

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MARIA OSTENDA, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ NUKLEOZYDO-DWU- I TRÓJ-FOSFATAZ W MÓZGU SZCZURA W OSTRYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA

BADANIA W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM I ELEKTRONOWYM

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

Zagadnienie obrzęku mózgu w zatruciu tlenkiem węgla nie jest jednoznacznie wyjaśnione. W piśmiennictwie neuropatologicznym, dotyczącym zatruc CO u ludzi podkreśla się jego występowanie, a nawet przypisuje się mu istotną rolę patogenetyczną w rozwoju zmian demielinizacyjnych (Jacob 1968, Jacob i wsp. 1962, van Bogaert 1947, Schwedenberg 1959). Wyniki badań doświadczalnych są znacznie bardziej zróżnicowane. Miyagishi i Suwa (1969) oraz Korthals i wsp. (1973) wykazali, że obrzęk mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla nie jest zjawiskiem stałym. Korthals i wsp. (1973) stwierdzali obecność mikroskopowo-elektronowych wykładników obrzęku jedynie w przypadkach bardzo ciężkiego, powtarzanego kilkakrotnie zatrucia. Przy jednorazowym zatruciu, prowadzącym do znacznych, choć przejściowych zaburzeń metabolicznych, cech obrzęku nie obserwowano. W tym samym modelu doświadczalnym Rap i wsp. (1974) nie stwierdzili cech uszkodzenia przepuszczalności naczyń mózgowych dla znaczników białkowych, leżącego u podłoża naczyniopochodnego obrzęku mózgu, wykazując jednak przejściowy przyrost zawartości wody w tkance interpretowany jako wykładnik obrzęku cytotoksycznego.

Zlokalizowanym w elementach złącza naczyniowo-tkankowego fosfatazom nukleozydów, przypisuje się istotną rolę w czynności transportowej (Torack, Barrnett 1964). Zmiany w ich aktywności towarzyszą zaburzeniom przepuszczalności naczyń, występującym w obrzęku naczyniopochodnym (Ostenda, Szumańska 1975).

Wydawało się przeto celowe prześledzenie aktywności tych enzymów w mózgu zwierząt poddanych jednorazowemu zatruciu tlenkiem węgla,

u których w oparciu o spostrzeżenia Rapa i wsp. (1974) oczekiwać można obrzęku cytotoksycznego, przebiegającego bez uszkodzenia naczyniowo-tkankowych mechanizmów barierowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 18 szczurach rasy Wistar, samicach, o ciężarze ciała około 150 g, które poddano zatruciu tlenkiem węgla wg sposobu opisanego przez Korthalsa i wsp. (1973). Zwierzęta przebywały w komorze doświadczalnej, przez którą przepuszczano w okresie 60 min. powietrze atmosferyczne zawierające 1% CO. Przez dalsze 30 minut pobytu zwierząt w komorze zawartość CO ulegała stopniowemu zmniejszeniu, na skutek odcięcia dopływu tlenu węgla, przy zachowanym ciągłym przepływie powietrza atmosferycznego z dotychczasową szybkością 1 l/min.

Badany materiał pochodził od zwierząt zabijanych w 20 min pobytu w komorze doświadczalnej, w momencie zakończenia zatrucia (czas „0”) oraz po upływie 2, 4, 24 i 48 godzin od zatrucia. Każda grupa doświadczalna składała się z 3 zwierząt. Materiał kontrolny stanowiły szczury żyjące w warunkach zwierzętarnianych.

Pobrane bezpośrednio po dekapitacji mózgi dzielono na bloki tkankowe, cięciami w płaszczyźnie czołowej przechodzącymi na wysokości rozwiniętych jąder podstawy, skrzyżowania wzrokowego oraz mózdzku.

Materiał do badań histochemicznych w mikroskopie świetlnym zamrażano w sproszkowanym suchym lodzie, a następnie bloki tkanki skrawano w kriostacie na skrawki o grubości 14 μ . Skrawki przetrzymywano przez okres 60 minut w roztworach inkubacyjnych zawierających substraty niezbędne dla ujawnienia aktywności cytozynotrójfosfatazy (CTP-azy), guanozynotrójfosfatazy (GTP-azy) i inozynodwufosfatazy (IDP-azy), przygotowanych wg sposobu Wachsteina i Meisela (1957). Temperatura inkubacji 37°C.

Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano bloczki tkanki o grubości 1 mm, z okolicy czołowo-ciemieniowej, obejmujące korę mózgową i formacje podkorowe. Materiał utrwalano przez 2 godz. w roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym o pH 7,2, w temperaturze 4°C. Po utrwaleniu tkanek płukano przez noc w 0,3 M roztworze sacharozy w buforze kakodylowym o pH 7,2. Następnego dnia, z tak przygotowanego materiału pobierano wycinki tkankowe 1 mm³, obejmujące fragmenty kory i istoty białej podkorowej i inkubowano je w roztworach przygotowanych według tej samej metody jaką stosowano dla materiału do badań histochemicznych w mikroskopie świetlnym, z uwzględnieniem modyfikacji zaproponowanej przez Toracka i Barrnetta (1964).

Po inkubacji bloczki tkankowe płukano w sacharozie, a następnie na kilka sekund zanurzano je w 2% roztworze czterotlenku osmu w buforze kakodylowym o pH 7,2. Tak przygotowany materiał po jego rutynowym odwodnieniu zatapiano w Eponie 812 i skrawano na ultramikrotomie. Niekontrastowane ultracienkie skrawki oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A i Tesla 500 BS.

