

ALICJA PRONASZKO-KURCZYŃSKA, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI,
MARIA OSTENDA, JAN KORTHALS

ZMIANY ZAWARTOŚCI GLIKOGENU W MÓZGU W DOŚWIADCZALNEJ ISCHEMII *)

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

Odkładanie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym w warunkach różnego typu uszkodzeń jest zjawiskiem pospolitym. Nieprawidłowe złogi wielocukru, stanowiące wyraz zaburzeń metabolizmu glikozy występują zazwyczaj albo w otoczeniu ognisk nieodwracalnie uszkodzonej tkanki nerwowej, np. dookoła ognisk martwicy niezależnie od jej pochodzenia (Shimizu, Hamuro 1958, Klatzo i wsp. 1961, 1970, Guth, Watson 1968), lub w tkance nie wykazującej w ogóle histologicznych cech uszkodzenia (Miquel i wsp. 1963, Mossakowski i wsp. 1968, Long i wsp. 1971, Mossakowski, Zelman 1971). Odkładanie się przeto histochemicznie wykrywalnego glikogenu może być traktowane jako morfologiczny wykładnik zaburzeń metabolicznych tkanki nerwowej i jej uszkodzeń leżących poniżej progu wykrywalności przy użyciu rutynowych metod histologicznych.

Spośród różnorodnych czynników uszkadzających, prowadzących do gromadzenia się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym w warunkach doświadczalnych, dużą grupę stanowią czynniki, których cechą wspólną jest ograniczenie dopływu tlenu do tkanki nerwowej. Mossakowski i wsp. (1968) opisali obfite nagromadzenie się glikogenu w warunkach okołoporodowej asfiksji noworodków małp. Na to samo zjawisko, w następstwie umiarkowanego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, zwracają uwagę Long i wsp. (1971) oraz Ibrahim i wsp. (1970). Ci sami autorzy obserwowali gromadzenie się glikogenu w tkance nerwowej w następstwie doświadczalnej anoksji prostej. Crowell i wsp. (cyt. za Klatzo i wsp. 1970) stwierdzali analogiczne zmiany w warunkach przejściowego niedokrwienia mózgu u małp.

*) Praca częściowo subsydiowana z umowy polsko-amerykańskiej PL 480, Grant Public Health Service USA. Agreement 05-004-1.

Większość badań, poza doświadczeniami Rivery i wsp. (1970) dotyczącymi modelu asfiksji okołoporodowej, była prowadzona metodami histochemicznymi, z natury rzeczy ograniczającymi możliwość ilościowej oceny zjawiska.

Celem podjętych przez nas badań była ilościowa analiza zmian w zawartości glikogenu w mózgu szczurów w warunkach jego częściowego niedokrwienia oraz próba oceny ich dynamiki w czasie.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na 10-tygodniowych szczurach, rasy Wistar, obu płci. Zwierzętom doświadczalnym w narkozie eterowej podwiązywano obustronnie tętnice szyjne wspólne. Zwierzęta grupy kontrolnej poddawano wyłącznie narkozie eterowej, przez okres czasu odpowiadający trwaniu zabiegu operacyjnego u zwierząt doświadczalnych*).

Zwierzęta obu grup zabijano przez dekapitację po upływie 6, 12, 24, 48, 72 i 120 godzin od podwiązania tętnic szyjnych lub od zastosowania narkozy, a następnie pobierano mózg do badań biochemicznych lub histologicznych i histochemicznych.

Dodatkową grupę kontrolną stanowiły szczury nie poddane żadnemu zabiegowi doświadczalnemu.

Badania biochemiczne

Do oznaczeń glikogenu pobierano obie półkule mózgowe. Tkanekę zamrażano natychmiast w mieszaninie alkoholu metylowego i suchego lodu (-70°C). Czas pobierania tkanki od momentu dekapitacji do chwili zamrożenia nie przekraczał 1,5 minuty. Zamrożone części mózgu ważono na wadze torsyjnej i wrzucano do probówek z wrzącym 30% KOH (3 ml). Tkanekę mózgową hydrolizowano we wrzącej łaźni wodnej przez 45 minut. Następnie do każdej probówki dodawano 3,6 ml etanolu celem wytrącenia z płynu glikogenu i pozostawiano w chłodni do następnego dnia. Glikogen odwirowywano. Osad glikogenu zawieszano w mieszaninie chloroformu i alkoholu metylowego i ogrzewano w ultratermostacie w 50°C (5 min.), po czym ponownie odwirowywano. Ekstrakcję wykonywano trzy razy. Oczyszczony glikogen zawieszano w 1 N HCL i hydro-

