STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XVIII

1980

ZESZ. 1

-JN/12

WARSZAWA

NEUROPATOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XVIII

STYCZEŃ-MARZEC

Nr 1

KOMITET REDAKCYJNY

Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąmbska, Jerzy Dymecki, Andrzej Goncerzewicz, Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Tadeusz Majdecki, Mirosław J. Mossakowski, Janina Rafałowska, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Környey (Pesc), Jochen Quandt (Bernburg-Saale), Franz Seitelberger (Wiedeń), Istvan Tariska (Budapeszt)

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski Sekretarz Redakcji: Halina Weinrauder

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-70-18

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

BARBARA GAJKOWSKA

WPŁYW WYSOKIEJ TEMPERATURY OTOCZENIA NA ULTRASTRUKTURĘ UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO SZCZURA

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN Kierownik Pracowni: prof. dr J. W. Borowicz

Udział podwzgórza w regulacji ciepłoty ciała jest stwierdzony od dość dawna, jednakże ciągle jeszcze nie dość dokładnie poznany. Ustalono, że w obrębie przedniej części podwzgórza znajdują się dwa ośrodki: utraty ciepła oraz produkcji i utrzymania ciepła. Nie wykazano, czy ośrodek termoregulacji może w sposób trwały podwyższać lub obniżać metabolizm energetyczny w tkankach i tą drogą regulować ciepłotę ciała. Nie ustalono także, czy ośrodek termoregulacji stanowi jeden kompleks neuronów o zbliżonej funkcji, czy też istnieją neurony o jednokierunkowo wyspecjalizowanej funkcji, rozsiane w różnych strukturach.

Celem obecnej pracy była próba określenia zmian morfologicznych w ultrastrukturze jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego oraz płata nerwowego przysadki w warunkach wysokiej (43°), krótkotrwałej (30 min.) temperatury otoczenia i w warunkach nieco podwyższonej (37°), lecz długo trwającej (6 tygodni) temperatury.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie wykonano na 30 dwumiesięcznych szczurach, samcach szczepu Wistar, które podzielono na dwie grupy doświadczalne: I grupę stanowiło 10 zwierząt, które poddano działaniu wysokiej temperatury otoczenia (43°C) przez okres 30 minut.

II grupę stanowiło 10 zwierząt, które przetrzymywano w specjalnych klatkach z termoklimatyzacją przez okres 6 tygodni w temperaturze 37° C.

W obydwu grupach doświadczalnych zwierzęta dostawały pokarm i wodę *ad libitum*, a wilgotność powietrza była zawsze taka sama (30%). Zwierzęta doświadczalne dekapitowano zawsze łącznie ze zwierzętami kontrolnymi, których było także 10. Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano wycinki z mózgu szczura, z okolic jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego oraz nerwowego płata przysadki. Materiał utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym, a następnie w 2% OsO₄ w buforze fosforanowym, odwadniano w alkoholach o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie. Materiał skrawano na ultramikrotomie Reichert Om U2 i dobarwiano na siateczkach octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM—7A.

WYNIKI

Jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe. (Neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego wykazują zmiany ultrastrukturalne o podobnym charakterze i nasileniu, podany opis odnosi się do wszystkich neuronów sekrecyjnych).

W grupie zwierząt, które zostały poddane działaniu wysokiej temperatury otoczenia (43°C), zaobserwowano zmiany ultrastrukturalne w budowie wszystkich komórek nerwowych. Jądra komórkowe uległy przerostowi, charakteryzując się również obecnością głębokich inwaginacji błony jądrowej i obecnością jednego lub dwóch elektronowogęstych jąderek. Chromatyna jądrowa, raczej równomiernie rozmieszczona, niekiedy tworzyła również dość duże agregaty tuż przy błonie jądrowej. Największą uwagę zwracał jednak bardzo dobrze rozwinięty aparat Golgiego zlokalizowany przeważnie w obszarze okołojądrowym (ryc. 1, 2). lecz często także zajmujący również dość duże obszary całej cytoplazmy. Kanały aparatu Golgiego były liczne, niekiedy mocno poszerzone i optycznie puste. W pobliżu aparatu Golgiego obecne były również dość liczne pęcherzyki opłaszczone (coated vesicles) oraz pę-

2

Ryc. 1. Grupa I. Jądro nadwzrokowe. Widoczny fragment jądra komórkowego z głębokimi inwaginacjami błony jądrowej i elektronowogęstym jąderkiem. W cytoplazmie znajduje się dobrze rozwinięty aparat Golgiego, liczne mitochondria, ciałka gęste i lizosomy zawierające kroplowate przejaśnienia (L). Obecne są również ziąrnistości neurosekrecyjne (S), opłaszczone pęcherzyki (CV) oraz ciało wielopęcherzykowe. Pow. 13 950 \times .

Fig. 1. Group I. Supraoptic nucleus. Fragment of cell nucleus with deep invaginations of nuclear membrane and electron dense nucleolus. In cytoplasm — well developed Golgi apparatus, numerous mitochondria, dense bodies and lysosomes containing drop-like lucid fragments (L). Also present neurosecretory granules (S), coated vesicles (CV) and multivesicular body (MVB) \times 13 950.

cherzyki przypominające niedojrzały neurosekret i nieco zwiększona w porównaniu z normą ilość typowych ziarnistości neurosekrecyjnych. Ziarnistości neurosekrecyjne były rozrzucone nierównomiernie w całej cytoplazmie. Oprócz opisanych struktur, szczególnie w obszarze aparatu Golgiego, ale również i w innych obszarach cytoplazmy znaj-



dowano znaczną ilość lizosomów i różnego rodzaju ciałek gęstych typowych lub zawierających wakuole, krople lipidowe, lub niewielkie agregaty substancji o dużej gęstości elektronowo-optycznej (ryc. 1, 2). W obszarze aparatu Golgiego oprócz ciałek gęstych, obecne były zaw-



sze ciała wielopęcherzykowe. Siatka ergastoplazmatyczna nie wykazywała odchyleń od normy, była dobrze rozwinięta, pokryta znaczną ilością rybosomów, niekiedy można było zauważyć koncentryczny układ jej błon. W cytoplazmie znajdowała się znaczna ilość rybosomów oraz sporadycznie występowało ciałko jąderko-podobne (nucleolus-like body). Spotykane mitochondria były niezmienione, niekiedy tylko wielokształtne, neurotubule rozmieszczone nieregularnie w całej cytoplazzmie posiadały prawidłową budowę ultrastrukturalną — były dosyć długie i nieliczne.

Część nerwowa przysadki. W zakończeniach włókien spotykano ziarnistości neurosekrecyjne, mikropęcherzyki, mitochondria i neurotubule. W tej grupie doświadczalnej zaobserwowano również występowanie ciał gęstych oraz lizosomów o budowie lamelarnej, zwanych ciałami błoniastymi (ryc. 3, 4, 5). Obserwowano obecność włókien nerwowych o różnej ilości ziarnistości neurosekrecyjnych, oraz różnej gęstości elektronowo-optycznej. Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w porównaniu z normą wydawała się być jednak nieco mniejsza. Ciekawe, i zapewne nie bez znaczenia, było również rozmieszczenie mikropecherzyków. Spotykano bowiem tutaj trzy rodzaje włókien nerwowych: włókna, które nie zawierały mikropęcherzyków, włókna z niewielką ilością mikropęcherzyków rozmieszczonych nieregularnie i włókna, które posiadały dużą ilość mikropęcherzyków tworzących skupienia (podobnie jak pęcherzyki synaptyczne) tuż przy błonie lub w centralnych partiach włókna (ryc. 4, 5). W badanej grupie doświadczalnej ilość włókien, zawierających mikropęcherzyki tworzące skupienia wydawała się największa.

W drugiej grupie doświadczalnej (tzn. u zwierząt poddanych działaniu temperatury 37°C przez okres 6 tygodni) w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz we włóknach płata nerwowego przysadki obserwowano zmiany ultrastrukturalne o tym samym charakterze, lecz o niewielkim nasileniu (ryc. 6, 7).

Ryc. 2. Grupa I. Jądro przykomorowe. W cytoplazmie widoczny aparat Golgiego, niektóre jego kanały mocno poszerzone (strzałka). W pobliżu liczne opłaszczone pęcherzyki (CV), ziarnistości neurosekrecyjne (S), ciałka gęste i lizosomy (L). Widoczne jest również ciałko wielopęcherzykowe i neurotubule (Nt) oraz liczne mitochondria. Pow. 20 800 \times .

Fig. 2. Group I. Paraventricular nucleus. In cytoplasm — Golgi apparatus, with some channels markedly dilated (arrow). In the vicinity numerous coated vesicles (CV), neurosecretory granules (S), dense bodies and lysosomes (L). Also present multivesicular body, neurotubules (Nt) and numerous mitochondria. $\times 20\,800$.

Nr 1



Ryc.3. Grupa I. Płat nerwowy przysadki. We włóknach nerwowych obecne są ziarnistości neurosekrecyjne (S), neurotubule (Nt), w niektórych mikropęcherzyki (mi) i ciała błoniaste (strzałka). Pow. 28 800 $\times.$

Fig. 3. Group I. Neurohypophysis. In nerve fibers — neurosecretory granules (S), neurotubules (Nt), in a number of them — microvesicles (mi) and membraneous bodies (arrow). \times 28 800.



Ryc. 4. Grupa I. Płat nerwowy przysadki. Przekroje poprzeczne włókien nerwowych. Widoczne ziarnistości neurosekrecyjne (S) i duże skupisko mikropęcherzyków (mi). We fragmentach włókien widocznych obok, obecne są jedynie ziarnistości neurosekrecyjne (S) i pojedyncze ciała błoniaste (strzałka) Pow. 28 800 \times . Fig. 4. Group I. Neurohypophysis. Transverse sections of nerve fibers. Neurosecretory granules (S) and large agglomeration of microvesicles (mi). In the adjacent fiber fragments, only neurosecretory granules (S) and single membra-

neous bodies are present. \times 28 800.

OMÓWIENIE

Na podstawie przeprowadzonych badań ultrastrukturalnych można sądzić, że podwyższona temperatura otoczenia powoduje aktywację neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego, za czym przemawiają obrazy morfologiczne jądra komórkowego, aparatu Golgiego i wreszcie zwiększona ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w neuronach. Obserwuje się także morfologiczne oznaki zwiększonego wydzielania tych ziarnistości z włókien płata nerwowego przysadki. Nie można jednak stwierdzić ostatecznie, czy zaobserwowana przez nas reakcja układu podwzgórzowo-przysadkowego spowodowana jest wyłącznie tzw. stresem termicznym bez uruchamiania innych mechaniz-







Ryc. 7. Grupa II. Jądro przykomorowe. W jądrze komórkowym duże elektronowogęste jąderko, w cytoplazmie zaś dobrze rozwinięty aparat Golgiego, oraz liczne ziarnistości neurosekrecyjne (S) i mitochondria. Pow. 13950 ×.

Fig. 7. Group II. Paraventricular nucleus. In the cell nucleus — large electron dense nucleolus, in cytoplasm — well developed Golgi apparatus, numerous neurosecretory granules (S) and mitochondria. \times 13 950.

Ryc. 5. Grupa I. Płat nerwowy przysadki. W jednym z włókien nerwowych zwracają uwagę dwa duże skupiska mikropęcherzyków (strzałka), w drugim ciała błoniaste i ziarnistości neurosekrecyjne (S). Pow. 28 800 \times .

Fig. 5. Group I. Neurohypophysis. In one of the nerve fibers two large agglomerations of microvesicles (arrow), in the other — membraneous bodies and neurosecretory granules (S). \times 28 800.

Ryc.6. Grupa II. Jądro nadwzrokowe. We fragmencie cytoplazmy widoczny aparat Golgiego, niektóre tylko kanały są nieco poszerzone (strzałka). W cytoplazmie nieliczne lizosomy i ziarnistości neurosekrecyjne (S), neurotubule (Nt) i mitochondria. Pow. 20700 $\times.$

Fig. 6. Group II. Supraoptic nucleus. In cytoplasm fragment — Golgi apparatus, only a few channels somewhat dilated (arrow). Small number of lysosomes and neurosecretory granules (S), neurotubules (Nt) and mitochondria. \times 20 700.

mów, jak twierdzą niektórzy autorzy (Curé, Teyssier 1973). Wyniki naszych badań nie są zgodne z wcześniej prowadzonymi obserwacjami (Fujino i wsp. 1966, cyt. za Curé, Teyssier 1973), którzy obserwowali redukcję ilości ziarnistości neurosekrecyjnych w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym w hipertermii (34—38°C) trwającej 26 dni.

Zaobserwowane zmiany morfologiczne w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz we włóknach nerwowego płata przysadki, przemawiają za tym, że w warunkach stresu spowodowanego podwyższoną temperaturą otoczenia, istnieje także dodatkowy czynnik prowadzący do czynnościowych zaburzeń mechanizmów sterujących gospodarką wodną ustroju. Wywołuje on aktywację podwzgórzowo-przysadkowego układu antydiuretycznego. Zaobserwowane zmiany ultrastrukturalne podobne były bowiem do opisywanych w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz we włóknach płata nerwowego przysadki w stanach odwodnienia (Picard, Cotte 1970; Borowicz, Gajkowska 1972; Picard i wsp. 1972; Choy, Watkins 1977). Tak więc obecność dużej ilości ciałek gęstych i lizosomów w całym układzie podwzgórzowo-przysadkowym można wiązać prawdopodobnie z regulacją nadmiaru ziarnistości neurosekrecyjnych, tworzonych obficie w reakcji na stres z jednej strony i odpowiedzialnych także za wydzielanie wazopresyny z drugiej strony. Aktywacja układu antydiuretycznego umożliwia maksymalną redukcję ilości wody wydalanej przez nerki. Poza wpływem na gospodarkę wodną ustroju może mieć ona również znaczenie w dostosowywaniu czynności układu krążenia do warunków hipertermii. Wzrost stężenia wazopresyny we krwi może także działać hipotermicznie przez obniżenie tempa przemiany materii (Okuno i wsp. 1965). Dane, wskazujące na aktywację układu antydiuretycznego podczas ekspozycji na działanie wysokiej temperatury otoczenia, pojawiły się już pod koniec lat czterdziestych, kiedy to Kenney i Miller (1949) zaobserwowali szybko pojawiające się i proporcjonalne do wzrostu temperatury otoczenia hamowanie diurezy wodnej u ludzi. Hellman i Weiner (1953) stwierdzili następnie pojawianie się substancji antydiuretycznej w moczu ludzi przebywajacych w środowisku o wysokiej temperaturze. Badania prowadzone przez Robinsona i Mac Farlane'a (1956) wykazały, że przyczyną aktywacji układu antydiuretycznego w hipertermii jest wzrastająca osmolalność płynu pozakomórkowego. Badania zaś Kozłowskiego i wsp. (1972) oraz Szczepańskiej-Sadowskiej (1977) ustaliły, że w wyniku hipertermii wyraźnie wzrasta poziom wazopresyny we krwi na skutek aktywacji układu antydiuretycznego. Wyniki tych badań fizjologicznych są zgodne z uzys-

kanymi przez nas danymi morfologicznymi, na podstawie których można wysunąć hipotezę, że zwiększona synteza i wydzielanie ziarnistości neurosekrecyjnych w układzie podwzgórzowo-przysadkowym ułatwia funkcjonowanie organizmu w warunkach hipertermii również przez swój wpływ na gospodarkę wodną ustroju. Można sądzić także, że wytwarzane w układzie podwzgórzowo-przysadkowym ziarnistości neurosekrecyjne odgrywają dość istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy termicznej.

WNIOSKI

 Podczas ekspozycji szczurów na działanie temperatury otoczenia: wysokiej (43°C przez 30 minut) i podwyższonej (35°C przez okres 6 tygodni) stwierdzono zmiany morfologiczne, wskazujące na aktywację układu podwzgórzowo-przysadkowego.

2) Można sądzić, że aktywacja układu podwzgórzowo-przyadkowego spowodowana stresem termicznym może odgrywać istotną rolę w utrzymywaniu zarówno homeostazy termicznej jak i wodnej ustroju.

3) Zaobserwowane zmiany w budowie ultrastrukturalnej układu podwzgórzowo-przysadkowego są zaznaczone wyraźniej w grupie zwierząt poddanych działaniu wysokiej temperatury przez krótki okres czasu, w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w grupie zwierzęt pozostających przez dłuższy okres czasu w środowisku o nieco podwyższonej temperaturze.

Б. Гайковска

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Резюме

Исследовано морфологическую картину супраоптического и медиального ядер гипоталамуса, а также нервной доли гипофиза крыс, подвергаемых влиянию высокой (43°, 30 мин) и повышеной (35°, 6 недель) температуры окружающей среды.

Полученные результаты морфологических исследований указывают, что гипоталамо и гипофизарная система активизируется: усиливается синтез нейросекреторных грануляцией в обоих ядрах гипоталамуса, а также убыток этих грануляцией в волокнах нервной доли гипофиза.

Автором обсуждается роль нейросекреторных грануляцией образованных в гипоталамусе в поддерживанию водного и термического гомеостаза организма.

11

B. Gajkowska

B. Gajkowska

EFFECT OF HIGH ENVIRONMENTAL TEMPERATURE ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSEAL SYSTEM

Summary

The study dealt with the morphological picture of the supraoptic and paraventricular nuclei of hypothalamus and of neurohypophysis of rats exposed to the following temperatures of the environment: 1) high $(43^{\circ}C)$ for 30 min and 2) elevated $(35^{\circ}C)$ for 6 weeks.

The results indicate that the hypothalamo-hypophyseal system undergoes activation, since there is a notable increase of the synthesis of neurosecretory granules in both of the hypothalamic nuclei and a loss of the granules in neurohypophysis.

The role of the neurosecretory granules formed in hypothalamus in maintaining the water- and thermal homeostasis in the organism is discussed.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Borowicz J. W., Gajkowska B.: Zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego szczura w wyniku odwodnienia organizmu. Pat. Pol. 1972, 23, 247—261.
- Curé M., Teyssier M.: Donnés histologiques et cariométriques sur l'appareil hypothalamo-neurohypophysaire du rat exposé chroniquement à une ambiance thermique chaude. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1973, 167, 1135—1138.
- 3. Choy V. J., Watkins W. B.: Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. Cell Tiss. Res. 1977, 180, 467-490.
- Hellman K., Weiner J. S.: Antidiuretic substance in urine following exposure to high temperature. J. Appl. Physiol. 1953, 6, 194—198.
- Kenney R. A., Miller D. H.: Effects of environmental temperature on water output and the pattern of chloride excretion. Acta Med. Scand. 1949, 135, 87-90.
- Kozłowski S., Szczepańska-Sadowska E., Drzewiecki K.: Zmiany poziomu wazopresyny (ADH) we krwi u ludzi pod wpływem krótkotrwałego działania na ustrój wysokiej temperatury otoczenia. Pol. Arch. Med. Wew. 1972, 49, 251–256.
- 7. Muckle D. S., Dickson J. H.: Hyperthermia $(42^{\circ}C)$ as an adjonct to radiotherapy in the treatment of allogenic VX₂ carcinoma in the rabbit. Brit. J. Cancer 1973, 27, 307–315.
- Okuno A. M., Yamamoto M., Itoh S.: Lowering of the body temperature induced by vasopressin. Jap. J. Physiol. 1965, 15, 378-387.
- 9. Picard D., Cotte G.: Ultrastructure de l'appareil de Golgi dans la cellule neurosécrétrice du noyau supraoptique du rat. C. R. Soc. Biol. (Paris) 1970, 164, 584-587.

http://rcin.org.pl

Nr 1

Ultrastruktura UPP w hipertermii

- Picard D., Michel-Bechet M., Athouel A. M., Rua S.: Granules neurosécrétoires, lysosomes et complexe GRL dans le noyau supra-optique du rat. Bipolarité des complexes Golgiens. Exp. Brain Res. 1972, 14, 331-353.
- Robinson K. W., Mac Farlane M. V.: The influence of environmental temperature on the level of plasma antidiuretic substance in the rats. Aust. J. Biol. Sci. 1956, 9, 130-138.
- 12. Szczepańska-Sadowska E.: Physiological mechanism suppressing thirst and enhancing vasopressin release in hypertermia. Studia Societatis Scientarium Torunensis. PWN, Warszawa 1977, 3, 1—11.

Adres autorki: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego CMDiK PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3

Nr 1

NEUROPAT. POL., 1980, XVIII, 1

LUBOMIRA DYDYK, MIECZYSŁAW JUSTYNA, MARIA DĄMBSKA

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W KORZE MÓZGU KRÓLIKÓW 36-DNIOWYCH PODDANYCH DZIAŁANIU NORMOBARYCZNEJ HIPEROKSJI W 20 DNIU ŻYCIA

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN Kierownik Pracowni: prof. dr M. Dąmbska Oddział Anestezjologii i Reanimacji Instytutu Gruźlicy Kierownik: doc. dr M. Justyna

Badania ultrastrukturalne kory mózgu królików 24-dniowych poddanych doświadczeniu z hiperoksją w 20 dniu życia, wykazały zmiany spowodowane bezpośrednim działaniem nadmiaru tlenu i wtórnym jego niedoborem (Dydyk i wsp., 1979 b).

Celem tej pracy jest wykazanie zmian ultrastrukturalnych w korze mózgu królików 36-dniowych, które poddano działaniu normobarycznej hiperoksji w 20 dniu życia.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 10 królikach 20-dniowych, z których 4 poddano działaniu 6-godzinnej hiperoksji, następne 4 działaniu 24-godzinnej hiperoksji, a pozostałe 2 stanowiły grupę kontrolną, która odpowiadała normie. Opis doświadczenia podano w pracy Dydyk i wsp. (1979 b). Materiał do badań pobierano w 16 dniu po doświadczeniu, tj. w 36 dniu życia. Badania prowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego Tesla BS 500.

WYNIKI

Grupa I — po 6-godzinnej hiperoksji

W korze mózgu stwierdzono obecność komórek nerwowych, z jednolicie rozrzedzoną hialoplazmą. Na jej tle występowały nieliczne rybosomy

L. Dydyk i wsp.

oraz ciała gęste. Ponadto w cytoplazmie obserwowano poszerzone zbiorniki gładkiej siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Nieliczne zbiorniki szorstkiej siatki śródplazmatycznej nie wykazywały zmian (ryc. 1). Rzadziej spotykano komórki nerwowe, w których obserwowano ogniskowe rozrzedzenia hialoplazmy, poszerzenie cystern gładkiej siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego oraz mitochondria z ciemną macierzą i pojedyncze mitochondria wykazujące cechy obrzmienia (ryc. 2). Połączenia synaptyczne aksosomatyczne były nieliczne. Cytoplazma komórek glejowych, podobnie jak w 4 dniu po 6-godzinnym doświadczeniu, była obrzmiała i zawierała małą liczbę organelli komórkowych. W neuropilu obserwowano zmiany w dendrytach i wypustkach astrogleju. W cytoplazmie dendrytów by-



Ryc. 1. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej kory mózgu królika 36-dniowego, poddanego działaniu 6-godzinnej hiperoksji. Jednolite rozrzedzenie hialoplazmy, mała liczba kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej (re), poszerzone zbiorniki gładkiej siatki śródplazmatycznej (se) i aparatu Golgiego (G), ciała gęste (db), jądro (N). Pow. 36 000 \times .

Fig. 1. Fragment of the neuron cytoplasm from the cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 6-hour hyperoxia. Hyaloplasm of small electron density, small number of the rough endoplasmic reticulum channels (re), enlarged channels of the smooth endoplasmic reticulum (se) and cysterns of the Golgi apparatus (G), dense bodies (db), nucleus (N). \times 36 000.

Nr 1



Ryc. 2. Fragmenty dwóch neuronów w korze mózgu królika 36-dniowego, po 6-godzinnej hiperoksji. Ogniskowe rozrzedzenia hialoplazmy, mitochondria z ciemną macierzą (m), obrzmiałe mitochondrium (m₁), poszerzone cysterny aparatu Golgiego (G), siatka śródplazmatyczna szorstka (re). Pow. 36 000 ×.

Fig. 2. Fragments of the neurons from the cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 6-hour hyperoxia. Focal rarefactions of hyaloplasm, mitochondria with dark matrix (m), swollen mitochondrium (m_1), enlarged cysterns of the Golgi apparatus (G), rough endoplasmic reticulum (re). \times 36 000.

ły widoczne bardzo szerokie zbiorniki gładkiej siatki śródplazmatycznej, ciała gęste, mitochondria z ciemną macierzą i mitochondria obrzmiałe. Zarówno w dendrytach, jak i w obrzmiałych wypustkach astrocytów stwierdzono obecność morwowatych ziaren glikogenu. Aksony i połączenia synaptyczne aksodendrytyczne były niezmienione (ryc. 3). Komórki śródbłonkowe naczyń nie wykazywały zmian.

Grupa II — po 24-godzinnej hiperoksji

W korze mózgu, podobnie jak w I-szej grupie doświadczalnej (po 6-godzinnej hiperoksji), obserwowano komórki nerwowe z jednolicie rozrzedzoną hialoplazmą. W II-ej grupie doświadczalnej (po 24-godzinnym doświadczeniu) spotykano je częściej. Ponadto stwierdzono martwicę pojedynczych neuronów, które otoczone były wieńcem obrzmiałych wypustek astrocytarnych (ryc. 4). Spotykano też pojedyncze komórki glejowe, które wykazywały zmiany miartwicze (ryc. 5). Neuropatologia Polska – 2





Ryc. 5. Martwica komórki glejowej w korze mózgu królika 36-dniowcgo, po 24-godzinnej hiperoksji. Cytoplazma zawiera liczne struktury wodniczkowe (V), obrzmiałe mitochondrium (m). Pow. 20000 ×.

Fig. 5. Necrosis of the glial cell from the cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 24-hour hyperoxia. Vacuolar structure (V), swollen mitochondrium (m). \times 20 000.

Ryc. 3. Neuropil kory mózgu królika 36-dniowego, po 6-godzinnej hiperoksji.
W dendrytach widoczne są poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej gładkiej (SE), ciała gęste (db), obrzmiałe mitochondria (m) i ziarna glikogenu (gl). Połączenie synaptyczne aksodendrytyczne (sj), pęcherzyki synaptyczne (sv). Glikogen (gl) w wypustkach astrocytów (ast). Pow. 48000 ×.

Fig. 3. Neuropil from cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 6-hour hyperoxia. In the dendrites the enlarged channels of the smooth endoplasmic reticulum (SE), dense bodies (db), swollen mitochondria (m), glycogen granules (gl). Axodendritic synaptic junction (sj), synaptic vesicles (sv). Glycogen granules (gl) in astrocytic processes (ast). \times 48 000.

Ryc. 4. Martwica komórki nerwowej w korze mózgu królika 36-dniowego, po 24-godzinnej hiperoksji. Obrzmiałe wypustki astrogleju (ast). Pow. 20000 \times .

Fig. 4. Necrosis of the neuron from the cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 24-hour hyperoxia. Swelling of the astrocytic processes (ast). \times 20 000.



W licznych komórkach glejowych występowały ciała gęste, pojedyncze wodniczki i ziarna glikogenu ryc. 6). Wypustki astrogleju były obrzmiałe (ryc. 7). Połączenia synaptyczne aksosomatyczne spotykano bardzo rzadko.

OMÓWIENIE

W obu grupach doświadczalnych (po 6-godzinnej i po 24-godzinnej hiperoksji), zmiany obserwowane w 16 dniu po doświadczeniu są większe w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w 4 dniu po doświadczeniu (Dydyk i wsp., 1979 b). Stwierdzenie to prowadzi do wniosku, że normobaryczna hiperoksja zapoczątkowuje w ustroju królika reakcję łańcuchową, która nie ulega zahamowaniu, mimo ustania bezpośredniego wpływu nadmiaru tlenu. W oparciu o powyższy wniosek, a także biorąc pod uwagę charakter opisanych zmian, które odpowiadają zmianom ultrastrukturalnym stwierdzanym w hipoksji i ischemii (Brown, Brierley 1972; Ju i wsp., 1972 a, b), można przyjąć, że są to zmiany spowodowane wtórnym niedoborem tlenu.

Zmiany obserwowane w korze mózgu królików poddanych działaniu 24-godzinnej hiperoksji są bardziej nasilone w porównaniu ze zmianami stwierdzanymi po 6-godzinnym doświadczeniu. W związku z tym, można mówić o ich narastaniu nie tylko w zależności od czasu przeżycia, lecz również w zależności od czasu działania nadmiaru tlenu.

W korze mózgu, w 16 dniu po 6-godzinnym doświadczeniu, zmiany ultrastrukturalne zaznaczają się w komórkach nerwowych i glejowych oraz w dendrytach i wypustkach astrogleju.

Zmiany w perikarionach neuronów są wyrazem dalszego ciągu reakcji łańcuchowej, która w 4 dniu po doświadczeniu doprowadza do zmian o tym samym charakterze, ale mniej nasilonych. W komórkach glejowych, w zestawieniu z obrazami mikroskopowo-elektronowymi w 4 dniu po doświadczeniu, utrzymują się cechy obrzęku śródkomórkowego.

Ryc.6. Fragment komórki glejowej kory mózgu królika 36-dniowego, po 24-go-dzinnej hiperoksji. Ciała gęste (db), struktury wodniczkowe (V), ziarna glikogenu (gl). Pow. 36 000 $\times.$

Fig. 6. Fragment of the glial cell from the cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 24-hour hyperoxia. Dense bodies (db), vacuolar structures (V), glycogen granules (gl). \times 36 000.

- Ryc. 7. Neuropil kory mózgu królika 36-dniowego, po 24-godzinnej hiperoksji. Bardzo liczne obrzmiałe wypustki astrocytów (ast). Pow. 36000 ×.
- Fig. 7. Neuropil from cerebral cortex of a rabbit on the 36th day of life, after 24-hour hyperoxia. Numerous swollen astrocytic processes. \times 36 000.

L. Dydyk i wsp.

Pojawienie się zmian ultrastrukturalnych w dendrytach, może być związane ze zwiększonym zapotrzebowaniem tlenowym w okresie ich wzrostu. W warunkach istniejącego niedotlenienia, zapotrzebowanie to nie jest pokrywane. Spostrzeżenia dotyczące zmian w dendrytach są zgodne z obserwacjami Balentine'a (1974, 1975), który prowadził badania nad wpływem hiperbarycznej hiperoksji na ultrastrukturę istoty szarej rdzenia u dorosłych młodych szczurów i wykazał wybiórcze uszkodzenie wypustek neuronalnych, głównie dendrytów. Obrzmienie wypustek astrogleju można tłumaczyć wpływem utrzymującego się niedotlenienia kory mózgu.

Całokształt opisanych zmian ultrastrukturalnych w komórkach nerwowych i glejowych oraz w wypustkach astrocytarnych, może wskazywać na postępujący rozwój obrzęku mózgu.

Dodatkowego omówienia wymaga gromadzenie się glikogenu w korze mózgu młodych królików w 4 i 16 dniu po 6-godzinnym i niekiedy po 24-godzinnym doświadczeniu. Prace licznych autorów wykazały, że gromadzenie się glikogenu w tkance nerwowej, jest wykładnikiem jej uszkodzeń. Według Mossakowskiego i wsp. (1968, 1971, 1973) odkładanie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym jest spowodowane uszkodzeniem neuronów. Następstwem tego jest upośledzenie transportu glikogenu, który "zalega" w astrogleju. Badania Ibrahima (1975) sugeruja, że gromadzenie się glikogenu w komórkach glejowych i nerwowych mózgu, jest następstwem ich zaburzonego metabolizmu. W oparciu o powyższe sugestie, gromadzenie się glikogenu w perikarionach i wypustkach komórek nerwowych i glejowych należy uznać za następstwo zaburzeń metabolicznych spowodowanych działaniem hiperoksji. Taką interpretację w odniesieniu do komórek nerwowych potwierdzają pośrednio badania Cohna i Gersha (1945), Sonnenscheina i Steina (1953), Rucciego i wsp. (1967), Radaya i wsp. (1975), Hayakawy i Waltza (1975) oraz Heissa i wsp. (1976), którzy w warunkach hiperoksji i ischemii stwierdzili postępujące obniżenie aktywności bioelektrycznej kory mózgu.

W 16 dniu po 24 godzinnym doświadczeniu, w korze mózgu występują nieodwracalne uszkodzenia, wyrazem których jest martwica pojedynczych neuronów i pojedynczych komórek glejowych.

Na szczególną uwagę zasługuje stwierdzana w obu grupach doświadczalnych, mała liczba połączeń synaptycznych aksosomatycznych, które u królików 36-dniowych, w warunkach prawidłowych są dość liczne. Prace Grossmana i Williamsa (1971), Silvera (1973) oraz Bischera i wsp. (1973), którzy badali potencjał błon komórek nerwowych w niedotlenieniu, sugeruja, że w neuronach najbardziej wrażliwe na niedo-

bór tlenu są połączenia synaptyczne. W związku z powyższym, można przypuszczać, że w hiperoksji z wtórnym niedotlenieniem, liczne połączenia aksosomatyczne ulegają uszkodzeniu, które powoduje ich gorszą barwliwość.

W obu grupach doświadczalnych (po 6-godzinnej i po 24-godzinnej hiperoksji) zmiany stwierdzane w korze mózgu królików, które poddano działaniu normobarycznej hiperoksji w 20 dniu życia, są bardziej zaawansowane w porównaniu ze zmianami u królików, które poddano doświadczeniu w 1 dniu życia (Dydyk i wsp. 1976 a, b). Zjawisko to tłumaczy Shanklin (1969) znaczną wrażliwością płodu na hiperoksję. W oparciu o badania Towella (1966), który stwierdził, że wzrost ciśnienia czastkowego tlenu w krwi matki wywiera tylko nieznaczny wpływ na wzrost ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi płodu, można przypuszczać, że w życiu płodowym łożysko pełni rolę ochronną przed wzrostem ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi płodu. W warunkach fizjologicznych, przejście z życia płodowego do życia poza ustrojem matki jest przejściem ze stanu "względnego niedoboru tlenu" do stanu "względnego nadmiaru tlenu". W związku z powyższym należy przyjąć, że muszą istnieć "mechanizmy obronne", które chronią ustrój noworodka przed uszkadzającym działaniem nadmiaru tlenu. W oparciu o wyniki badań poziomu katecholamin w korze mózgu królików poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji, wydaje się, że nadmiar tlenu jest czynnikiem wstrząsorodnym (Dydyk i wsp., 1979 a). W organizmach bardziej dojrzałych, zespół adaptacyjny Selyego, będący reakcją na stres, występuje wcześniej. W tych warunkach, w korze mózgu królików 20-dniowych zmiany strukturalne rozwijają się wcześniej niż u królików, które poddano doświadczeniu w 1 dniu życia. Słuszność takiego rozumowania może potwierdzać jednakowy charakter zmian, które występują jak gdyby "z wyprzedzeniem", zarówno w badaniach mikroskopowo-elektronowych, jak i biochemicznych (Dydyk i wsp., 1978) w korze mózgu królików poddanych doświadczeniu w 20 dniu życia.

WNIOSKI

1) Zmiany stwierdzane w korze mózgu królików poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji w 20 dniu życia, narastają w zależności od czasu trwania hiperoksji i czasu przeżycia.

2) W korze mózgu królików 36-dniowych, które w 20 dniu życia poddano działaniu 24-godzinnej normobarycznej hiperoksji, rozwijają się zmiany nieodwracalne.

L. Dydyk i wsp.

Л. Дыдык, М. Юстына, М. Домбска

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА 36-ДНЕВНЫХ КРОЛИКОВ, ПОДДВЕРГНУТЫХ ВЛИЯНИЮ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПЕРОКСИИ НА 20 ДЕНЬ ИХ ЖИЗНИ

Резюме

Целью работы было показать дальнейшее развитие изменений, найденных в предыдущих исследованиях в коре головного мозга 24-дневных кроликов, поддвергнутых влиянию нормобарической гипероксии на 20 день их жизни.

Исследования проводились на 10 кроликах, которые помещались в кислородную камеру на 6 часов (I группа) и на 24 часа (II группа).

Материал для исследования брали на 16 день после эксперимента, т.е. на 36 день жизни.

Ультраструктурные исследования показали, что нормобарическая гипероксия, продолжающаяся 24 часа, ведет к неотвратимым изменениям в нервных клетках головного мозга. Установлено также, что обнаруженные в условиях нормобарической гипероксии изменения возрастают в зависимости от продолжительности гипероксии и длительности прожития.

L. Dydyk, M. Justyna, M. Dambska

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE CEREBRAL CORTEX OF 36-DAY RABBITS SUBJECTED TO NORMOBARIC HYPEROXIA IN THE 20TH DAY OF AGE

Summary

The aim of the study was to evaluate the further development of changes observed in the cerebral cortex of 24-day rabbits i.e. 4 days after hyperoxia (see the preceding paper). The investigations were done on 10 rabbits subjected to hyperoxia for 6 or 24 hrs. The material for the studies was taken on the 16th day after the experiment i.e. in the 36th day of life. Ultrastructural examination revealed that hyperoxia leads to irreversible changes in the nerve cells of cerebral cortex. The changes occurring in the conditions of normobaric hyperoxia were also observed to develop further, depending on the duration of hyperoxia and the time of survival.

PIŚMIENNICTWO

1. Balentine J. D.: Ultrastructural pathology of hyperbaric oxygenation in the central nervous system. Observations in anterior horn grey matter. Lab. Invest. 1974, 31, 580-592.

- 2. Balentine J. D.: Dendritic degeneration following hyperbaric oxygen exposure. Adv. Neurol., 1975, 12, 471-481.
- Bischer H. J., Bruley D., Reneau D. D., Knisely M.: Regulatory mechanisms of brain oxygen supply. W: Oxygen Supply. Red. M. Kessler et al., Urban, Scharzenberg, München 1973, 180-185.
- Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischaemic cell changes in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. J. Neurol. Sci. (Amst.), 1972, 16, 59-84.
- 5. Cohn R., Gersh I.: Changes in brain potentials during convulsions induced by oxygen under pressure. J. Neurophysiol., 1945, 8, 155-160.
- Dydyk L., Dąmbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. I. Zmiany wczesne. Neuropat. Pol., 1976a, 14, 177–183.
- Dydyk L., Dąmbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. II. Zmiany późniejsze. Neuropat. Pol., 1976b, 14, 323—330.
- Dydyk L., Piekarczyk A., Szreter T., Prokopczyk J.: Wpływ normobarycznej hiperokcji na zawartość glikogenu w dojrzewającym mózgu królika. Neuropat. Pol., 1978, 16, 497-506.
- Dydyk L., Wańkowicz B., Szreter T., Prokopczyk J.: Poziom katecholamin w dojrzewającej korze mózgu królików poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji. Neuropat. Pol., 1979a, 17, 395–406.
- Dydyk L., Justyna M., Dąmbska M.: Zmiany ultrastrukturalne w korze mózgu królików 24-dniowych poddanych działaniu normobarycznej hiperoksji w 20 dniu życia. Neuropat. Pol., 1979b, 17, 545-555.
- Grossman R. G., Williams V. F.: Electrical activity and ultrastructure of cortical neurones and synapses in ischaemia. W: Brain hypoxia. Red. J. B. Brierley, B. S. Meldrum. Spastics International Medical Publications, 1971, 61-73.
- 12. Hayakawa T., Waltz A. G.: Immediate effects of cerebral ischemia. Evolution and resolution of neurological deficits after experimental occlusion of one middle cerebral artery in conscious rats. Stroke, 1975, 6, 321–327.
- 13. Heiss W. D., Hayakawa T., Waltz A. G.: Cortical neuronal function during ischemia. Arch. Neurol., 1976, 33, 813-820.
- 14. Ibrahim M. Z. M.: Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system. Advances Anat. Embryol. Cell Biol. 1975, 52; fasc 1.
- Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuron alterations. Acta neuropath. (Berl.), 1972a, 22, 222-234.
- Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. II. Neuroglia and blood vessels. Acta neuropath. (Berl.), 1972b, 22, 235-244.
- Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Cusch H. R., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in perinatal asphyxia. J. Neuropathol. exp. Neurol., 1968, 27, 500-516.
- Mossakowski M. J., Zelman I.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenowego w warunkach doświadczalnych. Postępy Astronautyki, 1971, Supl. 1, 37—50.
- Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak J.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. Neuropat. Pol., 1973, 11, 53—68.

- Raday N., Conforti N., Harel D., Lavy S.: Analysis of preseizure electrocorticographic changes in rats during hyperbaric oxygenation. Exp. Neurol., 1975, 46, 9-19.
- Rucci F. S., Giretti M. L., La Rocca M.: Changes in electrical activity of the cerebral cortex and some subcortical centres in hyperbaric oxygen. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 1967, 22, 231-238.
- Shanklin D. R.: A general theory of the oxygen toxicity in man. Perspect. Biol. Med., 1969, 13, 80-87.
- Silver J. A.: Brain oxygen tension and cellular activity. W: Oxygen Supply. Red. M. Kessler et al., Urban, Scharzenberg, München 1973, 186-193.
- 24. Sonnenschein R. R., Stein S. N.: Electrical activity of the brain in acute oxygen poissoning. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 1953, 5, 521-524.
- Towell M. E.: The influence of labor on the fetus and newborn. Pediatr. Clin. North Amer., 1966, 13, 575-580.

Adres autorów: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

MARIANNA SIKORSKA

WPŁYW HIPOKSJI KRĄŻENIOWEJ NA AKTYWNOŚĆ KINAZ BIAŁKOWYCH W PODFRAKCJACH KOMÓRKOWYCH W MÓZGU KRÓLIKA

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

Model hipoksji krążeniowej (Mchedlishvili 1973), ze względu na możliwość kontrolowania czasu trwania niedokrwienia oraz pełną odwracalność stwierdzanych zaburzeń, stanowi przedmiot wielokierunkowych badań, między innymi, licznych opracowań biochemicznych (Albrecht 1974; Sikorska, Śmiałek 1974; Broniszewska-Ardelt, Sikorska 1976). W tych samych warunkach doświadczalnych uprzednio wykazano wzrost poziomu 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu, którego udział w regulacji przemian komórkowych jest szeroko podkreślany, jak również zmiany aktywności cyklazy adenylowej i fosfodwuesterazy 3',5'-cyklicznych nukleotydów (Sikorska 1976; Chikvaidze, Melitauri 1974, 1976). W świetle ogólnie przyjętych poglądów metabolicznych funkcje cyklicznych nukleotydów realizowane są poprzez kinazy białkowe, enzymy, których aktywność może być bezpośrednio regulowana poziomem tych nukleotydów. Niewiele dotychczas wiadomo o zachowaniu się kinaz białkowych w mózgu w warunkach patologicznych, jedynie Schwartz i wsp. (1976) wykazali spadek aktywności kinaz zależnych od cAMP w homogenatach z kory mózgowej chomików mongolskich po jednostronnym podwiazaniu tetnicy szyjnej wspólnej.

Celem niniejszej pracy było wykazanie wpływu niedokrwienia na aktywność kinaz białkowych (EC 2.7.1.37) — ATP: białko fosfotransferaz zależnych od 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP), zależnych od 3',5'-cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) oraz niezależnych od cyklicznych nukleotydów, w podfrakcjach komórkowych, otrzymywanych z mózgów królików poddanych 15-minutowej hipoksji krążeniowej.

