

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

## MORFOLOGIA I HISTOCHEMIA USZKODZEŃ GLEJU WYWOŁANYCH CYJANKIEM SODU W HODOWLI TKANKOWEJ

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

Zatrucie cyjankiem prowadzi do ciężkich zaburzeń metabolizmu komórki w następstwie blokowania istotnych ogniw wewnątrzkomórkowych przemian tlenowych. Uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, rozwijające się w doświadczalnym zatruciu cyjankami manifestują się występowaniem ognisk martwicy i demielinizacji (Lumsden, 1950; Levine, 1967, Hirano i wsp., 1967, 1968), którym towarzyszą strukturalne i histochemiczne zmiany neurogleju. Dotychczasowe badania histoenzymatyczne, prowadzone w warunkach *in vivo*, między innymi przez van Hutena i Friede (1963), Ibrahima i wsp. (1963) oraz Wendera i wsp. (1972, 1973) przyniosły niejednorodne, a niekiedy kontrowersyjne spostrzeżenia, uzasadniające odmienną interpretację roli i udziału neurogleju w procesach patologicznych rozwijających się w ośrodkowym układzie nerwowym w następstwie zatrucia cyjankami.

Wydawało się przeto celowe przeprowadzenie serii doświadczeń na tkance glejowej hodowanej *in vitro* oraz przesłedzenie w niej zmian strukturalnych i histochemicznych rozwijających się w następstwie jednorazowego krótkotrwałego zatrucia cyjankiem sodu.

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowli tkankowej mózdków jednodniowych noworodków szczurzych, prowadzonej we flaszkach Carrela w sposób standardowy wg metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Wyselekcjonowane hodowle w 7, 14 i 21 dniu przetrzymywania *in vitro* przenoszono do środowiska odżywczego zawierającego cyjanek sodu, w stężeniu końcowym wynoszącym  $10^{-3}M$ . Dawkę cyjanku wyliczono w oparciu o dane z pracy Ybata i wsp. (1971). Po 1 godzinnym przetrzymywaniu hodowli w medium zawierającym cyjanek, hodowle splukiwano w roztworze wieloelektrolitowym Earla ogrzanym do temp.  $37^{\circ}C$  i poddawano bezpośrednio opracowaniu technicz-

nemu, lub przenoszono do standardowego środowiska odżywczego na okres 24 i 72 godzin oraz 7 dni.

Badanie histologiczne obejmowało barwienie błękitem toluidyny oraz impregnację solami srebra wg sposobu Gallyasa hodowli utrwalonych uprzednio w roztworze Carnoya. Reakcję PAS wg Mc Mannusa i PAS-dimedon wg Bulmera (1959) przeprowadzono na hodowlach utrwalonych w płynie Rossmanna. Badanie histoenzymatyczne, wykonane na nie utrwalonych hodowlach obejmowało aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (Scarpelli i wsp. 1958), mleczanowej i glukozy-6-fosforanowej (Hess i wsp. 1958), oksydazy cytochromowej (Burstone 1960) oraz fosfatazy kwaśnej wg Gomoriego (Holt i wsp. 1959).

Materiał kontrolny stanowiły hodowle, z tych samych serii co materiał doświadczalny, przetrzymywane w standardowym medium odżywczym i poddawane opracowaniu histologicznemu i histochemicznemu w odpowiednich grupach równocześnie z hodowlami doświadczalnymi.

#### WYNIKI

##### *Obraz histologiczny*

W hodowlach badanych bezpośrednio po zatruciu większość komórek glejowych wykazuje wyraźne osłabienie barwliwości błękitem toluidyny-

*Ryc. 1.* Obrzmiałe, słabo barwiące się komórki glejowe strefy wzrostu, których cytoplazma zawiera liczne wodniczki. Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×.

*Fig. 1.* Pale, swollen glial cells from the outgrowth zone, containing vacuoles in the cytoplasm; 1-week culture, immediately after cyanide intoxication. Toluidine blue. × 200.

*Ryc. 2.* Astrocyty ze zwyrodnieniem wodniczkowym cytoplazmy. Hodowla 2-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×.

