

Mirosław J. Mossakowski, Irmína B. Zelman

ZMIANY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM NA SKUTEK NIEDOBORU
TLENOWEGO W WARUNKACH DOŚWIADCZALNYCH

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: doc. dr med. Mirosław J. Mossakowski

Rola niedostatku tlenowego w patologii ośrodkowego układu nerwowego znana jest od początków kliniki neurologicznej. Istnieje też obszerne piśmiennictwo poświęcone klinicznemu, morfologicznemu i fizjologicznemu, a ostatnio także i biochemicznemu aspektom tego zagadnienia. Badania prowadzone przy zastosowaniu nowoczesnych technik poszerzyły znacznie znajomość zaburzeń spowodowanych niedotlenieniem tkanki nerwowej, jednak patomechanizm wielu reakcji OUN na niedobór tlenu wciąż jeszcze nie jest wyjaśniony.

Ograniczenie dopływu tlenu do ośrodkowego układu nerwowego prowadzi po przekroczeniu bardzo niskiej bariery czasu trwania niedotlenienia do powstania nieodwracalnych uszkodzeń znajdujących wyraz w obrazie morfologicznym i histochemicznym tkanki nerwowej. O charakterze zmian patologicznych, ich nasileniu i umiejscowieniu decyduje z jednej strony typ niedotlenienia, z drugiej - wrażliwość poszczególnych elementów i struktur na niedostatek tlenu, uwarunkowana prawdopodobnie

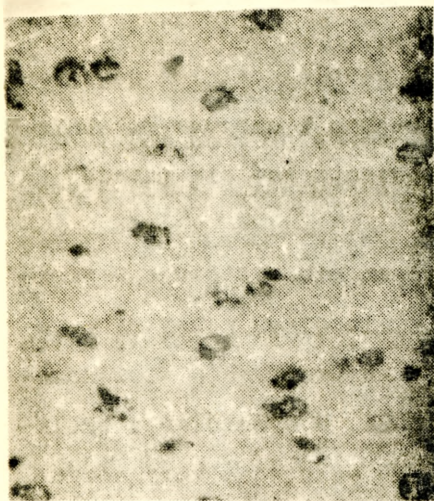
ich zróżnicowaniem metabolicznym.

Celem naszych badań była ocena odwracalnych zmian metabolicznych i strukturalnych, stanowiących wstępne skutki hipoksji, to znaczy takich zmian w tkance nerwowej, które leżą poniżej progu uszkodzeń ujawnianych przy użyciu rutynowych metod histologicznych. To założenie wymagało stosowania modeli doświadczalnych, w których ograniczenie dopływu tlenu do śródkowego układu nerwowego nie prowadzi do nieodwracalnych zmian tkankowych w ogóle, lub też wywołuje powtarzalne, ściśle ograniczone i zlokalizowane uszkodzenia możliwe do wyłączenia z badanego materiału. Badania prowadziliśmy na 3 modelach pełniących te postulatory: 1/ model krótkotrwałej hipoksji i wzrostu - doświadczenia wykonano na dorosłych małpach i szczurach, które przez okres 3 minut /do pełnego bezdechu/ przebywały w atmosferze składającej się z 96% azotu i 4% tlenu; 2/ model tzw. częściowego niedokrwienia tkanki nerwowej - doświadczenia przeprowadzono na szczurach, którym obustronnie odwiązywano tętnice szyjne wspólne i na kotach, którym podwiązywano tętnicę główną brzuszną poniżej odejścia tętnic nerwowych. Badania wykonano na zwierzętach z dojrzałym i rozwijającym się układem nerwowym; 3/ asfiksja okołoporodowa u małp, pisana z morfologicznego punktu widzenia przez Baileya /2/,versa /7/ i Mossakowskiego /9/. Badania prowadzono przy użyciu metod histologicznych, histochemicznych i histoenzymatycznych, mikroskopowo-elektronowych oraz biochemicznych.

