiet — K — 962
females.

Z materiału Instytutu Psychoneurologicznego wzięto pod uwagę wyłącznie przypadki powyżej 35 roku życia (w liczbie 1665), z uwagi na fakt, że miażdżycę w wieku młodszym obserwowano wyjątkowo rzadko. Łącznie poddano więc analizie 1807 przypadków. Materiał Instytutu Psychoneurologicznego obejmował przypadki z Oddziałów Neurologicznych i Psychiatrycznych Instytutu oraz Szpitala Psychiatrycznego w Pruszkowie.

Koło tętnicze wydaje się odpowiednim terenem dla badań nad miażdżycą mózgu. Jest łatwe do wyjęcia w całości, przechowywania i oceny, a poza tym wiadomo, że jest ono predyлекcyjnym odcinkiem występowania zmian miażdżycowych (Dymecki 1967). Ponadto koło tętnicze stanowi obiekt porównywalny w badaniach międzynarodowych w oparciu o system oceny nasilenia miażdżycy, opracowany przez Światową Federację Neurologiczną w związku z szeroko zakrojonymi badaniami nad rolą czynników geograficznych w rozwoju miażdżycy, podjętymi w latach sześćdziesiątych. Kod Ś.F.N. (4) stosowany był w odniesieniu do naszego materiału w latach 1961—1973.

Od r. 1974 stosowany był system kodowania opracowany przez Bakera i współpracowników, używany przez nich dla badań porównawczych populacji różnych narodów (Baker i wsp. 1967, 1973; Resch i wsp. 1969). Kod ten oparty jest na identycznych zasadach jak kod Ś.F.N. i stanowi jego udoskonaloną wersję.

Wg Bakera dobry kod winien odpowiadać następującym kryteriom:

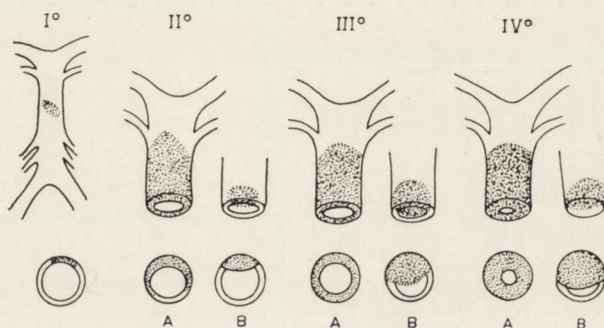
1) winien być dostatecznie prosty, aby badanie jednego przypadku nie zajęło więcej niż kilka minut,

2) stopień miażdżycy musi być na tyle wyraźnie określony, aby kodowanie przeprowadzone przez różnych pracowników dało identyczne wyniki,

3) należy oceniać możliwie dużą liczbę punktów naczynia, aby uzyskać wskaźnik zarówno natężenia, jak i rozprzestrzenienia miażdżycy,

4) oceniane punkty winny być wyraźnie określone, aby w każdym przypadku ocena dotyczyła identycznych okolic koła tętniczego,

5) system oceny musi uwzględniać nie tylko zmiany w ścianie, ale i w świetle tętnicy.



Ryc. 1. Czterostopniowa skala Bakera i wsp. dla oceny stopnia miażdżycy koła tętniczego mózgu.

Fig. 1. Four-grade Baker's et al. score for evaluation of the degree of atherosclerosis in the circle of Willis.

System kodowania opracowany przez Bakera i wsp. (1967) a zastosowany w naszej pracy spełnia powyższe kryteria.

Stopień miażdżycy każdego odcinka koła tętniczego mózgu oceniany był wg następującej czterostopniowej skali (ryc. 1).

I° miażdżycy: zmłoczenie odcinka ściany naczynia bez zwężenia jego światła;

II^o: A — rozlane cienkie blaszki nie obejmujące całego obwodu naczynia i minimalnie zwężające światło;

B — małe, grube blaszki zwężające światło mniej niż o 25%;

III^o: A — rozlane, cienkie blaszki obejmujące cały obwód tętnicy z niewielkim zwężeniem światła;

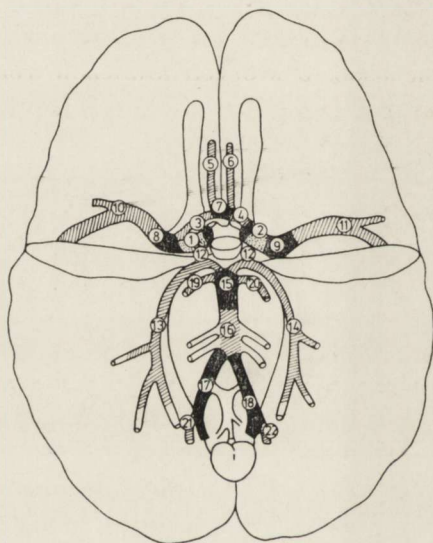
B — grube ogniska zwężające światło od 25 do 50%;

IV^o: A — grube blaszki obejmujące cały obwód tętnicy z umiarkowanym lub dużym zwężeniem światła;

B — grube ogniska zwężające światło o ponad 50%.

Oceny stopnia miażdżycy dokonywano w następujący sposób:

Po starannym zdjęciu koła tętniczego wraz z odgałęzieniami, naszywano je na kartonik i oznakowywano inicjałami chorego i numerem sekcijnym. W momencie oceny rozpoznanie kliniczne nie było znane badającemu.



Ryc. 2. Odcinki koła tętniczego poddawane ocenie celem określenia rozległości zmian miażdżycowych.

Fig. 2. Segments of the circle of Willis subjected to evaluation of the expansion of atherosclerotic changes.

Dla określenia rozległości procesu miażdżycowego koło tętnicze podzielono na 22 odcinki (ryc. 2) i stopień miażdżycy oceniano dla każdego odcinka osobno. Wskaźnik nasilenia miażdżycy obliczano sumując liczby określające stopień miażdżycy we wszystkich punktach. Ponieważ punktów było 22, a największe nasilenie miażdżycy określano licz-

bą 4, najwyższy wskaźnik w tym systemie kodowania wynosił 88 punktów. W każdym przypadku określano następnie łączny stopień miażdżycy dla całego koła tętniczego posługując się następującą punktacją:

- I^o miażdżycy — 0—22 punktów kodu Bakera
- II^o miażdżycy — 23—44 punktów kodu Bakera
- III^o miażdżycy — 45—66 punktów kodu Bakera
- IV^o miażdżycy — 67—88 punktów kodu Bakera

Dane z historii choroby, badania sekcyjnego ogólnego i badania neuropatologicznego mózgu nanoszono następnie na karty perforowane uwzględniając: wiek, płeć, szpital, z którego pochodzi dany przypadek, elementy rozpoznania klinicznego (ze szczególnym uwzględnieniem alkoholizmu przewlekłego) oraz sumarycznie określony stopień miażdżycy naczyń mózgowych.

WYNIKI

Zestawienia liczbowe zależności między nasileniem miażdżycy a wiekiem i płcią w grupie osób, u których klinicznie rozpoznano alkoholizm przewlekły, a którą oznaczono umownie symbolem ALC + oraz w reszcie populacji (ALC —) przedstawiają tabele 2 i 3.

Łączna liczba przypadków, w których stwierdzono klinicznie alkoholizm przewlekły jest stosunkowo niewielka i obejmuje w naszym materiale 93 chorych. U pozostałych 1714 w wywiadzie nie ma wzmianki o nadużywaniu alkoholu. Grupę tę należy jednak oceniać z pewną ostrożnością, biorąc pod uwagę fakt, że w niektórych przypadkach, szczególnie w tych z nagłą utratą przytomności i z krótkim okresem pobytu w szpitalu, wywiad może być niekompletny. W związku z tym nie można wykluczyć, że w grupie tej znajduje się pewien odsetek chorych nadużywających alkoholu w różnych okresach życia.

Większość przypadków z alkoholizmem przewlekłym w wywiadzie mieści się w przedziale wieku od 35 do 70 lat, gdy grupa bez rozpoznania alkoholizmu obejmuje wiek od 35 do 95 lat. Zwraca uwagę fakt, że w przedziale wieku powyżej 70 r.ż. było tylko 10 przypadków z rozpoznaniem alkoholizmu, co stanowi zaledwie 2,15%.

W tabeli 4 zestawiono przypadki z rozpoznaniem klinicznym alkoholizmu i bez niego, z podziałem pod kątem obecności miażdżycy. Jak wynika z tabeli częstość występowania miażdżycy jest wyraźnie mniejsza w grupie ALC +. Różnica ta jest istotna statystycznie.

Biorąc pod uwagę, że I^o miażdżycy według przyjętej klasyfikacji reprezentuje minimalne zmiany nie zwięzające światła tętnicy i nie rzu-

Tabela 2. Nasilenie zmian miażdżycowych w zależności od wieku w grupie pacjentów, u których rozpoznano alkoholizm przewlekły

Table 2. Intensity of atherosclerotic changes depending on age in patients with diagnosed chronic alcoholism

Wiek Age	Stopień nasilenia miażdżycy						Degree of atherosclerosis intensity						Razem Total			
	0°		I°		II°		III°		IV°							
	M	K	R	M	K	R	M	K	R	M	K	R	M	K	R	
35—40	11	2	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13
41—50	14	—	14	2	—	2	1	—	1	1	—	1	1	—	1	19
51—60	14	1	15	3	1	4	1	—	1	1	1	2	1	—	1	23
61—70	6	2	8	8	—	8	5	—	5	5	—	5	1	1	2	28
71—80	3	1	4	1	—	1	—	1	1	1	—	1	1	—	1	8
81—90	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
ponad 90 above	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Razem — Total	49	6	55	15	1	16	7	1	8	8	1	9	4	1	5	93

M — mężczyźni
malesK — kobiety
femalesR — razem
total

Tabela 3. Nasilenie zmian miażdżycowych w zależności od wieku w grupie pacjentów nie nadużywających alkoholu

Table 3. Intensity of atherosclerotic changes depending on age in patients not abusing alcohol

Wiek Age	Stopień nasilenia miażdżycy															Razem Total
	0°			I°			II°			III°			IV°			
	M	K	R	M	K	R	M	K	R	M	K	R	M	K	R	
35—40	22	18	40	1	3	4	3	—	3	—	1	1	—	—	—	48
41—50	28	53	81	13	10	23	4	2	6	—	2	2	3	1	4	116
51—60	52	74	126	42	41	83	20	15	35	13	7	20	5	3	8	272
61—70	63	73	136	87	106	193	42	59	101	54	37	91	13	13	26	547
71—80	38	39	77	71	99	170	63	78	141	32	70	102	24	26	50	540
81—90	6	12	18	20	32	52	12	28	40	13	30	43	3	12	15	168
ponad 90	1	1	2	—	2	2	3	9	12	1	4	5	—	2	2	23
Razem Total	210	270	480	34	293	527	147	191	338	113	151	264	48	57	105	1714

M — mężczyźni
malesK — kobiety
femalesR — razem
total

Tabela 4. Obecność miażdżycy w grupie ALC+ i ALC-

Table 4. Atherosclerosis in groups ALC+ and ALC-

Miażdżycy Atherosclerosis	ALC+		ALC-	
	N	%	N	%
Nieobecna — absent	55	59	480	28
Obecna — present	38	41	1234	72
Razem — Total	93	100	1714	100

 $\chi^2 = 41,03$ $p < 0,001$.N — liczba przypadków
number of cases.

tujące na przepływ w naczyniu, podjęto próbę porównania obu grup, obliczając przypadki z miażdżycą stopnia 0 i I łącznie i porównując je z grupą z miażdżycą II^o, III^o i IV^o (tabela 5). Otrzymano również różnice istotne statystycznie.

Tabela 5. Obecność miażdżycy ciężkiego stopnia w grupie ALC+ i ALC-

Table 5. Advanced atherosclerosis in groups ALC+ and ALC-

Stopień miażdżycy Degree of atherosclerosis	ALC+		ALC-	
	N	%	N	%
0 ^o —I ^o	71	76	1007	59
II ^o , III ^o , IV ^o	22	24	707	41
Razem Total	93	100	1714	100

 $\chi^2 = 11,22$ $p < 0,001$.N — liczba przypadków
number of cases.

Jednym z czynników, które mogą rzutować na wyniki, jest rozkład płci. W grupie ALC+ jest zdecydowana przewaga mężczyzn, podczas gdy w grupie ALC— liczba kobiet i mężczyzn jest bardzo zbliżona. Aby zrównać obie grupy pod względem płci i odrzucić czynnik wpływów hormonalnych, które jak wiadomo, przed 50 r.ż. u kobiet wyraźnie hamują rozwój miażdżycy (Cowdry 1967), porównano nasilenie miażdżycy wyłącznie u mężczyzn (tabela 6). Po wyeliminowaniu różnic zależnych od płci okazało się, że różnica co do intensywności miażdżycy między przypadkami ALC+ i ALC— wyraża się nadal proporcjonalnie

większą liczbą przypadków wolnych od miażdżycy w grupie z rozpoznaniem alkoholizmu przewlekłego.

Tabela 6. Obecność miażdżycy u mężczyzn w grupie ALC+ i ALC-

Table 6. Atherosclerosis in males in groups ALC+ and ALC-

Miażdżycza Atherosclerosis	ALC+		ALC-	
	N	%	N	%
Nieobecna absent	49	59	210	28
obecna present	34	41	542	72
Razem Total	83	100	752	100

$\chi^2=33,81$ $p<0,001$.

N — liczba przypadków
number of cases

Ponieważ większość przypadków z klinicznie rozpoznany alkoholizmem należy do grupy wieku poniżej 70 lat, wyeliminowano z dalszych rozważań chorych przekraczających ten wiek. Biorąc ponadto pod uwagę, że I° miażdżycy reprezentuje minimalne zmiany nie zwięzające światła tętnicy, wykluczono z dalszego opracowania wszystkie przypadki z rozpoznaniem miażdżycy I° i dokonano porównania materiału zrównanego pod względem wieku z uwzględnieniem obecności lub nieobecności wyłącznie ciężkich zmian miażdżycowych. Tabela 7 wskazuje, że między grupą ALC+ i ALC- po takim zrównaniu materiału występują nadal różnice, które są istotne statystycznie.

