

p. 105

292 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM XI

1973

ZESZ. 3

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XI

Lipiec — Wrzesień 1973

Nr 3

KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Groniowski (Warszawa), *Hanna Jędrzejowska* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Szczecin), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Danuta Markiewicz* (Pruszków), *Mirosław Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmína Zelman* (Warszawa).

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs), *William H. McMenemey* (Londyn), *Franz Seitelberger* (Wiedeń), *Istvan Tariska* (Budapeszt).

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, *Adam Kunicki*, *Mirosław Mossakowski*, *Ewa Osetowska*, *Mieczysław Wender*

REDAKCJA

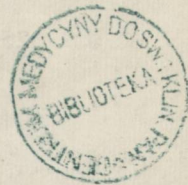
Redaktor Naczelny: *Irmína Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Tadeusz Majdecki*
Sekretarz techniczny: *Władysława Smolińska*

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 45-56-76

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



GEORGE I. MCHEDLISHVILI

EXPERIMENTAL MODEL OF CONTROLLABLE CIRCULATORY HYPOXIA (ISCHEMIA) OF CEREBRAL HEMISPHERES

Department of Pathophysiology and Morphology, Institute of Physiology,
Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, U.S.S.R.

The disturbance of blood circulation within the brain with ensuing hypoxia of its tissue is the most common cause of neurologic disorders and holds the third place (following heart diseases and cancer) in the mortality rate; this is partly due to the extremely high sensitivity of the brain tissue to oxygen deficiency. Hence, a wide interest of researchers in cerebral hypoxia can be easily understood. The main factor limiting however investigations into the problem was the lack of adequate experimental models.

PECULIARITIES OF CEREBRAL HYPOXIA CAUSED BY CIRCULATORY DISORDERS

In contrast to other kinds of cerebral hypoxia, when deficient tissue oxygenation is the result of lack of oxygen in the inhaled air (hypoxic hypoxia), of a considerable impairment of alveolar ventilation (asphyxia), or of a decrease in the blood ability of oxygen transportation (anemia, carboxyhemoglobinemia, etc.), circulatory hypoxia shows some peculiarities. Since this condition is brought about by disorders of blood flow in the cerebral microvascular bed, it might be caused both by systemic and regional disturbances of blood circulation. Thus, under the conditions of circulatory hypoxia there is a disturbance in supply to the tissues not only of oxygen, but also of necessary nutritive and physiologically active substances, and, on the other hand, there is an impairment in the elimination of CO_2 and other metabolic products from the tissues. For this reason the disturbances in tissue metabolism, resulting from circulatory hypoxia, are much more complicated than when the tissues suffer from any kind of hypoxia.

REVIEW OF METHODS EMPLOYED FOR PRODUCING ISCHEMIA
(CIRCULATORY HYPOXIA) WITHIN THE ANIMAL'S BRAIN

For reduction of the blood supply to the whole brain or to some of its parts various methods have been proposed previously. These methods could be classified into the following groups:

1. Use of a pneumatic cuff constricting the major arteries of the brain (Opitz and Kreuzer, 1955; Hirsch et al., 1957). This method may have the following advantages: it does not require any preparatory surgical procedure, and the circulatory changes inside the skull may be reversible. However, the method has also some substantial limitations: (a) it is difficult to occlude the vertebral arteries which are surrounded by bones; therefore some authors advised a previous ligation of the vertebral arteries before the use of the cuff (Boyd and Connolly, 1962; Ames et al., 1968); (b) simultaneous compression of the neck veins resulting in venous blood stagnation inside the skull, as well as of the trachea with ensuing stoppage of respiration; (c) considerable irritation of the neck tissues under the cuff; (d) difficulty of controlling the changes in cerebral blood flow, particularly because of simultaneous alterations of systemic circulation.

2. Ligation of the major brain arteries in the neck region has been used in the following variations: either only carotid arteries were ligated (Ruščak, 1962; Meyer et al., 1965; Symon, 1967; Wexler and Saroff, 1970), or this was done simultaneously with occlusion of the vertebral arteries (Liubomudrov, 1929; Andreyev, 1935; Symon 1967), or even with ligation of the cranial vena cava (Vinogradov, 1967); ligation of the vertebral arteries and an anastomotic connection between the carotid artery and jugular vein has also been proposed (Anokhin and Anokhina-Ivanova, 1930). The advantage of these methods over the use of a pneumatic cuff surrounding the neck is that one knows which of the blood vessels are excluded from the blood supply to the brain. However, using these methods it is difficult to control the degree of impairment of the cerebral blood flow because of the high ability of the vasculature to provide collateral blood supply to the brain through other pathways, as well as because of active responses of the systemic circulation due to reflexes from the sino-carotid receptors under these conditions.

3. Ligation (or clipping) of the larger arteries inside the skull, usually of the middle cerebral arteries (Waltz and Sundt, 1967; Meyer, 1958; Begli et al., 1970; Symon et al., 1971) or of the anterior cerebral arteries (Kosmarskaya and Kapustina, 1953; Kuklina, 1957), results in a deficient blood supply to the respective areas of the brain. However, in such cases

it is also difficult to control the degree of the blood supply deficiency to the cerebral tissues, because of nonsimilar capacity for collateral circulation to the affected brain regions in different species. Another limitation of the method is that because of ligation of the arteries, the cerebral circulatory changes become usually irreversible.

4. Occlusion of all pial arteries surrounding some cortical area results in the appearance of a focus of cerebral ischemia (Mchedlishvili and Ormotsadze, 1963; Kometiani et al., 1969). The advantage of the method is that ischemic changes may be compared with the same parameters in the contralateral brain area with a normal circulation. However, the limitation of the method consists in the impossibility of controlling both the degree and the duration of the circulatory changes which are more or less irreversible.

5. Occlusion of the smaller arteries entering the cerebral tissue makes it possible to obtain a restricted area of cerebral ischemia. Since within the brain tissue there are no interarterial anastomoses and the capillary pathways cannot provide a collateral blood supply to the brain (Klovovsky, 1951), such arterial occlusion alone is always effective (Vasil-tchenko, 1956; Kukushkina, 1956; Gannoushkina, 1958). However, by this method it is also impossible to control both the degree of the blood supply deficiency, and the duration of ischemic changes which are always irreversible. The same may be said of embolization of the smaller cerebral arteries (Meyer et al., 1962) which has one more disadvantage: it is almost impossible to control the area of the brain subjected to ischemization.

6. Drop of the systemic arterial pressure ensuing exsanguination from a large artery was also used to cause a temporal stoppage of the blood supply to the brain (Mchedlishvili, 1960; Kowada et al., 1968). It is difficult however, to control the degree of decrease of cerebral blood flow because of the perfect autoregulatory possibilities and compensatory mechanisms which may be observed even during a complete drop of systemic arterial pressure to zero (Mchedlishvili, 1972). Some modifications of the method have also been suggested, e.g. exsanguination (1/6 to 2/3 of the blood) together with suspending of the animal in a head-up position (Petrov, 1929); however, the latter method has not been accepted because of a certain abnormality of the animals position and impossibility to control the degree of insufficiency of blood supply to the brain under these conditions.

7. Changes in blood supply to the isolated animal's head permit a good control of both the degree and duration of cerebral blood flow changes (Hirsch et al., 1957b); the same concerns the isolated brain (White, 1967).

The limitations of these methods are the extremely complicated preparatory surgical procedures, preceding the experiments.

8. Rise in intracranial pressure has been also used to cause restriction of blood supply to the brain (Harreveld, 1947; Zozulya, 1972). To obtain a decrease in cerebral circulation a considerable intracranial hypertension is necessary — the pressure inside the skull should almost reach the level of the systemic arterial pressure. This, certainly, would have an additional abnormal effect upon the brain and, probably for this reason the method has not been used by many researchers.

PRINCIPLES OF THE NEW MODEL OF CONTROLLABLE CEREBRAL ISCHEMIA (CIRCULATORY HYPOXIA) AND ITS ADVANTAGES

To avoid the limitations of the previous experimental models of ischemia (circulatory hypoxia) within the brain, the new one should be characterized by the following features: (a) the degree of the circulatory changes should be under control, i.e. it should be possible to regulate their extent, (b) the cerebral blood flow changes should be reversible, i.e. it should be possible to reestablish the normal blood supply to the brain after a desirable duration of circulatory disturbances, and (c) the negative effects of the preparatory surgical procedure, as well as of anesthesia on the circulatory and the metabolic events within the brain should be minimized.

The most common method to produce a decrease in cerebral circulation is the occlusion of the respective arteries supplying blood to the brain. However, after such a procedure the main difficulty to control the degree of impairment of cerebral blood flow is caused by collateral blood supply which usually varies in different species and under different conditions. Thus, the problem is how to restrict the collateral blood supply to the brain down to a desirable degree. The most convenient method is the lowering of systemic arterial pressure. If the latter would be decreased down to a certain level, the degree of restriction of collateral circulation would be under control. The controllable decrease of systemic arterial pressure can be easily achieved by means of a pressurable reservoir system containing heparinized blood or some substitutive fluid of dextrane type, which would be connected by a large catheter with some branch of the aorta.

Consequently, the principle of the proposed method to cause controllable hypoxia (ischemia) within the brain involves two components: firstly occlusion of certain arteries, supplying the brain with blood (in this case of both carotids) and, secondly, restriction of the collateral blood supply to the brain by way of a decrease of systemic arterial

pressure down to desirable level. Thus, the degree of the circulatory hypoxia would be under the experimenter's control (Diagram 1). By subsequent removal of the arterial occlusion and by increasing systemic arterial pressure to the initial level the cerebral circulation could recover after a desirable duration of circulatory hypoxia within the brain. To abolish the negative effect of narcosis on the brain tissues and on

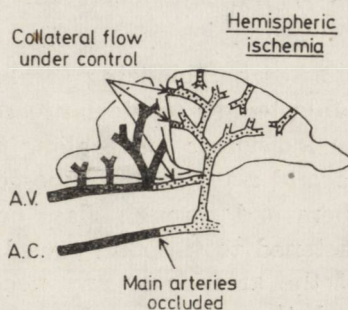


Diagram 1. Controllable ischemia (circulatory hypoxia) in the cerebral hemispheres of experimental animals. Explanation in the text.

Schemat 1. Kontrolowane niedokrwienie (niedotlenienie krążeniowe) w półkulach mózgowych zwierząt doświadczalnych. Wyjaśnienia w tekście.

cerebral circulation (narcosis is necessary for most kinds of experimental animals) those species should be used in which circulatory hypoxia can be studied without general narcosis. From this point of view rabbits are very convenient, since it is possible to perform the preparatory surgical procedure without general anesthetics and employing local anesthetics only in the regions subjected to surgical manipulations. Thus, the method proposed provides a controllable degree and duration of the circulatory changes within the brain, as well as elimination of the negative effects of narcosis.

The field of application of the proposed experimental model of circulatory hypoxia within the brain is very wide. It might be used in the following spheres of biomedical research to investigate disturbances within the brain and the mechanisms of compensation during cerebral hypoxia:

- 1) Circulatory physiology and pathophysiology,
- 2) Neurophysiology,
- 3) Biophysical studies with the use of different biosensors placed on the brain surface or within the tissues,
- 4) Neurohistological, neurocytological and neuropathological studies with light and electron microscopes,
- 5) Histochemical studies,
- 6) Biochemical studies of brain homogenates.

SURGICAL TECHNIQUES FOR ACHIEVING A CONTROLLABLE
CIRCULATORY DEFICIENCY WITHIN THE BRAIN

The preparatory surgical procedure for decreasing the cerebral blood flow in experimental animals should be at least the following: (a) exposure of both common carotid arteries to be occluded and (b) exposure of a large artery to insert a polythene or glass cannula with a maximally large diameter for connecting it with the pressurized reservoir system.

After immobilizing a rabbit on its back and infiltration of the tissues subjected to surgical procedure with a local anesthetic (e.g. novocaine) an incision is made along the sagittal line of the neck and the common carotid arteries are exposed. Thick threads are then put round each of them and through glass or plastic tubes 3—4 cm long. The tubes are fastened to the skin sewed around them. This makes possible occlusion of the arteries at any necessary moment by pulling the ligatures out and, thus, pressing the arteries to the ends of the tubes.

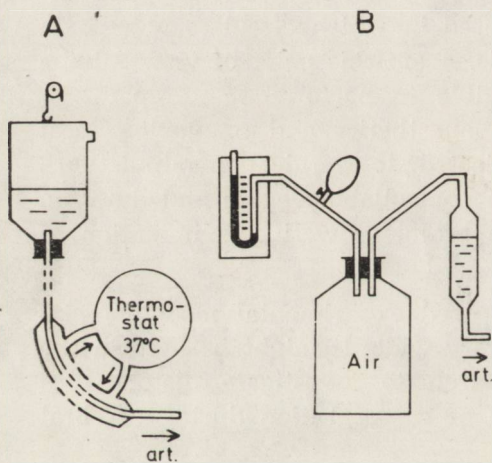


Diagram 2. Pressurized reservoir systems of two types: A — for control of systemic arterial pressure and B for controllable infusion of fluid into the cerebral vasculature. Explanation in text.

Schemat 2. Dwa typy układu zbiorników: A — dla regulacji ciśnienia tętniczego i B — dla regulowania wlewu płynu do układu naczyniowego mózgu. Wyjaśnienia w tekście.

To connect the animal's arterial system with a pressurized reservoir set-up (Diagram 2-A) the external iliac artery (its extraperitoneal portion) or the subclavian artery may be used. However, since the occlusion of one of the common carotid arteries under conditions of arterial normotension does not result in any changes in cerebral blood flow (Carlyle and Grayson, 1956), it was possible to insert a catheter of the pressurized reservoir system into one of the common carotid arteries towards the aorta, the more so as in some cases the cranial end of the artery had to be used for insertion of another catheter into it in cranial direction.

This made it possible to infuse any fluid, e.g. for fixation, into the cerebral vascular system at any moment during cerebral ischemia or in the postischemic period. In such cases a polythene or glass cannula was inserted in cranial direction into the common carotid artery after ligating all its branches, except the internal carotid artery. The injection of the necessary fluid into the cerebral vascular system has to be done with a pressurized reservoir system of another type (Diagram 2-B), but not with a syringe (since with the latter it is impossible to control the injection pressure). This makes it possible to perform the infusion under constant and controlled pressure within a normal range of 100—120 mm Hg. The preparatory surgical procedure, as well as the set-up for producing cerebral ischemia (circulatory hypoxia) is schematically shown in Diagram 3.

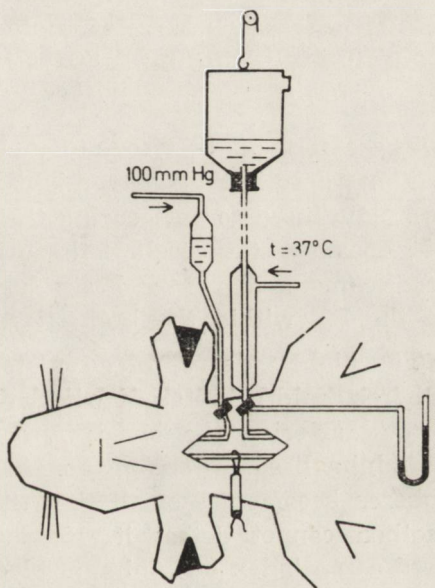


Diagram 3. Presentation of set-up for producing controllable ischemia (circulatory hypoxia) within the cerebral hemispheres of rabbits.

Schemat 3. Urządzenie umożliwiające wywołanie kontrolowanego niedokrwienia (niedotlenienia krążeniowego) w półkulach mózgowych królika.

Since under normal conditions the carotid system is responsible for blood supply mainly to the cerebral hemispheres, occlusion of both common carotid arteries might cause ischemic changes in those parts of the brain. The collateral blood flow to the cerebral hemispheres could take place in this case only through the vertebral arterial system. It would be controlled by a decrease of the systemic arterial pressure resulting from exsanguination of the animal into the pressurized reservoir system. When infusion of a fixation fluid has to be done at any moment of cerebral ischemia or of the postischemic period, there usually

occurs a sudden rise in the systemic arterial pressure preventing normal infusion of the fluid from the reservoir into the cerebral vasculature. To avoid this, the animal has to be completely exsanguinated simultaneously with the infusion. This could be done through the catheter inserted into the same carotid artery towards the aorta, which previously was used for controlling the level of the systemic arterial pressure.

When the cerebral surface has to be exposed either for investigation of the functional behaviour of the pial arterial system, or for mounting biosensors on the brain surface (electrodes recording the CBF, P_o , P_{co} , pH, pNa, pK, etc.), or for intravital fixation of the cerebral tissue from the brain surface and immediately after its excision, etc., a trepanation of the skull in its parietal region has to be made also under local anesthesia.

MONITORING OF SOME METABOLIC CHANGES CAUSED BY ISCHEMIA WITHIN THE BRAIN

The extent of the circulatory changes within the brain caused by the method described above might be monitored quantitatively by any technique used for measuring the cerebral blood flow. As to the degree of hypoxia of the cerebral tissue it could be detected with oxygen electrodes (mounted on the brain surface) from which quantitative data as to the P_{o_2} within the brain tissue can be obtained.

The highest degree of circulatory changes within the cerebral hemispheres could be obtained when, together with occlusion of both common carotid arteries, the blood flow through the vertebral arteries would be minimalized. In such cases the blood flow within the cerebral hemispheres becomes so small that the hydrogen (or any isotope) clearance method cannot detect it. However spontaneous respiration might be used as an index of minimum blood flow through the vertebral arteries: i.e. when such a minimum is reached, the blood supply to the medulla is still sufficient to maintain the spontaneous respiration, but the subsequent small drop of the systemic arterial pressure of about 1 or 2 mm Hg immediately results in disturbance of respiration.

When the cerebral ischemia reached such an extent, the following metabolic changes were detected by selective electrodes mounted on the brain surface (Mchedlishvili et al., 1972) in experiments carried out in collaboration with Antia and Nikolaishvili. The P_{o_2} of the cerebral cortex which initially was on the average 35 ± 3 mm Hg, started to decrease after the beginning of cerebral hypoxia and within 1—1½ mi-

minutes reached its minimum value which in the majority of experiments was zero (average 1.7 ± 1 mm Hg).

The pH of the extracellular fluid of the cerebral cortex (the pH electrodes were mounted on the brain surface in the parietal region), with an initial value of 7.32 ± 0.06 , started to decrease within some 40 seconds after the beginning of the drop of P_{O_2} , and gradually diminished during the whole period of cerebral ischemia and continued to decrease about 5–10 minutes after the recovery of cerebral blood flow. When cerebral ischemia lasted 15 minutes, the extracellular fluid pH dropped to its minimum value of 6.44 ± 0.1 . Its recovery took place slowly and even within one hour and one half after cerebral ischemia of a considerable degree it did not reach its initial level.

The pNa and pK measured by appropriate selective electrodes mounted on the brain surface might be considered as indexes of respective ion concentration in the extracellular fluid and, thus, of activity of the sodium and potassium „pump” of the cellular membranes. After beginning of the drop of the cortical P_{O_2} , the extracellular fluid pNa increased regularly (within ca. 5 minutes of cerebral hypoxia of the maximum degree). If the initial value of extracellular pNa was 0.80 ± 0.04 , during its maximum increase it reached 1.08 ± 0.19 . The pK electrode did not give quantitative data, but qualitatively the extracellular fluid potassium ion activity decreased after the beginning of cerebral ischemia. The decrease of pK (and hence an increase in potassium ion concentration) in the extracellular fluid started even earlier than the rise of pNa. After the end of cerebral ischemia there was a slow return to the initial level of both pNa and pK of the extracellular fluid of the cerebral cortex. However, even within one hour and one half after ischemia they usually did not reach their initial value.

The relatively slow reversal of the pH, pNa and pK in the extracellular fluid of the cerebral cortex was probably due not only to hypoxic changes occurring in the cerebral cortex during the period of ischemia, but also to the fact that after its end both the cerebral blood flow and the cerebral P_{O_2} did not return quickly to the initial values. Their changes during the postischemic period will be discussed below.

SOME MICROCIRCULATORY EVENTS IN THE CEREBRAL CORTEX DURING CIRCULATORY HYPOXIA AND THE POSTHYPOXIC PERIOD

The blood flow in the cortex of the cerebral hemispheres, evaluated by the hydrogen-clearance method before ischemia reached an average of 0.48 ml/g/min., and during the period of carotid occlusion and de-

pressed systemic arterial pressure, decreased until it could not be detected by the method. The responses of the pial arteries were studied by means of their serial microphotography and subsequent measurements of the vascular diameter on the frames of the film. After beginning of the cerebral ischemia the smaller pial arteries (with diameter smaller than 100μ) regularly dilated by about one third of their initial size. This seems to be a compensatory vasodilator response as it is usually also manifested under conditions of moderate arterial hypotension resulting in a decreased blood supply to the cerebral cortex (Mchedlishvili et al., 1971). However, the pial arteries of larger caliber (more than 100μ in the diameter) showed no regular responses during the ischemic period: either dilatation or constriction, or an unchanged vascular diameter were detected in various cases. This was probably due to a different relationship under ischemic conditions between the considerably lowered intravascular pressure and the actively decreased tension of the arterial walls. An evidence of the later was a considerable dilatation of both smaller and larger pial arteries, which appeared immediately after the recovery of blood supply to the brain and restoration of the intravascular pressure.

After restoration of normal blood flow in the carotids and of the initial level of the systemic arterial pressure, the blood flow in the cerebral hemispheres increased and reached its maximum — 1.07 ± 0.09 ml/g/min., i.e. it was more than twice the initial value. The pial arteries became considerably dilated in this period — the smaller ones (below 100μ in the diameter) by $60 \pm 9.7\%$ and the larger ones — by $34 \pm 3.5\%$ of their initial size before ischemia. That was certainly a manifestation of reactive (postischemic) hyperemia within the brain.

As may be seen in Fig. 4, reactive hyperemia was usually followed in the postischemic period by a considerable decrease in cerebral blood flow which reached an average value of 0.36 ± 0.06 ml/g/min. within 30—40 minutes, i.e. one third of its value during reactive hyperemia. Later the cerebral blood flow increased again approximately to the value found in the period prior to the cerebral ischemia. The dynamics of P_{O_2} of the cerebral cortex almost followed the changes of the cerebral blood flow (Diagram 4) and seemed to be a result mainly of the respective circulatory changes, as well as of changes in oxygen consumption by the cerebral tissue.

Thus, it was necessary to ascertain the causes of both circulatory and oxygen deficiency of the cerebral cortex in the course of the postischemic period. The dilatation of the pial arteries detected immediately after cerebral ischemia disappeared gradually, and their diameter be-

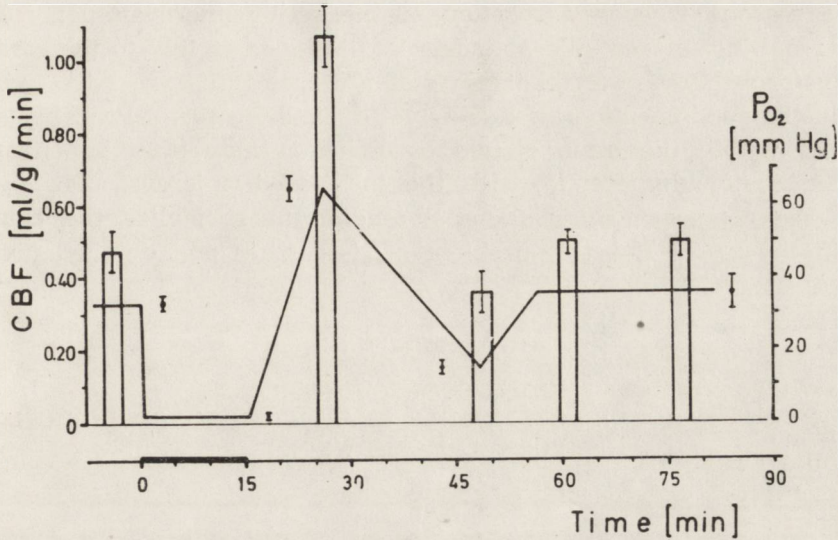


Diagram 4. Dynamics of blood flow measured by the hydrogen clearance method (bars) and P_{O_2} determined quantitatively by a membrane-covered Lübbers electrode (solid line) in cerebral cortex ($M \pm m$) of rabbits during and after 15-minute ischemia in the cerebral hemispheres.

Schemat 4. Dynamika przepływu krwi mierzona metodą wydalania wodoru (kolumny) i P_{O_2} oznaczane ilościowo za pomocą elektrody Lübbersa pokrytej błoną (linia ciągła) w korze mózgowej ($M \pm m$) królika podczas i po 15-minutowym niedokrwieniu półkul mózgowych.

came sometimes even smaller than the initial size. Within 30–40 minutes after the end of cerebral ischemia, i.e. when the cerebral blood flow was at its minimum in the postischemic period, they became most narrow. Besides, the wall: lumen ratio of the pial arteries increased considerably.

Further studies of the functional behaviour of the pial arteries offshoots and of the precortical arteries (i.e. vascular segments between the pial and radial arteries entering the cerebral cortex) were made on total microscopic preparations of the pia mater including its vasculature after supravital fixation of the tissue at certain moments of the experiments (Mchedlishvili and Baramidze, 1971). The present studies carried out in collaboration with Baramidze made it evident that, at the time when there was a considerable cerebral blood flow decrease, the pial arterial offshoots become 2–3 times smaller than during reactive hyperemia. Simultaneously there was a tendency to constriction of both precortical and cortical arteries. That seems to be in agreement with the previous results concerning the postischemic circulation within the brain (Mchedlishvili et al., 1965, Chiang et al., 1968).

The reason for such a reaction of the active microvascular mechanism resulting in a considerable decrease in blood supply to the cerebral cortex (probably also to other parts of the brain) after reactive hyperemia in the postischemic period is as yet difficult to solve. Probably some changes within the brain caused by ischemia may even be enhanced during reactive hyperemia, and the mentioned microvascular events might be compensatory responses tending to normalize the changes within the brain. But this problem needs further and detailed investigation.

G. I. Mchedlishvili

MODEL DOŚWIADCZALNY
KONTROLOWANEGO NIEDOTLENIENIA KRAŻENIOWEGO (NIEDOKRWIENIA)
PÓLKUL MÓZGOWYCH

Streszczenie

W pracy poddano krytycznemu przeglądowi metody stosowane dla wywołania hipoksji krążeniowej mózgu zwierząt doświadczalnych. Autor opisuje nowy model doświadczalnego niedokrwienia mózgu, pozwalający regulować nasilenie i czas trwania ischemii.

Zasada tego modelu polega na zamknięciu obu tętnic szyjnych wspólnych i ograniczeniu dopływu krwi do półkul mózgowych przez krążenie oboczne za pomocą obniżenia ciśnienia tętniczego krwi do określonego poziomu. Opisano niektóre wskaźniki metaboliczne oraz mikrokrążenie mózgowie podczas i po 15-minutowym niedokrwieniu półkul, badane przyżyciowo.

Г. И. Мchedlishvili

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЦИРКУЛЯРНОЙ
ГИПОКСИИ (ИШЕМИИ) В ПОЛУШАРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

Статья содержит критический обзор существующих методов, применяющихся в эксперименте для получения циркулярной гипоксии в мозге. Описана новая модель экспериментальной гипоксии (ишемии) в полушариях головного мозга, позволяющая контролировать степень и продолжительность гипоксии. Принцип этого метода заключается в следующем: а) окклюзии обоих общих сонных артерий и б) ограничения коллатерального притока крови в полушариях мозга путем снижения общего артериального давления.

Описаны изменения некоторых показателей метаболизма и микроциркуляции, вызванных действием ишемии в течение 15 мин.

REFERENCES

1. Ames A., Wright L., Kowada M., Thurston J., Majno G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. Amer. J. Pathol., 1968, 52, 437—453.
2. Andreyev L. A.: Functional changes in the brain of the dog after the reduction of blood supply. Arch. Neurol. Psychiat., 1935, 34, 481—508.

3. Anokhin P. K., Anokhina-Ivanova A. P.: Study of the cerebral anemia. *Russk. fiziol. zhurn.*, 1930, 3, 385—392.
4. Begli F., Yamaguchi T., Waltz A. G.: Effects of inhalation of oxygen on blood flow and microvasculature of ischemic and non-ischemic cerebral cortex. *Stroke*, 1970, 1, 314—319.
5. Boyd R. J., Connolly J. E.: Total cerebral ischemia in the dog. Technique of sequelae of total cerebral ischemia. *Arch. Surg.*, 1962, 84, 434—438.
6. Chiang J., Kowada M., Ames A., Wright L., Majno G.: Cerebral ischemia. III Vascular changes. *Amer. J. Pathol.*, 1968, 52, 455—476.
7. Carlyle A., Grayson J.: Factors involved in the control of the cerebral blood flow. *J. Physiol.*, (London) 1956, 133, 10—30.
8. Gannoushkina I. V.: Aftereffects of closure of the intracerebral arteries and veins of the cerebral cortex. *Zh. Nevropat. i Psikhiat.*, 1958, 58, 1025—1031.
9. Harreveld van A.: The electroencephalogram after prolonged brain asphyxiation. *J. Neurophysiol.*, 1947, 10, 361—370.
10. Hirsch H., Euler K. H., Schneider M.: Über die Erholung und Wiederbelebung des Gehirns nach Ischämie bei Normothermie. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1957, 265, 281—313.
11. Hirsch H., Koch D., Krenkel W., Schnellbecher F.: Über die Bedeutung des Abtransportes von Metaboliten (Spülfunktion des Blutes) für die Erholung nach Ischämie. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1957, 265, 337—341.
12. Klosovskii B. N.: The circulation of blood in the brain. Moscow, 1951.
13. Kometiani P. A., Chikvaidze V. N., Svanidze I. K., Mchedlishvili G. I.: Effect of ischemia on some metabolic processes in the central nervous system. In: „Correlation of blood supply with metabolism and function” (ed. by G. I. Mchedlishvili), Tbilisi, 1969, 201—216.
14. Kosmarskaya E. N., Kapustina E. V.: Zones of collateral circulation in the brain. *Byull. Experim. Biol. i Med.*, 1953, No 4, 78—83.
15. Kowada M., Ames A., Majno G., Wright L.: Cerebral ischemia. An improved experimental model for study; cardiovascular effects and demonstration of an early vascular lesion in the rabbit. *J. Neurosurg.*, 1968, 28, 150—157.
16. Kuklina A. S.: Aftereffects of closure of the anterior cerebral arteries in dogs and influence of the manipulation on higher nervous activity. *Vopr. Neurokhir.*, 1957, No 2, 46—50.
17. Kukushkina V. P.: Experimental investigations of the blood supply to the striated system. *Vopr. Neurokhir.*, 1956, No 1, 14—23.
18. Liubomudrov A. P.: Collateral blood supply developing after ligation of the carotid artery and of the vertebral artery in the neck of the dog. *Ztschr. Anat. Entw. Gesch.*, 1929, 91, 452—519.
19. Mchedlishvili G. I.: Changes in the cerebral circulation during resuscitation by intraarterial blood transfusion. *Patol. Fiziol. i Exper. Terap.*, 1960, 4, No 4, 14—20.
20. Mchedlishvili G. I.: Vascular mechanisms of the brain. New York—London 1972.
21. Mchedlishvili G. I., Antia R. V., Mitagvaria N. P., Amashukeli G. V.: The polygraphic studies in vivo of cerebral circulation, respiration and metabolism under conditions of different types of hypoxia. In: „Modern Problems of function and structure of the central nervous system”, Tbilisi 1972, 3 (16), 139—187.

22. Mchedlishvili G. I., Baramidze D. G.: Functional behaviours of the precortical arteries under conditions of experimental hypo- and hypertension. *Byull. Exper. Biol. i Med.*, 1971, 72, No 10, 14—16.
23. Mchedlishvili G. I., Kuparadze M. R., Baramidze D. G.: Dynamics of changes in vessels of the cerebral cortex during the development of postischemic edema. *Byull. Exper. Biol. i Med.*, 1965, 60, No 12, 30—35.
24. Mchedlishvili G. I., Nikolaishvili L. S., Antia R. V., Mitagvaria N. P., Baramidze D. G.: The physiological mechanism of dilatation of the pial arteries in response to a reduced systemic arterial pressure. *Fizjol. Zh. SSSR*, 1971, 56, 240—247.
25. Mchedlishvili G. I., Ormotsadze L. G.: A hemodynamic mechanism compensating for decreased blood supply to the cerebral cortex. *Physiol. Bohemoslov.*, 1963, 12, 100—105.
26. Meyer J. S.: Circulatory changes following occlusion of the middle cerebral artery and their relation to function. *J. Neurosurg.*, 1958, 15, 653—673.
27. Meyer J. S., Gotoh F., Tazaki Y.: Circulation and metabolism following experimental cerebral embolism. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1962, 21, 4—23.
28. Meyer J. S., Gotoh F., Fevale E.: Effects of carotid compression on cerebral metabolism and electroencephalogram. *EEG Clin. Neurophysiol.*, 1965, 19, 362—376.
29. Opitz E., Kreuzer F.: Über das Verhalten des Kaninchengehirns gegenüber Ischämie und Anoxie bei Höhenanpassung unter EEG-Kontrolle. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1955, 260, 480—510.
30. Petrov J. R.: On cerebral anemia in dogs. *Zh. Exper. Biol. i Med.*, 1929, 28, 88—94.
31. Ruščak M.: Changes in the level of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the ischemic brain of rats following application of some stimuli evoking spreading EEG depression. *Physiol. Bohemoslov.*, 1962, 11, 192—198.
32. Symon L.: A comparative study of middle cerebral pressure in dogs and macaques. *J. Physiol. (London)*, 1967, 191, 449—465.
33. Symon L., Khodadad G., Montoya G.: Effect of carbon dioxide inhalation on the pattern of gaseous metabolism in ischaemic zones of primate cortex. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 481—486.
34. Vasilchenko G. S.: Coagulation of the thalamo-tuberine artery for isolated occlusion of the blood supply to the anterior part of the thalamus in dogs. *Vopr. Neurokhir.*, 1956, No 4, 15—18.
35. Vinogradov V. I.: An experimental model of hypoxic edema of the brain. *Patol. Fiziol. i Exper. Terap.*, 1967, 11, No 3, 66.
36. Wexler B. C., Saroff J.: Metabolic changes in response to acute cerebral ischemia following unilateral carotid artery ligation in arteriosclerotic versus nonarteriosclerotic rats. *Stroke*, 1970, 1, 38—51.
37. White R. J.: Das isolierte Gehirn. *Naturwissenschaft und Medizin*, 1967, No 17, 32—38.
38. Waltz A. G., Sundt Th. M.: The microvasculature and microcirculation of the cerebral cortex after arterial occlusion. *Brain*, 1967, 90, 681—696.
39. Zozulya Yu. A.: Cerebral circulation during brain tumors. Kiev, 1972.

Author's address: Georgian Academy of Sciences, Institute of Physiology, Voennno-Gruzinskaja dor. 62, Tbilisi S.S.S.R.

LUBOMIRA DYDYK

KRWAWIENIA NARZĄDOWE A NIEDOMOGA OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Maz.
Kierownik: prof. dr E. Osetowska

Obserwacje kliniczne przypadków z przebytymi krwotokami, które kończą się często zejściem śmiertelnym z powodu niewielkiego spadku ciśnienia krwi, lub stosunkowo niedużej utraty krwi i negatywne wyniki badań sekcyjnych skłaniają do poszukiwania przyczyny tych zgonów w mózgu.

Podjęcie badań morfologicznych dla wyjaśnienia zmian mózgowych u ludzi w przypadkach niedokrwienia wynika z braku obserwacji tego typu w literaturze, natomiast liczne doniesienia na temat doświadczalnego niedokrwienia mózgu u zwierząt, skłaniają do porównania wyników badań doświadczalnych z wynikami badań materiału ludzkiego.

Wyodrębnienie niedokrwienia spośród innych rodzajów niedotlenienia wynika z różnicy między ustaniem wszystkich funkcji krwi w niedokrwieniu, a zniesieniem tylko niektórych jej funkcji w innych typach niedotlenienia (Schneider (1969).

Courbier (1964) wyróżnia dwie fazy w okresie poprzedzającym bezpośrednio zatrzymanie krążenia: kompensacyjną (która nie istnieje w przypadkach cardiac arrest) i dekompensacyjną (przy spadku ciśnienia ogólnego krwi poniżej 70 mm Hg). Espagno (1952) wykazał, że przy ciśnieniu tętniczym krwi obwodowej powyżej 70 mm Hg, ciśnienie mózgowie prawie nie ulega zmianie. Przepływ mózgowy zmniejsza się minimalnie, ponieważ pojemność naczyniowa wzrasta o 25% wartości początkowej. Objawy niedotlenienia mózgu występują dopiero przy spadku obwodowego ciśnienia tętniczego krwi poniżej 70 mm Hg. Schneider (1963) określa to ciśnienie mianem krytycznego ciśnienia mózgowego. Zdaniem Schneidera powolne zmiany ciśnienia tętniczego krwi obwodowej wyzwalają w mózgu autoregulację przepływu krwi podobną do stwierdzonej w nerkach. Gdy ciśnienie tętnicze krwi obwodowej spada powoli do

wartości powyżej 70 mm Hg, przepływ mózgowy pozostaje niezmienny, natomiast spadek obwodowego ciśnienia tętniczego krwi poniżej 70 mm Hg oraz gwałtowny jego spadek powodują zmiany mózgowego przepływu krwi równoległe do zmian ciśnienia obwodowego. Autoregulacja w mózgu pozostaje pod wpływem bodźców chemicznych i zmian ciśnienia krwi. Wzrost prężności dwutlenku węgla we krwi prowadzi do zwiększenia przepływu mózgowego na skutek rozszerzenia tętnic mózgowych przy równoczesnym skurczu pozostałych naczyń tętniczych. Spadek ciśnienia tętniczego krwi pobudza czynność autonomicznego układu nerwowego i powoduje zwiększone wydzielanie amin katecholowych przez nadnercza. U człowieka istnieją dwa typy receptorów, które reagują na działanie katecholamin — alfa i beta. W mózgu i sercu nie ma receptorów alfa wrażliwych na działanie adrenaliny i dlatego w następstwie pobudzenia układu współczulnego naczynia mózgowe i wieńcowe nie ulegają skurczowi, co przyczynia się do zachowania prawidłowego krążenia krwi w tych narządach.

Z badań Jacoba (1963) wynika, że zmiany neuronalne zarówno specyficzne jak i niespecyficzne dla niedotlenienia mogą być dostrzeżone już po 30 minutach od wystąpienia anoksji. Jednakże największe zmiany obserwuje się dopiero po 10 godzinach przeżycia. Pierwsze regresywne zmiany gleju występują po 3 godzinach, natomiast rozplem astrocytów i neuronofagia po 14 godzinach. Demielinizacja pojawia się po 18—24 godzinach, a glejoza włóknista po upływie 2—3 dni.

Problem, czy różnym etiologicznie postaciom niedotlenienia odpowiada określona topografia zmian morfologicznych w mózgu, jest nierozstrzygnięty. Lindenberg (1963) uważa, że w obrazie morfologicznym i klinicznym nie stwierdza się różnic zależnych od rodzaju niedotlenienia. Według Scholza i Boellarda (1959) zmiany umiejscowione w korze nowej, korze mózdzku, rogu Amona oraz we wzgórzu i prążkowie są typowe dla niedokrwienia, podczas gdy lokalizacja zmian w gałce bladej, jądrze podwzgórzowym Luysa i jądrze zębatym jest charakterystyczna dla czystego niedotlenienia.

Celem podjętej pracy było przebadanie charakteru i lokalizacji zmian w mózgach ludzi zmarłych z powodu wykrwawienia oraz próba wyodrębnienia niedokrwienia mózgu u ludzi, spośród innych typów niedotlenienia, w oparciu o różnice w topografii uszkodzeń.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na 25 mózgach pochodzących od pacjentów, którzy zmarli z powodu wykrwawienia. W materiale tym 18 mózgów pochodziło z przypadków z jednorazowym krwawieniem, pozostałe 7 —

z przypadków z dwu lub kilkakrotnym krwawieniem. Czas przeżycia chorych z jednorazowym krwawieniem wahał się od 5 godzin do 8 dni, u pozostałych chorych od kilku godzin do 7 dni po ostatnim krwawieniu.

Dane dotyczące płci, wieku, przyczyny krwawienia i czasu przeżycia pacjentów oraz towarzyszących chorób zestawiono w tabeli 1 i 2.

Do badania otrzymano mózgi w całości utrwalone w 10% roztworze formaliny. Materiał sekcjonowano w płaszczyźnie czołowej metodą Spielmeyera. Do badania mikroskopowego pobierano trzy wycinki przez półkulę: na poziomie wczesnych zwojów podstawy, wzgórze z rogiem Amona oraz styku ciemieniowo-potylicznego, ponadto śródmózgowie, opuszkę i mózdzek. Pobrany materiał przeprowadzono w sposób standardowy do parafiny. Preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, met. Heidenhaina, Holmesa, Kanzler-Arendta i van Gieson. Materiał opracowano w dwóch grupach. W grupie pierwszej zebrano przypadki z jednorazowym krwawieniem, w grupie drugiej przypadki z kilkakrotnymi krwawieniami.

WYNIKI

Sekcja mózgow wykazała: w trzech przypadkach znacznie nasilone zaniki, w czterech przypadkach ślady po wklinowaniu do otworu potylicznego wielkiego i w dziewięciu — miażdżycę naczyń podstawy mózgu o różnym nasileniu. Mózgi na przekrojach były blade.

Grupa I — przypadki z jednorazowym krwawieniem.

Badaniem mikroskopowym we wszystkich przypadkach stwierdzono rozsiane, miejscami warstwowe ubytki komórek nerwowych w korze mózgu, liczne drobne pola opustoszeń we wszystkich warstwach kory i uszkodzenie neurocytów, głównie o typie schorzenia ischemicznego (ryc. 1). Odcinkowe ubytki warstwowe najczęściej w III, lub w III i V warstwie kory stwierdzono w połowie przypadków. W dwóch przypadkach ubytki komórkowe były bardziej rozległe i tworzyły ogniska selektywnej martwicy, zajmującej kilka warstw kory (ryc. 2).

