

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ CYKLAZY ADENYLOWEJ
I FOSFATAZY ZASADOWEJ W NACZYNIACH MÓZGU SZCZURA
W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU CHLORKIEM MANGANAWYM

Zespół Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Badania patomorfologiczne doświadczalnej encefalopatii manganowej sugerują, że przynajmniej część nieprawidłowości strukturalnych może być uwarunkowana upośledzeniem mechanizmów bariery krew-mózg (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1983 a, b; Dydyk, Mossakowski 1984). Należą do nich przede wszystkim wykładniki naczyńpochodnego obrzęku mózgu, stwierdzane zarówno w badaniach histopatologicznych, jak i w mikroskopowo-elektronowych bezpośrednio po zatruciu i utrzymujące się około 1 tygodnia. Znamiennej cechą naczyńpochodnego obrzęku mózgu jest upośledzenie mechanizmów bariery krew-mózg, związane z uszkodzeniem elementów strukturalnych złącza naczyniowo-tkankowego (Klatzo 1967). Znajdują one zazwyczaj wykładniki morfologiczne w obrazie mikroskopowo-elektronowym ścian naczyń włosowatych, bądź czynnościowe wyrażające się przechodzeniem znacznikowych substancji „barierowych” z naczyń do tkanek mózgu (Klatzo 1967; Reese, Karnowsky 1967) lub zmianami aktywności enzymów zlokalizowanych w elementach złącza naczyniowo-tkankowego (Torack, Barnett 1964; Ostenda i wsp. 1978; Vorbrodt i wsp. 1983).

Badania mikroskopowo-elektronowe dotyczące zarówno wczesnej, jak i późnej fazy encefalopatii manganowej wykazały minimalne zmiany w ultrastrukturze naczyń mózgu (Mossakowski i wsp. 1983 a, b; Dydyk, Mossakowski 1984). Wyrażały się one nieznacznym obrzmieniem komórek śródbłonna i zwiększoną ilością pęcherzyków mikropinocytarnych w ich cytoplazmie. Obkurczenie drobnych tętniczek obserwowano jedynie we wczesnych stadiach zatrucia. W tej sytuacji wydawało się celowe przeprowadzenie badań histochemicznych, pozwalających na dokładniejszą charakterystykę stanu naczyń mózgu w warunkach zastosowanego uprzednio modelu doświadczalnego. Wobec przyjętego obecnie poglądu o zasadniczej roli śródbłonna naczyń w utrzymaniu mechanizmów

bariery krew-mózg (Reese, Karnowsky 1967; Bodenheimer, Brightman 1968; Joó 1971) postanowiono ocenić aktywność cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej, enzymów zlokalizowanych w śródbłonku i uczestniczących w procesach transportowych. Pierwszy z nich spełnia istotną funkcję w regulacji makromolekularnego transportu (Joó 1979; Joó i wsp. 1983), a drugi uczestniczy w procesach transportu czynnego poprzez defosforylację licznych metabolitów przechodzących do ośrodkowego układu nerwowego (Samorajski, McCloud 1961; Vorbrodtt i wsp. 1981 a, 1983).

MATERIAŁ I METODY

Encefalopatię manganową wywoływano w taki sam sposób jak w poprzednich badaniach (Mossakowski i wsp. 1983). Szczury białe szczepu Wistar, samce o masie ciała około 120—150 g otrzymywały w okresie 4 tygodni 7 dożylnych iniekcji chlorku manganowego ($MnCl_2$) w fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Pełna podana dawka środka toksycznego w przeliczeniu na Mn^{++} wynosiła 250 mg/kg masy ciała. Dwie pierwsze iniekcje w dawce po 20 mg Mn^{++} /kg masy ciała podano w odstępach trzydniowych, trzy dalsze po 40 mg Mn^{++} /kg masy ciała w dwudniowych odstępach, a dwie następne (40 mg Mn^{++} /kg masy ciała) w odstępach jednodniowych. Szczury kontrolne otrzymywały w tym samym czasie dożylnie iniekcje fizjologicznego roztworu chlorku sodu. Zachowanie zwierząt doświadczalnych w okresie zatruwania i ich śmiertelność nie różniły się od uprzednio opisanych (Śmiałek, Mossakowski 1981). Z ogólnej liczby 38 zwierząt, poddanych zatruciu, 17 padło. Padły przeważnie w czasie podawania środka toksycznego albo bezpośrednio po iniekcji. Przez cały okres doświadczenia szczury nie wykazywały objawów neurologicznych, stawały się jednak mniej ruchliwe i traciły łaknienie.

Badania histochemiczne obejmowały ocenę aktywności cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Badanie przeprowadzono bezpośrednio po podaniu ostatniej dawki $MnCl_2$, po upływie 24 godzin i po 7 dniach. Każda grupa czasowa obejmowała 4 zwierzęta (3 doświadczalne i 1 kontrolne).

Szczury przeznaczone do badań aktywności cyklazy adenylowej (AC) uśmiercano przez dekapitację. Mózgi natychmiast wyjmowano z jamy czaszki, oziębiano na lodzie i dzielono na dwie półkule. Z półkuli prawej, przeznaczonej do badań w mikroskopie świetlnym, pobierano bloki tkankowe, które po zatopieniu w „Tissue-tekk” zamrażano w suchym lodzie i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 20 μm . Z półkuli lewej, przeznaczonej do badań w mikroskopie elektronowym, pobierano bloki tkanki o wymiarach 1 mm^3 z okolicy jąder podstawy i spoidła wielkiego. W celu uwidocznienia aktywności cyklazy adenylowej zarówno skrawki kriostatowe, jak i nieutralone bloki tkankowe podda-

wano trzem kolejnym etapom preparatyki histochemicznej, obejmującej proces utrwalania, aktywacji enzymu i właściwej inkubacji według metody opisanej uprzednio przez Szumańską i wsp. (1984) oraz Vorbrodta i wsp. (1984).

Utrwalanie przeprowadzano w świeżo przygotowanym płynie utrwalającym zawierającym cukrozę (0,2 M), 5% dwumetylo-sulfoxid (DMSO), kwas askorbinowy (0,1 mM), 1% paraformaldehyd w buforze kakodylowym, pH 7,4 oraz aktywatory reakcji: 1-izoproterenol (0,1 mM) i sól sodową guanylylimidodwufosforanu GMP (PNP) (0,1 mM). Utrwalanie przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

Płyn aktywujący zawierał wyżej wymienione aktywatory rozpuszczone w buforze kakodylowym, pH 7,4. Aktywację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Płyn inkubacyjny zawierał sól sodową 5'-adenylyl-imido-dwufosforanu (AMP-PNP), wyżej wymienione aktywatory, inhibitor fosfo-dwuesterazy oraz chlorek strontu (SrCl_2), przekształcany następnie pod wpływem octanu ołowiu, w widoczny w mikroskopie elektronowym fosforan ołowiu, rozpuszczone w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH 9,0. Końcowe pH płynu inkubacyjnego wynosiło 8,5—8,7. Inkubację przeprowadzano w temperaturze pokojowej w ciągu 1—3 godzin.