*Fig. 2.* Vacuolar degeneration of the astrocytes; 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. Toluidine blue. × 400.

*Ryc. 3.* Komórki glejowe z licznymi wodniczkami w cytoplazmie. Obok dobrze utrzymane komórki. Hodowla 2-tygodniowa po 24 godz od zatrucia cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×.

*Fig. 3.* Vacuolar degeneration in some glial cells, the remaining cells with normal morphological picture; 2-week culture, 24 h following cyanide intoxication. Toluidine blue. × 200.

*Ryc. 4.* „Sygnetowate” komórki glejowe w 3-tygodniowej hodowli w 24 godz. po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×.

*Fig. 4.* „Ring-like” glial cells in 3-week culture, 24 h following cyanide intoxication. Toluidine blue. × 400.

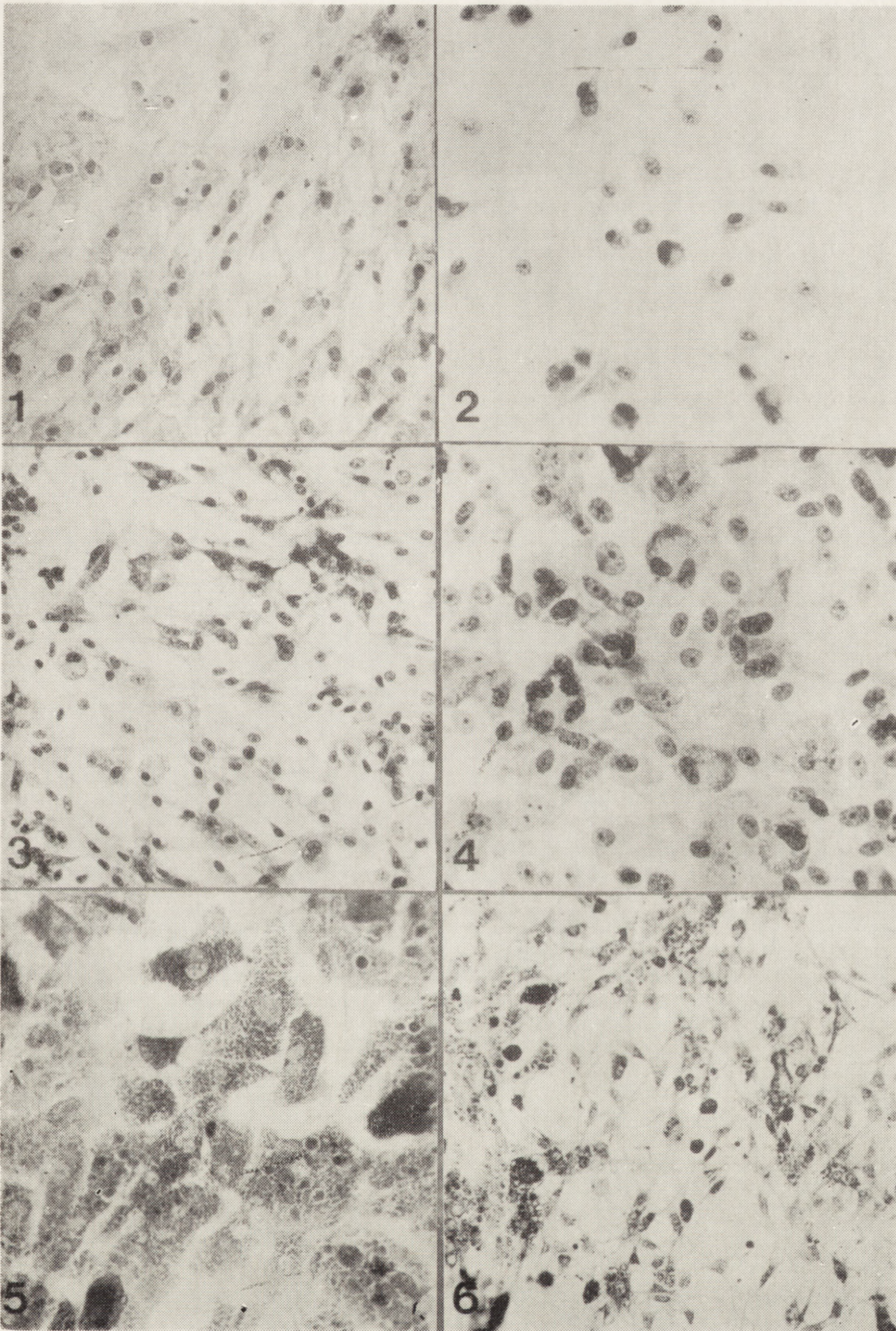
*Ryc. 5.* Obrzmiałe komórki glejowe z obfitymi PAS-dodatnimi ziarnistościami. Liczne, PAS-dodatnie kuliste twory w cytoplazmie komórek. Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. PAS. Pow. 400 ×.