M. Sikorska

MATERIAŁ I METODY

Warunki doświadczalne

Badania przeprowadzono na 20 królikach obu płci, o ciężarze ciała 2,5—3,5 kg. Doświadczalne niedokrwienie mózgu u królików wywoływano zgodnie z warunkami podanymi przez Mchedlishvili (1973). Zwierzętom, w ogólnym znieczuleniu nembutalem (40 mg/kg ciężaru ciała), izolowano tętnice szyjne wspólne, z których prawą przewiązywano a lewa, po podwiązaniu jej odcinka dogłowowego, łączono z naczyniem, do którego upuszczano krew. Przed upuszczeniem krwi króliki heparynizowano (0,3 ml/kg ciężaru ciała). Po obniżeniu obwodowego ciśnienia krwi tętniczej do wartości ok. 20 mm Hg zwierzęta przetrzymywano w takim stanie przez 15 min., po czym wykonywano retransfuzję. Obwodowe ciśnienie krwi tętniczej rejestrowano przy pomocy urządzenia składającego się z przetwornika f-my Statham i elektromanometru EK-4 f-my Farum, połączonych kaniulą z lewą tętnicą udową. Królikom grupy kontrolnej wykonywano wszystkie elementy opisanego zabiegu chirurgicznego, z wyjątkiem upuszczenia krwi. Zwierzęta doświadczalne i kontrolne uśmiercano poprzez przecięcie rdzenia przedłużonego. Do oznaczeń biochemicznych pobierano obie półkule mózgowe.

Badania przeprowadzono w czterech grupach:

- grupa I obejmowała króliki nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym (norma),
- grupa II zwierzęta, którym wykonywano kontrolny zabieg operacyjny,
- grupa III króliki badane po 15 minutach niedokrwienia, przed wykonaniem retransfuzji krwi,
- grupa IV króliki badane po 15 minutach niedokrwienia i po retransfuzji krwi.

Otrzymywanie podfrakcji komórkowych

W celu otrzymania podfrakcji komórkowych posługiwano się metodami Whittaker'a i wsp. (1964) oraz Gurd'a i wsp. (1974). Szczegóły stosowanej techniki rozdziału przedstawiono na schemacie 1.

Aktywność kinaz białkowych badano w osadzie otrzymywanym po wirowaniu przy $1000 \times g$, zawierającym jądra komórkowe, następnie w nadsączu (frakcja postmitochondrialna), w mielinie, w mitochondriach oraz we wszystkich podfrakcjach błon synaptozomalnych, których charakterystyka przedstawia się następująco:





Schemat 1. Otrzymywanie podfrakcji komórkowych

M. Sikorska

- A' i A lżejsze i cięższe błony synaptozomalne, nieznacznie zanieczyszczone strukturami lizosomalnymi i błonami siatki śródplazmatycznej;
 - B błony synaptozomalne, wyraźnie zanieczyszczone zewnętrznymi błonami mitochondrialnymi;
 - C błony synaptozomalne znacznie zanieczyszczone wewnętrznymi błonami mitochondrialnymi;
 - D mitochondria synaptozomalne.

Wszystkie badane podfrakcje rozcieńczano 0,32 M sacharozą w takim stopniu, aby zawartość białka nie przekraczała 3 mg/ml.

Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951).

Oznaczanie aktywności kinaz białkowych

Aktywność kinaz białkowych oznaczano wg zmodyfikowanej metody Costy i wsp. (1976). Mieszanina inkubacyjna (260 µl) zawierała: 15 mM buforu fosforanowego pH 6,5, 15 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 0,05 mM γ -³²P-ATP — 0,5 µCi (Amersham), 2 mM teofiliny, 0,3 mM EGTA (Sigma), 100 µg białek histonowych (typ II-A, Sigma), 10 µM cAMP (sól sodowa, Sigma) lub 10 µM cGMP (sól sodowa, Sigma), oraz badane białko w ilości nie przekraczającej 30 µg. W przypadku badania aktywności kinaz niezależnych zamiast roztworów cyklicznych nukleotydów dodawano w odpowiedniej ilości wodę. Próby inkubowano przez 5 min w 30°C, po czym do każdej z nich dodawano po 50 µl 0,63% albuminy (frakcja V, Sigma) i 60% TCA (kwas trójchlorooctowy). Wytrącony osad zbierano na sączkach miliporowych HA 0,34 µm i przemywano 10—15 ml 10% TCA. Po wysuszeniu sączków radioaktywność badanych prób mierzono w liczniku scyntylacyjnym Isoca 300 (f-my Nuclear Chicago).

WYNIKI

Grupa I — króliki nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Aktywne enzymy zdolne do przenoszenia γ -³²P-fosforanu z ATP na białko histonowe stwierdzono w każdej z badanych frakcji. Dotyczyło to zarówno kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) jak również enzymów, których aktywność nie zależy od obecności tych nukleotydów. W każdej z badanych frakcji aktywność kinaz badanych wobec cAMP była wyższa od aktywności stwierdzanej w obecności cGMP. Największą różnicę między aktywnością kinaz niezależnych i zależnych od cyklicznych nukleotydów (największe aktywujące od-

Kinazy białkowe w niedokrwieniu mózgu

Nr 1

Tabela	1.	Aktywność	kinaz	białkowyc	h w	podfrakejach	komórkowych	z m	nózgów	królików
		n	ie pod	dawanych	żadn	ym zabiegom	doświadczalnyr	m		

Table 1. Activity of protein kinases in the subcellular fractions of the brains of rabbits subjected to no experimental treatment

	Group					
nmole ATP/mg białka/min nmoles ATP/mg protein/min						
	niezależne independent	cAMP zależne cAMP dependent	cGMP zależne cGMP dependent			
x±SD						
	$3,\!50\!\pm\!1,\!28$	$6,40 \pm 2,58$	$4,46 \pm 1,73$			
	$2,93 \pm 1,41$	$4,\!45\!\pm\!2,\!03$	$3,92 \pm 1,27$			
	4,49±1,93	$10,\!57\!\pm\!4,\!83$	$7,\!58\pm3,\!19$			
	$5,\!53\!\pm\!2,\!56$	$7,99 \pm 2,07$	$6,\!11\!\pm\!2,\!69$			
A'	$7,91\pm3,05$	$15,\!48\!\pm\!6,\!78$	$10,31 \pm 4,63$			
Α	$6,44 \pm 2,64$	$10,\!66\!\pm\!4,\!15$	$8,23 \pm 3,14$			
В	$6,\!14\!\pm\!2,\!62$	$10,49 \pm 4,59$	$7,09 \pm 3,64$			
С	$4,84 \pm 2,62$	$9,96\pm4,13$	$6,23 \pm 2,86$			
D	$8,29 \pm 3,21$	$14,\!08\pm\!6,\!26$	$8,64 \pm 2,24$			
	A' A B C D	$\begin{tabular}{ c c c c c } \hline & $110{\rm up}1$ \\ \hline & $110{\rm up}1$ \\$				

Grupa I

 $x\pm SD$ — średnia arytmetyczna z 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe — arithmetic mean of 5 determinations \pm standard error

działywanie cyklicznych nukleotydów) obserwowano we frakcji postmitochondrialnej, natomiast w synaptozomalnej podfrakcji D (określanej jako mitochondria synaptozomalne) nie stwierdzono stymulującego wpływu cGMP na aktywność kinaz białkowych.

Grupa II - króliki, którym wykonano kontrolny zabieg operacyjny. Wyniki wyrażono w % wartości odpowiednich podfrakcji komórkowych z mózgów zwierząt grupy I — tabela 2.

Znamienny statystycznie spadek aktywności trzech badanych enzymów stwierdzono w mitochondriach (o ok. 20%), natomiast we frakcji postmitochondrialnej ich aktywność wzrastała: kinaz niezależnych o ok. 66%, a enzymów zależnych od cAMP i cGMP o ok. 40%. W osadzie zawierającym jądra komórkowe oraz w synaptozomalnej podfrakcji C, wzbogaconej w zewnętrzne błony mitochondrialne, obser-

M. Sikorska

Tabela 2. Aktywność kinaz białkowych w podfrakcjach komórkowych z mózgów królików po kontrolnym zabiegu operacyjnym

Table 2. Activity of protein kinases in the subcellular fractions of the brains of rabbits after sham operation Grupa II

		Group I	Ι				
		aktywność kinaz w % wartości grupy I kinase activity — % of values in group I					
Rodzaj frakeji Fraction 		niezależne independent	cAMP zależne cAMP dependent	cGMP zależne cGMP dependent			
		$\overline{\mathbf{x}}_{\pm}$ SD					
		$124,\!4\!\pm\!35,\!1$	93,5±19,3	104,8±14,1			
mitochondria mitochondria		79,3±11,5*	78,9±7,2*	75,4±16,2*			
postmitochondrialna (nadsącz) postmitochondrial (supernatant)		166,5±49,2*	$137,0\pm 26,1$	144,1±39,5*			
osad — pellet		$133,7\pm29,7*$	$135,8\pm22,1*$	146,8±29,6*			
podfrakcje błon	A'	$113,6 \pm 31,3$	$93,9 \pm 27,8$	$113,6\pm 26,7$			
synaptozomalnych	А	$91,9 \pm 16,8$	$86, 6 \pm 21, 3$	$105,3 \pm 29,9$			
synaptosomal membrane	В	$85,5 \pm 38,3$	$78,6\pm24,0$	$84,5 \pm 22,7$			
subfractions	С	$138,8 \pm 29,3*$	$132,0\pm 22,5*$	$151,8\pm 39,1*$			
	D	$119,2\pm 25,4$	$102,4 \pm 37,0$	$114,0 \pm 27,5$			

 ${\rm x}\pm{\rm SD}$ — średnia arytmetyczna z 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

— arithmetic mean of 5 determinations \pm standard deviation

* — różnice znamienne statystycznie

* — differences statistically significant.

wowano również wzrost aktywności kinaz cAMP-zależnych i niezależnych o ok. 30—35%, a cGMP-zależnych o ok. 46—50%.

Grupa III — króliki po 15 minutowym niedokrwieniu przed retransfuzją krwi. Uzyskane wyniki odnoszono do wyników obu poprzednich przedstawionych grup i wyrażono w % odpowiednich wartości stwierdzanych w grupach I i II (tabela 3).

W porównaniu z wynikami grupy I stwierdzono znamienny statystycznie wzrost aktywności trzech badanych kinaz, wynoszący ok. 100%

Nr 1

Kinazy białkowe w niedokrwieniu mózgu

Tabela 3. Aktywność kinaz białkowych w podfrakcjach komórkowych z mózgów królików po 15 min hipoksji krążeniowej (badanych przed wykonaniem retransfuzji krwi)

Table 3. Activity of protein kinases in the subcellular fractions of the brains of rabbits after 15-minute circulatory hypoxia (before retransfusion) Grupa III

Group III								
		Aktywność kinaz w % wartości grup kontrolnych Kinase activity (% of values in control groups)						
Rodzaj frakcji Fraction		niezależne independent	cAMP zależne cAMP-dependent	cGMP zależne cGMP-dependent				
prover by prover and the			$\bar{x\pm}$ SD					
mielina		N 125,6 \pm 29,7	115,1+37,2	101,3+14,7				
myelin		Z 116,1 \pm 27,4	$131,7\pm 42,6$	$108,9 \pm 15,7$				
mitochondria		N 126,8±31,0	$109,4\pm 20,2$	$90,6 \pm 11,4$				
mitochondria		Z 171,9 \pm 42,0*	$204,6 \pm 37,8*$	$175,3 \pm 22,2*$				
postmitochondrialna		N 208,5±80,5*	$189,3 \pm 46,5 *$	$200,8 \pm 26,5*$				
postmitochondrial		Z 89,5 \pm 34,6	$99,1 \pm 26,5$	$86,9 \pm 21,4$				
osad — pellet		N 107,3±13,8	$106, 6 \pm 14, 8$	$83,9 \pm 10,8*$				
		Z 103,8±17,2	$113,2\pm 15,8$	72,8 \pm 14,6*				
podfrakcie błon synaptozo	- A'	N 132.6 $+37.1$	92.9 ± 15.5	101.4 ± 7.7				
malnych		Z $116,1\pm 25,0$	$119,4\pm20,0$	$102,1\pm7,5$				
	A	N 126,9±28,3	$97,4\pm 19,8$	$86,5 \pm 28,3$				
		Z 119,8 \pm 26,8	$96,5 \pm 24,6$	$126,4\pm 36,9$				
synaptosomal membrane	в	N 116,9±3,9*	$105,7 \pm 19,3$	97,5±22,1				
subfractions		Z 246,0 \pm 79,2*	$223,9\pm71,5*$	$235,5 \pm 56,2*$				
	С	N 149,8±31,9*	$167,7\pm24,6*$	180,1±17,8*				
		Z 125,4 \pm 11,5	$129,5\pm 5,5*$	$130,9 \pm 6,6*$				
	D	N 106,2±35,2	$95,9\pm9,3$	$85,4 \pm 22,9$				
		Z 111,2±19,3	$98,1 \pm 22,9$	$113,7 \pm 30,6$				

N -- za 100% przyjęto wyniki grupy I -- results of group I taken as 100%

- Z za 100% przyjmowano wyniki grupy II — results of group II taken as 100%
- $x\pm$ SD średnia arytmetyczna z 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe — arithmetic mean of 5 determinations \pm standard deviation
- róźnice znamienne statystycznie
 differences statistically significant

Neuropatologia Polska - 3

Nr 1

we frakcji postmitochondrialnej (nadsącz) oraz 50—80% w synaptozomalnej podfrakcji C. Ponadto stwierdzono znamienny statystycznie spadek aktywności enzymu zależnego od cGMP (o ok. 20%) w osadzie. Wzrost aktywności kinaz niezależnych w synaptozomalnej podfrakcji C wynosił również ok. 20%.

Tabela 4. Aktywność kinaz białkowych w podfrakcjach komórkowych z mózgów królików po 15 min hipoksji krążeniowej (badanych po wykonaniu retransfuzji krwi)

Table 4. Activity of protein kinases in the subcellular fractions of the brains of rabbits after 15-minute circulatory hypoxia (with subsequent retransfusion) Grupa IV

Group IV							
		Aktywność kinaz w % wartości kontrolnych Kinase activity (% of values in control groups)					
Rodzaj frakcji Fraction		niezależne independent	cAMP zależne cAMP-dependent	cGMP zależne cGMP-dependent			
			x±SD				
mielina	N	$97,8\pm 35,2$	84,9±11,5*	$92,6\pm25,1$			
myelin	Z	$80,9\pm29,6$	$100,6 \pm 28,6$	$94,3 \pm 28,2$			
mitochondria	N	f 91,1±30,3	$89,6 \pm 25,1$	$107,9 \pm 31,9$			
mitochondria	Z	$112,7\pm 30,6$	$102,7 \pm 33,6$	$142,4\pm 52,6$			
postmitochondrialna	N	$93,4\pm 30,9$	$107,1\pm 37,2$	$95,3 \pm 39,3$			
postmitochondrial		84,0±33,0	$90,4\pm 30,7$	77,9±17,7*			
osad — pellet	N	$87,6\pm 22,4$	$79,3 \pm 4,4*$	$76,4 \pm 18,5*$			
	Z	67,4±19,9	$78,7 \pm 19,1*$	$66,7 \pm 16,7*$			
podfrakcje błon synaptozo- A'		$99,4\pm 32,6$	$99,3 \pm 34,5$	$106, 1 \pm 34, 9$			
malnych	Z	$89,3 \pm 20,5$	88,3±17,3	$94,3 \pm 30,8$			
А	N	$136,6\pm 41,4$	$104,2\pm 34,3$	$102,4 \pm 38,7$			
	Z	$131,5 \pm 47,5$	$98,1\pm 38,1$	$106,8 \pm 32,1$			
synaptosomal membrane B	N	$100,2\pm 30,7$	$115,2\pm 25,4$	$139,7 \pm 25,4*$			
subfractions	Z	$109,5 \pm 36,2$	$128,5\pm 17,7*$	169,4±36,8*			
C	N	$142,1\pm 30,6*$	$142,7\pm13,2*$	$142,6\pm 30,1*$			
	Z	84,3±27,5	$81,8 \pm 27,8$	85,9±31,5			
D	N	$94,9\pm11,6$	95,8±19,2	$91,9 \pm 28.0$			
	Z	$99,1 \pm 28,9$	$112,2\pm 31,6$	$118,5 \pm 26,2$			

Oznaczenia jak w Tabeli 3

For designations see Table 3

34

W porównaniu z grupą II znamienny wzrost aktywności wszystkich trzech badanych kinaz stwierdzono w mitochondriach (75—100%) oraz w synaptozomalnych podfrakcjach B (o ok. 130%) i C (o ok. 30%). W podfrakcji nazwanej osadem, a zawierającej jądra komórkowe obniżała się o ok. 30% jedynie aktywność kinaz zależnych od cGMP.

Grupa IV — króliki po 15 minutowym niedokrwieniu i po retransfuzji krwi. Podobnie jak w grupie III, uzyskane wyniki porównano z wynikami grup I i II (tabela 4).

W odniesieniu do wyników grupy I stwierdzono znamienny statystycznie spadek aktywności kinaz zależnych od cAMP w mielinie (o ok. 15%) i w osadzie (o ok. 20%). W synaptozomalnej podfrakcji B obserwowano tylko wzrost aktywności kinaz zależnych od cGMP (o ok. 40%), natomiast w podfrakcji C wszystkich trzech kinaz — o ok. 40%.

Z porównania wyników grupy IV z grupą II wynika spadek aktywności ok. 20—30% wszystkich badanych kinaz w osadzie zawierającym jądra komórkowe oraz podwyższenie aktywności kinaz zależnych od cAMP i cGMP w synaptozomalnej podfrakcji B (o ok. 30—40%).

OMÓWIENIE

Stosowany model doświadczalnej hipoksji krążeniowej, poza elementem niedokrwienia tkanki nerwowej (Mossakowski 1974; Kapuściński 1974), zawiera szereg dodatkowych czynników, wynikających z zabiegu chirurgicznego, wpływu stosowanego środka narkotycznego, a także szoku hipowolemicznego i hipotermii, związanych z upustem krwi. Powoduje to konieczność porównywania wyników uzyskiwanych w warunkach hipoksji krążeniowej z dwoma układami kontrolnymi: z grupą zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom doświadczalnym oraz z grupą zwierząt po kontrolnym zabiegu operacyjnym. Ta ostatnia grupa łączy wpływ stosowanej narkozy nembutalowej oraz tych elementów, które wynikają z wykonywania na królikach zabiegu chirurgicznego, trwającego ok. 30 minut.

Oddziaływanie tych czynników na aktywność badanych enzymów odzwierciedlają zmiany ich aktywności stwierdzane w mitochondriach, w podfrakcjach błon synaptozomalnych zawierających zewnętrzne i wewnętrzne błony mitochondrialne, a także we frakcji postmitochondrialnej i w osadzie zawierającym jądra komórkowe (tabela 2). Zmiany te dotyczą w równym stopniu wszystkich badanych kinaz.

Dla wykazania ewentualnych różnic w zachowaniu się kinaz białkowych w warunkach niedokrwienia tkanki nerwowej oraz bezpośrednio po jego ustąpieniu, badania wykonano przed (grupa III) i po wykonaniu retransfuzji krwi (grupa IV). Porównując wyniki uzyska-
ne w obu grupach doświadczalnych stwierdzono wyraźne różnice w zachowaniu się badanych enzymów.

W mitochondriach, we frakcji postmitochondrialnej, w mielinie, a także w podfrakcjach zawierających zewnętrzne i wewnętrzne błony mitochondrialne, zmiany aktywności kinaz białkowych były znacznie wyraźniejsze w grupie III tzn. w mózgach królików badanych przed retransfuzją krwi. Jedynie we frakcji zawierającej jądra komórkowe zmiany aktywności kinaz nasilały się po wykonaniu retransfuzji. Wydaje się, że większość zmian w aktywności badanych enzymów, jakie stwierdzono w czasie trwania niedokrwienia wyrównuje się po wprowadzeniu do ustroju królika upuszczonej krwi, co nie wyklucza możliwości ponownego ich wystąpienia w późniejszym okresie poischemicznym.

W żadnej z badanych grup doświadczalnych nie obserwowano istotnych różnic w aktywności kinaz zależnych od cAMP i cGMP. Zgodnie z poglądami niektórych autorów (Dinnendahl 1975; Stone i wsp. 1975; Wiegant, Gispen 1976), zarówno oba cykliczne nukleotydy, jak również zależne od nich kinazy białkowe są zaangażowane w różne układy przewodnictwa nerwowego: cAMP i zależne od niego kinazy w układzie adrenergicznym, natomiast cGMP wraz z zależnymi kinazami w układzie cholinergicznym. W podfrakcjach synaptozomalnych A' i A zawierających fragmenty cholinergicznych i adrenergicznych połączeń synaptycznych, otrzymanych z mózgów normalnych królików (grupa I — tabela 1) aktywność kinaz zależnych od obu cyklicznych nukleotydów była najwyższa, nie stwierdzono jednak zmian aktywności kinaz cAMP-zależnych lub cGMP-zależnych w żadnej z grup doświadczalnych.

Z przedstawionych wyników badań wynika także, że szczególnie wrażliwe na niedokrwienie są enzymy zlokalizowane w podfrakcjach synaptozomalnych zawierających wewnętrzne i zewnętrzne błony mitochondrialne, w mitochondriach, we frakcji postmitochondrialnej zawierającej struktury mikrosomalne oraz w osadzie, w którym znajdowały się jądra komórkowe. Lokalizacja tych zaburzeń wyraźnie sugeruje ich związek, ze stwierdzanymi w tych samych warunkach doświadczalnych, zmianami we własnościach metabolicznych mitochondriów (Domańska-Janik i wsp. 1974), w metabolizmie glikogenu (Sikorska, Śmiałek 1974), w aktywności enzymów ciągu glikolitycznego (Broniszewska--Ardelt, Sikorska 1976), a także z zaburzeniami w procesach biosyntezy białek (Albrecht 1974; Svanidze, Museridze 1974).

Interpretacja zmian aktywności kinaz białkowych stwierdzonych w stosowanych warunkach doświadczalnych jest trudna, ponieważ

niewiele dotychczas wiadomo o czynnikach mogących modulować ich aktywność. Wykazano, że zależne od cyklicznych nukleotydów kinazy białkowe występują w postaci kompleksów z naturalnym, termostabilnym białkiem (modulatorem), które oddysocjowując wraz z cząsteczką nukleotydu, lub zmieniając własności pod jego wpływem odsłania aktywny enzym (Langan 1973).

Poziom cAMP w mózgu w warunkach niedotlenienia zwykle wzrasta (Sikorska 1980), poziom cGMP obniża się (Kabayashi i wsp. 1977), natomiast zmiany aktywności kinaz zależnych od obu cyklicznych nukleotydów, a także i kinaz niezależnych przebiegają zupełnie równolegle, trudno jest więc ustalić bezpośredni związek między zmianami w zawartości cyklicznych nukleotydów i w aktywności badanych kinaz. Istotny wpływ na procesy fosforylacji przebiegające z udziałem tych enzymów mają również jony wapnia (De Lorentzo 1976). Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy nie można jednak ocenić, który z wymienionych czynników i w jakim stopniu warunkuje stwierdzone zmiany w aktywności badanych kinaz białkowych.

Serdecznie dziękuję Paniom Teresie Pańkowskiej i Teresie Bok oraz Panu Sławomirowi Januszewskiemu za pomoc, techniczną przy wykonywaniu niniejszej pracy.

М. Сикорска

a state to part

ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛЯТОРНОЙ ГИПОКСИИ НА АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВЫХ КИНАЗ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МОЗГА КРОЛИКА

Резюме

Исследовалось влияние 15-минутной циркуляторной гипоксии по модели Мчедлишвили (1973), а затем ретрансфузии, на активность белковых киназ зависимых и независимых от сАМР и сСМР в разных субклеточных фракциях мозка кролика, с учетом изменений, вызванных операцией.

В условиях гипоксии наступал рост активности энзимов всех трех групп в митохондриях, а также в двух тяжелых фракциях синаптосомальных оболочек (фракции В и С по Виттакеру, 1964) при одновременном снижению активности киназ зависимых от сСМР во фракциях, заключающих клеточные ядра.

Ретрансфузия вызывала дополнительно значительное заторможение активности всех киназ, связанных с ядерной фракцией, а одновременно проявлялась тенденция к возврату к норме активности энзимов, связанных с остальными субклеточными фракциями.

Комментируется связь наблюдаемых изменений с остальными метаболическими неправильностями, сопутствующими циркуляторной гипоксии.

http://rcin.org.pl

37

M. Sikorska

M. Sikorska

EFFECT OF CIRCULATORY HYPOXIA ON THE ACTIVITY OF PROTEIN KINASES IN THE SUBCELLULAR FRACTIONS OF RABBIT BRAIN

Summary

The study deals with the effect of a 15-minute circulatory hypoxia performed according to Mchedlishvili (1973) and of subsequent retransfusion on the activities of cAMP- and cGMP-dependent and cyclic nucleotide-independent protein kinases in various subcellular fractions of the rabbit brain, with a correction being made for the changes produced by sham operation. Hypoxia led to an increase of the activity of all the three groups of enzymes in mitochondria and in the two heavy synaptosomal membrane fractions (B and C after Whittaker, 1964), and to a drop of the cGMP-dependent kinase activity in the fraction containing cell nuclei. Retransfusion caused an additional marked reduction of all the three kinases associated with the nuclear fraction, while the enzymes of the other subcellular fractions showed a tendency to return to the control level. The relation of the observed changes to other metabolic alterations accompanying circulatory hypoxia is discussed.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Albrecht J.: Polyribosomes of the rabbit brain in circulatory hypoxia. Neuropat Pol. 1974, 12, 665-669.
- 2. Broniszewska-Ardelt B., Sikorska M.: Effect of circulatory hypoxia on the activities of key glycolytic enzyme. Bull. Acad. Sci Pol. 1976, 24, 303-308.
- Chikvaidze V. N., Melitauri N. N.: Effect of ischemia on the regional distribution of biogenic amines in the brains of rabbits. Neuropat. Pol. 1974, 12, 671-682.
- Chikvaidze V. N., Melitauri N. N.: Issledovanije sviazi izmienienij sodzierzanija biogennych aminov so sdvigami cikliczeskoj 3,5-adenozinomonofosfornoj kisloty w golovnom mozgie w processie ischemii i w postischemiczeskom periode. Brain Ischemia — Symposium, Tbilisi 1976. streszczenia.
- Costa M., Gerner E. W., Russell D. H.: G₁ specific increases in cyclic AMP levels and protein kinase activity in chinese hamster ovary cells. Biochim. Biophys. Acta 1976, 425, 246-255.
- 6. De Lorenzo R. J.: Calcium-dependent phosphorylation of specific synaptosomal fraction proteins: possible role of phosphoproteins in mediating neurotransmitter release. Bioch. Bioph. Res. Comm. 1976, 71, 590-596.
- Dinnendahl V.: Effect of stress on mouse brain cyclic nucleotide levels in vivo. Brain Res. 1975, 100, 716-719.
- Domańska-Janik K., Wideman J., Łazarewicz W., Majewska D.: Effects of circulatory hypoxia on some metabolic processes in the brain. Neuropat. Pol. 1974, 12, 643-654.
- 9. Gurd J. W., Jones L. R., Mahler H. R., Moore W. J.: Isolation and partial characterization of rat brain synaptic plasma membranes. J. Neurochem. 1970, 22, 281-290.

Kinazy białkowe w niedokrwieniu mózgu

- Kapuściński A.: Cerebral blood flow under conditions of circulatory hypoxia with particular reference to the retransfusion period. Neuropat. Pol. 1974, 12, 563-572.
- Kobayashi M., Lust W. D., Passonneau J. V.: Concentrations of energy metabolites and cyclic nucleotides during and after bilateral ischemia in the gerbil cerebral cortex. J. Neurochem. 1977, 29, 53—59.
- Langan T. A.: Protein kinases and protein kinase substrates. Advances Cycl. Res. 1973, 3, 99-153.
- 13. Lowry O. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-270.
- 14. Mchedlishvili G. I.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. Neuropat. Pol. 1973, 11, 242-262.
- Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. Neuropat. Pol. 1974, 12, 573—581.
- Schwartz J. P., Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Passonneau J. V., Klatzo I.: Alterations of cyclic nucleotide-related enzymes and ATP-ase during unilateral ischemia and recirculation in gerbil cerebral cortex. J. Neurochem. 1976, 27, 101-107.
- 17. Sikorska M., Śmiałek M.: Glycogen level and UDP glucose:glycogen α -4--glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in the brain of rabbits after experimental circulatory hypoxia. Neuropat. Pol. 1974, 12, 655–664.
- Sikorska M.: Adenylate cyclase activity in the rabbit brain following circulatory hypoxia. Brain Ischemia — Symposium, Tbilisi 1976, streszczenia.
- 19. Sikorska M.: Poziom 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu oraz aktywność enzymów związanych z jego metabolizmem w mózgach szczurów w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla. Neuropat. Pol. 1980, w druku.
- Stone T. W., Taylor D. A., Bloom F. E.: Cyclic AMP and cyclic GMP may mediate opposite neuronal responses in the rat cerebral cortex. Science 1975, 187, 845—846.
- Svanidze I. K., Museridze D. P.: Changes in cytoplasmic RNA content and nuclear dry mass of the cortical neurons and glia in the postischemic period. Neuropat. Pol. 1974, 12, 635-642.
- Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirkland R. J. A.: The separation of synaptic vecicles from nerve-ending particles ("synaptosomes"). Biochem. J. 1964, 90, 293—303.
- Wiegant V. M., Gispen W. H.: Cyclic nucleotides and nerve function. W: Molecular and functional neurobiology, Ed. W. H. Gispen, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York 1976, 235—254.

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

39

RYSZARD PLUTA, ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

CAŁKOWITE NIEDOKRWIENIE MÓZGU A CZYNNOŚĆ BIOELEKTRYCZNA

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

Niedokrwienie mózgu jest bardzo ważnym czynnikiem patogennym dla różnych zaburzeń neurologicznych, a jego następstwa są przedmiotem szczegółowych badań klinicznych i doświadczalnych. Pomimo licznych prac w tej dziedzinie granice odwracalności uszkodzenia niedokrwiennego mózgu sa nadal dyskusyjne. W standardowych warunkach doświadczalnych, w których mózgowy przepływ krwi był całkowicie zatrzymany przy prawidłowej ciepłocie zwierzęcia otrzymywano bardzo różne wyniki. Maksymalny czas całkowitego niedokrwienia mózgu, po którym powracała spontaniczna czynność EEG wahał się pomiedzy 10 min. (Hirsch i wsp. 1957) i 60 min. (Hossmann, Sato 1971; Hossmann, Zimmermann 1974), a uszkodzenia neurologiczne były obecne po 4 min. (Weinberger i wsp. 1940) lub nieobecne po 25 min. (Neely, Youmans 1963). Opisano także całkowity powrót do normy zapisu EEG, który podczas kilku tygodni był płaski (Cavafutti 1959; Bental, Leibowitz 1961). Niejednolite wyniki pojawiły się nawet w tym samym modelu doświadczalnym, chociaż zwracano uwagę na powtarzalność postępowania operacyjnego Hossmann, Kleihues 1973; Hossmann, Zimmermann 1974).

Duże różnice w czasie odnowy po niedokrwieniu kontrastują z wąskimi granicami zaniku czynności bioelektrycznej podczas niedokrwienia. U zwierząt normotermicznych, jak i u ludzi z zatrzymaniem krążenia mózgowego, spontaniczna czynność bioelektryczna mózgu zanika pomiędzy 10 a 20 sek. (Hossmann, Sato 1971; Hossmann, Zimmermann 1974; Majkowski 1975; Vise i wsp. 1978). Różnice w możliwości przeżycia mózgu, zależą w związku z powyższym, w dużej mierze od stopnia odnowy krążenia mózgowego po niedokrwieniu, a powrót czyn-

ności neuronalnej po długim niedokrwieniu możliwy jest tylko wtedy, kiedy mózgowy przepływ krwi jest w pełni odnowiony (Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974). Z drugiej strony, jeżeli całkowite niedokrwienie mózgu trwa dłużej niż 5 min., to trudno jest uniknąć zaburzeń w mózgowym przepływie krwi po okresie niedokrwienia (Vries i wsp. 1975). Zaburzenia te spowodowane są szeregiem zmian, wśród których wymienić należy spadek ciśnienia krwi w początkowym okresie odnowy krążenia, agregację elementów morfotycznych krwi, zmiany lepkości krwi, koagulację wewnątrznaczyniową, zmiany morfologiczne mózgu, a wśród nich obrzęk śródbłonków naczyń, co pociąga za sobą wzrost oporów naczyniowych i zmniejszenie ciśnienia perfuzyjnego w mózgu (Hossmann, Zimmermann 1974; Fischer i wsp. 1977; Hossmann i wsp. 1977). Stosunkowo mało wiadomo o wspólnych zależnościach pomiędzy tymi zmianami i ich wzajemnym stosunku, a jeszcze mniej o możliwościach ich zapobiegania. Wydaje się, że jakikolwiek, mózgowy czy pozamózgowy parametr, który w czasie niedokrwienia może ulec zmianie, ma niewątpliwie istotny, bezpośredni czy też pośredni wpływ na mózgowy przepływ krwi po niedokrwieniu, a co za tym idzie na odnowe czynności bioelektrycznej mózgu.

Celem pracy było określenie czasu wystąpienia pierwszych objawów powrotu spontanicznej czynności bioelektrycznej mózgu oraz ośrodka oddechowego po całkowitym niedokrwieniu mózgowia.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia wykonano na 22 królikach samcach, o ciężarze ciała 2,5-3,0 kg. Zwierzęta były usypiane pentobarbitalem (Nembutal 40 mg/kg dożylnie), następnie wykonywano tracheotomię i po unieruchomieniu Tricuranem (13.5 mg/kg dożylnie) były one wentylowane powietrzem pokojowym. W razie potrzeby małe dodatkowe dawki Nembutalu i Tricuranu podawano dożylnie podczas trwania doświadczenia. Jedna tętnica i jedna żyła udowa były kaniulowane celem pomiaru ciśnienia krwi i wstrzyknieć leków. Doświadczenia były przeprowadzane w warunkach normotermicznych. Całkowite niedokrwienie mózgu wykonywano u królików w czasie 5, 15, 20, 30, 45 i 60 min. przez wewnątrzklatkowe zamkniecie pnia ramiennogłowowego i lewej tętnicy podobojczykowej w odległości około 5 mm od ich odejścia od łuku aorty, dojściem nadmostkowym bez wykonywania torakotomii. W celu uniknięcia obocznego napływu krwi do mózgu zmniejszano obwodowe ciśnienie tętnicze do 70-50 mm Hg metoda kontrolowanego skrwawania przez drugą tętnicę udową do kompensatora ciśnienia. Po okresach całkowitego niedokrwienia mózgu, udrażniano tętnice dopro-

wadzające krew do mózgu przez zdjęcie zacisków, wznawiając w ten sposób krążenie. Jedynie tętnica szyjna wewnętrzna prawa pozostawała niedrożna, ponieważ tą drogą wstrzykiwano znacznik dla oceny mózgowego przepływu krwi. Czas przeżycia zwierząt po niedokrwieniu mózgu wynosił od 2 do 6 godz. W okresie po niedokrwieniu wykonywano reinfuzję własnej krwi zwierzęcia, a układowe ciśnienie tętnicze utrzymywano na poziomie kontrolnym przy użyciu kompensatora, który zawierał fizjologiczny roztwór soli (50 ml) oraz 3 mg adrenaliny. Czynność neuronalna oceniano technikami elektrofizjologicznymi. Po umocowaniu głowy zwierzęcia w aparacie stereotaktycznym, EEG rejestrowano srebrnymi elektrodami dyskowymi (Beckman 214 410), które umieszczano bezpośrednio na powierzchni kości czaszki. Elektrody znajdowały się w okolicy czołowo-ciemieniowej i ciemieniowo-potylicznej nad półkula lewa oraz w okolicy ciemieniowo-potylicznej nad półkulą prawą. Odległości międzyelektrodowe wynosiły 3-5 mm, stosownie do wielkości czaszki. Zapis uzyskiwano za pomocą aparatu do EEG (Accutrace-8 firmy Beckman) poprzez dwubiegunowe odprowadzenia podłużne i poprzeczne przy prędkości przesuwu papieru 10 i 30 mm/sek. (dwie kratki na ryc. 1-4 odpowiadają 1 sekundzie). Z użyciem tego samego aparatu rejestrowano równocześnie zintegrowaną czynność ośrodka oddechowego z nerwu przeponowego przy pomocy srebrnej elektrody dwubiegunowej. Nieżależnie od zapisu, czynność bioelektryczną ośrodka oddechowego kontrolowano również metodą akustyczną przez wzmocnienie impulsów i zastosowanie głośnika. Ciśnienie wewnątrzczaszkowe mierzono przez igłę umieszczoną w komorze czwartej z zastosowaniem przetwornika ciśnienia (Statham P23) i elektromanometru (EK 4 firmy Farum). Układowe ciśnienie tętnicze mierzono w tętnicy udowej z wykorzystaniem wyżej wymienionych urządzeń Zarówno ciśnienie wewnątrzczaszkowe, jak i ciśnienie układowe krwi rejestrowano w sposób ciągły przy użyciu poligrafu (Multicard-3M firmy Farum). Mózgowy przepływ krwi oceniano metodą klirensu ¹³³Xe po wstrzyknięciu do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej. Detektor scyntylacyjny (NaJ) umieszczano nad prawą półkulą mózgową w okolicy czołowo-ciemieniowej, rejestrując krzywą klirensu w sposób ciągły z zastosowaniem typowego zestawu do pomiarów promieniowania gamma. W określonych przedziałach czasowych po niedokrwieniu, mózgi perfundowano przez prawą tętnicę szyjną wewnętrzną pod ciśnieniem 80 mm Hg i pobierano do badań w mikroskopie świetlnym.

WYNIKI

Przed okresem niedokrwienia wykonywano kontrolne pomiary wszystkich zapisywanych parametrów. Pomimo rozległej preparatyki chi-

43

R. Pluta, A. Kapuściński 🦂

Tabela 1. Powrót pierwszych objawów spontanicznej czynności bioelektrycznej mózgu i ośrodka oddechowego po całkowitym niedokrwieniu

Table 1. Recovery of first symptoms of the spontaneous bioelectric activity of brain and respiratory center after complete ischemia

Czas niedokrwienia		Powrót	czynności			
mózgu (min) Liczba zwierząt		oddech	owej (min)	Powrót EEG (min)		
Time of brain ische-	Number of animals	Recovery	of respiratory	Recovery	of EEG (min)	
mia (min)		activ	ity (min)			
		0,5		2,5	_	
5	3	2,0	x = 1,3	2,0	x = 2,8	
		1,5		4,0		
		9,0		30,0		
15	3	16,0	x=10,0	54,0		
		5,0		25,0		
	L - Charles	20,0		37,0		
		12,0		42,0		
20	5	7,0	$\bar{x}=10,2$	34,0	x = 42,2	
		6,0		43,0		
		6,0		55,0		
The Party of the P		11,0		35,0		
				43,0		
30	5	8,0	x=8,3	40,0		
				37,0		
		6,0		35,0		
		14,0		50,0		
45	3	20.0	$\bar{x} = 17.0$	60,0	x = 61.6	
				75,0		
		17.0		60.0		
60	3	23.0	-21.6	61.0	$\bar{x} = 69.0$	
00	0	25,0	a=21,0	86.0	a=00,0	
		20,0		00,0		

rurgicznej zapisy mieściły się w granicach fizjologicznych. W EEG dominowała głównie aktywność o średniej częstotliwości z amplitudą zmieniającą się w szerokich granicach (ryc. 1 i 2). Zapis z nerwu przeponowego był bezpośrednim potwierdzeniem aktywności bioelektrycznej ośrodka oddechowego (ryc. 3 i 4). Częstość impulsów ośrodka oddechowego odpowiadała ściśle ilości oddechów zwierzęcia przed podaniem środka zwiotczającego.

Zaciśnięcie tętnic doprowadzających krew do mózgu wraz z obniżeniem obwodowego ciśnienia tętniczego przez upust krwi powodowało zatrzymanie krążenia mózgowego. Potwierdzeniem zatrzymania mózgowego przepływu krwi w czasie całkowitego niedokrwienia były płaskie krzywe klirensu ¹³³Xe, które ilustrują ryciny 5 i 6.



Ryc. 1. Zmiany EEG w całkowitym niedokrwieniu mózgu. Czas niedokrwienia 5 min. A. Kontrola, B. Początek niedokrwienia, C. Niedokrwienie — cisza bio-elektryczna, D. Pierwsze objawy powrotu EEG — 2 min po niedokrwieniu, E. 25 min po niedokrwieniu. W każdej fazie doświadczenia górna krzywa — odprowadzenie podłużne (lewa półkula), dolna krzywa — odprowadzenie poprzeczne (międzypółkulowe). Kalibracja: I 100 µV — 1 sek.

Fig. 1. EEG changes in the complete brain ischemia. Time of ischemia 5 min. A. Control, B. Beginning of ischemia, C. Ischemia — bioelectric silence, D. First symptoms of EEG recovery — 2 min after ischemia, E. 25 min after ischemia. In the each phase of experiment upper curve — longitudinal lead (left hemisphere), lower curve-transversal lead (interhemispheric). Calibration: I 100 μ V — 1 sec.

Po zatrzymaniu mózgowego krążenia krwi pojawiały się gwałtowne zmiany w czynnościach neurofizjologicznych. Czas zaniku spontanicznej czynności EEG wynosił średnio 23,9 sek (n=17). Napięcie i częstotliwość EEG bardzo szybko zmniejszały się i po upływie wyżej wymienionego czasu zanikały, osiągając wartości linii izoelektrycznej.

Natomiast czas zaniku spontanicznej czynności oddechowej rejestrowanej z nerwu przeponowego wynosił średnio 3,6 min. (n=19). W czasie niedokrwienia EEG był izoelektryczny oraz cały czas utrzymywała się cisza bioelektryczna w ośrodku oddechowym.

Mózgowy przepływ krwi odnawiano 5, 15, 20, 30, 45 i 60 min. od zaciśnięcia tętnic doprowadzających, przy obwodowym ciśnieniu tęt-

niczym wahającym się w granicach kontrolnych. Udrożenie tętnic, doprowadzających krew do mózgu, powodowało gwałtowny spadek obwodowego ciśnienia tętniczego, któremu przeciwdziałano infuzją krwi i adrenaliny, dopóki średnie ciśnienie nie ustabilizowało się na poziomie kontrolnym. Recyrkulację krwi w mózgu odzwierciedlał wzrost wartości klirensu ¹³³Xe wstrzykniętego przed niedokrwieniem oraz ciśnienia wewnątrzczaszkowego z ujemnego na dodatnie. Ciśnienie tętnicze krwi było utrzymywane przez infuzję leków naczynioreaktywnych,

and all and the second and the secon B C D E G

a w pojedynczych doświadczeniach samoistnie przez układ krążenia zwierząt bez konieczności podawania środków farmakologicznych.

