

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, LUBOMIRA DYDYK, MIECZYSLAW SMIALEK

## WCZESNE USZKODZENIA OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU ZWIĄZKAMI MANGANU

Zespół Neuropatologii i Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum  
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Strukturalne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu mają zróżnicowany charakter i z reguły występują po długotrwałym kilkumiesięcznym podawaniu środków toksycznych (Pentschew i wsp. 1963; Mustaffa, Chandra 1971; Chandra 1972; Chandra, Shukla 1980). W znacznej większości przypadków dotyczą one formacji szarych i występują bądź w postaci zmian uogólnionych, przeważających w korze mózgu i mózdzku, bądź też selektywnie ograniczonych do struktur podkorowych, takich jak gałka biała, prążkowie, wzgórze, jądro niskowzgórzowe Luysa i substancja czarna (Makarczenko 1956; Pentschew i wsp. 1963; Neff i wsp. 1969; Jonderko 1970; Chandra, Srivastava 1970; Mustafa, Chandra 1971; Chandra 1972). W naszych poprzednich badaniach opisano zmiany patologiczne dotyczące przede wszystkim, jeśli nie wyłącznie, istoty białej mózgowia, z niewielkim tylko zajęciem formacji szarych (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1982). Miały one charakter uogólnionego zgąbczenia istoty białej z nieznacznym uszkodzeniem osłonek mielinowych i umiarkowanym włóknistym odczynem glejowym. Nieprawidłowości w strukturach szarych wyrażały się wybiórczym zwyrodnieniem i ubytkiem neuronów istoty czarnej oraz rozsianym zwyrodnieniem komórek nerwowych kory mózgu i mózdzku. Badania mikroskopowo-elektronowe ujawniły, że u podłoża zmian patologicznych stwierdzonych w mikroskopie świetlnym leżało masywne uszkodzenie mitochondriów włókien nerwowych we wszystkich ich odcinkach, włącznie z zakończeniami nerwowymi, prowadzące w skrajnych przypadkach do rozděcia aksonów. Dominującym nieprawidłowością aksonalnym towarzyszyło obrzmienie astrocytów z cechami proliferacji cytoplazmatycznych elementów włókienkowych. Zmiany te występowały u zwierząt,

które w celu ewentualnej eliminacji metalu nagromadzonego w ośrodkowym układzie nerwowym pozostawiano na jednomiesięczne przeżycie, po zakończeniu zatruwania trwającego przez 4 tygodnie (Hietanen i wsp. 1981). W celu prześledzenia ewolucji i dynamiki zmian przeprowadzono ich ocenę bezpośrednio po zatruciu.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w identyczny sposób jak w poprzednich grupach doświadczalnych (Śmiałek, Mossakowski 1981). Szczury szczepu Wistar, samce w wieku 6 tyg. (ok. 150 g masy ciała) otrzymywały w okresie 4 tygodni 7 iniekcji dożylnych chlorku manganowego ( $MnCl_2$ ) w fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Pełna podana dawka środka toksycznego, w przeliczeniu na  $Mn^{++}$ , wynosiła 240 mg/kg masy ciała. Dwie pierwsze iniekcje w dawce po 20 mg  $Mn^{++}$ /kg masy ciała podano w odstępach jednodobowych, trzy dalsze po 40 mg  $Mn^{++}$ /kg masy ciała w dwudniowych odstępach w okresie jednego tygodnia, a dwie następne (40 mg  $Mn^{++}$ /kg ciężaru ciała) w odstępach jednotygodniowych. Zachowanie zwierząt w czasie zatruwania oraz ich śmiertelność nie różniły się od opisanych poprzednio (Śmiałek, Mossakowski 1981). Z ogólnej liczby 18 zwierząt w okresie prowadzenia doświadczenia 8 padło. Padały zazwyczaj albo w czasie podawania środka toksycznego, albo bezpośrednio po iniekcji. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta nie wykazywały objawów neurologicznych. Stawały się jednak mniej ruchliwe, traciły łaknienie, a ich sierść była matowa. Zwierzęta podzielono na dwie grupy — pierwszą uśmiercano nazajutrz po ostatnim podaniu chlorku manganowego, a drugą po upływie 7 dni. W każdej grupie 3 szczury użyto do badań w mikroskopie świetlnym i po 2 — w mikroskopie elektronowym.

Zwierzęta przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym uśmiercano przez otwarcie klatki piersiowej i wykonanie przezsercowej perfuzji zubożonym do pH 7,2 10% roztworem formaliny. Perfuzję przeprowadzono pod ciśnieniem 80—100 mm Hg. Do badania pobierano mózgowie, które po wyjęciu z jamy czaszki krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki, przechodzące na wysokość przednich i w pełni rozwiniętych zwojów podstawy, śródmózgowia, mostu z mózdzkiem i dolnego odcinka opuszki na pograniczu z rdzeniem kręgowym. Bloki tkankowe przeprowadzano do parafiny, a skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną-eozyną oraz według metod Klüvera-Barrery i Kanzler-Arendta.

U zwierząt przeznaczonych do badań mikroskopowo-elektronowych uśmiercanych w sposób identyczny perfuzję wykonywano przy użyciu 2% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,3. Po wyjęciu mózgowia z jamy czaszki pobierano bloczki tkankowe z istoty białej półkul mózgu, z jąder kresomózgowia, wzgórze, istoty czarnej,

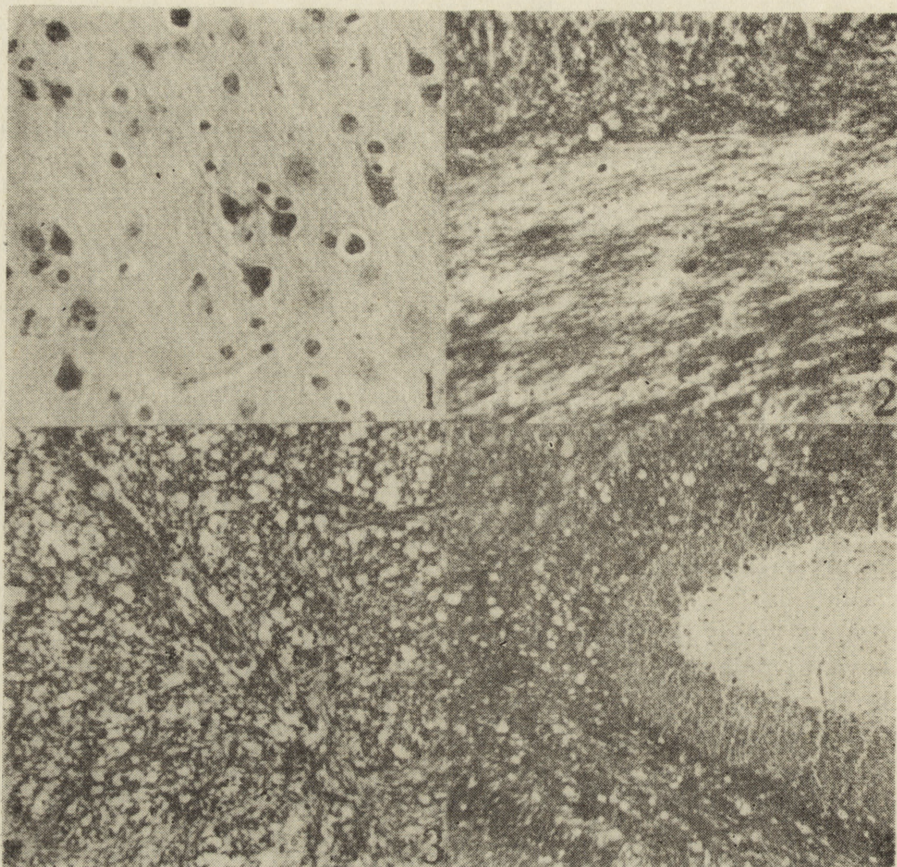
opuszki i istoty białej mózdzku. Błoczki płukano w 0,1 M buforze kakodylanowym przez 1 godz. Utrwalano je następnie dodatkowo przez okres 1 godz. w 2% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym, odwadniano w sposób rutynowy i zatapiano w Eponie 812. Półcienkie skrawki barwiono 1% błękitem toluidyny w 1% wodnym roztworze boraksu, a skrawki ultracienkie kontrastowano w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu. Materiał oglądano w mikroskopie elektronowym firmy Jeol, JEM 7A.