WYNIKI

Obraz histochemiczny w mikroskopie świetlnym

W grupie zwierząt kontrolnych wysoka aktywność cytozynotrójfosfatazy (CTP-azy) w naczyniach krwionośnych pozwala na prześledzenie ich przebiegu, określenie charakteru i różnicowanie właściwości angioarchitektoniki poszczególnych struktur morfologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Gęstą zróżnicowaną sieć naczyniową stwierdzono w korze mózgu, jądrach podstawy, zawoju hipokampa oraz w warstwach ziarnistej i zwojowej kory mózdzku (ryc. 1, 2, 3), w przeciwieństwie do ubogonaczyniowej istoty białej. Wysoką aktywność enzymatyczną stwierdzono w ścianach tętniczek, drobnych żył i naczyń włosowatych oraz na powierzchni zawartych w ich świetle erytrocytów. Zwracała jednak uwagę śladowa aktywność enzymu w komórkach śródbłonna. Ziarniste, nierównomiernie rozrzucone na błonie komórkowej i jądrowej produkty odczynu histochemicznego, wyznaczały umiarkowaną aktywność komórek Purkiniego (ryc. 4), komórek piramidowych kory nowej (ryc. 5) oraz komórek dwupiramidowych zawoju hipokampa. Nieznaczne nagromadzenie produktu końcowego reakcji, obserwowano ponadto w jąderkach i cytoplazmie neuronów oraz w neuropilu otaczającym komórki nerwowe. Drobne ziarenka produktu końcowego w otoczeniu naczyń włosowatych wyznaczały również fragmentarycznie błony jądrowe komórek glejowych. W istocie białej nie stwierdzano pozanaczyniowej aktywności enzymu, z wyjątkiem grubych pasm włókien nerwowych, zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie komory bocznej (ryc. 6).

Aktywność guanozynotrójfosfatazy (GTP-azy) występowała niemal wyłącznie w ścianach naczyń włosowatych i drobnych naczyń tętniczych i żylnych (ryc. 7), przy jej zupełnym braku w ścianach naczyń większego kalibru. Sporadycznie tylko obserwowano komórki nerwowe wykazujące słabą aktywność enzymatyczną, przy dyfuzyjnym charakterze odczynu histochemicznego.

Umiarkowana aktywność inozynodwufosfatazy (IDP-azy) charakteryzowała się rozmieszczeniem analogicznym jak GTP-aza (ryc. 8). Na-

gromadzenie produktu końcowego odczynu histoenzymatycznego obserwowano w ścianach drobnych naczyń krwionośnych, oraz na powierzchni nagromadzonych w ich świetle erytrocytów. Niska aktywność enzymatyczna występowała również w neuronach zawoju hipokampa. Ziarliste produkty końcowe reakcji rozmieszczone były na błonach komórkowej i jądrowej oraz w neuropilu otaczającym bezpośrednio komórki nerwowe.

U zwierząt zabijanych w 20 minucie zatrucia, odczyn histochemiczny ujawniający aktywność CTP-azy ulegał bardzo znacznemu obniżeniu zarówno w naczyniach krwionośnych (ryc. 9) jak i w jeszcze większym stopniu, w komórkach piramidowych kory mózgu, neuronach zawoju hipokampa, komórkach Purkiniego i w okołonacyniowym gleju. Zmniejszenie ilości ziarnistych produktów odczynu histoenzymatycznego, jak i zmiana jego charakteru z ziarnistego na dyfuzyjny, prowadziło do zatarcia zarysów komórkowych elementów strukturalnych OUN. Podobnie

Ryc. 1. Kora mózgu. Gęsta sieć naczyń krwionośnych wykazujących dodatni odczyn na CTP-azę; szczur kontrolny. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Cerebral cortex. Dense network of blood vessels revealing strong CTP-ase activity. Control rat. × 60.

Ryc. 2. Część czołowa zawoju hipokampa. Silna aktywność CTP-azy w naczyniach, komórkach nerwowych oraz w ich wypustkach. Szczur kontrolny. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Frontal part of hippocampal gyrus. Strong CTP-ase activity in the blood vessel walls, neurons and their processes. Control rat. × 200.

Ryc. 3. Warstwa ziarnista i zwojowa mózdzku. Gęsta sieć naczyń krwionośnych wykazujących silną aktywność CTP-azy. Szczur kontrolny. Pow. 100 ×.

Fig. 3. Granular and Purkinje cells layers of the cerebellum. Dense network of blood vessels showing strong CTP-ase activity. Control rat. × 100.

Ryc. 4. Mózdzek. Obok silnego odczynu ujawniającego aktywność CTP-azy w naczyniach, umiarkowana aktywność w komórkach Purkiniego. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 4. Cerebellum. In addition to the remarkable CTP-ase activity in blood vessel walls, moderate enzyme activity in Purkinje cells. Control rat. × 400.

Ryc. 5. Warstwa 2 i 3 kory mózgu. Aktywność CTP-azy w warstwie komórek piramidowych — w błonie komórkowej i jądrowej. Silny odczyn w naczyniach. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Second and third layers of cerebral cortex. Activity of CTP-ase in cell and nuclear membranes of pyramidal neurons. Strong enzyme activity in vascular walls. Control rat. × 400.

Ryc. 6. Dodatni odczyn na CTP-azę we włóknach nerwowych istoty białej w sąsiedztwie komory bocznej. Szczur kontrolny. Pow. 200 ×.

Fig. 6. CTP-ase activity in the white matter nerve fibers in the vicinity of the lateral ventricle. Control rat. × 200.

Ryc. 7. Aktywność GTP-azy w naczyniach kory mózgowej. Śladowa reakcja w elementach komórkowych. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

Fig. 7. GTP-ase activity in cortical blood vessels. Traces of enzyme activity in cellular elements of the cerebral cortex. Control rat. × 400.