Po inkubacji skrawki kriostatowe wywoływano w roztworze wielosiarczku amonu, płukano w 0,2 M cukrozie i zamykano w glicerożelatynie. Bloki tkanki przeznaczone do badań w mikroskopie elektronowym płukano w 0,2 M cukrozie, utrwalano dodatkowo w 1% czterotlenku osmu w buforze kakodylowym, pH 7,2 barwiono en block w 0,5% octanie uranylu przez 1 godzinę, odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w żywicy „Spurr”. Kontrolę swoistości odczynu histochemicznego wykonywano inkubując materiał bez substratu i bez aktywatorów oraz z zastosowaniem wybiórczych inhibitorów

Zwierzęta przeznaczone do badań aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) zabijano za pomocą przezsercowej perfuzji płynem składającym się z 2% paraformaldehydu i 1% aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylowym, pH 7,3. Czas perfuzji wynosił około 20 minut. Po perfuzji mózgi wyjmowano z jamy czaszki, przeznaczając jedną półkulę do badań w mikroskopie świetlnym, a drugą do mikroskopii elektronicznej.

Bloki tkanki przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym skrawano na mikrotomie zamrożeniowym na wolnopływające skrawki o grubości około 20 μm . Bloczki tkanki o wymiarach około 1 mm^3 przeznaczone do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano w okolicy jądra ogoniastego i spoidła wielkiego. Wolno pływające skrawki i bloczki tkankowe utrwalano następnie w płynie perfuzyjnym, bacząc aby łączny okres perfuzji i utrwalania immersyjnego nie przekraczał 1,5 godziny.

Reakcję histochemiczną służącą ujawnieniu aktywności fosfatazy zasadowej przeprowadzano według metody Mayahara i wsp. (1967) w mo-

dyfikacji Vorbrodta i wsp. (1981 a). Płyn inkubacyjny zawierał: 0,01 M α -glicerofosforan sodu, 0,1 M Tris-malleinian, 0,005 M chlorek magnezu ($MgCl_2$) oraz 0,002 M cytrynian ołowiu. Końcowe pH roztworu inkubacyjnego wynosiło 9,2. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 45 minut. Płyn inkubacyjny w kontroli swoistości odczynu histochemicznego zawierał dodatkowo 0,5 mM hydrochlorek lewamisolu, stanowiący inhibitor FZ (Borgers 1973).

Skrawki do badań w mikroskopie świetlnym montowano w sposób typowy na szkiełkach podstawowych. Błoczki do badań mikroskopowo-elektronowych przeprowadzano rutynowo do zatopienia w żywicy „Spurr”.

Materiał do badań ME skrawano na ultramikrotomie LKB, montowano na siatkach oraz oglądano i wykonywano zdjęcia w mikroskopie elektronowym JEM 100 Cx lub Philips 300*.

WYNIKI

Aktywność cyklazy adenylowej

Badania w mikroskopie świetlnym. U zwierząt kontrolnych reakcja histochemiczna występowała w naczyniach krwionośnych mózgowia i w spłotach naczyńkowych. Wyrysowywała ona ściany naczyń we wszystkich strukturach OUN, zarówno w istocie szarej (ryc. 1) jak i białej. Intensywność odczynu była wyraźnie wyższa w naczyniach większych niż w sieci włósniczkowej (ryc. 1). Nie obserwowano przy tym różnic nasilenia reakcji w licznych naczyniach włosowatych istoty szarej i ubogiej sieci kapilar w istocie białej.

U zwierząt badanych bezpośrednio po zatruciu odczyn histochemiczny był znacznie słabszy (ryc. 2); spadek ten był większy w naczyniach istoty białej niż szarej. Było to wyraźnie widoczne w zwojach podstawy, w których naczynia pęczków pallido-striatalnych pozbawione były całkowicie produktu reakcji histochemicznej lub wykazywały znaczne zróżnicowanie intensywności odczynu w różnych odcinkach (ryc. 3). W korze mózgu, w której obniżenie intensywności odczynu histochemicznego było mniej wyraźne niż w jądrach podstawy, stwierdzano naczynia o zróżnicowanym nasileniu reakcji oraz drobne pólka z całkowicie bezodczynowymi naczyniami włosowatymi. Znaczne osłabienie odczynu w stosunku do kontroli występowało również w splocie naczyńkowym.

U zwierząt badanych w 24 godziny po zatruciu utrzymywało się nadal osłabienie odczynu histochemicznego, jakkolwiek było ono mniej wyraźne niż w grupie poprzedniej (ryc. 4). Niekiedy stwierdzano wyższy odczyn w naczyniach istoty białej niż w formacjach szarych.

* Zdjęcia wykonano w Instytucie Anatomii Uniwersytetu w Helsinkach oraz w Instytucie Ochrony Pracy w Helsinkach.

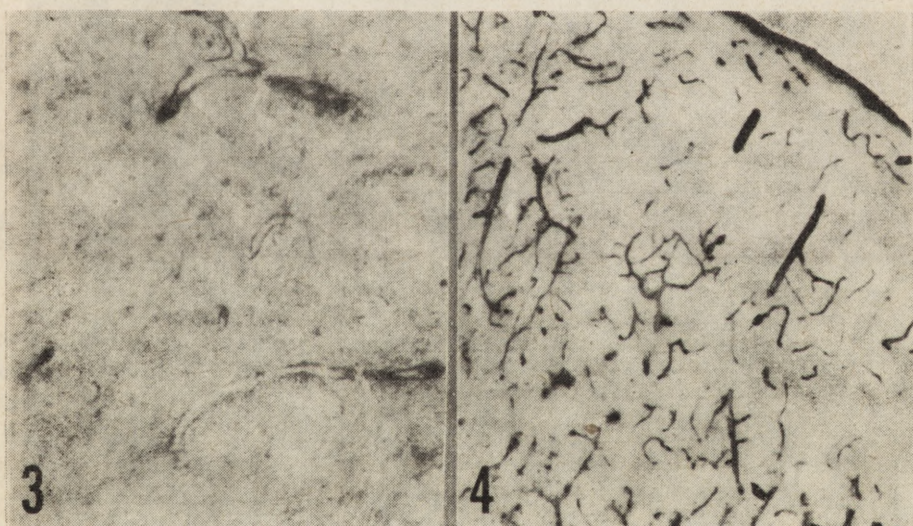


Ryc. 1. Kontrola. Kora mózgu. Cyklaza adenylova. Reakcja dodatnia w kapilarach oraz silniejsza w większych naczyniach mózgowych. Pow. 60 ×

Fig. 1. Control rat. Cerebral cortex. Adenylate cyclase activity. Positive reaction in capillary vessels, more pronounced in vessels of greater caliber. × 60

Ryc. 2. Czas 0 (zwierzę zabite natychmiast po ostatniej dawce maganu). Kora mózgowa. Cyklaza adenylova. Spadek aktywności enzymatycznej w sieci kapilarów. W naczyniach większych reakcja silna. Pow. 60 ×

Fig. 2. Time 0 — rat sacrificed directly after last injection of $MnCl_2$. Cerebral cortex. Adenylate cyclase activity. Decrease of enzyme activity in capillary network. Strong reaction in blood vessels of greater caliber. × 60



Ryc. 3. Czas 0. Jądro ogoniaste. Wyraźny spadek aktywności cyklazy adenylowej w kapilarach. Pow. 200 ×