#### WYNIKI

W obrazie makroskopowym mózgowia w obu grupach doświadczalnych nie stwierdzono nieprawidłowości strukturalnych.

Badanie mikroskopowe mózgow zwierząt grupy I ujawniło zmiany patologiczne zarówno w formacjach szarych, jak i białych, przy przewadze tych ostatnich. W korze czołowej i zakręcie hipokampa występowały nieliczne neurony obkurczone lub z cechami kwasochłonnego zwyrodnienia (ryc. 1). Były one obfitsze w korze mózdzku, gdzie wybiórczo dotyczyły komórek Purkinjego, oraz w strukturach formacji siatkowatej pnia mózgu, zwłaszcza opuszki. Obok neuronów obkurczonych, ciemnych stwierdzano niekiedy komórki nerwowe z cechami mikrowakuolizacji cytoplazmy. Zwyrodnienia komórek nerwowych nie stwierdzano w jądrach podstawy i we wzgórzu. Populacja komórkowa istoty czarnej była niezmieniona. Zmiany w istocie białej wyrażały się znacznym rozluźnieniem jej utkrania, szczególnie wyraźnym w półkulach mózgu (ryc. 2), w powrózkach tylnych i bocznych górnego odcinka rdzenia kręgowego (ryc. 3) oraz obecnością licznych drobnych jamek, których zagęszczenia prowadziły do zgąbczenia tkanki. Ostro ograniczone, okrągłe lub owalne jamki występujące w istocie białej były w większości przypadków puste, rzadko tylko zawierały drobne, kwasochłonne, okrągłe struktury, mogące odpowiadać bądź jądom, bądź też obrzmiałym aksonom. Jamki te były stosunkowo nieliczne w istocie białej półkul mózgu, w tym również w pęczkach striopalidarnych. Znacznie obficie występowały w istocie białej mózdzku (ryc. 4), zarówno rdzennej, jak i blaszkowej oraz w zbitych strukturach pnia mózgu i rdzenia. W istocie białej mózdzku dochodziło do zlewania się ze sobą pojedynczych struktur jamkowych. W żadnym przypadku nie stwierdzono wykładników włóknistej reakcji gleju, jakkolwiek w istocie białej półkul populacja jąder glejowych widocznych w barwieniach przeglądowych była zwiększona.

W mózgow zwierząt grupy II zmiany komórkowe wykazywały również nieznaczone nasilenie, jakkolwiek były one bardziej uogólnione niż u zwierząt zabijanych w 24 godziny po zatruciu. Pojedyncze obkurczone neurony oraz komórki z cechami mikrowakuolizacji cytoplazmy wy-



*Ryc. 1.* I Grupa doświadczalna. Obkurczone, kwasochłonne neurony rozsiane w korze czołowej. H—E. Pow. 400 ×

*Fig. 1.* Experimental group I. Shrunken eosinophilic neurons dispersed in the frontal cortex. H—E. × 400

*Ryc. 2.* I Grupa doświadczalna. Zblednięcie osłonek mielinowych oraz rozluźnienie utkania podkorowej istoty białej. Pojedyncze jamki na granicy kory mózgu. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

*Fig. 2.* Experimental group I. Palor and loosening of the subcortical white matter. Some vacuoles seen in the cortico-subcortical junction. Klüver-Barrera. × 200

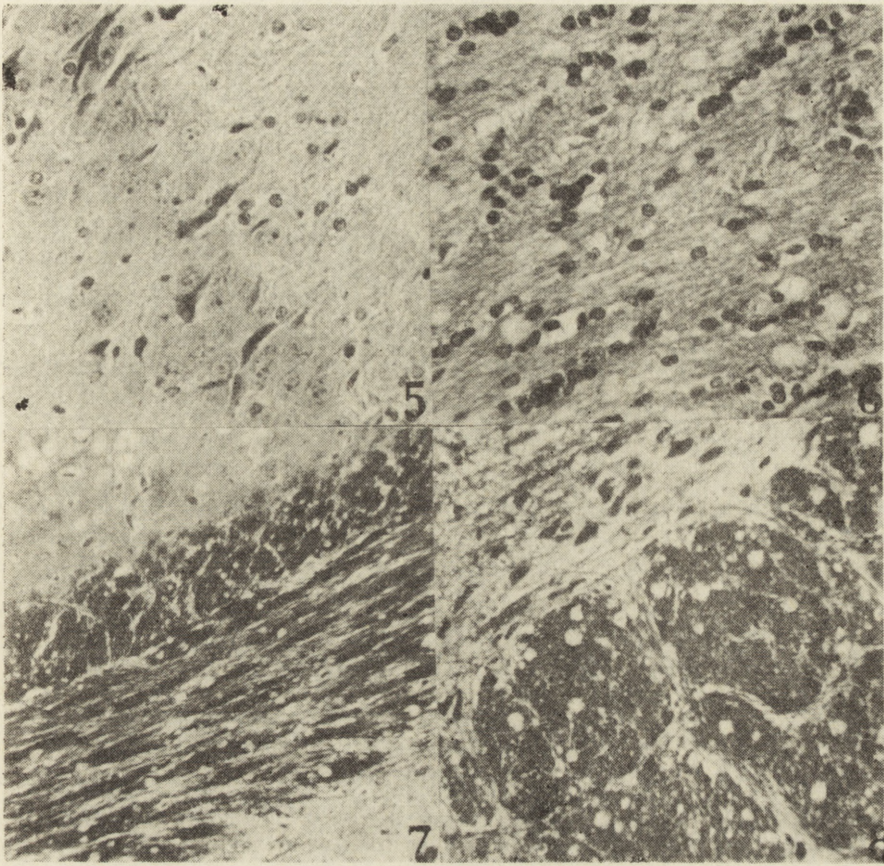
*Ryc. 3.* I Grupa doświadczalna. Znaczne rozluźnienie utkania powrózka tylnego w rdzeniu szyjnym. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

*Fig. 3.* Experimental group I. Severe disintegration of the posterior funiculi of the cervical spinal cord. Klüver-Barrera. × 200

*Ryc. 4.* I Grupa doświadczalna. Liczne jamki w istocie białej mózdzku. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

*Fig. 4.* Experimental group I. Abundant vacuolization of the cerebellar white matter. Klüver-Barrera. × 200

stępowały w korze nowej i w korze zakrętu hipokampa (ryc. 5) oraz w jądrach podstawy, wzgórzu i w strukturach komórkowych pnia mózgu. Były one liczniejsze wśród komórek Purkinjego. Nasilenie zmian