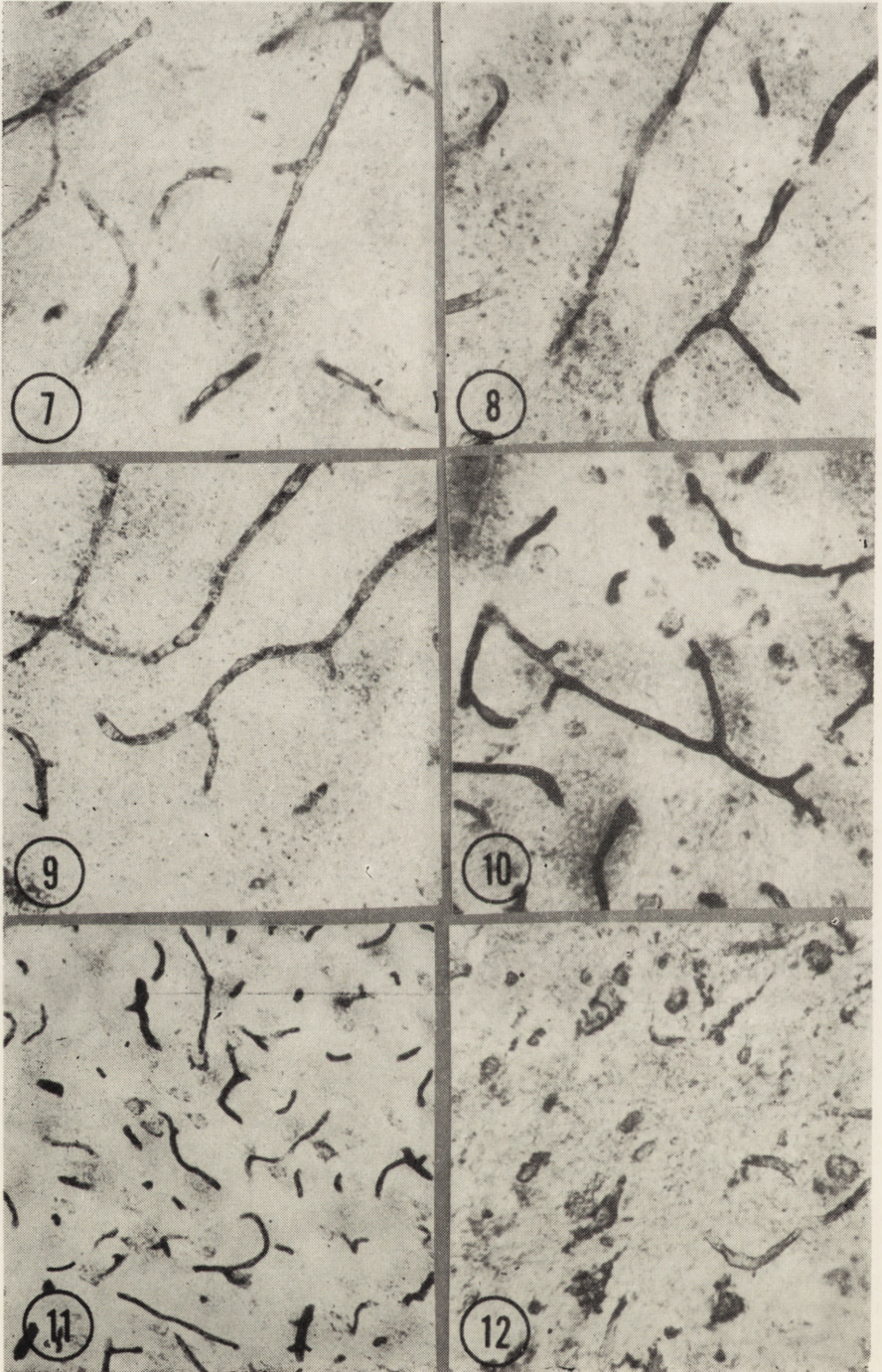
Ryc. 8. Umiarkowana aktywność IDP-azy w naczyniach kory mózgowej. Szczur kontrolny. Pow. 400 ×.

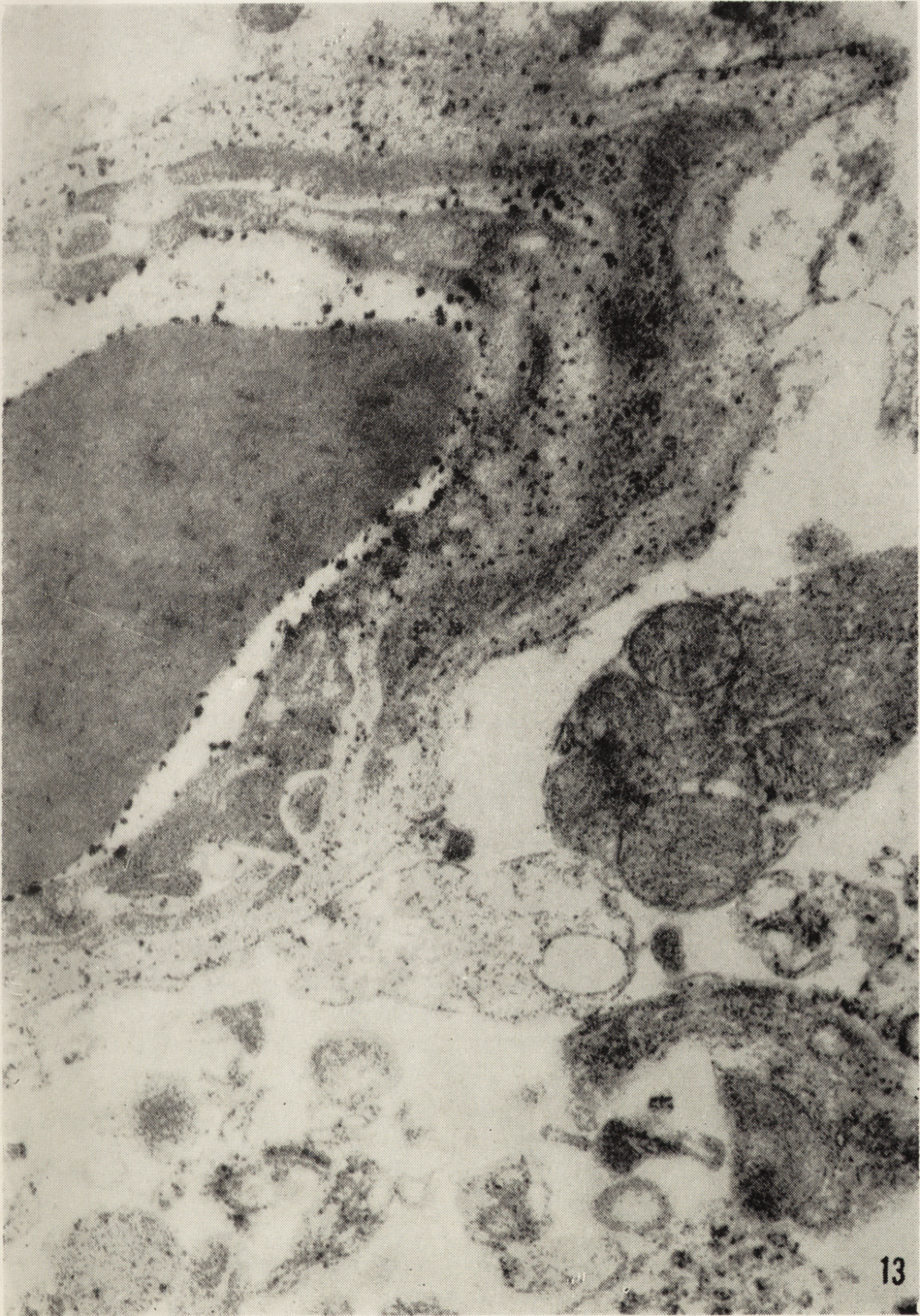
Fig. 8. Moderate IDP-ase activity in the cortical blood vessels. Control rat. × 400.