*Fig. 5.* Swollen astrocytes from 1-week culture immediately after cyanide intoxication, their cytoplasm loaded with PAS-positive granules and globules. PAS. × 400.

*Ryc. 6.* Kuliste twory PAS-dodatnie w cytoplazmie dobrze utrzymanych astrocytów w hodowli 3-tygodniowej w 3 dni po zatruciu. PAS. Pow. 200 ×.

*Fig. 6.* PAS-positive globules in morphologically normal astrocytes; 3-week culture, 3 days following intoxication. PAS. × 200.

ny (ryc. 1) i zdolności impregnacyjnych solami srebra. W hodowlach 1- i 2-tygodniowych niemożliwe jest rozróżnienie rodzaju patologicznie zmienionych komórek glejowych, podczas gdy w hodowlach 3-tygodnio-



wych wydaje się, że uszkodzenie w większym stopniu dotyczy oligodendrocytów. Cytoplazma zmienionych komórek glejowych jest obrzmiała i blada. W większości spośród nich ma ona piankowaty wygląd, spowodowany obecnością bardzo licznych, drobnych wodniczek (ryc. 2). Obrysy komórek są zaokrąglone, liczne z nich nie mają wypustek, lub tylko ich krótkie, pogrubiałe fragmenty. Jądra komórkowe są również często obrzmiałe, powiększone i ubogochromatynowe. Już w tym okresie pojawiają się nieliczne komórki „sygnetowate”, charakteryzujące się obwodowym usytuowaniem jądra i zagęszczeniem substancji barwliwej pod błoną komórkową. We wszystkich grupach hodowli zwraca uwagę lepsze utrzymanie komórek eksplantatu. Zjawisko to najwyraźniej występuje w hodowlach 1-tygodniowych, w których prawie cała populacja komórkowa strefy wzrostu jest uszkodzona. W hodowlach starszych bardziej charakterystyczny jest mozaikowy rozkład uszkodzeń.

Hodowle z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu charakteryzuje opisany powyżej wzorec uszkodzeń strukturalnych (ryc. 3). Zmiany wydają się jednakże nieco mniej nasilone. Zwiększa się liczba komórek bezwypustkowych i sygnetowatych (ryc. 4). W hodowlach 2- i 3-tygodniowych zmniejsza się populacja oligodendrocytów. Obecnie są natomiast duże, okrągłe, lub owalne jedno-, rzadziej kilkujądrazyste przerosłe astrocyty. Zwiększa się liczba makrofagów i makrofagopodobnych komórek gwiaździstych.

*Ryc. 7.* Wysoka aktywność oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 2-tygodniowej hodowli, bezpośrednio po zatruciu. Pow. 200 ×.

*Fig. 7.* High cytochrome oxidase activity in glial cells in 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. × 200.

*Ryc. 8.* Prawidłowa aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach glejowych 2-tygodniowej hodowli, bezpośrednio po zatruciu. Pow. 200 ×.

*Fig. 8.* Normal succinate dehydrogenase activity in glial cells from 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. × 200.

*Ryc. 9.* Wybitnie obniżona aktywność oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 2-tygodniowej hodowli, po upływie 24 godz. od zatrucia. Pow. 200 ×.