Powrót czynności mózgu po niedokrwieniu oceniano na podstawie pojawiania się zapisu EEG i impulsacji oddechowej. Jako początek powrotu czynności EEG brano pod uwagę pierwsze, minimalne, widoczne wychylenia linii EEG o bardzo małej amplitudzie przy takim samym wzmocnieniu jak w okresie kontrolnym. Zmiany EEG w całkowitym 5 min. niedokrwieniu mózgu ilustruje ryc. 1, natomiast powyższe zmiany po 60 min. niedokrwienia ilustruje ryc. 2.



Ryc. 3. Zmiany zintegrowanej czynności ośrodka oddechowego — zapis z nerwu przeponowego w całkowitym niedokrwieniu mózgu. Czas niedokrwienia 5 min. A. Kontrola, B. Początek niedokrwienia — 1 min, C. Niedokrwienie — cisza bio-elektryczna — 3 min, D. Pierwsze objawy powrotu czynności oddechowej — 2 min po niedokrwieniu, E. 25 min po niedokrwieniu. Kalibracja: I 200 μ V — 1 sek.

Fig. 3. Changes of the respiratory center integrated activity — recording from the phrenic nerve in the complete brain ischemia. Time of ischemia 5 min. A. Control, B. Beginning of ischemia, C. Ischemia — bioelectric silence — 3 min, D. First symptoms of respiratory activity recovery — 2 min after ischemia, E. 25 min after ischemia. Calibration: I 200 μ V — 1 sec.

Ryc. 2. Zmiany EEG w całkowitym niedokrwieniu mózgu. Czas niedokrwienia 60 min. A. Kontrola, B. Początek niedokrwienia, C. Niedokrwienie — cisza bioelektryczna, D. Pierwsze objawy powrotu EEG — 61 min po niedokrwieniu, E. 140 min po niedokrwieniu, F. 285 min po niedokrwieniu, G. 375 min po niedo krwieniu. W każdej fazie doświadczenia górna krzywa — odprowadzenie podłużne (lewa półkula), dolna krzywa — odprowadzenie poprzeczne (międzypółkulowe). Kalibracja: I 100 μ V — 1 sek.

Fig. 2. EEG changes in the complete brain ischemia. Time of ischemia 60 min.
A. Control, B. Beginning of ischemia, C. Ischemia — bioelectric silence, D. First symptoms of EEG recovery — 61 min after ischemia, E. 140 min after ischemia, F. 285 min after ischemia, G. 375 min after ischemia. In the each phase of experiment upper curve — longitudinal lead (left hemisphere), lower curve — transversal lead (interhemispheric). Caligration: I 100 μV — 1 sek.

Nr 1



Ryc. 4. Zmiany zintegrowanej czynności ośrodka oddechowego — zapis z nerwu przeponowego w całkowitym niedokrwieniu mózgu. Czas niedokrwienia 60 min. A. Kontrola, B. Początek niedokrwienia — 1 min. C. Niedokrwienie — 3 min, D. Niedokrwienie — cisza bioelektryczna — 4 min, E. Pierwsze objawy powrotu czynności oddechowej — 17 min po niedokrwieniu, F. 34 min po niedokrwieniu, G. 71 min po niedokrwieniu, H. 156 min po niedokrwieniu. Kalibracja: I 200 μ V — 1 sek.

Fig. 4. Changes of the respiratory center integrated activity — recording from the phrenic nerve in the complete brain ischemia. Time of ischemia 60 min.
A. Control, B. Beginning of ischemia — 1 min, C. Ischemia — 3 min, D. Ischemia — bioelectric silence, — 4 min, E. First symptoms of respiratory activity recovery — 17 min after ischemia, F. 34 min after ischemia, G. 71 min after ischemia, H. 156 min after ischemia. Calibration: I 200 µV — 1 sec.



Ryc. 5. Mózgowy przepływ krwi badany metodą klirensu ¹³³Xe. A. Kontrola, B. Niedokrwienie 5 min — zatrzymanie mózgowego przepływu krwi. Strzałki oznaczają zatrzymanie i przywrócenie mózgowego przepływu krwi. (—) 1 min.

Fig. 5. Cerebral blood flow measured by the ¹³³Xe clearance method. A. Control, B. Ischemia 5 min — stop of the cerebral blood flow. Arrows mean stop and restoration of the cerebral blood flow. (---) 1 min.



Ryc. 6. Mózgowy przepływ krwi badany metodą klirensu ¹³³Xe. A. Kontrola,
B. Niedokrwienie 60 min — zatrzymanie mózgowego przepływu krwi. Strzałki oznaczają zatrzymanie i przywrócenie mózgowego przepływu krwi. (---) 1 min.
Fig. 6. Cerebral blood flow measured by the ¹³³Xe clearance method. A. Control,
B. Ischemia 60 min — stop of the cerebral blood flow. Arrows mean stop and restoration of the cerebral blood flow. (---) 1 min.

Ryciny 3 i 4 przedstawiają zmiany zintegrowanej czynności ośrodka oddechowego rejestrowane z nerwu przeponowego po 5 i 60 min. całkowitego niedokrwienia mózgu. Należy zwrócić uwagę, że zanik czynności bioelektrycznej mózgu był dużo wcześniejszy niż zanik czynności bioelektrycznej ośrodka oddechowego. Natomiast po niedokrwieniu czynność ośrodka oddechowego powracała wcześniej niż spontaniczna czynność bioelektryczna mózgu.

Powrót EEG postępował bardzo wolno. Początkowo pojawiały się pojedyncze fale wolne o wysokiej amplitudzie, oddzielone odcinkami izoelektrycznymi o zmiennym czasie trwania. Później pojawiały się fale o większej częstotliwości i niskiej amplitudzie, których napięcie wolno wzrastało. Obserwowano również pojedyncze zwierzęta, u których powrót EEG był tylko okresowy i u których występował wtórnie nieodwracalny zanik czynności bioelektrycznej mózgu.

Powrót spontanicznej czynności ośrodka oddechowego był szybszy w porównaniu z powrotem EEG. Częstość impulsów oddechowych wzrastała w czasie i po określonym okresie osiągała wartości kontrolne. Czas powrotu spontanicznej czynności oddechowej do częstości zbliżonych do wartości kontrolnych, w wyżej wymienionych okresach niedokrwienia, wynosił od 8 do 240 min. od zakończenia całkowitego niedokrwienia mózgu.

OMÓWIENIE

Wyniki obecnej serii doświadczeń na królikach są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych autorów dokonanych na normotermicznych kotach i małpach, u których również złożone czynności neuronalne, takie jak wzbudzona i spontaniczna aktywność EEG, powracały po Neuropatologia Polska – 4

całkowitym, trwającym 60 min. niedokrwieniu (Hossmann, Sato 1971; Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974).

Nasze obserwacje wskazują, że krótkotrwałe niedokrwienie mózgu, trwające 5 min., pozwala na całkowity powrót do normy EEG i czynności ośrodka oddechowego. Po tym czasie niedokrwienia czynność ośrodka oddechowego normalizowała się średnio około 10,6 min. (n=3). Natomiast EEG normalizowało się średnio około 18 min (n=3), co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Vries i wsp. 1975). Należy zwrócić uwagę na to, że czynność ośrodka oddechowego wraca dużo wcześniej w porównaniu z powrotem spontanicznej czynności bioelektrycznej mózgu. Mogłoby to sugerować większą tolerancję neuronów ośrodka oddechowego na niedokrwienie lub wolniejsze rozwijanie się zmian niedokrwiennych w tych neuronach. Należy również brać pod uwagę różnice w unaczynieniu rdzenia przedłużonego i mózgu.

W obecnych doświadczeniach odnowa przepływu krwi w mózgu pojawiała się w optymalnych warunkach sercowo-krążeniowych. Uzyskiwano je, zapobiegając reakcji nadciśnieniowej w obwodowym układzie krążenia na zacisk naczyń przez kontrolowany upust krwi, co nie dopuszczało do niewydolności serca podczas niedokrwienia mózgu. Zapobieganie reakcji nadciśnieniowej wydaje się szczególnie ważne, ponieważ taka odpowiedź może prowadzić do ostrej niewydolności krążenia z ciężkim obrzękiem płuc. Można sądzić, że unikając tej komplikacji zachowuje się wydolność sercowo-krażeniowa i przez to poprawia odnowę przepływu krwi w mózgu. Inny czynnik, który wydaje się być ważny dla odnowy czynności bioelektrycznej mózgu, to prowadzenie niedokrwienia bez zastoju krwi (Hossmann, Zimmermann 1974). Według tych autorów zastoinowe niedokrwienie jest bardziej uszkadzające niż niedokrwienie bez zastoju krwi. Można to tłumaczyć agregacją elementów morfotycznych krwi w układzie naczyniowym mózgu, które utrudniając mózgowy przepływ krwi w okresie odnowy, moga wydłużać czas niedokrwienia (Fischer i wsp. 1977; Hossmann i wsp. 1977). Należy przypuszczać, że w obecnych doświadczeniach czynnik ten nie był tak istotny, ponieważ krew odpływała naczyniami żylnymi, ale mechanizm ten może mieć wpływ na stopień czynnościowej odnowy mózgu.

Uniknięcie niewydolności sercowo-krążeniowej i zaburzeń mikrokrążenia w mózgu umożliwia prawidłową odnowę przepływu krwi w mózgu po długich okresach jego niedokrwienia. Wydaje się, że istnieje ścisła zależność pomiędzy przepływem krwi w mózgu po niedokrwieniu, a powrotem czynności bioelektrycznej neuronów (Hossmann i wsp. 1973). Istotny wpływ na czas powrotu spontanicznej czynności bioelektrycz-

nej mózgu i ośrodka oddechowego miało obwodowe ciśnienie tętnicze, które w okresie po niedokrwieniu utrzymywane było w granicach kontrolnych. Celem tego postępowania było utrzymywanie układu krążenia w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, co mogło mieć wpływ na nieco krótsze czasy powrotu EEG, zwłaszcza po długich okresach niedokrwienia, w porównaniu z wynikami innych autorów (Hossmann, Zimmermann 1974).

Na podstawie przeprowadzonych badań istnieją przesłanki do przyjęcia, iż komórki mózgowe przeżywały wyżej wymienione okresy niedokrwienia. Powstaje w związku z tym pytanie — jaki odsetek neuronów nie uległ zmianie pod wpływem czynnika patologicznego. W przeprowadzonych doświadczeniach odnowa czynnościowa nie może być jednakże opisywana terminami funkcjonowania neurologicznego, ponieważ zwierzęta były pod wpływem narkozy i środka zwiotczającego przy utrzymywaniu czynności oddechowej za pomocą sztucznej wentylacji. Obserwowanego przez nas powrotu czynności bioelektrycznej, zwłaszcza po dłuższych czasach całkowitego niedokrwienia, nie należy wobec tego utożsamiać z potencjalnym powrotem czynności mózgu jako całości.

Р. Плута, А. Капустински

ПОЛНАЯ ИШЕМИЯ МОЗГА А БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Резюме

У 22 кроликов, анестезированных пентобарбиталом и обездвиженных Трикураном, на фоне искусственной вентиляции в условиях нормотермии вызывали полную ишемию мозга длительностью от 5 до 60 минут путем пережатия truncus brachiocephalicus и левой подключичной артерии при снижении артериального давления до 70—50 мм рт. ст. После ишемии животные переживали от 2-х до 6-ти часов при поддержании артериального давления на контрольном урбвне. Первые признаки спонтанной активности дыхательного центра, регистрируемой от диафрагмального нерва, появлялись после ишемии раныше, чем первые симптомы спонтанной активности головного мозга на ЭЭГ, соответственно от 1,3 до 21,6 мин. для активности дыхательного центра и от 2,8 до 69,0 мин. для электрической активности мозга.

R. Pluta, A. Kapuściński

COMPLETE BRAIN ISCHEMIA VERSUS BIOELECTRICAL ACTIVITY

Summary

In 22 rabbits anesthetized with pentobarbital, immobilized with Tricuran and artificially ventilated at normothermic conditions, complete brain ischemia was performed during the period of 5 to 60 min by occlusion the brachiocephalic and left subclavian arteries, and a decrease of blood pressure to 70—50 mm Hg. The survival time of animals following ischemia was 2 to 6 hrs with the blood

pressure maintained at the control level. First symptoms of the spontaneous respiratory activity registered from the phrenic nerve recovered earlier following ischemia as compared to recovery of first symptoms of the spontaneous EEG activity and presented respectively from 1.3 to 21.6 min for respiratory activity, and from 2.8 to 69.0 min for EEG activity.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Bental E., Leibowitz U.: Flat electroencephalograms during 28 days in a case of "encephalitis". Electroenceph. clin. Neurophysiol., 1961, 13, 457-460.
- 2. Cavafutti G. B.: Depressed EEG tracings in infantile encephalitic syndromes. Electroenceph. clin. Neurophysiol., 1959, 11, 847.
- 3. Fischer E. G., Amer A. III., Hedley-Whyte E. T., O'Gorman S.: Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon". Stroke 1977, 8, 36–39.
- Hirsch H., Euler K. H., Schneider M.: Über die Erholung und Wiederbelebung des Gehirns nach Ischämie bei Normothermie. Pflueger Arch. ges. Physiol., 1957, 265, 281—313.
- 5. Hossmann K.-A., Sato K.: Effect of ischemia on the sensorimotor cortex in cat. Electroenceph. clin. Neurophysiol., 1971, 30, 535-545.
- Hossmann K.-A., Kleihues P.: Reversibility of ischemic brain damage. Arch. Neurol. (Chic.), 1973, 29, 375—384.
- Hossmann K.-A., Lechtape-Grüter H., Hossmann V.: The role of cenebral blood flow for the recovery of the brain after prolonged ischemia. Z. Neurol., 1973, 204, 281–299.
- Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. Brain Res., 1974, 81, 59-74.
- Hossmann V., Hossmann K.-A., Takagi S.: Disseminated intravascular coagulation and blood flow following prolonged ischemia of the cat brain. W: Cerebral function metabolism and circulation. Red. D. H. Ingvar, N. A. Lassen, Munksgaard, Copenhagen 1977, Acta Neurol. Scand., 56, Suppl. 64, 23.4-23.5.
- 10. Majkowski J.: Atlas elektroencefalografii. PZWL, Warszawa 1975.
- 11. Neely W. A., Youmans J. R.: Anoxia of canine brain without damage. J. Amer. med. Ass., 1963, 183, 1085-1087.
- Vise W. M., Schuier F. J., Hossmann K.-A., Zülch K. J.: Pathophysiology and morphology after microembolism of the cat brain. Advances in Neurology, Red.: J. Cervós-Navarro, E. Betz, G. Ebhardt, R. Ferszt, R. Wüllenweber, Raven Press, New York, 1978, 263-269.
- Vries J. K., Sullivan H. G., Becker D. P.: The threshold for ischemic brain damage. Blood flow and metabolism in the brain. Proc. 7th Intern. Symp., Aviemore, Scotland, 1975. Red. M. Harper, B. Jennett, D. Miller, J. Rowan. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 1975, 10.8-10.9.
- Weinberger L. M., Gibbon M. H., Gibbon J. H. Jr.: Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. I. Physiologic effects. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.), 1940, 43, 615-634.

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

52

start of a set in sector

V FLAME LE LEVEL & BELLEVEL VILLE

55 1

C. M. C. MARK

MIECZYSŁAW WENDER, ANDRZEJ ŻÓRAWSKI, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ, OLGA MULAREK, JANINA STANISŁAWSKA, DANUTA TALKOWSKA

and the second s

KWASY TŁUSZCZOWE LIPIDÓW MIELINY MÓZGU W ZATRUCIU METYLONITROZOMOCZNIKIEM *

Instytut Chorób Układu Nerwowego Akademii Medycznej, Poznań Dyrektor: prof. dr M. Wender

Mielina jest strukturą tkanki nerwowej o dużej wrażliwości na działanie szeregu substancji chemicznych. Zatrucie cyjanowodorem, związkiem powodującym ostre niedotlenienie przez inaktywację oksydazy cytochromowej, a także wywołującym zahamowanie transportu aminokwasów, prowadzi do rozległej demielinizacji w istocie białej mózgu, szczególnie w spoidle wielkim (Levine, Stypulkowski 1959; Hirano 1967; Wender i wsp. 1978 b). Zatrucie cyjanianem sodu przez działanie na końcowe grupy aminowe białek, wywołuje powstawanie dużych wakuoli wewnątrzmielinowych z rozszczepieniem blaszek mieliny na liniach międzyperiodycznych (Tellez i wsp. 1978). Cały szereg związków fosforoorganicznych powoduje demielinizację, mającą jednak prawdopodobnie charakter wtórny w stosunku do uszkodzenia aksonów. Nie jest natomiast wiadome, w jakim stopniu jest to zależne od wydatnego obniżenia syntezy lipidów w tkance nerwowej oraz aktywacji obojętnej proteazy, co należy do znamiennych zjawisk biochemicznych obserwowanych w doświadczalnym zatruciu tymi związkami (Porzellati 1971).

Podanie zwierzęciu doświadczalnemu pojedynczej dawki trójetylenku cyny powoduje duży obrzęk istoty białej z tworzeniem wakuoli wewnątrzmielinowych. Rzadko jednak spostrzega się demielinizację. Udaje się ją uzyskać przy przewlekłym stosowaniu trójetylenku cyny (Eto i wsp. 1971; Smith, 1973; Wender i wsp. 1974). Zastosowanie u młodych zwierząt kuprisonu (bis cyclohexanone oxaldihydrazone), silne-

^{*} Badania zostały wykonane w ramach problemu węzłowego 10.4.2.02.3.3. koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

go związku chelatującego miedź prowadzi również do znacznego obrzęku mózgu, szczególnie istoty białej z następową demielinizacją. Zmiany ultrastrukturalne są zbliżone do opisanych przy zatruciu trójetylenkiem cyny (Carleton 1969). Podobny jest także wpływ heksachlorofenu, w którego mechanizmie działania toksycznego szczególną rolę odgrywa hamowanie aktywnego transportu aminokwasów (Lampert i wsp. 1973; Matthieu i wsp. 1974). W szczególnych warunkach doświadczalnych także hydrazyd kwasu izonikotynowego (Lampert, Schachet 1968), dieta uboga w miedź (Carleton, Kelly 1969), cykloleucyna, aminokwas interferujący z przemianą metioniny (Greco i wsp. 1978), oraz 6-aminonikotynamid (Miyoshi i wsp. 1978) prowadzą do zmian wakuolarnych w osłonce mielinowej. Jak wykazały prace Kroh (1973, 1976), pochodne alkilowe nitrozomocznika mogą wywoływać również zmiany demielinizacyjne w ośrodkowym układzie nerwowym.

Badania toksycznych demielinizacji mają istotne znaczenie dla wyjaśnienia szeregu aspektów patomechanizmu zjawiska demielinizacji, ze względu na możliwość określenia charakteru zaburzeń przemian ustrojowych, wywołanych przez stosowany czynnik szkodliwy. Dużą wartość w tym zakresie mają badania wpływu pochodnych alkilowych nitrozomocznika, które wywierają silne działanie na kwasy nukleinowe i białka komórkowe, co prowadzi do transformacji blastomatycznej.

W dotychczasowych naszych badaniach (Wender i wsp. 1977) na temat wpływu zatrucia dorosłych szczurów BD IX metylonitrozomocznikiem, w dawce 60 mg na kg wagi ciała, podawanego przez 6 kolejnych dni, stwierdziliśmy powstawanie zmian gąbczastych w istocie białej mózgu i móżdżku. Obraz elektroforetyczny białek mieliny był zasadniczo niezmieniony. Lipidy osłonek wykazały natomiast, w pierwszych 3 miesiącach po zatruciu, obniżenie zawartości sfingomielin oraz zwiększenie ilości estrów cholesterolu. Wskazuje to, że zatrucie metylonitrozomocznikiem powoduje u dorosłych szczurów zaburzenie przemiany lipidów struktur błoniastych tkanki nerwowej. Kontynuując te badania, w niniejszej pracy zajęliśmy się składem kwasów tłuszczowych lipidów mieliny, zwracając szczególną uwagę na frakcje sfingomielin i estrów cholesterolu, to jest tych składników, których zawartość ulega w toku zatrucia metylonitrozomocznikiem istotnym zmianom. W badaniach uwzględniono również skład kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny i plazmalogenu, to jest tych frakcji fosfatydowych, które zdaniem niektórych badaczy dostarczać mogą kwasów tłuszczowych dla estryfikacji wolnego cholesterolu w przebiegu procesu demielinizacji (Borri i wsp. 1969).

MATERIAŁ I METODY

Dorosłym szczurom BD IX obu płci, wagi 200—300 g, wstrzykiwano dożylnie 1 raz dziennie przez 6 kolejnych dni 3% roztwór wodny metylonitrozomocznika (MNU) w dawce 60 mg na kg wagi ciała. Badano obraz kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny, plazmalogenu, sfingomielin i estrów cholesterolu frakcji mielinowej uzyskanej od zwierząt zabitych w 2, 3, 4, 6, 8 i 12 tygodniu od ostatniego wstrzyknięcia MNU.

Badania chemiczne. Mózgi przeznaczone do badań chemicznych wyjmowano z czaszki jak najszybciej po dekapitacji, a następnie izolowano z nich frakcję mielinową według metody opisanej przez Nortona i Poduslo (1973). Próbki mózgu poddawano wirowaniu różnicowemu w nieciągłym (0,32 i 0,95 M, pH 7,0) gradiencie gęstości sacharozy, w rotorze wolno wiszącym. Wyizolowaną frakcję mielinową przemywano 3-krotnie wodą destylowaną, stosując po każdym przemyciu wirowanie przez 20 min. przy 70 000 \times g. Skład i czystość otrzymanej frakcji mielinowej kontrolowano przy użyciu mikroskopu elektronowego.

Lipidy ekstrahowano z frakcji mielinowej stosując metodę Folch-Pi i wsp. (1957). Ekstrakt całkowity lipidów rozdzielano przy użyciu chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej. Cholesterol rozdzielano przy użyciu metody według Svennerholma (1964). Fosfolipidy rozdzielano przy pomocy dwukierunkowej chromatografii według techniki opisanej przez Singha i wsp. (1971). Płytki pokrywano żelem krzemionkowym G (Merck), a następnie chromatogramy rozwijano w pierwszym kierunku przy użyciu mieszaniny chloroform-metanol-woda (65:25:4). Po wysuszeniu płytki hydrolizowano 12% kwasem solnym w metanolu. HCl i metanol wyparowywano z płyt przy użyciu strumienia azotu, a następnie chromatogramy rozwijano w drugim kierunku mieszaniną chloroform-aceton-metanol-kwas octowy lodowaty-woda (5:2:1:1:0,5).

Kwasy tłuszczowe fosfatydylocholiny, plazmalogenu, sfingomielin i estrów cholesterolu mieliny przeprowadzano w estry metylowe stosując kwaśną metanolizę w obecności 4% HCl. Estry metylowe ekstrahowano heksanem. Rozpuszczalnik odparowywano całkowicie w atmosferze argonu, według metody opisanej przez Kishimoto i Radina (1965). Otrzymane w ten sposób estry metylowe kwasów tłuszczowych rozdzielano następnie za pomocą chromatografii cieczowo-gazowej, w chromatografie gazowym Pye 104 wyposażonym w detektor jonizacyjno-płomieniowy. Kolumny wypełniano 15% DEGS (bursztynian glikolu dwuetylenowego), zaadsorbowanym na gaz-chrom Q 100/120 mesh. Temperatura kolumny 220°C, temperatura detektora 280°. Gaz nośny argon. Przepływ 30 ml/min.

Kwasy tłuszczowe identyfikowano porównując odpowiednie szczyty chromatogramów doświadczalnych z otrzymanymi ze standardowej mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Applied Sciences Laboratories). Ocena ilościowa chromatogramu była oparta na oznaczeniu odpowiednich pól szczytów wyliczonych z czasu retencji i wysokości szczytu. Wyniki wyrażono we względnym stosunku poszczególnych kwasów tłuszczowych w odniesieniu do całości kwasów tłuszczowych.

Techniki histologiczne. Skrawki mrożone barwiono metodą Spielmeyera, hematoksyliną-eozyną oraz Sudanem III. Skrawki zatopione w celoidynie barwiono metodą Woelcke, Nissla i hematoksyliną-eozyną, a zatopione w parafinie metodą Kanzlera, Nissla i Klüver-Barrery.

WYNIKI

Dane kliniczne. W okresie podawania metylonitrozomocznika, zwykle w połowie serii wstrzyknięć, zwierzęta wykazywały spowolnienie psychoruchowe. Innych objawów ogólnych, ani neurologicznych nie spostrzegano w czasie całego okresu obserwacji.

Dane morfologiczne. U wielu zwierząt, należących do wszystkich grup doświadczalnych, obserwowano w istocie białej mózgu i móżdżku różnego stopnia zmiany gąbczaste oraz nieznaczne poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych. Nie spostrzegano reakcji glejowej, demielinizacji ani obecności złogów sudanododatnich.

Dane biochemiczne. Wyniki badań chemicznych są przedstawione w tabelach od 1 do 4. Z analizy spektrum kwasów tłuszczowych lipidów mieliny, uzyskanego drogą chromatografii gazowej wynika, że skład kwasów tłuszczowych wszystkich badanych frakcji lipidów, to jest fosfatydylocholiny, plazmalogenu, sfingomielin i estrów cholesterolu był w zatruciu doświadczalnym zmieniony w porównaniu z obrazem kontrolnym. Obraz kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny wykazał najbardziej stałe zmiany w pierwszych 6 tygodniach po wstrzyknięciu metylonitrozomocznika. Zmiany dotyczyły kwasu olejowego (18:1) oraz dwóch kwasów wielonienasyconych (20:5 i 22:6). Pierwszy z tych kwasów tłuszczowych wykazał wyraźny spadek, a dwa pozostałe wzrost zawartości odsetkowej. Podobne w swym charakterze, chociaż niecałkowicie identyczne zmiany stwierdzono w składzie kwasów tłuszczowych plazmalogenu. Stwierdzono tu spadek zawartości kwasu olejowego (18:1), najwyższego ilościowo kwasu tłuszczowego tej frakcji lipidowej oraz wzrost odsetka kwasów tłuszczowych wielonienasy-

conych (20:5 i 22:6). Otrzymane wyniki wykazały także spadek odsetka kwasu gadoleinowego (20:1) oraz wzrost względnej zawartości kwasu arachidonowego (20:4) i kwasu lignocerynowego (24:0). Stwierdzono również wzrost odsetka dwóch kwasów tłuszczowych niezidentyfikowanych. Powyżej przedstawione odchylenia występują w prawie wszystkich grupach doświadczalnych.

Frakcja sfingomielinowa mieliny wykazała również istotne odchylenia. Szczególnie wyraźny był obserwowany we wszystkich grupach doświadczalnych spadek odsetka kwasu nerwonowego (24:1) oraz wzrost procentowy kwasu homolinolenowego (20:3) i kwasu wielonienasyconego (20:5). W niektórych grupach doświadczalnych stwierdzono także obniżenie odsetkowej zawartości kwasu palmitoolejowego (16:1).

Skład kwasów tłuszczowych estrów cholesterolu mieliny u szczurów BD IX zatrutych metylonitrozomocznikiem różni się również znacznie od stwierdzonego w estrach cholesterolu, występujących w ilościach śladowych w mielinie prawidłowej. Najbardziej znamienny był obserwowany we wszystkich grupach doświadczalnych wzrost odsetka kwasów tłuszczowych wielonienasyconych: homolinolenowego (20:3) i (20:5). W wielu, chociaż nie we wszystkich grupach doświadczalnych spostrzega się także wzrost odsetka kwasu mirystynowego (14:0), lignocerynowego (24:0) oraz spadek odsetka kwasu olejowego (18:1) i linolowego (18:2).

OMÓWIENIE

Zmiany w składzie lipidów mieliny obserwowane w zatruciu metylonitrozomocznikiem dorosłych szczurów BD IX są tylko częściowo zbliżone do obserwowanych w pierwotnych i wtórnych procesach demielinizacyjnych. Odpowiada to charakterowi zmian morfologicznych, w tym znaczeniu, że nie obserwuje się wyraźnego rozpadu osłonek mielinowych, a przeważają zmiany gąbczaste, podobne do występujących w wielu procesach toksycznych, przedstawionych w zarysie we wstępie pracy. Szczególnie nietypowy dla procesu demielinizacyjnego jest prawie wybiórczy spadek zawartości sfingomielin, obserwowany po zatruciu metylonitrozomocznikiem (Wender i wsp. 1977). Również obraz kwasów tłuszczowych tej frakcji lipidowej, jak wykazały nasze obecne badania, jest nieprawidłowy, przy czym szczególnie uderza wyraźny spadek zawartości kwasu nerwonowego, przy wzroście zawartości kwasów wielonienasyconych. Jest interesujące, że podobne, chociaż nieidentyczne zmiany w zakresie obrazu kwasów tłuszczowych wielonienasyconych obserwuje się w dwóch innych frakcjach fosfolipidów mieliny, a mianowicie w fosfatydylocholinie i sfingomielinie.

Nr 1

Kwasy tłuszczowe	Norma	2 tygodnie weeks	3 tygodnie weeks	4 tygodnie weeks	6 tygodnie weeks	8 tygodni weeks	12 tygodni weeks			
Fatty acids	Control group		po zatruciu MNU after MNU intoxication							
14:0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.5 ± 0.2			
14:1	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02			
15:0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.04			
16:0	22.5 ± 0.7	26.6 ± 1.6	19.6 ± 2.4	21.3 ± 2.3	16.5 ± 0.7	19.8 ± 1.2	31.4 ± 1.1			
16 : 1	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1			
17:0	0.4±0.03	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04			
18:0	22.2 ± 0.5	$22.6\!\pm\!0.4$	20.4 ± 1.0	19.7 ± 2.5	18.1 ± 0.8	20.7 ± 0.7	19.4 ± 0.6			
18 : 1	35.8 ± 1.1	21.8 ± 3.1	10.6 ± 5.1	26.2 ± 2.1	19.5 ± 3.7	30.0 ± 2.0	26.6 ± 2.2			
18:2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	$1.3\pm0,1$	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.05			
18:3	0.2 ± 0.02	0.3±0.04	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.05			
20:0	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.05	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.1			
20 : 1	2.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	$1.4 \pm 0,3$	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.1			
20 : 2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03	0.4 ± 0.3	0.0±	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.04	0.0±			
J. S. A.			http://rcin	.org.pl						

Tabela 1. Skład procentowy kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny mózgowej mieliny szczurów BD IX zatrutych metylonitrozomocznikiem Table 1. Percent composition of fatty acids in phosphatidyl choline of the cerebral myelin in BD IX rats intoxicated with MNU

Nr 1

58

a hi danata danata data da ana ana ana ana ana ana ana ana ana							
niezidentyfikowany unidentified	3.7 ± 0.4	8.9 ± 1.6	16.6 ± 2.9	5.4 ± 0.8	69+09	53 ± 04	77+19
20 • 3	19+01		26+03	38+08	31+08	20101	22102
20:4	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.4	3.0 ± 0.8 2.2 ± 0.4	3.1 ± 0.8 2.4 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2
20:5	3.1 ± 0.3	2.2 ± 0.5	9.8 ± 2.2	6.5 ± 1.2	10.3 ± 1.1	6.4 + 0.5	1.7 ± 0.03
niezidentyfikowany	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.6±0.04	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
unidentified	0.1 + 0.04	0.0 (
unidentified	0.1±0.04	0.0±	1.5 ± 0.4	0.0±	2.6 ± 0.3	0.0±	1.6 ± 0.5
niezidentyfikowany	0.0.1	0.0.1	0.0.1	0.0.1	0.0.1	0.0.1	
undentified	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±
24:0	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.4	2.4 ± 0.3	2.9 ± 0.4	1.2 ± 0.04
24 : 1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.6 ± 0.3	5.9 ± 1.0	2.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2
niezidentyfikowany							
unidentified	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.4	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm -$	0.0±-	$0.0 \pm$
22 : 6	0.6 ± 0.1	5.7±1.7	$\underline{6.3\pm0.9}$	2.7 ± 0.7	4.5 ± 1.9	0.9 ± 0.4	$0.0 \pm -$

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Number of animals in each group: 6 Średnia \pm średni błąd średniej Mean \pm S.E.

http://rcin.org.pl

Lipidy mózgu w zatruciu MNU

59

. Tabela 2. Skład procentowy kwasów tłuszczowych plazmalogenu mózgowej mieliny szczurów BD IX zatrutych metylonitrozomocznikiem

Table 2. Percent composition of fatty acids in plasmalogen of the cerebral myelin in BD IX rats intoxicated with MNU

Kwasy tłuszczowe	Norma	2 tygodnie weeks	3 tygodnie weeks	4 tygodnie weeks	6 tygodni weeks	8 tygodni weeks	12 tygodni weeks	
Fatty acids	Control group	1 a 144	the set of the	po zatruciu MNU after MNU intoxication		-	ŕ	
14:0	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	
14:1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.05	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04	
15:0	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.1	
16:0	6.8 ± 1.0	10.3 ± 0.7	10.5 ± 0.7	$7.7\!\pm\!0.4$	6.5 ± 0.5	6.8 ± 0.7	5.9 ± 0.6	
16 : 1	2.6 ± 0.3	2.8 ± 0.3	3.4 ± 0.9	2.4 ± 0.3	0.4±0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	
	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.05	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.05	
niezidentyfikowany unidentified	0.6 ± 0.1	0.0±	0.0±-	0.0±	0.7 ± 0.2	0.0±	0.0±	
18:0	5.0 ± 0.4	9.4 ± 0.4	5.5 ± 0.4	4.3 ± 0.4	6.7 ± 0.6	5.4 ± 0.4	4.3 ± 0.2	
18 : 1	44.8 ± 2.8	$\underline{33.4 \pm 2.6}$	$\underline{18.0\pm2.7}$	$\underline{32.9 \pm 3.2}$	4.6 ± 0.7	31.4 ± 1.0	33.0 ± 2.4	
18:2	1.3 ± 0.5	$0.7\!\pm\!0.09$	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	
. 18 : 3	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.03	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.05	

20:0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.07	0.7 ± 0.05	0.8 ± 0.1	2.1 ± 0.4	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3
20:1	$12,6\pm1.0$	7.2 ± 0.5	2.5 ± 0.6	8.7 ± 1.2	2.2 ± 0.8	9.4 ± 1.1	9.6 ± 0.5
niezidentyfikowany unidentified	$0.0 \pm -$	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±-	0.3 ± 0.05
20:2	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.03	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.05	0.2 ± 0.1
niezidentyfikowany							
unidentified	6.0 ± 0.8	11.7 ± 1.3	16.5 ± 2.5	10.3 ± 1.0	2.1 ± 0.5	10.2 ± 0.9	6.8 ± 1.4
			1			28 T	- +or1
20:3	3.6 ± 0.4	3.5 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.3	2.0 ± 0.6	5.4 ± 0.3	8.1 ± 0.7
20:4	0.3 ± 0.03	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	5.0 ± 1.1	1.8 ± 0.3	3.7 ± 1.4
niezidentyfikowany unidentified	$0.0 \pm -$	0.2 ± 0.2	0.0±-	0.0±	0.6 ± 0.2	0.0±	0.7 ± 0.2
20:5	5.3 ± 0.8	3.4 ± 0.3	13.2 ± 0.7	13.9 ± 1.6	6.6 ± 0.3	14.7 ± 1.1	6.3 ± 0.7
niezidentyfikowany unidentified	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.9 ± 1.0	1.6 ± 0.2	3.6 ± 0.5	2.2 ± 0.2	0.9 ± 0.3
niezidentyfikowany unidentified	$4.6\!\pm\!0.8$	2.8 ± 0.3	3.9 ± 1.0	2.2 ± 0.4	3.1 ± 0.5	3.9 ± 0.3	5.3 ± 1.0
24:0	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	26.6 ± 1.8	0.7 ± 0.2	2.2 ± 0.4
24:1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	$0.0 \pm$	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.6
niezidentyfikowany unidentified	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	$0.0 \pm -$	0.0±	5.3 ± 0.8	0.0±-	3.1 ± 0.6
niezidentyfikowany unidentified	0.0±	0.0±	$0.0 \pm$	0.0±-	0.0±	0.0±	0.0±
22:6	0.6 ± 0.3	5.9 ± 1.5	8.6 ± 1.7	4.7 ± 0.9	14.9 ± 1.3	1.6 ± 0.3	$0.0 \pm$
the second s							

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Number of animals in each group: 6 Średnia \pm średni błąd średniej Mean \pm S. E.

http://rcin.org.pl

Lipidy mózgu w zatruciu MNU

Nr 1

61

Kwasy tłuszczowe	Norma	2 tygodnie weeks	3 tygodnie weeks	4 tygodnie weeks	6 tygodni weeks	8 tygodni weeks	12 tygodni weeks	
Fatty acids	Control group		po zatruciu MNU after MNU intoxication					
14:0	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.4	15+03	1.1 ± 0.2	18-02	23408	10102	
14:1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.3 ± 0.8 0.2 ± 0.06	1.0 ± 0.2	
15:0	2.0 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.1 0.7 + 0.1	0.2 ± 0.00	0.1 ± 0.03	
16:0	14.7 + 1.8	16.0 + 1.2	15.4 + 1.1	10.3 ± 0.9	12.3 ± 0.6	15.0 ± 3.0	9.7 ± 1.6	
16 : 1	6.9 ± 1.0	5.6 ± 0.6	4.3 ± 0.7	2.2 ± 0.3	3.6 ± 1.0	2.8 ± 0.8	2.9 ± 0.7	
17:0	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.4 + 0.1	0.5 + 0.1	0.6 ± 0.1	
18:0	19.1 ± 1.2	23.2 ± 2.2	16.1 ± 0.8	15.0 + 1.5	13.9 ± 0.5	18.1 ± 0.9	26.2 ± 1.1	
18:1	12.2 ± 1.3	14.6 ± 0.4	13.8 ± 1.2	10.6 ± 0.8	10.8 ± 0.9	9.2 ± 0.9	9.7 ± 0.7	
18:2	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.1 + 1.1	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	
18:3	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.9	0.8 ± 0.07	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	
20:0	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.2 ± 0.04	0.2 + 0.1	2.2 ± 0.5	3.9 ± 0.4	
20:1	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.4	3.5 + 0.1	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	
20:2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.6	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	
niezidentyfikowany						-	-	
unidentified	1.6 ± 0.2	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.2 ± 0.4	1.2 ± 0.1	3.1 ± 0.3	2.6 ± 0.6	
20:3	2.6 ± 0.5	4.3 ± 0.5	6.6 ± 0.8	9.8 ± 0.9	7.4 ± 0.9	6.1 ± 1.0	4.9 ± 0.7	
20:4	3.4 ± 0.8	$\overline{3.7\pm0.3}$	5.1 ± 0.3	6.7 ± 1.0	3.8 ± 0.1	4.4 ± 0.2	7.1+1.4	
20 : 5	12.6 ± 1.0	8.5 ± 2.4	21.5 ± 1.8	28.3 ± 2.3	$\frac{28.7\pm1.6}{}$	22.4 ± 4.1	14.3 ± 0.7	
niezidentyfikowany unidentified	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.0±	0.0±	0.0±	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.05	
niezidentyfikowany unidentified	0.0±	0.3 ± 0.2	$0.0\pm$	0.0±	0.0±	$0.0 \pm$	0.0±	

Tabela 3. Skład procentowy kwasów tłuszczowych sfingomielin mózgowej mieliny szczurów BD IX zatrutych metylonitrozomocznikiem Table 3. Percent composition of fatty acids in sphingomyelins of the cerebral myelin in BD IX rats intoxicated with MNU

http://rcin.org.pl

M. Wender i wsp.

Nr -

24:0	3.6 ± 0.3	1.1 ± 0.5	4.2 ± 0.4	5.4 ± 1.1	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.2	5.3 ± 0.5
24:1	10.8 ± 1.5	5.0 ± 0.5	$0.0 \pm$	1.3 ± 0.2	5.0 ± 0.8	3.6 ± 1.1	6.0 ± 0.6
22:6	$0.0 \pm$	1.6 ± 0.3	$0.0 \pm$	0.0±-	0.0±-	1.9 ± 0.2	0.0±-

Tabela 4. Skład procentowy kwasów tłuszczowych estrów cholesterolu mózgowej mieliny szczurów BD IX zatrutych MNU Table 4. Percent composition of fatty acids in cholesteryl esters of the cerebral myelin in BD IX rats intoxicated with MNU

Kwasy tłuszczowe	Norma	2 tygodnie weeks	3 tygodnie weeks	4 tygodnie weeks	6 tygodni weeks	8 tygodni weeks	12 12tygodni weeks			
Fatty acids	Control group		po zatruciu MNU after MNU intoxication							
14:0	2.8 ± 0.5	3.5 ± 0.4	6.2 ± 0.6	4.7 ± 0.7	2.6 ± 0.4	3.2 ± 0.6	4.3 ± 0.8			
14:1	0.6 ± 0.6	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 + 0.1	1.1 + 0.1			
15:0	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1			
16:0	22.8 ± 0.7	19.5 ± 0.7	23.7 ± 1.0	20.0 ± 1.0	12.6 ± 1.9	17.5 ± 1.5	20.3 + 1.7			
16:1	7.7 ± 0.5	5.4 ± 0.5	7.7 ± 0.7	4.8 ± 0.6	4.2 ± 0.6	4.0 ± 0.5	6.8 ± 0.5			
niezidentyfikowany unidentified	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	$0.0\pm$ —	0.0±	$0.0 \pm -$	0.0±	0.0±			
17:0	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.05	0.6 ± 0.1	0.5 + 0.1	0.5 + 0.04			
niezidentyfikowany unidentified	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm -$	0.0±	0.0±			
18:0	14.6 ± 0.4	12.2 ± 0.3	11.3 ± 0.6	12.2 ± 1.2	10.8 ± 0.4	12.8 ± 1.0	10.9 ± 1.2			
18:1	21.1 ± 0.7	17.4 ± 0.8	19.3 ± 1.0	15.7 ± 0.9	16.8 ± 1.3	12.4 ± 0.6	20.9 ± 1.9			
niezidentyfikowany unidentified	0.3 ± 0.1	$0.0 \pm -$	0.2 ± 0.1	0.0±	0.0±	0.0±	0.0±			

Nr

18:2	4.9 ± 1.4	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.6	3.2 ± 1.0	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.7
18:3	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.3
niezidentyfikowany	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	$0.0\pm$ —	0.4 ± 0.1	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm$	$0.3\pm0,1$
unidentified							
20:0	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2
20:1	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1
niezidentyfikowany	$0.0 \pm -$	$0.0\pm$	$0.0 \pm$	$0.0\pm$	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3
unidentified							
20:2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.4	2.2 ± 0.3
niezidentyfikowany	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.5	0.0±	$0.0 \pm$	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	$0.0 \pm -$
unidentified	0.0.1	0.0.1.0.1	0.0.1	0.0.1	0.0.1	0.0.+	0.0+
niezidentyfikowany	$0.0 \pm -$	0.0 ± 0.1	0.0±	0.0±-	0.0±	0.0±	0.0 =
unidentified	22102	10100	45104	41109	70104	78119	61-19
20:3	2.6 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.1 ± 0.3	7.0 ± 0.4	7.8±1.2	0.1 ± 1.2
20:4	2.0 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.1	5.7 ± 1.5	1.7 ± 0.4
niezidentyfikowany	0.3 ± 0.05	0.7 ± 0.2	$0.0\pm$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm \pm$
unidentified							
20:5	8.0 ± 1.3	18.6 ± 1.6	$13.5 \pm 1,0$	21.4 ± 2.0	26.7 ± 2.7	20.9 ± 2.0	14.3 ± 3.8
niezidentyfikowany	0.5 ± 0.04	0.0±	0.0±-	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3	$1.1\!\pm\!0.2$
unidentified					0 0 1 0 1	0.0.1	0.0.1
niezidentyfikowany	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm -$	$0.0 \pm$	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	$0.0 \pm -$	0.0±-
unidentified					10.04	22104	15100
24:0	$0.0 \pm$	0.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	$0.0 \pm -$	1.9 ± 0.4	2.3 ± 0.4	1.5 ± 0.2
24:1	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.1	$0.0\pm$	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.4	$0.0 \pm$
22:6	$0.0\pm$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm$	$0.0 \pm$	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.3

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Number of animals in each group: 6 Średnia ± średni błąd średniej Mean ± S.E. http://rcin.org.pl M. Wender i wsp.