Ponieważ we wszystkich grupach doświadczalnych najbardziej istotne zmiany dotyczyły glikogenu i enzymów metabolizujących glikogen, chcielibyśmy skoncentrować się przede wszystkim na tych obserwacjach.

W warunkach prawidłowych glikogen nie występuje w większości struktur OUN, przynajmniej w ilościach uchwytanych metodami histochemicznymi. U zwierząt kontrolnych stwierdzano jego obecność w splocie naczyńkowym, w wysięłce i okolicy podwysięłkowej, w powierzchniowych warstwach kory mózgu i móżdżku i w pojedynczych neuronach, niektórych ugrupowań jądrowych. W całym naszym materiale doświadczalnym przy zasadniczo wspólnym wzorcu zmian obserwowanych u wszystkich zwierząt, najbardziej uderzającym zjawiskiem było gromadzenie się w układzie nerwowym obfitych złogów glikogenowych. Istniały przy tym wyraźne różnice pomiędzy zwierzętami z dojrzałym i rozwijającym się układem nerwowym.

Złogi glikogenu występowały w postaci luźnych ziaren w neuropilu, w skupieniach okołonaczyniowych oraz w cytoplazmie i wypustkach astrogleju. U zwierząt dorosłych złogi glikogenu ograniczały się wyłącznie do istoty szarej, podczas gdy u zwierząt młodych występowały tak w formacjach szarych, jak i białych /ryc. 1/, przy czym w tych ostatnich ograniczały się wyłącznie do struktur znajdujących się w okresie mielinizacji. Glikogen pojawiał się i następnie znikał w różnym czasie po zabiegu w zależności od rodzaju doświadczenia. W przypadku asfiksji okołoporodowej po upływie 12 godzin złogi

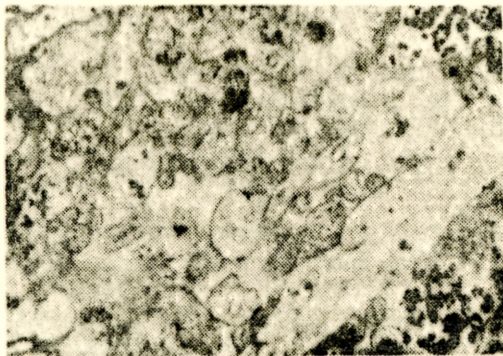


yc. 1. Obfite złogi glikogenowe w astrocytach istoty białej u noworodka małpy w 24 godz. po niedotlenieniu, Pas-dimedon. Pow. 200 x.

glikogenu były już bardzo obfite, najliczniej stwierdzano je po 24 godzinach, a zanikały całkowicie po upływie 4 dni.

U szczurów po podwiązaniu tętnic szyjnych śladowe ilości złogów polisacharydu stwierdzano już po upływie 2 godzin. Ilość astrocytów wypełnionych glikogolem wzrastała do 24 godzin, a zaczynała zmniejszać się po 48 godzinach. Po 7 dniach od zabiegu histochemicznie nie udawało

się stwierdzić obecności polisacharydu w astrogleju. Astrocytarną lokalizację złogów glikogenowych potwierdziło badanie w mikroskopie elektronowym /ryo. 2/. Glikogen występował u zwie-



ryo. 2. Typowe rozetki glikogenowe w poszerzonych wypustkach astrocytów podkorowej istoty białej u noworodka małpy w 24 godz. po niedotlenieniu. M.E. 8.200 x. <http://rcin.org.pl>

rzęć dorosłych w istocie szarej, u zwierząt niedojrzałych zarówno w istocie szarej jak i w białej, z przewagą w tej ostatniej. Wzrost zawartości glikogenu w tkance nerwowej wykazywał również oznaczenia chemiczne, przy czym dynamika tego procesu przedstawiała się różnie u zwierząt dojrzałych i u zwierząt z rozwijającym się układem nerwowym /tabela 1/. U tygodniowych

