

eqz 2

p. 105

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XVIII

1980

ZESZ. 2

WARSZAWA

~~100~~, ~~Nchiro~~, ~~Mo~~, 24

<http://roin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XVIII

KWIECIEŃ-CZERWIEC

Nr 2

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Környey (Pesc), 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



ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ

CHANGES IN THE MYELIN LIPIDS OF THE RABBIT OPTIC NERVE DURING ONTOGENIC DEVELOPMENT*

Department of Neurology, Institute of Diseases of the Nervous System
and of Sensory Organs, Academy of Medicine, Poznań
Head: prof. M. Wender

The assessment of the lipid composition of the CNS**, as well as of the optic nerve as its integral part, is of essential importance for the cognition of the role of lipid constituents in various nervous processes when considered on a molecular or supramolecular level. The determination of changes in the lipid composition occurring in the developing nervous system of experimental animals may pave the ways for understanding of mechanisms underlying the process of maturation of the CNS. From this knowledge it is possible to derive implications as to the physiological and pathological events occurring in the developing human CNS.

The lipid composition of the developing and mature optic nerve of the rat has been described by Hirose and Bass in 1973, and by Detering and Wells in 1976, whereas that of the developing rabbit by Adamczewska-Goncerzewicz in 1977. Since we were interested in events connected with myelination as well as demyelination we decided to assess the developmental changes in the lipid spectrum of a myelin fraction isolated from the optic nerve of the rabbit during various stages of its ontogenic development. The obtained results should serve comparative purposes with respect to the whole nerve, the cerebral white matter of the rabbit, and even with respect to results reported for other animal species and thus enable to draw conclusions about the existence or nonexistence of differences between various cerebral structures of the homologous animal or even between heterologous animal species.

* This investigation was supported by NIH PL 480 Research Agreement. No. 05-092-N.

** Abbreviations used in the text: CE — cerebroside, CNS — Central Nervous System, GL — galactolipids, PC — phosphatidylcholine, PE — phosphatidylethanolamine, PL — phospholipids, Plas — plasmalogens.

The lipid composition of myelin fractions has so far been studied by Banik et al. (1968) in the cat, and by MacBrinn and O'Brien (1969) in the ox, and this only in adult animals.

There are no data available as to the myelin fraction of the developing optic nerve and we thus hoped to provide results which could shed some light on biochemical events concurrent with the process of myelination in the optic system of the rabbit.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals. Chinchilla rabbits of either sex, aged 18, 26, 30, 34, 48, 100 and 150—180 days postnatal, served as the experimental animals. When needed for examination, they were killed by decapitation and their optic nerves were removed as quickly as possible, blotted against filter paper and weighed. The optic nerves from several animals were pooled to acquire sufficient material for the intended determinations (22 pairs of nerves from animals aged 18 days, 12 pairs — from rabbits 26 days old, 10 pairs from those aged 30, 34 and 48 days, and 3 and 2 pairs of optic nerves from 100 days old and adult animals respectively).

Chemical procedure. The myelin fraction was isolated according to the method of Norton and Poduslo (1971). The purity of the obtained myelin fraction was checked by means of electron microscopy.

The myelin lipids were extracted by means of the method of Folch-Pi et al. (1957) and the lipid extract was separated into classes on Florisil columns, followed by one- and bidimensional thin-layer chromatography on Silica-Gel G (Merck). For details of the chromatographic procedure and analytical methods used, the reader is referred to Adamczewska-Goncerzewicz (1977).

The myelin output as well as the myelination peak in the developing rabbit optic nerve were determined gravimetrically on separate lots of optic nerves from animals aged 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 40, 43, 45, 48, 60, 100 days and from adult ones. The myelin output was expressed in mg/optic nerve and the daily increase in mg/day/nerve. There was six estimations in each group. The obtained results were statistically evaluated. The comparison of means was based on the analysis of variances according to the Duncan's test (Oktaba, 1966).

RESULTS

The content of almost all myelin lipids increased during the ontogenic development of the rabbit optic nerve. However, the individual lipids did not accumulate at equal rates. When expressed in g of the respective lipid per 100 g of fresh myelin (Table 1) it appeared that

cholesterol, the galactolipids (both cerebrosides and sulfatides) and plasmalogen displayed the highest indices of increase. Instead, the content of phosphatidylcholine — one of the main phospholipid constituents — rose only slightly, and this only till 48 days postnatal. Thereafter, i.e. in 100 day rabbits as well as in the adult ones, its content was markedly reduced. The increase of phosphatidylserine and of phosphoinositides was delayed in comparison with other lipids, a definite increase was observed only between the age of 34—48 days. The phosphatidylethanolamine content instead showed a steady decrease over the whole developmental period under investigation.

From Table 2, presenting the molar composition of myelin lipids versus cholesterol assumed as 100 it appeared that cholesterol constitutes the dominating lipid species throughout the whole developmental period. The next position was occupied by cerebrosides, followed by phosphatidylcholine and plasmalogens. The situation however changed at the animals age of 100 days and above that age. In these animals it was the plasmalogen fraction which made up the dominating phospholipid constituent.

During the ontogenic maturation of the myelin sheath of the rabbit optic nerve, there were observed appreciable alterations in the molar ratios of both the main lipid classes and of the individual lipids, the most characteristic change pertaining to the galactolipid to phosphatidylcholine ratio, which rose from a value of 3.7 at the age of 18 days till 9.3 in adult animals. High molar ratios of cerebrosides to phosphatidylcholine and of plasmalogen to phosphatidylethanolamine were observed as well. The molar ratios of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine and of plasmalogen to phospholipids remained almost constant during the ontogenic development of the rabbit optic nerve.

Fig. 1 shows the deposition of myelin in the rabbit optic nerve as a logarithmic function of the animal's postnatal age. The scale on the left ordinate corresponds to the myelin output expressed in mg/optic nerve, and the scale on the right ordinate — shows the daily increase of myelin in mg/day/optic nerve. It thus appears that the process of myelin deposition continues over a long period of the ontogenic development, extending far beyond the stage of active myelinogenesis, which in the case of the rabbit optic nerve ranges the postnatal age of between 20—35 days. During the myelination peak (30th day postnatal) the daily increase of myelin amounted 0.62 mg/day/nerve.

DISCUSSION

Myelinogenesis in the central nervous system takes place at two levels: a molecular and a supramolecular one (Mandel et al., 1972). The

Table 1. Myelin lipids of the rabbit optic nerve during ontogenic development (in g/100 g of myelin wet wt.)
 Tabela 1. Lipidy mieliny nerwu wzrokowego królika podczas rozwoju ontogenetycznego (w g/100 g mieliny świeżej)

Lipids Lipidy	Age, days Wiek w dniach						
	18	26	30	34	48	100	150—180
Protein mg/g myelin Białko mg/g mieliny	28.30	30.90	32.00	34.30	40.00	43.20	45.10
Myelin yield mg/g of optic nerve Mielina, wydajność mg/g nerwu wzrokowego	263.50	307.40	310.10	405.30	482.20	684.50	694.30
Cholesterol	0.60 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.88 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.95 ± 0.01	1.17 ± 0.12
Total galactolipids Suma galaktolipidów	0.94 ± 0.11	1.07 ± 0.03	1.14 ± 0.05	1.22 ± 0.03	1.44 ± 0.08	1.62 ± 0.03	2.15 ± 0.01
Cerebrosides Cerebrozydy	0.67 ± 0.06	0.76 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.96 ± 0.02	1.14 ± 0.07	1.29 ± 0.02	1.54 ± 0.06
Sulfatides Sulfatydy	0.27 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.61 ± 0.04
Total phospholipids Suma fosfolipidów	0.89 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.05 ± 0.04	1.25 ± 0.02	1.42 ± 0.03	1.46 ± 0.04	1.60 ± 0.05
Sphingomyelins Sfingomieliny	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.32 ± 0.01
Phosphatidyl choline Fosfatydylocholina	0.24 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.04
Lysophosphatidyl choline Lizofosfatydylocholina	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Phosphatidyl serine + phosphoinositides Fosfatydyloseryna + fosfoinozytol	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Phosphatidyl ethanolamine Fosfatydyloetanolamina	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.11 ± 0.01
Plasmalogen Plazmalogen	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.65 ± 0.02

Values represent means ± standard deviation

Średnia ± odchylenie standardowe

The changes with age for phospholipids, cerebrosides, plasmalogens and sphingomyelins were statistically significant at the confidence level $p = 0.05$.

Zmiany w zależności od wieku dla fosfolipidów, cerebrozydów, plazmalogenu i sfingomielin były statystycznie znamienne przy półprzedziale ufności $p = 0,05$.

Table 2. Molar composition and ratios of myelin lipids in the rabbit optic nerve during ontogenic development

Tabela 2. Skład i stosunki molowe lipidów mieliny nerwu wzrokowego królika podczas rozwoju ontogenetycznego

Lipids Lipidy	Age, days Wiek w dniach						
	18	26	30	34	48	100	150—180
Cholesterol	100	100	100	100	100	100	100
Cholesterol							
Total galactolipids (GL)	70	77	63	63	70	78	84
Suma galaktolipidów							
Cerebrosides (CE)	52	57	47	51	57	64	62
Cerebrozydy							
Sulfatides	18	20	16	12	13	14	22
Sulfatydy							
Total phospholipids (PL)	72	75	65	71	76	75	69
Suma fosfolipidów							
Sphingomyelins	8	11	10	15	14	14	14
Sfingomieliny							
Phosphatidyl choline (PC)	19	21	19	21	21	14	9
Fosfatydylocholina							
Lysophosphatidyl choline	6	3	3	3	4	1	1
Lizofosfatydylocholina							
Phosphatidyl serine							
+ phosphoinositides	4	4	6	5	9	11	10
Fosfatydyloseryna + fosfoinozytol							
Phosphatidyl ethanolamine (PE)	17	14	8	8	8	9	5
Fosfatydyloetanoloamina							
Plasmalogen (Plas)	18	22	19	19	20	26	30
Plazmalogen							
Molar ratio PE/PC	0.89	0.67	0.42	0.38	0.38	0.64	0.56
Stosunek molowy							
Molar ratio GL/PC	3.68	3.77	3.32	3.00	3.33	5.57	9.33
Stosunek molowy							
Molar ratio CE/PC	2.74	2.71	2.47	2.43	2.71	4.57	6.88
Stosunek molowy							
Molar ratio Plas/PL	0.25	0.29	0.29	0.27	0.26	0.35	0.43
Stosunek molowy							
Molar ratio Plas/PE	1.05	1.57	2.37	2.37	2.50	2.89	6.00
Stosunek molowy							

Data calculated from values in Table 1.

Dane obliczono z wyników w Tabeli 1.

molecular level encompasses biosynthetic processes of the chemical myelin constituents, and the supramolecular one — events — engaged in their orderly deposition.

The abundance of galactolipids with long chain unsaturated as well as hydroxy fatty acyl residues makes the characteristic feature of the myelin membrane. Nevertheless, like in other membranes, various pho-

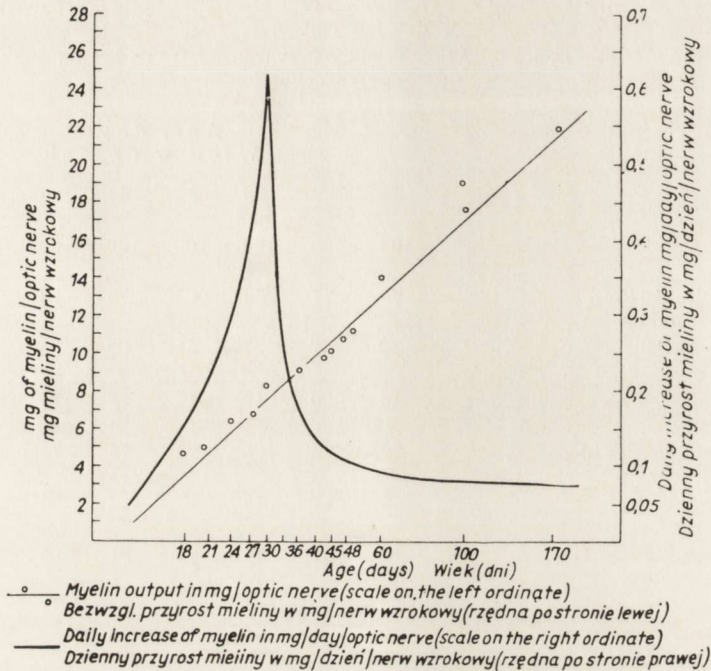


Fig. 1. Deposition of myelin in the rabbit optic nerve as a logarithmic function of postnatal age

Ryc. 1. Odkładanie się mielin w nerwie wzrokowym królika jako funkcja logarytmiczna wieku pozapłodowego.

spholipids and cholesterol are found in appreciable amounts in the myelin sheath as well.

According to many authors (Horrocks, 1973; Desmuh, Bear, 1977; Adamczewska, 1978), developmental processes in the CNS, and particularly the process of myelin formation and maturation bring about considerable changes in the composition of the protein as well as lipid structural constituents of all membranous structures of the brain, the myelin membranes undergoing the most pronounced remodelling. The literature concerned with the developing and mature optic nerve (Banik et al., 1968; MacBrinn, O'Brien, 1969; Hirose, Bass, 1973; Detering, Wells, 1976; Adamczewska-Goncerzewicz, 1977; Das et al., 1978) lays as well emphasis on the dynamic changes in the lipid composition of this very nerve. The onset of these compositional alterations fall on the end of the first decade of postnatal life (Brenkert, Radin, 1972) coinciding with that of myelin formation and pertaining galactolipids, cholesterol and plasmalogens in particular.

The myelin lipid composition of the rabbit optic nerve is very much like that of the rabbit cerebral white matter (Dalal, Einstein, 1969) and

this is not an unexpected finding, since the optic nerve constitutes an integral part of the central nervous system. There exist considerable similarities in the lipid composition of the optic nerves of different species (Hirose, Bass, 1973; Detering, Wells, 1976 — rat optic nerve; MacBrinn, O'Brien, 1968 — ox optic nerve myelin; Banik et al., 1968 — kitten optic nerve; Adamczewska-Goncerzewicz, 1977 — rabbit optic nerve). Nevertheless, the quantitative data reported by these authors do not overlap and show considerable differences. Different techniques employed for isolation, of the myelin fraction from the CNS as well as for separation and quantitation of the lipids under study could eventually explain these inconsistencies. The myelin fraction isolated during the early period of myelin formation (Agrawal et al., 1970; Davison, 1971) has proved to be poor in cerebrosides and basic proteins. According to Banik et al. (1968), Norton and Poduslo (1971) and Davison (1972), the early myelin is made up of two different fractions, a myelin-like fraction with the chemical composition resembling closely that of the oligodendrocyte plasma membrane and another one, which has a chemical composition comparable to that of mature myelin. Myelin fractions that have been isolated by numerous authors with the aid of various techniques, have provided fairly well defined criteria of purity (Smith, 1969; Norton, Poduslo, 1973) and there are: a sufficiently high content of galactolipids, cholesterol and plasmalogens, a relatively low content of phospholipids — in particular of phosphatidylcholine.

The herewith demonstrated systematic increase of the absolute amount of almost all lipid constituents furnishing the lipid portion of the myelin membrane during the ontogenic development of the rabbit optic nerve, as well as the differential accumulation of individual lipids seems to reflect the profound qualitative and quantitative structural changes determining both the process of myelin formation and maturation.

The dominating specific change observed already during the earliest phases of myelinogenesis was, like in the case of the rabbit cerebral white matter, the drastic increase of the galactolipid content, which according to Nussbaum et al. (1969) may contribute to an increasing stability of the myelin membrane. The high cholesterol content instead might be regarded as a quantitative exponent of the myelin mass, both in the developing and mature CNS (Banik et al., 1968; Bass, Hess, 1969).

The same ensues, when the compositional changes are evaluated on a molar basis. It then appears that the developing myelin becomes gradually enriched in specific myelin lipids, as exemplified by the early, intense deposition of galactolipids, and the much later accumulation of plasmalogens. And thus, when adjusted by molar concentration, the

order of the individual myelin lipid at the postnatal age of between 18—48 days was as follows: cholesterol, cerebrosides, phosphatidylcholine. At the age of 100 days and above that age, this order changed, and the plasmalogen content exceeded that of phosphatidylcholine.

It thus appeared that the myelin fraction isolated during the early developmental periods of the rabbit differed appreciably with respect to its lipid composition from that isolated during later stages of the rabbit's ontogeny, the latter acquiring gradually the characteristics of the myelin fraction of adult animals.

The gradual enrichment of the developing myelin membrane by specific lipids resulted in considerable alterations of the respective molar ratios of the individual lipid constituents. The steadily increasing and high galactolipid to phosphatidylcholine (GL/PC), in particular the cerebroside to phosphatidylcholine (CE/PC) ratio, as well as the rising plasmalogen to phosphatidylethanolamine (Plas/PE) molar ratios could serve as the most characteristic exponents and measure of maturity of the myelin membrane. Such an interpretation of the GL/PC and CE/PC ratios has already been suggested by Norton and Poduslo in 1973. In the developing rabbit optic nerve myelin the respective molar ratios amounted to 3.3 and 2.7 at the postnatal ages of 18 and 48 days, whereas in animals aged 100 days and above that age the molar GL/PC and CE/PC ratios were almost three times higher, amounting to 9.3 and 6.8 respectively. These high ratios are thus another differentiating feature between the immature and mature myelin membrane.

The above described compositional changes occurring during the later developmental stages may thus represent events that serve the process of transformation of the immature form of the myelin membrane into the mature or „adult” one.

The considerable drop of the absolute phosphatidylcholine content, observed during the latest developmental stage of the rabbit optic nerve could suggest a selective exchange of lipid constituents, serving as an additional event causing qualitative alterations in the maturing membrane. Davison (1972) have assumed the possibility of a specific exchange of some polar lipids of the immature myelin membrane, particularly of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine for cerebrosides and plasmalogens. The early intense deposition of galactolipids and cholesterol instead may reflect the *de novo* formation of new myelin lamellae.

In fact, as demonstrated beforehand, the process of myelin deposition in the rabbit optic nerve starts very early during the postnatal development, reaching the highest daily increment (myelination peak) already

at the age of 30 days postnatal, as opposed to the rabbit cerebral white matter, which was shown to fall on the 48th day of extrauterine life (Pankrac, 1976). On the other hand, in the rabbit optic nerve, myelin is being formed over a much longer period of time (up to 180 days postnatal, which was the longest time tested), thus confirming the postulates of Davison (1971) and Horrocks (1973), that myelin deposition continues far beyond the period of the so called active myelinogenesis.

The results of our investigation have shown that the active stage of myelinogenesis in the developing rabbit optic nerve was characterized by a systematic increase of the absolute amounts of myelin specific lipid constituents, i.e. of cholesterol, galactolipids and plasmalogens, the late developmental period instead was marked by considerable alterations of the proportions of the individual lipid constituents, resulting in a remodelling of the structurally immature myelin membrane into a mature one.

ACKNOWLEDGEMENTS: I am greatly indebted to Mrs Jadwiga Pankrac for the preparation of the myelin fraction and to Urszula Adrych for the excellent technical assistance in isolation and quantifying of the individual lipids.

Z. Adamczewska-Goncerzewicz

ZMIANY LIPIDÓW MIELINY NERWU WZROKOWEGO KRÓLIKA PODCZAS ROZWOJU ONTOGENETYCZNEGO

Streszczenie

Badano skład lipidów osłonki mielinowej nerwu wzrokowego królika w różnych okresach rozwoju ontogenetycznego.

Frakcję mielinową wyodrębniono z nieciągniętego gradientu gęstości sacharozą drogą wirowania różnicowego. Ilość mieliny była funkcją logarytmiczną wieku pozapłodowego i wyrażała jej przyrost bezwzględny w procesie dojrzewania. Szczyt mielinizacji nerwu wzrokowego przypadał na 30 dzień życia królika i wynosił 0,62 mg/dzień/nerw wzrokowy.

Zawartość poszczególnych lipidów mieliny określano ilościowo po rozdziale na drodze chromatografii kolumnowej oraz cienkowarstwowej jedno- i dwukierunkowej.

W wykonanych badaniach stwierdzono systematyczny przyrost bezwzględnej ilości wszystkich składników lipidowych. Największe wskaźniki wzrostu dotyczyły galaktolipidów (cerebrozydów i sulfatydów) oraz cholesterolu, plazmalogenu i sfingomielin. Przyrost frakcji fosfatydylocholiny jest wolniejszy i dlatego podczas rozwoju osłonki mielinowej nerwu wzrokowego obserwuje się względny spadek zawartości tego głównego składnika fosfolipidowego.

Podczas całego okresu dojrzewania, błona mielinowa wzbogacała się w typowe dla niej lipidy, co powodowało znamienne zmiany stosunków molowych pomiędzy poszczególnymi klasami oraz indywidualnymi lipidami. Najbardziej charakterystyczne i bardzo wysokie były stosunki molowe galaktolipidów do fosfatydylocholiny (GL/PC), cerebrozydów do fosfatydylocholiny (CE/PC) i plazmalogenu do fosfatydyloetanoloaminy (Plas/PE).

Badania wykazały, że w okresie aktywnej mielinogenezy (aż do 48 dnia życia) następuje systematyczny wzrost bezwzględnej zawartości niemal wszystkich składników lipidowych nowo formującej się błony mielinowej. W późniejszym okresie rozwoju najbardziej charakterystycznym zjawiskiem było znaczne przesunięcie proporcji udziału poszczególnych lipidów tworzących strukturalnie dojrzałą błonę mielinową.

3. Адамчевска-Гончеревич

ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДОВ МИЕЛИНОВОЙ ОБОЛОЧКИ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА КРОЛИКА В ТЕЧЕНИЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Резюме

Исследовался состав липидов миелиновой оболочки зрительного нерва кролика в разные периоды его онтогенетического развития. Миелиновая фракция выделялась из непостоянного градиента концентрации сахарозы последствием дифференцированного центрифугирования. Количество миелина было логарифмической функцией бесплодного возраста и выражало его безусловный прирост в процессе зрелости. Пик миелинизации зрительного нерва приходился на 30 день жизни кролика и составлял 0,62 мг/день/зрительный нерв.

Содержание отдельных липидов определялось количественно после раздела при помощи колонной и тонкослойной хроматографии (в одном и двух направлениях).

В произведенных исследованиях наблюдался систематический прирост безусловного количества всех липидных составных. Самые большие показатели роста относились к галактолипидам (цереброзидам и сульфатидам), а также к холестеролу, плазмалогену и сфингомиелинам. Прирост фракции фосфатидилхолина проходит более медленно, в связи с чем во время развития миелиновой оболочки зрительного нерва наблюдается сравнительное уменьшение содержания этого главного фосфолипидного элемента.

Во время всего периода зрелости миелиновая оболочка обогащалась типичными для нее липидами, что вызывало значительные изменения. Молярного соотношения между отдельными кислотами и индивидуальными липидами.

Наиболее характерными и очень высокими были молярные соотношения галактолипидов к фосфатидилхолину, цереброзидов к фосфатидилхолину и плазмалогена к фосфатидилэтаноламину.

Исследования показали, что во время активного миелиногенеза (вплоть до 48 дня жизни) наступает систематический рост безусловного содержания почти всех липидных элементов формирующейся миелиновой оболочки. В последующий период развития наиболее характерным явлением был значительный передвиг в пропорции отдельных липидов, формирующих структурально зрелую миелиновую оболочку.

REFERENCES

1. Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Lipid composition of the rabbit optic nerve during ontogenic development. *Folia Biol. (Kraków)*, 1977, 25, 415—423.
2. Adamczewska Z.: Myelin lipids in the developing rat brain. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 11—23.

3. Agrawal H. C., Banik N. C., Bone A. H., Davison A. N.: The identity of a myelin-like fraction isolated from developing brain. *Biochem. J.* 1970, 120, 635—642.
4. Banik N. L., Blunt M. J., Davison A. N.: Changes in the osmiophilia of myelin and lipid content in the kitten optic nerve. *J. Neurochem.* 1968, 15, 471—475.
5. Bass N. H., Hess H. H.: A comparison of cerebrosides, proteolipid proteins, and cholesterol as indices of myelin in the architecture of rat cerebrum. *J. Neurochem.* 1969, 16, 731—750.
6. Brenkert A., Radin N. S.: Synthesis of galactosylceramide and glucosyl ceramide by rat brain: assay procedures and changes with age. *Brain Res.*, 1972 36, 183—193.
7. Dalal K. B., Einstein E. R.: Biochemical maturation of the central nervous system. I. Lipid changes. *Brain Res.* 1969, 16, 441—451.
8. Das S. K., Steen M. E., McCullough M. S., Bhattacharyya D. K.: Composition of lipids of bovine optic nerve. *Lipids* 1978, 13, 679—684.
9. Davison A. N.: Cellular aspects of neural growth and differentiation. Ed. D. C. Pease. University of California Press 1971, 365—429.
10. Davison A. N.: Metabolism of myelin lipids in the developing brain. *Biochem. Soc. Sympos.* 1972, 35, 129—139.
11. Deshmuh D. S., Bear W. D.: The distribution and biosynthesis of the myelin-galactolipids in the subcellular fractions of brains of quaking and normal mice during development. *J. Neurochem.* 1977, 28, 987—993.
12. Detering N. K., Wells M.: The non-synchronous synthesis of myelin components during early stages of myelination in the rat optic nerve. *J. Neurochem.*, 1976 26, 253—257.
13. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
14. Horrocks L. A.: Composition and metabolism of myelin phosphoglycerides during maturation and aging. *Neurobiological Aspects of Maturation and Aging.* Elsevier, Amsterdam 1973, 383—395.
15. Hirose G., Bass N. H.: Maturation of oligodendroglia and myelinogenesis in rat optic nerve: A quantitative histochemical study. *J. Comp. Neurol.* 1973, 152, 201—209.
16. MacBrinn M. C., O'Brien J. S.: Lipid composition of optic nerve myelin. *J. Neurochem.* 1969, 16, 7—12.
17. Mandel P., Nussbaum J. L., Neskovic N. M.: Regulation of myelinogenesis. *Advances Enzym. Regulat.* Ed. G. Weber. Pergamon Press, Oxford, New York 1972, 101—118.
18. Norton W. T., Poduslo S. E.: Myelination in rat brain.: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 1971, 21, 749—757.
19. Norton W. T., Poduslo S. E.: Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.* 1973, 21, 759—773.
20. Nussbaum J. L., Neskovic N., Mandel P.: A study of lipid composition in brain in the „Jimpy” mouse, a mutant with myelin deficiency. *J. Neurochem.* 1969 16, 927—934.
21. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalna. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1966 172—174.

22. Pankrac J.: Oznaczanie przyrostu mieliny oraz szczytu mielinizacji w mózgu w rozwoju ontogenetycznym. XI Dzień Neurochemii Klinicznej, Zielona Góra 1976, 8—9.
23. Smith M. E.: An in vitro system for the study of myelin synthesis. *J. Neurochem.*, 1969, 16, 83—92.

Author's address: Department of Neurology, Academy of Medicine, 49 Przybyszewskiego str., 60-355 Poznań, Poland.

HALINA WEINRAUDER, ZUZANNA KRAŚNICKA

ANTYGENY GLEJOWE W HODOWLI TKANKOWEJ MÓZDŻKU SZCZURA

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

Hodowla tkanek jest bardzo dogodnym modelem doświadczalnym zarówno do badań składu antygenowego — ze względu na możliwość uzyskiwania homogennych populacji — jak i do badań biologicznego oddziaływania surowic odpornościowych. Antygeny układu nerwowego, traktowane jako swoiste markery immunochemiczne, znajdują coraz częstsze zastosowanie w badaniach dojrzewania i różnicowania komórek *in vitro*. Najwięcej prac dotyczy badań, w których stosuje się surowicę odpornościową przeciwko GFAP (Eng i wsp. 1971), antygenowi, który jest uważany za swoisty marker astrocytów (Bissell i wsp. 1974; Antanitus i wsp. 1975; Gilden i wsp. 1976; Kozak i wsp. 1978; der Meulen i wsp. 1978; Bignami, Stoolmiller 1979).

W poprzednich pracach wykazano obecność swoistych antygenów glejowych w różnych okolicach mózgu szczura (Weinrauder, Lach 1975, 1977; Weinrauder, Krajewski 1979). Celem niniejszej pracy było ustalenie czy stosowane przez nas surowice odpornościowe wykrywają swoiste antygeny w tkance hodowanej *in vitro* oraz jaka jest ich lokalizacja komórkowa.

MATERIAŁ I METODY

Surowica odpornościowa. Surowicę otrzymywano uodporniając króliki domięśniowo homogenatem mózgu szczura (250 mg w 1 ml), z niepełnym adjuwantem Freund'a (IFA Difco) w stosunku 1 : 1. Po kilkakrotnym wstrzyknięciu immunogenu i uzyskaniu odpowiedniego miana (5 lub więcej linii w odczynie podwójnej dyfuzji z surowicą nieabsorbowaną). Surowice absorbowano normalną surowicą szczura oraz homo-

genatami narządów (nerka, wątroba, śledziona, płuca). Absorpcje powtarzano aż do całkowitego usunięcia przeciwciał reagujących z antygenami użytymi do absorpcji. Skuteczność absorpcji kontrolowano w odczynie ID oraz IF na skrawkach z narządów szczura. Do badań IF przeprowadzanych na hodowli stosowano surowice reagujące tylko z antygenami z mózgu szczura i dające w odczynie ID 1 lub 2 swoiste linie precypitacji. Szczegóły metodyczne podano poprzednio (Weinrauder, Lach 1977).

Hodowle tkankowe. Badania przeprowadzono na 7- i 21-dniowych hodowlach z mózdku noworodków szczurzych, prowadzonych w medium z dodatkiem 50% surowicy cielęcej, według metody opisanej uprzednio (Kraśnicka, Mossakowski 1965). Hodowle po wyjęciu z medium starannie, kilkakrotnie płukano w PBS i utrwalano w zimnym (-20°C) acetonie przez 4 min. Po utrwaleniu preparaty przechowywano w temp. -20°C do chwili wykonania odczynu IF.

Odczyn IF. Utrwalone hodowle przemywano PBS i inkubowano 30 min. w 37°C z surowicą odpornościową rozcieńczoną 1:10. Po kilkakrotnym przemyciu PBS preparaty inkubowano z kozimi gammaglobulinami przeciwko gammaglobulinom króliczym, konjugowanymi z izotiocjanianem fluoresceiny (Biomed, Warszawa). Odczynnik fluorescencyjny absorbowano proszkiem acetonowym z wątroby szczura i używano w rozcieńczeniu 1:10. Po wypłukaniu szkiełek z nadmiaru surowicy przy pomocy PBS, montowano je w zbuforowanej glicerynie i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss (filtry BG 12/4 i OG-1 (GG-9)).

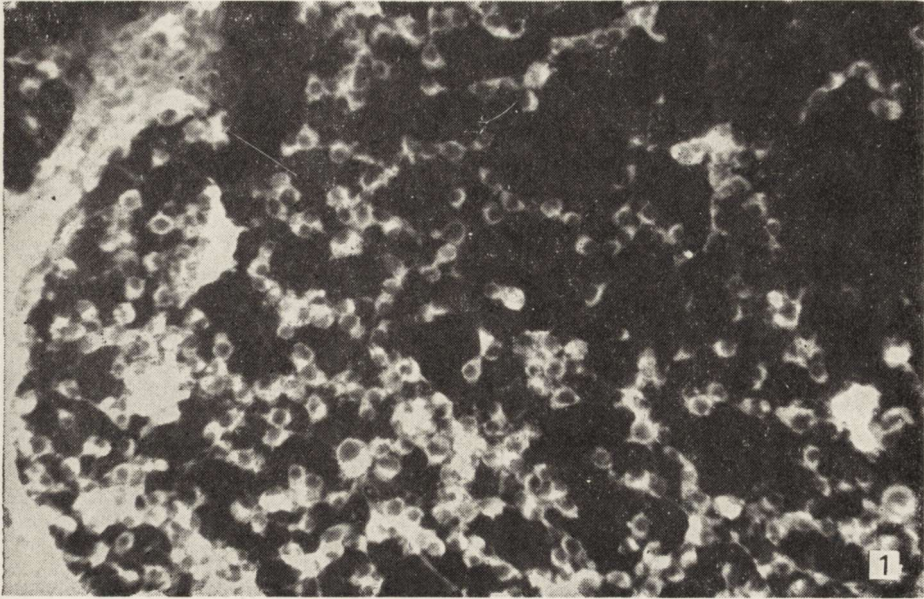
Kontrole swoistości odczynu IF przeprowadzono zastępując surowicę odpornościową normalną surowicą króliczą, PBS lub surowicą odpornościową wyabsorbowaną homogenatem mózgu szczura. Wszystkie kontrole były ujemne.

Barwienia histologiczne. Hodowle w tym samym wieku co używane do odczynu IF barwiono błękitem toluidyny oraz metodą Gallyasa.

WYNIKI

We wszystkich badanych hodowlach odczyn immunofluorescencyjny z surowicą anty mózg szczura był dodatni. Intensywność świecenia była różnie nasiloną i zależała od wieku hodowli oraz od tego, czy komórki znajdowały się w eksplantacie czy w strefie wzrostu. W eksplantacie reakcja była bardzo intensywna i malała w miarę oddalania się od niego.

W hodowli 7-dniowej, czyli w okresie rozpoczynającego się różnicowania komórek, reakcja IF była już wyraźnie dodatnia. Komórki były drobne, okrągłe, z nielicznymi wypustkami, z fluorescencją zlokalizo-



Ryc. 1. Hodowla 7-dniowa z obfitym wzrostem mało zróżnicowanych komórek. Widoczny fragment eksplantatu z silną fluorescencją. Dodatni odczyn IF w cytoplazmie komórek glejowych słabnący w miarę oddalania się od eksplantatu. Pow. 100 X

Fig. 1. 7-day culture. Dense growth of weak-differentiated cells. Fragment of explant with strong fluorescence. Positive IF reaction in the cytoplasm of glial cells. The number of positive cells decreases with the distance from the explant. X 100

waną w perikarionie. W wypustkach odczyn był bardzo słaby lub ujemny. Jądra komórkowe były zawsze ujemne (ryc. 1). W większym powiększeniu można było obserwować kropelkową fluorescencję wzdłuż wypustek oligodendrocytów (ryc. 2). W tym okresie hodowli reakcja w astrocytach była znacznie słabsza lub nawet ujemna. Szczególnie silny odczyn zacierający granice poszczególnych komórek występował w eksplantacie. Komórki w strefie wzrostu wykazywały słabszą reakcję immunofluorescencyjną, a komórki leżące na obwodzie hodowli często były ujemne.

W hodowlach 21-dniowych dodatnie reakcje IF obserwowano w całej populacji komórek. Podobnie jak w hodowlach 7-dniowych, w strefie wzrostu możliwe było różnicowanie komórek z dodatnim odczynem, natomiast bardzo silna reakcja w eksplantacie nie pozwalała na takie różnicowanie. Fluorescencję o charakterze dyfuzyjnym obserwowano w obu typach komórek glejowych: w astro- i oligodendrocytach. Oligodendrocyty charakteryzowały się silnym odczynem zlokalizowanym w perikarionie, niesymetrycznie wokół jądra (ryc. 3a). W niektórych ko-

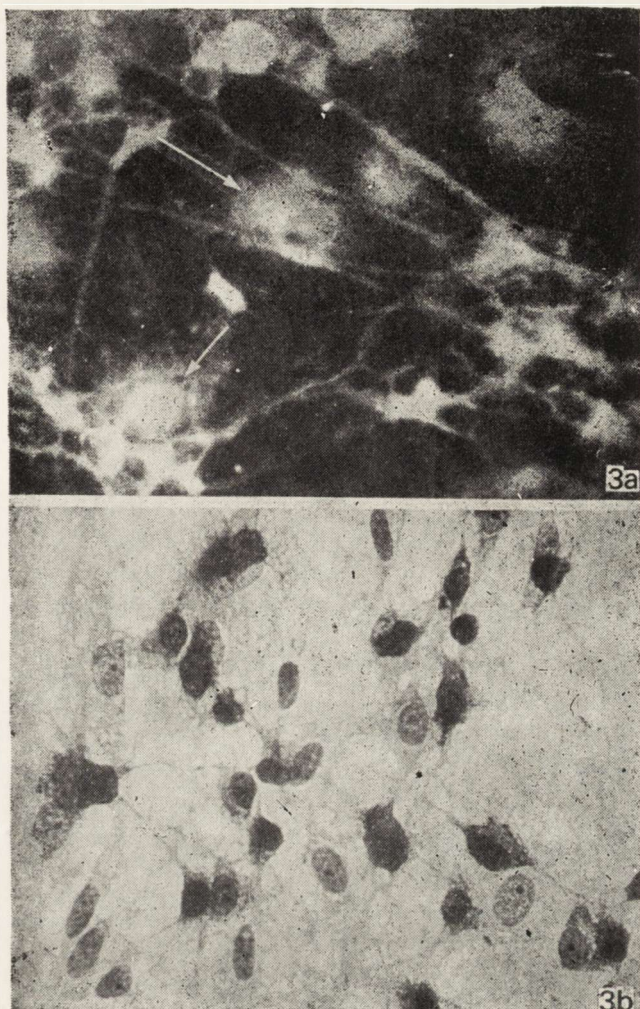


Ryc. 2. Hodowla 7-dniowa. Strefa wzrostu w większym powiększeniu. Oligodendrocyty z silniej zaznaczoną dodatnią fluorescencją w cytoplazmie (krótka strzałka). Wzdłuż wypustek widoczny kropelkowy odczyn IF. W astrocytach (długa strzałka) fluorescencja znacznie słabsza, niektóre astrocyty negatywne. Pow. 200 ×

Fig. 2. 7-day culture. Growth zone in higher magnification. Oligodendrocytes with more positive fluorescence in the cytoplasm (short arrow). Droplet-like IF reaction along oligodendrocytes processes. In astrocytes (long arrow) much weaker fluorescence, some astrocytes negative. × 200

mórkach, szczególnie w tych leżących pojedynczo w strefie wzrostu, zaznaczony był również dodatni odczyn w wypustkach. Obrazy fluorescencji w oligodendrocytach podkreślały ich cechy cytologiczne, wyraźnie widoczne w preparatach hodowli barwionych błękitem toluidynowy lub metodą Gallyasa (ryc. 3b).

Astrocyty w hodowlach 21-dniowych wykazywały większe zróżnicowanie obrazów reakcji immunohistochemicznej, zależnie od budowy cytologicznej poszczególnych typów tych komórek. W astrocytach protoplazmatycznych (ryc. 4a, b) fluorescencja miała charakter bardziej homogenny i obejmowała całą cytoplazmę komórki ze szczególnym nasileniem wokół jądra. W innych postaciach astrogleju odczyn immunofluorescencji podkreślał „włókienkowatą” budowę cytoplazmy. Dodatni odczyn obserwowano także w płatowatych, progresywnie zmienionych astrocytach, tworzących pierwszą warstwę hodowli, leżącą bezpośrednio na pokrytym kolagenem szkle (ryc. 5a). Wszystkim postaciom astrocytów wykazujących dodatni odczyn IF odpowiadały obrazy w preparatach hodowli barwionych błękitem toluidynowy (ryc. 5b).

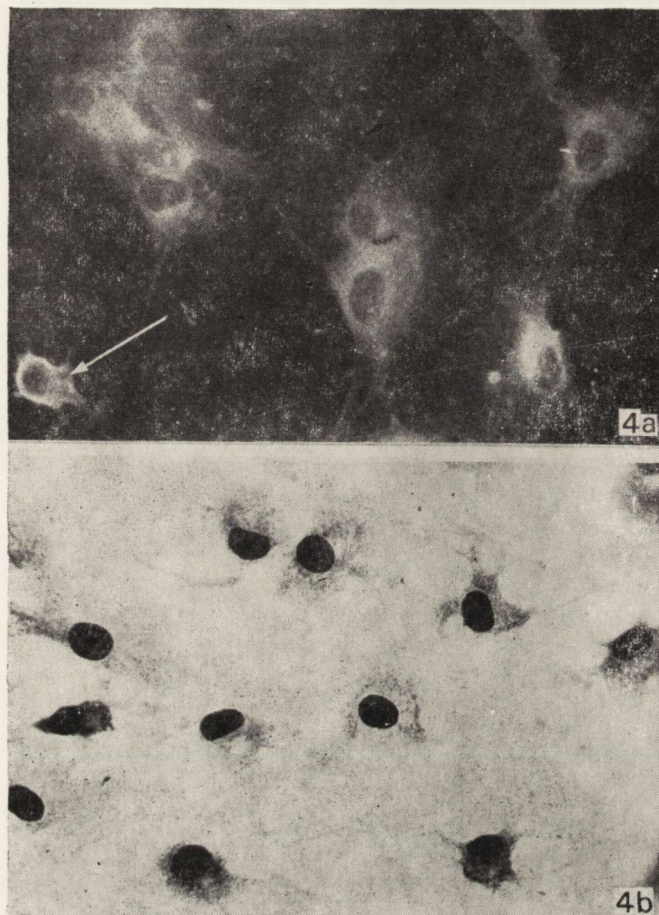


Ryc. 3. Hodowla 21-dniowa. a) dodatni odczyn IF w komórkach oligo- i astrogleju. Najsilniej zaznaczony odczyn w cytoplazmie i wypustkach oligodendrocytów. Różne nasilenie i charakter odczynu w różnych postaciach astrogleju. Astrocyt włóknisty (krótka strzałka) i protoplazmatyczny (długa strzałka). Pow. 400 \times . b) barwienie błękitem toluidyny. Wyraźne zróżnicowanie komórek oligo- i astrogleju. Pow. 400 \times

Fig. 3. 21-day culture. a) positive IF test in oligo- and astroglial cells. Strongest reaction in the cytoplasm and processes of oligodendrocytes. Different intensity and character of IF test in different types of astroglia. Fibrous astrocyte (short arrow) and protoplasmic astrocyte (long arrow). $\times 400$. b) toluidine blue staining. Distinct differentiation of astro- and oligodendroglial cells. $\times 400$

OMÓWIENIE

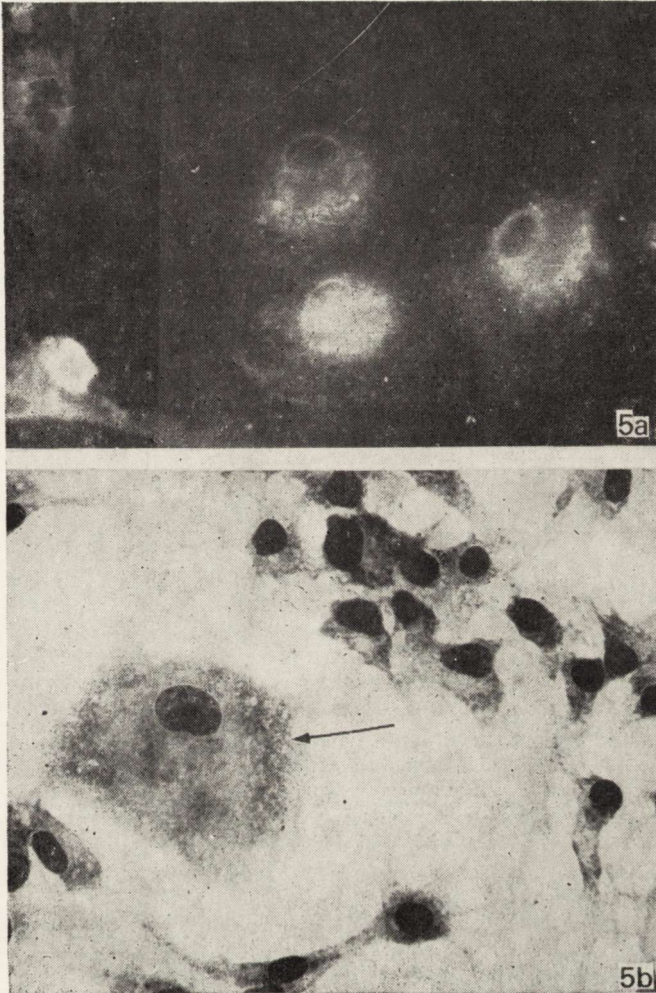
W stosowanej przez nas surowicy odpornościowej, skierowanej przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu szczura, znajdują się przeciwcia-



Ryc. 4. Hodowla 21-dniowa. a) Fragment hodowli z przewagą astrocytów z dyfuzyjnym odczynem IF w cytoplazmie. Strzałka wskazuje oligodendrocyt. b) Fragment hodowli w barwieniu błękitem toluidyny, z przewagą astrocytów „tucznych”. Pow. 400 ×

Fig. 4. 21-day culture. a) Fragment of culture with predominance of astrocytes with IF reaction of diffuse character in cytoplasm. Arrow indicates oligodendrocyte. b) Fragment of culture with predominance of „mast” astrocytes. Toluidine blue staining. × 400

ła reagujące swoiście z antygenami zarówno oligo- jak i astrocytów. Odczyn w oligodendrocytach pojawia się wcześniej i jest intensywniejszy. Nasilenie swoistej reakcji w starszych hodowlach wzrasta równolegle z morfologicznym dojrzewaniem komórek. Podobne obrazy obserwowali w pierwotnych i pasażowanych hodowlach z mózgu płodów ludzkich i noworodków króliczych Wahlström i wsp. (1973). Autorzy ci używali do badań surowicę przeciwko mózgowi ludzkiemu, pochodzącemu od dorosłego osobnika, która w immunodyfuzji tworzyła jedną linię pre-



Ryc. 5. Hodowla 21-dniowa. a) Dodatni odczyn IF w progresywnie zmienionych astrocytach pokrywających podłoże hodowli. b) Barwienie błękitem toluidyny. Widoczny zmieniony progresywnie astrocyt (strzałka) w otoczeniu komórek glejowych. Pow. 400 ×

Fig. 5. 21-day culture. a) Positive IF reaction in progressively changed astrocytes covering the culture ground. b) Toluidine blue staining. Visible progressive changed astrocyte (arrow) among glial cells. × 400

cypitacji ze swoistym antygenem narządowym z mózgu różnych gatunków zwierząt i człowieka. W badaniach immunofluorescencyjnych surowica ta dawała dodatni odczyn na obu typach komórek glejowych. Można przypuszczać, i dotyczy to także wyników uzyskanych przez nas, że chodzi o antygen występujący zarówno w oligo- jak i w astrogleju. Możliwe jest jednak także, że w skład zidentyfikowanego antygeny gle-

jowego wchodzą dwie komponenty, nie rozdzielające się w odczynie immunodyfuzji.

Zmienność i różnorodność morfologiczna komórek układu nerwowego hodowanych *in vitro* jest do tej pory przedmiotem dyskusji. Wróblewska i wsp. (1975) oraz Rorke i wsp. (1975) hodując *in vitro* komórki z mózgu ludzkiego, wyróżnili wśród 7 typów morfologicznych trzy, które ich zdaniem są komórkami glejowymi, co zostało potwierdzone dodatnim odczynem IF z surowicą przeciwko GFAP (Gilden i wsp. 1976). Dodatnią reakcją z tą surowicą uzyskali jednak również w czwartym typie komórek, które uważają za komórki pochodzenia mezenchymalnego. Być może są to zmienione astrocyty, za czym przemawia wystąpienie swoistej reakcji IF, a także dodatni odczyn z surowicą przeciw mózgowi, uzyskany przez Wahlströma i wsp. (1973), i przez Antanitusa i wsp. (1975) z surowicą anty GFA, w bardzo podobnych morfologicznie komórkach astrogleju.

Nasze spostrzeżenia, dotyczące negatywnej reakcji IF w komórkach typu fibroblastów oraz wyraźnie dodatniego odczynu w kilku morfologicznie różniących się postaciach gleju, są zgodne z danymi zawartymi w pracy Wahlströma i wsp. (1973). Różnice cech morfologicznych mogą być związane z gatunkiem zwierzęcia oraz dojrzałością tkanki mózgowej, z której zakładano hodowle. Hodowle w pracach Wróblewskiej i wsp. (1975) oraz Rorke i wsp. (1975) pochodziły z dojrzałego mózgu ludzkiego, natomiast hodowle z obrazami IF, bardzo zbliżonymi do obserwowanych przez nas były zakładane przez Wahlströma i wsp. (1973) z mózgu płodów ludzkich i noworodków króliczych. Naszym zdaniem dodatnia reakcja IF w komórkach, nawet nie wykazujących typowych cech komórki glejowej, przemawia za ich glejową przynależnością. Tego typu reakcję obserwowaliśmy w „płatowatych”, lub w inny sposób zmienionych astrocytach.

Swoistość odczynu IF została w naszych badaniach potwierdzona zarówno ujemnymi reakcjami na skrawkach z narządów używanych do absorpcji surowicy, jak również ujemnymi reakcjami z normalną surowicą króliczą i surowicą odpornościową absorbowaną mózgiem. Glejową lokalizację antygenów wykrywanych przez używane przez nas surowice wykazaliśmy uprzednio w mózgu szczura (Weinrauder, Lach 1975, 1977; Weinrauder, Krajewski 1979) oraz w ludzkich guzach mózgu pochodzenia glejowego (Lach, Weinrauder 1978). Obecne badania potwierdziły glejową lokalizację także w komórkach hodowanych *in vitro*, przy czym silniejsze reakcje wydają się wskazywać na większą zawartość antygenów (antygenów) w oligodendrocytach. Do tej pory nie wyizolowano antygenów swoistych dla tego typu gleju, jakkolwiek pojawiły się w piśmiennictwie prace wskazujące na ich występowanie

(Abramsky i wsp. 1977). Na obecnym etapie badań nie możemy wypowiedzieć się czy zidentyfikowane przez nas antygeny glejowe są wspólne dla obu typów gleju (podobnie jak ma to miejsce w przypadku S-100 — Bock 1977), czy też w surowicach używanych przez nas znajdują się przeciwciała skierowane przeciwko większej liczbie swoistych komponent glejowych, o różnej lokalizacji komórkowej. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia będzie przedmiotem dalszych badań.

Г. Веинраудер, З. Красницка

ГЛИАЛЬНЫЕ АНТИГЕНЫ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

Резюме

В работе исследовали присутствие и клеточную локализацию специфических глиальных антигенов в культурах из мозжечка новорожденных крыс, культивированных 7 и 21 дней *in vitro*. Употребляли непрямой метод иммунофлуоресценции при помощи сыворотки против мозга крысы. Иммунная сыворотка, после интенсивной абсорбции нормальной сывороткой и гомогенатами органов крысы, обнаруживает специфические антигены в обоих типах глии, в астро- и олигодендроцитах. Иммунофлуоресцентная реакция является положительной в морфологически разных типах астроглии, но интенсивность флуоресценции кажется быть больше в олигодендроцитах — как в 7-дневных так и в 21-дневных культурах.

Авторы обсуждают проблему присутствия совместного антигена в обоих типах глии, а также возможность нахождения в сыворотке двух разных антител против глии.

H. Weinrauder, Z. Kraśnicka

GLIAL ANTIGENS IN TISSUE CULTURE OF RAT CEREBELLUM

Summary

The presence and cellular localization of specific glial antigens in 7- and 21-day cultures of newborn rat cerebellum was investigated. The indirect immunofluorescence (IF) test with anti-rat brain serum was used. Immune serum after exhaustive absorption with normal serum and rat organ homogenates, recognized glial specific antigens in both astro- and oligodendrocytes. IF reaction was positive in morphologically different types of astroglia but its intensity was stronger in oligodendrocytes in both the 7- and 21-day cultures.

The question whether one common antigen is present in both types of glia or two different antigial antibodies exist in immune serum, is discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Abramsky O., Saida T., Lisak R. P., Pleasure D., Silberberg D. H.: Immunologic studies with isolated oligodendrocytes. *Neurology* (Minneapolis) 1977, 27, 342—343.

2. Antanitus D. S., Choi B. H., Lapham L. W.: Immunofluorescence staining of astrocytes in vitro using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 1975, 89, 363—367.
3. Bignami A., Stoolmiller A. C.: Astroglia-specific protein (GFA) in clonal cell lines derived from the G26 mouse glioma. *Brain Res.* 1979, 163, 353—357.
4. Bissell M. G., Rubinstein L. J., Bignami A., Herman M. M.: Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. *Brain Res.* 1974, 82, 77—89.
5. Bock E.: Immunochemical markers in primary cultures and in cell lines. W: *Cell, tissue, and organ culture in neurobiology.* Red. S. Fedoroff, L. Hertz, Acad. Press, New York, San Francisco, London 1977, 407—422.
6. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971, 28, 351—354.
7. Gilden H. D., Wróblewska Z., Eng L. F., Rorke L. B.: Human brain in tissue culture. Part 5. Identification of glial cells by immunofluorescence. *J. neurol. Sci.* 1976, 29, 177—184.
8. Kozak L. P., Dahl D., Bignami A.: Glial fibrillary acidic protein in reaggregating and monolayer cultures of fetal mouse cerebral hemispheres. *Brain Res.* 1978, 150, 631—637.
9. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—408.
10. Lach B., Weinrauder H.: Glia-specific antigen in the intracranial tumors. Immunofluorescence study. *Acta neuropath. (Berl.)* 1978, 41, 9—15.
11. der Meulen, van, J. D. M., Houthoff H. J., Ebels E. J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropath. appl. Neurobiol.* 1978, 4, 177—190.
12. Rorke L. B., Gilden D. H., Wróblewska Z., Santoli D.: Human brain in tissue culture. IV. Morphological characteristics. *J. comp. Neurol.* 1975, 161, 329—339.
13. Wahlström T., Linder E., Saksela E.: Glia-specific antigens in cell cultures from rabbit brain, human foetal and adult brain, and gliomas. *Acta path. microbiol. scand.* 1973, 81, 768—774.
14. Weinrauder H., Lach B.: Immunofluorescence studies on the localization of the brain specific antigens in the central nervous system of the rat. *Proc. VIIth Intern. Congress Neuropath. Budapest 1974.* Red. St. Környey, St. Tariska, G. Gosztonyi, Excerpta Medica, Amsterdam 1975, 115—118.
15. Weinrauder H., Lach B.: Localization of organ-specific antigens in the nervous system of the rat. *Acta neuropath. (Berl.)* 1977, 39, 109—114.
16. Weinrauder H., Krajewski S.: Immunofluorescencyjna lokalizacja narządowo-swoistych antygenów w mózgu przy użyciu surowic homo- i heterologicznych. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 273—285.
17. Wróblewska Z., Devlin M., Gilden D. H., Santoli D., Friedman H., Koprowski H.: Human brain in tissue culture. II. Studies of long-term cultures. *J. comp. Neurol.* 1975, 161, 307—316.