Nie stwierdzono wyraźnego powiązania topograficznego ubytków komórkowych z naczyniami. Półka opustoszeń neuronalnych występowały zarówno przynacyniowo jak też niezależnie od naczyń. Jedynie w trzech przypadkach z bardzo zaawansowanymi zmianami stwardnieniowymi ścian naczyń stwierdzono większą predylekcję opustoszeń do układu naczyniowego. Największe nasilenie zmian obserwowano na poziomie pogranicza ciemieniowo-potylicznego, zwłaszcza w korze płaciaków ciemieniowych górnych i dolnych, w obrębie których kora była zawsze znacznie przerzedzona, ubogokomórkowa. W czterech przypadkach ubytki komórkowe były wyraźnie większe w zawojach czołowych

Tabela 1. Kliniczne dane przypadków z jednorazowym krwawieniem

Table 1. Clinical data of cases with one time hemorrhage

Lp. No.	Nr przypadku Number of cases	Płeć Sex	Wiek Age	Przyczyna wykrwawienia Cause of hemorrhage	Choroby towarzyszące Concomitant diseases	Czas przeżycia Time of survival
1	68/69	kobieta woman	56	<i>Haemorrhagia e pulmone</i>	<i>Struma toxica</i>	5 godzin hrs
2	50/68	mężczyzna man	62	<i>Haemorrhagia post operationem aneurysmae myocardii</i>		5 „
3	82/68	mężczyzna man	45	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>		6 „
4	78/69	mężczyzna man	21	<i>Haemorrhagia e ventri- culo</i>	<i>Torsio mesenterii</i>	6 „
5	69/69	mężczyzna man	74	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>		9 „
6	66/69	kobieta woman	77	<i>Haemorrhagia ex aneu- ryσμα aortae abdomi- nalis</i>		12 „
7	61/69	kobieta woman	65	<i>Haemorrhagia ex aneu- ryσμα aortae thoracalis</i>		12 „

8	70/69	mężczyzna man	71	<i>Haemorrhagia ex ulcere duodeni</i>		1 dzień day
9	110/68	mężczyzna man	48	<i>Haemorrhagia subphre- nica</i>	<i>Carcinoma et cirrhosis hepatis. Diabetes mel- litus</i>	1 „
10	57/69	mężczyzna man	46	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>	<i>Tuberculosis pulmonum</i>	2 dni days
11	115/68	mężczyzna man	60	<i>Haemorrhagia post operationem modo Cril</i>	<i>Carcinoma laryngis</i>	2 „
12	49/68	kobieta woman	82	<i>Haemorrhagia ex intestinis</i>		2 „
13	81/68	mężczyzna man	59	<i>Haemorrhagia e varici- bus oesophagii</i>	<i>Cirrhosis hepatis</i>	3 „
14	112/68	kobieta woman	81	<i>Haemorrhagia ex ulcere duodeni</i>	<i>Tuberculosis pulmonum</i>	4 „
15	114/68	mężczyzna man	70	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>	<i>Tuberculosis pulmonum</i>	4 „
16	51/68	mężczyzna man	36	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>	<i>Cirrhosis hepatis. Uraemia. Diabetes mel- litus</i>	6 „
17	59/69	mężczyzna man	72	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>		7 „
18	53/68	mężczyzna man	53	<i>Haemorrhagia ex ulcere ventriculi</i>		8 „

Tabela 2. Kliniczne dane przypadków z kilkakrotnymi krwawieniami

Table 2. Clinical data of cases with several times hemorrhage

Lp. No.	Nr przypadku Number of cases	Płeć Sex	Wiek Age	Przyczyna wykrwawienia Cause of hemorrhage	Choroby towarzyszące Concomitant diseases	Czas przeżycia Time of survival
1	58/69	mężczyzna man	42	<i>Haemorrhagia e varicibus oesophagii</i>	<i>Cirrhosis hepatis</i> <i>Tuberculosis pulmonum</i>	11 godz. po I krwawieniu, kilka godz. po II krwawieniu 11 hrs after Ist hemorrhage several hrs after IIInd hemorrhage
2	67/69	mężczyzna man	66	<i>Haemorrhagia e varicibus oesophagii</i>	<i>Cirrhosis hepatis</i> <i>Alcoholismus chronicus</i>	1 rok po I krwawieniu, 1 dzień po II krwawieniu 1 year after Ist hemorrhage 1 day after IIInd hemorrhage
3	11/68	mężczyzna man	68	<i>Haemorrhagia ex ulcere duodeni</i>		4 dni po I krwawieniu 1 dzień po II krwawieniu 4 days after Ist hemorrhage 1 day after IIInd hemorrhage

4	54/68	mężczyzna man	45	<i>Haemorrhagia e varicibus oesophagii</i>	<i>Cirrhosis hepatis</i>	5 dni po I krwawieniu, kilkanaście godz. po II krwawieniu 5 days after Ist hemorrhage several hrs after IInd hemorrhage
5	55/68	mężczyzna man	61	<i>Haemorrhagia e varicibus oesophagii</i>	<i>Cirrhosis hepatis</i>	w ciągu 4 ostatnich lat 6 krwotoków, 7 dni po ostatnim krwawieniu during 4 last years 6 times hemorrhage 7 days after last hemorrhage
6	83/68	mężczyzna man	44	<i>Haemorrhagia e ventriculo</i>		7 dni po I krwawieniu, 10 godz. po II krwawieniu 7 days after Ist hemorrhage 10 hrs after IInd hemorrhage
7	80/68	kobieta woman	67	<i>Haemorrhagia ex ulceratione neoplasmatica in regione inguinale dextra</i>	<i>Carcinoma vaginae</i> <i>Diabetes mellitus</i>	8 dni po I krwawieniu, 6 dni po II krwawieniu 8 days after Ist hemorrhage 6 days after IInd hemorrhage

górných, w ich obrębie zlokalizowane były również wspomniane poprzednio pola wybiórczych martwic. W płatach skroniowych rozleglejsze ubytki występowały w zawojach skroniowych górnych i w zawojach hipokampa. W siedmiu przypadkach stwierdzono w korze stopy hipokampa w sektorze Sommera odcinkowe ubytki komórek nerwowych (ryc. 3). W większości przypadków przerzedzenia i ubytki komórkowe w płacie potylicznym były wyraźnie mniejsze niż w przednich częściach mózgowia.

Zachowane komórki nerwowe kory wykazywały uszkodzenia o różnym stopniu nasilenia, na ogół proporcjonalnie do ubytków komórkowych. Najczęściej obserwowano schorzenie ischemiczne komórek oraz cienie zanikających neuronów, następnie zmiany ciężkie, od tigliolizy aż do całkowitego rozpadu (ryc. 4).

Ponadto w części przypadków stwierdzono zwyrodnienie barwikowe neurocytów z gromadzeniem lipofuscyny.

Zmiany neuronalne w korze miały charakter bezodczynowy, albo towarzyszył im rozplęgnięcie gleju głównie astrocytów. W niektórych przypadkach obserwowano pomnożenie komórek oligodendrogleju i zwiększoną satelitozę. W części przypadków zaznaczało się wyraźne nasilenie glejocy podwyściółkowej i podoponowej.

W prążkowie, podobnie jak w korze mózgowej dominowały ubytki i uszkodzenia neuronów. Ubytki komórkowe miały charakter rozsiany i dotyczyły w większości przypadków w równym stopniu małych i dużych neuronów. W zachowanych neuronach prążkowie obserwowano najczęściej dwa rodzaje zmian: w komórkach małych schorzenie ischemiczne, w komórkach dużych zmiany ciężkie i rozplęgnięcie się. Stosunkowo dobrze zachowane były komórki gałki bladej. We wzgórzu, w którym ubytki neuronów były na ogół niewielkie, prawie we wszystkich przypadkach stwierdzano największe nasilenie zmian w części brzusznej jądra bocznego.

W istocie białej stwierdzono rozlane spłowienie mieliny zwłaszcza w ośrodku półowalnym, któremu towarzyszyło znaczne rozrzedzenie struktury podłoża (ryc. 5). Przestrzenie okołonaczyniowe były poszerzone z widocznym obrzękowym rozluźnieniem tkanki na pograniczu naczyniowo-tkankowym (ryc. 6). W kilku przypadkach wybitna glejoza włóknista zaznaczała się w płacie skroniowym, zwłaszcza w zawoju skroniowym dolnym (ryc. 7).

W śródmózgowiu ubytki i uszkodzenia komórkowe były stosunkowo mało nasilone, przy tym większe w jądrze czerwonym, niż w istocie czarnej. W opuszcze w większości przypadków stwierdzono uszkodzenie

istoty siateczkowatej (ryc. 8 i 9) i oliw dolnych. Często obserwowano wybitnie nasiloną glejozę włóknistą we wnękach i jądrach oliw (ryc. 10).

W mózdzku występowały odcinkowe lub rozsiane ubytki, bądź to wyłącznie komórek Purkinjego, bądź też z towarzyszącym przerzedzeniem warstwy ziarnistej (ryc. 11). We wszystkich przypadkach zachowane komórki Purkinjego wykazywały mniej lub bardziej uogólnione zmiany typu schorzenia homogenizacyjnego. W części przypadków stwierdzono duże opustoszenia komórkowe i nasilone zmiany ischemiczne w neuronach jądra zębatego. Istota biała mózdzku wykazywała zmiany podobne do stwierdzanych w istocie białej półkul mózgowych.

W ścianie tętnic zarówno śródmózgowych jak i oponowych obserwowano zmiany włókniste lub szkliste o różnym nasileniu.

Opony poza niewielkim obrzękiem stwierdzanym w części przypadków nie wykazywały zmian lub jedynie zwłóknienie tkanki łącznej.

Grupa II — przypadki z kilkakrotnymi krwawieniami.

Charakter i lokalizacja uszkodzeń były takie same, jak w poprzedniej grupie, stwierdzono natomiast większe nasilenie obserwowanych zmian.

W obu grupach w przypadkach powikłanych uszkodzeniem narządów miąższowych obserwowano ponadto zmiany związane z podstawowym procesem chorobowym. W marskości wątroby stwierdzono obecność komórek Alzheimera typu II (ryc. 12), brak odczynu włóknistego gleju i ogniska stanu gąbczastego w okolicach korowo-podkorowych, w skorupie jądra soczewkowatego i w jądrze zębatym mózdzku. W mocznicy tzw. rzekomej obserwowano w warstwie drobinowej kory mózgu liczne pałeczkowate formy mikrogleju.

OMÓWIENIE

W uzyskanych wynikach przede wszystkim zwraca uwagę powtarzająca się, jednakowa w obu grupach topografia zmian neuronalnych. We wszystkich przypadkach uszkodzenie dotyczy kory mózgowej, zwłaszcza pogranicza ciemieniowo-potylicznego, płata czołowego, zawoju skroniowego górnego i hipokampa oraz kory mózdzku, jądra zębatego, wzgórze, skorupy i istoty siateczkowatej opuszki, w większości przypadków również oliw dolnych i sektora Sommera.

Lokalizacja zmian neuronalnych w opuszce i korze sugeruje uszkodzenie ośrodków regulacji krążenia i oddychania w rdzeniu przedłużonym, a także ich ośrodków nadrzędnych w korze mózgu. Baker i wsp. (1950), badając współzależność objawów klinicznych i zmian neuropatologicznych w przypadkach *poliomyelitis bulbaris* stwierdzili, że obustronne uszkodzenie neuronów przyśrodkowych istoty siateczkowatej

opuszki dolnej prowadzi do zapaści krążeniowej, natomiast obustronne uszkodzenie neuronów bocznych istoty siateczkowej opuszki górnej wywołuje zaburzenia oddechu. Ośrodki te pozostają pod wpływem impulsów korowych. Folkow (1955) wykazał, że zmiany ciśnienia tętniczego krwi mogą być wywołane przez pobudzenie okolicy ruchowej kory, powierzchni oczodołowej płata czołowego, okolicy skroniowej przedniej i wyspy. Neurony tych okolic pełnią funkcję nadrzędnych ośrodków regulacji krążenia. Badania prowadzone przez fizjologów wykazały obecność neuronów związanych z regulacją oddychania w korze wyspy.

W badanych przypadkach wykluczono wpływ innych czynników chorobowych, można więc przyjąć, że obserwowane zmiany spowodowane są niedokrwieniem tkanki. Różnice w topografii zmian anoksyjnych i ischemicznych uzasadnia Lampert (1961) zróżnicowaniem biochemicznym struktur mózgowych. Struktury bogate w enzymy uczestniczące w glikolizie beztlenowej są mniej wrażliwe na niedotlenienie. Ponieważ energia otrzymywana z glikolizy beztlenowej jest o wiele mniejsza od otrzymywanej z glikolizy tlenowej, w niedotlenieniu istnieje duże zapotrzebowanie energetyczne na glukozę. Zostało to potwierdzone w pracach Hieslanda i Nelsona (1945), którzy wykazali, że hyperglikemia może przedłużyć czas przeżycia w przebiegu niedotlenienia. Niedokrwienie, w którym występuje nie tylko brak tlenu, lecz również brak glukozy, prowadzi do cięższych zmian, niż niedotlenienie.

Charakterystycznym zjawiskiem w anoksyjnych uszkodzeniach mózgu jest występowanie zaburzeń czynnościowych i zmian morfologicznych dopiero po upływie pewnego czasu od momentu zadziałania niedotlenienia. Opóźnione ujawnianie się uszkodzeń sugeruje bądź to ilościowe narastanie zmian, bądź też istnienie łańcucha zaburzeń. Cameron i Abraham (1962) traktują zmiany biochemiczne jako pierwotne zaburzenie, prowadzące do powstania strukturalnych uszkodzeń tkanki.

Nasilenie ubytków i uszkodzeń komórkowych wzrasta w przypadkach drugiej grupy, w której na zmiany powstałe podczas poprzednich krwotoków nakładają się zmiany świeże. Różnice w nasileniu zmian w poszczególnych strukturach mózgu, w tym samym przypadku, są uwarunkowane niejednakową wrażliwością tych struktur na niedotlenienie.

Wrażliwość poszczególnych struktur na niedotlenienie, między innymi, jest zależna od unaczynienia. W badanym materiale zależność tę obserwuje się przede wszystkim w korze mózgu, w której zmiany neuronalne są najbardziej nasilone w pogranicznych strefach unaczynienia tętnicy mózgu przedniej i środkowej oraz tętnicy mózgu środkowej i tylnej.

Schneider (1951) porównuje układ naczyniowy mózgu z systemem kanałów nawadniających, a Zülch (1955) umiejscawia pola tzw. ostatniej łąki w strefach pogranicznych dużych pni tętniczych.

Uszkodzenia stwierdzone w obrębie istoty szarej ograniczone są wyłącznie do komórek nerwowych, glej prawie we wszystkich przypadkach reaguje mniej lub bardziej nasilonym rozrostem i rozplemem. Zmiany te określa Spielmeyer (1927) jako wybiórczą martwicę mięszową, która występuje w etiologicznie różnych postaciach niedotlenienia tkanki nerwowej. Nasilenie glejozy komórkowej i włóknistej zwiększa się wraz z czasem przeżycia pacjentów, toteż częstość występowania tych odczynów jest większa w przypadkach drugiej grupy. Obrzęk obserwowany we wszystkich przypadkach występuje najwyraźniej w istocie białej. W przypadkach z dłuższym przeżyciem zaznaczone są zmiany demielinizacyjne, nasilające się proporcjonalnie do obrzęku, co wskazuje na ich obrzękowo-pochodny charakter.

Spśród 25 opisanych przypadków dodatkowego omówienia wymagają wykrwawienia w przebiegu schorzeń, które powodują występowanie zmian w tkance nerwowej. Należy tu siedem przypadków marskości wątroby, przypadek mocznicy pozanerkowej i przypadek przewlekłego alkoholizmu. W przypadkach powikłanych marskością wątroby, obserwowano cechy uszkodzenia gleju w postaci braku odczynu włóknistego oraz obecności tzw. nagich jąder. Według Mossakowskiego (1966) uszkodzeniu włókien glejowych towarzyszy wyrównawczy rozplem i przerost astrogleju oraz pojawienie się komórek Alzheimera typu II, które są wyrazem zwyrodnienia gleju. O uszkodzeniu gleju świadczą również opisane ogniska stanu gąbczastego, których lokalizacja w okolicach korowo-podkorowych, jądrze zębatym mózdzku i skorupie jądra soczewkowatego sugeruje wpływ czynnika naczyniowego. W oparciu o prace Lazorthesa i wsp. (1960) oraz van den Bergha (1961) okolice korowo-podkorowe, jądro zębate i skorupę można zaliczyć do struktur posiadających uboższe unaczynienie i mniejsze możliwości wyrównania zaburzeń poprzez krążenie oboczne.

Przypadek mocznicy tzw. rzekomej, poza zmianami anoksyjnymi i obrzękowymi oraz obecnością w warstwie drobinowej kory mózgu licznych pałeczek mikrogleju, spotykanych bardzo często w stanach mocznicowych (Osetowska, Mossakowski (1963) nie wykazywał innych zmian charakterystycznych dla mocznicy pozanerkowej.

W doświadczalnym niedokrwieniu mózgu topografia stwierdzanych zmian i częstość ich występowania w poszczególnych strukturach przedstawiają się następująco: kora mózgu (przede wszystkim warstwa III, lub II i III), kora mózdzku (zwłaszcza komórki Purkiniego), wzgórze

(szczególnie jądro przednie lub jądro brzuszne), hipokamp (sektor h_2 , lub h_2 i h_1), prążkowie i istota biała (Brierley, Excell 1966, Colmant 1965, Levine 1960, Lucas, Strangways 1963).

W materiale doświadczalnym Korthalsa (1969) topografia obserwowanych zmian była podobna do topografii zmian w materiale ludzkim. Istniejące różnice w topografii, jak również w częstości występowania zmian neuronalnych zwiększało się w przypadkach z dwukrotnymi i króliczych, należy łączyć z różnicami w unaczynieniu i metabolizmie tych struktur. W materiale doświadczalnym Korthalsa (1969) nasilenie zmian neuronalnych zwiększało się w przypadkach z dwukrotnymi upustami, podobnie jak u pacjentów z kilkakrotnymi krwawieniami. Czas przeżycia zarówno u ludzi jak i u królików wyraźnie wpływa na zwiększenie odczynu glejowego.

WNIOSKI

1. Krwotoki narządowe są przyczyną powstawania w ośrodkowym układzie nerwowym zmian morfologicznych o charakterze ubytków i uszkodzeń neuronalnych.

2. Topografia zmian jednakowa w większości przypadków sugeruje możliwość wyodrębnienia niedokrwienia spośród innych rodzajów niedotlenienia.

3. W zabiegach chirurgicznych przeprowadzanych na chorych z przebytymi dużymi krwawieniami należy się liczyć z zaburzoną regulacją krążenia i oddychania na skutek organicznych uszkodzeń mózgu w następstwie krwotoku.

Л. Дыдык

КРОВОТЕЧЕНИЯ ОРГАНОВ И НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Автор исследовала характер и топографию морфологических изменений в мозгах пациентов, умерших на обескровливание. Материал, охватывающий 25 мозгов, разделен на 2 группы. Первая группа насчитывала 18 случаев с однократным кровотоком в истории болезни, со временем прожития от 5 часов до 8 дней, вторая — 7 случаев с двумя или несколькими кровотоками, со временем прожития от 11 часов до 4 дней от последнего кровотока.

В центральной нервной системе установлены простирания изменения характера клеточных болезней и нейронных потерь (рассеянных, локальных и послойных) безреактивных и с сопровождающим репаративным реакциям глии

различной интенсивности. Нарушение клеток объявлялось, в основном, в виде тяжелого и гомогенизационного ишемического заболевания.

Во всех случаях установлены черты отека и сопровождающие отек изменения в ткани, усиление которых было обусловлено временем жизни пациентов. Наиболее сильные изменения были в коре, особенно на теменно-затылочной границе, в сером бугре, клетках Пуркиньи, в зубчатом ядре мозжечка и в нижних оливах. Типография и характер изменений были одинаковы в двух группах, а их большее усиление наблюдалось в случаях с несколькими кровотечениями. Морфологические изменения в сетчатой формации продолговатого мозга, обнаруженные во всех изучаемых случаях, могут быть причиной функционального расстройства дыхательного центра и кровообращения. С органическим повреждением этих центров следует считаться в случае проведения хирургической операции у пациентов с перенесенными большими кровотечениями.

Совокупность наблюдаемых изменений, особенно их локализация, указывают на некоторые топографические особенности, вызванные ишемией, по сравнению с другими формами гипоксемии нервной системы.

L. Dydyk

ORGAN HEMORRHAGES AND DYSFUNCTION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Summary

The author has examined the character and topography of morphological changes in the brains of patients who died for exsanguination. The material, comprising 25 brains, has been divided into 2 groups. The first group included 18 cases with one time hemorrhage and the survival ranging from 5 hrs to 8 days, the second — 7 cases with two or several times hemorrhage and the survival after last bleeding from several hrs to 7 days.

In the central nervous system, diffuse changes were found, characterized by cellular damages and disseminated, focal and laminar neuronal losses, the changes being either reaction-free or accompanied by glia proliferation of varying intensity. The cell impairment was mainly manifested in the form of ischemic, severe and homogenising disease. In all the cases, features of edema and edema induced changes were stated in the tissue, their intensity being related to the time of survival of the patient. The neuronal changes were more intensive in the cortex, especially in the parieto-occipital region as well as in thalamus, Purkinje cells and dentate nucleus of cerebellum and lower olives. The topography and character of changes were identical in both groups, their intensity being higher in the cases with repeated hemorrhages. The morphological changes in the reticular formation of medulla oblongata observed in all the cases, might have been responsible for the dysfunction of respiratory and circulatory centres. Organic impairment of these centres has to be taken into account in cases when surgical operations are performed in patients who in the past suffered extensive hemorrhages.

The character of the observed changes and in particular their localization suggests differences in ischemia as compared to other forms of hypoxia of the nervous system.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker A. B., Howard A., Matske and Brown J. R.: Poliomyelitis III. Bulbar poliomyelitis. A study of medullary function. *A.M.A. Arch. Neur. Psych.*, 1950, 63, 257—281.
2. Van den Bergh R.: La vascularisation arterielle intracerebrale. *Acta Neurol. Belg.*, 1961, 11, 1013—1023.
3. Cameron G. R., Abraham C. P.: *General Pathology*. Ed. H. Florey, London 1962, 382—391.
4. Colmant H. J.: Zerebrale Hypoxie. In: *Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*. Ed. W. Bergmann, W. Doerr, Thieme, Stuttgart 1965, 16, 1—93.
5. Courbier R., Torresani J.: *L'Arret Circulatoire*. Masson et Cie. Paris 1964, 38—39.
6. Espagno J.: *Le débit sanguin cérébral*. Thèse Toulouse, 1052.
7. Folkow B.: Nervous control of the blood vessels. *Physiol. Rev.*, 1955, 35, 629—663.
8. Hiesland W. A. and Nelson J. W.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1945, 59, 258—262.
9. Jacob H.: C.N.S. tissue and cellular pathology in hypoxaemic states. In: *Selective Vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Ed. J. P. Schadé, W. H. McMenemey. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1963, 153—163.
10. Korthals J.: Doświadczalne niedokrwienie mózgu u królika. *Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 113—158.
11. Lampert P.: The selective vulnerability of the brain to anoxia. *Canad. Med. Assoc. J.*, 1961, 84, 1172—1176.
12. Lazorthes G., Poulhes J., Bastide G., Rouleau J., Amarol-Gomez F.: *Les grands courants arteriels du cerveau. Recherche anatomique et deductions sur la pathogenie et la topographie des hemorrhagies cerebrales*. La Press Medicale 1960, 68, 137—140.
13. Levine S.: Anoxic — ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.*, 1960, 36, 1—17.
14. Lindenberg R.: Patterns of CNS vulnerability in acute hypoxaemia including anaesthesia accidents. In: *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Ed. J. P. Schadé, W. N. McMenemey, Blackwell. Oxford 1963, 189—209.
15. Lucas B. G. B., Strangways D. H.: Experimental cerebral anoxia. *J. Path. Bact.*, 1963, 86, 273—281.
16. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, IV, 2, 231—304.
17. Osetowska E., Mossakowski M. J.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w stanach mocznicowych. *Neuropat. Pol.*, 1963, 1, 101—122.
18. Schneider M.: Critical blood pressure in the cerebral circulation. In: *Selective Vuln. of the brain in hypoxaemia*. Ed. J. P. Schadé, Blackwell, Oxford 1963, 7—20.
19. Schneider M.: *Kreislauf und Gehirn*. Steinkopf, Heidelberg, 1951.
20. Schneider M.: Survival and revival of the brain in anoxia and ischemia. In: *Cerebral anoxia and the electroencephalogram*, E. H. Gastaut, J. S. Meyer. Thomas, Springfield 1969, 134—143.

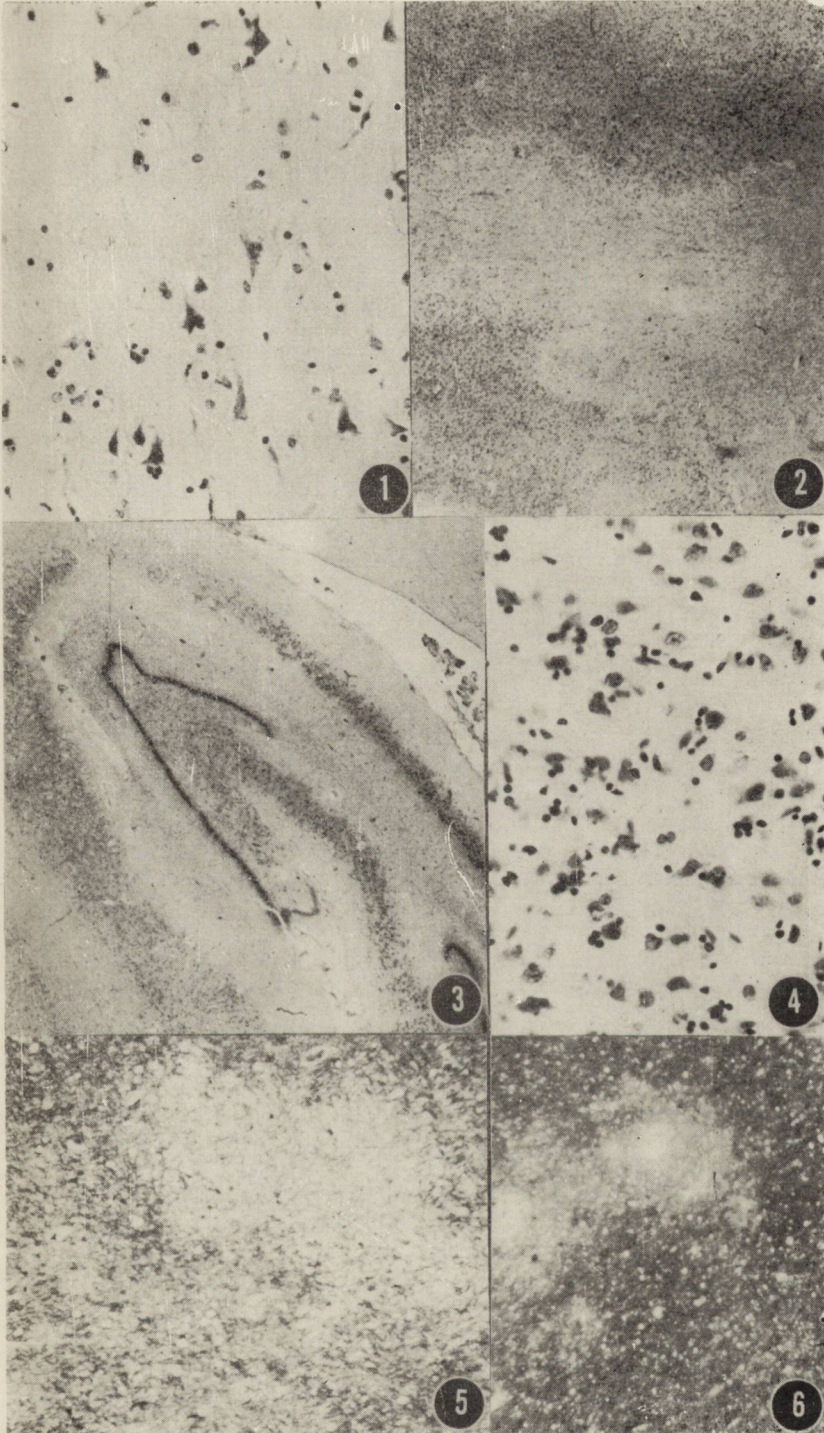
21. Scholz W., Boellard J. W.: Toxicity changes in the central nervous system. Part I. The morphologic pattern of oxygen deficiency in the human brain. Astia Rep. Contract A. F., 1959, 524—545.
22. Spielmeier W.: Zeitschr. Neurol. 1927, 109, 501.
23. Zülch K. J.: On the circulatory disturbances in the borderline zones of the cerebral and spinal vessels. Proc. of the II. International Congress of Neurology 1955, Ex. Med. Found., Amsterdam 1955.

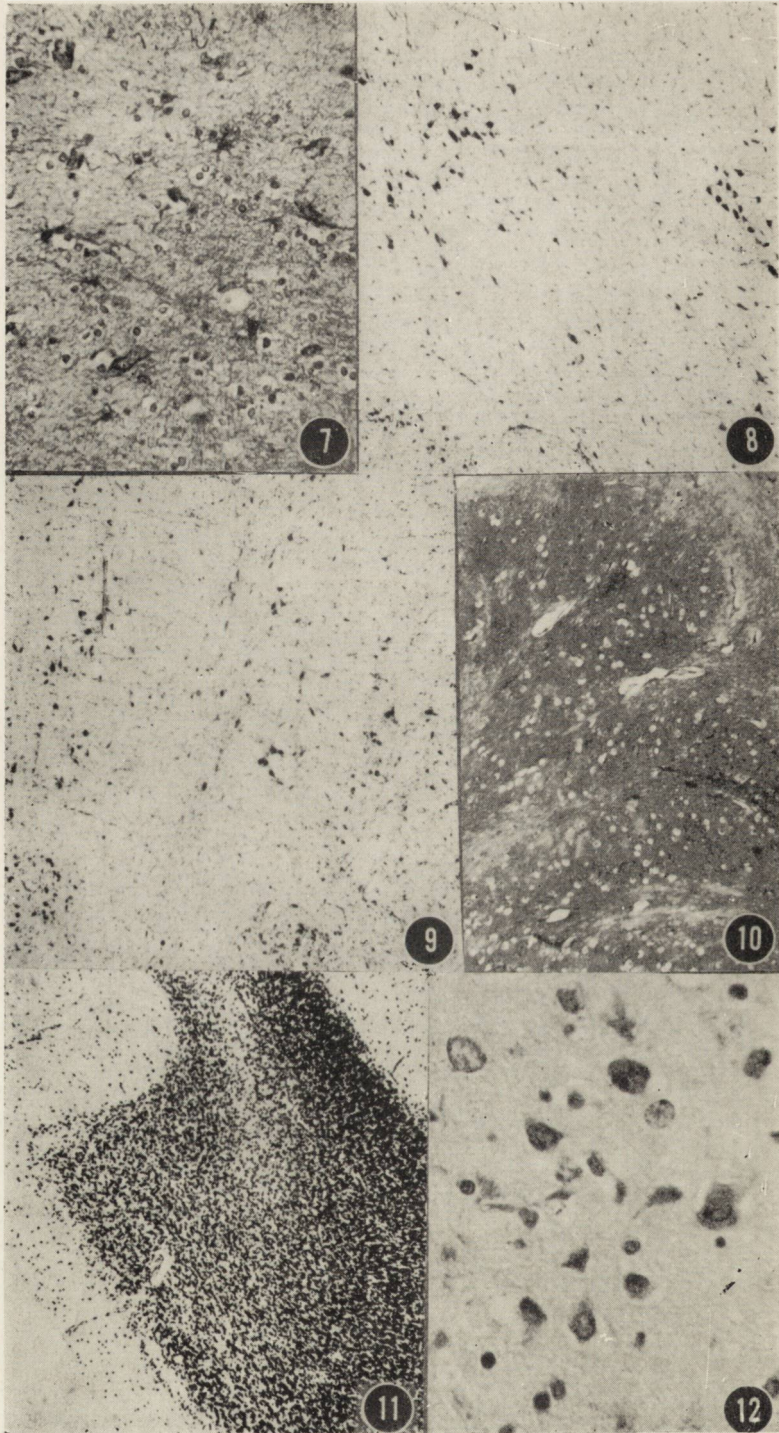
Adres autora: Zespół Neuropatologii C.M.D. i K. PAN, Warszawa, ul. Pasteura 3.

PODPISY POD RYCINY

LEGENDS FOR FIGURES

- Ryc. 1.* Przyp. 59/69. Ubytki komórkowe i schorzenie ischemiczne neuronów w korze mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 200×.
- Fig. 1.* Case No 59/69. Neuronal loss and ischemic changes in cerebral cortex. Cresyl violet. ×200.
- Ryc. 2.* Przyp. 57/69. Pólka martwicy w korze mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.
- Fig. 2.* Case No 57/69. Areas of necrosis in cerebral cortex. Cresyl violet. Magn. glass.
- Ryc. 3.* Przyp. 70/69. Przerzedzenie neuronów w sektorze Sommera. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.
- Fig. 3.* Case No 70/69. Rarefactions of neurons in Sommer's sector. Cresyl violet. Magn. glass.
- Ryc. 4.* Przyp. 59/69. Cienie komórek nerwowych, tigróliza, zmiany ischemiczne i rozpad neuronów w korze mózgu. Widoczny również rozplem gleju komórkowego. Fiolet krezyłu. Pow. 200×.
- Fig. 4.* Case No 59/69. Shadows of nerve cells with concomitant glia reaction. Cresyl violet. ×200.
- Ryc. 5.* Przyp. 53/68. Uszkodzenie mieliny w istocie białej półkul mózgowych. Met. Heidenhaina. Pow. 30×.
- Fig. 5.* Case No 53/68. Damage of myelin in cerebral white matter. Heidenhain meth. ×30.
- Ryc. 6.* Przyp. 69/69. Okołonaczyniowe spłowienie mieliny w istocie białej półkul mózgowych. Met. Heidenhaina. Pow. 30×.
- Fig. 6.* Case No 69/69. Perivascular myelin pallor in cerebral white matter. Heidenhain meth. ×30.
- Ryc. 7.* Przyp. 112/68. Glejoza włóknista w istocie białej płata skroniowego. Met. Kanzler-Arendta. Pow. 200×.
- Fig. 7.* Case No 112/68. Fibrous gliosis in white matter of temporal gyrus. Kanzler-Arendt meth. ×200.
- Ryc. 8.* Przyp. 66/69. Ubytki neuronów w obrębie ośrodka oddechowego w istocie siateczkowatej opuszki górnej. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.
- Fig. 8.* Case No 66/69. Loss of nerve cells in respiratory centre in reticular formation in upper part of medulla oblongata. Cresyl violet. Magn. glass.
- Ryc. 9.* Przyp. 61/69. Ubytki neuronów w obrębie ośrodka regulacji krążenia w istocie siateczkowatej opuszki dolnej. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.
- Fig. 9.* Case No 61/69. Loss of nerve cells in respiratory centre in reticular formation in lower part of medulla oblongata. Cresyl violet. Magn. glass.
- Ryc. 10.* Przyp. 53/68. Glejoza włóknista w oliwach dolnych. Met. Kanzler-Arendta. Pow. 30×.
- Fig. 10.* Case No 53/68. Fibrous gliosis in inferior olive. Kanzler-Arendt meth. ×30.
- Ryc. 11.* Przyp. 83/68. Przerzedzenie warstwy ziarnistej i ubytki komórek Purkiniego w korze mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100×.
- Fig. 11.* Case No 83/68. Rarefaction of granular layer and loss of Purkinje cells in cerebellum. Cresyl violet. ×100.
- Ryc. 12.* Przyp. 65/68. Nagie jądra w jądrze zębatym. Fiolet krezyłu. Pow. 400×.
- Fig. 12.* Case No 65/68. Naked nuclei in dentate nucleus. Cresyl violet. ×400.





JAN KORTHALS, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI, M. ŚMIAŁEK

OBRAZ HISTOLOGICZNY I ULTRASTRUKTURALNY
OSTREJ DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII
TLENKOWĘGLOWEJ *Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

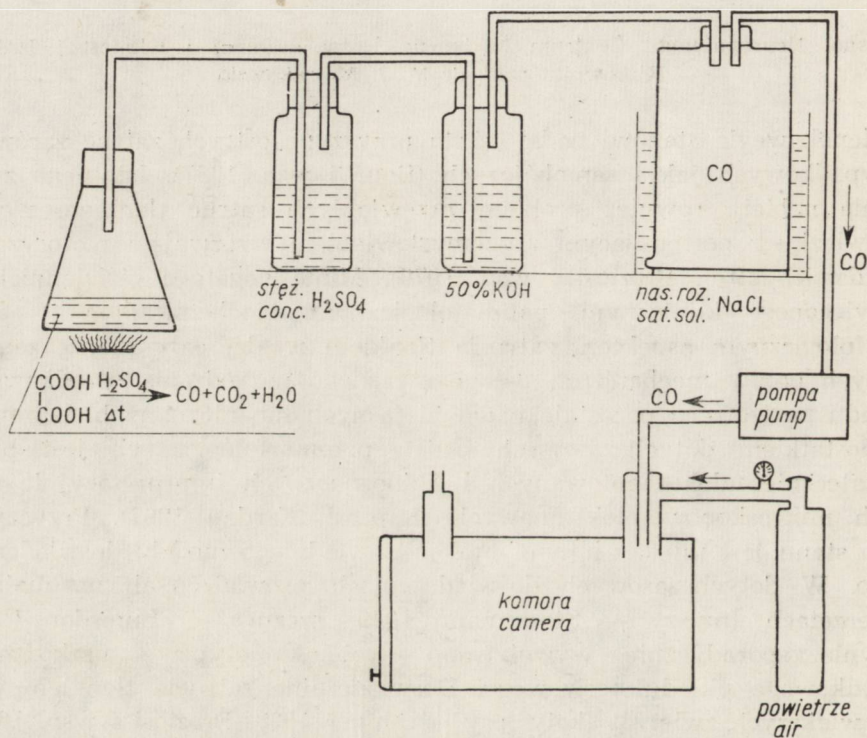
Tlenek węgla stanowi nadal częstą przyczynę ostrych zatruc zarówno przypadkowych jak i samobójczych (Bour i wsp. 1967). Istotnego znaczenia nabiera również problem przewlekłych zatruc tlenkiem węgla w związku z postępującym uprzemysłowieniem i rozwojem motoryzacji (Goldsmith 1970, Preziosi i wsp. 1970). Mimo bogatego piśmiennictwa poświęconego klinicznemu, patofizjologicznemu, biochemicznemu i patomorfologicznemu aspektom zatrucia tlenkiem węgla, cały szereg zasadniczych ogniw mechanizmu patogenetycznego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego pozostaje nadal niejasnych lub nieznanych. Istotnym niedostatkim dotychczasowych badań patomorfologicznych jest brak dostatecznie udokumentowanych i jednoznacznych interpretacyjnie danych mikroskopowo-elektronowych (Lapresl, Fardau 1967). Przyczyną tego stanu jest między innymi brak odpowiedniego modelu doświadczalnego. W dotychczasowych doświadczeniach prowadzonych na małych zwierzętach (myszy — Strassmann 1949, szczury — Lumsden 1950) jedynie sporadycznie wywoływano drobne nietypowe uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Doświadczalne zatrucie tlenkiem węgla większych zwierząt (koty, psy — Meyer 1928, Preziosi i wsp. 1970) prowadziło wprawdzie w części przypadków do powstawania charakterystycznych dla encefalopatii tlenkowęgłowej zmian w strukturach szarych i w istocie białej mózgu, jednakże ze względu na ich nieregularne występowanie oraz niestałą lokalizację i związane z tym trudności pobrania odpowiednich wycinków tkankowych, nie można było przeprowadzić na tych modelach doświadczalnych systematycznych badań mikroskopowo-elektronowych.

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

Celem niniejszej pracy było uzyskanie powtarzalnego modelu doświadczalnej encefalopatii tlenkowej i przedstawienie jego ogólnej charakterystyki histologicznej i mikroskopowo-elektronowej.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na szczurach białych rasy Wistar, obu płci. Zwierzęta doświadczalne umieszczano w 60-litrowej komorze, przez którą przepuszczano mieszaninę powietrza i tlenku węgla. Tlenek węgla otrzymywano z rozkładu kwasu szczawowego, w sposób przedstawiony na schemacie 1.



Schemat 1. Generacja tlenku węgla oraz układ modelu doświadczalnego.
Diagram 1. Carbon monoxide generation and the system of the experimental model.

W poszukiwaniu modelu doświadczalnego badania przeprowadzono w 5 grupach, przedstawionych w tabeli 1, różniących się między sobą czasem zatrucia i jego stopniem, wyrażającym się procentową zawartością hemoglobiny tlenkowej we krwi zwierząt i ich stanem klinicznym. Stopień zatrucia regulowano za pomocą zmiany zawartości tlenku węgla w mieszaninie gazowej przepuszczanej przez komorę.

Tabela 1. Grupy doświadczalne — charakterystyka ogólna
Table 1. Experimental groups — general characteristics

Grupa doświadcz. Experim. group	Zawartość CO w powietrzu CO content in air	Czas zatrucia Intoxication time	Stopień zatrucia Intoxication time		Czas przeżycia po zatruciu Survival time following intoxication	Zmiany morfologiczne (liczba zwierząt) Morphological changes (number of animals)
			Zawartość HbCO we krwi HbCO content in blood	Czas trwania śpiączki Duration of comatous state		
I	1%	15—30 min	25—65%	0	0 i 14 dni 0 and 14 days	0*/16**
II	0,1%	24 godz. hrs	25%	—	„	0/14
III	0,25%	24 godz. hrs	50%	—	„	1/4
IV	1% zmniejszająca się 1%decreasing	1,5 godz. hr	65—80%	15 min	2—120 godz. hrs	0/16
V						
1-razowe zatrucie single intoxication						8/29
3-krotne zatrucie 3-time intoxication	1% zmniejszająca się 1%decreasing	1,5 godz. hr	65—80%	40 min	24 i 120 godz. 24 and 120 hrs	6/9
7-krotne zatrucie 7-time intoxication	1%decreasing					6/6

*) Liczba zwierząt z uszkodzeniami mózgu
Number of animals with brain lesions

***) Liczba zwierząt badanych
Number of examined animals

Zwierzęta grupy I przetrzymywano w mieszaninie gazowej zawierającej 1% tlenu węgla; były one usuwane z komory po upływie 15–30 min., przy wystąpieniu pierwszych objawów śpiączki, zwykle po osiągnięciu poziomu 65% HbCO we krwi.

Zwierzęta grupy II i III zatrutowano przy użyciu mieszaniny gazowej o stałej zawartości CO, wynoszącej odpowiednio 0,1 i 0,25% przez okres 24 godzin. Poziom HbCO we krwi osiągał przy tym maksymalne wartości 25% i 50%.

Zwierzęta grupy IV i V zatrutowano w mieszaninie gazowej, zawierającej początkowo 1% tlenu węgla. Po wystąpieniu pierwszych objawów śpiączki pojawiającej się zazwyczaj przy 65% zawartości HbCO we krwi, stężenie w mieszaninie gazowej zmniejszono i następnie regulowano w sposób umożliwiający przeżycie zwierząt w stanie śpiączki przez okres 15 min. (grupa IV) i 40 min. (grupa V). Następnie dopływ gazu zamknięto, zostawiając nadal przepływ powietrza, co prowadziło do zmniejszenia stężenia CO w mieszaninie gazowej. W mieszaninie o zmniejszającym się stężeniu czadu przetrzymywano zwierzęta do pełnych 90 min. od początku doświadczenia. W tym czasie poziom HbCO we krwi wynosił u większości zwierząt około 50%. Zwierzęta grupy V poddawano jedno-, trzy- i siedmiokrotnemu zatruciu w odstępach 24-godzinnych.

Poziom karboksyhemoglobiny we krwi określono u większości (62) zwierząt z różnym stopniem zatrucia wg metody Witeheada i Worthingtona (1961). Ponieważ określono stężeniu hemoglobiny tlenkowej we krwi odpowiadał charakterystyczny zespół kliniczny, u części zwierząt w ocenie stopnia zatrucia kierowano się obrazem klinicznym. Badano zwierzęta w wieku 3 miesięcy, z wyjątkiem grupy IV, którą stanowiły szczury 6-tygodniowe.

W grupie I i II badania ograniczono do histologicznej i histochemicznej oceny mózgu zwierząt. W grupie III, IV i V przeprowadzono pełny cykl badań, obejmujący ocenę histologiczną, histochemiczną (oznaczanie gli-kogenu) i mikroskopowo-elektronową.

Badania histologiczne i histochemiczne przeprowadzono na mózgach 5 zwierząt kontrolnych i 94 doświadczalnych, uśmiercanych w uspieniu eterowym poprzez dosercową perfuzję 10% roztworem formaliny w 0,9% chlorku sodu, przygotowanym wg sposobu Cammermeyera (1961) lub 4% roztworem aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym Milloniga o pH 7,3, stosowanym w przypadku, jeśli mózgi zwierząt przeznaczone były równocześnie do badań mikroskopowo-elektronowych. Perfuzję wykonywano przez 30 min. przy ciśnieniu początkowym 110 mm Hg. W dwie godziny po zakończeniu perfuzji wyjmowano mózgi z jamy czaszki, dzielono je na bloki w płaszczyznach czołowych, na wysokości skrzyżowania nerwów wzrokowych i środkowej części wzgórza

oraz przez mózdzek z pniem mózgu. Bloki tkanki rutynowo przeprowadzano do parafiny, skrawano na mikrotomie na skrawki grubości 10 μ . Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem kręzylu i wg metody Heidenhaina na osłonki mielinowe. Glikogen oznaczano w skrawkach przy pomocy odczynu PAS, z równoczesnym blokowaniem dimedonem wg Bulmera (1959). Swoistość reakcji kontrolowano przez trawienie diastazą.