*) W doświadczeniach wstępnych stwierdzono, że nie ma różnic w zawartości glikogenu w mózgu między zwierzętami poddanymi wyłącznie działaniu narkozy eterowej a szczurami, u których wykonano zabieg rzekomy, polegający na nacięciu skóry szyi i wyłonieniu obustronnym pęczka naczyniowo-nerwowego, bez podwiązania tętnic szyjnych.

lizowano przez 3 godziny we wrzącej łaźni wodnej. Zhydrolizowany roztwór glikogenu zubożeniano i uzupełniano H₂O do 7 ml. Oznaczenie glukozy wykonywano metodą kolorymetryczną wg Nelsona (1944). Natężenie barwy odczytano na fotometrze spektralnym „Spekol” przy długości fali 540 m μ . Stężenie glukozy odczytywano z krzywej wzorcowej wykonanej z 10, 20, 40, 80 i 100 μ g glukozy. Roztwór wyjściowy wynosił 100 μ g glukozy w 1 ml. Wyniki zawartości glikogenu wyrażano w mg glukozy w przeliczeniu na 100 g tkanki mózgowej. Obliczenia statystyczne wykonano wg testu Studenta.

Badania morfologiczne

Badania morfologiczne, obejmujące rutynowe barwienie skrawków hematoksyliną i eozyną oraz histochemiczne oznaczanie glikogenu wykonano na 18 mózgach szczurów, w tym 8 doświadczalnych i 10 kontrolnych.

Mózg po wydobyciu z czaszki dzielono dwoma cięciami w płaszczyźnie czołowej (1 — przez płaty czołowe na wysokości guza popielatego, 2 — do tyłu od ciał suteczkowatych) na bloki, które utrwalano w płynie Rossmanna, zatapiano w parafinie i skrawano na mikrotomie na skrawki grubości 10 μ .

Oznaczenie glikogenu wykonywano na skrawkach przy pomocy odczynu PAS z równoczesnym blokowaniem reakcji dimedonem wg sposobu opisanego przez Bulmera (1959). Swoistość odczynu histochemicznego sprawdzano przy pomocy trawienia diastazą.

Badanie mikroskopowo-elektronowe

Do badań mikroskopowo-elektronowych użyto 3 szczury (2 po podwiązaniu tętnic szyjnych wspólnych i 1 poddany wyłącznie działaniu narkozy eterowej) z 48-godzinnym przeżyciem po zabiegu. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację po czym szybko otwierano czaszkę i pobierano drobne wycinki tkanki z okolicy czołowo-ciemieniowej obu półkul mózgu. Pobrany materiał utrwalano przez 2 godziny w 4% roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym o pH 7,3, a następnie przez 1 godzinę w 2% czterotlenku osmu. Tkanekę odwadniano w etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie 812. Materiał krojono na ultramikrotomie f-my Reichert. Ultracienkie skrawki podbarwiane octanem uranylu i cytrynianem ołowiu oglądano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Żadne ze zwierząt doświadczalnych po wyjściu z narkozy nie zdradzało objawów świadczących o uszkodzeniu układu nerwowego, poza obecnością u większości z nich obustronnej ptozy, której wystąpienie wiązano z uszkodzeniem współczulnych splotów tętniczo-szyjnych w czasie podwiązania *a. carotis*.

Oznaczenia ilościowe

Wyniki oznaczeń glikogenu zarówno grupy zwierząt z podwiązanymi obustronnie tętnicami, jak i grupy zwierząt kontrolnych poddanych narkozie eterowej zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość glikogenu w mózгах szczurów w różnym czasie po obustronnym podwiązaniu tętnie szyjnych i zastosowaniu narkozy

Table 1. Glycogen content in brain tissue of rats, at various times following bilateral carotid arteries ligation and ether anaesthesia

Czas po zabiegu (godz.) Time following experiment (hrs)	Zawartość glikogenu (mg/100 g tkanki) Glycogen content (mg/100 g of tissue)		t	p
	zwierzęta doświadczalne (operowane) experimental animals (operated)	zwierzęta kontrolne (narkoza) control animals (anaesthetized)		
6	47,9* ± 5,2** (5)***)	38,6 ± 7,5 (5)	2,3	0,1 > p > 0,05
12	55,9 ± 4,8 (7)	45,3 ± 4,6 (7)	4,2	0,02 > p > 0,01
24	53,4 ± 2,5 (5)	30,9 ± 4,0 (5)	10,7	< 0,001
48	73,0 ± 4,9 (6)	38,3 ± 3,3 (6)	14,5	< 0,001
72	70,5 ± 5,3 (5)	29,2 ± 3,7 (5)	5,4	0,02 > p > 0,01
120	63,2 ± 2,3 (4)	32,0 ± 1,7 (4)	21,8	< 0,001