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

ZBIGNIEW M. RAP, JANUSZ WIDEMAN

EFFECT OF REDUCED AND OXIDIZED GLUTATHIONE
ON STRUCTURAL CHANGES OF NERVOUS TISSUE IN
VASOGENIC BRAIN EDEMA

Department of Neuropathology Medical Research Centre, Polish Academy
of Sciences

Head: Prof. dr M. J. Mossakowski

Department of Neurochemistry Medical Research Centre, Polish Academy
of Sciences

Head: Ass. prof. J. W. Łazarewicz

It is known that sulfhydryl compounds play in the tissues a protective role in stabilizing structure and function of cell membranes. These properties of sulfhydryl compounds result among others, from their ability to bind cation of heavy metals and neutralize free radicals (Chapman, Cronkite, 1950; Hope, 1959). Sulfhydryl compounds are found in the CNS in the reduced and oxidized forms and mutual relation between them is determined by specific redox system (Jocelyn, 1972; Orłowski, Karkowsky, 1976). Under physiological conditions the reduced form prevails, while the oxidized one accounts for only about three percent of all sulfhydryl compounds. The decrease of sulfhydryl group in turn leads to an increase of disulfide compounds which may damage cells membranes and abolish cell functions (Barron, 1951; Martin, McIlwain, 1959; Jocelyn, 1972; Baba et al., 1978). During development of vasogenic brain edema a significant decrease of the total, non-protein and protein sulfhydryl groups (SH) in the nervous tissue was noticed. Reduced glutathione (GSH) injected intravenously slowed down the dynamics of spread of brain edema and oxidized glutathione (GSSG) accelerated this process. It was connected with changes in the water content in the nervous tissue (Rap, Wideman, 1976). This paper, the second of the series, deals with morphological estimation of extension of brain edema after GSH and GSSG intravenous administration.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out with 60 rabbits weighing 3—3.5 kg. The animals were anesthetized with Nembutal (25 mg/kg). The brain edema was induced by freezing the cerebral cortex to -60°C during 15 sec as described by Klatzo et al. (1958). The experiments were performed with the following groups of animals: group I — cold injury of brain cortex (control group); group II — cold injury and intravenous injection of GSSG; group III — cold injury and intravenous injection of GSH. Both these compounds were injected intravenously in the doses of 0.2 nmol/kg immediately after cold injury had been induced. The animals were decapitated 3, 6, 12, 24 and 48 hours after freezing and the brains were taken for morphological studies.

The vessels permeability and extension of brain edema was studied using 2 per cent Evans blue solution which was injected intravenously (2 ml/kg) just before freezing. The spread of Evans blue in the nervous tissue was determined macroscopically and in fluorescent microscope by means of the HBO-200 lamp and BG-12 (4i0G-9) filters. Black and white pictures were taken on ORWO PP-27 film.

The material for histological studies fixed in formalin or in Rossman's fluid was embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin-eosin, cresyl-violet, Heidenhain, PAS and PAS-dimedone methods.

For electron microscopic studies sections of the grey and white matter were taken from the peripheral areas of brain edema 3 and 6 hrs after cold injury. Sections were fixed in 5 per cent glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4), then postfixed in 2 per cent OsO_4 in Millonig's buffer (pH 7.4). Material was embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained in saturated uranyl acetate solution at 37°C for 45 min and then with Reynolds reagent at room temperature for 15 min. Pictures were taken in a JEM — 7A electron microscope on ORWO E 42 plates.

RESULTS

In the first group, 3 hours after cold injury had been performed, Evans blue extravasation in the cortical lesion and subcortical white matter was found. Blue staining progressively extended in 6, 12, 24 hrs reaching maximal area in the 48th hour and occupied mostly the white matter of adjacent gyri, centrum semiovale and corpus callosum.

In animals of the second group with intravenous injection of GSSG both the lesion of cortex and area of brain edema marked by Evans

blue were larger than in the control group. A different picture was observed in the third group with GSH injected. In each period of time after inducing edema the cortical lesion and area of brain edema were smaller than those in the control and GSSG groups.

Fluorescence microscopic study permitted to distinguish two separate areas: the area of the direct BBB damage and the field of brain edema. The area of BBB damage occupied cortical lesion and the adjacent white matter. In this area red fluorescence in walls of different types of cerebral vessels and in the tissue around them was observed. Diffused red lighting of Evans blue-albumin complex spread in the white matter without visible connection with the vessel walls. Comparison of the areas of BBB damage in all three groups showed that in GSSG group this area was larger than in others (Figs 1—5).

Local cold injury of the brain surface produced hemorrhagic necrotic foci which occupied both cerebral cortex and the subcortical white matter. The extent of hemorrhagic component in the cortical lesion was among others the factor differentiating three experimental groups. Cortical lesions were smaller in GSH group than in the control and GSSG groups, while animals treated with GSSG had larger damaged area. Light microscopy demonstrated non-specific reaction of the nervous tissue to the damage. Various forms of morphological changes in neurons and glial cells as well as separation of fibers by edematous fluid and swelling of myelin sheaths in the white matter were found in the adjacent lesion zone. In edematous white matter PAS positive fluid was accumulated. Glycogen granules in glial cells and neuropil occurred in all groups, but in GSSG group they were found already in the 6th hour of the brain edema. In the second zone of brain edema morphological changes were less pronounced. During the next 24 hrs reactive forms of glial cells appeared in the second zone surrounding the lesion.

Electron microscopic study was performed on the material from all experimental groups in the 3rd and 6th hour of brain edema. It concerned different structural elements of the nervous tissue laying on the peripheral area of edema. A common feature was the enlargement of extracellular space in the white and to a lesser degree in the grey matter. Ultrastructural changes in neurocytes and glia cells were expressed by the enlargement of endoplasmic reticulum channels, swelling of mitochondria and increased amount of free ribosomes (Figs 6, 7). The shrinking of axoplasm and dislamination of myelin sheaths were seen (Fig. 8). In the dendritic processes swelling of mitochondria dominated. Swelling of mitochondria membranes and nuclear envelopes



Fig. 1. Red fluorescence of Evans blue-albumin complex within the trabecular arteriole and capillaries of the cerebral cortex. Control rabbit. 60 X.

Ryc. 1. Czerwona fluorescencja kompleksu błękitu Evansa z albuminą w świetle tętniczki bełczkowatej i naczyńkach włosowatych kory mózgu. Królik kontrolny. Pow. 60 X

Fig. 2. The area of BBB damage spreading over cortex and white matter. The red fluorescence of Evans blue-albumin complex within and around the vessels as well as in the adjacent nervous tissues. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema. 60 X

Ryc. 2. Uszkodzenie bariery krew-mózg obejmujące korę i istotę białą mózgu. Czerwona fluorescencja kompleksu błękitu Evansa z albuminą widoczna w świetle naczyń krwionośnych oraz w otaczającej je tkance nerwowej. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu. Pow. 60 X

Fig. 3. Red fluorescence within the blood vessel and in surrounding nervous tissues within the area of BBB damage. Higher magnification from *Fig. 2.* 100 X.

Ryc. 3. Czerwona fluorescencja w świetle naczynia krwionośnego i w otaczającej go tkance nerwowej w obszarze uszkodzonej bariery krew-mózg. Fragment *ryc. 2* w większym powiększeniu. Pow. 100 X.

with their dislamination predominant in glia cells, was often noticed in GSSG group (Figs 9, 10). Serious damage of astroglia with complete destruction of cytoplasm and swelling of their processes dominated in electron microscopic pictures (Fig. 11). Additionally, ultrastructural changes in cerebral vessels from edematous area were noted. Vacuolization of cytoplasm with mitochondrial swelling occurred in endothelial cells. It was accompanied by swelling of perivascular glia processes (Figs 12, 13).

DISCUSSION

The previously published biochemical data (Rap, Wideman, 1976) showed the significant decrease of SH groups level in edematous tissue what may be related to the presented morphological results. It was shown that intravenous injection of GSH and GSSG can influence in different ways histochemical and ultrastructural changes in the nervous tissue due to BBB damage. GSH diminished the area of BBB damage and area of brain edema. It was concomittant with smaller extension of cortical lesions as compared to GSSG and control groups. The opposite results were obtained after GSSG treatment. Necrotic foci with large hemorrhagic component and areas of the BBB damage were more extensive than in control group. Accumulation of glycogen deposits in the damaged hemisphere in this group was found earlier than in the others. Additionally, the electron-microscopic study very often revealed dislamination of cellular, mitochondrial and nuclear membranes. These morphological changes led probably to larger extension of the area of the brain edema in animals treated with GSSG. The above mentioned results suggest that exogenous GSH may protect cells membranes and GSSG damage them. Discussing the biochemical (Rap, Wideman, 1976) and morphological results we would like to call attention to some mechanisms in which SH groups participate and

Fig. 4. Diffuse red fluorescence in the white matter indicating spreading of the brain edema. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 60 X.

Ryc. 4. Rozlana czerwona fluorescencja w istocie białej wskazująca na kierunek rozprzestrzeniania się obrzęku mózgu. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 60 X.

Fig. 5. Undamaged blood vessel in the area of the brain edema. Red fluorescence within and in far distance from it. High magnification from *Fig. 4.* 100 X.

Ryc. 5. Nieuszkodzone naczynie krwionośne w polu obrzęku mózgu. Czerwona fluorescencja w świetle naczynia i w odległej od niego tkance nerwowej. Fragment z *ryc. 4.* Pow. 100 X.

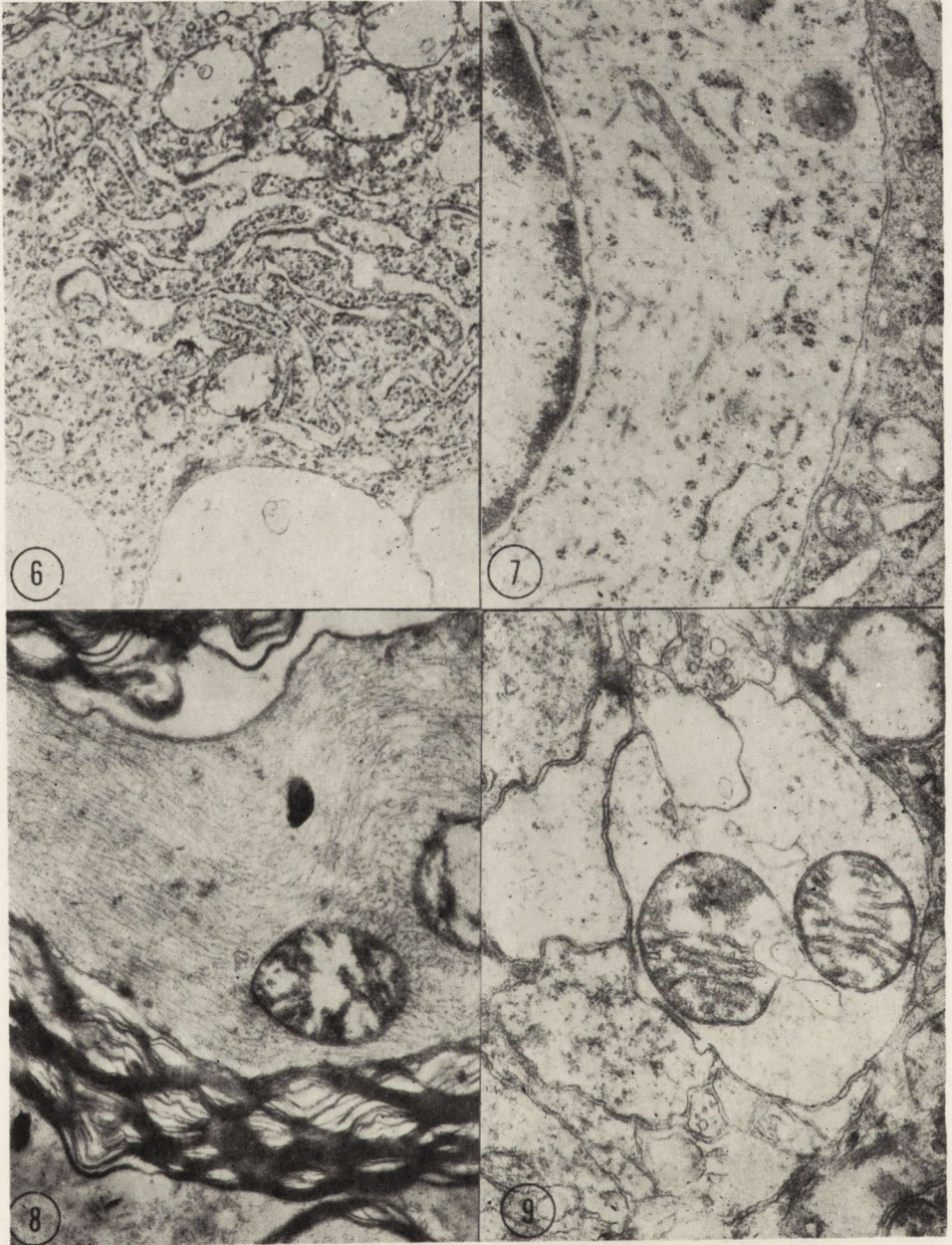


Fig. 6. Part of neuron from the area of the brain edema. Enlargement of endoplasmic reticulum channels, free ribosomes and swelling of glia processes adhering the neuron. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema. 21 700 \times .

Ryc. 6. Poszerzenie kanałów siatki endoplazmatycznej, luźno leżące rybosomy, obrzmienie mitochondriów w neuronie znajdującym się w polu obrzęku mózgu. Obrzmienie wypustek glejowych przylegających do neuronu. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu. Pow. 21 700 \times .

which are responsible for stabilizing the function and structure of the membranes. The protective action of SH group in this case results probably from neutralisation of free radicals and binding metal cations which stimulate strongly the peroxidative processes in the membranes (Martin, McIlwain, 1959; Ellman, 1959). At is has been already mentioned the amount of SH group and disulfide compounds remains in a constant balance. Any alteration of this balance which favours accumulation of disulfides causes pronounced consequences, namely the damage of the membrane structure especially in mitochondria, as it was also observed in our studies. Our experiments showed that vasogenic brain edema is characterized by a considerable decrease of SH groups which probably leads to increased level of disulfides. Therefore intravenous injection of GSSG evoked deeper pathological changes in the structure of the nervous tissue. Under different conditions, mainly in experimental anoxia, a decrease of SH group content in the nervous tissue and disturbances in enzyme mechanism regulating their level were reported (Wideman, Domańska-Janik, 1974). In vasogenic brain edema uncontrolled penetration of water, electrolites, protein and other compounds into the nervous tissue leading to the enlargement of extracellular space and physico-chemical changes in the membranes of neurocytes, glia cells and their processes were found (Bakay, Haque, 1964; Pappius, 1965; Wolman, Wiener, 1965; Kałuża, 1971; Klatzo, 1972; Szydłowska et al., 1972; Go et al., 1976; Reulen et al., 1976). Some compounds of iron and copper as well as some lipo- and proteolytic enzymes present in the edematous fluid catalize catabolic reaction in the cells membranes. As the recent studies show these changes lead to the rise of free radicals of peroxidized lipids, which in turn, cause swelling of the membranes and increase a vulnerability of the brain to development of edema (Chapman, Cronkite, 1950; Wiśniewski et al.,

Fig. 7. Part of astrocyte with enlarged endoplasmic reticulum channels, free ribosomes and marked swelling of the cell and nuclear membranes. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema. 17 200 X.

Ryc. 7. Astrocyt z poszerzonymi kanałami siatki endoplazmatycznej, luźno leżącymi ribosomami, obrzmiałymi mitochondriami oraz widocznymi rozwarstwieniami błony komórkowej i otoczki jądrowej. Pow. 17 200 X.

Fig. 8. Axon with dislamination of myelin sheaths and slightly shrunked axoplasm. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema. 50 000 X.

Ryc. 8. Akson z rozluźnionymi blaszkami osłonki mielinowej i obkurzczoną akso-plazmą. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu. Pow. 50 000 X.

Fig. 9. Glia process. Dislamination of mitochondria membrane. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 32 200 X.

Ryc. 9. Wypustka glejowa. Rozwarstwienie błony mitochondrialnej. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 32 200 X.

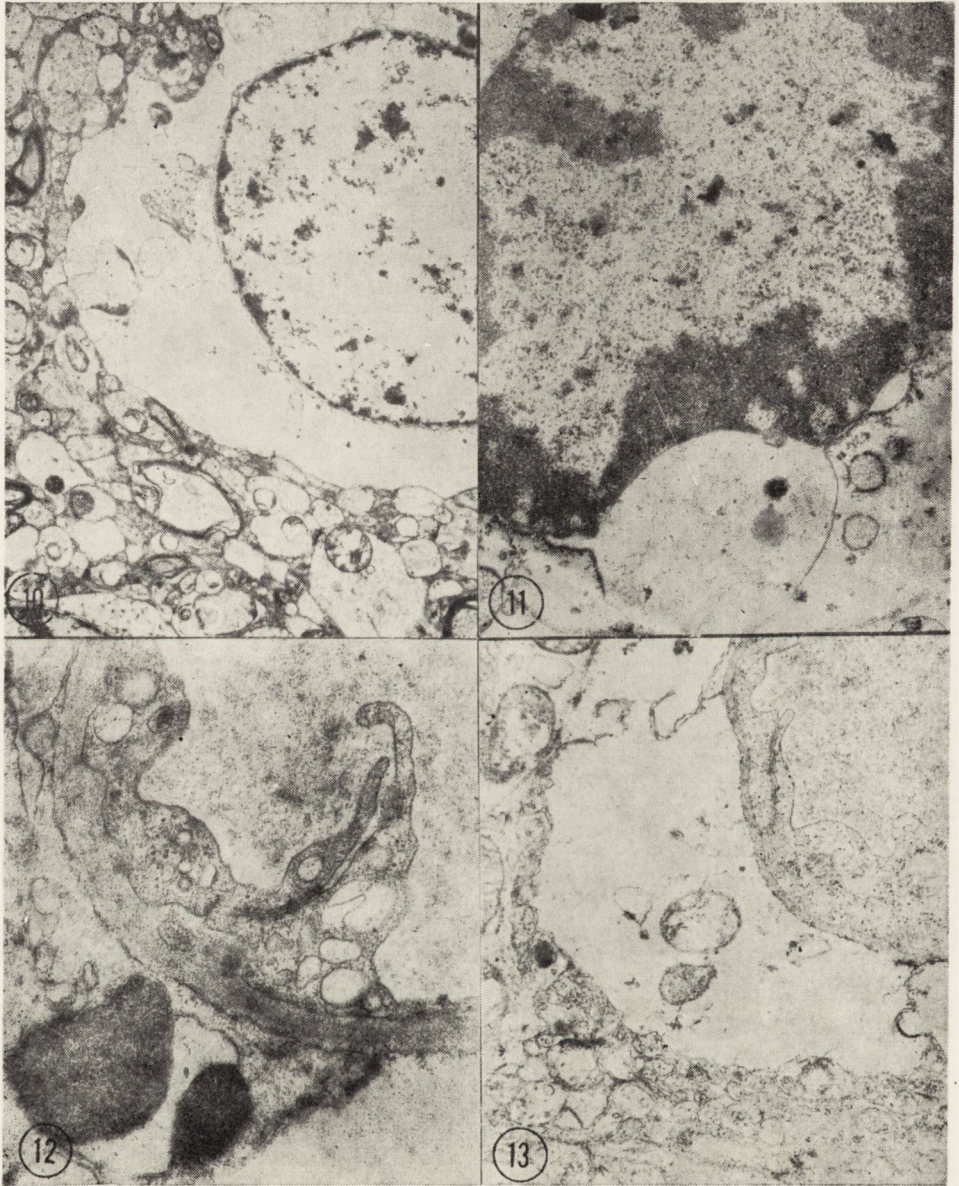


Fig. 10. Dislamination of nuclear membrane and vacuolization of the glia cell. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 29 800 X.
Ryc. 10. Rozwarstwienie otoczki jądrowej z wytworzeniem wodniczki w komórce glejowej. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 29 800 X.

Fig. 11. Swelling of astrocyte with vacuolization of cytoplasm. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 12 700 X.

Ryc. 11. Obrzmienie astrocytu z całkowitą dezintegracją cytoplazmy. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 12 700 X.

1966; Demopoulos et al., 1972; Ortega et al., 1972). Assuming that the spread of a brain edema depends, among others, on the damage of the membranes system of structural elements of the nervous tissue it may be suggested that antioxidative processes may be involved in it. Indirect studies with so called postdecapitative ischemia demonstrated the increase of lipids peroxides in the microsomal fraction of the nervous tissue *in vitro* (Strosznajder, Dąbrowiecki, 1975). More convincing evidence was found in experiments on vasogenic brain edema induced by cold injury when the increase of free radicals in the nervous tissue was accompanied by a decrease of lipids antioxidants (Rap, Dąbrowiecki, 1979). An additional arguments for the failure of antioxidative mechanism as a reason of damaging the membranes of the nervous tissue are the results obtained during the treatment of brain edema with the so-called antioxidants. Antioxidant properties are displayed among others by GSH and therefore GSH could slow down the development of brain edema in these experiments.

Summarizing, it could be suggested that disturbances in the balance between thiol and disulfides might be connected with the damage of CNS membranes as demonstrated by morphological changes. In consequence these disturbances might be important in dynamics of development of vasogenic brain edema.

Z. M. Rap, J. Wideman

WPLYW ZREDUKOWANEGO I UTLENIONEGO GLUTATIONU
NA POWSTAWANIE ZMIAN STRUKTURALNYCH W TKANCE NERWOWEJ
W NACZYNIOPPOCHODNYM OBRZĘKU MÓZGU

Streszczenie

W przebiegu doświadczalnie wywołanego naczyniopochodnego obrzęku mózgu stwierdzono 10—20% spadek poziomu grup sulfhydrylowych (SH) w tkance nerwowej. Dożylnie podanie zredukowanego glutationu (GSH) zmniejszyło dynamikę narastania obrzęku mózgu, natomiast podanie utlenionego glutationu (GSSG)

Fig. 12. Part of the blood vessel. Swelling of mitochondria and numerous vacuoles in the endothelium cell. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 26 400 X.

Ryc. 12. Obrzmiałe mitochondria oraz liczne wodniczki w cytoplazmie komórki śródbłonka. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 26 400 X.

Fig. 13. Swelling of glia feet around the vessel. Rabbit 6 hrs after inducing brain edema and GSSG administration. 21 200 X.

Ryc. 13. Obrzmienie wypustek glejowych wokół naczynia krwionośnego. Królik w 6 godz. po wywołaniu obrzęku mózgu i podaniu GSSG. Pow. 21 200 X.

zwiększyło jego dynamikę. Badania w mikroskopie świetlnym wykazały, że ogniska uszkodzeń wywołane zamrożeniem kory mózgu u zwierząt z uprzednio podanym GSSG były znacznie większe niż u zwierząt w grupie kontrolnej i po podaniu GSH. Pozostawały one w ścisłym związku ze stopniem uszkodzenia bariery krew-mózg i dynamiką narastania obrzęku mózgu. Zmiany o charakterze obrzmienia lub obrzęku cytoplazmy astrogleju oraz ich wypustek dominowały w badaniach elektronowo-mikroskopowych, a rozwarstwienia błon komórkowych, mitochondrialnych i otoczek jądrowych uzupełniały obraz zmian ultrastrukturalnych w uszkodzonej półkuli mózgu. Wymienione zmiany strukturalne były bardziej nasilone u zwierząt po podaniu GSSG.

Zaobserwowane różnice w rozległości uszkodzeń mózgu u zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych prawdopodobnie należy wiązać z różnym stopniem uszkodzenia „systemu błon” wszystkich elementów strukturalnych tkanki nerwowej. Zachwianie równowagi między związkami sulfhydrylowymi (SH) a dwusiarczkowymi (—SS—), może wywierać niekorzystny wpływ na strukturę i funkcję błon. Zwiększenie poziomu dwusiarczków (GSSG) prowadzić może do ich uszkodzenia, podczas gdy związki sulfhydrylowe (GSH) spełniają rolę ochronną, stabilizując funkcję błon komórkowych.

З. М. Рап, Я. Видеман

ВЛИЯНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО И ОКИСЛЕННОГО ГЛЮТАТИОНА НА ОБРАЗОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В НЕРВНОЙ ТКАНИ В ОТЕКЕ МОЗГА СОСУДИСТОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Резюме

В экспериментально вызванном отеке мозга сосудистого происхождения обнаруживали 10—20% падение уровня сульфгидрильных групп (СГ) в нервной ткани. Внутривенное введение восстановленного глутатиона (ГСГ) уменьшало динамику возникновения отека мозга, в то время когда подача окисленного глутатиона (ГССГ) увеличивало ее. Исследования в световом микроскопе показали, что фокусы повреждений, вызванные замораживанием коры мозга у животных, которым предварительно вводили ГССГ были значительно больше чем в контрольной группе и после подачи ГСГ. Находились они в тесной связи со степенью повреждения барьера кровь-мозг и динамикой возникновения отека мозга. Изменения типа набухания или отека цитоплазмы астроглии и их отростков преобладали в электронномикроскопических исследованиях. Расслоения клеточных, митохондриальных и ядерных оболочек дополняли картину ультраструктурных изменений в поврежденном полушарии мозга. Перечисленные структурные изменения были более выраженные у животных после подачи ГССГ.

Наблюдаемые разницы в объеме повреждений мозга у животных в отдельных опытных группах следует вероятно связывать с разной степенью повреждения „системы оболочек” всех структурных элементов нервной ткани. Нарушение равновесия между сульфгидрильными (—СГ—) и дисульфидными (—СС—) группами может вызывать неблагоприятное влияние на структуру и функцию оболочек. Увеличение уровня дисульфидов (ГССГ) может вести к их повреждению, в то время когда сульфгидрильные соединения (ГСГ) исполняют охранительную роль стабилизируя функцию клеточных оболочек.

REFERENCES

1. Baba L., Lee E., Matsuda T., Kihara T., Iwata H.: Reversible inhibition of adenylate cyclase activity of rat brain caudate nucleus by oxidized glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1978, 35, 1204—1210.
2. Bakay L., Haque I.: Morphological and chemical studies in cerebral edema. I. Cold-induced edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1964, 23, 393—418.
3. Barron E. S. G.: Thiol groups of biological importance. *Adv. Protein Chem.* 1951, 11, 201—266.
4. Chapman W. H., Cronkite E. P.: Further studies on the beneficial effect of glutathione on X-irradiated mice. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1950, 75, 318—322.
5. Demopoulos H. B., Milvy P., Karkari S., Ranshoff J.: Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema. In: *Steroids and Brain Edema*. Eds. J. J. Reulen, K. Schurmann. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1972, 29—39.
6. Ellman G. L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70—77.
7. Hope D. B.: Thiol and radiation damage. *Biochem. Soc. Symposia.* 1959, 17, 93—114.
8. Go K. G., Woudenberg F., Beekhus H., Schut T., Doorenbos H.: The effect of cortisone on cold-induced edema in the rat brain. *Neurochir.* 1971, 14, 232—240.
9. Jocelyn P. C.: *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London 1972.
10. Kałuza J.: Experimental brain edema. Comparison of the brain wound and cryogenic necrosis. *Acta Med. Pol.* 1971, 4, 487—502.
11. Klatzo I., Piraux A., Laskowski E. J.: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1958, 17, 548—564.
12. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of brain edema. In: *Steroids and Brain Edema*. Eds. H. J. Reulen, K. Schurmann. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1972, 1—8.
13. Martin H., McIlwain H.: Glutathione oxidized and reduced in the brain and in isolated cerebral tissue. *Biochem. J.* 1959, 71, 275—280.
14. Orłowski M., Karkowsky A.: Glutathione metabolism and some possible function of glutathione in the nervous system. In: *International Review of Neurobiology*. Eds. C. C. Pfeiffer, J. R. Smythies, Academic Press, New York, San Francisco, London 1976, 75—121.
15. Ortega B., Demopoulos H. B., Ranshoff J.: Effects of antioxidants on experimental brain edema. In: *Steroids and Brain Edema*. Eds. H. J. Reulen, K. Schurmann, Springer-Verlag, New York, Heidelberg. Berlin 1972, 167—176.
16. Pappius H. M.: The distribution of water in brain tissues swollen in vitro and in vivo. *Progr. Brain Res.* 1965, 15, 135—154.
17. Rap Z. M., Wideman J.: Changes in the sulfhydryl group level and influence of exogenous glutathione on dynamics of vasogenic brain edema. In: *Dynamics of Brain Edema*. Eds. H. Pappius, W. Feindel, Springer-Verlag. Berlin, New York, Heidelberg 1976, 164—168.

18. Rap Z. M., Dąbrowiecki Z.: The influence of Decadron phosphate on the free radical reaction in nervous tissue during development of vasogenic brain edema. 7th Int. Congr. Pharmacol., Satellite Symposium on Cerebrovascular Diseases. Reims, July, 1978, Proceedings (in press).
19. Reulen H. J., Hodjidioms A., Schurmann K.: The effect of dexamethasone on water and electrocyte content and rCBF in perifocal brain edema in man: In: Steroids and Brain Edema. Eds. H. J. Reulen, K. Schurmann. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1972, 239—252.
20. Strosznajder J., Dąbrowiecki Z.: Peroxidation of fatty acid in microsomes prepared from normal and ischemic guinea pig brain. Bull. Acad. Pol. Sci. 1975, 9, 647—653.
21. Szydłowska H., Wiśniewski H., Śmiałek M., Rap Z. M., Zalewska T.: Badania doświadczalne nad zmianą zawartości wody w mózgu kota pod wpływem rozmiękania, zamrażania i krwotoku. Neuropat. Pol. 1972, 10, 65—77.
22. Wideman J., Domańska-Janik K.: Regulation of thiols in the brain. I. Concentrations of thiols and glutathione reductase activity in different parts of the rat brain during hypoxia. Resuscitation 1974, 3, 27—36.
23. Wiśniewski H., Śmiałek M., Zalewska T., Szydłowska H., Rap Z. M.: Copper contents in brains with blood-brain barrier damaged by freezing, haemorrhage and encephalomalacia (Experimental work). Neuropat. Pol. 1966, 4, 33—51.
24. Wolman M., Wiener H.: Structure of the myelin sheath as a function of concentration of ions. Biochem. Biophys. Acta 1965, 102, 269—279.

Authors' address: Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences.
00-784 Warszawa, 3 Dworkowa str.

MARIANNA SIKORSKA

POZIOM 3',5'-CYKLICZNEGO ADENOZYNOMONOFOSFORANU
ORAZ AKTYWNOŚĆ CYKLAZY ADENYLOWEJ,
FOSFODWUESTERAZY 3',5'-CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW
I KINAZ BIAŁKOWYCH W MÓZGACH SZCZURÓW
W WARUNKACH DOŚWIADCZALNEGO ZATRUCIA
TLENKIEM WĘGLA

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

Zatrucie tlenkiem węgla, wynikające z wysokiego powinowactwa tlenu węgla do hemoglobiny, prowadzi, poza zespołem ogólnoustrojowych zaburzeń, do niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego. Przez odpowiednio dobrane warunki doświadczalne Korthals i wsp. (1973) uzyskali model, w którym zatrucie CO nie prowadziło do uszkodzenia elementów strukturalnych OUN powodowało natomiast szereg odwracalnych, krótkotrwałych zaburzeń metabolicznych, między innymi w przemianie glikogenu (Śmiałek i wsp. 1973), w poziomie nukleotydów adeninowych (Sikorska i wsp. 1974), w aktywności enzymów ciągu glikolitycznego (Sikorska, Broniszewska-Ardelt 1976) oraz w procesach biosyntezy białek (Albrecht 1973).

Spośród wielu czynników regulujących przemiany metaboliczne w mózgu, wiele uwagi w ostatnich latach poświęcono roli cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) i wykazano jego wpływ na szereg procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Stąd też przy wyjaśnianiu zaburzeń metabolicznych występujących w warunkach niedotlenienia, rola zmian w poziomie cAMP wydaje się szczególnie istotna.

Celem przedstawianej pracy jest ocena zachowania się poziomu 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu oraz aktywność enzymów związanych z jego przemianą: cyklazy adenylowej (EC 4. 6. 1. 1.), fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydów (EC 3. 1. 4. 17), i kinaz białkowych (EC 2. 7. 1. 37 — ATP: białko fosfotransferaz) w mózгах szczurów poddanych działaniu tlenu węgla.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 6-tygodniowych szczurach, rasy Wistar, obu płci, o ciężarze ciała 150—180 g. Doświadczalne zatrucie tlenkiem węgla wywoływano zgodnie z warunkami podanymi w pracy Korthalsa i wsp. (1973). Szczury umieszczano w 60-litrowej komorze doświadczalnej, przez którą przepływała mieszanina powietrza i tlenku węgla z szybkością 1 l/min. Przez okres 60 min. mieszanina zawierała ok. 1% CO, przy czym ilość tę regulowano w zależności od stanu klinicznego zwierząt. Po upływie 60 min wyłączano dopływ CO do komory, zapewniając nadal ciągły przepływ powietrza i pozostawiano w niej szczury na okres dalszych 30 min. Zwierzęta przebywały więc w komorze przez 90 min., po czym przenoszono je do warunków panujących w pomieszczeniu doświadczalnym. Śmiertelność wynosiła ok. 15—20% zwierząt.

Tabela 1. Poziom karboksyhemoglobiny we krwi szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 1. The carboxyhemoglobin level in rat blood in the conditions of experimental carbon monoxide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group	Poziom HbCO w %		HbCO level (%)
		$\bar{x} \pm \text{SEM}^*$	
Okres przebywania w komorze doświadczalnej	10 min	35,3 ± 2,5	(6)**)
	20 min	50,0 ± 2,4	(5)
	30 min	77,2 ± 4,1	(4)
Time of maintenance in the chamber	50 min	75,8 ± 1,0	(5)
	60 min	76,1 ± 1,3	(5)
	90 min	59,2 ± 2,5	(7)
Okres przeżycia po wyjęciu z komory	2,5 min	40,8 ± 4,8	(5)
	5 min	25,4 ± 1,8	(4)
	10 min	19,2 ± 3,5	(4)
Time of survival outside the chamber	1 h	8,8 ± 0,7	(4)
	2 h	3,4 ± 0,8	(4)
	4 h	1,3 ± 0,4	(3)

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

**) Liczby w nawiasach oznaczają ilość przebadanych szczurów
In parentheses — number of animals

Zawartość karboksyhemoglobiny we krwi oznaczano metodą Whiteheada i Worthingtona (1961). Tabela 1 przedstawia poziomy HbCO u szczurów w czasie ekspozycji CO i po wyjęciu zwierząt z komory doświadczalnej. Zwierzęta dekapitowano bez znieczulenia w trakcie działania CO oraz w różnym czasie po zatruciu (podanym w tabelach wyników 2 i 3). Do badań pobierano obie półkule mózgowe.

Grupę kontrolną stanowiły szczury tej samej rasy i wieku nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Oznaczanie poziomu cAMP. Głowy badanych szczurów zamrażano w ciekłym azocie natychmiast po dekapitacji. Zamrożoną tkankę mózgową homogenizowano w 6% kwasie trójchlorooctowym (TCA) (100 mg tkanki/1 ml kwasu). Homogenat wirowano przy $10.000 \times g$ przez 15 min. w temp. $+2^{\circ}C$. Nadmiar TCA w nadsączu usuwano stosując metodę ekstrakcji eterem dwuetylowym (Walton, Garren 1970). Zawartość cAMP w ekstrakcie tkankowym oznaczano przy użyciu testowego zestawu odczynników f-my Boehringer, wykorzystując opisane przez Gilmana (1970) własności naturalnego białka do tworzenia trwałych kompleksów z cAMP oraz kompetycyjność pomiędzy zimnym i gorącym cAMP o kompleksujący substrat. Tworzenie kompleksu przebiega w środowisku kwaśnym, pH 4,0, w temp. $0^{\circ}C$ w ciągu 100 min.

Mieszanina reakcyjna (200 μ l) zawierała: wyciąg tkankowy odpowiadający ok. 5 mg świeżej tkanki, bufor octanowy pH 4,0, 10 μ moli, ok. 5,3 pmola $^3H/cAMP$ (25 Ci/mmol) oraz kompleksujące białko w ilości zapewniającej możliwość oznaczania zawartości cAMP w granicach 2—20 pmoli/próbkę. Kompleks cAMP-białko izolowano na filtrach miliporowych HA 0,45 μ m i radioaktywność badanych prób mierzono w liczniku scyntylacyjnym Izocap 300.

Oznaczanie aktywności cyklazy adenylowej. Aktywność enzymu oznaczano wg metody Perkinsa i Moore'a (1971) oraz Krishny i wsp. (1968). Szczegóły dotyczące rodzaju używanych odczynników, ich stężeń oraz optymalnych warunków dla przebiegu reakcji katalizowanej przez cyklazę adenylową podano w poprzedniej pracy (Sikorska 1976).

Oznaczanie aktywności fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydów. Optymalne warunki dla oznaczania aktywności enzymu opracowano na podstawie prac Breckenridge'a i Johnstone'a (1969) oraz Cheunga (1971).

Mieszanina inkubacyjna (100 μ l) zawierała: bufor imidazol-HCl pH 7,5 — 5 μ moli, $MgCl_2$ 0,2 μ mola, albuminę — 10 μ g (V frakcja Sigma), triton X-100 10 μ g, cAMP 0,4 μ mola (sól sodowa, Sigma) oraz badany nadsącz w ilości odpowiadającej 30—100 μ g białka. Do prób ślepych dodawano zagotowany nadsącz. Mieszaninę inkubowano przez 15 min. w $30^{\circ}C$. Pierwszy etap reakcji zatrzymywano przez zagotowanie prób w łaźni wodnej (2 min.). Po ochłodzeniu do każdej próby dodawano po 20 μ g 5'-nukleotydazy (Sigma) rozpuszczonej w buforze Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 (Cheung 1967) i inkubowano je ponownie przez 15 min. w $30^{\circ}C$. Reakcję przebiegającą przy współudziale 5'-nukleotydazy zatrzymywano przez dodanie 200 μ l 10% TCA. Po usunięciu zdenaturo-

wanego białka w nadsączu oznaczano stężenie fosforanów nieorganicznych (Erler i wsp. 1967), będące wykładnikiem aktywności badanego enzymu.

Oznaczanie aktywności kinaz białkowych. Badanie aktywności kinaz białkowych wykonywano w pełnym homogenacie z mózgow szczurów. Do homogenizacji użyto bufor Tris-HCl pH 7,0 z dodatkiem 5 mM DTT (dithiotreitol — Sigma) oraz 4 mM EDTA. Metodę oznaczania aktywności kinaz opracowano na podstawie pracy Costy i wsp. (1976).

Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący (260 μ l): 15 mM bufor fosforanowy pH 6,5, 15 mM NaF, 10 mM $MgCl_2$, 0,05 mM ATP — γP^{32} (0,5 μ Ci/próbkę, f-my Amersham), 2 mM teofiliny, 0,3 mM EGTA (Sigma), 100 μ g białek histonowych (typ IIA, Sigma), 10 μ M cAMP (sól sodowa, Sigma) lub wodę w odpowiedniej ilości (w przypadku badania aktywności kinaz niezależnych od cAMP) oraz badane białko w ilości nie przekraczającej 30 μ g.

Próby inkubowano przez 5 min. w 30°C, po czym do każdej z nich dodawano po 50 μ l 0,63% albuminy (V frakcja, Sigma) i 60% TCA. Wytrącony osad zbierano na sączkach miliporowych HA 0,45 μ m, przemywając 10—15 ml 10% TCA. Radioaktywność prób mierzono w liczniku scyntylicyjnym Izocap 300.

Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951).

WYNIKI

W tabeli 2 przedstawiono wyniki dotyczące poziomu cAMP oraz aktywności cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy.

3',5'-cykliczny adenozynomonofosforan (cAMP). W porównaniu z zawartością cAMP w mózгах zwierząt kontrolnych stwierdzono ponad dwukrotny wzrost poziomu cAMP w mózгах szczurów badanych po 20 min. przebywania w atmosferze CO, oraz ok. 40% spadek poziomu nukleotydu w mózгах badanych po 60 min. działania CO. W pozostałych badanych przedziałach czasu nie obserwowano istotnych zmian w zawartości cAMP.

Cyklaza adenylowa. Aktywność cyklazy adenylowej wyrażano w % wartości kontrolnych oznaczanych równoległe do każdego doświadczenia. Po 30-min ekspozycji CO aktywność cyklazy w mózгах szczurów wzrastała ok. 2,5-krotnie, natomiast po 60 min. ekspozycji ok. 8-krotnie w porównaniu z kontrolą. Aktywność enzymu nie zmieniała się w znaczący sposób w mózгах zwierząt przebywających w komorze doświadczalnej przez okres 90 min., a także badanych po przeżyciu 2, 4 i 24 godzin od zatrucia.

Tabela 2. Poziom cAMP oraz aktywność cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy 3', 5'-cyklicznych nukleotydów w mózгах szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 2. The cAMP level and the adenylate cyclase and 3', 5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase activities in the brains of rats in the conditions of experimental carbon monoxide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group		cAMP		cyklaza adenylowa		fosfodwuesteraza			
		p mole cAMP/mg świeżej tkanki p moles cAMP/mg fresh tissue		% kontroli adenylate cyclase % control		nmoles P nieorg./mg białka/min phosphodiesterase nmoles P inorg./mg protein/min			
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$		p	
Kontrola — Control		2,71 ± 0,16	(16)	100		20,3 ± 1,0			
Okres przebywania w komorze doświadczalnej	20 min	5,79 ± 1,12	(8)	0,0009					
	30 min				258,6 ± 43,2	(5)	23,3 ± 0,4	(4)	0,150
	60 min	1,84 ± 0,07	(7)	0,001	817,1 ± 148,0	(4)	20,7 ± 1,7	(5)	0,891
Time of maintenance in the chamber	90 min	2,49 ± 0,35	(5)	0,530	110,1 ± 48,7	(4)	19,4 ± 2,0	(4)	0,649
Okres przeżycia po wyjęciu z komory	1 h	2,17 ± 0,08	(5)	0,082			28,4 ± 1,0	(6)	0,0005
	2 h	3,25 ± 0,35	(5)	0,130	85,3 ± 20,1	(5)	21,7 ± 0,7	(4)	0,397
	4 h	2,94 ± 0,10	(5)	0,433	128,9 ± 32,5	(4)	19,7 ± 1,4	(4)	0,666
Time of survival outside of the chamber	6 h						20,7 ± 2,0	(4)	0,858
	24 h				71,0 ± 32,5	(5)			

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej

— arithmetic mean ± mean error of the mean

p — prawdopodobieństwo wg testu Studenta

— probability according to Student's test

Liczby w nawiasach oznaczają ilość przebadanych zwierząt

In parentheses — number of animals

Tabela 3. Aktywność kinaz białkowych w mózgach szesurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 3. The activity of protein kinases in the brains of rats in the conditions of experimental carbon monoxide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group		nmole ATP/mg białka/min		nmoles ATP/mg protein/min		n
		cAMP-zależne	cAMP- zależ- ny	cAMP niezależne	cAMP inde- pendent	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	
Kontrola	Control	3,57 ± 0,25		1,92 ± 0,27		8
Okres przebywania w komorze	20 min	1,85 ± 0,11	0,0006	0,78 ± 0,04	0,0004	5
	60 min	1,90 ± 0,19	0,0002	0,96 ± 0,08	0,0002	6
	90 min	2,55 ± 0,22	0,014	1,00 ± 0,13	0,001	5
Okres przeżycia po wy- jściu z komory	1 h	4,63 ± 0,50	0,055	2,04 ± 0,25	0,102	5
	2 h	4,72 ± 0,66	0,069	2,27 ± 0,14	0,153	4
	4 h	3,71 ± 0,40	0,762	1,91 ± 0,03	0,981	4
	24 h	3,16 ± 0,30	0,345	1,53 ± 0,24	0,394	4

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej

— arithmetic mean ± mean error of the mean

p — prawdopodobieństwo wg testu Studenta

— probability according to Student's test

n — ilość przebadanych zwierząt

— number of animals

Fosfodwuesteraza 3',5'-cyklicznych nukleotydów. Zgodnie z wynikami przedstawionymi w tabeli 2 jedynie w mózgach zwierząt badanych po upływie 1 godz. od wyjęcia z komory doświadczalnej stwierdzono znamiennej statystycznie (ok. 30%) wzrost aktywności fosfodwuesterazy. W okresie bezpośredniego działania CO na szczury, jak również po przeżyciu dłuższym niż 1 godz. od zatrucia, aktywność enzymu nie ulegała znaczącym zmianom.

Kinazy białkowe. W przypadku kinaz zależnych od cAMP stwierdzono znaczny, ok. 50% spadek aktywności w mózgach szczurów badanych po 20 i 60 min. działania CO. Również po 90 min. przebywania zwierząt w komorze doświadczalnej aktywność kinaz cAMP-zależnych była niższa niż w kontroli, ale już tylko o ok. 30% (Tabela 3).

W pozostałych badanych przedziałach czasu nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnic w aktywności tych enzymów. Aktywność kinaz białkowych niezależnych od cAMP zachowywała się podobnie. W porównaniu z kontrolą, znamiennej statystycznie spadek aktywności enzymów o ok. 60% stwierdzono po 20 min. działania CO i o ok. 50% po 60 i 90 min. Po upływie 1 godz. od wyjęcia z komory doświadczalnej aktywność kinaz niezależnych od cAMP nie różniła się od kontroli, podobnie jak po 2, 4 i 24 godz. od zatrucia.

OMÓWIENIE

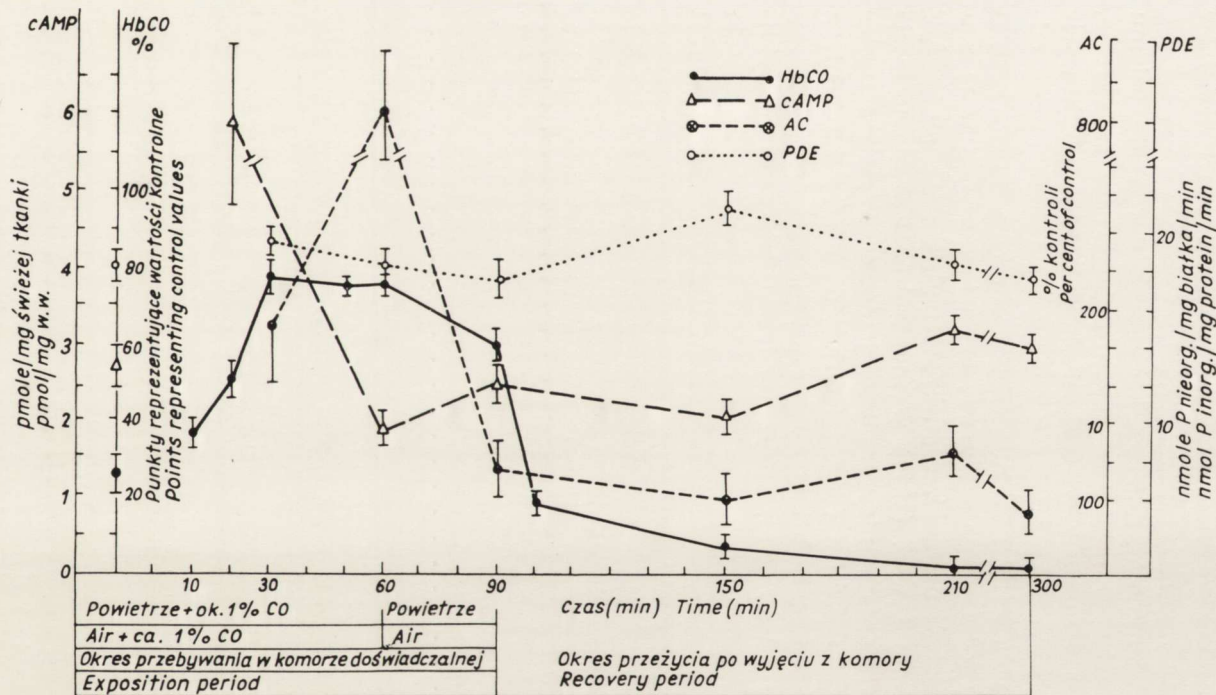
Na wykresie 1 przedstawiono graficznie zmiany w poziomie cAMP, w aktywności cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy w mózгах oraz krzywą zawartości karboksyhemoglobiny (HbCO) we krwi szczurów poddanych działaniu CO.

Z przedstawionych danych wynika, że krótkotrwały wzrost poziomu cAMP w mózгах zwierząt doświadczalnych pojawia się w okresie, w którym zawartość HbCO we krwi wynosi ok. 50%, co z punktu widzenia klinicznego odpowiada pojawianiu się pierwszych zaburzeń oddechowych i ruchowych. Przy poziomie HbCO ok. 75%, prowadzącym do krytycznego stanu klinicznego szczurów, zawartość cAMP w mózgu spada poniżej wartości kontrolnej. Podobny spadek poziomu cAMP stwierdzili także Flamm i wsp. (1977) w mózгах kotów po upływie 3 i 24 godz. od podwiązania tętnicy środkowej mózgu. W miarę postępującej dysocjacji HbCO poziom cAMP powraca do normy i nie ulega istotnym zmianom w pozostałych badanych czasach.

Aktywność cyklazy adenylowej, enzymu odpowiedzialnego za cyklizację ATP, a więc warunkującego poziom cAMP w tkance, wzrastała ponad dwukrotnie w okresie, w którym poziom HbCO we krwi osiągał wartości 60—75%. Zmiany aktywności tego enzymu znacznie się nasilały w miarę pogarszania się stanu klinicznego zwierząt i w okresie krytycznym, tj. w 60 min. działania CO na szczury, obserwowano największy ok. 8-krotny wzrost aktywności enzymu. Wraz z odtwarzaniem się oksyhemoglobiny we krwi aktywność enzymu powracała do normy.

Aktywność fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydów nie ulegała istotnym zmianom w okresie bezpośredniego działania CO na szczury. Nieznaczny wzrost stwierdzono jedynie po upływie 1 godz. od zatrucia.

Reasumując omówione wyniki można przypuszczać, że zwiększona aktywność cyklazy adenylowej, przy braku zmian w aktywności fosfodwuesterazy jest czynnikiem bezpośrednio warunkującym wzrost poziomu cAMP w tkance mózgowej, obserwowany w okresie pierwszych 20 min. działania CO. Zaskakujące natomiast jest zachowanie się poziomu cAMP i aktywności cyklazy w późniejszym okresie (60 min.). Pogłębiającemu się niedotlenieniu towarzyszył spadek poziomu cAMP i wybitny wzrost aktywności cyklazy adenylowej. Być może wyjaśnienia tych faktów należy szukać w stwierdzonej przez Greengarda i wsp. (1969) odwracalności reakcji cyklizacji ATP. Wymienieni autorzy wykazali, że cAMP może być donorem reszt adenylowych i przy katalitycznym współdziałaniu cyklazy resyntetyzować ATP. Omówione wyżej zachowanie się poziomu cAMP i aktywności cyklazy sugeruje możliwość takiego przebiegu reakcji w tkance nerwowej w stosowanych warun-



Wykres 1. Poziom 3',5'-cyklicznego adenzynomonofosforanu, aktywność cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydwów w mózgu oraz zawartość karboksyhemoglobiny w krwi szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla.