Do badań mikroskopowo-elektronowych użyto 4 szczury kontrolne i po 2 szczury z grupy III i IV oraz 18 szczurów z grupy V (po 6 z każdej podgrupy). Pobierano wycinki tkanki z kory okolicy ciemniowej i ośrodków półowalnych obu półkul mózgu, z rogu Amona i z płata spoidła wielkiego. Wycinki tkanki utrwalono dodatkowo w 1% roztworze czterotlenku osmu przez 1 godzinę, odwadniano w etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie 812. Materiał skrawano na ultramikrotomie f-my Reichert. Półcienkie skrawki o grubości 1 μ barwiono błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oglądano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Obraz kliniczny szczurów zmieniał się w zależności od poziomu hemoglobiny tlenkowej we krwi. Przy 25% HbCo poza obniżoną ruchliwością szczury nie wykazywały odchyień od stanu prawidłowego. Zmniejszenie ruchliwości pogłębiało się i pojawiały się zaburzenia statyki zwierząt przy poziomie około 50% hemoglobiny tlenkowej. Przy przekroczeniu 65% HbCO zwierzęta stawały się zupełnie wiotkie, zanikały odruchy, częstość oddechów spadała do 40/min. W miarę dalszego wzrostu HbCO liczba oddechów spadała do 20—40/min. Przy zawartości 80% HbCO we krwi zwierzęta padały.

Po wyjęciu z komory wszystkie szczury z grupy I i IV oraz część z grupy V przybierały prawidłową postawę i zwykłą ruchliwość po 5—10 min. Tylko u części zwierząt z grupy V przez kilka godzin po zatruciu obserwowano zmniejszenie ruchliwości, zaburzenia statyki i drżenia.

Obserwacje morfologiczne

Grupa kontrolna. W barwieniach przeglądowych i w badaniu mikroskopowo-elektronowym stwierdzono cechy dobrego utrwalenia tkanki nerwowej. W barwieniu PAS-dimedon skąpe ziarniste złoży

glikogenu występowały jedynie w splocie naczyńiówkowym, komórkach wyściółki komór, w warstwie podwyściółkowej i podoponowej oraz przy pojedynczych naczyniach warstwy drobinowej kory mózgu. Obecne były również w warstwie zwojowej kory mózdzku, gromadząc się wokół jąder astrogleju i dokoła komórek Purkinjego, oraz w neuropilu szarych struktur pnia mózgu, szczególnie w pobliżu komory IV i w jądrze brzuszonym nerwu VIII. Znaczne złogi glikogenu występowały w komórkach śródmózgowego jądra nerwu V.

Grupa I—III. U zwierząt grupy I i II nie stwierdzono histologicznych uszkodzeń mózgu. W grupie III, u dwu szczurów uspijonych bezpośrednio po wyjęciu z komory doświadczalnej w obrazie mikroskopowo-elektronowym było widoczne obrzmienie mitochondriów w niektórych komórkach nerwowych i oligodendrocytach. Ponadto u jednego z nich w mikroskopie świetlnym stwierdzono zmiany tigrolityczne w części komórek piramidowych odcinka h_2 rogu Amona.

Grupa IV. U szczurów tej grupy obraz histologiczny mózgu nie odbiegał w zasadzie od normy, natomiast zarówno w mikroskopie świetlnym jak i elektronowym stwierdzono wybitne zwiększenie złogów glikogenowych. Występowały one szczególnie obficie w rogu Amona (ryc. 8), w korze mózgu, prążkowiu (ryc. 9), w warstwie komórek Purkinjego kory mózdzku oraz w szarych strukturach pnia. Najobfitsze złogi glikogenowe występowały w okresie od 4—12 godz. po zatruciu. W półkulach mózgu już po 24 godzinach spostrzegano jedynie nieznaczne złogi, a w późniejszych okresach ich obraz histochemiczny nie odbiegał od spostrzeganego w materiale kontrolnym. W pniu mózgu i w mózdzku spadek zawartości glikogenu był wyraźnie wolniejszy, a jego nieprawidłowe złogi można było spotkać jeszcze w 5 dni po zatruciu. Szczegółowy opis obrazu histochemicznego i mikroskopowo-elektronowego wraz z wynikami badań biochemicznych tej grupy zwierząt przedstawiono w pracy Śmiałka i wsp. (1973).

Grupa V. Przedmiotem szerokiej analizy morfologicznej były zwierzęta grupy V. Nieodwracalne uszkodzenia tkankowe stwierdzono u około 1/4 zwierząt z jednorazowym zatruciem, u 2/3 z trzykrotnym i u wszystkich z zatruciem siedmiokrotnym. Na łączną liczbę 20 szczurów, u których stwierdzono nieodwracalne zmiany w mózgu, u 15 było widoczne uszkodzenie kory zawoju hipokampa (tabela 2). Najczęściej zmiany występowały w jego części czołowej, położonej nad wzgórzem a tu przede wszystkim w odcinku h_2 i w płycie końcowej h_{4-5} rogu Amona (ryc. 1). W żadnym przypadku nie stwierdzono zmian w *fascia dentata*. Rzadziej niż w hipokampie występowały zmiany w *neocortex*, głównie w dolnych i górnych warstwach kory (ryc. 3) i w prążkowiu

(ryc. 4). Dwóm przypadkom nieznacznego uszkodzenia galki bladej towarzyszyły zmiany w prążkowie i w innych strukturach. Najczęściej bowiem stwierdzano równoczesne uszkodzenie kilku struktur. W pojedynczych przypadkach, w których zmiany były ograniczone wybiórczo do jednej struktury, dotyczyły one bądź rogu Amona, bądź też istoty białej.

Zmiany spostrzegane w formacjach szarych miały charakter zwyrodnień neuronalnych o typie schorzenia ischemicznego, przewlekłego, lub ciężkiego, bądź też zaniku komórek nerwowych o cechach tzw. martwicy selektywnej. W pojedynczych tylko przypadkach towarzyszyło im rozrzedzenie utkania podłoża. Zmianom neuronalnym towarzyszył zazwyczaj wyraźny odczyn astrocytarno-mikroglejowy, szczególnie wyraźny u zwierząt, które usypiano po 5 dniach od zatrucia (ryc. 2, 4). U szczurów z 3- i 7-krotnym zatruciem obok wczesnych bezodczynowych ognisk martwicy selektywnej, występowały uszkodzenia z towarzyszącym odczynem glejowym.

W istocie białej uszkodzeniu ulegał najczęściej płat spoidła wielkiego mózgu i ośrodki półowalne w okolicy ciemieniowej (ryc. 5). Przy bardziej nasilonych uszkodzeniach rozległa demielinizacja obejmowała prawie całą istotę białą okolic ciemieniowych i potylicznych, a ponadto drobne ogniska demielinizacyjne występowały w strzępku hipokampa, drogach wzrokowych (ryc. 5) i w istocie białej mózdzku. Wokół naczyń stwierdzano zwykle zachowaną strukturę istoty białej (ryc. 7). Czasami spotykano obraz plackowatej demielinizacji (ryc. 6). Uszkodzenie istoty białej często łączyło się z obecnymi w niej cechami obrzęku, jednakże spotykano również liczne obszary demielinizacji bez znamion obrzęku. W przypadkach z 5-dniowym przeżyciem spostrzegano objawy rozplemu oligodendroglu.

U zwierząt z jedno- i trzykrotnym zatruciem, u których w barwieniach przeglądowych nie stwierdzono uszkodzeń tkankowych w mózgu, obraz histochemiczny mózgu przedstawiał się jak u szczurów w grupie IV w odpowiednich okresach czasu tj. w 24 godziny i w 5 dni po zatruciu. U zwierząt wszystkich podgrup, w których mózgach stwierdzono nieodwracalne uszkodzenia tkankowe, po upływie 24 godzin od ostatniego zatrucia występowały również obfite złogi glikogenowe. Gromadziły się one wyłącznie w strukturach szarych nie objętych procesem martwicy i miały charakter ziarnistości luźno rozsianych w neuropilu, zagęszczających się dookoła naczyń, jąder astrogleju, rzadziej na zewnątrz komórek nerwowych. Niekiedy wypełniały ciało i wypustki astrocytów. Szczególnie obfite złogi glikogenu gromadziły się w sąsiedztwie struktur wykazujących zmiany o charakterze martwicy niepełnej,

i tak np. przy zaniku neuronów w polu h_2 rogu Amona, obfite ziarnistości wielocukru występowały w pozostałych jego odcinkach, a niekiedy również i w warstwie drobinowej *fascia dentata* (ryc. 13). Nierzadko między ogniskami martwicy, a obszarem z widocznymi złogami glikogenowymi stwierdzano przejściowy pas tkanki, który w obrazie histochemicznym charakteryzował się brakiem ziarnistości glikogenu, a w obrazie histologicznym tigralitycznymi zmianami neuronów.

W mózdzku, który poza dwoma przypadkami, nie wykazywał nieodwracalnych zmian tkankowych, złogi glikogenu znajdowano głównie w warstwie zwojowej kory (ryc. 10), rzadziej w warstwie drobinowej i w jądrach głębokich. W pojedynczych przypadkach, zwłaszcza po kilkakrotnym zatruciu, ziarnistości wielocukru gromadziły się również w perikariach komórek Purkinjego (ryc. 11). W pniu mózgu obfite złogi glikogenu stwierdzano w tych strukturach, w których występowały one u zwierząt kontrolnych, z tym jednak że u szczurów doświadczalnych były one znacznie obfitsze. Były one również widoczne w pojedynczych neuronach jąder nerwów czaszkowych (ryc. 12).

W 5 dniu po ostatnim zatruciu złogi glikogenu w półkulach mózgu występowały jedynie w otoczeniu ognisk martwicy. Utrzymywały się one nadal w strukturach pnia mózgu, z tym jednak, że były znacznie mniej obfite niż w 24 godziny po zatruciu.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym formacji szarych półkul mózgu, w 24 godziny po jednokrotnym lub kilkakrotnym zatruciu można

Tabela 2. Topografia uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego

Table 2. Topography of the central nervous system lesions

Struktura Structure	Liczba zwierząt Number of animals
Róg Amona Ammon's horn	15
Istota biała mózgu Cerebral white matter	11
Kora mózgu Cerebral cortex	8
Prążkowie Striatum	7
Gałka biała Pallidum	2
Mózdzek Cerebellum	2
Wzgórze Thalamus	1

było wyróżnić trzy stopnie uszkodzenia tkanki nerwowej. Najłżejsze zmiany charakteryzowały się jedynie obecnością obfitych ziaren glikogenowych w cytoplazmie astrocytów głównie w ich wypustkach przynaczyniowych. Przy bardziej zaawansowanym uszkodzeniu tkanki nerwowej były widoczne zmiany w komórkach nerwowych, wykazujące zwykle znaczną rozpiętość nasilenia: od obrzęku pojedynczych mitochondriów w części perikarialnej lub wypustkach neuronu (ryc. 14) do obrzmienia wszystkich mitochondriów, występującego łącznie z zagęszczeniem cytoplazmy i obrzmieniem siatki śródplazmatycznej (ryc. 15). Zmianom w neuronach towarzyszyło zwykle zwiększenie ilości ziaren glikogenu w otaczających je astrocytach.

W najcięższym stopniu uszkodzenia stwierdzano zmiany martwicze komórek nerwowych, cechujące się całkowitą destrukcją ich cytoplazmy (ryc. 19). Zmianom tym towarzyszyło niekiedy rozluźnienie otaczających je struktur. W obszarach tych również nie stwierdzano ziarnistości glikogenu ani w perikariach, ani w wypustkach astrocytów. W otoczeniu martwiczo zmienionych neuronów spotykano różne formy zwyrodniałych wypustek nerwowych, charakteryzujących się najczęściej zagęszczeniem ich cytoplazmy (ryc. 16). W części wypustek stwierdzano zagęszczenie mitochondriów i ciał gęstych (ryc. 17).. Niekiedy wypustki wypełnione były licznymi rozgałęzionymi tworami tubularnymi (ryc. 18).

Najcięższe zmiany mikroskopowo-elektronowe przeważały w mózgach zwierząt kilkakrotnie zatrutowanych, jakkolwiek występowały one również u zwierząt z jednokrotnym zatruciem.

W 5 dni po ostatnim zatruciu do zmian opisanych powyżej dołączało się występowanie komórek o ultrastrukturalnych cechach makrofagów oraz licznych postaci gleju odczynowego, zwłaszcza astrocytów włóknkowych, przy czym nieprawidłowe ziarnistości glikogenu występowały zarówno w astrocytach protoplazmatycznych jak i włóknkowych (ryc. 19, 20). W obu postaciach astrogleju występowały również liczne ciała lipidowe.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym istoty białej u części zwierząt spotykano znaczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych (ryc. 21, 22). Widoczne było również obrzmienie cytoplazmy astrocytów (ryc. 22) przy prawie niezmienionej strukturze mitochondriów, podczas gdy mitochondria gleju skąpowypustkowego, wykazywały znacznego stopnia obrzmienie (ryc. 22), a w niektórych uszkodzonych mitochondriach spostrzegano struktury mielinopodobne. W wypustkach nerwowych również było widoczne obrzmienie pojedynczych mitochondriów (ryc. 23) lub zwiększenie ich liczby i ciałek gęstych. W części wypustek stwierdzano zagęszczenie cytoplazmy aksonu (ryc. 24), względnie ziarnisty rozpad

włókienek i tubuli. Przy bardziej nasilonych zmianach w aksonie dochodziło również do uszkodzenia osłonek mielinowych (ryc. 24). Często jednak stwierdzano uszkodzenie osłonki mielinowej przy nieznacznych jedynie zmianach wypustek osiowych. Spostrzegano poszerzenie odległości między blaszkami mielinowymi, rozszczepienie blaszek mielinowych lub przerwanie ich ciągłości (ryc. 25, 26, 27). Resztki osłonek mielinowych zupełnie zdeorganizowanych, względnie z zachowanym jeszcze okresowym układem blaszek znajdowano zarówno w przestrzeni międzykomórkowej jak i w makrofagach. Niekiedy w cytoplazmie makrofagów były widoczne struktury mielinopodobne, wykazujące mniejszą gęstość elektronową niż normalne osłonki mielinowe (ryc. 28).

Często spostrzegano również obrazy rozbudowanej znacznie zewnętrznej wypustki cytoplazmatycznej osłonki mielinowej, zawierającej liczne organelle w postaci tubul, mitochondriów lub pęcherzyków (ryc. 30, 32). Niekiedy przerośnięta wypustka otaczała całkowicie osłonkę mielinową o znacznej gęstości (ryc. 32). Czasami stwierdzano bezpośrednią łączność między ostatnią blaszką mieliny a cytoplazmą oligodendrocytu (ryc. 31). Spotykano również drobne aksony otoczone całkowicie przez cytoplazmę komórki skąpowypustkowej (ryc. 29). Stwierdzono ponadto, że z ciała oligodendrocytu biorą początek zarówno wypustki o normalnej gęstości cytoplazmy, jak i wypustki z cytoplazmą wykazującą niską gęstość elektronową (ryc. 33).

W mniej uszkodzonych obszarach istoty białej obserwowano pomnożenie ilości oligodendrocytów, a w niektórych przerost cytoplazmy. Proliferacja oligodendrogleju i obrazy sugerujące mielinizację wypustek osiowych były widoczne już po 24 godzinach u zwierząt z 3- i 7-krotnym zatruciem. Najwyraźniejsze były jednak u szczurów z 5-dniowym przeżyciem po doświadczeniu.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że dla uzyskania nieodwracalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego o typie encefalopatii tlenkowej niezbędne jest zachowanie określonych warunków doświadczalnych, dotyczących zarówno stopnia zatrucia jak i czasu jego trwania. Strukturalne uszkodzenia tkanki nerwowej obserwowano jedynie u tych zwierząt, u których „śpiączkowy” poziom hemoglobiny tlenkowej wynoszący od 65%—80% HbCO utrzymywano przez okres 40 min. Kilkakrotne powtórzenie tego samego zatrucia w 24-godzinnych odstępach zwiększało częstość i nasilenie uszkodzeń tkankowych. Przechowywanie zwierząt w tych samych warunkach, przy skróconym do 15 min. okresie śpiączki, prowadząc do głębokich zaburzeń metabolicz-

nych (Albrecht 1973, Śmiałek i wsp. 1973, Szumańska 1973) nie wywoływało zmian morfologicznych w układzie nerwowym.

Badanie histologiczne mózgow szczerów zatrutych tlenkiem węgla wykazało typową i powtarzalną lokalizację i charakter uszkodzeń tkankowych. Najczęściej dotyczyły one rogu Amona i istoty białej, rzadziej występowały w *neocortex* i w skorupie; zmiany w gałce bladej należały do wyjątków. Stwierdzone w naszym materiale umiejscowienie uszkodzeń było podobne do opisywanego u zwierząt doświadczalnych przez innych autorów (Meyer 1928, Romanowa 1959, Preziosi i wsp. 1970). Zbliżone było również do lokalizacji zmian w przypadkach zatruc CO u ludzi (Lapresle, Fardau 1967, Brucher 1967).

Zasadnicze różnice pomiędzy wynikami poszczególnych autorów, w tym również naszymi, dotyczyły częstości występowania uszkodzeń w gałce bladej. Meyer (1928) stwierdzał często zmiany w gałce bladej u psów i kotów, natomiast nie spostrzegał ich u królików i świnek morskich, co mogło wskazywać na gatunkowe różnice w reagowaniu na zatruciu CO. Z drugiej jednak strony Preziosi i wsp. (1970) w doświadczeniach na psach nie stwierdzili w ogóle uszkodzeń gałki bladej, a w materiale doświadczalnym Romanowej (1959) obecne były wyłącznie w jednym przypadku. Wydaje się, że różnice wyników badań, prowadzonych na tym samym gatunku zwierząt przez różnych autorów, odnieść należy do odmiennych warunków doświadczalnych. Często stwierdzone uszkodzenie gałki bladej w materiale ludzkim w porównaniu z naszym materiałem doświadczalnym wydaje się być właściwością uwarunkowaną różnicami gatunkowymi, jakkolwiek należy również uwzględnić zasadnicze różnice warunków zatrucia.

Wyniki badań mikroskopowo-elektronowych naszego materiału różnią się znacznie od spostrzeżeń Miyagishi i Suwa (1969) w doświadczalnym zatruciu tlenkiem węgla szczerów. Miyagishi i Suwa (1969) stwierdzali jedynie nieznaczne uszkodzenia tkanki nerwowej. Zasadnicze różnice między spostrzeżeniami wyżej wymienionych autorów i naszymi dotyczą obrazu mikroskopowo-elektronowego formacji szarych mózgu. Wydaje się, że na odmiennosc wyników badań mogły wpłynąć różnice warunków doświadczalnych, miejsca i sposobu pobierania materiału do badań oraz techniki utrwalania. Miyagishi i Suwa (1969) przetrzymywali zwierzęta w mieszaninie o niższej zawartości tlenu węgla i doprowadzali je do stanu śpiączkowego trwającego tylko przez 15 min. Z naszych spostrzeżeń wynika, że jest to okres niewystarczający do uzyskania nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej. Pobierany przez nich materiał do badań obejmował jedynie okolicę ciemieniową, a więc formacje *neocortex*, która jak wynika z naszych obserwacji nie stanowi miejsca najczęstszych i najcięższych uszkodzeń tkankowych. Stwierdzone w na-

szym materiale ultrastrukturalne zmiany w komórkach nerwowych, z dominującym uszkodzeniem mitochondriów odpowiadają obrazom patologicznie zmienionych neuronów opisywanych w niedotlenieniu prostym przez Hagera (1963), w niedotlenieniu z hyperkapnią przez Bakaya i Lee (1968) oraz w doświadczalnym zespole anoksyjno-ischemicznym (Brown, Brierley 1972). Przypominają one nieco również wczesne zmiany stwierdzone w przewlekłym niedotlenieniu (Yu i wsp. 1972). Podobnie zbliżone do obrazów opisanych przez powyższych autorów były zmiany dotyczące astro- i oligodendrogleju. Charakterystyczna była obecność astrocytarnych złogów glikogenu, opisywanych uprzednio w różnych typach niedotlenienia (Mossakowski i wsp. 1968, Ibrahim i wsp. 1970, Mossakowski i wsp. 1973). Złogi glikogenowe stwierdzano zarówno u zwierząt, u których nie obserwowano poza tym żadnych strukturalnych uszkodzeń w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i u tych, u których występowały różnego nasilenia zmiany tkankowe, z tym tylko, że w tym ostatnim przypadku były ograniczone do nie uszkodzonych obszarów mózgu.

Zmiany w istocie białej, polegające na uszkodzeniu osłonek mieliny współprzebiegającym ze zmianami patologicznymi we włóknach osiowych lub występującym niezależnie od nich były zbliżone do obrazów opisanych przez Miyagashi i Suwa (1969), wykazując jednak znacznie większe nasilenie. Od obrazów opisanych przez wyżej wymienionych autorów różniły się obecnością niestałego i na ogół nieuogólnionego poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych oraz obecnością i zróżnicowaniem nieprawidłowości ultrastrukturalnych astro- i oligodendrocytów.

Zgodnie z powszechnie panującą opinią zasadniczy mechanizm szkodliwego działania tlenu węgla wiąże się z jego wysokim powinowactwem do hemoglobiny, wielokrotnie przewyższającym powinowactwo tlenu. Zastąpienie tlenu w związku z hemoglobiną przez tlenek węgla prowadzi do niedotlenienia typu hipoksyjnego. Samo jednak zjawisko hipoksji nie tłumaczy wybiórczej lokalizacji uszkodzeń mózgu. Dla jej wyjaśnienia niezbędne jest przyjęcie udziału dodatkowych czynników patogenetycznych, wśród których na plan pierwszy wysuwają się ogólnoustrojowe zaburzenia hemodynamiczne, towarzyszące zatruciu tlenkiem węgla prowadzące do zastoju i niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Zarówno obserwacje u ludzi jak i badania doświadczalne (Romanowa 1959, Bour i wsp. 1967, Preziosi i wsp. 1970) wskazują, że w zatruciu tlenkiem węgla dochodzi często do znacznego uszkodzenia mięśnia sercowego, zwłaszcza komory prawej. Obserwuje się spadek tętniczego ciśnienia krwi i wzrost żylnego. Według Lindenberga (1963)

i Preziosi i wsp. (1970) zaburzenia w krążeniu żylnym w mózgu sprzyjają uszkodzeniu istoty białej. Ogólnoustrojowe zaburzenia hemodynamiczne prowadzą do umiejscowienia zmian w pogranicznych strefach unaczynienia mózgu, do których należą najczęściej w naszym materiale uszkodzone okolice czołowe zawoju hipokampa (Korthals 1969), ośrodek półowalny okolicy ciemieniowej mózgu (Lindenberg 1963) i płat spoidła wielkiego (Levine 1967). Należy przy tym zwrócić uwagę na podkreślony przez Kowada i wsp. (1968) fakt, że zaburzenia niedokrwienne mózgu mogą prowadzić do zastoju naczyniowego trwającego przez dłuższy okres czasu nawet po ustaniu działania czynnika szkodliwego i unormowaniu się ogólnoustrojowego ciśnienia krwi.

Szereg autorów podkreśla rolę zakrzepów naczyniowych w patogenezie uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego w zatruciu tlenkiem węgla (Courville 1957, Pentschew 1958, Meyer 1963). W naszym materiale nie stwierdziliśmy ich obecności, co oczywiście nie wyklucza możliwości ich występowania. Przetrwwały zastój żylny może bowiem sprzyjać ich powstawaniu. Stanowiłyby one jednak zjawisko wtórne w stosunku do zaburzeń hemodynamicznych. Przeciwno ich istotnej roli w patogenezie uszkodzeń tkanki nerwowej, przemawiają często obserwowane obrazy prawidłowo zachowanej struktury tkanki wokół naczyń wśród uszkodzonej istoty białej (Brucher 1967). To samo zjawisko obserwowaliśmy w naszym materiale.

Hipoksemia i zaburzenia hemodynamiczne mogą oddziaływać uszkadzająco na drodze bezpośredniej poprzez niedotlenienie i niedokrwienie tkanki, lub pośrednio poprzez jej obrzęk. Uszkodzeniom bariery krew-mózg i obrzękowi przypisywano szczególną rolę w patogenezie zmian demielinizacyjnych w istocie białej, zwłaszcza w przypadkach remisyjnej leukoencefalopatii tlenkowej (Jacob i wsp. 1958, 1962, Osetowska 1964). Nasze obserwacje na materiale doświadczalnym nie wskazują na zasadniczą rolę obrzęku w złożonym patomechanizmie uszkodzeń tkanki nerwowej w zatruciu CO. W istocie szarej stwierdziliśmy jedynie nieznaczne cechy obrzęku, a w istocie białej objawy ciężkiego uszkodzenia osłonek mielinowych występowały w obszarach nie wykazujących całkowicie zmian obrzękowych. Badania mikroskopowo-elektronowe Hirano i wsp. (1968) i Lamperta (1968) wykazały, że w przypadkach obrzęku mózgu z gromadzeniem się płynu w przestrzeniach międzykomórkowych, nie stwierdza się zasadniczych zmian w strukturze osłonek mielinowych. Podobnie Adams (1965) w oparciu o zróżnicowanie odczynów histochemicznych w przypadkach obrzęku mózgu i w demielinizacji skłonny jest nie przypisywać obrzękowi istotnej roli w rozwoju demielinizacyjnych uszkodzeń istoty białej.

Zdaniem Schwedenberga (1959) i szeregu innych autorów przyczyną

! styl!

demielinizacji może być bezpośrednio toksyczne działanie tlenu węgla rozpuszczonego w płynie obrzękowym. Brak jest jednak dotąd niewątpliwych danych potwierdzających tę teoretyczną możliwość w warunkach *in vivo*, mimo stwierdzenia niewątpliwego uszkadzającego działania CO na tkankę nerwową i glejową *in vitro* (Hoppe-Kurowska 1973, Korthals i wsp. 1973). W naszym materiale zwracał uwagę bogaty obraz mikroskopowo-elektronowych zmian w istocie białej, a w szczególności zróżnicowanie reakcji astro- i oligodendrogleju, polegające na obecności bardzo znacznego obrzmienia cytoplazmy astrocytów przy stosunkowo niezmięnionej ultrastrukturze mitochondriów, podczas gdy w oligodendrogleju przeważały uszkodzenia mitochondriów. Jednakże pełna interpretacja wzajemnych powiązań zmian patologicznych w komórkach astrogleju, oligodendrogleju, osłonkach mielinowych i w samych wypustkach osiowych wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań na zwierzętach z przeżyciem dłuższym niż 5 dni i krótszym niż 24 godziny.

Wydaje się uzasadnione przyjęcie, że skojarzone działanie niedotlenienia i niedokrwienia jest główną przyczyną powstawania uszkodzeń mózgu w zatruciu tlenkiem węgla. Zróżnicowanie obrazu uszkodzeń uwarunkowane jest stopniem niedotlenienia i niedokrwienia. Wydaje się przy tym prawdopodobne, że samo niedotlenienie, względnie niedotlenienie skojarzone z nieznacznie stopnia niedokrwieniem prowadzi jedynie do odkładania się glikogenu w astrocytach. Przy bardziej nasilonych zaburzeniach ischemicznych powstają uszkodzenia komórkowe pod postacią przede wszystkim obrzmienia mitochondriów w neuronach i oligodendrocytach. Nałożenie się przetrwałego ciężkiego niedokrwienia prowadzi wreszcie do powstania nieodwracalnych zmian tkankowych składających się na obraz rozwiniętej encefalopatii tlenkowęgłowej. Bezpośrednie cytotoksyczne działanie tlenu węgla na elementy parenchymalne ośrodkowego układu nerwowego pozostaje nadal zagadnieniem otwartym.

WNIOSKI

1. Uzyskanie doświadczalnej encefalopatii tlenkowęgłowej u szczurów wymaga zachowania określonych warunków doświadczalnych, dotyczących stopnia zatrucia i czasu jego trwania. Dla otrzymania strukturalnych uszkodzeń tkanki nerwowej niezbędne jest uzyskanie ponad 65% zawartości HbCO we krwi i jej utrzymanie przez okres około 40 min.

2. Zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym zlokalizowane są w sposób powtarzalny w części czołowej zawoju hipokampa, w ośrodkach półowalnych okolicy ciemieniowej półkul mózgu oraz

w płacie spoidła wielkiego, rzadziej obejmują *neocortex* i skorupę, do wyjątków należy zajęcie gałki bladej.

3. W formacjach szarych przeważa zwyrodnienie komórek nerwowych i ich ubytki w postaci ognisk martwicy selektywnej, w istocie białej dominuje obraz demielinizacji.

4. W obrazie mikroskopowo-elektronowym formacji szarych przeważa uszkodzenie mitochondriów neurocytów i oligodendrogleju oraz nieznaczne obrzmienie wypustek astrocytów i gromadzenie się w nich złogów glikogenowych. W istocie białej dominuje uszkodzenie osłonek mielinowych, aż do ich całkowitego rozpadu, współtowarzyszące lub nie uszkodzeniom włókien osiowych. Ponadto występuje niestałe poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych, obrzmienie cytoplazmy astrocytów i znacznego stopnia uszkodzenie mitochondriów oligodendrogleju.

5. U podłoża zmian w ośrodkowym układzie nerwowym leży niedotlenienie typu hipoksyjnego, z nakładającym się zespołem niedokrwienia, stanowiącym następstwo ogólnoustrojowych zaburzeń hemodynamicznych.

Я. Кортхалс, М. Я. Моссаковски, М. Смялек

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПНАЯ КАРТИНА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОКСИУГЛЕРОДНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У КРЫС

Резюме

Проведены гистологические, гистохимические (определения гликогена) и электронно-микроскопные исследования мозга крыс, подвергнутых действию окиси углерода.

Опыты поставлены на 94 взрослых крысах, разделенных на 5 экспериментальных групп, различающихся по продолжительности и степени отравления, что выражалось процентным содержанием карбоксигемоглобина в крови и клиническим состоянием животных.

У животных с продолжительностью отравления 30 мин. с уровнем карбоксигемоглобина до 65% (I группа), а также у животных, которые содержались в атмосфере окиси углерода в течение 24 часов и у которых уровень карбоксигемоглобина не превышал 25% (II группа) не установлено необратимых нарушений нервной ткани. Незначительные, непостоянные рассеянные повреждения нейроцитов и олигодендроглия обнаружены в мозге животных, подвергнутых действию CO в течение 24 часов и у которых уровень карбоксигемоглобина достигал 50% (III группа). У крыс, содержащихся в атмосфере с окисью углерода в течение 1,5 часов, у которых уровень карбоксигемоглобина достигал 70—80% и которые во время отравления доводились до состояния спячки, длящейся до 15 мин. (IV группа) констатировалось как постоянное явление образование накоплений гликогена в нервной ткани в период после отравления при отсутствии признаков гистологического и электронно-микроскопного повреждения ткани. Наибольшие накопления гликогена выступали между 4 и 12 часом после отрав-

ления. На 5-ые сутки эксперимента гликогенные накопления, обнаруженные в нервной ткани, не отличались ни количеством ни топографией от таковых, наблюдаемых у контрольных животных.

Необратимые нарушения ткани наблюдались у животных, у которых при отравлении в течение 1,5 часа уровень карбоксигемоглобина достигал 70—80%, а время спячки протягивалось до 40 мин. (V группа).

Гистологические изменения чаще всего выступали в передней части гипокампа (участок Н₂ и Н₄₋₅), а также в белом веществе полушарий головного мозга и в комиссуре. Исключительно редко повреждение наблюдалось в бледном шаре.

В ультраструктурной картине коры мозга в 24 часа после отравления можно различить 3 степени повреждения. Самые небольшие изменения характеризовались увеличенным количеством зёрн гликогена в цитоплазме астроцитов, прежде всего в их присосудистых отростках.

При более сильном повреждении ткани заметна была опухоль митохондрий в нейронах и олигодендронитах, а в отростках астроцитов, окружающих поврежденные нейроны, собирались накопления гликогена.

Наиболее сильное повреждение характеризовалось наличием дезинтеграционных изменений клеточных элементов. В этих случаях накопления гликогена не выступали.

В белом веществе наблюдалось расширение межклеточного пространства, опухоль астроглии, опухоль митохондрий, прежде всего олигодендронитов и дегенеративные изменения нервных отростков, охватывающие чаще всего как и аксон, так и его миелиновую оболочку. Часто замечали гипертрофию наружного цитоплазматического отростка миелиновой оболочки. Иногда можно было заметить мелкие аксоны полностью окруженные цитоплазматическими отростками олигодендронитов.

В обсуждении патогенеза описанных изменений авторы обращают внимание на основную роль гипоксемии и гемодинамических расстройств (увеличение венозного давления, застой) в определении тканевых повреждений. В то время как второстепенную роль могут играть такие факты как отёк, непосредственное действие окиси углерода на ткань, а также редко встречающиеся венозные тромбы. Накопление гликогена является ранним и чувствительным показателем повреждения серого вещества мозга.

J. Korthals, M. J. Mossakowski, M. Śmiałek

HISTOLOGICAL AND ELECTRON MICROSCOPIC PICTURE OF EXPERIMENTAL CARBON MONOXIDE ENCEPHALOPATHY

Summary

Histological, histochemical (glycogen determination) and electron microscopic studies were carried out on the brains of 94 adult rats exposed to carbon monoxide. The rats were divided into 5 groups of different time and degree of intoxication, the latter finding expression in the blood carboxyhemoglobin level and clinical conditions of the animals.

In the animals intoxicated for 30 minutes at the carboxyhemoglobin level of up to 65% (group I), as well as in those exposed to carbon monoxide for 24 hrs

where the carboxyhemoglobin level did not exceed 25% (group II), no irreversible impairment of the nervous tissue was found. Insignificant and irregular disseminated lesions of neurocytes and oligodendroglia were being observed in the brains of animals treated with CO for 24 hrs, where the carboxyhymoglobine level reached the value of 50% (group III). In the rats subjected to CO for 1.5 hr and brought during intoxication to 15 min. coma, with the carboxyhemoglobin level reaching values of 65—80% (group IV), accumulation of glycogen deposits in the nervous tissue in the period following intoxication was observed to be a permanent phenomenon, whereby neither histological nor electron microscopic features of the tissue damage were present at that time. The most abundant glycogen deposits have appeared between the 4th and 12th hour after intoxication. At the 5th day of experiment, both the quantity and topography of glycogen deposits were identical to those observed in the control animals.

Irreversible tissue lesions were stated in animals in which during 1.5 hr intoxication the carboxyhemoglobin level reached the values of 65—80% and duration of coma — 40 minutes (group V).

Histological changes most frequently were being observed in the frontal part of Ammon's horn (segments h_2 and h_{4-5}), in the white matter of cerebral hemispheres and in the splenium of corpus callosum. The pallidal lesions were very rare.

In the ultrastructural picture of brain cortex at 24 hrs after intoxication, 3 degrees of tissue lesions could have been distinguished. The mildest changes were characterized by the increased number of glycogen grains in the cytoplasm of astrocytes, in particular in their perivascular processes. More intensive tissue impairment was manifested by swelling of mitochondria in neurocytes and oligodendrocytes. In the astrocytes processes surrounding the impaired neurocytes, glycogen deposits accumulated. The most severe degree was characterized by the occurrence of desintegrative changes in the cellular elements. In the latter cases the glycogen deposits were absent.

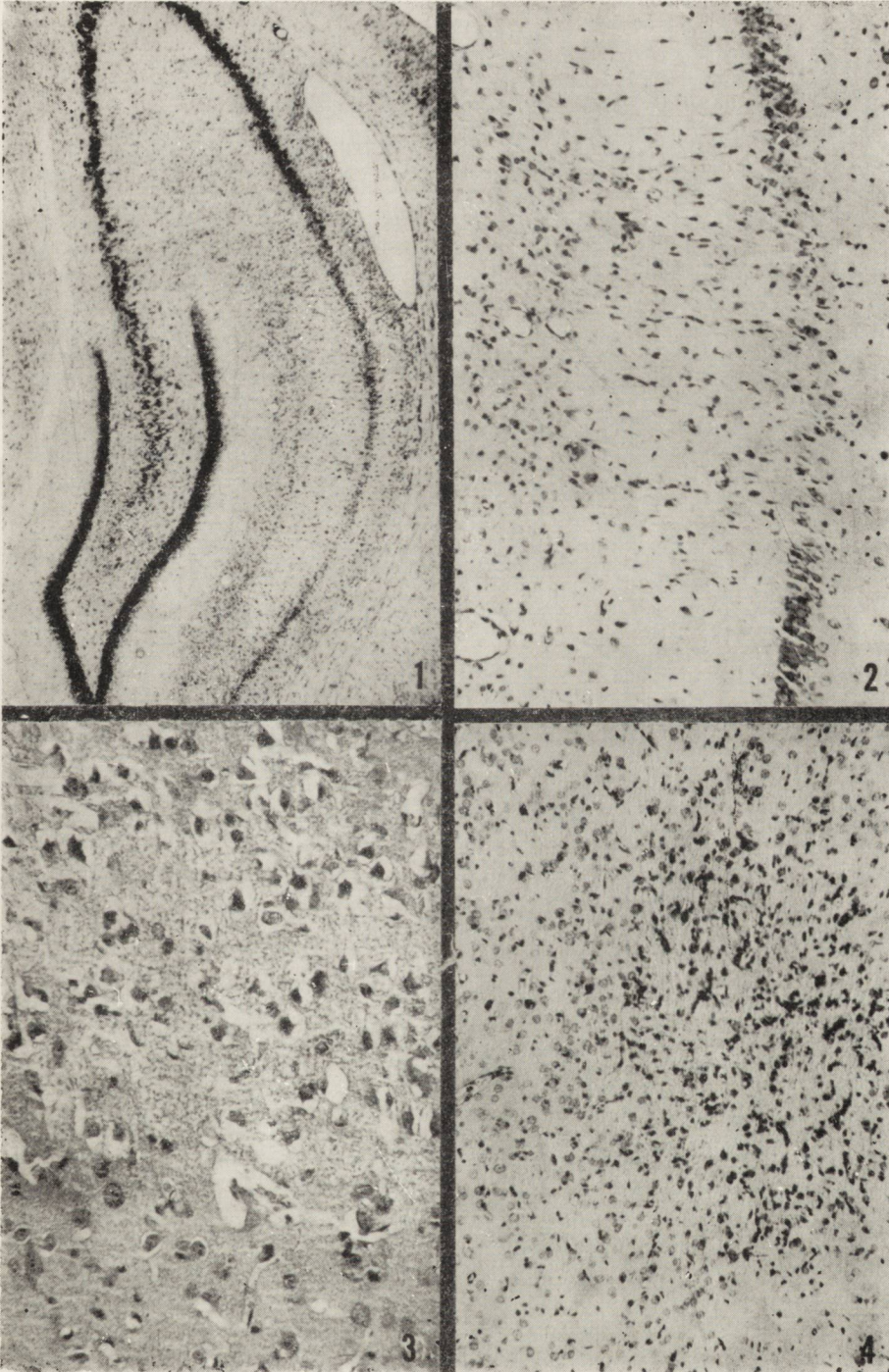
In the white matter, the following changes were being observed: extension of intracellular spaces, swelling of astroglia, swelling of mitochondria, mostly oligodendrocytic and degenerative changes in nerve processes, usually involving both the axon and its myelin sheath.

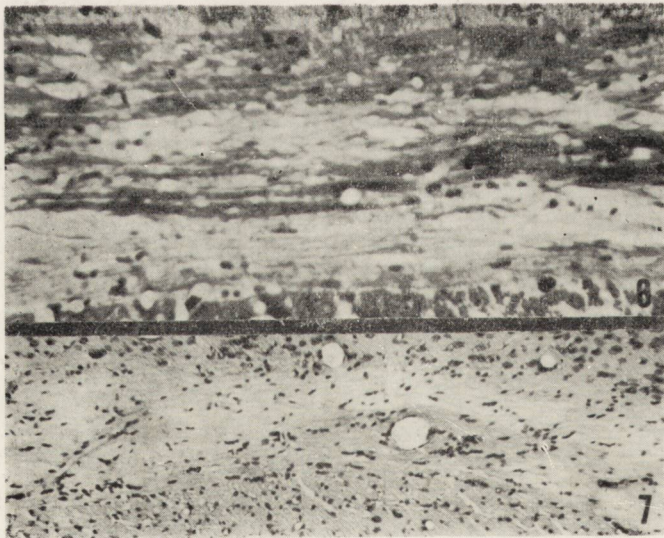
Discussing the pathogenesis of the described changes, the authors point at the crucial role of hypoxemia and hemodynamic disturbances (increase of venous blood pressure, stasis) in the formation of tissue lesions. Factors like edema, direct effect of CO on the tissue and rarely occurring venous thrombi play a secondary role. Accumulation of glycogen constitutes an early and sensitive indication of the impairment of grey matter.

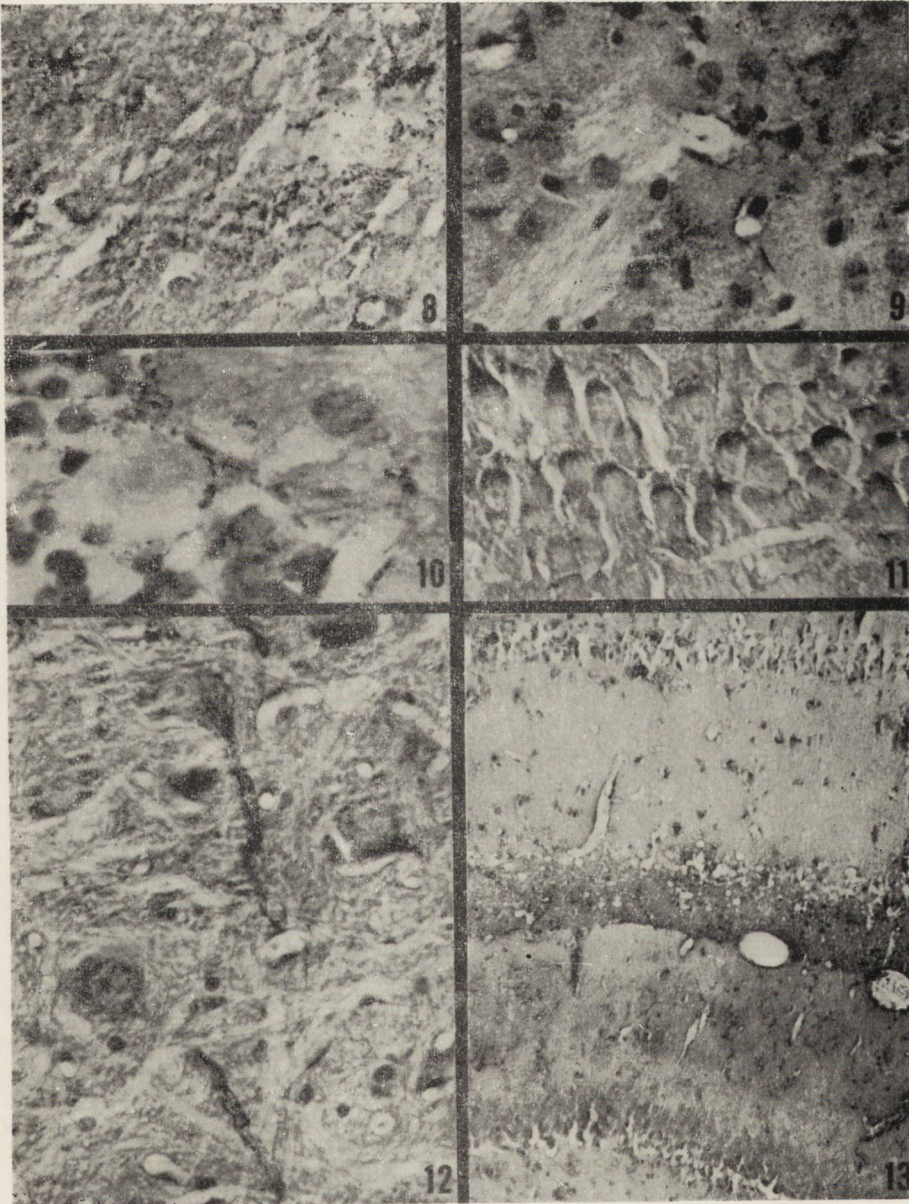
PIŚMIENNICTWO

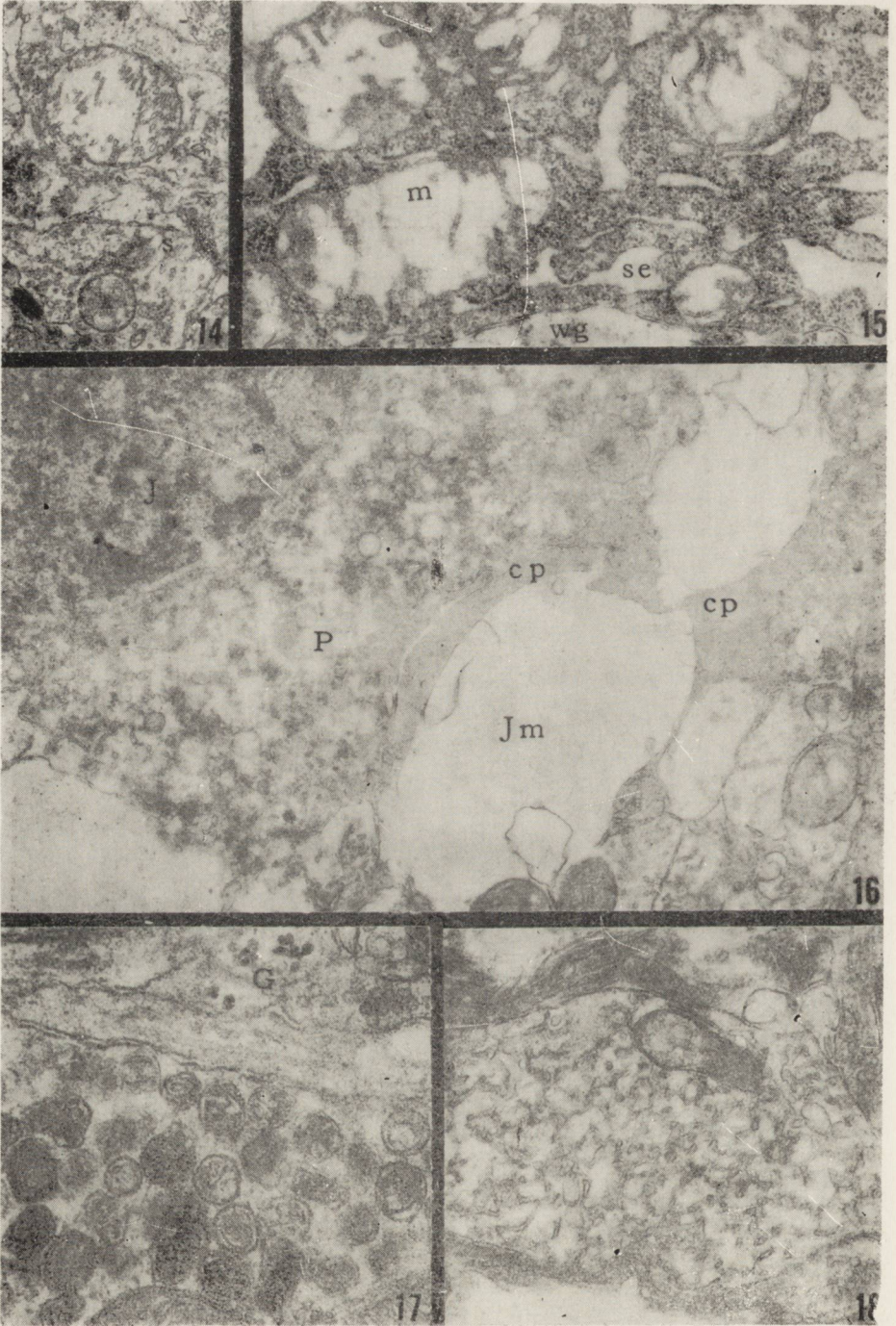
1. Adams C.W.M., Ibrahim M.Z.M., Leibowitz: „Demyelination”. W: Neurochemistry, Adams C. (ed.), Elsevier, Amsterdam 1965, 437—487.
2. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide on individual steps of synthesis in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973.
3. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697—706.