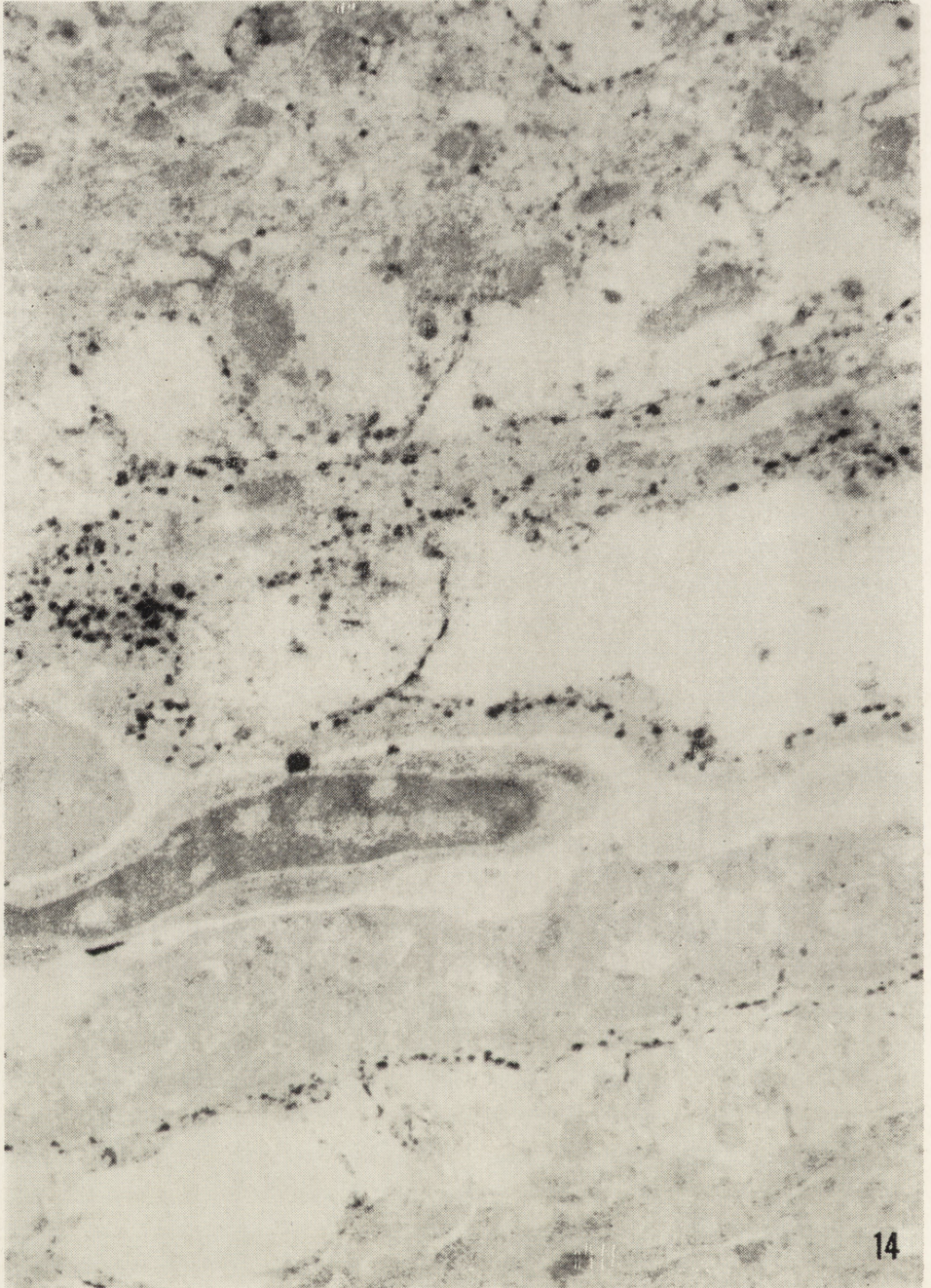
Ryc. 9. Obniżenie aktywności CTP-azy w naczyniach kory mózgowej i elementach komórkowych po 20 minutach zatrucia (porównaj ryc. 5). Pow. 400 ×.