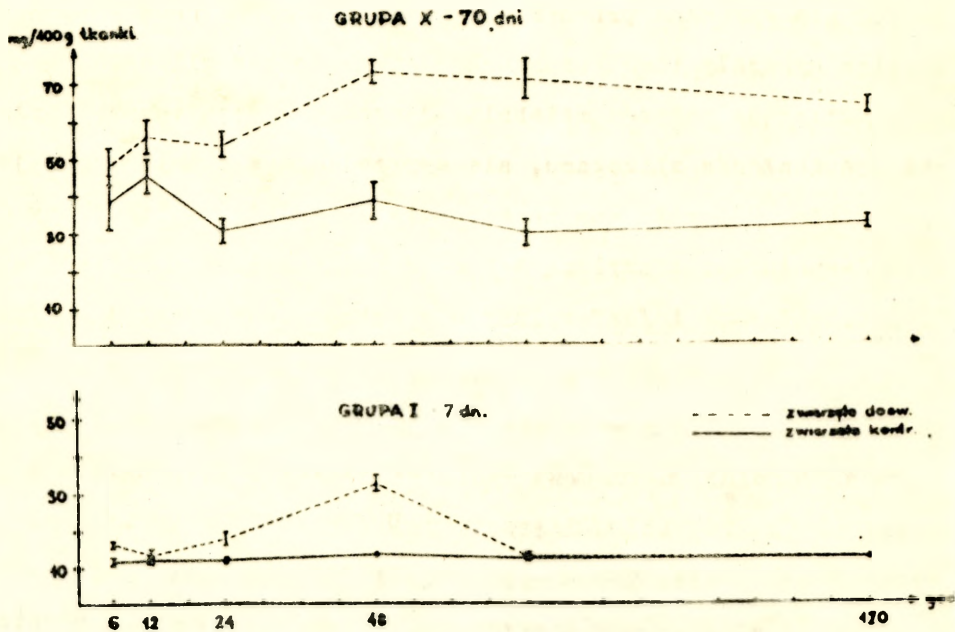


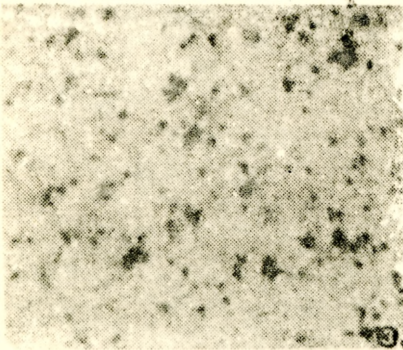
Tabela 1

szozurów z podwiązanymi tętnicami szyjnymi najwyższy przyrost zawartości glikogenu w mózgu przypada na 48-mą godzinę po zabiegu, a po 72 godzinach osiąga poziom wartości kontrolnej.

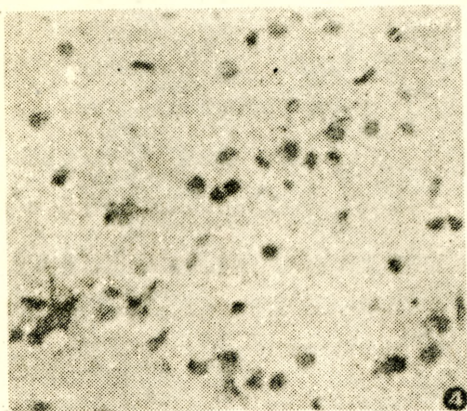
U zwierząt dorosłych najwyższe nagromadzenie glikogenu stwierdzano również 48 godzin po zabiegu, ale wzrost ten utrzymywał się, aż do 5-go dnia na statystycznie znamienne podwyższonym poziomie. Badanie zwierząt w różnych grupach wieku pozwoliło na stwierdzenie, że przekształcenie krzywej niedojrzałej w krzywą typu dorosłego występuje u zwierząt 4-tygodniowych tj. w okresie, w którym zakończony jest okres mielinizacji. Podobne badania wykonane przez Riverę i wsp. /12/ na noworodkach małpich wykazały identyczny przyrost ilościowy glikogenu.