Ryc. 5. II Grupa doświadczalna. Kwasochłonne neurony rozsiane w warstwie piramidowej rogu Amona. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 5. Experimental group II. Eosinophilic neurons dispersed in the pyramidal cell layer of Ammon's horn. H—E. × 400

Ryc. 6. II Grupa doświadczalna. Nieznaczne rozluźnienie tkanki istoty białej z widocznymi drobnymi jamkami i niewielkie pomnożenie jąder gleju. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 6. Experimental group II. Slight loosening of the subcortical white matter with microcavitation and moderate glial proliferation. H—E. × 400

Ryc. 7. II Grupa doświadczalna. Rozsiane jamki w prawidłowej poza tym podkorowej istocie białej. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 7. Experimental group II. Delicate microcavitation of otherwise normal subcortical white matter. Klüver-Barrera. × 200

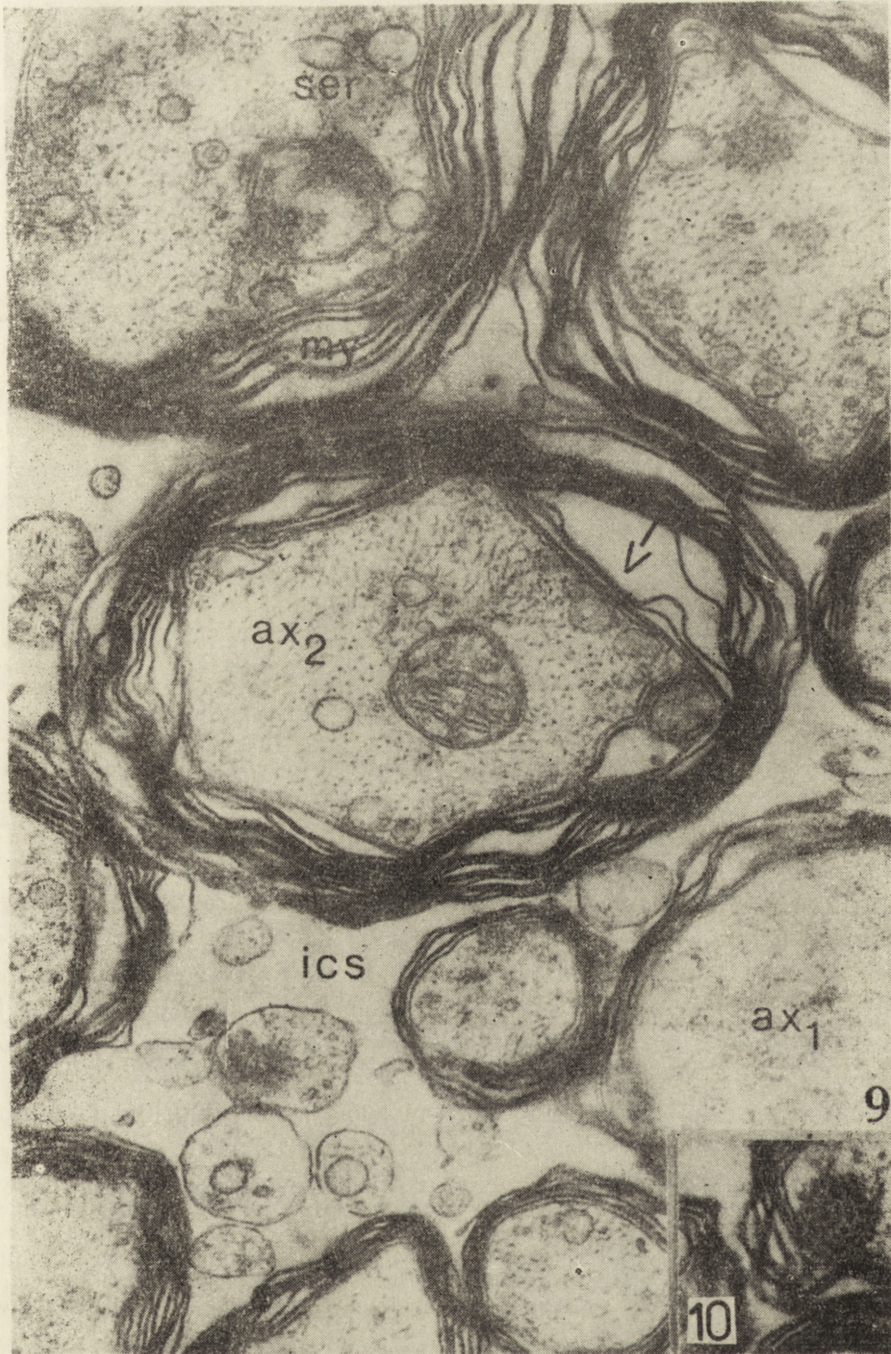
Ryc. 8. II Grupa doświadczalna. Rozsiane jamki w szlakach piramidowych mostu. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 8. Experimental group II. Microvacuoles dispersed in the pyramidal fibers in the pons. Klüver-Barrera. × 200

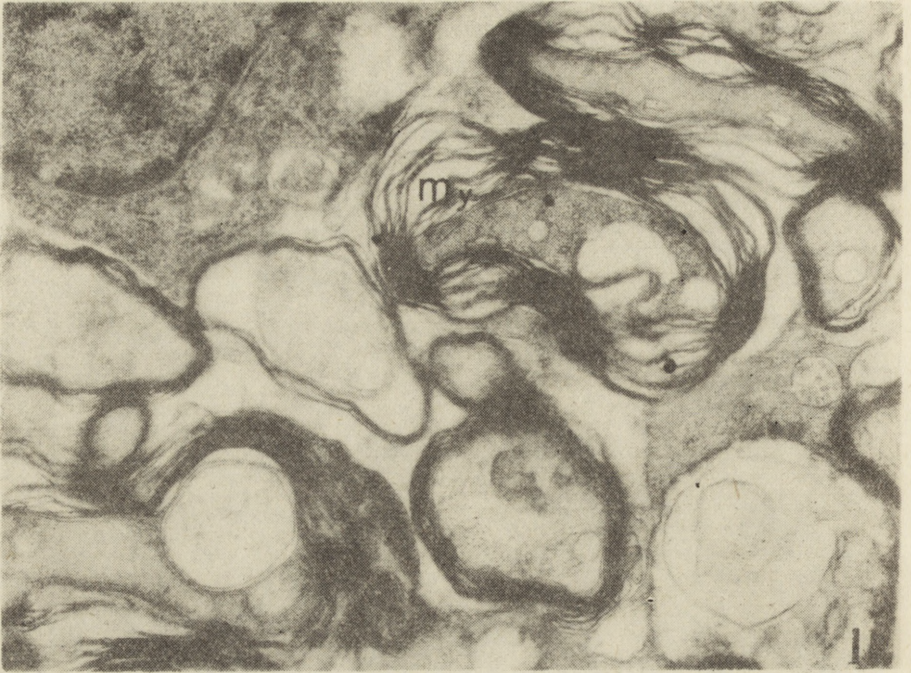
w istocie czarnej nie różniło się od pozostałych formacji szarych. W dolnych warstwach kory mózgu, we wzgórzu, formacji siatkowatej pnia mózgu i w rogach przednich rdzenia kręgowego występowały nieliczne jamki, nie różniące się od opisanych w poprzedniej grupie w istocie