Diagram 1. The level of cyclic 3',5'-adenosinemonophosphate, activity of adenylyl cyclase and cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in the brain and the content of carboxyhemobiny we krwi szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia carbon monoxide intoxication.

kach doświadczalnych. Reakcja ta nie może stanowić oczywiście głównego źródła resyntezy ATP, ale mogłaby stanowić istotny element dla podtrzymania przebiegu niektórych procesów metabolicznych w krytycznych dla komórki warunkach. Na możliwość wykorzystywania do resyntezy ATP w warunkach niedotlenienia innych źródeł niż fosforylacja oksydacyjna, wskazują wyniki prac dotyczących poziomu nukleotydów adeninowych w tym samym modelu doświadczalnym (Sikorska i wsp. 1974) oraz w modelu hipoksyjnym (Broniszewska-Ardelt, Sikorska 1979). W warunkach obu wymienionych modeli spadek poziomu ATP w mózgu był krótkotrwały, po czym, mimo pogłębiającego się niedotlenienia poziom nukleotydu osiągał lub nawet przekraczał wartości kontrolne.

Mechanizm stymulacji cyklazy adenylowej obserwowany po niedotlenieniu nie jest znany, trudno jest więc w sposób jednoznaczny zinterpretować wzrost aktywności enzymu w stosowanych warunkach doświadczalnych. Do najlepiej poznanych czynników aktywujących ten enzym należą aminy biogenne, a zwłaszcza katecholaminy (Robinson i wsp. 1967). W następstwie niedotlenienia poziom amin biogennych ulega zwykle obniżeniu (Brown i wsp. 1974, Szumańska i wsp. 1976), trudno jest łączyć wzrost aktywności cyklazy adenylowej, pojawiający się w trakcie działania CO, ze zmianami stężeń amin biogennych.

Brostrom i wsp. (1975) wykazali w mózgach szczurów obecność endogennego, termostabilnego białka charakteryzującego się zdolnością do wiązania jonów Ca^{+2} i w postaci kompleksu wapń : białko, stymulującego aktywność cyklazy adenylowej. Wymienieni autorzy podkreślają zwłaszcza regulacyjną rolę jonów Ca^{+2} , których wewnątrzkomórkowe zmiany stężeń stanowić mogą jeden z czynników warunkujących zmiany w metabolizmie cAMP w warunkach niedotlenienia.

Inna możliwość regulacji aktywności cyklazy adenylowej może wynikać z budowy cząsteczki enzymu, postulowanej przez Najjara i Constantopoulou (1973). Wymienieni autorzy przytaczają szereg dowodów wskazujących, że enzym ten istnieje w dwóch formach: nieaktywnej ufosforylowanej i aktywnej — zdefosforylowanej. Postulują również możliwość bezpośredniej defosforylacji nieaktywnej cyklazy na drodze reakcji chemicznej o charakterze nukleofilowym. Funkcję akceptora reszty fosforanowej mogą, między innymi, spełniać hormony tkankowe, co pozwala wyjaśnić zdolność cyklazy adenylowej do gwałtownych zmian aktywności obserwowanych także w różnych układach *in vitro* (Robinson i wsp. 1967).

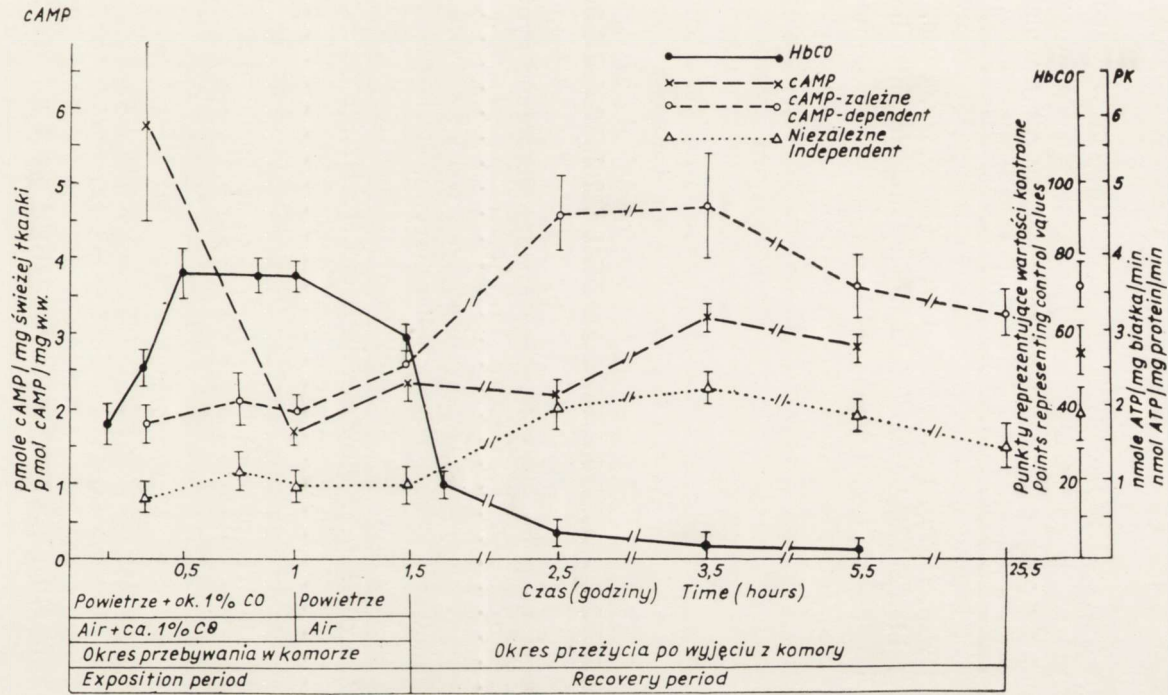
Fosfodwuesteraza 3',5'-cyklicznych nukleotydów, drugi enzym związany bezpośrednio z przemianą cAMP, okazał się mało wrażliwy na stosowane warunki doświadczalne. Może to wynikać z jego wewnątrz-

komórkowej lokalizacji. Fosfodwuesteraza jest enzymem cytoplazmatycznym, związanym głównie z frakcją mikrosomalną (Weiss, Costa 1968), natomiast niedostatek tlenowy jest czynnikiem działającym przede wszystkim na struktury błonowe, stąd też enzymy zlokalizowane na błonach komórkowych są szczególnie wrażliwe na niedotlenienie. W warunkach niedokrwienia mózgu u chomików mongolskich Schwartz i wsp. (1976) obserwowali zmiany aktywności enzymów błonowych takich jak: cyklaza adenylova, Na, K-ATP-aza, cAMP-zależne kinazy białkowe, natomiast aktywność fosfodwuesterazy nie ulegała zmianie pomimo znacznego wzrostu poziomu cAMP (Watanabe, Ishii 1976).

Stwierdzony brak zmian aktywności tego enzymu w warunkach niedotlenienia mózgu mógł jednak być pozorny i wynikać z niemożności ujawnienia mechanizmu aktywacji w układzie doświadczalnym *in vitro*: fosfodwuesteraza staje się aktywna po utworzeniu kompleksu z naturalnie występującym aktywatorem białkowym, przy czym wewnątrzkomórkowa lokalizacja obu elementów stanowiących aktywny enzym jest różna (Kakiuchi, Yamazaki 1970; Cheung 1971; Miki, Yoshida 1971). Taka budowa enzymu stwarza możliwość regulacji jego aktywności, ale zmian tych nie można wykazać w badaniach *in vitro*. Nie dysponujemy dotychczas żadnymi informacjami wskazującymi na zachowanie się aktywatora fosfodwuesterazy w warunkach patologicznych. Wiadomo jedynie, że jego komponenta białkowa i komponenta białkowa aktywatora cyklazy adenylowej są identyczne (Brostrom i wsp. 1975). Ustalenie, w jakim stopniu własności tego białka warunkują zmiany w aktywności obu enzymów metabolizujących cAMP w zatruciu CO jest niemożliwe, ani na podstawie uzyskanych wyników, ani też w oparciu o aktualnie dostępne informacje.

Na wykresie 2 porównano zmiany w aktywności kinaz białkowych z poziomem cAMP w mózgach szczurów, oraz odniesiono je do zawartości HbCO we krwi. W początkowym okresie działania CO na szczury, mimo znacznego wzrostu poziomu cAMP, obserwowano wyraźne zahamowanie aktywności kinaz białkowych zależnych od cAMP. Spadek aktywności enzymów utrzymywał się przez cały okres przebywania zwierząt w atmosferze CO, a więc przez okres odpowiadający zwiększonej zawartości HbCO we krwi. Normalizacja aktywności badanych kinaz rozpoczyna się właściwie w okresie ostatnich 30 min. przebywania w komorze doświadczalnej, tzn. po wyłączeniu dopływu CO. Spadek aktywności enzymów stwierdzony po 90 min. był mniejszy niż po 60 min. działania CO. Poziom cAMP w tym okresie ulegał obniżeniu.

Zgodnie z przyjętymi poglądami, kinazy białkowe zależne od cAMP występują w postaci kompleksów enzym: inhibitor białkowy, a ich działalność enzymatyczna ujawnia się dopiero po odłączeniu inhibitora lub



Wykres 2. Poziom 3',5'-cyklicznego adenozymonofosforanu i aktywność kinaz białkowych w mózgu oraz poziom karbonyhemoglobiny we krwi szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla.

Diagram 2. The level of cyclic 3',5'-adenosinemonophosphate and the activity of protein kinases in the brain and the content of carboxyhemoglobin in the blood of rats under conditions of experimental carbon monoxide intoxication.

po zmianie jego własności pod wpływem cAMP (Greengard i wsp. 1969). Można by więc sądzić, że stwierdzony w warunkach zatrucia CO spadek poziomu cAMP w mózгах szczurów jest związany z wzajemnym oddziaływaniem nukleotydu z kinazami białkowymi. Przeciwko takiej interpretacji przemawia jednak pełna równoległość zmian aktywności kinaz zależnych i niezależnych od cAMP (Wykres 2).

Przyczyny zmian aktywności badanych kinaz białkowych w warunkach zatrucia CO nie są znane. Porównanie tych zmian z krzywą zawartości HbCO pozwala przypuszczać, że zmiany te są wynikiem działania czynników wyzwalanych nie tylko przez niedotlenienie, ale również bezpośredniego toksycznego działania CO na błony komórkowe. Badania Chance'a i wsp. (1970), Estabrooka i wsp. (1970) wykazują, że CO przenika przez błony komórkowe, zaburzając funkcje mitochondriów, oddziałując na siatkę endoplazmatyczną, a w szczególności na procesy utleniania zachodzące w mikrosomach. Można więc przypuszczać, że tlenek węgla przenikający do tkanki nerwowej, działając na struktury błonowe elementów komórkowych, wpływa również na aktywność kinaz białkowych zaliczanych do enzymów błonowych.

Zahamowanie aktywności kinaz białkowych, stwierdzone po zatruciu CO, może warunkować szereg innych zaburzeń metabolicznych, występujących w mózгах szczurów w tych samych warunkach doświadczalnych (Albrecht 1973; Sikorska, Broniszewska-Ardelt 1976). Wśród kinaz zależnych od cAMP znajdują się także kinazy regulujące aktywność dwu kluczowych enzymów związanych z przemianą glikogenu: syntetazy i fosforylazy glikogenowej. Spadek aktywności cAMP-zależnych kinaz może być jednym z czynników warunkujących wzrost aktywności syntetazy glikogenowej i poziomu tego polisacharydu, stwierdzanych przez Śmiałka i wsp. (1973) w takich samych warunkach doświadczalnych. Reasumując wyniki przedstawionych badań można przyjąć, że zmiany w metabolizmie cAMP warunkują szeroki wachlarz zmian metabolicznych w mózgu.

Serdecznie dziękuję Pani *Teresie Pańkowskiej* za pomoc techniczną przy wykonywaniu niniejszej pracy.

М. Сикорска

УРОВЕНЬ 3',5'-ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФOSФАТА
И АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛОВОЙ ЦИКЛАЗЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ
3',5'-ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И КИНАЗ БЕЛКА В МОЗГАХ КРЫС
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОТРАВЛЕНИЯ ОКИСЬЮ УГЛЯ

Резюме

Острое отравление крыс окисью углерода вело к больше чем 2-кратному увеличению уровня 3',5'-циклического АМФ (цАМФ) в мозге в 20 минуте экспозиции на окись углерода, затем в 60 (последней) минуте экспозиции наблю-

далось падение содержания этого нуклеотида ниже контрольной величины. Возвращение к контрольному уровню имело место на 30 минуту после прекращения экспозиции. Активность адениловой циклазы увеличивалась постепенно во время экспозиции достигая по 20 минутам 2,5 раза высшего чем контрольный уровень, а спустя 60 минут — превышала контрольный уровень даже в 8 раз. После прекращения экспозиции имело место быстрое снижение активности энзима. Фосфодиэстераза 3',5'-циклических нуклеотидов оказалась относительно нечувствительной на действие окиси углерода. Экспозиция на окись углерода сопровождалась кроме того снижением активности киназ белков — так зависящих как и независимых от цАМФ.

Полученные результаты указывают на большую чувствительность метаболизма цАМФ мозга на отравление окисью углерода. Выяснение отличий в динамике изменений в уровне нуклеотида и энзимов обуславливающих его уровень требует дальнейших исследований. Полагается, что изменения в метаболизме цАМФ лежат в основе широкого веера раньше наблюдаемых метаболических последствий отравления окисью углерода.

M. Sikorska

THE LEVEL OF CYCLIC 3',5'-ADENOSINEMONOPHOSPHATE
AND THE ACTIVITY OF ADENYLATE CYCLASE,
CYCLIC 3',5'-NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE AND PROTEIN KINASES
IN RAT BRAINS UNDER EXPERIMENTAL CARBON
MONOXIDE INTOXICATION

Summary

Acute carbon monoxide intoxication led to an over two-fold increase of cyclic 3',5'-AMP (cAMP) level in the brain after 20 min of exposition to carbon monoxide. On the 60th (last) min of exposition the lowering of this nucleotide content below the control value was observed, followed by return to the control level after 30 min of recovery. The activity of adenylate cyclase was characterized by a gradual increase during exposition to CO, reaching in 20 min. 2.5 times and after 60 min 8 times the control value. During recovery the activity of this enzyme returned rapidly to the control values. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase remained virtually insensitive to carbon monoxide action. The exposition to carbon monoxide was moreover accompanied by the decrease of activities of protein kinases — both cAMP-dependent and independent. The obtained results indicate a great sensibility of brain cAMP metabolism to carbon monoxide intoxication, although the elucidation of the dynamics of changes in the level of the nucleotide and enzymes participating in its metabolism must await further studies. It is suggested that the changes in cAMP metabolism underlie a wide range of observed earlier metabolic consequences of carbon monoxide intoxication.

PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
2. Breckenridge B. L., Johnston R. E.: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in brain. *J. Histochem. Cytochem.* 1969, 17, 505—511.

3. Broniszewska-Ardelt B., Sikorska M.: High-energy phosphate compounds and some glycolytic substrates in the rat brain during hypoxia. *J. Neurosci. Res.* 1979, 4, 261—264.
4. Brostrom Ch. O., Huang Y. Ch., Breckenridge B. McL., Wolff D. J.: Identification of calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1975, 72, 64—68.
5. 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.
6. Chance B., Erecińska M., Wagner M.: Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1970, 174, 193—204.
7. Cheung W. Y.: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 2859—2864.
8. Cheung W. Y.: Properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase from rat brain. *Biochemistry* 1967, 6, 1079—1087.
9. Costa M., Gerner E. W., Russell D. H.: G₁ specific increases in cyclic AMP levels and protein kinase activity in chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 425, 246—255.
10. Erler W., Egger E., Schwarze H., Göthe W.: Bestimmung des anorganisch gebundenen phosphors in Serum Arzneimittel Standardisierung, Leipzig 1967, 5, 180—182.
11. Estabrook R. W., Franklin M. R., Hildebrandt A. G.: Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on cytochrome P-450-catalyzed mixed function oxidation reactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1970, 174, 218—232.
12. Flamm E. S., Schiffer J., Viau A. T., Naftchi N. E.: Alterations of cyclic adenosine monophosphate in cerebral ischemia. *Stroke* 1977, 8, abstr. IV — 35, 9.
13. Gilman A. G.: A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1970, 67, 305—312.
14. Greengard P., Hayashi O., Colwick S. P.: Enzymatic adenylation of pyrophosphate by 3',5'-cyclic AMP: reversal of adenylyl cyclase reaction. *Fed. Proc.*, 1969, 28, 467.
15. Kakiuchi S., Yamazaki R.: Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 1970, 41, 1104—1110.
16. Korthals J., Mossakowski M. J., Smialek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczałnej encefalopatii tlenkowęglowej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 279—300.
17. Krishna G., Weiss B., Brodie B. B.: A simple, sensitive method for the assay of adenylyl cyclase. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1968, 163, 379—385.
18. Lowry O. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—270.
19. Miki N., Yoshida H.: Purification and properties of cyclic AMP phosphodiesterase from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 268, 166—174.
20. Najjar V. A., Constantopoulos A.: The activation of adenylate cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* 1973, 2, 87—93.
21. Perkins J. P., Moore M. M.: Adenylyl cyclase of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 62—68.
22. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.: Adenylyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1967, 139, 703—715.

23. Schwartz J. P., Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Passonneau J. V., Klatzo I.: Alterations of cyclic nucleotide-related enzymes and ATPase during unilateral ischemia and recirculation in gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.* 1976, 27, 101—107.
24. Sikorska M.: Aktywność cyklazy adenylowej w mózgu szczura w warunkach niedotlenienia. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 185—196.
25. Sikorska M., Broniszewska-Ardelt B.: The activity of adenylate cyclase, hexokinase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. Biol.* 1976, 24, 429—435.
26. Sikorska M., Bicz W., Śmiałek M., Mossakowski M. J.: ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 387—395.
27. Szumańska G., Sikorska M., Gadamski R.: Zachowanie się amin katecholowych w mózgu szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 23—30.
28. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Korthals J., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose : glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—231.
29. Walton G. M., Garren L. D.: An assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate based on the association of the nucleotide with a partially purified binding protein. *Biochemistry* 1970, 9, 4223—4229.
30. Watanabe H., Ishii S.: The effect of brain ischemia on the levels of cyclic AMP and glycogen metabolism in gerbil brain in vivo. *Brain Res.* 1976, 102, 385—389.
31. Weiss B., Costa E.: Regional and subcellular distribution of adenyl cyclase and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in brain and pineal gland. *Biochem. Pharmacol.* 1968, 17, 2107—2116.
32. Whitehead T. P., Worthington S.: The determination of carboxyhaemoglobin. *Clin. Chim. Acta* 1961, 1, 356—359.

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

BRAIN FUNCTION IN OLD AGE, EVALUATION OF CHANGES AND DISORDERS. Eds F. Hoffmeister, C. Müller in collaboration with H. P. Krause. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1979. str. 533. Ryc. 82.

Prezentowana czytelnikowi książka stanowi zbiór materiałów z sympozjum nt. „Funkcja mózgu w wieku starczym”, zorganizowanego w październiku 1978 r. w Grosse Ledder k/Kolonii pod auspicjami firmy Bayer. Warto nadmienić, że było to siódme z kolei sympozjum poświęcone aktualnym problemom nauk biomedycznych zorganizowane przez tę firmę w okresie ostatnich 10 lat. Sympozjum zgromadziło około 40 uczonych z USA, Kanady, Francji, Szwajcarii, Wielkiej Brytanii, Szwecji, Danii, Austrii i RFN, reprezentujących szeroki krąg specjalności od geriatricy i psychiatrii, poprzez psychologię, neuropsychologię i neurofizjologię do farmakologii, fizjologii, biochemii i patologii.

Ideą wiodącą sympozjum, rzutującą na prezentowaną na nim niezwykle bogatą i zróżnicowaną tematykę, znajdującą pełne odzwierciedlenie w przedstawionej czytelnikowi książce, była próba znalezienia możliwie najlepszych metod obiektywnej oceny zjawisk i procesów towarzyszących starzeniu się oraz ustalania ich związku zarówno z procesami toczącymi się w ośrodkowym układzie nerwowym jak i z zaburzeniami ogólnoustrojowymi, rzutującymi w sposób pośredni lub bezpośredni na czynność mózgu.

Obrazy sympozjum toczyły się w dziewięciu kolejnych sesjach, zakończonych ogólną, podsumowującą dyskusją. Temu też rygorowi podporządkowany jest układ rozdziałów książki. Dotyczą one w kolejności:

1. Charakterystyki zmian i zaburzeń behawioralnych w wieku starczym.
2. Próby ewaluacji zmian i zaburzeń związanych z wiekiem starczym.
3. Zagadnień uczenia się i pamięci.
4. Funkcji poznawczych.
5. Stanu emocjonalnego.
6. Oceny regionalnego mózgowego krążenia krwi.
7. Znaczenia badań eksperymentalnych u ludzi.
8. Znaczenia eksperymentu zwierzęcego.
9. Zagadnienia terapii zmian i zaburzeń związanych z wiekiem starczym.

Każdy z rozdziałów zawiera od 3—8 artykułów, poświęconych właściwej dla danej sesji tematyce. Artykuły mają zarówno charakter syntetyzujących przeglądów informacji w danej dziedzinie, jak i oryginalnych prac badawczych. W krótkim omówieniu nie sposób zawrzeć treści poszczególnych rozdziałów. Przykładowe przedstawienie treści jednego z nich może jednakże zorientować czytelnika w sposobie prezentacji materiału i rozległości tematyki w nim zawartej. W rozdziale poświęconym zagadnieniu mózgowego przepływu krwi w wieku starczym, znajdują się prace poświęcone wykładnikom zaburzeń czynności mózgu, stanowiących następstwa udaru mózgowego, wykrywalnych metodami oceny regionalnego przepływu krwi i techniką skomputeryzowanej tomografii osiowej, statyczno-dynamicznym aspektem mózgowego przepływu krwi w powiązaniu ze stanem czynnościowym mózgu, pomiarom regionalnego przepływu mózgowego jako wykładnika zróżnicowania czynności mózgu w ośpieniu starczym, zaburzeniom krążenia mózgowego w „fizjologicznym” starzeniu się i w ośpieniu starczym itp. Podobny układ oraz rozległość tematyczna charakteryzuje pozostałe rozdziały.

Dobór, zarówno tematów, jak i specjalistów je prezentujących stanowi gwarancję wszechstronnego i kompetentnego naświetlenia poszczególnych zagad-

ZOFIA ZALEWSKA

EFFECT OF INTOXICATION OF PREGNANT RATS WITH
RONNEL ON THE ACTIVITY OF BRAIN MITOCHONDRIAL
OXIDOREDUCTASES IN THE PROGENY*)

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

Head of Department: Prof. dr W. Bicz

Most experiments dealing with the action of organophosphorus insecticides on nervous tissue metabolism were performed with mature individuals (Sitkiewicz, Zalewska, 1975a, b; Suliński et al., 1976; Sitkiewicz et al., 1977). The results of these studies indicate that beside their antiacetylcholinesterase action, the organophosphorus compounds may disturb energetic metabolism in the mitochondria of the central nervous system (Sitkiewicz, Zalewska, 1975a, b; Sitkiewicz et al., 1979). It is also known that some organophosphorus compounds induce what is called a late neurotoxic effect associated with their strong demyelinating influence (Aldridge, Barnes, 1966a, b; Johnson, 1969, 1970, 1974). Since the early stages of ontogenetic brain development are linked with intensive myelinogenesis (Rappoport et al., 1971), it is possible that insecticides may act in a different way on developing than on mature brain. Earlier experiments suggest a relation between myelinogenesis and the development of full activity of brain mitochondrial oxidoreductases organophosphorus (Zalewska et al., 1977b; Suliński et al., 1979). To date two organophosphorus insecticides have been tested in this laboratory — Trichlorphon and Dichlorvos — derivatives of phosphonic and phosphoric acid. The present paper deals with an organothiophosphorus compound — Ronnel. This insecticide is particularly interesting because it has been demonstrated that one of its metabolites — the oxygen analogue — disturbs oxydatix phosphorylation in the mitochondria and synaptosomes of rat brain (Sitkiewicz, 1975; Sitkiewicz et al., 1979). It would seem, therefore, that Ronnel may act diffe-

*) This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences — Research Programme 10.4.2.

rently on mitochondrial enzyme development than Dichlorvos and Trichlorphon which do not disturb oxidative phosphorylation (Zalewska et al., 1977a).

MATERIAL AND METHODS

The experimental material consisted of white female rats from closed breeding randomly mated, weighing about 250 g. During the experimental period the animals were fed a standard granulated diet and received water *ad libitum*. Ronnel dissolved in edible oil was introduced into the stomach with a probe in a volume of 1 ml. For the female rats the LD₅₀ dose was assumed as equal to 2630 mg/kg body weight (Malinowski, Śledziński, 1967). The insecticide was administered to the rats beginning with day 14 of pregnancy for 7 successive days in doses amounting to 2 or 10 per cent of the LD₅₀ dose. As control served rats receiving intragastrically 1 ml of oil. The progeny of the poisoned females was sacrificed by decapitation after 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 and 56 days of life and the material was prepared for examination.

Cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities were determined in the rat brain mitochondrial fractions. These fractions were obtained by the method described by Moor and Jobsis (1970). Homogenates of the brain hemispheres were prepared in an isolation solution composed of: 0,25 M sucrose, 0,5 mM K⁺ EDTA, 10 mM Hepes, pH 7,4. The homogenate was centrifuged for 3 min. at 3 000 x g. The sediment was discarded and the supernatant was centrifuged for 3 min at 30 000 x g. The supernatant was decanted and the white fluffy layer over the sediment was thoroughly removed. The sediment was mixed with the isolation solution and the mitochondrial fraction was sedimented by centrifugation for 3 min at 30 000 x g at 4°C in a Janetzki K-70 centrifuge. The final sediment was resuspended in 1 cm³ of the isolation solution and stored in ice.

Cytochrome oxidase was determined by the spectrophotometric method (Smith, 1954) in a medium containing: 20 mM Tris/HCl buffer pH 7,4 and 125 mM KCl. Cytochrome C was reduced with Na₂S₂O₄ and desalted on 1×16 cm column filled with Sephadex G-25 fine (Yonetani, Ray, 1965). Ferrocyanochrome C was eluted from the column with a solution consisting of: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 and 1 mM EDTA. The enzyme activity was expressed as the 1-st order reaction rate constant converted to 1 mg of protein (Smith, 1955).

Succinate dehydrogenase activity was determined by the spectrophotometric method after King (1963) in a medium containing: 0,1 M phosphate buffer pH 7,4, 1,5 mM potassium cyanide, 20 mM potassium succinate, 0,05 mM 2,6-dichlorophenolindophenol and 1,8 mM phenazin

metasulphate. The number of μ moles of succinate oxidated during 1 min of enzymatic reaction by 1 mg of protein served as measure of enzyme activity. Mitochondrial protein was determined by the biuret method (Layne, 1957). Protein and the activity of both enzymes were determined immediately after solubilization with a 1 per cent sodium deoxycholate solution. Enzyme activity measurements were performed on a Specord UV-Vis (Zeiss) spectrophotometer. The results were evaluated statistically by Student's t test.

RESULTS

The changes in the cytochrome oxidase activity in the rat brain in dependence on the age of the progeny, after poisoning of pregnant mothers with Ronnel are shown in Fig. 1.

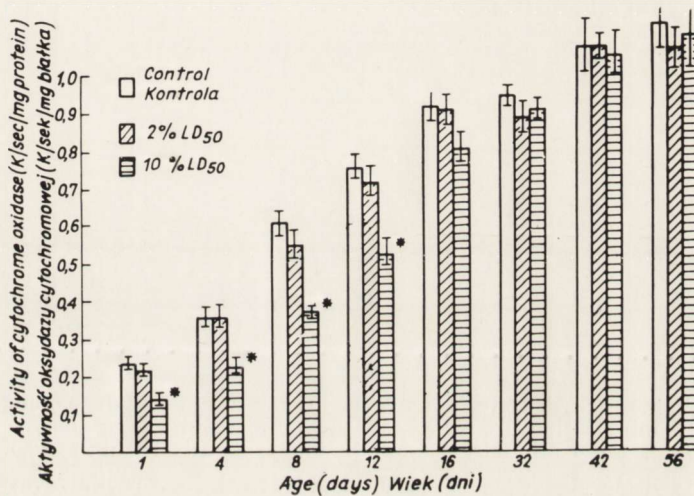


Fig. 1. Changes of cytochrome oxidase activity in the brain of developing rat following Ronnel intoxication of pregnant females. Results are shown as mean \pm S.E.M. for 6 animals. * — statistically significant at $p \leq 0,05$.

Ryc. 1. Zmiany aktywności oksydazy cytochromowej w mózgu szczura w zależności od wieku po zatruciu ciężarnych samic Ronnelem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 6 szczurów. * — znamienność statystyczna $p \leq 0,05$.

The lowest cytochrome oxidase activity in the mitochondrial fraction of the brain was noted on the 1st day of life. Thereafter the activity increased gradually reaching 300% of the initial value on the 16th day. Between day 42 and 56 the cytochrome oxidase activity was identical with that observed previously in adult rat brain (Sitkiewicz, Zalewska, 1975, a, b). In the period of the rapid increase of enzyme activity (between 1 and 12 day of life) the influence of intoxication

of pregnant females with Ronnel was pronounced. In the brain mitochondrial fraction of the progeny of the females receiving the pesticide in 2 or 10 per cent LD₅₀ doses a depression of the cytochrome oxidase activity was observed. Statistical analysis demonstrated that the differences were significant only in the case of the progeny of females intoxicated with a 10 per cent LD₅₀ dose. In the further stages of development the cytochrome oxidase activity was similar to that in the controls.

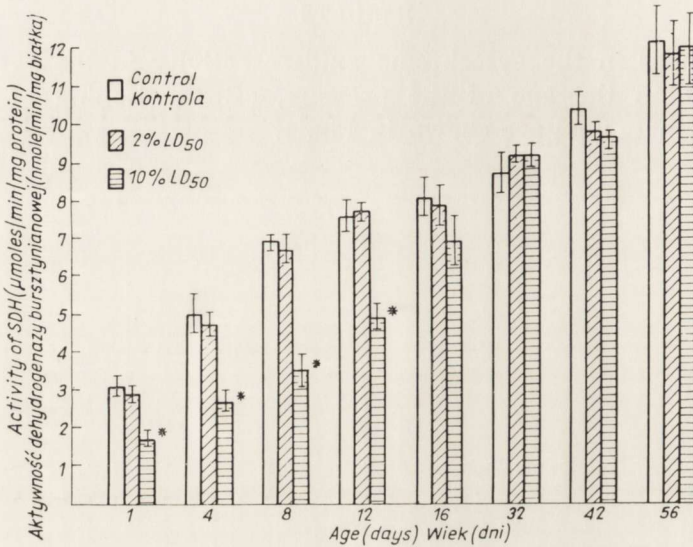


Fig. 2. Succinate dehydrogenase activity in the brain of developing rat following Ronnel intoxication of pregnant females. Results are shown as mean \pm S.E.M. for 6 animals. * — statistically significant at $p \leq 0,05$.

Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w rozwijającym się mózgu szczura po zatruciu ciężarnych samic Ronnelem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 6 szczurów. * — znamienność statystyczna $p \leq 0,05$.

Fig. 2. shows the changes in the succinate dehydrogenase activity in the rat brain after poisoning of pregnant females in relation to the age of the progeny. The lowest succinate dehydrogenase activity was noted on the 1st day of life. During further development a distinct rise of the activity occurred, reaching on the 56th day values close to those observed in the brains of mature rats (Sitkiewicz, Zalewska, 1975a, b). A marked influence of intoxication of the pregnant mothers with Ronnel was noted in the period of the rapid increase of the dehydrogenase activity (between day 1 and 12). In the brain mitochondrial fraction from the progeny of females poisoned with Ronnel in a 10 per cent LD₅₀ dose a statistically significant de-

pression of succinate dehydrogenase activity in about 35 per cent of animals was observed. At later periods of development (between day 16 and 56) this activity reached a level close to the control one.

DISCUSSION

The intoxication model used in the present study consisted in poisoning a pregnant female for the last 7 days of pregnancy. This period was chosen in order to avoid the period of fetus formation and the teratogenic period. Moreover, the last seven days of pregnancy are in rats the time of first steps in brain formation. In this period the nerve cells spread and differentiate (Rappoport et al., 1971). Thus, the eventual action of the pesticide in this stage may influence the course of further postnatal development which has been the object of investigation. The period chosen for the experiments comprised the full functional, structural and metabolic development of the brain (Rappoport et al., 1971).

The results obtained indicate that poisoning of mothers with Ronnel in a dose of 10 per cent LD₅₀ causes in the period of the first 12 days of postnatal life a significant depression of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activity in the mitochondria. Since in the subsequent period of 32, 42 and 56 days the enzyme activity in the progeny of the intoxicated mothers did not differ from that in the control animals, it may be concluded that the observed effect is connected with a retardation of development.

Full development of mitochondrial enzymes activity in the rat brain occurs around the 20th day of life (Seiler, 1969). In the same period the mitochondria are fully efficient in the respiratory chain, and do not undergo further significant changes (Land et al., 1976). The enhanced activity of enzymes of the respiratory chain during development may be associated, on the one hand with synthesis of enzymes protein and on the other, with their integration into the inner mitochondrial membrane. The activity of membrane enzymes including mitochondrial oxidoreductases is dependent on or regulated by phospholipids (Fleischer, Klonwen, 1961). This fact suggests that the observed depression of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activity is linked with disturbances in phospholipid synthesis, this possibly causing a slower functional development of mitochondrial membranes. This supposition seems to be supported by the results of Kiełducka and Sitkiewicz (1977) and those of Antunes-Madeira and Madeira (1979) which demonstrated an interaction between phospholipid and organophosphorus compounds. It seems, therefore, that the effects observed in the progeny are not a consequence of the direct

action of the pesticide. This was confirmed by the fact that all the compounds tested so far, in spite of wide differences in their chemical structure — Dichlorvos, Trichlorphon and Ronnel — give very similar effect in respect to the mitochondrial enzymes in the brain of the progeny. This confirms the supposition of a retarded development of the central nervous system. Investigations of other authors suggest a different mechanism of organothiophosphorus compound action than that of organophosphorus derivatives on various metabolic processes in the brain of adult and developing rats (Biczowa et al., 1976; Zalewska et al., 1977a; Suliński, Bicz 1979). The depressor effect on cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activity in mitochondria of the rat brain during individual development as the result of poisoning of pregnant females with Ronnel is similar to that noted after intoxication with Dichlorvos and Trichlorphon (Zalewska et al., 1977b; Suliński et al., 1979). The identical effects of various organophosphorus insecticides confirms this suggestion.

*

The author wishes to thank Professor W. Bicz, Head of the Department of Drug Metabolism, for his advice and guidance during the present studies.

Z. Zalewska

WPŁYW ZATRUCIA CIĘŻARNYCH SZCZURZYC RONNELEM
NA AKTYWNOŚĆ OKSYDOREDUKTAZ W MITOCHONDRIACH
MÓZGU POTOMSTWA

Streszczenie

Badano aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mózgach potomstwa po zatruciu ciężarnych samic Fenchlorfossem (Ronnel). Insektycyd podawano *per os* w dawkach 2% lub 10% LD₅₀ podczas ostatnich 7 dni ciąży. Aktywność enzymów oznaczano we frakcjach mitochondrialnych w 1, 4, 8, 12, 16, 32 i 56 dniu życia.

W grupie kontrolnej podczas pierwszych szesnastu dni życia stwierdzono przyrost aktywności oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej. W okresie szybkiego wzrostu aktywności enzymów w mózgach potomstwa samic zatrutowanych fenchlorfossem w dawce 10% LD₅₀ obserwowano wyraźnie obniżoną aktywność obu oksydoreduktaz mitochondrialnych.

З. Залевска

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ БЕРЕМЕННЫХ КРЫС РОННЕЛОМ
НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ
В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА ПОТОМСТВА

Резюме

Исследовалась активность цитохромовой оксидазы и сукциндегидрогеназы в мозгах потомства после отравления беременных самок Фенхлорфосом (Роннел). Инсектицид подавался *per os* в дозах 2% или 10% LD₅₀ во время последних

7 дней беременности. Активность энзимов определялась в митохондриальных фракциях на 1, 4, 8, 12, 16, 32 и 56 дней жизни.

В контрольной группе, во время первых 16 дней жизни обнаруживается приращение активности цитохромовой оксидазы и сукциндегидрогеназы. Во время быстрого роста активности энзимов в мозгах потомства самек, отравляемых Фенхлорфосом в дозе 10% LD₅₀ обнаруживалась отчетливо сниженная активность обеих митохондриальных оксидоредуктаз.

REFERENCES

1. Aldridge W. N., Barnes I. M.: Further observation on the neurotoxicity of organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1966a, 15, 541—548.
2. Aldridge W. N., Barnes I. M.: Esterases and neurotoxicity of some organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1966b, 15, 549—554.
3. Antunes-Madeira M. C., Madeira V. M. C.: Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 550, 384—392.
4. Biczowa B., Sikorska M., Zalewska Z., Bicz W.: Effect of a thiophosphoric insecticide — Fenchlorphos on the glycogen level, glycolysis and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 381—388.
5. Fleischer S., Klonwen H.: The role of soluble lipid in mitochondrial enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1961, 5, 378—383.
6. Johnson M. K.: A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 1969, 111, 487—495.
7. Johnson M. K.: Organophosphorus and other inhibitors of brain „neurotoxic esterase” and the development of delayed neurotoxicity in hens. *Biochem. J.* 1970, 120, 523—531.
8. Johnson M. K.: The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J. Neurochem.* 1974, 28, 285—289.
9. Kiełducka A., Sitkiewicz D.: Hamowanie aktywności oksydazy cytochromowej przez związki fosforoorganiczne. Rola komponentu lipidowego. XV Zjazd P.T. *Biochem. Gdańsk* 1977, Abstr. Nr Pc-7.
10. King T. E.: Reconstruction of respiratory chain enzyme systems. *J. Biol. Chem.* 1963, 238, 4032—4036.
11. Land I. M., Booth R. F. G., Berger R., Clark J. B.: Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochem. J.* 1977, 164, 339—348.
12. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology*. Ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, 3, 447—454.
13. Malinowski R., Śledziński B.: Tionofosforan 0,0-dwumetylo-0-2,4,5 trójchlorofenyłowy — ważny insektycyd o niskiej toksyczności. *Pestycydy* 1967, 1, 1—14.
14. Moore C. L., Jobsis F. F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 138, 295—305.
15. Rappoport D. A., Fritz R. R., Yamagami S.: Development. In: *Handbook of Neurochemistry*. Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York, London 1971, 5, 439—480.

16. Seiler N.: Enzyme changes during development. In: Handbook of Neurochemistry. Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York, London 1969, 1, 337—355.
17. Sitkiewicz D.: Procesy utleniania w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego i wątroby szczura w następstwie działania insektycydów tiofosforoorganicznych. Praca doktorska, Akademia Medyczna, Warszawa 1975.
18. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: The effect of ronnel and its oxygen analogue on succinate oxidation by rat brain, liver homogenates and mitochondria. *Pest. Biochem. Physiol.* 1977, 7, 501—509.
19. Sitkiewicz D., Skonieczna M., Krzywicka K., Dziedzic E., Staniszevska K., Bicz W.: Effect of organophosphorus insecticides on the oxidative processes in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 1980, 34, 619—626.
20. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mózgu szczura po zatruciu fosforoorganicznymi insektycydami dichlorfosem i trichlorfonem. *Neuropat. Pol.* 1975a, 13, 273—281.
21. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.* 1975b, 13, 463—469.
22. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 50, 285—298.
23. Smith L.: Cytochromes a, a₁, a₂ and a₃. In: *Methods in Enzymology*, Ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, 2, 732—740.
24. Suliński A., Bicz W.: The effect of intoxication of pregnant rats with Ronnel on cholinesterase activity in the progeny during postnatal development. *Neuropat. Pol.* 1979, 18, 575—582.
25. Suliński A., Skalska E., Obrusiewicz K.: The activities of acetylcholinesterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase of the rat brain following fenchlorphos intoxication. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 451—459.
26. Suliński A., Zalewska Z., Sosnowska K., Bicz W.: Effect of intoxication of pregnant rats with Trichlorphon on the activities of some brain enzymes in the progeny during postnatal development. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 135—143.
27. Yonetani T., Ray G. S.: Studies on cytochrome oxidase kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome C by cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 3392—3398.
28. Zalewska Z., Jurkiewicz G., Wenzel E.: Fosforylacja oksydacyjna i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem i dichlorfosem. *Brom. Chem. Toksykol.* 1977a, 10, 357—365.
29. Zalewska Z., Wolna B., Sitkiewicz D., Bicz W.: Effect of dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases. *Neuropat. Pol.* 1977b, 15, 367—372.

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

PRZEMYSŁAW NOWACKI

KRWIAK PODTWARDÓWKOWY A ZMIANY KRWOTOCZNE
O TYPIE *PACHYMENINGOSIS HAEMORRHAGICA INTERNA*

Pracownia Neuropatologii Kliniki Neurologii Instytutu Chorób
Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów PAM, Szczecin
Kierownik Pracowni: doc. dr J. Kulczycki

Do dnia dzisiejszego nie ma zgodności poglądów na patogenезę krwiała podtwardówkowego. Początek dyskusji na temat zmian krwotocznych w oponie twardej dał Virchow (1857). Przedstawił on przypadek cechujący się rozplemem drobnych naczyń w wewnętrznej blaszce twardej, licznymi krwinkotokami wokół tych naczyń oraz naciekami zapalnymi. Stąd przypuszczenie, że u podłoża niektórych krwiałków mogą leżeć nieurazowe zmiany w oponie twardej. Według tego autora istotę procesu stanowi zapalenie wewnętrznej blaszki opony z wtórnymi zmianami naczyniowymi. Stan ten nazwał on *pachymeningitis haemorrhagica interna (phi)*. Określenie to wprowadziło sporo zamieszania do poglądów na temat patogenезy wycieczek krwi do przestrzeni podtwardówkowej. Nasunęło się bowiem pytanie, czy *pachymeningitis haemorrhagica interna* jest osobną jednostką nozologiczną o cechach klinicznych krwiała podtwardówkowego, czy zmianą pierwotną w oponie twardej odpowiedzialną za powstanie krwiała, czy może wreszcie nie ma żadnej różnicy między *pachymeningitis haemorrhagica interna*, a krwiałkiem podtwardówkowym. Na przełomie naszego stulecia niektórzy autorzy opowiadali się za koncepcją zmian krwotocznych w oponie twardej, jednak w przeciwieństwie do Virchowa, nie o cechach zapalnych, lecz zwyrodnieniowych z wtórnym odczynem komórkowym (Kremiansky 1868; Jores 1898; Jores, Laurent 1901). Proces ten nazwali *pachymeningosis haemorrhagica interna*.

Trotter (1914) przeciwstawił się poglądom o pierwotnych zmianach krwotocznych w twardej, twierdząc, że krwawienie zależy wyłącznie od urazu, a występujące zmiany krwotoczne i zapalne są wyni-

kiem organizacji krwiaka. Byli jednak i tacy autorzy, którzy wskazywali na możliwość współistnienia pierwotnych zmian krwotocznych w oponie twardej z urazem, który miał być decydującym czynnikiem wyzwalającym krwawienie do przestrzeni podtwardówkowej (Link 1959; Wolf 1962). Link w kilku pracach odrzucił możliwość powstania krwiaków pod oponą całkowicie zdrową. Źródłem krwiaków bez urazu w wywiadzie lub z urazem niewielkim miały być pierwotne zmiany w oponie twardej (Link 1958, 1959, 1960). Autor ten był zdania, że takie właśnie stany mogą odpowiadać pojęciu *pachymeningosis haemorrhagica interna*. Niektórzy autorzy są skłonni w dalszym ciągu przypisywać zmianom krwotocznym w oponie twardej duże znaczenie w powstawaniu wynaczynień krwi do przestrzeni podtwardówkowej, szczególnie w tych przypadkach, gdy uraz jest niepewny (Christensen 1944; Christensen, Husby 1963; Krempien 1976). W takich przypadkach powstanie *pachymeningosis haemorrhagica interna* może być związane z szeregiem schorzeń ogólnoustrojowych, zwłaszcza metabolicznych: cukrzyca, chorób nerek, wątroby oraz z alkoholizmem i podeszłym wiekiem (Wolf 1962; Falkiewiczowa 1966; Peters 1970; Friede 1971; Lindenberg 1971; Łobkova, Gabibow 1974). Nie bez znaczenia ma też być leczenie środkami przeciwwkrzepliwymi (Falkiewiczowa 1966).

Autorzy anglosascy decydującą rolę w powstawaniu krwiaków podtwardówkowych przypisują urazom, nawet jeśli są one negowane w wywiadzie (Putnam, Cushing 1925; Putnam 1927; Elvidge, Jackson 1949; Hoff, Gauger 1975). Nie przywiązują oni większej wagi do zmian krwotocznych w oponie. Są zwolennikami teorii uszkodzenia tzw. żył mostkowych, przebiegających między twardówką, a powierzchnią mózgu, zwłaszcza w pobliżu zatoki strzałkowej górnej (Jamieson, Yelland 1972). Do chwili obecnej nie zdołano ustalić ostatecznie zależności między opisanym typem zmian w oponie twardej, a krwiakiem podtwardówkowym. Chęć wniknięcia w istotę *pachymeningosis haemorrhagica interna* oraz ustalenia powiązania między zmianami tego typu a krwiakiem podtwardówkowym stała się motywem do podjęcia niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Pierwszą część materiału stanowiło 35 opon twardych, pobranych podczas sekcji zwłok w Zakładzie Anatomii Patologicznej PAM od osobników obojga płci i w różnym wieku, u których za życia rozpoznawano stany uważane za patogenne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna*. Osobników płci męskiej było 16, żeńskiej 19. Przypadki podzielono według rodzaju schorzenia na następujące grupy:

choroby wątroby — 6 przypadków, choroby nerek — 4, cukrzyca — 5, alkoholizm — 4, choroby krwi z rozpoznaną skazą krwotoczną lub choroby, w przebiegu których stosowano leki prowadzące do skazy krwotocznej — 6; 10 opon twardych pobrano od osób, które zmarły w wieku 82—96 lat. Grupę kontrolną stanowiło 10 opon twardych pobranych ze zwłok osób obojga płci i w różnym wieku (18—56 lat), które zmarły z powodu innych chorób, niż wymienione wyżej stany uważane za patogenne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna*.

Drugą część materiału stanowiły opony twarde z 9 przypadków krwiaków podtwardówkowych pobrane od osób płci męskiej w wieku 9—67 lat.

Materiał po ocenie makroskopowej utrwalano w 8% roztworze formaliny, a następnie wycinki opon twardych, bądź opon z przyległym krwiakiem zatapiało w parafinie, skrawano na mikrotomie i barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu i metodami van Gieson i Weigerta. W celu dokładniejszej oceny grubości opon wykonywano 5 pomiarów i wyliczano średnią arytmetyczną. Gdy było to możliwe, w podobny sposób mierzono blaszki opon.

WYNIKI

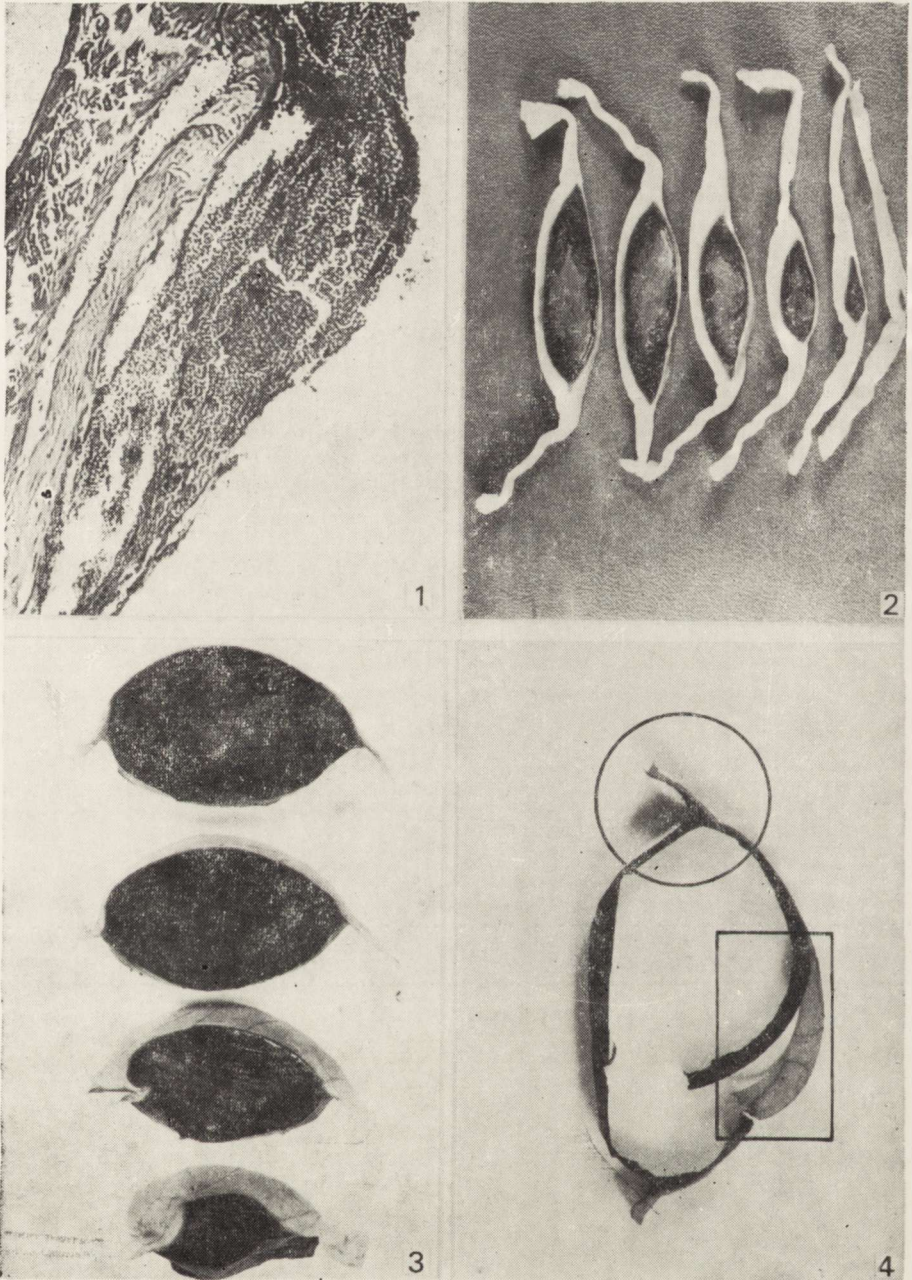
Ocena morfologiczna opon twardych w 35 przypadkach chorób lub stanów uważanych za patogenne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna*

Makroskopowo opony nie wykazywały zmian.

Ocena mikroskopowa. Podział opony na blaszkę zewnętrzną i wewnętrzną można było dość dobrze prześledzić, poza kilkoma przypadkami z grupy opon starczych. Włókna łącznotkankowe w blaszce zewnętrznej utkane były dość luźno, w wewnętrznej natomiast, nie licząc kilku opon pochodzących od osób starych, przebiegały gęsto i bardziej równoległe.

Duże naczynia tętnicze i żyłne spotykano jedynie w utkaniu blaszki zewnętrznej, bądź między blaszkami. Osiągały one średnicę do 150 μm . Ich ściany nie wykazywały istotnych odchyień od stanu prawidłowego; ściany niektórych naczyń osiągały grubość do 50 μm . Drobne naczynia spotykano w utkaniu obu blaszek, częściej w głębszych okolicach blaszki wewnętrznej. Zwykle miały średnicę do 30—40 μm .

Głównymi elementami komórkowymi opony były fibrocyty, fibroblasty i komórki limfoidalne. Dwa ostatnie typy komórek występowały rzadziej, głównie w pobliżu naczyń i miejscami w okolicach wewnętrznej powierzchni twardówki.



Ryc. 1. Drobne, dobrze odgraniczone ognisko krwotoczne przylegające do niezmienionej powierzchni opony twardej. Od obwodu rozpoczyna się organizacja wynaczynienia. Barwienie H-E. Pow. 63 \times .

Fig. 1. Small, well defined hemorrhagic focus adjacent to unchanged dura mater surface. The development of the hemorrhagic focus organisation starts on its border.

Grubość opony wynosiła od 450—500 μm . W 2 przypadkach chorób nerek i cukrzycy dochodziła do 600—800 μm . Grubość obu blaszek była mniej więcej jednakowa, a stosunek grubości blaszki zewnętrznej do wewnętrznej wynosił 1:1.

Zmiany krwotoczne na wewnętrznej powierzchni opony twardej były jedynym istotnym odchyleniem od stanu prawidłowego, nie występowały jednak w samej twardówce. Miały charakter drobnych, zwykle rozsianych, płaskich ognisk krwotocznych, barwy ciemnobrunatnej, dobrze odgraniczonych od otoczenia. Znalezione je tylko w 2 grupach (podeszły wiek i choroby nerek). Składały się ze świeżych erytrocytów, w kilku przypadkach podlegały początkowej organizacji. Blaszka wewnętrzna ponad ogniskami krwotocznymi nie wykazywała odchylenia od stanu prawidłowego (ryc. 1).

