

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI,  
SŁAWOMIR JANUSZEWSKI

## ZMIANY AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ZASADOWEJ I CYKLAZY ADENYLOWEJ W SIECI NACZYNIOWEJ MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM ZESPOLE POREANIMACYJNYM

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Swoiste właściwości złącza naczyniowo-tkankowego w ośrodkowym układzie nerwowym, określone nazwą bariery krew–mózg, zapewniającej wybiórczość dwukierunkowej wymiany substancji między łożyskiem naczyniowym a tkanką nerwową, związane są z cechami strukturalnymi, czynnościowymi i metabolicznymi naczyń terminalnych. Pod pojęciem tym należy rozumieć zarówno naczynia włosowate, jak i powiązane z nimi odcinki tętniczek i żyłek. Na poziomie tych właśnie naczyń zachodzą intensywne procesy wymiany metabolicznej. W obecnym stanie wiedzy zasadniczą rolę w utrzymaniu mechanizmów bariery krew–mózg przypisuje się śródbłonom terminalnej sieci naczyniowej (Reese, Karnowsky 1967; Bodenheimer, Brightman 1968; Joó 1971). Szczególne znaczenie w tym mechanizmie przypada układom enzymatycznym komórek śródbłonna (Joó 1969; 1971; Oldendorf 1977; Betz, Goldstein 1978; Betz i wsp. 1980; Joó i wsp. 1983; Vorbrodt i wsp. 1983). Spośród nich najczęściej zwraca się uwagę na rolę nieswoistej fosfatazy zasadowej (Samorajski, McCloud 1961), swoistych fosfataz nukleotydowych (Torack, Barnett 1964), a ostatnio również cyklazy adenylowej (Vorbrodt i wsp. 1981a, 1983, 1984; Szumańska i wsp. 1984). Uważa się, iż fosfataza zasadowa uczestniczy w procesach czynnego transportu przez ścianę naczyniową poprzez defosforylację licznych metabolitów zarówno przechodzących do tkanek ośrodkowego układu nerwowego (Vorbrodt i wsp. 1981a, 1983), jak i je opuszczających (Vorbrodt i wsp. 1985). Cyklaza adenyłowa wiązana do niedawna w układzie nerwowym wyłącznie z procesami neurotransmisji i opisywana w lokalizacji synaptycznej (Recharadt, Härkönen 1977; Panula, Recharadt 1979; Recharadt, Harvonen 1985, 1986), okazała się stałym składnikiem komórek śródbłonna naczyniowego, odgrywającym istotną funkcję w mechanizmach bariery krew – mózg (Wagner i wsp. 1972; Joó, Toth

1975; Karnushkina i wsp. 1980; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). Joó (1979) oraz Joó i wsp. (1983) przypisują jej zasadniczą rolę w regulacji transportu makromolekularnego.

Należy przy tym podkreślić, iż nieprawidłowości w aktywności wszystkich wymienionych wyżej enzymów opisywano w różnorodnych typach doświadczalnej patologii ośrodkowego układu nerwowego nie wyłączając niedokrwienia i niedotlenienia, których wspólną cechą, potwierdzoną różnymi metodami, było zaburzenie czynności bariery krew – mózg (Szumańska i wsp. 1976, 1987; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska, Ostenda 1980; Szumańska 1981; Vorbrodt i wsp. 1981b, 1983, 1985; Wiśniewski i wsp. 1983; Szumańska, Mossakowski 1985). Powtarzalność tych nieprawidłowości jest tak duża, iż można je w sposób niewątpliwy traktować jako wykładniki zaburzeń przepuszczalności naczyń ośrodkowego układu nerwowego.

Niedokrwienie mózgu, zarówno globalne, jak i częściowe, bardzo często prowadzi do upośledzenia przepuszczalności naczyń i rozwoju wtórnego w stosunku do niego naczyniopochodnego obrzęku (Klatzo 1975, 1985). Cechą znamioną przy tym jest fakt, iż uszkodzenia mechanizmów barierowych występować mogą w zależności od ciężkości incydentu niedokrwienego w różnym czasie po jego przebyciu, zgodnie z prawidłowościami zjawiska dojrzewania procesu patologicznego (Klatzo 1975; Fujimoto i wsp. 1976). Warto również podkreślić, że Ostenda i Gadamski (1980) zwrócili uwagę na dwufazowe upośledzenie naczyniowych mechanizmów barierowych u chomików mongolskich w następstwie jednostronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, występujące w kilka godzin i po kilku dniach od incydentu niedokrwienego. Identyczne zjawisko obserwowali Kuroisawa i wsp. (1985) w ogniskowym niedokrwieniu mózgu u kotów.

W tym kontekście wydawało się celowe przeprowadzenie oceny aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) i cykazy adenylowej (AC), traktowanych jako znaczniki stanu przepuszczalności naczyń mózgu w warunkach globalnego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącego następstwo doświadczalnie wywołanej śmierci klinicznej.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych szczurach, rasy Wistar, samicach, o masie ciała 160–170 g, u których wywoływano śmierć kliniczną według metody opisanej przez Korpaczewa i wsp. (1982). Zwierzętom w płytkiej narkozie eterowej wprowadzono do klatki piersiowej zacisk igłowy, za pomocą którego uciskano pęczek naczyniowy serca na okres 3–3,5 min. W tym czasie następowało pełne zatrzymanie akcji serca i czynności oddechowej. Zabiegi reanimacyjne, polegające na zewnętrznym masażu serca i zastosowaniu kontrolowanego oddechu przy użyciu respiratora dla małych zwierząt laboratoryjnych, podejmowano po 10 min od zatrzymania akcji serca. Prowadziły one do kolejno po sobie następujących: powrotu czynności serca,

akcji oddechowej, reakcji na ból oraz odruchu rogówkowego. Szczegółowe omówienie modelu doświadczalnego oraz jego charakterystykę patofizjologiczną przedstawiono w pracy Mossakowskiego i wsp. (1986). Doświadczenie cechowała wysoka śmiertelność zwierząt. W okresie śmierci klinicznej lub/i w czasie czynności reanimacyjnych ginęło około 50% szczurów. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane krótkotrwałej narkozie eterowej, którym wprowadzano do klatki piersiowej zacisk igłowy bez wywoływania ucisku na pnie naczyniowe serca. Zwierzęta zabijano po upływie 6, 24 godz. i 3 dni po zabiegu doświadczalnym.

Badanie histochemiczne obejmowało ocenę aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) i cyklazy adenylowej (AC) w naczyniach ośrodkowego układu nerwowego, przeprowadzoną w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

Zwierzęta przeznaczone do oznaczeń aktywności (FZ) uśmiercano przez przesusowaną perfuzję roztworem utrwalającym, zawierającym 2% paraformaldehyd i 0,5% aldehyd glutarowy w 0,1 M buforze kakodylanowym, pH 7,4 (22°C). Czas perfuzji wynosił około 20 min, po czym wyjmowano mózgowie z jamy czaszki, przeznaczając jedną półkulę mózgu do badań w mikroskopie świetlnym, drugą – w mikroskopie elektronowym. Do badań w mikroskopie świetlnym pobierano blok tkankowy o grubości około 4 mm, przechodzący przez całą szerokość półkuli na wysokości skrzyżowania wzrokowego. Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano bloczki tkankowe o wymiarach około 1 mm<sup>3</sup> z kory mózgu i spoidła wielkiego. Pobrany materiał utrwalono dodatkowo w zimnym (4°C) płynie utrwalającym o podanym powyżej składzie, przez 1 godz. Bloki przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym skrawano na mikrotomie zamrożeniowym na wolnopływające skrawki o grubości 30 µm.

Aktywność FZ wykrywano według metody Mayahara i wsp. (1967) w modyfikacji Vorbrodta i wsp. (1981a). Płyn inkubacyjny zawierał: 0,01 M β-glicerofosforan sodu, 0,1 M Tris-maleinian, 0,004 M siarczan magnezu oraz 0,005 M zasadowy cytrynian ołowiu. Końcowe pH roztworu inkubacyjnego wynosiło 9,2–9,4. Inkubację wolnopływających skrawków i bloczków tkankowych przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 45 min. Płyn inkubacyjny dla przeprowadzenia kontroli odczynu histochemicznego zawierał dodatkowo 0,5 mM hydrochlorek lewamisolu, stanowiący swoisty inhibitor FZ (Borgers 1973).

Zwierzęta przeznaczone do oceny aktywności AC dekapitowano. Mózgi wyjmowano natychmiast z jamy czaszki i dzielono je na lodzie na dwie półkule. Z półkuli przeznaczonej do badań w mikroskopie świetlnym pobierano blok tkankowy o grubości około 4 mm, przechodzący przez całą jej szerokość na poziomie skrzyżowania nerwów wzrokowych, zatapiano go w „tissue tek”, zamrażano w suchym lodzie i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 20 µm. Z półkuli przeznaczonej do badań w mikroskopie elektronowym, pobierano bloczki tkankowe o wymiarach około 1 mm<sup>3</sup> z kory mózgu i spoidła wielkiego. Skrawki kriostatowe i bloczki tkankowe poddawano następnie

trzem po sobie następującym etapom preparatyki histochemicznej – utrwalaniu, aktywacji enzymatycznej i właściwej inkubacji według metod opisanych przez Szumańską i wsp. (1984) oraz Vorbrodta i wsp. (1984). Zastosowana metoda histochemiczna ujawnia aktywność cyklazy adenylowej w śródbłonkach naczyniowych, wykazuje ona jedynie w nieznacznym stopniu aktywność enzymu w obszarze połączeń synaptycznych.