Aktywacja enzymów metabolizujących glikogen towarzyszyła obecności złogów glikogenu, ale wyprzedzała w czasie ich pojawianie się. Polegała ona na wzroście aktywności fosforylazy a w porównaniu z fosforylazą a+b oraz pojawianiu się aktywności UDPG-transferazy i fosforylazy a w astrocytach /ryc. 3 i 4/,

w których normalnie aktywności tych enzymów nie stwierdza się. Aktywność UDPG-transferazy i fosforylazy a pojawiała się w astrocytach już po upływie godziny od doświadczenia i widoczna była w postaci drobnych ziarenek zarówno w perikariach jak i wypustkach astrogleju, wzrastała do 24 godziny po zabiegu,



Ryc. 3. Aktywność fosforylazy a w astrocytach istoty białej mózdzku u noworodka małpy w 10 godz. po niedotlenieniu. Met. Takeuchi-Kuriaki. Pow. 180 x.

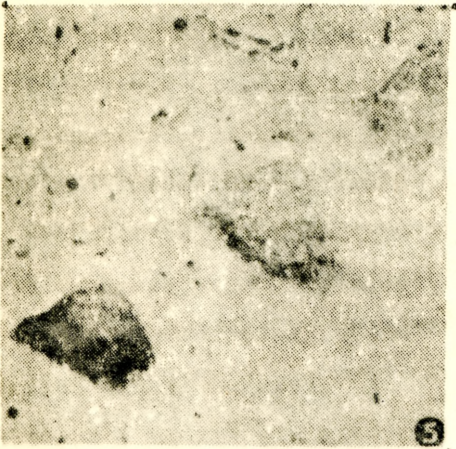


Ryc. 4. Aktywność UDPG-transferazy w astrocytach mielinizującej się istoty białej półkul mózgowych u noworodka małpy w 10 godz. po niedotlenieniu. Met. Takeuchi-Glenner. Pow. 180 x.

po czym spadała wracając do stanu prawidłowego po upływie 4 dni. Biochemiczne oznaczenie aktywności obu tych enzymów w tkance mózgowej potwierdziło w pełni obserwacje histochemiczne.

Nieco odmiennie kształtowały się zmiany u kotów z podwiązaną aortą brzuszną. Na preparatach histologicznych stwierdzano jedynie dyskretną chromatolizę małych komórek nerwowych w

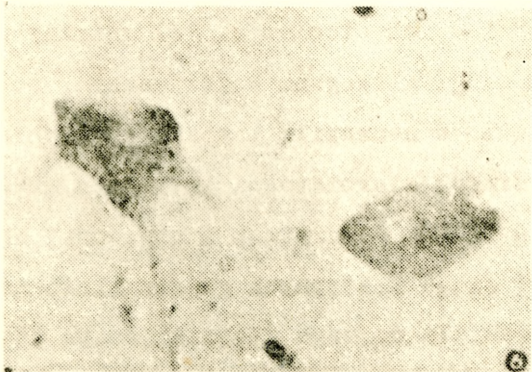
centralnej części rogów przednich i w okolicy kanału środkowego. Natomiast najbardziej interesujące zmiany histochemiczne występowały w obrębie histologicznie niezmiennych dużych neuronów ruchowych i w ich otoczeniu. Pół godziny po zabiegu pojawiały się już złogi glikogenu wokół naczyń, po 1 godzinie występowały one luźno w neuropilu i w skupieniach okołoneuronalnych, po 3 godzinach ziarnistości glikogenu stwierdzano w neurocytach, początkowo w dendrytach i obwodowej części cytoplazmy /ryc. 5/. W ciągu następnych godzin ilość ich w komórkach nerwowych narastała do tego stopnia, że po 24 godzinach praktycznie wszystkie motoneurony rogów przednich wypełnione były ziarnami polysacharydu /ryc. 6/. Po 48 godzinach złogi glikogenu zaczynały zanikać, przy czym sekwencja ich zanika-



Ryc. 5. Złogi glikogenowe w cytoplazmie komórek ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego. Takie same złogi umiejscowione wokół naczyń.