Badanie morfologiczne opon twardych w 9 przypadkach krwiaków podtwardówkowych

O c e n a m a k r o s k o p o w a. Zewnętrzna powierzchnia opony twardej w badaniu makroskopowym nie wykazywała istotnych odchyleń od stanu prawidłowego. Tylko w jednym przypadku w utkaniu bardzo pogrubiałej twardówki obserwowano duże ognisko krwotoczne w kształcie dysku o szerokości ok. 2 cm (ryc. 2). W pozostałych 8 przypadkach złogi krwi przylegały do wewnętrznej powierzchni opony twardej. Ilość krwi w przestrzeni podtwardówkowej wahała się w szerokich granicach: od cienkiej, kilkumilimetrowej warstewki do masywnego krwiaka o grubości do 5 cm (ryc. 3). W jednym przypadku nad półkulą przeciwną do wynacznienia, w okolicy ciemieniowo-skroniowej obserwowano kilka małych ciemnobrunatnych, dobrze odgraniczonych, cienkich ognisk krwotocznych. Największą grubość osiągały wynacznienia w okolicy skroniowo-ciemieniowej. Świeże,

Ryc. 2. Wrzecionowate wynacznienie między pogrubiałymi blaszkami opony twardej.

Fig. 2. Fusiform extravasation between thickened laminae of dura mater.

Ryc. 3. Przekroje czołowe przez otorbione złogi krwi przylegające do opony twardej, osiągające grubość do 5 cm.

Fig. 3. Frontal sections through encysted blood deposits adjacent to dura mater, 5 cm of thickness.

Ryc. 4. Błonka otaczająca wynacznioną pod twardówkę krew (masy krwotoczne usunięte dla przejrzystości obrazu). Przylega ona do wewnętrznej powierzchni twardówki. Po odpreparowaniu błonki od opony widoczna niezmiennona powierzchnia wewnętrzna twardówki (fragment w prostokącie). W kółku widoczna okolicca podziału błonki na blaszkę wewnętrzną i zewnętrzną.

Fig. 4. Membrane surrounding extravasation under dura mater (mass of blood removed to clear the picture). The membrane adheres to internal surface of dura mater. Unchanged internal surface of dura mater (the fragment in rectangle) visible after membrane removal.

nieotorbione złogi krwi łatwo można było usunąć z powierzchni opony, która nad nimi nie wykazywała istotnych odchyień od normy. Również bardzo luźno przylegały do opony wielowarstwowe masy krwotoczne. Składały się one z wielu nieotorbionych blaszek skrzepu, leżących luźno jedna na drugiej. W pozostałych przypadkach, poza ogniskiem krwotocznym w oponie twardej, wynaczynienia otoczone były mniej lub bardziej wyraźną torebką łącznotkankową (ryc. 4). Stanowiła ją cienka błonka, barwy szarobiaławej, niekiedy z licznymi, drobnymi, ciemnobrunatnymi ogniskami krwotocznymi. Osiągały one grubość 1—2 mm.

O c e n a m i k r o s k o p o w a. We wszystkich przypadkach podział opony twardej na blaszkę zewnętrzną i wewnętrzną można było łatwo prześledzić. Włókna łącznotkankowe ułożone były bardziej lub mniej regularnie, głównie w pęczkach różnej grubości, gęściej w blaszce wewnętrznej. Duże naczynia tętnicze i żyłne leżały w utkaniu blaszki zewnętrznej. Przekraczały zwykle średnicę 150 μm . Część naczyń uwypuklała się ponad zewnętrzną powierzchnię opony. Drobne tętniczki i żyłki spotykano zwykle w utkaniu blaszki wewnętrznej.

Elementy komórkowe stanowiły głównie fibrocyty, fibroblasty i komórki limfoidalne. Spotykano je w utkaniu obu blaszek, lecz częściej występowały, podobnie jak drobne naczynia, w pobliżu wewnętrznej powierzchni opony.

Grubość twardówki wynosiła zwykle 450—550 μm , a poszczególnych blaszek około 250—300 μm . Stosunek grubości blaszek wynosił 1 : 1.

Stosunek mas krwotocznych do wewnętrznej powierzchni opony twardej w poszczególnych przypadkach był niejednakowy. Złogi krwinek czerwonych w świeżych krwiakach przylegały bezpośrednio do opony, z której wnikały w nie miejscami drobne pasma włókien łącznotkankowych. Wzdłuż włókien leżały pojedyncze fibroblasty i komórki limfoidalne. W 2 przypadkach wnikały w masy krwi liczne, grube pasma włókien łącznotkankowych, fibroblastów, komórek limfoidalnych i śródbłonek, tworząc miejscami utkanie przypominające świeżą torebkę krwiaka podtwardówkowego. W przypadku wielowarstwowego wynaczynienia blaszki utworzone były z erytrocytów o jednokowym wyglądzie, między którymi obserwowano liczne ziarna hemosyderyny. Ognisko krwotoczne oddzielone było od opony dość wyraźną błoną łącznotkankową z dużą ilością naczyń zatokowatych, bogatą w fibroblasty i komórki limfoidalne. W błonie znajdowały się liczne, rozległe ogniska krwotoczne w stadium wczesnej rozbiórki makrofagowej (ryc. 5).

W przypadku, gdy błona była wyraźnie wykształcona, składała się z dużej ilości komórek, głównie fibroblastów, komórek limfoidalnych

i makrofagów. Fibroblasty przeważały w jej części zewnętrznej. Naczynia miały charakter zatokowatych i rozrzucone były w utkaniu całej błony (ryc. 6). Grubość błony wynosiła około 350 μm .

We wszystkich przypadkach opisane wyżej błony miały utkanie typowej torebki krwiaka podtwardówkowego. W wielu przypadkach przylegały one ściśle do wewnętrznej powierzchni opony twardej, co sprawiało wrażenie, jakby do zmian charakterystycznych dla błon dochodziło w samej twardówce. Decydujące znaczenie dla różnicowania między błoną, a oponą twardą miała ocena włókien łącznotkankowych, które w twardówce były o wiele grubsze, gęściej i równomierne ułożone (ryc. 5, 5a, 6, 6a). Blaszkę wewnętrzną opony, zwróconą w stronę pajęczynówki, obserwowano w 3 przypadkach. Była ona bardzo delikatna, składała się z pojedynczych włókien łącznotkankowych, małej ilości komórek i była prawie całkowicie pozbawiona naczyń.

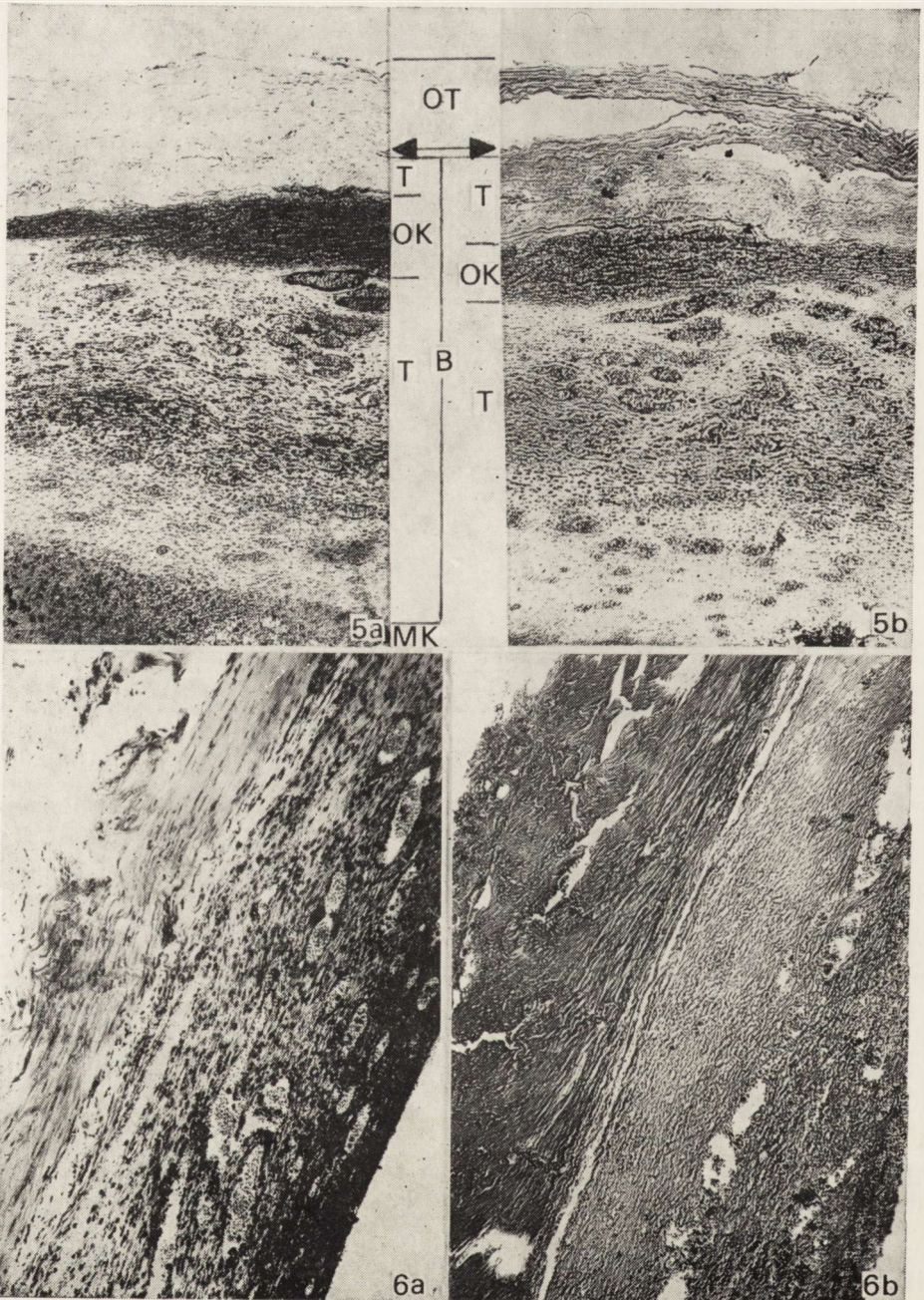
W badaniu mikroskopowym wynacznienia śródtwardówkowego stwierdzono, że jego zawartość stanowiły masy erytrocytów, między którymi występowały liczne ziarna hemosyderyny, zwłaszcza w pobliżu granicy z oponą.

DYSKUSJA

Dla jaśniejszego przedstawienia zagadnienia pracę podzielono na dwa etapy, poddając ocenie: opony twarde, w których można było spodziewać się zmian krwotocznych i opony twarde z przyległymi do ich wewnętrznej powierzchni krwiami.

W pierwszej części pracy próbowano odpowiedzieć na pytanie, czy czynniki uważane za patogenne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna* rzeczywiście wywołują w oponie twardej zmiany krwotoczne. W przebadanym materiale nie stwierdzono takich zmian. Co prawda w niektórych przypadkach w utkaniu wewnętrznej blaszki twardówki spotykano większą ilość naczyń o większej średnicy, nie było jednak w ich sąsiedztwie zmian patologicznych.

Na uwagę zasługują obserwowane w niektórych przypadkach drobne ogniska krwotoczne, przylegające do wewnętrznej powierzchni opony twardej. Taka ich lokalizacja mogłaby świadczyć o uszkodzeniu naczyń mostkowych w przestrzeni podtwardówkowej. Nie bez znaczenia wydaje się fakt, że spotykano te ogniska jedynie u osób zmarłych w podeszłym wieku lub z objawami skazy krwotocznej. Istnieje pogląd, że starczy zanik mózgu prowadzi do napinania się drobnych naczyń w poszerzonej przestrzeni podtwardówkowej, wówczas nawet drobny, trudny do ustalenia uraz głowy może spowodować pęknięcie tych naczyń. Podobne urazy mogłyby uszkodzić naczynia w przypadkach chorób przebiegających ze skazą krwotoczną. Potwierdzają te



Ryc. 5a. Opona twarda (OT) i przylegająca do niej gruba błona łącznotkankowa (B). W utkaniu błony ogniska krwotoczne w stadium organizacji (OK) poprzedzielane utkaniem typowym dla torebki krwiaka (T) z licznymi naczyniami zatokowatymi. Granica między oponą a błoną zatarta (strzałka). W dolnej części ryciny masy krwotoczne (MK). H-E. Pow. 63 X.

obserwacje niektórzy autorzy, opisujący nieurazowe krwiaki u osób z chorobami krwi, leczonych środkami przeciwwkrzepliwymi (Silverstein 1960; Wiener, Nathanson 1962; Tallala, Marin 1971).

W wymienionych we wstępie schorzeniach, uważanych za patogene dla *pachymeningosis haemorrhagica interna*, nie stwierdzono zmian krwotocznych w oponie twardej w żadnym z przebadanych przypadków. Występowanie kilku drobnych ognisk wynacznienia na wewnętrznej powierzchni twardówki nie odpowiadało pojęciu *pachymeningosis haemorrhagica interna*, a świadczyło jedynie o lokalnym uszkodzeniu mózgowych naczyń żylnych zdążających do lakun twardówkowych.

W drugim etapie badań podjęto próbę ustalenia stosunków topograficznych, panujących między twardówką, a zawartym pod nią krwiakiem. Badania te można było przeprowadzić jedynie w przypadkach sekcyjnych. Dwa z nich nasuwały obducentowi rozpoznanie *pachymeningosis haemorrhagica interna*, pozostałe krwiaka podtwardówkowego. Badając zawartość mas krwotocznych, stwierdzono, że w części z nich, między niezmienioną oponą, a masami krwotocznymi znajduje się pasmo łącznotkankowe w postaci cienkiej błonki o brunatnym zabarwieniu. Takie błonki miałyby być charakterystyczne dla

Fig. 5a. Dura mater (OT) and adjacent thick connective tissue membrane (B). Hemorrhagic foci in the stage of organisation (OK) separated by the tissue characteristic for the hematoma's capsula (T) with abundant sinusoides in the membrane's structure. The border between dura mater and the membrane obliterated (arrow). In the bottom part of the picture hemorrhagic mass (MK). H-E. $\times 63$.

Ryc. 5b. Ten sam preparat co na rycinie 5a barwiony na włókna łącznotkankowe. Widoczna wyraźna granica między grubowłóknistą oponą twardą (OT) a błoną łącznotkankową (B-strzałka). Van Gieson. Pow. 63 \times .

Fig. 5b. The section as above (Fig. 5a) stained for connective tissue fibers. Demarcated limit between thick fibers of dura mater (OT) and connective tissue membrane (B-arrow). Van Gieson. $\times 63$.

Ryc. 6a. Błona łącznotkankowa o budowie typowej torebki krwiaka z licznymi naczyniami zatokowatymi, przylegająca ściśle do opony twardej. Nieostra granica między błoną a twardówką daje złudzenie, jakby błona stanowiła integralną część opony. Fiolet krezyłu. Pow. 63 \times .

Fig. 6a. Connective tissue membrane with typical structure of hematoma's capsula with numerous sinusoides adhering closely to dura mater. Unsharp border between membrane and dura mater creates an appearance that the membrane constitutes an integral part of dura mater. Cresyl violet. $\times 63$.

Ryc. 6b. Ten sam preparat co na ryc. 6a. Wybarwienie włókien łącznotkankowych pozwala dokładnie prześledzić granicę między oponą a błoną o cienkich, delikatnych włóknienkach. Van Gieson. Pow. 63 \times .

Fig. 6b. The section as above (Fig. 6a). Staining of connective tissue fibers allows to trace the border between dura mater and thin, delicate fibrills of the membrane. Van Gieson. $\times 63$.

pachymeningosis haemorrhagica interna (Link 1959; Kowalczykowska 1968). Badając strukturę błonek stwierdzono, że chociaż posiadają one w swym utkaniu elementy charakterystyczne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna*, o których wspomniano we wstępie, w rzeczywistości mają budowę typowej torebki krwiaka podtwardówkowego. Przylegają ściśle do wewnętrznej powierzchni opony twardej, co może sprawiać wrażenie, że stanowią integralną jej część, a zmiany toczą się wewnątrz twardówki. Nigdy jednak nie spotykano błonek w przestrzeni podtwardówkowej, jeśli w tej okolicy nie było wynaczonej krwi. Po ich oddzieleniu od twardówki, ta ostatnia pozostawała zawsze niezmienną.

Na podstawie powyższych spostrzeżeń można przyjąć, że blaszki pod oponą twardą są torebką krwiaka podtwardówkowego, powstałą przy udziale twardówki w trakcie jego organizacji. W tym świetle zmiany morfologiczne, określane przez wielu autorów jako zwyrodnienie krwotoczne opony twardej stanowią torebkę krwiaka przylegającą do wewnętrznej powierzchni opony i luźno z nią związaną.

W niniejszej pracy nie stwierdzono istnienia zmian krwotocznych w oponie twardej o typie *pachymeningosis haemorrhagica interna*.

WNIOSKI

1. W przebadanym materiale schorzenia uważane za patogenne dla *pachymeningosis haemorrhagica interna* nie wywołały wyraźnych zmian krwotocznych w oponie twardej.

2. W przypadkach krwiaków podtwardówkowych nie wykazano istnienia w oponie twardej zmian krwotocznych o charakterze *pachymeningosis haemorrhagica interna*. Należy przypuszczać, że zjawiska zachodzące na wewnętrznej powierzchni opony twardej są przejawem organizacji krwiaka.

П. Новацки

СУБСКЛЕРНАЯ ГЕМАТОМА И ГЕМОПРАГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИПА *PACHYMENINGOSIS HAEMORRHAGICA INTERNA*

Резюме

Целью работы была оценка влияния на твердую мозговую оболочку факторов, которые считаются патогенными для *pachymeningosis haemorrhagica interna* (*phi*), а также определение топографических соотношений, какие имеют место между твердой мозговой оболочкой и прилегающими к ее внутренней поверх-

ности гематомами. Исследовали 35 твердых мозговых оболочек, полученных во время секции особей, у которых во время жизни был установлен диагноз характерный для *phi*, а также твердые мозговые оболочки 9 субсклерных гематом, полученных после вскрытия. Исследования сводились к гистопатологической оценке материала окрашиваемого гематоксилином-эозином, кризильвиолетом и методами Ван Гизона и Вейгерта.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие заключения: 1) Заболевания, которые считаются патогенными для *phi* в исследованном материале не вызывали геморрагических изменений в твердой мозговой оболочке. 2) Экстравазация крови в субсклерозное пространство соответствует понятию субсклерозной гематомы, а изменения происходящие на внутренней поверхности склеры связаны с процессами организации этой гематомы.

P. Nowacki

SUBDURAL HEMATOMA AND HEMORRHAGIC CHANGES OF THE PACHYMEMINGOSIS HAEMORRHAGICA INTERNA TYPE

Summary

The aim of the study was to ascertain the influence of the factors assumed to be pathogenic for *pachymeningosis haemorrhagica interna (phi)* on the dura mater and to establish topographic relation existing between dura mater and hematomas attached to its internal surface. The study was performed on 35 sectioned cases with intravitaly diagnosed pathogenic states of *phi* and 9 cases with subdural hematoma. The observations consisted of histological diagnosis of the sectioned material stained by H-E., cresyl violet, van Gieson and Weigert's methods.

As the results following remarks can be brought forward: 1) The diseases ascertained as pathognomonic for *phi* do not play the important role in the appearance of hemorrhagic changes in dura mater; 2) Extravasations to subdural space correspond to the concept of subdural hematoma and the changes occurring on the internal surface of the dura mater are connected with the process of hematoma organization.

PIŚMIENICTWO

1. Christensen E.: Studies on chronic subdural hematoma. Acta Psychiat. Scand. 1944, 19, 63—148.
2. Christensen E., Husby J.: Chronic subdural hematoma in infancy. Acta Neurol. Scand. 1963, 39, 323—342.
3. Elvidge A., Jackson R.: Subdural hematoma and effusion in infants, review of 55 cases. Am. J. Dis. Child. 1949, 78, 635—642.
4. Falkiewiczowa S.: Pachymeningosis haemorrhagica interna. Pat. Pol. 1966, 27, 107—116.
5. Friede L.: Incidence and distribution of neomembranes of dura mater. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 1971, 34, 439—446.
6. Hoff J., Gauger G.: Arterial subdural hematomas of unusual origin. J. Trauma 1975, 15, 528—531.

7. Jamieson K., Yelland J.: Surgical treated traumatic subdural hematomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1972, 37, 137—149.
8. Jores E.: cyt. za Friede L., poz. piśm. 5.
9. Jores E., Laurent H.: cyt. za Friede L., poz. piśm. 5.
10. Kowalczykowska J.: Zarys anatomii patologicznej ogólnej i szczegółowej, PZWL, Warszawa 1968, 518—521.
11. Kremiansky J.: cyt. za Friede L., poz. piśm. 5.
12. Krempien B.: Altersugang der Gefäßbeziehungen zwischen Dura mater cerebri und Schädeldach. Beziehungen zum Krankheitsbild der Pachymeningosis haemorrhagica interna (Phi). *Virchow Arch. Path. Anat.* 1976, 343, 282—294.
13. Lindenberger R.: Subdural hematoma. W: *Pathology of the nervous system*. Red. J. Minckler, McGraw-Hill, New York 1971, 1711—1719.
14. Link K.: Zum Schicksal der traumatischen subduralen Blutung. *Zbl. Neurol.* 1958, 146, 296—297.
15. Link K.: Zum Kenntnis der Pachymeningitis haemorrhagica interna und des pachymeningitischen Hämatoms der Dura mater. *Zbl. Neurol.* 1959, 152, 103.
16. Link K.: Traumatische subdurale Blutung aus Brückenvenen bei abnormen Duraknochen. *Zbl. Neurol.* 1960, 156, 87—88.
17. Łobkowska E., Gabibow A.: Osobiennosti kliniki, chirurgiczeskogo leczenia i morfologiczieskich izmienenij pri chroniczieskich subduralnych giematomach, protiekajuszczich kak wnutrimozgowyje opucholi bolszich pouszarij. *Vopr. Neurokhir.* 1974, 5, 3—7.
18. Peters G.: Subdurales hämatompachymeningosis haemorrhagica interna. W: *Klinische Neuropathologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970, 207—211.
19. Putnam T., Cushing H.: Chronic subdural hematoma. *Arch Surg.* 1925, 11, 329—393.
20. Putnam T.: The experimental study of pachymeningitis haemorrhagica interna. *J. Nerv. Dis.* 1927, 65, 26—271.
21. Silverstein A.: Intracranial bleeding in hemophilia. *Arch. Neurol. (Chicago)* 1960, 3, 141—145.
22. Tallala A., Marin M.: Acute traumatic subdural hematoma: a review of one hundred consecutive cases. *J. Trauma* 1971, 11, 771—777.
23. Trotter W.: cyt. za Friede L., poz. piśm. 5.
24. Virchow R.: cyt. za Friede L., poz. piśm. 5.
25. Wiener L., Nathanson M.: The relationship of subdural hematoma to anti-coagulant therapy. *Arch. Neurol. (Chicago)*, 1962, 6, 282—286.
28. Wolf G.: Das subdurale Haematom und die Pachymeningitis haemorrhagica interna, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962, 65—70.

Adres autora: Klinika Neurologii PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

MILENA LAURE-KAMIONOWSKA

WPLYW GESTOZY NA MÓZG PŁODU

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik Pracowni: prof. dr M. Dąbska

W okresie okołoporodowym może zadziałać wiele czynników stwarzających zagrożenie dla płodu i noworodka. Choroby matki stwarzają niekorzystne dla płodu warunki rozwoju, wpływające na zaburzenie wymiany składników krwi matki i płodu bezpośrednio poprzez zmianę właściwości krwi matki, bądź pośrednio, wywołując uszkodzenie łożyska. Badania neuropatologiczne sugerują, że uszkodzenie OUN, odgrywające istotną rolę w złej adaptacji noworodka do samodzielnego życia występuje w przypadkach obciążonych patologią ciąży (Nyka 1976). Zaobserwowano, że noworodki pochodzące z ciąż powikłanych chorobami matki mają opóźniony wzrost wewnątrzmaciczny, a ponadto stwierdzano u nich częściej niż w populacji ogólnej zespół mózgowego porażenia dziecięcego.

Badania statystyczne wykazały zależność między częstością występowania powyższych zmian, a jednym z częstszych powikłań ciąży, jakim jest gestoza (Hagberg i wsp. 1976). U około 8% kobiet stwierdza się w drugiej połowie ciąży zespół objawów chorobowych manifestujący się obrzękami, nadciśnieniem i białkomoczem. Nazwa tego zespołu — gestoza jest odpowiednikiem dawnych określeń: zatrucie ciążowe, toksemia (Michałkiewicz 1977). Zwrócono uwagę, że gestoza nie tylko jest jednym z czynników prowadzących do hipotrofii, czyli mniejszej wagi i wzrostu noworodka w stosunku do długości trwania życia płodowego (Gruenwald 1963), ale wywiera wpływ na zwiększenie umieralności okołoporodowej (Röttger 1957) i stanowi jedną z przyczyn wcześniactwa (Brown i wsp. 1946). Przy ocenie wpływu gestozy na płód nie przeprowadzono dotąd dokładnych badań neuropatologicznych. Jedynie dawne obserwacje Brasha (1949) sugerują wzrost częstości występowania krwotoków domózgowych oraz innych uszkodzeń będących następstwem asfiksji. O uszkadzającym wpływie

gestozy na mózg płodu mówiono jedynie, wymieniając ją łącznie z innymi procesami chorobowymi, które mogą oddziaływać w okresie życia wewnątrzmacicznego. Wynikało to prawdopodobnie z tego, że kryteria rozpoznawcze zespołu zmian składających się na obraz gestozy nie były ściśle określone. Pod pojęciem zatrucia ciążowego występowały różnorodne obrazy kliniczne. Komitet do Spraw Gestoz, który obradował w Bazylei w 1972 roku, wprowadził nowy podział gestoz i ujedynolicił nazewnictwo, co umożliwiło dokładniejsze zbadanie wpływu tego poważnego i groźnego dla płodu powikłania ciąży. Za wykładniki gestozy przyjęto wartość ciśnienia skurczowego krwi powyżej 140 mm Hg, rozkurczowego powyżej 90 mm Hg, wzrost ciśnienia skurczowego w przebiegu ciąży o 30 mm Hg, bądź rozkurczowego o 15 mm Hg, zawartość białka w moczu powyżej 0,5‰, oraz uogólnione i występujące rano obrzęki. Do rozpoznania gestozy wystarczy silnie wyrażony jeden z objawów. Podział gestoz według wymienionych wyżej objawów jest następujący:

1) gestozy monosymptomatyczne — gdy występuje jeden z poniższych objawów: obrzęki (*edema*) — gestozą E, białkomocz (*proteinuria*) — gestozą P, nadciśnienie (*hypertensio*) — gestozą H

2) gestozy polisymptomatyczne — gdy występują dwa lub trzy objawy: obrzęki i nadciśnienie — EH, obrzęki i białkomocz — EP, nadciśnienie — EPH

3) zrzucawka (*eclampsia convulsiva*) — EC, gdy w przypadku gestozy wystąpią drgawki.

Celem niniejszej pracy jest analiza wpływu gestozy na rozwój OUN, prześledzenie topografii i struktury uszkodzeń mózgu płodu, oraz ustalenie zależności między obserwowanymi zmianami morfologicznymi w OUN, a obrazem klinicznym i zmianami w narządach wewnętrznych.

MATERIAŁ I METODY

Opracowanie dotyczy 50 noworodków zmarłych w wieku 24—42 tygodni życia płodowego, urodzonych przez kobiety, u których podczas ciąży wystąpiła gestozą. Opracowywane przypadki wybrano spośród 636 noworodków zmarłych w latach 1963—1978 w II Klinice Położnictwa i Ginekologii Instytutu Położniczo-Ginekologicznego AM w W-wie, których mózgi objęte były badaniem neuropatologicznym w Pracowni Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN. Pod uwagę brano wszystkie gestozy, z wyjątkiem gestozy obrzękowej (E), której nie uwzględniono, z powodu dużej subiektywności w ocenie objawu.

Stopień ciężkości gestozy oceniano obliczając indeks gestozy według tabeli 1 (Michałkiewicz 1977).

Tabela 1. Obliczanie indeksu gestozy
Table 1. Calculation of gestosis index

Objawy Symptoms	Punkty Points			
	0	1	2	3
obrzęki edema	brak none	połudzi shin	uogólnione generalized	—
białkomocz (‰) proteinuria	0,5	0,5—2,0	2,0—5,0	5,0
ciśnienie tętnicze skurezowe (mmHg) systolic blood pressure	140	140—160	160—180	180
ciśnienie tętnicze rozkurzowe (mmHg) diastolic blood pressure	90	90—100	100—110	110

Indeks gestozy od 1 do 4 punktów odpowiada lekkiej postaci, od 5 do 8 punktów średnio-ciężkiej, a powyżej 8 punktów — ciężkiej gestozi.

Gestosis index of 1 to 4 points corresponds to the light form, of 5 to 8 — to mild-severe, and above 8 points — to severe gestosis.

Do badań neuropatologicznych pobrano reprezentatywne skrawki z półkul mózgu i mózdzku oraz przekroje przez pień mózgu na poziomie śródmózgowia, mostu i opuszki. Materiał zatapiający w parafinie barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu i metodą Klüver-Barrera. Przeprowadzono również badania mikroskopowe łożysk i narządów wewnętrznych. Przy ocenie rozwoju noworodka poddano analizie wiek, obliczany na podstawie czasu trwania ciąży (wiek ciążowy), wiek oceniany w oparciu o ciężar i długość noworodka oraz na podstawie dojrzałości histologicznej narządów wewnętrznych i mózgu. Długość noworodka odpowiadającą określonej wiekowi rozwojowemu ustalono w oparciu o wyniki pracy Brandta (1949). Waga urodzeniowa była porównywana z krzywymi wzrostu wewnątrzmacicznego opracowanymi przez Janczewską (1980) oraz podanymi przez Larroche (1977). Dojrzałość histologiczną płuc oceniano w oparciu o wyniki pracy Naeye i Kelly (1966). Rozwój mózgu ustalono oceniając zasób macierzy przykomorowej, uzwojenie i rozwój uwarstwienia kory mózgu, uzwojenie i rozwój uwarstwienia kory mózdzku, stopień mielinizacji pnia i zwojów podstawy.

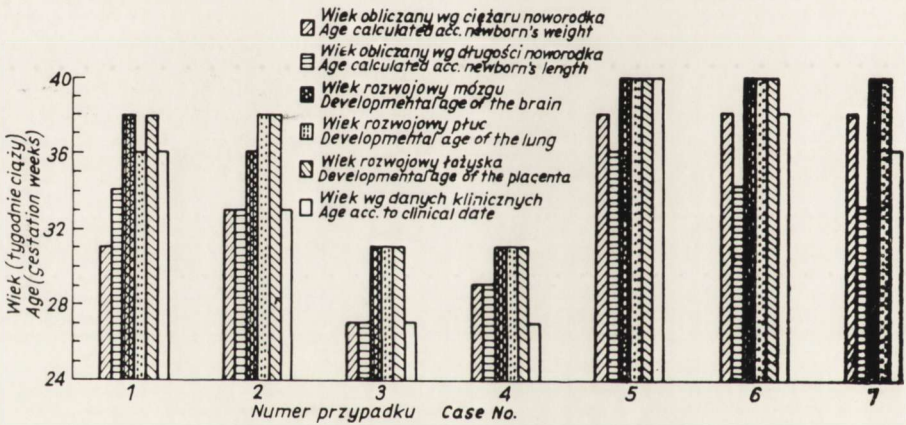
Przy ocenie mielinizacji dróg pnia mózgu i zwojów podstawy wzięto pod uwagę wyniki badań Yakovleva i Lecours (1967) oraz Rorke i Riggs (1972), przy ocenie uzwojenia i uwarstwienia kory mózgu — pracę Larroche (1962), a dla mózdzku dane Friedego (1973). Gniazda macierzy przykomorowej oceniano w oparciu o pracę Larroche (1977). Przy ocenie rozwoju mózgu noworodka, nie rozpatrywano ciężaru mózgu, ze względu na nieporównywalność danych (niektóre mózgi były ważone przed, inne po utrwaleniu, mózgi sekcjonowane przed utrwaleniem nie były ważone).

WYNIKI

Zebrane przypadki przeanalizowano pod kątem wpływu gestozy na rozwój mózgu na tle ogólnego rozwoju noworodka. Wyodrębniono następujące grupy: grupa I — obejmuje noworodki hipotroficzne bez opóźnienia rozwoju mózgu; grupa II — noworodki hipotroficzne z opóźnieniem dojrzewania mózgu; grupa III — noworodki eutroficzne, wykazujące wybiórcze opóźnienie rozwoju mózgu; grupa IV — noworodki o nadmiernej wadze urodzeniowej pochodzące z ciąży powikłanych poza gestozą również cukrzycą matki; grupa V — obejmuje noworodki, u których wiek ciąży pokrywa się z wiekiem rozwojowym narządów.

Grupa I

W grupie noworodków hipotroficznych wiek rozwojowy obliczany w oparciu o dojrzałość histologiczną mózgu, płuc i łożyska oraz wiek ciąży pokrywały się, podczas gdy waga i długość noworodków były mniejsze (ryc. 1).



Ryc. 1. Grupa I. Noworodki hipotroficzne. Wiek rozwojowy według wybranych parametrów.

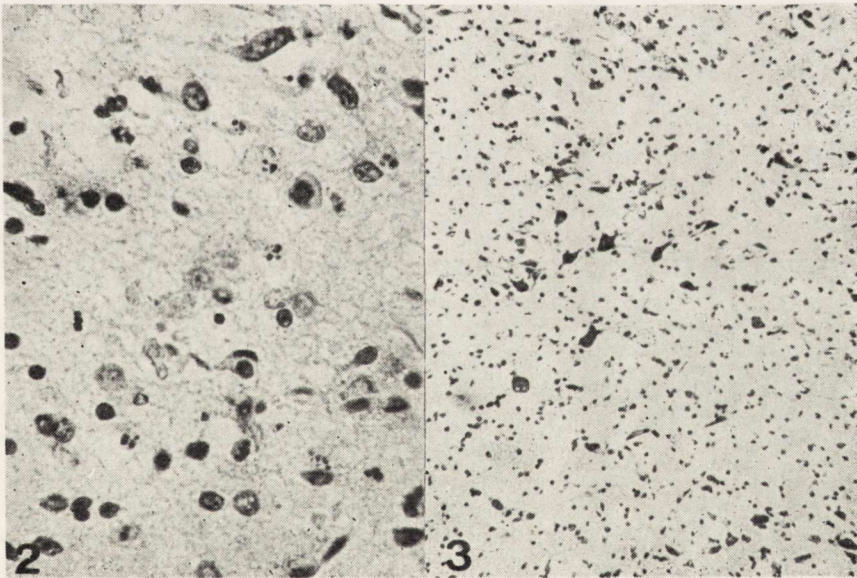
Fig. 1. Group I. Hypotrophic newborns. Developmental age according to the chosen parameters.

Objawy kliniczne gestozy w tej grupie były różne. Wystąpiły gestozy EH, H i P średniego stopnia, gestozy EPH ciężkiego i średniego stopnia i rzucawka po 4-tygodniowym stopniowym narastaniu objawów. Czas trwania gestozy był w części przypadków trudny do dokładnego określenia ze względu na brak wiarygodnego wywiadu, ale stwierdzono, że nie był krótszy niż 4 tygodnie. Objawy gestoz narastały stopniowo. W kilku przypadkach wystąpiły zmiany na dnie oka,

na tle wysokich wartości ciśnienia zarówno skurczowego jak i rozkurczowego. Białkomocz również osiągnął wysokie wartości, w moczu obecne były wałeczki. W grupie tej zaznaczała się przewaga noworodków donoszonych. Poród odbywał się siłami natury, tylko w przypadku rzucawki ciężarną rozwiązywano cięciem cesarskim. Dzieci rodziły się słabe, do zgonu dochodziło w czasie porodu, lub w kilka minut po porodzie. Ponad jedną dobę przeżyły dwa noworodki. W badaniach anatomopatologicznych w narządach wewnętrznych obserwowano głównie zmiany o typie niedotlenieniowym, w dwóch przypadkach zapalenie płuc. W łożyskach zmiany były miernie nasilone, dotyczyły głównie kosmków.

W obrazie neuropatologicznym zmiany dotyczyły zarówno struktur szarych, jak i istoty białej. Uszkodzenie struktur szarych było średnio nasilone z przewagą zmian w korze. Najwyraźniejsze zmiany stwierdzono w korze hipokampa, w postaci rozsianych uszkodzeń i ubytków neuronów. W jednym przypadku obserwowano *karyorrhexis* w obrębie kory amonalnej (ryc. 2). Gałka błada i prążkowie były nieznacznie uszkodzone, podobnie jak wzgórze.

We wszystkich przypadkach stwierdzono, wyrażające się ubytkami, uszkodzenia neuronów w strukturach pnia mózgu. W przerzedzonych



Ryc. 2. Rozpad neuronów w korze amonalnej. Fiolet krezylu. Pow. 400 \times .

Fig. 2. Destruction of neurons in Ammon's horn. Cresyl violet. \times 400.

Ryc. 3. Uszkodzenie komórek nerwowych tworzącego siatkowatego. Fiolet krezylu. Pow. 200 \times .

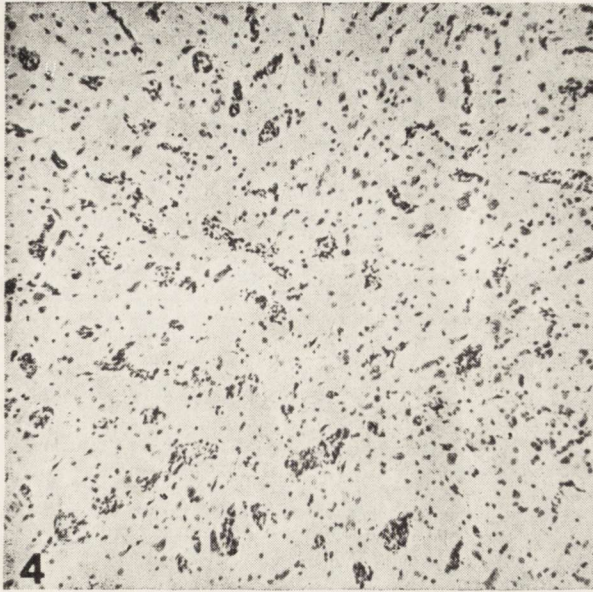
Fig. 3. Damage of neurons in reticular formation. Cresyl violet. \times 200.

strukturach część neuronów była ciemna, obkurczona. Najsilniej wyrażone zmiany przedstawiały przypadki 1 i 3, przebieg gestozy w tych przypadkach był najcięższy. W przypadku 3, w którym doszło do zgonu wewnątrzmacicznego stwierdzono wyraźne zmiany w tworze siatkowatym (ryc. 3). Podobne uszkodzenia można było zaobserwować w oliwach, w ich częściach dolnobocznych, w jądrach nerwów czaszkowych III, IV, V, VII, VIII, jądrach pęczka smukłego i klinowatego. W dwóch przypadkach (2 i 3) uszkodzenia pnia przeważały nad uszkodzeniami innych struktur. W przypadku 3, dominującym objawem było pomnożenie sieci naczyń włosowatych w części nakrywkowej opuszki (ryc. 4). W istocie białej oprócz uogólnionego zastojów widoczne były w otoczeniu drobnych naczyń przesieki rozlewające się nieostro w tkance i zaznaczające się rozluźnieniem podłoża i różnicą w jego barwliwości. W dwóch przypadkach, 6 i 7, zaobserwowano wczesne zmiany martwicze, a w przypadku 5 — wyraźne ognisko przykomorowej martwicy skrzepowej. Zastój żylny w naczyniach śródmiąższowych był różnie nasilony.

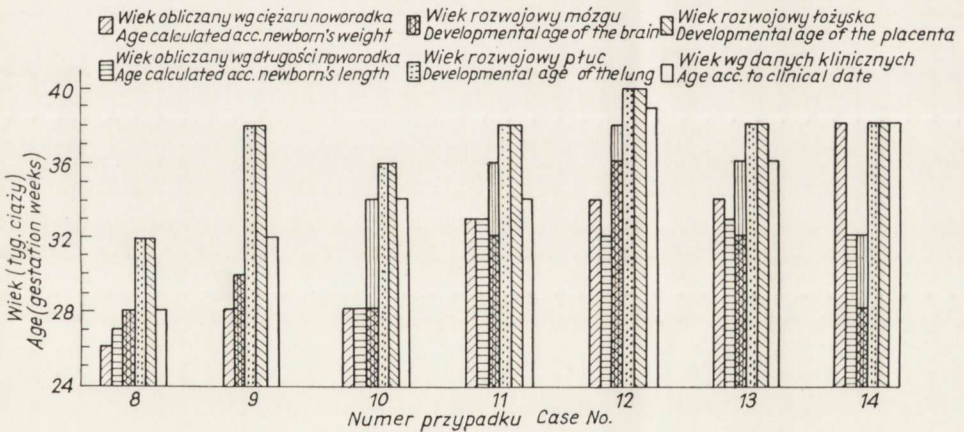
Grupa II

Ryc. 5 przedstawia przypadki, w których wiek oceniany na podstawie wagi i długości oraz dojrzałości mózgu był młodszy od wieku, ocenianego w oparciu o dojrzałość innych narządów i od wieku klinicznego. W odniesieniu do tej grupy można mówić o wewnątrzmacicznym opóźnieniu wzrostu i opóźnieniu rozwoju mózgu (ryc. 6 a, b, 7 a, b). W grupie tej można zauważyć w pięciu przypadkach rozbieżność między wiekiem mózgu, ocenianym na podstawie mielinizacji, a wiekiem mózgu ocenianym na podstawie zasobu macierzy oraz dojrzałości uwarstwienia kory mózgu i mózdzku. Wiek „mielinowy” w tych przypadkach jest młodszy o około 4 tygodnie. Są to przypadki, w których stwierdzono uszkodzenie istoty białej w półkulach mózgu.

Gestozą we wszystkich przypadkach tej grupy była ciężka, indeks wynosił powyżej 6 punktów. Wartości ciśnienia osiągały 160—200/110—130 mm Hg. W dwóch przypadkach długotrwałe nadciśnienie doprowadziło do zmian na dnie oka; powikłaniem jednego przypadku było odklejenie siatkówki. Białkomocz występował w trzech przypadkach (0,16‰; 1,9‰; 7,7‰). Towarzyszyła mu obecność w moczu wałeczków ziarnistych i szklisto-ziarnistych. Występowały objawy niewydolności kłębkowej nerek (wzrost poziomu kreatyniny, mocznika, kwasu moczowego) oraz niewydolności kanalikowej (niski ciężar właściwy moczu, poliuria). Czas trwania gestozy był w tej grupie długi i wynosił ponad dwa miesiące. Gestozy były leczone, obserwowano

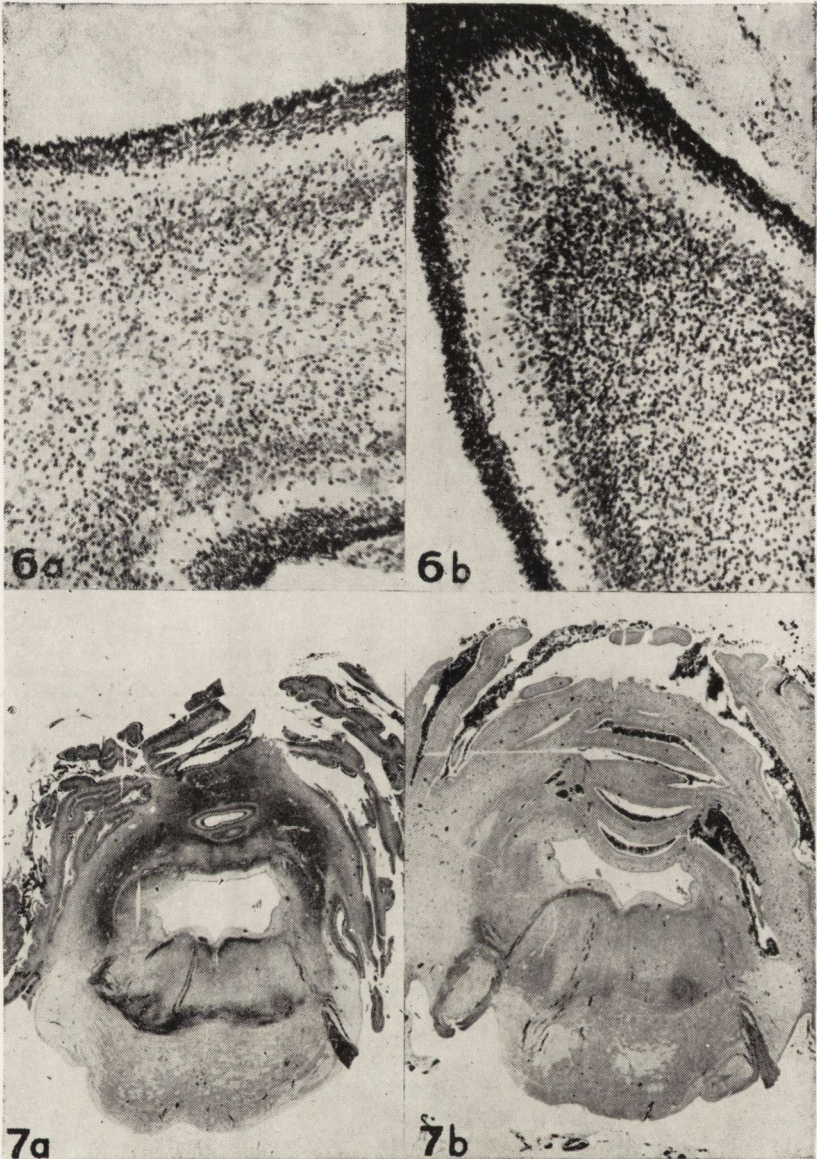


Ryc. 4. Pomnożenie sieci naczyń opuszki. Fiolet krezyłu. Pow. 100 X.
 Fig. 4. Proliferation of vessels in medulla oblongata. Cresyl violet. X 100.



Ryc. 5. Grupa II. Noworodki hipotroficzne z opóźnieniem rozwoju mózgu. Wiek rozwojowy według wybranych parametrów.
 Fig. 5. Group II. Hypotrophic newborns with delayed brain development. Developmental age according to the chosen parameters.

okresową poprawę w nasileniu objawów. Cięższe ze względu na ciężki przebieg rozwiązywane były cięciem cesarskim. Noworodki rodziły się w złym stanie, w dwóch przypadkach zgon nastąpił w czasie porodu, w trzech przeżycie było krótsze niż 24 godz. Z dwóch przypad-



Ryc. 6. Kora półkul mózdzku. a) noworodek w wieku ciążowym 34 tyg. Rozwój mózdzku opóźniony odpowiada 28 tyg. Przyp. 19/73. b) norma dla wieku 34 tyg. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×.

Fig. 6. The cortex of the cerebellar hemispheres. a) newborn at the intrauterine age of 34 weeks. Delayed cerebellum development corresponding to 28th week. Case 19/73. b) normal state for the age of 34 weeks. Cresyl violet. × 100.

Ryc. 7. Mielinizacja dróg nerwowych mostu i mózdzku. a) noworodek donoszony (norma), b) noworodek w 38 tyg. rozwoju. Mielinizacja opóźniona odpowiadająca 28 tyg. rozwoju. Przyp. 74/64. Barwienie met. Klüver-Barrera. Pow. 100 ×.

ków o przeżyciu ponad 3 doby, jeden noworodek był cały czas w stanie ciężkim, u drugiego pogorszenie nastąpiło po 48 godz. Patologia łożyska występowała we wszystkich przypadkach, obserwowano zmiany naczyń kosmków (zarastanie tętnic, mikrozawały), podścieliska (włóknienie) i trofoblastu.

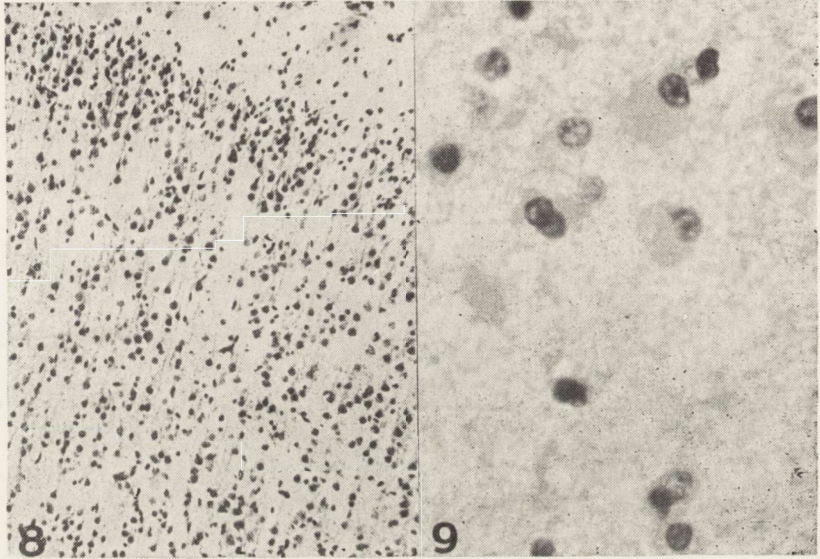
Powyższą grupę w badaniu neuropatologicznym cechowało bardzo duże uszkodzenie struktur nerwowych, wykazujące zależność od stopnia uszkodzenia łożyska i obrazu klinicznego gestozy. Zasadniczy obraz zmian był podobny do stwierdzanego w poprzedniej grupie, ale były one bardziej nasilone. Zwłaszcza w obrębie kory często obserwowano warstwowe wypadanie komórek (ryc. 8), większe były, prawdopodobnie wtórne, zmiany w obrębie wzgórza. W tej grupie również we wszystkich przypadkach stwierdzono uszkodzenie struktur pnia. W połowie przypadków można było nawet ustalić przewagę uszkodzeń pnia nad uszkodzeniem półkul mózgu. Prawie we wszystkich przypadkach zwracały uwagę uszkodzenia występujące w istocie białej półkul mózgu. W przypadku 8, 9 i 13 zmiany były dyskretne. W kilku polach w istocie białej półkul widoczne było wyraźne rozrzedzenie struktury. Astrocyty były pobudzone, z dobrze widoczną cytoplazmą, ale bez powiększenia ich liczby. Pozostałe przypadki przedstawiały daleko posunięty rozpad istoty białej (ryc. 9). Spotykano tu pola martwicy niezupełnej, rozplywnej i skrzepowej. W obrębie, i wokół pół martwicy, stwierdzono przerost astrogleju i mikrogleju z obecnością makrofagów. W przypadku 11, również w środkowej części zawojów, doszło do powstania ognisk martwicy obrzękowej. Podobne zmiany obserwowano w przypadku 11 i 13, w mózdzku, w okolicy wnęki jądra zębatego. W czterech przypadkach, w których wiek mózgu wynosił 28—32 tygodni życia płodowego, wystąpiły przykomorowe krwotoki do gniazd macierzy. Zastój żylny w naczyniach śródmiąższowych był miernie nasilony i dotyczył zarówno półkul jak i pnia mózgu. W dwóch przypadkach przekrwienie było szczególnie nasilone w naczyniach pnia mózgu, obserwowano pomnożenie sieci kapilarów.

Grupa III

Ryc. 10 przedstawia przypadki, w których mózgi wykazują opóźnienie dojrzewania w stosunku do innych badanych parametrów roz-

Fig. 7. Myelination of the pons and cerebellar nervous tracts. a) Mature newborn (norm), b) newborn at 38th week of the development. Delayed myelination corresponding to 28th week of the development. Case 74/64. Staining after Klüver-Barrera method. $\times 100$.

woju (ryc. 11 a, b). Jest to grupa czterech noworodków donoszonych, urodzonych w ciężkim stanie. Zgon dwóch z nich nastąpił bezpośrednio po porodzie. W przypadkach tych gestoza matki była ciężka. W pozostałych dwóch przypadkach względnie lekkiej gestozy przeżycie noworodków było dłuższe. Badanie anatomopatologiczne ujawniło we wszystkich przypadkach cechy ogólnego niedotlenienia, zapalenie płuc, w jednym wadę serca. W łożyskach zwracały uwagę niewielkie zmiany zwyrodnieniowe.



Ryc. 8. Przerzedzenie i uszkodzenie komórek nerwowych głównie warstwy III kory ruchowej noworodka donoszonego. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .

Fig. 8. Depletion and damage of neurons in the IIIrd layer of the motor cortex of mature newborn. Cresyl violet. \times 100.

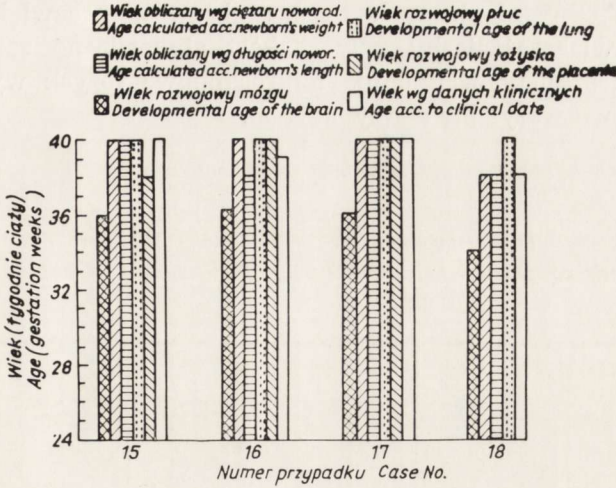
Ryc. 9. Rozpad istoty białej, martwica rozplywna. H-E. Pow. 400 \times .