Utrwalanie przeprowadzono w świeżo przygotowanym roztworze utrwalającym, który zawierał: 1% paraformaldehyd, 0,1% aldehyd glutarowy w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,4), 0,2 M cukrozę, 5% dwumetylosulfotlenek (DMSO), 0,1 mM L-izoproterenol, 0,1 mM kwas askorbinowy oraz 0,1 mM sól sodową guanyloimidodwufosforanu (GMP-PNP). Po utrwaleniu trwającym 3–5 min w temperaturze 22°C skrawki kriostatowe i bloczki tkankowe przenoszono do płynu aktywującego, zawierającego wszystkie z wymienionych wyżej składników, poza aldehydami, rozpuszczone w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,4). Proces aktywacji przeprowadzono w temperaturze 22°C, przez 30 min.

Po aktywacji przeprowadzano właściwą inkubację, w temperaturze pokojowej, w czasie 1–3 godz. Płyn inkubacyjny zawierał substrat w postaci 0,5 mM soli sodowej lub litowej 5'-adenyloimidodwufosforanu (AMP-PNP), 5 mM chlorek magnezu, 0,1 mM L-izoproterenol, 0,1 mM kwas askorbinowy, 0,1 mM sól sodową guanyloimidodwufosforanu (GMP-PNP), 5 mM teofilinę, 5% DMSO oraz 10 mM uwodniony chlorek strontu ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), rozpuszczone w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 9,0. Końcowe pH płynu inkubacyjnego wynosiło 8,5–8,7.

Do wykazania aktywności AC w obrazach mikroskopowo-elektronowych niezbędna była uzupełniająca preparatyka histochemiczna. Bloczki tkankowe po inkubacji płukano przez 10 min w buforze Tris-HCl (pH 9,0), zawierającym 0,2 M cukrozę, a następnie przenoszono je do 80 mM roztworu cytrynianu ołowiu o pH 9,0 na okres 5 min (powtarzając ten zabieg dwukrotnie), w celu przekształcenia imido-dwufosforanu strontu w imidodwufosforan ołowiu widoczny w obrazach mikroskopowo-elektronowych. Kontrole histochemiczne odczynu ujawniającego aktywność cyklazy adenylowej przeprowadzono w roztworach inkubacyjnych pozbawionych substratu i aktywatorów enzymu.

Końcowe fazy preparatyki histochemicznej były podobne dla obu enzymów. Materiał do badań w mikroskopie świetlnym (skrawki wolnopływające i kriostatowe) przemywano w 0,2 M cukrozie i przenoszono do roztworu żółtego siarczku amonu, płukano w wodzie i zamykano na szkiełkach podstawowych w glicerożelu.

Bloczki tkankowe przeznaczone do badań w mikroskopie elektronowym po inkubacji, przepłukiwano w 0,2 M roztworze cukrozy, a następnie utrwalono je dodatkowo w 1% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym, pH 7,2. Z kolei kontrastowano je en block w 0,5% octanie uranylu przez 1 godz. a następnie odwadniano w roztworach etanolu

o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie. Bloczki eponowe skrawano na ultramikrotomie LKB i montowano na siatkach. Materiał oglądano i zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100Cx.

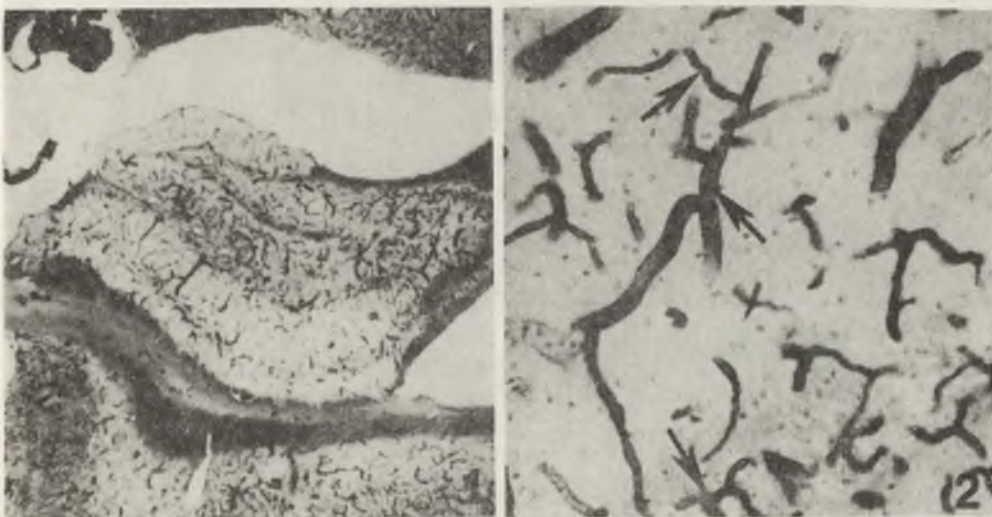
## WYNIKI

### Aktywność fosfatazy zasadowej (FZ)

#### *Badania w mikroskopie świetlnym*

U zwierząt kontrolnych odczyn histochemiczny wyznaczał wyraźnie sieć naczyniową półkul mózgu, zarówno w strukturach szarych, jak i białych (ryc. 1). Cechą znamioną było największe nasilenie odczynu we włosniczkach, malejące wraz z powiększaniem się kalibru naczynia krwionośnego (ryc. 2).

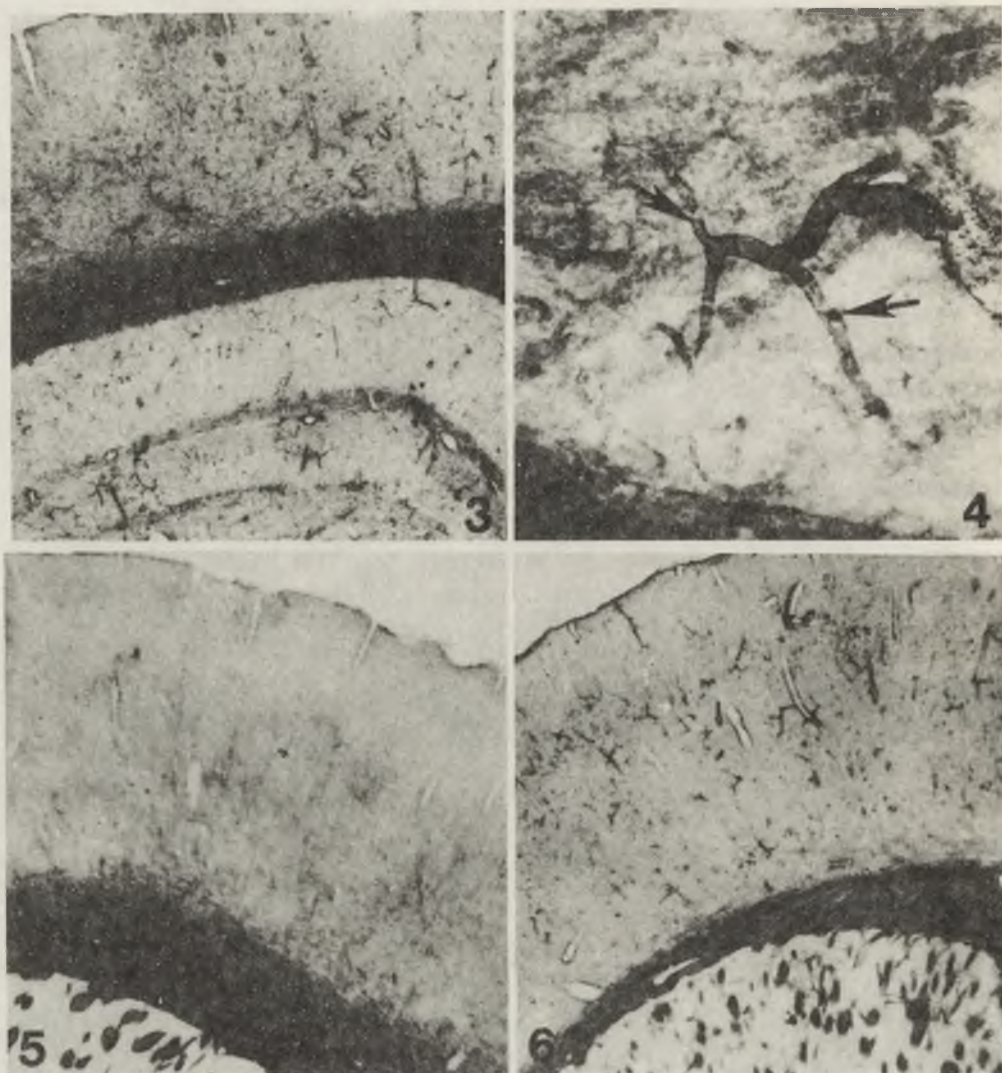
U zwierząt doświadczalnych w 6 godz. po przebytych niedokrwieniu charakter i nasilenie odczynu w większych naczyniach nie zmieniały się w stosunku do stwierdzonych u zwierząt kontrolnych (ryc. 3). Był on natomiast wyraźnie słabszy w sieci naczyń włosowatych (ryc. 3 i 4). W 24 godz. po incydencie niedokrwieniowym odczyn histoenzymatyczny był śladowy zarówno



Ryc. 1. Zwierze kontrolne. Fosfataza zasadowa (FZ). Głębokie warstwy kory, spoidło wielkie i zakręt hipokampa. Odczyn enzymatyczny wyznaczający sieć naczyniową mózgu. Pow. 25 ×  
 Fig. 1. Control animal. Alkaline phosphatase (Alk P) activity in deep cortical layers, white matter and hippocampal gyrus. Strong enzymatic activity marking vascular network of the brain. × 25