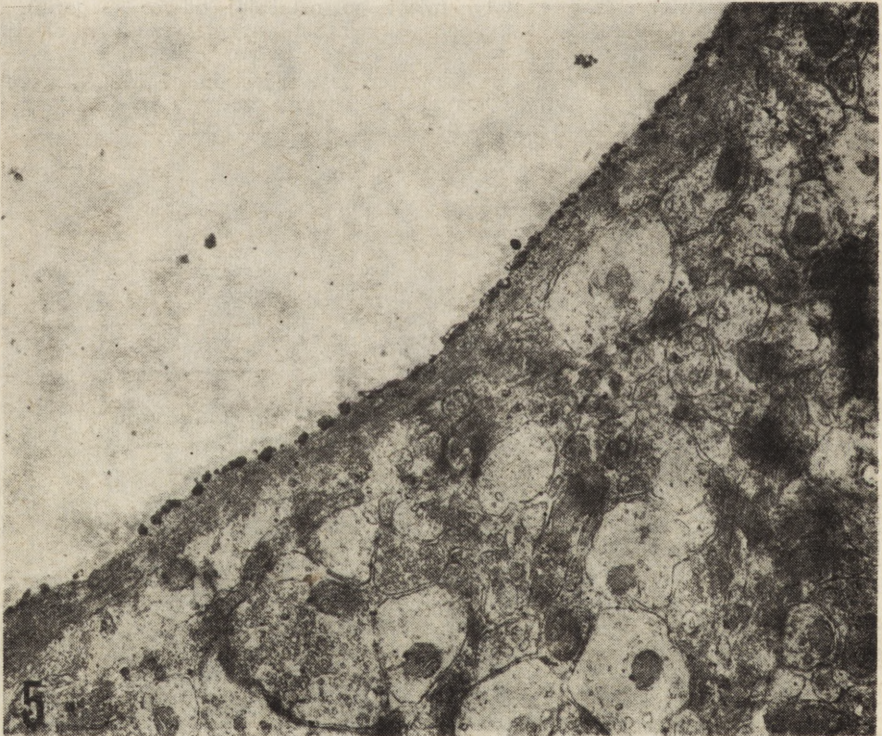
Fig. 3. Time 0. Caudate nucleus. Distinct decrease of adenylate cyclase activity in capillary vessels. × 200

Ryc. 4. 24 godziny po ostatniej dawce maganu. Kora mózgowa. Wzrost aktywności cyklazy adenylowej wobec grupy 0. Pow. 60 ×

Fig. 4. Rat 24 h after last $MnCl_2$ injection. Increase of adenylate cyclase activity in cerebral cortex in comparison with that at time 0. × 60

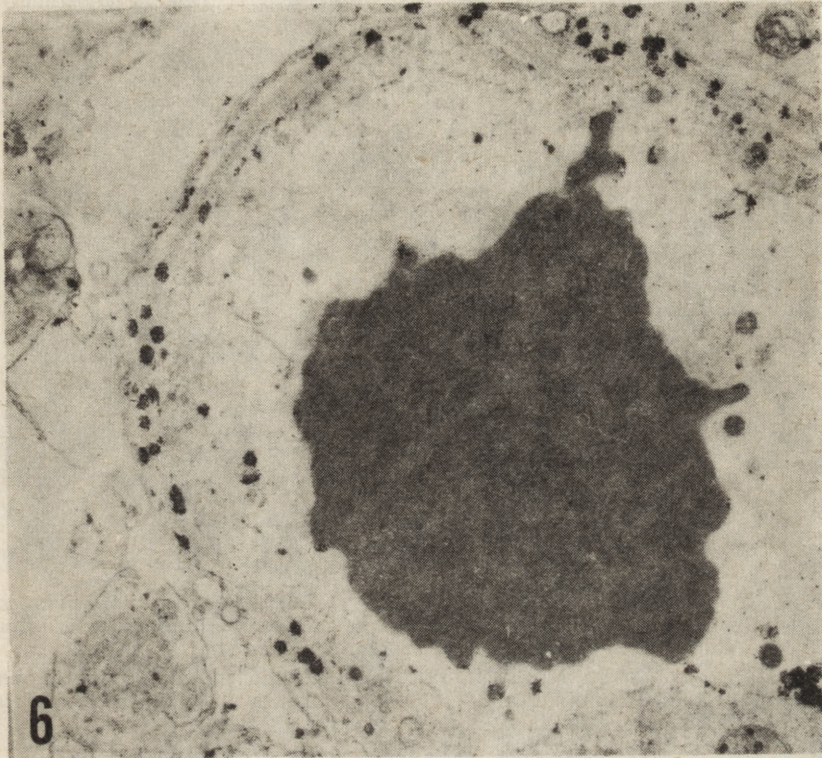
U zwierząt, które przeżyły 7 dni po ostatniej iniekcji $MnCl_2$, obraz reakcji histochemicznej przypominał opisany u zwierząt kontrolnych. Intensywność odczynu wyznaczającego sieć naczyń kory mózgu wydawała się nawet wyższa niż w materiale kontrolnym. Równocześnie zwracały uwagę naczynia pozbawione zupełnie produktów odczynu histochemicznego w istocie białej (spoidło wielkie) oraz znaczne zróżnicowanie intensywności reakcji w naczyniach jąder podstawy od bardzo silnej do śladowej. Część naczyń nie wykazywała jej w ogóle.

Badanie mikroskopowo-elektronowe. U zwierząt kontrolnych stwierdzono dwa wzorce rozmieszczenia produktów reakcji histochemicznej. W typie pierwszym, charakterystycznym przede wszystkim dla kapilarów, produkt reakcji związany był głównie z błoną komórkową śródbłonnków zwróconą do światła naczynia (powierzchnia luminalna) (ryc. 5) lub jej zagłębieniami i z pęcherzykami pinocytarnymi. W typie drugim, właściwym dla drobnych tętniczek, produkt reakcji wykazywał związek z luminalną i abluminalną błoną komórek śródbłonna oraz zwróconą do błony podstawnej powierzchnią wypustek komórek mięśni gładkich.



Ryc. 5. Kontrola. Kora mózgowa. Cyklaza adenylowa. Produkt reakcji enzymatycznej rozmieszczony na luminalnej błonie komórek śródbłonna. Pow. 9000 ×
 Fig. 5. Control rat. Cerebral cortex. Product of enzymatic activity distributed on luminal membrane of endothelial cell. Adenylate cyclase activity. × 9000

U zwierząt zabijanych bezpośrednio i w 24 godziny po zatruciu stwierdzono wyraźnie uboższe niż w kontroli odkładanie się produktu reakcji histochemicznej zarówno w ścianach naczyń włosowatych (ryc. 6), jak i w tętniczkach. Bardzo często spotykano przekroje naczyń cał-