Kot, 3 godziny od podwiązania tętnicy głównej brzusznej. PAS-dimedon. Pow. 160 x.

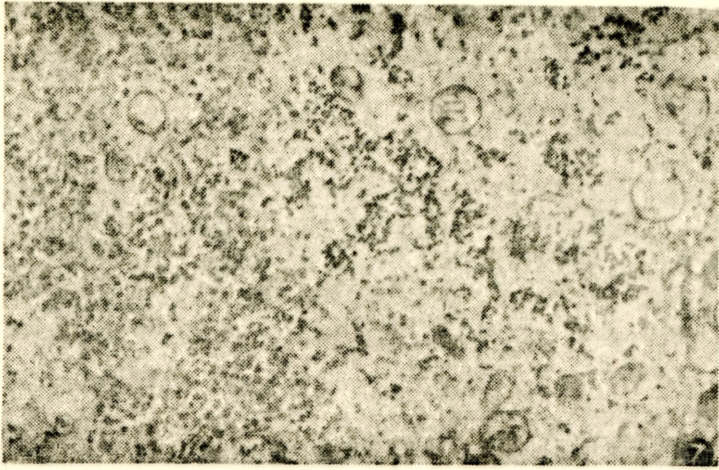
nia była identyczna, jak kolejność pojawiania się. Po 5 dniach ziarnistości glikogenu spostrzegano tylko w pojedynczych neuronach, a po 10 dniach obraz mikroskopowy rogów przednich był zupełnie prawidłowy. Badanie ultrastrukturalne potwierdziło obserwacje uzyskane w mikroskopie świetlnym /ryc. 7/. Po 1 godzinie widoczne były rozetki glikogenu w przynaczyniowych wypustkach astrogleju i nielicznych dendrytach, po 6



Ryc. 6. Neurony rogów przednich rdzenia z cytoplazmą całkowicie wypełnioną złoгами glikogenu.

Kot, 24 godziny po podwiązaniu tętnicy głównej brzusznej.

PAS-dimedon. Pow. 22 x

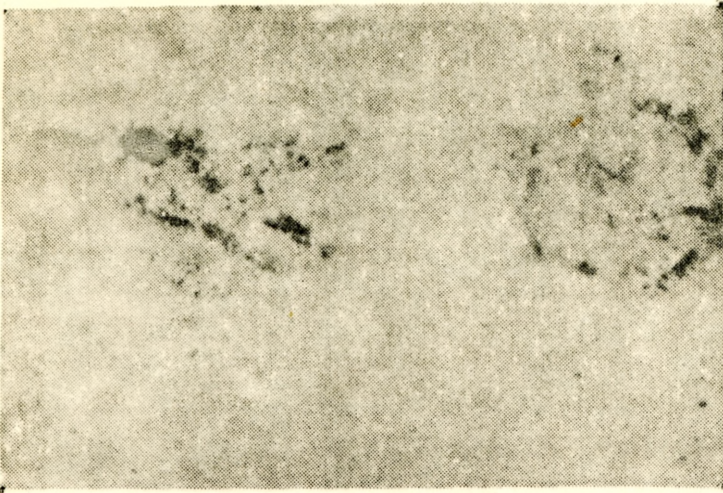


Ryc. 7. Rozety glikogenu w cytoplazmie neuronu ruchowego rdzenia kręgowego. Dysocjacja siatki śródplazmatycznej, obrzmienie mitochondriów.
Kot, 24 godziny po podwiązaniu tętnicy głównej brzusznej
M.E. 12.400 x.

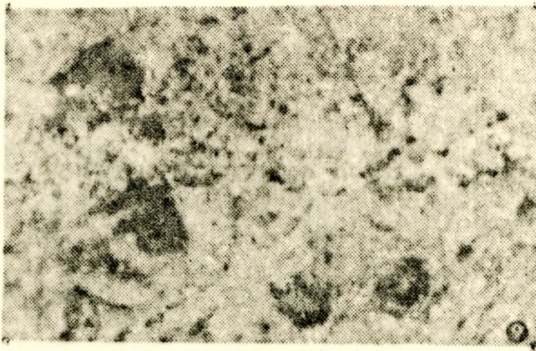
godzinach złogi neuronalne przeważały nad astrocytarnymi. Gromadzeniu się glikogenu towarzyszyła dyspersja siateczki śródplazmatycznej i jej obrzęk oraz obrzmienie mitochondriów.