Fig. 9. Desintegration of the white matter, colliquative necrosis. H-E. \times 400.

W badaniu neuropatologicznym stwierdzono uszkodzenia komórkowe różnie nasilone. Najwyraźniej uszkodzona we wszystkich przypadkach była kora mózgu, zmiany w innych strukturach były mniejsze.

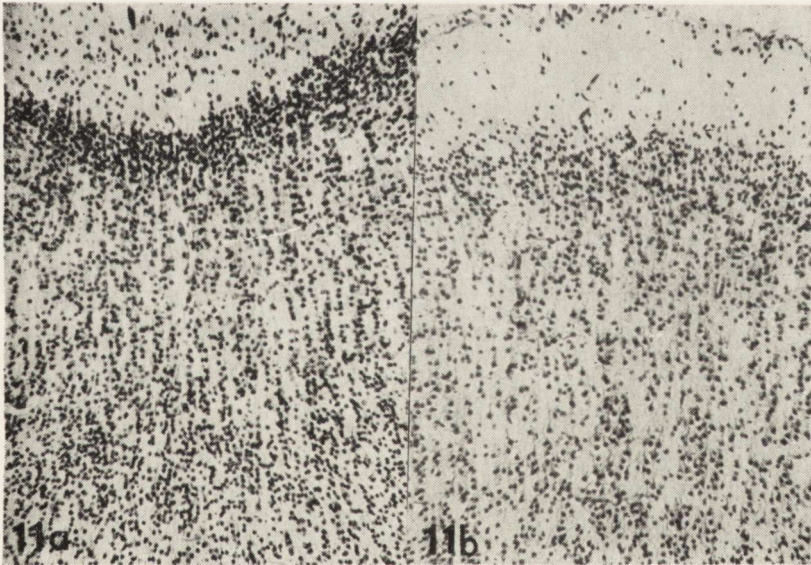
Grupa IV

Osobną grupę stanowią noworodki, których matki poza gestożą chorowały na cukrzycę jawną bądź utajoną (ryc. 12). Noworodki tej grupy wykazywały zwiększenie wagi i wzrostu. Gestoza w przypadkach należących do tej grupy była średniego i lekkiego stopnia. Ciąże rozwiązywane były cięciem cesarskim. Charakterystyczny był, dłuższy niż w poprzednich grupach, czas przeżycia noworodków. W ba-



Ryc. 10. Grupa III. Noworodki eutroficzne z opóźnieniem rozwoju mózgu. Wiek rozwojowy według wybranych parametrów.

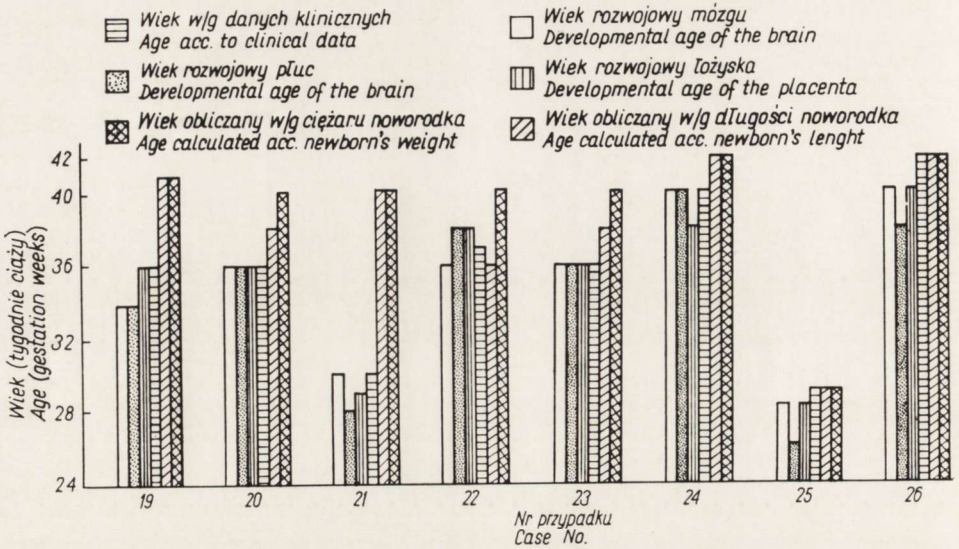
Fig. 10. Group III. Eutrophic newborn with delayed brain development. Developmental age according to the chosen parameters.



Ryc. 11. Kora ruchowa półkul mózgu. a) noworodek donoszony, rozwój kory mózgowej opóźniony. Przyp. 3/65, b) norma dla wieku rozwojowego 40. Fiolet krezyli. Pow. 100 X.

Fig. 11. Motor cortex of the brain hemispheres. a) mature newborn, delayed development of the brain cortex. Case 3/5, b) norm for the developmental age of 40 weeks. Cresyl violet. X 100.

daniach anatomopatologicznych oprócz objawów przewlekłego niedotlenienia, u większej liczby noworodków stwierdzono zapalenie płuc i zespół błon szklanych. Badanie mikroskopowe łożysk wykazało rozległe zmiany we wszystkich przypadkach.



Ryc. 12. Grupa IV. Noworodki z ciąży powikłanej gestozą i cukrzycą. Wiek rozwojowy według wybranych parametrów.

Fig. 12. Group IV. Newborns from a pregnancy complicated with gestosis and diabetes. Developmental age according to the chosen parameters.

Uszkodzenie struktur nerwowych w tej grupie wydaje się mniejsze, niż wynikałoby to z nałożenia się dwóch zespołów chorobowych u matki w czasie ciąży. Zmiany dotyczyły głównie komórek nerwowych kory i pnia mózgu, uszkodzenie istoty białej było nieznaczne. Dominowały zmiany obrzękowe w korze i istocie białej.

Grupa V

Grupa ta obejmuje 24 przypadki gestozy, w których wiek ciążowy pokrywał się z wiekiem rozwojowym narządów. Gestozą wykazywała różny przebieg, w większości przypadków była lekka, krótko trwająca, ale obserwowano tu również gestozy ciężkie. Zmiany w łożyskach były w większości przypadków niewielkie. Charakter i topografia uszkodzeń struktur mózgowych były w tej grupie podobne do poprzednich, ale ich nasilenie było różne. Duża liczba przypadków w tej grupie i duża rozbieżność nasilenia objawów gestozy w poszczególnych przypadkach pozwala na stwierdzenie wyraźnej zależności między postacią gestozy a stopniem uszkodzeń OUN.

We wszystkich prawie przypadkach stwierdzono uszkodzenie komórek nerwowych pnia. Obserwowano nasilone zmiany we wszystkich strukturach opuszki. Schorzenie ischemiczne, ubytki neuronów widoczne były w oliwach, tworze siatkowatym, jądrach czuciowych i ruchowych pnia. W sześciu przypadkach zmiany dotyczyły głównie tworze siatkowatego. Zlokalizowane były w neuronach jądra wielkokomórkowego, neuronach wokół pęczka samotnego i w okolicy jądra dwuznacznego.

OMÓWIENIE

Dla uzyskania odpowiedzi na sformułowane w niniejszej pracy pytania, potrzebna była możliwie duża grupa przypadków przebadanych i ocenianych według tych samych metod i kryteriów. Uzyskanie wystarczającej liczby przypadków było możliwe przy wykorzystaniu materiału obejmującego okres 15 lat. Zaletą materiału pochodzącego z tego samego oddziału położniczego i badanego zawsze w tych samych warunkach, jest zapewnienie jednolitości badań klinicznych, anatomopatologicznych i neuropatologicznych. Niedostatkami jest brak niektórych specjalistycznych badań klinicznych, które stopniowo wprowadzane i ulepszane, są niejednolite i nie nadają się do porównania. Nie dysponowaliśmy badaniami określającymi przyzyciowo stopień niedotlenienia płodu, np. pomiary ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi pępowinowej. Ich analiza mogła być przydatna, ponieważ Ewerbeck (1966) stwierdził w gestozie obniżenie różnicy ciśnienia parcjalnego tlenu między krwią matki i płodu. Brak nam również wyników badania stopnia zakwaszenia krwi pępowinowej, co uniemożliwia ocenę stopniowego narastania kwasicy w krwi płodu obserwowaną przez Kyank'a i Eggerta (1963). Również nie we wszystkich przypadkach przeprowadzone było badanie mikroskopowe łożyska.

Przebadane przypadki podzieliliśmy na pięć grup, przyjmując jako kryterium podziału ocenę rozwoju mózgu noworodka w stosunku do jego rozwoju ogólnego i dojrzałości narządów. Z przedstawionych wyników badań wynika, że gestoza wywołuje dwa rodzaje zmian: zaburzenia ogólnego rozwoju noworodka i jego OUN oraz uszkodzenia mózgu o typie przede wszystkim niedotlenieniowym. Zaburzenia rozwojowe noworodka mogą przybierać różne formy. Przyczyną niskiej wagi urodzeniowej mogą być wszystkie czynniki wpływające niekorzystnie na rozwój płodu, a szczególnie każda nieprawidłowo przebiegająca ciąża (Dawes 1968). Jak wspomniano we wstępie niniejszej pracy wielokrotnie obserwowano, że gestoza wywiera wpływ na wielkość płodu. W naszym materiale do wewnątrzmacicznego opóźnienia

wzrostu doszło w 30% badanych przypadków. Ich ocena wykazuje, że hipotrofia płodu wystąpiła w przypadkach, w których objawy gestozy ujawniły się wcześniej, stopniowo narastały i utrzymywały się przez okres co najmniej sześciu tygodni. W łożyskach tych płodów powstały rozległe zmiany w obrębie kosmków. Obserwowano zmiany zwyrodnieniowe syncytiotrofoblastu, włóknienie podścieliska, obrzęk zrębu. Podobne zmiany opisali w gestozie Michałkiewicz i wsp. (1973). Prowadzą one do wzrostu „grubości” elementów bariery łożyskowej, wydłużenia drogi wymiany między matką a płodem, a więc do gorszego odżywienia rozwijającego się płodu. Altshuler i wsp. (1975) badając łożyska noworodków za małych w stosunku do wieku ciążowego, u 25% wykazał uszkodzenie kosmków.

Badania Gruenwalda (1963), Myersa i wsp. (1971) i Larroche (1977), przemawiają za tym, że w przypadkach z hipotrofią noworodka mózg i nerki są narządami najmniej upośledzonymi w rozwoju. Chase i wsp. (1972) natomiast, obserwowali u dzieci z wewnątrzmacicznym opóźnieniem wzrostu zmniejszenie ciężaru mózgu, niższą niż w normie zawartość DNA i cerebrozydów. Doświadczalne badania Winnicka i wsp. (1974) sugerują, że mózg płodu w przypadkach hipotrofii nie jest zaoszczędzony, gdy stopień niedożywienia matki i płodu jest duży. W naszym materiale w 20% badanych przypadków wystąpiło opóźnienie dojrzewania mózgu płodu, siedem przypadków wykazało upośledzenie rozwoju mózgu na tle ogólnej hipotrofii noworodka, a w czterech przypadkach opóźnienie rozwoju mózgu wystąpiło u noworodków eutroficznych.

W większości mózgow, których wiek rozwojowy ocenialiśmy, stwierdziliśmy różnie nasilony zespół uszkodzeń. W kilku przypadkach w grupie noworodków hipotroficznych, z opóźnieniem rozwoju mózgu, stwierdziliśmy rozbieżność pomiędzy wiekiem określanym na podstawie stopnia mielinizacji, a ocenianym na podstawie innych parametrów. Zjawisko to można tłumaczyć wystąpieniem w tych przypadkach przewlekłych zmian w istocie białej, które mogły zaburzyć wstępny okres mielinizacji. Wynika stąd zastrzeżenie, które wysuwała również Larroche (1977), że uszkodzenia struktur mózgu utrudniają ocenę ich dojrzewania. W naszym materiale porównywano w każdym przypadku kilka parametrów dojrzłości mózgu, dzięki czemu, nawet w przypadkach z uszkodzeniami można było określić wiek rozwojowy mózgu. W większości z nich, stopień zmian morfologicznych nie był tak duży, aby można było je uznać za czynnik wpływający na upośledzenie rozwoju. W sumie ocena całego materiału pozwala na stwierdzenie, że widoczne w badaniu mikroskopowym uszkodzenia OUN niewątpliwie wpływają na jego dalszy rozwój w całości lub w zakre-

sie poszczególnych struktur, ale opóźnienie rozwoju występuje również jako objaw nie będący następstwem ogniskowych uszkodzeń.

Trudny do wyjaśnienia jest patomechanizm wybiórczego opóźnienia rozwoju mózgu u czterech noworodków eutroficznych. Gestoza w tych przypadkach wykazywała ostry początek. Można więc przypuszczać, że odegrało rolę nagłe zadziałanie czynnika szkodliwego, którego nie można bliżej określić, ponieważ patomechanizm gestozy nie jest znany. Opóźnienie rozwoju byłoby wyrazem złej adaptacji układu nerwowego do nagle zmienionych warunków życia wewnątrzmacicznego.

W grupie przypadków powikłanych łącznie gestożą i cukrzycą, uwidocznił się wpływ zaburzeń metabolicznych występujących w przebiegu cukrzycy. Powodują one nadmierny wzrost i nadwagę płodów (Laure-Kamionowska i wsp. 1980). W ocenianej grupie nasilenie gestozy i objawów cukrzycy było miernego stopnia, tak, że nie wystąpiło w niej opóźnienie rozwoju mózgu.

Opóźnienie rozwoju OUN w porównaniu z rozwojem ogólnym płodu ma duże znaczenie ze względu na dalszy rozwój dziecka. U wielu dzieci pochodzących z ciąż powikłanych gestożą, które przeżyły, obserwowano upośledzenie rozwoju psychoruchowego oraz padaczkę (Degen 1978). Przyczyną tych zmian mogą być nie tylko uszkodzenia struktur OUN ale również młodszy wiek mózgu w momencie porodu.

Uszkodzenia mózgu, które zaobserwowano w przebiegu gestozy przedstawiają obraz taki, jaki stwierdza się w niedotlenieniu. Gestoza stanowi wyraźne obciążenie noworodków prawie donoszonych powyżej 36 tygodnia ciąży. Wyniki badań Nyki (1976) sugerują, że wcześniej dojrzewające struktury (kora amonalna, pień) są ciężiej uszkodzone w przypadkach niedotlenienia działającego w ostatnich tygodniach ciąży. Nasze badania obejmujące większą grupę przypadków, pozwoliły na potwierdzenie tej sugestii. W większości przypadków zbadanej grupy stwierdzono uszkodzenia pnia mózgu.

Na uszkodzenia komórek nerwowych pnia zwrócił uwagę Towbin (1970), podnosząc znaczenie urazu i krwotoku jako czynnika przyczyniającego się do uszkodzeń pnia mózgu. Podobne zmiany obserwowала Norman (1972) oraz Griffiths i Laurence (1974). W naszym materiale uszkodzenia komórkowe w pniu obserwowano zwłaszcza w gestozach długo trwających. W kilku przypadkach doszło do rozplemu sieci naczyniowej w obrębie pnia, co można traktować jako wyraz adaptacji do warunków przewlekłego niedostatku tlenowego (Brand, Bignami 1969).

Pod względem objawów klinicznych, noworodki, u których stwierdzono uszkodzenia pnia można podzielić na dwie grupy: grupa pierw-

sza obejmuje przypadki, w których śmierć wystąpiła w czasie porodu lub noworodki urodzone w ciężkim stanie (Apgar 1—3), zmarłe krótko po porodzie. W grupie drugiej czas przeżycia wynosił więcej niż 24 godz. Noworodki rodziły się w stanie dobrym (Apgar 8—10), po około 24 godz. występowała sinica, napad drgawek, zaburzenia oddychania i zgon. W obrazie neuropatologicznym u noworodków z grupy pierwszej stwierdzono bardzo nasilone zmiany we wszystkich strukturach opuszki. W grupie drugiej zmiany dotyczyły głównie tworów siatkowatego.

Podobne uszkodzenia pnia opisywane były przez Leecha i Alwolda (1977) u noworodków z niedotlenieniem, Norman (1972) zwraca uwagę na znaczną wrażliwość struktur pnia w okresie ich dojrzewania. Neurony tworów siatkowatego są wrażliwe na niedokrwienie i niedotlenienie w wieku dojrzałym, tym bardziej więc ulegają uszkodzeniu w okresie dojrzewania ich struktury i funkcji. Zmiany w obrębie regulacyjnych ośrodków pnia mózgu mogły być jedną z przyczyn zaburzeń oddychania i rozwijających się w konsekwencji powikłań płucnych. Objawy narastały stopniowo, pojawiła się bradykardia i sinica, doszło do objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej. Można przypuszczać, że w przypadkach tych ostry stres, jakim jest nawet fizjologiczny poród, spowodował nagłe pogorszenie stanu noworodka, u którego doszło do uszkodzenia komórek nerwowych tworów siatkowatego. Zaobserwowane korelacje morfologiczno-kliniczne wskazują, że uszkodzenia pnia mózgu powodują gorsze przystosowanie się noworodków do nowych warunków życia.

WNIOSKI

Przedstawione wyniki badań opracowane w oparciu o materiał pochodzący od noworodków zmarłych pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Gestoza upośledza rozwój ogólny płodu i w 25% przypadków prowadzi do opóźnienia rozwoju OUN.
2. Opóźnienie rozwoju mózgu, podobnie jak zaburzenia ogólnego rozwoju płodu uzależnione jest od czasu trwania gestozy i stopnia uszkodzenia łożyska.
3. W przebiegu gestozy dochodzi do uszkodzenia OUN, którego stopień jest związany z nasileniem gestozy.
4. Uszkodzenia pnia mózgu występują w większości przypadków gestozy. Ich nasilenie znajduje odbicie w stanie klinicznym i wpływa na długość przeżycia noworodka.

М. Ляурэ-Камионовска

ВЛИЯНИЕ GESTOZA НА МОЗГ ПЛОДА

Резюме

Исследовали 50 случаев новорожденных происходящих из беременности осложненной гестозом. В работе исследуется влияние гестоза на развитие мозга и полученная картина сравнивается с общим развитием плода. Была прослежена топография и структура повреждений мозга плода и корреляция между наблюдаемыми морфологическими изменениями в центральной нервной системе и клиническими, а также анатомопатологическими симптомами.

Нарушения развития плода могут принимать разные формы: гипотрофии, гипотрофии с опозданием развития мозга, опоздания развития мозга у эуτροφических новорожденных. Структура повреждений мозга прежде всего обнаруживает гипоксический тип изменений с отчетливой локализацией в стволе мозга. Повреждения ствола мозга имеют место в большинстве случаев гестоза. Их выраженность находит отражение в клиническом состоянии периода выживаемости новорожденного.

M. Laure-Kamionowska

EFFECT OF GESTOSIS ON THE FETAL BRAIN

Summary

The study dealt with 50 cases of newborns derived from pregnancies complicated by gestosis. The effect of gestosis on the brain development was analyzed and compared with the influence on the general development of the fetus. The topography and structure of the fetal brain lesions were investigated and the correlation of the morphological changes with the clinical and anatomopathological features was evaluated.

The disturbances of fetal development may assume different forms: hypotrophy, hypotrophy with a delayed development of the brain, delay of the brain development in the eutrophic newborns. The brain lesions were mostly of the anoxic type, with a distinct location in the brain stem and were observed to appear in most of the cases of gestosis. The intensity of the changes finds a reflection in the clinical condition and in the time of survival of the newborns.

PIŚMIENNICTWO

1. Altshuler G., Russel P., Ermocilla R.: The placental pathology of small for gestational age infants. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975, 121, 351—359.
2. Brand M., Bignami A.: The effects of chronic hypoxia on the neonatal and infantile brain. *Brain* 1969, 92, 233—255.
3. Brandt W.: *Lehrbuch der Embryologie*. S. Karger, Basel 1949, 99.
4. Brash A.: The effect of toxæmia of pregnancy upon the fetus and newborn child. *Arch. Dis. Child* 1949, 24, 107—110.
5. Brown E., Lyon R., Anderson N. A.: Causes of prematurity. Influence of toxæmia on the incidence of prematurity. *Amer. J. Dis. Child* 1946, 71, 378—382.

6. Chase P., Welch N., Dabiere C., Vason N., Butterfield J.: Alterations in human brain biochemistry following intrauterine growth retardation. *Pediatrics* 1972, 50, 403—411.
7. Dawes G. S.: The placenta and fetal growth. W: *Fetal and neonatal physiology*. Red. G. S. Daves, Year Book Med. Publ., Chicago, 1968, 42—59.
8. Degen R.: Epilepsy in children. An etiological study based on their obstetrical records. *J. Neurol.* 1978, 217, 145—158.
9. Ewerbeck M.: Die spätaŝphyxie und ihre Behandlung. W: *Die prophylaxe frühkindlichen Hirnŝchäden*. Red. R. Elert, Thieme Verlag, Stuttgart 1966, 162—170.
10. Friede L. R.: Dating the development of human cerebellum. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 23, 48—58.
11. Griffiths A. D., Laurence K. M.: The effect of hypoxia and hypoglycaemia on the brain of the newborn human infant. *Develop. Med. Child Neurol.* 1974, 16, 308—319.
12. Gruenwald P.: Chronic fetal distress and placental insufficiency. *Biol. Neonate* 1963, 5, 215—265.
13. Hagberg G., Hagberg B., Olow J.: The changing panorama of cerebral palsy in Sweden 1954—1970. III. The importance of foetal deprivation of blood supply. *Acta Paediatr. Scand. (Uppsala)* 1976, 65, 403—409.
14. Janczewska E.: Czynniki determinujące ciężar płodu. PZWL, Warszawa 1980 w druku.
15. Kyank M., Eggert J.: Determination of the values in the umbilical cord blood of newborn infants delivered by woman with toxemia of late pregnancy. *Biol. Neonate* 1963, 5, 50—58.
16. Larroche J. C.: Quelques aspects anatomiques du development cerebral. *Biol. Neonate* 1962, 4, 126—153.
17. Larroche J. C.: *Developmental pathology of neonate*. Excerpta Medica, Amsterdam, Londyn, Nowy York 1977.
18. Laure-Kamionowska M., Dąbska M., Jaczewska E., Czerwiński W.: Brain changes in newborns from diabetic mothers. *Z. Geburtsh. Perinat.* 1980, w druku.
19. Leech R. W., Alword E. C.: Anoxic-ischemic encephalopathy in the human neonatal period. The significance of brain stem involvement. *Arch. Neurol.* 1977, 34, 109—113.
20. Michałkiewicz W.: *Podręcznik położnictwa*. PZWL, Warszawa 1973.
21. Michałkiewicz W., Brębowicz H., Pisarski T.: *Histoklinika popłodu*. PZWL, Warszawa 1977, 474—478.
22. Myers R., Hill D. E., Holt A. B., Scott R., Mellits E., Cheek B.: Fetal growth retardation produced by experimental placenta insufficiency in the Rhesus monkey. I. Body weight. Organ size. *Biol. Neonate* 1971, 18, 379—394.
23. Naeye R. L., Kelly J. A.: Judgement of fetal age (The pathologic evaluation). *Ped. Clin. N. Am.* 1966, 13, 849—862.
24. Norman M. C.: Antenatal neuronal loss and gliosis of the reticular formation, thalamus and hypothalamus. *Neurology* 1972, 22, 910—916.
25. Nyka W.: Cerebral lesions of mature newborn due to perinatal hypoxia. II. Mother's disease. *Z. Geburtsh. Perinat.* 1976, 180, 295—299.
26. Rorke L. B., Riggs H. E.: Myelination of the brain in the newborn. *J. B. Lipincott, Philadelphia* 1972.

27. Röttger H.: Die perinatale Sterblichkeit der Neugeborenen bei Spätgestosen. *Geburtsh. Frauenheilk.* 1957, 17, 783—788.
28. Towbin A.: Central nervous system damage in the human fetus and newborn infant. *Amer. J. Dis. Child.* 1970, 119, 529—542.
29. Winnick M., Brasel J. A., Rosso P.: The effects of hormones and nutrition on fetal growth. W: *Early diabetes in early life.* Acad. Press, New York 1974, 3—9.
30. Yakovlev P., Lecours A.: The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. W: *Regional development of the brain in early life.* Minkowski, Oxford, Edinburgh, 1967, 3—70.

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

nień. Istotną zaletą książki jest zawarcie w każdym rozdziale pełnego tekstu dyskusji rozwijającej się w czasie poszczególnych sesji. Daje to czytelnikowi możliwość skonfrontowania własnego odbioru prac z ich percepcją przez uczestniczących w niej specjalistów i wyjaśnienia nasuwających się wątpliwości. Dodatkowym walorem książki jest niezwykle bogaty spis piśmiennictwa zamykający każdy z artykułów. Czyni to z niej cenne źródło bibliograficzne.

Uważam, że książka jest wysoce pożytecznym, wszechstronnym opracowaniem monograficznym, poświęconym społecznym, psychologicznym, klinicznym i biologicznym aspektom starzenia się mózgu. Jestem przekonany, że każdy zainteresowany przedmiotem znajdzie w niej bogaty zasób informacji, materiał do przemyśleń i inspirację badawczą. Warto ją mieć na półce bibliotecznej po to aby móc do niej często i łatwo sięgać.

Prof. dr hab. M. J. Mossakowski

KOMUNIKATY

W dniach 25 i 26 kwietnia 1980 r. odbędzie się w Krakowie Konferencja, której tematem będą postępy w rozpoznawaniu i leczeniu nowotworów glejopochodnych o.u.n.

Organizatorem Konferencji jest Komisja Neuroonkologii Komitetu Nauk Neurologicznych PAN oraz Oddział Krakowski Polskiego Towarzystwa Onkologicznego.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

doc. dr med. *Józef Kałuża*,

Zakład Neuropatologii AM, Botaniczna 3, 31-503 Kraków.

* * *

W okresie od 6 do 8 maja odbędzie się w Wiedniu I Europejski Kongres Neuropatologii.

Głównymi tematami Kongresu będą:

- neuropatologia doświadczalna,
- neuroonkologia,
- choroby zapalne i demielinizacyjne o.u.n.,
- neuroanatomia i neuropatologia rozwojowa,
- patologia nerwów obwodowych i mięśni,
- choroby metaboliczne układu nerwowego.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Prof. K. *Jellinger*, M. D.

Ludwig Boltzmann-Institute of Clinical Neurobiology Leinz Hospital
A-1130 Wien, Wolkersbergenstrasse 1.

* * *

Stowarzyszenie Neuropatologów Polskich wspólnie z Towarzystwem Neuropatologii i Neuroanatomii RFN organizuje Międzynarodowe Sympozjum Neuropatologiczne. Odbędzie się ono w Krakowie, w okresie od 17 do 21 września 1980 r.

Tematyka Sympozjum obejmuje następujące problemy:

- zwyrodnienie gąbczaste o.u.n. (aspekty kliniczne, morfologiczne i doświadczalne),
- neuroanatomia rozwoju i starzenia się mózgu,
- tematy wolne.

Termin zgłaszania uczestnictwa mija 1 kwietnia 1980.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

doc. dr med. *Józef Kałuża*,

Zakład Neuropatologii AM, ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków.

Jerzy Dymecki

KATARZYNA KUCHARSKA-DEMCZUK, ANNA POLEWSKA-JESKE

ATYPOWE LIMFOCYTY PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W ZAPALENIACH I PODRAŻNIENIACH OPON *

Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych
Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin
Kierownik: doc. dr B. Trzaska

W prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym (m.rdz.), limfocyty mają postać niewielkich komórek o średnicy 5—7 μm lub 10—15 μm , o dużym jądrze wypełniającym niemal całą komórkę i barwiącym się na fioletowo barwnikami zasadowymi, otoczonym wąskim rąbkim barwiącej się na niebiesko cytoplazmy. W zapaleniach opon, jak również w zespołach podrażnienia opon, pod wpływem działania różnych czynników antygenowych komórki te ulegają transformacji, w czasie której zachodzą w nich zmiany morfologiczne i czynnościowe. Przyjmuje się, że transformowane komórki limfoidalne płynu mózgowo-rdzeniowego odgrywają ważną rolę w procesach odpornościowych (Bischoff 1963; Sanberg 1973; Schwarze 1973; Guseo 1974; Kucharska-Demczuk 1975).

Celem niniejszej pracy była ocena morfologiczna, cytochemiczna oraz ocena aktywności fagocytarnej atypowych, transformowanych limfocytów płynu mózgowo-rdzeniowego, zwanych także formami przejściowymi (f.p.), w zapaleniach i zespołach podrażnienia opon. Postanowiono również dokonać analizy ilości i częstości występowania tych elementów komórkowych, w zależności od etiologii, fazy i przebiegu choroby.

MATERIAŁ I METODY

Badano płyn mózgowo-rdzeniowy od 624 chorych, w tym 393 mężczyzn i 231 kobiet, w wieku od 14 do 75 lat, leczonych w latach 1972—1978 w Klinice Chorób Zakaźnych PAM w Szczecinie *. Badaniami nie objęto gruźlicy i innych przewlekłych przypadków zapalenia opon, które będą przedmiotem osobnego doniesienia. W zależności od usta-

* — Badania wykonano przy pomocy technicznej pani Marii Zaremby.

lonego rozpoznania, chorych podzielono na następujące grupy: I — zapalenie opon i mózgu o etiologii wirusowej: świnkowe zapalenie opon i zespół podrażnienia opon, półpaścowe zapalenie opon i mózgu, kleszczowe zapalenie mózgu, limfocytowe zapalenie opon i mózgu; II — zapalenie opon i mózgu o etiologii bakteryjnej: ropne zapalenie opon i mózgu (meningokokowe, pneumokokowe i inne o etiologii nie ustalonej), leptospirowe zapalenie opon; III — zespoły podrażnienia opon w zakażeniach bakteryjnych: zapalenie zatok obocznych nosa, zapalenie płuc, angina ropna, zatrucia pokarmowe, zapalenie pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych, zapalenie nerek, inne zakażenia; IV — zespoły podrażnienia opon w zakażeniach wirusowych: grypa, ostry nieżyt górnych dróg oddechowych, ostre choroby wysypkowe, inne zakażenia.

Wykonano 967 badań cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego metodą osadową Sayka (1960), w komorze własnej konstrukcji (Kucharska-Demczuk 1974). Osady barwiono metodą May-Grünwald-Giemsy, a następnie oceniano jakościowo i ilościowo przez obliczanie składu odsetkowego komórek. Dla dokładniejszej oceny komórek i ich stanu czynnościowego wykonano następujące odczyny histochemiczne: oznaczanie aktywności esterazy nieswoistej wg Braunstëinera (1959), reakcję PAS na glikogen wg Manus-Hotchkissa (Woytowicz 1967), reakcję z Sudanem czarnym B na obecność lipidów wg Shechana i Storeya (Woytowicz 1967), reakcję na obecność mieloperoksydazy wg Sato i Sekiye'a (Woytowicz 1967), test NBT (redukcji błękitu nitrotetrazolowego wg Parka i wsp. 1968), badanie fagocytozy cząstek lateksu przy użyciu preparatu Bacto-Latex.

Na próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego, pochodzącego od 200 chorych, wykonano 464 badania cytochemiczne i cytoenzymatyczne (dane liczbowe podano w tabeli 3). U 39 chorych z tej samej próbki płynu wykonywano jednocześnie 4 oznaczenia cytochemiczne: reakcję PAS, reakcję z Sudanem czarnym B, reakcję na obecność mieloperoksydazy i oznaczenie esterazy nieswoistej. Badania wykonywano zwykle w pierwszych dniach pobytu chorego na oddziale (był to przeważnie 2--7 dzień choroby), natomiast badania kontrolne wykonywano w 7--10 dni później. Płyn mózgowo-rdzeniowy pobierano bezpośrednio z igły do komory, podczas nakłucia kanału kręgowego w odcinku lędźwiowym.

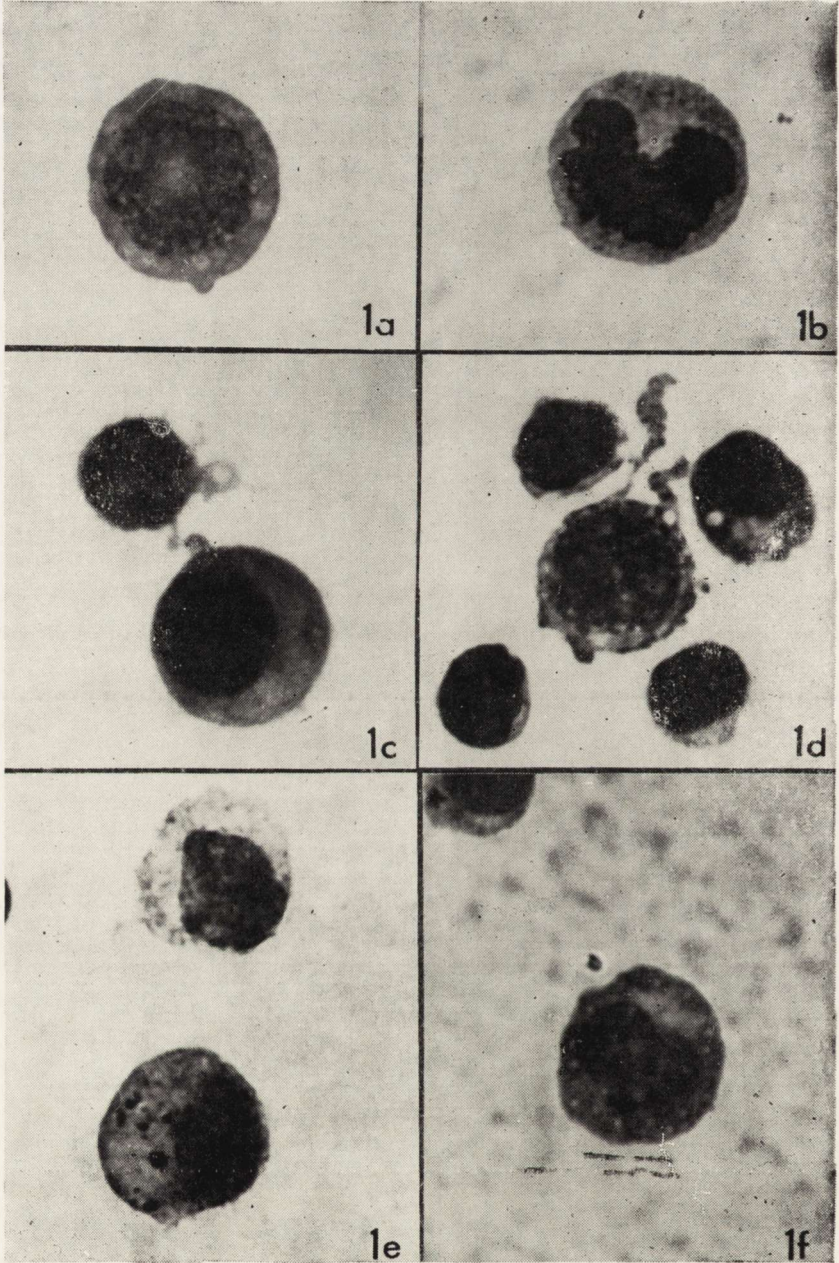
WYNIKI

Obecność f.p. stwierdzono w 497 badanych osadach płynu m.rdz. co stanowi 51,3%. Były to komórki podobne morfologicznie do spotykanych w mononukleozie zakaźnej, odpowiadające transformowanym

pod wpływem fitohemaglutyniny (PHA) limfocytom w hodowli. Obserwowano dużą różnorodność morfologiczną tych elementów, utrudniającą niejednokrotnie ich różnicowanie. Spotykano zarówno formy wykazujące podobieństwo do monocytów (ryc. 1b), jak i do komórek plazmatycznych (ryc. 1c, 2c). W cytoplazmie niektórych komórek stwierdzano obecność wodniczek (ryc. 1f) lub ziarnistości (ryc. 1e). Niekiedy obserwowano tworzenie wypustek cytoplazmatycznych tzw. pseudopodiów (ryc. 1a, c, d). W jądrach widywano jąderka, czasami dość liczne (ryc. 2a, b, c).

Wyniki badań zestawiono w tabelach. W tabeli 1 uwidoczniiono dane dotyczące częstości występowania f.p. w płynie m.rdz. w poszczególnych grupach chorych. Formy przejściowe najczęściej stwierdzano w płynie chorych na świnkowe zapalenie opon (80,5%), rzadko u chorych z zespołem podrażnienia opon w zakażeniach bakteryjnych (28,1%) i ropnych zapaleniach opon (29,1%). W tabeli 2 przedstawiono częstość występowania f.p. w płynie m.rdz. w stanach zapalnych opon w zależności od etiologii i fazy choroby. Dane uwidocznione w tej tabeli wskazują, że f.p. najczęściej, bo w 82,3% przypadków, spotykano w ostrej fazie świnkowego zapalenia opon, najrzadziej, bo tylko w 11,8%, w ostrym okresie ropnego zapalenia opon i mózgu. W okresie zdrowienia podobnie często i w wysokich wartościach odsetkowych stwierdzano te elementy komórkowe w płynie chorych na świnkowe zapalenie opon i kleszczowe zapalenie mózgu (78,1% i 78,5%). Warto podkreślić, że w leptospirowym zapaleniu opon, mimo stwierdzenia w pojedynczych przypadkach dość znacznego odsetka f.p. (do 33% wszystkich komórek osadu), częstość ich występowania była niższa niż w zapaleniach wirusowych, zarówno w ostrym okresie choroby, jak i w okresie zdrowienia.

Wyniki badań cytochemicznych i cytoenzymatycznych oraz aktywności fagocytarnej form przejściowych płynu m.rdz. w badanych grupach chorych zestawiono w tabeli 3. Formy przejściowe płynu mózgowo-rdzeniowego u wszystkich badanych chorych nie wykazywały obecności esterazy nieswoistej, lipidów i mieloperoksydazy. Warto zaznaczyć, że u większości badanych również komórki limfoidalne zachowywały się podobnie i tylko w 4 przypadkach (w 2 ropnych oraz leptospirowym i świnkowym zapaleniu opon), obserwowano słabą reakcję esterazy nieswoistej w pojedynczych ziarnistościach cytoplazmy. U większości chorych na wirusowe (64,2%) i u części chorych na ropne zapalenie opon (24%) stwierdzono w formach przejściowych dodatnią reakcję PAS. Średnie wartości odsetkowe form przejściowych PAS-dodatnich były również wyższe w wirusowych (27,1%), niż w ropnych zapaleniach opon (21%). Dodatni test redukcji NBT (ryc. 2d) oraz fago-



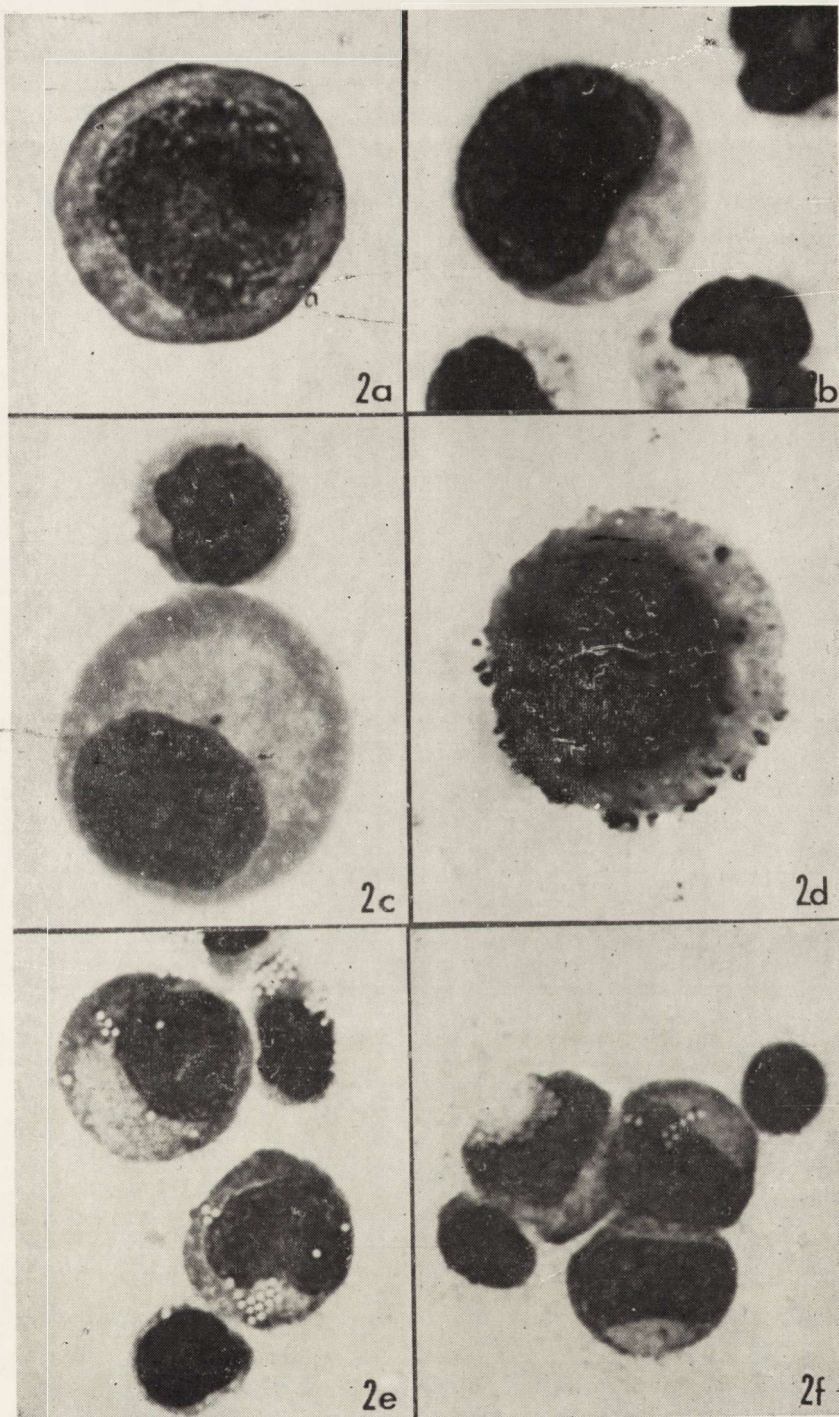
cytozę cząstek lateksu obserwowano sporadycznie tylko w nielicznych formach przejściowych u chorych na wirusowe zapalenie opon (ryc. 2e, f).

DYSKUSJA

Od czasu wprowadzenia przez Sayka (1954) metody osadowej do badań cytologicznych płynu m.rdz., atypowe limfocyty stwierdzano często w różnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego (Sayk 1960; Bischoff 1960, 1963; Olischer, Sayk 1967, 1969; Kolar, Zeman 1968; Seidel-Kołodziejowa 1969; Scholz, Summer 1970; Schwarze 1973; Dyken 1975; Kucharska-Demczuk 1975, 1977; Kölmel 1976; Oehmichen 1976; Dommash i wsp. 1977; Kucharska-Demczuk, Trzaska 1978; Kucharska-Demczuk i wsp. 1978). Brak ujednoczonego mianownictwa komórek płynu m.rdz. sprawia, że nazwy używane dla określenia form atypowych są różne. Jedni autorzy nazywają je komórkami aktywowanymi (Bischoff 1960, 1963), inni stymulowanymi (Kolar, Zeman 1968), bądź pobudzonymi (Dyken 1975). Używany przez nas termin „formy przejściowe” przyjęto wg mianownictwa Sayka (1960) i Olischera i Sayka (1967, 1969). Początkowo niektórzy autorzy (Sayk 1960, Bischoff 1960, 1963; Seidel-Kołodziejowa 1964) przyjmowali, że obecność f.p. w płynie m.rdz. stanowi dość charakterystyczny objaw gruźlicy opon. Obserwacje późniejsze (Kolar, Zeman 1968; Scholz, Summer 1970; Kucharska-Demczuk 1975, 1977; Kölmel 1976; Kucharska-Demczuk, Trzaska 1978; Kucharska-Demczuk i wsp. 1978) wykazały, że formy te występują często w różnych stanach zapalnych, zwłaszcza o etiologii wirusowej. Ostatnie dane (Sandberg 1973; Guseo 1974, 1976) wskazują, że komórki te odgrywają ważną rolę w procesach obronnych, biorąc udział

Ryc. 1. Formy przejściowe w bakteryjnych (ropnych i leptospirowych) zapale niach opon: a) forma przejściowa z dużym jądrem wykazującym luźną budowę chromatyny; widoczna wypustka cytoplazmatyczna w postaci krótkiego wyrostka. Pow. 1.350 X; b) forma przejściowa z jądrem o nieregularnym kształcie oraz z wyraźnym przyjądrowym przejaśnieniem cytoplazmy. Pow. 1.350 X; c) forma przejściowa podobna morfologicznie do komórki plazmatycznej, widoczna skręcona wypustka cytoplazmatyczna. Pow. 1.350 X; d) forma przejściowa z kilkoma wypustkami cytoplazmatycznymi tzw. pseudopodiami. Pow. 900 X; e) forma przejściowa z ziarnistościami w cytoplazmie komórkowej. Pow. 900 X; f) forma przejściowa z wakuolizacją cytoplazmy. Pow. 900 X.

Fig. 1. Transient forms in bacterial (purulent and leptospiral) meningitis: a) transient form with large nucleus showing loose chromatin structure; cytoplasmic process in a form of small appendix. X 1350. b) transient form with irregular-shaped nucleus and marked perinuclear lucidification of cytoplasm. X 1350. c) transient form morphologically resembling plasmatic cell, twisted cytoplasmic process. X 1350. d) transient form with a number of cytoplasmic processes, so-called pseudopodia. X 900. e) transient form with granules in cell cytoplasm. X 900. f) transient form with vacuolization of cytoplasm. X 900.



w produkcji immunoglobulin i innych biologicznie czynnych substancji odpowiedzialnych za odporność humoralną i komórkową. Obserwowane przez nas zmiany morfologiczne f.p. dotyczyły głównie ich wielkości i kształtu oraz obecności różnych wypustek cytoplazmatycznych (pseudopodiów) i ziarnistości. Zdaniem Guseo (1976) wypustki cytoplazmatyczne komórek płynu odgrywają ważną rolę we wzajemnych oddziaływaniach komórek i w procesach fagocytozy. W odczynach zapalnych opon mózgowo-rdzeniowych, częściej w zakażeniach wirusowych niż w bakteryjnych, stwierdzano wzrost zawartości glikogenu w f.p. płynu. Podobne zmiany w transformowanych limfocytach płynu w wirusowych zapaleniach opon obserwowali inni autorzy (Peiffer, Schwarze 1971; Olisher 1972; Guseo 1974). Naszej obserwacji dotyczącej fagocytarnych form przejściowych płynu m. rdz., wykazanej w teście NBT i próbie lateksowej, nie możemy porównać z danymi innych autorów z uwagi na ich brak w dostępnym piśmiennictwie. Wprowadzony przez Parka i wsp., w 1968 r., test NBT pozwala na określenie dwóch podstawowych czynności komórek: funkcji bakteriobójczej, wyrazem której jest powstawanie ciemnoniebieskiego formazanu podczas redukcji błękitu nitrotetrazolowego, uzależnione od obecności oksydazy NADH-cjankoniewrażliwej, oraz samej funkcji fagocytarnej. Błękit nitrotetrazolowy, jako związek o silnie dodatnim ładunku trudno przedostaje się do komórek, dopiero fagocytoza ułatwia jego przenikanie. Aktywność fagocytarna transformowanych limfocytów płynu m.rdz. nie jest dobrze poznana. W badaniach własnych wykazano, że w niektórych stanach zapalnych opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii wirusowej, komórki te wykazują zarówno aktywność fagocytarną jak i bakteriobójczą. Uzyskane wyniki oraz dane z piśmiennictwa (Sandberg 1973; Guseo 1974, 1976; Oehmichen 1976) sugerują, że formy przejściowe płynu mózgowo-rdzeniowego odgrywają dużą rolę w zjawiskach odpornościowych toczących się w tkance oponowej.

Ryc. 2. Formy przejściowe w wirusowym (świnkowym) zapaleniu opon: *a*) duża forma przejściowa, widoczne jąderka w jądrze. Pow. 1.350 \times . *b*) i *c*) formy przejściowe wykazujące podobieństwo do komórek plazmatycznych. Pow. 1.350 \times . *d*) forma przejściowa wykazująca dodatnią redukcję NBT (ciemne złoże formazanu rozmieszczone na brzegu komórki). Pow. 1.350 \times . *e*) i *f*) formy przejściowe wykazujące aktywność fagocytarną; w cytoplazmie komórek widoczne pochłonięte cząstki lateksu. Pow. 900 \times .

Fig. 2. Transient forms in viral (mumps) meningitis: *a*) large transient form, nucleoli in nucleus. \times 1350. *b*) and *c*) transient forms similar to plasmatic cells. \times 1350. *d*) transient form showing positive NBT reduction (dark formazane deposits located on the cell margin). \times 1350. *e*) and *f*) transient forms showing phagocytic activity; in cell cytoplasm — absorbed latex particles. \times 900.

Tabela 1. Występowanie form przejściowych w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na zapalenie i podrażnienie opon

Table 1. Occurrence of transient forms in the cerebro-spinal fluid of patients with meningitis and meningeal irritation

Grupy chorych Groups of patients	Podgrupy Subgroups	Liczba chorych badanych Number of patients examined	Wiek chorych od — do (lata) Age of patients, from — to (years)		Całkowita liczba badań Total number of tests	% badań z o- becnością form przejściowych Tests that revealed transient forms in %	
			M	K F			
I							
Zapalenie opon i mózgu o etio- logii wirusowej Meningitis and encephalitis of viral ethiology	1 — świnkowe zapalenie opon i zespół podrażnienia opon 1 — parotitic meningitis	97	68	19	14—53	149	80,5
	2 — półpaścowe zapalenie opon i mózgu 2 — shingles meningitis and encephalitis	13	7	6	16—68	24	66,6
	3 — kleszczowe zapalenie mózgu 3 — tick encephalitis	9	7	2	15—56	23	69,5
	4 — limfocytowe zapalenie opon i mózgu 4 — lymphocytic meningitis and encephalitis	149	95	54	14—45	292	62,3
II							
Zapalenie opon i mózgu o etio- logii bakteryjnej Meningitis and encephalitis of bacterial ethiology	1 — ropne zapalenie opon i mózgu 1 — purulent meningitis and encephalitis	104	79	25	15—74	206	20,1
	2 — leptospirowe zapalenie opon 2 — leptospiral meningitis	29	19	10	15—54	50	44,0

III							
Zespoły podrażnienia opon w zakażeniach bakteryjnych	1 — zapalenie zatok obocznych nosa	28					
	1 — inflammation of lateral nasal sinus						
	2 — zapalenie płuc	18					
	2 — bronchopneumonia						
	3 — angina ropna	34					
	3 — purulent angina						
Meningeal irritation syndromes in bacterial infections	4 — zatrucie pokarmowe	11	61	49	14—75	110	28,1
	4 — gastric intoxication						
	5 — zapalenie pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych	6					
	5 — inflammation of biliary tracts and gallbladder						
	6 — zapalenie nerek	5					
	6 — nephritis						
	7 — inne zakażenia bakteryjne	8					
7 — other bacterial infections							
IV							
Zespoły podrażnienia opon w zakażeniach wirusowych	1 — grypa	31					
	1 — influenza						
Meningeal irritation syndromes in viral infections	2 — ostry nieżyt górnych dróg oddechowych	23	57	56	15—62	113	44,2
	2 — acute inflammation of the upper respiratory tract						
	3 — ostre choroby wysypkowe	49					
	3 — acute eruptive diseases						
	4 — inne infekcje wirusowe	8					
4 — other viral infections							

M — mężczyźni K — kobiety

M — males F — females

Tabela 2. Częstość występowania form przejściowych w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na zapalenie i podrażnienie opon w zależności od etiologii i fazy choroby
Table 2. Frequency of occurrence of transient forms in the cerebro-spinal fluid of patients with meningitis and meningeal irritation depending on the etiology and stage of the disease

Grupa chorych Group of patients	Ostry okres choroby (1—10 dzień) Acute period (1st—10th of the disease)				Okres zdrowienia (powyżej 10 dni) Reconvalescence period (above the 10th day)			
	Cytoza w mm ³ od — do Cytosis (mm ³) from — to	Liczba badań Number of tests	% badań z formami przejściowymi Tests with transient forms (%)	% form przejściowych od — do Transient forms (%) from — to	Cytoza w mm ³ Cytosis (mm ³)	Liczba badań Number of tests	% badań z formami przejściowymi Tests with transient forms (%)	% form przejściowych od — do Transient forms (%) from — to
	I — Wirusowe zapalenie opon i mózgu Viral meningitis and encephalitis							
1 — świnkowe zapalenie opon i zespół podrażnienia opon 1 — parotitic meningitis	1—1429	85	82,3	1—23	1—1212	64	78,1	1—16
2 — półpaścowe zapalenie opon i mózgu 2 — shingles meningitis and encephalitis	1—401	13	76,9	2—10	2—86	11	54,5	1—5
3 — kleszczowe zapalenie mózgu 3 — tick encephalitis	71—1686	9	55,5	7—10	7—143	14	78,5	1—11
4 — limfocytowe zapalenie opon i mózgu 4 — lymphocytic meningitis and encephalitis	10—2165	118	68,6	1—19	1—820	174	58,0	1—29
II — Bakteryjne zapalenie opon Bacterial encephalitis								
1 — ropne zapalenie opon i mózgu 1 — purulent meningitis and encephalitis	118—137000	76	11,8	1—6	1—480	130	39,2	1—6
2 — leptospirowe zapalenie opon 2 — leptospiral meningitis	1—982	21	38,0	1—33	3—544	29	48,2	1—28
III — Zespół podrażnienia opon w zakażeniach bakteryjnych Meningeal irritation syndrome in bacterial infections	1—28	110	28,1	1—7	Nie badano Not tested			
IV — Zespół podrażnienia opon w za- każeniach wirusowych Meningeal irritation syndrome in viral infections	1—26	113	42,2	1—36	Nie badano Not tested			

Tabela 3. Wyniki badań cytochemicznych i cytoenzymatycznych oraz aktywności fagocytarnej form przejściowych płynu mózgowo-rdzeniowego w poszczególnych grupach chorych

Table 3. Results of cytochemical and cytoenzymatic studies and phagocytic activity tests with transient forms in the cerebro-spinal fluid in the particular groups of patients

Grupa chorych Group of patients	Liczba chorych	Liczba badań	Reakcja PAS PAS reaction		Lipidy Lipids	Peroksydaza Peroxidase	Esteraza nieswoista Nonspecific esterase	Test NBT NBT test	Próba lateksowa Latex test
	Number of patients	Number of tests	Liczba badań Number of tests	% form przejściowych (+) Transient forms (%) (+)	Liczba badań Number of tests	Liczba badań Number of tests	Liczba badań Number of tests	Liczba badań Number of tests	Liczba badań Number of tests
I — Zapalenie opon i mózgu o etiologii wirusowej Meningitis and encephalitis of viral ethiology	77	253	28 (18)	4—46	28 (0)	28 (0)	79 (0)	45 (6)	45 (10)
II — Zapalenie opon i mózgu o etiologii bakteryjnej Meningitis and encephalitis of bacterial ethiology	63	245	25 (6)	5—40	25 (0)	25 (0)	80 (0)	45 (0)	45 (0)
III — Zespół podrażnienia opon w zakażeniach bakteryjnych Meningeal irritation syndrome in bacterial infections	31	53					17 (0)	18 (0)	18 (0)
IV — Zespół podrażnienia opon w zakażeniach wirusowych Meningeal irritation syndrome in viral infections	29	35					21 (0)	7 (0)	7 (0)

W nawiasach podano liczbę badań, w których stwierdzono dodatnią reakcję cytochemiczną lub cytoenzymatyczną
In parentheses — number of tests that gave positive cytochemical or cytoenzymatic reaction.