OMÓWIENIE

Ocena przedstawionych wyników wymaga pewnej ostrożności z uwagi na to, że fakt nadużywania alkoholu może być pominięty w wywiadach, szczególnie u chorych, przybywających do szpitala w ciężkim stanie. Jednakże grupa pacjentów, u których klinicznie rozpoznano alkoholizm przewlekły nie budzi wątpliwości co do zasadności diagnozy, a co za tym idzie, co do jej wartości jako materiału badawczego. Uwzględniając wszystkie zastrzeżenia, z przeprowadzonych badań wynika sugestia, że przewlekłe nadużywanie alkoholu hamuje lub opóźnia rozwój miażdżycy. Badania doświadczalne natomiast dostarczają przeko-

Tabela 7. Obecność miażdżycy ciężkiego stopnia w przypadkach poniżej 70 roku życia w grupie ALC+ i ALC-

Table 7. Advanced atherosclerosis in cases below 70 years of age in groups ALC+ and ALC-

Miażdżycy Atherosclerosis	ALC+		ALC-	
	N	%	N	%
nieobecna absent	50	72	383	56
ciężkiego stopnia advanced	19	28	297	44
Razem Total	69	100	680	100

$\chi^2=6,69$ $p<0,01$

N — liczba przypadków
number of cases.

nywających danych, że zarówno u królików (Eberhard 1936; Goto i wsp. 1974) jak i u szczurów (Gottlieb i wsp. 1959), podawanie alkoholu równolegle z wywoływaniem miażdżycy doświadczalnej powoduje wyraźne zahamowanie jej rozwoju.

Nasze badania (Rosnowska i wsp. 1978) na królikach, u których wywołano intensywne zmiany miażdżycowe w aorcie dietą bogatocholesterolową, wskazują również na fakt zahamowania nacieczenia aorty lipidami w grupie zwierząt, którym równolegle z cholesterolem podawano alkohol. Interesujące jest przy tym, że opóźnienie rozwoju miażdżycy w tej grupie obserwowano pomimo że poziom lipidów w surowicy był bardzo wysoki, wyższy niż w grupie zwierząt karmionych samym cholesterolem.

Fakt powstawania hyperlipemii po pojeniu alkoholem stwierdzany był przez wielu zajmujących się tym problemem autorów, jednakże jak wskazują zarówno wyniki naszych badań, jak i doświadczenia innych autorów, hyperlipemia poalkoholowa nie prowadzi do rozwoju miażdżycy. Dotychczasowe badania biochemiczne nie dały zadowalających odpowiedzi na pytania czym różni się lipemia po diecie cholesterolowej od lipemii poalkoholowej i dlaczego akumulacja lipidów w tętnicach nie występuje przy jednoczesnym z cholesterolem podawaniu alkoholu. Mechanizm hyperlipemii po przewlekłym pojeniu zwierząt alkoholem, tłumaczą niektórzy autorzy obniżeniem przez alkohol poziomu lipazy lipoproteinowej lub wzmożeniem syntezy cholesterolu endogennego ewentualnie zahamowaniem metabolizmu cholesterolu egzogennego (Gottlieb i wsp. 1959).

Nie ulega jednak wątpliwości, że nie każdy rodzaj hyperlipemii jest aterogenny i że alkohol hamuje proces odkładania w ścianach tętnic krążących we krwi lipidów. Mechanizm tego hamującego wpływu nie jest jasny. Goto i wsp. (1974) stwierdzili w swoich badaniach, przeprowadzonych na królikach, obniżenie poziomu beta-lipoprotein, których aterogenny wpływ jest znany. Faktowi temu przypisują, stwierdzone w swoim materiale, zahamowanie rozwoju miażdżycy doświadczalnej po podaniu królikom alkoholu. Nie wszyscy autorzy jednak spostrzegali obniżenie poziomu beta-lipoprotein.

Jeżeli chodzi o mechanizm zależności między rozwojem miażdżycy a alkoholizmem u człowieka, to w piśmiennictwie podkreśla się, że alkohol wywiera wpływ na wątrobę i tą drogą może rzutować na rozwój miażdżycy. Hirst i wsp. (1965) sugerują, że alkohol upośledza detoksykacyjną czynność wątroby w stosunku do estrogenów. Wzrost poziomu estrogenów we krwi powoduje obniżenie poziomu cholesterolu i beta-lipoprotein. W takim ujęciu nie sam alkoholizm, ale wywołane przezeń uszkodzenie wątroby byłoby czynnikiem hamującym miażdżycę. Ten pogląd znajduje wsparcie w badaniach sekcyjnych, w których stwierdzono, że obecność marskości wątroby idzie w parze z mniejszą intensywnością miażdżycy (Klassen i wsp. 1973). Rissanen (1974) uważa, że mniejsze nasilenie stłuszczenia aorty u alkoholików może być związane z towarzyszącym często chorobie alkoholowej niedożywieniem. Wilens (1947) jest zdania, że wniosek o mniejszym nasileniu miażdżycy w przewlekłym alkoholizmie jest złudzeniem, wynikającym z wcześniejszych zgonów oraz rzadszego współistnienia u alkoholików chorób nasilających miażdżycę, takich jak otyłość, nadciśnienie czy cukrzyca.

W naszym materiale zwraca uwagę fakt, że wśród pacjentów z rozpoznaniem alkoholizmu jest bardzo niewielka liczba przypadków po 70 roku życia. Wilens (1947) uważa, że alkoholicy żyją krócej. Obok takiej interpretacji należy jeszcze wziąć pod uwagę, że po 70 roku życia rzadziej na ogół rozpoznaje się alkoholizm przewlekły, gdyż uwagę klinicystów przyciągają inne sprawy chorobowe wieku podeszłego.

Przy ocenie naszego materiału nie można zapomnieć o tym, że znaczna większość analizowanych przypadków pochodzi z oddziałów neurologicznych i psychiatrycznych. Jak wiadomo, na oddziałach takich duży procent chorych stanowią pacjenci, cierpiący na choroby naczyniopochodne mózgu, u podłoża których leży miażdżycza. Trzeba więc liczyć się z tym, że nasilenie miażdżycy tętnic mózgowych w naszym materiale może być nieco większe niż w populacji ogólnej. Materiał ze szpitala wielospecjalistycznego byłby bardziej reprezentatywny, jednak uzyskanie go okazało się niezmiernie trudne.

Podsumowując można jednak stwierdzić, pomimo tych, jak i wymienionych poprzednio zastrzeżeń, że porównanie nasilenia i rozprzestrzenienia miażdżycy tętnic podstawy mózgu u pacjentów, u których rozpoznano przewlekły alkoholizm, z grupą pacjentów nie nadużywających alkoholu wskazuje na tendencję do rzadszego występowania i mniejszego nasilenia miażdżycy u alkoholików.

W badaniach nad środkami hamującymi rozwój miażdżycy warto zwrócić więcej uwagi na działanie alkoholu. Aczkolwiek mechanizm jego ochronnego wpływu na układ naczyniowy nie jest jasny, dalsze badania nad istotą tego wpływu mogą przyczynić się do ulepszenia metod profilaktyki przeciwmiażdżycowej.

Dziękuję serdecznie doc. dr hab. Januszowi Zielińskiemu za konstruktywną dyskusję dotyczącą opracowania statystycznego oraz mgr Elżbiecie Medyńskiej, p. Bożenie Szwacz-Kępińskiej i p. Hannie Malewicz za pomoc techniczną.

Е. Дымецки

К ВОПРОСУ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ ХРОНИЧЕСКИМ АЛКОГОЛИЗМОМ И СКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ ОСНОВАНИЯ МОЗГА

Резюме

В связи с контроверсионными взглядами относительно зависимости между злоупотреблением алкоголя и развитием склероза проводилось сравнение выраженности склеротических изменений артериального круга мозга между группой пациентов страдающих хроническим алкоголизмом и группой больных не злоупотребляющих алкоголем.

Анализу подвергался секционный материал 1807 случаев пациентов возрастом свыше 35 лет, собранных из трех госпиталей за период от 1961 по 1978 г. Хронический алкоголизм имел место у 93 пациентов.

Оценки насilenия и распространения склероза мозговых артерий проводилась системой кодирования Бакера (сума оценки степени склероза в 22 пунктах артериального круга).

Результаты исследований указывают, что выраженность склеротических изменений мозговых артерий у пациентов возраста от 35 до 70 года жизни меньше у пациентов страдающих хроническим алкоголизмом чем у лиц не злоупотребляющих алкоголем. Оценка этих результатов требует определенной осторожности из-за того, что факт злоупотребления алкоголем может отсутствовать в анамнезе, особенно у больных принятых в госпиталь в тяжелом состоянии. Однако группа пациентов, у которых клинически был обнаружен хронический алкоголизм не вызывает сомнения относительно диагноза, и что за этим следует, относительно ее ценности как материала исследования.

В работе обсуждается ряд гипотез касающихся механизма влияния алкоголя на процесс откладывания липидов в стенке сосудов.

Результаты работы говорят о том, что в исследованиях средств тормозящих развитие склероза следует обратить больше внимания на действие алкоголя. Выяснение сущности его влияния на сосудистую систему может способствовать улучшению методов профилактики склероза.

J. Dymecki

ON THE RELATIONSHIP BETWEEN CHRONIC ALCOHOLISM
AND ATHEROSCLEROSIS OF BASAL ARTERIES OF THE BRAIN

Summary

In connection with the controversy around the relationship between alcohol abuse and the development of atherosclerosis, the intensity of atherosclerotic changes in the cerebral arterial circle in patients suffering from chronic alcoholism and in those not abusing alcohol were compared.

The analysis involved autopsy material of 1807 cases, all in the age above 35 years, collected from 3 hospitals in the period of 1961—1978. Chronic alcoholism was diagnosed in 93 patients.

The intensity and expansion of atherosclerosis was evaluated with the Baker's coding system (sum of evaluations in 22 points of the arterial circle).

The results indicate the intensity of sclerosis of cerebral arteries in patients with chronic alcoholism to be less than in those not abusing alcohol. This evaluation is acceptable with the reservation that, alcohol abuse could have escaped consideration in case history, in particular in patients who became hospitalized in critical condition. Nonetheless, the group of patients with clinically diagnosed chronic alcoholism raised no doubts as to the correctness of diagnosis and is considered as fully relevant for these studies.

A number of hypotheses concerning the mechanism of action of alcohol on lipid deposition in arterial walls were discussed.

The results suggest that further studies of drugs inhibiting the development of atherosclerosis should take into account the effect of alcohol. Elucidation of the essence of this effect may contribute to the improvement of the methods used in prevention of atherosclerosis.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker A. B., Flora G. C., Resch J. A., Loewenson R.: The geographic pathology of atherosclerosis: a review of the literature with some personal observations on cerebral atherosclerosis. *J. Chronic. Dis.* 1967, 20, 685—706.
2. Baker A. B., Resch J. A., Loewenson R.: Cerebral atherosclerosis in european populations: a preliminary report. *Stroke* 1973, 4, 898—903.
3. Cabot R. C.: The relation of alcohol to arteriosclerosis. *Cyt. za: Parrish H. M., Eberly A. L.: Negative association of coronary atherosclerosis with liver cirrhosis and chronic alcoholism — a statistical fallacy. J. Indiana Med. Ass.* 1961, 54, 341—347.
4. Collaborative study of epidemiological factors in cerebrovascular disease. Antwerpia, Belgia 1959.
5. Cowdry's Arteriosclerosis. Ed. H. T. Blumenthal, Ch. C. Thomas Publ., Springfield Ill., 1967.
6. Dymecki J.: Badania nad czynnikami determinującymi umiejscowienie ognisk miażdżycowych w tętnicach mózgowych. *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 449—507.
7. Eberhard T. P.: The effect of alcohol on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Arch. Path.* 1936, 21, 616—622. *Cyt. za: Wilens S. L., J.A.M.A.* 1947, 27, 1136—1139.

8. Goto Y., Kikushi H., Abe K., Nagahashi Y., Ohira S., Kudo H.: The effect of ethanol on the onset of experimental atherosclerosis. *Tohoku J. exp. Med.*, 1974, 114, 35—43.
9. Gottlieb L. S., Broitman S. A., Vitale J. J., Zamcheck N.: The influence of alcohol and dietary magnesium upon hypercholesterolemia and atherogenesis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, 53, 433—441.
10. Hall E. M., Olsen A. Y., Davis F. E.: *Am. J. Path.* 1953, 29, 993—1027. Cyt. za: Hirst A. F.: The effect of chronic alcoholism and cirrhosis of the liver on atherosclerosis. *Am. J. Med. Sci.* 1965, 249, 143—149.
11. Hirst A. F., Hadley G. G., Gore J.: The effect of chronic alcoholism and cirrhosis of the liver on atherosclerosis. *Am. J. Med. Sci.* 1965, 249, 143—149.
12. Hognestad J., Teisberg P.: Heart pathology on chronic alcoholism. *Acta path. microbiol. scand. A*, 1973, 81, 315—322.
13. Klassen A. C., Loewenson R. B., Resch J. A.: Cerebral atherosclerosis in selected chronic disease. *Atherosclerosis* 1973, 18, 321—336.
14. Lake M., Pratt G. H., Wright I. S.: Arteriosclerosis and varicose veins: occupational activities and other factors. *J.A.M.A.* 1942, 119, 9, 696—701.
15. Leary T.: The therapeutic value of alcohol. *New England J. M.* 1931, 205, 231—240. Cyt. za: Parrish H. M., Eberly A. L.: Negative associations of coronary atherosclerosis with liver cirrhosis and chronic alcoholism — a statistical fallacy. *J. Indiana Med. Ass.* 1961, 54, 341—347.
16. Majdecki T.: Zmiany w mózgu w alkoholizmie przewlekłym z uwzględnieniem miażdżycy naczyń. *Pol. Tyg. Lek.* 1964, 19, 1188—1191.
17. Nichols C. W., Siperstein M. D., Gaffey W., Lindsay S., Chaikoff I. L.: Does the ingestion of alcohol influence the development of arteriosclerosis in fowls? *J. Exp. Med.* 1956, 103, 465—475.
18. Parrish H. M., Eberly A. L.: Negative association of coronary atherosclerosis with liver cirrhosis and chronic alcoholism — a statistical fallacy. *J. Indiana Med. Ass.* 1961, 54, 341—347.
19. Resch J. A., Okabe N., Loewenson R. B., Kimoto K., Katsuki S., Baker A. B.: Pattern of vessel involvement in cerebral atherosclerosis. A comparative study between a Japanese and Minnesota population. *J. Atheroscler. Res.* 1969, 9, 239—250.
20. Rissanen W.: Coronary and aortic atherosclerosis in chronic alcoholics. *Z. Rechtsmedizin* 1974, 75, 183—189.
21. Rosnowska M., Karwacka H., Dymecki J.: Influence of alcohol on the development of experimental arteriosclerosis in rabbit. W: Brain tumors and chemical injuries to the central nervous system. *Red. M. J. Mossakowski, Pol. Med. Publ., Warszawa*, 1978.
22. Ruffer A. cyt. za: Cowdry's arteriosclerosis. Ed. H. T. Blumenthal, Ch. C. Thomas Publ., Springfield Ill. 1967.
23. Viel B., Donoso S., Salcedo D.: Coronary atherosclerosis in person dying violently. *Arch. Intern. Med.*, 1968, 122, 97—103.
24. Wilens S. L.: The relationship of chronic alcoholism to atherosclerosis. *J.A.M.A.* 1947, 27, 1136—1139.