*Fig. 9.* Pronounced decrease of cytochrome oxidase activity in glial cells from 2-week culture, 24 h following cyanide intoxication. × 200.

*Ryc. 10.* Wybitne obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w populacji komórek glejowych 2-tygodniowej hodowli w 24 godz. po zatruciu. Pow. 100 ×.

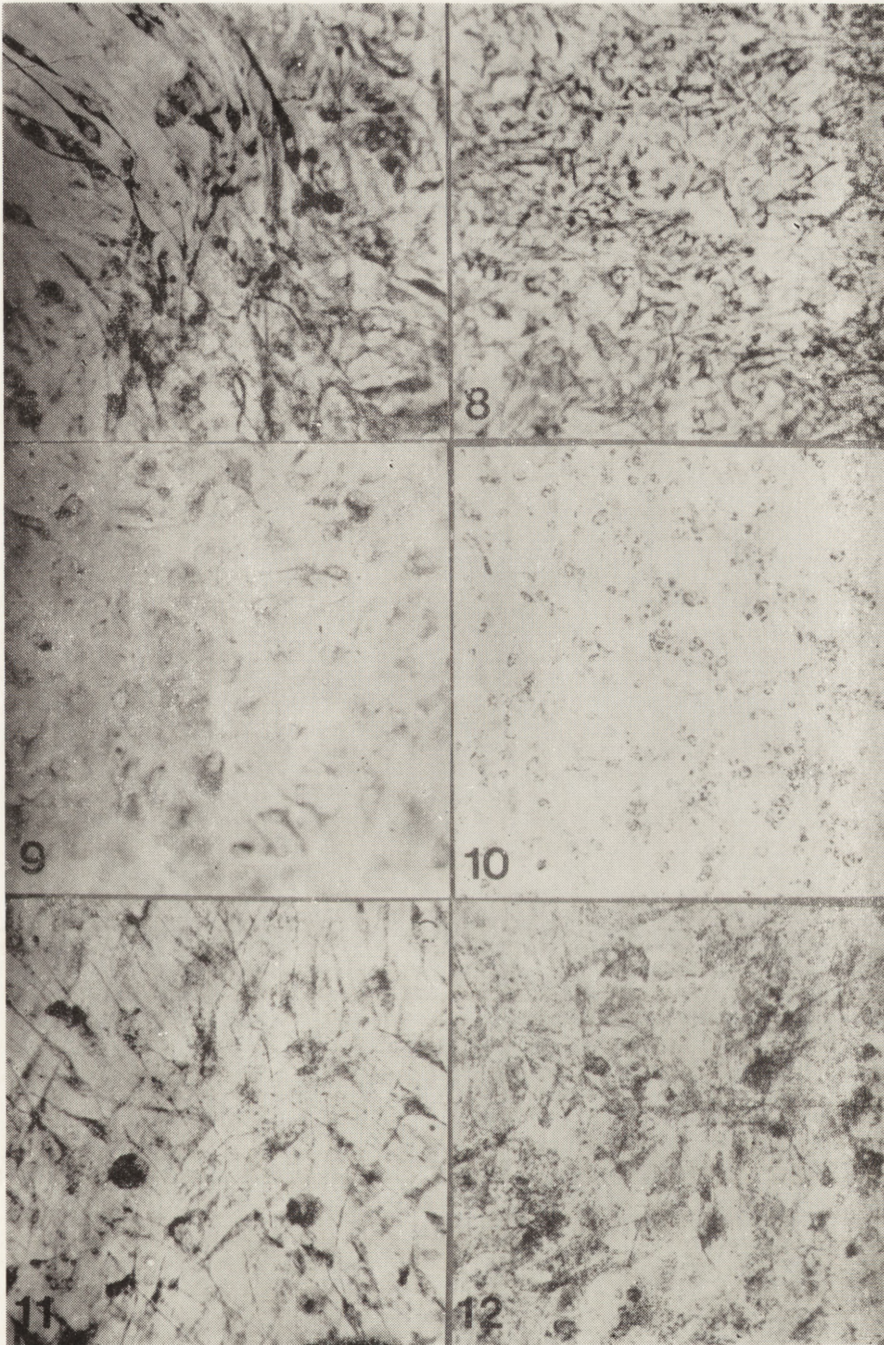
*Fig. 10.* Remarkable reduction of succinate dehydrogenase activity in glial population from 2-week culture, 24 h following intoxication. × 100.