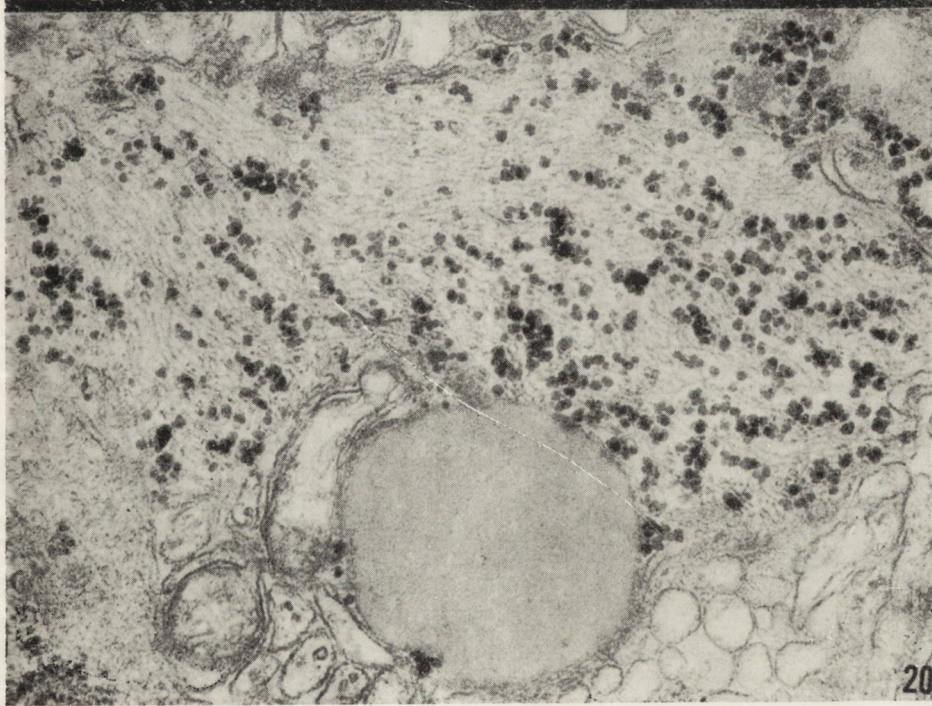
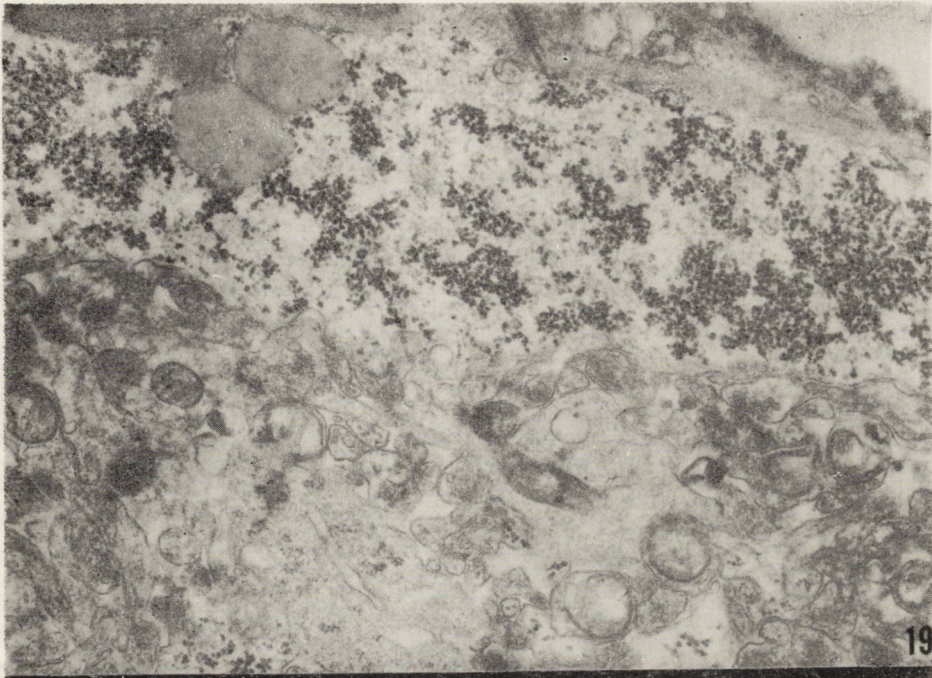
4. Bour H., Tutin M., Pasquier P.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. I. Clinical data with reference to 20 fatal cases. W: *Progress in Brain Research*, ed. H. Bour and Mc A. Ledingham, Amsterdam 1967, 24, 1—30.
5. Brown A. W., Brierley I. B.: Anoxic-ischemic cell changes in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. *J. neurol Sci.*, 1972, 16, 59—84.
6. Brucher J. M.: Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. W: *Carbon monoxide poisoning. Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour, J. Mc A. Ledingham. Elsevier, Amsterdam 1967, 24, 96—100.
7. Bulmer D.: Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
8. Cammermeyer I.: The importance of avoiding „dark neurons” in experimental neuropathology. *Acta neuropth. (Berl.)*, 1961, 1, 245—270.
9. Courville C. B.: The process of demyelination in the central nervous system. IV. Demyelination as a delayed residual of carbon monoxide asphyxia. *J. Nervous and Mental Disease*, 1957, 125, 534—546.
10. Goldsmith J. R.: Contribution of motor vehicle exhaust, industry and cigarette smoking to community carbon monoxide exposures. *An. New York Acad. Sci.*, 1970, 174, 122—134.
11. Hager H.: Electron microscopical observations on the early changes in neurons caused by hypoxidosis and on the ultrastructural aspects of neuronal necrosis in the cerebral cortex of mammals. W: *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Ed. J. Schadé i W. H. McMenemey. Oxford. Blackwell Sci. Publ., 1963, 125—138.
12. Hirano H., Inoue Y., Tanami J.: Studies on the mode of action of carbon monoxide. II. Pattern of action of carbon monoxide. *Jap. J. Hyg.*, 1968, 23, 286—292.
13. Hoppe-Kurowska B.: *Obraz histologiczny i histochemiczny gliopatii tlenko-węglowej in vitro*. Praca doktorska. Warszawa 1973.
14. Ibrahim M.Z.M., Pascoe E., Alam S., Miquel I.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.*, 1970, 60, 403—415.
15. Jacob H.: *Das Zentralnervensystem bei Infektionen, Intoxikationen und anderen Allgemein und Organerkrankungen*. W: *Hdb. der Spez. Path. Anatomie*. Ed. O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle, Springer, Berlin 1958, 13, 2A.
16. Jacob H., Mumme C., Solcher H.: Entmarkung bei zerebralen Oödemschaden. *Arch. Z. ges. Neurol.*, 1962, 203, 311—320.
17. Korthals J.: Doświadczalne niedokrwienie mózgu u królika. *Klinika i morfologia. Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 113—160.
18. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 315—322.
19. Kowada M., Ames A., Majno G., Wright R. L.: Cerebral ischemia. I. An improved experimental method for study, cardiovascular effects and demonstration of an early vascular lesion in the rabbit. *J. Neurosurg.*, 1968, 28, 150—157.
20. Lampert P. W.: Fine structural changes of myelin sheaths in the central nervous system. W: *The Structure and Function of Nervous Tissue*. Ed. G. H. Bourne, Academic Press, New York, 1968, 1, 187—204.

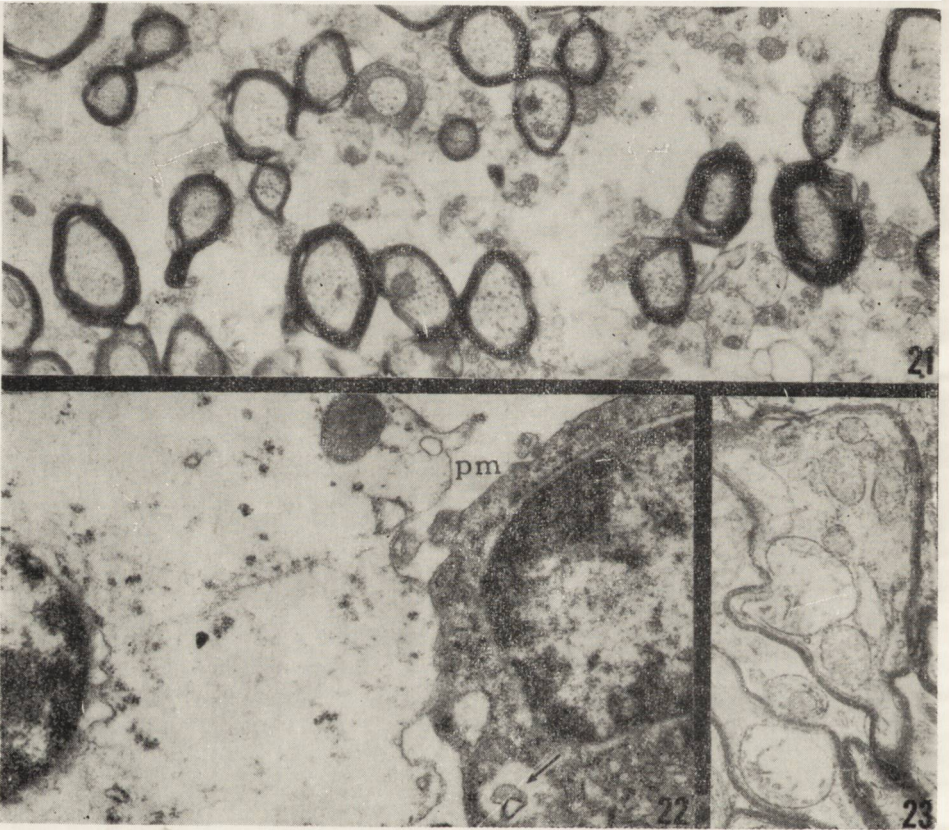


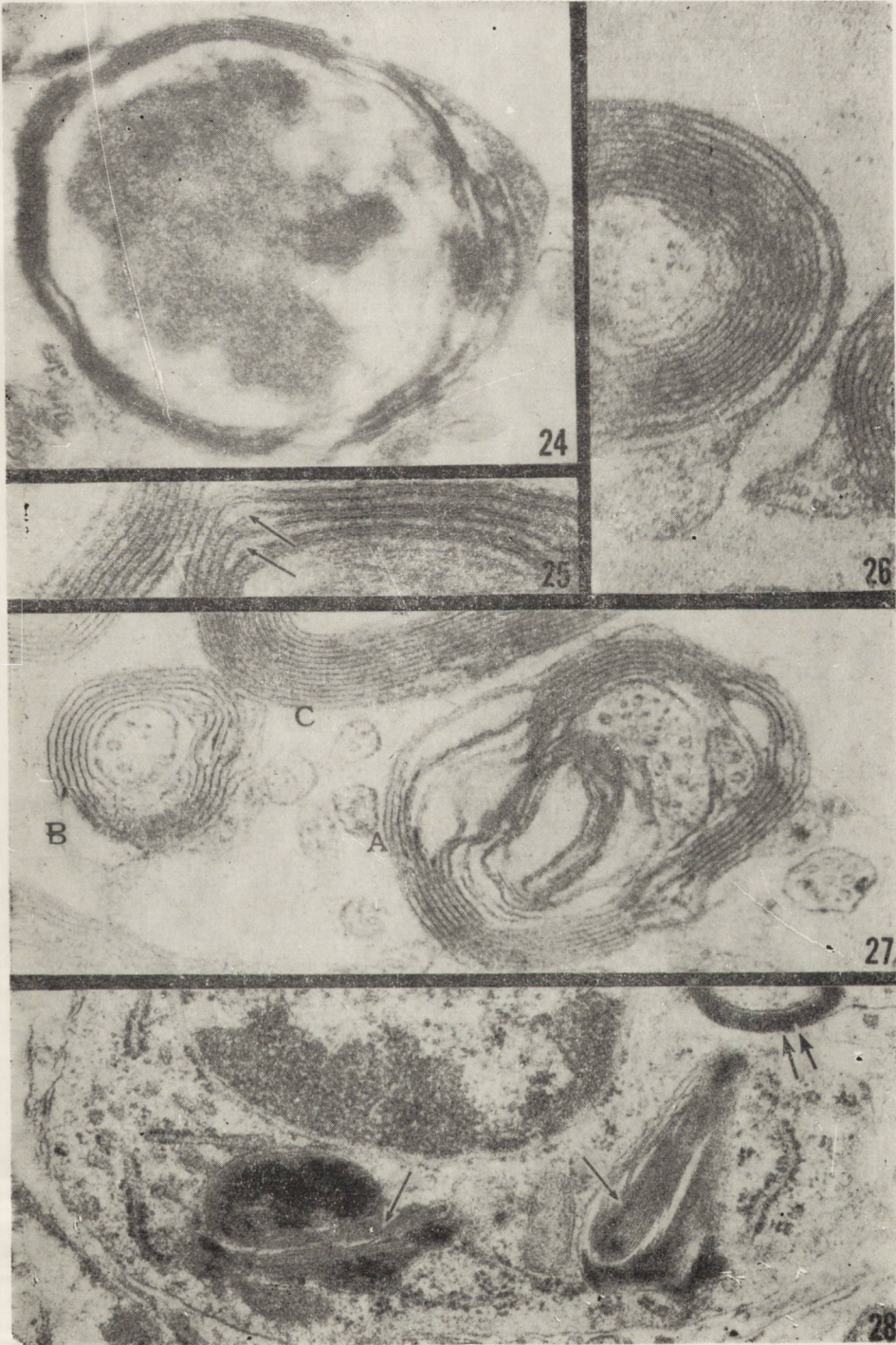


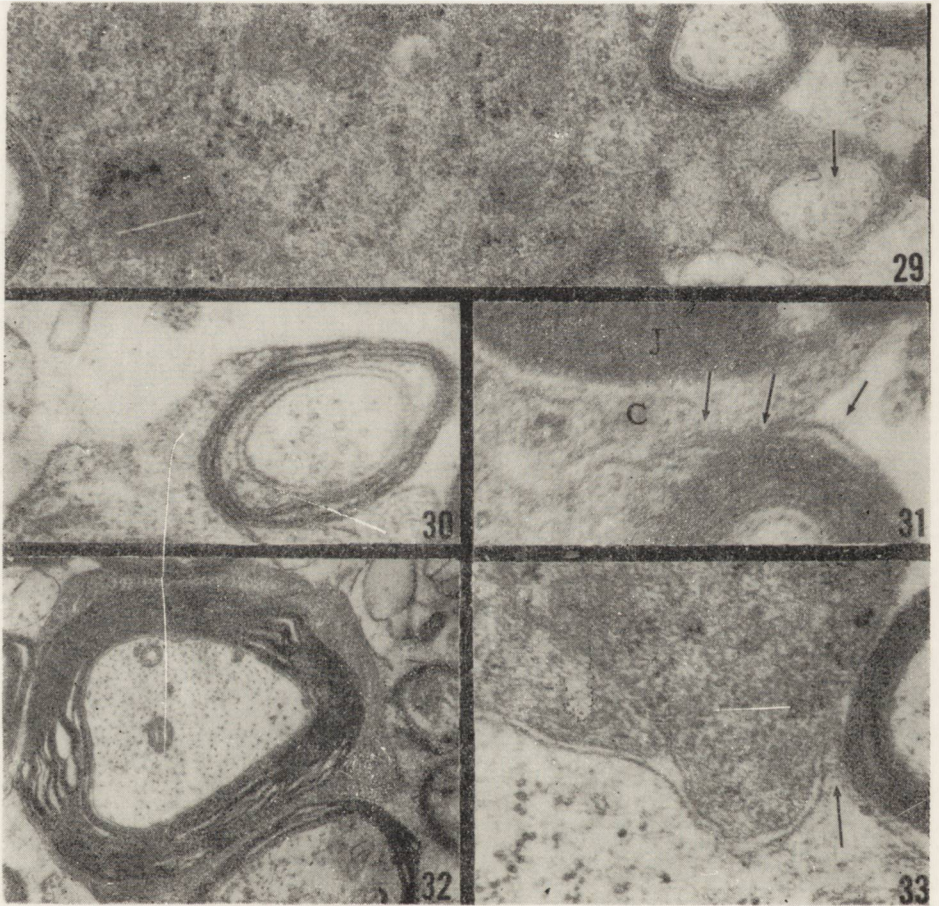












21. Lapresle J., Fardeau M.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. II. Anatomical study of brain lesions following intoxication with carbon monoxide (22 cases). W: Carbon monoxide poisoning. Progress in Brain Research. Ed. H. Bour, I. Mc A. Lendingham, Elsevier, Amsterdam 1967, 24, 96—100.
22. Levine E.: Experimental cyanide encephalopathy. Gradients of susceptibility in the corpus callosum. J. Neuropath. exp. Neurol., 1967, 26, 214—222.
23. Lindenberg R.: Patterns of CNS vulnerability in acute hypoxaemia, including anaesthesia accidents. W: Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Ed. I. P. Schadé, W. N. McMenemy, Blackwell, Oxford 1963, 189—209.
24. Lumsden C. E.: Cyanide leucoencephalopathy in rats and observations on the vascular and ferment hypotheses of demyelinating diseases. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1950, 13, 1—15.
25. Meyer A.: Experimentelle Erfahrungen über die Kohlenoxydvergiftung des Zentralnervensystem. Z. Neurol. 1928, 112, 187—212.
26. Meyer A.: Anoxias, intoxications and metabolic disorders. W: Neuropathology. Ed. J. G. Greenfield et al., E. Arnold, London 1963, 235—287.
27. Miyagishi T., Suwa N.: Electron microscopic studies on the cerebral lesions of rats in experimental carbon monoxide poisoning. Acta neuropath., 1969, 14, 118—125.
28. Mossakowski M. J., Long D. M., Meyers R. E., de Curret H. R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. J. Neuropath. exp. Neurol., 1968, 27, 500—516.
29. Mossakowski M. J., Pronaszko A., Korthals J.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. Neuropat. Pol., 1973, 11, 53—68.
30. Osetowska E.: Encefalopatia — CO. Neuropat. Pol., 1964, 2, 159—172.
31. Pentschew A.: Gasförmige Gifte. Ed. O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle, Springer, Berlin 1958, 13, 23.
32. Preziosi J. M., Lindenberg C., Levy D., Christensen M.: An experimental investigation in animals of the functional and morphologic effects of single and repeated exposures to high and low concentrations of carbon monoxide. Ann. New York Acad. Sci., 1970, 174, 369—384.
33. Romanowa H. P.: Patologonatomiczeskije izmenenija w gołownom mozgu sobak posle terminalnych sostojanii wyzwannyh ostroj krowopotierej i otrawieniem okiśju ugleroda. Awtoreferat dissertacji na soiskanie uczenaj stepeni kandidata medicinskih nauk. Moskwa 1959.
34. Schwedenberg T. M.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia. J. Neuropath. exp. Neurol., 1959, 18, 597—608.
35. Strassmann G.: The effect of repeated inhalation of illuminating gas on the brain. Monatschrift für Psychiatrie und Neurologie, 1949, 117, 360—366.
36. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Neuropat. Pol., 1973, 11, 301 — 314.
37. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski J.: The glycogen content and its topography and UDPGlucose: glycogen- α -4 glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. Acta neuropath., 1973, 24, 222—231.
38. Whitehead T. P., Worthington N.: The determination of carboxyhemoglobin. Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 356—358.

39. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta neuropath.* (Berl.), 1972, 22, 222—234.

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

PODPISY POD RYCINY

LEGENDS FOR FIGURES

- Ryc. 1.* Martwica komórek piramidowych w części odcinka h_2 i h_5 rogu Amona. Pow. 36 \times .
Fig. 1. Necrosis of pyramidal cells in a part of h_2 and h_5 segments of Amon horn. $\times 36$.
- Ryc. 2.* Martwica komórek piramidowych rogu Amona z wtórnym rozplemem glejowym w odpowiadającym odcinku warstwy piramidowej i *striatum radiationis*. Pow. 120 \times .
Fig. 2. Necrosis of pyramidal cells of Amon horn with secondary glial proliferation in the corresponding segment of pyramidal layer and *striatum radiationis*. $\times 120$.
- Ryc. 3.* Ognisko martwicy komórek nerwowych w *neocortex* ze zgębczeniem tkanki. Pow. 240 \times .
Fig. 3. Necrotic focus of nerve cells in *neocortex* with spongiosis of the tissue. $\times 240$.
- Ryc. 4.* Ognisko wybiórczej martwicy neuronów w prążkowie z odczynem glejowym. Pow. 120 \times .
Fig. 4. Focus of selective necrosis of neurons in striatum with glial reaction. $\times 120$.
- Ryc. 5.* Częściowa demielinizacja ciała modzelowatego, ośrodków półwalnych i lewego strzępka hipokampa. Drobne ogniska demielinizacji w drogach wzrokowych. Pow. 10 \times .
Fig. 5. Partial demyelination of corpus callosum, semioval centres and left hippocampal fimbria. Small demyelination foci in optic tracts. $\times 10$.
- Ryc. 6.* Odcinek istoty białej z plackowatą demielinizacją. Pow. 480 \times .
Fig. 6. Cerebral white matter with patchy demyelination. $\times 480$.
- Ryc. 7.* Zachowanie normalnej struktury tkanki wokół naczyń położonych w obrębie uszkodzonej istoty białej. Pow. 120 \times .
Fig. 7. Preservation of normal tissue structure around vessels situated within the damaged white matter. $\times 120$.
- Ryc. 8.* Złogi glikogenu w odcinku h_2 rogu Amona. Pow. 240 \times .
Fig. 8. Glycogen deposits in segment h_2 of Amon horn. $\times 240$.
- Ryc. 9.* Złogi glikogenu w istocie szarej prążkowie (jądro ogoniaste). Pow. 480 \times .
Fig. 9. Glycogen deposits in striatal grey matter (caudal nucleus). $\times 480$.
- Ryc. 10.* Złogi glikogenu w warstwie zwojowej kory mózdzku umiejscowione przy-naczyniowo i wokół komórek Purkinjego. Pow. 1000 \times .
Fig. 10. Glycogen deposits in the nerve cells layer of cerebellar cortex localized around the vessels and Purkinje cells. $\times 1000$.
- Ryc. 11.* Złogi glikogenu w perikariach komórek Purkinjego. Pow. 480 \times .
Fig. 11. Glycogen deposits in perikarya of Purkinje cells. $\times 480$.
- Ryc. 12.* Złogi glikogenu w perikariach i wypustkach komórek nerwowych jądra nerwu VII. Pow. 480 \times .
Fig. 12. Glycogen deposits in the perikarya and processes of nerve cells of facial nerve nucleus. $\times 480$.

Ryc. 13. Martwica odcinka h₂ rogu Amona połączona z całkowitym brakiem glikogenu. Złogi glikogenu są widoczne w warstwie drobinowej fascia dentata. Komórki piramidowe fascia dentata nie wykazują zmian. Pow. 120×.

Fig. 13. Necrosis of h₂ segment of Amon horn with complete absence of glycogen. Glycogen deposits visible in the molecular layer of fascia dentata. Pyramidal cells of fascia dentata show no changes. × 120.

Ryc. 14. Obrzmienie mitochondriów w wypustce protoplazmatycznej neuronu. s — synapsa. Pow. 14 000 ×.

Fig. 14. Swelling of mitochondria in dendritic process of a neuron. s — synapse. × 14 000.

Ryc. 15. Wycinek z perikarionu komórki nerwowej z zagęszczoną cytoplazmą. Obrzmienie mitochondriów (m) i siatki śródplazmatycznej (se). Wypustka glijowa — wg Pow. 18 000 ×.

Fig. 15. Fragment of nerve cell perikaryon with condensed cytoplasm. Swelling of mitochondria (m) and endoplasmic reticulum (se). Astrocytic process — wg × 18 000.

Ryc. 16. Martwiczo zmieniona komórka nerwowa i otaczające ją zwyrodnienie gąbczaste tkanki. Jądro — J, perikarion — P, jamka — Jm, ciemny profil wypustki — cp. Pow. 21 000 ×.

Fig. 16. Necrotic nerve cell. Around spongy degeneration of the tissue. Nucleus — J, perikaryon — P, cavitation — Jm, dark profile of the process — cp. × 21 000.

Ryc. 17. Nagromadzenie mitochondriów i ciałek gęstych w wypustce nerwowej. Glikogen — G. Pow. 37 000 ×.

Fig. 17. Accumulation of mitochondria and dense bodies in a nerve process. Glycogen — G. × 37 000.

Ryc. 18. Wypustka nerwowa z licznymi rozgałęzionymi strukturami tubularnymi. Pow. 19 000 ×.

Fig. 18. Nerve process with numerous branched tubular structures. × 19 000.

Ryc. 19. Ciała lipidowe i liczne ziarna glikogenu w przynaczyniowej wypustce astrocytu protoplazmatycznego. Pow. 15 000 ×.

Fig. 19. Lipid bodies and numerous glycogen grains in a perivascular process of protoplasmatic astrocyte. × 15 000.

Ryc. 20. Ciało lipidowe i liczne ziarna glikogenu w wypustce astrocytu włóknistego. Pow. 42 000 ×.

Fig. 20. Lipid body and numerous glycogen grains in a process of fibrillar astrocyte. × 42 000.

Ryc. 21. Poszerzenie przestrzeni między włóknami nerwowymi. Pow. 14 000 ×.

Fig. 21. Extension of the extracellular space between nerve fibres. × 14 000.

Ryc. 22. Poszerzenie przestrzeni (pm) między astrocytami i oligodendrocytem. W obrzmiałym mitochondrium oligodendrocytu widoczna struktura mielinopodobna (strzałka). W komórce astrocytarnej widoczne obrzmienie cytoplazmy i odcinkowe poszerzenie przestrzeni między błonami jądrowymi. Pow. 18 000 ×.

Fig. 22. Extension of the extracellular space (pm) between astrocyte and oligodendrocyte. Myelin-like structure visible in a swollen oligodendrocyte mitochondrium (arrow). Swelling of cytoplasm and segmental extension of the space between nuclear membranes visible in astrocyte. × 18 000.

Ryc. 23. Obrzmienie pojedynczych mitochondriów w wypustkach nerwowych.
Pow. 13 000 ×.

Fig. 23. Swelling of some mitochondria in nerve cell processes. × 13 000.

Ryc. 24. Zwyródnienie wypustki nerwowej pod postacią zagęszczenia cytoplazmy aksonu i zatarcia lub rozluźnienia struktury osłonki mielinowej. Pow. 30 000 ×.

Fig. 24. Axonal degeneration in the form of condensation of its cytoplasm with blurred and loosened structure of myelin sheath. × 30 000.

Ryc. 25. Oddzielenie się blaszek mielinowych powstałe na skutek rozszczepienia linii pośrednich osłonki mielinowej (strzałki). Pow. 90 000 ×.

Fig. 25. Separation of myelin lamellae due to splitting of intermediate lines of myelin sheath (arrows). × 90 000.

Ryc. 26. Oddzielenie się zewnętrznych blaszek mielinowych. Pow. 90 000 ×.

Fig. 26. Separation of two outer myelin lamellae. × 90 000.

Ryc. 27. Rozszczepienie blaszek osłonki mielinowej wypustki nerwowej widocznej po prawej stronie ryciny (A). Rozluźnienie struktury osłonki mielinowej wypustki nerwowej po lewej stronie ryciny (B). U góry ryciny widoczny wycinek prawidłowej osłonki mielinowej (C). Pow. 70 000 ×.

Fig. 27. Splitting of myelin sheath around nerve process on the right side of figure (A) and loosening of myelin sheath structure around axon visible on the left side (B). In the upper part of figure the fragment of normal myelin sheath (C) is seen. × 70 000.

Ryc. 28. Struktury mielinopodobne (pojedyncze strzałki) w cytoplazmie makrofaga wykazujące mniejszą gęstość elektronową niż normalna osłonka mielinowa (podwójne strzałki). Pow. 29 000 ×.

Fig. 28. Myelin-like structures (arrows) in macrophage cytoplasm showing a lower electron density than normal myelin sheath (double arrows). × 29 000.

Ryc. 29. Drobny akson (strzałka) otoczony przez cytoplazmę oligodendrocytu. Pow. 30 000 ×.

Fig. 29. Fine axon (arrow) surrounded by oligodendrocyte cytoplasm. × 30 000.

Ryc. 30. Osłonka mielinowa z poszerzoną zewnętrzną wypustką cytoplazmatyczną. Pow. 50 000 ×.

Fig. 30. Myelin sheath with extended external cytoplasmic process. × 50 000.

Ryc. 31. Osłonka mielinowa połączona z cytoplazmą oligodendrocytu poprzez ostatnią blaszkę mielinową (strzałki). Jądro — J, cytoplazma — C. Pow. 81 000 ×.

Fig. 31. Myelin sheath connected with oligodendrocyte cytoplasm by the last myelin lamella (arrows). Nucleus — J, cytoplasm — C. × 81 000.

Ryc. 32. Osłonka mielinowa dużego aksonu otoczona w całości przez rozbudowaną zewnętrzną wypustkę cytoplazmatyczną. W wypustce widoczne liczne poprzecznie przecięte tubule. Pow. 14 000 ×.

Fig. 32. Myelin sheath of large axon entirely surrounded by enlarged external cytoplasmic process. In the process numerous transversely sectioned tubuli are visible. × 14 000.

Ryc. 33. Wypustka o małej gęstości elektronowej połączona z ciałem komórkowym oligodendrocytu wykazującym normalną gęstość elektronową (strzałka wyznacza miejsce połączenia). Pow. 50 000 ×.

Fig. 33. Cell process of a low electron density connected with oligodendrocyte perikaryon showing normal electron density (arrow indicates point of junction). × 50 000.

GRAŻYNA SZUMAŃSKA

OBRAZ HISTOCHEMICZNY MÓZGU SZCZURA
W OSTRYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA *)Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Strukturalnym uszkodzeniom ośrodkowego układu nerwowego stanowiącym następstwo zatrucia tlenkiem węgla, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych, poświęcone jest obszerne piśmiennictwo neuropatologiczne. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy natomiast badań poświęconych zmianom histochemicznym w ośrodkowym układzie nerwowym, poza pracą Hoppe-Kurowskiej (1973), w której autorka omawia całokształt uszkodzeń histologicznych i histochemicznych występujących w hodowanej w warunkach pozaustrojowych tkance nerwowej i glejowej, poddanej działaniu tlenu węgla.

Śmiałek i wsp. (1973) w badaniach biochemicznych wykazali, że w odpowiednio dobranym modelu doświadczalnym zatrucia CO dochodzi do przejściowego gromadzenia się w ośrodkowym układzie nerwowym glikogenu, współlistniejącego z zaburzeniami w aktywności UDPG-g transferazy, fosforylasy i oksydazy cytochromowej w przypadkach, w których nie stwierdzano żadnych strukturalnych uszkodzeń tkankowych mózgu. W tych samych warunkach Albrecht (1973) wykazał obecność odwracalnych zaburzeń biosyntezy białka w mózgu. Wyniki wyżej wymienionych badań wskazują, że w następstwie ostrego zatrucia tlenkiem węgla dochodzi do zaburzeń metabolizmu ośrodkowego układu nerwowego, nie znajdujących wykładnika w jego obrazie morfologicznym.

Celem niniejszej pracy była histochemiczna ocena aktywności wybranych grup enzymatycznych w mózgu zwierząt poddanych jednorazowemu zatruciu tlenkiem węgla, u których nie stwierdzano strukturalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego. Ewentualne zmiany w aktywności histoenzymatycznej mogłyby stanowić wykładnik zaburzeń metabolicznych, wyprzedzających uszkodzenia strukturalne.

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

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 30 6-tygodniowych szczurach, rasy Wistar, samcach, wagi około 150 g. Materiał kontrolny stanowiło 18 szczurów. Zwierzęta doświadczalne umieszczano na okres 90 min. w komorze o pojemności 60 l, przez którą przez 60 min. przepuszczano w sposób ciągły powietrze (1 l/min.), zawierające 1% objętościowy tlenku węgla. Przez pozostałe 30 min. szczury pozostawały w komorze o zmniejszającej się zawartości CO, w wyniku przepuszczania przez nią w tym czasie czystego powietrza. W okresie zatruwania zwierzęta doprowadzano do stanu śpiączkowego, trwającego 15 min. W tym czasie poziom hemoglobiny tenkowęgłowej, oznaczanej wg metody Withehaeda i Warthingtona (1961) osiągał wartości 65—80%. Zastosowane warunki doświadczenia odpowiadały grupie IV w serii Korthalsa i wsp. (1973), w której badaniem w mikroskopie świetlnym i elektronowym nie stwierdzono zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym szczurów, poza nadmiernym gromadzeniem się złogów glikogenu. Warunki te były identyczne z warunkami doświadczalnymi stosowanymi przez Śmiałka i wsp. (1973) oraz Albrechta (1973) w przypadku badań biochemicznych.

Po zatruciu zwierzęta przenoszono do atmosfery czystego powietrza, a następnie dekapitowano bez narkozy w grupach po upływie 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 i 120 godzin od zakończenia doświadczenia. Każda grupa czasowa obejmowała po 3 zwierzęta doświadczalne i uzupełniana była 2 szczurami kontrolnymi, analogicznego wieku i wagi, nie poddanymi żadnym zabiegom.

Mózgi cięto na bloki w płaszczyźnie czołowej przechodzącej na wysokości skrzyżowania wzrokowego, rozwiniętych jąder podstawy oraz mózdzku z opuszką. Pobierane do badań bloki tkanki zamrażano na suchym lodzie w M-1 embedding matrix for frozen sectioning f-my Lipshaw i skrawano w kriostacie w temp. -15° na skrawki grubości 14 μ . Badanie histochemiczne obejmowało reakcję PAS wg Mc Mannusa i Mowry (1958) oraz oznaczanie glikogenu metodą PAS-dimedon wg Bulmera (1959). Swoistość odczynu kontrolowano trawieniem diastazą. Badanie histoenzymatyczne obejmowało określenie aktywności enzymów zestawionych w tabeli 1. Dla oceny ewentualnych uszkodzeń tkankowych oraz lepszego określenia topografii odczynów histochemicznych wykonano uzupełniające badania histologiczne na „bliźniaczych” skrawkach kriostatowych barwionych fioletem krezyłu.

Obraz histologiczny oceniany w barwieniu przeglądowym nie wyka-

Tabela 1. Wykaz wykonanych odczynów histochemicznych

Enzym	Metoda
Fosforylaza a	Takeuchi, Kuriaki (1955)
Fosforylaza a + b (niezależnie)	modyf. Godlewski (1963)
Fosforylaza całkowita	
Urydyno-dwufosfo-glukozy-glikogen-transferaza	Takeuchi, Glener (1961)
Oksydaza cytochromowa	Burston (1962)
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	Hess i wsp. (1958)
Dehydrogenaza bursztynianowa	Novikoff (1963)
Dehydrogenaza mleczanowa	Hess i wsp. (1958)
Fosfataza kwaśna	Barka (1963)
Fosfataza zasadowa	Gomori (1946)

WYNIKI

zywał zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w zadanej grupie zwierząt doświadczalnych.

Glikogen. U zwierząt kontrolnych drobne ziarniste złogi glikogenowe występowały jedynie w komórkach spłotu naczyńiówkowego, wyściółce komór, podoponowo oraz w niektórych neuronach formacji siateczkowej pnia mózgu.

U zwierząt doświadczalnych ziarnistości glikogenu pojawiały się ponadto we wszystkich formacjach szarych mózgu, zwłaszcza w korze mózgowej (ryc. 1), z wyraźnym nasileniem w rogu Amona, w strukturach szarych pnia mózgu oraz w warstwie komórek Purkiniego kory mózdzku (ryc. 2). Występowały one w postaci drobnych ziarnistości rozsianych w neuropilu, zagęszczających się dookoła naczyń oraz jąder komórek glejowych, a rzadziej wokół komórek nerwowych. Najobfitsze złogi glikogenowe obserwowano w grupie zwierząt 4-godzinnych, choć utrzymywały się one do 72 godziny po doświadczeniu. W 5 dni po doświadczeniu ilość i lokalizacja złogów glikogenowych nie odbiegały od obrazów stwierdzanych u zwierząt kontrolnych.

UDPG-g transferaza. Aktywność enzymu w mózgach zwierząt kontrolnych była niska i ograniczona wyłącznie do tych obszarów, w których stwierdzono złogi glikogenu. Ta sama zależność lokalizacyjna utrzymywała się również u zwierząt doświadczalnych. Złogi produktu końcowego reakcji stwierdzano w tych samych strukturach mózgu i mózdzku i w tym samym czasie co ziarnistości glikogenowe (ryc. 3, 4). W niektórych jednak okolicach mózgowia aktywność enzymu pojawiała się wcześniej niż złogi glikogenu. Należała do nich między innymi kora mózgu (ryc. 2), w której aktywność enzymatyczną UDPG-g transferazy stwierdzano już w 2-giej godzinie po zatruciu, podobnie jak w niektórych neuronach pnia mózgu, np. w jądrze bocznym nerwu przedśionkowego.

W okresie między 4 a 48 godziną po zatruciu odczyn enzymatyczny nasilał się, wykazując znaczne zróżnicowanie nasilenia w różnych okolicach mózgowia. Szczególnie wyraźnie występował w neuronach jądra bocznego formacji siatkowatej pnia mózgu i w niektórych jądrach nerwów czaszkowych oraz w komórkach Purkinjego (ryc. 5). W 5 dniu po doświadczeniu aktywność UDPG-g transferazy nie różniła się od stwierdzonej w materiale kontrolnym.

Fosforylaza y. U zwierząt kontrolnych stwierdzono bardzo znaczne zróżnicowanie natężenia i lokalizacji odczynu histochemicznego w poszczególnych reakcjach. Aktywność fosforylazy **a** była śladowa w większości formacji szarych i białych mózgu, nieco silniejsza jedynie w spoidle wielkim (ryc. 6), w torebce wewnętrznej i pęczkach włókien w jądrach podstawy. Aktywność fosforylazy **a+b** była znacznie silniejsza w formacjach szarych, zwłaszcza w korze mózgu w porównaniu z aktywnością fosforylazy **a**. Zróżnicowanie to wskazuje na to, że struktury szare zawierają enzym w postaci nieczynnej **b**, uczynnianej przez adenozyjno-mono-fosforan.

Odczyn na fosforylazę całkowitą, stanowiący wykładnik czynności fosforylazo-b-kinazy, był bardzo silny w istocie szarej jak i białej mózgu (ryc. 7) i zlokalizowany w komórkach nerwowych kory i w jej neuropilu oraz we włóknach nerwowych i w gleju. Szczególne nasilenie reakcji histoenzymatycznej obserwowano w neuronach rogu Amona i we włóknach spoidła wielkiego.

U zwierząt doświadczalnych w najwcześniejszych grupach czasowych, od 0—4 godz. po zatruciu, nie stwierdzono zmian w aktywności fosforylaz. Natomiast w okresie od 6 do 48 godz. po doświadczeniu obserwowano stopniowe wybitne nasilenie się odczynu na fosforylazę **a+b**, fosforylazę **b** i fosforylazę całkowitą (*fosforylazo-b-kinaza*) (ryc. 8). Nasilenie odczynu barwnego dotyczyło zarówno struktur istoty białej, jak i szarej, zwłaszcza kory mózgu, a w niej komórek nerwowych głębokich warstw (ryc. 9).

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu. Aktywność tego enzymu u zwierząt kontrolnych była niska i wyrażała się delikatnym dyfuzyjnym odczynem w korze mózgu i jeszcze słabszym w istocie białej, związanym zazwyczaj z komórkami glejowymi (ryc. 10). Podobną reakcję enzymatyczną obserwowano w korze i w istocie białej mózdzku. Znacznie silniejszy odczyn stwierdzano w jądrach podstawy.

U zwierząt poddanych zatruciu, już w czasie „0”, obserwowano wydatny wzrost aktywności tego enzymu, przede wszystkim w istocie białej, choć wyraźny również w strukturach szarych mózdzku i mózgu. W dalszych grupach czasowych od 2 do 48 godziny obserwowano obfite

złogi dwuformazanu w cytoplazmie i wypustkach komórek glejowych, głównie astrocytów istoty białej oraz komórek nerwowych kory mózgu (ryc. 11) i mózdzku. Wysoka, wyraźnie podwyższona w stosunku do zwierząt kontrolnych aktywność enzymu utrzymywała się aż do 5 dnia po zatruciu.