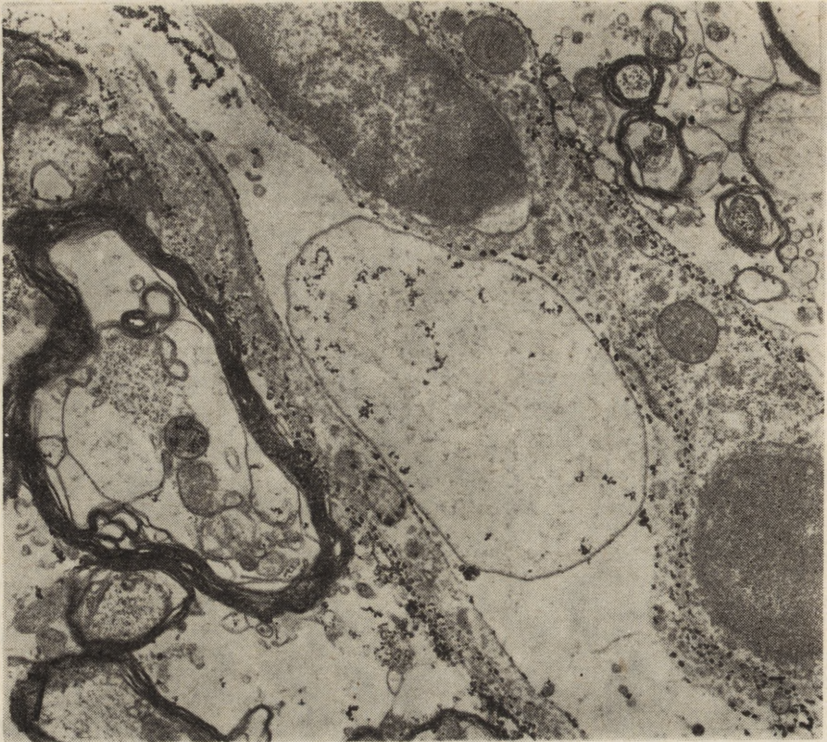


Ryc. 6. Naczynie włosowate z jądra ogoniastego. Czas 0. Produkt reakcji cykazy adenylowej związany z błoną abluminalną kapilary. Reakcja osłabiona wobec kontroli. Pow. 4182 \times

Fig. 6. Rat after manganese intoxication. Time 0. Capillary vessel from caudate nucleus. The reaction product connected with abluminal membrane. Decreased reaction compared with that of control rat. Adenylate cyclase activity. $\times 4182$

kowicie pozbawione złogów produktu końcowego. Dotyczyło to głównie naczyń z obrzmiałymi komórkami śródbłonka, zawierającymi liczne pęcherzyki pinocytarne. Nierzadko stwierdzano naczynia włosowate, w których produkt reakcji ograniczał się wyłącznie do powierzchni komórek śródbłonka zwróconej do błony podstawowej.

U zwierząt zabijanych w 7 dniu po zatruciu odczyn histochemiczny przypominał na ogół obrazy kontrolne. Zwraçało jednak uwagę zróżnicowanie jego intensywności. W wielu naczyniach występowały bardzo znaczne złogi produktu końcowego reakcji (ryc. 7), w innych jedynie śladowe. W większości naczyń włosowatych, podobnie jak w normie, były one związane z luminalną błoną komórek śródbłonka.



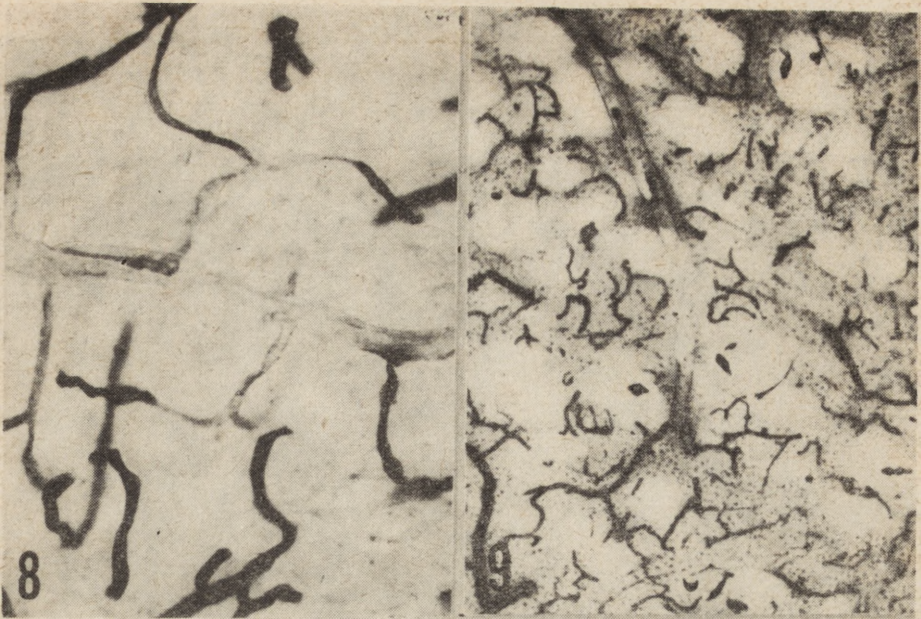
Ryc. 7. 7 dni po zatruciu manganem. Złogi produktu reakcji uwidaczniające cyklazę adenylową występująca zarówno w obrębie części luminalnej i abluminalnej śródbłonna, jak i w obszarze błony podstawnej. Pow. 3440 ×

Fig. 7. Rat 7 days after $MnCl_2$ intoxication. Products of enzymatic reaction within luminal and abluminal endothelial membranes and in the basal lamina. Adenylate cyclase activity. × 3440

Aktywność fosfatazy zasadowej

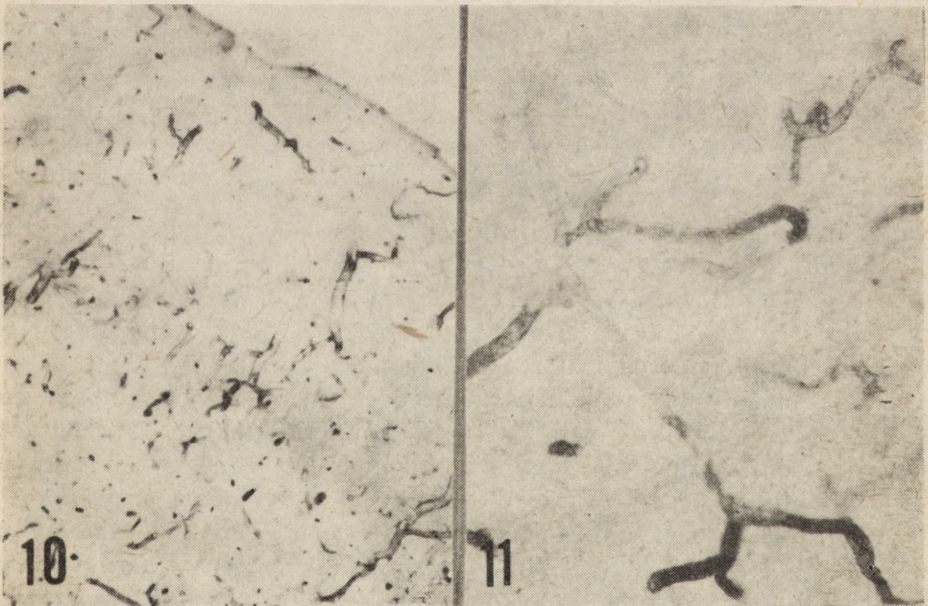
Badania w mikroskopie świetlnym. U zwierząt kontrolnych produkt reakcji histoenzymatycznej wyznaczał sieć naczyń włosowatych we wszystkich strukturach mózgu. Odwrotnie niż w przypadku cyklazy adenylowej, intensywność odczynu histochemicznego była najwyższa w naczyniach włosowatych i malała wraz ze wzrostem średnicy naczynia (ryc. 8). Wydawała się ona również wyższa w naczyniach formacji szarych (kora mózgu i zwoje podstawy) niż w istocie białej (ryc. 9). W większych powiększeniach naczynia włosowate mózgu wydawały się jednolicie „wypełnione” produktem reakcji histochemicznej.