białej. Rozluźnienie utkania istoty białej było wyraźnie mniejsze niż w grupie zwierząt zabijanych w 24 godziny po zatruciu (ryc. 6); utrzymywało się ono przede wszystkim w pęczkach rdzenia szyjnego. Natomiast ilość drobnojamkowych struktur była większa. Występowały one wyraźniej niż poprzednio w podkorowej istocie białej półkul mózgu (ryc. 7) w pęczkach striopalidarnych, w formacjach pnia (ryc. 8) i w półkulach mózdzku. Stwierdzano niewielkie namnożenie jąder glejowych w istocie białej, bez wyraźnego włóknistego odczynu glejowego.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym istoty białej mózgu zwierząt grupy pierwszej zmiany patologiczne wyróżniały się znacznym poszerzeniem przestrzeni międzykomórkowych, nieprawidłowościami ultrastruktury aksonów, przy mniej zaawansowanym zajęciu osłonek mielinowych oraz znacznie nasilonymi uszkodzeniami astrocytów. Ultrastrukturalne zmiany w aksonach polegały z jednej strony na rozrzedzeniu i przejaśnieniu aksoplazmy z namnożeniem poszerzonych zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej i neurofilamentów oraz nagromadzeniem nieobłonionych struktur o znacznej gęstości elektronowej, z drugiej zaś na jej wyraźnej kondensacji (ryc. 9, 10, 11). Przeważająca większość aksonalnych mitochondriów wykazywała różnego stopnia obrzmienie. Ich macierz była przejaśniona, grzebienie skrócone i przemieszczone na obwód. Dochodziło nierzadko do fragmentacji grzebieni mitochondrialnych i do pojawiania się w nich struktur tubularnych oraz pęcherzykowych (ryc. 12). Nierzadko stwierdzano skondensowaną konfigurację mitochondriów. Stopień obrzmienia mitochondriów był zróżnicowany, w skrajnych sytuacjach balonowate struktury otoczone podwójną błoną wypełniały całkowicie przekrój poszerzonego aksonu (ryc. 13). Osłonki mielinowe utrzymywały w większości swoją prawidłową strukturę. Dochodziło jednak do odcinkowego rozwarstwienia blaszek mielin i do wyraźnego poszerzenia przestrzeni okołoaksonalnych zawartych między aksolemmą i okołoaksonalną blaszką mielinową (ryc. 9). Opisane powyżej nieprawidłowości aksonalne występowały również w ich zakończeniach. Obserwowano tu ponadto obrzmienie synatoplazmy oraz nieprawidłowości w układzie pęcherzyków synaptycznych przemieszczonych w stosunku do zagęszczeń presynaptycznych, bądź też zbitych w nieregularne agregaty (ryc. 14). Większość astrocytów wykazywała znacznego stopnia przejaśnienie cytoplazmy perykariowej i wypustkowej oraz zmniejszenie ilości cytoplazmatycznych struktur subkomórkowych (ryc. 15, 16). Obecne były natomiast liczne poszerzone zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Mitochondria astrocytów wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalne identyczne jak opisane w wypustkach osiowych. Mikroskopowo-elektronowy obraz oligodendrocytów był stosunkowo mało zmieniony. Występowały tu jedynie obrzmiałe mitochondria. Zwracał jednak uwagę fakt, że w tej samej komórce obok mitochondriów w różnym stopniu obrzmiałych obecne były mitochondria o prawidłowej struk-



Ryc. 9. I Grupa doświadczalna. Fragment utkania prążkowiego. Widoczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowej (ics). Poszerzone są również przestrzenie okołooaksonalne (strzałka). We fragmencie włókien nerwowych widoczne są aksony z jasną aksoplazmą (ax<sub>1</sub>) oraz zawierające znaczną ilość struktur filamentarnych (ax<sub>2</sub>); we wszystkich obecne są poszerzone zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej



*Ryc. 11.* I Grupa doświadczalna. Fragment istoty białej mózdzku. Liczne aksony z zagęszczoną aksoplazmą, zawierającą znaczną ilość filamentów oraz obrzmiałe mitochondria. Odcinkowe rozwarstwienie osłonki mielinowej — my. Pow. 13.350 ×  
*Fig. 11.* Experimental group I. Tissue fragment from cerebellar white matter: Numerous axons with condensed axoplasm, with rich filamentous structures and swollen mitochondria. Local splitting of myelin lamellae — my. × 13 350

turze. Podobne nieprawidłowości stwierdzono w nielicznych uchwytynych w badanym materiale komórkach nerwowych. Ściany naczyń włosowatych otoczone przez obrzmiałe, przejaśnione wypustki astrocytów były na ogół niezmienione. W niektórych z nich można było dopatrywać się zwiększonej ilości pęcherzyków mikropinocytarnych w komórkach śródbłonka.

Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgow zwierząt grupy II nie od-

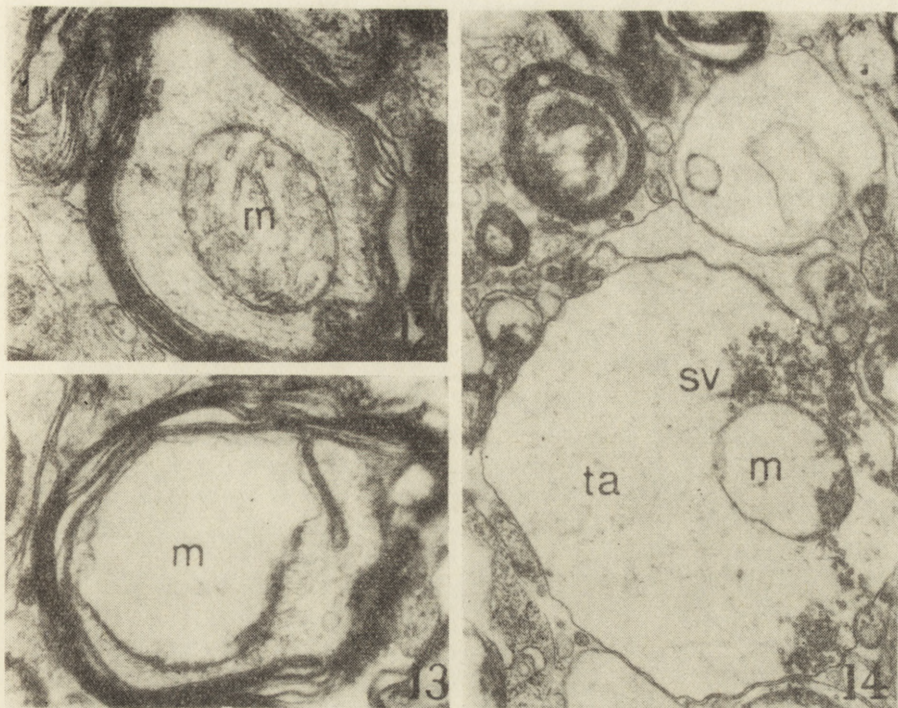
(ser). W prawym górnym aksonie występują ponadto skupienia nieobłonionych elektronowo-gęstych ziarnistości. Odcinkowe rozwarstwienie blaszek osłonki mielinowej — my. Pow. 26.700 ×

*Fig. 9.* Experimental group I. Tissue fragment from the putamen. Enlarged intracellular spaces (ics). Among visible nerve fibers there are axons with electron lucent axoplasm (ax<sub>1</sub>) and containing great amount of filaments (ax<sub>2</sub>). Numerous distended cisterns of smooth endoplasmic reticulum (ser) are present in most of axonal profiles. In the right upper corner an axon containing unbound groups of electron-dense, granular material. Splitting of myelin lamellae — my. × 26 700