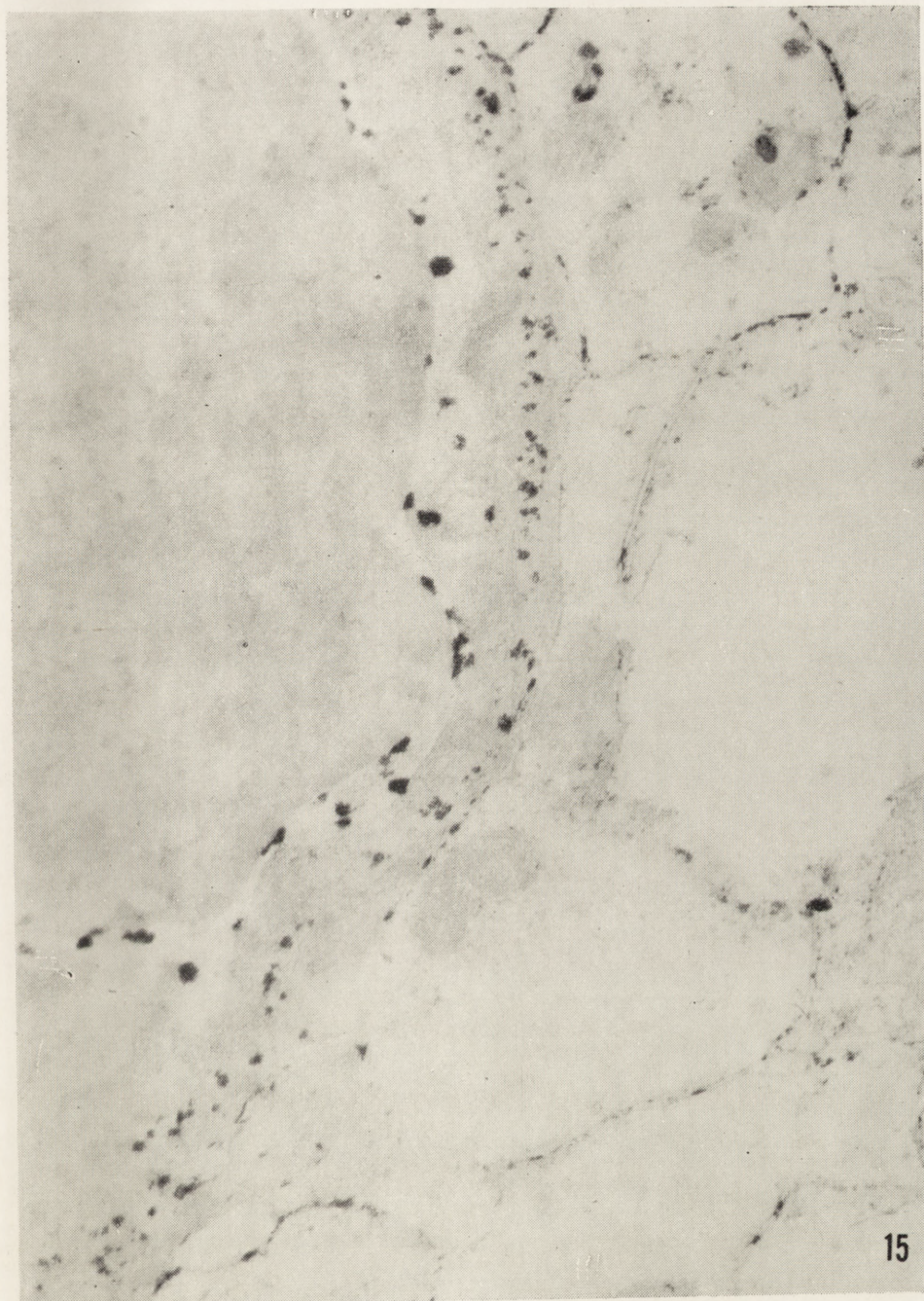
Fig. 9. Decrease of CTP-ase activity in vascular walls and cellular elements of the cerebral cortex at 20th min of CO poisoning (see fig. 5). × 400.

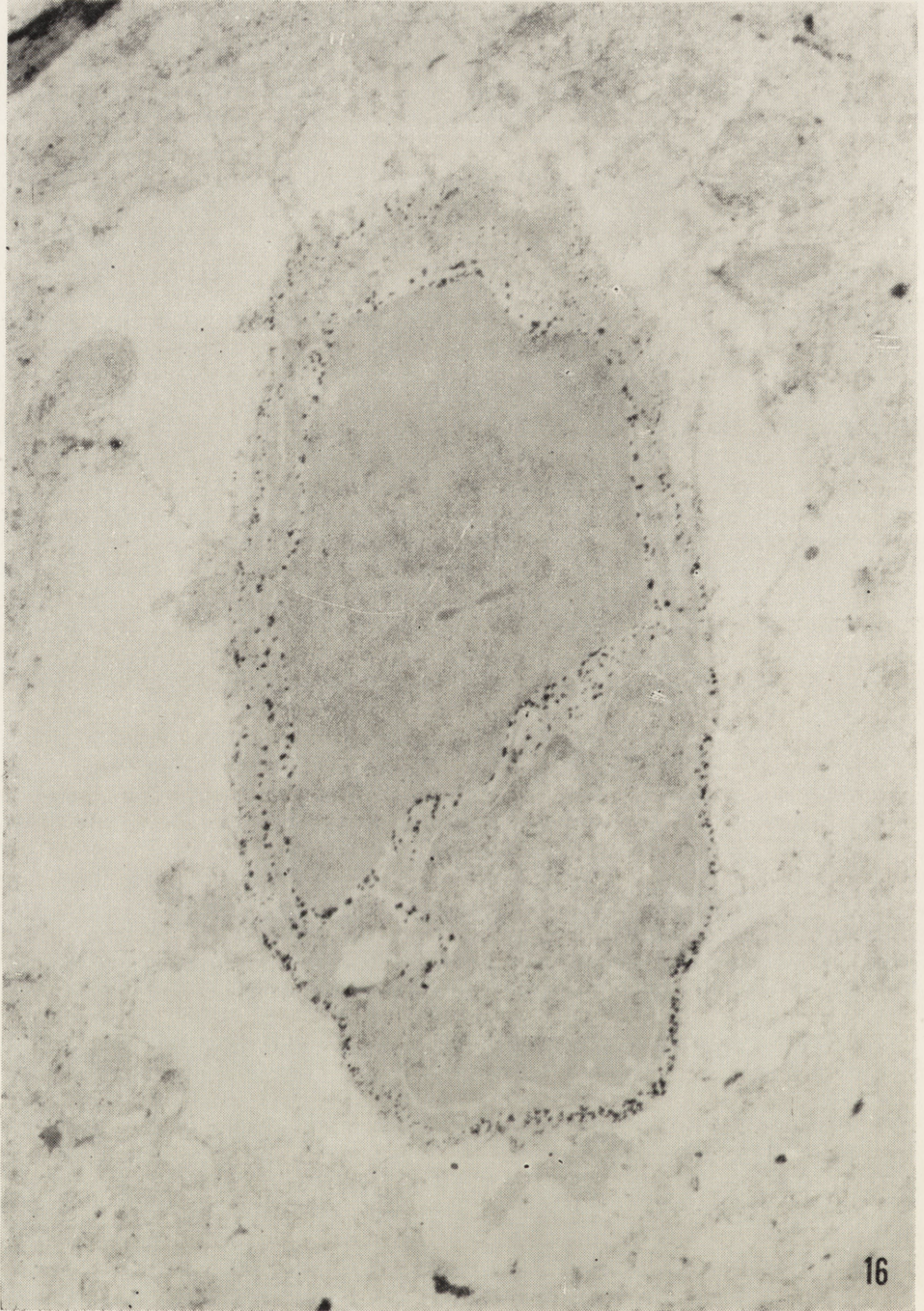












bardzo znacznie osłabił odczyn ujawniający aktywność GTP-azy w sieci naczyniowej mózgu. Natomiast bardzo znacznie wzrastała aktywność IDP-azy w ścianie naczyń mózgowych przede wszystkim w naczyniach kory mózgu, o promienistym w stosunku do jej powierzchni przebiegu (ryc. 10). Silniejszy był również odczyn histochemiczny w komórkach nerwowych, zwłaszcza w neuronach zawoju hipokampa. Pojawiała się aktywność enzymu w komórkach glejowych spoidła wielkiego, nie uwiadaczająca się u zwierząt kontrolnych.