Zmianom w zawartości glikogenu towarzyszył wzrost aktywności UDPG-transferazy w dużych neuronach rogów przednich /ryc. 8/, która w normalnych warunkach występuje tylko w pojedynczych neuronach i w bardzo niskim natężeniu. Również aktywność fosforylazy a wzrastała w neuropilu i pojawiała się w neuronach /ryc. 9/. Wzrost aktywności tego enzymu stwierdzano już po 3 godzinach po zabiegu, największe natężenie przypadało na 24-tą godzinę, po 7-10 dniach obserwowano powrót do stanu wyjściowego.

Przy podwiązaniu tętnic szyjnych u szczurów występowała dość istotna różnica obrazu morfologicznego w mózgach noworod-



Ryc. 8. Wzmocniona aktywność UDPG-transferazy w cytoplazmie neuronu ruchowego rdzenia kręgowego. Kot, 4 godziny po podwiązaniu tętnicy brzusznej głównej.
Met. Takeuchi-Glenner. Pow. 220 x.



Ryc. 9. Wzmocniona aktywność fosforylasy "całkowitej" w neuropilu i dużych komórkach ruchowych rdzenia kręgowego. Kot, 24 godziny po podwiązaniu tętnicy brzusznej.
Met. Takeuchi-Kuriaki. Pow. 150 x.

ków szczurzych w porównaniu ze zwierzętami dorosłymi. Podczas, gdy u szczurów dojrzałych nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości histologicznych, u noworodków w mikroskopie świetlnym obserwowano rozrzedzenia struktury istoty białej na pograniczu tętnie mózgu środkowej i przedniej, a w mikroskopie elektronowym - bardzo znaczne porozsuwanie włókien i wybitne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych.

OMÓWIENIE

Z przedstawionych obserwacji wynika, że we wszystkich stosowanych modelach doświadczalnych w następstwie niedostatku tlenowego występowało odkładanie się glikogenu w tkance nerwowej i wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen. Procesy te występują w komórkach glejowych, przede wszystkim w astrocytach i to zarówno protoplazmatycznych, jak i włóknikowych. Przeczy to utrwalonemu pogładowi Miquela i Haymakera /8/, według których zdolność gromadzenia glikogenu charakteryzuje wyłącznie astrocyty protoplazmatyczne. Obserwacje nasze wskazują, że proces ten nie zależy od rodzaju gleju, ale od jego stanu czynnościowego. Złogi glikogenu i wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen występowały w tych strukturach ośrodkowego układu nerwowego, które wykazują najwyższy metabolizm węglowodanowy. Są to istota szara w dojrzałym układzie nerwowym i w niedojrzałym struktury szare i mielinizująca się istota biała. Zwiększone zapotrzebowanie na glukozę w okresie mielinizacji wykazała Muray i wsp. /10/. Odkładanie się