*Ryc. 10.* I Grupa doświadczalna. We fragmencie aksonu pochodzącego ze wzgórza widoczne nieobłonione ugrupowanie elektronowo-gęstego materiału ziarnistego. Pow. 27.900 ×

*Fig. 10.* Experimental group I. In the fragment of axon from the thalamus, a small group of an unbound electron-dense granular material is visible. × 27 900





*Ryc. 12.* I Grupa doświadczalna. Zmielinizowane włókno nerwowe z opuszki, zawierające mitochondrium o jasnej macierzy i pofragmentowanych grzebieniach. Pow. 13650  $\times$

*Fig. 12.* Experimental group I. Myelinated nerve fiber from the medulla containing mitochondrium with a light matrix and fragmented cristae.  $\times$  13650

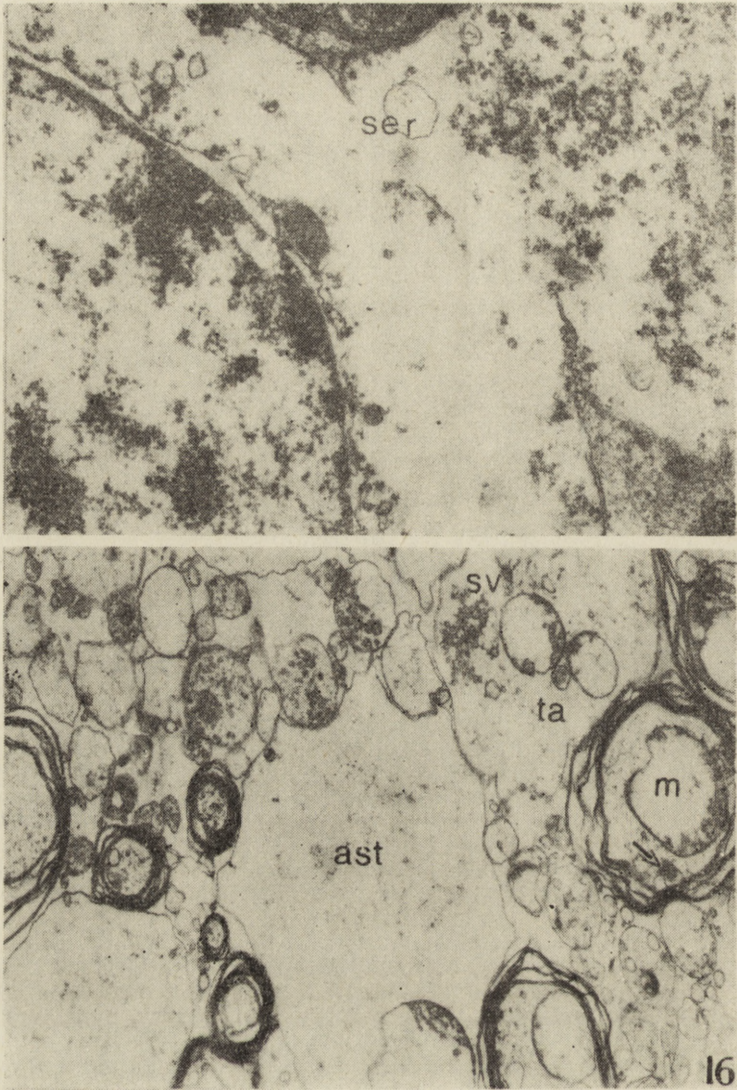
*Ryc. 13.* I Grupa doświadczalna. Zmielinizowane włókno nerwowe z opuszki, zawierające spęczniałe mitochondrium, wypełniające niemal cały przekrój aksonu. Pow. 13650  $\times$

*Fig. 13.* Experimental group I. Myelinated nerve fiber containing, greatly swollen mitochondrium, which occupies almost totally the axon's section.  $\times$  13650

*Ryc. 14.* I Grupa doświadczalna. Fragment istoty czarnej. Obrzmiałe zakończenie aksonalne z jasną cytoplazmą (ta), agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv) i obrzmiałym mitochondriem (m). Pow. 8900  $\times$

*Fig. 14.* Experimental group I. Tissue fragment from substantia nigra. Swollen axon terminal (ta) with light cytoplasm, aggregation of synaptic vesicles (sv) and swollen mitochondrium (m). 8900  $\times$

biegał istotnie od opisanego w grupie I (ryc. 17, 18). W szczególności odnosiło się to do nieprawidłowości aksonalnych i mielinowych. Wydaje się jedynie, że zmiany mitochondriów były bardziej nasilone. Obficie występowały aksony wypełnione balonowatymi strukturami skrajnie obrzmiałych mitochondriów. Wyraźnie mniejsze było poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych. W astrocytach, obok przejaśnienia i zubożenia ich cytoplazmy oraz opisanych uprzednio nieprawidłowości w strukturze mitochondriów, występowało obfite nagromadzenie gliofilamentów, obecnych zarówno w cytoplazmie perykarialnej jak i wypustkowej (ryc. 19).

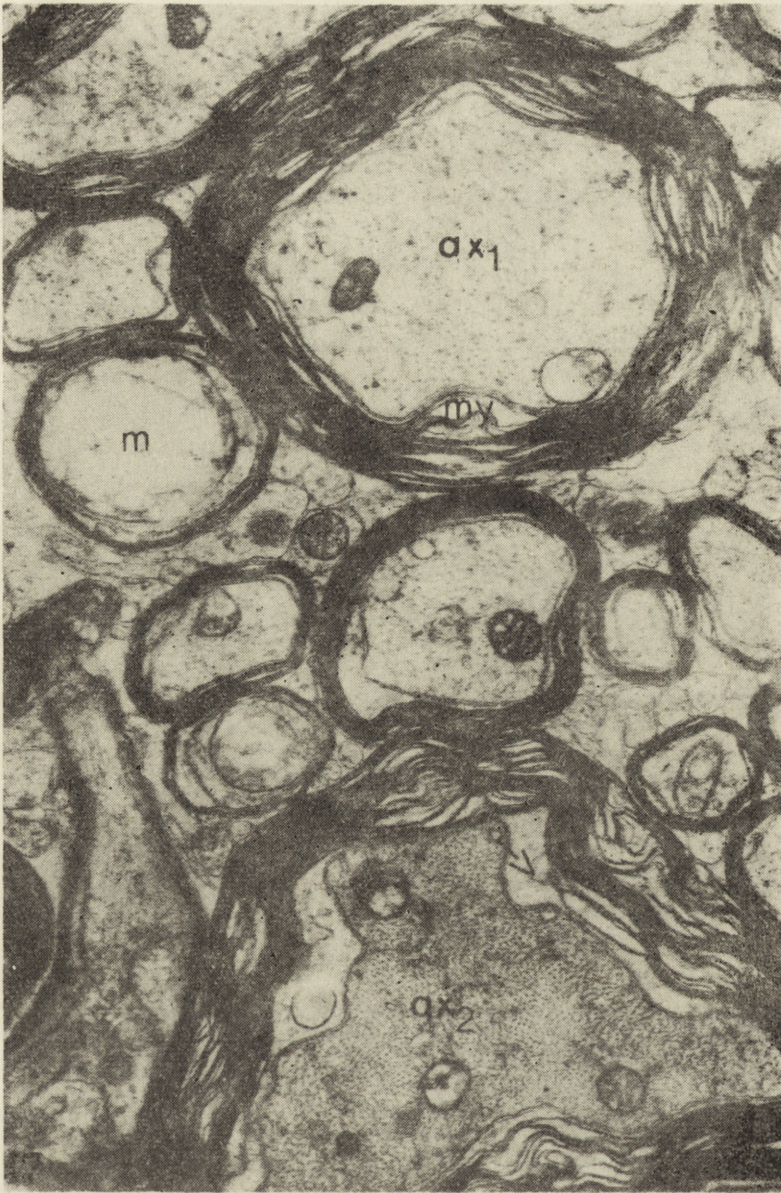


Ryc. 15. I Grupa doświadczalna. Fragment astrocytu z istoty białej mózdzku o obrzmiałej cytoplazmie z licznymi poszerzonymi zbiornikami gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser). Pow. 13350 ×