Ryc. 2. Zwierze kontrolne. FZ. Kora mózgu. Silny odczyn histochemiczny w naczyniach włosowatych (strzałki), słabnący w miarę wzrostu kalibru naczyń. Pow. 200 ×

Fig. 2. Control animal. AlkP activity in the cerebral cortex. Strong histochemical reaction in capillaries (arrows) decreasing parallelly with an increase of vascular caliber. × 200



Ryc. 3. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Głębokie warstwy kory, spoidło wielkie i zakręt hipokampa. Znaczne osłabienie odczynu histochemicznego dotyczące przede wszystkim naczyń włosowatych. Odczyn enzymatyczny w większych naczyniach przypomina spotykany u zwierząt kontrolnych. Pow. 25 ×

Fig. 3. Experimental animal, 6 hrs after ischemic incident. AlkP activity in deep cortical layers, white matter and hippocampal gyrus. Remarkable reduction of the intensity of histochemical reaction concerning mostly capillary vessels. Reaction in larger blood vessels similar to that in control animals. × 25

Ryc. 4. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Kora mózgu. Spadek aktywności enzymatycznej w sieci naczyń włosowatych (strzałki). Pow. 200 ×

Fig. 4. Experimental animal, 6 hrs after ischemic incident. AlkP activity in the cerebral cortex. Reduction of enzymatic activity in capillary network (arrows). × 200

Ryc. 5. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrwieniu. FZ. Kora mózgu. Niemal całkowity brak aktywności enzymatycznej w sieci naczyniowej mózgu. Pow. 25 ×

w większych naczyniach, jak i we włosniczkach (rys. 5). Po upływie 3 dni odczyn histochemiczny wzrastał w porównaniu z wcześniejszymi grupami doświadczalnymi. Cechą charakterystyczną wyróżniającą go w porównaniu do odczynu u zwierząt kontrolnych było jego znaczne zróżnicowanie. Obok naczyń włosowatych, w których nasilenie reakcji histochemicznej nie różniło się od typowego dla zwierząt kontrolnych, występowały włosniczki, a nawet ich odcinki, z odczynem bardzo słabym, a nawet śladowym (ryc. 6).

#### *Badanie w mikroskopie elektronowym*

U zwierząt kontrolnych odczyn histoenzymatyczny występował w ścianach naczyń różnego kalibru, wykazując w sposób typowy największe nasilenie w naczyniach włosowatych. Końcowy produkt odczynu występujący w postaci drobnych, elektronowo-gęstych, nieregularnych ziarnistości gromadził się na zwróconej do światła naczynia włosowatego powierzchni błony cytoplazmatycznej komórek śródbłonna (ryc. 7).

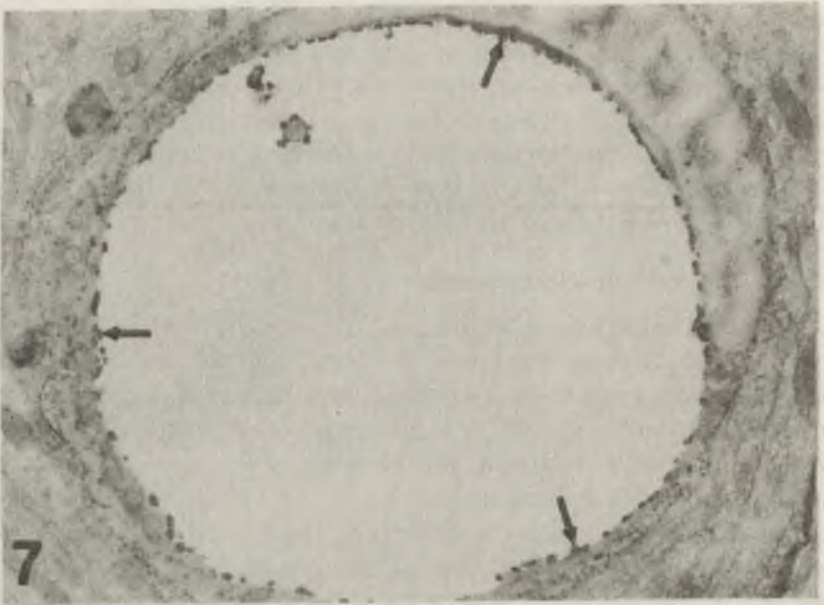
U zwierząt doświadczalnych, które przeżyły 6 godz. po przebytej śmierci klinicznej, produkt reakcji enzymatycznej gromadził się zarówno na luminalnej, jak i abluminalnej powierzchni błony cytoplazmatycznej komórek śródbłonna naczyń włosowatych (ryc. 8), a niekiedy był widoczny również w ich błonach podstawnych. Zwracało uwagę znaczne zróżnicowanie rozmieszczenia produktu końcowego odczynu w poszczególnych naczyniach. W niektórych włosniczkach ziarniste złogi były nieregularnie rozproszone na luminalnej powierzchni błony cytoplazmatycznej śródbłonna w miejscach jej wpukleń (inwaginacji) o różnej głębokości (ryc. 9). Obrazy takie sugerowały możliwość przemieszczania się cząsteczek enzymu z błony luminalnej w kierunku abluminalnej powierzchni komórki. W przypadkach tych spotykano również nieznaczne nagromadzenia produktu reakcji enzymatycznej w strukturach kanaliko-podobnych położonych w cytoplazmie śródbłonek (ryc. 9). W innych naczyniach włosowatych reakcja enzymatyczna ograniczona była do niewielkich odcinków błony podstawnej, podczas gdy komórki śródbłonna były jej całkowicie pozbawione (ryc. 10). W licznych naczyniach, w tym również włosowatych, nie stwierdzono w ogóle odczynu histoenzymatycznego. Należy dodać, iż w ocenianym okresie naczynia włosowate charak-

---

*Fig. 5.* Experimental animal, 24 h following cardiac arrest. AlkP activity in the cerebral cortex. Almost total absence of histochemical reaction in the cerebral vascular network.  $\times 25$

*Ryc. 6.* Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. FZ. Odczyn histoenzymatyczny znacznie wyraźniejszy niż w poprzedniej grupie czasowej (patrz ryc. 5) wyznacza nieregularnie sieć naczyńową kory mózgu. Zwraca uwagę nierównomierny rozkład produktu reakcji na przebiegu naczyń. Pow.  $25 \times$

*Fig. 6.* Experimental animal, 3 days after ischemic incident. AlkP activity in the cerebral cortex and white matter. Histochemical reaction much stronger than in previous experimental group (compare Fig. 5) marking irregularly cortical vessels. Note unequal distribution of the reaction end product along the course of vessels.  $\times 25$



Ryc. 7. Zwierze kontrolne. FZ. Kora mózgu. Złogi produktu odczynu histochemicznego umiejscowione są na luminalnej błonie komórek śródbłónka (strzałki). Pow. 3440 ×

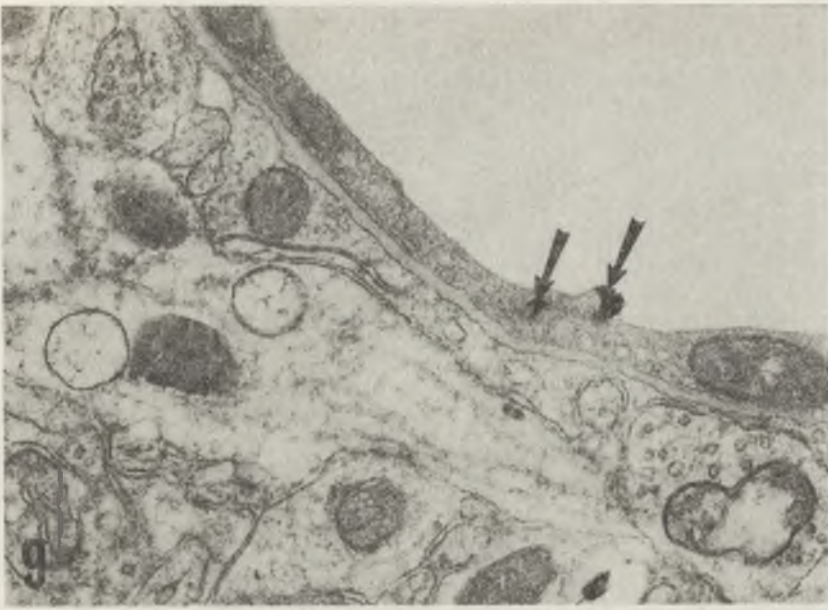
Fig. 7. Control animal. AlkP activity in the cerebral cortex. Products of histochemical reaction accumulated in the luminal surface of endothelial cells (arrows). × 3440



Ryc. 8. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Złogi produktu reakcji enzymatycznej zlokalizowanej zarówno na luminalnej, jak i abluminalnej błonie komórek śródbłónka oraz w niektórych odcinkach błony podstawnej. Pow. 22140 ×