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

HERMANN F. GERLACH, HANS J. HOLZHAUSEN

MULTIFOCAL PROGRESSIVE LEUKOENCEPHALOPATHY

Institute of Pathology Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg, GDR
Head: Prof. dr W. Janisch

Among the demyelinating diseases encountered in neuropathology, one of the rarest is the progressive multifocal leukoencephalopathy (MPL), which was first described by Åström et al. (1958). Though the disorder may be suspected clinically, a diagnosis can be made only by histopathological methods.

CASE REPORT

A 62 years old man had suffered for 5 years from lymphosarcoma. This diagnosis was confirmed by biopsy. Treatment consisted in repeated irradiations. Seven weeks before death the patient developed a slowly progressing right hemiparesis with facial weakness. During the last week he showed decreased responsiveness. The patient became aphasic, confused and lapsed into a coma prior to his death.

At general autopsy, lymphomatous deposits were found in many viscera, but not in the brain. On partial section of unfixed brain, several small, round areas of discoloration in the left frontal lobe were found. Samples for virological investigations were not taken. The brain was placed in formaline and cut after 2 weeks. Numerous tiny, lentilshaped foci were found in the medullar substance of the left frontal lobe. The largest foci were noted in the right frontal lobe and in the temporal lobes. In some areas the whole white matter was involved. The afflicted areas appeared as gelatinous zones and softenings on the cutting surfaces. The cortex seemed to be unaffected.

Microscopic findings. The brain slices were embedded in paraffin sectioned and stained (hematoxylin-eosin, van Gieson, Nissl, Jabonero, Holzer, Sudan III, Ceres). The multiple lesions varied from small, scattered foci of demyelination to extensive areas of large, confluent zones of demyelination (Fig. 1).

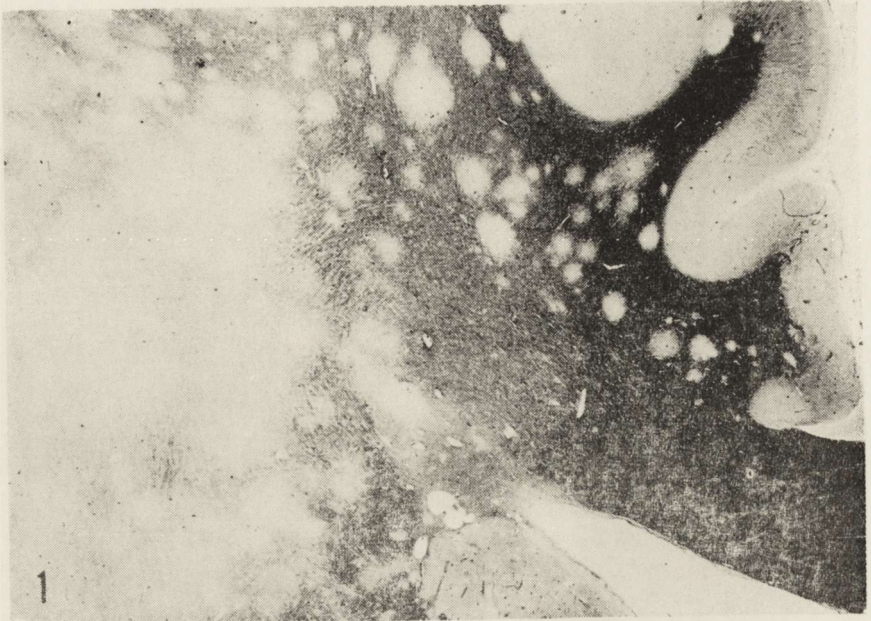


Fig. 1. Multiple demyelination foci in the cerebral white matter. Ceres myelin stain. Magn. glass.

Ryc. 1. Liczne ogniska demielinizacji w istocie białej półkuli mózgu. Met. Ceresa. Pow. lupowe.

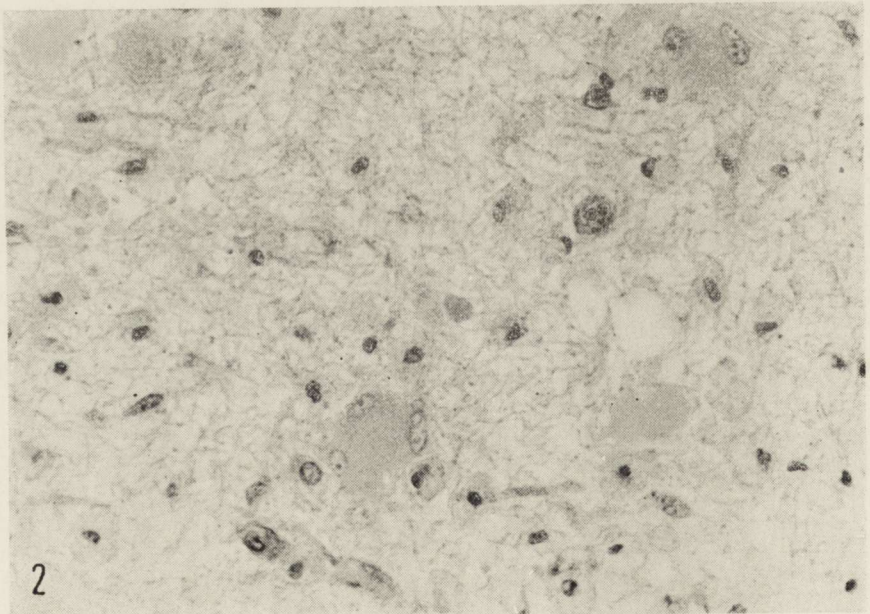


Fig. 2. Large, irregular, partly multinucleated astrocytes H-E., $\times 320$.

Ryc. 2. Duże, przerosłe, w części wielojądrzaste astrocyty. H-E. Pow. 320 \times .

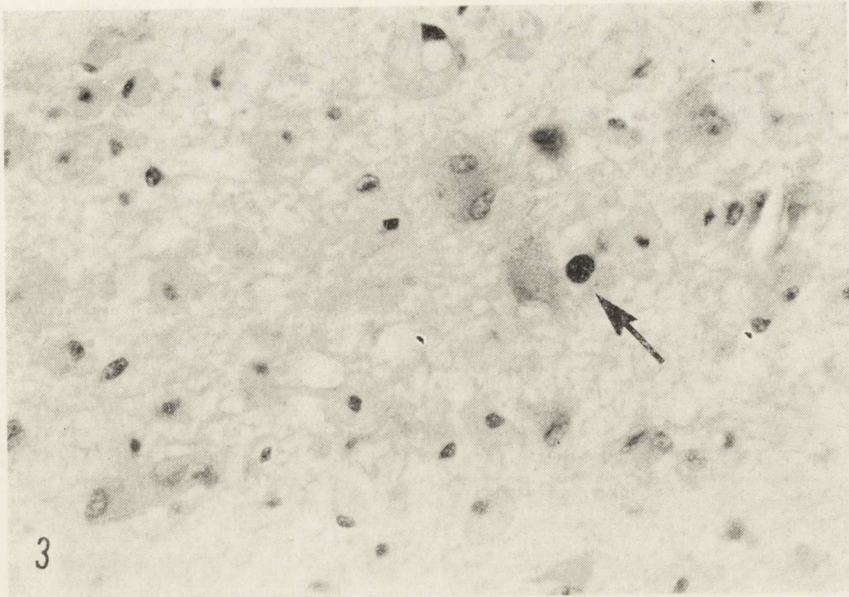


Fig. 3. Enlarged amphophilic oligodendroglial nucleus (arrow) H-E. $\times 400$.
 Ryc. 3. Powiększone amfofilne jądro oligodendrocyta (strzałka) H-E. Pow. $400 \times$

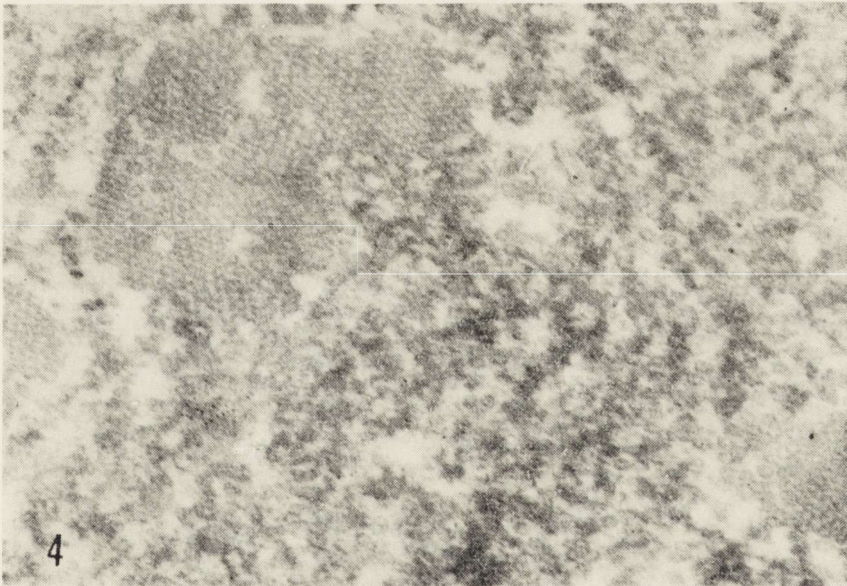


Fig. 4. Virus-like particles in crystalline-like clusters in the nucleus of glia cell.
 ME $\times 58\,000$.

Ryc. 4. Cząstki wiruso-podobne o układzie krystalicznym w jądrze komórki glicyjowej. ME. Pow. $58\,000 \times$.

The axons were damaged in some areas and well preserved in others. Most of the foci were predominantly composed of sudanophilic fat-containing macrophages. Histological examination showed numerous large protoplasmatic, partly multinucleated astrocytes, some of them representing bizarre monster glia (Fig. 2). In addition, enlarged oligodendroglia with basophilic and amphophilic nuclei was seen, likely to contain inclusion bodies (Fig. 3). Striking inflammatory changes were not present. In some sections mild perivascular cuffings were seen. Microscopically the process involved all the central nervous system, but spinal cord. The meninges were not affected. Electron microscopy was performed on brain tissue from areas with verified lesions. The brain remained fixed in formaldehyde for about 2 years. Virus-like particles were seen in the nuclei of glial cells. They were freely dispersed or packed in crystalline-like clusters (Fig. 4). The particles were spherical and had an electron translucent core surrounded by a darker zone, presumably a capsid structure. The diameter of the particles was about 35 nm. Filamentous structures were absent.

DISCUSSION

MPL has often been reported as a complication of immunological defects in a consequence of immunosuppressive treatment of different diseases (Manz et al. 1971; Sponzili et al. 1975). Frequently it is associated with other serious diseases, mostly leukemias and lymphomas. It has been also described in patients after renal transplantation. In some cases MPL has a character of primary disease, occurring in persons with no previous report of any pathological condition (Dąmbska et al. 1972).

In many cases MPL is considered as a papova-like virus disease. This infectious agent was first detected by ZuRhein (1965). In 1971 Padget et al. cultivated a papova-like virus from the brain of a patient with MPL. Other viruses of the papova group were isolated by Weiner et al. (1972).

The frequency of the disease is unknown. More than 100 cases have been reported up to date. Up to now no effective treatment of the disease is available (Conomy et al. 1974).

The presented report aims to demonstrate that presumable multiple encephalomalacias might emerge to be MPL. Therefore a thorough examination of the brain is essential.

H. F. Gerlach, H. J. Holzhausen

POSTĘPUJĄCA WIELOOGNISKOWA LEUKOENCEFALOPATIA

Streszczenie

Autorzy przedstawili przypadek postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii u 62-letniego mężczyzny w przebiegu mięsaka limfatycznego. Podkreślono wagę dokładnego badania neuropatologicznego przypadków z rozszanymi ogniskami rozmiękania istoty białej mózgu, dla prawidłowego rozpoznania zespołu chorobowego.

Г. Ф. Герлях, Г. Я. Хольцхаузен

ПРОГРЕСИРУЮЩАЯ МНОГОФОКУСНАЯ ЛЕЙКОЭНЦЕФАЛОПАТИЯ

Резюме

Авторы представили случай прогрессирующей лейкоэнцефалопатии у 62-летнего мужчины с лимфатической саркомой. Для правильного диагноза синдрома болезни подчеркивается значение точного некропатологического исследования случаев с рассеянными фокусами размякания белого вещества мозга.