Dehydrogenaza bursztynianowa. U zwierząt kontrolnych wysoką aktywność enzymu obserwowano we wszystkich formacjach szarych mózgowia. Przy czym dodatni odczyn histochemiczny występował zarówno w neuropilu jak i w części perikarialnej neuronów. Szczególnie nasiloną reakcję stwierdzano w komórkach nerwowych głębokich warstw kory (ryc. 12) oraz w niektórych neuronach okolicy podwzgórzowej (ryc. 14), pnia mózgu i komórkach Purkiniego mózdzku. W grupie zwierząt doświadczalnych, już w czasie „0” i w pozostałych czasach, aż do 72 godzin po zatruciu stwierdzono rozlany wybitny spadek aktywności enzymu zarówno w neuropilu jak i w perikariach neuronów (ryc. 13 i 15) we wszystkich formacjach szarych. Obraz aktywności enzymatycznej po 5 dniach nie odbiegał natomiast od obrazu stwierdzonego u zwierząt kontrolnych.

Dehydrogenaza mleczanowa. Wysoka aktywność enzymatyczna, występująca we wszystkich formacjach szarych mózgowia oraz w komórkach glejowych istoty białej, głównie w oligodendrocytach nie wykazywała różnic intensywności i lokalizacji u zwierząt doświadczalnych w porównaniu z materiałem kontrolnym.

Oksydaza cytochromowa. Aktywność enzymatyczna oksydazy cytochromowej u zwierząt kontrolnych wykazywała identyczną lokalizację jak aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Zjawiskiem charakterystycznym dla oksydazy cytochromowej była przewaga nasilenia odczynu histochemicznego w neuropilu w porównaniu z perikariami komórek nerwowych. Wiąże się to z wysoką aktywnością enzymatyczną w dendrytach, aksonach i zakończeniach synaptycznych. Najsilniejszy odczyn histoenzymatyczny u zwierząt kontrolnych występował w istocie szarej jąder podstawy.

U szczurów doświadczalnych, już w najwcześniejszych grupach czasowych stwierdzano wybitny, stopniowo nasilający się spadek aktywności enzymu we wszystkich strukturach mózgowia (ryc. 17). Przy czym nasilenie reakcji histoenzymatycznej nawet w 5 dni po zatruciu jest niższe niż w grupie kontrolnej.

Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej. W obrazie histochemicznym nie stwierdzono różnic nasilenia i lokalizacji aktywności obu enzymów między grupą zwierząt doświadczalnych i kontrolnych.

OMÓWIENIE

Wyniki naszych badań wskazują, że ostre zatrucie tlenkiem węgla nie prowadzące do strukturalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, powoduje zaburzenia w szeregu ognisk metabolizmu tkanki nerwowej, których wykładnikiem są stwierdzane zmiany histochemiczne.

Zasadniczy wzorzec nieprawidłowości histochemicznych był zbliżony do opisywanych w różnych modelach doświadczalnych niedotlenienia tkanki nerwowej (Shimizu, Hamuro 1958, Becker, Barron 1961, Spector 1963a, 1963b, Atkinson, Spector 1964, Mossakowski i wsp. 1968, 1973, Ibrahim i wsp. 1970, Domańska-Janik 1972). Nasze wyniki różniły się jednak od większości obserwacji wyżej wymienionych autorów odwracalnością i dynamiką narastania. Przedstawione zmiany histochemiczne wykazywały istotne zróżnicowanie w zależności od badanego enzymu. Enzymy metabolizujące glikogen wykazywały wzrost aktywności towarzyszący pojawieniu się złogów wielocukru. Podwyższenie aktywności charakteryzowało również dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu, reprezentującą pierwsze ogniwo cyklu pentozowego, podczas gdy oba enzymy mitochondrialne: oksydaza cytochromowa i dehydrogenaza bursztynianowa wykazywały bardzo wczesny spadek aktywności. Cytoplazmatyczna dehydrogenaza mleczanowa reprezentująca ciąg glikolityczny nie wykazywała natomiast żadnym zmian aktywności, podobnie jak lizosomalne enzymy hydrolityczne: fosfataza kwaśna i zasadowa.

Najbardziej znamienne i wykazujące największe podobieństwo do obrazów stwierdzanych w różnych typach niedotlenienia było gromadzenie się glikogenu i wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen.

Odwracalne gromadzenie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym w następstwie różnego typu niedotlenienia i/lub niedokrwienia tkanki nerwowej stwierdzili Mossakowski i wsp. (1968, 1973), Ibrahim i wsp. (1970), Long i wsp. (1972). Cechą wspólną obrazów stwierdzanych przez wyżej wymienionych autorów było odkładanie się złogów polisacharydu po zakończeniu działania czynnika uszkadzającego i ich występowanie wyłącznie w tych obszarach ośrodkowego układu nerwowego, które nie wykazywały cech histologicznego uszkodzenia. Topografia złogów wykazywała przy tym wyraźną zależność od typu doświadczenia i wieku zwierząt, a dynamika ich gromadzenia i zanikania była uwarunkowana rodzajem niedotlenienia.

W zatruciu tlenkiem węgla, zarówno w serii doświadczeń, przedstawionych w niniejszej pracy, jak i w doświadczeniach Korthalsa i wsp. (1973) (grupa IV), złogi glikogenowe pojawiały się i osiągały największe

nasilenie znacznie wcześniej niż w innych typach doświadczalnej hipoksji i ischemii.

Wzrost aktywności UDPG-g transferazy (syntetazy glikogenowej) wyprzedzał w czasie pojawianie się złogów glikogenu, podobnie jak w badaniach Mossakowskiego i wsp. (1968) nad okołoporodową asfiksją noworodków, wykazując przy tym pełną zgodność topograficzną w odkładaniu się polisacharydu. Dynamika gromadzenia się glikogenu i wzrostu aktywności UDPG-g transferazy są również zgodne z biochemicznymi obserwacjami Śmiałka i wsp. (1971, 1973) i mogą wskazywać, że w zatruciu tlenkiem węgla, podobnie jak w niedokrwieniu mózgu, nieprawidłowe gromadzenie się glikogenu jest związane ze wzrostem jego syntezy, uwarunkowanej podwyższoną aktywnością syntetazy glikogenowej. Mechanizm stymulacji aktywności UDPG-g transferazy jest niewątpliwie złożony i wieloogniskowy. Zwraca jednak uwagę fakt, że w następstwie niedotlenienia dochodzi do trwającego przez kilka godzin upośledzenia zużytkowania glukozy (Atkinson, Spector 1964)). Nie zużytkowana glukoza, zwłaszcza w jej formie ufosforylowanej może stanowić w tym przypadku czynnik stymulujący aktywność syntezy glikogenu (Breckenridge, Crawford (1961)). Nie wyłącza to oczywiście innych mechanizmów stymulacji aktywności enzymu.

W przeciwieństwie do syntetazy glikogenu, wzrost aktywności fosforylaz przypadał na okres późniejszy, pojawiając się w czasie znacznego nagromadzenia złogów wielocukru. Wydaje się, że glikogen gromadzący się w zwiększonej ilości może stanowić, zgodnie z sugestiami Nelsona i wsp. (1968) czynnik stymulujący aktywność fosforylaz. W naszym materiale zwracało uwagę zróżnicowanie natężenia aktywności enzymatycznej w trzech odczynach histochemicznych na fosforylasy, wskazujące przede wszystkim na wzrost aktywności fosforylasy **b**, zależnej od AMP, oraz fosforylazo-b-kinazy. Zmiany w puli nukleotydów adeninowych, w tkance nerwowej w następstwie zatrucia tlenkiem węgla, ze wzrostem poziomu AMP wykazane przez Sikorską i wsp. (1973) mogą z kolei stanowić czynnik stymulujący ten układ enzymatyczny.

Drugim elementem obserwowanych zmian histochemicznych był znaczny i wczesny spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej. Wydaje się, że obniżenie aktywności obu enzymów, spostrzegane również przez Spectora (1963a, 1963b) w przypadkach niedotlenienia prostego i ischemiczno-anoksyjnego, stanowi wykładnik zaburzeń czynnościowych w mitochondriach, jakkolwiek Korthals i wsp. (1973) w analogicznej grupie doświadczalnej (grupa IV) nie stwierdzali w obrazie mikroskopowo-elektronowym zmian w ich strukturze. Z drugiej strony jednak ci sami autorzy podkreślali wrażliwość mitochondriów komórek nerwowych i oligodendrocytów na dzia-

łanie tlenu węgla (grupa V). Wobec nie wyjaśnionego zagadnienia możliwości przechodzenia CO do tkanek ośrodkowego układu nerwowego, trudno jest przesądzić w jakiej mierze obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej jest następstwem hipoksji anoksyjnej, związanej z wytworzeniem hemoglobiny tlenkowęglovej, a w jakiej efektem bezpośredniego blokowania oksydazy cytochromowej przez CO. Zakładając możliwość przechodzenia CO do tkanek ośrodkowego układu nerwowego wraz z płynem obrzękowym (Schwedenberg 1959), należy zwrócić uwagę, że w analogicznej do naszej grupy doświadczalnej, Korthals i wsp. (1973) nie stwierdzili żadnych cech obrzęku mózgu.

Analogiczny do obserwowanego w naszym materiale wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu opisała Domańska-Janik (1972) u zwierząt w prostym i ischemiczno-hipoksyjnym niedotlenieniu mózgu. Zmiany histochemiczne, występujące wybiórczo w gleju, przede wszystkim astrocytarnym mogą być wyrazem aktywizacji metabolicznej cyklu pentozowego. Być może zwiększenie aktywności G-6-P DH jest związane z aktywacją procesów biorących udział w biosyntezie białka w komórkach glejowych, której wzrost w następstwie zatrucia tlenkiem węgla, ograniczony wyłącznie do frakcji glejowej, przy wydatnym spadku w neuronach stwierdzili Albrecht i Śmiałek (1973). Zgodnie z panującymi poglądami cykl pentozowy jest związany z procesami biosyntezy białek w ośrodkowym układzie nerwowym (Burt, Wenger 1961).

Brak zmian w aktywności dehydrogenazy mleczanowej, przy ich stwierdzaniu przez innych autorów (Domańska-Janik 1972) może być uwarunkowany stopniem uszkodzenia tkanki nerwowej. W materiale Domańskiej-Janik (1972), obniżenie aktywności LDH podobnie zresztą jak G-6-P DH dotyczyło bowiem tylko nieodwracalnie uszkodzonych obszarów mózgu. Niezmieniona aktywność LDH w obrazie histochemicznym nie może być jednoznacznie traktowana jako wyraz rzeczywistego braku zmian w tym układzie enzymatycznym. Zróznicowanie reakcji poszczególnych izoenzymów LDH na niedotlenienie może być odpowiedzialne za brak uchwytnych zmian w obrazie globalnej aktywności enzymatycznej uzyskiwanym w preparacie histochemicznym (Latner, Skillen 1968).

Brak zaburzeń w aktywności enzymów hydrolitycznych należy zapewne wiązać z natężeniem uszkodzenia tkanki. Becker i Barron (1961) podkreślali, że wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w tkance nerwowej wiąże się z występowaniem zmian zwyrodnieniowych w neuronach, a jej spadek z ubytkami komórek. W naszym materiale nie obserwowano tego typu zmian.

Podsumowując nasze obserwacje należy podkreślić, że stwierdzane przez nas nieprawidłowości histochemiczne odpowiadają zmianom opi-

sywanym jako następstwo niedotlenienia. Różnice obrazu histochemicznego w naszej serii doświadczalnej w porównaniu z obserwacjami innych autorów na innych modelach niedotlenienia należy odnieść zapewne do odrębności warunków doświadczalnych, dotyczących przede wszystkim stopnia i czasu trwania niedotlenienia. Ze względu na wspomnianą powyżej niejasność, co do przechodzenia CO do ośrodkowego układu nerwowego trudno ocenić jaki jest udział cytotoksycznego działania tlenku węgla, związanego z jego powinowactwem do komórkowych układów oddechowych, w patogenezie opisanych zmian histochemicznych. Jego możliwość sugerują nieprawidłowości aktywności oksydazy cytochromowej oraz biochemiczne obserwacje Śmiałka i wsp. (1973), którzy stwierdzili ca 25% spadek aktywności tego enzymu w mitochondriach mózgu już w czasie zatruwania zwierząt.

WNIOSKI

1. Ostre zatrucie tlenkiem węgla, nie powodujące trwałych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, prowadzi do przejściowych, odwracalnych w większości zmian histochemicznych, wyrażających się gromadzeniem się glikogenu, wzrostem aktywności enzymów metabolizujących glikogen i dehydrogenazy glikozo-6-fosforanu, oraz spadkiem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej.

2. Obserwowane zmiany histochemiczne mają charakter identyczny z zaburzeniami opisywanymi w innych typach doświadczalnego niedotlenienia.

3. Brak jest danych pozwalających na określenie patogenetycznej roli cytotoksycznego działania tlenku węgla.

G. Шуманска

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ КАРТИНА МОЗГА КРЫСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ОКСИУГЛЕРОДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Резюме

Проведены гистохимические исследования мозга крыс, подвергнутых острому отравлению окисью углерода. Животные помещались на 1,5 часа в камеру, через которую пропускали газовую смесь, содержащую 1% окиси углерода.

Уровень карбоксигемоглобина в крови животных составлял 65—80%. Во время отравления крысы в течение 15 минут были в состоянии спячки. Животных умертвляли в 0, 2, 4, 6, 12, 24 и 48 часов, а также 3 и 5 дней после отравления. Исследование охватывало оценку накопления гликогена и активности следующих энзимов: УДФГ-г-трансферазы, фосфорилаз, цитохромоксидазы, дегидрогеназ: глюкозо-6-фосфата, сукцината и молочной кислоты, а также щелочной и кислой фосфатазы. Параллельно проведен гистологический контроль материала.

Ни в одном случае не установлены видимые гистологические повреждения центральной нервной системы. В то время как в цитохимической картине мозга животных, подвергнутых отравлению окисью углерода, установлено наличие накоплений гликогена, повышение активности энзимов метаболизирующих гликоген (УДФГ-г-трансферазы и фосфорилаз), а также дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата при одновременном уменьшении активности дегидрогеназы сукцината и цитохромоксидазы. Активность дегидрогеназы молочной кислоты, а также кислой и щелочной фосфатазы независимо от времени после отравления не отличалось от активности, наблюдаемой у контрольных животных.

Вышепредставленные цитохимические преобразования были обратимыми и полностью исчезли через 5 дней после отравления. Являются они показателем нарушения метаболизма нервной ткани в результате действия CO, находящихся ниже порога ее необратимого повреждения.

G. Szumańska

HISTOCHEMICAL PICTURE OF RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL ACUTE CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Summary

Histochemical studies were carried out on 30 rats subjected to acute intoxication with carbon monoxide. The animals were group ventilated with a gas mixture containing 1% carbon monoxide for 1.5 hr in a chamber. The blood carboxy-hemoglobin level was 65—80%. During intoxication the animals were in comatous state for a period of 15 min. The rats were sacrificed at 0, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 hrs and 3 and 5 days after intoxication. The studies included the evaluation of glycogen accumulation and of the activity of the following enzymes: UDPG-transferase, phosphorylases, cytochrome oxidase, glucose-6-phosphate, succinate- and lactate dehydrogenases and acid and alkaline phosphatases. Parallel, a histological examination of the material was performed.

No histologically detectable changes in the central nervous system were found in any of the examined cases. Histochemical examination of the brains of rats subjected to carbon monoxide intoxication revealed accumulation of glycogen deposits and an increase of the activity of glycogen-metabolizing enzymes (UDPG-transferase and phosphorylases) and glucose-6-phosphate dehydrogenase with a concomitant drop in the succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase activity. The activities of lactate dehydrogenase and acid- and alkaline phosphatases were in all times after intoxication identical to the control values. The above histochemical changes were reversible and retreated completely within 5 days after intoxication. These changes form a manifestation of metabolic disturbances of the nervous tissue following CO intoxication, which do not exceed the threshold of its irreversible impairment.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide in individual steps of synthesis in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973.
2. Albrecht J., Śmiałek M.: Konsultacja osobista, 1973.

3. Atkinson J. N. C., Spector R. G.: Metabolism of glucose in anoxic ischemic rat brain. *Brit. J. Exp. Path.*, 1964, 45, 393.
4. Barka T., Anderson P. J.: *Histochemistry: Theory, Practice and Bibliography*. Hoeber Med. Div. New York, London 1963.
5. Becker N. H., Barron K. D.: The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Path.*, 1961, 38, 161—175.
6. Breckenridge B. M., Crawford E. J.: The quantitative histochemistry of brain enzymes of glycogen metabolism. *J. Neurochem.*, 1961, 7, 234—240.
7. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
8. Burstone M. S.: *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*. Acad. Press Inc. New York and London 1962.
9. Burt A. M., Wenger B. S.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the brain of the developing chick. *Dev. Biol.*, 1961, 3, 84—95.
10. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 17—43.
11. Godlewski H. G.: Are active and inactive phosphorylases histochemically distinguishable? *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 108—112.
12. Gomori G.: *Cyt. wg Pearse A. G. E.*, poz. 24.
13. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Piridine nucleotide linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753—760.
14. Hoppe-Kurowska B.: *Obraz histologiczny i histochemiczny gliopatii tlenkowej in vitro*. Praca doktorska. Warszawa 1973.
15. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.*, 1970, 20, 250—265.
16. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: *Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej*. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 279—300.
17. Latner A. L., Skillen A. W.: *Isoenzymes in biology and medicine*. Acad. Press, 1968.
18. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath.*, 1972, 20, 335—347.
19. McManus J. F. A., Mowry R. W.: Effects of fixation on carbohydrate histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1958, 6, 309—316.
20. Mossakowski M. J., Long D. M., Meyers R. E., de Curet H. R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 500—516.
21. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 53—68.
22. Nelson S. R., Schulz D. W., Passonneau J., Lowry O. H.: Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.*, 1968, 15, 1271—1279.
23. Novikoff A.: *Electron transport enzymes biochemical and tetrazolium studies*. I Inter. Congr. Histochem. Cytochem. Pergamon Press, Oxford 1963, 27, 500—516.

24. Pearse A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 2 Ed. Little, Brown, and Comp., Boston 1972.
25. Schwedenberg T. H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide poisoning. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1959, 18, 597—608.
26. Shimizu N., Hamuro Y.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wounds. *Nature*, 1958, 181, 781—782.
27. Sikorska M., Bicz W., Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Concentration of adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP) in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia. W przygotowaniu do druku.
28. Spector R. J.: Cerebral succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase and mono-amino-oxidase activity in experimental anoxic-ischemic brain damage. *Brit. J. exp. Path.*, 1963 a, 44, 251—254.
29. Spector R. J.: Selective changes in dehydrogenase enzymes and pyridine nucleotides in rat brain in anoxic-ischemic encephalopathy. *Brit. J. exp. Path.*, 1963b, 44, 312—316.
30. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDP-glucose: Glycogen α -4-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) and α -1,4-Glucan: Orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1) activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1971, 19, 242—248.
31. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Korthals J., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPG-glucose: glycogen- α -4 glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath.*, 1973, 24, 222—231.
32. Takeuchi T., Kuriaki H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, 3, 153—160.
33. Takeuchi T., Glenner G. G.: Histochemical demonstration of uridine disphosphate glucose — glycogen transferase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 11, 304—316.

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

PODPISY POD RYCINY
LEGENDS FOR FIGURES

Ryc. 1. Kora mózgu, warstwa drobinowa. Ziarniste złogi glikogenu w neuropilu i wokół naczyń (4 godz. po zatruciu). PAS-dimedon. Pow. 200×.

Fig. 1. Granular glycogen deposits in neuropile and around the vessels in the molecular layer of cerebral cortex (4 hrs after intoxication). PAS-dimedone, ×200.

Ryc. 2. Aktywność UDPG transferazy w warstwie drobinowej kory mózgu (2 godz. po zatruciu). Pow. 200×.

Fig. 2. UDPG-transferase activity in the molecular layer of cerebral cortex (2 hrs after intoxication). ×200.

Ryc. 3. Ziarnistości glikogenu w neuropilu w warstwie drobinowej kory mózgu (24 godz. po zatruciu). PAS-dimedon. Pow. 400×.

Fig. 3. Glycogen granulations in the neuropile in the molecular layer of cerebral cortex (24 hrs after intoxication). PAS-dimedone. ×400.

Ryc. 4. Aktywność UDPG transferazy w warstwie drobinowej kory mózgu (24 godz. po zatruciu). Pow. 400×.

Fig. 4. UDPG-transferase activity in the molecular layer of cerebral cortex (24 hrs after intoxication). ×400.

Ryc. 5. Aktywność UDPG transferazy w komórkach Purkiniego (4 godz. po zatruciu). Pow. 400×.

Fig. 5. UDPG-transferase activity in Purkinje cells (4 hrs after intoxication). ×400.

Ryc. 6. Aktywność fosforylazy a w spidle wielkim i korze mózgu u zwierzęcia kontrolnego. Pow. 100×.

Fig. 6. Phosphorylase a activity in corpus callosum and cerebral cortex in a control animal. ×100.

Ryc. 7. Aktywność fosforylazy całkowitej w spidle wielkim i w korze mózgu u zwierzęcia kontrolnego. Pow. 100×.

Fig. 7. Total phosphorylase activity in corpus callosum and cerebral cortex in a control animal. ×100.

Ryc. 8. Wzrost aktywności fosforylazy całkowitej w spidle wielkim i korze (6 godz. po zatruciu). Pow. 100×.

Fig. 8. Increase of total phosphorylase activity in corpus callosum and cerebral cortex (6 hrs after intoxication). ×100.

Ryc. 9. Silny ziarnisty odczyn na fosforylazę całkowitą w neuronach kory mózgu (12 godz. po zatruciu). Pow. 400×.

Fig. 9. Strong granular total phosphorylase reaction in cerebral cortex neurons (12 hrs after intoxication). ×400.

Ryc. 10. Słaba dyfuzyjna aktywność G-6-P dehydrogenazy w spidle wielkim i korze mózgu u zwierzęcia kontrolnego. Pow. 200×.

Fig. 10. Weak diffuse G-6-P dehydrogenase activity in the corpus callosum and cerebral cortex in a control animal. ×200.

Ryc. 11. Zwiększenie intensywności odczynu G-6-P dehydrogenazy w astrocytach istoty białej i neuronach kory mózgowej (4 godz. po zatruciu). Pow. 200×.

Fig. 11. Increase in intensity of G-6-P dehydrogenase reaction in white matter astrocytes and cerebral cortex neurons (4 hrs after intoxication). ×200.

Ryc. 12. Silna, nierównomierna aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w neuropilu i neuronach w IV warstwie kory mózgu, zwierzę kontrolne. Pow. 200×.

Fig. 12. Strong irregular succinic dehydrogenase activity in neuropile and neurons in the IVth cerebral cortex layer, control animal. ×200.

Ryc. 13. Obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w warstwie komórek różnokształtnych kory mózgu (2 godz. po zatruciu). Pow. 200×.

Fig. 13. Decrease of succinic dehydrogenase activity in the layer of multiform cells in cerebral cortex (2 hrs after intoxication). ×200.

Ryc. 14. Duże neurony pola przedwzrokowego z silnie zaznaczoną aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej w cytoplazmie, zwierzę kontrolne. Pow. 100×.

Fig. 14. Large neurons of preoptic area with strong succinic dehydrogenase activity in the cytoplasm, control animal. ×100.

Ryc. 15. Rozlane obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w neuropilu jądra przedsionkowego i zanik aktywności w neuronach (2 godz. po zatruciu). Pow. 100×.

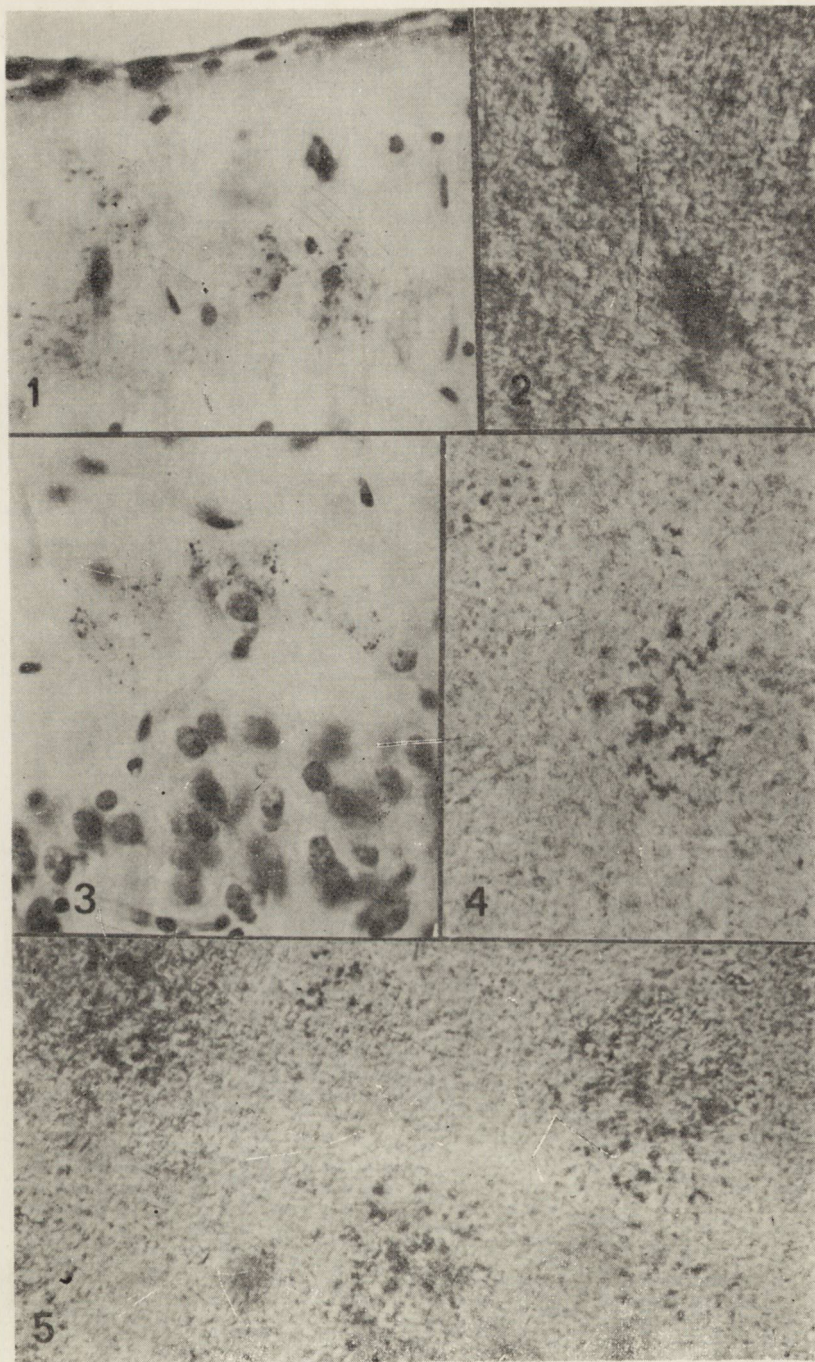
Fig. 15. Diffuse decrease of succinic dehydrogenase activity in neuropile of vestibular nucleus and lack of activity in neurons (2 hrs after intoxication). ×100.

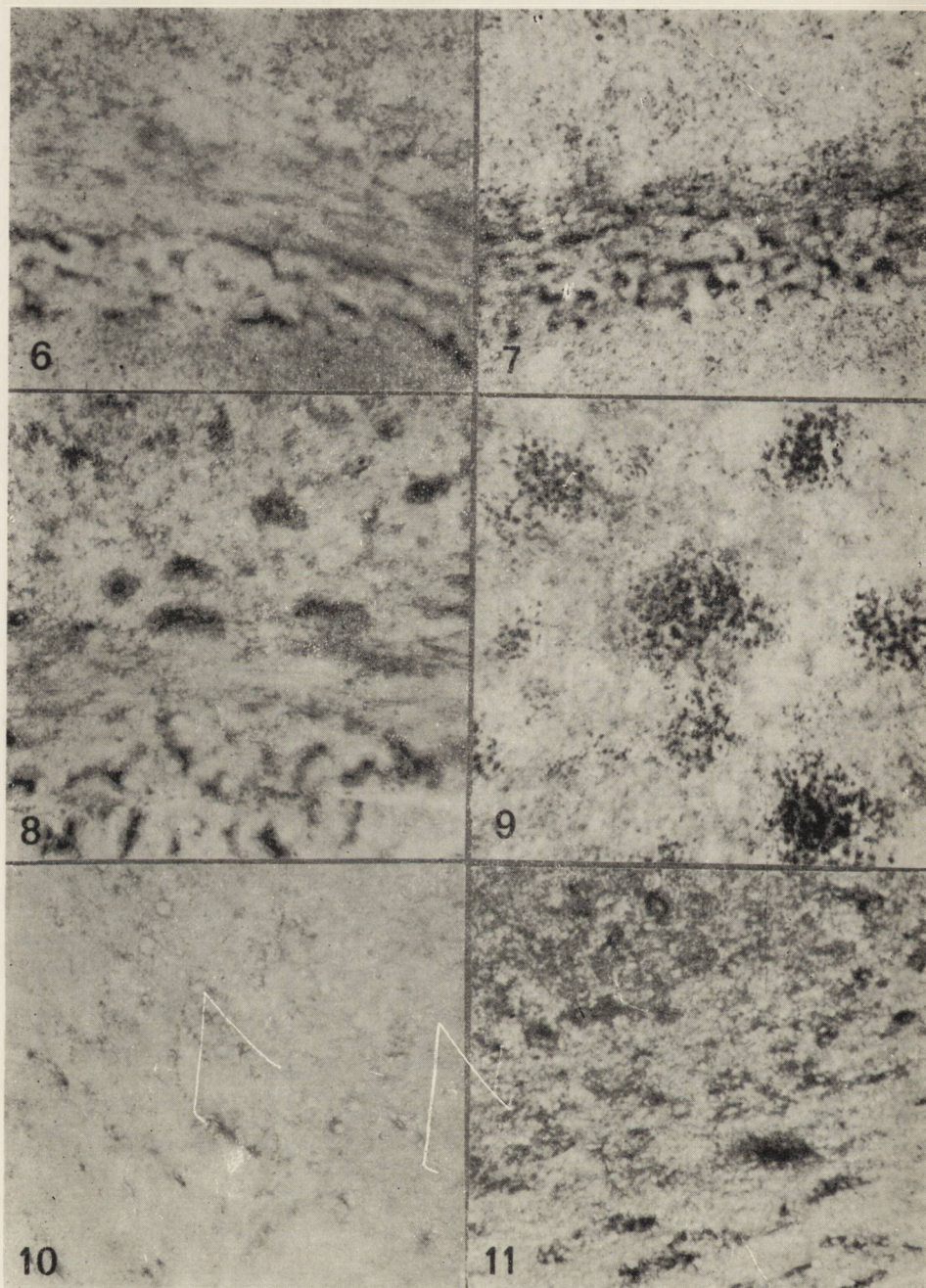
Ryc. 16. Silna ziarnista aktywność oksydazy cytochromowej w jądrach podstawy, zwierzę kontrolne. Pow. 200×.

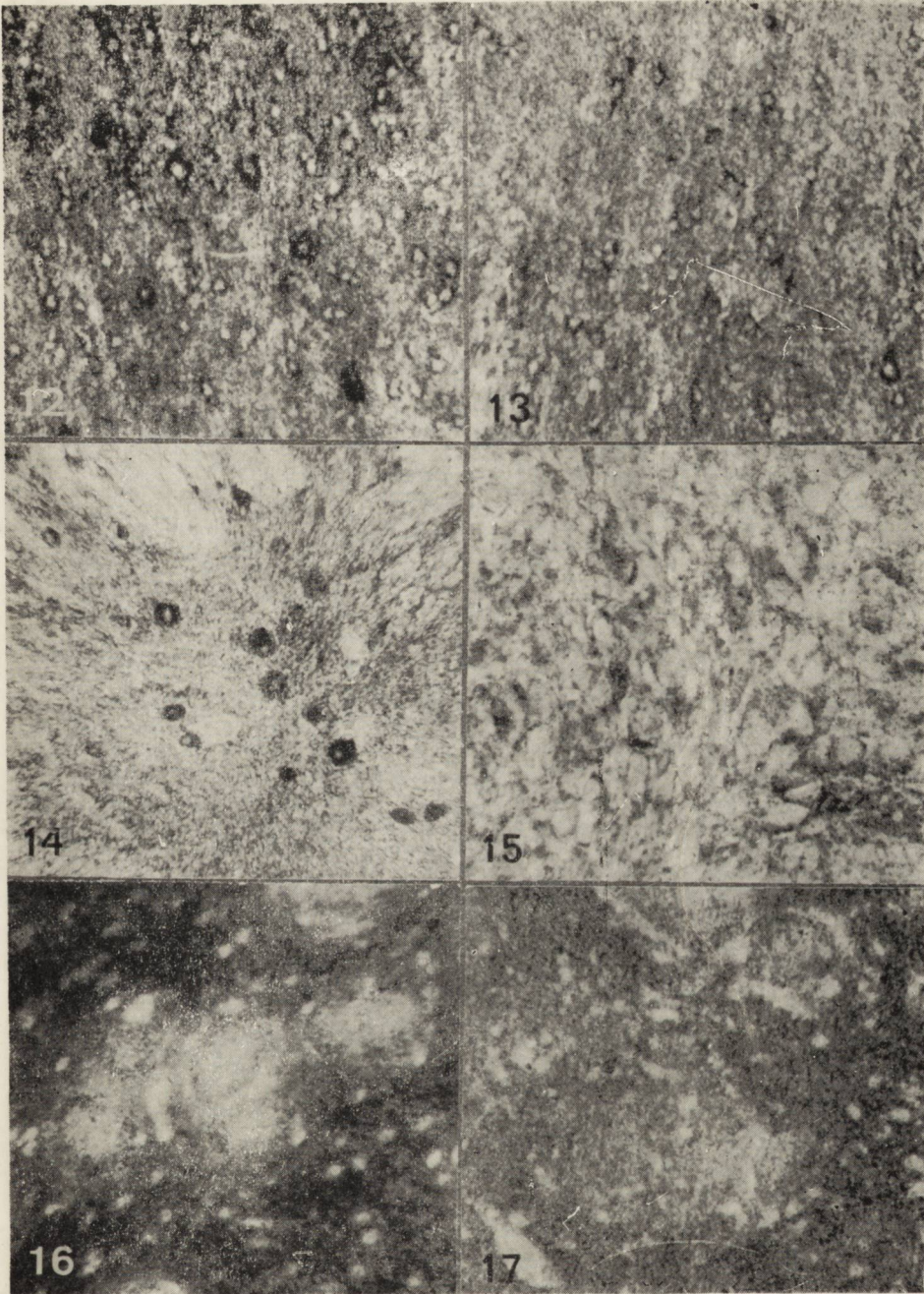
Fig. 16. Strong, granular cytochrome oxidase activity in basal ganglia, control animal. ×200.

Ryc. 17. Znaczny spadek aktywności oksydazy cytochromowej w obrębie jąder podstawy (6 godz. po zatruciu). Pow. 200×.

Fig. 17. Marked decrease of cytochrome oxidase activity within basal ganglia (6 hrs after intoxication). ×200.







JAN KORTHALS, BARBARA HOPPE, HANNA KARWACKA

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE
NAD TOKSYCZNYM WPŁYWEM TLENKU WĘGLA
NA TKANKĘ GLEJOWĄ HODOWANĄ *IN VITRO* *

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

Wpływ tlenku węgla na żywe organizmy stanowi przedmiot licznych wielokierunkowych badań. Powszechnie panuje zgodna opinia, że zasadniczy mechanizm szkodliwego działania tlenku węgla wiąże się z jego wysokim powinowactwem do hemoglobiny, w przypadku człowieka przewyższającym 240-krotnie powinowactwo tlenu (Forbes 1970). Tlenek węgla poprzez zastąpienie tlenu w związku z hemoglobina prowadzi do niedotlenienia organizmu o typie „hipoksji anoksyjnej”. Znacznie mniej jednoznaczne są poglądy co do możliwości bezpośredniego cytotoksycznego działania tlenku na komórkę poprzez blokowanie enzymów oddechowych, mimo stwierdzenia niewątpliwego hamującego działania CO na oddychanie komórkowe (Wartburg, Kubowitz 1927, Bänder, Kiese 1955). Wyniki doświadczeń z tlenkiem węgla na istotach niższych, nie posługujących się hemoglobina w transporcie tlenu są kontrowersyjne. Część autorów nie stwierdziła zahamowania czynności i rozwoju tych organizmów nawet pod wpływem wysokich stężeń tlenku węgla (80%) (Puchowski 1949). Nie wyłącza to oczywiście wysoce prawdopodobnego działania cytotoksycznego tlenku węgla w stosunku do organizmów wyższych.

W przedstawionej pracy, w oparciu o badania mikroskopowo-elektronowe starano się odpowiedzieć na pytanie, czy tlenek węgla wywiera działanie toksyczne na tkankę glejową hodowaną *in vitro* i jaki jest obraz ultrastrukturalny występujących uszkodzeń komórkowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowli tkanki glejowej z mózdzku 6—24-godzinnych noworodków szczyrzych szczepu Wistar. Hodowle pro-

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

wadzono wg standardowej metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Do badań używano hodowle 1 i 3-tygodniowe, przetrzymywane bezpośrednio przed utwaleniem przez okres 1 i 24 godzin w zmodyfikowanych dwusztykowych flaszki Carrela w atmosferze mieszaniny gazowej o składzie: 20% O₂, 70% N₂ i 10% CO. Tlenek węgla otrzymywano metodą laboratoryjną przez rozkład kwasu szczawiowego, pH medium hodowlanego kontrolowane przed i po doświadczeniu wynosiło 7,2—7,4.

Badanie histologiczne hodowli przeprowadzono na materiale barwionym błękitem toluidyny i impregnowanym wg metody Gallyasa, po jego uprzednim utwaleniu w płynie Carnoya.

Badania mikroskopowo-elektronowe przeprowadzono na 15 hodowlach jednodniowych i 60 trzytygodniowych poddanych działaniu CO. W każdej z kilkunastu serii doświadczalnych badano również po kilka hodowli kontrolnych.

Hodowle utrwalano na szkiełkach w 3% roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym Milloniga o pH 7,3 przez 1 godzinę, następnie w 1% OsO₄ w buforze Milloniga przez 1 godzinę. Utrwalone hodowle zdejmowano ze szkiełek, odwadniano w alkoholu i tlenku pyrenu, po czym zatapiano w Eponie 812. Część hodowli przygotowano do badania mikroskopowo-elektronowego na płytkach pokrytych spoli-meryzowanym Eponem wg metody opisanej przez Borowicza i Kraśnicką (1971). Ultracienkie skrawki krojono z wyselekcjonowanych pól ze środkowej części pasa wzrostu hodowli. Skrawki barwione octanem uranylu i cytrynianem ołowiu oglądano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

Obraz histologiczny

Zmiany morfologiczne obejmowały cały pas wzrostu hodowli 6—8-dniowych i część obwodową strefy wzrostu hodowli 3-tygodniowych. Wyrażały się one znacznym obrzmieniem wszystkich komórek glejowych, szczególnie astrocytów, znacznego stopnia obniżeniem ich barwności oraz zanikiem i uszkodzeniem wypustek komórkowych (ryc. 1). Astrocyty wykazywały zatarcie błony cytoplazmatycznej, powiększenie i zblednięcie jąder komórkowych oraz zwyrodnienie wodniczkowe w cytoplazmie i w wypustkach. W oligodendrocytach najbardziej istotną zmianą było zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy (ryc. 2). Zwraçała przy tym uwagę wyraźnie mniejsza w porównaniu z kontrolą ilość tych

komórek. Mikroglej występujący w postaci form pałeczkowatych i nielicznych makrofagów był nieznacznie powiększony i wykazywał umiarkowane zmiany wodniczkowe.

Obraz mikroskopowo-elektronowy

Obraz ultrastrukturalny hodowli kontrolnych nie odbiegał zasadniczo od obrazu prawidłowej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*, przedstawionego przez Kraśnicką i wsp. (1972). W naszym materiale stwierdzono większy polimorfizm mitochondriów, wyrażający się zwłaszcza zmienną liczbą różnie wykształconych grzebieni mitochondrialnych przy zwykle jednak gęstej elektronowo macierzy. W niektórych hodowlach 3-tygodniowych można było poza tym wyróżnić liczne astrocyty o wybitnym charakterze włóknistym.

Zmiany patologiczne po działaniu tlenu węgla częściej spotykano w hodowlach 1-tygodniowych, niż w 3-tygodniowych. Charakter zmian był jednak podobny w obu grupach. Nie stwierdzono również różnicy w patologicznym obrazie mikroskopowo-elektronowym hodowli na szkle w porównaniu z hodowlami w Eponie.

Po 1-godzinnym przetrzymywaniu hodowli w atmosferze tlenu węgla w komórkach glejowych znajdowano liczne drobne wakuole. W oligodendrocytach miały one charakter pęcherzyków wyraźnie odgraniczonych od otaczającej je cytoplazmy o niezmienionej gęstości elektronowej (ryc. 3). W astrocytach wakuolom towarzyszyło zwykle ogólne rozluźnienie struktury cytoplazmy i powiększenie jej rozmiarów. Część wakuoli była otoczona pojedynczą błoną, w części natomiast nie stwierdzono ograniczenia błonami. Niekiedy w świetle tych ostatnich znajdowano prawdopodobnie artefaktycznie obkurczone błony. Często była widoczna wyraźna ciągłość między wakuolami, a światłem kanałów szorstkiej siatki endoplazmatycznej (ryc. 4). Część wakuoli powstała prawdopodobnie na skutek obrzmienia układu Golgiego. Wskazywała na to ich przyjądrowa lokalizacja (ryc. 5) i niekiedy widoczna łączność wakuoli z charakterystycznymi dla struktury Golgiego równoległe ułożonymi spłaszczonymi cysternami. W części mitochondriów stwierdzono ich obrzmienie.

W hodowlach poddanych działaniu CO przez 24 godziny stwierdzono większe nasilenie zmian niż w hodowlach z 1-godzinną ekspozycją. Znacznie zwakuolizowana cytoplazma komórek glejowych upodabiała się do plastra miodu (ryc. 6). Niekiedy powstawały duże wakuole. Częściej niż w grupie poprzedniej było widoczne obrzmienie mitochondriów i zanik grzebieni mitochondrialnych (ryc. 7).

Zmianom wodniczkowym często towarzyszyło zmniejszenie ilości szorstkiej siatki endoplazmatycznej. W pojedynczych astrocytach stwierdzono obecność licznych centrioli i rzęsek. Również dokładnie były widoczne *puncta adhaerentia* między błonami komórkowymi. W astrocytach obserwowano niekiedy zwiększenie liczby ciał lizosomopodobnych, zawierających różną ilość materiału o znacznej gęstości elektronowej (ryc. 10).

Ponadto spotykano komórki zmienione martwiczo, charakteryzujące się całkowitą destrukcją cytoplazmy wypełnionej ziarnistym materiałem i resztkami *reticulum* w postaci kolistych elementów (ryc. 11). Chromatyna jądrowa była bardziej zagęszczona, lub wyłącznie skupiona przy błonie jądrowej.

OMÓWIENIE

Zastosowanie do badań modelu hodowli tkankowej pozwoliło na ocenę bezpośredniego działania tlenu węgla na komórkę. Pod jego wpływem w tkance glejowej hodowanej *in vitro* występują charakterystyczne zmiany komórkowe, polegające na obrzmieniu, przede wszystkim siatki śródplazmatycznej, a nieco rzadziej aparatu Golgiego i mitochondriów. Swoim charakterem są one zbliżone do uszkodzeń tkanki nerwowej w innych typach niedotlenienia. W badaniach mikroskopowo-elektronowych Webstera i Amesa (1961), Ronillera i wsp. (1971), Browna i Brierleya (1972) oraz Yu i wsp. (1972a, 1972b) prowadzonych zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* stwierdzano również dominujące obrzmienie elementów błoniastych komórki. W pracach tych, dotyczących przede wszystkim komórek nerwowych, autorzy zwracają uwagę na wysuwające się na pierwszy plan, zwłaszcza w doświadczeniach *in vivo*, zmiany w mitochondriach, a w dalszej dopiero kolejności na obrzmienie siatki śródplazmatycznej. Jedynie Yu i wsp. (1972b), opisując zmiany w tkance glejowej w następstwie przedłużonego działania hipoksji zwracają uwagę na obrzmienie siatki śródplazmatycznej jako jedyny wykładnik uszkodzeń pohipoksyjnych gleju i to przede wszystkim astrocytów.