*Ryc. 11.* Poprawa aktywności oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 3-tygodniowej hodowli, w 7 dni po zatruciu. Pow. 200 ×.

*Fig. 11.* Amelioration of cytochrome oxidase activity in glial cells from 3-week tissue culture, 7 days following cyanide intoxication. × 200.

*Ryc. 12.* Znaczna poprawa aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach glejowych w 3-tygodniowej hodowli, 7 dni po zatruciu. Pow. 200 ×.

*Fig. 12.* Remarkable amelioration of succinate dehydrogenase activity in glial cells from 3-week culture, 7 days following cyanide intoxication. × 200.



Po upływie 3 dni od zatrucia we wszystkich grupach hodowli utrzymują się nadal opisane zmiany komórkowe. Obficie występują komórki żerne. Liczba komórek sygnetycznych i bezwypustkowych przerosłych astrocytów jest większa niż w grupach poprzednich. Liczne są jednak również, zwłaszcza w grupie 3-tygodniowej, niezmienione oligo- i astrocyty, obok których obficie występują astrocyty z pojedynczą, pogrubiałą wypustką.

Obraz morfologiczny hodowli z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu zbliżony jest do obrazu hodowli kontrolnych. Wyróżnia się jednak znaczną liczbą komórek żernych i obecnością zwyrodniałych form glejowych. Obok prawidłowych komórek glejowych, typowych dla poszczególnych faz rozwojowych hodowli, występują liczne przerosłe, bez- i wielowypustkowe astrocyty.

#### *Obraz histochemiczny*

Zjawiskiem charakterystycznym dla wszystkich hodowli badanych bezpośrednio po zatruciu jest wzrost zawartości ziarnistości PAS-dodatnich w perikariach i wypustkach komórek glejowych. W przeciwieństwie do hodowli kontrolnych, w których występują wyłącznie drobnoziarniste złogi PAS-dodatnie, w komórkach hodowli doświadczalnych obok drobnych ziarnistości, obecne są większe kuliste twory, gromadzące się szczególnie obficie w komórkach bezwypustkowych (ryc. 5). Gromadzenie się ziarnistości PAS-dodatnich w komórkach glejowych z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu nasila się znacznie w grupie 1-tygodniowej, a mniej wydatnie w dwóch pozostałych. Charakterystyczne dla nich jest występowanie gniazd komórek z obfitymi drobnoziarnistymi i kulistymi złogami PAS-dodatnimi, położonych na tle populacji komórkowej, w której zawartość i charakter ziarnistości PAS-dodatnich nie różni się od kontroli. Szczególnie obfite ziarnistości spostrzega się w drobnych bezwypustkowych komórkach oligodendrocytów. Podobny obraz utrzymuje się w hodowlach z 72-godzinnym przeżyciem po zatruciu, z tym jednak, że w hodowlach 3-tygodniowych liczba komórek z obfitymi ziarnistościami PAS-dodatnimi jest wyraźnie mniejsza (ryc. 6). Po upływie 7 dni tylko w grupie hodowli 1-tygodniowych stwierdza się nadal liczne komórki z obfitymi ziarnistościami. W pozostałych hodowlach ich liczba jest znacznie mniejsza, choć nadal większa niż w odpowiednich kontrolach.

W hodowlach wszystkich grup wieku bezpośrednio po zatruciu i po upływie 24 godzin, nie stwierdza się złogów glikogenu w żadnym typie komórek glejowych, podczas gdy występują one obficie w fibroblastach w grupie z jednodobowym przeżyciem. W hodowlach, które przeżyły 72

godziny i 7 dni po zatruciu pojedyncze przerosłe astrocyty i duże komórki bezwypustkowe zawierają drobnoziarniste złogi glikogenu.