REFERENCES

1. Åström, K. E., Mancallt, E. L., Richardson, E. P., Jr.: Progressive multifocal leuco-encephalopathy: a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain*. 1958, 81, 93—111.
2. Conomy, J. P., Beard, N. S., Matsumoto, H., Roosmann, U.: Cytarabine treatment of progressive multifocal leucoencephalopathy. *J. Amer. med. Ass.* 1974, 1313—1316.
3. Dąmbska M., Korthals, J., Mossakowski, M. J.: Postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 545—554.
4. Manz, H. J., Dinsdale, H. B., Morrin, P.A.F.: Progressive multifocal leucoencephalopathy after renal transplantation: demonstration of papova-like virions. *Ann. Intern. Med.* 1971, 75, 77—81.
5. Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Ceroade, R. J.: Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, 1971, 1, 1257—1260.
6. Sponzilli, E. E., Schmith, J. K., Malamud, M., McCulloch, J. R.: Progressive multifocal leucoencephalopathy: a complication of immunosuppressive treatment. *Neurology (Minn.)* 1975, 25, 664—668.
7. Weiner, L. P., Herndon, R. M., Narayan, O., Johnson, T. R., Shale, K., Rubinstein, L. J., Preziosi, T. J., Conley, F. K.: Virus related to SV-40 in patients with progressive multifocal leucoencephalopathy. *New Engl. J. Med.* 1972, 286, 385—390.
8. ZuRhein, G. M., Chou, S. M.: Particles resembling papovaviruses in human cerebral demyelinating disease. *Science*. 1965, 148, 1477—1479.

Authors' address: Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität, Leninallee 14, 402 Halle/Saale, GDR

BOGDAN CZERNIAK, ANNA JAROSZEWICZ, JAN SOLECKI

ULTRASTRUKTURA MIĘŚNI SZKIELETOWYCH W MIOTONII WRODZONEJ

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik Pracowni: prof. dr med. S. Woyke
Oddział Neurologii WSG w Szczecinie
Ordynator: dr med. J. Solecki

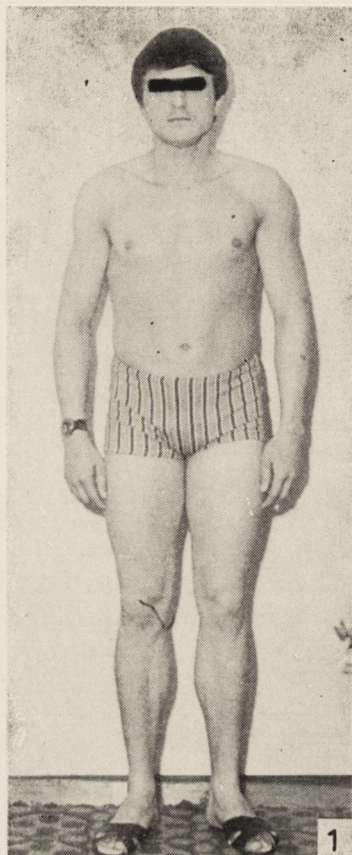
Miotonia wrodzona jest rzadką chorobą dziedziczną, w której mechanizm uszkodzenia komórki mięśniowej oraz patogeneza obserwowanych w jej przebiegu zaburzeń czynności mięśni szkieletowych nie są wyjaśnione (Hausmanowa-Petrusewicz 1977). Badania w mikroskopie świetlnym wykazały niewielkie zmiany morfologiczne polegające na przemieszczeniu jąder komórek mięśniowych z obwodu do środkowych części cytoplazmy (Fidziańska, Biczyskowa 1967; Garcin i wsp. 1967). Natomiast badania biochemiczne wykazały w komórkach mięśniowych zaburzenia gospodarki lipidowej i zaburzenia procesów energetycznych mitochondriów (Kuhn, Seiler 1970; Hausmanowa-Petrusewicz 1977). W piśmiennictwie polskim znaleźliśmy opis ultrastruktury mięśni szkieletowych trzech przypadków miotonii wrodzonej (Fidziańska, Biczyskowa 1967). Rzadkość tego schorzenia oraz pewne odrębności w ultrastrukturze, w porównaniu z dotychczas opisanymi przypadkami, skłoniły nas do przedstawienia obrazów ultrastrukturalnych mięśni szkieletowych dwu dalszych przypadków miotonii wrodzonej.

OPIS PRZYPADKÓW

Dane kliniczne

Przypadek T.: Chory L. M. Nr hist. chor. 2970/155, lat 21, od roku żołnierz służby czynnej, od kilku lat stwierdza u siebie przetrwałe skurcze mięśniowe zwłaszcza w obrębie mięśni dłoni, kończyn dolnych i twarzy. Skurcze te występują po ruchach dowolnych i nasilają się przy oziębieniu. W stanie przedmiotowym stwierdzono atletyczną bu-

dowę ciała ze znacznie przerośniętymi mięśniami obręczy barkowej, kończyn górnych i obu podudzi (ryc. 1). Badaniem neurologicznym z odchyleń stwierdzono tylko dodatni objaw miotoniczny szczególnie wyraźny w obrębie mięśni kończyn dolnych, dłoni i twarzy.



Ryc. 1. Chory L. M. Zwraca uwagę atletyczna budowa ciała z przerośniętymi mięśniami kończyn dolnych i obręczy barkowej.

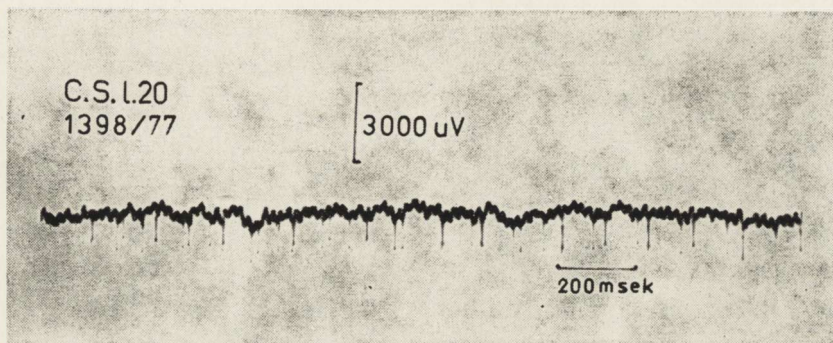
Fig. 1. Patient L. M. Athletic constitution. Hypertrophied muscles in lower extremities and acromial girdle.

Badanie EMG wykazało w mięśniu przywodzicielu prawego kciuka i w mięśniu naramiennym prawym liczne ciągi miotoniczne przy prawidłowym zapisie wysiłkowym. 15-minutowa próba oziębienia kończyny wykazała znaczne nasilenie czynności miotonicznej.

Przypadek II.: Chory C. S. Nr. hist. chor. 5137/206, lat 20, od sześciu miesięcy żołnierz służby czynnej, od 2 lat stwierdza u siebie przetrwałe skurcze mięśniowe występujące po ruchach dowolnych szczególnie w obrębie mięśni obu rąk i kończyn dolnych. Dolegliwości te znacznie

nasilają się po wysiłkach fizycznych i w niskiej temperaturze. W stanie podmiotowym stwierdzono prawidłową budowę ciała bez cech przerostu mięśni szkieletowych. Badaniem neurologicznym z odchyień stwierdzono tylko dodatni objaw miotoniczny szczególnie wyraźny w obrębie mięśni obu dłoni i obu podudzi. Badanie EMG wykazało w mięśni przywodziciela kciuka prawego i w mięśni naramiennym prawym liczne ciągi miotoniczne (ryc. 2) nasilające się po oziębieniu, przy prawidłowym zapisie wysiłkowym.

Wywiad rodzinny w obu przypadkach był niemożliwy do zebrania. Chory L. M. jest wychowankiem domu dziecka, natomiast rodzice chorego C. S. zmarli przed wielu laty.



Ryc. 2. Krzywa EMG z ciągiem miotonicznym.

Fig. 2. EMG curve with a myotonic course.

Badanie w mikroskopie elektronowym

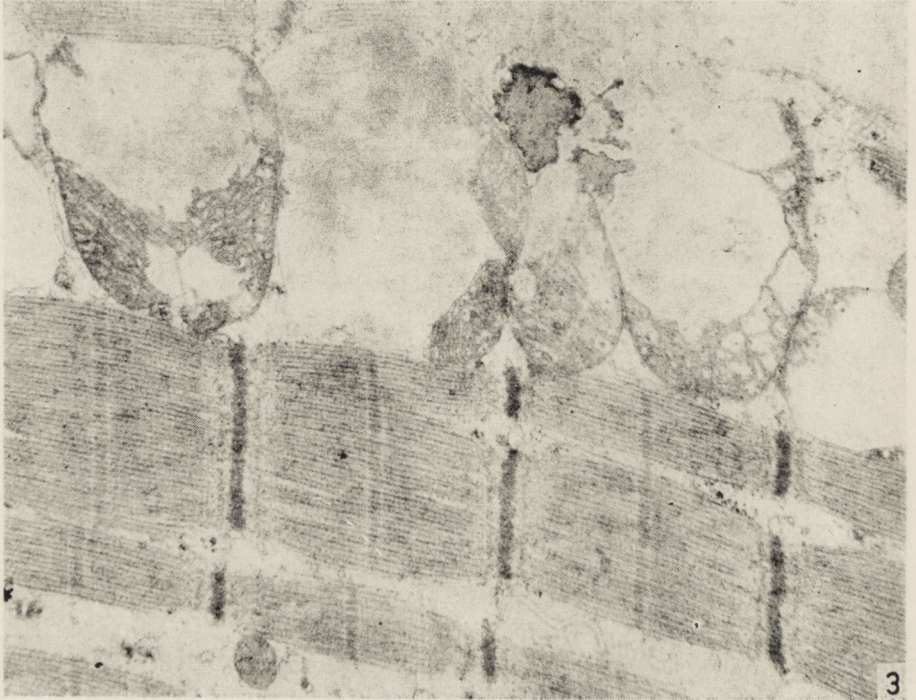
Wycinki do badań w mikroskopie świetlnym i mikroskopie elektronowym pobrano od obydwu chorych z mięśnia brzuchatego łydki. Materiał do badań w mikroskopie świetlnym utrwalono w 10% formalinie. Preparaty wykonano metodą bloczków parafinowych i barwiono H-E. Do badań w mikroskopie elektronowym drobne fragmenty tkanki mięśniowej utrwalono w 1% aldehydzie glutarowym, a następnie w 1% czterotlenku osmu. Materiał po odwodnieniu w szeregu acetonów zatopiono w Vestopalu W. Półcienki skrawki barwiono błękitem toluidyny i fioletem krezyli i oceniano w mikroskopie świetlnym. Ultracienki skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oceniano w mikroskopie elektronowym UEMW-100L.

WYNIKI

Obraz w mikroskopie świetlnym w obu przypadkach był identyczny. Zmiany polegały na przemieszczeniu jąder komórek mięśniowych do

środkowych części cytoplazmy. Jądra te miejscami leżały blisko siebie tworząc długie szeregi.

Obraz mikroskopowo-elektronowy był w obu przypadkach podobny. Stwierdziliśmy niewielkiego stopnia zniszczenie miofibryli, najwyraźniej widoczne w obwodowych częściach komórek. W wyniku ubytku filamentów w obwodowych częściach sarkomerów powstawały niekiedy pola wąskich, jakby przeczesanych miofibryli, o szerokich przestrzeniach międzywłókienkowych, najczęściej wypełnionych przez grupy dużych nieregularnych mitochondrów (ryc. 3). W obrębie za-



Ryc. 3. Skupienie rozdętych mitochondriów w okolicy podotoczkowej. W ich bezpośrednim sąsiedztwie widoczna kula lipidowa. Pow. 22 200 \times .

Fig. 3. Accumulation of swollen mitochondria in the subareolar region. Lipid ball in their close vicinity. \times 22 200.

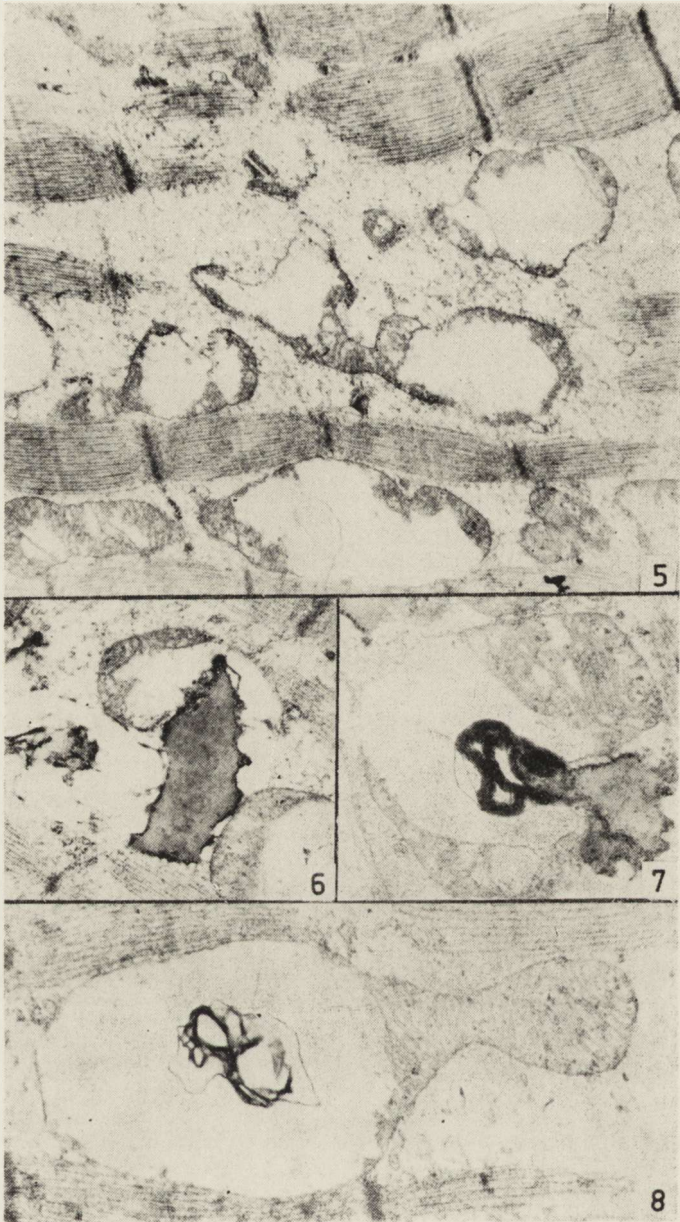
nikłych, wąskich miofibryli występowały przerwania w różnych odcinkach sarkomerów. Przerwania ciągłości miofibryli można było niekiedy stwierdzić również w obrębie sarkomerów o normalnej grubości (ryc. 4). Nie stwierdziliśmy wybiórczego niszczenia kompleksu aktyny lub miozyny. Stosunkowo często przerwania występowały w miejscu prążka Z. Zmiany w miofibrylach miały charakter ogniskowy, w pozostałej części cytoplazmy komórek mięśniowych występowały niezme-



Ryc. 4. Przekrój podłużny przez włókno mięśniowe. Obraz ze środkowej części cytoplazmy. W przestrzeni międzywłókienkowej rozdęte mitochondrium. Widoczne poprzerywania miofibryli głównie w miejscu prążka Z. Pow. 23 000 \times .