*) średnia arytmetyczna
arithmetic mean

**) odchylenie standardowe
standard deviation

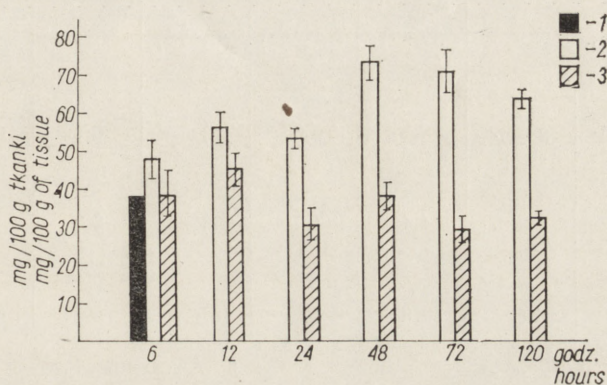
***) liczba zwierząt w grupie
number of animals

t — zmienna losowa testu Studenta
Student's test

p — prawdopodobieństwo
significance of difference

Zawartość glikogenu w mózgu u zwierząt doświadczalnych we wszystkich grupach czasowych jest wyższa od jego poziomu u zwierząt kontrolnych. W pierwszej badanej grupie czasowej tj. w 6 godz. po podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej różnice w zawartości glikogenu między grupą doświadczalną, a kontrolną nie są statystycznie znamienne.

We wszystkich następujących grupach natomiast, poczynając od 12 godziny doświadczenia, różnice te są już statystycznie wysoce znamienne. Zwiększanie się zawartości glikogenu przebiega dość łagodnie (schemat 1). Maksymalny przyrost przypada w 48 godzinie doświadczenia, utrzymuje się na tym poziomie przez dalsze godziny i po upływie 120 godzin od podwiązania tętnic nadal jeszcze różni się w sposób znamieny od poziomu glikogenu grupy kontrolnej.



Schemat 1. Zawartość glikogenu w mózgach szczurów w różnym czasie po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych i zastosowaniu narkozy w porównaniu ze zwierzętami nie poddanymi zabiegom doświadczalnym: 1 — zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym, 2 — zwierzęta operowane, 3 — zwierzęta poddane narkozie.

Diagram 1. Differences in glycogen content in the brain tissue of rats at various time intervals following bilateral carotid arteries ligation and ether anaesthesia, compared with that in normal animals: 1 — normal animals, 2 — operated animals, 3 — anaesthetized animals.

Poziom glikogenu w mózgach zwierząt kontrolnych ulega niewielkim wahaniom w okresie pierwszej doby po zastosowaniu narkozy eterowej w porównaniu do zawartości glikogenu w mózgach zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom. Jednakże zmiany te w odniesieniu do poziomu wyjściowego (tabela 2) nie są statystycznie znamienne w 6 i 24 godzinie doświadczenia. Jedynie nieznaczny przyrost glikogenu, mający jednakże cechy znamienności statystycznej stwierdzono w 12 godzinie po podaniu narkozy.

Obraz morfologiczny

Obraz histologiczny mózgow zwierząt z podwiązanymi tętnicami szyjnymi nie różnił się w sposób istotny od obrazu mózgow zwierząt kontrolnych, niezależnie od czasu jaki minął od wykonania zabiegu. U jednego tylko szczura, uspiętego po upływie 120 godzin po podwiązaniu

Tabela 2. Porównanie zawartości glikogenu w mózgach szczurów nietkniętych i poddanych narkozie eterowej

Table 2. Comparison of glycogen content in the brains of normal and anaesthetized rats

Grupa zwierząt Group of animals		Zawartość glikogenu (mg/100 g tkanki) Glycogen content (mg/100 g of tissue)			t	p
Zwierzęta nietknięte Normal animals		37,9*)	±1,2**)	(6)***)	—	—
Zwierzęta podda- ne narkozie, badane po: Anaesthetized animals after:	6 godz. hrs	38,5	±5,6	(8)	0,29	0,8 > p > 0,7
	12 godz. hrs	44,4	±4,7	(7)	3,3	< 0,01
	24 godz. hrs	30,9	±4	(5)	2,27	0,05 > p > 0,02

*) średnia arytmetyczna
arithmetic mean

***) odchylenie standardowe
standard deviation

***) liczba zwierząt
number of animals

t — zmienna losowa testu Studenta
Student's test

p — prawdopodobieństwo
significance of difference

tętnic szyjnych stwierdzono rozległe ognisko selektywnej martwicy ko-
ry mózgu, obejmujące jednostronnie obszar położony w zakresie una-
czynienia tętnicy środkowej mózgu.