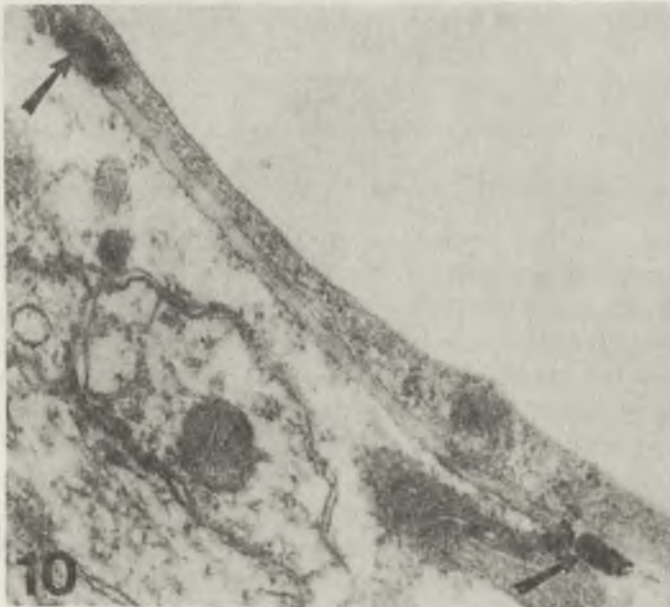
Fig. 8. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. AlkP activity. Products of histochemical reaction accumulated on both luminal and abluminal membranes of endothelial cells as well as in some parts of basal membranes. × 22140





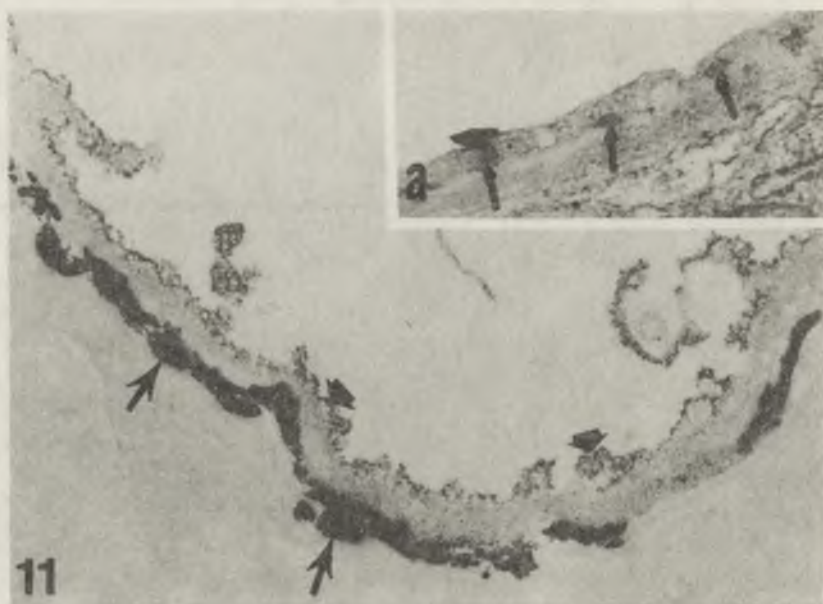
Ryc. 9. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Kora mózgu. Elektronowo gęste skąpe ziarnistości produktu reakcji enzymatycznej zlokalizowane na wpukleniu błony luminalnej śródbłonna oraz w strukturze kanaliko-podobnej (strzałki). Pow. 22140 ×

Fig. 9. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. AlkP activity. Electron dense, scanty deposits of histochemical reaction aggregated within invagination of luminal endothelial membrane and in canalicular structures within endothelial cytoplasm (arrows). × 22140



Ryc. 10. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Odczyn histochemiczny ujawniający aktywność FZ widoczny wyłącznie w „aktywnych odcinkach” strzałki błony podstawnej naczynia włosowatego. Pow. 32000 ×

Fig. 10. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. Histochemical reaction of AlkP seen exclusively in “active” fragments (arrows) of capillary basal membrane. × 32000



Ryc. 11. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Silna aktywność FZ zlokalizowana w błonie podstawnej i na abluminalnej powierzchni komórek śródbłonka (strzałka). Znacznie słabszy odczyn enzymatyczny w jego błonie luminalnej (groty strzałek). Pow. 32000  $\times$ .

Fig. 11. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. Strong histochemical reaction of alkP localized mostly in the basal membrane and abluminal surface of endothelial cells (arrows). Histochemical reaction on the luminal site of capillary endothelium much less intense (arrow heads).  $\times 32000$

Ryc. 11a. Aktywność FZ w pęcherzykach pinocytarnych komórek śródbłonka (strzałki). Pow. 32000  $\times$

Fig. 11a. AlkP, activity in the pinocytotic vesicles of endothelial cells (arrows).  $\times 32000$

teryzowały się dość znacznym obrzmieniem śródbłonek oraz poszerzeniem złączy międzyśródbłonkowych.

W 24 godz. po niedokrwieniu w większości naczyń mózgowych nie stwierdzono wykładników aktywności enzymatycznej FZ. W niektórych włosniczkach występowało jedynie odcinkowe nagromadzenie produktu końcowego reakcji wyłącznie w ich błonie podstawnej, naczynia włosowate w tym okresie charakteryzowały się obfitym nagromadzeniem pęcherzyków pinocytarnych w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonka oraz znacznym poszerzeniem przestrzeni międzyśródbłonkowych.

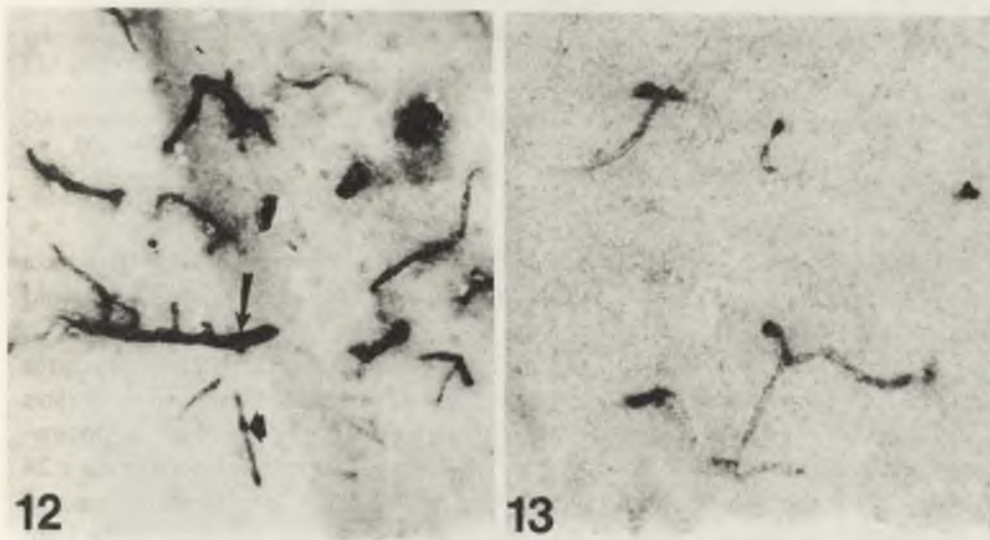
Grupę zwierząt z 3-dniowym przeżyciem po przebytych incydencie niedokrwienym charakteryzowało bardzo znaczne zróżnicowanie wzorca aktywności fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu, przy ogólnie bardziej nasilonym odczynie histoenzymatycznym w porównaniu z wcześniejszymi okresami po niedokrwieniu. W bardzo licznych naczyniach, stwierdzano obfite nagromadzenie złożeń produktu końcowego odczynu, w błonie podstawnej

i przylegającej do niej abluminalnej błonie cytoplazmatycznej śródbłonek. Stwierdzono znacznie mniejsze nasilenie reakcji na ich powierzchni luminalnej (ryc. 11). Niekiedy natomiast aktywność enzymatyczna błony cytoplazmatycznej śródbłonek, zwróconej do światła naczynia, dorównywała nasileniem reakcji występującej w strukturach abluminalnych. Dość często spotykano przekroje naczyń, w których aktywność FZ występowała w pęcherzykach pinocytarnych i kanaliko-podobnych strukturach cytoplazmy śródbłonek (ryc. 11a) oraz na obu powierzchniach – luminalnej i abluminalnej błony cytoplazmatycznej. Równocześnie nierzadko spotykano naczynia nie wykazujące zupełnie odczynu enzymatycznego.

### Aktywność cykazy adenylowej (AC)

#### Badanie w mikroskopie świetlnym

U zwierząt kontrolnych wysoka aktywność AC występowała zarówno w splotach naczyniówkowych, jak i w sieci naczyniowej mózgu. W przeciwieństwie do FZ, odczyn histoenzymatyczny wydawał się bardziej nasilony w naczyniach większego kalibru, niż we włosniczkach (ryc. 12). Nie stwierdzano

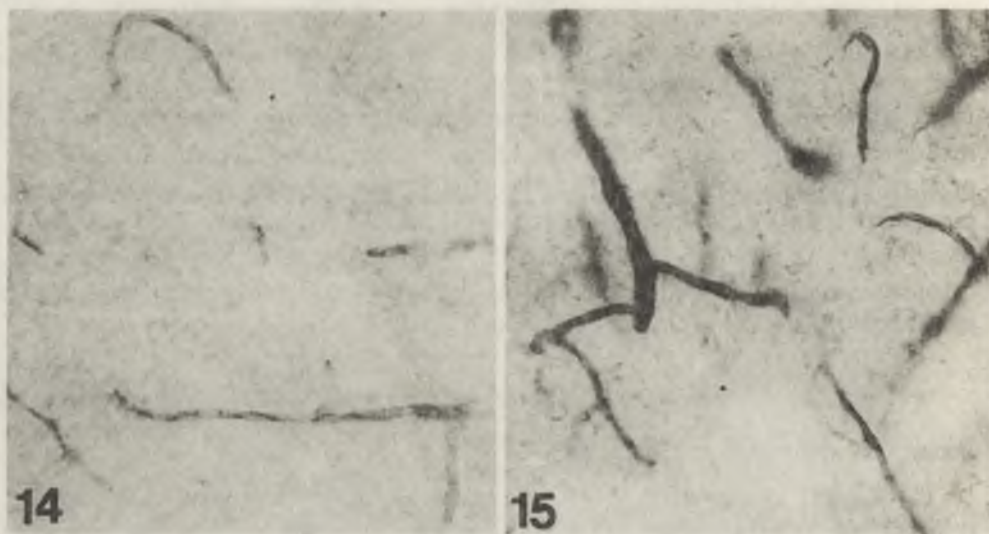


Ryc. 12. Zwierze kontrolne. Silny odczyn histoenzymatyczny ujawniający aktywność cykazy adenylowej (AC) w sieci naczyniowej kory mózgu. Aktywność enzymu jest wyższa w naczyniach większych (strzałka) niż we włosniczkach (grot strzałki). Pow. 200 ×