U zwierząt zabijanych bezpośrednio po ostatniej iniekcji $MnCl_2$ stwierdzono bardzo znaczne obniżenie intensywności odczynu zarówno w istocie szarej mózgu, jak i białej (ryc. 10). Sieć naczyń włosowatych kory mózgu wydawała się „wypłukana” z produktu końcowego reakcji (ryc. 11). W jądrach podstawy wyznaczona przez odczyn histochemiczny sieć naczyńniowa była uboższa niż u zwierząt kontrolnych, co wskazy-



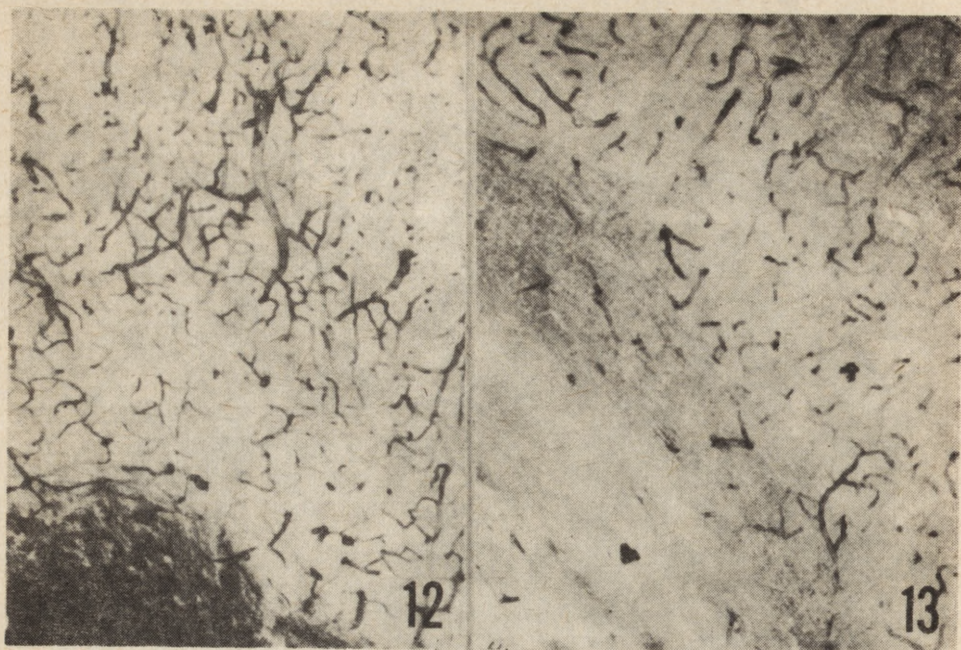
Ryc. 8. Kontrola. Kora mózgowia. Fosfataza zasadowa. Reakcja dodatnia w naczyniach włosowatych, słabnąca w miarę wzrostu średnicy naczyń. Pow. 200 ×
 Fig. 8. Control rat. Cerebral cortex. Alkaline phosphatase activity. Positive reaction in capillary network declining with increase of vessels' caliber. × 200

Ryc. 9. Kontrola. Jądro ogoniaste. Fosfataza zasadowa. Pow. 60 ×
 Fig. 9. Control rat. Alkaline phosphatase activity in caudate nucleus. × 60



Ryc. 10. Natychmiast po podaniu ostatniej dawki manganu (czas 0). Wyraźny spadek aktywności fosfatazy zasadowej w sieci naczyniowej kory mózgowej. Pow. 60 ×
 Fig. 10. Time 0 — directly after last manganese injection. Distinct decrease of alkaline phosphatase activity in cortical vascular network. × 60

Ryc. 11. Czas 0. Włośniczki wydają się „wypłukane” z produktu reakcji wykazującej fosfatazę zasadową. Kora mózgowia. Pow. 200 ×
 Fig. 11. Time 0. Capillary vessels in cerebral cortex seem to be washed away from reaction product. Alkaline phosphatase activity. × 200



Ryc. 12. 24 godziny po ostatniej iniekcji manganu. Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w sieci naczyniowej kory mózgowej. Pow. 60 ×

Fig. 12. Rat 24 h after last manganese injection. Increase of alkaline phosphatase activity in vascular network of cerebral cortex. × 60

Ryc. 13. 7 dni przeżycia po intoksykacji manganem. Zróżnicowana aktywność fosfatazy zasadowej w przebiegu poszczególnych naczyń. Ogólnie reakcja słabsza niż w kontroli. Pow. 60 ×

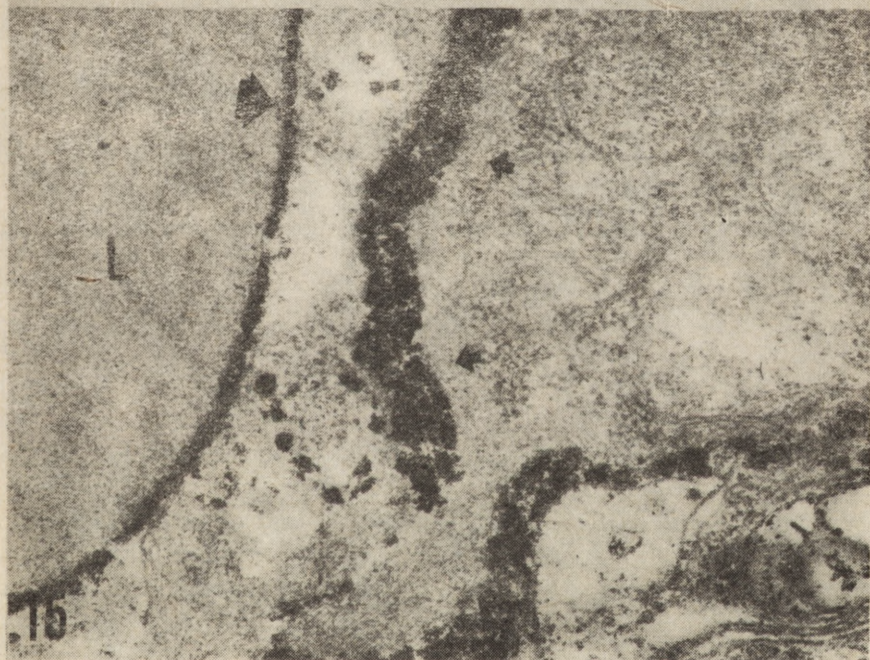
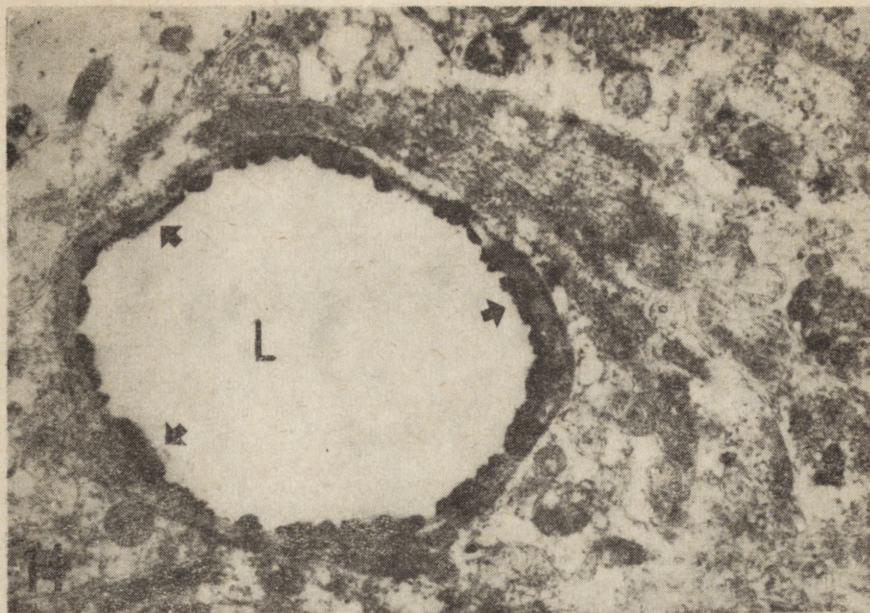
Fig. 13. Rat 7 days after intoxication. Different alkaline phosphatase activity along the course of particular vessels. Generally the reaction is less pronounced than in control. × 60