64

Nr 1

Drugim odchyleniem w obrazie lipidów mieliny, występującym w zatruciu metylonitrozomocznikiem jest znaczny wzrost estryfikacji cholesterolu. Jest to zmiana spotykana w szeregu procesów, prowadzących do uszkodzenia osłonki mielinowej i to już we wczesnym okresie choroby, jeszcze przed pojawieniem się odczynów fagocytarnych. W oparciu o wyniki własnych badań doświadczalnych (Wender i wsp. 1978a, b) stoimy na stanowisku, że jest to zjawisko istotne w patomechanizmie demielinizacji. Z problemem tym wiąże się ściśle, szeroko dyskutowane zagadnienie pochodzenia kwasów tłuszczowych dla estryfikacji cholesterolu w warunkach patologicznych. Borri i wsp. (1969) uważają, że następujące mechanizmy mogą tutaj być brane pod uwagę: uwolnienie kwasów tłuszczowych z fosfolipidów, z ich następowym wychwytywaniem przez cholesterol mieliny i tworzeniem wiązania estrowego, synteza de novo kwasów tłuszczowych dla estryfikacji cholesterolu, migracja estrów cholesterolu z prądem krwi do tkanki nerwowej albo też bezpośrednia transacylacja przez enzym analogiczny do acylotransferazy lecytyno-cholesterolowej. Ważny element do tej dyskusji wniosły badania Eto i Suzuki (1973), którzy wykazali, że osłonka mielinowa jest miejscem gdzie znajduje się hydrolaza estrów cholesterolu. Ponieważ jednak dotychczas nie wykazano w warunkach in vivo, że enzym ten może spełniać również rolę syntetyzującą, znaczenie jego w procesie estryfikacji cholesterolu pozostaje w sferze hipotez.

Uzyskane przez nas wyniki badań składu kwasów tłuszczowych głównych fosfatydów osłonki mielinowej, w zestawieniu ze składem kwasów tłuszczowych estrów cholesterolu w zatruciu MNU, zdają się wyraźnie przeczyć możliwości, że rozpad fosfatydów stanowi punkt wyjścia dla uwolnienia kwasów tłuszczowych, biorących następnie udział w estryfikacji cholesterolu, w tym procesie doświadczalnym. Przeczy temu szczególnie fakt, że w lecytynie, plazmalogenie, sfingomielinie, jak i w estrach cholesterolu mieliny stwierdzono wzrost zawartości, w dużym stopniu identycznych kwasów tłuszczowych wielonienasyconych. Stanowi to kolejny argument na rzecz tezy, że estryfikacja cholesterolu w mielinie nie jest zmianą wtórną, zależną od działania makrofagów na produkty rozpadu lipidów mieliny. Jako źródło kwasów tłuszczowych dla estryfikacji cholesterolu we wczesnym okresie uszkodzenia osłonek mielinowych wchodzi przeto w rachubę pula wolnych kwasów tłuszczowych tkanki nerwowej, chociaż nie można wykluczyć wzrostu ich syntezy. Potwierdza to naszą tezę wysuniętą w pracy na temat obrazu kwasów tłuszczowych lipidów mózgu w encefalopatii cyjanowej (Wender, Adamczewska 1975), że pod wpływem czynników zewnętrznych działających na osłonkę mielinową następuje zmiana

Neuropatologia Polska — 5

Nr 1

warunków determinujących aktywność enzymów estryfikujących cholesterol oraz aktualnego stężenia i składu substratów w tkance nerwowej, co prowadzi do znacznej estryfikacji cholesterolu mieliny. Proces ten zdaje się stanowić ogólny mechanizm zmieniający strukturę fizyko-chemiczną osłonki mielinowej w jej części lipidowej, chociaż nie rozstrzyga jeszcze czy wcześniej nie dochodzi w niektórych warunkach doświadczalnych, do zmian białkowych zależnych od uaktywnienia proteaz tkankowych (Gabrielescu 1978).

Przytoczone badania stanowią również rozszerzenie dotychczasowych naszych obserwacji wykazujących, że zatrucie pochodnymi alkilowymi nitrozomocznika powoduje zaburzenia metabolizmu struktur błoniastych tkanki nerwowej (Wender i wsp. 1978a). Pozostaje jednak nadal nie wyjaśniony mechanizm, w jaki sposób powstałe w wyniku działania nitrozomocznika końcowe lub pośrednie metabolity, niezależnie od swego potencjalnego działania karcinogennego, zaburzają metabolizm układu mielina — komórka oligodendrogleju.

М. Вендер, А. Журавски, З. Адамчевска-Гонцежевич, О. Мулярек, Я. Станиславска, Д. Тальковска

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА МОЗГА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ

Резюме

Исследовался образ жирных кислот фосфатидилхолина, плазмалогена, свингомиелинов и сложных эфиров холестерола миелина мозга у взрослых крыс ВД IX, которым вводили внутривенно в течение очередных 6 дней 3% раствор метилнитрозомочевины дозой 60 мг на кг веса на 2, 3, 4, 6, 8 и 12 неделю после последней инъекции. Результаты исследования привели к следующим выводам:

- Образ жирных кислот свингомиелиновой фракции миелина, которая после отравления МНМ сильно снижается, делается искаженным, причем особенно видимо снижение содержания нервоновой кислоты (24:1), при одновременном росте процента многоненасыщенных жирных кислот (20:3, 20:5).
- Фосфатидилхолин и плазмалоген миелина после отравления МНМ характеризуется неправильным составом жирных кислот в форме процентного роста двух многоненасыщенных жирных кислот (20:5 и 22:6) и уменьшения содержания масляной кислоты (18:1).
- 3. Сложные эфиры, появляющиеся при отравлении МНМ в значительно увеличенном количестве в миелиновой фракции мозга, характеризуются выразительными отклонениями в процентном составе жирных кислот, причем больше всего бросается в глаза рост содержания многоненасыщенных кислот (20:3 и 22:6).
- 4. Результаты исследования состава жирных кислот фосфатидов и сложных эфиров холестерола после отравления МНМ решительно противоречит тому, чтобы разложение фосфатидов было в процессе миелинопатии выходным

пунктом увольнения жирных кислот для формирования сложных эфиров холестерола. Это является дополнительным аргументом для тезиса, что резкое увеличение сложных эфиров холестерола миелина является одним из более ранних явлений, происходящих в липидной миелиновой оболочке во время процесса демиелинизации.

M. Wender, A. Żórawski, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, O. Mularek, J. Stanisławska, D. Talkowska

FATTY ACIDS OF MYELIN LIPIDS OF THE BRAIN IN METHYLNITROZOUREA (MNU) INTOXICATION

Summary

The fatty acids of phosphatidylcholine, plasmalogen and cholesterol esters of the adult brain myelin were examined in BD IX rats which were given intravenous injections of 3% MNU in a dose of 60 mg/kg body weight, for 6 consecutive days. The studies were performed 2, 3, 4, 6, 8 and 12 weeks after the last administration of MNU. The following conclusions were drawn:

1. The fatty acid composition of the sphingomyelin fraction of which the content in the myelin markedly decreased after MNU intoxication, was disturbed. The most remarkable changes included the lowered level of nervonic acid (24:1) and the rise of the content of polyunsaturated acids (20:3 and 20:5).

2. Phosphatidylcholine and plasmalogen were characterized by the increased proportion of two polyunsaturated acids (20:5 and 22:6) and the diminished content of oleic acid (18:1).

3. The cholesterol esthers, which during MNU intoxication occur in increased quantities, contained strikingly increased proportion of polyunsaturated acids 20:3 and 22:6.

4. The above results contradict the hypothesis that degradation of phosphatides be the trigger of the release of fatty acids for the esterification of cholesterol in the process of myelinopathy. This provides further support to the idea that a rapid increase of cholesterol esterification in myelin is one of the early events occurring in the lipid layer of the myelin sheath in the course of demyelination.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Borri F., Bertinelli R., Toso M., Taramelli M., Paci M., Pacini A.: Composizione degli acidi grassi degli esteri del colesterolo della sostanza bianca cerebrale della sclerosi multiple. Acta Neurol. (Napoli) 1969, 24, 593-602.
- Carleton W.: Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprisone. Exp. Molec. Path. 1969, 10, 274-283.
- 3. Carleton W., Kelly W.: Neural lesions in the offsprings of female rats fed a copper-deficient diet. J. Nutr. 1969, 97, 42-58.
- 4. Eto Y., Suzuki K., Suzuki K.: Lipid composition of rat brain myelin in triethyl tin-induced edema. J. Lipid Res. 1971, 12, 570-579.

Nr 1

- Eto Y., Suzuki K.: Developmental changes of cholesterol ester hydrolases localized in myelin and microsomes of rat brain. J. Neurochem. 1973, 20, 1475—1477.
- Folch Pi, J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957, 226, 497-511.
- 7. Gabrielescu E.: Neuroproteazele, Editura Academiei Republicii Socialiste Romania, Bucuresti 1978.
- 8. Greco C., Garrett R., Powell H., Lampert P.: Cycloleucine encephalopathy. Abstracts VIIIth Intern. Congress Neuropath. Washington 1978, 619.
- 9. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy. Electron microscopic observations of early lesions in white matter. J. Neuropath. Exp. Neurol. 1967, 26, 200-212.
- 10. Kishimoto Y., Radin N.: A reaction tube for methanolysis, instability of hydrogen chloride in methanol. J. Lipid Res. 1965, 6, 435-436.
- Kroh H.: Ethylnitrosourea-induced microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. W: Current Topics in Neuropathology. Selected papers of 4th Danube Symposium on Neuropathology. Red. K. Jellinger. Facultas Verlag, Wien 1973, 29—35.
- Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Preliminary report. Neuropat. Pol. 1976, 14, 115-119.
- Lampert P., Schachet S.: Electron microscope observations on experimental spongy degeneration of cerebellar white matter. J. Neuropath. exp. Neurol. 1968, 27, 210—224.
- Lampert P., O'Brien J., Garrett R.: Hexochlorophene encephalopathy. Acta neuropath. (Berl.) 1973, 23, 326—332.
- 15. Levine S., Stypulkowski W.: Experimental cyanide encephalopathy. Arch. Path. 1959, 67, 306-323.
- Matthieu J., Zimmerman M., Webster H. de F., Ulsamer A., Brady R., Quarles R.: Hexachlorophene intoxication. Characterization of myelin and myelin related fractions in the rat during early postnatal development. Exp. Neurol. 1974, 45, 558—564.
- 17. Miyoshi K., Takauchi S., Sato M.: White matter changes of acute 6-aminonicotinamide intoxication in rats. Abstracts VIIIth Intern. Congress Neuropath. Washington 1978, 661.
- Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. J. Neurochem. 1973, 21, 749-757.
- Porzellati G.: Demyelinating cholinesterase inhibitors: Lipid and protein metabolism. W: Handbook of Neurochemistry, Vol. 6 Red. A. Lajtha, Plenum Press, New York 1971, 457-478.
- Singh M., Spritz N., Geyer B.: Studies of brain myelin in the "quaking mouse". J. Lipid Res. 1971, 12, 473–481.
- 21. Smith H.: Studies on the mechanism of demyelination: Triethyl tin-induced demyelination. J. Neurochem 1973, 21, 357-364.
- 22. Svennerholm Z.: The distribution of lipids in the human nervous system. J. Neurochem. 1964, 11, 839-859.
- Tellez I., Johnson D., Nagel R., Cerami A.: Neurotoxicity of sodium cyanate: ultrastructural aspects. Abstracts VIIIth Intern. Congress Neuropath. Washington 1978, 699.

Lipidy mózgu w zatruciu MNU

- 24. Wender M., Zgorzalewicz B., Piechowski A.: Cell-free protein synthesis by rat brain in triethyl tin-intoxication. Acta Neurol. Scand. 1974, 50, 103-108.
- Wender M., Adamczewska Z.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in cyanide encephalopathy. Exp. Path. 1975, 11, 233—238.
- Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Mularek O., Pankrac J., Sędzik J.: The effect of intoxication with methylnitrosourea on the lipid composition of cerebral myelin. Neuropat. Pol. 1977, 15, 219-230.
- Wender M., Petrescu A., Filipek-Wender H., Stanisławska J.: Cholesteryl esters in demyelinating lesions in the light of histochemical and biochemical correlations. Neuropat. Pol. 1978a, 16, 83—95.
- Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. Neuropat. Pol. 1978b, 16, 153—162.
- 29. Wender M., Stanisławska J., Filipek-Wender H.: Cerebral cholesteryl esters in cyanide encephalopathy. Neuropat. Pol. 1978c, 16, 163-172.
- Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Mularek O., Zgorzalewicz B.: The effect of intoxication with alkylnitrosourea derivatives on cerebral myelin. W: Myelination and demyelination. Red. J. Palo, Plenum Press, New York, London, 1978, 487-498.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

http://rcin.org.pl

Nr 1

SPRAWOZDANIE

ZE ZJAZDU NIEMIECKIEGO STOWARZYSZENIA NEUROPATOLOGÓW

I NEUROANATOMÓW

(ESSEN, 14-16 WRZEŚNIA 1979)

XXIV doroczny Zjadz Niemieckiego Stowarzyszenia Neuropatologów i Neuroanatomów, zorganizowany przez kierownika Zakładu Neuropatologii miejscowego Uniwersytetu, prof. dr L. Gerhard, odbył się w bieżącym roku w Essen (Nadrenia). Do udziału w nim została zaproszona duża grupa członków Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich.

Tematyka zjazdu dotyczyła dwóch zagadnień: 1) problemów immunologicznych w neuropatologii, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu immunosupresji i niewydolności procesów immunologicznych na przebieg reakcji morfologicznych w układzie nerwowym i 2) doświadczalnej neuropatologii. Dopuszczone były poza tym tematy wolne.

Zjazd został zainaugurowany referatem okolicznościowym prof. Petersa, wygłoszonym z okazji 100 lecia urodzin jednego z klasyków neuropatologii, Waltera Spielmeyera. Referat stanowił interesujący przegląd historyczny wczesnego okresu rozwoju tej dziedziny wiedzy.

Pierwszą sesję naukową rozpoczął wykład Oehmichera z Tübingen na temat komórek immunoreaktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Autor stwierdził, że w warunkach normy, znajdujące się w mózgu limfocyty B i T oraz monocyty występują wyłącznie w przestrzeniach okołonaczyniowych i płynowych. Z dyskutowanych przez niego danych na temat odczynów komórkowych w stanach patologicznych na uwagę zasługuje twierdzenie, że komórki reaktywne określane jako progresywnie zmieniony mikroglej są pochodzenia monocytarnego.

Morfologię procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym przy supresji immunologicznej i defektach immunologicznych, w oparciu o bardzo obszerny materiał własny (376 autopsji), przedstawił Budka (Wiedeń). Autor podkreślił, że w warunkach supresji immunologicznej następuje, zarówno w zakażeniach bakteryjnych jak i w grzybiczych, wyraźny wzrost rozległości i charakteru martwiczego uszkodzenia oraz zmniejszenie ilości komórek wielojądrzastych w naciekach komórkowych.

Z polskich uczestników sympozjum na pierwszym posiedzeniu Krajewski (Warszawa) przedstawił przypadek gruźliczego zapalenia opon i mózgu u chorego leczonego immunosupresją po transplantacji nerek, a Markiewicz (Warszawa) morfologię ostrego zapalenia rogów przednich rdzenia kręgowego u dzieci z niewydolnością reakcji immunologicznych.

http://rcin.org.pl

c.d. na str. 82

JÓZEF SZCZECH

AKTYWNOŚĆ FOSFATAZ I ESTERAZ W CIELE MIGDAŁOWATYM SZCZURA W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA p-TOLUENOSULFANILIDEM ETYLORTĘCIOWYM *

Zakład Neuropatologii AM, Poznań Kierownik Zakładu: prof. dr M. B. Kozik

P-toluenosulfanilid etylortęciowy jest czynnym składnikiem zaprawy nasiennej uniwersalnej zwanej także mieszanką U. Ten arylowy związek rtęci jest szeroko używany w rolnictwie jako środek ochrony roślin o właściwościach grzybobójczych.

O działaniu toksycznym mieszanki U w odniesieniu do ludzi i zwierząt brak bliższych danych. W przypadkach sporadycznych zatruć pracowników rolnych, obok objawów ogólnych, obserwowano zaburzenia w przyjmowaniu pokarmów, które manifestowały się wzmożonym łaknieniem. Stąd wydawało się uzasadnione podjęcie badań doświadczalnych nad wpływem p-toluenosulfanilidu etylortęciowego na obraz histoenzymatyczny ciała migdałowatego.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 26 szczurach rasy Wistar, o ciężarze ciała wynoszącym 190 g, którym podawano dożołądkowo w odstępach 2 dniowych 10 dawek mieszanki U w ilości po 0,2 g na dawkę. Grupę kontrolną stanowiło 5 szczurów odżywianych tak samo jak zwierzęta doświadczalnie, którym zamiast mieszanki U wprowadzano dożołądkowo wodę wodociągową. Po zakończonym doświadczeniu szczury ważono, a następnie uśmiercano w narkozie eterowej przez przecięcie serca i wykrwawienie. Mózgowie utrwalano w płynie Baker'a w temp. 4°C przez 16 godzin i przeznaczano je do badań histopatologicznych oraz histoenzymatycznych. Skrawki parafinowe barwiono hematoksy-

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego nr 10.4.2.02.3.5.

liną-eozyną oraz fioletem krezylu. Skrawki cięte na mikrotomie mrożeniowym służyły do wykrywania aktywności następujących enzymów: pyrofosfatazy tiaminowej (TPPaza) (E.C. 2.5.1.3) * wg metody Novikoff'a i Goldfischer'a (1961), esterazy nieswoistej (NsE) (E.C. 3.1.1.1) wg metody Nachlas'a i Seligmann'a (1949), fosfatazy zasadowej (FZ) (E.C. 3.1.3.1) wg metody Gomori'ego (1953), acetylocholinoesterazy (AChE) (E.C. 3.1.1.7) wg metody Koelle w modyfikacji Gerebtzoff'a (1953), cholinoesterazy nieswoistej (ChE) (E.C. 3.1.1.8) wg metody Koelle w modyfikacji Gerebtzoff'a (1953), fosfatazy kwaśnej (FK) (E.C. 3.1.3.2) wg metody Gomori'ego (1953), adenozynotrójfosfatazy (ATPaza) (E.C. 3.6.1.3) wg metody Wachstein'a i Meisel'a (1957).

WYNIKI

Obraz kliniczny

U zwierząt doświadczalnych nie obserwowano wymiernych objawów zatrucia. Szczury chętnie spożywały pokarm i nie wykazywały istotnych różnic w ciężarze ciała pomiędzy okresem poprzedzającym doświadczenie i po jego zakończeniu. Niektóre osobniki z grupy doświadczalnej wydawały się być bardziej spowolniałe w stosunku do szczurów grupy kontrolnej.

Zmiany morfologiczne

W większości przypadków na obszarze ciała migdałowatego widoczne były zmiany naczyniowe, glejowe oraz zmiany zwyrodnieniowe neuronów. Zmiany naczyniowe (ryc. 1) polegały na obrzmieniu i rozplemie śródbłonków naczyń, naciekach limfocytarnych w ścianie naczyń i poszerzeniu przestrzeni okołonaczyniowej. Jądra niektórych komórek glejowych ulegały powiększeniu, a ich chromatyna rozluźnieniu. Sporadycznie obserwowano skupianie się kilku komórek glejowych wokół neurocytów. Zmiany te były widoczne częściej w jądrze korowym i przyśrodkowym niż w pozostałych jądrach ciała migdałowatego. Zmiany w komórkach nerwowych po zatruciu mieszanką U polegały na obkurczeniu neurocytów oraz ciemnym wybarwieniu ich cytoplazmy. Rzadziej w cytoplazmie neurocytów pojawiały się wodniczki. Zwyrodnienia neuronalne o typie schorzenia przewlekłego Nissla obserwowano w licznych komórkach jąder grupy korowo-przyśrodkowej (ryc. 2). Natomiast w neurocytach jąder zespołu podstawno-bocznego ciała

72

^{*} Numer listy enzymów (Florkin, Stotz 1973).
Nr 1

migdałowatego zmiany te występowały jedynie w pojedynczych neuronach.

Zmiany histoenzymatyczne

Pyrofosfataza tiaminowa (TPPaza). Dożołądkowe podawanie mieszanki U wywołuje na obszarze ciała migdałowatego szczura wyraźny wzrost aktywności pyrofosfatazy tiaminowej (ryc. 3a i b). Reakcja enzymatyczna narasta zarówno w aparacie Golgiego neurocytów, jak i w ścianach naczyń krwionośnych. Opisane zmiany obejmują całe ciało migdałowate, jednak wyraźniejszy wzrost aktywności TPPazy widoczny jest w komórkach nerwowych jądra podstawnego w porównaniu z neuronami pozostałych jąder ciała migdałowatego.

Nieswoista esteraza (NsE). W porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych podawanie mieszanki U wywołuje u szczurów doświadczalnych umiarkowany spadek aktywności enzymatycznej w komórkach nerwowych oraz w pericytach naczyń. W wyniku delikatnej dyfuzji produktu reakcji enzymatycznej do otoczenia (ryc. 4a i b), zarys neurocytów i pericytów staje się lekko nieostry. Spadek aktywności NsE jest większy w jądrze korowym, środkowym i przyśrodkowym niż w jądrze podstawnym.

Fosfataza zasadowa (FZ). W wyniku przeprowadzonego doświadczenia można zaobserwować spadek aktywności FZ w ścianach naczyń włosowatych. W większych naczyniach krwionośnych widoczna jest wyraźna aktywność FZ. W jądrze podstawnym grzbietowym oraz w jądrze korowym słaby odczyn enzymatyczny obserwuje się także w pojedynczych neurocytach, podobnie jak w grupie kontrolnej.

A c e t y l o c h o l i n o e s t e r a z a (AChE). Znaczny, spadek lub zanik aktywności acetylocholinoesterazy w przebiegu zatrucia p-toluenosulfanilidem etylortęciowym ma miejsce w dużej liczbie neurocytów oraz w neuropilu jąder zespołu korowo-przyśrodkowego (ryc. 5a i b). Zmiany są bardziej nasilone w bocznej części jądra środkowego niż w jądrze korowym. Natomiast w bocznej części jądra podstawnego spadek aktywności AChE jest znacznie mniejszy i można tu wykazać wyraźną aktywność AChE zarówno w neurocytach, jak i w neuropilu.

Nieswoista cholinoesteraza (ChE). Podawanie mieszanki U powoduje znaczny spadek aktywności tego enzymu w ścianach naczyń krwionośnych ciała migdałowatego. Spadek lub nawet zanik aktywności ChE jest szczególnie wyraźny w naczyniach krwionośnych jądra środkowego, przyśrodkowego i korowego. W naczyniach krwionośnych jądra podstawnego aktywność tego enzymu pozostaje wyraźna. Utrzymuje się również śladowy odczyn w neuropilu tego jądra.



Ryc. 1. Jądro korowe ciała migdałowatego. Nacieki w ścianie naczynia i poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej. Pow. 320 $\times.$

Fig. 1. Cortical nucleus of corpus amygdaleum. Infiltrations in vessel wall and dilatation of perivascular space. \times 320.

Ryc. 2. Jądro korowe ciała migdałowatego. Obkurczenie neurocytów. Pow. $800 \times$. Fig. 2. Cortical nucleus of corpus amygdaleum. Neurocyte shrinkage. $\times 800$.

Ryc. 3. a) Grupa kontrolna. Aktywność TPPazy w jądrze podstawno-grzbietowym ciała migdałowatego. Pow. $320 \times b$) Grupa doświadczalna. Znaczny wzrost aktywności TPPazy zarówno w neurocytach jak i w naczyniach włosowatych. Pow. $320 \times b$.

Fig. 3. a) Control group. TPPase activity in the basal-dorsal nucleus of corpus amygdaleum. \times 320. b) Experimental group. Marked increase of TPPase activity both in neurocytes and in capillary vessels. \times 320.

Fosfataza kwaśna (FK). W porównaniu z grupą kontrolną aktywność fosfatazy kwaśnej po podawaniu p-toluenosulfanilidu etylortęciowego znacznie spada we wszystkich zespołach komórkowych ciała migdałowatego. Nasilenie tych zmian jest jednak wyraźniejsze



Ryc. 4. a) Grupa kontrolna. Aktywność NsE w jądrze podstawno-grzbietowym ciała migdałowatego. Pow. 128 ×. b) Grupa doświadczalna. Jądro korowe ciała migdałowatego. Wyraźny spadek aktywności NsE. Pow. 80 ×.

Fig. 4. a) Control group. NSE activity in the basal-dorsal nucleus of corpus amygdaleum. \times 128. b) Experimental group. Cortical nucleus of corpus amygdaleum, marked decrease of NSE activity. \times 80.

Ryc. 5. a) Grupa kontrolna. Aktywność AChE w części grzbietowej ciała migdałowatego. Pow. $27 \times .$ b) Grupa doświadczalna. Po podawaniu p-toluenosulfanilidu etylortęciowego widoczny jest spadek aktywności AChE. Pow. $27 \times .$

Fig. 5. a) Control group. AChE activity in the dorsal part of corpus amygdaleum. \times 27. b) Experimental group. Decrease of AChE activity after administration of ethylmercury p-toluenosulphanilide. \times 27.

w neurocytach jąder zespołu podstawno-bocznego (ryc. 6a i b) w porównaniu z jądrami zespołu korowo-przyśrodkowego.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza). W stanach prawidłowych aktywność ATPazy występuje przede wszystkim w ścianach naczyń krwionośnych oraz w przynaczyniowych wypustkach astrogleju.



Ryc. 6. a) Grupa kontrolna. Aktywność FK w neurocytach jądra podstawnobrzusznego ciała migdałowatego. Pow. $320 \times b$) Grupa doświadczalna. Znaczny spadek aktywności enzymatycznej w neurocytach tego samego jądra. Pow. $320 \times c$

Fig. 6. a) Control group. FK activity in neurocytes of the basal-ventral nucleus of corpus amygdaleum. \times 320, b) Experimental group. Marked decrease of enzyme activity in neurocytes of the same nucleus. \times 320.

Kyc. 7. a) Grupa kontrolna. Aktywność ATP-azy w jądrze podstawno-brzusznym ciała migdałowatego. Żywy odczyn w naczyniach włosowatych i w gleju okołonaczyniowym. Pow. 128 ×. b) Grupa doświadczalna. Zanik aktywności ATP-azy w przynaczyniowych wypustkach astrogleju i osłabienie odczynu w ścianach naczyń włosowatych. Pojawia się słaba dyfuzyjna reakcja enzymatyczna w cytoplazmie neurocytów. Pow. 128 ×.

Fig. 7. a) Control group. ATPase activity in the basal-ventral nucleus of corpus amygdaleum. Strong reaction in capillary vessels and perivascular glia. \times 128. b) Experimental group. Disappearance of ATPase activity in the perivascular astrocytic processes and weakening of the reaction in the capillary walls. Weak diffuse enzymatic reaction in the neurocytes cytoplasm. \times 128.

W przebiegu omawianego doświadczalnego zatrucia p-toluenosulfanilidem etylortęciowym dochodzi do wyraźnego obniżenia aktywności ATPazy w naczyniach włosowatych przy dobrze zachowanym odczynie w naczyniach przedwłosowatych i małych tętniczkach (ryc. 7a i b). Zwraca także uwagę całkowity zanik aktywności ATPazy w przynaczyniowych wypustkach astrogleju oraz często pojawienie się dyfuzyjnego odczynu dla ATPazy w neurocytach. Zmiany te mają charakter uogólniony i obejmują wszystkie jądra ciała migdałowatego.

OMÓWIENIE

Coraz powszechniejsze stosowanie związków organicznych rtęci jako środków ochrony roślin stwarza możliwość niekorzystnego oddziaływania ich na populację ludzi, zwierząt i roślin. Przypadki sporadycznych i masowych zatruć pestycydami wywołały żywe zainteresowanie mechanizmem toksycznego działania różnych związków rtęci o takich właściwościach (Bidstrup 1964; Garman i wsp. 1975).

Przedstawione badania histoenzymatyczne potwierdzają złożony i różnorodny charakter zmian występujących w obrębie ciała migdałowatego w następstwie toksycznego działania p-toluenosulfanilidu etylortęciowego.

Ware i wsp. (1974) w badaniach wykonywanych na szczurach zatruwanych akilowymi związkami rtęci zaobserwowali przechodzenie albuminy znakowanej błękitem toluidyny ze światła naczyń krwionośnych do tkanki nerwowej. Zmiany aktywności histoenzymatycznej zaobserwowane na obszarze ciała migdałowatego po podawaniu mieszanki U mogą świadczyć o dysfunkcji błon biologicznych. Przemawia za tym spadek aktywności nieswoistej cholinoesterazy, adenozynotrójfosfatazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej. Według badań elektronowo-mikroskopowych Joó i Varkonyi (1969) oraz badań histoenzymatycznych (Kozik, Szczech 1977) cholinoesteraza nieswoista jest ściśle związana z błoną podstawną naczyń krwionośnych. Natomiast produkty reakcji na aktywność adenozynotrójfosfatazy i fosfatazy zasadowej związane są ze strukturami błoniastymi komórek tkanki nerwowej (Vorbrodt 1975).

Godne podkreślenia wydaje się spostrzeżenie, że spadek aktywności wymienionych enzymów jest wyraźniejszy niż zmiany aktywności fosfatazy kwaśnej i nieswoistej esterazy, enzymów związanych ze strukturami śródplazmatycznymi. Może to przemawiać za większym i wcześniejszym uszkodzeniem struktur błoniastych w porównaniu z uszkodzeniem struktur śródplazmatycznych. Spadek aktywności acetylocholinoesterazy być może spowodowany jest inaktywacją enzymu, a być

Nr 1

może upośledzeniem jego syntezy w następstwie uszkodzenia struktur zakończeń synaptycznych. Z pracy Grottela i Kozika (1977) wynika, że niektóre związki rtęci powodują uszkodzenie zakończeń presynaptycznych. Być może właściwości takie przejawia również p-toluenosulfanilid etylortęciowy.

Osobnym zagadnieniem wynikającym z przedstawionego materiału jest topografia zmian na obszarze ciała migdałowatego i ewentualne korelacje neurofizjologiczne. W zatruciu sublimatem (Kozik i wsp. 1977a), kalomelem (Kozik i wsp. 1977b) i niektórymi pestycydami rtęciowymi (Kozik, Wigowska-Sowińska w druku), obserwowano spadek łaknienia i obniżenie ciężaru ciała zwierząt, podczas gdy w zatruciu p-toluenosulfanilidem etylortęciowym stan somatyczny szczurów na ogół był dobry, a w szczególności nie stwierdzano utraty łaknienia i spadku ciężaru ciała. Zjawisko to nie jest łatwe do wyjaśnienia, może jednak wskazywać na zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych okolic mózgu na działanie określonych związków chemicznych.

W nawiązaniu do prac neurofizjologicznych (Fonberg 1974) warto wspomnieć, że ciało migdałowate, a zwłaszcza jego część grzbietowo--boczną określa się mianem "korowego centrum sytości". W przeprowadzonych badaniach największe zmiany histoenzymatyczne i histopatologiczne występowały w jądrach grupy korowo-przyśrodkowej, zlokalizowanej przypodstawnie i przyśrodkowo na obszarze ciała migdałowatego. W korelacji z takim obrazem morfologicznym i histoenzymatycznym można by się spodziewać, że efekt neurofizjologiczny w zatruciu p-toluenosulfanilidem etylortęciowym będzie wywołany przewagą bodźców płynących z zachowanej, boczno-podstawnej części ciała migdałowatego. Powinno to spowodować brak łaknienia i w konsekwencji spadek ciężaru ciała zwierzat doświadczalnych. Sytuacji takiej jednak nie było. Być może zatem, mimo większego uszkodzenia korowo-przyśrodkowej grupy jąder, zachowane tutaj jeszcze neurony kompensowały czynnościowo "uczucie głodu" i dlatego nie obserwowano spadku ciężaru ciała badanych zwierząt. Aczkolwiek rozważania te mają charakter hipotetyczny, to jednak wydaje się, że warto o nich wspomnieć na marginesie zmian morfologicznych i histoenzymatycznych obserwowanych w ciele migdałowatym po zatruciu p-toluenosulfanilidem etylorteciowym.

WNIOSKI

1) Dożołądkowe podawanie p-toluenosulfanilidu etylortęciowego prowadzi do szeregu zmian morfologicznych i histoenzymatycznych w obrębie ciała migdałowatego szczura. Histochemia jądra migdałowatego w zatruciu rtęcią

Nr 1

2) Zmiany morfologiczne polegają na obrzęku i rozplemie śródbłonków i na zwyrodnieniu szeregu neuronów. Stopień zmian morfologicznych jest większy w jądrach zespołu korowo-przyśrodkowego niż w jądrach zespołu podstawno-bocznego ciała migdałowatego.

3) Zmiany histoenzymatyczne polegają na spadku aktywności NsE, FZ, FK, AChE, ChE i równoczesnym wzroście aktywności TPPazy. Większy stopień tych zmian ma miejsce również w jądrach zespołu korowo-przyśrodkowego w porównaniu z jądrami zespołu podstawno-bocznego ciała migdałowatego.

4) Zróżnicowanie zmian morfologicznych i histoenzymatycznych pomiędzy zespołem jąder korowo-przyśrodkowym i podstawno-bocznym nie powoduje w tych warunkach doświadczalnych efektów fizjologicznych w postaci zaburzeń łaknienia.

Ю. Шчех

АКТИВНОСТЬ ФОСФАТАЗ И ЭСТЕРАЗ В МИНДАЛЕВИДНОМ ЯДРЕ КРЫСЫ ВСЛЕДСТВИЕ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТИЛОРТУТНЫМ ПАРА-ТОЛУОЛСУЛЬФАНИЛИДОМ

Резюме

Этилортутный пара-толуолсульфанилид употребляется в сельском хозяйстве как средство защиты растений. Отравление этим соединением вызывает м. пр. расстройство аппетита. Для лучшего выяснения патомеханизма этого явления автор решил проследить изменения энзиматической активности в миндалевидном ядре крысы.

Исследования проводились на 26 крысах племени Вистар, которым это соединение подавалось дожелудочно по 0,2 г в течение 10 дней. Затем животных умерщвляли в эфирном наркозе, брали образцы мозга, фиксировали их 16 часов в жидкости Бекера в температуре 4°С, а затем на замороженных отрезках производили гистоэнзиматические реакции для исследования активности некоторых фосфатаз и эстераз.

В проведенных исследованиях наблюдались изменения активности ряда энзимов в отдельных комплексах миндалевидных ядер. Эти изменения состояли, главным образом, в снижении энзиматической активности в кортико-медиальных ядрах по сравнению с базально-латеральными ядрами.

Подчеркивается особенная чувствительность отдельных миндалевидных ядер к этилортутным пара-толуолсульфанилидам, что может быть одним из элементов выяснения патогенеза расстройства аппетита, наблюдаемого при данной интоксикации.

J. Szczech

THE ACTIVITY OF PHOSPHATASES AND ESTERASES IN CORPUS AMYGDALEUS OF THE RAT FOLLOWING INTOXICATION WITH ETHYLMERCURY P-TOLUENESULPHOANILIDE

Summary

Ethylmercury p-toluenesulphoanilide 18 being used in agriculture for plant protection. Intoxications with this compound cause among others disturbances

J. Szczech

of appetite. In order to elucidate the pathomechanism of these disturbances, the changes of the enzymes activities in corpus amygdaleus were measured.

The studies were performed on 26 Wistar rats, which were given the compound intragastrically for 10 consecutive days in 0.2 g doses. The rats were sacrificed under ether anesthesia, the brains were collected and fixed in Baker's solution for 16 h at 4° C. Thereafter frozen slices were prepared and subjected to histoenzymatic reactions for a number of phosphatases and esterases.

The studies revealed changes in a number of enzyme activities in the particular nuclei of corpus amygdaleus. The changes mostly consisted in the decreased activity in the group of cortical-paramedial nuclei as compared to the group of basal-lateral nuclei.

The high sensitivity of the particular groups of corpus amygdaleus nuclei to ethylmercury p-toluenesulphoanilide is emphasized in view of their relation to the pathogenesis of the disturbances of appetite observed during intoxication.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Bidstrup L. P.: Toxicity of mercury and its compounds. Elsevier, Amsterdam 1964, 74-87.
- Florkin M., Stotz E. H.: Enzyme nomenclature. W: Comprehensive biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1973.
- 3. Fonberg E.: Amygdala functions within the alimentary system. Acta Neurobiol. Exp. 1974, 34, 435-466.
- Garman H. R., Weiss B., Evans H. L.: Alkylomercurial encephalopathy in monkey. Acta neuropath. (Berl.) 1975, 32, 61-74.
- 5. Gerebtzoff M.: Recherches histochimiques sur les acetylocholine et choline esterases. Acta anat. 1953, 19, 336—339.
- Gomori G.: Microscopic histochemistry. The University of Chicago Press. Chicago 1953.
- 7. Grottel K., Kozik M. B.: Atrophy of spines of apical dendrites in rats treated with mercuric chloride. Neuropat. Pol. 1977, 4, 555-560.
- Joó F., Varkonyi T.: Correlation between cholinesterase activity of capillaries and the blood-brain barrier in the rat. Acta biol. Acad. Sci. Hung. 1969, 20, 359-372.
- Kozik M. B., Szczech J.: The histoenzymatic activity of gyrus cinguli in the course of postnatal ontogeny of the rat. Folia Histochem. Cytochem. 1977, 15, 277-288.
- 10. Kozik M. B., Wigowska-Sowińska J.: Zmiany mózgowe w przebiegu intoksykacji octanem fenylortęciowym (w druku).
- Kozik M. B., Sosiński E., Szczech J.: Phosphatases and esterases in the brain following an acute sublimate intoxication. Folia Histochem. Cytochem. 1977a, 2, 87-94.
- Kozik M. B., Szczech J., Sosiński E.: Zmiany histoenzymatyczne w mózgu w przebiegu doświadczalnej intoksykacji kalomelem. Neuropat. Pol. 1977b, 2, 239—253.
- 13. Nachlas M., Seligmann A.: The histochemical demonstration of esterases. J. nat. Cancer Inst. 1949, 9, 415-425.

Nr 1

- Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. Proc. nat. Acad. Sci. 1961, 47, 802-810.
- Vorbrodt A.: Histochemia fosfataz. W: Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. Red. A. Krygier-Stojałowska, H. Godlewski, PWN, Warszawa 1975, 447-475.
- Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer. J. Clin. Path. 1957, 27, 13-23.
- Ware A. R., Chang L. W., Burkholder P. M.: An ultrastructural study on the blood-brain barrier dysfunction following mercury intoxication. Acta neuropath. (Berl.) 1974, 30, 211-224.

Adres autora: Zakład Neuropatologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

c.d. ze str. 70

Simon i Werner z Monachium omówili wpływ promieniowania jonizującego w dawce 300 r, 24 godz. przed zakażeniem, na rozwój doświadczalnego wirusowego zapalenia mózgu i rdzenia, wykazując, że w tych warunkach dochodzi do opóźnienia i zaburzenia antywirusowych reakcji immunologicznych. Jellinger i wsp. (Wiedeń) wysunęli, w oparciu o analizę morfologiczną nietypowego zapalenia mózgu, wykazującego morfologiczne podobieństwo do zwyrodnień układowych móżdżku i pnia mózgu, przypuszczenie, że zapalne zwyrodnienie układowe ośrodkowego układu nerwowego może być wyrazem defektu immunologicznego. W sesji tej Dąmbska i wsp. (Warszawa) przedstawili referat na temat patomorfologii gruźliczego zapalenia opon i mózgu u niedojrzałych królików. Autorki stwierdziły, że natężenie reakcji zapalnej w mózgu oraz charakter nacieków komórkowych są w tym modelu doświadczalnym zależne nie tylko od dawki wprowadzonych prątków, ale także od wieku zakażonego zwierzęcia.

Rothemund i wsp. (Monachium i Hannover) opisali interesujący przypadek zapalenia mózgu u dziecka z rzadkim zespołem niedoboru przeciwciał (obniżenie poziomu immunoglobulin IgA, IgG i IgM) oraz obniżenie liczby limfocytów T, przy wzroście liczby limfocytów B. Bardzo ważne zagadnienie dojrzewania układu immunologicznego omówiły w swoim referacie Stoltenburg-Didinger i wsp. (Berlin), wykazując na podstawie analizy obrazu morfologicznego reakcji zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym, że wewnątrzmaciczne zakażenie płodu stymuluje syntezę immunoglobulin.

Kilka doniesień zjazdowych dotyczyło zjawisk immunologicznych w chorobach demielinizacyjnych. Meyermann i wsp. (Getynga i Würzburg) wykazali w sposób przekonujący, że zakażenie wirusem korona IHM stanowi dobry model do badań demielinizacji uwarunkowanej zakażeniem wirusowym. Koestner i wsp. (Columbus) przedstawili dobrze udokumentowane dane świadczące, że wstrzyknięcie swoistych przeciwciał antymielinowych może prowadzić do demielinizacji, co stawia w nowym świetle od dawna dyskutowany problem roli przeciwciał krążących w rozwoju demielinizacji. Weinrauder i wsp. (Warszawa) omówili wyniki badań na temat swoistych antygenów glejowych, udowadniając, że komórki glejowe hodowane in vitro są w stanie produkować te antygeny. Wender i wsp. (Poznań) przedstawili badania dotyczące znaczenia reakcji blastycznej w węzłach chłonnych dla rozwoju alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia. W dwóch doniesieniach, jednym bardziej optymistycznym (Lassmann i wsp. Wiedeń, Nowy Jork) i drugim bardziej ostrożnym (Cuypers i Roggendorf Berlin) omówiono znaczenie przewlekłego, przebiegającego rzutami alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia, jako modelu doświadczalnego stwardnienia rozsianego, Goncarzewicz (Poznań) przedstawił badania ultrastrukturalne materiału autopsyjnego od chorych na stwardnienie rozsiane, a Kozik i Wender (Poznań) badania histochemiczne przypadków podostrego zapalenia mózgu i rdzenia.