W czasie „0” oraz 2 i 4 godzinie po zatruciu obserwowano wzmożenie odczynu histochemicznego ujawniającego aktywność CTP-azy i GTP-azy, którego intensywność przypominała obrazy spostrzegane u zwierząt kontrolnych (ryc. 11). Zwracał jednakże uwagę nierównomierny rozkład produktu reakcji enzymatycznej w ścianach naczyń krwionośnych. Wzdłuż przebiegu naczyń włosowatych widoczne były odcinki o wyso-

Ryc. 10. Wzrost aktywności IDP-azy w naczyniach kory mózgu i elementach komórkowych po 20 minutach zatrucia (por. ryc. 8). Pow. 400 X.

Fig. 10. Increased IDP-ase activity in vascular walls and cellular elements of the cerebral cortex at 20th min of CO intoxication (see fig. 8). X 400.

Ryc. 11. Wzrost aktywności CTP-azy w naczyniach i komórkach w porównaniu do kontroli; 2 godz. po zatruciu. Pow. 200 X.

Fig. 11. Increased, as compared to the control animals, activity of CTP-ase in the vascular walls and cellular elements of the cerebral cortex. Two hours following carbon monoxide intoxication. X 200.

Ryc. 12. Aktywność GTP-azy w korze mózgu w 4 godz. po zatruciu. Wzdłuż przebiegu kapilarów widoczne odcinki o wysokiej aktywności i miejsca wykazujące śladowy odczyn. Podobne zróżnicowanie aktywności enzymatycznej w komórkach nerwowych i glejowych. Pow. 400 X.

Fig. 12. Activity of GTP-ase in cerebral cortex 4 hours following carbon monoxide intoxication. Fragments of capillary reveal high enzyme activity, the other ones demonstrate trace enzyme activity. The differences in the activity of enzyme concern also nerve and glial cells. X 400.

Ryc. 13. Aktywność CTP-azy wyrażona w postaci elektronooptycznie gęstych stratów w błonie podstawnej naczynia. Szczur kontrolny. Pow. 48 000 X.

Fig. 13. CTP-ase activity demonstrated as electron dense deposits localized in the basal membrane of the capillary vessel. Control rat. X 48 000.

Ryc. 14. Produkt reakcji enzymatycznej znajduje się w błonie podstawnej naczynia oraz na błonach komórek glejowych otaczających naczynie, wypełniając przestrzenie międzykomórkowe; 20 minut zatrucia. IDP-aza. Pow. 7 000 X.

Fig. 14. Products demonstrating IDP-ase activity are visible in the basal membrane of the capillary wall and membranes of surrounding glial cells filling extracellular spaces; 20th min of carbon monoxide intoxication. X 7 000.

Ryc. 15. Produkt reakcji enzymatycznej znajduje się w błonie podstawnej, na powierzchni krwinki czerwonej oraz na błonach komórek glejowych, wypełniając okolonaczyniowe przestrzenie pozakomórkowe; 20 minut zatrucia. IDP-aza. Pow. 7 000 X.

Fig. 15. Deposits demonstrating IDP-ase activity are present in the basal membrane of the capillary wall, on the surface of the red blood cell and on the membranes of perivascular glia, filling adjacent intermembraneous spaces. Rat at 20th min of carbon monoxide intoxication. X 7 000.

Ryc. 16. Aktywność IDP-azy zlokalizowana w błonie podstawnej włóscizki oraz na powierzchni krwinki czerwonej, podobnie jak w materiale kontrolnym, 24 godz. po zatruciu. Pow. 7 000 X.

Fig. 16. Activity of IDP-ase localized in capillary basal membrane and on the surface of erythrocyte 24 hours following carbon monoxide poisoning. X 7 000.

kiej aktywności obok miejsc o śladowym jedynie odczynie. To samo zróżnicowanie odczynu histochemicznego dotyczyło jąder komórek nerwowych i glejowych (ryc. 12). Niektóre z nich w odczynie na CTP-azę miały ostro i wyraźnie zarysowaną błonę jądrową, sugerując wzrost aktywności enzymatycznej w stosunku do kontroli, podczas gdy w innych stwierdzano jedynie śladową ilość złogów produktu końcowego reakcji. W tych samych przedziałach czasowych odczyn na IDP-azę przypominał obrazy spostrzegane w materiale kontrolnym.

U zwierząt zabijanych w 24 godzinie po zatruciu obraz reakcji histochemicznej na CTP-azę i GTP-azę zbliżony był do obrazu charakterystycznego dla zwierząt, które nie uległy zatruciu CO, z tym jednak, że nadal występował nierównomierny rozkład produktu końcowego odczynu w pojedynczych naczyniach włosowatych. Pełną normalizację obrazu histochemicznego stwierdzono natomiast u zwierząt zabijanych po 48 godzinach.

Obraz histochemiczny w mikroskopie elektronowym

U zwierząt kontrolnych, aktywność badanych enzymów dla wszystkich trzech substratów wykazywała podobne umiejscowienie. Stwierdzono ją w ścianach naczyń krwionośnych, na powierzchni i w samej *membrana basalis*, przy jej braku w komórkach śródbłónka oraz na powierzchni erytrocytów występujących w świetle naczyń (ryc. 13). Aktywność enzymatyczna występowała również w jądrach komórek nerwowych i glejowych, zlokalizowana przede wszystkim na błonie jądrowej, jak również w zbiornikach i kanałach zespołu Golgiego neurocytów. Produkty reakcji enzymatycznej były zwykle drobnoziarniste, jedynie w skrawkach inkubowanych w roztworach zawierających inozynodwufosforan, tworzyły się niekiedy gruboziarniste konglomeraty o dużej gęstości elektrono-ptycznej.

U zwierząt zabitych w 20 minucie zatrucia produkty reakcji enzymatycznej, obok ich rozmieszczenia w błonie podstawnej naczyń włosowatych, występowały obficie na błonach komórek glejowych otaczających naczynia, wypełniając okołonaczyniowe przestrzenie międzybłonowe (ryc. 14 i 15). W tej grupie czasowej aktywność enzymatyczna występowała również w jądrach komórek oraz w kanałach zespołu Golgiego, zarówno komórek nerwowych jak i glejowych.