wało, iż w licznych naczyniach nie występował on w ogóle. Stwierdzało się również odcinkowe zróżnicowanie nasilenia odczynu na przebiegu tego samego naczynia. W istocie białej, a przede wszystkim w spoidle wielkim i w pograniczu korowo-podkorowym, występowały liczne naczynia pozbawione produktu reakcji histochemicznej.

W 24 godziny po zatruciu nasilenie odczynu było wyższe niż w grupie poprzedniej. Dotyczyło to zwłaszcza kory mózgu (ryc. 12). Zwraçało uwagę zróżnicowanie intensywności reakcji. Obok naczyń o odczynie wyższym niż w normie występowały naczynia z reakcją śladową.

Po 7 dniach odczyn histochemiczny był nadal znacznie słabszy niż u zwierząt kontrolnych (ryc. 13). Duże odcinki naczyń włosowatych nie zawierały w ogóle produktu końcowego, w innych stwierdzano jego znaczne nagromadzenie.

Badanie mikroskopowo-elektronowe. W materiale kontrolnym produkt reakcji histochemicznej ograniczony był wyłącznie do komórek śródbłónka włosniczek i tętniczek. Występował on w postaci



Ryc. 14. Kontrola. Jądro ogoniaste. Fosfataza zasadowa. Produkt reakcji na luminalnej błonie komórek śródbłonna. Pow. 3440 ×

Fig. 14. Caudate nucleus of control rat. Alkaline phosphatase activity. The reaction product on luminal membrane of endothelial cell. × 3440

Ryc. 15. 24 godziny po podaniu manganu. Produkt końcowy wykazujący miejsca aktywności fosfatazy zasadowej zgromadzony na luminalnej (duża strzałka) i abluminalnej (małe strzałki) błonie śródbłonna oraz na błonie podstawnej włókniczki. Pow. 17 220 ×

Fig. 15. Rat 24 h after manganese intoxication. The final reaction product accumulated on luminal (big arrow) and abluminal (small arrow) membranes and on the basal membrane of a capillary vessel. × 17 220



Ryc. 16. 7 dni po podaniu manganu. Produkt końcowy reakcji wyznaczający aktywność fosfatazy zasadowej zlokalizowany jest w obszarze błony abluminalnej (duża strzałka) i pogranicza z błoną podstawową śródbłonka (mała strzałka). Pow. 17 220 ×

Fig. 16. Rat 7 days after intoxication. The reaction product localized on the albuminal endothelial membrane (arrow) and at the border-line with the based lamina (small arrow). Alkaline phosphatase activity. × 17 220

drobnych nieregularnych ziarnistości związanych głównie z ich luminalną plazmolemmą (ryc. 14). Niekiedy występował również w pęcherzykach pinocytarnych.

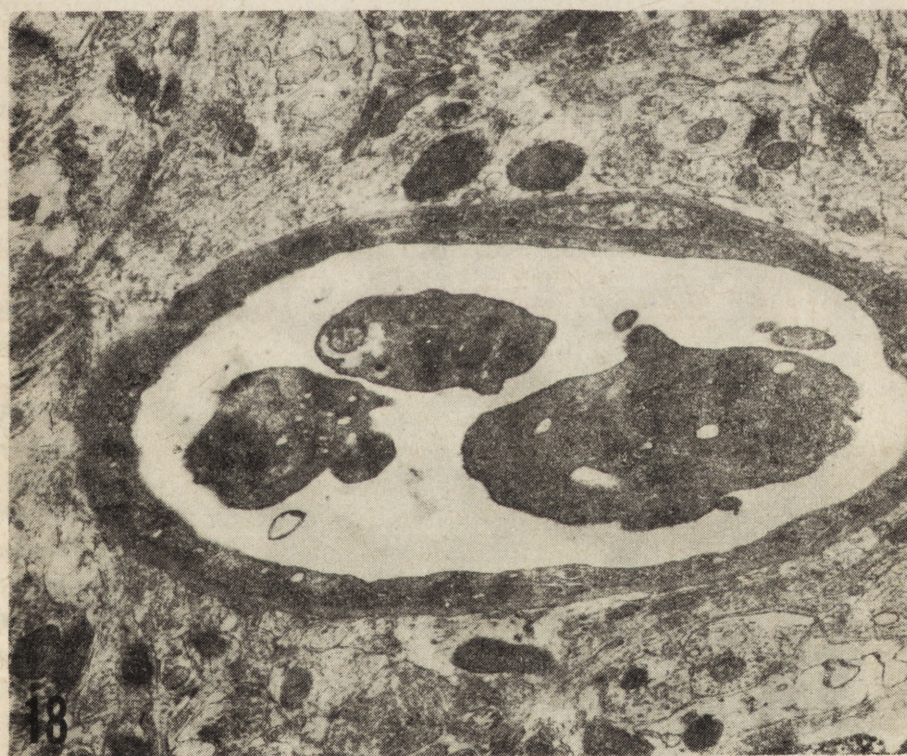
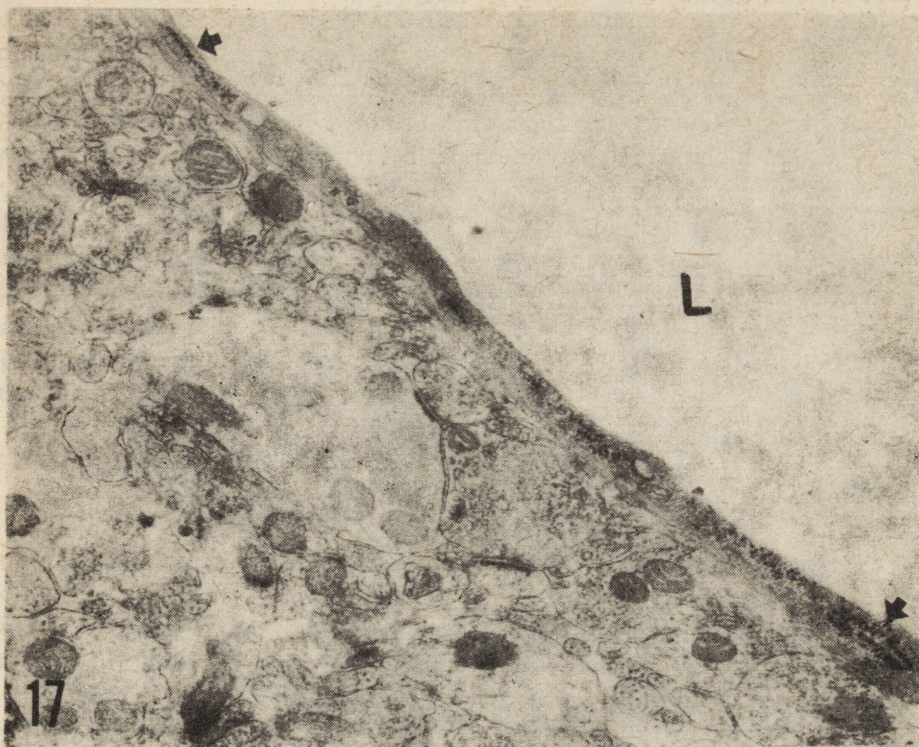
Wzorec zaburzeń obrazu histochemicznego u zwierząt doświadczalnych był wspólny dla wszystkich grup czasowych. Produkt reakcji histoenzymatycznej gromadził się nie tylko na powierzchni luminalnej komórek śródbłonka, lecz również na ich plazmolemie albuminalnej