Fig. 12. Control animal. Adenylyl cyclase (AC) activity in the vascular network of the cerebral cortex. Enzymatic activity stronger in larger vessels (arrow) than in capillaries (arrow head). × 200

Ryc. 13. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Słabszy odczyn aktywności AC w sieci włosniczkowej kory mózgu. Pow. 200 ×

Fig. 13. Experimental animal, 6 h after ischemic incident. AC activity. Weak histochemical reaction in cortical capillaries. × 200



Ryc. 14. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrwieniu. Bardzo słaby odczyn ujawniający aktywność AC w naczyniach mózgu. Pow. 200 ×

Fig. 14. Experimental animal, 24 h after ischemic incident. AC activity. Residual histoenzymatic reaction in cortical capillaries. × 200

Ryc. 15. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Aktywność AC w sieci włósczkowej mózgu wyraźnie wyższa w porównaniu z poprzednimi grupami doświadczalnymi (patrz ryc. 13 i 14). Pow. 200 ×

Fig. 15. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. Histochemical reaction visualizing AC activity stronger than in previous experimental group (see Figs. 13 and 14). × 200

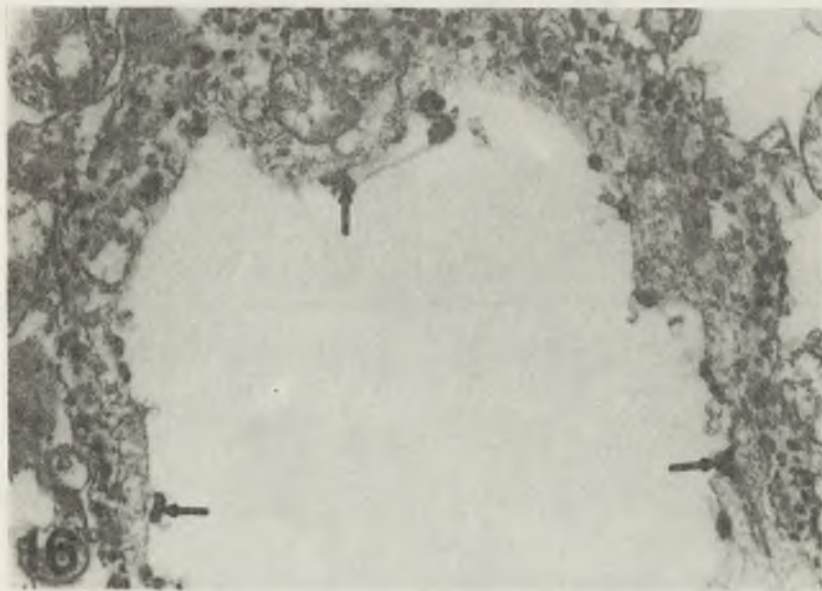
natomiast różnic w nasileniu reakcji w naczyniach formacji szarych i sieci naczyniowej istoty białej. Dodatni odczyn wykazywały również krwinki zawarte w świetle naczyń.

U zwierząt badanych po upływie 6 godz. od przebytego incydentu niedokrwienego stwierdzono wyraźne obniżenie intensywności odczynu histochemicznego, zwłaszcza w sieci naczyń włosowatych mózgu, w porównaniu z kontrolą (ryc. 13). Spadek ten był jeszcze wyraźniejszy u zwierząt z 24 godz. przeżyciem po niedokrwieniu (ryc. 14) i dotyczył zarówno naczyń większego kalibru, jak i włósczek. W mózgach szczurów, które przeżyły 3 dni po przebytej śmierci klinicznej stwierdzano natomiast wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej w porównaniu do obu wcześniejszych grup doświadczalnych (ryc. 15). Sieć naczyń włosowatych mózgu charakteryzowała się przy tym bardzo znacznym zróżnicowaniem intensywności odczynu histochemicznego. W niektórych naczyniach aktywność AC nie różniła się od stwierdzanej u zwierząt kontrolnych, podczas gdy w innych położonych w tej samej warstwie kory mózgu, była ona jedynie śladowa lub całkowicie nieobecna.

*Badanie w mikroskopie elektronowym*

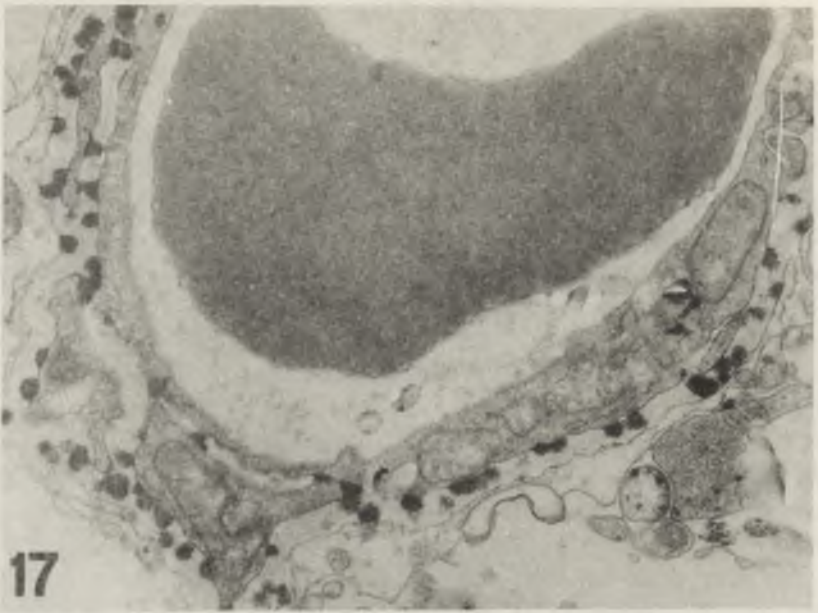
Naczynia mózgu u zwierząt kontrolnych, zgodnie z poprzednimi obserwacjami (Vorbrot i wsp. 1984), wykazywały dwa wzorce rozmieszczenia produktu reakcji enzymatycznej. Pierwszy, typowy dla mniejszych naczyń, przede wszystkim włośniczek, charakteryzował się obecnością złogów produktu końcowego reakcji umiejscowionych głównie na luminalnej powierzchni błon cytoplazmatycznych komórek śródbłónka. Typ drugi, występujący przeważnie w naczyniach większych, głównie arterioliach, znamionowało gromadzenie się optycznie gęstych ziarnistości produktu końcowego na obu błonach śródbłónków – luminalnej i abluminalnej (ryc. 16). Należy przy tym podkreślić, iż w mózgach zwierząt kontrolnych wiele naczyń lub ich pewne odcinki nie wykazywały w ogóle aktywności AC, niekiedy spostrzegano natomiast słabo zaznaczone obszary aktywności enzymatycznej w złączach synaptycznych.

U zwierząt doświadczalnych w 6 godz. po niedokrwieniu występował wyraźny spadek aktywności AC w ścianach większości naczyń. Wyrażało się to zarówno zmniejszeniem ilości ziarnistego produktu końcowego reakcji enzymatycznej, jak i ograniczeniem jego obecności wyłącznie do abluminalnej



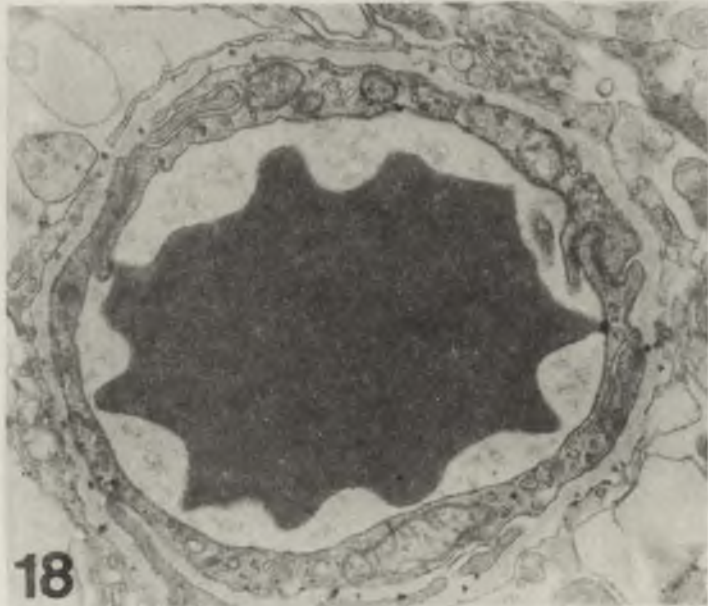
Ryc. 16. Zwierze kontrolne. Kora mózgu. AC. Produkt końcowy reakcji histochemicznej zlokalizowany zarówno na luminalnej (strzałki), jak i abluminalnej (groty strzałek) powierzchni śródbłónka. Pow. 40000 ×