Drugi główny temat zjazdu — neuropatologia doświadczalna — dotyczył szerokiego kręgu zagadnień, które tylko z dużym trudem można ująć w grupy. Z prac poświęconych niedokrwieniu mózgu na uwagę zasługuje doniesienie przedstawione przez Łazarewicza i wsp. (Warszawa), w którym wysunął on, w oparciu o badania wykonane na chomiku mongolskim, tezę, że degradacja fosfolipidów w synaptosomach odgrywa istotną rolę w mechanizmie uszkodzenia mózgu w ische-

c.d. na str. 120

JANINA RAFAŁOWSKA

SOME PROBLEMS OF THE DEVELOPMENT AND AGING OF NERVOUS SYSTEM

III. THE MOTOR CELL OF THE ANTERIOR HORN OF SPINAL CORD IN VARIOUS PERIODS OF LIFE

Department of Neurology, Medical Academy, Warszawa Head: prof. dr I. Hausmanowa-Petrusewicz

Quantitative methods were frequently applied for determination of the number of nerve cells in the cerebral cortex in man and animals. The size and number of the cells were also estimated in the anterior horn of the spinal cord of monkeys and cats (Spraque, 1951; Schadé, 1964). In humans the absolute number of cells in certain nuclei of anterior horn was calculated in patients dying from acute poliomyelitis (Sharrard, 1962). The absolute number of motor cells in the entire lumbo-sacral segment in man amounts to 52000-62000 (Tolimson et al., 1973), most of them in the L₅ segment (Irving et al., 1974).

The small number of works dealing with quantitative evaluation of anterior horn cells in humans probably reflects difficulties with establishing which groups of anterior horn cells are connected with particular muscles. Most of the work on this subject was done on experimental animals. Precise localization of various groups of motor cells for various muscles in human, elaborated by Sharrard (1955) was achieved with the lumbo-sacral segment of the spinal cord.

In the present work the C_8 —Th₁ segment, in particular the group of cells connected with the ulnar nerve were chosen. This choice was predicted from electrophysiological evaluation of a peripheral nerve. Groups of motor neurons, distinctly discernible in mammals (Hughes, 1968) are connected with well defined groups of muscles.

According to the proximal-distal direction of fetal development the motor neurons for the most proximal muscle groups, namely the paravertebral and shoulder-girdle muscles develop earliest in the cranial

segments of the spinal cord and in those located more medially. According to the same principle, groups of cells for most distal muscles located in lower segments of the spinal cord and most dorsally and laterally appear later (Hughes, 1968). The cells connected with the ulnar nerve appear in the distal part of the C₈ segment as a separate group, approximately in the 9th—10th week of fetal life (Shulejkina, 1958; 1959). This is the retroposterolateral group which is connected with innervation of the most distal part of the limb (Riley, 1943; Sharrard, 1962). It is present only in the lower half of the C₈ segment and in the Th₁ segment of the spinal cord, and is situated dorsally from the group of cells which extends from the C₆ level and is connected with the median nerve.

In view of the lack of exact data about the localization of the ulnar nerve nucleus, including its beginning and end, and of the fact that the size of its motor cells shows variation (Rexed, 1964) such a quantitative method of investigation was chosen which permitted only a relative evaluation of the number of motor cells in the nucleus of the ulnar nerve.

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of human fetuses as well as subjects deceased at the age from one day to 93 years and was divided into 4 groups: group I — fetal cases; group II — cases aged from 1 day to 3 years with diseases not affecting the nervous system; group III — cases aged 15—58 years with diseases not affecting the spinal cord; group IV — cases aged 72—93 years, with brain stroke. The spinal cord of fetuses obtained from cases of pregnancy interruption for medical and social indications, and spontaneous abortions, was taken for examinations 1.5—3 hours after death. Other cases were autopsied 9—28 hours after death. The spinal cord was fixed in 10% calcium formalin for 7—10 days and thereafter the lower halves of segment C₈ and segment Th₁ were taken for further studies.

Each paraffin block of the segments C_8 —Th₁ was cut serially into ± 10 µm thick sections for quantitative studies. In the majority of cases 3 sections were mounted on one slide, in the group of fetuses and in some other cases 3 to 6 sections were taken. All sections were stained with hematoxylin and eosin in cases of fetuses and children. In other cases every 3rd slide was stained to obtain in this way 3 serial sections per 60—100 µm segment. Major motor cells with well visible nucleus and nucleolus, as well as all detectable cells of the retroposterolateral nucleus of both anterior horns (nucleus of ulnar

Nr 1

nerve) were counted in 100 sections in each case with the exception of fetuses. If possible, an external group of cells (for extensors) and the internal group (for flexors) of the retroposterolateral nucleus were evaluated separately (Sharrard, 1962).

Taking into consideration the growth of nerve cells in the ontogenesis (Gabella, 1971; Ford, 1973) and the possibility of their diminution with aging (Ochta et al., 1974) in each case including the fetuses, the long axis was measured in 100 motor cells of anterior horns (including the nucleus of ulnar nerve). The long axis can indirectly indicate the size of the cell. Since the histopathological technique causes shrinkage of cells (Rexed, 1944) the long axis of the cell is shorter than in fresh, unfixed and unstained material. This parameter is thus a relative one; the error is the same in all cases.

The long axis of motor cells was measured using a NF-PK Zeiss Jena microscope with Zeiss micrometric ocular. In cells in which this was easily recognizable the long axis was accepted as the distance between the base of the dendrite and that of the axon. In other cells the longer of both axes was measured. For motor cells, measurement of those of the retroposterolateral and anteromedial groups were separated. In 2 cases of the group of children (N3, N4) the measurement was done twice, on various sections of the same segment of the spinal cord. Mean values of both measurements were used for statistical evaluations.

The statistical evaluation of the data concerning the number of cells in the retroposterolateral group was done in groups II, III and IV.

Tests for comparison of 2 fractions and for comparison of mean values of unrelated samples were used.

The distribution of the length of long axis was evaluated in the whole material including group I.

RESULTS

Number of cells in the retroposterolateral group

The numbers of cells in the retroposterolateral nucleus are shown in Fig. 1. The number of cells with visible nucleus and nucleolus tended to decrease with age, in elderly people being lower than in the other cases.

Table 1 indicates that the mean number (per 1 section) of cells with visible nucleus and nucleolus is the highest in group II, lower in group III and the lowest in group IV. The differences between groups for the entire retroposterolateral groups (without subdiving them into



Fig. 1. Number of motor cells of right and left retroposterolateral nucleus in groups II, III and IV.

Ryc. 1. Liczba komórek ruchowych prawego i lewego jądra zatylno-bocznego w przypadkach II, III i IV grupy.

external and internal ones) are statistically significant. Fig. 1 and Table 2 show that in 12 out of 20 cases the number of cells is higher on the right than on the left side. In a significant number of cases this difference is negligible, being statistically significant in only 4 of them (Table 2).

The length of long axis of the motor cells of anterior horn

The mean length of the long axis is shown in Table 3. Table 4 shows a rise of the mean values in the period from fetal life (32.41 μ m) up to the age of 15—58 years (53.23 μ m) and then their fall with ageing (49.39 μ m). The differences between the age groups are statistically significant.

The distribution of the lengths of long axis of cells according to the age groups (Fig. 2) reflects an increased number of the larger cells in group II and III, and their decreased number in group IV. The latter shows higher numbers of smallest cells. The percent of cells with long axis of 31—50 μ m is higher in group IV (72—93 years, 57.7%) than in group III (15—58 years, 43.3%). In the latter the long axis of 56.7% of cells exceeds 50 μ m.

Spinal cord development

			wek)				
		Right retropo nuc Prawe jądro za	Left retroposterolateral nucleus Lewe jądro zatylno-boczne				
Groups Grupy	External portion Zewnętrzna część	Internal portion Wewnętrzna część	Total Razem	External portion Zewnętrzna część	Internal portion Wewnętrzna część	Total Razem	
II III IV	$0,77 \pm 0,87$ $0,68 \pm 0,86$ $0,55 \pm 0,78$	$3,01\pm2,02$ $2,06\pm1,58$ $1,18\pm1,17$	$3,78 \pm 2,43$ $2,75 \pm 1,93$ $1,74 \pm 1,49$	$\begin{array}{c} 0,67 \pm 0,85 \\ 0,65 \pm 0,87 \\ 0,46 \pm 0,71 \end{array}$	$2,68 \pm 1,84$ $2,23 \pm 1,64$ $1,14 \pm 1,08$	$3,35 \pm 2,21$ $2,88 \pm 2,20$ $1,61 \pm 1,37$	
ce between groups a różnic między grupami	II— III p>0,05	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p<0,001	p<0,001	
	II— IV p<0,02	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
)ifferen Ocen	11— p<0,00	1 p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	

Table 1. Mean number of cells with visible nuclei and nucleoli per one section in age groups Tabela 1. Średnia liczba komórek z widocznym jądrem i jąderkiem w grupach wieku (na 1 skra-

DISCUSSION

Figure 1 and Table 1 indicate that the highest number of cells in the nucleus of ulnar nerve, both absolute and found in 1 section, was observed in group II (1 day — 3 years). The cells were not counted in group I (fetuses). However, in a part of fetal and infantile cases one section showed 50—60 cells and in adult cases 15-25 cells with visible nuclei and nucleoli. In fetal cases the length of the long axis was lowest and increased with age.

In fetal cases numerous small densely arranged motor cells were found. In the youngest fetus peripheral situation of tigroid indicates immaturity of the cells (Shulejkina, 1959). With increasing age the maturing motor cells gradually increased in size. Fig. 3 A, B, C, D (the same magnification) revealed the cells of the retroposterolateral nucleus in fetuses 16—17, 20, 27 and 34 weeks old. With progressing maturation the cells increase in size and occupy more space in the gray matter of spinal cord. At the same, the distance between the nerve cells gradually increases. The measurements of the long axis of cells (Table 3, Fig. 2) also indicate their gradual enlargement.

J. Rafałowska

Case	Number of cells wi	Number of cells with visible nucleoli				
Przypadek	Right side Strona prawa	Left side Strona lewa	Różnica między prawą i lewą stroną			
N 1	4.03 ± 2.33	4.21 + 1.98	p>0,05			
N 3	3,65+2,28	4,07+2,10	p>0,05			
N 4	$5,00 \pm 2,48$	$4,12\pm 2,13$	p<0,01			
N 2	$3,08 \pm 2,30$	$2,28 \pm 2,00$	p<0,01			
N 8	3,46+2,35	3,01 + 2,02	p>0,05			
N 6	$3,51 \pm 2,37$	$2,46 \pm 2,11$	p<0,001			
108/72	$2,65\pm2,03$	$3,16 \pm 2,09$	p>0,05			
104/74	$3,35 \pm 1,75$	$3,06 \pm 1,85$	p>0,05			
54/71	$2,54 \pm 1,71$	$2,97 \pm 3,07$	p>0,05			
N 7	$2,11 \pm 1,65$	$2,04 \pm 1,61$	p>0,05			
117/71	$3,\!56\!\pm\!2,\!41$	$4,15 \pm 2,05$	p>0,05			
39/74	$2,29 \pm 1,46$	$1,92 \pm 1,46$	p>0,05			
40/74	$1,46 \pm 1,29$	$0,89\pm0,91$	p<0,001			
89/71	$2,\!35\!\pm\!1,\!67$	$2,14\pm1,46$	p>0,05			
46/73	$1,44 \pm 1,41$	$1,72 \pm 1,36$	p>0,05			
106/71	$1,68 \pm 1,24$	$1,36 \pm 1,15$	p>0,05			
61/73	$1,69 \pm 1,56$	$1,44 \pm 1,26$	p>0,05			
161/72	$2,06\pm$	$2,09\pm$	p>0,005			
13/72	$1,73 \pm 1,55$	$1,48\pm1,31$	p>0,05			
52/73	$1,55\pm1,36$	$1,76\pm 1,50$	p>0,05			

Table 2. Mean number of cells with visible nuclei and nucleoli on the right and left side of the spinal cord

Tabela 2. Średnia liczba komórek z widocznym jądrem i jąderkiem po prawej i lewej stronie

rdzenia kregowego

We were unable to find in the available literature any quantitative data correlating the development and maturation of the motor cell of human spinal cord. The studies of development of endoplasmic reticulum of the cell in spinal cord of human 12-week fetuses made it possible to distinguish neuroblasts from immature glioblasts.

The accumulations of Nissl's granules enabled to distinguish the immature neurons. In the same period synapses were found on the surface of nerve cells (Malinsky, 1974). The ultrastructural studies ensured thus morphological evaluation of the development and growth of the cell. In newly formed cortex of 12-week human fetus close adherence of nerve cell to the capillary basement membrane results from lack of cell processes. In 16-week fetus small processes of the

Spinal cord development

0	١.	0
ж	c	u
•	,	J

Table	3.	Mean	length	of	long	axis	of	cells	in	examined	cases	(in	micrometers)
Tabela	3.	Średnie	wartośc	ei v	vielkoś	ci dłu	giej	osi k	omć	rek dla po	szczeg	ólny	ch przypadków (w mi-
							k	romet	racl	h)			

Case no Nr przypadku	Age Wiek	Mean value SD Średnia wielkość SD	Case no Nr przypadku	Age in years Wiek w latach	Mean value SD Średnia wielkość SD
Е 1	17 weeks tyg.	25,91±3,46	108/72	15	53,16±8,43
E 8	18 weeks tyg.	29,71±4,41	104/74	24	$53,\!58 \pm 15,\!84$
E 2/74	20 weeks tyg.	29,66±3,93	54/74	37	$54,25 \pm 11,33$
E 4/74	25 weeks tyg.	$33,\!62\!\pm\!4,\!49$,		
E 10	27 weeks tyg.	$32,62 \pm 6,42$	117/71	49	$54,\!38 \pm 11,\!24$
E 5/74	34 weeks tyg.	$42,96 \pm 6,95$	39/74	58	$53,\!33 \pm 8,\!13$
N 1	day 1 dzień	$49,\!41\!\pm\!8,\!76$	40/74	72	$48,63 \pm 8,41$
N 3	10 days dni	43,00±6,95	46/73	80	48,60±9,47
N 4	1 month	$44,\!40\!\pm\!9,\!45$	89/71	80	$46,81 \pm 7,77$
N 2	mies. 3 months	$47,06\pm 8,03$	61/73	83	$48,72 \pm 9,30$ 48,88 + 12,03
	mies.	·			
N 8	8 months mies.	$49,12\pm 8,91$	161/72	87	52,06±10,49
N 6	3 years lata	4 6,05±8,77	$13/72 \\ 52/73$	88 93	$51,80 \pm 11,74$ $49,68 \pm 8,62$

E — embryo cases płody

N — newborns or neonates noworodki lub niemowlęta

J. Rafałowska

	(w mikiom	letrach)	
Groups Grupy	Mean length Średnia wielkość	Difference	e between groups
I	$32,41\pm7,38$ n=600	Ocena róż I—II II—III	nic między grupami p<0,001 p<0,001
п	$45,80\pm8,76$ n=800	III—IV	p<0,001
ш	$53,23 \pm 11,05$ n=600		
IV	$49,39 \pm 10,05$ n=800		

Table 4. Mean length of long axis of cells in different age group (in micrometers) Tabela 4. Średnia wielkość długiej osi komórek w poszczególnych grupach wieku (w mikrometrach)





Ryc. 2. Rozkład odsetkowy wielkości długiej osi komórek wg grup wieku.

cell are already visible around the capillary basement membrane. The synaptic connections are also found. The observations of animal material are more numerous. Growth of cells in the anterior horn and their lower density after birth were observed in rats (Ford, 1973). In the rabbits cerebral cortex maturing after birth the pyramidal cells of the III and V layer showed almost a fivefold increase in volume (Shadé, Baxter, 1960). Similar cortical changes were also found in cats

Nr 1

(Brizzee, Jacobs, 1959). The phenomenon, typical of mammal ontogenesis was observed also in chickens, it seems thus to be specific of the tntire group of vertebrates. The less dense arrangement of neurons results from increased diameter of axons and their myelination, increased number of dendrites and their ramifications (Purpura et al., 1964; Schadé et al., 1964).

A rapid rise in the number of glial cells, synthesis of proteins, increased amount of amino acids and finally the rising content of lipids with myelination (Himwich, 1973) are also important factors contributing to less dense arrangement of cells, increased weight of nervous system and its gradual maturation.

These data indicate that a gradual increase of the motor cells in spinal cord and loosening of their arrangement with progressing development of the fetus are characteristic features in the ontogenesis of vertebrates.

Tables 2, 3, 4 demonstrate a statistical decrease in the number of cells of ulnar nerve nucleus and shortening of the long axis in elderly. Many of the motor cells remaining in anterior horns show pigmentary degeneration. The morphology of spinal cord with aging individuals gave no ground for relating diffuse atrophy of motor cells to atherosclerosis or hemodynamic disturbances (Rafałowska, 1975). The cause of formation and accumulation of lipofuscin in unknown. It is deposited in the cell due to various external factors and in the course of various diseases of the nervous system. A slight amount of lipofuscin was found in the nucleus of inferior olive already in a 3-month child. In a 38-year individual 84% of cells in the inferior olive, and in a 70-year one all cells of this nucleus contained this pigment while the number of cells was unchanged.

The nucleus of trochlear and abducens nerves as well as that of *locus coeruleus* were also studied in subjects of various ages from newborns up to 86th years. The number of cells in both these nuclei failed to demonstrate any age-dependent changes (Brody, 1973).

In brain stem nuclei of guinea pig accumulation of lipofuscin with ageing was observed in the mesencephalic nucleus of the Vth nerve, but in the Westphal-Edinger nucleus and in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve it was not found even in oldest animals. The opinion was expressed, therefore, that lipofuscin is accumulated earlier in cells with more active metabolism (Wilcox, 1959). The structure of lipofuscin in the motor and sensory cells was found to be identical (Samorajski et al., 1965). Decreased cell metabolism in aged, athero-

sclerotic subjects seems to confirm numerous hypotheses which relate the accumulation of lipofuscin to lysosomes (Samorajski et al., 1965). Hence, the lowered metabolism seems to be, both, the cause and effect of pigmentary degeneration of the cell. Rising amount of lipofuscin in the cell can produce degeneration and atrophy of the cell. Diffuse atrophy of anterior horn cells may be thus linked to their pigmentary degeneration the signs of which were observed in the present material. Similar atrophy of cells was also found in elderly people in the cortex of superior frontal and superior temporal gyri (Brody, 1971). Lowered number of the larger cells and increased number of the smaller cells in group IV (aged) as compared with group III (15-58 years) indicates indirectly diminution of cells in advanced age (Fig. 2 shows the shift of the histogram to the left). This seems to correspond to simple atrophy of the nerve cell observed in senile brain and in the spinal ganglia (Ochta et al., 1974). Decreased number of cells and their diminution reflect senile atrophy.

In cases of acute poliomyelitis Sharrard (1962) was able to demonstrate that 40% of active cells are sufficient to maintain the normal muscle function. These data can explain the fact that senile atrophy of anterior horn cells in the segment C_8 —Th₁ causes no clinical symptoms. Two compensatory mechanisms may be involved here (Eccles, 1973): conjugate degeneration and regeneration of synapses (Sotelo, Palay, 1971) and formation of new synapses to replace there disappearing ones (Eccles, 1973).

Table 2 and Fig. 1 show that in 12 out of 20 cases the right nucleus of the ulnar nerve had more cells than the left one, the difference being significant in 4 cases. Hemiparesis seemed to be without influence on this since in 4 cases more cells were found on the hemiparetic side (left and right side, 2 cases each). In 3 cases a considerable difference was found in children aged one month, 8 months and 3 years. It is possible that a higher number of cells in the nucleus of the nerve which innervates the right hand is the anatomical substrate of righthandedness.

The literature on this problem is very scant. Tomlinson et al. (1973) in their paper on the absolute number of cells of the anterior horn in the lumbo-sacral segment have not discussed this problem although a table reveals slight predominance of the number of cells on the right side in 2 out of 3 cases. The studied segment could reflect, however, only the domination of one hemisphere.

The determination of the weight of different bones and muscles of upper limbs in 10 human fetuses revealed the predominance of



Fig. 3. Retroposterolateral group of motor cells. Klüver-Barrera, $\times 270$. A. Case E₁, 16—17 week, Th₁. B. Case E₂, 20th week, Th₁. C. Case E₁₀, 27th week, C₈. D. Case E₅, 34th week, C₈.

Ryc. 3. Grupa zatylno-boczna komórek ruchowym. Klüver-Barrera. Pow. 270 \times . A. Przyp. E₁, 16—17 tyg., Th₁. B. Przyp. E₂, 20 tyg., Th₁. C. Przyp. E₁₀, 27 tyg., C₈. D. Przyp. E₅, 34 tyg. C₈.

muscles on the right side (Pande, Singh, 1971). On the basis of the weight of muscles predominance of one lower limb was also demonstrated in man (Chhibber, Singh, 1970) and animals (Singh, 1971). Taking into consideration that many people use almost equally the right and left hand the difference in the anatomical background can be negligible, if any. Because of the negligible number of studies it is impossible to say whether a different number of motoneurons supplying hand muscles constitutes the anatomical basis of precision of movements. A quantitative difference could exist in other structures of the nervous system, a.o. in the motor cortex.

J. Rafałowska

CONCLUSION

The size of the motor cells of anterior horn of spinal cord changes in the life of the individual. The process of aging affects both their size and number resulting in the diminution and atrophy of cells.

J. Rafałowska

WYBRANE PROBLEMY ROZWOJU I STARZENIA SIĘ UKŁADU NERWOWEGO III. Komórka ruchowa przedniego rogu rdzenia kręgowego w różnych okresach

życia

Streszczenie

W miarę dojrzewania zwiększa się wielkość komórki ruchowej rogu przedniego. U płodów jest ona najmniejsza (średnia wielkość 32,41 µm), wirasta stopniowo w wieku dziecięcym (średnia wielkość 45,80 µm), największą wartość osiąga u osobników młodych i w wieku średnim (52,23 µm). W wieku starczym wielkość komórki zmniejsza się (średnia wielkość 49,39 µm). Różnica wielkości pomiędzy grupami jest statystycznie znamienna. Największą liczbę komórek w jądrze nerwu łokciowego stwierdza się w grupie przypadków dziecięcych. W miarę wieku liczba ta zmniejsza się w związku ze wzrostem komórek i spadkiem ich gęstości. Najmniejszą liczbę komórek znaleziono w grupie przypadków starczych. Różnica pomiędzy liczba komórek w grupie przypadków starczych i grupa wieku 15-58 lat jest statystycznie znamienna. W grupie przypadków starczych stwierdza się statystycznie znamienny spadek liczby komórek ruchowych w jądrze nerwu łokciowego oraz zmniejszenie się ich wielkości. W 12 przypadkach na 20 badanych stwierdzono większą liczbę komórek ruchowych w jądrze nerwu łokciowego po stronie prawej; wśród nich w 4-ch przypadkach różnica była statystycznie znamienna.

Я. Рафаловска

ИЗБРАННЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ И СТАРЕНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

III. Двитательная клетка переднего рога спинного мозга в разных периодах жизни

Резюме

По мере зрелости возрастает величина двигательной клетки переднего рога. У плодов она меньше всего (средняя величина 32,4 µм), затем постепенно возрастает в детском возрасте (средняя величина 45,80 µм), а самый большой гоказатель роста достигает у лиц в юношеском и среднем возрасте (52,23 µм). В старческом возрасте величина клетки уменьшается (средняя величина 49,39 µм). Разница величины между отдельными группами статистически знаменательна. Самое большое количество клеток в ядре локтевого нерва наблюдается в группе лиц детского возраста. По мере созревания это количество уменьшается в связи с ростом клеток и сокращением их густоты. Самое небольшое количество клеток констатировалось в группе лиц в старческом возрасте.

Разница между количеством клеток у старых людей и в группе людей в возрасте 15—58 лет статистически знаменательна. В группе престарелых наблю-

Nr 1

Nr 1

дается статистически знаменательное сокращение количества двигательных клеток в ядре локтевого нерва и уменьшение их величины.

В 12 случаях на 20 исследованных наблюдалось большее количество двигательных клеток в ядре локтевого нерва с правой стороны, среди них в 4-х случаях разница была статистически знаменательна.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Brizzee K. R., Jacobs L. A.: Postnatal changes in volumetric and density relationships of neurons in cerebral cortex of cat. Acta Anat. (Basel), 1959, 38, 291-303.
- Brody H.: Structural changes in the aging nervous system. Interdiscipl. Topics Geront. Kargel, Basel, München, New York, 1970, 7, 9-21.
- Brody H.: Aging of the vertebrate brain. In: Development and aging in the nervous system. Eds. M. Rockstein, M. L. Sussman. Acad. Press, New York, London 1973, pp. 121-133.
- Chhibber S. R., Singh I.: Asymetry in muscle weight and one-sided dominance in the human lower limbs. J. Anat., 1970, 106, 553-556.
- Eccles J. C.: Trophic influences in the mammalian central nervous system. In: Development and aging in the nervous system. Eds. M. Rockstein, M. L. Sussman. Acad. Press, New York, London 1973, pp. 89–103.
- Ford D. H.: Selected changes in the developing postnatal rat brain. In: Development and aging in the nervous system. Eds. M. Rockstein, M. L. Sussman. Acad. Press, New York, London 1973, pp. 63-84.
- 7. Gabella G.: Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. J. Anat., 1971, 109, 81-95.
- Himwich W. A.: Neurochemical patterns in the developing and aging brain. In: Development and aging in the nervous system. Eds. M. Rockstein, M. L. Sussman. Acad. Press, New York, London 1973, pp. 151-169.
- Hughes A.: Development of limb innervation. In: Growth of the nervous system. Eds. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor J. A. Churchill, London 1968, pp. 110-117.
- Irving D., Rebeiz J. J., Tomlinson B. E.: The numbers of limb motor neurons in the individual segments of the human lumbosacral spinal cord. J. neurol. Sci., 1974, 21, 203—212.
- 11. Malinsky J.: Ultrastructural study of the endoplasmic reticulum during the differentiation of nerve cells. Acta Fac. Med. Univ. Purkyne, 1974, sep. 49.
- 12. Ochta M., Dyck P. J., Offord K.: Histometric evaluation of first sacral ganglion of man. J. neurol. Sci., 1974, 22, 73-82.
- Pande B. S., Singh I.: One-sided dominance in the upper limbs of human foetuses as evidenced by asymetry in muscle and bone weight. J. Anat., 1971, 109, 457-459.
- Purpura D. P., Shofer R. I., Housepian E. M., Noback C. R.: Comparative ontogenesis of structure-function relations in cerebral and cerebellar cortex. In: Growth and maturatoin of the brain. Progr. Brain. Res. Eds. D. P. Purpura, J. P. Schadé. Elsevier, Amsterdam, London, New York. 1964, 187-221.
- Rafałowska J.: W sprawie procesu starzenia w rdzeniu kręgowym. Neuropat. Pol., 1975, 13, 107-119.

J. Rafałowska

- Rexed B.: Contributions to the knowledge of the postnatal development of the peripheral nervous system in man. Acta Psychiat. Scand., 1944, supp. 33, 21-206.
- Rexed B.: Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. In: Organization of the spinal cord. Progr. Brain. Res., 1964, 11, 58-92. Eds. J. C. Eccles, J. P. Schadé, Elsevier, Amsterdam, London, New York.
- Samorajski T., Ordy J. M., Keefe J. R.: The fine structural of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. J. Cell. Biol., 1965, 26, 779-796.
- 19. Schadé J. P., Baxter C. F.: Changes during growth in the volume and surface area of cortical neurons in the rabbit. Exp. Neurol., 1960, 2, 158-178.
- Schadé J. P.: On the volume and surface area of spinal neurons. In: Organization of the spinal cord. Progr. Brain. Res. Eds. J. C. Eccles, J. P. Schadé, Elsevier, Amsterdam, London, New York. 1964, 11, 261-277.
- Schadé J. P., Van Backer H., Colon E.: Quantitative analysis of neuronal parameters in the maturing cerebral cortex. In: Growth and maturation of the brain. Progr. Brain Res., 1964, 4, 150-175.
- 22. Sharrard W. J. W.: The distribution of the permanent paralysis in the lower limb in poliomyelitis. J. Bone Joint Surg., 1955, 373, 540-558.
- Sharrard W. J. W.: Poliomyelitis and the anatomy of the motor cell columns in the spinal cord. VII Symposium European Poliomyelitis, Oxford, E. A. P., Brussels, 1962, 241-245.
- 24. Singh I.: One-sided dominance in the limbs of rabbits and frogs as evidenced by asymetry in bone weight. J. Anat., 1971, 109, 271-275.
- Sotelo C., Palay S. L.: Altered axons and axon terminals in the lateral vestibular nucleus of the rat. Possible example of axonal remodeling. Lab. Invest., 1971, 25, 653-671.
- 26. Spraque J. M.: Motor and propriospinal cells in the thoracic and lumbar ventral horn of the rhesus monkey. J. comp. Neurol., 1951, 95, 1, 103-123.
- Shulejkina K. W.: Rol nierawnomiernogo sozrewania embrionalnych struktur w formirowanii połnocennych funkcji noworożdzionnogo. Akush. Ginek. (Moskva), 1958, 34, 49–52.
- Shulejkina K. W.: Srawnitielnaja charakteristika rozwitia dwigatielnych centrow w szejnych segmentach spinnogo mozga czełowieka. Arkh. Anat., 1959, 36, 42—54.
- 29. Tomlinson B. E., Irving D., Rebeiz I. I.: Total numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord and an analysis of the accuracy of various sampling procedures. J. neurol. Sci., 1973, 20, 313–327.
- Wilcox H. W.: Structural changes in the nervous system related to the process of aging. In: The process of aging in the nervous system. Eds. J. Birren, H. Imus, W. Windle, Ch. C. Thomas, Springfield, Illinois 1959, 16-23.

Author's address: Department of Neurology, Medical Academy, 02-007 Warszawa, 6 Oczki Str.

ALEKSANDRA KRYGIER-STOJAŁOWSKA, JERZY KULCZYCKI, MIROSŁAW MADEJ, PRZEMYSŁAW NOWACKI, KRYSTYNA HONCZARENKO

ZMIANY ILOŚCIOWE DNA I BIAŁEK ZASADOWYCH (HISTONÓW) W JĄDRACH KOMÓREK NERWOWYCH I GLEJOWYCH MÓZGOWIA SZCZURÓW W RÓŻNYM WIEKU*

Pracownia Patologii Komórki Zakładu Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin Kierownik Pracowni: prof. dr A. Krygier-Stojałowska Pracownia Neuropatologii Kliniki Neurologicznej Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin Kierownik Pracowni: doc. dr J. Kulczycki

W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się doniesienia o występowaniu poliploidalnej ilości DNA w jądrach komórek różnych narządów ludzi i zwierząt. W poprzednich etapach naszej pracy (Krygier--Stojałowska i wsp. 1977; Kulczycki i wsp. 1979) udało nam się wykazać występowanie hiperdiploidalnych ilości DNA w jądrach neuronów mózgu człowieka. Stwierdziliśmy, że zjawisko to ma charakter fizjologiczny i narasta wraz z wiekiem. Interpretacja tego zjawiska jest trudna. Niektóre dane zdają się wskazywać, że wzrastanie ilości DNA idzie w parze ze zwiększonym obciążeniem funkcjonalnym neuronów, nie jest jednak wykluczone, że zjawisko to jest wynikiem pozostawania na terenie jąder resztek uszkodzonej i nie usuniętej z nich chromatyny.

Pewne światło na to zagadnienie mogłoby rzucić jednoczesne badanie ilościowe białek zasadowych (histonów) związanych z DNA i pełniących wobec niego funkcję represyjną (Myśliwski 1974). Założenie to stało się podstawą obecnych badań na materiale zwierzęcym.

MATERIAŁ I METODY

Do badania pobierano mózgi szczurów rasy Wistar obu płci, w następującym wieku: 1 dzień, 30, 42, 50, 165 i 300 dni po 2 zwierzęta oraz 510, 730, 900 i 1140 dni po 1 zwierzęciu.

* Praca wykonana w ramach planu węzłowego Nr 10.4.2.02.1.4.
 Neuropatologia Polska — 7

Do badań cytochemicznych użyto materiału z kory zakrętu hipokampa i pnia mózgu. Materiał natychmiast po pobraniu homogenizowano ręcznie i przygotowywano do barwienia według metody uprzednio opisanej (Krygier-Stojałowska i wsp. 1977). Do ilościowych badań DNA preparaty barwiono metoda Feulgena przy użyciu pararozaniliny, zawartość histonów oceniano w preparatach przygotowanych według metody Alferta i Geshwinda (1953) w następującej modyfikacji (Krygier-Stojałowska, w druku): Po hydrolizowaniu preparatów przez 15 min. w 5% wodnym roztworze kwasu trójchlorooctowego przepłukowano je wodnym roztworem alkoholu metylowego, z dodatkiem 0,1 NaOH w celu doprowadzenia do pH 8,0. Następnie preparaty barwiono roztworem błękitu brylantowego Commassie G-250). (0,25 G barwnika na 100 ml roztworu użytego do przepłukiwania preparatów). Po barwieniu płukano preparaty w tym samym roztworze aż do spłynięcia niezwiązanego barwnika. Po przemyciu wodą destylowaną preparaty odwadniano i zamykano w balsamie. Pomiarów ilościowych DNA i histonów w jądrach neuronów oraz komórek astro- i oligodendrogleju dokonywano przy odpowiednich długościach fali, w mikrodensytometrze integrującym f-my Barr and Stroud (Glasgow).

Po pobraniu materiału do badania cytochemicznego mózgi w całości utrwalano w formalinie i zatapiano w parafinie. Skrawano je w płaszczyźnie czołowej. Preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną oraz fioletem krezylu.

WYNIKI

Obraz neuropatologiczny

Mózgi wszystkich badanych zwierząt nie wykazywały morfologicznych odchyleń od normy. Nie stwierdzono też żadnych cech typowych dla inwolucji tkanki nerwowej (lipofuscyna, zmiany zanikowe, zmiany barwnikowe gleju, inne zmiany starcze).

Ilościowe badania cytochemiczne Zmiany w chromatynie jądrowej w zależności od wieku

Badając wrażliwość chromatyny jądrowej komórek glejowych i nerwowych na kwaśną hydrolizę stwierdziliśmy, że w obu tych rodzajach komórek była ona podobna. W przypadku szczura 1-dniowego, zarówno neurony jak i komórki glejowe wykazywały największą wrażliwość, uzyskując już po 5 minutach silne zabarwienie w preparatach przygotowanych metodą Feulgena. Szczyt wrażliwości komórek w tym przypadku wystąpił po 8 min. hydrolizy kwaśnej. Natomiast już w przypadku szczurów 30- i 42-dniowych dało się zauważyć słabsze narasta-

Uwarunkowane wiekiem zmiany DNA mózgu

nie krzywych wrażliwości, które osiągały swój szczyt po 11 min. hydrolizy kwaśnej. Dotyczy to głównie neuronów kory zakrętu hipokampa, natomiast w przypadkach neuronów pnia mózgu wartości szczytowe dla 11 min. hydrolizy znacznie różniły się od wartości osiągniętych po 8 min. hydrolizy kwaśnej. U szczurów starszych, w wieku 165, 300, 730, 900 i 1140 dni, krzywe wrażliwości wykazywały szczyt również po 11 min. hydrolizy kwaśnej, lecz ponadto wykazywały drugi, mniejszy szczyt po 14 lub 17 min. hydrolizy. Podkreślić należy, że z wyjątkiem szczura 1-dniowego nasilenie reakcji Feulgena we wszystkich zastosowanych czasach hydrolizy kwaśnej jest wyraźnie wyższe w neuronach kory zakrętu hipokampa niż w neuronach pnia mózgu, a w tych z kolei tylko nieznacznie wyższe niż w komórkach glejowych (ryc. 1, 2 i 3).





Zawartość DNA w neuronach i komórkach glejowych

Ilość DNA w komórkach nerwowych szczura 1-dniowego odpowiada w zasadzie ilości DNA w komórkach glejowych (ryc. 4). Tylko nieznacznie wyższe wartości uzyskano w komórkach pnia mózgu w porównaniu z neuronami kory zakrętu hipokampa i komórkami glejowymi.

W miarę wzrostu wieku szczurów ilość DNA w neuronach zakrętu hipokampa stopniowo narasta. Wzrost ten jest już wyraźnie widoczny w przypadkach szczurów 42- i 50-dniowych (ryc. 5). Ilość DNA w neu-

Nr 1

99



Ryc. 2. Krzywa hydrolizy chromatyny komórek mózgu szczura w wieku 42 dni. Fig. 2. Hydrolysis curve of brain chromatin, 42-day rat.



Ryc. 3. Krzywa hydrolizy chromatyny komórek mózgu szczura w wieku 730 dni. Fig. 3. Hydrolysis curve of brain chromatin, 730-day rat.



Ryc. 4. Nukleinogramy DNA komórek mózgu szczura 1-dniowego (diploidalna ilość DNA — 2c — wyznaczona została na podstawie wartości uzyskanych w starszych grupach wiekowych z bardziej stabilną chromatyną). JR — jednostki robocze.
Fig. 4. Nucleinograms of brain DNA, 1-day rat (diploidal amount of DNA — 2c — established basing on the values obtained for older age groups with more stable chromatin). JR — working units.

ronach zakrętu hipokampa może nawet zbliżać się do wartości tetraploidalnych (ryc. 5 i 6).

Ilość DNA w neuronach pnia mózgu we wszystkich przypadkach jest zbliżona do ilości DNA astrogleju, lecz zawsze większa niż oligodendrogleju, przy czym różnica ta jest większa u zwierząt starszych.



Ryc. 5. Nukleinogramy DNA komórek mózgu szczura w wieku 42 dni. Oznaczenia jak na ryc. 4.

Fig. 5. Nucleinograms of brain DNA, 42-day rat. Descriptions as in Fig. 4.



Ryc. 6. Nukleinogramy DNA komórek mózgu szczura w wieku 730 dni. Oznaczenia jak na ryc. 4.
Fig. 6. Nucleinograms of brain DNA, 730-day rat. Descriptions as in Fig. 4.

Cytochemiczne badania ilościowe białek zasadowych związanych z DNA

Ilość związanych z DNA białek zasadowych (histonów) narasta w komórkach nerwowych wraz z wiekiem zwierząt (ryc. 7, 8). To samo zjawisko odnotowaliśmy w jądrach astrogleju. W jądrach oligodendrogleju wzrost ten był prawie nieżauważalny (ryc. 8, 9). Odnotowaliśmy też różnicę pomiędzy narastaniem ilości histonów w neuronach pnia mózgu i kory zakrętu hipokampa. Podobnie, jak to miało miejsce z zachowaniem się ilości DNA w neuronach starszych zwierząt, ilość białek histonowych w pierwszej z wymienionych struktur narastała bardziej proporcjonalnie w stosunku do wieku. W najstarszych grupach wiekowych cytochemiczne oznaczenia histonów w neuronach pnia i kory hipokampa osiągały zbliżone do siebie, wysokie wartości (ryc. 7, 8).

DYSKUSJA

Uzyskane przez nas wyniki wskazują na wyższą zawartość DNA w neuronach starych zwierząt, przy czym zjawisko to w stopniu silniejszym dotyczy neuronów kory hipokampa niż neuronów pnia mózgu. Interesująco w świetle tego spostrzeżenia wygląda fakt stwierdzenia u szczura 1-dniowego występowania odwrotnego stosunku między zawartością DNA w obu tych strukturach mózgu. Wykrycie w niektórych komórkach astrogleju hiperdiploidalnych ilości DNA można tłumaczyć tym, że komórki te są zdolne do proliferacji.

Nr 1



Ryc. 7. Krzywe przedstawiające zmiany ilości DNA i histonów w jądrach neuronów w zależności od wieku szczurów. Wskaźnik jest ilorazem średniej arytmetycznej wartości pomiarów ilości histonów (DNA) w grupie badanych komórek przez średnią arytmetyczną wartości pomiarów ilości histonów (DNA) komórek oligodendrogleju najstarszego przypadku.

Fig. 7. Curves illustrating age-dependent quantitative changes of DNA and histones in the neuronal nuclei. The index is expressed as the ratio of the arythmetic mean of the values obtained for histones (DNA) in the examined group of cells to that measured for oligodendroglia of the oldest case.



 Ryc. 8. Histonogramy komórek mózgu szczurów w różnym wieku. Oznaczenia jak na nukleinogramach.
 Fig. 8. Histonograms of rat brain cells at different age. Descriptions as in nucleinograms.



 Ryc. 9. Krzywe przedstawiające zmiany ilości DNA i histonów w jądrach komórek gleju w zależności od wieku zwierząt. Wskaźnik jak na ryc. 7.
 Fig. 9. Curves demonstrating age-dependent changes of DNA and histones con-

tent in glial cell nuclei. Index as in Fig. 7.

Ilość DNA w komórkach oligodendrogleju odpowiadała w naszych pomiarach zawsze ilości diploidalnej. Tę niezmienność wyników uważamy za wiarygodną, ponieważ charakterystyczne cechy (szczególnie wielkość) jąder oligodendrocytów pozwoliły na wyeliminowanie wszystkich większych komórek, a wśród nich także i tych, które mogłyby syntetyzować DNA.

Przyczyna i mechanizmy pojawiania się zwiększonych ilości DNA w somatycznych, nie dzielących się komórkach nadal pozostają nie wyjaśnione. Możemy jednak stwierdzić, że zmiany te związane są z wiekiem badanych osobników. Wskazana przez nas uprzednio możliwość korelacji tych zmian z cechami zużycia tkanki nerwowej nie znalazła w obecnym zestawieniu potwierdzenia, ponieważ nie wykryliśmy tych cech w badanych mózgach. Godną zastanowienia jest obecność szczególnie dużej ilości DNA w neuronach kory hipokampa. Być może, zjawisko to jest związane ze zwiększonym obciążeniem funkcjonalnym tej grupy komórek u rozwijającego się zwierzęcia. Za tą hipotezą przemawiają również wyniki badań Magakjan i Karałowej (1978) dotyczące komórek Purkinjego..

Przeprowadzone na tych samych szczurach cytochemiczne badania nad zawartością w jądrach komórkowych białek histonowych wskazują na równoległy do DNA wzrost ich ilości wraz z wiekiem zwierząt. Stwierdzenie to jest zgodne z przyjętymi w literaturze poglądami o równoległości zmian ilościowych DNA i białek histonowych w czasie syn-

Nr 1

tezy DNA (Myśliwski 1974; Niedźwiedzka, Kaliciński 1977). Stwierdzenie związanego z wiekiem wzrastania ilości histonów jest dowodem wiarygodności uzyskanych przez nas wcześniej danych o zwiększaniu się ilości DNA w neuronach różnych struktur mózgowych u starszych ludzi.

Z danych przytaczanych w piśmiennictwie wiemy, że histony, poza represorowym wpływem na transkrypcję, stabilizują cząsteczkę DNA (Myśliwski 1974). Pośrednim dowodem tej stabilizacji jest wzrost temperatury topnienia DNA związanego z histonami. W naszych badaniach tego rodzaju dowodem stabilizowania kompleksu DNA-histony może być stwierdzona mniejsza wrażliwość chromatyny na kwaśną hydrolizę u starszych osobników.