(+) — odsetek form przejściowych z dodatnią reakcją PAS
percentage of transient forms with positive PAS reaction.

WNIOSKI

1. W 51,3% badanych osadów płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na zapalenie i podrażnienie opon o różnej etiologii, stwierdzono obecność atypowych limfocytów nazwanych formami przejściowymi.

2. Najczęściej i w najwyższym odsetku formy przejściowe występowały w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na wirusowe zapalenie opon.

3. Obserwowane zmiany morfologiczne i cytochemiczne, a także badania aktywności fagocytarnej oraz bakteriobójczej opartej na redukcji NBT sugerują, że formy przejściowe płynu mózgowo-rdzeniowego stanowią aktywny system komórkowy będący wyrazem reakcji obronnych toczących się w tkance oponowej w przebiegu chorób neuroinfekcyjnych.

К. Кухаркскса-Демчук, А. Полевска-Еске

АТИПИЧНЫЕ ЛИМФОЦИТЫ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ
В МЕНИНГИТАХ И РАЗДРАЖЕНИЯХ МОЗГОВЫХ ОБОЛОЧЕК

Резюме

При помощи цитологических, цитохимических и цитоэнзиматических методов исследовали нахождение, поведение и функциональное состояние атипических лимфоцитов спинномозговой жидкости в разных состояниях воспаления оболочек мозга и в синдроме раздражения оболочек мозга. Провели 967 разных исследований у 624 больных. Атипические лимфоциты, называемые также переходными формами, наблюдали в 51% исследованных проб спинномозговой жидкости. Чаще всего и в самом большом проценте эти формы наблюдали в спинномозговой жидкости больных вирусным воспалением оболочек мозга. Наблюдали значительную морфологическую разновидность исследованных клеточных элементов, что иногда затрудняло их дифференцировку. Атипические лимфоциты обнаруживали отрицательную реакцию на наличие липидов, миелопероксидазы и неспецифической эстеразы, а также положительную реакцию ПАСК на наличие гликогена. Кроме того обнаружено, что в некоторых случаях эти лимфоциты обладают фагоцитарными и бактерицидными свойствами (поглощают частицы латекса и восстанавливают нитротетразолблау).

Проведенные исследования указывают, что в разных воспалительных состояниях оболочек мозга, особенно вирусной этиологии, атипические лимфоциты спинномозговой жидкости представляют активную клеточную систему принимающую участие в иммунных реакциях.

К. Kucharska-Demczuk, A. Polewska-Jeske

АТYPICAL LYMPHOCYTES IN THE CEREBROSPINAL FLUID IN THE
INFLAMMATIONS AND IRRITATIONS OF THE MENINGES

Summary

The behavior and activity of atypical lymphocytes of the cerebrospinal fluid in various inflammatory states of the meninges and the brain, and in the meningeal irritation syndromes were examined with the use of a number of cytological,

cytochemical and cytoenzymatic methods. The investigation included 967 tests on 624 patients. Atypical lymphocytes, also referred to as transitory forms, were observed in 51% of the fluid samples. These forms most frequently accompanied viral (parotitic) meningitis. The cellular elements showed a high morphologic diversity, which in some instances made their investigation difficult. In the cytochemical and cytoenzymatic tests, atypical lymphocytes gave a negative reaction for the presence of lipids, myeloperoxidase and nonspecific esterase and a positive reaction for the presence of glycogen. Beside that in a number of cases, atypical lymphocytes were shown to possess phagocytic and bacteriocidal activity (they adsorbed latex particles and reduced nitroterazolium blue).

The results indicate that in various inflammatory conditions, in particular with viral etiology, atypical lymphocytes of the cerebrospinal fluid constitute an active cellular system participating in the immunological reactions.

PIŚMIENNICTWO

1. Bischoff A. M.: Der derzeitige Stand der Liquorcytodiagnostik. *Schweiz. Med. Wschr.* 1960, 90, 479—487.
2. Bischoff A. M.: L'examen cytologique du liquide cephalo-rachidien par la methode de sedimentation et de filtration. *Etude de 5000 cas. Rev. Neurol.* 1963, 108, 567—575.
3. Braunstëiner H.: Esterase in leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 1959, 7, 202—206.
4. Dommasch D., Grüninger W., Schultze B.: Autoradiografic demonstration of proliferating cells in cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 1977, 214, 97—112.
5. Dyken P. R.: Cerebrospinal fluid cytology: practical clinical usefulness. *Neurology* 1975, 25, 210—217.
6. Eneström S.: Some aspects of technique and clinical evaluation of CSF cytology. *Acta Neurol. Scand.* 1965, 41, suppl. 13, 153—159.
7. Guseo A.: Immunoglobulin containing cells in the cerebrospinal fluid. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 281—284.
8. Guseo A.: Morphological signs as indications of function of cells in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 1976, 212, 159—170.
9. Kolar O., Zeman W.: Spinal fluid cytomorphology. *Arch. Neurol.* 1968, 18, 44—51.
10. Kölmel H. W.: *Atlas of cerebrospinal fluid cells.* Springer-Verlag, Berlin 1976, 11—20.
11. Kucharska-Demczuk K.: Nowy wzór komory osadowej do badań cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego. *Pol. Tyg. Lek.* 1974, 29, 2283—2285.
12. Kucharska-Demczuk K.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w niektórych wirusowych zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 121—135.
13. Kucharska-Demczuk K.: Zmiany w płynie mózgowo-rdzeniowym w zespołach podrażnienia opon mózgowo-rdzeniowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1977, 32, 103—106.
14. Kucharska-Demczuk K., Trzaska B.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w leptospirowym zapaleniu opon. *Przegl. Epid.* 1978, 32, 195—202.
15. Kucharska-Demczuk K., Trzaska B., Polewska-Jeske A.: Odczyny komórkowe płynu mózgowo-rdzeniowego w ropnych zapaleniach opon. *Przegl. Epid.* 1978, 32, 203—213.
16. Oehmichen M.: *Cerebrospinal Fluid Cytology.* G. Thieme Publ., Stuttgart 1976, 37—46.

17. Olischer R. M., Sayk J.: Liquor-insbesondere Zellbefunde bei Meningitiden. *Forsch. Neurol. Psychiatr.* 1967, 35, 453—461.
18. Olischer R. M., Sayk J.: Zur Differenzierung „atypischer“ zellen im Liquor-cerebrospinalis durch verschiedene zytologische Methoden. *Wissen Zeit. DDR Universität Rostock*, 1969, 18, 559—605.
19. Olischer R. M.: Die PAS-Reaktion in der Zytodiagnostik des Liquor Cerebrospinalis. *Psychiat. Neurol. Med. Psychol. (Lpz.)* 1972, 24, 716—721.
20. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M.: Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet* 1968, 2, 53—62.
21. Peiffer J., Schwarze E. W.: Beitrag zur Enzymhistochemie der Liquor und Leptomeningealzellen. *Nerwenarzt* 1971, 42, 267—269.
22. Sandberg W. M.: Studies on immunoglobulin synthesis and lymphocyte subpopulations in the cerebrospinal fluid. Lund 1973 (praca doktorska).
23. Sayk J.: Ergebnisse neuer liquorcytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentkammervverfahren. *Arzt. Wochenschr.* 1954, 9, 1042—1046.
24. Sayk J.: Zytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. Fischer, Jena 1960, 28—51.
25. Scholz H., Summer K.: Klinisch-diagnostischer Wert liquorcytologischer Befunde bei Entzündungen der Meningen. *Wien. Z. Nervenheilk.* 1970, 28, 283—305.
26. Schwarze E. W.: Zytomorphologischer Vergleich der „kleinen und grossen Rundzellen“ des Liquor cerebrospinalis mit Lymphozyten des peripheren Blutes. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 1973, 57, 262—269.
27. Seidel-Kołodziejowa A.: Wartość badania osadu płynu mózgowo-rdzeniowego metodą Sayka dla różnicowania gruźliczego i limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. *Gruźlica*, 1964, 32, 297—300.
28. Woytowicz J.: Badania cytochemiczne. W: *Laboratoryjne metody diagnostyczne*, Red. J. Krawczyński, T. Osiński, PZWL, Warszawa 1967.

Adres autorek: Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych PAM, ul. Arkońska 4, 71-455 Szczecin.

MIECZYŚLAW WENDER, MIROŚLAW KOZIK, ZOFIA ADAMCZEWSKA-
-GONCERZEWICZ, JANINA STANISŁAWSKA, JADWIGA PANKRAC

BADANIA BIOCHEMICZNE I HISTOCHEMICZNE
ISTOTY BIAŁEJ MÓZGU
U CHORYCH Z WIELOGODZINNYM
ODDECHEM KONTROLOWANYM *

Instytut Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, Poznań
Dyrektor: prof. dr M. Wender

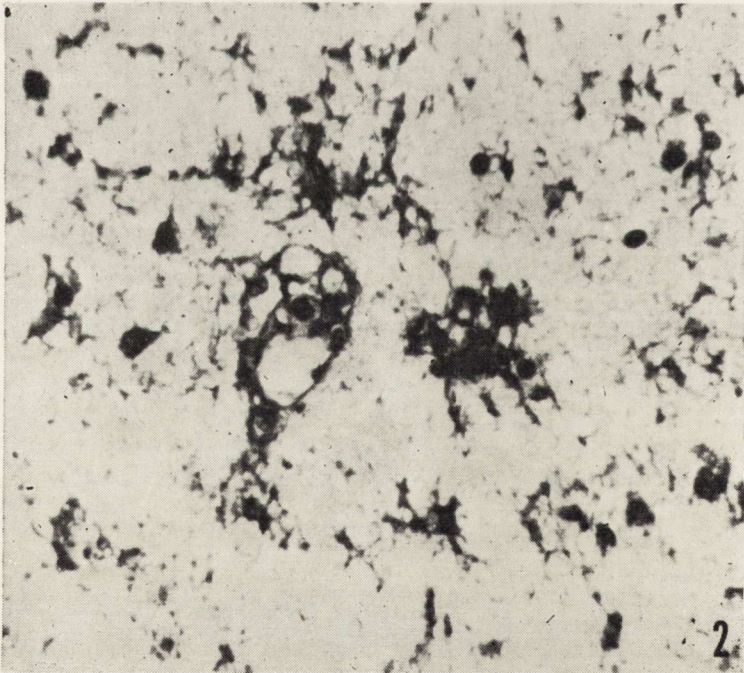
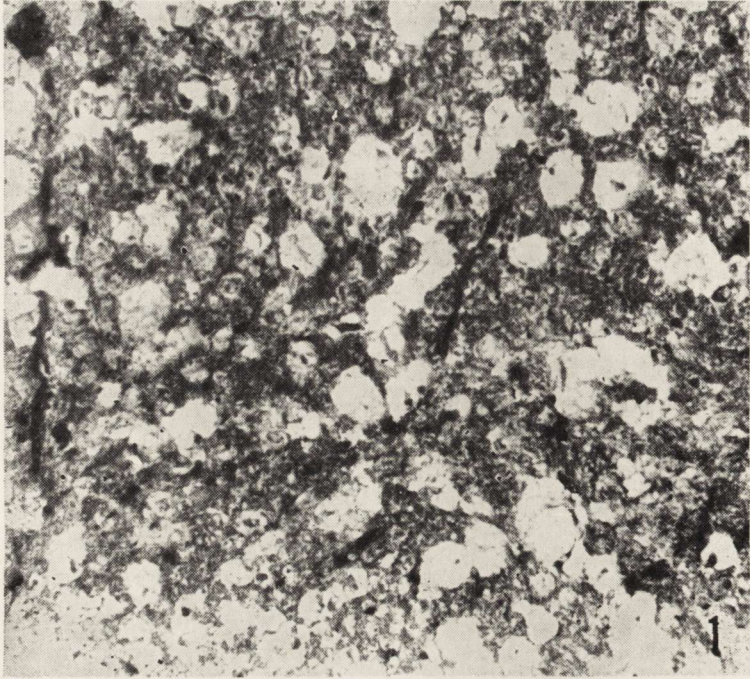
Wprowadzenie i szerokie zastosowanie w medycynie oddechu kontrolowanego u chorych z niewydolnością oddechową postawiło pytanie co do zmian zachodzących w mózgu w przypadkach z niepomyślnym przebiegiem choroby. Problem ten dyskutuje się głównie pod kątem czy stwierdzone zmiany można uważać za znamienne dla tego zespołu chorobowego, co upoważniłoby do określenia ich zbiorczym mianem mózg respiratorowy.

Pomijając to zagadnienie, w niniejszej pracy zajęto się wpływem wielogodzinnego oddechu kontrolowanego na stan istoty białej mózgu oraz stosunkiem występujących tu odchyłeń od stwierdzanych w początkowych fazach chorób demielinizacyjnych. W tym celu przeprowadzono biochemiczne badania lipidów mielin mózgu oraz histochemiczne oznaczenia aktywności fosfataz, esteraz i oksydoreduktaz w neurogleju.

MATERIAŁ I METODY

Badany materiał obejmuje 12 przypadków (w większości chorób naczyniowych mózgu), w których z powodu niewydolności oddechowej zastosowano kontrolowany oddech aparaturowy. Z materiału wyłączone przypadki z zatrzymaniem krążenia (cardiac arrest) oraz te, w których w obrazie klinicznym dominowały objawy ostrej niewydolności krążenia. Zestawienie podstawowych danych klinicznych badanych chorych znajduje się w tabeli 1. Przypadki podzielono na dwie podgrupy. Pierwszą złożoną z 8 chorych, u których oddech aparaturowy stosowano przez okres dłuższy niż 72 godziny, drugą obejmującą 4 przypadki, w których oddech kontrolowany trwał krócej niż 48 godzin.

* Praca częściowo subsydiowana z umowy polsko-amerykańskiej NIH PL 480 nr 05-092-N.



Autopsję wykonano w okresie od 2 do 6 godzin po śmierci, pobierając po ocenie makroskopowej mózgu, skrawki do badań biochemicznych, histochemicznych i histopatologicznych.

Wyniki badań biochemicznych grupy patologicznej porównano z analitycznymi oznaczeniami wykonanymi na istocie białej pobranej w czasie zabiegu operacyjnego, przy resekcji części niezmienionego makroskopowo płata mózgu, wykonanej ze względu na konieczność dojścia do głęboko położonego ogniska chorobowego.

Metody biochemiczne. Frakcję mielinową z istoty białej mózgu izolowano metodą opisaną przez Horrocksa (1967). Skład lipidowy określano po ekstrakcji wykonanej metodą Folch-Pi i wsp. (1957) i rozdziale przy użyciu chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej. Zawartość cerebrozydów i sulfatydów oznaczano metodą Radina i wsp. (1955), cholesterolu metodą Sperry i Webba (1950), a fosfolipidów przy użyciu metody Bartletta (1959). Bardziej szczegółowy opis stosowanej metodyki znajduje się w pracy Wendera i wsp. (1975).

Metody histologiczne. Badania histologiczne wykonano na materiale utrwalonym w płynie Bakera po zatopieniu w parafinie. Stosowano następujące metody barwienia: Nissl, hematoksylina-eozyna, Klüver-Barra, Kanzler oraz Sudan III i IV.

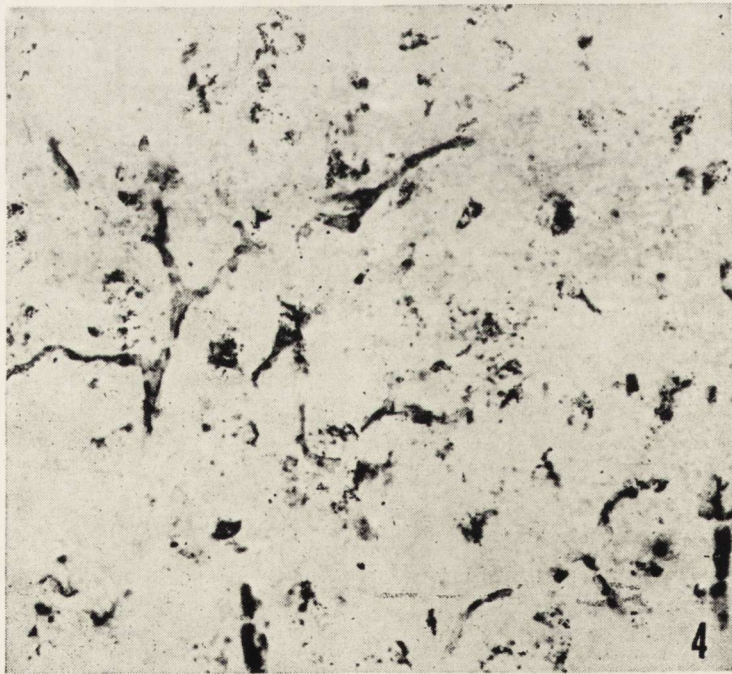
Metody histochemiczne. Dla oznaczeń aktywności esteraz i fosfataz materiał utrwalano przez 18 godz. w płynie Bakera w temp. 4°C. Oznaczenia enzymów oddechowych wykonano na nieutrwalonych skrawkach kriostatowych. Dla wykazania kwaśnej (E.C. 3.1.3.2.) i alkalicznej fosfatazy (E.C. 3.1.3.1.) stosowano metodę Gomori'ego (1953). Pirofosforylaze fosforanu tiaminy (TPPaza; E.C. 2.5.1.) oznaczano metodą Novikoffa i Goldfishera (1961), a fosfohydrolaze ATP (ATPaza; E.C. 3.6.1.3.) stosując technikę Wachsteina i Meisela (1957). Aktywność nieswoistej esterazy (karboksyoesteraza; E.C. 3.1.1.1.) określano metodą Barnetta i Seligmanna (1951) w modyfikacji Holta (1956). Dla wykazania acetylcholinoesterazy (AChE; E.C. 3.1.1.7) i nieswoistej cholinoesterazy (ChE; E.C. 3.1.1.8.) stosowano metodę Koelle'go w modyfikacji Gerebtzoffa (1953).

Ryc. 1. Zmiany gąbczaste w piramidach rdzenia przedłużonego. (H-E). Pow. 100 X.

Fig. 1. Spongy changes in spinal cord pyramids. H-E. X 100.

Ryc. 2. Rozrost astrogleju w istocie białej płata czołowego. (Metoda Kanzlera). Pow. 550 X.

Fig. 2. Proliferation of astroglia in the frontal lobe white matter. Kanzler. X 550.



Aktywność oksydoreduktaz oznaczano w standardowym medium inkubacyjnym zawierającym sól nitro BT tetrazolową, przygotowanym według Pearse'a (1960), łącznie z odpowiednimi substratami przygotowanymi według Niwelińskiego (1963). Badano aktywność następujących oksydoreduktaz: a) dehydrogenazy glicero-3-fosforanowej (E.C. 1.1.1.8.) — czas inkubacji 20 min.; b) dehydrogenazy mleczanowej (LDH — E.C. 1.1.1.27.) — czas inkubacji 50 min.; c) dehydrogenazy β -hydroksymaślanowej (E.C. 1.1.1.30.) — czas inkubacji 60 min.; d) dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (E.C. 1.1.1.49.) — czas inkubacji 30 min.; e) dehydrogenazy bursztynianowej (E.C. 1.3.99.1.) — czas inkubacji 30 min.; f) dehydrogenazy izocytrynianowej (E.C. 1.1.1.41.) — czas inkubacji 35 min.; g) dehydrogenazy zredukowany NADP-tetrazol (E.C. 1.6.66.1.) — czas inkubacji 35 min.

WYNIKI

W badaniach makroskopowych mózgu oprócz zmian związanych z chorobą podstawową (krwotok mózgowy lub podpajęczynówkowy, rozmiękanie, glejaki) stwierdzono obniżenie spoistości istoty białej. W niektórych przypadkach zmiany te były tak nasilone, że przypominały pośmiertną autolizę. W badaniach histologicznych stwierdzono w większości przypadków zmiany gąbczaste w różnych strukturach istoty białej (ryc. 1), a w niektórych również miejscowy przerost astrogleju włóknistego (ryc. 2). Zestawienie wyników badań morfologicznych znajduje się w tabeli 1.

Badania histoenzymatyczne wykazały w przerośniętych astrocytach wysoką aktywność TPPazy i ATPazy oraz częściowo fosfatazy kwasnej (ryc. 3, 4). Ponadto w obrębie istoty białej dochodziło do wzrostu aktywności esteraz nieswoistych w wielu oligodendrocytach (ryc. 5). Na ogół w badanym materiale nie obserwowano aktywności enzymów oksydoredukcyjnych. Jedynie w odniesieniu do dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej można było wielokrotnie zaobserwować wzrost odczynu enzymatycznego w przerośniętych astrocytach istoty białej (ryc. 6). Nie stwierdzono w neurogleju aktywności acetylocholinoesterazy i cholinesterazy nieswoistej.

Ryc. 3. Duża aktywność ATPazy w neurogleju zakrętu przedśrodkowego. Pow. 500 \times .

Fig. 3. High ATP-ase activity in the premedial gyrus neuroglia. \times 500.

Ryc. 4. Aktywność TPPazy w ścianach naczyń i w astrogleju protoplazmatycznym w prążkowie. Pow. 120 \times .

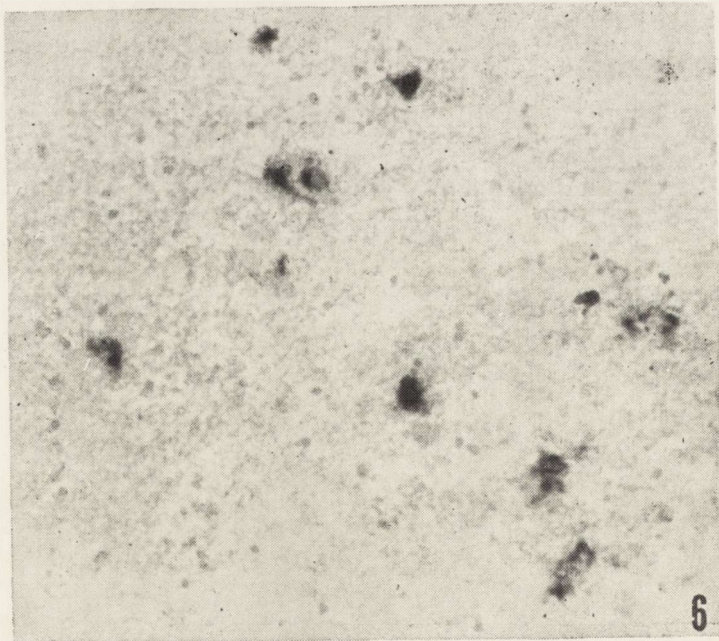
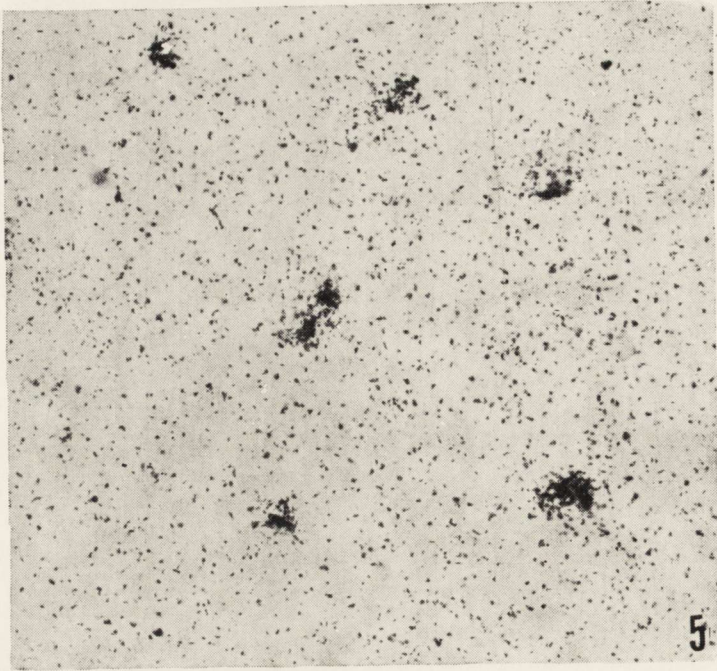
Fig. 4. TPP-ase activity in the vascular walls and protoplasmic astroglia in striatum. \times 120.

Tabela 1. Zestawienie podstawowych danych klinicznych i anatomopatologicznych

Table 1. Summary of basic clinical and anatomopathological data

Nr przyp. Case no.	Wiek (lata) Age (years)	Rozpoznanie Diagnosis	Czas trwania oddechu kontrolowanego (godz) Duration of controlled respiration (hours)	Charakterystyczne zmiany morfologiczne w mózgu Characteristic morphological changes in the brain
1	55	Krwotok dokomorowy Intraventricular hemorrhage	132	Krew w komorach mózgu. Liczne rozsiane ogniska rozmiękania w istocie szarej i białej mózgowia. Blood in cerebral ventricles. Numerous disseminated foci of malacia in the grey and white matter of the brain
2	43	Krwotok podpajęczynówkowy Subarachnoidal hemorrhage	82	Krew w przestrzeniach podpajęczynówkowych. Mnogie krwinkotoki okołonaczyniowe. Rozległe zmiany zwyrodnieniowe neurocytów mózgowia. Blood in subarachnoidal spaces. Numerous perivascular erythrorrhages. Wide-spread degenerative changes in neurocytes.
3	14	Guz mózgu Cerebral tumor	76	Skąpodrzewiak płata ciemieniowego. Ognisko krwotoczne w części grzbietowej mostu. Oligodendroglioma of parietal lobe, hemorrhagic focus in the dorsal part of pons.
4	74	Krwotok mózgowo-podpajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	78	Ognisko krwotoczne w lewej półkuli mózgu. Rozległa martwica warstwy ziarnistej mózdzku. Hemorrhagic focus in left cerebral hemisphere. Diffuse necrosis of the granular layer of cerebellum.
5	68	Rozmiękanie mózgu Encephalomalacia	77	Zawał krwisty płata czołowego. Ogniskowa martwica warstwy ziarnistej kory mózdzku. Plethoric infarct of frontal lobe. Focal necrosis of the granular layer of cerebellar cortex.

6	47	Krwotok mózgowo-pod- pajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	116	Ognisko krwotoczne w prawej półkuli mózgu. Rozlane zmiany zwyrodnieniowe neurocytów mózgowia. Zmiany gąbczaste istoty białej półkuli mózgu. Hemorrhagic focus in right cerebral hemisphere. Diffuse degenerative changes in neurocytes. Spongy degeneration of the white matter of cerebral hemispheres.
7	40	Guz mózgu Cerebral tumor	101	Gąbczak wielopostaciowy płata skroniowego. Zmiany zwy- rodnieniowe neurocytów jąder kresomózgowia. Multiform spongioblastoma of temporal lobe. Degenerative changes in neurocytes of telencephalic nuclei.
8	51	Krwotok mózgowo-pod- pajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	96	Ogniska krwotoczne w lewej półkuli mózgu oraz w moście. Hemorrhagic foci in left cerebral hemisphere and in pons.
9	48	Guz mózgu Cerebral tumor	8	Gąbczak wielopostaciowy płata czołowego. Obrzęk mózgu. Multiform spongioblastoma of frontal lobe. Cerebral edema.
10	69	Krwotok mózgowo-pod- pajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	40	Ognisko krwotoczne w lewej półkuli mózgu. Hemorrhagic focus in left cerebral hemisphere.
11	65	Krwotok mózgowo-pod- pajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	37	Ognisko krwotoczne w płacie ciemieniowym. Mnogie ogniska rozmiękania w mózgu. Martwica warstwy ziarnistej mózdzku. Hemorrhagic focus in parietal lobe. Numerous foci of encephalomalacia. Necrosis of the granular layer of cerebellum
12	69	Krwotok mózgowo-pod- pajęczynówkowy Cerebro-subarachnoidal hemorrhage	5	Ognisko krwotoczne w prawej półkuli mózgu. Hemorrhagic focus in right cerebral hemisphere.



Zawartość poszczególnych lipidów frakcji mielinowej mózgu wykazała, w porównaniu z normalnym spektrum, tylko niewielkie odchylenia w postaci wzrostu zawartości kwasów fosfatydylowych i estrów cholesterolu. Na uwagę zasługuje prawidłowa zawartość plazmalogenu oraz lizofosfatydów. Powyższe wyniki przedstawione są szczegółowo w tabeli 2. Spektrum fosfolipidów mieliny rozpatrywane oddzielnie, wyrażone w odsetkach całkowitej zawartości fosfolipidów mieliny potwierdziło wzrost zawartości kwasów fosfatydylowych. Dane liczbowe tych oznaczeń zawarte są w tabeli 3.

OMÓWIENIE

Patomechanizm powstawania zmian mózgowych przy wielogodzinnym stosowaniu oddechu kontrolowanego jest bardzo złożony, ze względu na współistnienie szeregu czynników patogennych. Niezależnie od charakteru sprawy podstawowej, zastosowanie oddechu kontrolowanego następuje po wystąpieniu niewydolności oddechowej, która przez różny okres czasu wywoływała zaburzenia w przemianach ustrojowych, wskutek zmniejszenia dopływu tlenu do mózgu.

Ze względu na duży wpływ ostrego zatrzymania krążenia krwi (cardiac arrest) na istotę białą mózgu, doprowadzającego niekiedy do rozlanego zespołu mielinopatii (Meyer 1961; Wender i wsp., 1964; Coquet i wsp., 1973), wyłączono z badanego materiału przypadki współistnienia zatrzymania krążenia i niewydolności oddechowej. Niezależnie jednak od tego, w okresie niewydolności oddechowej układ krążenia wykazywał odchylenia o różnym charakterze i nasileniu, stąd też nie można również i tego czynnika całkowicie pominąć w patomechanizmie zmian mózgowych. Dlatego też, mówiąc o wpływie oddechu kontrolowanego na mózg, mamy na myśli zespół kliniczny, obejmujący szereg czynników patogennych, z których dominującym było wielogodzinne stosowanie oddechu kontrolowanego.

W badaniach histochemicznych przeprowadzonych w zespole oddechu kontrolowanego stwierdzono w przerostowych astrocytach wzrost aktywności enzymów lizosomalnych oraz niską aktywność enzymów oksydoredukcyjnych. To ostatnie spostrzeżenie odbiega w znacznym stop-

Ryc. 5. Aktywność esterazy nieswoistej w oligodendrogleju płata czołowego. Pow. 120 \times .

Fig. 5. Nonspecific esterase activity in the frontal lobe oligodendroglia. \times 120.

Ryc. 6. Aktywność dehydrogenazy α -glicerofosforanowej w pojedynczych astrocytach torebki wewnętrznej. Pow. 120 \times .

Fig. 6. α -glycerophosphate dehydrogenase activity in single astrocytes of the internal capsule. \times 120.

Tabela 2. Zawartość lipidów mieliny mózgu w przypadkach
 Table 2. The lipid content of the cerebral myelin in

Material badany	Liczba przypadków	Kwasy fosfatydowe	Sfingomieliny	Lecytyny	Lizolecytyny
Examined material	Number of cases	Phosphatidic acids	Sphingomyelins	Lecithins	Lysolecithins
Przypadki kontrolne Control cases	4	0	6,2±0,4	11,5±0,5	1,5±0,8
Całość materiału po oddechu kontrolowanym	12	<u>1,5±0,7</u>	7,3±0,4	11,3±0,4	1,4±0,4
Total material after controlled respiration					
Przypadki z oddechem kontrolowanym dłuższym niż 72 godz.	8	<u>1,1±0,6</u>	7,0±0,4	11,3±0,6	1,2±0,3
Cases with controlled respiration longer than 72 hrs					
Przypadki z oddechem kontrolowanym krótszym niż 48 godz.	4	<u>2,1±0,6</u>	7,9±1,2	11,3±1,2	1,9±0,7
Cases with controlled respiration shorter than 48 hrs.					

Średnia ± średni błąd średniej. Mean ± SEM

Różnice istotne podkreślono

Significant differences underlined

niu od wyników wielu badań enzymatycznych, w których opisano hiperaktywność szeregu enzymów oddechowych jako cechę znamiennej dla przerostowego astrogliju (Mossakowski 1963; Adams 1965).

Stwierdzony przez nas wzrost aktywności fosfatyz (kwasnej, ATPazy i TPPazy) w astrogliju i nieswoistej esterazy w oligodendroglu istoty białej jest zjawiskiem występującym w całym szeregu procesów patologicznych prowadzących do uszkodzenia osłonek mielinowych (Wender, Kozik 1978). Jest interesujące, że pomimo tego wzrostu aktywności enzymatycznej komórek oligodendroglu, wskazującego na ich przejście w postać czynną, w badaniach biochemicznych stwierdzono tylko początkowe objawy uszkodzenia mieliny. Może to świadczyć o tym, że w niektórych stanach patologicznych zmiany w oligodendroglu mogą wyprzedzać demielinizację. Na uwagę zasługuje również nieznaczna aktywność enzymów oksydoredukcyjnych w oligodendroglu istoty białej, z których jedynie aktywność dehydrogenazy α -glicero-3-fosforanowej była wzmożona. Znajduje się to w wyraźnym przeciwieństwie do zmian stwierdzanych w typowych stanach chorobowych połączonych z uszkodzeniem osłonek mielinowych, jak stwardnienie rozsiane czy leukoencefalopatia cyjanowodorowa (Ibrahim 1965; Wender i wsp. 1972). Sądzimy jednak, że byłoby nadmiernym uproszczeniem próbować

oddechu kontrolowanego (w % ogólnej zawartości lipidów mózgu)

cases of controlled respiration (% of total lipids content)

Serynofosfatydy + Inozytylofosfatydy Serinephosphatides + Inositylphosphatides	Etanoloamino-fosfatydy Ethanolamine phosphatides	Plazmalo-gen Plasma-logen	Ogólna zawartość fosfatydów Total phosphatides content	Cholesterol Cholesterol	Estry cholesterolu Cholesterol esters	Cerebrozydy Cerebro-sides	Sulfatydy Sulphatides	Ogólna zawartość glikolipidów Total glycolipids content
5,7 ± 0,5	2,6 ± 0,3	11,6 ± 0,2	39,1 ± 1,1	32,8 ± 0,6	0,2 ± 0,1	22,4 ± 1,2	5,5 ± 0,6	27,9 ± 1,3
4,6 ± 0,5	3,6 ± 0,4	9,9 ± 0,9	39,6 ± 1,3	26,9 ± 1,1	1,2 ± 0,3	25,3 ± 1,5	7,0 ± 0,7	32,3 ± 1,8
4,9 ± 0,7	3,6 ± 0,6	9,8 ± 1,8	39,0 ± 1,0	26,0 ± 1,1	1,3 ± 0,5	26,0 ± 2,0	7,7 ± 0,9	33,7 ± 2,5
4,2 ± 0,8	3,4 ± 0,6	10,3 ± 1,1	41,1 ± 1,4	28,0 ± 2,0	1,3 ± 0,2	23,8 ± 1,8	5,8 ± 0,7	29,6 ± 1,6

wiązać stwierdzoną niską aktywność enzymów oddechowych w neurogleju z ogólnoustrojową niewydolnością oddechową, wobec bardzo złożonego patomechanizmu zmian w zespole oddechu kontrolowanego.

Wyniki badań biochemicznych wskazują, że w warunkach wielogodzinnego oddechu kontrolowanego zostaje uszkodzona również mielina. Zaobserwowane zmiany, takie jak znaczny wzrost zawartości estrów cholesterolu i kwasów fosfatydowych są znamienne dla początkowych stadiów procesów demielinizacyjnych, tak w patologii ludzkiej, jak i doświadczalnej (Wender, Pankrac 1976; Wender i wsp. 1978 a, b). Na podstawie tych ostatnich badań stoimy na stanowisku, że ilość estryfikowanego cholesterolu w mózgu znajduje się w stanie dynamicznej równowagi z pulą niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych i wolnego cholesterolu. Pod wpływem czynników patologicznych działających na aktywność enzymów katalizujących hydrolizę estrów i estryfikację wolnego cholesterolu oraz zmieniających aktualne stężenie i skład substratów, podwyższa się zawartość estrów cholesterolu w mielinie już w początkowym okresie uszkodzenia osłonek, niezależnie od późniejszego procesu gromadzenia i transportu tego związku przy fagocytarnej rozbiórce składników chemicznych mieliny w dalszych etapach jej rozpadu.

Tabela 3. Zawartość fosfolipidów mieliny istoty białej mózgu w przypadkach oddechu kontrolowanego (w % ogólnej zawartości fosfolipidów)
 Table 3. The content of myelin phospholipids of the cerebral white matter in cases of controlled respiration (% of total phospholipids content)

Material badany Examined material	Liczba przypadków Number of cases	Kwasy fosfatydowe Phosphatidic acids	Sfingomieli- ny Sphingo- myelins	Lecytyna Lecithin	Lyzolecy- tyna Lysolecithin	Serynofos- fatydy + Inosytylo- fosfatydy Serinophos- phatides + Inosityl- phosphati- des	Etanoloami- nofosfatydy Ethanolami- nephospha- tides	Plazmalogen Plasmalogen
Przypadki kontrolne Control cases	4	0	15,8 ± 0,6	29,4 ± 1,0	3,7 ± 1,9	14,6 ± 1,5	6,8 ± 1,0	29,7 ± 1,2
Całość materiału po oddechu kontrolowanym Total material after controlled respiration	12	<u>3,9 ± 1,2</u>	18,6 ± 1,4	28,6 ± 1,7	3,7 ± 0,9	11,5 ± 1,2	8,7 ± 1,0	25,0 ± 1,8
Przypadki z oddechem kontrolowanym dłuższym niż 72 godz. Cases with controlled respiration longer than 72 h.	8	2,8 ± 1,4	18,0 ± 1,6	30,0 ± 21,9	3,2 ± 0,8	12,3 ± 1,4	9,2 ± 1,4	24,5 ± 2,3
Przypadki z oddechem kontrolowanym krótszym niż 48 godz. Cases with controlled respiration shorter than 48 h.	4	5,1 ± 1,4	19,4 ± 2,9	27,0 ± 2,4	4,5 ± 1,7	10,6 ± 1,8	8,1 ± 1,2	25,3 ± 2,7

Średnia ± średni błąd średniej

Mean ± SEM

Różnice istotne podkreślono

Significant differences underlined

Znaczne nagromadzenie kwasów fosfatydowych, spotykane w początkowym okresie demielinizacji nie jest łatwe do wytłumaczenia. Kwasy fosfatydowe są wspólnym prekursorem fosfatydów i trójglicerydów, a równocześnie stanowią produkt rozpadu fosfatydów. Można przeto przypuszczać, że niewyrównana synteza fosfatydów lub tłuszczów obojętnych, a także podwyższenie aktywności fosfolipazy D, może prowadzić do odszczepienia zasady azotowej od fosfatydów. Ta ostatnia możliwość wydaje się najbardziej prawdopodobna, ponieważ histoenzymatycznie stwierdzono podwyższenie aktywności enzymów lizosomalnych.

Brak innych odchyień w składzie lipidowym osłonek mielinowych, poza podwyższeniem zawartości estrów cholesterolu i kwasów fosfatydowych wskazuje, że uszkodzenie mieliny w czasie wielogodzinnego oddechu kontrolowanego nie weszło jeszcze w fazę szybkiego rozpadu, dającego się stwierdzić histologicznie.

М. Вендер, М. Козик, З. Адамчевска-Гонсежевич, Я. Станиславска, Я. Панкрац

ХИМИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА МОЗГА У БОЛЬНЫХ С МНОГОЧАСОВЫМ КОНТРОЛИРУЕМЫМ ДЫХАНИЕМ

Резюме

Химические и гистохимические исследования липидов мозга и гистохимические определения активности в нейроглии ряда энзимов (фосфатаз, эстераз и оксидоредуктаз) проводили у 12 больных, у которых из-за недостаточности дыхания применяли в течение многих часов дыхание с помощью респиратора.

Результаты исследований привели к следующим заключениям: 1) В гипертрофированных астроцитах белого вещества обнаруживается увеличение активности лизосомальных энзимов и низкую активность оксидоредукционных энзимов. 2) Олигодендроглия белого вещества обнаруживает увеличение активности фосфатаз (кислой, АТФ-азы, ТФФ-азы) и неспецифической эстеразы при слабой активности дегидрогеназ. 3) В белом веществе мозга обнаруживается увеличение содержания эфиров холестерина и фосфатных кислот, что указывает на начальную стадию повреждения миелиновых оболочек. 4) Отсутствие других нарушений липидного состава миелиновых оболочек свидетельствует о том, что повреждение миелина не переходит во время дыхания с помощью респиратора в течение многих часов в фазу быстрого распада. 5) Увеличение активности лизосомальных энзимов олигодендроглии, наблюдаемое уже в начальной фазе повреждения миелина обнаруживает, что в некоторых патологических состояниях изменения в олигодендроглии могут предшествовать демиелинизации.

M. Wender, M. Kozik, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, J. Stanisławska, J. Pankrac
 BIOCHEMICAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE CEREBRAL WHITE
 MATTER IN PATIENTS WITH HOUR-LONG CONTROLLED RESPIRATION

Summary

Chemical studies of the brain lipids and histochemical assays of a number of enzymes (phosphatases, esterases and oxidoreductases) in the neuroglia were performed in 12 cases of patients subjected to hour-long controlled respiration applied due to respiratory insufficiency. The following was concluded: 1) Hypertrophied astrocytes of the white matter are characterized by an increased activity of the lysosomal enzymes and a low activity of redox enzymes. 2) Oligodendroglia of the white matter shows enhanced activities of phosphatases (acid, ATP-ase and TPP-ase) and nonspecific esterase, but weak reactions for dehydrogenases. 3) There is an increase of the cholesterol esters and phosphatidic acids content in the cerebral white matter, which is indicative of the early stage of the myelin sheaths impairment. 4) The absence of other irregularities in the lipid composition of the myelin sheaths indicates that the slight myelin impairment does not develop into the stage of rapid degradation in the course of hour-long instrument-controlled respiration. 5) The increased activity of the oligodendroglial lysosomal enzymes observed already at the early stage of myelin impairment indicates that, in some pathological conditions, the changes in oligodendroglia may precede demyelination.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams, C.: Disorders of neurones and neuroglia. W: Neurohistochemistry. Red. C. Adams, Elsevier, Amsterdam 1965. 403—436.
2. Barnett, R., Seligmann, A.: Histochemical demonstration of esterase by production of Indigo. *Science* 1951, 194, 2970—2971.
3. Bartlett, G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 466—468.
4. Coquet, M., Carde, H., Vallot, J., Cardinaud, J., Vitol, C., Castaing, R.: Un cas de leucoencéphalopathie anoxique postanesthésique. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 25, 237—243.
5. Folch-Pi, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
6. Gerebtzoff, M.: Recherches histochemiques sur les acétylcholine et choline-stérases. *Acta Anat.* 1953, 19, 336—369.
7. Gomori, G.: Microscopic histochemistry. The University of Chicago Press, Chicago 1953.
8. Holt, S.: The value of fundamental studies of staining reactions enzyme in histochemistry, with reference to indoxyl methods for esterases. *J. Histochem. Cytochem.* 1956, 4, 94—99.
9. Horrocks, L.: Composition of myelin from peripheral and central nervous system of the squirrel monkey. *J. Lipid. Res.* 1967, 8, 569—576.
10. Ibrahim, M.: Neuroglia and demyelination. W: Neurohistochemistry, Red. C. Adams, Elsevier, Amsterdam 1965, 454—464.
11. Meyer, J.: Hirnveränderungen vom Typ der intravallären CO-Vergiftung nach Stick-oxydut-Äther-Narkose. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 1961, 202, 113—125.

12. Mossakowski, M.: The activity of succinic dehydrogenase in the reactive glia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1963, 2, 282—290.
13. Niweliński, J.: *Dehydrogenazy*. W: *Skrypt metod histochemicznych*, Warszawa 1963, 177—198.
14. Novikoff, H., Goldfischer, B.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 1961, 47, 802—810.
15. Pearse, A.: *Histochemistry, theoretical and applied*, Churchill, London 1960.
16. Radin, N., Levin, F., Brown, J.: Determination of cerebroside. *J. biol. Chem.* 1955, 217, 789—796.
17. Sperry, W., Webb, M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
18. Wachstein, M., Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Amer. J. clin. Pathol.* 1957, 27, 13—23.
19. Wender, M., Jurczyk W., Stengert, K.: Cerebral lipids in myelinopathy caused by cardiac arrest. *Acta neuropath. (Berl.)* 1964, 4, 238—244.
20. Wender, M., Kozik, M., Wajgt, A.: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta histochem.* 1972, 43, 361—371.
21. Wender, M., Pankrac, J.: Biochemical and histochemical studies in SSPE. VII Congressus Neurol. Bohemosl., Bratislavae, 1976, 122.
22. Wender, M., Adamczewska, Z., Pankrac, J., Goncerzewicz A.: Myelin lipids in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 209—216.
23. Wender, M., Kozik, M.: Enzyme histochemistry of the neuroglia in demyelinating diseases. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 211—218.
24. Wender, M., Petrescu, A., Filipek-Wender, H., Stanisławska, J.: Cholesteryl esters in demyelinating lesions in the light of histochemical and biochemical correlations. *Neuropat. Pol.* 1978a, 16, 83—95.
25. Wender, M., Stanisławska, J., Filipek-Wender, H.: Cerebral cholesteryl esters in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1978b, 16, 163—172.

Adres autorów: Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

TERESA WIERZBA-BOBROWICZ

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY MÓZGU SZCZURA W OSTREJ DOŚWIADCZALNEJ HIPOGLIKEMII

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

Przeprowadzone poprzednio badania wykazały, że krótkotrwała, ostra hipoglikemia u szczura prowadzi do rozwoju zmian strukturalnych w OUN, które wobec wykluczenia wpływu zaburzeń mikrokrążenia mózgowego, można traktować jako następstwo „czystego” niedocukrzenia (Wierzba-Bobrowicz 1979). Zmiany te, w większości odwracalne, dotyczyły neuronów i wyrażały się mikrowakuolizacją ich cytoplazmy lub nadbarwliwością i obkurczeniem komórek nerwowych. Tego typu nieprawidłowości stanowią wg Brierleya i wsp. (1971 a) charakterystyczne wczesne następstwo niedostatku tlenowego, niezależnie od rodzaju niedotlenienia. Obserwowano je zarówno w modelu prostej hipoksji *in vivo* (Hager i wsp. 1960), jak i *in vitro* (Kraśnicka i wsp. 1974), w modelu anoksyjno-ischemicznym (Brown, Brierley 1968), w przypadku głębokiego podciśnienia (Brown i wsp. 1969), w zatruciu tlenkiem węgla i cyjankami (Schwedenberg 1959; Brierley 1977) oraz w warunkach przedłużonej kontrolowanej hipoglikemii (Brierley i wsp. 1971 b). McGee-Russel i wsp. (1970) wykazali, że przyczyną mikrowakuolizacji neuronów jest uszkodzenie struktur błoniastych ich perikarionów, przede wszystkim mitochondriów.

Zróznicowany patomechanizm zaburzeń zależny od typu niedotlenienia, pomimo wspólnego wykładnika zmian w mikroskopie świetlnym, znajduje niekiedy odbicie w odrębnościach w obrazie zmian ultrastrukturalnych.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opracowania zmian mikroskopowo-elektronowych w mózgu w warunkach ostrego niedocukrzenia, w związku z tym wydało się celowe poszerzenie naszych obserwacji patomorfologicznych o badania ultrastruktury.

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4.2.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na dwumiesięcznych szczurach rasy Wistar, obu płci. Przed podaniem insuliny odstawiono szczurom na 24 godz. stały pokarm, pozostawiając im swobodny dostęp do wody. Zwierzętom wstrzykiwano podskórną, jednorazowo, insulinę krystaliczną (Polfa), w dawce 0,5 j/m/100 g ciężaru ciała, przyjętej na podstawie wyników poprzednich badań (Wierzba-Bobrowicz 1979). Powodowała ona u dorosłych szczurów obniżenie zawartości glukozy we krwi poniżej 20 mg% na okres około 2 godz. i prowadziła do wystąpienia krótkotrwałej śpiączki, ustępującej samoistnie u większości zwierząt. Obserwacje kliniczne oraz zmiany zawartości glukozy we krwi zwierząt doświadczalnych po wstrzyknięciu insuliny opisano w poprzedniej pracy. Materiał kontrolny stanowiły szczury w tym samym wieku, którym wstrzyknięto podskórną fizjologiczny roztwór NaCl. Zwierzęta uśmiercano w 1, 3, 6 i 24 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Każda grupa obejmowała 3 zwierzęta doświadczalne i 1 zwierzę kontrolne. W momencie kończenia doświadczenia szczury usypiano przy pomocy eteru, po czym wykonywano przezsercową perfuzję, początkowo płynem fizjologicznym z dodatkiem heparyny, a następnie 3% roztworem aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym. Z mózgow wyjętych z jamy czaszki pobierano z okolicy ciemieniowej kory, zakrętu hipokampa i mózdzku, bloczki tkanki o wymiarach około 1 mm³. Wycinki dotrwalano w roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym, odwadniano w etanolach o wzrastającym stężeniu, a następnie zatapiano w Eponie 812. Z bloczków eponowych skrawano na ultramikrotomie f-my LKB półcienkie skrawki o grubości 1 nm, które barwiono błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym oraz ultracienkie skrawki, które po nałożeniu na siatki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obserwacje przeprowadzono i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

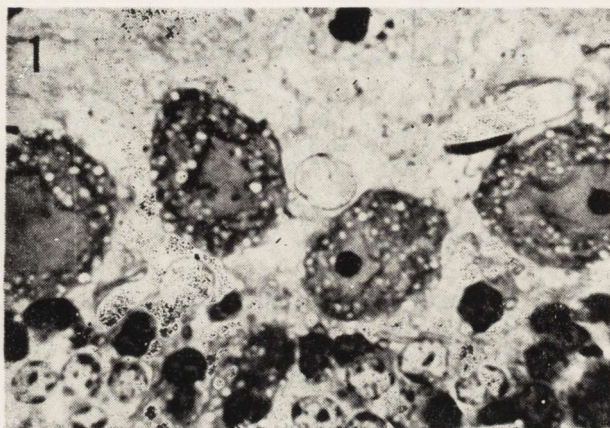
Zwierzęta kontrolne

W badaniu mikroskopowo-elektronowym stwierdzono cechy dobrego utrwalenia tkanki nerwowej. Badane elementy strukturalne kory mózgu, zakrętu hipokampa i mózdzku miały prawidłowy wygląd.