Obraz histochemiczny

U zwierząt kontrolnych skąpe, ziarniste złogi glikogenu występowały
w komórkach wyściółki komór, w warstwie podwyściółkowej, w komór-
kach splotu naczyńnkowego, w oponach miękkich oraz w ścianach
niektórych tętnic mózgu, zwłaszcza oponowych. Obraz ten odpowiadał
sposrzedzanemu u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświad-
czalnym.

W grupie doświadczalnej stwierdzono występowanie obfitych, ziarnis-
tych złogów glikogenu w półkulach mózgu. Poza obszarami ich typowej
lokalizacji występowały one w korze mózgu, a rzadziej w utkaniu zwo-
jów podstawy. W pojedynczych przypadkach widoczne były również w
podkorowej istocie białej. Złogi te występowały w postaci drobnych zia-
ren rozsianych w neuropilu w substancji szarej, grupujących się w więk-

szych skupieniach w otoczeniu naczyń krwionośnych (ryc. 1), lub dookoła jąder gleju, przede wszystkim astrocytarnego (ryc. 2), w sposób sugerujący ich śródplazmatyczne nagromadzenie. Niekiedy obfite złoże wielocukru wypełniające zarówno pericarion jak i wypustki astrocytów uwiadczały ich sylwetki w sposób przypominający obrazy impregnacyjne (ryc. 3). Korowe złoże glikogenu obejmowały zwykle całą jej szerokość, rzadziej wykazywały układ warstwowy, niekiedy były plackowato rozsiadane na tle skądinąd niezmienionej tkanki.

W wspomnianym uprzednio przypadku z martwicą kory mózgu bardzo obfite złoże glikogenowe — okołonaczyniowe, astrocytarne i luźno rozrzucone w neuropilu tworzyły szeroki wał dookoła ogniska martwicy (ryc. 4).

Złoże glikogenowe o tym samym charakterze i rozmieszczeniu w mózgu stwierdzono we wszystkich grupach zwierząt doświadczalnych, niezależnie od czasu przeżycia po podwiązaniu tętnic szyjnych. Jedyną uchwytą różnicą, dotyczącą rozmieszczenia złożeń, była ich obecność w neuropilu jąder podstawy u zwierząt usypianych po upływie 6 i 12 godzin od zabiegu, podczas gdy w pozostałych grupach ograniczały się zasadniczo do kory mózgu.

Obraz mikroskopowo-elektronowy

W badaniu elektronowo-mikroskopowym mózgow zwierząt z podwiązanymi tętnicami szyjnymi stwierdzono bardzo znaczne nagromadzenie glikogenu w astrocytach, przede wszystkim w ich wypustkach okołonaczyniowych. Wokół naczyń włosowatych równomiernie rozrzucone ziarna glikogenu gromadziły się w bardzo znacznie obrzękłych wypustkach astrocytarnych (ryc. 5). Ilość ziaren w poszczególnych wypustkach, otaczających nawet to samo naczynie różniła się bardzo znacznie. Zgrupowane wokół naczyń przedwłosowatych wypustki glejowe były mniej obrzmiałe, lub nie wykazywały w ogóle cech obrzmienia, a gromadzące się w nich złoże glikogenowe wypełniały miejscami całkowicie ich cytoplazmę.

Ponadto stwierdzono gromadzenie glikogenu w częściach perikarialnych astrocytów kory mózgu oraz w ich wypustkach nie związanych bezpośrednio z naczyniami (ryc. 6). Nieco większe nagromadzenie glikogenu obserwowano w wypustkach astrocytarnych, otaczających „ciemne” neurony.