Fig. 4. Muscle fiber, longitudinal section. Picture from central part of cytoplasm. Swollen mitochondrion in the interfibrillar space. Disruption of miofibrilles, mostly in the region of Z stria. \times 23 000.

nione miofibryle z sarkomerami bez morfologicznych odchyień od normy. Drugą grupę zmian stanowiły zmiany w mitochondriach. Liczba mitochondriów była znacznie większa od spotykanej w normalnych komórkach mięśniowych, a układ ich bardzo nieregularny. Nie stwierdziliśmy typowego dla komórek mięśniowych ułożenia kulistych mitochondriów na wysokości prążka I, a pałczkowatych w pobliżu prążka A. Leżały one bezładnie w przestrzeniach międzywłókienkowych. Występowały również pola zarówno kulistych jak i pałczkowatych lub nieregularnych, dużych mitochondriów (ryc. 3, 5). Spotykaliśmy je zarówno w okolicy podotoczkowej jak i w środkowych częściach cytoplazmy, gdzie wypełniały one poszerzone przestrzenie międzywłókienkowe. Część mitochondriów uległa rozdęciu. We wnętrzu rozdętych mitochondriów spotykaliśmy ciała mielinowe (ryc. 8). Stosunkowo często w pobliżu mitochondriów w bezpośrednim kontakcie z ich błoną leżały kuliste lub nieregularne twory zbudowane z homogennej substancji odpowiadającej



Ryc. 5. Obraz obwodowej części cytoplazmy. Poszerzone przestrzenie międzywłókienkowe wypełnione przez liczne, nieregularnych kształtów, mitochondria. Widoczne cienkie miofibryle poprzerywane w różnych odcinkach. Pow. 17 500 \times .

Fig. 5. Peripheral part of cytoplasm. Dilated interfibrillar spaces filled with numerous irregularly shaped mitochondria. Thin miofibrilles disrupted in various segments. \times 17 500.

swoim wyglądem ciałom lipidowym (ryc. 3, 6). Kule lipidowe wpuklały się niekiedy do światła mitochondriów (ryc. 6). Można było również zauważyć stopniowe przechodzenie kul lipidowych we wpuklające się do mitochondriów ciała mielinowe (ryc. 7). Jądra komórek mięśniowych, poza ich ułożeniem w środkowych częściach cytoplazmy, nie wykazywały żadnych morfologicznych odchyłeń od stanu prawidłowego. Nie stwierdziliśmy również zmian w tkance podścieliskowej i naczyńach krwionośnych.

DYSKUSJA

Zmiany ultrastrukturalne stwierdzone w badanych przez nas przypadkach miotonii wrodzonej dotyczą w zasadzie dwóch elementów komórki mięśniowej — miofibryli i mitochondriów. Stwierdzone przez nas zmiany zanikowe oraz przerywania miofibryli są identyczne z uprzednio opisanymi w przypadkach miotonii wrodzonej (Fidziańska, Biczyskowska 1967; Garcin i wsp. 1967). Zmiany tego typu opisano również w mięśniach szkieletowych, w postępującej dystrofii mięśniowej, a także w dystrofii miotonicznej (Aleu, Afifi 1964; Afifi i wsp. 1966). W mitochondriach opisano cały szereg zmian w różnych schorzeniach mięśni szkieletowych określanymi niekiedy wspólną nazwą miopatii mitochondrialnych (Ernester i wsp. 1959; Shy, Gonatas 1964; Shy i wsp. 1966; D'Agostino i wsp. 1968; Costaigne i wsp. 1972). Stwierdzone przez nas rozdęcia mitochondriów, ciała mielinowe w ich wnętrzu oraz bliski kontakt mitochondriów z kroplami lipidowymi nie były do tej pory opisane w miotonii wrodzonej.

Jak wynika z analizy naszych elektronogramów (ryc. 6, 8) wpuklenie się do wnętrza mitochondriów kul lipidowych stopniowo przechodzących w ciała mielinowe może dawać na niektórych przekrojach wrażenie obecności tych struktur we wnętrzu mitochondriów. W związku z tym, przynajmniej część ciałek mielinowych obserwowanych przez nas we wnętrzu mitochondriów, może stanowić tylko poprzecznie przecięte wpuklenie struktur leżących faktycznie poza mitochondrium. Ciała mielinowe nie są charakterystyczne dla miotonii wrodzonej i najczęściej

Ryc. 6. Kula lipidowa wpuklająca się do mitochondrium. Pow. 17 200 ×.

Fig. 6. Lipid ball invaginating into a mitochondrion. × 17 200.

Ryc. 7. Kula lipidowa stopniowo przechodząca w ciało mielinowe wpuklające się do mitochondrium. Pow. 21 000 ×.

Fig. 7. Lipid ball gradually developing into a myelin body, invaginating into a mitochondrion. × 21 000.

Ryc. 8. Ciało mielinowe leżące w rozdętej części mitochondrium. Pow. 29 400 ×.

Fig. 8. Myelin body in a swollen part of mitochondrion. × 29 400.

występują w przewlekłych stanach zapalnych mięśni szkieletowych (Sato i wsp. 1971; Hausmanowa-Petrusewicz 1977). Natomiast bliski kontakt kul lipidowych z mitochondriami opisano w wielu różnych stanach patologicznych komórki mięśniowej, między innymi w miopatiach dziecięcych, a także w dystrofii miotonicznej (Aleu, Afifi 1964; Shy i wsp. 1966). Według Palade'a i Schidlowsky'ego (1958) kule lipidowe są materiałem energetycznym zużywanym przez mitochondria w zaburzeniach przemiany lipidów przebiegających z niedostateczną fosforylacją kwasów tłuszczowych. Bliski kontakt ciał lipidowych z błoną mitochondriów umożliwia wtedy fosforylację kwasów tłuszczowych przez układy enzymatyczne mitochondriów. Za tego typu interpretacją naszych obrazów może również przemawiać fakt stwierdzenia w komórkach mięśniowych w miotonii wrodzonej, zmniejszonego poziomu oksydacyjnej fosforylacji oraz zaburzeń przemiany lipidowej, zwłaszcza w zakresie fosfolipidów (Kuhn, Seiler 1970; Hausmanowa-Petrusewicz 1977).

Б. Черняк, А. Ярошевич, Я. Солецки

УЛЬТРАСТРУКТУРА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ВО ВРЕЖДЕННОЙ МИОТОНИИ

Резюме

Представлена ультраструктура скелетных мышц двух случаев врожденной миотонии. Кроме до сих пор описанных изменений в виде небольшой дистрофии миофибрилл и их повреждений, обнаруживались многочисленные липидные шары и миелиновые тельца, изгибающиеся иногда внутрь митохондрий.

Авторы, на основании литературных данных и анализа собственных электронограмм, выдвигают гипотеза, что полученные изменения могут составлять морфологический показатель нарушений метаболизма липидов в мышечной клетке в этой болезни.

B. Czerniak, A. Jaroszewicz, J. Solecki

THE ULTRASTRUCTURE OF SKELETAL MUSCLES IN CONGENITAL MYOTONY

Summary

The study deals with the ultrastructure of skeletal muscles in two cases of in-born myotony. Beside earlier described changes such as partial atrophy and disruption of myofibrilles, numerous lipid balls and myelin bodies were observed, some of them invaginated into mitochondria.

Basing on the literature data and own electronograms, the authors put forward a hypothesis that the observed changes may be considered as a morphologic manifestation of disturbances of lipid metabolism in muscle cells in this nosologic unit.

PIŚMIENNICTWO

1. Afifi A. K., Aleu F. D., Goodgold J., MacKay J.: Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 1966, 5, 475—481.
2. Aleu F. D., Afifi A. K.: Ultrastructure of muscle in myotonic dystrophy. *Amer. J. Path.*, 1964, 45, 221—232.
3. Costaigne P., Laplane D., Fardeau M., Dordain G., Autret A., Hirt L.: Myopathie avec anomalies mitochondriales localisées aux fibres de type I. *Rev. Neurol.*, 1972, 126, 81—96.
4. D'Agostino A. N., Ziter F. A., Rallison M. L., Bray P. F.: Familial myopathy with abnormal muscle mitochondria. *Arch. Neurol.*, 1968, 18, 388—401.
5. Ernester L., Ikkos D., Luft R.: Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature*, 1959, 12, 1851—1854.
6. Fidziańska A., Biczyskova W.: Electron microscopy in biopsy of the skeletal muscles. *Acta Med. Pol.*, 1967, 8, 393—398.
7. Garcin R., Dubois-Poulsen A., Fardeau M.: Maladie de Thomsen de révélation néo-natale avec éteinte particulière des muscles respiratoires. Documents ultrastructuraux concernant la biopsie musculaire. *Wien. Z. Nervenheilk.*, 1967, 25, 172—181.
8. Hausmanowa-Petrusewicz I.: Choroby mięśni. PZWL, Warszawa, 1977.
9. Kuhn E., Seiler D.: Biochemische Besonderheiten und Unterscheide der Autosomal Dominant und Autosomal Recessiv Vererbten Myotonia Congenita. *Klin. Wschr.*, 1970, 48, 1134—1136.
10. Palade G. E., Schidlowsky G.: Functional association of mitochondria and lipid inclusions. *Anat. Rec.*, 1958, 130, 352.
11. Sato T., Walker D. L., Peters H. A., Reese H. H., Chou S. M.: Chronic polymyositis and myxovirus like inclusions. *Arch. Neurol.*, 1971, 24, 409—418.
12. Shy G. M., Gonatas N. K.: Human myopathy with giant abnormal mitochondria. *Science*, 1964, 145, 493—496.
13. Shy G. M., Gonatas N. K., Perez M.: Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. *Brain*, 1966, 89, 133—167.

Adres autora: Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Instytut Biostruktury PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin

KRYSTYNA RENKAWEK

WŁAŚCIWOŚCI MORFOLOGICZNE, HISTOENZYMATYCZNE
I ULTRASTRUKTURALNE ŚRÓDBŁONKÓW NACZYŃ
WŁOSOWATYCH MÓZGU W ORGANOTYPOWEJ HODOWLI
POZAUSTROJOWEJ

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

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

Naczynia włosowate ośrodkowego układu nerwowego charakteryzują się swoistymi właściwościami morfologicznymi i fizjologicznymi, zapewniającymi regulację wymiany substancji między krwią i tkanką (Lee 1971; Jasiński, Kilarski 1976). Kapilary mózgu wraz z systemem otaczających je wypustek glejowych pełnią rolę bariery uniemożliwiającej przechodzenie z naczyń do mózgu białek, wielu związków występujących w osoczu krwi oraz kompleksów barwnikowo-białkowych (Ehrlich 1885; Hoffman 1961; Klatzo i wsp. 1962). Nieprzepuszczalność naczyń włosowatych mózgu dla białek wiąże się z ich odmienną budową polegającą na istnieniu połączeń ścisłych między komórkami śródbłonka (Karnovsky 1967; Brightman, Reese 1969). Połączenia ściśle nie tworzą jednak bariery dla jonów, aminokwasów i glukozy, a stopień przepuszczalności naczyń mózgowych może ulegać zmianie w następstwie działania różnych czynników nie naruszających integralności międzykomórkowych połączeń ścisłych (Agnew, Crone 1967; Sershen, Lajtha 1976).

W świetle badań prowadzonych od szeregu lat nad wyjaśnieniem mechanizmów regulujących przepuszczalność naczyń mózgowych dla poszczególnych substancji ustalono, że przepuszczalność naczyń mózgowych związana jest ze zjawiskiem aktywnego transportu substancji poprzez komórki śródbłonka naczyń włosowatych. Źródło energii dla aktywnego transportu znajduje się w komórkach śródbłonka odpowiedzialnych zarówno za naczyniowy etap czynnego transportu substancji z krwi do mózgu, jak i za zjawiska bariery naczyniowo-tkankowej. W tym świetle szczególnego znaczenia nabiera zagadnienie wyposażenia komórek śród-

błonka naczyń włosowatych mózgu we właściwe układy enzymatyczne, uczestniczące w procesach aktywnego transportu. Szereg autorów (Albert i wsp. 1966; Joó i wsp. 1967; Farkas-Bargeton, Arsenio-Nunes 1970) przypisuje podstawowe znaczenie w przepuszczalności naczyń esterazie butyrylocholinowej (BChE-aza), fosfatazie zasadowej (FZ-aza) i gamma-glutamyltranspeptydazie (GGTP-aza), wiążąc ich czynność z utrzymaniem i regulacją mechanizmów barierowych krew-mózg. Z badań nad przepuszczalnością naczyń mózgu można sądzić, że rola śródbłonek naczyń mózgu jest inna niż w narządach, w których nie istnieje wybiórcza, zróżnicowana przepuszczalność naczyń, określana nazwą bariery krew-tkanka. Można zatem przypuszczać, że znajduje to również wyraz w odrębnościach enzymatycznych śródbłonek naczyń włosowatych mózgu i innych narządów. Dla oceny funkcji i właściwości biologicznych komórek śródbłonek istotne jest również wyjaśnienie czy określone właściwości enzymatyczne komórek śródbłonek są ich cechą „wrodzoną” (intrinsic factor), czy uwarunkowane są złożonymi procesami związanymi z krążeniem krwi w naczyniach *in situ*, wpływami ich środowiska tkankowego, oddziaływaniem związków chemicznych zawartych we krwi itp.

Wyłączenie komórek śródbłonek spod wpływów ich naturalnego środowiska w hodowli pozaustrojowej może sprzyjać lepszemu poznaniu ich właściwości biologicznych oraz ich udziału w procesach związanych z przepuszczalnością naczyń zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych.

Właściwości morfologiczne i metaboliczne śródbłonek *in vitro* są mało poznane. Dotychczasowe badania nad komórkami śródbłonek w hodowli pozaustrojowej dotyczą przede wszystkim innych niż mózg narządów (Altschul 1954), a ich wyniki są mało zachęcające. Wskazują one bowiem na niemożność identyfikacji komórek śródbłonek w hodowli, trudność ich utrzymania *in vitro* przez odpowiednio długi okres czasu, na brak wzrostu komórek śródbłonek w hodowlach organotypowych, a przede wszystkim ich przekształcanie się w fibroblasty.