Zwierzęta doświadczalne

W skrawkach półcienkich, oglądanych w mikroskopie świetlnym, obserwowano liczne, różnej wielkości mikrowakuole rozsiane nieregularnie w cytoplazmie neuronów, a niekiedy obecne również w neuro-

pilu (ryc. 1). Zmiany te były najbardziej nasilone w 1 i 3 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Większą liczbę wodniczek obserwowano w perikarionach neuronów kory mózgu i komórek Purkinjego mózdzku, mniejszą w neurocytach zakrętu hipokampa. W 6 godz. liczba wodniczek w neuronach wszystkich badanych struktur była mniejsza, a u szczurów z 24 godz. przeżyciem spotykano je tylko sporadycznie.

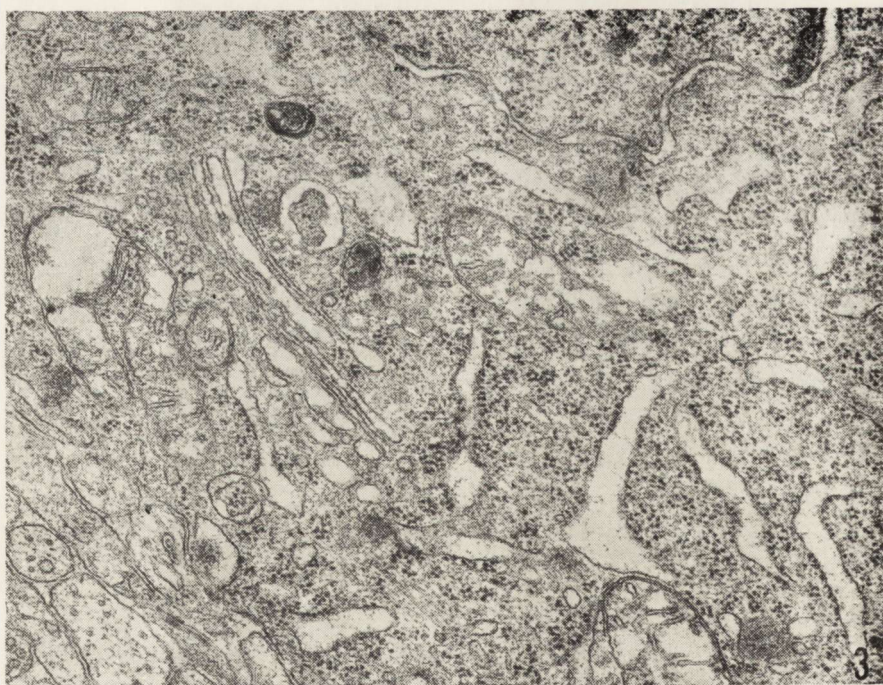
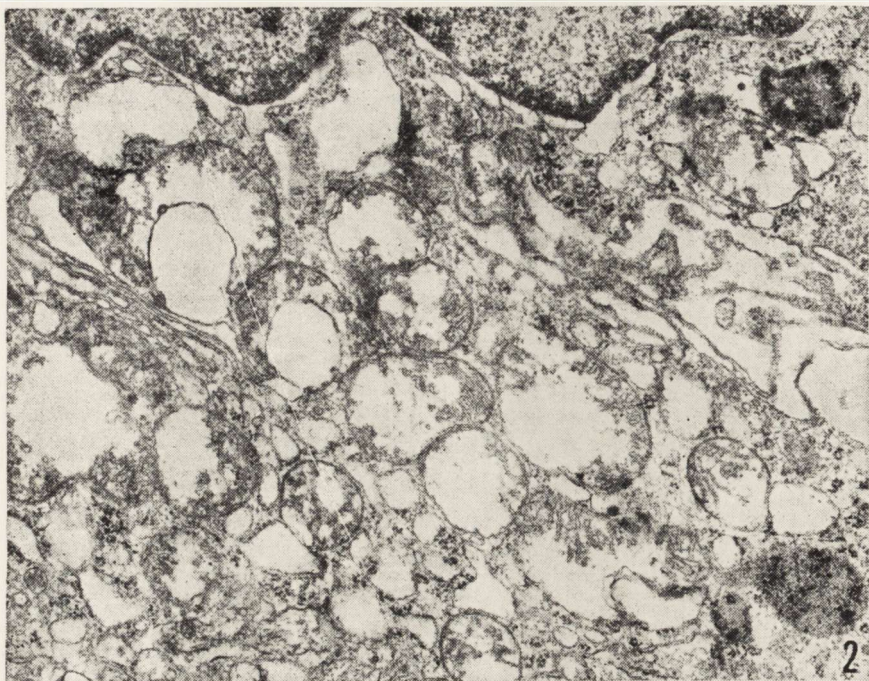


Ryc. 1. Szczur z 1 godz. przeżyciem po wstrzyknięciu insuliny. Widoczna mikro-wakuolizacja cytoplazmy komórek Purkinjego. Skrawek eponowy półcienki. Błękit toluidyny. Pow. 1600 \times .

Fig. 1. Rat with 1 h survival after insulin injection. Microvacuolization of Purkinje cells cytoplasm. Epon semithin section. Toluidine blue. \times 1600.

Badania mikroskopowo-elektronowe

W 1 godz. po wstrzyknięciu insuliny, największe zmiany obserwowano w neuronach i to zarówno kory ciemieniowej, jak i komórek Purkinjego mózdzku. W tym czasie prawie wszystkie mitochondria w perikarionach komórek Purkinjego wykazywały obrzmienie z uszkodzeniem grzebieni mitochondrialnych (ryc. 2). Zmienione mitochondria spotykano niekiedy również w wypustkach komórek nerwowych. Uszkodzeniu mitochondriów towarzyszyło poszerzenie kanałów aparatu Golgiego oraz siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Takie same zmiany obserwowano w neuronach kory ciemieniowej mózgu i to zarówno w małych, jak i dużych komórkach nerwowych. Natomiast w neuronach zakrętu hipokampa największe zmiany dotyczyły siatki śródplazmatycznej szorstkiej i aparatu Golgiego, a obrzmienie i uszkodzenie struktur błoniastych mitochondriów było mniej nasilone (ryc. 3). W żadnej z badanych okolic nie znaleziono zmian w osłonkach mieliniowych i w obrębie zakończeń synaptycznych. Elementy ścian naczyń włosowatych były niezmienione, natomiast przynacyniowo spo-



tykano obrzmiałe wypustki astrocytarne, w których tylko sporadycznie obserwowano obrzmiałe mitochondria.

U szczurów z 3 godz. przeżyciem, charakter i nasilenie uszkodzeń w komórkach nerwowych nie uległo zasadniczym zmianom. Ponadto w tym czasie poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej były pokryte mniejszą ilością rybosomów, obserwowano natomiast zwiększenie ilości polirybosomów. Częściej spotykano obrzmiałe wypustki astrocytarne, zarówno przynaczeniowo jak i poza nimi.

W 6 godz. od wstrzyknięcia insuliny, nasilenie zmian w mitochondriach komórek nerwowych wszystkich badanych struktur anatomicznych było mniejsze. W pojedynczych neuronach, wśród dosyć licznych obrzmiałych mitochondriów pozbawionych całkowicie lub częściowo grzebieni, spotykano mniej lub bardziej liczne mitochondria o prawidłowym wyglądzie (ryc. 4). Natomiast kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej oraz aparatu Golgiego były nadal poszerzone. Skupienia polirybosomów były liczne (ryc. 5). Nadal spotykano obrzmiałe wypustki astroglajowe.

Po upływie 24 godzin od podania insuliny, tylko nieliczne mitochondria wykazywały cechy uszkodzenia. Większość mitochondriów miała prawidłowo ukształtowane grzebienie (ryc. 6). Aparat Golgiego w komórkach nerwowych miał prawidłowy wygląd lub wykazywał jedynie nieznaczne poszerzenie kanałów. Tylko sporadycznie spotykano rozdęte kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej, natomiast nadal obserwowano skupienia polirybosomów i obrzmienie niektórych wypustek astroglajowych (ryc. 7).

OMÓWIENIE

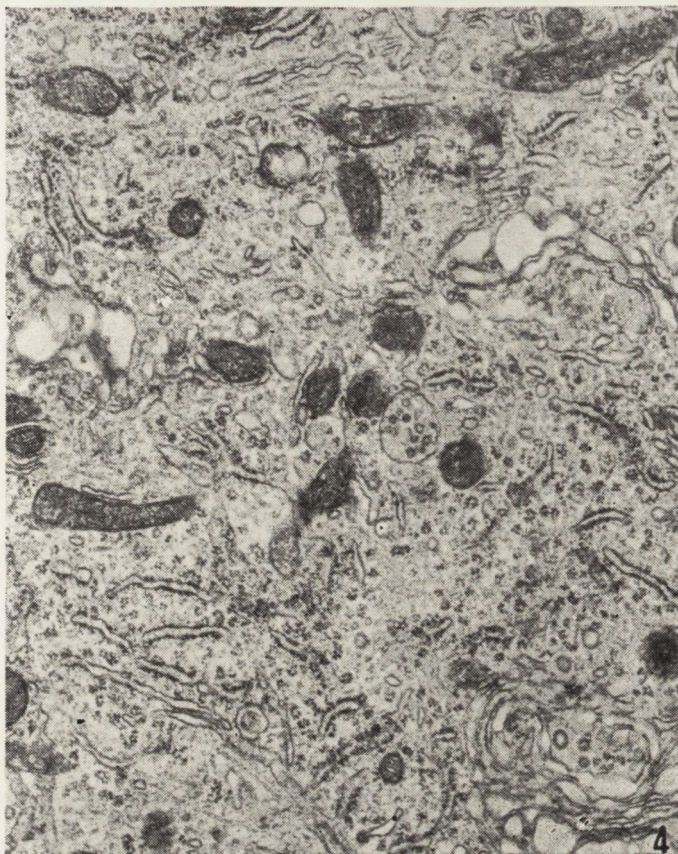
Z przeprowadzonych badań wynika, że ostre niedocukrzenie prowadzi do rozwoju głębokich zaburzeń ultrastrukturalnych mózgu szczura. Stwierdzone nieprawidłowości dotyczyły przede wszystkim peri-

Ryc. 2. Szczur z 1 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Fragment komórki Purkinjego. Obrzmienie mitochondriów niemal całkowicie pozbawionych grzebieni. Widoczne poszerzenie kanałów aparatu Golgiego i siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Pow. 14 000 X.

Fig. 2. Rat with 1 h survival after insulin injection. Fragment of Purkinje cell. Swollen mitochondria almost completely devoid of mitochondrial cristae, dilated channels of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus X 14 000.

Ryc. 3. Szczur z 1 godz. przeżyciem po wstrzyknięciu insuliny. Fragment neuronu zakrętu hipokampa. Znaczne poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Mniej nasilone uszkodzenie mitochondriów. Pow. 24 000 X.

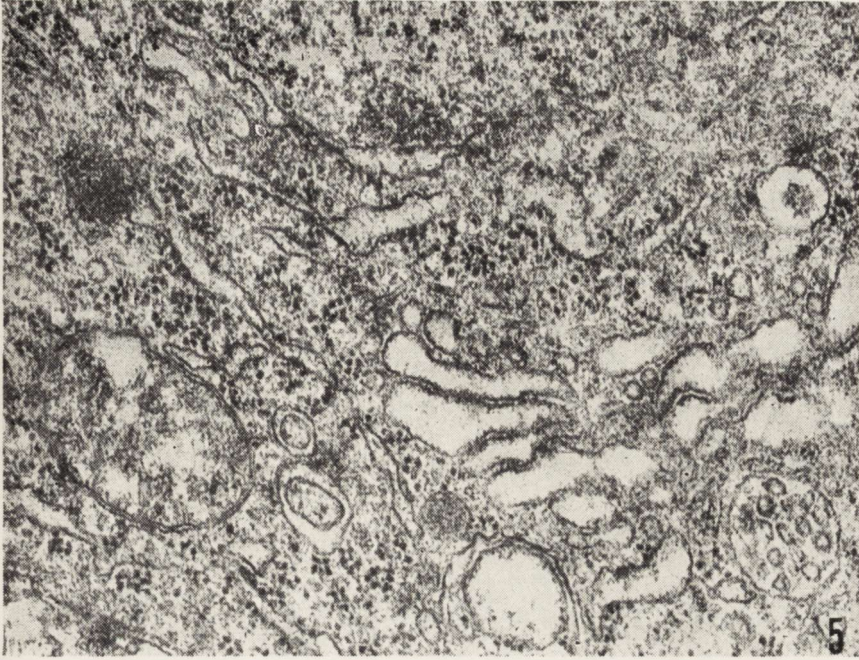
Fig. 3. Rat with 1 h survival after insulin injection. Fragment of hippocampal neuron. Marked dilatation of channels of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Mitochondrial abnormalities less pronounced. X 24 000.



Ryc. 4. Szczur z przeżyciem 6 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Fragment komórki Purkiniego. Widoczne mitochondria o prawidłowej budowie i poszerzone kanały aparatu Golgiego. Pow. 12 000 \times .

Fig. 4. Rat with 1 h survival after insulin injection. Normal mitochondria and dilated channels of Golgi apparatus \times 12 000.

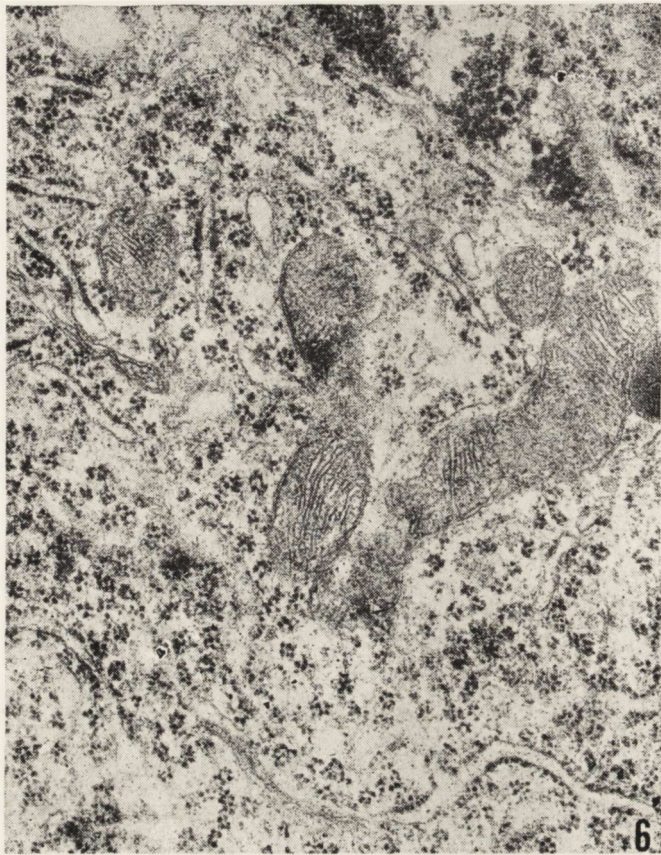
karionów komórek nerwowych wszystkich badanych struktur szarych i wyrażały się obrzmieniem mitochondriów z uszkodzeniem i porozrywaniem ich grzebieni, ponadto poszerzeniem kanałów siatki śródplazmatycznej szorstkiej i kanałów aparatu Golgiego oraz wzrostem ilości polirybosomów. Obrzmienie mitochondriów z mniej lub bardziej nasiloną destrukcją ich grzebieni, pojawiało się we wczesnym okresie niedocukrzzenia, po gwałtownym spadku zawartości glukozy we krwi i utrzymywało się w takim samym nasileniu w okresie, w którym poziom cukru był obniżony. Wzrost stężenia glukozy we krwi łączył się z ustępowaniem nieprawidłowości i prawie całkowitą normalizacją obrazu mikroskopowo-elektronowego mitochondriów w 24 godz. doświadczenia.



Ryc. 5. Szczur z 1 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Fragment neuronu zakrętu hipokampa. Poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Widoczne liczne skupienia polirybosomów. Pow. 30 000 \times .

Fig. 5. Rat with 1 h survival after insulin treatment. Fragment of hippocampal neuron. Dilatation of rough endoplasmic reticulum channels and numerous aggregations of polyribosomes. \times 30 000.

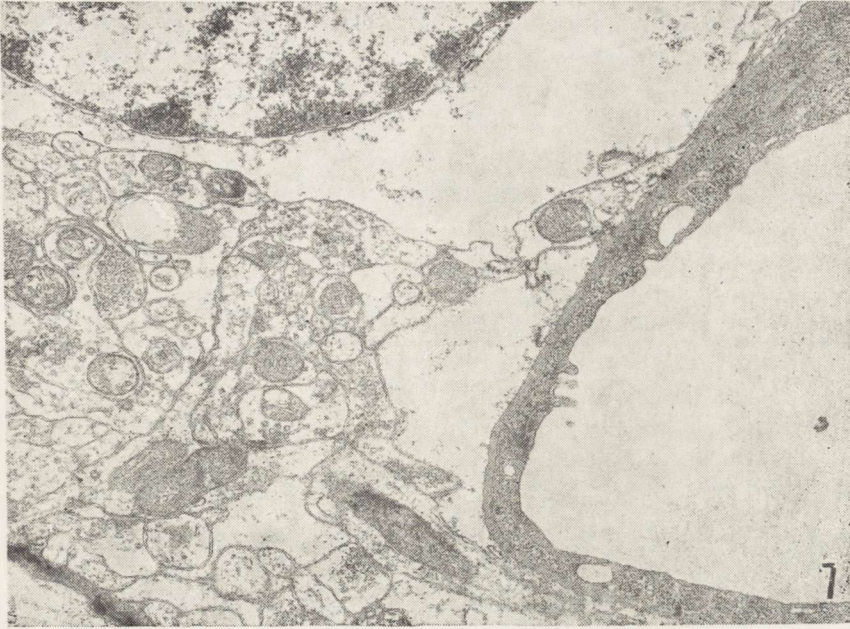
Zmiany w ultrastrukturze mitochondriów podobne do obserwowanych w naszym materiale opisywano w różnych modelach niedotlenienia i/lub niedokrwienia OUN (McGee-Russel 1970; Brown, Brierley 1971, Hartmann 1973), a także po zatruciu cyjankami oraz tlenkiem węgla (Korthals i wsp. 1973; Mossakowski, Gajkowska 1976; Brierley 1977). Obserwowano je także w hodowli tkanki nerwowej *in vitro* poddanej działaniu anoksji (Kraśnicka i wsp. 1974), jak również w skrawkach z mózgu inkubowanych w warunkach beztlenowych (Fujimoto 1965). Brown i Brierley (1971) stwierdzili uszkodzenie mitochondriów w neuronach OUN już w 5 min. po ekspozycji szczurów na działanie N_2 . Zmiany w budowie mitochondriów stanowią więc wczesne następstwo działania czynników patogennych, wspólne dla wszystkich typów ostrego niedotlenienia. W przeciwieństwie do uogólnionego uszkodzenia mitochondriów w komórkach nerwowych, mitochondria neurogleju są zwykle oszczędzone. To zróżnicowanie nasilenia uszkodzeń w obu typach komórek Hartmann i wsp. (1973) wiążą z ich odrębnością czynnościową i metaboliczną.



Ryc. 6. Szczur z przeżyciem 24 godz. po wstrzyknięciu insuliny. Fragment komórki Purkiniego. Mitochondria o prawidłowej budowie. Liczne skupienia poli-
rybosomów. Pow. 30 000 \times .

Fig. 6. Rat with 24 h survival after insulin injection. Fragment of Purkinje cell. Unchanged mitochondria and numerous aggregations of polyribosomes. \times 30 000.

Czas utrzymywania się nieprawidłowości w budowie mitochondriów jest niejednakowy w poszczególnych modelach doświadczalnych, zależnie od rodzaju i nasilenia czynnika uszkodzającego. W przedstawionym materiale zmiany ustępowały wraz ze wzrostem stężenia glukozy we krwi. Znajduje to wytłumaczenie w stosunkowo mało nasilonych i krótkotrwałych zaburzeniach przemiany energetycznej mózgu szczura w warunkach ostrej hipoglikemii poinsulinowej, wykazanych przez Ferendelli i Changa (1973) oraz Norberga i Siesjö (1976), w stwierdzonym u naszych zwierząt doświadczalnych niewielkim, statystycznie nieznamienne, spadku zawartości związków wysokoenergetycznych — ATP i fosfokreatyny (Wierzba-Bobrowicz, dane nie opublikowane), a także w wynikach badań Albrechta i wsp. (1979)



Ryc. 7. Szczur z 24 godz. przeżyciem po podaniu insuliny. Kora ciemieniowa. Widoczna obrzmiała przynaczyniowa wypustka astrocytu. Pow. 12 000 \times .

Fig. 7. Rat with 24 h survival after insulin treatment. Parietal cortex. Swollen perivascular astroglial process is seen. \times 12 000.

nad zachowaniem się glikogenu i enzymów metabolizujących glikogen w mózgach szczurów w warunkach ostrego niedocukrzenia. Nasilenie zmian mitochondrialnych w badanych strukturach było niejednakowe. Większe uszkodzenie neuronów kory nowej i komórek Purkiniego niż komórek nerwowych zakrętu hipokampa może być związane z ich większą wrażliwością na hipoglikemię. Do stałego obrazu zmian mikroskopowo-elektronowych w różnych typach niedotlenienia należy również poszerzenie siatki śródplazmatycznej szorstkiej i aparatu Golgiego. Opisano je w hipoksji prostej (Hager i wsp. 1960), w ischemii (Brown, Brierley 1971), w zatruciu cyjankami i tlenkiem węgla (Kort-hals i wsp. 1973; Mossakowski, Gajkowska 1976; Brierley 1977. Podobne zmiany, które rozwijały się prawie równolegle ze zmianami w mitochondriach, obserwowaliśmy w naszym materiale.

Pojawienie się skupień polirybosomów pod koniec trzeciej godziny doświadczenia, a więc w okresie normalizacji zawartości glukozy we krwi i ich występowaniu u szczurów z 24 godz. przeżyciem po wstrzyknięciu insuliny i prawidłowym poziomem cukru, może być związane z kompensacyjnym wzmożeniem procesu biosyntezy białek (Albrecht 1975), być może warunkującym odwracalność zmian ko-

mórkowych. Udział w procesie odnowy komórek może tłumaczyć występowanie skupień polirybosomów w czasie, gdy nastąpiła już prawie pełna normalizacja zaburzeń w budowie mitochondriów, kanałów aparatu Golgiego i siatki śródplazmatycznej szorstkiej.

W przeciwieństwie do zmian w neuronach, uszkodzenie struktur błoniastych astrocytów było nieznaczne. W komórkach glejowych dominującą nieprawidłowością było umiarkowane obrzmienie ich wypustek. Rozwijało się ono równolegle ze zmianami w perikarionach komórek nerwowych, podobnie jak w innych doświadczalnych modelach niedotlenienia lub niedokrwienia OUN (Brown, Brierley 1971).

Nieprawidłowości ultrastruktury neuronów obserwowane przez nas w warunkach ostrej hipoglikemii były zbliżone w ogólnym wzorcu do uszkodzeń spowodowanych innymi typami niedotlenienia lub niedokrwienia OUN. Podobieństwa w zakresie charakteru i dynamiki rozwoju tych zmian są zapewne związane ze zbliżonym mechanizmem zaburzeń tlenowego metabolizmu neuronów.

Autorka składa serdeczne podziękowanie prof. dr J. W. Borowiczowi za cenne konsultacje oraz dr B. Gajkowskiej i dr K. Olszewskiej za pomoc w wykonaniu zdjęć mikroskopowo-elektronowych.

T. Вежба-Бобровиц

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА МОЗГА КРЫСЫ В ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКЛИКЕМИИ

Резюме

Целью работы было установление субмикроскопических изменений в мозге во время острой гипогликемии, вызванной однократной инъекцией инсулина. Опыты проводились на взрослых крысах. Доза инсулина в кристаллическом виде составляла 0,5 м.е./100 г веса тела. Исследования проводились на животных спустя 1, 3, 6 и 24 часов их выживаемости после подачи гормона.

Было обнаружено, что снижение содержания глюкозы в крови ниже 20 мг% в течение 1,5—2 часов ведет к развитию в мозгах опытных животных глубоких обратимых нарушений ультраструктуры. Касаются они прежде всего перикарионов нервных клеток всех исследованных структур и проявляются главным образом изменениями в составе их оболочечных структур. В нервных клетках наблюдалось набухание митохондрий с повреждением и дегенерацией их крист, расширение канальцев шероховатого эндоплазматического ретикулума и Гольджиго аппарата, а также увеличение количества полирибосомов. По сравнению со степенью выраженности в нейронах — изменения в астроглии были незначительные с преобладанием умеренного набухания астроцитарных отростков.

Самое большое усиление нарушений в период самого большого снижения содержания глюкозы в крови и их упразднение вместе с нормализацией уровня сахара указывают на непосредственную связь ультраструктурных изменений с острой нехваткой сахара.

T. Wierzba-Bobrowicz

ELECTRON-MICROSCOPICAL PICTURE OF RAT BRAIN IN ACUTE
EXPERIMENTAL HYPOGLYCEMIA

Summary

The aim of the study was to establish the ultrastructural changes in the brain in the course of acute hypoglycemic state induced by a single insulin injection. The experiments were performed on adult rats. Dose of crystalline insulin was 0.5 i.u./100 g of body weight. The observations were done on the animals after 1, 3, 6 and 24 hrs of survival after the hormone injection. It was demonstrated that the decrease of blood glucose content to 20 mg% for 1.5–2 hrs leads to severe, reversible ultrastructural brain changes. In all studied structures the pericarya of neurons are affected mainly and expressed by the damage of their membrane structures. In the nerve cells swelling mitochondria with damaged and atrophied cristae, dilated channels of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and increased number of polyribosomes were observed. In comparison to intensive neuronal abnormalities the changes in neuroglia were slight with predominant, moderate edematous injuries of astroglia processes.

The presence of the most pronounced changes in the period of the lowest blood glucose content and the retreat of the changes parallel to the blood sugar normalization may point at the direct connection between ultrastructural abnormalities and acute hypoglycemia.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Niektóre etapy biosyntezy białka i RNA w mózgu szczura po wielokrotnym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 251–258.
2. Albrecht J., Hilgier W., Sikorska M., Mossakowski M. J.: Wpływ doświadczalnej hipoglikemii na zawartość glikogenu i aktywność enzymów metabolizujących glikogen w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 523–533.
3. Brierley J. B.: Cyanide intoxication in *Macaca mulatta*. *Physiological and neuropathological aspects.* *J. neurol. Sci.* 1977, 31, 133–157.
4. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The nature and time course of the neuronal alterations resulting from oligoemia and hypoglycaemia in the brain of *Macaca mulatta*. *Brain Res.* 1971a, 25, 483–499.
5. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The neuropathology of insulin-induced hypoglycaemia in a Primate (*M. mulatta*). Topography and cellular nature. W: *Brain hypoxia.* Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastic Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books, Philadelphia* 1971b, 225–230.
6. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *J. exp. Path.* 1968, 2, 87–106.
7. Brown A. W., Excell B. J., Meldrum B. S.: Brain damage in the Rhesus monkey resulting from profound arterial hypotension. I. Its nature, distribution and general physiological correlates. *Brain Res.* 1969, 13, 68–100.
8. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature and time course of anoxic-ischaemic cell change in the rat brain. An optical and electron microscope study. W: *Brain hypoxia.* Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastic Internat. Med. Publ. W. Heinemann Medical Books, Philadelphia* 1971, 49–60.

9. Ferendelli J. A., Chang M. M.: Brain metabolism during hypoglycaemia. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 173—177.
10. Fujimoto S.: Changes in the metabolism and the ultrastructure in brain cortex slices under anaerobic conditions. *Psychiat. Neurol.* 1965, 67, 759—779.
11. Hager H., Hirscherberger W., Scholz W.: Electron microscopic changes in brain tissue of Syrian hamsters following acute hypoxia. *Aerospace Med.* 1960, 31, 379—387.
12. Hartmann J. F., Becker R. A., Cohen M. M.: Cerebral ultrastructure in experimental hypoxia and ischaemia. W: *Monographs in Neural Sciences*, Red. M. M. Cohen, Chicago 1973, 50—64.
13. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 273—300.
14. Kraśnicka Z., Konowałow H., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje czuciowe hodowane in vitro. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 357—370.
15. McGee-Russel S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
16. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 441—449.
17. Norberg K., Siesjö B. K.: Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 1976, 26, 345—352.
18. Schwedenberg T. H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia, *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1959, 18, 597—608.
19. Wierzba-Bobrowicz T.: Wczesne zmiany strukturalne w mózgu szczura w ostrym doświadczalnym niedocukrzeniu. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 225—237.

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

IRMINA B. ZELMAN, TERESA WIERZBA-BOBROWICZ

OBRAZ STRUKTURALNYCH USZKODZEŃ MÓZGU SZCZURA W ZALEŻNOŚCI OD NASILENIA ZABURZEŃ TOWARZYSZĄCYCH HIPOGLIKEMII

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

Na obraz patomorfologiczny ostrej encefalopatii hipoglikemicznej składają się nieprawidłowości spowodowane obniżeniem zawartości glukozy we krwi oraz zmiany stanowiące następstwo zaburzeń wywołanych przez stres hipoglikemiczny. W warunkach patologii ludzkiej odróżnienie wykładników działania czystej hipoglikemii od uszkodzeń rozwijających się na skutek zaburzeń krążeniowo-oddechowych, jest praktycznie niemożliwe. Badania przeprowadzone na modelu przedłużonej kontrolowanej hipoglikemii u małp umożliwiły określenie charakteru i lokalizacji, zarówno wczesnych, jak i odległych zmian w mózgu, które można było odnieść wyłącznie do niedocukrzenia (Kahn, Myers 1971; Myers, Kahn 1971; Meldrum i wsp. 1971; Brierley i wsp. 1971). W doświadczeniach tych wykazano, że wczesne zmiany strukturalne spowodowane „czystą” hipoglikemią są takie same jak zmiany rozwijające się w następstwie niedotlenienia hipoksyjnego, ischemicznego lub cytotoksycznego (McGee-Russel i wsp. 1970; Brierley i wsp. 1973). W modelu kontrolowanej hipoglikemii u małp, tj. w warunkach zapewniających prawidłową funkcję układu krążenia i oddechowego, zapobiegających wystąpieniu innych dodatkowych zaburzeń wykazano, że 4—5 godzinne obniżenie poziomu cukru we krwi poniżej 20 mg% nie powoduje u większości zwierząt żadnych zaburzeń neurologicznych i nie prowadzi do rozwoju strukturalnych uszkodzeń mózgu (Kahn, Myers 1971; Brierley i wsp. 1971). Autorzy modelu podkreślają jednak, że tolerancja na niedocukrzenie jest bardzo zróżnicowana u poszczególnych osobników tego samego gatunku.

Problem węzłowy 10.4.2.

Badania biochemiczne, przeprowadzone na modelu hipoglikemii po-insulinowej u szczurów wykazały, że dopiero obniżenie zawartości glukozy w mózgu poniżej 1 nmola/g tkanki prowadzi do spadku ATP i fosfokreatyny i do zaburzenia przemiany energetycznej OUN (Lewis i wsp. 1974; Norberg, Siesjö 1976). Zmiany te były skorelowane ze stanem klinicznym — występowały zawsze u zwierząt będących w głębokiej śpiączce i z izoelektrycznym zapisem EEG, nie były natomiast bezpośrednio zależne od dawki podanej insuliny.

Wierzba-Bobrowicz (1979) ustaliła, że jednorazowe wstrzyknięcie szczurom insuliny w dawce 0,5 jm/100 g ciężaru ciała, prowadzi do rozwoju w mózgu tych zwierząt charakterystycznych zmian o typie mikrowakuolizacji i schorzenia ischemicznego neuronów, a odwracalność tych nieprawidłowości potwierdziła w badaniu mikroskopowo-elektronowym (Wierzba-Bobrowicz 1980).

Ustalony wpływ ogólnoustrojowych zaburzeń na przebieg kliniczny zespołu ostrego niedocukrzenia oraz ich udział w kształtowaniu obrazu zmian patomorfologicznych w mózgu, skłonił nas do podjęcia badań mających na celu określenie morfologicznych wykładników wspomnianych zaburzeń w modelu doświadczalnej hipoglikemii poinsulinowej u szczura.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych szczurach rasy Wistar, obu płci, wagi 180—220 g, którym wstrzykiwano podskórnie roztwór insuliny krystalicznej (Polfa) w dawce od 1 do 5 jm/100 g ciężaru ciała. Przed wstrzyknięciem insuliny zwierzętom odstawiano na 24 godz. stały pokarm pozostawiając im swobodny dostęp do wody. Kontrolę stanowiły szczury w tym samym wieku, którym wstrzyknięto fizjologiczny roztwór soli w takiej samej objętości. Czas przeżycia zwierząt doświadczalnych i kontrolnych wynosił 1, 2, 4, 6, 24 i 48 godz. Po zastosowaniu insuliny w dawce 4 i 5 jm/100 g nie udało się utrzymać zwierząt przy życiu do 24 godz.; najdłuższy czas obserwacji szczurów tej grupy wynosił 6 godz.

W momencie kończenia doświadczenia szczurom wykonywano przezsercową perfuzję, początkowo płynem fizjologicznym z dodatkiem heparyny, a następnie roztworem formaliny w 0,9% NaCl. Po zakończeniu perfuzji szczury dekapitowano i pozostawiano głowy w formalinowym roztworze perfuzyjnym na 24 godz. Po tym czasie wyjmowano z jamy czaszkowej mózgi wraz z pniem i mózdzkiem i krojono je w płaszczyźnie czołowej na bloczki, które przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny. Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu i wg metody Heidenhaina.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

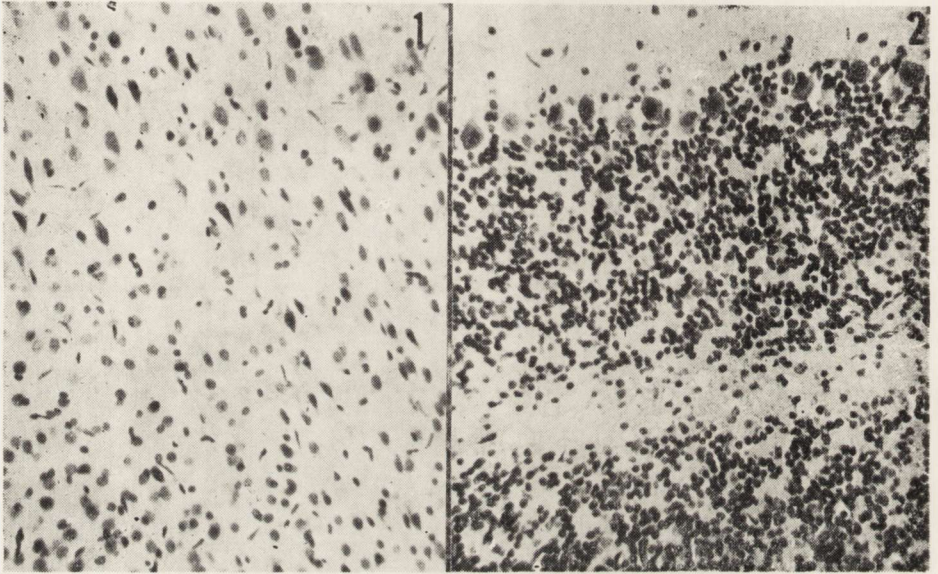
Przez 30—60 min. po wstrzyknięciu insuliny szczury, niezależnie od zastosowanej dawki, nie wykazywały na ogół wyraźnych odchyień od normy. Pod koniec pierwszej i na początku drugiej godziny zwierzęta stawały się mniej ruchliwe, sennie lub pobudzone. W 2 godz. pojawiały się u większości zwierząt zaburzenia krążeniowo-oddechowe o różnym nasileniu, rzadziej pojedyncze napady drgawkowe. W 3—4 godz. obserwowano największe zaburzenia kliniczne: sinicę, zaburzenia oddechu, śpiączkę, drżenia lub toniczno-kliniczne napady drgawkowe, niekiedy wytrzeszcz gałek ocznych. Czas ten był okresem krytycznym dla zwierząt, których stan skłaniał niekiedy do wykonania perfuzji we wcześniejszym niż planowano terminie. Nasilenie i czas trwania zaburzeń klinicznych zwiększały się na ogół wraz ze wzrastającą dawką hormonu; u niektórych szczurów nawet małe dawki insuliny powodowały ciężką niewydolność krążeniowo-oddechową i zgon w okresie hipoglikemii. Zwykle w 5—6 godz. stan kliniczny zwierząt ulegał poprawie i od tego czasu obserwowano stopniowy powrót do stanu prawidłowego. Pomimo wyrównania zaburzeń zwierzęta często padały w kilka lub kilkanaście godzin po okresie hipoglikemii.

Obserwacje neuropatologiczne

W mózgach szczurów z 1 godz. przeżyciem po podaniu insuliny obserwowano w korze nowej, rzadziej w zakręcie hipokampa, nieliczne rozsiane neurony wykazujące mikrowakuolizację oraz komórki o ciemnej, nierówno barwiącej się cytoplazmie, w której były widoczne pojedyncze drobne wodniczki. W korze półkul mózgowych uszkodzone neurony znajdowano w III i V warstwie. Podobne zmiany wykazywały pojedyncze komórki Purkinjego w mózdzku. Tego typu nieprawidłowości częściej stwierdzano u zwierząt, które otrzymały wyższe dawki insuliny.

U szczurów z przeżyciem 2, 4 i 6 godz. zespół obserwowanych zmian był bardziej zróżnicowany, a charakter, lokalizacja i nasilenie uszkodzeń były uwarunkowane stanem klinicznym zwierząt. W mózgach szczurów z 2 godz. przeżyciem liczba uszkodzonych neuronów była większa, a zmiany ischemiczne komórek nerwowych przeważały nad mikrowakuolizacją. U niektórych zwierząt obserwowano ogniskowe nagromadzenie nieprawidłowych neuronów w obszarach kory stanowiących pogranicze unaczynienia tętnicy środkowej i tylnej mózgu (ryc. 1) oraz tętnicy środkowej i przedniej mózgu. U niektórych szczurów z 2 godz. przeżyciem można było zauważyć rozluźnienie struk-

tury podłoża i inne cechy obrzmienia tkanki, najbardziej zaznaczone w hipokampie, w mózdku oraz w obrębie pnia mózgu. Zarówno u zwierząt z 2 godz. przeżyciem jak i dłuższym, w przypadku obrzmienia mózgu znajdowano w mózdku komórki Purkiniego o ciemnych, nadbarwliwych jądrach i silnie eozynochłonnej cytoplazmie (ryc. 2). Tak zmienione komórki obserwowano w najbardziej wysuniętych płacikach górnej i bocznej powierzchni mózdku, a także w obrębie robaka nad komorą IV.



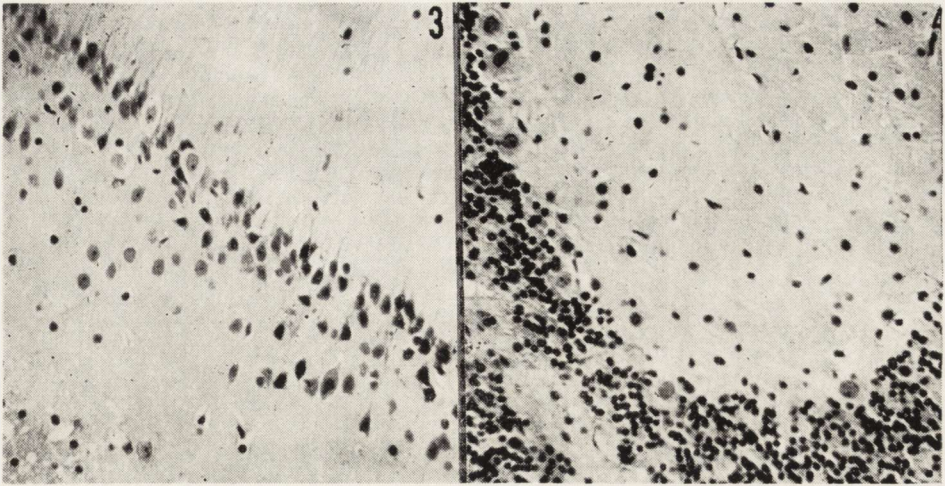
Ryc. 1. Szczur z 2 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 4 jm/100 g. Ischemicznie zmienione komórki w korze ciemieniowej. W niektórych neuronach widoczne pojedyncze wodniczki. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 1. Rat with 2 h survival after injection of insulin in a dose of 4IU/100 g. Ischemic neurons in parietal cortex. In some nerve cells single vacuoles are visible. H.-E. \times 120.

Ryc. 2. Szczur z 2 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 4 jm/100 g. Komórki Purkiniego o ciemnych, nadbarwliwych jądrach i silnie eozynochłonnej cytoplazmie. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 2 Rat with 2 h survival after injection of insulin in a dose of 4 IU/100 g. Purkinje cells with dark hyperchromatic nuclei and strongly eosinophilic cytoplasm. H.-E. \times 120.

W mózgach szczurów z 4 godz. przeżyciem ulegały nasileniu cechy obrzmienia tkanki nerwowej. Zmianom ischemicznym towarzyszyło ciężkie uszkodzenie neuronów kory mózgu, hipokampa (ryc. 3) i komórek Purkiniego (ryc. 4.) W opuszcze wyraźnie narastały nieprawidłowości dotyczące neuronów, które wykazywały różne typy uszkodzeń komórkowych (ryc. 5, 6, 7). Podobnie jak w poprzedniej gru-



Ryc. 3. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 3 jm/100 g. Wśród ischemicznie zmienionych komórek piramidowych zakrętu hipokampa widoczne pojedyncze rozplywające się neurony. Zwraca uwagę rozluźnienie struktury tkanki. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 3. Rat with 2 h survival after injection of insulin in a dose of 3 IU/100 g. Among ischemic neurons of hippocampal pyramidal cells layer, necrotic nerve cells are visible. H.-E. \times 120.

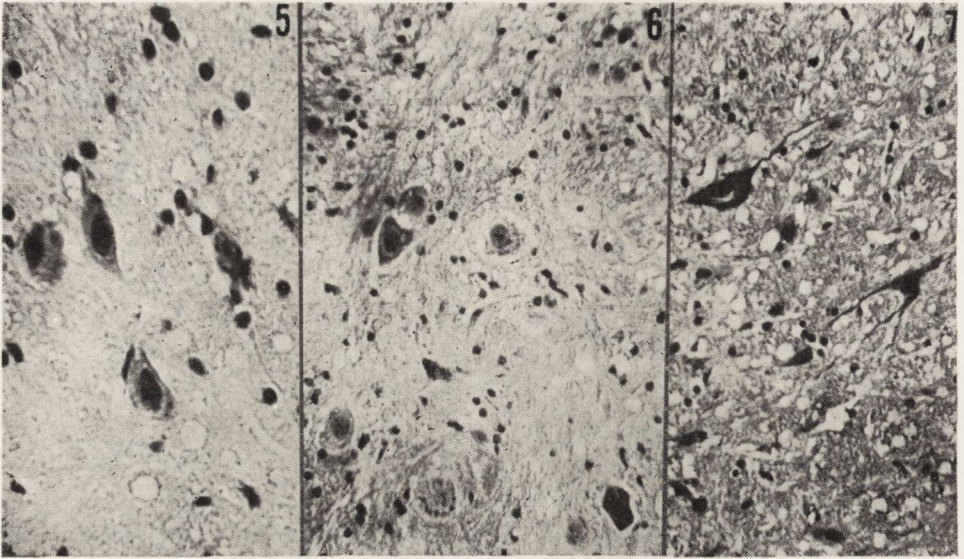
Ryc. 4. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 2 jm/100 g. Uszkodzone komórki Purkinje. Widoczne cienie komórek na dnie rowka. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 4. Rat with 4 h survival after injection of insulin in a dose of 2 IU/100 g. Damaged Purkinje cells and shadows of disappearing neurons in cerebellar folia. H.-E. \times 120.

pie czasowej, u niektórych zwierząt zmiany ograniczały się do ischemicznego uszkodzenia neuronów, nasilającego się na pograniczu unaczynienia pni tętniczych (ryc. 8).

W 6 godz. po podaniu insuliny zmiany były podobne, z dominującym ischemicznym i ciężkim uszkodzeniem neuronów, obecnością rozplywających się cieni komórkowych, obrzmieniem komórek glejowych i rozrzedzeniem podłoża. Uszkodzone neurony znajdowano również w strukturach pnia, w których poprzednio nie obserwowano zmian (ryc. 9).

W 24 i 48 godz. (okres ten przeżyły tylko szczury, które otrzymały niższe dawki hormonu i które okres hipoglikemii przeżyły bez nasilonych zaburzeń ogólnoustrojowych) oprócz zmienionych ischemicznie neuronów znajdowano niewielkie rozsiane i okołonaczyniowe ubytki komórek nerwowych w korze półkul mózgowych oraz ubytki komórek Purkinje, szczególnie na dnie rowków. U jednego szczura stwierdzono odcinkowy ubytek neuronów opaski zębatej (ryc. 10).



Ryc. 5. Szczur z przeżyciem 4 godz. po podaniu insuliny w dawce 2 $\mu\text{m}/100$ g. Ischemicznie zmienione neurony w opuszce z pojedynczymi wodniczkami w cytoplazmie. H.-E. Pow. 240 \times .

Fig. 5. Rat with 4 h survival after injection of insulin in a dose of 2 IU/100 g. Ischemic neurons in medulla. Some of nerve cells with single vacuoles in cytoplasm. H.-E. \times 240.

Ryc. 6. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 4 $\mu\text{m}/100$ g. Uszkodzone komórki nerwowe w opuszce. Widoczne rozluźnienie struktury tkanki. H.-E. Pow. 240 \times .

Fig. 6. Rat with 4 h survival after injection of insulin in a dose of 4 IU/100 g. Damage of the nerve cells in medulla. Tissue loosening is visible. H.-E. \times 240.

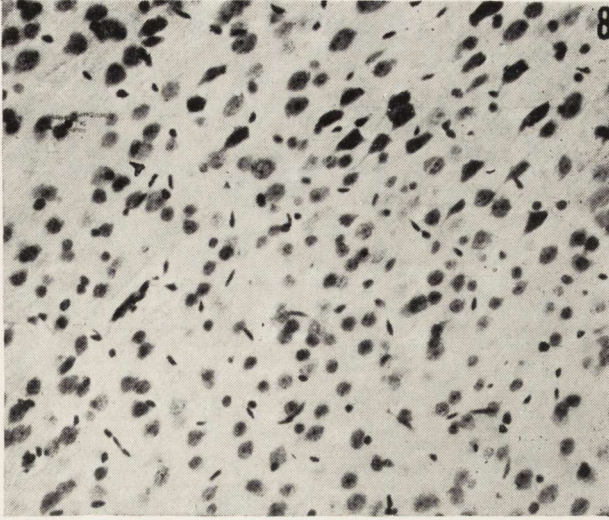
Ryc. 7. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 5 $\mu\text{m}/100$ g. Ciemne obkurczone neurony opuszki. Widoczne zarysy jąder i wypustek komórkowych. H.-E. Pow. 240 \times .

Fig. 7. Rat with 4 h survival after injection of insulin in a dose of 5 IU/100 g. Dark sclerotic neurons with visible nuclei and nerve processes in medulla. H.-E. \times 240.

OMÓWIENIE

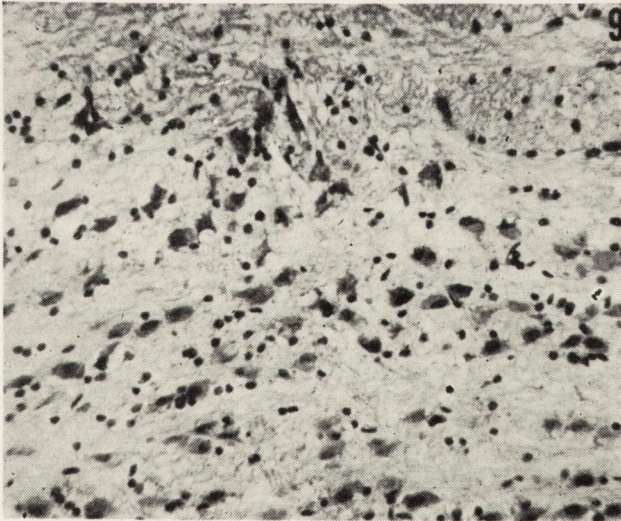
Przedstawione wyniki badań wskazują na sekwencję rozwoju uszkodzeń strukturalnych OUN w przebiegu ostrego niedocukrzenia i na zróżnicowany patomechanizm zaburzeń, mających udział w kształtowaniu obrazu patomorfologicznego ostrej encefalopatii hipoglikemicznej.

Wczesnym bezpośrednim następstwem drastycznego obniżenia zawartości glukozy we krwi jest mikrowakuolizacja komórek nerwowych, poprzedzająca rozwój schorzenia ischemicznego neuronu. Czas pojawienia się zmian wakuolizacyjno-ischemicznych jest różny w zależności od typu niedotlenienia i czasu jego trwania. W anoksyjno-



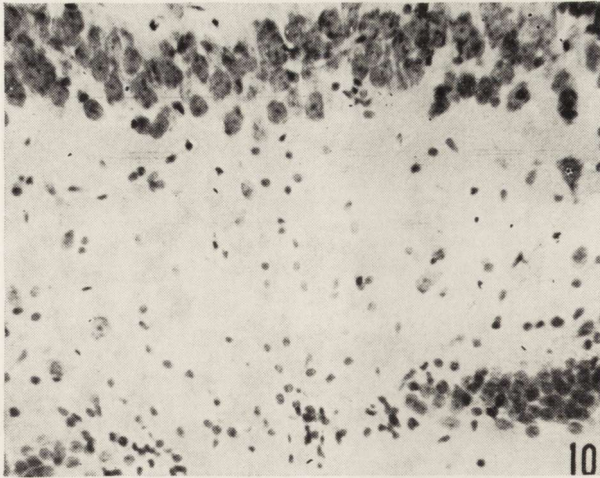
Ryc. 8. Szczur z 4 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 5 μ m/100 g. Skupienie ischemicznych neuronów w korze ciemieniowej na pograniczu unaczynienia tętnicy środkowej i tylnej mózgu. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 8. Rat with 4 h survival after injection of insulin in a dose of 5 IU/100 g. Accumulation of ischemic neurons in parietal cortex in the border zone of middle and posterior cerebral artery. H.-E. \times 120.



Ryc. 9. Szczur z 6 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 4 μ m/100 g. Zmiany ischemiczno-wakulizacyjne w jądrach własnych mostu. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 9. Rat with 6 h survival after injection of insulin in a dose of 4 IU/100 g. Ischemic-vacuolar changes in neurons of *nuclei proprii pontis*. H.-E. \times 120.



Ryc. 10. Szczur z 24 godz. przeżyciem po podaniu insuliny w dawce 2 $\mu\text{m}/100$ g. Odcinkowy ubytek neuronów w opasce zębatej zakrętu hipokampa. H.-E. Pow. 120 \times .

Fig. 10. Rat with 24 h survival after injection of insulin in a dose of 2 IU/100 g. Segmental loss of neurons in fascia dentata of Ammon's horn. H.-E. \times 120.

ischemicznym modelu Levine'a mikrowakuolizację neuronów kory i hipokampa stwierdzano już po 5—15 minutowej ekspozycji szczurów na działanie N_2 . Tego typu zmiany rozsiane głównie w korze mózgu i mózdzku obserwowano u szczurów po jednorazowym wstrzyknięciu insuliny w dawce 0,5 $\mu\text{m}/100$ g ciężaru ciała (Wierzba-Bobrowicz 1979), a w naszym doświadczeniu — u zwierząt uśmiercanych przed ujawnieniem się zaburzeń krążeniowo-oddechowych. Zmiany o podobnym charakterze i umiejscowieniu obserwowali Brierley i wsp. (1971) w modelu kontrolowanej hipoglikemii u małp, przy czym ujawniały się one po znacznie dłuższym okresie niedocukrzenia.

Badania biochemiczne przeprowadzone na modelach kontrolowanej i niekontrolowanej hipoglikemii u szczurów wskazują, że w warunkach obniżonej zawartości glukozy we krwi poniżej 20 mg% po jednorazowym wstrzyknięciu insuliny, bilans energetyczny OUN jest wyrównany (Lewis i wsp. 1974; Norberg, Siesjö 1976; Albrecht i wsp. 1979) chociaż w tym okresie mogą występować zmiany wakuolizacyjno-ischemiczne komórek nerwowych. Pojawienie się rozleglejszych i trwałych uszkodzeń mózgu może wiązać się z wyczerpaniem możliwości mechanizmów kompensacyjnych na skutek zbyt długo trwającego niedocukrzenia lub zadziałania innych czynników, zaburzających dodatkowo przemianę energetyczną OUN. Klasycznym przykładem pierwszej sytuacji są wyniki uzyskane w modelu przedłużonej kontrolowanej hipoglikemii u małp, u których dopiero w 6 godz. niedo-

cukrzemicy ujawniały się u większości zwierząt przejściowe lub trwałe zaburzenia neurologiczne, pomimo braku jakichkolwiek wykładników niedotlenienia i niedokrwienia OUN (Kahn, Myers 1971). Odległe następstwo stanu hipoglikemicznego u tych zwierząt stanowiły rozległe ubytki i warstwowe zaniki neuronów oraz martwice zupełne i niezupełne w korze półkul mózgowych i w *striatum*, nie związane topograficznie z pograniczem unaczynienia (Myers, Kahn 1971).