W naszych badaniach nad wpływem tlenu węgla *in vivo* stwierdziliśmy dominowanie obrzmienia mitochondriów w neurocytach i komórkach gleju skąpowypustkowego, podczas gdy w astrogleju przeważało obrzmienie cytoplazmy bez wyraźnych zmian w mitochondriach (Korthals i wsp. 1973). W warunkach hodowli tkankowej natomiast, niezależnie od typu komórek glejowych, na pierwszy plan wysuwały się zmiany w siatce śródplazmatycznej, zbliżające się swoim charakterem

do uszkodzeń w astrocytach, opisanych we wczesnych okresach niedotlenienia (24 godz.) przez Yu i wsp. (1972b). Zmiany mitochondrialne miały mniejsze nasilenie i jedynie w hodowlach przetrzymywanych przez 24 godziny w atmosferze tlenu węgla były nieco wyraźniej zaznaczone przede wszystkim w oligodendrocytach. Przewagę zmian ultrastruktury siatki śródplazmatycznej nad zmianami mitochondrialnymi w naszym materiale, w zestawieniu z obserwacjami wymienionych wyżej autorów, dotyczącymi komórek nerwowych można zapewne odnieść do odrębności funkcjonalnej mitochondriów gleju, postulowanej przez Ybata i wsp. (1971). Autorzy ci w doświadczeniach, polegających na inkubacji skrawków kory mózgu w roztworach NaCl, stwierdzili obrzmienie mitochondriów neuronów, przy braku zmian w mitochondriach astrogleju. Porównanie naszych obserwacji nad wpływem tlenu węgla w warunkach *in vivo* i *in vitro* winno uwzględniać odmiennosc mechanizmu toksycznego działania tlenu węgla *in vitro* oraz różnice tkanki hodowanej pozaustrojowo od tej samej tkanki w warunkach *in situ*.

W świetle naszych obserwacji toksyczne działanie tlenu węgla na tkankę glejową w hodowli pozaustrojowej wydaje się bezsporne, otwarte jednak pozostaje nadal zagadnienie możliwości bezpośredniego działania CO na tkankę nerwową w żywym organizmie. Wobec wysokiego powinowactwa tlenu węgla do hemoglobiny i jego niskiej rozpuszczalności w surowicy krwi (Coburn 1970) nieznane są możliwości przedostania się wolnego tlenu węgla do tkanki nerwowej. Graziani i Guariano (1956) nie stwierdzali wzrostu tlenu węgla w tkance nerwowej u królików, które doprowadzono do śmierci w wyniku półgodzinnego przetrzymywania w atmosferze tlenu węgla. Zakładając jednak, że wolny tlenek węgla może przedostawać się do tkanki nerwowej z płynem obrzękowym (Schwedenberg 1959) wydaje się, że znacznie więcej informacji dostarczyłyby badania tlenu węgla w mózgu zwierząt poddanych działaniu CO przez okres dłuższy niż 30 minut, przeprowadzone oddzielnie na istocie szarej i białej mózgu. Obrzęk mózgu, jak wynika z badań doświadczalnych Miyagishi i Suwa (1969) nie jest zjawiskiem stałym w zatruciu tlenkiem węgla, a jeśli występuje dotyczy przede wszystkim istoty białej (Korthals i wsp. 1973).

Innym argumentem wysuwany przeciwko możliwości bezpośredniego działania tlenu węgla na tkankę nerwową w warunkach *in vivo* jest fakt, że względne powinowactwo tlenu węgla do oksydazy cytochromowej jest 9,2 razy mniejsze niż tlenu (Ball i wsp. 1951). Trzeba jednak pamiętać, że zatrucie tlenkiem węgla prowadzi w następstwie wiązania hemoglobiny z CO do znacznego spadku zawartości tlenu

w tkance, co stwarza dogodniejsze warunki do wiązania CO z enzymami oddechowymi. Uzasadnia to teoretycznie możliwość współdziałania hypoksydozy anemicznej i metabolicznej (Bänder, Kiese 1955).

Я. Кортхалс, Б. Хоппе, В. Карвацка

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОКИСИ УГЛЕРОДА (СО) НА ГЛИАЛЬНУЮ ТКАНЬ IN VITRO

Резюме

Для оценки непосредственного токсического действия окиси углерода на клетки центральной нервной системы выращенную глиальную ткань мозжечка новорожденных крыс помещались на период 1 часа и 24 часов в газовую смесь, состоящую из 20% кислорода, 10% окиси углерода и 70% азота.

В ультраструктурной картине глиальных клеток, подвергнутых действию окиси углерода, доминировала опухоль эндоплазматической сетки и аппарата Гольджи, а в меньшей степени также и митохондрий. Заметны были также в цитоплазме клеток не ограниченные оболочками вакуоли.

Нарушения клеток были более отчетливы в молодых культурах, содержащих значительную популяцию малодифференцированных клеток. Самые тяжелые нарушения касались олигодендроглия.

Представленные результаты указывают на повреждающее цитотоксическое действие окиси углерода на глиальные клетки при выключении действия анемической гипоксии, связанной с блокадой транспорта кислорода в результате образования карбоксигемоглобина. Открытым остается, однако, вопрос: выступает ли этот механизм в условиях отравления целого организма.

J. Korthals, B. Hoppe, H. Karwacka

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON THE TOXIC EFFECT OF CARBON MONOXIDE ON THE GLIAL TISSUE CULTURED IN VITRO

Summary

To evaluate directly the toxic effect of carbon monoxide on the central nervous system cells, cultures of glial derived from newborn rat cerebellum were placed for 1 and 24 hrs in a gas mixture consisting of 20% oxygen, 10% carbon monoxide and 70% nitrogen.

In the ultrastructural picture of glial cells subjected to CO treatment predominated swelling of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and to a lesser degree of mitochondria. In addition, vacuoles not surrounded with membranes were being observed in cytoplasm.

Cell lesions were more pronounced in young cultures containing a larger population of poorly differentiated cells. The most severe lesions concerned oligodendroglia.

The present results demonstrate the cytotoxic effect of carbon monoxide on the glial cells with exclusion of anemic hypoxidosis related to the block of oxygen transport following the formation of carboxyhemoglobin. The question, however, whether this mechanism is also operative under conditions of intoxication of the whole organism, remains to be elucidated.

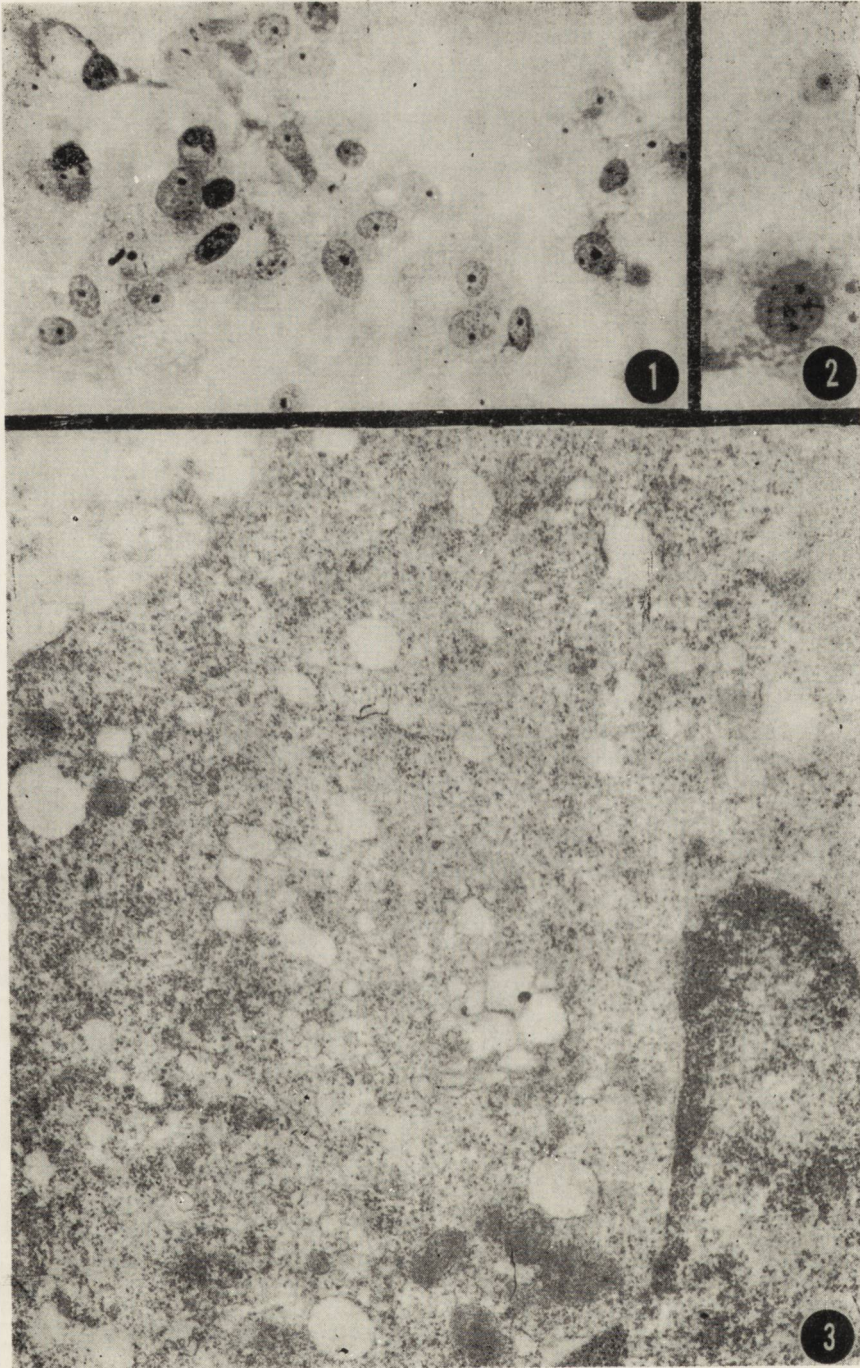
PIŚMIENNICTWO

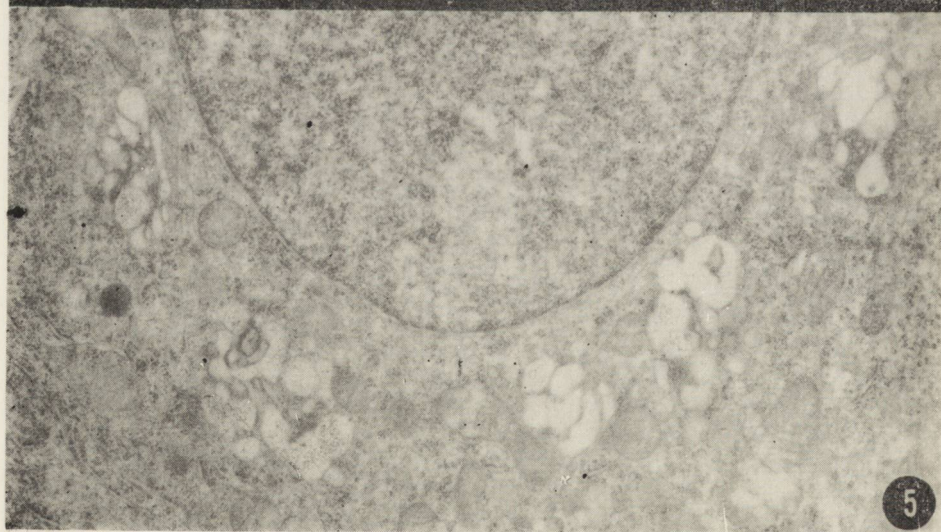
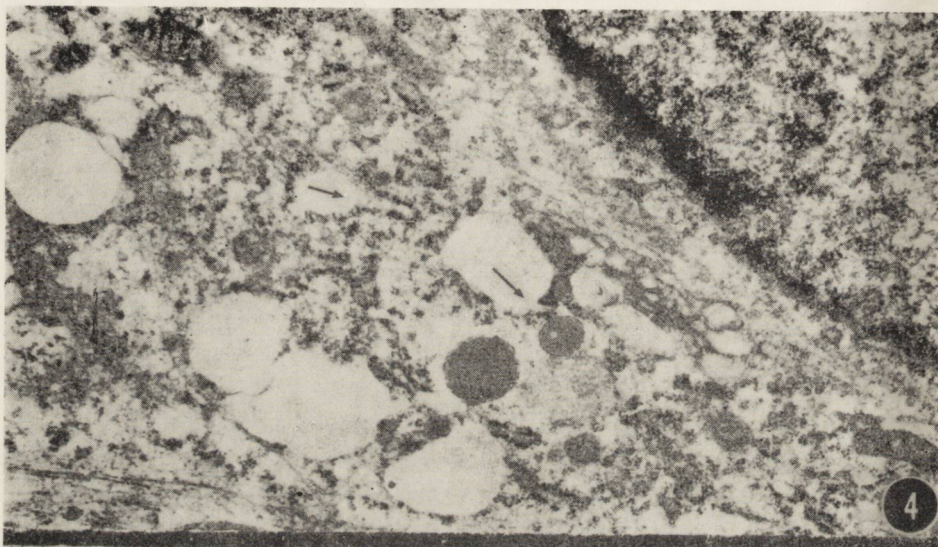
1. Ball E. G., Strittmatter C. F., Cooper O.: The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 635—647.
2. Bänder A., Kiese M.: Die Bedeutung der Wirkung des Kohlenoxyds auf die Zellatmung für die Kohlenoxydvergiftung. *Klin. Wschr.*, 1955, 33, 152—155.
3. Borowicz J. W., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych in vitro do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.*, 1971, 22, 691—697.
4. Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischemic cell changes in rat brain. Light-microscopic and fine structural observations. *J. Neurol. Sci.*, 1972, 16, 59—84.
5. Boburn R. F.: The carbon monoxide body stores. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1970, 174, 11—22.
6. Forbes W. H.: Carbon monoxide uptake via lungs. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1970, 174, 72—75.
7. Graziani G., Guariano A.: Il sistema nervoso centrale nella intossicazione acuta sperimentale da CO. *Fol. Med. Napoli*. 1956, 39, 457—470.
8. Korthals J., Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii tlenkowej u szczura. *Neuropat Pol.*, 1973, 11, 279—300.
9. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
10. Kraśnicka Z., Borowicz J. W., Gajkowska B.: Ultrastruktura komórki glejowej z hodowli tkankowej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 401—412.
11. Miyagishi T., Suwa N.: Electron microscopic studies of the cerebral lesions of rats in experimental carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropath. (Berlin)*, 1969, 14, 118—125.
12. Pentschew A.: Intoxication. *Hdb. der Spez. path. Anat. u. Histol.*, 1958, Springer, Berlin XIII/2B, 2107—2149.
13. Puchowski B.: O zatruciu tlenkiem węgla. Zakład Ubezpieczeń Społecznych. Warszawa 1949.
14. Roniller Ch., Nicolescu P., Orci L., Rufener C.: The effect of anoxia on the ultrastructure of the superior cervical ganglion of the rat in vitro. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 1971, 7, 269—292.
15. Schwedenberg T. H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1959, 18, 597—608.
16. Wartburg O.: 1927, cyt. za Pentschewem (poz. 12).
17. Webster H. F., Ames A.: Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. *J. Cell Biol.*, 1965, 26, 885—909.
18. Ybata Y., Piccoli F., Pappas G. D., Lajtha A.: An electron microscopic and biochemical study on the effect of cyanide and low Na⁺ on rat brain slices. *Brain Res.*, 1971, 30, 137—158.
19. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. Neuronal Alteration. I. *Acta Neuropath.*, 1972a, 22, 222—234.
20. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. Neuroglia and blood vessels. II. *Acta Neuropath.*, 1972b, 22, 235—244.

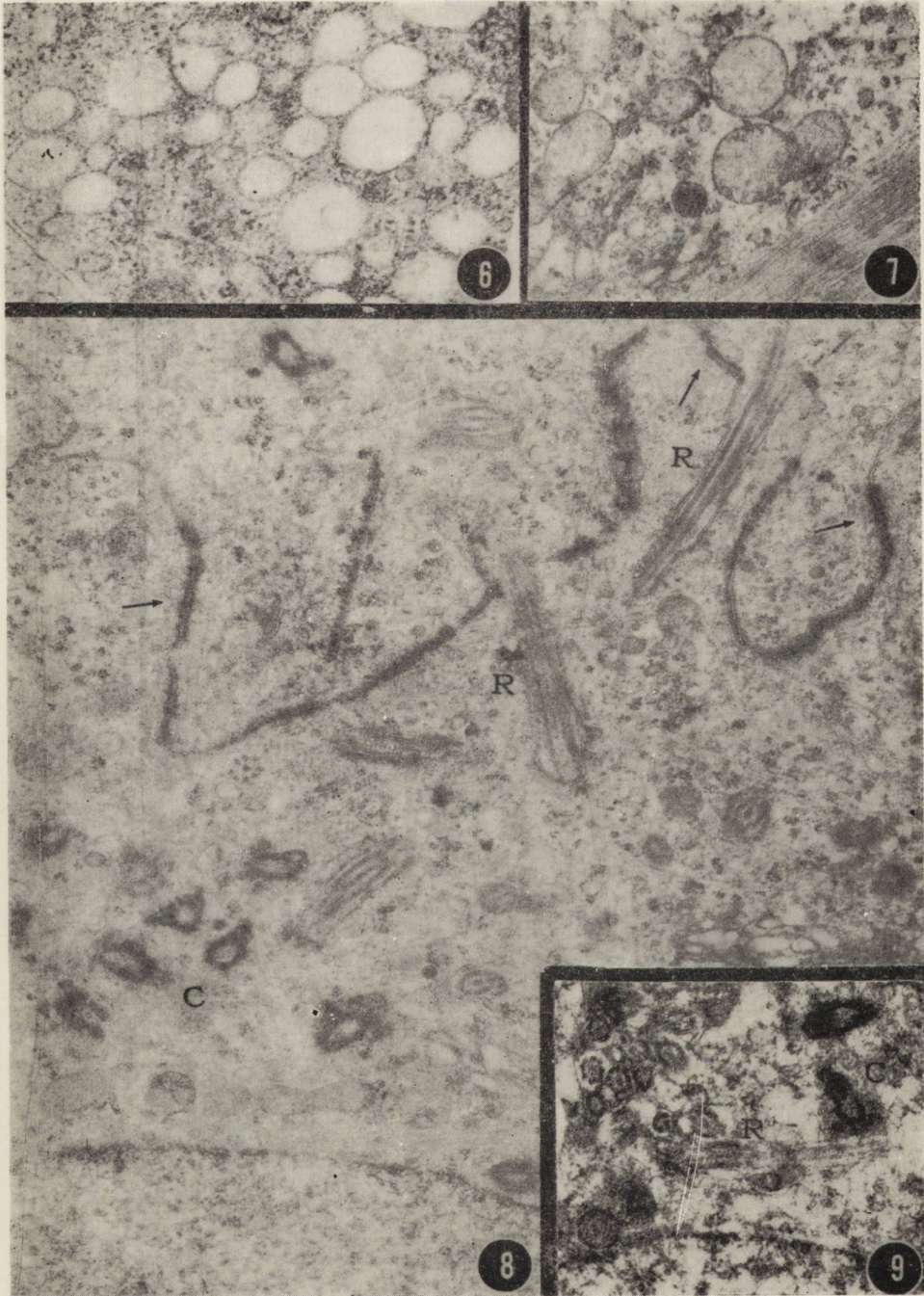
Adres autorów: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

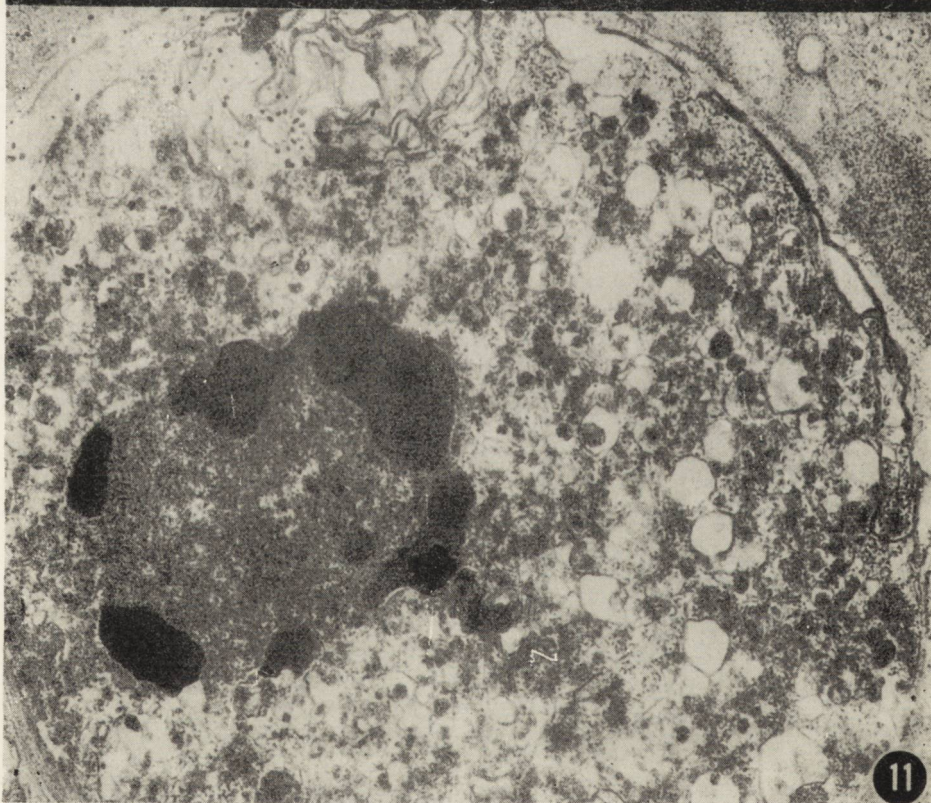
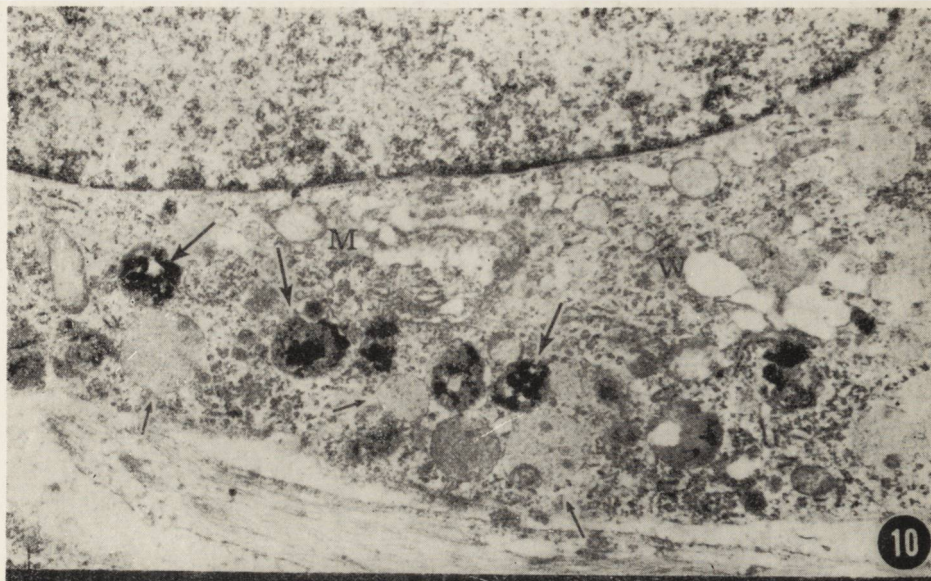
PODPISY POD RYCINY
LEGENDS FOR FIGURES

- Ryc. 1.* Liczne wodniczki w cytoplazmie i wypustkach astrogleju i oligodendrogleju poddanego działaniu CO przez 1 godz. Pow. 200×.
- Fig. 2.* Numerous vacuoles in the cytoplasm and processes of astroglia and oligodendroglia subjected to CO for 1 hr. ×200.
- Ryc. 2.* Zwyródnienie wodniczkowe astrocytu i oligodendrocytu po 24 godz. działania CO. Pow. 400×.
- Fig. 2.* Vacuolar degeneration of astrocyte and oligodendrocyte following subjection to CO for 24 hrs. ×400.
- Ryc. 3.* Liczne drobne wakuole w cytoplazmie oligodendrocytu. Pow. 18.000×.
- Fig. 3.* Numerous small vacuoles in oligodendrocyte cytoplasm. × 18.000.
- Ryc. 4.* Obrzmienie szorstkiej siatki endoplazmatycznej astrocytu. Widoczne przejście między wakuolami i światłem kanałów siatki endoplazmatycznej. Pow. 12.000×.
- Fig. 4.* Swelling of rough endoplasmic reticulum of astrocyte. Visible transition between vacuoles and the lumen of endoplasmic reticulum channels. ×12.000.
- Ryc. 5.* Obrzmienie układu Golgiego i umiarkowany obrzęk pojedynczych mitochondriów w cytoplazmie oligodendrocytu. Pow. 12.000×.
- Fig. 5.* Swelling of Golgi apparatus and moderate swelling of some mitochondria in oligodendrocyte cytoplasm. ×12.000.
- Ryc. 6.* Liczne drobne wakuole upodabniające cytoplazmę astrocytu do plastra miodu. Pow. 30.000×.
- Fig. 6.* Numerous small vacuoles making the astrocyte cytoplasm similar to a honey comb. ×30.000.
- Ryc. 7.* Obrzmienie mitochondriów w cytoplazmie astrocytu włóknikowego. Pow. 20.000×.
- Fig. 7.* Swelling of mitochondria in the cytoplasm of fibrillary astrocyte. ×20.000.
- Ryc. 8 i 9.* Liczne centriole (C) i rzęski (R) w komórce astrocytarnej. Ścisłe połączenia puncta adhaerentia między błonami komórkowymi (strzałki). *Ryc. 8* — Pow. 12.000×; *Ryc. 9* — Pow. 18.000×.
- Fig. 8 and 9.* Numerous centrioles (C) and cilia (R) in astrocyte. Tight junctions puncta adherentia between the cell membranes (arrows). *Fig. 8* ×12.000; *Fig. 9* ×18.000.
- Ryc. 10.* Liczne lizosomy (cienkie strzałki) częściowo wypełnione materiałem o znacznej gęstości elektronowej (grube strzałki). W cytoplazmie astrocytu widoczne obrzmiałe mitochondria (M) i drobne wakuole (W). Pow. 9000×.
- Fig. 10.* Numerous lysosomes (thin arrows), partially filled with a material of marked electron density (thick arrows). In astrocyte cytoplasm — swollen mitochondria (M) and fine vacuoles (W). ×9000.
- Ryc. 11.* Zaawansowane zwyrodnienie komórki glejowej, prawdopodobnie oligodendrocytu. Zagęszczenie chromatyny przy błonie jądrowej. Cytoplazma zawiera resztki siatki śróplazmatycznej w postaci elementów kolistych, ziarnisty materiał i struktury mielinopodobne. Pow. 12.000×.
- Fig. 11.* Advanced degeneration of a glial cell, probably oligodendrocyte. Chromatine condensation at the nuclear membrane. Cytoplasm containing fragments of endoplasmic reticulum in a form of circular elements, granular material and myelin-like structures. ×12.000.









M. WENDER, M. KOZIK, A. PIECHOWSKI

EFFECT OF CHRONIC TRIETHYL TIN INTOXICATION
ON THE MORPHOLOGICAL AND HISTOENZYMIC PATTERN
OF RAT BRAIN *

Institute of Neurology and Sensory Organs, Medical Academy, Poznań

Our previous investigations (Wender et al., 1971) performed during acute experimental triethyl tin (TET) poisoning have revealed that in the early period of TET-induced acute brain edema, there appears a weak acid phosphatase activity in the cytoplasm of interfascicular oligodendroglia and the hypertrophic astrocytes develop increased ATP-ase and TPP-ase activities. The observed changes in ATP-ase activity of the astroglia in the course of acute TET poisoning seem to indicate some deviations in the processes of active transport across biological membranes, e.g. across the blood-brain barrier. It also appeared that the histoenzymic spectrum of the oligodendroglia remained essentially unaffected by TET-induced acute brain edema. This observation might eventually explain the fact, that this type of edema, despite of the initial heavy impairment seen in the myelin sheaths, does not lead to demyelination proper.

In 1971 Eto and coworkers provided evidence, according to which there exist obvious differences in the biochemistry of myelin between acute and chronic TET intoxication. It thus seemed useful to reinvestigate the histoenzymic reactions under conditions of repeatedly applied small doses of TET, and to extend the investigated spectrum of enzymes by including oxidoreductases.

Alterations in ATP-ase and dehydrogenase activities have been claimed to constitute the most important enzymic contribution to the pathomechanism of toxic encephalopathy of this type (Ibrahim, 1965).

* The work was performed on behalf of the Polish Academy of Sciences (No. 09.4.1.3).

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed on two groups of white Wistar rats of either sex, of approximately 200 g of body weight, consisting of 6 animals each. TET (1 mg/kg of body weight) was administered intraperitoneally in 6 and 9 daily doses, respectively. The investigations were made on brain specimens taken 14 days after the last injection of TET. The animals were sacrificed by decapitation, the brains removed from the cranial vaults and instantly subjected to histochemical examination.

Routine histology was performed using the staining procedures with hematoxylin + eosin, sudan IV, and those following to the methods of Nissl, Klüver-Barrera, Cajal, Bodian, Kanzler-Arendt and Spielmeyer.

The material assigned for esterase and phosphatase assays was fixed in 10% calcium formaline at 4 °C for 18 hrs, and the incubations were performed on frozen sections, 15 μ thick.

Acetylcholinesterase (AChE) and unspecific cholinesterase (ChE) were assayed according to the method of Koelle as modified by Gerebtzoff (1953), and the activity of unspecific esterase was determined according to the method of Barnett and Seligman (1951) as modified by Holt (1956).

Acid and alkaline phosphatase activities were studied using the method of Gomori (1953), that of thiaminepyrophosphatase (TPP-ase) — according to the method of Novikoff and Goldfischer (1961), and that of adenosine triphosphatase (ATP-ase) — with the method of Wachstein and Meisel (1957).

The reactions for oxidoreductases activity were performed on unfixed sections cut by means of a cryostat.

Activities of the following oxidoreductases were studied: glycerol-3-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.8) — incubation time 20 min., lactate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) — incubation time 50 min., 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.30) — incubation time 60 min., glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49) — incubation time 30 min., succinate dehydrogenase (E.C. 1.3.99.1) — incubation time 30 min., isocitrate: NAD oxidoreductase (E.C. 1.1.1.41) — incubation time 35 min., reduced NADP: tetrazolium oxidoreductase (E.C. 1.6.99.1) — incubation time 30 min., reduced NAD: tetrazolium (E.C. 1.6.99.3) — incubation time 35 min.

The incubation for the individual enzyme assays were performed with the basal medium prepared according to Pearse (1960), containing Nitro BT tetrazolium salt and the appropriate substrate, as recommended by Niweliński (1963).

RESULTS

As the histoenzymic pattern of the two experimental groups (animals which received TET for either 6 or 9 successive days) did not differ significantly, the results for both groups will be presented jointly.

Clinical observations. The experimental animals did not develop any characteristic clinical symptoms, showing only a somewhat decreased mobility and progressing general inanition as the illness advanced.

Histological findings. In the whole white brain matter, especially in the corpus callosum (Fig. 1), in the bundles of fibres of the internal capsule (Fig. 2), in the base of brain peduncles, in the optic chiasm (Fig. 3) — diffuse spongy changes can be seen with sharply outlined empty spaces of variable size.

The myelin, when specifically stained, revealed a somewhat faded appearance only in a part of the experimental animals. This hypocolouration was seen mainly in the corpus callosum, whereas distinct demyelination within its central part was observed only exceptionally. Preparations from the remaining animals did not show any fading or decomposition of myelin. None of the studied cases revealed the presence of sudanophilic deposits.

Cytological staining revealed in the grey structures multiform degenerative changes of many neurocytes especially in the brain cortex. These changes could be identified either as chronic cell degeneration or as severe cellular disease. They were partially diffusely distributed, and partially covered some larger areas of the cortex, however, without notable preference for any special cortical layers. When stained according to the method of Bodian the nerve fibres had a normal appearance.

Apart from a moderate increase of satellite glia around the cortical changes, a distinct glial or mesenchymal reaction was nowhere discernible. Not even within the edematous parts of the white matter, was there a hypertrophy or proliferation of the glia.

Histoenzymic findings: In brains with experimental, TET-induced edema, apparently normal activities of the various esterases were observed (AChE, ChE, nonspecific esterase). All the more so, the neuropil of the basal nuclei did not show any evident changes in AChE activity (Fig. 4), and only single oligodendroglial cells adjacent to the edematous areas exhibited considerable enzymic activity.

When tested for acid phosphatase activity, no enzymic reaction products were found in the interfascicular oligodendroglia of edematous white matter. On the contrary neurocytes affected by all sorts of degenerative changes, mainly by chronic cell degeneration, showed a markedly increased acid phosphatase activity.

The reaction for alkaline phosphatase seemed considerably weakened in white matter bundles, corresponding closely to areas of faded myelin.

Control and experimental specimens showed an equally intensive enzymic reaction for TPP-ase within the capillary network, and the astroglial vascular feet (Fig. 5), as well as in the neuropil of basal nuclei. The oligodendroglia was free of any TPP-ase activity in either of the specimens.

ATP-ase activity too, showed a normal distribution and intensity within the perivascular feet of the astroglia (Fig. 6) and particularly in the neuropil of subcortical structures.

The pattern of activity of all investigated oxidoreductases in animals subjected to chronic TET intoxication was essentially comparable to that observed in control animals. Intracytoplasmic oxidoreductase activity was revealed by a part of interfascicular oligodendroglial cells of the white matter. In the grey matter — it was the neuropil which exhibited considerable activity of oxidoreductases, with definitely accentuated intensity of enzymic reaction in the basal nuclei.

DISCUSSION

The morphology of changes observed in chronic TET poisoning corresponds closely to those defined as spongy degeneration. They were restricted to the white matter exclusively.

The explanation of this very specific localization of toxic changes, found in both acute and chronic TET poisoning is not easy. Hirano et al. (1968) have shown that, contrary to other types of brain edema, in which swelling of astrocytes plays an important role, TET-induced edema is characterized by the appearance of numerous vacuoles interspersing the myelin lamina.

Contrary to Ibrahim (1965) and Torack (1965), who observed a decline of ATP-ase activity in the brain, we have found in our previous studies of acute TET poisoning, increased activity of this enzyme in the white matter hypertrophic astroglia and its perivascular feet. However, in the chronic experiment, we were unable, similarly as Katzman et al. (1963), to detect any noticeable changes in the ATP-ase activity of astrocytes. Thus, it cannot be assumed, that the observed changes in ATP-ase activity in the acute stage of poisoning are relevantly involved in the pathomechanism of spongy degeneration observed in the chronic stage of TET poisoning. Our observations are also at variance with the hypothesis of Ibrahim (1965) who believed that inhibition of some oxidoreductases of the brain plays a significant role in the pathogenesis of TET-induced morphological changes.

According to our observations in both experimental stages, i.e. in acute and chronic TET intoxication, the interfascicular oligodendroglia, which is inherently related to the myelin sheaths, did not show any morphological or histoenzymic changes.

These findings would indicate, that it is not the oligodendroglia, but the myelin sheath which is affected primarily in TET poisoning. Histo-enzymic investigations, however, are incapable of solving the question, whether, and which, metabolic disturbances or physicochemical factors initiate the spongy changes of myelin sheaths.

The exclusively degenerative nature of the processes involved in the tin-induced encephalopathy, without any accompanying inflammatory reactions (either of primary or secondary character), and without any signs of glial decomposition should also be pointed out. In this context the lack of any notable histoenzymatic changes, so characteristic for any increased biological activity of the neuroglia, is not a confusing observation. In this respect tin-induced brain edema may be clearly distinguished from many other types of toxic encephalopathies, although the markedly reduced myelin lipid content in chronic TET poisoning, as determined by Eto et al. (1971) with the aid of chemical techniques, does not entirely fit into this picture. Marked reduction of myelin lipids, observed in other kinds of nerve fiber degeneration, was always accompanied by a vivid glial-mesenchymal reaction, which was not the case in TET poisoning, either in acute or chronic experiments.

M. Wender, M. Kozik, A. Piechowski

WPŁYW PRZEWLEKŁEGO ZATRUCIA TRÓJETYLKIEM CYNY NA OBRAZ MORFOLOGICZNY I HISTOCHEMICZNY MOZGU SZCZURA

Streszczenie

Przeprowadzono badania morfologiczne oraz histoenzymatyczne w przewlekłym doświadczalnym obrzęku mózgu u szczurów, wywołanym siarczanem trójetylku cyny, podawanym dootrzewnowo w dawce 1 mg/kg wagi ciała przez 6 lub 9 kolejnych dni. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Przewlekłe zatrucie trójetylkiem cyny prowadzi do powstania stanu gąbczastego ograniczonego wyłącznie do istoty białej mózgu, bez odczynu zapalnego pierwotnego i wtórnego oraz bez rozbiórki glejowej.

2. W przewlekłej encefalopatii cynowej nie stwierdza się zmian histoenzymatycznych, znamienych dla wzrostu aktywności biologicznej neurogleju i to zarówno astrocytów jak i oligodendrogleju międzywłókienkowego.

3. Zmiany w osłonkach mielinowych prowadzące do powstania stanu gąbczastego wydają się zależeć w przewlekłej encefalopatii cynowej od pierwotnego uszkodzenia mieliny.

М. Вендер, М. Козик, А. Пеховски

ВЛИЯНИЕ ЗАТЯЖНОГО ОТРАВЛЕНИЯ ТРИЭТИЛОЛОВОМ НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ И ГИСТОХИМИЧЕСКУЮ КАРТИНУ МОЗГА КРЫС

Резюме

Проведены морфологические и гистоэнзиматические исследования в экспериментальном затяжном отёке мозга у крыс, вызванном сульфатом триэтилолова, введенном внутривентрикулярно в дозе 1 мг/кг веса тела ежедневно в течение 6 или 9 дней.

Результаты исследований позволили прийти к заключению:

1. Затяжное отравление триэтилоловом приводит к образованию губчатого состояния, ограничивающегося только белым веществом мозга, без первичной и вторичной воспалительной реакции, а также без глиозного распада.

2. В затяжной энцефалопатии, вызванной оловом, не наблюдаются гистоэнзиматических изменений, характерных для повышения биологической активности нейроглии как астроцитов так и межволокнистого олигодендроглия.

3. Изменения в миелиновых оболочках, ведущие к образованию губчатого состояния в затяжной энцефалопатии, вызванной оловом, зависят, видимо, от первичного нарушения миелины.

REFERENCES

1. Barnett R., Seligmann A.: Histochemical demonstration of esterase by production of Indigo. *Science*, 1951, 194, 2970—2971.
2. Eto Y., Suzuki K., Suzuki K.: Lipid composition of rat brain myelin in triethyl tin-induced edema. *J. Lipid. Res.*, 1971, 12, 570—579.
3. Gerebtzoff M.: Recherches histochemiques sur les acétylcholine et choline estérases. *Acta Anat.*, 1953, 19, 336—369.
4. Gomori G.: *Microscopic histochemistry*. The University of Chicago Press., Chicago, 1953.
5. Hirano A., Zimmerman H., Levine S.: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyl tin intoxication. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1968, 27, 571—580.
6. Holt S.: The value of fundamental studies of staining reactions enzyme in histochemistry, with reference to indoxyl methods for esterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1956, 4, 94—99.
7. Ibrahim M.: Neuroglia and demyelination. In: *Neurohistochemistry*. Ed. C. Adams, Elsevier, Amsterdam 1965, pp. 454—464.
8. Katzman R., Alen F., Wilson C.: Further observations on triethyltin edema. *Arch. Neurol.*, 1963, 9, 178—184.
9. Niweliński J.: Dehydrogenazy. In: *Skrypt Metod Histochemicznych*, Warszawa 1963, 177—198.
10. Novikoff A., und Goldfischer B.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1961, 47, 802—810.
11. Pearse A.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London, Churchill Ltd., 1960.

12. Torack R.: The relationship between adenosinetriphosphatase activity and triethyltin toxicity in the production of cerebral edema of the rat. *Am. J. Pathol.*, 1965, 46, 245—251.
13. Wachstein M., and Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1957, 27, 13—23.
14. Wender M., Kozik M., Piechowski A.: Enzymomorphological studies of the brain oedema produced with triethyl tin. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1971, 9, 217—226.

Authors' address: Institute of Neurology, Medical Academy, Poznań, Poland, Przybyszewskiego 49.

PODPISY POD RYCINY

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Severe spongy changes in rat corpus callosum in the course of chronic TET intoxication. Klüver-Barrera staining, $\times 35$.

Ryc. 1. Ciężkie zmiany gąbczaste w spoidle wielkim mózgu szczura w przewlekłym zatruciu TET. Barwienie met. Klüver-Barrera. Pow. $35 \times$.

Fig. 2. TET-induced edema in bundles of fibres of the internal capsule. Klüver-Barrera staining, $\times 32$.

Ryc. 2. Obrzęk w pęczkach włókien torebki wewnętrznej wywołany TET. Barwienie met. Klüver-Barrera. Pow. $32 \times$.

Fig. 3. Diffuse spongy changes in the optic tract of rat induced by chronic TET intoxication. Spielmeyer staining, $\times 32$.

Ryc. 3. Rozlane zmiany gąbczaste w paśmie wzrokowym mózgu szczura wywołane przewlekłym zatruciem TET. Barwienie met. Spielmeiera. Pow. $32 \times$.

Fig. 4. Normal activity of AChE in the neuropil of rat striatum in the course of chronic TET intoxication, $\times 32$.

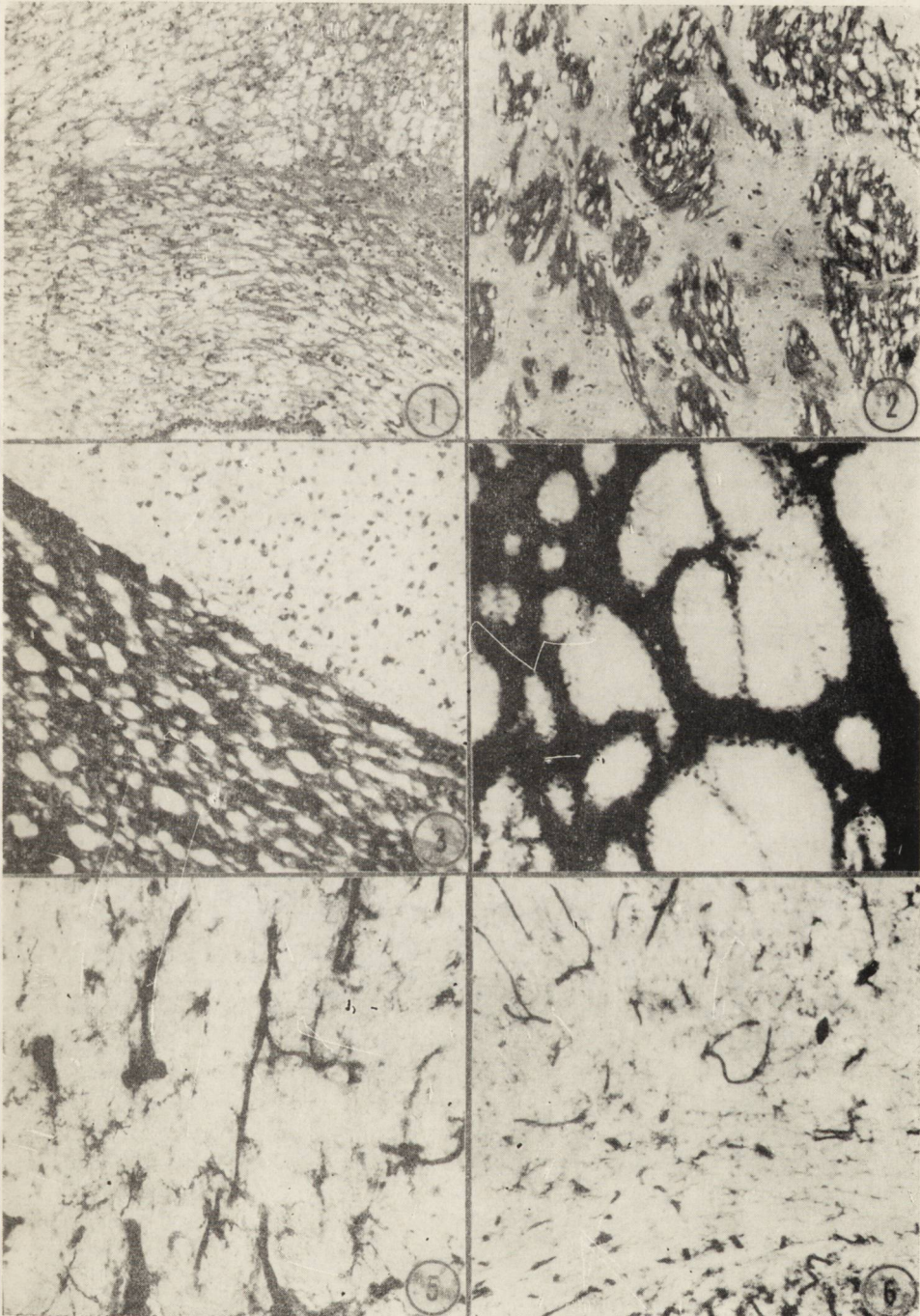
Ryc. 4. Prawidłowa aktywność AChE w neuropilu prążkowie u szczura w przewlekłym zatruciu TET. Pow. $32 \times$.