Celem podjętych badań było: 1) uzyskanie wzrostu naczyń włosowatych w hodowlach organotypowych mózdzku i opony miękkiej oraz innych narządów poza ośrodkowym układem nerwowym (skóra, żebro); 2) określenie aktywności enzymów związanych z mechanizmami barierowymi krew-mózg (BChE, Fz, GGTP-azy); 3) wykazanie różnic i podobieństw właściwości enzymatycznych śródbłonek naczyń nie tworzących układów barierowych krew-tkanka (splot naczyniówkowy, skóra, żebro); 4) obserwacja mikroskopowo-elektronowa tworzenia i dojrzewania naczyń *in vitro*, a szczególnie struktur morfologicznych odpowiadających za ich właściwości barierowe (połączenia ścisłe, błona podstawna, okołonacyniowa osłona glejowa).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowlach organotypowych mózdzku, opony miękkiej, spłotu naczyńiówkowego, skóry i żeber pochodzących od noworodków, płodów szczurzych i zarodków kurzych w różnych fazach rozwoju. Hodowle zakładano w komorach Maximova według metodyki podanej poprzednio przez Renkawek i wsp. (1976). Otrzymano wzrost około 1000 hodowli, z których większość użyto do badań histochemicznych i enzymatycznych. Hodowle oglądano codziennie w mikroskopie świetlnym, a naczynia fotografowano przyżyciowo w mikroskopie fazowo-kontrastowym. Hodowle poszczególnych tkanek w kolejnych tygodniach wzrostu *in vitro* utrwalano w roztworach odpowiednich do zastosowanej metody barwienia, a następnie barwiono fioletem krezyłu, błękitem toluidyny, według metody azanowej, zmodyfikowanej metody Mallory-Massona, Jennera-Giemsy, Bielschowskyego-Foota, Sudanem czarnym B, PAS, PAS-dimedonem. W hodowlach z poszczególnych grup doświadczalnych badano aktywność esterazy butyrylocholinowej (BChE), (Karnovsky, Roots 1964), fosfatazy zasadowej (Fz) (Burstone 1961) i gamma-glutamyltranspeptydazy (GGTP) (Glenner i wsp. 1962; Albert i wsp. 1966).

W hodowlach mózdzku i opony miękkiej wykonano ponadto badania autoradiograficzne z tymidyną znakowaną trytem z równocześnie przeprowadzoną reakcją enzymatyczną ujawniającą aktywność fosfatazy zasadowej.

Hodowle z mózdzków noworodków szczurzych w wieku od 4—33 dni *in vitro* pobierano do badań w mikroskopie elektronowym. Hodowle utrwalano i przeprowadzano w sposób standardowy i zatapiano w Eponie 812. Skrawano na ultramikrotomie f-my LKB. Ultracienkie skrawki kontrastowano w nasyconym roztworze octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A oraz 500 BS f-my Tesla.

WYNIKI

*Obraz morfologiczny**Wzrost śródbłonek i naczyń włosowatych*

Hodowle organotypowe mózdzku noworodków szczurzych i 9—12-dniowych zarodków kurzych. W eksplantatach hodowli po 24 godzinach przeżycia *in vitro* obserwuje się mniej lub bardziej liczne naczynia włosowate w większości zawierające elementy krwi, głównie eryocyty. Między 3—6 dniem w strefie wzrostu najbliższej położonej w stosunku do

eksplantatu stwierdza się wyrastanie naczyń włosowatych, a w wielu hodowlach, gdy eksplantat jest dostatecznie cienki, można prześledzić bezpośrednią ciągłość ścian nowotworzących się naczyń z naczyniami macierzystymi położonymi w eksplantacie. W 2 i 3 tygodniu wzrostu, zarówno w hodowlach oglądanych przyżyciowo w mikroskopie fazowo-kontrastowym jak i po zabarwieniu metodami histologicznymi obserwuje się liczne naczynia włosowate wyrastające do dalszej obwodowej strefy wzrostu. Komórki śródbłonka tworzą struktury tubularne z zachowanym światłem naczyniowym i charakteryzują się występowaniem licznych anastomoz i rozgałęzień. Wokół naczyń włosowatych obserwuje się ściśle przyleganie cytoplazmy części perikarialnej komórek glejowych do ściany naczyniowej jak również tworzenie stópek naczyniowych przez wypustki astrogleju. Poza uformowanymi strukturami tubularnymi naczyń włosowatych w strefie wzrostu hodowli występują pojedyncze komórki śródbłonka, tworzące układy równoległych pasm komórkowych lub też leżące luźno w obwodowej strefie wzrostu. Komórki śródbłonka i ich jądra mają charakterystyczne cechy morfologiczne wyróżniające je od elementów glejowych i fibroblastów, rosnących w hodowli. Jądra komórek śródbłonka są jasne, duże, owalne lub wydłużone i zawierają delikatne ziarna chromatyny. Cytoplazma komórek jest obfita. Mają one długie, przeważnie dwie, wypustki często z odgałęzieniami. Metody barwienia azanem i wg Mallory-Massona pozwalają na histologiczne odróżnienie komórek śródbłonka od innych komórek w hodowli.

Właściwości morfologiczne komórek śródbłonka i ich sposób wzrostu oraz tworzenie struktur naczyniowych nie ulegają istotnym zmianom w okresie dwóch miesięcy obserwacji *in vitro*.

Hodowle organotypowe opony miękkiej noworodków szczurzych i zarodków kurzych. W eksplantatach opony miękkiej od momentu założenia hodowli widoczne są liczne naczynia włosowate wypełnione krwinkami czerwonymi. W ciągu 3—5 dni *in vitro* w strefie wzrostu hodowli pojawiają się liczne naczynia włosowate tworzące anastomozy i rozgałęzienia. Nowotworzące się naczynia widoczne w strefie wzrostu stanowią kontynuację naczyń zawartych w eksplantacie zachowując ciągłość ściany i typową dla naczyń włosowatych strukturę tubularną. Naczynia włosowate opon w eksplantacie i w strefie wzrostu hodowli są otoczone komórkami mezenchymalnymi, a w niektórych polach wzrostu hodowli również komórkami glejowymi i ich wypustkami. Komórki śródbłonka naczyń włosowatych opony miękkiej mają charakterystyczne właściwości morfologiczne i cechy wzrostu odróżniające je od fibroblastów i pozostałych elementów mezenchymalnych opony *in vitro*.

W 2 i 3 tygodniu wzrostu oprócz typowych struktur tubularnych i sieci naczyń włosowatych, w strefie wzrostu hodowli obecne są liczne, izolowane komórki śródbłonka z dużymi, jasnymi jądrami i długimi wypustkami, niekiedy układające się w równoległe pasma. Pojedyncze komórki śródbłonka mają te same charakterystyczne cechy morfologiczne, co śródbłonki uformowanych naczyń w eksplantacie i w strefie wzrostu.

Hodowle organotypowe skóry 16-dniowych płodów szczurzych i 8-dniowych zarodków kurzych. Eksplantaty skóry wraz z tkanką podskórną zawierają obfitą sieć naczyń włosowatych wtopioną w elementy tkanki łącznej. Po 48 godzinach obserwacji *in vitro* wokół eksplantatu pojawiają się pierwsze wyrastające naczynia włosowate otoczone licznymi komórkami mezenchymalnymi. W kolejnych dniach *in vitro* naczynia włosowate wyrastają do strefy wzrostu, tworząc liczne anastomozy i rozgałęzienia przypominając niekiedy sploty naczyniowe. W hodowlach 2-tygodniowych liczne naczynia włosowate z widocznym światłem i lite pasma komórek śródbłonka stanowią dominujący element wieńca wzrostu.

Hodowle organotypowe żeber 19-dniowych płodów szczurzych i 9-dniowych zarodków kurzych. W pierwszych dniach obserwacji hodowli żeber *in vitro* naczynia włosowate są umiejscowione głównie w tkance łącznej otaczającej kostniejące żebro, część z nich występuje również między beleczkami kostnymi. Wyrastanie naczyń włosowatych występuje w 2 i 3 dniu *in vitro*. Naczynia rosną wolno. Komórki śródbłonka wyrastają przeważnie wzdłuż powierzchni kostnej żeber. W ciągu kolejnych dni *in vitro* komórki śródbłonka wyrastają do obwodowej strefy wzrostu, tworząc typowe, równoległe układy otaczające wąskie światło naczyniowe, bądź też występują pojedynczo jako elementy izolowane.

Hodowle organotypowe splotu naczyniówkowego noworodków szczurzych i 10—12 dniowych zarodków kurzych. Eksplantaty splotu naczyniówkowego stanowią uformowaną strukturę morfologiczną z wyraźnie wykształconymi poszczególnymi elementami histologicznymi: komórkami nabłonka, zrębu łącznotkankowego i naczyń włosowatych.

W pierwszym tygodniu wzrostu splotu *in vitro* naczynia włosowate podobnie jak w hodowlach opony miękkiej i mózdzku tworzą sieć wzajemnych połączeń i odgałęzień. Komórki śródbłonka barwią się szczególnie intensywnie w metodzie Mallory-Massona z uwidocznieniem ciemno-czerwonego jądra i niebieskiej cytoplazmy. Po 2 i 3 tygodniach wzrostu w hodowli obok struktur tubularnych i pasmowych występują również izolowane komórki śródbłonka zachowujące typowe właściwości morfologiczne jąder śródbłonka i równoległe pasmowate układy. W ho-

dowlach po dłuższym okresie obserwacji *in vitro* (6—8 tygodni) naczynia włosowate znajdują się w znacznej odległości od eksplantatu.

Badania autoradiograficzne z tymidyną znakowaną trytem hodowli mózdków noworodków szczurzych.

W naczyniach włosowatych eksplantu nie obserwuje się ziaren srebra nad jądrami komórek śródbłonka, występują one natomiast nad jądrami pojedynczych komórek glejowych. W hodowlach 1-tygodniowych ziarna srebra obecne są nad jądrami komórek śródbłonka naczyń włosowatych wyrastających z eksplantatu i położonych luźno w jego bliskim sąsiedztwie. W hodowlach 2-tygodniowych w naczyniach włosowatych w strefie wzrostu obserwuje się pojedyncze jądra śródbłonek wyznaczonych znakowaną tymidyną. W hodowlach w drugim miesiącu obserwacji *in vitro* liczne ziarna srebra występują zarówno nad jądrami pojedynczymi, izolowanych komórek śródbłonka, jak i nad jądrami komórek rosnących w pasmach.

W eksplantatach opony miękkiej, w strefie wzrostu odległej od eksplantatu wbudowywanie znakowanej tymidyny poza komórkami śródbłonka występuje również w większości jąder komórek mezenchymalnych i fibroblastów.

Równoczesne podanie izotopu i wykonanie reakcji enzymatycznej ujawniającej aktywność fosfatazy zasadowej umożliwia lepszą identyfikację komórek śródbłonka.

Obraz histochemiczny

Aktywność esterazy butyrylocholinowej (BChE): w eksplantatach mózdku noworodków szczurzych odczyn histochemiczny ujawniający aktywność BChE występuje we wszystkich naczyniach włosowatych, tworząc obraz mapy wyznaczającej ich obecność w eksplantowanej tkance. Wysoka aktywność enzymatyczna występuje również w strukturach tubularnych naczyń włosowatych na obwodzie eksplantatu i w strefie wzrostu hodowli. Odczyn ujawniający aktywność BChE jest obecny wyłącznie w śródbłonekach naczyń włosowatych. Neurony i komórki glejowe, zarówno otaczające naczynie w uformowanej tkance eksplantatu jak i rosnące luźno w strefie wzrostu nie wykazują odczynu ujawniającego aktywność BChE.

W kolejnych tygodniach wzrostu hodowli wysoka aktywność BChE występuje nadal zarówno w naczyniach eksplantatu jak i w położonych bezpośrednio wokół niego, a także w odległej strefie wzrostu. Wysoka

aktywność enzymatyczna jest widoczna również w poszczególnych komórkach śródbłonna, zarówno tworzących układy pasmowate jak i leżących luźno wśród komórek glejowych. Końcowy produkt odczynu enzymatycznego BChE jest drobnoziarnisty, występuje w cytoplazmie perikarjalnej i wypustkowej komórek śródbłonna. W niektórych komórkach wypełnia on ściśle cytoplazmę uwidaczniając wolne od aktywności jądra komórkowe. Dzięki wybiórczej aktywności BChE w śródbłonkach naczyń włosowatych można prześledzić ciągłość wyrastających naczyń i sieć wzajemnych połączeń komórkowych.

Odczyn enzymatyczny ujawniający aktywność BChE w naczyniach wyrastających z eksplantatów mózdzku zarodków kurzych jest znacznie słabszy i mniej wybiórczy dla naczyń niż w mózdzku szczura.

Aktywność BChE nie występuje w żadnym typie naczyń opony miękkiej i spłotu naczyniówkowego.

Aktywność fosfatazy zasadowej (Fz): Odczyn enzymatyczny jest znacznie nasilony w rozgałęzionych strukturach naczyń włosowatych w eksplantacie mózdzku i opony miękkiej obydwu badanych gatunków, pojawia się i stopniowo narasta w komórkach śródbłonna wyrastających z eksplantatu. Produkt reakcji enzymatycznej jest ziarnisty i występuje w cytoplazmie komórek z wyraźną akcentacją odczynu przy błonie komórkowej. W kolejnych tygodniach wzrostu hodowli odczyn ujawniający aktywność enzymu pojawia się i narasta w komórkach śródbłonna nowotworzących się naczyń i jest szczególnie nasilony w miejscu odgałęzień naczyniowych.