А. Крыгер-Стояловска, Е. Кульчицки, М. Мадей, П. Новацки, К. Хончаренко

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК И ЩЕЛОЧНЫХ БЕЛКОВ (ГИСТОНОВ) В ЯДРАХ НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Резюме

Авторы исследовали при помощи цитофотометрии количество гистонов и ДНК в ядрах нейронов и глиальных клеток извилины гипокампа и ствола мозга у 12 крыс разного возраста (от 1 до 1140 дня жизни). Как ДНК, так и гистоны ядер нейронов и астроцитов проявляли количественный рост соответственно возрасту животных. Эти изменения были наиболее интенсивны в нейронах извилины гипокампа. В олигоденроцитах это явление не наблюдалось. Авторы считают, что рост количества ДНК и гистонов в мозговых клетках животных имеет физиологический характер и зависит от их возраста. Повидимому это связано с функциональной нагрузкой клеток.

A. Krygier-Stojałowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowacki, K. Honczarenko

AGE-DEPENDENT CHANGES OF DNA AND BASIC PROTEINS (HISTONES) CONTENT IN NERVE AND GLIAL CELL NUCLEI OF THE RAT BRAIN

Summary

Cytophotometric measurements of the histones and DNA content in the nerve and glia cells of hippocampal gyrus and brain stem were performed on 12 rats in the age ranging from 1 to 1140 days. Both the DNA and histones contents In neurons and astrocytes were found to increase with age, the changes being most intensive in the hippocampal gyrus neurons. This phenomenon was not observed in oligodendroglia. It is suggested that the quantitative increase of DNA and histones in the brain cells of the animals is age-dependent and has a physiological, possibly function-related significance.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Alfert M., Geshwind I. J.: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1953, 39, 991-998.
- Krygier-Stojałowska A., Kulczycki J., Madej M., Nowacki P., Honczarenko K.: Ilość DNA w komórkach nerwowych i glejowych mózgu człowieka oznaczana metodą cytofotometryczną. Neuropat. Pol., 1977, 3, 349—356.
- 3. Krygier-Stojałowska A.: Cytochemiczne metody stosowane w ilościowej cytochemii, Monogr. Wszechnicy PAN (w druku).
- 4. Kulczycki J., Krygier-Stojałowska A., Madej M., Vainiene M., Nowacki P., Honczarenko K.: Zmiany ilościowe DNA w komórkach nerwowych i glejowych mózgu człowieka w zależności od wieku i topografii. Neuropat. Pol. 1979, 17, 73-83.
- Magakjan J. A., Karałowa E. M.: Sintjez DNK w jadrach kletok Purkinje mozżeczka embrionow kur w processie ich differencjirowki i morfofunkcjonalnoj specjalizacii. Citołogia, 1978, 20, 915–921.
- 6. Myśliwski T.: Histony. Post. Biol. Kom., 1974, 1, 15-38.
- Niedźwiedzka A., Kaliciński A.: Rola histonu H-I w strukturze i funkcji chromatyny. Post. Biochem. 1977, 23, 175–178.

Adres autorów: Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin

106

http://rcin.org.pl

Nr 1

NEUROPAT. POL., 1980, XVIII, 1

JOLANTA FINOWICKA-WALCZYNA

WPŁYW ODNERWIENIA NA ULTRASTRUKTURĘ DOJRZEWAJĄCEGO WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO SZCZURA*

(DONIESIENIE WSTĘPNE)

Klinika Neurologiczna AM Warszawa Kierownik: prof. dr I. Hausmanowa-Petrusewicz

Szczególnie intensywny w ciągu ostatnich kilkunastu lat rozwój mikroskopii elektronowej przyczynił się między innymi do znacznego rozszerzenia wiedzy o procesie miogenezy. Dokładne prześledzenie kolejnych etapów prawidłowego dojrzewania mięśnia pozwala następnie na uchwycenie zmian, powstałych wskutek zadziałania na rozwijający się mięsień pewnych czynników uszkadzających.

Coraz częściej przy rozpatrywaniu etiopatogenezy niektórych wrodzonych chorób nerwowo-mięśniowych u ludzi rozważana jest możliwość zaburzeń procesu miogenezy w okresie życia płodowego. Wśród schorzeń tych na uwagę zasługuje rdzeniowy zanik mięśni Werdniga--Hoffmanna. Dane uzyskane z badań nad strukturą i funkcją komórki mięśniowej i nerwu obwodowego (Fidziańska 1974; Hausmanowa i wsp. 1975) wydają się wskazywać na istniejące w tym schorzeniu zaburzenia dojrzewania obwodowego neuronu ruchowego z przetrwaniem pewnych cech charakterystycznych dla okresu płodowego.

Proces dojrzewania komórki mięśniowej był przedmiotem wielu badań, prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Modelem doświadczalnym dojrzewającego mięśnia zwierzęcego są najczęściej mięśnie szczura, pobierane do badań nie tylko w okresie życia płodowego, ale i w pierwszych dniach po urodzeniu, gdyż wiadomo, że szczur rodzi się z niedojrzałym układem mięśniowym (Dubowitz 1963; Landon 1970; Boëthius 1971).

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4.2.02.

Dość dobrze poznane są zmiany widoczne w mikroskopie elektronowym po odnerwieniu mięśnia dojrzałego. Prac poświęconych ultrastrukturze mięśnia dojrzewającego po deeferentacji jest znacznie mniej i dotyczą one głównie zmian w poszczególnych organellach włókna mięśniowego, a więc w obrębie miofibryli (Hanzlikowa, Schiaffino 1973), lizosomów (Schiaffino, Hanzlikova 1972), siatki sarkoplazmatycznej (Schiaffino, Settembrini 1970; Shafiq i wsp. 1972), komórek satelitarnych (Schultz 1976, 1978). Brak w dostępnym nam piśmiennictwie danych, dotyczących wpływu wczesnego odnerwienia na proces dojrzewania włókna mięśniowego, skłonił nas do podjęcia obecnej pracy, której celem były:

1) ocena ultrastrukturalna mięśnia szkieletowego szczura, dojrzewającego prawidłowo, z ustaleniem okresu uzyskania pełnej dojrzałości morfologicznej, łącznie z zaznaczeniem zróżnicowania włókien na typy metaboliczne według klasyfikacji Padykuli i Gauthier (1967).

2) prześledzenie zmian, zachodzących w ultrastrukturze komórek mięśniowych po odnerwieniu dokonanym u nowo narodzonych szczurów.

MATERIAŁ I METODY

Do badań pobierano wycinki z głowy przyśrodkowej mięśnia brzuchatego łydki szczurów rasy Wistar. Mięsień ten wybrany został do doświadczeń ze względu na równomierną (w przybliżeniu) zawartość włókien typu I, II i włókien pośrednich, co czyni go zbliżonym do mięśni szkieletowych człowieka.

Materiał stanowiły dwie grupy zwierząt:

1) Grupa kontrolna — szczury zdrowe, od których pobierano mięsień w 1—7 (codziennie), 10, 14, 21, 28, 35 i 42 dniu życia.

2) Grupa doświadczalna — szczury z przeciętym tuż po urodzeniu prawym nerwem kulszowym, od których pobierano mięsień w 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63 i 84 dniu życia.

W obecnym doniesieniu wstępnym przedstawiono wyniki badań odnerwionych mięśni pobranych w 35 dniu życia. Odnerwienia dokonywano w pierwszej dobie życia w warunkach hibernacji (przebywanie zwierząt w temperaturze 4°C przez okres 5—6 minut) poprzez przecięcie prawego nerwu kulszowego i usunięcie jego 2—3-milimetrowego odcinka na wysokości krętarza większego kości udowej. Pobrane wiązki mięśni były rozciągane na korku, utrwalane w 5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym o pH=7,4 przez dwie godziny, dobarwiane czterotlenkiem osmu w buforze kakodylowym przez
trzy godziny, odwadniane we wzrastających stężeniach alkoholu i acetonu i zatapiane w żywicy eponowej. Jednocześnie ten sam materiał oceniano przy użyciu metod histochemicznych (Kamińska 1976); badania te pozwoliły na wyłączenie przypadków z niepełnym odnerwieniem oraz reinerwacją.

Do wstępnego badania służyły półcienkie skrawki eponowe, barwione błękitem metylenowym. Skrawki ultracienkie skrawano przy pomocy ultramikrotomu LKB, dobarwiano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Oceny ultrastrukturalnej dokonywano przy pomocy mikroskopu elektronowego JEM-7 i JEM-100 S. Na przekrojach poprzecznych określano ogólny układ włókien mięśniowych, mierzono ich średnicę, a także obliczano odsetkową zawartość poszczególnych rodzajów komórek mięśniowych. Na przekrojach podłużnych oceniano układ miofibryli, długość sarkomerów, szerokość linii Z, zawartość mitochondriów i stopień rozwoju siatki sarkoplazmatycznej. Na podstawie tych danych oznaczano typ metaboliczny poszczególnych włókien mięśniowych, przyjmując, że włókna typu I są z reguły węższe, mają szerszą linię Z, większą zawartość mitochondriów i słabiej rozwiniętą siatkę sarkoplazmatyczną (Padykula, Gauthier 1967). W każdym preparacie oceniano dwieście włókien mięśniowych.

WYNIKI

Badanie mikroskopowo-elektronowe skrawków pobranych z głowy przyśrodkowej mięśnia brzuchatego łydki, zdrowych, nowo narodzonych szczurów, wykazuje cechy niedojrzałości układu mięśniowego: luźny układ komórek z szerokimi przestrzeniami międzykomórkowymi oraz obecność komórek, będących w różnym okresie rozwoju:

1) Komórki niezróżnicowane, jednojądrzaste, nie zawierające miofibryli; część z nich położona jest w bezpośrednim sąsiedztwie dojrzalszej komórki mięśniowej, co mogłoby sugerować ich późniejszy udział w procesie miogenezy. Nie uwzględniano ich w obliczaniu odsetkowego składu komórek mięśniowych (ryc. 1).

2) Miotuby — komórki zawierające miofibryle oraz ośrodkowo leżące jądra (średnica miotub = $5,9 \pm 2,9 \mu$ m); do tej grupy zaliczono również komórki, zawierające miofibryle, lecz z niewidocznym w płaszczyźnie przekroju jądrem, natomiast wymiarami zbliżone do niewątpliwych miotub. Łącznie grupa ta stanowiła 47% wszystkich komórek mięśniowych (ryc. 2).

3) Włókna mięśniowe niedojrzałe — zawierające pod wspólną blaszką podstawną kilka komórek (zwykle 2—3) w różnym okresie dojrze-



wania, z różną gęstością miofibryli, o średnicy $10,2 \pm 4,3 \mu m$. Stanowią one 49% wszystkich komórek mięśniowych (ryc. 3).

4) Włókna mięśniowe dojrzałe — niewielka (4%) liczba włókien z wyraźnie obwodowo ułożonym jądrem i ściśle skupionymi miofibrylami; średnica = $12,2 \pm 3,4 \mu m$ (ryc. 4).

Pełną dojrzałość morfologiczną (zwarty układ pęczkowy całkowicie dojrzałych włókien) badany mięsień uzyskuje pomiędzy 10 a 14 dniem życia zwierzęcia, po tym okresie następuje jedynie dalszy stopniowy przyrost średnicy włókien (np. po 5 tygodniach wynosi ona w warunkach prawidłowych $19,4\pm5,1$ µm). Natomiast cechy różnicowania włókien na typy metaboliczne pojawiają się pomiędzy 21 a 28 dniem życia.

W mięśniach odnerwionych tuż po urodzeniu zwierząt, wyraźne zmiany (w porównaniu z grupą kontrolną) stwierdzono po upływie kilku tygodni. Przedstawiamy przykładowo mięśnie pobrane po 5 tygodniach od chwili odnerwienia (dla porównania pokazano mięsień zdrowego 5-tygodniowego szczura o przeciętnej średnicy włókien jak podano powyżej — ryc. 5).

W mięśniu odnerwionym zwraca przede wszystkim uwagę znacznie luźniejszy układ włókien mięśniowych z poszerzeniem przestrzeni międzykomórkowych, które mniej lub bardziej obficie wypełnione są włókienkami kolagenu. Uderzająca jest rozpiętość średnic poszczególnych włókien: obok włókien o średnicy w przybliżeniu prawidłowej widoczne są skupienia włókien bardzo wąskich, o średnicy 2—5 µm (ryc. 6).

Ryc. 1. Pierwsza doba życia. Komórka niezróżnicowana, nie zawierająca miofibryli, leżąca w bezpośrednim sąsiedztwie niedojrzałego włókna mięśniowego. Pow. $6000 \times .$

Fig. 1. First day of life. Indifferentiated cell without myofibrils near an immature muscle fiber. \times 6000.

- *Ryc. 2.* Pierwsza doba życia. Miotuba zawierająca miofibryle wokół ośrodkowo położonego jądra. Pow. 6000 ×.
- Fig. 2. First day of life. Myotube with myofibrils and centrally located nucleus. \times 6000.
- Ryc. 3. Piewsza doba życia. Niedojrzałe włókno mięśniowe (trzy komórki na różnym etapie rozwoju pod wspólną blaszką podstawną). Pow. 6000 $\times.$
- Fig. 3. First day of life. Immature muscle fiber (three cells in different stages of development under a common basement membrane). \times 6000.
- *Ryc.* 4. Pierwsza doba życia. Włókno mięśniowe dojrzałe (gęsto ułożone miofibryle, własna blaszka podstawna, jądro położone obwodowo). Pow. 5800 ×.
- Fig. 4. First day of life. Mature muscle fiber with own basement membrane and peripherally located nucleus. \times 5800.

Nr 1



Nr 1

Te wąskie włókna, zbliżone wyglądem do miotub niedojrzałego mięśnia, odznaczają się (na przekroju poprzecznym) obecnością jednego dużego jądra, zwykle umieszczonego ośrodkowo i otoczonego rąbkiem cytoplazmy. Średnica tych "miotubopodobnych" włókien wynosi $3,8 \pm 2,1$ µm. Cytoplazma części tych włókien zawiera dość gęsto ułożone miofibryle (ryc. 7), czasem jednak jest ich niemal całkowicie pozbawiona (ryc. 8). Blaszka podstawna w tych włóknach zwykle przylega ściśle do ich sarkolemmy.

Mniej więcej w 10% występują ponadto włókna mięśniowe niedojrzałe, zawierające pod wspólną blaszką podstawną kilka komórek, będących w różnym stadium rozwoju i zawierających różną liczbę miofibryli. U zdrowego szczura włókna te są obecne jedynie do 7—10 dnia życia (ryc. 9).

We włóknach o średnicy zbliżonej do prawidłowych często stwierdzane są zmiany strukturalne o charakterze bądź ubytków miofilamentów na obwodzie włókna i w obrębie poszczególnych miofibryli (z poszerzeniem przestrzeni międzywłókienkowych), bądź też ogniskowej destrukcji i dezorganizacji miofibryli z pojawieniem się gęstych osmofilnych wiązek (zmiany podobne do tarczowatych) (ryc. 10).

Po upływie 5 tygodni od odnerwienia nie stwierdzono charakterystycznych dla zdrowego mięśnia wykładników morfologicznych dla włókien typu I i II.

OMÓWIENIE

Dokładny opis ultrastruktury mięśnia szczura z okresu okołourodzeniowego znany jest z prac Kelly'ego i Zacksa (1969a), Bergmana (1962) oraz Hanzlikovej i Schiaffina (1973). Z prac tych wynika, że w 16 dniu życia płodowego szczura układ komórek jest bardzo luźny; widoczne są miotuby leżące pojedynczo lub w niewielkich skupieniach, między nimi zaś znajdują się dość liczne niezróżnicowane komórki jednojądrzaste. W tym okresie blaszka podstawna jest niewidoczna.

Ryc. 5. Pięciotygodniowy, zdrowy szczur z grupy kontrolnej. Mięsień w pełni dojrzały: prawidłowy pęczkowy układ dojrzałych włókien mięśniowych, jądra leżące obwodowo, ścisłe wypełnienie sarkoplazmy miofibrylami. Pow. 2000 ×.

Fig. 5. Muscle from normal rat five weeks after birth. Arrangement of completely mature muscle fibers into bundles, peripherally located nuclei, tight filling of sarcoplasm with myofibrils. \times 2000.

Ryc. 6. Pięć tygodni po odnerwieniu. Znaczne różnice w wymiarach włókien. Poszerzone przestrzenie międzykomórkowe. Pow. 2500 ×.

Fig. 6. Five weeks after denervation. Muscle fibres of varying diameters; widening of the intracellular spaces. \times 2500.

Neuropatologia Polska — 8





Ryc.9. Pięć tygodni po odnerwieniu. Niedojrzałe włókno mięśniowe, trzy komórki pod wspólną blaszką podstawną. Pow. 10500 $\times.$

Fig. 9. Five weeks after denervation. Immature muscle fiber, three cells under a common basement membrane. imes 10 500.

W chwili urodzenia (19—21 dzień życia płodowego) oraz we wczesnym okresie pourodzeniowym dochodzi do ścisłego kontaktu komórek mniej zróżnicowanych z dojrzałą miotubą oraz do otoczenia takiego zespołu komórkowego wspólną blaszką podstawną. W odróżnieniu od autorów, którzy sugerują w konsekwencji fuzję tych komórek, Landon (1970, 1971) traktuje ten bliski kontakt tylko jako przemijający etap w procesie dojrzewania mięśnia, nie prowadzący do fuzji stykających się z sobą komórek.

Ryc. 7. Pięć tygodni po odnerwieniu. Komórka "miotubopodobna" z jądrem w środku i stosunkowo dobrze zachowanymi miofibrylami. Pow. 9500 $\times.$

Fig. 7. Five weeks after denervation. "Myotube-like" cell with centrally located nnucleus and relatively well preserved myofibrils. × 9500.

Ryc.8. Pięć tygodni po odnerwieniu. Bardzo wąskie włókno, prawie zupełnie pozbawione miofibryli, natomiast z obecną blaszką podstawną (strzałka). Pow. $9500 \times .$

Fig. 8. Five weeks after denervation. Very narrow muscle fiber with nearly total loss of myofibrils and present basement membrane (arrow). \times 9500.



Ryc. 10. Pięć tygodni po odnerwieniu. Obszar ogniskowej destrukcji miofibryli ostro odgraniczony od pozostałej części włókna mięśniowego. Pow. 11 $200 \times .$

Fig. 10. Five weeks after denervation. Area of disintegration of myofibrils separated from remaining part of the muscle fiber. \times 11 200.

Na podstawie danych z piśmiennictwa można przyjąć, że w procesie dojrzewania układu mięśniowego istotną rolę odgrywają dwa czynniki:

 Zlewanie się (fuzja) komórek, prowadzące do zwiększania długości i średnicy włókna mięśniowego z jednoczesnym wzrostem liczby jąder.

2) Wykształcenie się połączeń nerwowo-mięśniowych.

Proces fuzji we wczesnym okresie miogenezy jest prawdopodobnie niezależny od unerwienia; przejście od mioblastu do form dojrzalszych, z wykształceniem niemal wszystkich organelli wewnątrzkomórkowych włókna mięśniowego, widoczne jest w hodowli tkanki mięśniowej pomimo braku unerwienia (Przybylski, Blumberg 1966; Shimada 1971). Unerwienie odgrywa prawdopodobnie rolę kierującą w dojrzewaniu włókien i różnicowaniu ich na typy.

W chwili urodzenia zarówno nerwy obwodowe jak i złącza nerwowo-mięśniowe są u szczura niedojrzałe (Kelly, Zacks 1969b), co potwierdziło się również w naszych spostrzeżeniach (dane nie publikowane).

Wydaje się, że związany z tym jest brak cech zróżnicowania włókien mięśniowych na typy metaboliczne w pierwszych tygodniach życia (Shafiq i wsp. 1972; Hanzlikova, Schiaffino 1973). Wyniki naszych badań zgodne są z tymi doniesieniami.

Hanzlikova i Schiaffino (1973) po odnerwieniu mięśni płodów szczurzych *in utero* stwierdzili po dwumiesięcznej obserwacji obecność dużej liczby wąskich włókien z dobrze zachowanymi miofibrylami. Nie znaleziono różnic w zakresie szerokości linii Z, a także w zawartości mitochondriów. Podobne są spostrzeżenia Shafiqa i wsp. (1972), którzy po odnerwieniu okołourodzeniowym jako jedyną różnicę między włóknami wolnymi i szybkimi zauważyli niejednakowy stopień rozwoju siatki sarkoplazmatycznej: obfitszy w mięśniach z przewagą (w warunkach prawidłowych) włókien szybkich. Szczególną oporność siatki sarkoplazmatycznej na odnerwienie, a nawet jej proliferację opisali w 1970 r. Schiaffino i Settembrini.

Na podstawie naszych badań stwierdzamy, że odnerwienie dokonane u szczura tuż po urodzeniu prowadzi do zahamowania procesu dojrzewania włókien mięśniowych. Wykładnikiem tego jest obecność w 5--tygodniowym odnerwionym mięśniu komórek "miotubopodobnych" (w mięśniu zdrowym miotuby spotykano tylko w pierwszych dniach życia). Brak wyraźnych cech zaniku tych komórek (wyrażającego się pofałdowaniem blaszki podstawnej i zagęszczeniem jąder) sugeruje raczej ich przetrwanie z wcześniejszego okresu ontogenezy. Ich nieco mniejsza średnica (w porównaniu z miotubami w pierwszym dniu życia) jest jednak chyba dowodem na istnienie również pewnej komponenty zanikowej. O prawdopodobnym zahamowaniu fuzji części komórek w mięśniu odnerwionym świadczy natomiast przetrwanie włókien niedojrzałych (nieobecnych w warunkach prawidłowym już od 10 dnia życia). Ponadto po 5 tygodniach obserwacji nie stwierdziliśmy w mięśniu odnerwionym wykładników różnicowania włókien na typy metaboliczne. Oprócz cech świadczących o zahamowaniu dojrzewania mięśnia odnerwionego obserwowano też nakładające się zmiany zwyrodnieniowe.

Można pokusić się o stwierdzenie, że zmiany ultrastrukturalne w mięśniu szczura dojrzewającym po odnerwieniu uderzająco przypominają obraz morfologiczny mięśnia ludzkiego w rdzeniowym zaniku mięśni typu Werdniga-Hoffmanna, opisany przez Fidziańską (1974) oraz Hausmanową i wsp. (1975).

Autorka pragnie złożyć gorące podziękowanie Pani Docent Annie Fidziańskiej za niezwykle życzliwą i cenną pomoc zarówno w opracowaniu zagadnienia jak i w przygotowaniu oraz interpretowaniu zdjęć mikroskopowo-elektronowych.

Nr 1

J. Finowicka-Walczyna

Й. Финовицка-Вальчина

ВЛИЯНИЕ ДЕНЕРВАЦИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ДОЗРЕВАЮЩЕГО МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА КРЫСЫ

Резюме

В работе представляется микроскопо-электронный образ икроножной мышцы крысы, дозревающей в нормальных условиях и после денервации.

Денервация производилась спустя 12—18 часов после рождения путем перереза сидалищного нерва. Нормальный нерв достигает полной морфологической зрелости между 10 и 14 днем жизни. Ультраструктурные черты дифференциации волокон по метаболическим типам делаются видимыми с 21—28 дня жизни.

Денервация, произведеныая после рождения, тормозит созревание мышечных волокон: на 35 день после денервации наблюдается наличие большого количества очень узких "миотубовидных", а также незрелых мышечных волокон. Кроме того, у части волокон наблюдаются структуральные изменения (очаговое отсутствие или дезинтеграция миофибрилл). Не обнаруживаются ультраструктурные черты дифференциации волокон по метаболическим типам.

J. Finowicka-Walczyna

EFFECT OF DENERVATION ON THE ULTRASTRUCTURE OF MATURING MUSCLE FIBER IN RAT

Summary

The present study deals with the fine structure of the normal and denervated rat gastrocnemius muscle. Denervation was performed by the sciatic nerve section, 12—18 hours after birth. A normal muscle reaches complete morphological maturity between 10th and 14th day of life. The ultrastructural features of metabolic differentiation were observed between the 21st and 28th day of life.

Postnatal neurectomy delays the maturation of muscle fibres. On the 35th day after denervation there are many very narrow "myotube-like" fibres as well as immature muscle fibres. Moreover, some of the denervated muscles show structural changes (focal lack or disintegration of myofibrils). There are no ultra-structural features of metabolic differentiation of muscle fibres.

PIŚMIENNICTWO

- Bergman R. A.: Observations on the morphogenesis of rat skeletal muscle. Bull. Hopkins Hosp., 1962, 110, 187-201.
- 2. Boëthius J.: Electrophysiological and morphological development of leg and neck muscles in the rat. Acta Physiol. Scand., 1971, 81, 492-507.
- 3. Dubowitz V.: Enzymatic maturation of skeletal muscle. Nature, 1963, 197, 1215.
- Fidziańska A.: Ultrastructural changes in muscle in spinal muscular atrophy Werdnig-Hoffmann's disease. Acta neuropath. (Berlin), 1974, 27, 247—256.

- 5. Gauthier G. F., Padykula H. A.: Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. J. Cell. Biol., 1966, 28, 333—354.
- 6. Hanzlikova V., Schiaffino S.: Studies on the effect of denervation in developing muscle. III. Diversification of myofibrillar structure and origin of the heterogeneity of muscle fiber types. Z. Zellforsch. 1973, 147, 75–85.
- Hausmanowa-Petrusewicz I., Fidziańska A., Dobosz I., Drac H., Rynkiewicz B.: The foetal character of the lesion in the acute form of Werdnig-Hoffmann's disease. W: Proceedings of IIIth International Congress on Muscle Diseases, Newcastle upon Tyne. Excerpta Medica, Int. Series, Elsevier, Amsterdam 1975, 546—556.
- Kamińska A.: Wpływ odnerwienia na mięsień szkieletowy szczura w procesie ontogenezy. Neuropat. Pol., 1976, 14, 435–440.
- 9. Kelly A. M., Zacks S. J.: The histogenesis of rat intercostal muscle. J. Cell Biol., 1969a, 42, 135-153.
- 10. Kelly A. M., Zacks S. J.: The fine structure of motor end-plate morphogenesis. J. Cell Biol., 1969b, 42, 154-169.
- Landon D. N.: Observations on the morphogenesis of rat skeletal muscle. J. Anat., 1970, 107, 385—386.
- 12. Landon D. N.: A quantitative study of some fine structural features of developing myotubes in the rat. J. Anat., 1971, 110, 170-171.
- 13. Padykula H. A., Gauthier G. F.: Ultrastructural features of three types of muscle fibers in the rat diaphragm. Anat. Rec., 1967, 157, 296.
- 14. Przybylski R. J., Blumberg J. M.: Ultrastructural aspects of myogenesis in the chick. Lab. Invest., 1966, 15, 839-863.
- Schiaffino S., Settembrini P.: Studies on the effect of denervation in developing muscle. I. Differentiation of the sarcotubular system. Virchow Arch. Path. Anat., Abt. B Zellpath., 1970, 4, 345-356.
- Schiaffino S., Hanzlikova V.: Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. J. Ultrastruct. Res., 1972, 39, 1—14.
- Schultz E.: Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. Am. J. Anat., 1976, 147, 49-70.
- Schultz E., Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation. Anat. Rec., 1978, 190, 299-312.
- Shafiq S. A., Asiedu S. A., Milhorat A. T.: Effect of neonatal neurectomy on differentiation of fiber types in rat skeletal muscle. Exp. Neurol., 1972, 35, 529-540.
- Shimada Y.: Electron microscope observations on the fusion of chick myoblast in vitro. J. Cell Biol., 1971, 48, 128-142.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna AM, ul. Oczki 6, 02-007 Warszawa

Nr 1

c.d. ze str. 82

mii. Renkawek (Warszawa) przedstawiła wyniki rozległych badań na temat obrazu ultrastrukturalnego naczyń włosowatych mózgu w hodowli *in vitro*.

Wśród doniesień poświęconych nowotworom doświadczalnym duże zainteresowanie wzbudziły prace z Zakładu Neuropatologii we Freiburgu, kierowanego przez Kleihuesa, na temat bioaktywacji benzopirenu w układzie nerwowym oraz mechanizmu prenatalnej indukcji guzów układu nerwowego przez 7,12-dwumetylobenzantracen. Volk z Haidelbergu przedstawił ultrastrukturalne i histochemiczne dane wskazujące, że podawanie ciężarnym szczurzycom alkoholu prowadzi do zahamowania synaptogenezy w mózgu noworodków. Niezwykle interesujący problem, tak z punktu widzenia teoretycznego jak i praktycznego podnieśli Bischoff i Büchler (Berlin) przedstawiając możliwości autologicznej transplantacji nerwu wzrokowego do nerwu kulszowego u myszy. Bardzo ważne zagadnienie poruszył również Wolburg z Tübingen w swojej pracy na temat mielinizacji regenerujących aksonów, stawiając tezę, że neuron wytwarza czynniki stymulujące mielinę (MSF), które są następnie aktywowane obwodowo.

W ostatniej sesji zjazdu obejmującej tematy wolne, z ciekawszych doniesień można wymienić prace Anzila i wsp. (Monachium) na temat przypadku rodzinnej choroby Niemann-Picka typu C, Ikedy i Goebel (Getynga) o badaniach ultrastrukturalnych limfocytów w późnodziecięcej i dziecięcej postaci ceroido-lipofuscynozy oraz Schmitta z Heidelbergu o zmianach w mięśniach i w zakończeniach nerwowych w gangliozydozie GM2 oraz mukopolisacharydozie typu II (Huntera). Bardzo rzadki przypadek niedoboru transferazy karnityno-palmitylowej, w którego obrazie klinicznym dominowały zależne od temperatury bóle mięśni, stanowił przedmiot doniesienia Wiithältera i wsp. (Tübingen i Rotterdam).

W całości, w tym bardzo bogatym tematycznie i treściowo zjeździe neuropatologicznym, na uwagę zasługuje duże powiązanie prac doświadczalnych z tematyką kliniczną oraz zastosowanie bardzo szerokiego spektrum metod badawczych. Wyraźnie zaakcentowany udział polskich uczestników zjazdu stanowi przykład rysujących się możliwości współpracy pomiędzy Stowarzyszeniem Neuropatologów polskich a Niemieckim Stowarzyszeniem Neuropatologów i Neuroanatomów.

at it is a set of the the

That the state of the second states

Mieczysław Wender

25 - 32 "

and the war war in the same

WOJCIECH HILGIER

in the state of the

ZAWARTOŚĆ α-KETOGLUTARANU I GLUTAMINIANU W MÓZGU SZCZURÓW W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

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

1.1. 2051

W licznych doniesieniach opartych na analizie klinicznych przypadków śpiączki wątrobowej (Adams, Foley 1953; McDermott, Adams 1954; Bessman, Bessman 1955) zwracano uwagę na patogenetyczną rolę amoniaku w zespole encefalopatii wątrobowej w następstwie nieswoistych uszkodzeń wątroby. Również w pracach z doświadczalną przetoką wrotno-układową stwierdzono wzrost poziomu amoniaku w surowicy krwi oraz w mózgu (Kyu, Cavanagh 1970; Cavanagh, Kyu 1971; Hindfelt 1975). W poprzednich badaniach przeprowadzonych na modelu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, stanowiącej następstwo uszkodzenia wątroby czterochlorkiem węgla, wykazano wzrost aktywności glutaminazy w mózgu, co mogło stanowić pośredni wykładnik nagromadzenia amoniaku (Hilgier, Mossakowski 1979). Według hipotezy Mossakowskiego (1977) w patogenezie encefalopatii watrobowej podstawową rolę odgrywa upośledzenie detoksykacji amoniaku w mózgu, związane z niedoborem α-ketoglutaranu w ośrodkowym układzie nerwowym. Dane z piśmiennictwa dotyczące poziomu α-ketoglutaranu w mózgu w przypadkach ostrej hyperamonemii oraz w klinicznych przypadkach encefalopatii wątrobowej są jednak niejednoznaczne. Stwierdzono zarówno wzrost (Duffy i wsp. 1974; Hindfelt 1975), jak i niezmieniony poziom tego związku (Hawkins i wsp. 1973).

Wydawało się zatem celowe ocenić poziom a-ketoglutaranu, oraz glutaminianu jako kolejnych ogniw w detoksykacji amoniaku, u szczurów z doświadczalną encefalopatią wątrobową.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 64 szczurach rasy Wistar, samcach. Wiek zwierząt na początku doświadczenia wynosił 2 miesiące. U 33 szczurów uszkodzenie wątroby wywoływano przez podskórne wstrzykiwa-

W. Hilgier

nie, co drugi dzień, roztworu czterochlorku węgla w płynnej parafinie, w dawce 0,1 ml na 100 g ciężaru ciała, według metody podanej przez Georgijewa i wsp. (1968). Zwierzęta kontrolne w liczbie 31 otrzymywały w tych samych warunkach i objętościach podskórne injekcje płynnej parafiny.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację bez użycia narkozy, w grupach po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od rozpoczęcia doświadczenia. W chwili zakończenia doświadczenia, niezależnie od okresu jego trwania, wiek zwierząt wynosił 8 miesięcy. Do badań pobierano obie półkule mózgu bez pnia i móżdżku. Tkankę homogenizowano w 4 częściach 0,6 M kwasu nadchlorowego, a następnie wirowano 10 min przy $3000 \times g$. Do oznaczania zawartości glutaminianu pobierano 3 ml nadsączu i doprowadzano do pH ok. 9 przy użyciu 2 M mieszaniny fosforanów o pH ok. 12. Następnie nadsącz odstawiano na 10 min do lodu, po czym sączono przez sączek karbowany, a przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej.

Mieszanina reakcyjna zawierała: 3 ml buforu glicyno-hydrazynowego (0,5 M glicyna, 0,4 hydrazyna pH 9), 0,2 ml przesączu (do próby ślepej woda destylowana), 0,2 ml NAD (około 3×10^{-2} M). Ekstynkcję odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 366 nm. Następnie dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej (ok. 10 mg białka/ml) wolnej od jonów amonowych i odczytywano wynik po 30 min. Z różnicy ekstynkcji obliczano zawartość glutaminianu wg wzoru reakcji (Bernt, Bergmeyer 1963).

Do oznaczania α -ketoglutaranu pobierano 4 ml supernatantu, doprowadzano do pH ok. 7,6 przy użyciu 1 M K₃PO₄, odstawiano na 10 min do lodu, a następnie sączono na sączku karbowanym. Przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej.

Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,75 ml przesączu, 0,05 ml NADH (ok. 8×10^{-3} M). Ekstynkcję odczytywano wobec wody destylowanej w spektrofotometrze przy długości fali 366 nm. Dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej (2 mg białka/ml) zawieszonej w 2,8 M siarczanie amonowym i odczytywano ponownie ekstynkcję po 4 min. Z różnicy ekstynkcji obliczano zawartość *a*-ketoglutaranu na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej (Bergmeyer, Bernt 1963).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu t-Studenta.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Poziom α-ketoglutaranu i glutaminianu w mózgach zwierząt kontrolnych i doświadczalnych z wszystkich grup przedstawiono w tabeli I.

Nr 1

α-ketoglutaran w encefalopatii wątrobowej

Tabela	1.	Zawartość	α -ketoglutaranu	i glutami	inianu w	r mózgu	szczurów	w	doświadczalnej	ence-
				falopatii	wątrobe	owej				

Table	1.	The α -ketoglutarate	and	glutamate	content	in	rat	brain	in	experimental	hepatic	ence-
				ph	alopathy	7						

Czas trwania doświadcze- nia	Glutaminian Glutamate	(µmole/kg) (µmoles/kg)		$\begin{array}{l} \alpha {\rm -Ketoglutaran} \ (\mu {\rm mole/kg}) \\ \alpha {\rm -Ketoglutarate} \ (\mu {\rm moles/kg}) \end{array}$					
Duration of experiment	kontrola control	doświadczalne experimental	р	kontrola control	doświadczalne experimental	р			
mies. 2 months	12,7±0,2*) (6)	12,3±0,2 (6)	<0,01	38,4±2,7 (5)	38,2±5,8 (5)	>0,05			
mies. 4 months	12,5±0,2 (6)	$12,6\pm0,3$ (6)	<0,05	38,8±1,5 (4)	24,6±3,1 (5)	<0,01			
mies. 6 months	12,8±0,2 (6)	12,4±0,1 (6)	<0,01	38,5±2,3 (4)	23,0±3,1 (5)	<0,01			

p — prawdopodobieństwo () — liczba zwierząt *) — średnia arytmetyczna ± SD — probability — number of animals — mean ± SD

Z uzyskanych danych wynika, że u zwierząt z 2-miesięcznym podawaniem czterochlorku węgla dochodzi do niewielkiego (ok. 3%) obniżenia zawartości glutaminianu. W tym samym czasie nie obserwuje się zmian w poziomie α -ketoglutaranu. Po 4 miesiącach zawartość glutaminianu w grupie zwierząt doświadczalnych nie różniła się w sposób istotny od stwierdzanego u zwierząt kontrolnych. Obserwowano natomiast wyraźny (ok. 37%) spadek poziomu α -ketoglutaranu. U zwierząt z 6-miesięcznym okresem doświadczenia spadek zawartości α -ketoglutaranu wynosił ok. 40%, podczas gdy spadek zawartości glutaminianu był nieznaczny i statystycznie nieznamienny.

Zwraca uwagę fakt, że dynamika zmian jest analogiczna z narastaniem nieprawidłowości morfologicznych astrogleju (Mossakowski i wsp. 1970), oraz ze wzrostem aktywności glutaminazy w mózgu w tym samym modelu doświadczalnym (Hilgier, Mossakowski 1979). Uzyskane wyniki mogą stanowić potwierdzenie hipotezy Mossakowskiego i wsp. (1977), według której w mechanizmie patogenetycznym encefalopatii wątrobowej podstawową rolę odgrywa upośledzenie detoksykacji amoniaku w mózgu, uwarunkowane niedoborem α -ketoglutaranu.

Nr 1

123

W. Hilgier

Wyniki nasze nie pokrywają się z oznaczeniami innych autorów (Hawkins i wsp. 1973; Duffy i wsp. 1974; Hindfelt 1975). Można sądzić, że wynika to z różnic w zastosowanych modelach. Większość prac była prowadzona w ostrej hyperamonemii (dożylne iniekcje octanu amonu, lub na modelach z doświadczalną przetoką wrotno-układową). W tych przypadkach może nie dochodzić do zaburzeń układów enzymatycznych, warunkujących detoksykację amoniaku, lub też mogą się ujawniać mechanizmy kompensacyjne w przypadku niewielkiego wzrostu zawartości α -ketoglutaranu. W naszym przypadku mamy do czynienia z modelem przewlekłym i spadek α -ketoglutaranu może być następstwem trwąłego uszkodzenia któregoś z układów enzymatycznych, związanych z metabolizmem α -ketoglutaranu, najprawdopodobniej na jednym z etapów cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Brak zmian w poziomie glutaminianu można wiązać ze znanym zjawiskiem jego kompartmentacji w ośrodkowym układzie nerwowym. Na podstawie szeregu badań omówionych szczegółowo między innymi w pracach przeglądowych Fischera (1974) i Baxtera (1976) wiadomo, że w procesie detoksykacji amoniaku, glutamina syntetyzowana jest z szybko metabolizującej się puli glutaminianu, stanowiącej tzw. mały przedział metaboliczny, a charakteryzującej się stałym poziomem w komórce. Stwierdzony wzrost aktywności glutaminazy świadczy o dogodnych warunkach szybkiego rozkładu glutaminy, aczkolwiek trudno sądzić czy zjawisko to związane jest z indukcją enzymu przez wzrastające stężenie substratu, czy też wynika ze wzrostu ilości enzymu syntetyzowanego de novo. Prowadzone obecnie badania nad poziomem glutaminy w mózgu w warunkach doświadczalnej encefalopatii wątrobowej powinny przynieść wyjaśnienie tego problemu. Dla pełnej oceny znaczenia spadku puli a-ketoglutaranu dla procesu detoksykacji amoniaku niezbędne jest również wykonanie bezpośrednich oznaczeń zawartości amoniaku w mózgu w tych samych warunkach. Jak dotychczas, amoniak w mózgu oznaczano jedynie w modelu encefalopatii wrotno-układowej, stwierdzając jego wzrost (Hindfelt 1975).

В. Хильгер

СОДЕРЖАНИЕ «-КЕТОГЛУТАРАТА И ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕПАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

. Sia.

Было проведено исследование содержания α-кетоглутарата и глутамата в мозге крыс, у которых вызывалось повреждение печени посредством подкожных иньекций четыреххлористого угля. Иньекции проводили через два дня в течение

Nr 1

2, 4 и 6 месяцев. Наблюдали усиливающиеся во времени снижение содержания α-кетоглутарата. После 2 месяцев уровень α-кетоглутарата не отличался существенным образом от уровня у контрольных животных. После 4 месяцев обнаруживали около 37%, а после 6 месяцев около 40% снижение содержания α-кетоглутарата. Не наблюдали существенных изменений в содержании глутамата в мозге.

W. Hilgier

THE α -KETOGLUTARATE AND GLUTAMATE CONTENT OF THE RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The α -ketoglutarate and glutamate contents were examined in the brains of rats in which liver damage was induced by subcutaneous injections of carbon tetrachloride. The injections were performed every other day for 2, 4 and 6 months. A gradual decrease of the α -ketoglutarate content was observed. The decrease was undetectable after 2 months, but reached 37% after 4 months and 40% after 5 months. The glutamate content remained unchanged throughout.

PIŚMIENNICTWO

- Adams R. D., Foley J. M.: The neurological changes associated with liver disease. Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis. 1953, 32, 198-237.
- Baxter C. F.: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. W: GABA in Nervous System Function. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976.
- 3. Bernt W. E., Bergmeyer H. U.: L-Glutamate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H. U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963.
- Bergmeyer H. U., Bernt E.: α-Oxoglutarate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H. U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963.
- Bessman S. P., Bessman A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanisms of hepatic coma. J. clin. Inv. 1955, 36, 622-628.
- 6. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanisms of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. J. neurol. Sci. 1971, 12, 241-261.
- Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. W: Brain Dysfunction in Metabolic Disorders. Red. F. Plum, Res. Publ. Assoc Nerv. Ment. Dis., Raven Press, New York 1974.
- 8. Fischer J. E.: Hepatic coma in cirrhosis, portal hypertension, and following portocaval shunt. Arch. Surg. 1974, 108, 325-336.
- Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu CCl₄ na wątrobę prawidłową i regenerującą. Pat. Pol. 1968, 19, 179–187.
- 10. Hawkins R. A., Miller R. C., Nielsen C., Weech R. L.: The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. Biochem. J. 1973, 4, 1001-1008.

W. Hilgier

- 11. Hindfelt B.: On mechanisms in hyperamonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975, 253, 116-123.
- Hilgier W., Mossakowski M. J.: Aktywność l-glutamino-aminohydrolazy w mózgu szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol. 1979, 17, 287—293.
- Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rats. Brit. exp. Path. 1970, 51, 217-227.
- McDermott W. V., Adams R. B.: Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. J. clin. Inv. 1954, 33, 1—9.
- Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatij wątrobowej. Neuropat. Pol. 1970, 8, 365—374.
- Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Rózga J., Paluszkiewicz R.: Wpływ α-oksoglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. Neuropat. Pol. 1977, 15, 317–325.