Fig. 15. Experimental group I. Fragment of astrocyte from the cerebellar white matter, with swollen cytoplasm, containing distended cisterns of smooth endoplasmic reticulum (sr). Pow. 13350 ×

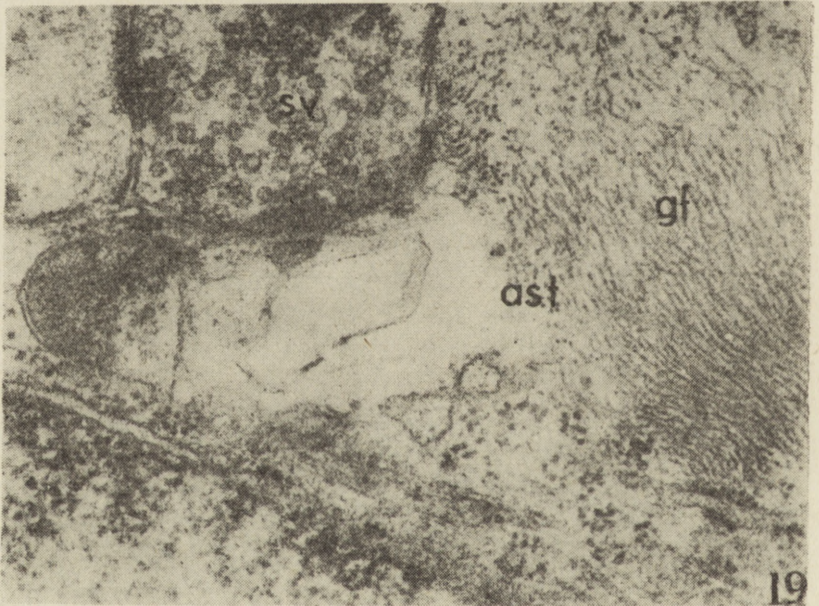
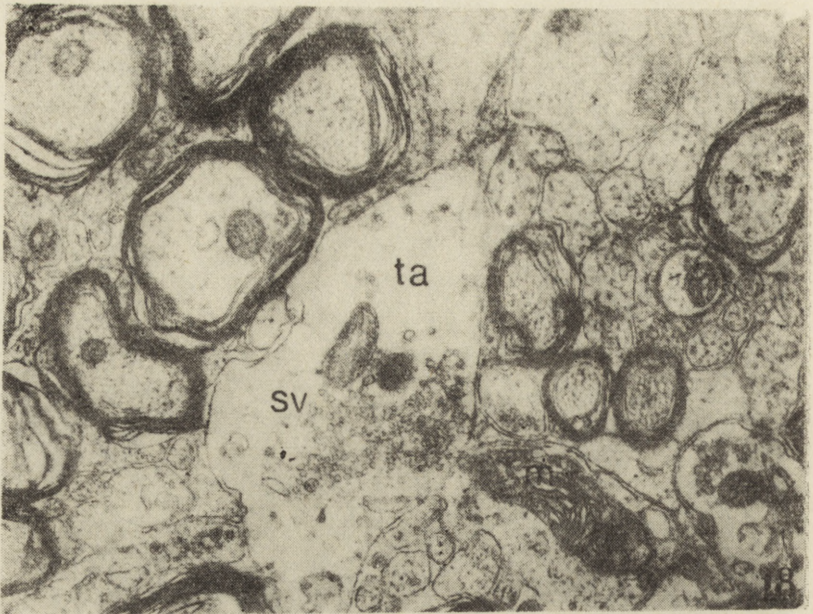
Ryc. 16. I Grupa doświadczalna. Fragment z prążkowania. Wypustka astrocytu (ast) o bardzo obrzmiałej cytoplazmie. Akson końcowy (ta) z małą gęstością elektronową cytoplazmy i agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv). Obrzmiałe mitochondrium (m) wypełnia znaczną część przekroju aksonu. Strzałka wskazuje na elektrownowo-gęste skupienie ziarnistej substancji w aksoplazmie. Pow. 13350 ×

Fig. 16. Experimental group I. Tissue fragment from putamen. Astrocytic process (ast) with greatly swollen cytoplasm. Axon terminal (ta) with light cytoplasm and synaptic vesicles aggregation (sv). Swollen mitochondrion (m) occupying great portion of axonal section. Arrow pointing at small aggregation of electron dense granular material. 13350 ×



*Ryc. 17.* II Grupa doświadczalna. Fragment podkorowej istoty białej. Większość widocznych włókien nerwowych wykazuje nieprawidłowości strukturalne. Akson o niskiej gęstości elektronowej aksoplazmy —  $ax_1$ , obok akson o bardzo znacznym zagęszczeniu aksoplazmy z bardzo licznymi neurofilamentami —  $ax_2$ ; odcinkowe rozwarstwienie osłonki mielinowej —  $my$ . Strzałka wskazuje poszerzenie przestrzeni okołooksonalnej. Balonowate rozdęte mitochondrium ( $m$ ) wypełnia całkowicie przekrój aksonu. Pow. 13650  $\times$

*Fig. 17.* Experimental group II. Tissue fragment of the subcortical white matter. Most of visible nerve fibres reveal ultrastructural abnormalities;  $ax_1$  — an axon with electron light cytoplasm;  $my$  — local splitting of myelin lamellae;  $ax_2$  — an axon with condense axoplasm filled with rich neurofilaments. Arrow points at widened periaxonal space;  $m$  — baloon-like distended mitochondrion filling totally axonal section. 13650  $\times$



*Ryc. 18.* II Grupa doświadczalna. Fragment istoty czarnej. Zakończenie aksonalne (ta) z obrzmiałą cytoplazmą i agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv); m — mitochondrium z macierzą o znacznej gęstości elektronowej. Pow. 13350 ×

*Fig. 18.* Experimental group II. Tissue fragment from substantia nigra. Axonal terminal (ta) with moderate swelling of cytoplasm and aggregation of synaptic vesicles (sv); m — mitochondrium with electron-dense matrix. 13350 ×

*Ryc. 19.* II Grupa doświadczalna. Fragment prążkowiec. Wypustka astrocytu (ast) wypełniona licznymi gliofilamentami (gf); sv — niezmiernie zakończenie aksonu wypełnione pęcherzykami synaptycznymi. Pow. 13350 ×

*Fig. 19.* Experimental group II. Tissue fragment from putamen. Astrocytic process (ast) filled with rich gliofilaments (gf); sv — unchanged axonal terminal with synaptic vesicles. 13350 ×

## OMÓWIENIE

Zasadniczy wzorec mikroskopowych i mikroskopowo-elektronowych nieprawidłowości tkankowych był wspólny dla obu wczesnych grup doświadczalnych i grupy zwierząt badanych po upływie 4 tygodni od zatrucia (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1982). Dominowało zajęcie istoty białej z charakterystycznym obrazem zmian mikroskopowych i mikroskopowo-elektronowych oraz stosunkowo nieznaczne zajęcie formacji szarych. W obu strukturach występowały jednak pewne odrębności morfologiczne, pozwalające na próbę określenia dynamiki procesu i jego sekwencji czasowych.