Aktywność gamma-glutamyltranspeptydazy (GGTP): Odczyn enzymatyczny jest obecny w naczyniach eksplantatów mózdzku, opony miękkiej i spłotu naczyniówkowego i w poszczególnych naczyniach wyrastających z eksplantatów do brzeżnej strefy wzrostu. Produkt reakcji ma charakter ziarnisty lub dyfuzyjny i występuje w cytoplazmie komórek śródbłonna. Wysoka aktywność enzymatyczna występuje również w poszczególnych naczyniach włosowatych, tworzących anastomozy i rosnących w odległej strefie wzrostu. W luźno leżących, pojedynczych komórkach śródbłonna aktywność GGTP-azy nie występuje bądź też ma niewielkie natężenie i dyfuzyjny charakter. Poza tym ziarniste produkty reakcji enzymatycznej występują również w cytoplazmie perikarjalnej i w wypustkach komórek glejowych.

Naczynia włosowate skóry i żeber wyrastające z eksplantatu jak i rosnące na obwodzie hodowli nie wykazują obecności odczynu histochemicznego ujawniającego aktywność BChE, Fz i GGTP-azy. W eksplantatach i w makrofach występuje niekiedy nieswoiste zabarwienie komórek po przeprowadzeniu reakcji dla poszczególnych enzymów.

Dyfuzyjny odczyn GGTP-azy występuje w komórkach nabłonka skóry i w krwinkach czerwonych wypełniających światło naczyń pochodzących zarówno ze skóry jak i żeber.

Obraz mikroskopowo-elektronowy

W ciągu całego okresu obserwacji (4—33 dni *in vitro*) w hodowli organotypowej mózdzku szczura występują dwa równoległe procesy: dojrzewania naczyń oraz tworzenia naczyń włosowatych z komórek śródbłonka wyrastających z naczyń uformowanych.

Naczynia włosowate eksplantatów w pierwszych dniach obserwacji *in vitro* mają strukturę naczyń niedojrzałych, wypełnionych elementami krwi, z których część ulega zwyrodnieniu i rozpadowi. Światło naczyń otoczone jest przez kilka komórek śródbłonka, których przylegające błony komórkowe tworzą połączenia przeważnie typu zwartego, o widocznej strukturze blaszkowej. Naczynia otoczone są cienką i nieciąglą błoną podstawną o charakterze delikatnie włóknistym oraz wypustkami glejowymi o różnym stopniu dojrzałości. Komórki śródbłonka charakteryzują się obfitą cytoplazmą bogatą w organelle, pęcherzyki pinocytarne i opłaszczony oraz mikrofilamenty i mikrotubule.

Komórki śródbłonka wyrastające do strefy wzrostu hodowli otoczone są cienką, delikatnie włóknistą błoną podstawną stanowiącą przedłużenie błony podstawnej naczyń eksplantatu. Tworzące się naczynia włosowate otoczone są licznymi wypustkami glejowymi, z których tylko część ma charakter typowych wypustek okołonacyniowych astrogleju. Mimo ich niedojrzałości otaczają one ściśle naczynia, tworząc przylegającą osłonę glejową.

W kolejnych tygodniach obserwacji stwierdza się dojrzewanie naczyń w eksplantacie i naczyń utworzonych w strefie wzrostu. Można prześledzić kolejne stadia dojrzewania błony podstawnej aż do utworzenia szerokiej, homogennej warstwy włóknistej. Naczynia otoczone są licznymi wypustkami glejowymi tworzącymi podobnie jak *in situ* „stópki” okołonacyniowe. W utworzonych naczyniach kształtują się połączenia o typie całkowitego zamknięcia poprzedzone tworzeniem się odcinkowych połączeń zewnętrznych blaszek błon komórkowych śródbłonka oddzielonych wąską szczeliną międzykomórkową. Powstawanie plamek przylegania prowadzi do całkowitego zamknięcia przestrzeni między światłem naczynia, komórkami śródbłonka, pericytami i wypustkami glejowymi.

W strefie wzrostu hodowli, rzadziej w eksplantacie poza tworzącymi się naczyniami, występują pojedyncze komórki śródbłonka rosnące w ścisłym kontakcie z komórkami glejowymi. Komórki te charaktery-

zują się odmiennymi cechami morfologicznymi różniącymi je od śródbłonek uformowanych naczyń eksplantatu i naczyń wyrastających do strefy wzrostu. Różnice strukturalne polegają głównie na znacznym po fałdowaniu błony komórkowej, tworzącej zakola i liczne kosmki połączone wzajemnie optycznie gęstymi złączami. Cytoplazma śródbłonek zawiera obfite typowe organelle. Szczególnie bogata jest siatka śródplazmatyczna obydwu typów, której kanały wypełnione są osmofilną substancją amorficzną. W kolejnych fazach wzrostu *in vitro* komórki śródbłonek łączą się między sobą, zamykając światła nowotworzących się naczyń. Następnie otacza je błona podstawna i wypustki astrocytów.

OMÓWIENIE

Bariera krew-mózg jest pojęciem czynnościowym, tym niemniej funkcja barierowa naczyń ośrodkowego układu nerwowego polegająca na regulacji wymiany substancji między krwią i tkanką mózgu, uwarunkowana jest właściwościami strukturalnymi i metabolicznymi komórek śródbłonek naczyń włosowatych, błony podstawnej i otaczających naczynie astrocytów.

Hodowle organotypowe mózdzku i opony miękkiej stanowią korzystny model dla wzrostu naczyń włosowatych jak również dla prowadzenia równoczesnych badań porównawczych właściwości metabolicznych śródbłonek naczyń innych narządów, w których nie występują mechanizmy barierowe krew-tkanka. Dla otrzymania wzrostu śródbłonek w hodowlach organotypowych konieczny jest odpowiedni wiek dojrzałości naczyń *in situ* (Donahue, Pappas 1961; Delorme i wsp. 1968). Naczynia włosowate mózdzku szczura wyrastają najliczniej z eksplantatów pobranych od noworodków, z mózdzku zarodków kurzych w 11 i 12 dniu rozwoju *in ovo*.

Tworzenie się naczyń włosowatych *in vitro* jest wynikiem zarówno rozplemu komórek śródbłonek na drodze podziałów mitotycznych jak i ich migracji z eksplantatu. Wbudowywanie tymidyny do jąder komórkowych wskazuje na aktywny proces syntezy DNA w komórkach śródbłonek naczyń włosowatych przy równoczesnym wysokim wskaźniku mitotycznym i intensywnej syntezy DNA w komórkach glejowych rosnących w tych samych hodowlach (Renkawek 1977).

W hodowlach mózdzku i opony miękkiej utrzymywanych przez długi okres czasu *in vitro* (2 miesiące) struktura morfologiczna naczyń w eksplantacie i sposób wyrastania komórek śródbłonek do strefy wzrostu hodowli są podobne do obrazu naczyń w hodowlach innych narządów (White, Parshley 1951; Woodward, Pomerat 1953; Pomerat, Slick 1963). Charakterystyczną cechą naczyń włosowatych, zarówno w eksplantacie jak i rosnących w znacznej odległości od eksplantatu jest zdolność do

tworzenia struktur tubularnych i licznych anastomoz. Istotną właściwością morfologiczną naczyń włosowatych w hodowlach organotypowych tkanki nerwowej jest charakterystyczne dla włóścińców mózgu wykształcanie stópek okołonaczyniowych astrogleju. Pojedyncze, izolowane od naczyń komórki śródbłonka zachowują charakterystyczne dla nich cechy morfologiczne, jak również zdolność do tworzenia równoległych układów komórkowych i wzajemnych połączeń. Pozwala to na ich identyfikację i odróżnienie od fibroblastów. Spostrzeżenie to jest odmienne od ogólnie przyjętego poglądu o przekształcaniu się śródbłonek naczyń w fibroblasty w hodowlach różnych narządów (Altschul 1954).

Równoległe badania histoenzymatyczne naczyń włosowatych w hodowlach mózdzku, opony miękkiej, spłotu naczyńiówkowego i innych układów i tkanek wykazały, że komórki śródbłonka naczyń włosowatych OUN charakteryzuje zasadnicza odmiennosc właściwości histochemicznych dotyczących aktywności BChE właściwej wyłącznie śródbłonom naczyń mózgu. Naczynia włosowate opony miękkiej i spłotu naczyńiówkowego nie wykazują obecności odczynu BChE. Aktywnosc tego enzymu nie występuje w żadnym innym typie komórek hodowli tkanki nerwowej. Odczyn ten pojawia się w naczyniach tworzących się *in vitro* oraz występuje w pojedynczych komórkach śródbłonka. Jego nasilenie zarówno w hodowli jak i *in situ* (Brightman, Albers 1959; Ostenda, Renkawek 1969) jest uzależnione od gatunku zwierząt, nie ulega natomiast zasadniczym zmianom w czasie dojrzewania naczyń *in vitro*.

Wybiórcze występowanie odczynu BChE w śródbłonekach naczyń mózgowych w hodowli, lokalizacja enzymu *in situ* w pęcherzykach pinocytarnych, uczestniczących w mechanizmach transportu śródkomórkowego (Joo, Csilik 1966; Westergaard 1977) potwierdza hipotezę o roli enzymu w mechanizmie regulacji przepuszczalności naczyń poprzez hydrolizę biologicznie aktywnych estrów choliny właściwą komórkom śródbłonka naczyń mózgu.

W naczyniach włosowatych hodowli organotypowej tkanki nerwowej występuje odczyn enzymatyczny Fz i GGTP-azy, obecny również w naczyniach mózgu *in situ* (Bannister, Romanul 1963; Albert i wsp. 1966). Czynność Fz powszechnie wiąże się z transportem substancji poprzez błony komórkowe śródbłonek naczyńiowych, ze względu na występowanie znacznych różnic w natężeniu aktywności enzymu w różnych stanach patologicznych, w których uszkodzona jest bariera krew-mózg (Samorajski, McCloud 1961). Obecność aktywności Fz w naczyniach spłotu naczyńiówkowego wydaje się wskazywać na powiązanie Fz nie tylko z funkcjami barierowymi w mózgu, ale z jej udziałem w transporcie substancji poprzez błony komórkowe komórek śródbłonka naczyń. W tych samych naczyniach w hodowli występuje aktywność enzyma-

tyczna GGTP-azy. Odczyn enzymatyczny występuje również w komórkach glejowych, nie jest więc wybiórczy dla naczyń ośrodkowego układu nerwowego (Albert i wsp. 1966).

Poza charakterystycznymi właściwościami morfologicznymi i histochemicznymi komórki śródbłonna *in vitro* wykazują szczególne cechy ultrastrukturalne, które w znacznej mierze stanowią o ich udziale w czynnościach barierowych *in situ* (Delorme i wsp. 1970). W hodowli można obserwować poszczególne etapy angiogenezy, poczynając od najprostszych form naczyniowych utworzonych przez pojedyncze komórki śródbłonna do w pełni uformowanych naczyń z wykształconym światłem i całkowicie dojrzałą strukturą ściany naczyniowej, wraz z okołonacyniową otoczką wypustek komórek glejowych.

Naczynia włosowate eksplantatu w początkowym okresie obserwacji wykazują strukturę odpowiadającą naczyniom w odpowiednim okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego *in situ* u ludzi (Bauer, Vester 1970; Hauw i wsp. 1975) i u zwierząt doświadczalnych (Caley, Maxwell 1970; Roy i wsp. 1974; Wolff i wsp. 1974). W kolejnych etapach wzrostu obserwuje się proces ich dojrzewania. W nowotworzonych *in vitro* naczyniach włosowatych obserwuje się podobne procesy. Powstają w nich i dojrzewają poszczególne struktury morfologiczne charakterystyczne dla naczyń OUN *in situ*: połączenia międzyśródbłonkowe o typie złącz zwartych (Karnovsky 1967; Brightman, Reese 1969), homogenna błona podstawna (Bär, Wolff 1972) i „stópki” okołonacyniowe astrogleju (Phelps 1972).

Z obserwacji *in vitro* wynika, że komórki śródbłonna wyizolowane od wpływu mechanizmów krążeniowych zachowują cechy morfologiczne stanowiące *in situ* wykładniki ich uczestnictwa w czynnościach transportowych (Joo 1971; Westergaard 1977), typowe właściwości histochemiczne oraz im tylko właściwą zdolność do tworzenia charakterystycznych, optycznie gęstych złącz błon komórkowych zamykających całkowicie światło naczynia. W tworzeniu struktury ściany naczyń powstających *in vitro* aktywnie współuczestniczy astroglej, wytwarzający ciągłą osłonkę okołonacyniową. Wytwarzanie okołonacyniowych błon glejowych, stanowiących istotny element barierowej interfazy naczyniowo-tkankowej jest cechą właściwą wyłącznie dla ośrodkowego układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Albert Z., Orłowski M., Rzucidło Z., Orłowska J.: Studies on gamma-transpeptidase activity and its histochemical localization in the central nervous system. *Acta histochem.*, 1966, 25, 312—320.
2. Altschul R.: Endothelium. Its development, morphology, function and pathology. McMillan Co., New York 1954.

3. Agnew W. F., Crone C.: Permeability of brain capillaries to hexoses and pentoses in the rabbit. *Acta physiol. scand.*, 1967, 70, 168—175.
4. Bannister R. G., Romanul C. A.: The localization of alkaline phosphatase activity in cerebral blood vessels. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1963, 26, 333—340.
5. Bauer K. F., Vester G.: Das elektronenmikroskopische Bild der Hirncapillaren menschlicher Feten. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 1970, 38, 270—318.
6. Bär T., Wolff J. R.: The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z. Zellforsch.*, 1972, 133, 231—248.
7. Brightman M. W., Albers R. W.: Species differences in the distribution of extraneuronal cholinesterases within the vertebrate nervous system. *J. Neurochem.*, 1959, 4, 244—250.
8. Brightman M. W., Reese T. S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.*, 1969, 40, 648—677.
9. Burstone G. H.: Histochemical demonstration of phosphatases in frozen sections with naphthol AS-phosphates. *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 9, 146—153.
10. Caley D. W., Maxwell D. S.: Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J. comp. Neurol.*, 1970, 138, 31—48.
11. Delorme P., Grignon G., Gayet J.: Ultrastructure des capillaires dans le telencephale du poulet au cours de l'embryogenese et de la croissance postnatale. *Z. Zellforsch.*, 1968, 87, 592—602.
12. Delorme P., Gayet J., Grignon G.: Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken. *Brain Res.*, 1970, 22, 269—283.
13. Donahue S., Pappas G. D.: The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. *Amer. J. Anat.*, 1961, 108, 331—347.
14. Ehrlich O.: *Das Sauerstoff Bedürfnis des Organismus* Hirschwald. Berlin 1885, 69—72.
15. Farkas-Bargeton E., Arsenio-Nunes M. L.: Maturation de l'equipement enzymatique des parois vasculaires du systeme nerveux. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1970, 15, 251—271.
16. Glenner G. G., Folk J. E., McMillan P. J.: Histochemical demonstration of a gamma-glutamyl transpeptidase-like activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 481—489.
17. Hauw J. J., Berger B., Escourolle R.: Electron microscopic study of the development capillaries in human brain. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1976a, 31, 229—242.
- 17A. Hauw J. J., Berger B., Escourolle R.: Ultrastructural observations on human cerebral capillaries in organ culture. *Cell Tiss. Res.*, 1975b, 163, 133—150.
18. Hoffman H. J., Olszewski J.: Spread of sodium fluorescein in normal brain tissue. *Neurology* 1961, 11, 1081—1085.
19. Jasiński A., Kilariski W.: Ultrastruktura naczyń włosowatych kręgowców. Morfologiczne podstawy mikrokrążenia i przepuszczalności. *Postępy Biol. Komórki*, 1976, 3, 393—503.
20. Joo F.: Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Brit. J. exp. Path.*, 1971, 52, 646—649.