Ryc. 17. 7 dni po podaniu manganu. Produkt reakcji fosfatazy zasadowej zlokalizowany w strukturach kanalikopodobnych śródbłonka (strzałki). Pow. 22 140 ×

Fig. 17. Rat 7 days after $MnCl_2$ intoxication. The reaction product localized in tubular-like structures of endothelial cell. Alkaline phosphatase activity. × 22 140

Ryc. 18. 7 dni po podaniu manganu. Fosfataza zasadowa. Reakcja negatywna we wszystkich strukturach naczyń. Pow. 3440 ×

Fig. 18. Rat 7 days after manganese injection. Negative reaction of alkaline phosphatase in all vascular structures. × 3440



i w błonie podstawnej (ryc. 15). Często spotykano śródbłonkowe struktury kanalikopodobne wypełnione produktem odczynu histochemicznego. Natomiast tylko część spośród licznych pęcherzyków pinocytarnych wypełniona była ziarnistościami produktu końcowego. Cechą charakterystyczną wszystkich grup czasowych było znaczne zróżnicowanie obrazu histochemicznego. W części naczyń włosowatych, podobnie jak w normie, odczyn ograniczał się do luminalnej plazmolemy komórek śródbłonka i jej głębokich wgłobień, w części związany był z ich powierzchnią abluminalną i błoną podstawną (ryc. 16), a w komórkach śródbłonka występowały struktury kanalikopodobne wypełnione produktem końcowym reakcji (ryc. 17). W niektórych naczyniach stwierdzano jego obfite nagromadzenie, w innych bardzo skąpe, a w innych nie stwierdzało się go w ogóle (ryc. 18).

OMÓWIENIE

Przedstawione obserwacje wskazują, że w zastosowanym modelu doświadczalnej encefalopatii manganowej występują zaburzenia aktywności cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w ścianie naczyń krwionośnych mózgu. Są one najsilniej wyrażone we wczesnym okresie po zatruciu, ale utrzymują się przez cały okres obserwacji. Zaznaczają się przy tym wyraźne różnice między obu badanymi enzymami, o ile bowiem histochemiczny obraz aktywności cyklazy adenylowej wykazuje tendencję do normalizacji w miarę wydłużania się czasu od zatrucia, o tyle morfologiczne wykładniki zaburzonej aktywności fosfatazy zasadowej są zjawiskiem bardziej trwałym, utrzymującym się do końca obserwacji.

Histochemiczne zaburzenia aktywności obu enzymów wyrażały się przede wszystkim wyraźnie zmniejszoną intensywnością odczynu, aż do zaniku włącznie, bardzo znacznym zróżnicowaniem jego nasilenia w poszczególnych naczyniach lub ich odcinkach, od bardzo silnego, przewyższającego w późniejszych okresach obserwacji występujący u zwierząt kontrolnych, do śladowego lub wręcz jego braku, i wreszcie zaburzeniem jego rozmieszczenia w elementach ściany naczyniowej. W warunkach prawidłowych aktywność cyklazy adenylowej w naczyniach mózgu wykazuje zróżnicowanie rozkładu. W naczyniach włosowatych związana jest ona z luminalną plazmolemą komórek śródbłonka i jej wgłobieniami oraz z pęcherzykami pinocytarnymi, w drobnych tętniczkach natomiast z luminalną i abluminalną powierzchnią śródbłonek i zwróconymi do błony podstawnej powierzchniami komórek mięśni gładkich (Wagner i wsp. 1972; Joó 1979; Panula, Rechar 1979; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). Rozkład ten ulegał wyraźnemu zaburzeniu po zatruciu manganem. Zmiany w cytologicznym rozkładzie aktywności fosfatazy zasadowej były jeszcze wyraźniejsze. U zwierząt kontrolnych

końcowy produkt reakcji histochemicznej odkłada się linijnie na luminalnej powierzchni komórek śródbłonka, rzadko wykazując związek z ich plazmolemmą abluminalną i nielicznymi pęcherzykami pinocytarnymi (Vorbrodt i wsp. 1981 a; Kreutzberg, Toth 1983; Vorbrodt i wsp. 1983). Sugeruje się, iż właśnie w obszarze luminalnej plazmolemmy komórek śródbłonka odbywa się proces defosforylacji różnych substancji metabolicznych transportowanych z krwi do mózgu (Vorbrodt i wsp. 1981 a, b). Polarność ta ma warunkować w przypadku szeregu enzymów śródbłonek naczyń, w tym również fosfatazy zasadowej, enzymatyczną kontrolę procesów czynnego transportu (Betz i wsp. 1980). Ulegała ona wyraźnemu zaburzeniu w zatruciu chlorkiem manganawym. Produkt reakcji enzymatycznej w licznych naczyniach był w ogóle nieobecny na zwróconej do światła powierzchni komórek śródbłonka, a gromadził się obficie w ich plazmolemmie abluminalnej, w błonie podstawnej oraz w licznych pęcherzykach pinocytarnych i w kanalikopodobnych strukturach śródbłonkowych. To ostatnie zjawisko Lossinsky i wsp. (1981) wiąże szczególnie ze wzmożoną przepuszczalnością naczyń.

Całokształt stwierdzonych przez nas zaburzeń histochemicznych jest identyczny ze zmianami opisywanymi w przebiegu uszkodzenia mechanizmów bariery krew-mózg (Joó 1979; Joó i wsp. 1983; Vorbrodt i wsp. 1981 a, b; 1983; Spatz, Mrsulja 1982). Są one również podobne do nieprawidłowości histoenzymatycznych, dotyczących szeregu fosfataz nukleozydowych w innych doświadczalnych stanach patologicznych przebiegających z uszkodzeniem bariery krew-mózg (Torack, Barnett 1964; Szumańska i wsp. 1976; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska 1981).