W najwcześniejszej grupie doświadczalnej, w obrazie mikroskopowym istoty białej dominowało uogólnione rozluźnienie jej utkania, stanowiące niewątpliwy wykładnik obrzęku. Znajdowało to potwierdzenie w obrazie mikroskopowo-elektronowym w postaci poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych i znacznego obrzmienia astrocytów. W grupie z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu rozluźnienie istoty białej, aczkolwiek utrzymujące się nadal, było wyraźnie mniejsze, czemu w badaniu mikroskopowo-elektronowym odpowiadał brak lub tylko nieznaczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych przy utrzymującym się obrzmieniu perykaryalnej i wypustkowej cytoplazmy astrocytów. W obu wczesnych grupach nie spostrzegano mikroskopowych wykładników włóknistej reakcji glejowej, jakkolwiek u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu występowały już zmiany świadczące o śródplazmatycznej proliferacji gliofilamentów w astrocytach. W grupie z najdłuższym przeżyciem po zatruciu, w której nie spostrzegano w ogóle cech rozluźnienia utkania istoty białej, wyraźna była fibroglejoza, a w badaniu mikroskopowo-elektronowym poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych należało do rzadkości, obrzmienie astrocytów było mniejsze w porównaniu do grup wcześniejszych, a w znacznej części komórek gleju gwiaździstego cytoplazma perykaryalna i wypustkowa zawierała obfite nagromadzenie gliofilamentów (Mossakowski i wsp. 1982). Analogiczny przebieg czasowy wykazywały, nieznaczne zresztą, zmiany w ścianach naczyń włosowatych istoty białej. Niewielkiego stopnia nagromadzenie pęcherzyków mikropinocytarnych w komórkach śródbłonna stwierdzano jedynie u zwierząt z najkrótszym przeżyciem po zatruciu.

Diametralnie różną dynamikę wykazywały główne nieprawidłowości tkankowe istoty białej, występujące w postaci jej zgąbczenia, stanowiącego następstwo nagromadzenia się w niej drobnych, o różnym stopniu zagęszczenia, jamek. Wykazywały one wyraźną progresję czasową, będąc najmniej nasilone w najwcześniejszej grupie doświadczalnej, wyraźniejsze u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu, a najbardziej zaawansowane w „późnej” grupie doświadczalnej.

Zakładając, że uszkodzenia istoty białej obserwowane u zwierząt z 4-tygodniowym przeżyciem po zakończeniu zatrucia, mają mikro-

skopowo-elektronowe cechy obrzęku cytotoxycznego z nieznacznym tylko komponentem naczyńiopodobnym, należy przyjąć, że we wczesnych grupach doświadczalnych dominują morfologiczne wykładniki obrzęku naczyńiopodobnego, z narastającymi w czasie elementami obrzęku cytotoxycznego. Zatrucie chlorkiem manganowym prowadziłoby więc we wstępnej fazie do naczyńiopodobnego obrzęku tkanki, przekształcającego się następnie w obrzęk cytotoxyczny, zbliżony w swoim obrazie morfologicznym do zmian stanowiących następstwo zatrucia cyjankami (Hirano i wsp. 1967) i fosforoorganicznymi pestycydami (Zelman 1977; Zelman, Majdecki 1979). Za taką sekwencją zmian obok struktury uszkodzeń tkankowych przemawiać może dodatkowo występowanie niewielkich wprawdzie, ale wyraźnych nieprawidłowości w obrazie naczyń włosowatych, ograniczonych do najwcześniejszej grupy doświadczalnej. O słuszności tej hipotezy zadecydują badania przepuszczalności naczyń z użyciem znaczników barierowych, przeprowadzone w czasie i w różnych okresach po zatruciu. W tym kontekście włóknisty odczyn glejowy narastający w zatruciu stanowiłby następstwo wcześniejszego obrzęku naczyńiopodobnego (Rubinstein i wsp. 1962; Klatzo 1968). W świetle porównawczej analizy obrazów występujących w różnym czasie po zatruciu chlorkiem manganowym należy przyjąć, że reakcja obrzękowa tkanki ma charakter mieszany, o różnej w akcentacji jej dwóch komponentów. Ich wzajemne zależności przyczynowe, o ile istnieją w ogóle, są trudne do określenia. Wydaje się mało prawdopodobne, aby nieprawidłowości aksonalne, stanowiące zasadniczy element cytotoxycznego obrzęku w naszym materiale były następstwem obrzęku naczyńiopodobnego, jakkolwiek atrakcyjne wydaje się wiązanie preferencji uszkodzeń aksonalnych w istocie białej z rozwojem dominującego w niej wcześniej obrzęku naczyńiopodobnego. Uszkodzeń tego typu nie obserwowano w obrzęku naczyńiopodobnym wywołanym przez inne czynniki patogenetyczne. Narastają one w czasie cofania się obrzęku naczyńiopodobnego, który prowadzi zresztą w pierwszej kolejności do uszkodzenia osłonek mielinowych (Klatzo 1968), niezmiennych lub wykazujących nieznaczące nieprawidłowości w przedstawionym materiale. Wydaje się przeto, że u podłoża uszkodzeń aksonalnych, stanowiących mikroskopowo-elektronowy odpowiednik zgąbczenia istoty białej leży pierwotne uszkodzenie mitochondriów związane z bezpośrednim działaniem manganu. Liczne badania biochemiczne i histochemiczne nad doświadczalnym zatruciem manganem wskazują na znaczne obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych (Chandra 1972; Seth, Husain 1974; Sigh i wsp. 1974; Situramayya i wsp. 1974; Hietanen i wsp. 1981), a wybiórcze powinowactwo manganu do mitochondriów może być związane z obfitym jego gromadzeniem się w tych właśnie strukturach subkomórkowych w mózgu w warunkach prawidłowych (Cotzias 1958). Sprawą otwartą pozostaje natomiast wybiórcza wrażliwość mitochondriów aksonalnych i astrocy-

tarnych istoty białej, przy znacznie mniejszej, jak można sądzić z obrazów mikroskopowo-elektronowych, wrażliwości perykaryalnych mitochondriów komórek nerwowych i oligodendrocytów. Nie wyjaśnioną kwestią pozostaje również narastanie uszkodzeń aksonalnych po przebytym zatruciu, w okresie gdy — wnosząc z badań Hietanena i wsp. (1981) — dochodzi do stopniowego zmniejszania się zawartości metalu w mózgu. To samo dotyczy zresztą uszkodzeń istoty czarnej, nieobecnych w grupie najwcześniejszej, nieznacznych u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem, a wyraźnych u zwierząt zabijanych po upływie 4 tygodni od zatrucia (Śmiałek, Mossakowski 1981). Być może taka właśnie dynamika zmian stanowi wykładnik tzw. zjawiska dojrzewania procesu patologicznego, opisanego przez Klatzo (1975) w warunkach niedokrwienia mózgu, a stanowiącego — jak się wydaje — ogólną prawidłowość reakcji tkanki nerwowej na działanie różnorodnych czynników uszkadzających.