Fig. 16. Control animal. AC activity in the cerebral cortex. End product of histochemical reaction localized both on luminal (arrows) and abluminal (arrow heads) membranes of endothelial cells. × 40000



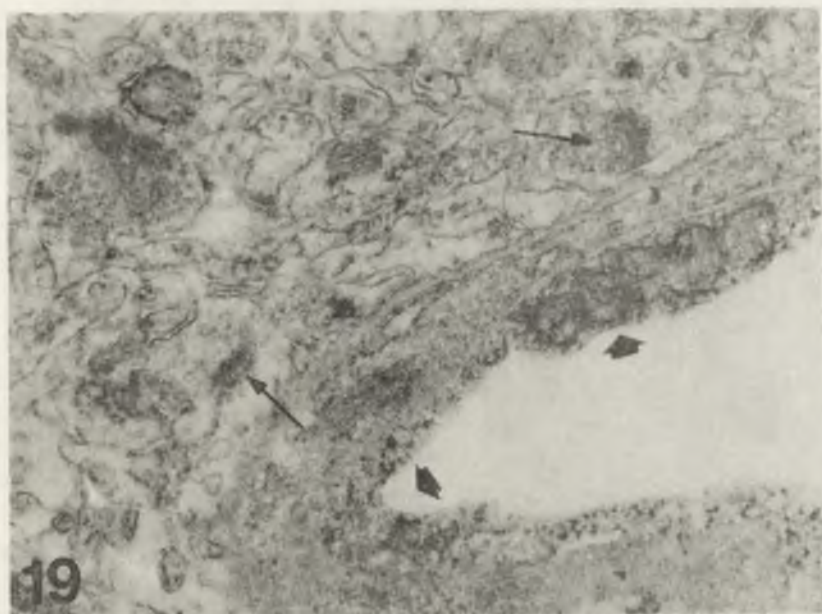
Ryc. 17. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Kora mózgu. AC. Produkt końcowy reakcji enzymatycznej umiejscowiony jest wyłącznie w błonie abluminalnej komórek śródbłonna.  
Pow. 3440 ×

Fig. 17. Experimental animal, 6 h after ischemic incident. AC activity. End product of histochemical reaction localized exclusively on abluminal endothelial membrane. × 3440



Ryc. 18. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrwieniu. Śladowa aktywność AC w ścianie naczyń mózgu. Pow. 3440 ×

Fig. 18. Experimental animal, 24 h after ischemic incident. Residual histochemical reaction visualizing AC activity in the walls of cortical vessels. × 3440



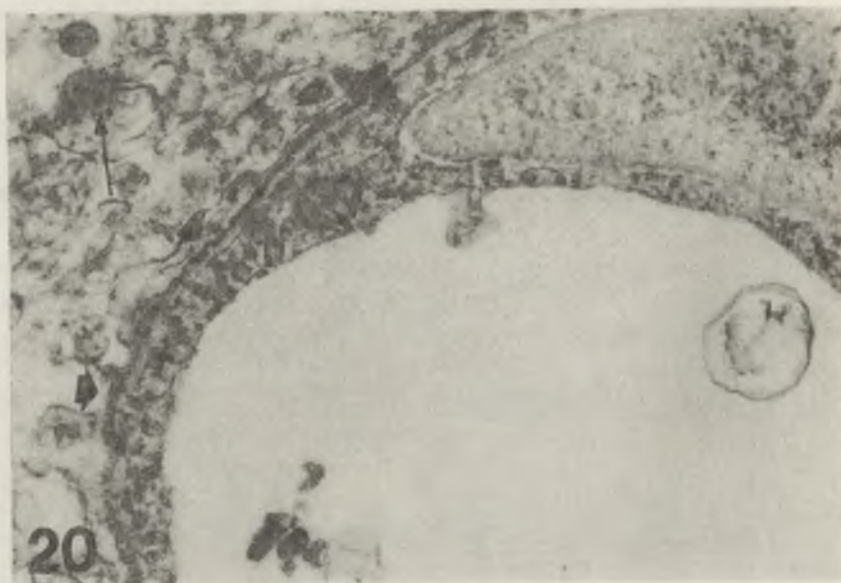
Ryc. 19. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Elektronowo gęste złoży produktu końcowego reakcji enzymatycznej wskazujące na aktywność AC umiejscowione są w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonka, głównie w ich części luminalnej (groty strzałek). Słaba aktywność AC widoczna również w rejonie synaps (strzałki). Pow. 3440 ×

Fig. 19. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. AC activity. Electron dense fine aggregates of end product of enzymatic reaction are localized in the luminal portion of swollen endothelial cells (arrow heads), some enzymatic activity seen in the synaptic contacts (arrows). × 3440

powierzchni komórek śródbłonka (ryc. 17). Na licznych przekrojach naczyń stwierdzano również skupienie optycznie gęstych ziarnistości w błonie podstawnej naczyń. Opisanym obrazom histochemicznym towarzyszyło obrzmienie śródbłonek oraz nagromadzenie w ich cytoplazmie licznych pęcherzyków pinocytarnych. Nierzadko występowały pęcherzyki opłaszczone. W obu typach pęcherzyków nie stwierdzono gromadzenia się produktów odczynu histochemicznego.

Grupę zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po niedokrwieniu znamionowało dalsze obniżenie aktywności enzymatycznej w naczyniach krwionośnych mózgu, w tym przede wszystkim w naczyniach włosowatych. Niekiedy tylko obserwowano śladowy odczyn histochemiczny (ryc. 18), częściej nie stwierdzano go w ogóle.

Po upływie 3 dni od niedokrwienia aktywność AC wzrastała bardzo znacznie w porównaniu z wcześniejszymi okresami obserwacji. Elektronowo-gęste, ziarniste złoży produktu końcowego reakcji gromadziły się głównie w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonka, przede wszystkim w jej części skierowanej do światła naczynia (ryc. 19). Błona luminalna śródbłonek



Ryc. 20. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. AC. Aktywność enzymatyczna umiejscowiona w wypustkach mięśniówki gładkiej, przylegających do błony podstawnej (groty strzałek), oraz w rejonie synaps (strzałki). Pow. 32000 ×

Fig. 20. Experimental animal, 3 days after ischemic episode, AC activity. Histochemical reaction localized in processes of smooth muscle fibres (arrow heads) and in synaptic contacts (arrows). × 32000

pozbawiona była na ogół produktu reakcji enzymatycznej. Niekiedy natomiast występował on w wypustkach komórek mięśni gładkich, przylegających do błony podstawnej naczyń (ryc. 20). Należy podkreślić, iż w obrzniętych komórkach śródbłonna, w licznych naczyniach włosowatych nie stwierdzano śladowej nawet aktywności enzymatycznej. Przestrzenie międzysródbłonkowe tych naczyń były znacznie poszerzone.

Na uwagę zasługuje również fakt, iż w mózгах zwierząt, które przeżyły 3 dni po przebytej śmierci klinicznej obserwowano śladową aktywność cyklazy adenylowej w zakończeniach synaptycznych (ryc. 19, 20). Jej obecność była zjawiskiem stałym u zwierząt kontrolnych. Utrzymywała się ona nadal w 6 godz. po śmierci klinicznej. Nie stwierdzano jej natomiast u zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po niedokrwieniu.

#### OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że głębokie niedokrwienie mózgu związane z 10-minutową śmiercią kliniczną prowadzi do zaburzeń aktywności obu badanych enzymów, wyrażających się w obrazie histochemicznym zmniejszeniem intensywności odczynu, aż do jego całkowitego zaniku oraz nieprawidłową



dystrybucją jego produktu końcowego. Zmiany dotyczące aktywności zarówno FZ, jak i AC, charakteryzowały się podobnym wzorcem histochemicznym i dynamiką w poszczególnych fazach po przebytych incydencie niedokrwienym. Towarzyszyły one uchwytnym w obrazie mikroskopowo-elektronowym nieprawidłowościom strukturalnym ściany naczyń włosowatych, wyrażającym się obrzmieniem komórek śródbłonka, zwiększeniem liczby pęcherzyków pinocytarnych oraz wyraźnym poszerzeniem złącz międzyśródbłonkowych. Brak badań mikroskopowo-elektronowych z użyciem peroksydazy chrzanowej nie pozwala na jednoznaczną ocenę stanu zespołów ścisłych. Dominujące w obrazie mikroskopowo-elektronowym przemieszczenie produktu końcowego odczynu z powierzchni luminalnej komórek śródbłonka na ich powierzchnię abluminalną może być uznane za wykładnik zaburzenia czynnościowej polarności, charakterystycznej dla komórek, w których zachodzą procesy czynnego transportu (Betz, Goldstein 1978; Betz i wsp. 1980; Vorbrodt i wsp. 1983).