W obrazie ultrastrukturalnym glikogen występował w postaci luźno leżących w cytoplazmie pojedynczych ziaren, lub też typowych układów rozetowych. Poza tym widoczne były różnopostaciowe skupienia kilku lub kilkunastu ziaren glikogenu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stwierdzony przez nas wzrost zawartości glikogenu w mózgach szczurów z doświadczalnie wywołanym ograniczeniem ukrwienia ośrodkowego układu nerwowego stanowi ilościowe potwierdzenie dotychczasowych obserwacji histochemicznych, prowadzonych na identycznym modelu doświadczalnym przez Ibrahima i wsp. (1970) i Longa i wsp. (1971). Obserwowany przyrost ilościowy znajduje swój pełny odpowiednik w uzyskanych przez nas wynikach badań histochemicznych.

Nieprawidłowe, histochemicznie uchwytne złogi glikogenu, w warunkach zastosowanego modelu doświadczalnego pojawiają się po upływie 6 godzin od podwiązania tętnic szyjnych (Ibrahim i wsp. 1970, Long i wsp. 1971). W tym samym mniej więcej czasie opisywano najwcześniejsze astrocytarne złogi glikogenowe w okołoporodowej asfiksji u małp (Mossakowski i wsp. 1968). W naszym materiale po upływie 6 godzin od zadziałania czynnika uszkadzającego obserwuje się również wzrost zawartości glikogenu w mózgu, nie ma on jednak cech znamienności statystycznej. Rozbieżność ta może tłumaczyć się tym, że pojawiające się w tym czasie niewielkie złogi, obejmujące jedynie poszczególne formacje anatomiczne ośrodkowego układu nerwowego są zbyt nikłe, aby mogły rzutować na globalną zawartość wielocukru w mózgu. Statystycznie znamienny wzrost zawartości glikogenu występuje dopiero po upływie 12 godzin od podwiązania tętnic szyjnych, osiągając swój szczyt po 48 godzinach i utrzymując się na znamienne podwyższonym poziomie do końca doświadczenia tj. do piątego dnia od zadziałania czynnika uszkadzającego.

Dynamika zmian w zawartości glikogenu w naszym materiale różni się od obserwacji Rivery i wsp. (1970), uzyskanych w modelu asfiksji okołoporodowej u małp. Autorzy ci bowiem stwierdzili, że maksymalne ilościowe nagromadzenie glikogenu w mózgach zwierząt po asfiksji przypada na 12 godzinę doświadczenia. Po upływie 48 godzin zawartość glikogenu spada do poziomu wartości kontrolnych, podczas gdy w naszych badaniach na ten okres właśnie przypada szczytowe nagromadzenie wielocukru. Źródeł tych rozbieżności szukać zapewne należy w różnicach gatunkowych użytych w jednym i drugim przypadku zwierząt, bądź też w zależnej od wieku zwierząt różnej wrażliwości układu nerwowego na działanie czynnika uszkadzającego, lub wreszcie w odmienności modelu doświadczalnego — krótkotrwałej, przejściowej asfiksji w doświadczeniach Rivery i wsp. (1970) i trwałego podwiązania tętnic szyjnych w naszym. Na rolę czynników gatunkowych, wiekowych, a nawet topograficznych mogą w tym względzie wskazywać między innymi różnice w czasie pojawiania histochemicznie uchwytanych złogów

glikogenowych w warunkach tego samego modelu doświadczalnego. W częściowym niedokrwieniu rdzenia kręgowego u kotów, najwcześniejsze złogi glikogenu pojawiały się już po upływie jednej godziny od podwiązania aorty brzusznej (Long i wsp. 1971).

Większość autorów zajmujących się zagadnieniem pojawiania się glikogenu w tkance nerwowej pod wpływem czynników upośledzających jej zaopatrzenie w tlen (Mossakowski i wsp. 1968, Ibrahim i wsp. 1970, Klatzo i wsp. 1970, Long i wsp. 1971, Mossakowski, Zelman 1971) zwraca uwagę na całkowitą odwracalność zmian i na odkładanie się złogów wielocukru w tkance morfologicznie nieuszkodzonej. W przedstawionej serii doświadczeń nie udało się nam potwierdzić pierwszego spostrzeżenia. Zawartość glikogenu w mózgu jeszcze po upływie 120 godzin od podwiązania tętnic szyjnych przewyższa znacznie jego poziom u zwierząt kontrolnych. Istnieją jednak podstawy, aby przypuszczać, że w zastosowanym modelu doświadczalnym (stałe podwiązanie tętnic szyjnych) powrót do normy następuje dopiero w okresie późniejszym. Nieprawidłowe złogi glikogenowe w rdzeniu kręgowym, poddanym częściowemu niedokrwieniu utrzymują się do 7 — 10 dni (Long i wsp. 1971). Natomiast gromadzenie się glikogenu w naszym materiale, podobnie jak i u innych autorów, dotyczyło wyłącznie struktur mózgu nie wykazujących histologicznych cech uszkodzenia.