W czasie „0” nie stwierdzono istotnych zmian w lokalizacji aktywności badanych enzymów. Wydawało się jednak, że zarówno w porównaniu z grupą kontrolną jak i grupą badaną w czasie ekspozycji na działanie tlenku węgla, znacznie mniejsza ilość naczyń wykazywała aktywność enzymatyczną. W dwie godziny po ekspozycji na działanie CO zwraca-

cało uwagę bardzo znaczne nagromadzenie produktu reakcji w jądrach komórkowych oraz ich znaczny ubytek w ścianach naczyń krwionośnych. Sporadycznie pojawiały się one również w śródbłonkach naczyńniowych. Aktywność enzymatyczną jąder komórek charakteryzowało wybitne zróżnicowanie intensywności. Obok jąder pokrytych produktami odczynu histoenzymatycznego, stwierdzano jądra całkowicie ich pozbawione. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w tej właśnie grupie czasowej w preparatach kontrastowanych, stwierdzano zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym mitochondriów, wyrażające się ich obrzmieniem i ubytkiem grzebieni, oraz poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej.

U zwierząt z 4-godzinnym przeżyciem obraz histochemiczny na poziomie ultrastrukturalnym był podobny do stwierdzanego w 2 godziny po ekspozycji na działanie CO. Odczyn w ścianie naczyńniowej nadal słaby, był umiejscowiony w błonie podstawnej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przedziale czasowym 0—4 godz. po zatruciu, zmniejszała się ilość produktów końcowych reakcji zlokalizowanych na błonach gleju okołonaczyńniowego i wypełniających przynaczyńniowe przestrzenie międzybłonowe. Podobnie w tych grupach czasowych nie obserwowano aktywności hydrolaz w zbiornikach i kanałach zespołu Golgiego neurocytów i gleju.

W grupie zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem aktywność badanych enzymów występowała w licznych naczyniach krwionośnych, wykazując umiejscowienie identyczne jak u zwierząt niezatrutowanych (ryc. 16). Bardzo rzadko produkty reakcji enzymatycznej zlokalizowane były w błonach okołonaczyńniowego gleju, wypełniając przestrzenie międzybłonowe. Aktywność hydrolaz stwierdzano również w jądrach komórek nerwowych i glejowych przede wszystkim na błonach jądrowych i w okolicy jąderka.

W żadnej grupie czasowej zespoleń międzyśródbłonkowe naczyń włosowatych nie zawierały produktów reakcji enzymatycznej.

OMÓWIENIE

Przedstawione powyżej obserwacje wskazują, że ostre zatrucie tlenkiem węgla prowadzi do stosunkowo niegłębokich i przejściowych zaburzeń w aktywności badanych dwu- i trój-fosfataz nukleozydowych, którym przypisuje się istotny udział w czynności transportowej przez złącza naczyńniowo-tkankowe w ośrodkowym układzie nerwowym (Torack, Barnett 1964). Zaburzenia te charakteryzuje określona dynamika w czasie po zatruciu i ich cofanie się po upływie 48 godzin.

We wczesnej fazie zatrucia, przypadającej na okres uogólnionego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (Mossakowski 1975), wyrażają się one spadkiem aktywności CTP-azy i GTP-azy w ścianie naczyń

krwionośnych, widocznym na poziomie mikroskopu świetlnego oraz pojawieniu się aktywności enzymatycznej na błonach komórkowych gleju okołonaczyniowego, stwierdzanym w badaniach mikroskopowo-elektronowych. Być może to ostatnie zjawisko uznać należy, za wykładnik czynności kompensacyjnych, związanych ze spadkiem aktywności enzymatycznej w elementach strukturalnych ściany naczyniowej. W przedziale czasowym 0—4 godziny po zatruciu wzorzec reakcji enzymatycznej w elementach złącza naczyniowo-tkankowego ulega zmianie. W obrazach z mikroskopu świetlnego zmiana ta wyraża się nierównomiernym spadkiem aktywności histoenzymatycznej, obejmującym poszczególne naczynia lub ich odcinki. W mikroskopie elektronowym, obok nierównomiernego występowania aktywności enzymów w poszczególnych naczyniach, stanowiącego odpowiednik zmian z mikroskopu świetlnego, obserwuje się obniżenie aktywności enzymatycznej w błonie podstawnej kapilarów i stopniowe jej zmniejszanie się w błonach komórkowych gleju okołonaczyniowego. Zmiany powyższe przypadają na tę fazę nieprawidłowości mikrokrazenia mózgowego, w której dominują ogniskowe zaburzenia ukrwienia mózgu, nałożone na cechy jego uogólnionego przekrwienia (Mossakowski 1975).

W świetle poglądów Toracka i Barnetta (1964) oraz Gabryela (1973), stojących na stanowisku, że spadek lub brak aktywności hydrolaz w ścianie naczyniowej, a zwłaszcza w błonie podstawnej kapilarów, stanowi wskaźnik upośledzenia przeznaczyniowego transportu substancji, należy przyjąć, iż w okresie między zakończeniem zatrucia a 4 godziną po zatruciu dochodzić może do zaburzenia czynności transportu czynnego. Przypadają one na okres narastania zawartości wody w tkance, poprzedzony jej statystycznie znamionym spadkiem obserwowanym w czasie „0”. Poprzedzają one jednak jej maksymalny przyrost, stwierdzany w 12 godzinie po zatruciu (Rap i wsp. 1974). Przyrost zawartości wody w tkance, przy równoczesnym braku zmian przepuszczalności naczyń dla białkowych znaczników barierowych, wskazuje na cytotoksyczny charakter obrzęku, rozwijający się w zastosowanych warunkach zatrucia. Być może przeto, obserwowane przez nas zmiany stanowią histochemiczny wykładnik zaburzeń przepuszczalności naczyń, występujących w obrzęku cytotoksycznym. Różnią się one w sposób istotny od zmian obserwowanych w obrzęku naczyniopochodnym, któremu towarzyszy zanik aktywności hydrolaz w błonach podstawnych kapilarów i pojawienie się jej w komórkach śródbłonek (Ostenda, Szumańska 1975). Stwierdzony przez nas typ zmian histoenzymatycznych w elementach złącza naczyniowo-tkankowego w warunkach doświadczonego zatrucia tlenkiem węgla, nie prowadzącego do nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych, a jedynie do odwracalnych zaburzeń metabolicznych

(Albrecht 1973, Szumańska 1973, Śmiałek i wsp. 1973) nie przesądza oczywiście o ich charakterze przy głębszym zatruciu, w którym Korthals i wsp. (1973) obserwowali mikroskopowo-elektronowe wykładniki obrzęku naczyniopochodnego.