Fig. 5. TET intoxication in rat. Normal intensive reaction for TPP-ase within capillaries and astroglial vascular feet, $\times 80$.

Ryc. 5. Zatrucie TET u szczura. Prawidłowy intensywny odczyn na TPPazę we włóścinkach i przynaczyniowych wypustkach astrogleju. Pow. $80 \times$.

Fig. 6. Normal distribution of ATP-ase activity within the capillary network in rat brain with chronic tin-induced brain edema, $\times 32$.

Ryc. 6. Prawidłowy rozkład aktywności ATPazy w sieci włóścinkowej mózgu szczura w przewlekłym obrzęku mózgu wywołanym TET. Pow. $32 \times$.



MIECZYŚLAW WENDER, ALEKSANDER PIECHOWSKI,
ANDRZEJ WAJGT

CEREBRAL PROTEINS IN EXPERIMENTAL
ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS *

Department of Neurology, Institute of Diseases of the Nervous System
and Sensory Organs, Medical Academy Poznań

The inflammatory syndrome of the early stage of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), characterized by the hematocytes moving out of the vascular lumen into the adjacent nervous tissue comprises also some alterations in the endothelial permeability for serum proteins (Vulpe et al., 1960). However, according to later observations of this author, only a part of the blood vessels showed such a change in physicochemical properties of the vascular endothelium, and only in the acute phase of the illness, whereas — in the chronic state of EAE — the vascular endothelium seemed unimpaired.

The investigations of Wajgt (1972) performed by the immunofluorescent method revealed some leakage of serum albumins, γ -G and β_1 C globulins, limited to perivascular exudates. The latter technique cannot provide complete evidence as to the state of cerebral proteins in this experimental disease, especially regards the existence of protein alterations provoked by brain edema. It is for these reasons that we have undertaken chemical studies of the soluble cerebral proteins in EAE by means of disc electrophoresis on polyacrylamide gel, introduced by Ornstein (1964) and Davis (1964). By this method an accurate analysis of the pattern of tissue proteins is rendered possible.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed with white Wistar rats, of either sex, 200—300 g of body weight.

Immunization of animals yielding experimental allergic encephalomyelitis (EAE). The experimental animals were immunized by single

* This investigation was supported by NIH PL 480 Research Agreement No. 05-027-1.

intradermal injections of 0.1 ml of the encephalitogenic mixture (according to Paterson, 1960) applied into the pads of the animals' hind legs. The encephalitogenic mixture was prepared as follows: 40% fresh homogenate of guinea pig spinal cord was emulsified with the same volume of complete adjuvant, containing 85 parts of Bayol F, 1.5 parts of Arlacel A and a solution of *Mycobacterium tuberculosis* H 37 RV (4 mg/ml).

The experiments were performed with groups of 10 animals each at two different stages of the evoked illness. 10 days after administration of the pathogenic mixture, i.e. at the preparalytic stage, and 12—16 days after immunization, i.e. at the time of fully developed pathological symptoms.

In the latter group, the material was collected on the day of appearance of clinical symptoms, and was then further subdivided into two groups, according to the intensity of the pathological process. In order to detect eventual differences, only animals which exhibited either weak or strong inflammatory changes were taken for examination, while those with intermediate symptoms were excluded from the experiment.

The term „weak inflammatory reaction” was adopted for samples showing only a few delicate areas of infiltration (Fig. 1 and 2) or 1—2 more pronounced ones. For the second group, with a „strong inflammatory reaction” such animals were selected, which showed numerous fields of infiltration as well as those which had a disseminated or diffuse inflammatory reaction in each field of vision even at small magnification.

Biochemical methods. The cerebral samples were prepared according to the method of Karcher et al. (1959). The protein content of the final supernatant was estimated by the method of Exton as modified by Gernard and Hajek (1966). Polyacrylamide gel disc electrophoresis was performed as described by Davis (1964). The proteinograms were evaluated by means of the Vitatron microdensitometer and quantitated gravimetrically according to the method of Jackman (1959). For a more detailed description of the chemical methods employed, the reader is referred to our previous publication (Wender et al., 1972).

Histological procedures. Routine histology was performed with the use of the following staining procedures: H + E, Nissl, Spielmeyer, Woelcke, and Klüver-Barrera.

RESULTS

Clinical observations. Animals immunized with brain antigen developed a typical neurological syndrome of diffuse encephalomyelitis be-

tween the 12th and 16th day, usually on the 13—14th day after sensitization.

Morphological studies. Histological slides demonstrated inflammatory changes localized mainly in perivascular and subependymal regions, with distinct preference of the pathological process to the brain stem (Fig. 3). Marked inflammatory changes were seen in the choroid plexus. Perivascular demyelination however was only occasionally observed (Fig. 4).

Biochemical findings. The total soluble protein content in brains from the experimental animals is listed in Table 1. These data indicate the

Table 1. Content of total brain soluble proteins in EAE expressed as % dry weight

Tabela 1. Całkowita zawartość rozpuszczalnych białek mózgu w EAE wyrażona jako % suchej wagi

Experimental material Materiał doświadczalny	White matter Istota biała	Grey matter Istota szara
Control animals Zwierzęta kontrolne	2.76±0.16	3.74±0.23
Preparalytic stage of EAE Okres przedporażenny EAE	4.42±0.55	5.93±0.63
Paralytic stage of EAE (weak pathological reaction) Okres porażenny (nieznaczne objawy patologiczne)	3.41±0.32	5.00±0.36
Paralytic stage of EAE. (strong pathological reaction) Okres porażenny (nasilone objawy patologiczne)	3.72±0.21	4.38±0.26

Results are given as mean ± standard error

Wyniki podano jako średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

apparently increased content of total soluble proteins in the white and grey matter derived from animals with EAE. However, owing to wide variations of individual results within the experimental groups, these differences are statistically insignificant.

The electrophoretic pattern of soluble brain proteins in EAE is shown in Tables 2 and 3. From these figures it appears that the albumin fraction as a whole remained quantitatively unchanged in EAE. Some alterations however in its electrophoretic mobility were evident, as compared with the control animals. The globulin fractions showed some changes only at the preparalytic stage of EAE. When compared with

Table 2. Electrophoretic pattern of soluble white matter proteins in EAE (in rel. %)
 Tabela 2. Obraz elektroforetyczny rozpuszczalnych białek istoty białej mózgu w EAE (w %)

Protein fraction Frakcja białka	Control animals Zwierzęta kontrolne	Preparalytic stage Okres przedporażeniowy	Paralytic stage Okres porażenny	
			Weak pathological reaction Nieżnaczone objawy patologiczne	Strong pathological reaction Nasilone objawy patologiczne
Prealbumins 1	1.38 ± 0.16	1.48 ± 0.17	1.28 ± 0.22	1.13 ± 0.17
Prealbuminy 2	3.95 ± 0.13	4.54 ± 0.21	4.40 ± 0.32	4.30 ± 0.25
Albumins 3	8.24 ± 0.50	11.96 ± 0.79	11.73 ± 1.24	12.22 ± 1.10
Albuminy 3a	2.78 ± 0.95	0.54 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Postalbumins 4	5.17 ± 0.45	3.74 ± 0.37	3.11 ± 0.28	4.29 ± 0.63
Postalbuminy 5	9.28 ± 0.32	10.88 ± 0.55	11.08 ± 0.81	11.03 ± 0.46
6	6.69 ± 0.41	6.40 ± 0.27	6.98 ± 1.01	7.58 ± 0.62
Globulins 7	17.18 ± 0.41	12.11 ± 1.68	14.63 ± 0.89	13.19 ± 0.45
Globuliny 8	10.24 ± 0.35	12.11 ± 0.61	11.87 ± 0.49	12.76 ± 0.52
9	22.02 ± 0.78	22.27 ± 1.66	22.61 ± 0.56	22.78 ± 0.96
γ-Globulins 10	12.20 ± 0.83	6.93 ± 0.97	10.33 ± 0.94	10.72 ± 0.84
γ-Globuliny 11	0.87 ± 0.47	7.06 ± 0.74	2.00 ± 1.07	0.00 ± 0.00

Results are given as mean ± standard error

Wyniki podano jako średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

normal brains, a significant increase of the second γ -globulin fraction (fraction 11) was noted. Proteinograms obtained from animals with the developed syndrome of EAE were again quite normal in respect to their globulin composition.

DISCUSSION

Cerebral proteins are inevitably involved in the mechanisms leading to brain edema, which is the result of reaction against agents noxious to the nervous tissue, to the cerebral white matter in particular.

Kaps (1954) who performed paper electrophoresis of proteins, reported that in the white matter of edematous human brains, the appearance of albumins could be observed. The brain cortex, on the other hand was not affected in this instance. Basing on results of investigations of the soluble protein profile performed with the aid of paper electrophoresis,

Table 3. Electrophoretic pattern of soluble grey matter proteins in EAE (in rel. %)
 Tabela 3. Obraz elektroforetyczny rozpuszczalnych białek istoty szarej mózgu w EAE
 (w %)

Protein fraction Fracja białkowa	Control animals Zwierzęta kontrolne	Preparalytic stage Okres przedporażen- ny	Paralytic stage Okres porażenny	
			Weak pathological reaction Nieznaczone objawy patologiczne	Strong pathological reaction Nasilone objawy patologiczne
Prealbumins 1	1.23 ± 0.24	1.31 ± 0.05	1.37 ± 0.15	1.13 ± 0.17
Prealbuminy 2	4.75 ± 0.10	4.79 ± 0.21	5.78 ± 0.44	4.30 ± 0.25
Albumins 3	7.57 ± 0.43	9.69 ± 0.54	11.77 ± 0.59	12.22 ± 1.10
Albuminy 3a	3.43 ± 0.77	0.98 ± 0.65	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Postalbumins 4	5.15 ± 0.64	4.46 ± 0.36	4.44 ± 0.66	4.29 ± 0.63
Postalbuminy 5	9.56 ± 0.79	11.60 ± 0.36	12.64 ± 0.54	11.03 ± 0.46
6	7.30 ± 0.74	5.75 ± 0.23	5.05 ± 0.17	7.58 ± 0.62
Globulins 7	17.39 ± 1.08	13.27 ± 1.28	14.62 ± 0.15	13.19 ± 0.45
Globuliny 8	10.09 ± 0.94	12.10 ± 0.86	11.52 ± 0.62	12.76 ± 0.52
9	22.00 ± 0.96	20.15 ± 0.80	21.02 ± 0.66	22.78 ± 0.96
r-Globulins 10	8.68 ± 0.40	8.47 ± 1.44	10.06 ± 1.00	10.72 ± 0.84
r-Globuliny 11	2.85 ± 0.83	7.43 ± 0.66	1.74 ± 1.02	0.00 ± 0.00

Results are given as mean ± standard error.

Wyniki podano jako średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

Kiyota (1959) suggested, that from the point of view of brain protein behaviour two different forms of brain edema should be postulated, a simple and a complicated one.

Simple brain edema is characterized by a normal soluble brain protein pattern, whereas in the complicated one — the protein composition of the brain is altered by the emergence of additional protein fractions corresponding by virtue of their electrophoretic mobility to serum albumins. These observations have been confirmed by Cumings (1961, 1962), who employed starch gel electrophoresis to investigate the protein composition of edematous brain regions in the immediate surroundings of a brain tumor, and who found markedly increased albumin contents in the white matter adjacent to the tumor.

In the opinion of Cumings, these results confirm the assumption that there exist two biochemically different types of brain edema. These

results however, could not be fully corroborated by Löwenthal (1964) who using agar electrophoresis was in fact able to demonstrate some increase in the level of a fast migrating brain protein fraction, but this fraction showed all characteristics specific for α -globulins and not for albumins.

Hauser and coll. (1963) employed a different experimental model of brain edema, which was induced in dogs by means of inplanting *Psyllium* seeds into the brain. Using paper electrophoresis of brain proteins these authors demonstrated a markedly increased albumin content (band 2 in the proteinogram) but only in those brain specimens which showed morphological signs of swelling. This correlation seemed so obvious that an increased content of albumins was not only regarded as being indicative of brain edema but also as an accurate measure of its intensity.

In our study of the composition of cerebral proteins in EAE — in a pathological process which produces inflammatory edema we were unable to find any significant increase of either prealbumins or albumins. Only with the aid of immunohistochemical methods some extravascular deposits of serum albumins and β_1 C globulins could be detected (Wajgt, 1972). The observations in EAE seem to indicate that brain edema in this experimental disease does not affect the cerebral soluble protein pattern, and thus should be recorded as the simple edema.

The factor, which is decisively responsible for alterations in the cerebral protein pattern is the antigen — antibody reaction, by virtue of which an intensive production of immunoglobulins is set up in the early period of the illness. In the electrophoretic pattern this is reflected by the increased proportion of the second γ -globulin fraction. The transient nature of this change excludes the other possible explanation, that it is myelin membrane proteins which become solubilized by the pathological demyelinating process and which migrate in electrophoresis together with cerebral globulins.

CONCLUSIONS

1. The inflammatory brain edema in experimental allergic encephalomyelitis is not associated with alterations in the electrophoretic cerebral protein pattern thus indicating that from a biochemical point of view it constitutes a simple type of edema.

2. The rather small alterations of the γ -globulin pattern in the early period of EAE (increase of second γ -globulin fraction — fraction 11) are the result of an induced immunoglobulin production in the nervous tissue.

3. The impairment of myelin membranes in EAE is not reflected in the electrophoretic pattern of soluble brain proteins.

M. Wender, A. Piechowski, A. Wajgt

BIAŁKA MÓZGU
W DOŚWIADCZALNYM ALERGICZNYM ZAPALENIU MÓZGU
I RDZENIA (EAE)

Streszczenie

Autorzy przeprowadzili badania biochemiczne rozpuszczalnych białek mózgu u szczurów z alergicznym zapaleniem mózgu i rdzenia, wywołanym jednorazowym śródskórnym wstrzyknięciem mieszaniny encefalitogennej. Badania przeprowadzono w 2 różnych okresach rozwoju procesu chorobowego: w okresie przedporażennym i w okresie w pełni rozwiniętego zespołu klinicznego. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wyciągają następujące wnioski:

1. W obrzęku mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia nie stwierdzono zmian w elektroforetycznym obrazie białek mózgu. Z biochemicznego punktu widzenia wskazuje to na prosty typ obrzęku.

2. Stosunkowo niewielkie zmiany w obrazie elektroforetycznym gamma-globulin (frakcja 11) są następstwem wytwarzania immunoglobulin w tkance nerwowej.

3. Uszkodzenie osłonek mielinowych w EAE nie powoduje zmian w obrazie elektroforetycznym rozpuszczalnych białek mózgu.

M. Вендер, А. Пеховски, А. Вайгт

БЕЛКИ В МОЗГЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ
ВОСПАЛЕНИИ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА (ЭАЭ)

Резюме

Авторы привели биохимические исследования растворимых белков мозга у крыс с аллергическим воспалением головного и спинного мозга, вызванном однократным подкожным введением энцефалитогенной смеси.

Исследования проведены в двух разных периодах развития болезни: в период перед поражением и во время полного развития клинического комплекса.

На основании полученных результатов авторы пришли к следующим заключениям:

1. В отеке мозга при экспериментальном аллергическом воспалении головного и спинного мозга не обнаружено изменений в электрофорезной картине белков мозга, что указывает на несложный тип отека.

2. Относительно небольшие изменения в электрофорезной картине гамма-глобулин с увеличением второй фракции гамма-глобулин (фракция II) в раннем периоде ЭАЭ являются результатом образования иммуно-глобулин в нервной ткани.

3. Повреждение миелиновых оболочек при ЭАЭ не вызывает изменений в электрофорезной картине растворимых белков мозга.

REFERENCES

1. Cumings J.: Soluble cerebral proteins in normal and oedematous brain. *J. clin. Path.*, 1961, 14, 289—298.
2. Cumings J.: Water soluble proteins and enzymes in normal and in oedematous brain tissue. IV Intern. Congress Neuropath. Ed. H. Jacob, vol. I, Thieme, Stuttgart 1962, pp. 157—161.
3. Davis B.: Disc electrophoresis — II Method and application to human serum proteins. *Annals N. York Acad. Sci.*, 1964, 121, 404—427.
4. Gernard K., and E. Hajek: Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Liquor (und Harn) Eiweissbestimmung mit einem modifizierten Fxton-Reagens. *Dtsch. Gesundheitswesen*, 1966, 11, 510—513.
5. Hauser H., Sven H., McKenzie B., Mc Guckin W., and Goldstein N.: A study of cerebral protein and polysaccharide in the dog. III. „Albumin“ changes in experimental cerebral edema. *Neurology (Minneap.)*, 1963, 13, 945—952.
6. Jackman L.: Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in organic chemistry, Pergamon Press, London, 1959.
7. Kaps G.: Über elektrophoretische Untersuchungen an Hirngewebe, insbesondere aus der Umgebung von Tumoren-zugleich ein Beitrag zur Pathogenese von Hirnschwellung und Hirnödem. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1954, 192, 115—128.
8. Karcher D., van Sande M., and Lowenthal A.: Micro-electrophoresis in agar gel of proteins of the cerebrospinal fluid and central nervous system. *J. Neurochem.*, 1959, 4, 135—140.
9. Kiyota K.: Electrophoretic protein fractions and the hydrophilic property of brain tissue. I. The proteins of normal brain. II. The proteins of brain with oedema. *J. Neurochem.*, 1959, 4, 202—208 and 209—216.
10. Lowenthal A.: Agar gel electrophoresis in neurology, Elsevier, Amsterdam 1964.
11. Ornstein L.: Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Annals N. York Acad. Sci.*, 1964, 121, 321—349.
12. Paterson P.: Transfer of experimental allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells, *J. Exp. Med.*, 1960, 111, 119—136.
13. Vulpe M., Hawkins A., and Rozdilsky B.: Permeability of cerebral blood vessels in experimental allergic encephalomyelitis studied by radioactive iodinated bovine albumin. *Neurology (Minneap.)*, 1960, 10, 171—177.
14. Wajgt A.: Immunohistochemical study of experimental allergic encephalomyelitis. *Ann. Immunol.*, 1972, 4, 183—194.
15. Wender M., Piechowski A., Wajgt A.: Cerebral proteins in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 519—527.

Authors' address: Department of Neurology, Medical Academy, Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

PODPISY POD RYCINY
LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Delicate infiltrate in venous wall. Medulla oblongata — 12 days after immunization. H+E, $\times 480$.

Ryc. 1. Delikatny naciek w ścianie naczynia żylnego. Rdzeń przedłużony — 12 dni po immunizacji.

Fig. 2. Weak perivascular reaction in spinal cord — 12 days after immunization. H+E, $\times 240$.

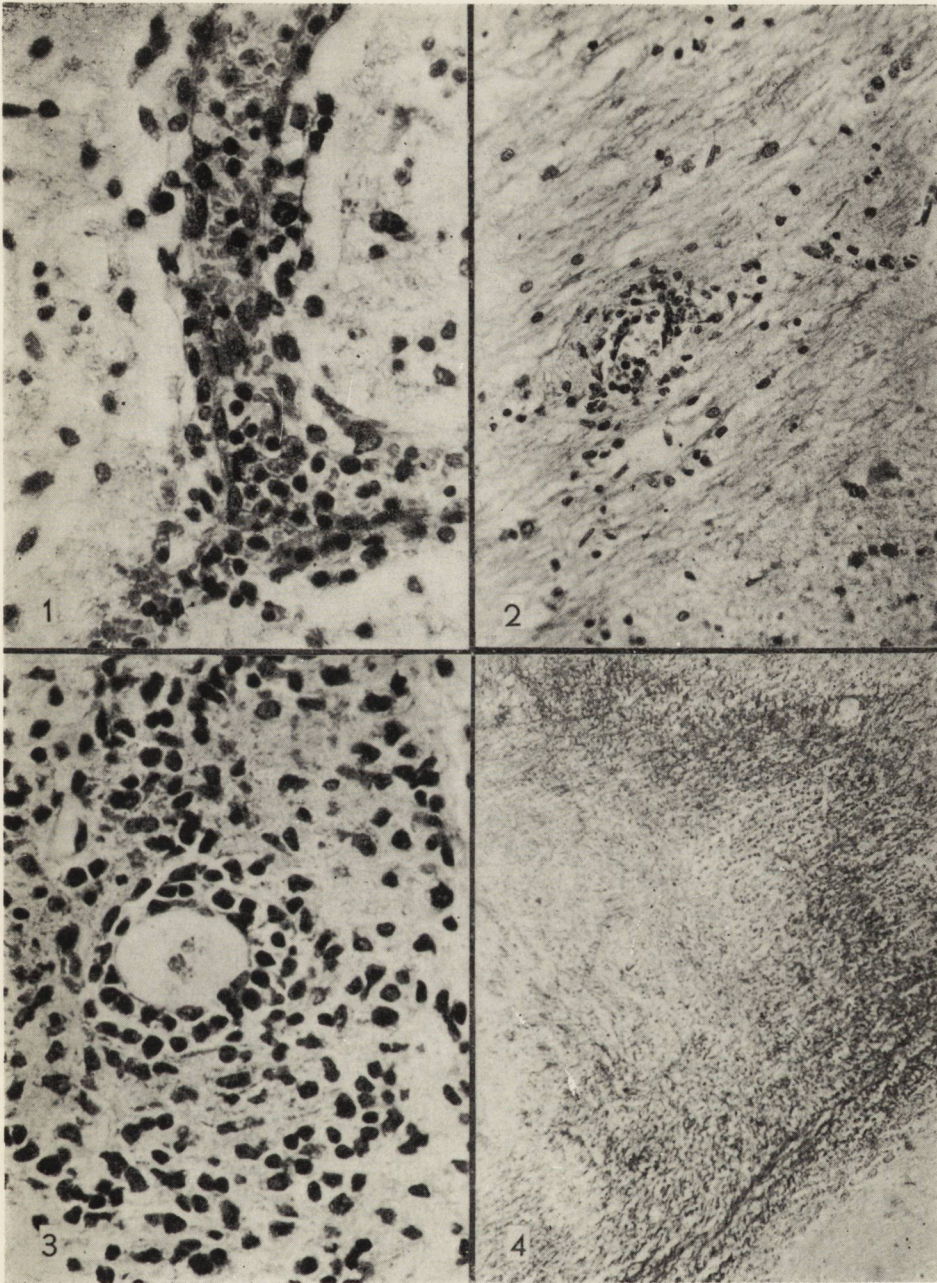
Ryc. 2. Słaby odczyn okołonaczyniowy w rdzeniu kręgowym — 12 dni po immunizacji.

Fig. 3. Large perivenous infiltration in pons — 14 days after immunization. H+E, $\times 480$.

Ryc. 3. Duży naciek okołożylny w móście — 14 dni po immunizacji.

Fig. 4. Diffuse demyelination in cerebellar white matter. 14 days after immunization. Klüver-Barrera staining, $\times 240$.

Ryc. 4. Rozlana demielinizacja w istocie białej mózdzku — 14 po immunizacji.



MARIA OSTENDA, HALINA STRUGALSKA

HISTOCHEMICZNE ZMIANY
WE WRZECIONACH MIĘŚNIOWYCH
W PRZYPADKACH CHORÓB MIĘŚNI *

Klinika Neurologiczna AM, w Warszawie
Kierownik: prof. dr I. Hausmanowa-Petrusewicz

Wrzeciona mięśniowe uważane były przez długi czas za twory odporne na procesy chorobowe toczące się w układzie mięśniowym. Z badań doświadczalnych wynika, że jedynym pewnym czynnikiem prowadzącym do uszkodzenia wrzecion jest uszkodzenie neuronu (Tower 1932, Adal 1969, Bourne 1960, Bravo-Rey i wsp. 1969). Wydaje się więc, że w jednostkach chorobowych, w których napotyka się uszkodzenia neuronu, można by oczekiwac zmian we wrzecionach mięśniowych. Ostatnio ukazały się prace donoszące o zmianach we wrzecionach, w niektórych przypadkach chorób mięśni (Lapresle, Milhaud 1964, Jędrzejewska, Fidiańska 1966, Cazzato, Walton 1968, Adams i wsp. 1962, d'Agostino i wsp. 1968).

Celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności niektórych enzymów we wrzecionach mięśniowych w przebiegu chorób pierwotnie mięśniowych i neurogennych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał obejmuje 39 przypadków wybranych z 450 przypadków chorób mięśniowych badanych w Klinice Neurologicznej AM w Warszawie, w latach 1965—1969.

Dwa przypadki rozpoznane jako schorzenia niemięśniowe (*Spina bifida* oraz dziecięce porażenie mózgowe), w których badania kliniczne, histopatologiczne, biochemiczne oraz elektromiograficzne nie wykazały

* Praca wykonana i subsydiowana z umowy polsko-amerykańskiej PL 480, Grant Public Health Service USA. Agreement Nr 05-002-1.

zmian w tkance mięśniowej, traktowano jako materiał porównawczy przy ocenie patologii wrzecion.

Podział materiału według rozpoznań, z uwzględnieniem mięśni, z których pobierano wycinki, jest przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Przypadki chorób mięśni, w których w pobranym wycinku mięśniowym znajdowano wrzeciona

Table 1. Cases of muscle diseases in which in muscle biopsies were found

Lp. No	Rozpoznanie Diagnosis	Liczba przyp. Number of cases	Mięsień — Muscle				
			biceps	quadr.	delt.	glut.	tib.
1	<i>Dystrophia musc. progressiva</i>						
	a) <i>Facio-scapulo-humeralis</i>	5	4	1			
	b) Duchenne	15	14		1		
2	<i>Myopathia</i>	8	5	2	1		
3	<i>Dystrophia myotonica</i>	1	1				
4	<i>Myotonia</i>	1	1				
5	<i>Atrophia spinalis</i>	4	4				
6	<i>M. Kugelberg-We-lander</i>	2	1	1			
7	<i>M. Charcot-Marie Tooth</i>	3		1			2
8	<i>Spina bifida</i>	1				1	
9	<i>Paralysis cerebr. inf.</i>	1	1				
	Razem — Total	41	31	5	2	1	2

Wycinki mięśniowe pobierano w znieczuleniu miejscowym 2% roztworem nowokainy. Pobrany, nieutralony wycinek zamrażano natychmiast w ciekłym azocie lub suchym lodzie i skrawano na kriostacie w temperaturze -18°C . W skrawkach badano aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy alfa-glicerofosforanowej (alfa-GDH), dehydrogenazy glicero-6-fosforanowej (G-6-PDH) według Barka (1965), UDPG-transferazy, fosforylazy a, b oraz a+b (Pla, Plb, Pla+b) według Guha i Wegmana w modyfikacji Godlewskiego (1963), adenzynotrójfosfatazy miofibrylarnej (ATP-aza) według Padykuli i Hermannna (1955), acetylocholinesterazy (ACHE) według Koelle w modyfikacji Gerebtzoffa (1959). We wszystkich metodach przeprowadzano kontrolę, inkubując skrawek w „ślepych” substracie.

WYNIKI

Wrzeciona mięśniowe pochodzące z przypadków, w których nie stwierdzono zmian w mięśniach, były otoczone torebką, w której odczyn na fosforylaze był ujemny, a na ATP-azę i dehydrogenazy słabo dodatni. Aktywność enzymów we włóknach intrafuzalnych była zróżnicowana, we włóknach wąskich wysoka dla fosforylazy i ATP, zaś we włóknach szerokich aktywność ATP była niższa, fosforylazy dość wysoka (ryc. 1, 2). Aktywność enzymów oddechowych była wyrównana, wysoka zarówno we włóknach szerokich jak i wąskich (ryc. 3). W przestrzeni wewnątrztorebkowej odczyny barwne nie występowały.

Dystrophia musculorum progressiva

Typ obręczowo-kończynowy. W niektórych przypadkach występowało nieznaczne pogrubienie torebki łącznotkankowej, przegród wewnątrztorebkowych oraz rozwarstwienie blaszek torebki. Niekiedy stwierdzano zmniejszenie rozmiarów włókien intrafuzalnych oraz obniżenie aktywności enzymów.

Typ Duchenne'a. W tej postaci dystrofii mięśniowej zmiany o różnym nasileniu występowały we wszystkich badanych przypadkach, obejmując torebkę, włókna intrafuzalne i przestrzeń wewnątrztorebkową. W torebce stwierdzono pogrubienie i rozwarstwienie blaszek (ryc. 5). W przestrzeni wewnątrztorebkowej pojawiał się materiał słabo barwiący się przy reakcji na ATP-azę i dehydrogenazy (ryc. 8, 9). Aktywność ATP-azy różnicowała typy metaboliczne włókien intrafuzalnych (ryc. 4), czasem występowały wyraźne ubytki aktywności tego enzymu (ryc. 5). W badaniu aktywności dehydrogenaz również stwierdzono występowanie ubytków we włóknach intrafuzalnych. Przypominały one opisywane w przerosłych włóknach ekstrakuzalnych „blebs” (ryc. 12, 13, 14). W niektórych włóknach lub całych ich grupach obserwowano ubytki aktywności fosforylaz (ryc. 10). Były to zwykle włókna bardzo małych rozmiarów, umieszczone ekscentrycznie w poszerzonej (pozornie?) przestrzeni limfatycznej otoczonej cienką torebką. W niektórych przypadkach recyprokalność odczynów na enzymy cyklu glikolitycznego i oksydoredukcyjne wydawała się zatarta (ryc. 15, 16, 17, 18). Mozaikowy układ odczynów enzymatycznych we włóknach ekstrakuzalnych sąsiadujących z wrzecionami był zachowany.

W przypadkach z zaawansowanymi zmianami tkanki mięśniowej stwierdzano obecność wrzecion mięśniowych o prawidłowej strukturze. Aktywność enzymów we włóknach intrafuzalnych była jednak nieco

zmieniona: wyższa we wszystkich włóknach, niezależnie od ich rozmiarów (ryc. 6).

Myopathia. W tej grupie chorób mięśniowych, zmiany we wrzecionach występowały w sposób niestały. W pojedynczych włóknach intrafuzalnych stwierdzono ubytki aktywności enzymatycznej przypominające opisane poprzednio „blebs”. W niektórych włóknach aktywność enzymów była nieco obniżona. W przypadku *myopathia myotubularis* znaleziono niezmienną wrzeciono w skrawku mięśnia, w którym liczne włókna ekstrakufalne były w stadium miotuby.

W przypadkach: *nemaline myopathia*, *glycogenosis*, *dystrophia myotonica* i *myotonia* nie stwierdzono zmian we wrzecionach.

Atrophia spinalis

We wrzecionach obok niezmiennych włókien występowały włókna bardzo małe o obniżonej aktywności fosforylaz, a zachowanej dehydrogenaz — oceniane przez nas jako zanikowe (ryc. 21, 22, 23). W niektórych przypadkach wrzeciona wykazywały względną odporność na proces chorobowy, utrzymując się w polach typowo neurogenego zaniku włókien ekstrakufalnych (ryc. 24).

Morbus Kugelberg-Welander

W dwu badanych przypadkach wrzeciona pozostawały w granicach normy.

Morbus Charcot-Marie-Tooth

W badanych przypadkach stwierdzono, w znacznie zmienionej tkance mięśniowej, wrzeciona o zachowanej strukturze i wyrównanej aktywności enzymatycznej we włóknach intrafuzalnych, niezależnie od ich rozmiarów (ryc. 20). W jednym przypadku stwierdzono zmniejszenie ilości włókien intrafuzalnych we wrzecionie: 1—2 włókna znajdowały się w szerokiej przestrzeni wewnątrzorebkowej (ryc. 19).

OMÓWIENIE

Jako materiał porównawczy w stosunku do wrzecion pochodzących z przypadków chorób mięśniowych potraktowano wrzeciona mięśniowe z przypadków, w których nie stwierdzono chorób mięśni. Liczba włókien intrafuzalnych we wrzecionie waha się w granicach od 4 do 18. We wszystkich badanych wrzecionach występowały zarówno włókna szerokie jak i wąskie. Wydaje się, że włókna szerokie odpowiadają według klasycznego podziału włóknom „bag”, a wąskie „chain” (Ruffini 1892 cyt. wg Adamsa i wsp. 1962). W badanym materiale stwierdzono zróżnicowanie typów metabolicznych włókien intrafuzalnych: aktywność ATP-azy miofibrylarnej i fosforylaz była wysoka we włóknach wąskich (podobnie jak w II typie metabolicznym włókien ekstrakufalnych),

a niska we włóknach szerokich (typ I). Obok dwu zróżnicowanych typów włókien występowały włókna średniej wielkości, o umiarkowanej aktywności ATP-azy i fosforylasy P₁, które mogą odpowiadać włóknom pośrednim (ryc. 1, 2). Do typu II należą, jak się wydaje „chain”, zaś „bag” należą do typu I i pośredniego, jeżeli przyjmiemy za wskaźnik aktywność ATP-azy i fosforylaz. Aktywność enzymów oksydoredukcyjnych bywa we włóknach intrafuzalnych wyrównana, niezależnie od ich rozmiarów (ryc. 1). Włókna intrafuzalne są otoczone torebką łącznotkankową, w której aktywność fosforylaz jest nieobecna, dehydrogenaz i ATP-azy mierna. W warunkach prawidłowych grubość torebki, oraz szerokość przestrzeni wewnątrztorbkowej zmienia się wzdłuż osi długiej wrzeciona.

W rozpatrywanych przypadkach chorób mięśni zmiany dotyczyły w różnym stopniu wszystkich elementów wrzeciona mięśniowego: torebki łącznotkankowej, przestrzeni wewnątrztorbkowej i włókien intrafuzalnych. Pogrubienie torebki wrzeciona stwierdzono w kilku przypadkach zarówno chorób pierwotnie mięśniowych jak i neurogennych, przeważnie w postaciach o ostrym przebiegu klinicznym (*M. Werdnig-Hoffmanna*, *M. Duchenne'a*). Błazki pogrubiałej torebki były zwykle rozwarstwione, towarzyszyły im zmiany we włóknach intrafuzalnych. Zmiany te mogły odpowiadać histopatologicznemu obrazowi „oedematous swelling” (*Cazzato, Walton 1968*). Poszerzenie przestrzeni wewnątrztorbkowej występujące w szeregu przypadków powinno być rozpoznawane ostrożnie ze względu na zmiany jej rozmiarów w warunkach fizjologicznych, zależne od poziomu przekroju. Przy zaniku włókien intrafuzalnych poszerzenie przestrzeni może być pozorne (ryc. 7, 8, 9, 10, 22). W niektórych przypadkach w poszerzonej przestrzeni wewnątrztorbkowej występowała bezstrukturalna masa ze słabym odczynem barwnym, nie będącym odczynem enzymatycznym. Interpretacja tego zjawiska jest trudna, dopóki nie zostanie w pełni wyjaśniona rola fizjologiczna przestrzeni i jej zawartości (*Brzeziński 1961*). Najistotniejsze zmiany dotyczą włókien intrafuzalnych. W niektórych przypadkach udało się stwierdzić niewątpliwe zmniejszenie liczby włókien intrafuzalnych, których niewielkie grupy były umieszczone ekscentrycznie w szerokiej przestrzeni wewnątrztorbkowej, otoczonej niezmienną torebką (ryc. 8, 9, 10, 21). Obraz ten przypominał zanik opisywany w miopatiach, prowadzący do całkowitego opustoszenia torebki wrzeciona (*Cazzato, Walton 1968, Martin, Resnier 1968*). Zmiany tego rodzaju w naszym materiale występowały jedynie w przypadkach zaniku mięśni pochodzenia neuralnego. W przetrwałych włóknach aktywność enzymatyczna była zachowana, jednakże fosforylasy nieco obniżona, a dehydro-

genazy wysoka niezależnie od rozmiarów włókien. W niektórych przypadkach w neuralnym zaniku mięśni udało się stwierdzić zmniejszenie rozmiarów niektórych włókien intrafuzalnych (ryc. 19, 20). Włókna te o obniżonej aktywności fosforylazy i zachowanej aktywności ATP-azy występowały obok włókien obu typów metabolicznych o prawidłowych odczynach.

Wewnątrz włókien intrafuzalnych stwierdzono zmiany w lokalizacji aktywności niektórych enzymów. W kilku przypadkach były to drobne ubytki aktywności dehydrogenaz, nadające cytoplazmie wygląd piankowaty (ryc. 12, 13, 14), o obrazie identycznym z „blebs” opisywanymi w przerosłych włóknach ekstrakufalnych. W niektórych przypadkach stwierdzono we włóknach intrafuzalnych ubytki aktywności ATP i PI (ryc. 5, 6, 11). Opisane zmiany dotyczyły przeważnie włókien szerokich typu I, tzn. „bag”.

W większości przypadków udało się stwierdzić podział włókien intrafuzalnych na typy metaboliczne, zwłaszcza gdy jako kryterium oceny przyjmowano aktywność ATP-azy (ryc. 4), w niektórych przypadkach jednakże aktywność we wszystkich włóknach pozostawała mierna (ryc. 5). Aktywność dehydrogenaz we włóknach intrafuzalnych była w wielu przypadkach wyrównana, nie wykazując recyprokalności w stosunku do aktywności PI, opisywanej w mięśniach zwierząt (Corvaja i wsp. 1969, Yellin 1969a, 1969b, Wirsén 1964, Rebollo, de Anda 1967, Edgerton, Simpson 1969, Nakajima i wsp. 1968, Spiro, Beilin 1969a). Badania prowadzone na prawidłowej tkance mięśniowej człowieka nie wykazywały takiej recyprokalności (Spiro, Beilin 1969b), traktowaliśmy więc wyrównaną aktywność PI i DHaz we włóknach intrafuzalnych jako ich cechę prawidłową.

Mechanizm powstawania zmian we wrzecionach opisywany jest dość skąpo; pewnym jest jedynie występowanie zmian we wrzecionach przy uszkodzeniu korzonków (Tower 1932). W przebiegu zatrucia Vincristine, lekiem uszkadzającym pierwotnie wrzeciona mięśniowe, zmiany znajdowano zarówno w tkance mięśniowej jak i nerwowej (Sandler i wsp. 1969). Autorzy badający wrzeciona w przebiegu chorób mięśniowych znajdowali w nich zmiany zarówno w przypadkach uważanych za pierwotnie mięśniowe jak i neuralne (Lapresle, Milhaud 1964, Jędrzejowska, Fidziańska 1966, Cazzato, Walton 1968, Conen, Bell 1970, Cooper, Daniel 1963). Na podstawie naszego materiału, wydaje się jednak, że charakter zmian występujących w tych dwóch grupach schorzeń jest odrębny: zaniki włókien intrafuzalnych stwierdzono jedynie w przypadkach neurogennych, zaś miejscowe ubytki aktywności enzymów występowały przeważnie w zespołach miogennych, najczęściej w postę-

pującym zaniku mięśni typu Duchenne'a. Włókna intrafuzalne wykazują, jak się wydaje, skłonność do określonego rodzaju zmian zależnie od ich typu metabolicznego; miejscowe ubytki aktywności enzymatycznej występują raczej we włóknach typu I, zaś typ II wykazuje większą skłonność do ogólnego obniżenia aktywności i do zaników.

Zmiany występujące w naszym materiale były opisywane w przebiegu chorób mięśniowych we włóknach ekstrakufalnych. Nasuwa to przypuszczenie, że mimo różnic histologicznych i fizjologicznych między włóknami ekstrakufalnymi i intrafuzalnymi mechanizm kształtowania zmian chorobowych jest w nich zasadniczo podobny. Zmiany enzymatyczne nie występują jednak równolegle w obu rodzajach włókien; zmienne wrzeciona leżą niejednokrotnie w niezmięnionej tkance mięśniowej, i odwrotnie, w prawie całkowicie rozpadłej tkance mięśniowej znajdowaliśmy nie uszkodzone wrzeciona.

Występowanie zmian we wrzecionach mięśniowych wydaje się uzależnione od przebiegu procesu chorobowego: w jednostkach chorobowych o cięższym przebiegu klinicznym występują one częściej.

WNIOSKI

1. We wrzecionach mięśniowych człowieka w warunkach prawidłowych występują trzy typy metaboliczne włókien intrafuzalnych. „Chains” wydają się odpowiadać II, a „bags” I i pośredniemu typowi.

2. W przebiegu chorób mięśniowych, we wrzecionach występują zmiany dotyczące torebki, przestrzeni wewnątrztorebkowej i włókien intrafuzalnych. Rodzaj zmian w tych ostatnich jest taki sam, jak we włóknach ekstrakufalnych (zanik włókien, obniżenie w nich aktywności enzymatycznej, miejscowe ubytki typu „blebs”), sugerując podobieństwo metabolizmu.

3. W przypadkach chorób pierwotnie mięśniowych częściej obserwowano zmiany miejscowe włókien intrafuzalnych, zaś w chorobach neuralnych — zanik. Zmiany we wrzecionach częściej spotykano w jednostkach chorobowych o ostrzejszym przebiegu.

М. Остенда, Х. Стругальска

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЕЧНЫХ ВЕРЕТЕНАХ ПРИ БОЛЕЗНЯХ МЫШЦ

Резюме

Мышечные веретена были исследованы в 41 случае мышечных болезни. Установлены изменения в сумке, внутрисумочного пространства и в интрафазальных волокнах. Тип изменений в интрафазальных волокнах одинаков с таковым

в экстрафузальных (исчезновение, уменьшение энзиматической активности, локальные потери активности типа „blebs”), внушая сходство метаболизма. Локальные изменения интрафузальных волокон наблюдались чаще в случаях болезней первичномышечных, а атрофия при невралных болезнях. В случаях острого течения болезни изменения выступали более часто.

M. Ostenda, H. Strugalska

HISTOCHEMICAL CHANGES IN MUSCLE SPINDLES IN MUSCLE DISEASES

Summary

Muscle spindles in 41 cases of muscle diseases were studied. The changes found involved capsule, intracapsular space and intrafusal fibres. The changes in intrafusal fibres were of the same type as in the extrafusal ones (atrophy, decrease of enzymatic activity, local activity loss of the „blebs” type) suggesting a close similarity with respect to the metabolism. Local changes in intrafusal fibres were more frequently observed in cases of primarily muscular diseases, whereas atrophies in neural diseases. The changes occurred more frequently in disease units of a more acute course.

PIŚMIENNICTWO

1. Adal M. N.: The fine structure of the sensory region of cat Muscle spindles. *J. Ultrastr. Res.*, 1969, 26/3—4, 332—352.
2. Adams R. D., Denny-Brown D., Pearson C. M.: *Diseases of Muscle*. Hoeber, New York 1962.
3. D'Agostino A. N., Ziter F. A., Rollison M. L., Bray P. F.: Familial myopathy with abnormal muscle mitochondria. *Arch. Neurol.*, 1968, 18, 388—401.
4. Barka T., Anderson P.: *Histochemistry. Theory, practice and bibliography*. Hoeber, New York 1965.
5. Bourne G. H.: *The Structure and Function of Muscles*. Vol. I. Acad. Press. London 1960.
6. Bravo-Rey M. O., Yamazaki J. N., Eldred E., Maier A.: Ionizing Irradiation on development of the Muscle Spindles. *Exp. Neurol.*, 1969, 25/4, 595—602.
7. Brzeziński D. K.: Untersuchungen zur Histochemie der Muskelspindeln. II. Zur Topochemie und Function des Spindelraumes und der Spindelkapsel. *Acta Histochem. (Jena)*, 1961, 12, 277—288.
8. Cazzato G., Walton J. N.: The Pathology of the Muscle Spindle (A Study of Biopsy Material in Various Muscular and Neuromuscular Diseases). *J. Neurol. Sci.*, 1968, 7, 15—70.
9. Conen P. E., Bell C. D.: Histochemical fibre „Types” in Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 1970, 10/2, 163—170.
10. Cooper S., Daniel P. M.: Muscle Spindles in Man: their Morphology in the Lumbricals and the Deep Muscles of the Neck. *Brain*, 1963, 86, 563—586.
11. Corvaja N., Marinozzi V., Pompeiano O.: Muscle Spindles in the Lumbrical Muscles of the Adult Cat. *Arch. Ital. Biol.*, 1969, 107/4, 365—543.