Na odrębną uwagę zasługuje topograficzny rozkład złogów glikogenowych. Siedzibą ich jest wyłącznie kora mózgu, w znacznie mniejszym stopniu zwoje podstawy. Złogi w istocie białej należą do rzadkości i pojawiają się tu jedynie w okresie późniejszym. Topografia złogów nie ulega przy tym zasadniczym zmianom w czasie po zadziałaniu bodźca uszkadzającego. Badanie histochemiczne pozwala na astrocytarną i neuropilową lokalizację złogów. Ta ostatnia, jak wynika z badań mikroskopowo-elektronowych odpowiada również ich nagromadzeniu w obrzniętych wypustkach astrocytów. Nie obserwowano nigdy neuronalnych złogów wielocukru.

Topograficzne rozmieszczenie złogów wskazuje na fakt, że gromadzą się one w obrębie tych formacji ośrodkowego układu nerwowego, które wykazują największe zużycie glukozy, a ich lokalizacja śródkomórkowa dotyczy astrocytów — komórek, które zgodnie z poglądami Friede (1954) i Oksche (1961) odgrywają podstawową rolę w metabolizmie i w transporcie glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. Pozwala to przypuszczać, że gromadzenie się glikogenu w tkance nerwowej w następstwie ograniczania jej zaopatrzenia w tlen stanowi wyraz upośledzonego użytkowania glukozy przez tkankę. Obniżona zdolność użytkowania glukozy w tych warunkach może dotyczyć przede wszystkim komórek nerwowych, które z jednej strony są jej głównymi

konsumentami, z drugiej zaś charakteryzują się największą wrażliwością na niedotlenienie. W obecnym stanie badań mechanizm ewentualnego obniżenia zużytkowania glukozy przez tkankę nerwową w następstwie niedotlenienia pozostaje niewyjaśniony. Być może, że ograniczenie zużytkowania glukozy w następstwie obniżenia puli związków wysokoenergetycznych, jest przyczynowo związane z obniżeniem syntezy białek, na co wskazywały badania Yapa i Spectora (1965).

Z chwilą obniżenia zużytkowania glukozy przez komórki nerwowe, lub jej gromadzenia się w nadmiarze w tkance nerwowej w następstwie hypoksji (Thorn i wsp. 1959, Steward i wsp. 1970, Domańska-Janik 1970) może ona gromadzić się w postaci glikogenu w cytoplazmie transportujących ją w układzie nerwowym astrocytów (Hager 1966). Gromadzenie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym może stanowić następstwo bądź jego wzmożonej syntezy, bądź też zmniejszonego rozpadu. Badania Klatzo i wsp. (1970) przesądzają to zagadnienie na rzecz pierwszego mechanizmu.

Hypoksja, jak wykazali Passonneau i Lowry (1962) stanowi czynnik stymulujący fosforylację glukozy. Glukoza-6-fosforan jest z kolei aktywatorem glukozylotransferazy UDPglukoza-glikogen (Basu, Bachawat 1961, Stossel i wsp. 1970). Wydaje się przeto możliwe, że sama gromadząca się w układzie nerwowym glukoza może prowadzić w tych warunkach do aktywacji układu enzymów syntetyzujących glikogen i jego następczego odkładania się. Badania histochemiczne Mossakowskiego i wsp. (1968), Goldberga i O'Toole'a (1969), Ibrahima i wsp. (1970) oraz Longa i wsp. (1971), dotyczące aktywności enzymów metabolizujących glikogen i ich związku z gromadzeniem się glikogenu w mózgu, potwierdzają tę możliwość. Na taki również mechanizm odkładania się złogów glikogenowych w ośrodkowym układzie nerwowym wskazują badania Śmiałka i wsp. (1971) nad aktywnością glukozylotransferazy UDPglukoza — glikogen w warunkach niedokrwienia mózgu.