### *Obraz histoenzymatyczny*

We wszystkich grupach hodowli badanych bezpośrednio po zatruciu aktywność trzech dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej nie różni się zasadniczo od hodowli kontrolnych (ryc. 7, 8). Cechą wyróżniającą jest jednak odmienność rozkładu końcowego produktu odczynu histoenzymatycznego, wyrażająca się jego nierównomiernym rozmieszczeniem w cytoplazmie komórek zawierających wodniczki oraz zatarcie zróżnicowania śródplazmatycznej lokalizacji produktu między astro- i oligodendrocytami. W hodowlach z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu, niezależnie od ich wieku obserwuje się bardzo niską aktywność wszystkich dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej. Wybitny spadek aktywności w porównaniu z grupą poprzednią, obserwuje się zarówno w komórkach uszkodzonych, jak i w tych, które nie wykazują strukturalnych nieprawidłowości. Spadek aktywności dotyczy w największym stopniu dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej (ryc. 9, 10), w znacznie mniejszym dehydrogenazy mleczanowej. Obraz aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glukozy-6-fosforanowej cechuje występowanie rozsianych, pojedynczych komórek, głównie astrocytów z obfitą zawartością złogów produktu końcowego reakcji, na tle ogólnie niskiej aktywności enzymatycznej. Hodowle z 3-dniowym przeżyciem charakteryzuje znaczne zróżnicowanie obrazu aktywności badanych enzymów. Odczyn histochemiczny ujawniający aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej jest nadal słabszy niż w kontroli. Jednakże na tle ogólnie niskiej aktywności, występują stosunkowo liczne komórki, głównie astrocyty z obfitymi złoгами produktu końcowego, wypełniającymi ich perikaria i wypustki. Odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy mleczanowej, a w nieco mniejszym stopniu i glukozy-6-fosforanowej jest znacznie silniejszy niż w grupie poprzedniej. Cechą charakterystyczną jest zróżnicowanie natężenia odczynu od śladowego do wysokiego w licznych komórkach glejowych i bardzo wysokiego w przerosłych astrocytach i komórkach bezwypustkowych. W hodowlach z 7-dniowym przeżyciem nadal utrzymuje się słaby odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej, choć jest ogólnie wyższy niż w grupie poprzedniej (ryc. 11, 12). Zwraca uwagę zróżnicowanie natężenia odczynu między poszczególnymi komórkami glejowymi. Jediną cechą wyróżniającą hodowle z 7-dniowym przeżyciem od hodowli kontrolnych w obrazie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glukozy-

-6-fosforanowej jest obecność licznych komórek głównie przerosłych astrocytów z histochemicznymi wykładnikami aktywności wyższej niż w normie.

Odczyn wykrywający aktywność nieswoistej fosfatazy kwaśnej w komórkach glejowych bezpośrednio po zatruciu nie różni się od hodowli kontrolnych. Zawartość zlogów produktu końcowego odczynu w poszczególnych komórkach oraz liczba komórek z wysoką aktywnością w hodowlach badanych w okresach późniejszych wzrasta w miarę nasilania się cech zwyrodnieniowych.

#### OMÓWIENIE

Przedstawione obserwacje wskazują, że krótkotrwałe przetrzymywanie hodowli tkanki glejowej w środowisku zawierającym cyjanek sodu prowadzi do strukturalnego uszkodzenia wszystkich rodzajów komórek glejowych, którego nasilenie wykazuje zależność od wieku hodowli (stopnia jej zróżnicowania), typu komórek a przede wszystkim od czasu przeżycia po zatruciu. Największe nasilenie zmian morfologicznych obserwuje się bezpośrednio po zatruciu i po upływie 24 godzin, choć i w tym czasie są one nierównomierne. W okresie późniejszym pojawiają się odczynowe formy komórkowe. Oligodendrocyty są bardziej uszkodzone niż glej gwiaździsty. Stwierdzone zmiany morfologiczne, wśród których przeważają obrzmienie komórek i ich zwyrodnienie wodniczkowe sugerują zaburzenia w przepuszczalności błon komórkowych, na co między innymi wskazuje obfite gromadzenie się zlogów substancji PAS-dodatnich, które wg Renkawek (1972) stanowi wykładnik przenikania substancji białkowych z medium odżywczego do cytoplazmy komórki. Wydaje się, że zmiany te można wiązać ze stwierdzonym przez Masurowsky'ego i Bunge (1971) oraz Ybatę i wsp. (1971) w zatruciu cyjankami *in vitro* spadkiem aktywności ATP-az błonowych.