Fosfataza zasadowa uznana za enzym uczestniczący w aktywnym transporcie poprzez aktywację lub inaktywację różnych enzymów komórkowych na drodze ich defosforylacji, lub wprost defosforylacji transportowanych substratów (Goldstein, Harris 1981), wykazuje w warunkach prawidłowych silną aktywność zlokalizowaną w luminalnej plazmolemie śródbłonek wszystkich naczyń ośrodkowego układu nerwowego, wyposażonych w mechanizmy barierowe. W następstwie 10-minutowego niedokrwienia dochodziło do postępującego spadku jej aktywności w większości naczyń włosowatych, wyrażającego się w 24 godz. po przebytej śmierci klinicznej niemal całkowitym brakiem odczynu histochemicznego. Wprawdzie pojawiał się on ponownie w stosunkowo wysokim nasileniu po upływie 3 dni, nie osiągając jednakże intensywności typowej dla warunków prawidłowych, a co ważniejsze nie normalizowała się jego dystrybucja komórkowa. Na podkreślenie zasługuje przy tym dynamika jej zaburzeń. W 6 godz. po niedokrwieniu produkty aktywności enzymatycznej obserwowano zarówno w luminalnej, jak i abluminalnej plazmolemie śródbłonek, a także w błonie podstawnej niektórych włóścików. Cechą znamioną tej fazy poischemicznej była bardzo znaczna nieregularność rozmieszczenia produktów odczynu. W tym też okresie występowały one w inwaginacjach luminalnej plazmolemy oraz w ujawniających się wówczas cytoplazmatycznych strukturach kanaliko-podobnych. Obrazy te w kontekście pojawiania się aktywności w abluminalnej plazmolemie i w błonie podstawnej mogą sugerować transcytoplazmatyczne przemieszczanie się enzymu. Za taką interpretacją zjawiska opowiadają się między innymi Vorbrodt i wsp. (1981a). W 24 godz. po niedokrwieniu, na tle na ogół negatywnego odczynu ujawniającego aktywność FZ, nieliczne naczynia wykazujące jego obecność gromadziły produkty końcowe reakcji na abluminalnej powierzchni śródbłonka. Restytucja aktywności enzymatycznej, obserwowana w 3 dniu w niewielkim tylko stopniu dotyczyła powierzchni komórek zwróconych do światła naczyniowego. Przeważał odczyn w błonie podstawnej

i skierowanej do niej powierzchni komórek śródbłonka. W tym też biegunie ich cytoplazmy gromadziły się przede wszystkim stosunkowo nieliczne pęcherzyki wypełnione ziarnistym produktem odczynu histochemicznego. Większość bowiem licznych pęcherzyków śródplazmatycznych nie wykazywała aktywności enzymatycznej. Spostrzegano ją natomiast w strukturach kanaliko-podobnych. Obraz histochemiczny występujący w 3 dniu po niedokrwieniu stanowił niejako odwrotność tego, co spostrzegano w 6 godz. i przypominał zmiany opisane przez Vorbrodta i wsp. (1985) w okresie rezolucji obrzęku mózgu. Analogiczne do opisanych przez nas zmiany aktywności FZ występowały również w innych typach doświadczalnej patologii mózgu, których wspólną cechą były uszkodzenia bariery krew – mózg (Vorbrodt i wsp. 1981a, b; 1983; Wiśniewski i wsp. 1983). Towarzyszące nieprawidłowościom histochemicznym pojawianie się struktur kanaliko-podobnych w cytoplazmie śródbłonek obserwowane było również przez innych autorów i traktowane jako jeden z morfologicznych wykładników zaburzenia naczyniowych mechanizmów barierowych (Simionescu i wsp. 1978; Lossinsky i wsp. 1981; Lossinsky, Wiśniewski 1986). Uważa się, iż stanowią one drogę transportu płynu z krwi do tkanki, a być może i w odwrotnym kierunku – z obrzękłej tkanki do światła naczyń.

Na marginesie tych spostrzeżeń warto odnotować, iż we wcześniejszym cyklu prac, poświęconych aktywności swoistych fosfotaz nukleotydowych w sieci naczyniowej mózgu w różnych typach niedostatku tlenowego z zespołami niedokrwinnymi włącznie, stwierdzono również szereg nieprawidłowości wskazujących na upośledzenie funkcji transportowych w złączy naczyniowo-tkankowym (Szumańska i wsp. 1976; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska, Ostenda 1980; Szumańska 1981). Ich cechą charakterystyczną było zróżnicowanie wzorca nieprawidłowości histoenzymatycznych, ich topografii i dystrybucji w poszczególnych elementach strukturalnych naczyń i otaczających je wypustkach astrocytarnych, a także w dynamice narastania i cofania się zmian w zależności od stosowanego modelu doświadczalnego i występujących w nim uszkodzeń tkankowych. Podstawowym czynnikiem różnicującym był charakter rozwijającego się obrzęku – cytotoksycznego lub naczyniopochodnego. Wydaje się to oczywiste w świetle zasadniczej różnicy ich mechanizmu patogenetycznego – braku zmian czynności transportowej naczyń w pierwszym oraz ich obecności w drugim (Klatzo 1967). Wspomniana uprzednio różnorodność zmian obrazu histochemicznego mogła stanowić odbicie faktu, iż w większości sytuacji doświadczalnych oba mechanizmy patogenetyczne obrzęku mózgu wzajemnie się na siebie nakładają. Dotyczy to zwłaszcza stanów niedostatku tlenowego (Klatzo 1985).

Drugi z badanych enzymów – cyklaza adenyłowa – w warunkach prawidłowych charakteryzuje się zróżnicowaną lokalizacją aktywności w zależności od kalibru naczynia (Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). W naczyniach włosowatych końcowy produkt reakcji enzymatycznej związany jest z luminalną plazmolemmą śródbłonek, z obecnymi na jej po-

wierzchni inwaginacjami oraz z pęcherzykami zawartymi w ich cytoplazmie. W drobnych tętniczkach natomiast gromadzi się on na powierzchni abluminalnej komórek śródbłonka, w błonie podstawnej oraz na błonach zwróconych do niej wypustek mięśniówki gładkiej. Przebyte niedokrwienie prowadziło do pogłębiającego się w czasie obniżenia aktywności enzymatycznej, aż do śladowej w 24 godz. po śmierci klinicznej oraz do znacznych, nie normalizujących się do 3 dnia nieprawidłowości w rozmieszczeniu produktów reakcji histochemicznej w ścianie naczyń, mimo wyraźnego w tym okresie zwiększenia jej nasilenia. Wzorzec zaburzeń odczynu był w zasadniczych zarysach zbliżony do stwierdzonego w przypadku FZ. Przy bardzo znacznym nagromadzeniu pęcherzyków pinocytarnych w cytoplazmie komórek śródbłonkowych, w żadnym okresie po niedokrwieniu nie stwierdzono gromadzenia się w nich produktu reakcji histoenzymatycznej.

AC jest integralnym składnikiem błon komórek śródbłonka (Wagner i wsp. 1972), spełniającym zasadniczą rolę w czynnym transporcie metabolitów z krwi do tkanek ośrodkowego układu nerwowego (Dux i wsp. 1984; Joó 1985). Przypisuje się jej między innymi szczególne znaczenie w regulacji pęcherzykowego transportu substancji makromolekularnych (Joó 1971), który stanowi alternatywną w stosunku do przestrzeni międzyśródbłonkowych drogę przechodzenia białek surowicy krwi do tkanek ośrodkowego układu nerwowego, występującego w warunkach zaburzenia przepuszczalności naczyń, a w niewielkim stopniu również w naczyniach prawidłowych (Joó 1971; Beggs, Waggener 1976).

Dux i wsp. (1984) wykazali, iż w stanach niedotlenienia, prowadzącego do wzrostu aktywności pinocytarnej w komórkach śródbłonka i zaburzeń przepuszczalności naczyń, występuje podwyższenie aktywności AC. Nasze spostrzeżenia różnią się w sposób zasadniczy. Pomimo niewątpliwego zwiększenia liczby pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonkach naczyniowych oraz stwierdzonej metodami immunochemicznymi ekstrakcji białek surowicy krwi do tkanek (Mossakowski, Krajewski 1987) w żadnym okresie poischemicznym nie stwierdzaliśmy wzrostu aktywności enzymu. Wręcz przeciwnie, występował jej wyraźny spadek, który nawet w okresie jej restytucji nie osiągał nasilenia występującego w materiale kontrolnym. Podobne obniżenie aktywności AC obserwowano w przypadku przewlekłego zatrucia związkami manganu (Szumańska, Mossakowski 1985) oraz ostrego zatrucia tlenkiem węgla (Szumańska i wsp. 1988). Zmiany enzymatyczne w obu modelach zatrucia różniły się jednak od następstw przebytej śmierci klinicznej odmienną dynamiką ich narastania i cofania się oraz pełnym powrotem obrazu histochemicznego do stanu typowego dla zwierząt kontrolnych. W porównywaniu uzyskanych wyników zachować należy znaczną ostrożność, ze względu na odmienną warunków doświadczalnych i ciężkości związanych z nimi uszkodzeń tkankowych.

W kontekście zmian stwierdzanych w zastosowanym przez nas modelu śmierci klinicznej, wyrażających się wykładnikami obrzęku naczyniopochodnego we wczesnym okresie poreanimacyjnym (Mossakowski i wsp. 1986),

przechodzeniem białek surowicy do utkania mózgu (Mossakowski, Krajewski 1987) oraz wybitnie wzmoczoną aktywnością pinocytarną śródbłonnków naczyniowych wydaje się uzasadniona hipoteza „wyczerpywania” się aktywności enzymatycznej AC w energochłonnych procesach funkcji komórek śródbłonka. Czas restytucji jej aktywności zależałby od nasilenia działania czynników uszkadzających, różnych w przytoczonych powyżej modelach doświadczalnych. Wyniki uzyskane przez Duxa i wsp. (1984) były w tym kontekście wykładnikiem aktywizacji enzymu pod wpływem czynników o stosunkowo niewielkim oddziaływaniu na stan przepuszczalności naczyń (Kuroisawa i wsp. 1985).