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

HRISTO PROKOPANOW

CAPILLARY ULTRASTRUCTURE IN GLIOMAS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Department of Pathology, Institute of Biostructure, Academy of Medicine, Poznań Head: prof. dr P. Gabryel

Capillary permeability has been established to be heavily disturbed in primary tumors, in particular in the anaplastic gliomas and among the isomorphic glomas — in oligodendroglioma (Waggener, Beggs, 1976). According to a number of authors all the structural components of capillaries in the anaplastic gliomas may reveal abnormalities which are not observed in the normal brain tissue (Long, 1970; Hassoun et al. 1975; Stoltenberg-Didinger, Cervos-Navarro, 1976). Though the capillary permeability is also increased in the isomorphic gliomas, there is no agreement as to the structural features of these vessels.

The purpose of our study was to establish: 1) whether the structure of capillaries is the same in the isomorphic and in the anaplastic gliomas; 2) whether the degree of the structural abnormalities of capillaries depends on the tumor maturity; 3) whether vascular abnormalities within the individual tumor may explain the increased capillary permeability in brain gliomas.

MATERIAL AND METHODS

The ultrastructural observations were carried out on 8 isomorphic and 4 anaplastic gliomas obtained from patients operated in the Neurosurgical Clinic of the Academy of Medicine in Poznań. Small tissue samples were taken from the central and peripheral regions of the tumor. They were immediately fixed in glutaraldehyde and paraformaldehyde prepared according to Karnovsky's method (Karnovsky, 1965). After prefixation the specimens were postfixed with 1% OsO_4

in phosphate buffer and embedded in Epon 812 (Luft, 1961). Sections were cut on the Reichert OmU_3 microtome and stained with uranyl acetate (Watson, 1958) and lead citrate (Reynolds, 1963) and examined in a JEM 7A (JEOL) electron microscope. All these tumors were diagnosed in light microscopy using the formalin fixation and routine stainings and impregnations.

RESULTS

Isomorphic gliomas

The structure of capillaries in all the investigated isomorphic gliomas was altered in a similar way and differed distinctly from the structure of the normal brain capillaries. Thus the whole group of these tumor can be handled jointly. Most of the observed capillaries had a single layer of endothelium. From the surface of the endothelial cells single villous processes emerged towards the vessels lumen. Besides the cells with a light cytoplasm and a small number of organelles, dark cells, rich in endoplasmic reticulum and ribosomes, were also seen. The endothelial cells underwent hyperplasia in some sections. They formed a multilayer lining, narrowing or even obliterating the



Fig. 1. Astrocytoma. Central part of tumor. Fenestrated endothelium (arrows), enlarged pericapillary space (PS) containing collagen fibers (Co) and many replicas of basal membrane. \times 17 500.

Ryc. 1. Gwiaździak. Centralna część guza. Śródbłonek z fenestracjami (strzałki), poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa (PS) zawierająca włókna kolagenowe (Co) i replikacje błony podstawnej. Pow. 17500 $\times.$

vessel lumen. Some endothelial cells were swollen. The cytoplasm of these cells formed a very thin lamina with numerous fenestrae, closed by a single membrane (Fig. 1). However, fenestration of the endothelial lining was found rather rarely. Numerous microvesicles were situated both on the side of the vessel lumen and in the vicinity of the vascular basement membrane.

In all capillaries predominated endothelial cell junctions, demonstrating the expected pentalaminar configuration. Beside these open junctions were present (Figs. 2, 3), rarely in the shape of gaps of 0.2-0.3 μ m width (Fig. 4). The continuous basement membrane was of usual configuration exhibiting irregularities of width and electron density. Most of the capillaries had a basement membrane with multiple layers (Figs. 1, 2, 3) some enclosing a pericyte. In some areas the newly formed sinusoid-like vessels showed no basement membrane. The endothelial cells were separated from the adjacent tumor cells by a space of about 20-40 nm.



Fig. 2. Astrocytoma. Central part of tumor. Between two endothelial cells open junction (arrows). Enlarged pericapillary space (PS) containing replicas of basal membrane and fibroblast (F). × 29 000.

Ryc. 2. Gwiaździak. Centralna część guza. Otwarte zespolenie pomiędzy dwiema komórkami śródbłonka (strzałki). W poszerzonej przestrzeni okołonaczyniowej (PS) replikacje błony podstawnej i fibroblast (F). Pow. 29 000 ×.

PPM 1:031

All the investigated capillaries possessed a well marked perivascular space; in the central parts of tumors it was situated between the vascular and glial basement membrane and its width was uneven (Figs. 1, 2). Some fragments of basement membrane, collagen fibrils, fibroblasts and single tumor cells or their processes, intermingled with Neuropatologia Polska -9



Fig. 3. Ependymoma. Central part of tumor. Fenestrated (arrows) endothelium (End), enlarged pericapillary space (PS) containing discontinuous vascular basal membrane (VBM). $\times 50$ 850.

Ryc. 3. Wyściółczak. Centralna część guza. Śródbłonek (End) z fenestracjami (strzałki), poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa (PS) z pozbawioną ciągłości błoną podstawną naczynia (VBM). Pow. 50 850 \times .

proteinaceous material, filled the perivascular space (Fig. 4). The glial basement membrane separated the perivascular space from the tumor cells. It often protruded between the processes and the bodies of tumor cells (Fig. 4). Very rarely it was discontinued or missing in longer sections. Such breaks were more numerous in pilocytic astrocytomas. In these cases there was apparently a direct communication between the perivascular space and the intercellular spaces of the neoplastic tissue (Fig. 4).

Fig. 4. Isomorphous oligodendroglioma. Central part of tumor. Between endothelial cells (End) wide interruptions (arrows). Enlarged pericapillary space (PS) containing discontinuous vascular basal membrane (VBM), replicas of basal membrane, processes of tumor cells (TC) and discontinuous glial basal membrane (GBM). Connections between pericapillary space and intercellular space (triangles). \times 18 300. *Ryc.* 4. Izomorficzny skąpodrzewiak. Centralna część guza. Szerokie przerwy (strzałka) pomiędzy komórkami śródbłonka (End). Poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa z nieciągłą błoną podstawną naczynia (VBM), replikacjami błony podstawnej, wypustkami komórek guza (TC) i pozbawioną ciągłości glejową błoną podstawną (GBM)' Połączenia pomiędzy przestrzenią okołonaczyniową i międzykomórkową (trójkąty). Pow. 18 300 \times .



H. Prokopanow

Anaplastic gliomas

The structure of capillaries showed the same qualitative abnormalities (Fig. 5) as in the isomorphic gliomas but were more strongly expressed. In the peripheral regions of the tumor the capillary structure was similar to that of the normal cerebral capillaries except for an insignificant swelling of the endothelial cells and considerable increase of the pinocytotic activity (Fig. 6). All the changes found in capillaries of gliomas are summarized in Fig. 7.



Fig. 5. Medulloblastoma. Central part of tumor. Fenestrated (arrows) endothelial layer (End). Enlarged pericapillary space (PS) containing multilayered vascular basal membrane (VBM), collagen fibers (Co) and tumor cell process (TC). $\times 23\,800$.

Ryc. 5. Rdzeniak. Centralna część guza. Fenestracje (strzałki) śródbłonka (End). Poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa (PS), zawierająca wielowarstwową błonę podstawną naczynia (VBM), włókna kolagenu (Co) i wypustkę komórki guza (TC). Pow. 23 800 \times

DISCUSSION

Although some of our observations are similar to those described by other authors, some are different. This holds for the "gap junctions"



Fig. 6. Astrocytoma. Peripheral part of tumor. Swollen endothelial cytoplasm (End). Between endothelial cells tight junctions. Vascular and glial part of basal membrane form single layer (BM). Swollen processes of astrocyte (A). \times 17 150.

Ryc. 6. Gwiaździak. Obwodowa część guza. Obrzmiała cytoplazma śródbłonka (End). Pomiędzy komórkami śródbłonka połączenia ścisłe. Naczyniowa i glejowa część błony podstawnej tworzy pojedynczą warstwę (BM). Obrzmiałe wypustki astrocyta (A). Pow. 17150 ×.

between the endothelial cells and the fenestrations in the isomorphic gliomas; so far we found no other descriptions of these phenomena. Some authors even maintain that the endothelial layer in these tumors is as continuous as in the capillaries of the normal brain tissue (Hossmann et al., 1965; Hossmann, Wechsler, 1965, 1971; Hossmann, 1967). The gap junctions and the fenestrations occur relatively rarely in the isomorphic gliomas; that is why they were not observed by other authors who carried out their observations on a scarce material. Waggener and Beggs (1976) found the most gap junctions in areas of degeneration, inflammation or poor fixation; they assume that the role of gap junctions in vascular leakage has not been established yet. In our material the gap junctions and fenestrations have been found in well preserved areas without sings of degeneration of tumor cells, hence it may be inferred that both the "gap junctions" and the fenestrations represent a primary defect taking place in the endothelial layer of glioma vessels.



Fig. 7. Schematic picture of changes in the capillary walls and in the adjacent structures of tumor. L — lumen, End — endothelial cells, arrows — interruption between endothelial cells, VBM — vascular basement membrane, PS — perivascular space, F — fibroblast, Co — collagen, TC — tumor cells, GBM — glial basement membrane, triangle — interruption in the glial basement membrane, ES — extracellular space.

Ryc. 7. Schematyczny obraz zmian w ścianie naczyń włosowatych oraz w przyległych strukturach guza. L — światło, End — komórki śródbłonka, strzałki — przerwy pomiędzy komórkami śródbłonka, VBM — błona podstawna naczynia, PS — przestrzeń okołonaczyniowa, F — fibroblast. Co — kolagen, TC — komórki guza, GBM — glejowa błona podstawna, trójkąt — przerwanie glejowej błony podstawnej, ES — przestrzeń pozakomórkowa.

Other characteristic changes in the capillary endothelial layer of cerebral tumors (e.g. an increased pinocytotic activity, swelling and hyperplasia of endothelial cells, the presence of numerous ribosomes) were also described in the same way by other authors (Luse, 1960; Hossmann, 1967; Long, 1970; Matakas et al., 1970; Waggener, Beggs, 1976). A more distinct phenomenon in the brain tumor vessels is an increase in the frequency of pinocytotic vesicles in comparison to normal brain tissue. According to Westergaard and Brightman (1973) the

micropinocytotic vesicles may participate in the transport of macromolecules.

A high number of microvesicles in the endothelial layer is common in normal embryonal vessels (Tani, Ishii, 1963) so that their occurrence in the endothelium of tumors may be a reflection of the immaturity of these vessels. As far as the vascular basement membrane is concerned our results are similar to those stated by other authors. There was not basement membrane in the sinusoid type vessels in the pilocytic astrocytoma; all the other investigated capillaries had a continuous vascular membrane with varying width and electron density. The membrane was frequently replicated and occupied some areas in the perivascular space. The presence of continuous basement membrane does not a contradict to the increased permeability of the vessel walls in tumor. Numerous studies with the use of different tracers have shown that in pathological conditions the basement membrane represents no effective barrier to the transport of substances from the blood to the surrounding tissue, though the transport may be delayed to some extent (Gabryel, 1973).

In all the investigated isomorphic and anaplastic gliomas the perivascular space was greatly increased over that seen in the normal brain. It contained fragments of replicated basement membrane, collagen fibers, fibroblasts and occasionally blood cells. These observations are in agreement with those of other authors (Luse, 1960; Duffel et al., 1963). We can not confirm the observations of Hossmann et al. (1965); these authors maintain that in the isomorphic gliomas the vascular and glial basement membrane fuse together as they do in the normal brain capillaries. The existence of the enlarged perivascular space, the discontinuity or even the absence of glial basement membrane and the wide extracellular spaces in tumor tissue may be considered as a morphological manifestation of the increased transport of substances from blood to the tumor.

All these described findings were common for isomorphic and anaplastic gliomas but were more marked in the latter. It is in agreement with the results obtained by Bakay (1970) who used radioisotopic markers.

All the observed abnormalities of the capillary vessels in brain gliomas may be explained considering the enormous proliferative potentialities of tumor capillaries. The proliferation may be due to: a) hypoxia that causes dilatation of capillaries and endothelial cell proliferation (Bar, Wolf, 1976), and b) proliferative properties of tumor angiogenesis factor-TAF (Philips et al., 1976).

H. Prokopanow

H. Prokopanow

ULTRASTRUKTURA NACZYŃ WŁOSOWATYCH W GLEJAKACH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Streszczenie

Zmiany ultrastrukturalne naczyń włosowatych w izomorficznych i anaplastycznych glejakach są jakościowo podobne, natomiast różnią się w aspekcie ilościowym. Odchylenia od normy są częstsze w guzach anaplastycznych niż w izomorficznych. Uszkodzenia śródbłonków naczyń, obecność szerokich przestrzeni okołonaczyniowych i ich połączenie z międzykomórkowymi przestrzeniami tkanki guza, mogą być uważane za morfologiczny wykładnik wzmożonej przepuszczalności naczyń włosowatych dla związków drobno- i wielkocząsteczkowych.

Х. Прокопанов

УЛЬТРАСТРУКТУРА КАПИЛЛЯРОВ В ГЛИОМАХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Ультраструктурные изменения капилляров в изоморфных и анапластических глиомах качественно подобные, однако они отличаются количественно. Отклонения от нормы более частые в анапластических чем в изоморфных опухолях. Повреждения эндотелия сосудов, наличие широких периваскулярных пространств и их сообщения с межклеточными пространствами ткани опухоли могут считаться морфологическим паказателем усиленной проницаемости капилляров для мелко- и многомолекулярных соединений.

REFERENCES

- 1. Bakay L.: The extracellular space in brain tumors. Morphological considerations. Brain, 1970, 93, 693-698.
- Bar Th., Wolff J. R.: Development and adult variations of the wall of brain capillaries in the neocortex of rat and cat. In: The cerebral vessel wall. Ed. J. Cervos-Navarro, Raven Press, New York, 1976.
- 3. Duffel D., Farber L., Chou S., Hartmann J. F.: Electron microscopic observations on astrocytoma. Am. J. Pathol. 1963, 43, 539-545.
- 4. Gabryel P.: "Blood-brain-barrier", structure and function. Pat. Pol. 1973, 24, 217-235.
- Hassoun J., Hirano A., Zimmerman H. M.: Fine structure of intercellular junctions and blood vessels in medulloblastomas. Acta Neuropath. (Berl.), 1975, 33, 67-78.
- 6. Hossmann K. A.: Morphological substrate of the blood-brain-barrier in human brain tumors. In: Brain Edema. Eds. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer--Verlag, 1967.

Ultrastructure of capillaries in gliomas

- Hossmann K. A., Schroder M., Wechsler W.: Das morphologische Substrat der Bluthirnschranke unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Verh. Deutsch. Ges. Path. 1965, 49, 350-356.
- Hossmann K. A., Wechsler W.: Zur Feinstruktur menschlicher Spongioblastome. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1965, 187, 327–351.
- 9. Hossmann K. A., Wechsler W.: Ultrastructural cytopathology of human cerebral gliomas. Oncology, 1971, 25, 455-480.
- 10. Karnovsky M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 1965, 27, 137.
- 11. Long D. M.: Capillary ultrastructure and the blood-brain-barrier in human malignant brain tumors. J. Neurosurg. 1970, 32, 127-144.
- 12. Luft J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961, 9, 409-414.
- Luse S. A.: Electron microscopic studies of brain tumors. Neurology (Minn.) 1960, 10, 881—905.
- 14. Matakas F., Cervos-Navarro J., Gullota F.: The ultrastructure of medulloblastomas. Acta neuropath. (Berl.) 1970, 16, 271-284.
- 15. Philips P., Steward J. K., Kumar S.: Tumour angiogenesis factor (TAF) in human and animal tumors. Int. J. Cancer. 1976, 17, 549-558.
- 16. Reynolds E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 1963, 17, 208-212.
- Stoltenberg-Didinger G., Cervos-Navarro J.: Ultrastruktur der Gefässe im Glioblastom. In: Deutsche Gesellschaft für Neuropath. und Neuroanatomie. Jahrestagung 8—11.10, 1976, Kurzfassungen der Vortrage 44.
- 18. Tani E., Ishii S.: Ontogenic studies on the rat brain capillaries in relation to the human brain tumor vessels. Acta neuropath. (Berl.) 1963, 2, 253-270.
- Waggener J. D., Beggs J. L.: Vasculature of neural neoplasms. Advances in Neurology, vol. 15. Raven Press, New York, 1976.
- Watson M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958, 4, 475-476.
- Westergaard E., Brightman M. W.: Transport of proteins across normal cerebral arterioles. J. comp. Neurol. 1973, 152, 17-44.

Author's address: Institute of Biostructure, Department of Pathological Anatomy, Medical Academy. 49, Przybyszewski str., 60-355 Poznań.

http://rcin.org.pl

137

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniu 30 czerwca 1979 r .tytuł profesora zwyczajnego otrzymał prof. dr hab. med. Mirosław Mossakowski, dyrektor Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Tegoz dnia tytuły profesorów nadzwyczajnych uzyskali:

- doc. dr hab. med. Maria Dąmbska, kierownik Pracowni Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN w Warszawie,
- doc. dr hab. med. Maria Dąmbska, kierownik Pracowni Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN w Warszawie,

* * *

Walne Zgromadzenie Polskiego Towarzystwa Patologów w dniu 7 września 1979 r. nadało prof. dr hab. Mirosławowi Mossakowskiemu godność członka honorowego Towarzystwa.

* * *

W dniu 30 listopada 1979 r. zostały przyznane zespołowe nagrody naukowe Sekretarza Naukowego PAN. Otrzymali je:

 prof. dr hab. med. Mirosław Mossakowski, Dyrektor CMDiK PAN, członek korespondent PAN, za "Badania nad patogenezą niedokrwiennych uszkodzeń mózgu".

W skład nagrodzonego zespołu wchodzą: dr hab. med. M. Ostenda, dr hab. med. A. Kapuściński, dr n. przyr. J. Albrecht, dr wet. R. Gadamski, dr n. przyr. G. Szumańska, dr med. M. Śmiałek,

— prof. dr hab. med. Adam Kunicki z CMDiK PAN, członek rzeczywisty PAN, za "Opracowanie uproszczonej metody histograficznej badania wewnątrzczaszkowej kompensacji objętościowej jako elementu oceny zagrożenia ciasnotą wewnątrzczaszkową".

W skład nagrodzonego zespołu wchodzą: dr hab. med. J. Szewczykowski, dr med. J. Dziduszko, mgr inż. J. Korsak-Śliwka, mgr inż. G. Pawłowski, mgr inż. S. Śliwka.

— doc. dr hab. med. Irmina Zelman z CMDiK PAN, za "Cykl badań nad strukturalnymi i metabolicznymi następstwami ostrej hipoglikemii".

Do nagrodzonego zespołu należeli: dr n. przyr. M. Sikorska, lek. med. T. Wierzba-Bobrowicz, mgr W. Hilgier.

* * *

W dniu 1 grudnia 1979 wręczone zostały doroczne nagrody naukowe Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich. Otrzymali je:

c.d. na str. 150

EUGENIA POLKOWSKA-KULESZA, ANNA PŁUŻAŃSKA, JANUSZ ALWASIAK, MARIA MIKUTA, TADEUSZ ROBAK, ZBIGNIEW WĘGRZYN, RYSZARD MACULEWICZ

IMMUNOGLOBULINS AND OTHER SERUM PROTEINS, T AND B LYMPHOCYTES AND DEGREE OF BLASTIC TRANSFORMATION OF LYMPOCYTES STIMULATED BY PHA IN THE BRAIN TUMORS PATIENTS*

 IInd Department of Internal Medicine Head: prof. dr A. Mazurowa
Department of Oncology, Medical Academy, Łódź Head: prof. dr L. Woźniak
Department of Neurosurgery, Copernicus Hospital, Łódź Head: dr Z. Węgrzyn

For better characterization of biological properties of brain tumors we decided to examine some non-specific indicators of neoplastic processes and to determine the immunological condition of the patients. We were looking for changes within serum proteins (mainly within immunoglobulins), as an expression of humoral responses in the course of the disease. In some of these patients, quantitative studies of T and B lymphocytes in blood and evaluation of T lymphocytes function on the basis of their ability of blastic transformation after stimulation by PHA were performed.

MATERIAL AND METHODS

In the group of 43 patients with different brain tumors the following studies were done: Qualitative characterization of proteins carried out by means of immunoelectrophoresis in 1,5% Bacto-Agar-Difco as a gel-medium, according to the micromethod of Scheidegger under previously established conditions (Dmochowska, Polkowska-Kulesza,

^{*} Supported by U.S. Public Health Service, N.I.H., Research Grant PL 480, Agreement no 05-013-N.

1966). Horse serum was used as antiserum against physiological serum proteins (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Warszawa).

Quantitative determination of serum proteins. Total protein concentration was measured and separation of proteins by paper strip electrophoresis was performed under conditions reported earlier (Dmochowska, Polkowska-Kulesza, 1966). Immunoglobulins IgG, IgA, and IgM were estimated quantitatively by gel diffusion technique in commercially supplied immunochemical equipment on the Tri-Partigen Behringwerke plate. Haptoglobin levels assayed by Owen's et al. method (1960). Additionally, in 19 patients, the ceruloplasmin level was measured according to Rice et al. method (1963).

In some patients (23) quantitative studies of T and B lymphocytes in blood were performed by: E rosette test (i.e. non-immunological test of binding sheep erythrocytes by T lymphocytes); EAC rosette test (B lymphocytes bind immunological complexes through a surface receptor for the third component of the complement); test for the presence of immunoglobulins on the surface of B lymphocytes. Within the same group of patients the degree of blastic transformation of lymphocytes after stimulation by PHA was also evaluated.

The techniques for the study of surface markers of lymphocytes had been reported in detail previously (Płużańska et al., 1976) and were in agreement with the indication of the WHO Report (Aiuti et al., 1974).

Lymphocytes were obtained by density gradient centrifugation in a Ficoll-isopaque mixture. E rosettes were evaluated after 18 hours of incubation at 4°C. The results were expressed as percentage of E and EAC rosettes and S Ig⁺ in the total population of lymphocytes. In relation to leukocytosis and white cell pattern the probable absolute number of lymphocytes producing E and EAC rosettes and S Ig+ in 1 mm³ blood was also evaluated (,,probable absolute number of lymphocytes" for we assumed, that there was similar loss in T and B lymphocytes during density gradient centrifugation).

The remaining blood samples were used for three days culturing of lymphocytes stimulated by PHA. Bacto-Phytohemaglutynin M (Difco) was added in a dose of 0.15 ml per 10 ml of culture medium containing 1×10^6 lymphocytes in 1 ml. Such a dose was found in our laboratory to be the smallest optimal dose to induce maximum transformation of lymphocytes from healthy patients. The technique of lymphocyte culturing was reported earlier (Płużańska, 1972). In the evaluation of lymphocyte blastic transformation, morphological criteria were considered and the percentage of cells that underwent trans-

Immunopathology of patients with brain tumors

Nr 1

formation within the total amount of lymphocytes was given as a blastic index (BI).

The results of an examination of 35 healthy persons, in a similar range of age, was served as control.

Blood for examination was taken one day before the surgery. The operative material was fixed in 4% neutral formaldehyde solution and stained according to routine neuropathological methods.

The results were analyzed statistically by means of the median test in the studies of serum proteins and the Student test in the examination of lymphocytes.

RESULTS

The histopathological diagnose of all examined cases are presented in Table 1. There were mostly glial tumors (25 cases). The results of all examinations of 7 patients with metastatic carcinoma and 1 pa-

Table 1. Serum proteins and lymphocytes examinations in peripheral blood of patients with brain tumors with different histological diagnosis

Tabela 1. Białka i limfocyty krwi obwodowej u chorych z guzami mózgu oraz rozpoznanie histopatologiczne

Histopathological diagnosis Rozpoznanie histopatologiczne	Number of cases with serum proteins examina- tion Liczba chorych z wyko- nanymi badaniami bia- łek surowicy	Number of patients with lymphocytes examination Liczba chorych z wyko- nanymi badaniami lim- focytów
		Lin Strates
Astrocytoma	4	and the second state of the second
Astrocytoma anaplasticum	ð	19
Oligodendroglioma	1	insta
Oligo-astrocytoma	1	man 20 " Well and
Oligodendroglioma anaplasticum	1	Burn the second second second
Ependymoma	2	1
Ependymoma anaplasticum	1	1
Glioblastoma multiforme	10*)	2
Meningioma	7 7	3
Adenomá hypophysis	3	. T
Lymphoma malignum lymphoplasmo	nides 1 1	ality of a straight
Carcinoma metastaticum	7	5 5 1 Hair
Number of cases	43	23
Liczba przypadków		
Number of examinations	45	23
Liczba badań	201 25 1 93591	- JUL (1997, 1987 / 858
Children De la construction de l		

*) — two cases were investigated twice: before first surgery and before reoperation dwa przypadki badano dwukrotnie: przed operacją i przed reoperacją

tient with primary lymphoma of the brain were in compatibility with the range of the results of the other 35 patients. Because these values have no essential influence on the average data (i.e. median, arithmetical mean, and standard deviation) the results of all 45 examination are discussed together.

Table 2. Some proteins in the blood serum of 43 patients with tumors of brain and 35 healthy persons

Tabela 2. Niektóre białka surowicy krwi u 43 chorych z guzami mózgu i 35 zdrowych osób

Test		ain tumois pa z guzam	atients — i mózgu	- chorzy	Healthy persons — ludzie zdrowi				
Rodzaj badania	n	range zakres	- x	SD	n	range zakres	x	SD	
Protein (total) g/l	45	61,2-81,0	71,40	4,83	35	62-79,5	72,90	5,31	
Albumin g/l	45	28,3-48,0	38,63	4,58	35	33,1-46,7	41,27	2,93	
Globulin alfa ₁ g/l	45	2,5-4,8	3,63	0,61	35	2,0-4,4	3,35	0,35	
Globulin alfa ₂ g/l	45	4,8-12,2	6,95	1,58	35	4,6-9,5	6,09	1,14	
Globulin beta g/l	45	6,7-12,7	8,57	1,20	35	5,7-11,8	8,03	1,47	
Globulin gamma g/l	45	9,7-17,8	13,65	1,87	35	8,3-18,2	13,10	2,6	
Immunoglobulin G IU	45	82,4-323,6	162,0	37,49	27	89,4-232,2	150,6	38,87	
Immunoglobulin A IU	45	65,6-286,0	152,8	44,84	19	51,4-232,2	107,8	57,36	
Immunoglobulin M IU	45	71,3-348,6	175,4	80,08	27	72,1-340,0	184,9	67,06	
Haptoglobin g/l	45	0,40-2,40	1,33	0,51	28	0,35 - 1,65	0,80	0,31	
Ceruloplasmin IU	19	28,5-86,0	58,20	15,49	18	33,0-74,6	51,20	13,12	

x — average value

x — wartość średnia

- SD standard deviation
- SD odchylenie standardowe

n — number of examinations

n — liczba badań

The results of quantitative determination of serum proteins are presented in Table 2. Total protein concentration in all 45 samples was normal and did not differ from that in the control group (p>0.7). Similarly, paper strip electrophoresis did not show any significant deviations when compared to generally accepted standards of proteinograms. Only in 1 patients (with anaplastic astrocytoma) slight hypoalbuminemia and in 3 patients (2 with glioblastomas and 1 with hypophyseal adenoma) the increase of $alfa_2$ -globulins was observed. There were no differences in the fractions in comparison to the control group (p>0.3) except for $alfa_2$ -globulins which were significantly higher in the group of brain tumor patients (0.02>p>0.01).

Immunopathology of patients with brain tumors

Nr 1

Immunoelectrophoresis in agar revealed an increased level of at least one protein fraction in 15 out of 43 patients. In 5 cases this concerned $alpha_1$ -glycoprotein, in 2 cases orosomucoid, in 10 cases haptoglobin, in 10 cases ceruloplasmin, in 1 case immunoglobulin G (IgG), and in 1 case immunoglobulin M (IgM). The increase of immunoglobulins in the above mentioned patients was proved by the immunodiffusion method; slightly raised levels of IgG (323.6 IU in case of anaplastic astrocytoma) and IgM (348.6 IU in case of ependymoma) were observed. In other 43 examinations the level of three main classes of immunoglobulins was within the range of accepted norm; there were no statistically significant differences between immunoglobulin concentration in the serum of tumor patients and control group (p \geq 0.05).

Qualitative changes in the saturation of haptoglobin arches in immunoelectrophoresis were in all cases supported by enzymatic studies. In 10 patients the serum haptoglobin level was above the limits generally accepted for this method. The results of the whole group of patients were statistically different from those obtained in control group (0.02>p>0.01).

There was no statistical difference in the level of ceruloplasmin in 19 tumor patients as compared to 18 healthy persons evaluated by the use of the enzymatic method (p>0.5). Only in 2 brain tumor patients the ceruloplasmin activity was higher than normal for this method. Among 10 patients with immunoelectrophoretically evaluated changes within the ceruloplasmin arch, enzymatic examination of this protein was performed only in 3 cases: in 2 cases the results supported those obtained by qualitative examination, in the third one the ceruloplasmin activity was within the norm range.

The percentage and the absolute number of T and B lymphocytes in 1 ml peripheral blood (identified by E and EAC rosette tests and by the presence of surface immunoglobulins) is presented in Table 3. The results in 23 brain tumor patients do not differ from those in healthy persons (p>0.1).

The results of lymphocyte blastic transformation after stimulation by PHA in 3 day cultures of blood cells are presented in Table 4. The degree of lymphocytes transformation from brain tumor patients showed statistically significant difference as compared to the control group (p ≤ 0.001).

DISCUSSION

Several nonspecific factors as well as direct and indirect specific effectors of immunological reactions are known to influence the course of the neoplastic process (Hudson et al., 1974; Mahaley et al., 1977).

143

E. Polkowska-Kulesza et al.

Table 3. E rosettes, EAC rosettes and surface Ig (S Ig⁺) of lymphocytes in peripheral blood of 23 patients with brain tumors and 35 healthy persons

Tabela 3. Rozety E, EAC i powierzchniowe Ig limfocytów (komórki S Ig⁺) we krwi obwodowej 23 chorych z guzami mózgu i 35 zdrowych osób

		Brain tumo z g	rs patients guzami mé	s — chorzy ózgu	Healthy persons — ludzie zdrowi			
Kind of Rodza	measurement j pomiaru	E rosettes rozety E	EAC rosettes rozety EAC	SIg+ cells limfocyty Ig+	E rosettes 10zety E	EAC rosettes rozety EAC	SIg+ cells limfocyty Ig+	
%	range zakres x SD	55—78 65,5 7,4	6-21 16,5 3,87	16-21 18,5 2,17	52—78 66,2 7,9	13—25 17,4 2,9	15—26 19,3 3,0	
number in 1 mm ³ liczba w	range zakres x	689—1560 1102 285,6	74 <u>4</u> 54 283,5 60,6	166—410 309 72,0	632—2120 1184 416	183—560 303 98	212—646 336 125	
1 mm	SD							

Table 4. The degree of blastic transformation of lymphocytes stimulated by PHA in peripheral blood of 23 patients with brain tumors and 35 healthy persons

Tabela 4. Stopień transformacji blastycznej limfocytów pobudzonych PHA we krwi obwodowej 23 chorych z guzami mózgu i 35 zdrowych osób

Lymphocytes transformation Transformacja limfocytów	Patients Chorzy	Healthy persons Ludzie zdrowi
the results a pperiod to see the set	12 2 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 2 1 1 1 1 1	and the second second
Range — zakres	14-72	63—82
x	57,3	72,5
SD TO TO TO TO TO	18,8	4,7

Maximal engagement of T and B effector cells at different stages of the development of neoplastic process and, when added, humoral blocking factors, may paradoxically enhance tumor growth and dissemination (Oda, 1974). On the other hand, it is known that the growing tumor itself may stimulate the changes of some proteins not engaged in immunological processes (Hollinshead et al., 1977; Küstner et al., 1976). Specific anatomical relations within cranial cavity have an evident influence on the result of the interactions between specific and nonspecific factors, the host immunity and the biological properties of tumor. Thus it seems interesting to compare the morphological pattern of tumor with the predicted systemic indicators of neoplastic processes.

144
We did not find any essential differences from generally accepted norms in the serum protein studies, performed in 43 patients with different brain tumors. Only slight hypoalbuminemia in one case and hyperalpha₂-globulinemia in three cases were observed. This may suggest a connection with neoplastic disease. Other fractions, except alpha₂-globulin did not differ from control. Since the level of alpha₂--globulins was in a majority of tumors patients close to the upper limit of the norm, therefore the means of both examined groups differed significantly. According to Küstner et al. (1976) and to Lee (1977) hyperalpha2-globulinemia and then the increase of alpha1-globulin and the decrease of algumins level are than most characteristic protein changes in the course of the neoplastic disease. Together with alpha-globulins a number of other proteins migrate which seem to be non-specifically stimulated by the neoplastic process. These are: polypeptide which inhibits lymphocytes reaction (Glasgow et al., 1974; Lee, 1977) and glycoproteins, among which there are alpha1-glycoprotein and orosomucoid (alpha1-acid-glycoprotein) (Bogdanikowa, Murawski, 1968), haptoglobin (Owen et al., 1960; Shim, 1976) and ceruloplasmin (Shifrine, Fisher, 1976). In our opinion the increase of the average level of alpha₂-globulins in our patients is due to the increase of some of these factors. Immunoelectrophoretically we showed the increase of at least one of these factors in 15 out of 43 patients, The increase above norm of haptoglobin in 10 patients was especially characteristic. This was supported by the enzymatic examination in which statistically significant differences in comparison to control group were emphasized. Link and Tibbling (1977) claim that in different organic brain diseases the increase of serum haptoglobin is the most characteristic among the protein changes, apart from the increase of serum lgG. Besides, we noted an increase of the ceruloplasmin level in 10 patients.

The mediators of inflammatory process and the release of proteolytic enzyme (Bogdanikowa, Murawski, 1968; Shim, 1976) e.i. exudative and necrotic processes within the tumor and surrounding tissue are thought to stimulate the synthesis of ceruloplasmin and haptoglobin as well as other glycoproteins. So the increase of so-called acute phase reactans indicates secondary changes within the neoplasm. Our findings support this view. In majority of cases with necrosis within tumor tissue the increase of one or more serum proteins, indicators of inflammatory process, was found. Most frequently it was the increase of haptoglobin.

We found no essential changes which could indicate specific host humoral responses against growing tumor. No abnormal level of three Neuropatologia Polska -10

main classes of immunoglobulin in the serum of 41 out of 43 patients was observed. Only in 1 case IgG level and in 1 case IgM level were slightly elevated: the first case concerned anaplastic astrocytoma with marked edema and intense lymphocytic and microglial infiltrates in the tumor periphery; the second case concerned ependymoma without inflammatory response. Our observations are in agreement with Mahaley's et al. (1977) opinion that there is no abnormality in IgG and IgA in glioma patients; but on the basis of 12 examinations performed in 10 patients, we are unable to support their observation about the increase of IgM in cases of glioblastoma. On the other hand we did not find any decrease of IgG or IgM which was demonstrated by Monari et al. (1978).

In different neoplasms, among others in brain tumors, the failure of cellular immunity was described on the basis of in vivo studies (Brooks et al., 1976; Young et al., 1976; Mahaley et al., 1977). Immunological disturbances may be connected with the diminution of the number of T lymphocytes, with functional disturbances of these cells, or with both these factors. In our studies we observed changes neither in the total number of lymphocytes nor in the percentage and number of T and B lymphocytes in 1 ml blood of brain tumor patients in comparison to the results obtained in the control group. There are different opinions about the number of T lymphocytes in the blood of patients with different tumors. Wybran and Fudenberg (1973), Nemoto et al. (1974), and Płużańska et al. (1977), described normal proportion and number of T and B lymphocytes in carcinoma patients, whereas Dellon et al. (1975) and Gross et al. (1975) observed decrease of T lymphocytes in blood of similar patients. Brooks et al. (1976), by the use of E rosette test, examined T lymphocytes of brain tumor patients and found decreased number of these lymphocytes. In our studies proportion of T and B lymphocytes in the blood of brain tumor patients was normal, but some failure of blastic transformation of lymphocytes after PHA stimulation was observed. This is compatible with the results of Brooks et al. (1976) and Young et al. (1976). Although the relationship between blastic transformation of lymphocytes and their ability to react in different immunological processes (effectors, helper and suppresor blood cells) has not been yet established, the opinion that evaluation of blastic transformation under the influence of mitogens gives insight into the lymphocyte reaction in cellular immunity (Waksman, 1972; Daguillard, 1972) is still a predominant one. Therefore we can assume that the failure in lymphocyte function without changes in the quantity of these cells may be responsible for cellular immunity disturbances in brain tumor patients.

More frequently the decrease of ability of blastic transformation of lymphocytes after PHA stimulation concerned patients with more anaplastic tumors (anaplastic astrocytoma and glioblastoma).

The results of our studies concerning the level of immunoglobulins and so-called tests of acute phase seem to show the participation of inflammatory mechanisms in the course of brain tumors. The decrease of blastic transformation of lymphocytes after PHA stimulation, found in these patients, supports the opinion of other authors (Albright et al., 1977) about the participation of immunological mechanisms in the initiation and course of development of brain tumors.

E. Polkowska-Kulesza, A. Płużańska, J. Alwasiak, M. Mikuta, T. Robak, Z. Węgrzyn, R. Maculewicz

IMMUNOGLOBULINY I INNE BIAŁKA SUROWICY, LIMFOCYTY T I B ORAZ STOPIEŃ TRANSFORMACJI BLASTYCZNEJ LIMFOCYTÓW PO STYMULACJI PHA U CHORYCH Z GUZAMI MÓZGU

Streszczenie

W celu scharakteryzowania niektórych biologicznych właściwości guzów mózgu, badano zmiany w białkach surowicy u 43 chorych z różnymi nowotworami mózgu oraz zmiany w obrębie limfocytów krwi obwodowej u 23 chorych.

Z wyjątkiem wzrostu poziomu alfa₂-globulin nie stwierdzono zmian poziomu białka całkowitego ani innych przesunięć w proteinogramie, jak również w trzech głównych klasach immunoglobulin: IgG, IgA, IgM. Charakterystyczny był tylko wzrost reaktantów ostrej fazy tj. alfa₁-glikoproteidu, orozomukoidu, ceruloplazminy, a zwłaszcza haptoglobiny. Proporcje i absolutna liczba limfocytów T (oznaczonych testem rozet E) i limfocytów B (oznaczonych testem rozet EAC oraz za pomocą wykazania immunoglobulin powierzchniowych) były prawidłowe. Natomiast transformacja blastyczna limfocytów stymulowanych PHA była znamiennie upośledzona.

Postuluje się udział procesów zapalnych i immunologicznych w przebiegu guzów mózgu.

Е. Польковска-Кулеша, А. Плужаньска, Я. Альвасяк, М. Микута, Т. Робак, З. Венгжин, Р. Мацулевич

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, ДРУГИЕ СЫВОРОТОЧНЫЕ БЕЛКИ, ЛИМФОЦИТЫ Ти В, СТЕПЕНЬ БЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ СТИМУЛИРОВАНИЯ РНА У БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ МОЗГА

Резюме

Целью работы была характеристика некоторых свойств опухолей мозга. Исследовано изменения сывороточных белков у 43 больных и изменения лимфоцитов в периферической крови у 23 больных.

За исключением повышения уровня α_2 -глобулинов не констатировано изменений уровня общего белка и других смещений протеинограма, а также изменений в главных классах иммуноглобулинов: IgG, IgA и IgM. Обнаружено характеристические увеличение реактантов острой фазы: α_1 -гликопротеида, орозомукоида, церулоплазмина, и особенно гаптоглобина. Пропорции и абсолютное число лимфоцитов Т (определяных тестом розеток E) и лимфоцитов Б (определяных тестом розеток E) и лимфоцитов С (определяных тестом розеток E) и лимфоцитов С (определяных тестом розеток E) и лимфоцитов С (определяных тестом розеток E) и лимфоцитов Б (определяных иммуно-

Авторы предполагают участие воспалительных и иммунологичесчих процессов в течении опухолей мозга.

PIŚMIENNICTWO

- Aiuti F., Cerottini J. C., Coombs R. R. A., Cooper M., Dickler H. B., Frøland S. S., Fudenberg H. H., Greaves M. F., Grey H. M., Kunkel H. G., Natvig L. D. Draud'hamma, L. L. Paballina, F. Bitta, P. F. Baura, D. S. Saligmann, S
- J. B., Preud'homme J. L., Rabellino E., Ritts R. E., Rowe D. S., Seligmann M., Siegal F. P., Stjernswärd J., Terry W. D., Wybran J.: Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Scand. J. Immunol. 1974, 3, 521-526.
- Bogdanikowa B., Murawski K.: Rozpoznawanie zmian w białkach krwi. PZWL, Warszawa 1968.
- Brooks W. H., Roszman T. L., Rogers A. S.: Impairment of rosette-forming T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. Cancer 1976, 37, 1869—1873.
- 5. Daguillard F.: Immunologic significance of in vitro lymphocyte responses. Med. Clin. N. Amer. 1972, 56, 293-303.
- 6. Dellon A. L., Potvin C., Chretien P. B.: Thymus dependent lymphocyte levels in bronchogenic carcinoma — correlation with histology, clinical stage, and clinical course after surgical treatment. Cancer 1975, 35, 687—694.
- Dmochowska M., Polkowska-Kulesza E.: Behavior of immunoglobulins and some natural and acquired antibodies in chronic lymphatic leukaemia. Acta Med. Pol. 1966, 7, 185—190.
- Glasgow A. H., Nimberg R. B., Menzoian J. O., Saporoschetz I., Cooperband S. R., Schmid K., Mannick J. A.: Association of anergy with an immunosuppresive peptide fraction in the serum of patients with cancer. New Eng. J. Med. 1974, 291, 1263—1267.
- Gross R. L., Latty A., Williams E. A., Newborne P. M.: Abnormal spontaneous rosette formation and rosette inhibition in lung carcinoma. N. Eng. J. Med., 1975, 292, 439-443.
- Hollinshead A. C., Chuang Ch.-Y., Cooper E. H., Catalona W. J.: Interrelationship of prealbumin and alfa₁-acid glycoprotein in cancer patient sera. Cancer 1977, 40, 2993—2998.
- Hudson M. J. K., Humphrey L. J., Mantz F. A., Morse P. A.: Correlation of circulating serum antibody to the histologic findings in breast cancer. Am. J. Surg. 1974, 128, 756-762.