Zmiany powyższe w swoim ogólnym wzorcu przypominają nieprawidłowości stwierdzone w niedotlenieniu (Kraśnicka, Renkawek, 1972) i zatruciu tlenkiem węgla (Hoppe, 1974) tkanki glejowej przetrzymywanej w warunkach hodowli pozaustrojowej. W odróżnieniu od nich zwraca uwagę bardzo skąpe i późne śródkomórkowe gromadzenie się glikogenu. Być może należy to wiązać ze stopniem uszkodzenia komórek. W doświadczalnym niedotlenieniu i zatruciu CO glikogen gromadził się wyłącznie w komórkach nie wykazujących cech morfologicznego uszkodzenia.

Zmianom morfologicznym towarzyszą nieprawidłowości aktywności enzymatycznej badanych dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej, stanowiące wykładnik zaburzeń metabolizmu śródkomórkowego. Niepra-



widliwości te wykazują pełną analogię z zaburzeniami stwierdzonymi uprzednio przy zatruciu CO (Hoppe, 1974) i daleko idące podobieństwa do zmian opisywanych przy niedotlenieniu.

Na podkreślenie zasługuje brak upośledzenia aktywności enzymatycznej bezpośrednio po zatruciu, jej późniejszy spadek z następczym powrotem do obrazów prawidłowych, a nawet obecnością odczynowych komórek o aktywności wyższej niż w materiale kontrolnym. Zwraca uwagę również zróżnicowanie nieprawidłowości histoenzymatycznych w zależności od badanych enzymów i nierównomierność nasilenia odczynów histochemicznych w tej samej populacji komórkowej.

Przedstawione obrazy w swoim ogólnym wzorcu zbliżone są do zmian opisanych przez Wendera i wsp. (1973) w materiale *in vivo*. Wydaje się jednakże, że przedstawiona dynamika zmian oraz nierównomierność uszkodzeń w jednolitej populacji komórkowej, z jaką mamy do czynienia w hodowli tkankowej może w pewnej mierze tłumaczyć dyskrepancję obrazów obserwowanych przez Ibrahima i wsp. (1965) z jednej strony, a Wendera i wsp. (1973) z drugiej.

Zestawienie naszych spostrzeżeń z danymi z badań na zwierzęcym materiale doświadczalnym sugeruje, że uszkodzenie neurogleju przez cyjanki może odgrywać istotną rolę patogenetyczną w uszkodzeniach tkankowych ośrodkowego układu nerwowego, a przede wszystkim w rozwoju demielinizacji.

М. Я. Моссаковски

#### МОРФОЛОГИЯ И ГИСТОХИМИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕВРОГЛИИ, ВЫЗВАННЫХ ЦИАНИДОМ НАТРИЯ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

##### Резюме

Проведен анализ структурных повреждений и гистохимических аномалий, являющихся результатом действия цианида натрия на невроглию, выращиваемую *in vitro*. Исследования проводили на 7, 14 и 21-дневных органотопических культурах мозжечка новорожденных крыс, находившихся в течение 1 часа в среде, содержащей  $10^{-3}$  М цианида натрия.

Структурные повреждения как астро-, так и олигодендроцитов зависели от возраста культуры, типа невроглийных клеток, их положения в культуре, а также от времени переживания после отравления. Наиболее существенные изменения имели место в 7-дневных культурах в зоне роста культуры. Олигодендроглия повреждалась сильнее, чем астроциты. Наблюдали набухание цитоплазмы клеток, ее гидропическое вырождение, а также фрагментацию и утрату отростков клеток. В цитоплазме обоих типов клеток невроглии появлялось обильное накопление PAS-положительных субстанций. В гистоэнзиматической картине преобладало снижение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, в меньшей степени — глюкозо-6-фосфат- и лактатдегидрогеназы, а также увеличение активности кислой фосфатазы. Наибольшая интенсивность

этих аномалий имела место через 24 часа после отравления. В более поздние сроки картина постепенно нормализовалась, однако, даже по истечении 7 дней активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы была ниже, чем в контрольном материале. Через 3 и 7 дней после отравления наряду с поврежденными клетками появлялись клетки с гистологическими признаками прогрессирующих изменений.