glikogenu wskazuje na zaburzenie metabolizmu glikozy wynikające przypuszczalnie z jej zmniejszonego zużycowania przez tkankę nerwową. Na zjawisko to w przypadku niedostatku tlennego zwracali uprzednio uwagę Atkinson i Spector /1/ i Lowry i wsp. /6/, a Yap i Spector /13/ wiąźali je ze stwierdzanym przez siebie obniżeniem syntezy białek i nukleotydów w niedotlenieniu. Być może rolę ozyznika hamującego zużycie glikozy odgrywają wolne kwasy tłuszczowe gromadzące się w tkance nerwowej w następstwie hypoksji /3/. Obniżona zdolność zużycowania glikozy dotyczy przede wszystkim neuronów i oligodendrocytów, które są głównymi konsumentami glikozy i których wrażliwość na niedostatek tlenu jest znacznie większa niż astrogleju. Determinuje to obserwowany przez nas rozkład występowania złogów. Glikoza transportowana jest w układzie nerwowym przez astrocyty /4, 11/. Ograniczenie jej zużycowania po niedotlenieniu prowadzi do gromadzenia jej w cytoplazmie /5/. Odkładana w astrocytach glikoza, lub jej pochodne stanowią ozyznik stymulujący aktywność enzymów metabolizujących glikogen, w wyniku czego glikoza zostaje spolimeryzowana do formy wielocukru. Ten z kolei uruchamiany zostaje w tkance w miarę powrotu zdolności do utylizacji glikozy. Kolejność gromadzenia się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym może sugerować również zaburzenia transportu glikozy w tkance nerwowej. Gromadzenie się glikogenu w komórkach nerwowych rogów przednich rdzenia wskazuje na to, że w pewnych warunkach glikoza przetransportowana do neuronu może być zdeponowana w nim samym. Zjawisko to zależy

zapewne od odrębnych właściwości metabolicznych tych komórek. Duże neurony ruchowe rogów przednich były jedynymi neuronami, w których obserwowaliśmy złogi glikogenowe zarówno w asfiksji okołoporodowej jak i hypoksji prostej. Nasze doświadczenia nie pozwalają na wyjaśnienie jakie właściwości metaboliczne motoneuronów są odpowiedzialne za to zjawisko.

Warto podkreślić, że pojawianie się złogów glikogenowych i aktywacja enzymów metabolizujących glikogen występowały we wszystkich stosowanych przez nas modelach doświadczalnych, niezależnie od tego jakie dodatkowe czynniki uszkodzające towarzyszyły niedotlenieniu /hyperkapnia w asfiksji, czy ograniczenie dopływu glikozy w ischemii/. Sugeruje to, że niedostatek tlenu jest podstawowym czynnikiem prowadzącym do gromadzenia glikogenu, a wspomniane wyżej dodatkowe czynniki modyfikują tylko obraz podstawowy.

Do tych dodatkowych czynników należą także różnice gatunkowe zwierząt, stan dojrzałości układu nerwowego i naczyń krwionośnych.

Omówione zmiany są w pełni odwracalne, po upływie 2-5 dni cofają się one całkowicie i obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki nerwowej zwierząt doświadczalnych nie różni się od zwierząt kontrolnych.

LITERATURA

1. Atkinson J.N.C., Spector R.G.: Brit. J. Exp. Pathol., 1964, 45, 394.

2. Bailey C.J., Windle W.F.: *Exper. Neurol.*, 1959, 1, 467.
3. Bazan M.G., Cliffe Jr. de Joel.: *Federation Proc.* 1968, 27, 751.
4. Friede R.: *Z. f. Allg. Path. Anat.*, 1954, 92, 65.
5. Hager H.: *Proc. V Inter. Congress of Neuropath. Zürich 1965*. Ed. Lüthy i Bischoff. *Exc. Med. Found. Amsterdam* 1966, 64.
6. Lowry O.H., Passonau J.V., Haselberger F.X., Schultz D.W.: *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 18.
7. Meyers R. E.: *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 172.
8. Miquel J., Haymaker W.: *Progress in Brain Research. Vol.15. Biology of Neuroglia*. Ed. D.P. de Robertis and R.Carrea. *Amsterdam. Elsevier Publ.* 1965, 89.
9. Mossakowski M.J., M. de Long, Meyers R.E., Curet H.R., Klatzo I.: *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500.
10. Murray M.R., Peterson E.R., Bunge R.P.: *Proc. IV Inter. Congress Neuropath. Ed. H. Jacob. Stuttgart. Vol. II.* 1962, 267.
11. Oksche A.: *Z. Zellforsch.* 1961, 54, 307.
12. Rivera A., Brann A.W., Myers R.E.: *Exp. Neurol.* 1970, 26, 309.
13. Yap S.L., Spector R.G.: *J. Path. Bact.* 1965, 90, 543.