W modelu hipoglikemii niekontrolowanej występują często u zwierząt doświadczalnych objawy niewydolności krążenia i oddechu oraz napady drgawkowe, które powodują dodatkowe niedotlenienie i niedokrwienie OUN. Wykładnikiem patomorfologicznym działania tych czynników było w naszym materiale ogniskowe nasilenie uszkodzeń w obrębie pogranicza unaczynienia oraz obrzmienia mózgu ze zwiększeniem nieprawidłowości w półkulach mózgu i w mózdzku oraz pojawieniem się rozległego uszkodzenia neuronów opuszki. We wspomnianym uprzednio modelu kontrolowanej hipoglikemii u małp, wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego obserwowano tylko u tych zwierząt, u których badane parametry wskazywały na niedotlenienie OUN (Myers, Kahn 1971), a ogniskowe zmiany w strefie pogranicza unaczynienia obserwowano w przypadku obniżenia ciśnienia krwi tętniczej poniżej 50—40 mm Hg (Meldrum i wsp. 1971). Zaburzenia rytmu serca i migotanie komór, pojawiające się we wczesnym okresie hipoglikemii w związku z hipopotasemią i uwolnieniem endogennych katecholamin, mogą prowadzić do spadku ciśnienia krwi i niedokrwienia mózgu. Występowanie zaburzeń oddychania w okresie, w którym występuje spadek zawartości glukozy i glikogenu w mózgu (Mayman, Tijerina 1971; Lewis i wsp. 1974; Norberg, Siesjö 1976) stwarza sytuację szczególnej wrażliwości tkanki nerwowej na niedotlenienie i towarzyszące mu zakwaszenie. Stanowią one prawdopodobnie bezpośrednią przyczynę obrzmienia elementów tkanki nerwowej i ciężkiego obrzękowego uszkodzenia neuronów.

Na szczególną uwagę zasługuje przy tym nasilenie zmian komórkowych w obrębie pnia mózgu, a zwłaszcza opuszki, które w modelu kontrolowanej hipoglikemii u małp nie wykazywały w żadnym okresie nieprawidłowości (Myers, Kahn 1971). Wydaje się, że można w tym wypadku uwzględnić możliwość miejscowych zaburzeń krążenia w obrębie pnia, towarzyszących jego przemieszczeniu w kierunku kanału kręgowego w związku z rozwojem ciasnoty wewnątrzczaszkowej. Uszkodzenie neuronów tworzących siatkę pnia i centralnych ośrodków oddychania i krążenia może stanowić bezpośrednią przyczynę zgonu w trakcie hipoglikemii lub we wczesnym okresie pohipoglikemicznym. Może ono również stanowić przyczynę niemożności wyrównania zabu-

rzeń przez dożylne podanie glukozy, obserwowane zarówno w patologii ludzkiej jak i w warunkach doświadczalnych.

И. Б. Зельман, Т. Вежба-Бобрович

КАРТИНА СТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЗГА КРЫСЫ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ГИПОГЛИКЕМИИ

Резюме

Целью работы было установление влияния общеорганизмальных нарушений сопутствующих состояниям острой нехватки сахара на развитие патоморфологических изменений в мозге. Опыты проводились на крысах породы Вистар. Кристаллический инсулин вводился животным однократно в дозе от 1 до 5 м.е./100 г веса тела. Время выживания составляло 1, 2, 4, 6, 24 и 48 часов.

Обнаружено, что толеранция на действие инсулина является очень разной у отдельных животных и степень структурных нарушений, а также их распределение зависят прежде всего от степени общеорганизмальных нарушений имеющих место по инъекции гормона. Независимо от величины дозы инсулина, в случае небольших и быстро проходящих нарушений, типичные для острого дефицита сахара изменения, обнаруживаются рассеянно в коре мозга и мозжечке, в меньшей степени в подкорковых структурах и стволе мозга. У животных с тяжелыми общеорганизмальными нарушениями набухание и ишемия мозга ведут к очаговому образованию структурных повреждений в типичных для этих процессов районах центральной нервной системы. Отчетливое нахождение повреждений ствола и ретикулярной формации может быть непосредственной причиной смерти опытных животных во время гипогликемии и в ранний постгипогликемический период.

I. B. Zelman, T. Wierzba-Bobrowicz

ULTRASTRUCTURAL PICTURE OF RAT BRAIN DAMAGE DEPENDING
TO AN INTENSITY OF HYPOGLYCEMIA

Summary

The aim of the study was to establish an influence of generalized metabolic disturbances accompanying the acute hypoglycemic states on the development of the patomorphological changes in the brain. The experiments were performed on Wistar rats. Crystalline insulin was injected to the rats in a single dose of 1 to 5 i.u./100 g of the body weight. The time of survival was 1, 2, 4, 6, 24 and 48 hrs.

It was stated that particular animals exhibit different tolerance to insulin but the intensity of the structural changes and their distribution mainly depend on the severity of generalized metabolic disturbances appearing after the hormone injection. Apart from the insulin dose the characteristic changes of acute hypoglycemia are dispersed through the cerebral and cerebellar cortex. Less pronounced changes are present in the subcortical structures and in the brain stem. In the animals with severe metabolic organs disturbances, brain edema and ischemia lead to more intensive focal structural changes in the CNS structures typical for these processes. Distinct intensification of the brain stem and reticular formation damage can be direct cause of the animals death occurring during hypoglycemia and in the early period after the hypoglycemic state.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J., Hilgier W., Sikorska M., Mossakowski M. J.: Wpływ doświadczalnej hipoglikemii na zawartość glikogenu i aktywność enzymów metabolizujących glikogen w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 523—533.
2. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The neuropathology of insulin-induced hypoglycaemia in a Primate (M. Mulatta): Topography and cellular nature. W: *Brain hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Med. Books. London* 1971, 225—230.
3. Brierley J. B., Meldrum B. S., Brown A. W.: The threshold and neuropathology of cerebral „anoxic-ischemic” cell change. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 367—374.
4. Kahn J. K., Myers R. E.: Insulin-induced hypoglycaemia in the non-human primate. I. Clinical consequences. W: *Brain hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Med. Books. London* 1971, 185—194.
5. Lewis L. D., Ljunggren B., Ratcheson R. A., Siesjö B. K.: Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia related to blood glucose and to EEG. *J. Neurochem.* 1974, 23, 673—679.
6. Mayman Ch. I., Tijerina M. L.: The effect of hypoglycaemia on energy reserves in adult and newborn brain. W: *Brain hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Med. Books. London* 1971, 242—250.
7. McGee-Russel S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell changes in rat brain. *Brain Res.* 1970, 20, 193—200.
8. Meldrum B. S., Horton R. W., Brierley J. B.: Insulin-induced hypoglycaemia in the Primate: Relationship between physiological changes and neuropathology. W: *Brain hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann. Med. Books. London* 1971, 207—224.
9. Myers R. E., Kahn J. K.: Insulin-induced hypoglycaemia in the non-human primate. II. Long-term neuropathological consequences. W: *Brain hypoxia*. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. *Spastics Internat. Med. Publ. W. Heinemann Med. Books. London* 1971, 195—206.
10. Norberg K., Siesjö B. K.: Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 1976, 26, 345—352.
11. Wierzba-Bobrowicz T.: Wczesne zmiany strukturalne w mózgu szczura w ostrym doświadczalnym niedocukrzeniu. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 225—235.
12. Wierzba-Bobrowicz T.: Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgu szczura w ostrej doświadczalnej hipoglikemii. *Neuropat. Pol.* 1980, 18, 289—300.

Adres autorek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Maz., ul. Warszawska 126.

THE 3rd POLISH-HUNGARIAN SYMPOSIUM
on TOXIC ENCEPHALOPATHIES and NEUROPATHIES

CRACOW, SEPTEMBER 20—22, 1979

A B S T R A C T S

D. KARASSZON (BUDAPEST, HUNGARY)

COMPARATIVE NEUROPATHOLOGY
OF TOXIC ENCEPHALOPATHIES

In the understanding of pathological processes in toxic encephalopathies the means of comparative neuropathology are new and promising.

The phytotoxic encephalopathies of herbivorous animals, the mycotoxic encephalopathies of animals feeding fodder infected by toxin producing microscopic fungi and the different acute and chronic encephalopathies due to a single dose, or to a protracted ingestion of herbicides, insecticides, antiparasitic compounds and water polluting industrial toxins are not only of economic importance but they are also remarkable from the neuropathological point of view.

The author shows in a tabulated form the most important toxic encephalopathies of mammals, birds and fishes, their characteristic clinical signs and pathological changes, and attempts a comparative neuropathological analysis of human and different animal toxic encephalopathies.

M. WENDER, Z. ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ, A. ŻÓRAWSKI
(POZNAŃ, POLAND)

THE EFFECT OF METHYLNITROSOUREA (MNU) INTOXICATION
ON THE FATTY ACID PATTERN OF MYELIN LIPIDS

Our earlier investigations have shown that treatment of adult BD IX rats with MNU (60 mg/kg of body weight) for 6 successive days caused unexpectedly large alterations in the fatty acid (FA) spectrum of all studied lipid components of the myelin fraction. In this study

we were concerned with myelin lipids showing no quantitative changes in the above experimental model.

The results demonstrate that the fatty acid spectrum of all myelin lipid components was significantly altered by MNU treatment. In the phosphatidylcholine fraction besides minor changes in various FA, the content of palmitic acid (16:0) was significantly reduced. Phosphatidylserine showed an increased percentage of oleic acid (18:1) and lower percentage of decosahexaenoic acid (20:6).

Significant changes were noted in the FA pattern of galactolipids. Cerebrosides showed reduced percentages of oleic acid (18:1), along with an increased content of lignoceric acid (24:0). Increased percentages of lignoceric acid were also seen in the sulfatide fraction. Besides, the sulfatides were enriched with respect to linoleic acid (18:2), but contents of linolenic (18:3), and of the (20:5) acids were markedly reduced.

The results presented are a further extension of our previous observations demonstrating that intoxication by alkyl derivative of nitrosourea brings about severe deterioration in the metabolism of fatty acyl residues of lipids, the essential components of membrane structures of the nervous tissue. However, the mechanisms by which these compounds or their metabolites affect the metabolic pathways of the myelin — oligodendroglial system remain obscure.

L. LEEL-ÓSSY (ESZTERGOM, HUNGARY)

NEUROPATHOLOGICAL FINDINGS IN CHRONIC CARBON DISULFIDE EXPOSITION

The observations and experiments carried out hitherto have not determined the nature of the damaging effect of carbon disulfide on the central nervous system. Some authors emphasize the angiotropic, while others the neurotropic effects of the poison. It is extremely difficult to define the dose at the working place that may cause toxic symptoms.

After our clinical investigations (ten years) among the artificial fiber workers we came to the conclusion that there was no specific toxic effect upon the central nervous system. We attempted to confirm our benign negative statement by animal experiments.

We placed for half a year different species in the working place. After this time we carried out neuropathological examination on 5 cocks, 22 guinea pigs and 23 rabbits. Control examinations have also been made.

No change could be observed in the behavior and the neurological state of the animals. What we considered to be most essential were the changes in the glial system (mainly in astrocytes) of the white matter. These glial changes were surely of protective or of excitatory, progressive character, though regressive signs could also be seen rarely in part of the two types of neuroglia.

We concluded that the chronic non-toxic carbon disulfide inhalation had a gliotropic effect without any obvious clinical symptoms in experimental animals.

M. DĄMBSKA, M. MAŚLIŃSKA (WARSAW, POLAND)

THE INTERACTION EFFECT OF PHENOBARBITAL AND DDVP ON MYELINATION

A combined effect of phenobarbital and dichlorvos on the process of rabbit brain myelination was investigated. Pregnant rabbits received phenobarbital per os (18.5 mg/kg body weight) since the 3rd day of pregnancy till delivery. The offspring was treated with DDVP (10 mg/kg body weight) since 6th till 15th day of life. Brains of young rabbits were morphologically examined on the 16th and 32nd day of life. A lower degree of myelination of the corpus callosum and the internal capsule was observed in the experimental animals as compared to the control. Ultrastructural studies showed degenerative changes in myelinating glial cells: abnormal process of myelination with degeneration of some axons. These changes in comparison to those observed in animals treated only with pesticide seemed more advanced both in glial cells and in myelinating nerve fibers. Ultrastructural pictures indicate addition of the injurious effect of phenobarbital administered during fetal life and dichlorvos given in the period of brain myelination.

D. MAŚLIŃSKA, M. DĄMBSKA (WARSAW, POLAND)

THE INTERACTION EFFECT OF PHENOBARBITAL AND DDVP ON MATURATION OF CEREBRAL AND CEREBELLAR CORTEX IN RABBIT

The effect of dichlorvos on the development of cerebral and cerebellar cortex in progeny of mothers treated with phenobarbital was investigated in rabbits.

Pregnant animals received phenobarbital (18.5 mg/kg per os) since 3rd day of pregnancy till delivery. Newborns were treated with dichlorvos (10 mg/kg per os) since 6th till 15th day of life.

Biochemical investigations of AChE activity (Ellman method) showed statistically significant decrease of enzyme activity in cerebellum of experimental animals as compared to the control.

In histochemical investigations the topographical changes of the enzyme localization in the cerebellar cortex were observed. In neuropil in the granular and molecular layer these changes were more pronounced.

The degenerative changes of cells of the cerebral and cerebellar cortex were visible in the electron microscope especially in mitochondria. They were more pronounced than in animals treated only with dichlorvos.

The mechanism of the observed changes is discussed.

I. BALOGH, L. SZEGEDY, P. SÓTONYI, E. SOMOGYI
(BUDAPEST, HUNGARY)

ELECTRON MICROSCOPICAL AND CYTOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF CARBON MONOXIDE POISONING IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Acute carbon monoxide poisoning is a common environmental hazard. Using white rats, carbon monoxide inhalation experiments (gaseous atmosphere contained: 44.12% O₂, 5.25% CO₂ in carbon monoxide, exposition time: 0.5 — 4 minutes) were conducted. After a 2.5% glutaraldehyde perfusion, the cerebral and cerebellar cortex, the hippocampus and the facial nucleus were investigated. In the pericapillary space and around the myelin sheaths a striking edema was noted. In the Golgi area of Purkinje cells only a cisternal dilation was found while the interlamellar space remained almost intact. Swelling of the mitochondria, appearance of lipid droplets intramitochondrially, lamellar fusion of the endoplasmic reticulum, a widening of the synaptic membranes, dendritic edema and severe myelin and axonal alteration were the main ultrastructural characteristics. Using lanthanum tracer a severe alteration of permeability was detected, while the mitochondrial membranes remained unaltered. The cytochrome oxidase activity decreased, while at the 3rd minute the succinate dehydrogenase reaction showed a tendency to increase. The intramitochondrial calcium content was

elevated. Hence besides the mainly histotoxic pathomechanism some hypoxic events such as mitochondrial membrane permeability and several cytochemical features, should not be neglected.

M. KOZIK, J. SZCZECH (POZNAŃ, POLAND)

THE EFFECT OF „CYNKOTOX” ON THE ACTIVITY OF BRAIN DEHYDROGENASES

An experimental study was conducted on 8 Wistar rats fed intragastrically with 1.0 g of „Cynkotox” for 10 consecutive days. The preparation „Cynkotox” is a fungicide of wide agricultural application. After the experimental feeding period, the animals were killed by heart puncture followed by exsanguination and their brains were subjected to histochemical examination with respect to the activity of various oxidoreductases.

The examinations were carried out on cryostat sections as well as on small cerebral and cerebellar fragments incubated for 16 h at 4°C and then fixed and embedded in paraffin, according to the method described by Kozik et al. (1979). An ultrastructural examination of the mitochondria was made as well.

It has been shown that ingestion of „Cynkotox” caused considerable lesions of many mitochondria, exerting also an inhibitory effect on various dehydrogenases.

M. TÁRCZY, I. TULOK, M. PAPP, A. TAKÁTS, A. AUGUSZT
(BUDAPEST, HUNGARY)

CORRELATION AMONG NEUROLOGICAL, BIOCHEMICAL AND NEUROPATHOLOGICAL FINDINGS IN EXPERIMENTAL ENCEPHALOPATHY PRODUCED BY THIAMINASE CONTAINING FISH IN CAT

According to literary data a diet containing fish rich in thiaminase produces encephalopathy in cat, which is very similar to Wernicke-Korsakoff disease. Adult cats were fed with salt water herring and sacrificed after the development of deep coma (average time: 34 — 40 days). The initial symptoms of encephalopathy (ataxia, dilatation of pupils, etc.) were registered after 26 — 30 days of experiment.

Venous blood samples were taken at the beginning of the trial, on the 3rd week, i.e. before the onset of neurological symptoms, and before autopsy. The levels of pyruvate, lactate and citrate were measured.

A significant rise of pyruvate was observed on the 3rd week, when no neurological symptoms could have been detected.

Pyruvate levels in the stage of deep coma with serious neuropathological changes were extremely high, accompanied with a slight increase of lactate and citrate.

The findings suggest the importance of altered pyruvate metabolism in the pathogenesis of this type of encephalopathy.

Z. JANKA, I. SZENTISTVÁNYI (SZEGED, HUNGARY)

STUDIES ON THE NEUROTOXICITY AND DISTRIBUTION OF LITHIUM IN BRAIN CELL CULTURE

We have studied the toxic effects of lithium and its distribution and transport characteristics in brain cell cultures. Lithium chloride was added in 5 and 10 mM concentrations for different periods of exposure time to dissociated cultures obtained from chick embryonic brain. When supplementing lithium at day 1 *in vitro* for five days, a dose-dependent decrease in total protein was observed in the cultures, as compared to the sodium-treated controls. Profound reduction was revealed in the length of neuronal processes and in the number of neuronal cell bodies by phase contrast microscopy and by morphometric means. Ultrastructurally swollen and degenerating nerve processes were found after lithium treatment suggesting a particular sensitivity of these structures to lithium ion.

The transport experiments demonstrated that lithium uptake of glial cells was significantly lower than that of the neural elements. A steady state distribution of lithium was observed by 30 min of incubation period. Lithium influx into the cells was strongly dependent on the external sodium level in a reciprocal manner. A lithium-sodium hetero-exchange was revealed in the nerve cell cultures suggesting a physiological importance of this mechanism in lithium homeostasis of the central nervous system during prophylactic maintenance lithium therapy, including the toxic side effects as well.

M. ŚNIATAŁA-KAMASA, M. WENDER, A. PIECHOWSKI
(POZNAŃ, POLAND)

THE ULTRASTRUCTURE OF THE RAT OPTIC NERVE IN THE COURSE OF CHRONIC TRIETHYL TIN (TET) INTOXICATION

Wistar rats were intoxicated chronically with TET according to the method described by Eto et al. (1971). The poison was administered *per os*, *via* the drinking water, which contained 5 mg of TET/1 for the

first 15 days, thereafter the concentration of TET was increased to 10 mg/l.

Beginning from 9th day of TET ingestion the experimental animals developed gradually a decreased motoric activity, and after 25 days of TET ingestion, paralysis of the hind extremities and of sphincters occurred.

The electron microscopic picture of the optic nerves, taken after 10-day treatment with TET revealed focal delamination of the myelin sheath, which tended to extend as intoxication continued and finally all kinds of axons the large and small ones were affected.

During the late period of TET ingestion (longer than 60 days) the optic nerves exhibited severe edematous changes. They were packed with large, filament-containing vacuoles, surrounded by lamellar structures.

This heavy extensive vacuolization of the optic nerve resulting from ingestion of TET would indicate a high sensitivity of the nerve fibers in the optic nerve, especially of large axons, towards chronic intoxication with TET.

H. CSERMELY (BUDAPEST, HUNGARY)

CONGENITAL UREMIA WITH MICROCEPHALY AND LEUCODYSTROPHY

In a 3 month old suckling the autopsy revealed hypoplastic, hardly bean sized kidneys as the cause of uremia. Beside microcephaly the neuropathological examination showed orthochromatic leucodystrophy.

The author considers the possibility that the microcephaly and the orthochromatic leucodystrophy might have been the responses of the developing CNS uremia.

W. M. NYKA, J. BOROWSKA-LEHMAN, A. DUBRZYŃSKI, J. JANKOWSKA
Z. FORYCKI (GDAŃSK, POLAND)

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF ACUTE SUICIDAL INTOXICATIONS

The authors present the clinical and neuropathological picture of four patients (women of ages 14, 19, 67 and 70), who died of poisoning. The reasons of poisoning were: isonicotinic acid, silver nitrate, petrol and relanium. The patients were taken to the Acute Poisoning Ward

unconscious and in a serious condition. The symptoms of disseminated lesion of the central nervous system, of decerebration and brain edema were diagnosed. The patients died after 4, 5 and 2 days of hospitalization. Only in the case of one patient poisoned by relanium the survival time was three months.

In the case of patients, who died a few days after poisoning the edema of capillary endothelium, capillary-venous hyperemia and morphological features of the brain edema were observed. The recent hemorrhagic effusions were found in the leptomeninges and the recent suffusions in the cerebral cortex and subcortical white matter.

In the neurons, especially in cortical neurons, the features of degeneration and large areas of neuronal loss were observed.

In the case of patient with long survival time after poisoning the hyalinisation of the small artery walls and inveterate suffusions in the surrounding area were found. In the upper layers of the cerebral cortex an extensive glio-connective scar and degeneration of preserved neurons were visible.

M. PAPP, A. TAKÁCS, M. TÁRCZY, P. HARCOS, A. AUGUSZT
(BUDAPEST, HUNGARY)

COMPARATIVE NEUROPATHOLOGICAL EXAMINATIONS
IN WERNICKE-KORSAKOFF ENCEPHALOPATHY
AND IN EXPERIMENTAL ENCEPHALOPATHY PRODUCED
BY THIAMINASE CONTAINING FISH

Neuropathological alterations observed in human Wernicke-Korsakoff encephalopathy (W-K) and in cats held on a raw fish diet containing thiamine destroying enzyme were compared. The encephalopathy developed about in 40 days in cats resembled mostly to the subacute form of the W-K.

Besides microhemorrhages, its histopathological characteristics were: capillary proliferation, progressive astroglial changes and a moderate damage to the nerve cells. Especially the astroglial changes observed in both species were similar. The characteristic lesions in cats were localized around the 4th ventricle and in the colliculus inferior, while the areas around the cerebral aqueduct and the 3rd ventricle, as well as the thalamus and hypothalamus showed less damage than in man. On the other hand, astroglial reactions, capillary proliferation and petechial hemorrhages, besides these localizations were observed often in other parts of the central nervous system in cats.

In our opinion the great similarity of the glio-vasal changes in the vicinity of the cerebrospinal fluid space in the two species might be a valuable sign of a common pathomechanism of both conditions.

A. GUSEO, L. GYÓRI (PÉCS, HUNGARY)

ELECTROPHYSIOLOGY AND NEUROPATHOLOGY OF CARDIAC ARREST

Characteristic pattern of generalized periodic paroxysmal discharges has been described in Jakob-Creutzfeldt disease, in some cases after head injury, cardiopulmonary resuscitation or in cases of uncleared comas. In our previous paper (Szirmai et al., 1975) we presumed that the generator of the triphasic discharges might be localized in a circumscribed area of the thalamus and the non-specific activating system.

Now we give account of our observations and neuropathological analysis of a 39 year old male who suffered a 366 second long cardiac arrest and survived in an apallic state for 39 days.

After the resuscitation a permanent 2—2.5 cps spike-wave pattern was observed superposed by beta waves. During apnea a transient slowing of the periodical paroxysmal activity was observed and after the normalisation of oxygen uptake the slow spike-wave pattern could be registered. Following the acute period two characteristic electric patterns could be distinguished: 1) periodic paroxysmal complexes, 2) a complex fluctuating activity in which generalized synchron theta-delta waves, a 6 cps spindle activity, resembling the „recruiting thalamic response” and low voltage „suppression burst” periods were alternating.

The neuropathological investigation revealed a widespread laminar necrosis in the third and fifth layer of the cerebral cortex. In the brain stem the putamen and caudate nucleus were the most affected areas. In the thalamus the medial nuclei and in the mesencephalon the periaquaeductal region was gliotic.

The distribution of pathological alterations corresponded to that, observed in case of Jakob-Creutzfeldt disease. The appearance of periodic paroxysmal complexes depends on the cortical functional state determined by the actual balance of the brain stem activating system. Szirmai, I., Guseo, A., Czopf, J., Pálffy, G.: Analysis of clinical electroencephalographic and histopathological data in a case of Jakob-Creutzfeldt disease. *Current Topics in Neuropathol. Facultas, Wien* 1975, Vol. 2, 33 — 37.

L. SZEGEDY, I. BALOGH (BUDAPEST, HUNGARY)

ULTRASTRUCTURAL STUDIES IN THE RAT BRAIN DURING CHEMICALLY EVOKED CONVULSIONS

Ultrastructure of the rat cerebral and cerebellar cortex of the hippocampus and facial nucleus was examined during methionine sulphoximine (MSO) provoked convulsions. The animals were killed 3, 6 and 12 hours after i.p. injection of MSO (600 mg/kg). Convulsions appeared in about 4—5 hours, *status epilepticus* developed in about 8—9 hours after injection.

At the onset of MSO effect the swelling of cytoplasm and processes of astrocytes were revealed. Proliferative changes of cytoplasmic organelles were found. Following the appearance of convulsions a progressive edema, degenerative changes of organelles in the cytoplasm and in the processes could be observed.

After the appearance of the first few reactive and proliferative neuronal alterations the cisternae of the Golgi complex and of the endoplasmic reticulum were dilated. The mitochondria were swollen, cristae partly fragmented, and a partial lysis could be observed. Some dense mitochondria containing lipid inclusions and vacuoles appeared.

The damage of synapses occurred after the appearance of convulsions. After the start of mitochondrial destruction in the terminal axons a decrease in number of vesicles and a thickening of synaptic membrane was noted.

The most striking neuronal alterations were found within the cerebellar cortex and the hippocampus. The changes of the facial nucleus were less pronounced. The structures of the cerebral cortex were mostly spared.

I. TARISKA (BUDAPEST, HUNGARY)

ENCEPHALOMYELITIS DUE TO ENTEROVIRUS 71 INFECTION

In 1978 aseptic meningitis and encephalitis epidemy due to enterovirus 71 infection was disseminated in Hungary predominantly among children below five years of age. Cerebellar ataxia, polio-like paralysis of the limb(s) were main clinical manifestations of the encephalitis, furthermore bulbar symptoms which ended frequently in death. The causative agent was either isolated (in five instances) or evidenced by presence of specific IgM and antibodies in the serum.

The central nervous system exhibited strikingly similar histopathological changes in 17 cases investigated. It was a hyper acute encephalomyelitis with miliary necroses predominantly in gray matter of the

brain stem and spinal cord. The tectal and tegmental portions were more severely involved than the basal parts. The changes decreased in the severity in the cerebellum and hypothalamus. The cerebral and cerebellar cortex and white matter were affected either in a lesser degree, or were entirely preserved. In addition, a peculiar fibrillary gliosis varying in extent and severity was detected in all but two cases surpassing the inflamed fields.

Interpretation of the findings and the differential diagnosis will be discussed.

S. KRAJEWSKI, K. OLSZEWSKA, Z. KRAŚNICKA (WARSAW, POLAND)

INFLUENCE OF RABBIT SERA WITH CHRONIC SERUM SICKNESS ON ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE OF THE NERVOUS SYSTEM

The influence of serum from rabbits with chronic serum sickness on the nervous tissue cultures was examined. Experimental chronic serum sickness is a classical model of immune complex disease which leads to renal insufficiency and uremic syndrome. The aim of the present work was to evaluate the morphological changes caused by uremic toxins and to examine the pathogenic role of antigen-antibody complexes in the nervous tissue.

The studies were performed on 3 week cultures of newborn rat cerebellum. The sera used in the experiments were differentiated with regard to urea, creatinine, the content of anti-BSA antibodies and the presence of circulating immune complexes. The observations were made 4, 24, 48 and 72 hours after serum addition. The cultures were investigated by light, fluorescent and electron microscope.

Sera from rabbits with high uremic syndrome indexes led to prominent disorders in neurons, glial cells and the myelin structure. Characteristic for the cultures of this group was also the appearance of a great number of progressively changed microglial cells.

The accumulation of immune complexes in the astroglial cytoplasm were observed in all cultures after the incubation with immunized sera. The phenomenon of phagocytosis of immune complexes by astroglia is discussed.

M. GALLAI, G. AMBRÓZY (BUDAPEST, HUNGARY)

COLLAGEN POCKETS OF SCHWANN CELLS WITH DIFFERENT TYPES OF NEUROPATHIES

In 15 sural nerves of polyneuropathy patients we defined the relation of unmyelinated fibers and collagen pockets and we expressed it as

the percentage of pockets, related to the number of axons. This relation may be characteristic for polyneuropathies of different etiologies. On the basis of our examinations it seems, that the percentage of collagen pockets is characteristically high with HMSN and paraneoplastic neuropathies untreated with cytostatic drugs. On the other hand, it is low with hypothyreosis and the more frequent form of diabetic neuropathy. In the future, with the examination of a greater number of cases, probably characteristic relations may be found also in cases of other etiologies.

This simple method may have a diagnostic significance in sural nerve biopsies.

K. RENKAWEK (WARSAW, POLAND)

ULTRASTRUCTURAL PROPERTIES OF BRAIN CAPILLARIES CULTURED *IN VITRO*

In the CNS cultures, originally explantated as well as newly formed vessels are present. Two parallel processes are observed: maturation of capillaries and following stages of vasculogenesis from the simple form of vascular sprouts to the vessel wall formation. Particular morphological structures involved in BBB function *in situ* (tight junctions, basement membrane, perivascular glial endfeet) are present *in vitro*. The endothelial cells in spite of blood flow deprivation possess morphological features expressing their function in transport and the inherent ability to form characteristic membrane junctions. The formation of capillaries and their maturation *in vitro* is correlated with the development of glial cells and with the formation of a layer of astroglial processes around the vessels. This indicates that astrocytes actively cooperate in BBB function and this feature distinguishes the brain vessels from the vessels of other organs.

M. MÁZLÓ (BUDAPEST, HUNGARY)

MARGINAL HEMOSIDEROSIS

The forms of iron storage were investigated in a case of marginal hemosiderosis, in which an ependymoma was the source of the minimal, recurrent bleeding. The meninges overlying the spinal cord, cerebellum and the base of cerebrum, as well as the 2 — 3 mm deep underlying tissue were of rust-brown color and gave the Berlin blue reaction. In addition, the ependyma and the underlying tissue of the IIIrd and IVth ventricles showed the same coloration.

Three forms of iron pigment storage were conspicuous under the light microscope: diffuse, small granular and coarse-grained.

The electron microscopic examination supported this observation. Iron was found most often in fine granular form in the cytoplasmic matrix or surrounded by a membrane in the cytoplasm of the Bergmann glia cells, which corresponds to the diffuse form of Berlin blue reaction. In the cytoplasm of microglia iron clustered in large granules with sharp outline. This form corresponds to the small granules seen under the light microscope. The coarse grains which seemed to be isolated under the light microscope, showed no connection with cells in the electron microscope. Their variable structure contained no cell components.

G. SZUMAŃSKA, M. OSTENDA (WARSAW, POLAND)

HISTOENZYMATICAL CHANGES OF CEREBRAL VESSELS IN EXPERIMENTAL HYPOXIA

Histochemical studies were carried out on 60 rats subjected to short-lasting anoxia. The animals were ventilated with a gas mixture containing: I group: 92% N₂ and 8% O₂; II group: 96% N₂ and 4% O₂, III group: N₂ (technical).

In the cerebral capillaries and in the cellular elements of the rat brain, nucleoside phosphatases, butyrylcholinesterase and alkaline phosphatase were demonstrated at the light microscopy and electron microscopy level. The rats were sacrificed at „O”, 1, 2, 4, 24 and 48 hours after hypoxia.

Significant reduction of enzymatic activity in the blood vessel walls and increased activity in cellular elements of the nerve tissue was observed after hypoxia. Normalization of the histochemical picture was noted 24 and 48 hours following hypoxia.

At electron microscopy level deposits indicating the site of enzymes activity were localized in intermembraneous spaces and in the endothelial cytoplasm. At 24 hours after hypoxia electron microscopic picture showed no differences as compared to the control ones.

J. MIKLÓSSY (BUDAPEST, HUNGARY)

BRAIN STEM ENCEPHALOPATHY DUE TO VASCULAR MALFORMATION IN THE MESENCEPHALON

A case of vascular malformation of the brain stem will be presented from the clinico-pathological point of view. The patient died at the age of 69. Slowly progressive brain stem symptoms developed for

several years accompanied by rhythmic myoclonus in the muscles of the face and trunk.

The neuropathological examination revealed bilateral, though slightly asymmetric angioma localized along with the tegmentum of the mesencephalon and pons. A hypertrophic degeneration of the olives was caused in the consequence of lesions of the central tegmental tract and dentate nucleus. At the cervical level of the spinal cord pathologically dilated vessels and dysraphic phenomena were found.

A. TARASZEWSKA (MIŃSK MAZOWIECKI, POLAND)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG BEIM pt-KANINCHEN

Bei 7 Kaninchen mit dem erblichen paralytischen Tremor (Symbol pt) im Alter von 6 bis 10 Wochen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Basalganglien, des Kleinhirns und Rückenmarks dargestellt.

Nach den ultrastrukturellen Befunde sind die Veränderungen in den Nervenzellfortsätzen, insbesondere in Axonen auffallender und häufiger als Veränderungen im Perikarion der Nervenzellen.

Daneben treten Markscheidenschäden auf, bei denen jedoch eine sekundäre Myelindegeneration ist gering; meistens handelt es sich um Myelinisationstörungen.

Auf der Beteiligung der Gliazellen und ultrastrukturellen Merkmale der intrazerebralen Verkalkungen in Beziehung zu der neuronalen Läsionen wird auch kurz hingewiesen.

I. ÓVÁRY, S. FAZEKAS, E. HORVÁTH (BUDAPEST, HUNGARY)

INFLAMMATORY AND POSTINFLAMMATORY ENCEPHALOPATHIES IN INFANCY

The astroglial cells are involved in the majority of inflammatory processes during the intrauterine and postnatal life. Mossakowski, Seitelberger, Brotchi and Gerebtzoff examined the characteristics of reactive and activated astroglial cells in different encephalopathies. The laminar arrangement of astroglial fibers of the hypendymal layer along the cerebral ventricles and their seam formation were studied earlier (Óváry et al.). The present report is concerned with quantitative topo-optical review of the astroglial fiber system along the middle line axis

comparing 6 cases of Chiari II deformity and 6 babies died after enterovirus 71 infection.

Involvement of the raphal astroglial fiber system was evidenced in the cases died after enterovirus 71 infection using the substructural gold topo-optical reaction (Óváry, Fazekas). These data suggest that the depolymerisation of the subunits of astroglial fibers during the inflammatory and postinflammatory process is responsible for decreasing anisotropy. The myosin-like protein has been found in the cells of different mammalian brains. The results of the first experiments in connection with human brain myosin was interpreted in a previous report (Fazekas).

Some biochemical data in a number of experimental *in vitro* conditions resulting in polymerisation and depolymerisation of different types of myosins were studied in our Laboratory in order to elucidate some mechanism underlying the postinflammatory processes. The defective astroglial cells producing more vulnerable angio-glio-neuronal units seem to be insufficient to react against further noxas (astroglial insufficiency).

Mossakowski, M. J. (1970) VIth Inter. Congr Neuropath. Paris. Masson (ed), Paris, 1970, 366 — 376.

Seitelberger, F. (1970) VIth Inter. Congr. Neuropath. Paris, Masson (ed), Paris, 1970, 392 — 406.

Brotchi, J. Gerebtzoff, M. A. (1970) VIth Inter. Congr. Neuropath., Paris, Masson (ed.), Paris, 1970, 532 — 533.

Óváry, I. et al.: Aktuelle Probleme der Neuropathologie. 56 — 60. 1973. Facultas Verlag, Wien, K. Jellinger (ed.), 1973.

Óváry, I., Fazekas, S.: Acta Morph. Acad. Sci. Hung., Budapest, 1979.

Fazekas, S. et al.: Proc. 19th Hung. Ann. Meet. Biochem., Budapest 1979, 159 — 160.

J. DYMECKI, M. WALSKI, E. MEDYŃSKA (WARSAW, POLAND)

TENTATIVE MORPHOMETRIC STUDY OF CHANGES IN EXCITATORY SYNAPSES AFTER AUDIOGENIC EPILEPTIC SEIZURES IN MICE

The aim in view was an attempt to evaluate morphometrically the changes occurring in cholinergic synapses, caused by audiogenic convulsive seizures in mice.

The experiments were performed with 12 Swiss Albinos Rb mice with genetically conditioned audiogenic epilepsy. The animals were divided into three groups: I — after a single epileptic seizure, II —

after a series of epileptic seizures (24 attacks in 3 days), III — control group.

The seizures were evoked by ringing a bell with 100 dB intensity. After immediate decapitation material was taken from the motor cortex for electron microscopic examination and impregnated by the zinc-iodide-osmium tetroxide (ZIO) method after Kawana (1969). Some authors suggest that the synaptic vesicles may translocate under the influence of neuron stimulation towards the synaptic cleft. In order to check the correctness of this concept, the number of vesicles filled with transmitter substance (impregnated with ZIO) and of the „empty” ones was determined in three successive zones of the synaptic button, at various distances from the synaptic cleft.

It results from the morphometric analysis that the joint number of synaptic vesicles per $1 \mu\text{m}^2$ button section diminishes after a single seizure as compared with the control. After a series of seizures the changes were less pronounced.

The distribution of the vesicles within the synaptic button did not undergo significant changes after the seizures. The highest number of vesicles, in both experimental groups as well as in control, was noted in central zone of the synaptic button, that is at a distance of 0.1 to 0.2 μm from the cleft. The total number of synaptic vesicles impregnated with zinc iodide decreased after a single seizure, as well as after a whole series as compared to the control.

No marked predilection of vesicles filled with the transmitter substance to settle in a definite zone of the synapse could be established.

The results were confronted with concepts advanced in the literature, concerning the mechanism of transmitter substance release from synaptic vesicles as the effect of excitation of the neuron.

A. TAKÁTS, S. KOMOLY, E. CSANDA, A. SZÜCS, A. AUGUSZT
(BUDAPEST, HUNGARY)

HISTOCHEMICAL EXAMINATIONS IN EXPERIMENTAL BRAIN EDEMA INDUCED BY ^{90}Y IMPLANTATION

Epidural or intracerebral implantation of ^{90}Y rods results in a standard vasogenic brain edema. Resolution of edema fluid, cell reaction and the antiedematic effect of different drugs can be traced well by this experimental model.

In our present experiments the late period of vasogenic edema was examined using some histochemical reactions.

^{90}Y rods of 0.25 — 2 mCi activity were implanted into the epidural space in cat. The animals were sacrificed 24 — 74 days after operation. Evans blue administered intravenously was used as a tracer for detection of protein extravasation. The oxidative enzymatic activity in astrocytes increased extremely about the 30th day. Later, that is between 50 — 70 days this enhancement moderately decreased. The changes of histochemical activity of astrocytes compared with spreading of Evans blue appear to be a valuable sign also for the detection of vasogenic edema.

Z. M. RAP (WARSAW, POLAND)

PEROXIDATIVE PROCESSES AS A FACTOR IMPAIRING THE NERVOUS TISSUE MEMBRANES DURING VASOGENIC BRAIN EDEMA

In vasogenic brain edema the deprivation of protective properties of membranes probably depends on the enzymic and free radical degradation of their protein and lipid components. The level of sulfhydryl (SH) group as well as conjugated double bonds (CDB) — intermediate form of free radical reaction and lipid antioxidants were estimated biochemically in the nervous tissue during development of vasogenic brain edema induced by cold injury (Rap, Wideman, 1976; Rap, Dąbrowiecki, 1978).

The total protein and nonprotein SH group level decreased significantly during the first 24 hours of brain edema, while in 36 and 48 hrs their level was still lower but showed a marked tendency to return to the control value. During the first 6 hrs spread of brain edema CDB level increased threefold and this was accompanied by a decrease in the level of lipid antioxidants. At 12 hrs, CDB dropped below the control level, while lipid antioxidants reached the control value. Then, at 24 and 48 hrs, CDB as well as lipid antioxidant levels were elevated. Reduced glutathione and Decadron phosphate injected intravenously prior to experiment diminished the dynamics of the development of brain edema, decreasing the water content in the damaged hemisphere. At the same time a decrease of free radical reactions noticed.

These results suggest that the development of vasogenic brain edema is accompanied by degradation of the membraneous system of the nervous tissue by peroxidative processes, which is expressed by the increase of free radical-lipid peroxidation and simultaneous decrease of sulfhydryl compounds.

J. KAŁUŻA, J. KUJAWSKA, R. KIJAK, I. GOŚCIŃSKI (CRACOW, POLAND)

MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL STUDIES OF GLIOMA CELL CULTURES AFTER MEGAVOLT IONISATION

The investigations were performed on cultures of neoplasms of glial origin i.e. 15 multiform glioblastomas and 12 anaplastic oligodendrogliomas. The tumor tissue obtained at surgery was fragmented to 1 mm² specimens used for crude culture preparations: 4 — 5 explants were placed on glass slide prior to explantation and covered with plasma clot. Parkers 199 medium was used as nutritional environment enriched with calf serum and embryo extract. The irradiation of cultures was performed on the at least 14th day of culture, when the growth zone became well developed. Before irradiation the tumor cells were counted in the growth zone by the use of a phase-contrast optical arrangement.

As the source of ionic radiation cobalt 60 was used. Up to the 8th day no changes in the cells were observed, then the first signs of culture damage appeared. The cultures lost the adhesiveness to the ground, at first the explants, very seldom the cells of the growth zone. Later the cell processes receded from each other, shortened and the tumor glial cells became rounded off. In the cytoplasm vacuolisation appeared later; granules of various sizes filled especially the cytoplasm around the nucleus. In some cells homogenous material was present in the cytoplasm shifting the cell nucleus aside. LDH and acid phosphatase as a lysosomal enzyme were used as markers of the progressing degenerative changes. The enzymatic changes did not precede the morphological signs of cell damage. The accumulation of the reaction product was growing parallel to the progressing degeneration of the cells. However, only part of the cells degenerated, very few remained intact and well preserved.

H. KROH (WARSAW, POLAND)

TRANSFORMATION OF OLIGODENDROGLIA; AN EFFECT OF ETHYLNITROSOUREA APPLICATION

The electron microscopic study concerned groups of maternal mice, their offspring and adults injected i.v. with a single dose of ENU. Histologically the investigated brains presented two main types of changes: nests of cells and foci of demyelination. Several animals in each experimental group were affected. Cellular nests composed usually of few glial cells were found only among white matter fibers of subepen-

dymal area, in cerebellar white matter, brain stem, striatum and corpus callosum. The earliest foci were found in 28 days old offspring the latest — in 572 days old mother. Ultrastructurally, the striking features the nest-forming cells were closely interdigitated fine cytoplasmic processes and abundant cytoplasm which distended the interfascicular space. A few demyelination areas were detected in the offspring and maternal mice. Thicker fibers were the most affected. Unchanged axoplasm was covered only in short distance with lamellar myelin sheath, the other parts of the axon being covered with small vesicles and membranaceous bodies.

The morphological features of interfascicular cellular nests and their possible relation to neoplastic human neurinoma and experimental MNU induced Schwannoma cells are discussed. Degeneration of myelin without evident signs of the damage to the axoplasm could be connected with the development of abnormal oligodendroglial processes after drug administration. It seems that the oligodendroglia becomes the most involved and the demyelination is only a secondary event to the primary transformation of oligodendroglial cells.

L. MAZIARZ, A. GODLEWSKI (POZNAŃ, POLAND)

MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES OCCURRING IN THE BRAIN FOLLOWING INGESTION OF LARGE DOSES OF ZINC OXIDE

Zinc oxide is generally thought to be of negligible toxicity. However, because of its wide application in praxis we were interested in determining its effect on the morphology and histoenzymatic activity of the brain.

The experiments were conducted on 12 rats fed intragastrically with 100 mg of ZnO daily, over a period of 10 days. Afterwards, the animals were killed and their brains examined histologically and histochemically. Brain specimens designed for histoenzymatic assays were fixed in the Baker's solution for 16 hrs at 4°C, and those for morphological evaluation — at room temperature.

The experimental brains displayed only negligible morphological alterations of both nerve and glial cells. However, considerable changes were found with respect to histoenzymatic activity of the experimental brains. The acid phosphatase, acetylcholinesterase and ATPase activities were reduced while that of TPPase was elevated.

K. KARSAY, I. DURKÓ (SZEDED, HUNGARY)

POLYNEUROPATHY IN CASE OF AN ACUTE COPROPORPHYRIA

In consequence to the biochemical and genetical examinations of the last decades the porphyries do not belong anymore to the category of rare diseases. As the range of the provoking chemicals and medicaments is increasing, we may expect its more often occurrence.

The authors present the case of a female patient of 38 years, who's disease was diagnosed in the beginning because of its neurological symptoms as an acute intermitting porphyria.

The quantitative and chromatographic examinations of the blood, urine and feaces for porphyrin and its precursors proved the typical case of an acute coproporphyria. B-vitamins, Stigmosan, Atriphos, a diet rich in carbohydrates and adenosine monophosphate completed with physiotherapeutic treatment gave a good result.

It could be observed again, similar to other authors, that there is no tight relation between the porphyrin values measured in course of different treatments and the clinical state of the patient.

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Dr med. Tadeusz Majdecki, kierownik Zakładu Ochrony Układu Nerwowego w Centralnym Ośrodku Badawczym Kolejowej Służby Zdrowia w Warszawie uzyskał w dniu 23 maja 1979 r. stopień naukowy doktora habilitowanego na podstawie pracy pt. „Ultrastruktura ciał wtrętowych w gangliozydozach i ceroid-lipofuscynozie”.

Praca została wykonana w Zespole Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

* * *

W ostatnich miesiącach następujący koledzy uzyskali stopnie naukowe doktora nauk medycznych:

— mgr biol. Małgorzata Zaleska z CMDiK PAN w Warszawie na podstawie pracy: „Metabolizm amin katecholowych i serotoniny w oun szczura w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego — wpływ zwiększonego stężenia dwutlenku węgla w anestezji pentobarbitalowej”. Promotor — prof. dr hab. med. Mirosław J. Mosakowski.

— lek. Milena Laure-Kamionowska z CMDiK PAN w Warszawie na podstawie pracy: „Wpływ gestozy na mózg płodu”. Promotor — prof. dr hab. med. Maria Dąbska.

— lek. Stanisław Krajewski z CMDiK PAN w Warszawie, na podstawie pracy: „Badania immunomorfologiczne oun w mocznicy u ludzi i doświadczalnej mocznicy w przebiegu przewlekłej choroby posurowiczej”. Promotor — doc. dr hab. med. Zuzanna Kraśnicka.

— lek. Teresa Nowak-Michalska, uczestniczka Studium Doktoranckiego przy Instytucie Psychoneurologicznym na podstawie pracy: „Zaburzenia transmisji nerwowo-mięśniowej w nadczynności tarczycy”. Promotor — dr hab. med. Barbara Emeryk-Szajewska.

— lek. Piotr Kozłowski z CMDiK PAN w Warszawie na podstawie pracy: „Uszkodzenia okołokomorowej istoty białej w mózgu noworodka”. Promotor — prof. dr hab. med. Maria Dąbska.

Jerzy Dymecki

T R E Ś Ć

Z. Adamczewska-Goncerzewicz: Zmiany lipidów mieliny nerwu wzrokowego królika podczas rozwoju ontogenetycznego	169
H. Weinrauder, Z. Kraśnicka: Antygeny glejowe w hodowli tkankowej mózdzku szczura	181
Z. M. Rap, J. Wideman: Wpływ zredukowanego i utlenionego glutationu na powstawanie zmian strukturalnych w tkance nerwowej w naczynio-pochodnym obrzęku mózgu	191
M. Sikorska: Poziom 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu oraz aktywność cykazy adenylowej, fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydów i kinaz białkowych w mózgach szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla	203
Z. Zalewska: Wpływ zatrucia ciężarnych szczuryc Ronnelem na aktywność oksydoreduktaz w mitochondriach mózgu potomstwa	219
P. Nowacki: Krwiak podtwardówkowy a zmiany krwotoczne o typie <i>pachymeningosis haemorrhagica interna</i>	227
M. Laure-Kamionowska: Wpływ gestozy na mózg płodu	239
K. Kucharska-Demczuk, A. Polewska-Jeske: Atypowe limfocyty płynu mózgowo-rdzeniowego w zapaleniach i podrażnieniach opon	259
M. Wender, M. Kozik, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, J. Stanisławska, J. Pankrac: Badania biochemiczne i histochemiczne istoty białej mózgu u chorych z wielogodzinnym oddechem kontrolowanym	273
T. Wierzba-Bobrowicz: Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgu szczura w ostrej doświadczalnej hipoglikemii	289
I. B. Zelman, T. Wierzba-Bobrowicz: Obraz strukturalnych uszkodzeń mózgu szczura w zależności od nasilenia zaburzeń towarzyszących hipoglikemii	301
Polsko-Węgierskie Sympozjum Neuropatologiczne „Encefalopatie i neuropatie toksyczne”, Kraków, Wrzesień, 1979	313
J. Dymecki: Dział kroniki i informacji	333

СО Д Е Р Ж А Н И Е

З. Адамчевска-Гонджевич: Изменения липидов миелиновой оболочки зрительного нерва кролика в течение онтогенетического развития . . .	169
Г. Веинраудер, З. Красницка: Глиальные антигены в культуре ткани мозжечка крысы . . .	181
З. М. Рап, Я. Видеман: Влияние восстановленного и окисленного глутатиона на образование структурных изменений в нервной ткани в отеке мозга сосудистого происхождения . . .	191
М. Сикорска: Уровень 3'-5'-циклического аденозинмонофосфата и активность адениловой циклазы, фосфодиэстеразы 3'-5'-циклических нуклеотидов и киназ белка в мозгах крыс в условиях экспериментального отравления окисью угля . . .	203
З. Залевска: Влияние отравления беременных крыс Роннелом на активность оксидоредуктаз в митохондриях мозга потомства . . .	219
П. Повацки: Субсклерная гематома и геморрагические изменения типа <i>pachymeningosis haemorrhagica interna</i> . . .	227
М. Ляуре-Камионовска: Влияние гестоза на мозг плода . . .	239
К. Кухарска-Демчук, А. Полевска-Еске: Атипичные лимфоциты спинномозговой жидкости в менингитах и раздражениях мозговых оболочек . . .	259
М. Вендер, М. Козик, З. Адамчевска-Гонджевич, Я. Станиславска, Я. Панкрац: Химические и гистохимические исследования белого вещества мозга у больных с многочасовым контролируемым дыханием . . .	273
Т. Вежба-Бобрович: Электронномикроскопическая картина мозга крысы в острой экспериментальной гипогликемии . . .	289
И. Б. Зельман, Т. Вежба-Бобрович: Картина структурных повреждений мозга крысы в зависимости от степени гипогликемии . . .	301
Польско-Венгерский Симпозиум: „Токсические энцефалопатии и невропатии“, Краков, Сентябрь, 1979 . . .	313
Е. Дьмецки: Кроника и информация . . .	333

CONTENTS

Z. Adamczewska-Goncerzewicz: Changes in the myelin lipids of the rabbit optic nerve during ontogenic development	169
H. Weinrauder, Z. Kraśnicka: Glial antigens in tissue culture of rat cerebellum	181
Z. M. Rap, J. Wideman: Effect of reduced and oxidized glutathione on structural changes of nervous tissue in vasogenic brain edema	191
M. Sikorska: The level of cyclic 3',5'-adenosinemonophosphate and the activity of adenylate cyclase, cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and protein kinases in rat brains under experimental carbon monoxide intoxication	203
Z. Zalewska: Effect of intoxication of pregnant rats with Ronnel on the activity of brain mitochondrial oxidoreductases in the progeny	219
P. Nowacki: Subdural hematoma and hemorrhagic changes of the pachymeningosis <i>haemorrhagica interna type</i>	227
M. Laure-Kamionowska: Effect of gestosis on the fetal brain	239
K. Kucharska-Demczuk, A. Polewska-Jeske: Atypical lymphocytes in the cerebrospinal fluid in the inflammations and irritations of the meninges	259
M. Wender, M. Kozik, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, J. Stanisławska, J. Pankrac: Chemical and histochemical studies of the cerebral white matter in patients with hour-long controlled respiration	273
T. Wierzba-Bobrowicz: Electron-microscopical picture of rat brain in acute experimental hypoglycemia	289
I. B. Zelman, T. Wierzba-Bobrowicz: Ultrastructural picture of rat brain damage depending to an intensity of hypoglycemia	301
Polish-Hungarian Symposium on „Toxic Encephalopathies and Neuropathies”, Cracow, September, 1979	313
J. Dymecki: Chronicle and information	333

T

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 społecznej, 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 NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. 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