Istotnym zagadnieniem jest rola narkozy, jako czynnika prowadzącego do wzrostu zawartości glikogenu w mózgu. Na jej wpływ na poziom glikogenu w tkance nerwowej zwracają uwagę Oksche (1961) i Goldfied i wsp. (1966). Rivera i wsp. (1970) stwierdzili lekki wzrost zawartości glikogenu w mózgach zwierząt kontrolnych w ciągu pierwszych 6 godzin obserwacji i przypuszczali, że zmiany te należy wiązać z działaniem środka narkotycznego. W naszych badaniach, w analogicznym okresie stwierdzano również nieznaczne wahania w zawartości glikogenu w mózgach poddanych narkozie zwierząt kontrolnych. Jednakże analiza statystyczna wykazała, że zmiany te nie mają cech znamienności w stosunku do wahań zawartości glikogenu w mózgach zwierząt dekapitowa-

nych, bez żadnych zabiegów poprzedzających. Można jednak przyjąć nieznaczny wpływ narkozy na zawartość glikogenu u zwierząt badanych w 12 godzin po zastosowaniu środka znieczulającego. W okresach późniejszych wpływ ten zanika całkowicie.

WNIOSKI

1. Obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u 10-tygodniowych szczurów prowadzi do znacznego przyrostu zawartości glikogenu w mózgu, przy braku jego strukturalnego uszkodzenia. Przyrost ten wykazuje cechy znamienności statystycznej w stosunku do grupy kontrolnej po upływie 12 godzin, a osiąga swój ilościowy szczyt po 48 godzinach od podwiązania tętnic szyjnych. W okresie 5 dni po zabiegu nie obserwuje się powrotu zawartości glikogenu do poziomu wyjściowego.

2. Uchwytne histochemicznie nieprawidłowe złogi glikogenu w tkance nerwowej umiejscowione są w formacjach szarych mózgu, przede wszystkim w korze, a w mniejszym stopniu i tylko w okresach wczesnych w jądrach podstawy. Złogi w istocie białej należą do rzadkości.

Badanie mikroskopowo-elektronowe wskazuje, że złogi wielocukru gromadzą się wyłącznie w cytoplazmie astrocytów i w ich wypustkach.

3. Eterowe znieczulenie ogólne prowadzi do nieznacznego, lecz statystycznie znamiennego wzrostu zawartości glikogenu w mózgu wyłącznie w 12 godzin po podaniu środka znieczulającego. W okresie późniejszym wpływ ten zanika całkowicie.

A. Пронашко-Курчиньска, М. Я. Моссаковски, М. Остенда, Я. Кортхальс

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В МОЗГУ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИСХЕМИИ

Резюме

Проводились количественные определения содержания гликогена в мозгах 10-недельных крыс расы Вистар, которым подвязывали общие сонные артерии с обеих сторон. Определение содержания гликогена проводилось в течение 6, 12, 24, 48, 72 и 120 часов после подвязки артерий.

Биохимические исследования дополнялись гистологическими и ультраструктурными исследованиями, а также гистохимическим определением гликогена. На основании проведенных исследований авторы выдвигают следующие заключения:

1. Обусторонняя подвязка общих сонных артерий ведет к значительному росту содержания гликогена в мозгу при отсутствии свойств его структурного

повреждения. Это приращение обнаруживает статистическую достоверность по отношению к контрольной группе спустя 12 часов и достигает количественного максимума в 48 часов после подвязки сонных артерий. В течение 5 дней от операции не наблюдается возврат содержания гликогена до исходного уровня.

2. Заметные гистохимические неправильные отложения гликогена в нервной ткани находятся в серых образованиях мозга, прежде всего в коре, и в меньшей степени и только в ранних периодах в базальных ядрах. Отложения в белом веществе принадлежат к редкости. Электронно-микроскопическое исследование указывает на то, что полисахаридные отложения накапливаются исключительно в астроцитах и их отростках.

3. Общая эфирная анестезия ведет к незначительному, однако статистически достоверному росту содержания гликогена в мозгу спустя 12 часов от подачи анестетика. В последующий период это влияние исчезает полностью.

Авторы выдвигают предположение, что накопление гликогена в условиях частичного недостаточного кровоснабжения мозга связано с ухудшенным использованием глюкозы нервной тканью.

A. Pronaszko-Kurczyńska, M. J. Mossakowski, M. Ostenda, J. Korthals

CHANGES IN BRAIN GLYCOGEN CONTENT IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA

S u m m a r y

Glycogen was quantitatively determined in brains of 10-week-old Wistar rats with bilaterally ligated common carotid arteries, at 6, 12, 24, 48, 72, and 120 h after artery ligation.