Результаты исследований указывают на возможность участия повреждений невроглии в формировании тканевых аномалий в центральной нервной системе при остром отравлении цианидом.

M. J. Mossakowski

#### MORPHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY OF GLIA DAMAGE PRODUCED BY SODIUM CYANIDE IN TISSUE CULTURE

##### Summary

The analysis of structural damages and of histochemical abnormalities resulting from NaCN action on glial tissue cultured *in vitro* was performed. Newborn rat cerebellar 7, 14 and 21-days organotopic cultures were incubated for 1 hour in a medium containing  $10^{-3}$  M NaCN.

Structural damages of both astro- and oligodendrocytes depended on the culture age, type of glial cells, their location in the culture and survival time after intoxication. The most advanced changes appeared in 7-days old cultures in the zone of culture growth. Oligodendroglia was damaged more than astrocytes. The swelling of cell cytoplasm, its vacuolar degeneration, as well as the fragmentation and loss of processes were observed. In the cytoplasm of both glial cell types occurred abundant accumulation of PAS-positive substances. In the histoenzymic picture dominated the decrease of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities, to a smaller extent that of glucose-6-phosphate and lactate dehydrogenases, as well as the rise of acid phosphatase activity. The greatest intensification of these abnormalities occurred 24 hours after intoxication. In later periods the picture was gradually normalized, however, even after 7 days the activities of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase were lower than in the control material. On the 3rd and 7th day after intoxication, besides the damaged cells, occurred cells with histological features of progressive changes.

The results of studies point at the possibility of participation of glia damages in the formation of tissue abnormalities in the central nervous system during acute cyanide intoxication.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technology*, 1959, 24, 163—191.
2. Burstone S.: Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new reagents. *J. Histochem. Cytochem.*, 1960, 8, 62—70.
3. Hess R., Scarpelli G. D., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. Pyridine nucleotide linked dehydrogenase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753—760.

4. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
5. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Remyelination in the central nervous system after cyanide intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 234—245.
6. Holt S. J.: Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon Gomori acid phosphatase technique. *Exp. Cell Res.*, 1959, Suppl. 7, 1—28.
7. Hoppe B.: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego *in vitro* poddanego działaniu tlenku węgla. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 371—385.
8. Hutten van W., Friede R.: Histochemical studies of experimental demyelination produced with cyanide. *Exp. Neurol.*, 1963, 4, 402—412.
9. Ibrahim M., Philande E., Briscoe B. S. jr., Bayliss O., Adams C.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy in the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1963, 26, 479—486.
10. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
11. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 507—518.
12. Levine E.: Experimental cyanide encephalopathy. Gradients of susceptibility in the corpus callosum. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 214—222.
13. Lumsden C. E.: Cyanide leucoencephalopathy in rats and observations on the vascular and ferment hypotheses of demyelinating diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1950, 13, 1—15.
14. Masurowsky E. B., Bunge R. P.: Pattern of myelin degeneration following the rapid death of cells in culture of peripheral nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1971, 30, 311—324.
15. Renkawek K.: The histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 307—315.
16. Scarpelli D. G., Hess R., Pearse A. E. G.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 747—752.
17. Ybata Y., Piccoli F., Pappas G. D., Lajtha A.: An electron microscopic and biochemical study on the effect of cyanide and low Na<sup>+</sup> on rat brain slices. *Brain Research*, 1971, 30, 137—158.
18. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta histochem.*, 1972, 43, 361—371.
19. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Late changes in the enzymatic activity of the neuroglia as a sequel to acute hydrogen cyanide encephalopathy. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1973, 11, 213—220.

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