W pracy ze względu na zastosowaną technikę badań histochemicznych nie rozwinęto zagadnienia aktywności cykazy adenylowej w złączach synaptycznych, mimo uchwytanych zmian ich obrazu. Ocena aktywności AC w obszarze synaps, opisana przez Rechartd i wsp. (1986) stanowi przedmiot odrębnego opracowania.

#### CHANGES IN THE ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE AND ADENYLATE CYCLASE IN THE BRAIN VASCULAR NETWORK IN EXPERIMENTAL POSTRESUSCITATION SYNDROME

##### Summary

Activity of alkaline phosphatase and adenylate cyclase was evaluated in the brain vascular network of rats subjected to 10 min clinical death due to cardiac arrest.

Progressive decrease of both enzymes activities was noted in the early survival stages, reaching the lowest intensity in 24th h after ischemic incident. Restitution of enzymatic activity was observed 2 days later, although even then it did not reach intensity typical for normal controls. Electron microscopic study revealed disturbances of normal polarity of enzyme distribution in the cytoplasmic membranes of vascular endothelia. Activity of enzymes disappeared from luminal endothelial surfaces, appearing on abluminal ones and in the capillary basal membranes. Ultrastructural picture of the cerebral capillaris was additionally characterized by remarkable increase of micropinocytic vesicles, and appearance of coated vesicles as well as canalicular structures. Swelling of endothelial cytoplasm and widening of interendothelial clefts were also present.

The results obtained indicate that deep 10 min ischemia in experimentally induced clinical death is leading to the impairment of transport functions in damaged cerebral capillary vessels.

#### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И АДЕНИЛОВОЙ ЦИКЛАЗЫ СОСУДИСТОЙ СЕТИ МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ СИНДРОМЕ

##### Резюме

С помощью цитохимических методов, применяемых в световой и электронной микроскопии, оценивалась активность щелочной фосфатазы и адениловой циклазы в сосудах мозга крыс, находившихся в течение 10 минут в состоянии экспериментально вызванной

клинической смерти. Обнаружено прогрессирующее понижение активности обоих энзимов, наиболее резко выраженное 24 часа после ишемии. Восстановление энзиматической активности, наблюдавшееся в течение 3-х дней после ишемии, не достигало уровня, типичного для контрольных животных. Электронно-микроскопическое исследование показало нарушение полярного расположения энзимов на цитоплазматических мембранах эндотелия капилляров. Энзиматическая активность на прилегающей к просвету сосуда плазмолемме эндотелиальных клеток снижалась и появлялась на внешней стороне и в базальной мембране. Кроме того, ультраструктура сосудов характеризовалась значительным увеличением содержания пиноцитарных пузырьков, появлением окруженных оболочкой (мембраной) пиноцитарных пузырьков и канальцеподобных структур, а также набуханием цитоплазмы и расширением межэндотелиальных пространств. Полученные результаты показывают, что 10-минутная ишемия при экспериментальных условиях клинической смерти приводит к нарушению транспортных функций в стенках поврежденных мозговых сосудов.

### PIŚMIENICTWO

1. Beggs J. L., Waggener J. D.: Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord. *Lab. Invest.*, 1976, 34, 428–439.
2. Betz L., Goldstein G. W.: Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science*, 1978, 202, 225–226.
3. Betz A. L., Firth J. A., Goldstein G. W.: Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.*, 1980, 192, 17–28.
4. Bodenheimer T. S., Brightman M. W.: A blood-brain barrier to peroxidases in blood vessels surrounded by perivascular space. *Am. J. Pathol.*, 1968, 122, 249–268.
5. Borgers M.: The cytochemical application of new potent inhibitors of alkaline phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 812–824.
6. Dux E., Temesvari P., Joó F., Adam G., Clementi F., Dux L., Hideg J., Hossmann K. A.: The blood-brain barrier in hypoxia: ultrastructural aspects and adenylate cyclase activity of brain capillaries. *Neuroscience*, 1984, 12, 951–958.
7. Fujimoto T., Walker J. T. Jr., Spatz M., Klatzo I.: Pathophysiological aspects of ischemic edema. W: *Dynamics of Brain Edema*. Red.: H. M. Pappius, W. Feindel. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, pp. 171–192.
8. Goldstein D. J., Harris H.: Mammalian brain alkaline phosphatase: expression of liver (bone) kidney locus. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 53–57.
9. Joó F.: Electron histochemical structure of capillaries in the rat brain. *Acta Biol. Szeged.*, 1969, 15, 79–88.
10. Joó F.: Significance of adenylate cyclase in the regulation of permeability of brain capillaries. W: *Pathophysiology of cerebral energy metabolism*. Red.: B. B. Mrsulja, L. M. Rakič, I. Klatzo, M. Spatz. Plenum Press, New York, 1979, pp. 211–237.
11. Joó F.: Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Br. J. Exp. Pathol.* 1971, 52, 646–649.
12. Joó F.: The blood-brain barrier *in vitro*: ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem.*, 1985, 7, 1–25.
13. Joó F., Toth I.: Brain adenylate cyclase: its common occurrence in the capillaries and astrocytes. *Naturwissenschaften*, 1975, 8, 397.
14. Joó F., Temesvari P., Dux E.: Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res.*, 1983, 278, 165–174.
15. Karnushkina I., Palacios J. M., Barbin G., Dux E., Joó F., Schwartz J. C.: Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminic components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1201–1208.

16. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol., Exp. Neurol.*, 1967, 26, 1–13.
17. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The Nervous System*. Red.: D. B. Tower. Vol. 1. *The Basic Neuroscience*. Raven Press, New York, 1975, pp. 313–322.
18. Klatzo I.: Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br. J. Anaesth.*, 1985, 57, 18–22.
19. Korpaczew W., Łysenkow S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie klinicznej smierci i postreanimacyjnej choroby u krys. *Patol. Fizjol. Exp. Ter.*, 1982, 3, 78–80.
20. Kuroisawa T., Ting P., Martinez H., Klatzo I.: The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1985, 68, 122–129.
21. Lossinsky A. S., Vorbrod A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultracytochemical evidence for endothelial channel-lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 197–202.
22. Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: A comparative ultrastructural study of endothelial cell tubular structures from injured mouse blood-brain barrier and normal hepatic sinusoid demonstrated after perfusion fixation with osmium tetroxide. W: *Microvascular Research*. Academic Press, 1986, 31, 333–344.
23. Mayahara H., Hirano H., Saito T., Ogawa K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of nonspecific alkaline phosphatase. *Histochemie*, 1967, 1, 88–96.
24. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
25. Mossakowski M. J., Krajewski S.: Antineural antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia. *Neuropat. Pol.*, 1988, 26, 37–48.
26. Oldendorf W. H.: The blood-brain barrier. W: *The ocular and cerebrospinal fluids*. Red.: L. Z. Bito, H. Davson, J. D. Fenstermacher. Academic Press, London, 1977, pp. 177–190.
27. Ostenda M., Szumańska G., Gadamski R.: Specific hydrolases activity in blood vessels of rabbit brain after circulatory hypoxia. W: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWL, Warszawa, 1978.
28. Ostenda M., Gadamski R.: Permeability of cerebral vessels for horseradish peroxidase in mongolian gerbils after unilateral ligation of the common carotid artery. II. Comparison of early and late changes. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 631–639.
29. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neuroscience*, 1979, 4, 779–799.
30. Rechart L., Härkönen M.: Electron microscopical demonstration of adenylate cyclase activity in nervous tissue. *Histochemistry*, 1977, 51, 113–119.
31. Rechart L., Harvonen H.: Cytochemical demonstration of adenylate cyclase activity with cerium. *Histochemistry*, 1985, 82, 501–505.
32. Rechart L., Hervonen H.: Histochemical localization of adenylate cyclase in nervous tissue. W: *Neurohistochemistry: Modern methods and applications*. Alan R. Liss Inc., 1986, 443–452.
33. Resse T. S., Karnovsky M. J.: Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 16, 270–274.
34. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability. *Lab. Invest.*, 1961, 10, 492–501.
35. Simionescu N., Simionescu M., Palade G. E.: Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculature of diaphragm. II. Pathways by microperoxidase across the endothelium. *Microvasc. Res.*, 1978, 15, 17–36.
36. Szumańska G., Ostenda M., Mossakowski M. J.: Aktywność nukleozydo-dwu- i trój-fosfataz w mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 197–207.

37. Szumańska G., Ostenda M.: Histochemical changes of tissue vascular junction in the rat brain as a result of hypoxic hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 601–618.
38. Szumańska G.: Badania ultrastrukturalne fosfataz nukleocydowych w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 551–573.
39. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1984, 62, 219–224.
40. Szumańska G., Mossakowski M. J.: Aktywność cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 3, 297–314.
41. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J., Uusitalo H.: Aktywność cyklazy adenylowej w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1988 (w druku).
42. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleotide phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1964, 23, 46–59.
43. Vorbrodt A. W., Lassmann H., Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S.: Ultracytochemical studies of the blood-meningeal barrier (BMB) in rat spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981a, 55, 113–123.
44. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981b, 53, 203–211.
45. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983, suppl. 8, 43–57.
46. Vorbrodt A. W., Szumańska G., Dobrogowska D. H.: Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 1984, 32, 275–284.
47. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Suzuki R., Yamaguchi T., Masoaka H., Klatzo I.: Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1985, 66, 265–273.
48. Wagner R. C., Kreiner P., Barnett R. J., Bitensky M. W.: Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1972, 69, 3176–3179.
49. Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S., Moretz R. C., Vorbrodt A. W., Lassmann H., Carp R. I.: Increased blood-brain barrier permeability in scrapie-infected mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1983, 42, 615–626.

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