Nieprawidłowości histoenzymatyczne dotyczące komórek nerwowych i gleju, obserwowane do 4 godziny po zatruciu i wyrażające się w mikroskopie świetlnym obniżeniem aktywności enzymatycznej neuronów, a w mikroskopie elektronowym spadkiem aktywności enzymatycznej w aparacie Golgiego w neurocytach i komórkach glejowych oraz zmianami aktywności jąder komórkowych są trudne do wyjaśnienia w oparciu o dotychczasowe rozważania.

Wydaje się słuszne odnosić je do uszkodzenia cytomembran komórkowych, w których zlokalizowane są nukleozydofosfatazy (Szczeklik 1974). Czynnikiem uszkadzającym w tym przypadku może być zarówno hypoksemia anemiczna, związana z blokowaniem hemoglobiny przez tlenek węgla, jak i jego bezpośrednie działanie toksyczne na elementy komórkowe tkanki nerwowej i glejowej, lub wreszcie współdziałanie obu czynników (Korthals i wsp. 1973). Podobieństwo uszkodzeń ultrastrukturalnych ze zmianami stwierdzanymi w materiale z hodowli pozaustrojowej (Korthals i wsp. 1973b) popiera ewentualność toksycznego działania CO. Za taką interpretacją przemawia ponadto obecność w naszym materiale uszkodzeń innych organelli subkomórkowych, przede wszystkim mitochondriów, korespondujących z opisanym przez Szumańską (1973) spadkiem aktywności oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej.

Г. Шуманьска, М. Остенда, М. Я. Моссаковски

АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЗИД-ДИ- И ТРИФОСФАТАЗ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

На уровне оптического и электронного микроскопов была прослежена активность нуклеозидных дву- и трифосфатаз в элементах сосудисто-мозгового соединения у крыс, подвергнутых однократному отравлению окисью углерода.

В оптическом микроскопе было обнаружено на 20 минуте отравления снижение активности ферментов в стенках кровеносных сосудов и клеточных элементах центральной нервной системы, и возрастание ее вновь в период между временем „0” и 4 часом после отравления. Обращало на себя внимание неравномерное распределение конечного продукта гистоэнзиматической реакции в стенках кровеносных сосудов в период после отравления.

В электронно-микроскопической картине можно было наблюдать, что электронно-плотные осадения, определяющие активность исследуемых ферментов, были локализованы на 20-ой минуте отравления в базальной мембране капилляров и клеточных оболочках околососудистой астроцитной глии, обильно заполняя межклеточное пространство. Период после отравления характеризо-

вался неравномерностью распределения продуктов гистоэнзиматической реакции в базальной мембране отдельных капилляров вплоть до полного их отсутствия, уменьшением количества отложений в оболочках околососудистых глиальных клеток и изменениями в распределении в субклеточных структурах нейронов и глии. Через 24 часа после отравления электронно-микроскопическая картина активности исследуемых ферментов в мозге экспериментальных животных не отличалась от наблюдаемой у контрольных животных.

G. Szumańska, M. Ostenda, M. J. Mossakowski

ACTIVITY OF NUCLEOSIDE PHOSPHATASES IN RAT BRAIN FOLLOWING CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Summary

The studies concerned the activity of nucleoside phosphatases in cellular elements of the blood-brain interphase in rats subjected to carbon monoxide intoxication.

On the light microscopy significant reduction of enzymatic activity in the blood vessel walls and in cellular elements of the nerve tissue was observed at 20th min of CO poisoning. This was followed by its increase observed in the period between the end of intoxication and 4th hour of recovery. Normalization of the histochemical picture was noted 24 and 48 hours following CO poisoning.

On electron microscopy level at 20th min of intoxication deposits indicating the site of enzyme activity were localized in the basal membranes of capillaries as well as on the cell membranes of perivascular glia, being accumulated in intermembraneous spaces. First hours of the postintoxication period were characterized by significant reduction of the electron dense deposits in the capillary basal membranes, their unequal distribution, progressive diminution of their accumulation on the cell membranes of perivascular glia and by their abnormal distribution in neurons and glial cells. At 24th hr following intoxication electron microscopic picture of the enzymatic activity in experimental animals did not show any differences as compared to the control ones.

The above presented enzymatic changes in cellular elements of the blood-brain interphase have been considered as abnormalities accompanying the evolution of cytotoxic brain edema occurring in those experimental conditions.

PISMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
2. Gabryel P.: „Bariera krew-mózg” struktura i funkcja. *Pat. Pol.* 1973, 24, 218—235.
3. Jacob H.: Das Nervensystem bei Infectionen, Intoxicationen und anderen Allgemein- und Organerkrankungen. W Hdb. der Spez. Path. Anatomie. Red. O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle. Springer, Berlin 1958, 13, 2A.
4. Jacob H., Mumme C., Solcher H.: Entmarkung bei zerebralen Oedemschaden. *Arch. Z. ges. Neurol.* 1962, 203, 311—320
5. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczałnej encefalopatii tlenkowejłowej. *Neuropat. Pol.* 1973a, 11, 279—300

6. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973b, 11, 315—322
7. Miyagishi T., Suwa N.: Electron microscopic studies on the cerebral lesions of rats in experimental carbon monoxide poisoning. *Acta neuropath. (Berlin)* 1969, 14, 118—125
8. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla u szczurów. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—250
9. Ostenda M., Szumańska G.: Lokalizacja ultrastrukturalna aktywności enzymów hydrolizujących estry fosforanowe w mózгах królików po przebytej hipoksji. *Neuropat. Pol. w druku*
10. Rap. Z., Kapuściński A., Sikorska M.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartości wody w mózgu w doświadczalnym ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 403—412
11. Schwedenberg T. M.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1959, 18, 597—608
12. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—314
13. Smialek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose-glycogen glucosyltransferase activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—231
14. Szczeklik F.: *Enzymologia Kliniczna*. Warszawa, PZWL 1974
15. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1964, 23, 46—59
16. Van Bogaert L.: La methode histopathologique et les problems des maladies de la substance blanche. *J. Belg. de Neurol.* 1947, 47, 82—110

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