21. Joó F., Csillik B.: Topographic correlation between the hematoencephalic barrier and the cholinesterase activity of brain capillaries. *Exp. Brain Res.*, 1966, 1, 147—151.
22. Joó F., Varkonyi T., Csillik B.: Developmental alterations in the histochemical structures of brain capillaries: A histochemical contribution to the problem of the blood brain barrier. *Histochemie*, 1967, 9, 140—148.
23. Karnovsky M. J.: Ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, 1967, 35, 213—237.
24. Karnovsky M. J., Roots L.: A "direct-coloring" tiochrome method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12, 219—221.
25. Klatzo I., Miquel J., Otenasek R.: The application of fluorescein labelled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1962, 2, 144—160.
26. Lee J. C.: Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. W: *Progress in Neuropathology*, Ed. H. M. Zimmerman, Grune, Stratton, New York 1971, 4, 84—145.
27. Ostenda M., Renkawek K.: The changes of localization of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity in maturing rat cerebellum after irradiation (Co⁶⁰). *Folia Histochem. Cytochem.*, 1969, 7, 63—76.
28. Renkawek K.: On the histochemical and enzymo-histochemical differences, between various types of glial cells cultured in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 307—315.
29. Renkawek K.: Synteza DNA w procesie dojrzewania i wzrostu komórek glejowych w hodowli organotypowej mózdzku szczura in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 341—348.
30. Renkawek K., Murray M., Spatz M., Klatzo I.: Distinctive histochemical characteristics of brain capillaries in organotypic culture. *Exp. Neurol.*, 1976, 50, 194—206.
31. Roy S., Hirano A., Kochen A., Zimmerman H. M.: The fine structure of cerebral blood vessels in chicken embryo. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1974, 30, 277—285.
32. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood brain permeability. *Lab. Invest.*, 1961, 10, 492—501.
33. Sershen H., Lajtha A.: Capillary transport of amino acids in the developing brain. *Exp. Neurol.*, 1976, 53, 465—474.
34. Westergaard E.: The blood-brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1977, 39, 181—187.
35. White J. F., Parshley M. S.: Growth in vitro of blood vessels from bone marrow of adult chicken. *Amer. J. Anat.*, 1951, 39, 321—345.
36. Wolff J. R., Rajan K. T., Noack W.: The fate and fine structure of fragments of blood vessels in CNS tissue cultures. *Cell Tiss. Res.*, 1974, 156, 89—102.
37. Woodward W. C., Pomerat C. M.: The development of patent blood vessels from adult human rib bone marrow in tissue culture. *Anat. Rec.*, 1953, 117, 663—683.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Na posiedzeniu Zarządu Głównego Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, które odbyło się w dniu 16 grudnia 1978 omówiono m.in. problemy związane z organizacją Europejskiego Stowarzyszenia Neuropatologów. Zapczniano się z zasadniczymi tezami raportu Prezydenta Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego, prof. J. A. N. Corsellisa o stanie neuropatologii europejskiej. Straciła ona wg niego obecnie pierwszoplanową pozycję w świecie na rzecz neuropatologii amerykańskiej. Droga, wiodącą do odzyskania tej pozycji, mają być inicjatywy zmierzające do zacieśnienia kontaktów naukowych na szczeblu kontynentalnym, a przede wszystkim utworzenie Europejskiego Stowarzyszenia Neuropatologów oraz organizowanie europejskich kongresów neuropatologicznych co 4 lata, pomiędzy kongresami Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego. Przedmiotem dyskusji pozostaje formuła organizacyjna europejskiego stowarzyszenia (federacja towarzystw czy członkostwo indywidualne) oraz miejsce pierwszego europejskiego Kongresu, planowanego na rok 1980 (Wiedeń czy Amsterdam).

Zebrani w dyskusji wyrazili poparcie dla zasadniczych tez raportu oraz dla kandydatury Wiednia jako miejsca pierwszego Kongresu. Zaproponowali elastyczną, alternatywną formułę członkostwa w europejskim stowarzyszeniu, przy czym SNP, ze względów formalnych i finansowych, zadeklarowałyby swoją przynależność jako członek zbiorowy.

Następnie prof. Mossakowski zreferował przebieg posiedzenia kuratorów Sympozjów Dunajskich. Miejscem następnego sympozjum będzie Innsbruck, a tematyka obejmować będzie zagadnienia śmierci mózgu, nowe osiągnięcia badawcze w dziedzinie patofizjologii bólu oraz doniesienia wolne.

Prof. M. Wender poinformował o nawiązaniu kontaktu z nową przewodniczącą Niemieckiego Stowarzyszenia Neuropatologów i Neuroanatomów dr Liselotte Gerhard. Podtrzymała ona zaproszenie grupy polskich neuropatologów na konferencję w Essen, w okresie od 14 do 16 września 1979.

Wobec wypełnienia wymagań statutowych przyjęty został do Stowarzyszenia lek. med. Piotr Kozłowski z CMDiK PAN w Warszawie.

* * *

W dniu 18.I.1979 r. kol. Mirosław Kozik, kierownik Samodzielnego Zakładu Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM w Poznaniu otrzymał nominację na profesora nadzwyczajnego.

Jerzy Dymecki

KOMUNIKAT

W dniach 25—28.IX.1980 r. odbędzie się w Poznaniu VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego z Międzynarodowym Udziałem.

Program Zjazdu:

1. Farmakologia ośrodkowego układu nerwowego
2. Farmakologia układu krążenia
3. Tematy wolne

Podczas Zjazdu odbędą się 2 Sympozja:

1. Sympozjum Europejskiego Towarzystwa Farmakologii Biochemicznej „On the arachidonic acid cascade”.
2. Sympozjum: „Farmakokinetyka i biotransformacja leków w ustroju ludzkim i zwierzęcym”.

Obrady toczyć się będą w języku angielskim. Przewidziane są także sesje plakatowe. Termin nadsyłania zgłoszeń upływa 30 listopada 1979, streszczeń prac 29 lutego 1980. Zgłoszenia kierować należy na adres Komitetu Organizacyjnego VII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego ul. Fredry 10, 61-701 Poznań, Zakład Farmakologii Akademii Medycznej.

Przewodniczący Komitetu
Organizacyjnego

Doc. dr A. Mrozikiewicz

T R E Ś C

A. Sh. Tsitsishvili: Wpływ niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia) na ultrastrukturę naczyń włosowatych kory mózgu	337
I. L. Lazriev, I. K. Svanidze, A. Sh. Tsitsishvili, E. I. Dzamoewa: Wpływ niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia) na ultrastrukturę neuronów i synaps kory mózgu królika	351
E. I. Dzamoewa, I. K. Svanidze, I. L. Lazriev, A. Sh. Tsitsishvili: Wpływ niedotlenienia krążeniowego (niedokrwienia) na ultrastrukturę komórek glejowych kory mózgu królika	369
N. N. Melitauri, V. N. Chikvaidze, L. N. Nikolaishvili: Zmiany zawartości wolnych aminokwasów w mózgu królików w warunkach niedokrwienia	379
G. I. Mchedlishvili: W sprawie wykorzystania analizy systemowej w planowaniu i koordynacji badań nad niedokrwieniem mózgu	391
L. Dydyk, B. Wańkiewicz, T. Szreter, J. Prokopczyk: Poziom katecholamin w dojrzewającej korze mózgu królików poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji	397
J. Rafałowska: Wybrane problemy rozwoju i starzenia w układzie nerwowym. II. Mielinizacja korzeni rdzeniowych w II połowie życia płodowego i w okresie wczesno-dziecięcym	407
B. Gajkowska, A. Luciani, J. Borowicz: Reakcja układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura na stres wywołany unieruchomieniem	421
I. B. Zelman, T. Majdecki: Zmiany ultrastrukturalne w mózgach szczurów po zatruciu fosforoorganicznym insektycydem dichlorofosem (DDVP)	443
J. Dymecki: W sprawie zależności między przewlekłym alkoholizmem a miażdżycą tętnic podstawy mózgu	455
H. F. Gerlach, H. J. Holzhausen: Postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia	471
B. Czerniak, A. Jaroszewicz, J. Solecki: Ultrastruktura mięśni szkieletowych w miotonii wrodzonej	477
K. Renkawek: Właściwości morfologiczne, histoenzymatyczne i ultrastrukturalne śródbłonek naczyń włosowatych mózgu w organotypowej hodowli pozaustrojowej. Streszczenie pracy habilitacyjnej	487
J. Dymecki: Dział kroniki i informacji	500

СО Д Е Р Ж А Н И Е

А. Ш. Цицишвили: Влияние циркуляторной гипоксии (ишемии) на тонкую структуру капилляров коры головного мозга	337
И. Л. Лазриев, И. К. Сванидзе, А. Ш. Цицишвили, Э. И. Дзамоева: Влияние циркуляторной гипоксии (ишемии) на тонкую структуру нейронов и синапсов коры головного мозга кролика	351
Э. И. Дзамоева, И. К. Сванидзе, И. Л. Лазриев, А. Ш. Цицишвили: Влияние циркуляторной гипоксии (ишемии) на тонкую структуру нейроглии коры головного мозга кролика	369
Н. Н. Мелитаури, В. Н. Чикваидзе, Л. Н. Николаишвили: Изменение содержания свободных аминокислот в головном мозгу кроликов в условиях ишемии	379
Г. И. Мчедlishvili: Об использовании системного подхода при планировании и координации совместных исследований ишемии головного мозга	391
Л. Дыдык, Б. Ванькович, Т. Шретер, Я. Прокопчик: Уровень катехоламинов в созревающей коре мозга кроликов подвергнутых воздействию нормобарической гипероксии	397
Я. Рафаловска: Избранные проблемы развития и старения в нервной системе. II. Миелинизация спинномозговых корешков во второй половине внутриутробной жизни и в ранний детский период	407
Б. Гайковска, А. Лючиани, Е. Борович: Реакция гипоталамо-гипофизарной системы крысы на стресс вызванный иммобилизацией	421
И. Б. Зельман, Т. Майдечки: Ультраструктурные изменения в мозге крысы после интоксикации органофосфатным инсектицидом дихлорфос (ДДФП)	443
Е. Дымецки: К вопросу зависимости между хроническим алкоголизмом и склерозом артерий основания мозга	455
Г. Ф. Герлях, Г. Я. Хольцхаузен: Прогрессирующая многофокусная лейкоэнцефалопатия	471
Б. Черняк, А. Ярошевич, Я. Солецки: Ультраструктура скелетных мышц во врежденной миотонии	477
К. Ренкавек: Морфологические, гистоэнзиматические и ультраструктурные свойства эндотелия капилляров мозга в органотипической культуре. Резюме докторской диссертации	487
Е. Дымецки: Хроника и информация	500

CONTENTS

A. Sh. Tsitsishvili: Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on the fine structure of blood capillaries of the rabbit cerebral cortex	337
I. L. Lazriev, I. K. Svanidze, A. Sh. Tsitsishvili, E. I. Dzamoeva: Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on fine structure of neurons and synapses of the rabbit cerebral cortex	351
E. I. Dzamoeva, I. K. Svanidze, I. L. Lazriev, A. Sh. Tsitsishvili: Effect of circulatory hypoxia (ischemia) on fine structure of neuroglia of the rabbit cerebral cortex	369
N. N. Melitauri, V. N. Chikvaidze, L. N. Nikolaishvili: Change in the content of free amino acids in the brain of rabbits under circulatory hypoxia (ischemia)	379
G. I. Mchedlishvili: A note on the use of the systems' approach in planning and coordination of joint studies of cerebral ischemia	391
L. Dydyk, B. Wańkiewicz, T. Szreter, J. Prokopczyk: The level of catecholamines in the developing cerebral cortex of rabbits during normobaric hyperoxia	397
J. Rafałowska: Some problems of the development and aging of nervous system. II. Myelination of spinal roots in the 2nd half of fetal life and in early infancy	407
B. Gajkowska, A. Luciani, J. Borowicz. Reaction of the hypothalamo-hypophyseal system of rat to stress produced by immobilization	421
I. B. Zelman, T. Majdecki: Ultrastructural changes in rat brain following organophosphate insecticide dichlorvos (DDVP) intoxication	443
J. Dymecki: On the relationship between chronic alcoholism and atherosclerosis of basal arteries of the brain	455
H. F. Gerlach, H. J. Holzhausen: Multifocal progressive leukoencephalopathy	471
B. Czerniak, A. Jaroszewicz, J. Solecki: The ultrastructure of skeletal muscles in congenital myotony	477
K. Renkawek: Morphology, histochemistry and ultrastructural of brain capillaries endothelium in organotypic tissue culture.. Summary of Ph. D. thesis	487
J. Dymecki: Chronicle and informations	500

WARUNKI PRENUMERATY

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

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Cena prenumeraty:

półrocznie	50 zł
rocznie	100 zł

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych. Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch” Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71. Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zleceniodawców instytucji i zakładów pracy.

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

Zakł. Graf. „Tamka”. Z. 2. Zam. 163. Pap. kredowy III kl. 90 g. B1.
Nakład 567 + 23 egz. Ark. druk. 10,5. C-35.