Opierając się na przedstawionych powyżej spostrzeżeniach i danych z piśmiennictwa można sądzić, że w zatruciu solami manganu dochodzi do upośledzenia mechanizmów bariery krew-mózg, z jego wszystkimi skutkami prowadzącymi do rozwoju ciężkich uszkodzeń tkanki. Są one zbieżne w czasie z obecnością morfologicznych wykładników naczyniopochodnego obrzęku mózgu. Patomechanizm naczyniopochodnego obrzęku mózgu nadal nie jest jednoznacznie wyjaśniony. W przeciwieństwie do wcześniejszych poglądów wiążących jego rozwój wyłącznie z uszkodzeniem ścisłych zespołów międzyśródbłonkowych (Rapaport 1970; Brightman i wsp. 1973), obecnie przyjmuje się alternatywny patomechanizm, uwarunkowany przechodzeniem białek surowicy krwi do tkanek mózgu drogą wzmożonego transportu pęcherzykowego w śródbłonekach naczyń (Joó 1971; Beggs, Waggener 1976; Westergaard i wsp. 1978). W regulacji tego zjawiska istotną rolę odgrywa cyklaza adenylova, zlokalizowana w śródbłonekach naczyń włosowatych (Joó 1972). Spostrzeżenia Wierzby (1984) w tym samym modelu doświadczalnej encefalopatii manganowej z użyciem peroksydazy chrzanowej, wskazujące na penetrację znacznika barierowego z krwi do tkanek mózgu przy nie-

zmienionym stanie zespołów ścisłych, sugerują w naszym materiale doświadczalnym ten właśnie mechanizm patogenetyczny naczyniopochodnego obrzęku mózgu. Potwierdzają to również przedstawione powyżej wyniki badań histochemicznych dotyczących aktywności cykazy adenylowej.

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛОВОЙ ЦИКЛАЗЫ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СОСУДАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ ХЛОРИСТЫМ МАРГАНЦОМ

Резюме

Авторы оценили на уровне светового и электронного микроскопа активность адениловой циклазы и щелочной фосфатазы в сосудах головного мозга крысы в отравлении хлористым марганцем. Марганцовую энцефалопатию они вызывали 7-кратным внутривентральным введением хлористого марганца в периоде I месяца в общей дозе 240 мг M^{++} /кг массы тела. Животных умерщвляли при помощи чрезсердечной перфузии фиксирующим средством непосредственно после отравления, спустя 24 часа и по истечении 7 дней.

В микроскопной и в электронно-микроскопной картине констатировано изменения гистохимической картины выражающиеся снижением активности обоих ферментов а также неправильной локализацией конечной реакции. Своим характером они напоминали нарушения описываемые в случаях повреждения гемато-энцефалического барьера. Они внушают ослабление активного транспорта в сосудах и повышение проницаемости сосудов для высокомолекулярных веществ. Они указывали также на то, что нарушения гемато-энцефалического барьера могут участвовать при развитии марганцовой энцефалопатии.

ADENYLATE CYCLASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE CEREBRAL BLOOD VESSELS OF THE RAT IN MANGANESE CHLORIDE INTOXICATION

Summary

Changes in the histochemical activity of adenylate cyclase and alkaline phosphatase in the cerebral microvessels of the rat were studied in manganese intoxication at the level of light- and electron microscopy. Manganese encephalopathy was induced by 7 intraperitoneal injections of manganese chloride in the course of one month in a total dose of 240 mg Mn^{++} /kg body weight. The animals were sacrificed by transcardiac perfusion of the appropriate fixatives immediately after last intoxication, 24 h and 7 days after it.

Light- and electronmicroscopic studies revealed alterations in the histochemical picture as compared with that of untreated animals, expressed by reduction of the activity of both enzymes and abnormalities in distribution of the reaction end product. They were similar in nature to those described as a result of changes in the blood-brain barrier. They suggest the existence of both disturbances of active transport mechanism and increased permeability for high molecular weight substances. The observed changes indicate that damage to the blood-brain barrier may play an important role in the pathogenesis of manganese encephalopathy.

PIŚMIENNICTWO

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 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.
3. Bedonheimer T. S., Brightman M. W.: A blood brain barrier to peroxidases in blood vessels surrounded by perivascular spaces. *Am. J. Pathol.*, 1968, 122, 249—268.
4. Borgers M.: The cytochemical application of new, potent inhibitors of alkaline phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 812—824.
5. Brightman M. W., Hori M., Rapaport S. J., Reese T. S., Westergaard E.: Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J. comp. Neurol.*, 1973, 152, 317—326.
6. Dydyk L., Mossakowski M. J.: Ultrastructural alterations of the grey matter structures of the brain due to experimental manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 265—280.
7. Joó F.: Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Brit. J. Exper. Pathol.*, 1971, 52, 646—649.
8. Joó F.: Effect of N⁶O⁶-dibutyryl cyclic 3; 5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. *Experientia*, 1972, 28, 1470.
9. Joó F.: Significance of adenylate cyclase in the regulation of the permeability of brain capillaries. [W:] *Pathophysiology of cerebral energy metabolism*. Red.: B. B. Mrsulja, L. M. Rakić, I. Klatzo, M. Spatz. Plenum Press, New York 1979, 211—237.
10. Joó F., Temesvari P., Dux E.: Regulation of the macromolecular transport of the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res.*, 1983, 278, 165—174.
11. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—13.
12. Kreutzberg G. W., Toth L.: Enzyme cytochemistry of cerebral microvessel wall. [W:] *Cerebrovascular transport mechanisms*. Red.: K.-A. Hossmann, I. Klatzo. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. 8, 1983, 35—41.
13. Lossinsky A. S., Vorbrodtt A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultracytochemical evidence for endothelial channel — lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 53, 197—202.
14. 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.
15. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983 a, 21, 393—410.
16. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1983 b, 21, 455—468.
17. 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. Polish Medical Publishers. Warsaw 1978, 60—66.

18. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neuroscience*, 1979, 4, 779—788.
19. Rapaport S. I.: Effect of concentrated solutions on blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol. Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 270—274.
20. Reese T. S., Karnowski M. J.: Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 207—212.
21. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability. *Lab. Invest.*, 1961, 10, 492—501.
22. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
23. Spatz M., Mrsulja B. B.: Progress in cerebral microvascular studies related to the function of the blood-brain barrier. *Advances in Cell Neurobiol.*, 1982, 3, 311—337.
24. Szumańska G., Ostenda M., Mossakowski M. J.: Aktywność nukleozyddwui trójfosfataz w mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 197—207.
25. Szumańska G.: Badania ultrastrukturalne fosfataz nukleozydowych w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 551—573.
26. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1984, 62, 219—224.
27. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleotide phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. exper. Neurol.*, 1964, 23, 46—59.
28. Vorbrodth A. W., Lassmann H., Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S.: Ultracytochemical studies of the blood-meningeal barrier (BMB) in rat spinal cord. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981 a, 55, 113—123.
29. Vorbrodth A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981 b, 53, 203—211.
30. Vorbrodth A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. 8, 1983, 43—57.
31. Vorbrodth 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.
32. Wagner R. C., Kreiner P., Barrette R. J., Bitensky M. W.: Biochemical characterization and cytochemical localization of catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated brain capillary endothelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3175—3179.
33. Westergaard E., Go G. K., Klatzo I., Spatz M.: Enhanced vesicular transport of horseradish peroxidase across cerebral vessels induced by ischemia in Mongolian gerbils. [W:] *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. Polish Medical Publishers, Warsaw 1978, 53—59.
34. Wierzba T.: Badanie ultrastrukturalne bariery krew-mózg dla peroksydazy chrzanowej u szczurów po zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1984 (w druku).

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