Opisane przez nas zmiany, zarówno w grupach wczesnych, jak i później, różnią się zasadniczo od znanych z piśmiennictwa (Pentschew i wsp. 1963; Neff i wsp. 1969; Chandra, Srivastava 1970; Chandra 1972) dotyczącego uszkodzeń tkankowych mózgu w zatruciu związkami manganu, swoją wybiórczością, a co najmniej przewagą zajęcia istoty białej oraz czasem występowania. Jak wspomniano poprzednio, niezależnie od drogi podania, ogólnej i jednostkowej dawki oraz rodzaju związku chemicznego manganu, mózgowo uszkodzenia tkankowe dotyczyły przede wszystkim struktur szarych i rozwijały się po wielomiesięcznym zatruciu. Sigh i wsp. (1974) po zatruciu szczurów siarczanem manganu przez okres 25 dni nie stwierdzali w ogóle zmian patologicznych w mózgu uchwytanych w badaniach mikroskopowych. Nie istnieje przy tym możliwość porównania nieprawidłowości ultrastrukturalnych, gdyż w dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy mikroskopowo-elektronowych opracowań encefalopatii manganowej.

\*

#### Podziękowanie

Autorzy dziękują Paniom Teresie Bok, Renacie Wojdzie i Wandzie Ciesielskiej za bardzo staranną pomoc techniczną.

#### РАННЕЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ СОЕДИНЕНИЯМИ МАРГАНЦА

#### Резюме

Охарактеризовано ранние патоморфологические изменения в центральной нервной системе у крыс, развивающиеся вследствие отравления хлористым марганцем, вводимым внутривенно в периоде 4 недель, в общей дозе 240 г  $Mn^{++}/kg$  веса тела. Предметом исследований были головной и спинной мозги животных убиваемых непосредственно или по истечении 1 недели от введения полной дозы токсичного вещества. Констатированные изменения были сопоставлены с повреждениями выступающими после месячного переживания с момента отравления (Моссаковски и сотр., 1982).

Ранние морфологические изменения выражались умеренной неспецифической дегенерацией нервных клеток, без уловимого локализационного предпочтения, и обобщенным отеком белого вещества, подтвержденным в оптическом и электронном микроскопах. Отечным изменениям белого вещества в раннем периоде не сопутствовала фибринозная глиозная реакция. Но ее незначительные показатели уловимы исключительно в электронном микроскопе появлялись у животных убитых по истечении недели от отравления. Характерный для поздней группы пороз белого вещества животных, убитых непосредственно после отравления, был незначителен и ограничивался в основном к структурам ромбовидного моста и спинного мозга. Этот пороз, усиливаясь и обобщаясь у животных убиваемых спустя 7 дней от отравления, не достигал однако протяженности и интенсивности констатированной в поздней группе. В электронно-микроскопной картине преобладало усиливающееся с течением времени повреждение аксонов, выражающееся изменениями электронной плотности аксоплазмы, ростом содержания нейрофиламентов и тяжелой дегенерацией митохондрий который велет к их шаровидному вздутию. Такой же тип митохондриальных повреждений выступал в аксональных окончаниях и в опухших астроцитах при относительно неизменных митохондриях перикарионов нервных клеток и олигодендроглии.

На основании анализа невропатологической картины авторы выдвинули гипотезу о двухфазном характере повреждений нервной системы. Первую фазу составляет обобщенный вазогенный отек, а вторую фазу — цитотоксический отек, связанный с селективными повреждениями митохондрий.

#### EARLY LESIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN EXPERIMENTAL MANGANESE INTOXICATION

##### Summary

Early morphological alterations of the central nervous system in rats due to manganese chloride intoxication were characterized. The animals were intoxicated in the course of 4 weeks by intravenous administration of manganese chloride in a total dosis of 240 g Mn<sup>++</sup>/kg of body weight. The animals were killed either immediately or 7 days after the last injection of the toxic substance. The morphological abnormalities of the central nervous system were compared with those found in animals surviving 1 month after intoxication (Mossakowski et al. 1982).

Contrary to the late group, the early alterations consisted of a mild non-specific degeneration of neurons, spread over the gray structures with no topographic predilection and of generalized, decreasing in time, brain edema of the white structures, confirmed in both light and electron microscopy. In the earliest group of animals the white matter edema was not accompanied by fibrous glial reaction, the slight traces of which appeared in animals killed 7 days following intoxication. Spongy degeneration of the white matter, typical for the late group, in animals killed immediately after intoxication, was mild and practically limited to hindbrain structures and spinal cord. Becoming more spread and intensive in animals sacrificed 7 days later it never reached the severity observed in animals killed after one month survival. The most striking feature of the electron microscopic picture consisted in severe axonal abnormalities, taking the form of increased electron density of axoplasm, enhanced content of neurofilaments and severe mitochondrial degeneration. Mitochondrial swelling led to the formation of giant baloon-like structures. The same mitochondrial abnormality was present in axonal endings and in swollen astrocytes. Neuronal perikarya and oligodendrocytes were relatively normal.

Basing on the above observations it was postulated that manganese intoxication has been resulting in the biphasic central nervous system alteration. The first



phase consisted in generalized vasogenic brain edema, while the second one was expressed by cytotoxic edema of the white matter due to massive mitochondrial abnormalities.

## PISMIENNICTWO

1. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
2. Chandra S. V., Shukla S. G.: Effect of manganese on synthesis of brain catecholamines in growing rat. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1981, 48, 449—454.
3. Chandra S. V., Srivastava S. P.: Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride. *Acta Pharmac.*, (Kbh.) 1970, 28, 177—183.
4. Cotzias G. C.: Manganese in health and disease. *Physiol. Rev.*, 1958, 38, 503—506.
5. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzyme responses to manganese exposure in rats. *Acta Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339—345.
6. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 28, 200—213.
7. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. Śląska Akademia Medyczna. Katowice 1970.
8. Klatzo I.: Brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—13.
9. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. [W:] „The Nervous system — The Basic Neurosciences”. Red. D. B. Tower, Raven Press. New York 1975, 313—322.
10. Makarczenko A. F.: Izmenienija nierwnoj sistiemy pri intoksikacyi margancem. AN USRR, Kijów 1956, 211—272.
11. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. IX. Inter. Congr. of Neuropathology, Vienna, September 5—10, 1982. Abstracts 78.
12. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 931—933.
13. Neff N. H., Barrett R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140—1141.
14. Pentschew A., Ebner F. F., Kovatch R. M.: Experimental manganese encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 488—496.
15. Rubinstein L. J., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity in glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1962, 21, 116—128.
16. Seth P. K., Husain R.: *In vitro* inhibition of succinate dehydrogenase by manganese and its reversal by chelating agents. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 176—180.
17. Singh J., Husain R., Tandon S. K., Seth P. K., Chandra S. V.: Biochemical and histopathological alteration in early manganese toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 16—23.
18. Sitaramaya A., Nagar N., Chandra S. V.: Effect of manganese on enzymes in rat brain. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1974, 35, 185—190.

19. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
20. Zelman I. B.: Patomorfologia mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu fosforoorganicznym pestycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 516—522.
21. Zelman I. B., Majdecki T.: Zmiany ultrastrukturalne w mózgu szczurów po zatruciu fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 443—453.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii CMDiK PAN, ul. Dworkowa 3, 00—784 Warszawa