12. Edgerton V. R., Simpson D. R.: The intermediate muscle fibres of rats and guinea pigs. *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, 17/12, 828—838.
13. Gerebtzoff M. A.: *Cholinesterases*. Pergamon Press, London 1959.
14. Godlewski H. G.: Are active and inactive phosphorylases histochemically distinguishable? *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 198—112.
15. Jędrzejowska H., Fidzińska A.: Zmiany we wrzecionach mięśniowych w chorobach mięśni. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4/2, 217—230.
16. Lapresle J., Milhaud M.: Pathologie du fuseau neuromusculaire. *Rev. Neurol.*, 1964, 110/2, 97—122.
17. Martin L., Resnier J.: Nemaline Myopathy. I. Histochemical Study. *Acta neuropath.* (Berlin), 1968, 11, 282—293.
18. Nakajima Y., Shantha T. R., Bourne G. H.: Enzyme-Histochemical Studies on the Muscle Spindle. *Histochemie*, 1968, 16, 1—8.
19. Padykula H. A., Herman E.: The Specificity of the histochemical method for adenosine triphosphate. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, 3, 170—195.
20. Rebollo M. A., de Anda G.: The neuromuscular Spindles in the Adult Chicken. II. Histochemistry. *Acta Anatom.*, 1967, 67, 595—608.
21. Sandler S. G., Tobin W., Henderson E. S.: Vincristine induced neuropathy. *Neurology* (Minneap.), 1969, 19, 367—374.
22. Spiro A. J., Beilin R. L.: Histochemical Duality of Rabbit Intrafusal Fibres. *J. Histochem. Cytochem.*, 1969a, 17/5, 348—349.
23. Spiro A. J., Beilin R. L.: Human Muscle Spindle Histochemistry. *Arch. Neurol.*, 1969b, 20, 271—275.
24. Tower S. S.: Atrophy and degeneration in the muscle spindles. *Brain*, 1932, 55, 77—90.
25. Wirsen C.: Histochemical Heterogeneity of Muscle Spindle Fibers. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12, 308—309.
26. Yellin H.: A Histochemical Study of Muscle Spindles and their Relationship to Extrafusal Fiber Types in the Rat. *Amer. J. Anat.*, 1969a, 121/1, 31—46.
27. Yellin H.: Unique intrafusal and Extraocular Muscle Fibres. Exhibiting Dual Actomyosin ATP-ase activity. *Exp. Neurol.*, 1969b, 25, 153—163.

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

PODPISY POD RYCINY

LEGENDS FOR FIGURES

Ryc. 1 Mięsień niezmieniony. Wrzeciono mięśniowe wykazuje trzy typy wewnątrzwrzecionowych włókien: szerokie z niską aktywnością ATP-azy, wąskie z wysoką aktywnością i część szerokich z pośrednią aktywnością tego enzymu. ATP-aza. Pow. 200×.

Fig. 1 Unchanged muscle. Muscle spindle shows three types of intrafusal fibres: wide with low ATP-ase activity, small with high and wide with medium activity of this enzyme. ATP-ase. ×200.

Ryc. 2. Mięsień niezmieniony. Fosforylaza a wykazuje recyprokalną aktywność w stosunku do aktywności ATP-azy. Fosforylaza a. Pow. 200×.

Fig. 2 Unchanged muscle. Phosphorylase activity is reciprocal to that of ATP-ase. Phosphorylase a, ×200.

Ryc. 3. Mięsień niezmieniony. Słabo zróżnicowana aktywność SDH we włóknach wewnątrzwrzecionowych. Recyprokalne zachowanie się aktywności enzymu między włóknami wewnątrz- i zewnątrzwrzecionowymi. SDH. Pow. 400×.

Fig 3. Unchanged muscle. SDH activity is poorly differentiated in intrafusal fibres. The reciprocity of activity between intrafusal and extrafusal fibres is visible. SDH. ×400.

Ryc. 4. *Dystrophia musculorum progressiva*, typ Duchenne'a. Aktywność ATP-azy wyższa w małych wewnątrzwrzecionowych włóknach (prawdopodobnie „chains”), w szerszych (prawdopodobnie „bags”) — niższa. Aktywność enzymatyczna włókien wewnątrzwrzecionowych niezmieniona. ATP-aza. Pow. 200×.

Fig. 4. *Dystrophia musculorum progressiva*, of Duchenne type. In small intrafusal fibres (probably chains) the ATPase activity is high, in wide fibres (probably bags) it is low. The structure and enzyme activity in muscle spindle is relatively unchanged. ATPase. ×200.

Ryc. 5. *Dystrophia musculorum progressiva*, typ Duchenne'a. Niska aktywność ATP-azy w obu typach włókien wewnątrzwrzecionowych. W obwodowej części włókien widoczne ubytki aktywności. ATP-aza. Pow. 200×.

Fig. 5. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. Low ATPase activity in both types of intrafusal fibres. The lack of enzyme activity at the periphery of the fibres is visible. ATPase. ×200.

Ryc. 6. *Dystrophia musculorum progressiva*, typ Duchenne'a. Wąski pęczek włókien mięśniowych w szerokiej przestrzeni wewnątrztorbkowej. Zróżnicowana aktywność ATP-azy, w niektórych włóknach niższa na obwodzie. ATP-aza. Pow. 200×.

Fig. 6. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. The bundle of intrafusal fibres is narrow in relation to wide intracapsular space. Differentiated ATPase activity, in some fibres decreased at the periphery. ATPase. ×200.

Ryc. 7. *Dystrophia musculorum progressiva*, typ Duchenne'a. Niezmienione wrzeciono w tkance mięśniowej wykazującej zmiany zwyrodnieniowe. LDH. Pow. 200×.

Rig 7. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. Unchanged muscle spindle in almost fully degenerated muscle tissue. LDH. ×200.

Ryc. 8, 9, 10. *Dystrophia musculorum progressiva*, typ Duchenne'a. Zachowanie się aktywności enzymatycznej różnych enzymów w tym samym wrzecionie. *Ryc. 8* — LDH; *Ryc. 9* — G-6-PDH; *Ryc. 10* — Fosforylaza a+b. Aktywność fosforylaza jest wyraźnie niska we włóknach zewnątrzwrzecionowych. Przestrzeń wewnątrztorbkowa poszerzona w stosunku do włókien wewnątrzwrzecionowych. Pow. 200×.

Fig. 8, 9, 10. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. The activities of different enzymes in the same muscle spindle. Fig. 8. — LDH; Fig. 9 — G-6-PDH:

Fig. 10 — Phosphorylase a+b. Very low phosphorylase activity in extrafusal fibres. The intracapsular space is widened in relation to the bundle of intrafusal fibres. $\times 200$.

Ryc. 11. *Dystrophia musculorum progressiva*, typu Duchenne'a. Wyższa aktywność fosforylaza widoczna w centralnej części włókna. Fosforylaza. Pow. $200\times$.

Fig. 11. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. Phosphorylase activity is decreased in the central part of certain fibres. Phosphorylase. $\times 200$.

Ryc. 12. *Dystrophia musculorum progressiva*, typu Duchenne'a. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej rozłożona nieregularnie tworzy „blebs” we włóknach wewnątrzwrzecionowych. SDH. Pow. $100\times$.

Fig. 12. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. The activity of succinic dehydrogenase locally decreasing, forms the blebs in intrafusal fibres. SDH. $\times 100$.

Ryc. 13. *Dystrophia musculorum progressiva*, typu Duchenne'a. Aktywność SDH ogniskowo obniżona tworzy „blebs” we włóknach wewnątrzwrzecionowych. SDH. Pow. $100\times$.

Fig. 13. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. SDH activity. The blebs are visible in wide intrafusal fibres. SDH. $\times 100$.

Ryc. 14. *Dystrophia musculorum progressiva*, typu Duchenne'a. Aktywność SDH. Wycinek z ryc. 13. Pow. $200\times$.

Fig. 14. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. SDH activity. An inset from Fig. 13. $\times 200$.

Ryc. 15, 16, 17, 18. *Dystrophia musculorum progressiva*, typu Duchenne'a. Włókna wewnątrzwrzecionowe wykazują słabo zaznaczone zróżnicowanie aktywności enzymatycznej na trzy typy. Aktywność SDH nie wykazuje recypokalności do fosforylaza, względnie wysoka we włóknach szerokich i tylko zaznaczona we włóknach wąskich. Ryc. 15 — fosforylaza a+b. Pow. $200\times$; Ryc. 16 — fosforylaza b. Pow. $200\times$; Ryc. 17 — SDH. Pow. $200\times$; Ryc. 18 — UDPG-transferaza. Pow. $200\times$.

Fig. 15, 16, 17, 18. *Dystrophia musculorum progressiva* of Duchenne type. Enzymes activity is poorly differentiated in three types intrafusal fibres. SDH activity is not exactly reciprocal to that of phosphorylase: relatively high in wide fibres, slightly lower in the small ones. Fig. 15 — phosphorylase a+b. $\times 200$; Fig. 16 — phosphorylase b. $\times 200$; Fig. 17 — SDH. $\times 200$; Fig. 18 — UDPG-transferase. $\times 200$.

Ryc. 19. *Morbus Charcot-Marie-Tooth*. W szerokiej przestrzeni torebkowej widoczne dwa włókna o wysokiej aktywności enzymatycznej, sugeruje to zanik włókien intrafuzalnych. SDH. Pow. $200\times$.

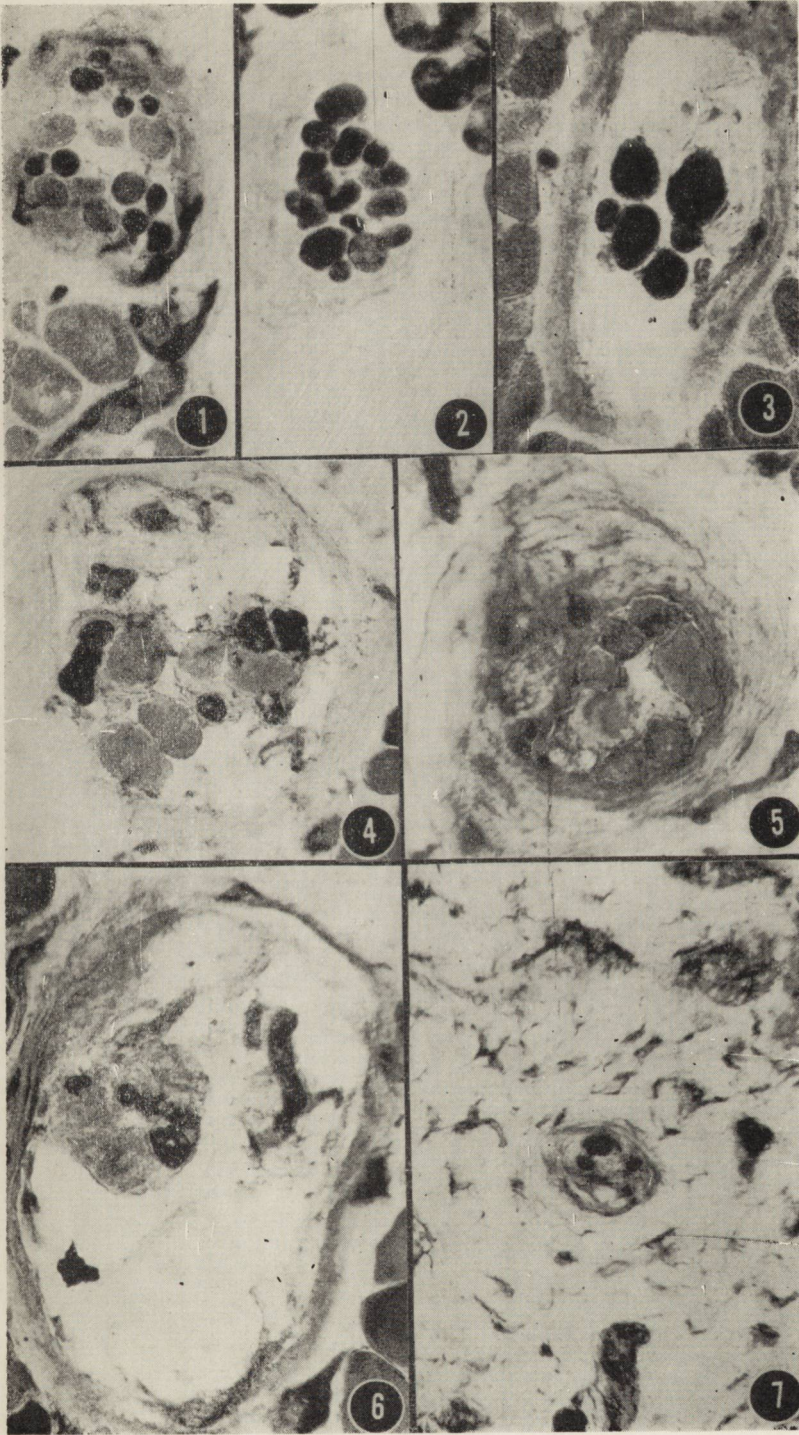
Fig. 19. Charcot-Marie-Tooth disease. Two fibres of high enzymatic activity are visible in wide intracapsular space. It suggests the atrophy of intrafusal fibres. SDH. $\times 200$.

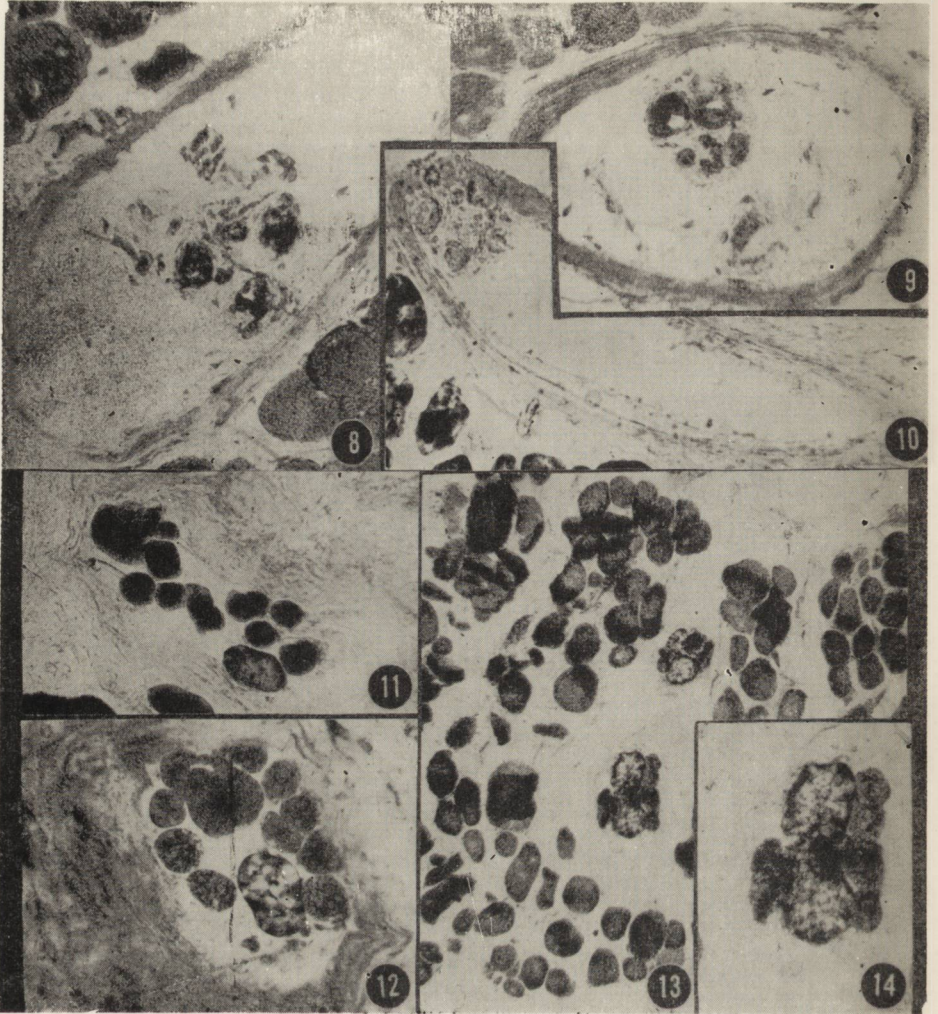
Ryc. 20. *Morbus Charcot-Marie-Tooth*. Dwa wrzeciona mięśniowe wśród zanikłej tkanki mięśniowej. LDH. Pow. $100\times$.

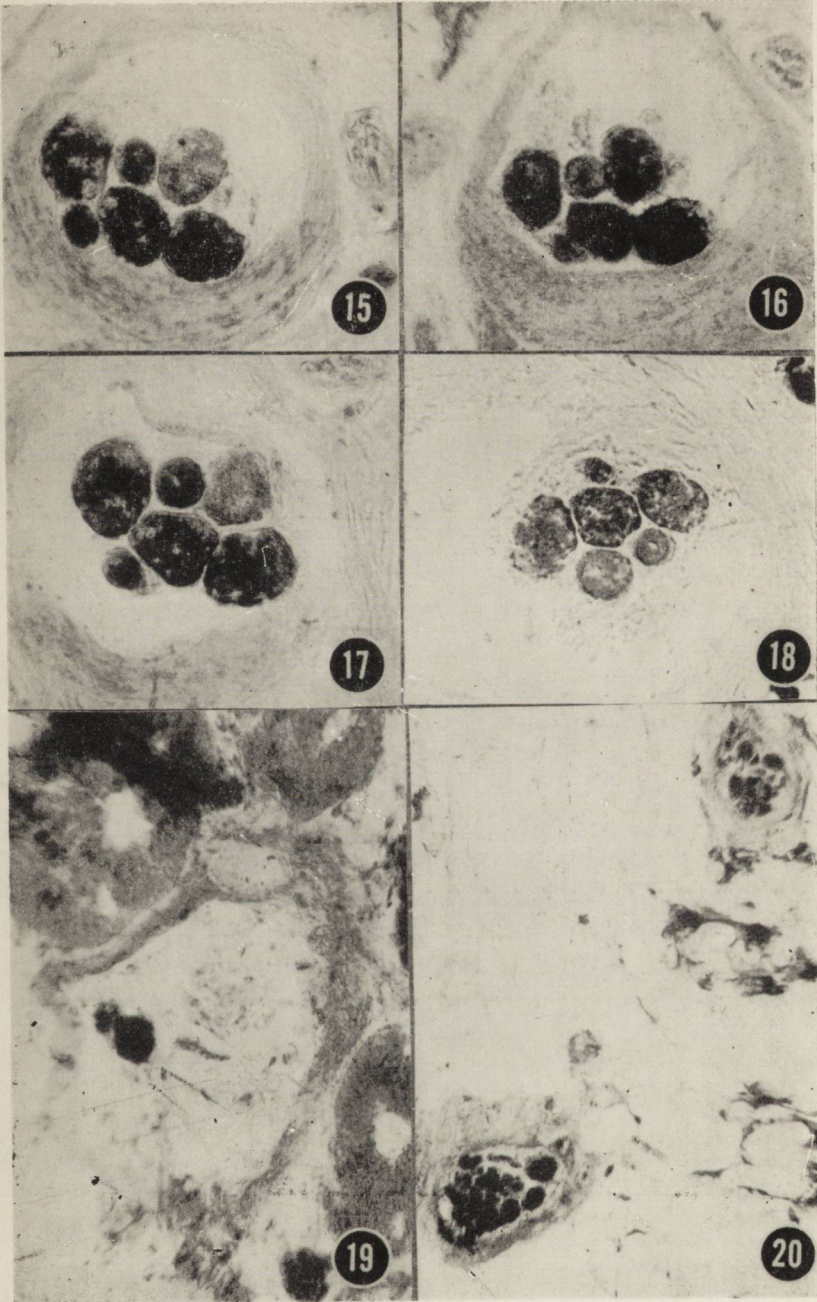
Fig. 20. Charcot-Marie-Tooth disease. Two muscle spindles in completely degenerated muscle tissue. LDH. $\times 100$.

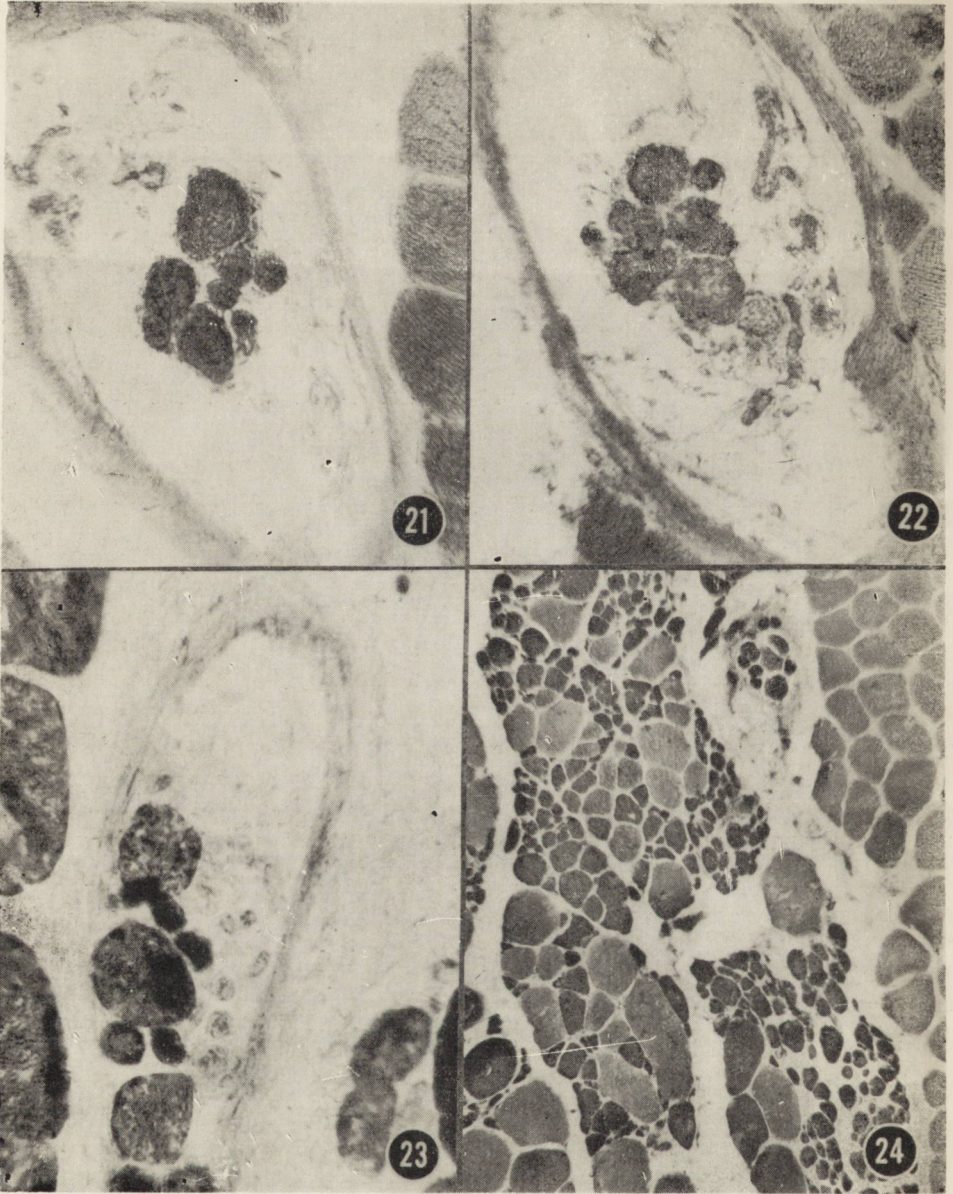
Ryc. 21, 22, 23, 24. Atrophia spinalis. Włókna wewnątrzwrzecionowe wykazują słabe zróżnicowanie aktywności dehydrogenaz na trzy typy, przy dobrze zachowanym podziale w aktywności fosforylaz. Kilka wąskich włókien (zanikłych) pozbawionych aktywności fosforylaz (*ryc. 23*). Niezmienione wrzeciono w obszarze typowo neurogenego zaniku (*ryc. 24*). *Ryc. 21* — LDH. Pow. 400×; *Ryc. 22* — alfa-G DH. Pow. 400×; *Ryc. 23* — fosforylaza a+b. Pow. 400×; *Ryc. 24*. ATP-aza. Pow. 100×.

Fig. 21, 22, 23, 24. Atrophia spinalis. The dehydrogenases activities are poorly differentiated in three metabolic types of intrafusal fibres. The phosphorylase activity is well-differentiated. Narrow intrafusal fibres (atrophied) deprived of phosphorylase activity (*Fig. 23*). Unchanged muscle spindle in an area of typical neurogenic atrophy (*Fig. 24*). *Fig. 21* — LDH. ×400; *Fig. 22* — alpha-G DH. ×400; *Fig. 23* — phosphorylase a+b. ×400; *Fig. 24* — ATP'ase. ×100.









TADEUSZ MAJDECKI, ANDRZEJ REŃSKI

ZASTOSOWANIE SPECJALNEJ TECHNIKI FOTOGRAFICZNEJ PRZY INTERPRETACJI ULTRASTRUKTURY MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO *

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

Dążenie do uzyskania optymalnych efektów w badaniach materiału biologicznego, przy użyciu mikroskopii elektronowej, koncentruje się na ulepszeniach aparatury i modyfikacjach w opracowywaniu pobranego materiału. Po uzyskaniu obrazu na kliszy niezmiennie stosuje się ogólnie przyjętą standardową obróbkę negatywu, której wynikiem końcowym jest odpowiednio powiększone zdjęcie fotograficzne. Proponowana w niniejszej pracy metoda stanowi próbę wykorzystania zmodyfikowanej techniki fotograficznej w stosunku do uzyskanego negatywu, przy interpretacji obrazu ultrastruktury. Stwarza ona możliwość pełniejszej i bardziej wnikliwej interpretacji zdjęć mikroskopowo-elektronowych materiału biologicznego.

W przeprowadzonych próbach posłużono się specjalnymi technikami fotograficznymi, polegającymi na opracowaniu na papierach światłoczułych pozytywów, zmieniających charakter obrazu osiąganego przy zwykłym systemie prowadzenia procesu pozytywowego (Sommer 1956). Dzięki metodom takim jak „solaryzacja”, „relief” i „anaglif” (Cyprian 1970) można między innymi otrzymać specjalne efekty zmieniające charakter obrazu. Omawiane techniki stosuje się w fotografice przede wszystkim w celu uplastycznienia szczegółów w światłach i cieniach obrazu, kosztem partii półtonowych.

W zastosowanej technice fotograficznej przyjęto następujący schemat postępowania: 1) otrzymywanie z oryginalnego negatywu diapozytywów „cieni”, 2) otrzymywanie z oryginalnego negatywu diapozytywów „światel”, 3) sporządzanie z diapozytywów „światel” negatywów „światel”, 4) sporządzanie z diapozytywów „cieni” negatywów „cieni”, 5) otrzymywanie ostatecznego obrazu przez rzutowanie na papier światłoczuły nałożonych dwóch negatywów „cieni” i „światel”, przesuniętych w sto-

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

sunku do siebie w taki sposób, aby można było uzyskać efekt stereoskopowy.

W próbach zastosowania opisanej techniki fotograficznej posłużono się negatywami zdjęć pochodzących z różnorodnego materiału biologicznego. Najlepsze efekty uzyskiwano ze zdjęć wykonywanych przy stosunkowo dużych powiększeniach (pierwotne powiększenie obrazu na kliszy 10.000—15.000 \times) elementów bogatych w struktury błoniaste. Wykorzystano klisze negatywowe zdjęć mikroskopowo-elektronowych wykonanych w mikroskopie JEM-7A z obrazem tkanki mózgu, pochodzącej od pacjenta z neurolipidozą (materiał biopsyjny). Na tych kliszach były utrwalone typowe dla pewnych postaci lipidów ciała wtrętowe, występujące w cytoplazmie neurocytów, składające się głównie z nagromadzonych struktur błoniastych.

Porównawcze zestawienie fotogramów wykonanych metodą tradycyjną i z zastosowaniem wyżej opisanej techniki fotograficznej przedstawiono na ryc. 1, 2, 3, 4. Na przedstawionych rycinach obraz ultrastruktury tkanki zyskał cechy obrazu trójwymiarowego, plastycznego.

Opisana metoda ze względu na jej pracochłonność i czasochłonność nie znajduje zastosowania w pracy rutynowej. Jednak dodatkowe porównanie zdjęć wykonanych techniką tradycyjną ze zdjęciami wykonanymi opisaną techniką fotograficzną jest przydatne w przypadkach, w których zachodzi konieczność wnikliwej analizy cech ultrastruktury, ważnych diagnostycznie fragmentów materiału biologicznego. Zastosowana metoda poszerza możliwości interpretacyjne obrazu dzięki „uplastycznieniu”, mogących ująć uwagę, niektórych drobnych elementów zdjęcia mikroskopowo-elektronowego. Stwarza ona poza tym możliwość odmiennego spojrzenia na badany materiał, który bez utraty ostrości nabiera cech trójwymiarowości.

T. Майдеcki, А. Ренски

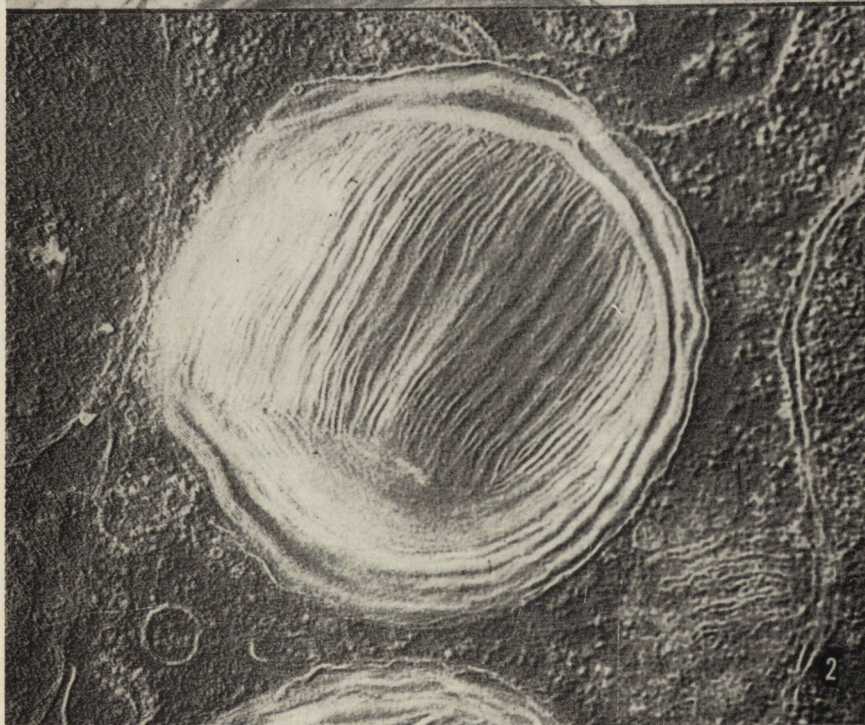
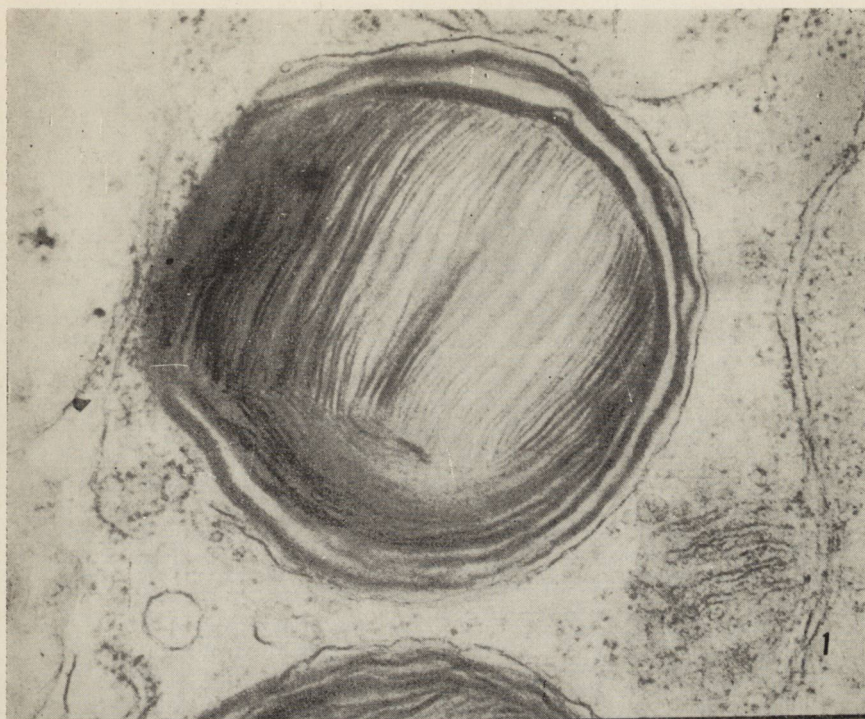
ПРИМЕНЕНИЕ СПЕЦИАЛЬНОЙ ФОТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

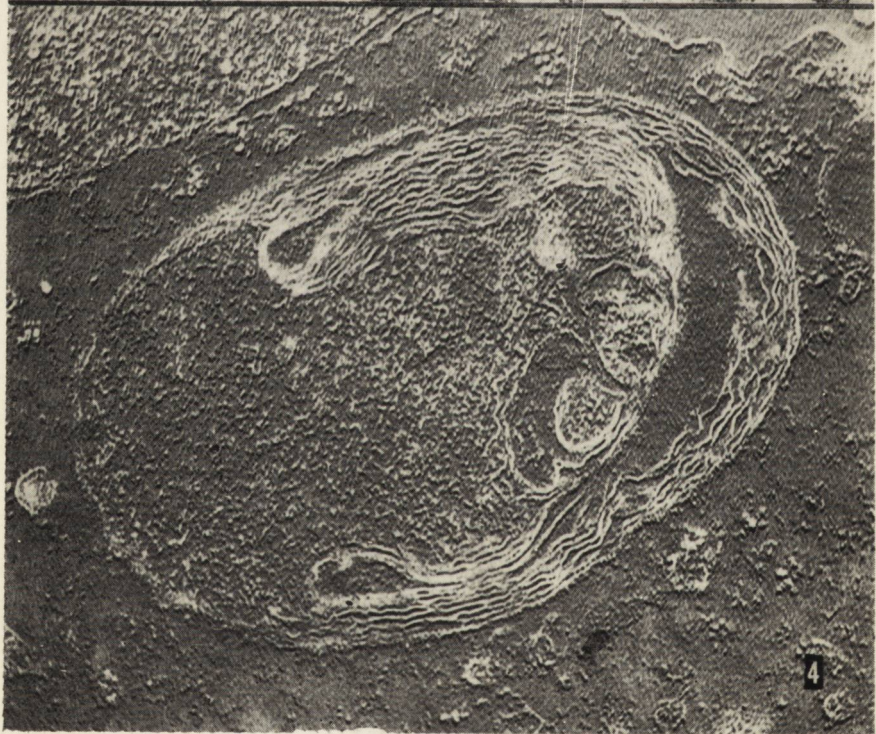
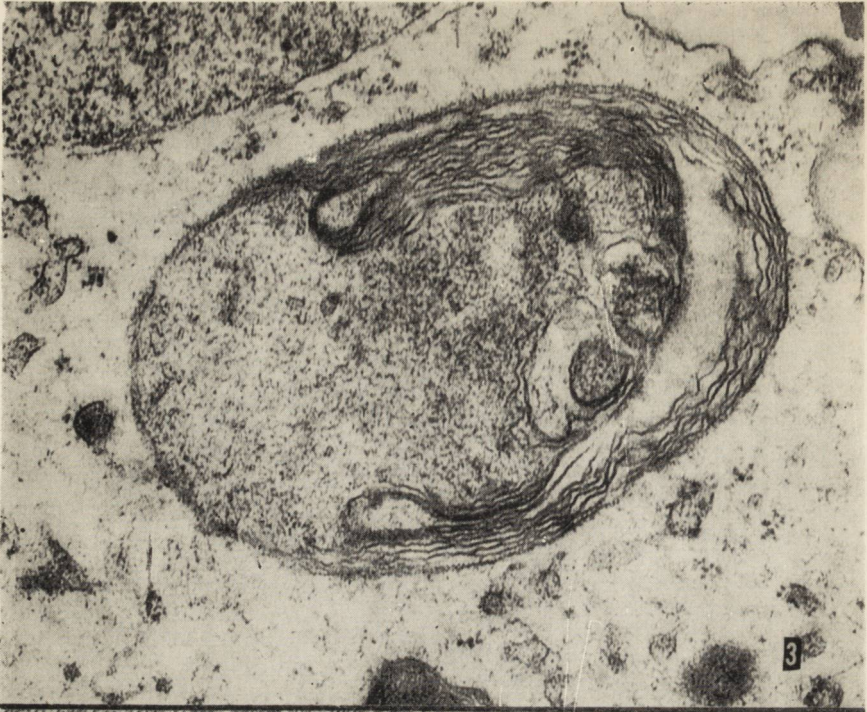
Резюме

В статье представлена возможность применения тоноразделительной фотографической техники для получения более полной и более вдумчивой интерпретации электронно-микроскопных снимков биологического материала.

Получена рельефная картина с чертами трехмерности, дающая возможность наблюдать мелкие элементы, которые в нормальных условиях могут уйти вниманию.

Предлагаемый метод является пробой использования для интерпретации ультраструктурной картины фотографической техники по отношению к негативу.





T. Majdecki, A. Reński

APPLICATION OF A NEW PHOTOGRAPHIC TECHNIQUE
FOR INTERPRETING THE ULTRASTRUCTURE OF BIOLOGICAL MATERIAL

Summary

The authors present the possibility of application of a tone-differentiating photographic technique for obtaining a more complete and discriminating interpretation of electron-microscopic pictures of the biological material.

A plastic picture of three-dimensional features was obtained, enabling observation of fine elements, which under routine conditions might escape detection.

The present method forms an attempt to utilize a photographic technique relative to the negative, for the interpretation of ultrastructural pictures.

PIŚMIENNICTWO

1. Cyprian T.: *Fotografia*. Wyd. Nauk. Tech. Warszawa 1970.
2. Sommer S.: *Vademecum fotografa*. Film. Agencja Wyd. Warszawa 1956.

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

PODPISY POD RYCINY

LEGENDS FOR FIGURES

Ryc. 1. Błoniaste ciało cytoplazmatyczne (MCB) w przypadku neurolipidozy. Zdjęcie wykonane metodą standardową. Pow. 45.300×.

Fig. 1. Membraneous cytoplasmic body (MCB) in case of neurolipidosis. Picture made with a standard method. ×45.300.

Ryc. 2. Zdjęcie, jak na rycinie 1 wykonane opisaną w tekście specjalną techniką fotograficzną. Pow. 45.300×.

Fig. 2. Picture as in Figure 1 made with special photographic technique described in text. ×45.300.

Ryc. 3. Wtręt cytoplazmy neurocytu zawierający materiał błoniasty w przypadku neurolipidozy. Zdjęcie wykonane metodą standardową. Pow. 45.300×.

Fig. 3. Inclusion body of neurocyte cytoplasm containing membraneous material in case of neurolipidosis. Picture made with a standard method. ×45.300.

Ryc. 4. Zdjęcie jak na rycinie 3 wykonane opisaną w tekście specjalną techniką fotograficzną. Pow. 45.300×.

Fig. 4. Picture as in Figure 3 made with the special photographic technique described in text. ×45,300.

SPIS TREŚCI

G. I. Mchedlishvili: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres	249
L. Dydyk: Krwawienia narządowe a niedomoga ośrodkowego układu nerwowego	263 ✓
J. Korthals, M. J. Mossakowski, M. Smialek: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej	279
G. Szumańska: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla	301
J. Korthals, B. Hoppe, H. Karwacka: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro	315
M. Wender, M. Kozik, A. Piechowski: Effect of chronic triethyl tin intoxication on the morphological and histoenzymic pattern of rat brain	323
M. Wender, A. Piechowski, A. Wajgt: Cerebral proteins in experimental allergic encephalomyelitis	331
M. Ostenda, H. Strugalska: Histochemiczne zmiany we wrzecionach mięśniowych w przypadkach chorób mięśni	341 ✓
T. Majdecki, A. Reński: Zastosowanie specjalnej techniki fotograficznej przy interpretacji ultrastruktury materiału biologicznego	353

СОДЕРЖАНИЕ

Г. И. Мчедлишвили: Экспериментальная модель контролируемой циркулярной гипоксии (ишемии) в полушариях головного мозга	249
Л. Дыдык: Кровотечения органов и недостаточность центральной нервной системы	263
Я. Кортхалс, М. Я. Моссаковски, М. Смялек: Гистологическая и электронно-микроскопная картина экспериментальной оксиглеродной энцефалопатии у крыс	279
Г. Шуманска: Гистохимическая картина мозга крысы в экспериментальной острой оксиглеродной интоксикации	301
Я. Кортхалс, Б. Хоппе, В. Карвацка: Электронно-микроскопные исследования токсического действия окиси углерода (СО) на глиальную ткань in vitro	315
М. Вендер, М. Козик, А. Пеховски: Влияние затяжного отравления триэтилологом на морфологическую и гистохимическую картину мозга крыс	323
М. Вендер, А. Пеховски, А. Вайгт: Белки в мозге при экспериментальном аллергическом воспалении головного и спинного мозга (ЕАЕ)	331
М. Остенда, Х. Стругальска: Гистохимические изменения в мышечных веретенах при болезнях мышц	341
Т. Майдеки, А. Ренски: Применение специальной фотографической техники при интерпретации ультраструктуры биологического материала	353

CONTENTS

G. I. Mchedlishvili: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres	249
L. Dydyk: Organ hemorrhages and dysfunction of the central nervous system	263
J. Korthals, M. J. Mossakowski, M. Smialek: Histological and electron microscopic picture of experimental carbon monoxide encephalopathy . .	279
G. Szumańska: Histochemical picture of rat brain in experimental acute carbon monoxide intoxication	301
J. Korthals, B. Hoppe, H. Karwacka: Electron microscopic studies on the toxic effect of carbon monoxide on the glial tissue cultured in vitro . . .	315
M. Wender, M. Kozik, A. Piechowski: Effect of chronic triethyl tin intoxication on the morphological and histoenzymic pattern of rat brain. .	323
M. Wender, A. Piechowski, A. Wajgt: Cerebral proteins in experimental allergic encephalomyelitis	331
M. Ostenda, H. Strugalska: Histochemical changes in muscle spindles in muscle diseases	341
T. Majdecki, A. Reński: Application of a new photographic technique for interpreting the ultrastructure of biological material	353

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:	
rocznie	— zł 100.—
półrocznie	— zł 50.—

Institucje państwowe i społeczne, zakłady pracy, szkoły itp. mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach Przedsiębiorstw Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch”, w terminie do 25 listopada na rok następny.

Prenumeratory indywidualni w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty mogą opłacać prenumeratę w urzędach pocztowych i u listonoszy, lub dokonywać wpłat na konto PKO Nr 1-6-100020 — Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch”, Warszawa, ul. Towarowa 28.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

Sprzedaż egzemplarzy numerów zdezaktualizowanych, na uprzednie pisemne zamówienia, prowadzi Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch” Warszawa, ul. Towarowa 28.

*

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.

Indeks 36910

Zakł. Graf. „Tamka”. Z. 2. Zam. 220. Pap. ilustr. kl. III. 80 g. B1.
Nakład 452+23 egz. Ark. druk. 6,75+1,75. R-29.