148

- Küstner W., Bernhard S., Lützen Ch., Ritter U.: Kombinatzionen unspezifischer Laboruntersuchungen in der Tumordiagnostic. Med. Klin. 1976, 71, 323—332.
- 13. Lee Y. N.: Quantitative change of serum protein and immunoglobulin in patients with solid cancers. J. Surg. Oncol., 1977, 9, 179–187,
- 14. Link H., Tibbling G.: Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1977, 37, 391-396.
- 15. Mahaley M. S., Brooks W. H., Roszman T. L., Bigner D. D., Dudka L., Richardson S.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part I: Studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. J. Neurosurg. 1977, 46, 467-476.
- 16. Monari M., Galvez S., Fracas A.: Cerebrospinal fluid and serum immunoglobulins and C_3 levels in 30 intracranial tumors. Neurocirugia 1978, 36, 75-82.
- Nemoto T., Han T., Minowada J., Angleur V., Chamberlain A., Doo T. L.: Cell-mediated immune status of breast cancer patients evaluation by skin tests, lymphocyte stimulation and counts of rosette-forming cells. J. Nat. Cancer Inst. 1974, 53, 641-645.
- Oda Y.: Studies on cellular immunity of brain tumors: glial carcinofetal antigens and serum blocking factors in gliomas. Arch. Jap. Chir. 1974, 43, 111-123.
- 19. Owen J. A., Better F. C., Hoban J.: A simple method for the determination of serum haptoglobins. J. Clin. Path. 1960, 13, 163-164.
- 20. Płużańska A.: Blastic transformation of lymphocytes in culture as a test evaluating the immunological state of patients with cancer. Pol. Med. J. 1972, 11, 509-513.
- Płużańska A., Mazurowa A., Robak T.: Limfocyty T i B we krwi obwodowej ludzi z usuniętą śledzioną. Acta Haemat. Pol. 1976, 7, 13—21.
- Płużańska A., Robak T., Bartuzel T., Kuchowicz W., Szadowska A., Mazurowa A.: Limfocyty T i B we krwi obwodowej kobiet chorych na raka szyj-ki macicy. Gin. Pol. 1977, 48, 369—373.
- Rice E. V., Wagman E., Takenaka Y.: Ceruloplasmin assay in serum. In: Standard methods of clinical chemistry, v. 4. Ed.: Seligson D., Academic Press, New York 1963, p. 57.
- 24. Shifrine M., Fisher G. L.: Ceruloplasmin levels in sera from human patients with osteosarcoma. Cancer 1976, 38, 244-248.
- 25. Shim B. S.: Increase in serum haptoglobin stimulated by prostaglandins. Nature 1976, 256, 326—327.
- Waksman B. M.: Measurement of cell-mediated immunity. N. Eng. J. Med. 1972, 286, 431–432.
- 27. Wybran J., Fudenberg H. H.: Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. J. Clin. Invest. 1973, 52, 1026.
- 28. Young H. F., Sakalas R., Kaplan A. M.: Inhibition of cell-mediated immunity in patients with brain tumors. Surg. Neurol., 1976, 5, 19-23.

Authors address: IInd Department of Internal Medicine, Medical Academy, 62 Pabianicka str., 93-513 Łódź

Dwie równorzędne pierwsze nagrody za najlepsze publikacje:

— dr med. Danuta Markiewicz z Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie, za pracę pt. "Neuropathology of poliomyelitis anterior acuta in children with defective immunological reactions" (doniesienie przygotowane wspólnie z lek. med. B. Schmidt-Sidor i dr med. M. Czachorowską).

Praca została opublikowana w materiałach Sympozjum Niemieckiego Towarzystwa Neuroanatomów i Neuropatologów, które odbyło się 15 wrzełnia 1979 r. w Essen (RFN).

Drugą nagrodę za najlepsze doniesienie na posiedzeniu SNP:

-- dr med. Piotr Kozłowski z Pracowni Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN w Warszawie, za pracę pt. "Ogniskowe uszkodzenie mózgu noworodka a zespół wykrzepiania śródnaczyniowego", przedstawioną w dniu 27.X.79 r.

Jerzy Dymecki

PRZEMYSŁAW NOWACKI

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY WIEKIEM KRWIAKA PODTWARDÓWKOWEGO A OBRAZEM MORFOLOGICZNYM JEGO TOREBKI

Pracownia Neuropatologii Kliniki Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów PAM w Szczecinie Kierownik Pracowni: doc. dr J. Kulczycki

Nagromadzenie krwi w przestrzeni podtwardówkowej nosi od dawna nazwę krwiaka podtwardówkowego (Virchow 1857; Trotter 1914; Putnam, Cushing 1925; Peters 1970).

Od czasu badań Trottera, większość autorów uważa, że najczęstszą przyczyną krwiaka podtwardówkowego jest uraz głowy; stąd wiek krwiaka równy jest zwykle okresowi, który upłynął od chwili tego urazu. Niejednokrotnie pacjent jednak nie pamięta przebytego urazu albo wręcz go neguje (Lavy, Herishianu 1969; Castleman 1972; Schmitt 1975). Częste są też przypadki, w których chory czuje się przez długi czas po urazie dobrze, a dopiero później jego stan ulega pogorszeniu (Lindenberg 1971; Jamieson, Yelland 1972). Wreszcie część pacjentów podaje w wywiadzie wielokrotny uraz, nierzadko w ciągu krótkiego czasu. Zdarzają się również przypadki nierozpoznanych przyżyciowo krwiaków, które stały się przyczyną zgonu chorego. Jak z powyższego wynika, ustalenie wieku krwiaka na podstawie danych o przebytym urazie jest często bardzo trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe. Dlatego też należałoby poszukać innego rozwiązania dla określenia wieku krwi wynaczynionej pod twardówkę. Duże znaczenie praktyczne miałoby przeprowadzenie korelacji między niektórymi danymi klinicznymi, a obrazem histopatologicznym krwiaka. Wydaje się, że największa zależność istnieje między wiekiem krwiaka podtwardówkowego, a stopniem jego organizacji. Krew w przestrzeni podtwardówkowej wywołuje szereg reakcji miejscowych, w wyniku czego powstaje torebka zbudowana z tkanki łącznej, oddzielająca masy krwiaka od

twardówki (Parkinson, Chochinov 1960; Christensen, Husby 1963; Decker, Jacobs 1974). Torebka ta mogłaby się okazać najodpowiedniejszym materiałem dla oceny wieku krwiaka, przy założeniu, że podlega ona charakterystycznym zmianom w miarę starzenia się wynaczynienia. W dostępnym piśmiennictwie napotkano na próby oceny morfologii torebki; dotyczyły one jednak tylko niektórych składników występujących w jej utkaniu. W kilku zaledwie przypadkach opisane były ogólnie zmiany, jakim te składniki podlegają w miarę starzenia się krwiaka (Friede 1971; Watanabe i wsp. 1972; Sato, Suzuki 1975). Celowe wydaje się więc podjęcie próby wnikliwszej oceny składników wchodzących w utkanie torebki, jak i przemian, którym one podlegaja w miare upływu czasu. Ze względu na podkreślany przez niektórych autorów (Sato, Suzuki 1975) duży udział naczyń w procesie organizacji mas krwotocznych, na uwagę zasługuje także i ten element budowy torebki. Ocena morfologiczna krwiaka może być przydatna nie tylko dla ustalenia jego wieku; badania torebki moga rzucić światło na mechanizm powiększania objętości krwiaka.

Wymienione w tym rozdziale trudności w ocenie wieku krwiaka podtwardówkowego i mechanizmu wzrostu jego objętości, były bodźcem do podjęcia niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Przebadano 29 torebek krwiaków podtwardówkowych, pobranych podczas zabiegu operacyjnego w Klinice Neurochirurgii PAM w Szczecinie w latach 1968—1976 u osób obojga płci w wieku od 8 miesięcy do 78 lat. Osobników płci męskiej było 20, żeńskiej 9. Torebki po ocenie makrosko-

Ryc. 1. Skupiska granulocytów obojętnochłonnych i komórek limfoidalnych w masach krwotocznych. Widoczne są także pasma włóknika. Fiolet krezylu. Pow. 280 ×. Fig. 1. Accumulations of neutrophilic granulocytes and lymphoidal cells in hemorrhagic masses. Fibrin bands. Cresyl violet. \times 280.

Ryc. 2. Delikatna torebka krwiaka 8-dniowego z przewagą fibroblastów. Brak naczyń. H-E. Pow. 60 $\times.$

Fig. 2. Delicate capsule of 8-day hematoma with predominance of fibroblasts. Absence of vessels. H-E. \times 60.

Ryc.3. Bogatokomórkowa torebka krwiaka 12-dniowego z pojedynczymi naczyniami włosowatymi. Fiolet krezylu. Pow. 60 $\times.$

Fig. 3. Rich-cellular capsule of 12-day hematoma with single capillary vessels. Cresyl violet. \times 60.

Ryc.4. Bogatokomórkowa torebka krwiaka 22-dniowego z wyraźnym podziałem na warstwy: zbitą, naczyniową (z naczyniami zatokowatymi) i luźną. Fielet krezylu. Pow. 60 $\times.$

Fig. 4. Rich-cellular capsule of 22-day hematoma with a distinct division into layers: compact, vascular (with sinusoidal vessels) and loose. Cresyl violet. \times 60.



while cancel a situated elerw

powej utrwalano w 8% roztworze formaliny, zatapiano w parafinie, a następnie skrawano na mikrotomie w przekroju poprzecznym i barwiono: hematoksylina-eozyna (H-E), fioletem krezylu (F.K.) oraz metodami Van Gieson i Weigerta. Badaniom poddano jedynie te przypadki, w których można było określić początek choroby, to znaczy uraz poprzedzający wystąpienie objawów neurologicznych. W celu dokładniejszej oceny wieku zmian, jakim podlegają torebki krwiaków, podzielono otrzymany do badania materiał na grupy, w zależności od czasu, który upłynął od chwili urazu do dnia operacji: grupa I 1-5 dni, grupa II 6-15 dni, grupa III 16-30 dni, grupa IV 31-50 dni, grupa V 51-70 dni, grupa VI ponad 70 dni. Na podstawie budowy morfologicznej wyróżniono w torebkach krwiaków 3 warstwy: zewnętrzną (zbitą), środkową (naczyniową), wewnętrzną (luźną). Dokonano pomiarów warstw torebki, ścian naczyń i ich kalibru. Każda warstwę torebki mierzono 10-krotnie w różnych miejscach i obliczano średnią arytmetyczną; grubość ścian i kaliber naczyń mierzono 3-krotnie, również ustalając średnią arytmetyczną. Ocenę materiału konfrontowano z danymi otrzymanymi z historii cho-

rób, protokołów operacyjnych lub bezpośrednio od pacjentów.

WYNIKI

Oceniając dynamikę zmian zachodzących w utkaniu torebki i zawartości krwiaka podtwardówkowego w przebiegu jego starzenia się, uzyskano następujące wyniki:

- Ryc. 5. Komórkowo-włóknista (pozorne rozrzedzenie utkania) torebka krwiaka 30-dniowego z licznymi średnimi i dużymi naczyniami zatokowatymi oraz drobnymi żyłami. Fiolet krezylu. Pow. 60 ×.
- Fig. 5. Cellular-fibrillary (apparent rarefaction of the texture) capsule of 30-day hematoma with numerous medium-size and large sinusoidal vessels and small veins. Cresyl violet. \times 60.
- Ryc.6. Gruba torebka krwiaka 45-dniowego. Włókniste utkanie warstwy zbitej i części zewnętrznej warstwy naczyniowej. Duże naczynia zatokowate w utkaniu całej torebki. H-E. Pow. 60 $\times.$
- Fig. 6. Thick capsule of 45-day hematoma. Fibrillary texture of compact layer and the outer part of vascular layer. Large sinusoidal vessels in the whole capsule texture. H-E. \times 60.
- Ryc.7. Włóknista torebka krwiaka ok. 60-dniowego z licznymi dużymi naczyniami zatokowatymi. Fiolet krezylu. Pow. 60 $\times.$
- Fig. 7. Fibrillary capsule of about 60-day hematoma with numerous, large sinusoidal vessels. Cresyl violet. \times 60.
- Ryc. 8. Torebka krwiaka 70-dniowego. Widoczne duże, grubościenne naczynia żylne w pobliżu powierzchni zewnętrznej; poza tym liczne żyły w utkaniu całej torebki. Fiolet krezylu. Pow. 60 \times .
- Fig. 8. Capsule of 70-day hematoma. Large thick-walled veins reins in the vicinity of the outer surface. Numerous veins in the whole capsule texture. Cresyl violet. $\times 60$.



P. Nowacki

Torebka krwiaka (dane ogólne)

W grupie I w żadnym z przebadanych przypadków nie udało się znaleźć typowej dla krwiaka torebki, choć miejscami obserwowano początkowe stadia organizacji wynaczynienia (ryc. 1). Począwszy od grupy II spotykano wyraźną torebkę podlegającą przemianom w miarę starzenia się krwiaka. Przypadki zawarte w grupie II i III posiadały torebkę bogatokomórkową z niewielką ilością włókien łącznotkankowych (ryc. 2, 3, 4). W grupie V i VI posiadała ona już wyraźnie charakter mieszany, komórkowo-włóknisty, przy czym włókna znajdowały się głównie w warstwie zewnętrznej. W miarę starzenia się krwiaka ilość włókien wzrastała. Wzrost ten postępował od warstwy zbitej w głąb torebki (ryc. 5, 6, 7, 8, 9, 10). Niekiedy włókna układały się równolegle, co nadawało torebce charakter utkania zbliżony do opony twardej.

Szerokość warstw torebki (wykres 1)

1. Warstwa zbita (zewnętrzna) — szerokość jej nie podlegała większym wahaniom w miarę starzenia się krwiaka. Malała jedynie w przypadkach najstarszych (ponad 70 dni).

2. Warstwa naczyniowa (środkowa) — szerokość tej warstwy niemal równolegle wzrastała z wiekiem krwiaka, przekraczając w przypadkach najstarszych kilkakrotnie wymiary warstwy luźnej i kilkanaście razy warstwy zbitej.

Ryc.9. Torebka krwiaka ok. 90-dniowego. Wyraźnie włóknisty charakter utkania części zewnętrznej (górna część ryciny). Widoczne duże naczynie żylne i zatokowate. Fiolet krezylu. Pow. 60 $\times.$

Fig. 9. Capsule of about 90-day hematoma. Clearly fibrous character of the texture of outer surface (upper part of the figure). Large vein and sinusoidal vessel. Cresyl violet. \times 60.

Ryc. 10. Torebka krwiaka ok. 150-dniowego. Podział na część włóknistą zewnętrzną i bogatokomórkową wewnętrzną. Duże naczynie żylne w części włóknistej. Fiolet krezyłu. Pow. 60 \times .

Fig. 10. Capsule of about 90-day hematoma. Division into the outer fibrillary and inner rich-cellular layers. Large vein in the fibrillary part. Cresyl violet. \times 60.

Ryc. 11. 12. Granulocyty kwasochlonne w utkaniu torebki krwiaka podtwardówkowego, H-E. Pow. imersyjne.

Figs. 11. 12. Acidophilic granulocytes in the texture of subdural hematoma capsule. H-E. Immersion.

Ryc. 13. Ognisko krwotoczne w utkaniu torebki w stadium proliferacji fibroblastów i rozbiórki makrofagów. H-E. Pow. $60 \times$.

Fig. 13. Hemorrhagic focus in the capsule texture in the stage of fibroblast proliferation and macrophagic degradation. H-E. \times 60.



3. Warstwa luźna (wewnętrzna) — jej szerokość wzrastała w miernym stopniu, osiągając największe wartości w grupie IV, potem spadała jednak dość wyraźnie, lecz nie poniżej rozmiarów w grupie II i III.





Diagram 1. Changes in the maximum width of capsule layers in the course of aging of hematoma.

Elementy komórkowe torebki

Komórkami leżącymi w podścielisku torebki były głównie fibroblasty, fibrocyty, komórki limfoidalne i makrofagi. Fibroblasty obserwowano już w grupie I. Obecne one były we wszystkich pozostałych grupach, zwykle równomiernie usiane w podłożu, zaś w grupie V i VI głównie w warstwie naczyniowej i luźnej. W przypadkach grupy III pojawiały się w warstwie zbitej fibrocyty. Stopniowo ich ilość wzrastała, tak, że w grupie V i VI obserwowano je w warstwie zbitej i zewnętrznej części warstwy naczyniowej. Ilość pozostałych komórek wymienionych wyżej podlegała podobnym wahaniom jak fibroblastów; tych ostatnich było jednak zawsze najwięcej. Makrofagi obładowane hemosyderyną, a od grupy III także hematoidyną, nie podlegały większym zmianom w miarę starzenia się krwiaka.

Nr 1

Nr 1

Tabela 1. Korelacje między wiekiem krwiaka a typem i wielkością naczyń w jego torebce. Table 1. Correlation between the age of hematoma and the type and size of vessels in its capsule

Wiek krwiaka (dni) Age of	Liczba przy- padków	Typ naczyń Type of	Maksymalna średnica naczyń Maximum	Średnica najczęściej spotykanych naczyń	Grubość ściany naczynia Vessel	Najczęściej spotykana lokalizacja naczyń w warstwach:
hematoma (days)	No of cases	vessels	vessel diameter	Most frequent diameter	wall thickness	Most frequent location of vessels in layers
15	3		brak na	czyń — abser	ce of vessel	8
6—15	7	zatokowate sinusoidal	35 μ	15—20 μ 25—35 μ		П П
16—30	10	zatokowate sinusoidal	70 µ	2030 μ 4560 μ		I, II, III II>I
		żylne venous	40 µ	15—20 μ 30—40 μ	5—8 μ 8—10 μ	II>1 II
3150	3	zatokowate sinusoidal	70 µ	25—30 μ 50—60 μ		I, II, III II>I
		żylne venous	60 µ	25—30 μ 40—60 μ	10—15 μ 10—15 μ	II>I II
51—70	3	zatokowate sinusoidal	70 µ	25—35 μ 50—70 μ		III>I>III II>I
		żylne venous	70 µ	20—30 μ 50—60 μ	10—12 μ 15—20 μ	II>I II>I
ponad 70 above	3	zatokowate sinusoidal	75 µ	30—40 μ 60—70 μ		I, II, III II, III
		żylne venous	100 µ	40—60 μ 70—90 μ	15—20 μ 20—25 μ	II>I>III II>I

Na szczególną uwagę zasługuje obecność granulocytów kwasochłonnych w utkaniu torebki (ryc. 11, 12). Obserwowano je w 7 z 29 opisanych torebek krwiaków. Komórki te leżały pojedynczo, bądź w skupiskach. U 5 z 7 chorych w wywiadzie stwierdzono alkoholizm.

P. Nowacki

Naczynia krwionośne torebki (tabela 1, ryc. 1-10)

We wszystkich przypadkach poza grupą I występowały naczynia typu zatokowatego. Ich ilość i średnica wzrastały z wiekiem torebki. W grupie II obecne były w warstwie naczyniowej, potem spotykano je w całej torebce, jednak najczęściej w warstwie naczyniowej. Drugim typem naczyń były żyły, obserwowane począwszy od grupy III. Ich średnica, grubość ściany i ilość wzrastały także w miarę starzenia się krwiaka. Znajdowały się głównie w warstwie naczyniowej, rzadziej zbitej, w wewnętrznej pojawiały się dopiero w przypadkach najstarszych (grupa VI). W niektórych torebkach, niezależnie od wieku krwiaka, obserwowano ogniska krwotoczne w różnych fazach organizacji (ryc. 13). Ogniska te leżały zwykle w warstwie naczyniowej, niekiedy również w zewnętrznej i wewnętrznej.

Zawartość krwiaka

9 Brit Bark

26

W grupach I, II i III spotykano erytrocyty świeże. W przypadkach starszych były one w znacznym stopniu shemolizowane. Największą penetrację fibroblastów i naczyń włosowatych z torebki w masy krwi obserwowano w grupie II, III i IV. Granica między torebką a zawartością krwiaka była w miarę starzenia się wynaczynienia coraz bardziej ostra. Ilość barwnika krwi powstałego z rozpadu erytrocytów pozostawała we wszystkich przypadkach mniej więcej jednakowa.

DYSKUSJA

W przeanalizowanym materiale pierwsze oznaki organizacji wynaczynienia obserwowano od około 4—5 dnia po urazie. Polegały one na pojawieniu się sporej ilości komórek limfoidalnych, granulocytów obojętnochłonnych i pojedynczych pasm fibroblastów, żwłaszcza na obwodzie krwiaka, nie tworząc jeszcze typowej dla krwiaka torebki. O udziale neutrofilów w początkowej fazie organizacji krwiaka donosi także Lindenberg (1971). Wszystkie elementy komórkowe układały się zazwyczaj w pasmach włóknika, bardzo obficie występującego w tym czasie w masach krwotocznych. Zjawisko to zdaje się świadczyć o dużym znaczeniu włóknika we wczesnym okresie organizacji wynaczynienia. Tak interpretuje je również szereg innych autorów (Putnam, Cushing 1925; Watanabe i wsp. 1972; Apfelbaum i wsp. 1974). Stanowisko takie reprezentują zwłaszcza Apfelbaum i wsp (1974), którzy na podstawie wykonanego modelu doświadczalnego stwierdzili, że nie dochodzi do organizacji wynaczynienia w tym przypadku, gdy pozba-

wione zostanie ono włóknika. Właściwy rozwój torebki obserwowałem od około 7 dnia choroby. Według moich obserwacji, torebka składała się początkowo prawie wyłącznie z elementów komórkowych: fibroblastów, komórek limfoidalnych, makrofagów obładowanych hemosyderyna oraz niewielkiej ilości włókien łacznotkankowych. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy uważają, że komórki te pojawiają się między 5 a 6 dniem choroby (Lindenberg 1971; Watanabe i wsp. 1972; Apfelbaum i wsp. 1974). W tych przypadkach, w których obserwowano pojawienie się torebki pod koniec drugiego tygodnia choroby, prace przeprowadzano na modelu doświadczalnym u zwierząt i dynamika rozwoju organizacji krwiaka mogła być nieco inna niż u człowieka (Watanabe i wsp. 1972; Apfelbaum i wsp. 1974). Oceniane przeze mnie torebki posiadały bardzo mało granulocytów obojętnochłonnych. Wymienione dotychczas komórki torebki w dalszych fazach jej organizacji obecne są zwłaszcza w warstwie II i III. Stopniowo zastępują je włókna kolagenowe, obficie występujące w warstwie I i II. W okolicach bogatych we włókna pojawiają się fibrocyty. W dostępnych w piśmiennictwie opisach torebek, nie znalazłem wzmianki o fibrocytach, jak również danych o rozmieszczeniu elementów komórkowych w torebce w różnych okresach czasu po urazie. Opisany sposób ułożenia składników torebki związany jest prawdopodobnie z organizacją krwiaka, która postępuje z obwodu w głąb mas krwiaka.

Na szczególną uwagę zasługuje obecność w niektórych przypadkach granulocytów kwasochłonnych. Występują one głównie w warstwie naczyniowej torebki. Taka ich lokalizacja wskazuje na możliwość migracji tych elementów z krwi obwodowej. Wiadomo, że reakcja alergiczna stanowi zmienioną jakościowo odpowiedź na obce gatunkowo białko, lub białko własne, o ile pojawi się ono w okolicy, w której zwykle nie występuje (Aleksandrowicz 1969; Ławkowicz, Krzemińska--Lawkowiczowa 1973; Angielski, Regulski 1976). Odczyn eozynofilny w naszych przypadkach może być związany właśnie z alergizującym działaniem produktów degradacji krwi wynaczynionej pod twardówkę. Dość częstym zjawiskiem potwierdzającym to alergizujące działanie krwiaka jest odczyn ze strony opony twardej, polegający na, niekiedy wyraźnym, jej przekrwieniu. Przypadki, w których obserwowano granulocyty kwasochłonne w utkaniu torebki dotyczyły przeważnie osób z alkoholizmem w wywiadzie. Ze względu na to, że alkoholizm zdarza się dość często u osób z krwiakiem podtwardówkowym (Traunfellner 1957; Kak, Gleadhill 1971; Raskind i wsp. 1972), wymienione korelacje między występowaniem granulocytów kwasochłonnych a nadużywaniem alkoholu, mogą być tylko przypadkowe.

Neuropatologia Polska — 11

Obserwując ilość, typ i rozmieszczenie naczyń krwionośnych oraz zmiany w ich otoczeniu, odnosi się wrażenie, że odgrywają one decydującą rolę w organizacji krwiaka i stanowią ważny element budowy jego torebki. Większość autorów poprzestawała na określeniu naczyń w utkaniu torebki mianem kapilarów, nie przywiązując wagi do ich rozmieszczenia i zmian, jakim podlegają w miarę starzenia się krwiaka. Jedynie Putnam i Cushing (1925), a potem Sato i Suzuki (1975), wprowadzili podział naczyń na drobne włosowate i duże zatokowate. Na podstawie własnych badań mogłem stwierdzić, że naczynia podlegają zmianom ilościowym i jakościowym w miarę postępu choroby. Równocześnie ze wzrostem liczby zmienia się ich wielkość i rodzaj. Początkowo drobne włośniczki ustępują miejsca dużym naczyniom zatokowatym, a od około 3 tygodnia choroby, również stopniowo powiększającym się żyłom. Obserwowane przeze mnie liczne naczynia pączkujące w masy krwotoczne oraz obecność w pobliżu tych naczyń dużej ilości komórek rozbiórki ruchomej, świadczy o znaczeniu, jakie posiadają one dla transportu produktów rozpadu wynaczynionej krwi. Podobne spostrzeżenia poczynili inni autorzy (Borowska-Lehman 1974). Ciągły przyrost grubości warstwy naczyniowej w przebadanych przeze mnie przypadkach odbywa się częściowo kosztem pozostałych warstw; świadczy to z jednej strony o coraz lepszym unaczynieniu torebki, z drugiej zaś o tym, że warstwa naczyniowa stanowi część wzrostową torebki. Obecność świeżych krwinek czerwonych w świetle niektórych naczyń także przemawia za dobrze rozwiniętym krążeniem w torebce. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa (Apfelbaum i wsp. 1974).

Wokół niektórych naczyń w pobliżu wewnętrznej powierzchni torebki oraz w warstwie naczyniowej obserwowano różnej wielkości ogniska krwotoczne, niekiedy w stadium rozbiórki makrofagowej i proliferacji fibroblastów. Spostrzeżenie to może mieć znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów powiększania objętości krwiaka. Do dnia dzisiejszego nie wiadomo ostatecznie, jaka jest przyczyna powiększania objętości krwiaka. Część autorów stoi na stanowisku, że przyrost masy krwiaka odbywa się dzięki wchłanianiu płynu mózgowo-rdzeniowego do wnetrza otorbionego wynaczynienia, gdzie panuje zwiększone ciśnienie osmotyczne (Gardner 1932; Ambrosetto 1962; Suzuki, Takaku 1970). Według innych, przyczyna tkwi w dodatkowych krwawieniach z przerwanych naczyń torebki (Putnam, Cushing 1925; Watanabe i wsp. 1972; Decker, Jacobs 1974). Dyskutowana jest także możliwość współistnienia obu czynników: osmotycznego i dodatkowych krwawień (Świcowa, Dziewicka 1974). Analiza własnego materiału zdaje się przemawiać za dokrwawianiem do mas krwiaka.

Patomorfologia krwiaków podtwardówkowych

Poza przedstawioną tu obserwacją o prawdopodobnym mechanizmie powiększania objętości krwiaka, na podstawie przeprowadzonych badań nasuwa się spostrzeżenie, że rodzaj i rozmieszczenie elementów torebki, zwłaszcza naczyń i włókien kolagenowych, podlegają dość wyraźnym i charakterystycznym zmianom wraz z jej wiekiem. Pozwala to na określenie wieku krwiaka, przy czym należy podkreślić, że ocena wieku starszych krwiaków jest trudniejsza ze względu na mniej dynamiczny rozwój organizacji wynaczynienia. Jest to zgodne ze spostrzeżeniami Stricha (1976). Według opinii części autorów, niektóre krwiaki, zwłaszcza drobne, ulegają w miarę starzenia się prawie całkowitemu wchłonięciu z pozostawieniem niewielkiego zgrubienia na wewntęrznej powierzchni opony twardej (Goodell, Mealey 1963; Zülch 1974). W przebadanym materiale nie spotkałem takich przypadków.

Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy nie mogą być uważane za niepodważalne, gdyż procesy fizjologiczne i patologiczne w każdym organizmie są różne i zależą od wielu czynników (szybkości przemiany materii, zdolności regeneracji tkanki łącznej, wieku i innych). Z tych względów wiek krwiaka podtwardówkowego należy oceniać na podstawie przedstawionych wyników w sposób przybliżony, a podział materiału na 6 grup należy traktować jako schemat wynikający z metodyki pracy.

WNIOSKI

1) Typ i wielkość naczyń krwionośnych, ilość włókien łącznotkankowych oraz rozmieszczenie tych elementów w utkaniu torebki, podlegają dość charakterystycznym zmianom w przebiegu starzenia się krwiaka. Umożliwia to określenie wieku wynaczynienia. W krwiakach starych określenie wieku natrafia na większe trudności ze względu na mniej dynamiczny rozwój ich organizacji.

2) Wzrost grubości warstwy naczyniowej odbywający się kosztem pozostałych warstw, zwłaszcza luźnej, świadczy o coraz lepszym unaczynieniu torebki. Warstwa naczyniowa jest częścią "wzrostową" torebki.

3) Obecność granulocytów kwasochłonnych w utkaniu torebki krwiaka podtwardówkowego może przemawiać za alergicznym charakterem odczynu, który jest odpowiedzią ustroju na produkty degradacji krwi wynaczynionej do przestrzeni podtwardówkowej.

4) Istotne znaczenie dla wzrostu objętości krwiaka posiada dokrwawianie z naczyń jego torebki, czego dowodem są spotykane w pobliżu tych naczyń ogniska krwotoczne w różnych stadiach organizacji.

Nr 1

http://rcin.org.pl

1000

P. Nowacki

П. Новацки

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ СУБДУРАЛЬНОЙ ГЕМАТОМОЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ОБРАЗОМ ЕЁ КАПСУЛЫ

Резюме

Исследовано 29 случаев субдуральной гематомы. Затем исследовалась морфология капсулы гематомы и степень ее организации в зависимости от возраста экстравазации, а также изменения в структуре капсулы, на основании которых можно делать выводы относительно механизма увеличения объема гематомы.

Исследования заключались в гистопатологической оценке материала при употреблении типичных методов окрашивания.

Во время развития капсулы субдуральной гематомы находящиеся в ней колагенные волокна и кровеносные сосуды проходят характерные изменения. Знание этих преображений дает возможность установить возраст гематомы. Вблизи некоторых сосудов капсулы находятся очаги кровоизлияния в разных фазах организации. Они могут быть источником экстравазации в массу гематомы и вызывать благодаря этому рост ее объема.

Следует обратить внимание на наличие в некоторых капсулах ацидофильных гранулоцитов. Их наличие может свидетельствовать о алергическом характере реакции, которая является ответом организма на продукты деградации крови, изливаемой в субдуральное пространство.

P. Nowacki

RELATIONSHIP BETWEEN THE AGE OF SUBDURAL HEMATOMA AND THE MORPHOLOGICAL APPEARENCE OF ITS CAPSULE

Summary

The study comprised 29 cases of subdural hematomas. The evaluation included the morphology of the capsule and its degree of organization in the relation to the age of hematoma, as well as the changes in the texture providing indications as to the mechanism of the volume increase of hematoma. The material was examined histopathologically with routine staining methods.

In the course of development of the capsule, its collagen fibres and blood vessels undergo characteristic changes allowing to determine the age of hematoma. In the vicinity of some vessels hemorrhagic foci are present in various stages of organization. The foci may be the cause of bleeding to the mass of hematoma resulting in the increase of its volume. Acidophilic granulocytes were present in some of the capsules, indicating the allergic character of the reaction manifesting the response of the organism to the degradation products of blood extravasated into the subdural space.

PIŚMIENNICTWO

- 1. Aleksandrowicz J.: Choroby krwi i układu krwiotwórczego. PZWL, Warszawa, 1969.
- 2. Ambrosetto C.: Post-traumatic subdural hematoma. Arch. Neurol., 1962, 6, 287-292.

Patomorfologia krwiaków podtwardówkowych

- Angielski S., Rogulski J.: Zarys biochemii klinicznej i analitycznej. PZWL, Warszawa, 1976.
- Apfelbaum R., Guthkelch A., Shulman K.: Experimental production of subdural hematomas. J. Neurosurg., 1974, 40, 336–346.
- Borowska-Lehman J.: Pourazowy wodniak podtwardówkowy powikłany przewlekłym zapaleniem opon z uszkodzeniem kory mózgu. Pat. Pol., 1974, 25, 441-445.
- Castleman B.: Case records of the Massachusetts General Hospital. N. Eng. J. Med., 1972, 286, 650-656.
- Christensen E., Husby J.: Chronic subdural hematoma in infancy. Acta Neurol. Scand., 1963, 39, 323–342.
- Decker R., Jacobs L.: Unusual intracranial complication of head trauma. New York J. Med., 1974, 74, 832—837.
- Friede L.: Incidence and distribution of neomembranes of dura mater. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1971, 34, 439-446.
- 10. Gardner W.: Traumatic subdural hematoma with particular reference to the latent interval. Arch. Neurol., 1932, 27, 847-855.
- 11. Goodell Ch., Mealey J.: Pathogenesis of chronic subdural hematoma. Arch. Neurol., 1963, 8, 429-440.
- Jamieson K., Yelland J.: Surgical treated traumatic subdural hematomas. J. Neurol. Neurosurg., 1972, 37, 137-149.
- Kak V., Gleadhill C.: Chronic subdural hematoma. (A review of 66 cases). Ulster Med. J., 1971, 40, 163—168.
- 14. Lavy S., Herishianu Y.: Chronic subdural haematoma in the age. J. Amer. Geriat. Soc., 1969, 17, 380-383.
- Lindberg R.: Subdural hematoma. W: Pathology of the nervous system. Red. J. Minckler, McGraw-Hill, New York, 1971, 1711-1719.
- Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa I.: Kliniczna diagnostyka różnicowa w hematologii. PZWL, Warszawa, 1973.
- 17. Parkinson D., Chochinov H.: Subdural hematomas some observations on their postoperative course. J. Neurosurg., 1960, 17, 901—904.
- Peters G.: Subdurales Hämatompachymeningeosis haemorrhagica interna. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1970, 207–211.
- Putnam T., Cushing H.: cyt. za Friede L., J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1971, 34, 439-446.
- Raskind R., Glover M., Weiss S.: Chronic subdural hematoma in the elderly: a challange in diagnosis and treatment. J. Amer. Geriat. Soc., 1972, 20, 330-334.
- Sato S., Suzuki J.: Ultrastructural observations of the capsule of chronic subdural hematoma in various clinical stages. J. Neurosurg., 1975, 43, 569— --578.
- Schmitt B.: Delayed onset of acute post-traumatic subdural effusion, Amer. J. Dis. Child., 1975, 129, 749-750.
- Strich S.: Cerebral trauma. W: Greenfields' Neuropathology, Red. J. Greenfield, Blackwood, London, 1976, 340—345.
- Suzuki J., Takaku A.: Nonsurgical treatment of chronic subdural hematoma. J. Neurosurg., 1970, 33, 548-553.
- Świcowa K., Dziewicka A.: Przewlekły wysięk podtwardówkowy u niemowląt. Pol. Tyg. Lek., 1974, 39, 1299—1303.

165

P. Nowacki

- Traunfellner Z.: Samoistne krwotoki pod oponę twardą. Arch. Med. Sąd., 1957, 9, 107—114.
- 27. Trotter W. cyt. za: Friede L., J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1971, 34, 439-446.
- Virchow R. cyt. za: Friede L., J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1971, 34, 439—446.
- 29. Watanabe S., Shimada H., Ishii S.: Production of clinical form chronic subdural hematoma in experimental animals. J. Neurosurg., 1972, 37, 552-561.
- Zülch K.: Pathomorphology and pathophysiology of cranio-cerebral trauma. Pat. Pol., 1974, 25, 339-366.

Adres autora: Klinika Neurologii PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin

TREŚĆ

Β.	Gajkowska: Wpływ wysokiej temperatury otoczenia na ultrastrukturę	
	układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura	1
L.	Dydyk, M. Justyna, M. Dambska: Zmiany ultrastrukturalne w korze móz-	
	gu królików 36-dniowych poddanych działaniu normobarycznej hiper-	
	oksji w 20 dniu życia	15
M.	. Sikorska: Wpływ hipoksji krążeniowej na aktywność kinaz białkowych	
	w podfrakcjach komórkowych w mózgu królika	27
R.	Pluta, A. Kapuściński: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bio-	
	elektryczna	41
M.	. Wender, A. Żórawski, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, O. Mularek, J. Sta-	
	nisławska, D. Talkowska: Kwasy tłuszczowe lipidów mieliny mózgu w	
	zatruciu metylonitrozomocznikiem	53
J.	Szczech: Aktywność fosfataz i esteraz w ciele migdałowatym szczura w na-	
	stępstwie zatrucia p-toluenosulfanilidem etylortęciowym	71
J.	Rafałowska: Wybrane problemy rozwoju i starzenia się układu nerwo-	
	wego. III. Komórka ruchowa przedniego rogu rdzenia kręgowego w róż-	
	nych okresach życia	83
Α.	Krygier-Stojałowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowacki, K. Hon-	
	czarenko: Zmiany ilościowe DNA i białek zasadowych (histonów) w ją-	
	drach komórek nerwowych i glejowych mózgowia szczurów w różnym	
	wieku	97
J.	Finowicka-Walczyna: Wpływ odnerwienia na ultrastrukturę dojrzewają-	
	cego włókna mięśniowego szczura	107
W.	. Hilgier: Zawartość α-ketoglutaranu i glutaminianu w mózgu szczurów	101
	w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	121
H.	Prokopanow: Ultrastruktura naczyń włosowatych w glejakach ośrodko-	107
_	wego układu nerwowego	127
E.	Polkowska-Kulesza, A. Płużańska, J. Alwasiak, M. Mikuta, T. Robak,	
	Z. Węgrzyn, R. Maculewicz: Immunoglobuliny i inne białka surowicy,	
	limiocyty T i B oraz stopien transformacji blastycznej limfocytów po	120
D	stymulacji PHA u chorych z guzami mozgu	199
Ρ.	Nowacki: Zalezność między wiekiem krwiaka podtwardowkowego a obra-	151
	zem moriologicznym jego torebki	101

СОДЕРЖАНИЕ

F	Гойнороко: Влидино вырокой температиры окружающей среды на	
D.	Y TETRO CTO WY TWY THINGS IS A CTURING WITH A CONTRACT COLOR AND	1
Π	ультык М. Юстьца М. Ломбска: Ультраструктурные изменения в коре	
	голеного мозга 36-лиевных кроликов поллерогнутых влиянию нор-	
	мобарической гипероксии на 20 лень их жизни	15
M.	Сикорска: Влияние ширкуляторной гипоксии на активность белковых	
	киназ в субклеточных фракциях мозга кролика.	27
P.	Плута, А. Капустински: Полная ишемия мозга а биоэлектрическая	
	активность	41
M.	Вендер, А. Журавски, З. Адамчевска-Гонцежевич, О. Мулярек, Я. Ста-	
	ниславкса. Д. Тальковска: Жирные кислоты липидов миелина мозга	
	при отравлении метилнитрозомочевиной	53
Ю	. Шчех: Активность фосфатаз и эстераз в миндалевидном ядре крысы	
	вследствие интоксикации этилортутным пара-толуолсульфанилидом .	71
Я.	Рафаловска: Избранные проблемы развития и старения нервной системы.	
	III. Двигательная клетка переднего рога спинного мозга в разных	
	периодах жизни	83
A.	Крыгер-Стояловска, Е. Кульчицки, М. Мадей, П. Новацки, К. Хонча-	
	ренко: Количественные изменения ДНК и щелочных белков (гисто-	
	нов) в ядрах нервных и глиальных клеток мозга крыс разного	07
	возраста	97
И.	Финовицка-Вальчина: Влияние денервации на ультраструктуру дозре-	107
D	вающего мышечного волокна крысы	107
в.	Хильгер: Содержание α-кетоглутарата и глутамата в мозге крыс в экс-	191
v	периментальной гепатической энцерралопатии	121
л.	прокопанов: ультраструктура капилляров в глиомах центральной нерв-	127
T	HON CHCTEMBE	121
E.	2 Devenuer D. Mouris applier Manual Tody Market and Chapter and Ch	
	5. Бенгжин, Г. Мацулевич. Инмуновогоридской прансформации ним-	
	chouwrop nocte cruwy woopaung PHA y forthely on yourgawy Morra	139
П	Нованки: Зависимость межлу сублуральной гематомой и морфологичес-	200
	ким образом её капсулы	151
	with opposition to handy and it is in the second se	

CONTENTS

 B. Gajkowska: Effect of high environmental temperature on the ultrastruc- ture of the hypothalamo-hypophyseal system J. Dudyk M. Juetyna, M. Dambska: Illtrastructural changes in the cerebral 	1
cortex of 36-day rabbits subjected to normobaric hyperoxia in the	15
20th day of age	10
M. Sikorska: Effect of circulatory hypoxia on the activity of protein kinases	97
In the subcentular fractions of rabolit brain	41
M. Wonder A. Zárovski: Complete brain ischema versus pioelectrical activity	±1
m. weineel, A. Zolawski, Z. Auaniczewska-Gonecizewicz, O. Mulai et al., S. Sta-	
in methylnitrozoures (MNII) intovication	53
J Szczech: The activity of phosphatases and esterases in corpus amygdaleus	
of the rat following intoxication with ethylmercury p-toluenesulpho-	
anilide	71
J. Rafałowska: Some problems of the development and aging of nervous sy-	
stem. III. The motor cell of the anterior horn of spinal cord in various	
periods of life	83
A. Krygier-Stojałowska, J. Kulczycki, M. Madej, P. Nowicki, K. Honczaren-	
ko: Age-dependent changes of DNA and basic proteins (histones) con-	
tent in nerve and glial cell nuclei of the rat brain	97
J. Finowicka-Walczyna: Effect of denervation on the ultrastructure of ma-	
turing muscle fiber in rat	107
W. Hilgier: The α -ketoglutarate and glutamate content of the rat brain in	101
experimental hepatic encephalopathy	121
h. Frokopanow: Capinary ultrastructure in gliomas of the central nervous	197
Policousto Kuloszo A Divisiólzo I Almonialz M Milanto M Debala	141
Z. Wedrath B. Maculawigz: Immunoglabuling and other some pro-	
teins T and B lymphocytes and degree of blastic transformation of	
lymphocytes stimulated by PHA in the brain tumors nationle	139
P. Nowacki: Relationship between the age of subdural hematoma and the	-00
morphological appearance of its capsule	151

WARUNKI PRENUMERATY

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW "Prasa-Książka-Ruch" oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Cena prenumeraty:

półrocznie	50	zł	
rocznie	100	zł	

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW "Prasa-Książka-Ruch", w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych. Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW "Prasa-Książka--Ruch" Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zleceniodawców instytucji i zakładów pracy.

Quarterly "Neuropatologia Polska" appearing since 1963, as an official Journal of Polish Association of Neuropathologists publishes papers in the field of: Clinical and Experimental Neuropathology, Neurooncology, Neurochemistry and Neuroanatomy.

Yearly subscription US \$ 12. — (prices in other currencies are the effective exchange rates in relation to the currency quoted above). Subscriptions from abroad should be paid to Ars Polona-Ruch account No 1595-006-71000 through the Bank Handlowy S.A. Warsaw, Poland.

Zakł. Graf. "Tamka". Z. 2. Zam. 458. Pap. kredowy III kl. 90 g. Bl. Nakład 567 + 23 egz. Ark. druk. 10,5 + 0,25. O-110.