The biochemical investigations were supplemented by histological and ultrastructural studies as well as by histochemical glycogen determination. On the basis of the studies performed the following conclusions are drawn:

1. Bilateral common carotid artery ligation leads to a considerable rise of the brain glycogen level without any signs of brain structural lesion. This increase is statistically significant as compared with the control group after 12 h, and reaches its peak 48 h after artery ligation. For 5 days after the operation no return of the glycogen level to the initial value was observed.

2. Histochemically noticeable unnormal glycogen deposits in the nerve tissue are found in the grey formations of the brain, and in the first place in the cortex, they are less frequent and appear only in earlier periods in the basal nuclei. Deposits in the white matter are extremely rare. Electron microscopic inspection shows that polysaccharide deposits accumulate exclusively in the cytoplasm of astrocytes and in their processes.

3. Ether general anaesthesia leads to a slight, but statistically significant rise of the brain glycogen level exclusively at 12 h after application of the anaesthetic. At a later time this influence is no more noticeable.

The authors suggest that glycogen accumulation under conditions of moderate brain ischemia is connected with defective glucose utilisation by the nerve tissue.

PIŚMIENNICTWO

1. Basu D. K., Bachhawat B. K.: Purification of uridine diphosphoglucoseglycogen transglucosylase from sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 123 — 128.
2. Bulmer D.: Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95 — 98.
3. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. W druku.
4. Friede R. L.: Die Bedeutung der Glia für den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel. *Zbl. allg. Path. Anat.* 1954, 92, 65 — 74.
5. Gattfied P. D., Lowry O. H., Schuetz D. W., Passonneau J. V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischaemia and anaesthesia. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 185 — 195.
6. Goldberg N. D., O'Toole A. G.: The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 3053 — 3061.
7. Guth L., Watson P. K.: A correlated histochemical and quantitative study on cerebral glycogen after brain injury in the rat. *Exp. Neurol.*, 1968, 22, 590 — 602.
8. Hager H.: Die frühen Alterationen des Nervengewebes nach Hypoxidose und die fortgeschrittene Nekrose im elektronenmikroskopischen Bild. *Proc. V. Inter. Congr. Neuropath.*, Ed. F. Lüthy, A. Bischoff. *Exc. Med. Found.*, Amsterdam 1966, 64 — 78.
9. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Pathol.*, 1970, 60, 403 — 415.
10. Klatzo I., Miquel J., Tobias C., Haymaker W.: Effects of particle radiation on the rat brain including vascular permeability and glycogen studies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1961, 20, 459 — 483.
11. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. *VI Inter. Congr. Neuropath.* Paryż 1970, 351 — 365.
12. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in central nervous system ischaemia, 1971, w druku.
13. Miquel J., Klatzo I., Menzel D. B., Haymaker W.: Glycogen changes in X-irradiated rat brain. *Acta Neuropath.* 1963, 2, 482 — 490.
14. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., de Curet H. R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 500 — 516.
15. Mossakowski M. J., Zelman I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenowego w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astro-nautyki*, Supl. 1, 1971, 37 — 50.
16. Nelson N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, 153, 375 — 380.
17. Oksche A.: Der histochemisch nachweisbare Glykogenaufbau und abbau in der Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer Funktionsabhängigen Stoffwechselaktivität der Neuroglia. *Z. Zellforsch.* 1961, 54, 307 — 361.
18. Passonneau J. V., Lowry D. H.: Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1962, 7, 10 — 15.

19. Rivera A., Brann A. W., Myers R. E.: Brain glycogen of the recovering asphyxiated monkey newborn. *Exp. Neurol.*, 1970, 26, 309 — 315.
20. Shimizu N., Hamuro Y.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wounds. *Nature* 1958, 181, 781 — 782.
21. Stewart M. A., Sherman W. R., Kurion M. M., Moonsammy G. L., Wisgerhof M.: Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosaemia. *J. Neurochem.*, 1967, 14, 1057 — 1066.
22. Stosel T. P., Murad F., Mason R. J., Vaughan M.: Regulation of glycogen metabolism in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 6228 — 6234.
23. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDPglucose: glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) and α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1) activity in rat brain in experimental ischemia. In press.
24. Thorn W., Isselhard W., Moldener B.: Glycogen-, Glucose- und Milchsäuregehalt in Warmblüterorganen bei unterschiedlicher Versuchsanordnung und anoxischer Belastung mit Hilfe optischer Fermentteste ermittelt. *Biochem. Z.* 1959, 331, 545 — 562.
25. Yap S. L., Spector R. G.: Cerebral protein synthesis in anoxic-ischemic brain injury in the rat. *J. Path. Bact.* 1965, 90, 543.

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