

c 165  
D-13  
egz. do wględu we wniyściu  
~~nie do wglp~~ egz 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

egz. 2  
P. 19-

# NEUROPATOLOGIA POLSKA

He

TOM XII

1974

ZESZ. 3

---

WARSZAWA

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XII

Lipiec – Wrzesień 1974

Nr 3

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY WSPÓŁPRACY

*Ludo van Bogaert* (Antwerpia), *Werner Jänisch* (Erfurt), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs), *William H. McMenemey* (Londyn), *Jochen Quandt* (Bernburg-Saale), *Franz Seitelberger* (Wiedeń), *Istvan Tariska* (Budapeszt).

## REDAKCJA ŚCISŁA

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

## REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmina 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



BARBARA GAJKOWSKA

## ZMIANY MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE JĄDRA NADWZROKOWEGO I JĄDRA PRZYKOMOROWEGO PODWZGÓRZA MÓZGU SZCZURA W NIEDOCZYNNOŚCI NADNERCZY

Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk  
Kierownik: doc. dr Jerzy Borowicz

Lokalizacja ośrodków neurosekrecyjnych odpowiedzialnych za wytwarzanie hormonów podwzgórzowych o działaniu hipofizotropowym nie została dotąd dokładnie ustalona. Obserwacje wielu autorów wykazały, że po wykonaniu adrenalectomii dochodzi w neurocytach jąder podwzgórza do wyraźnie zaznaczonych zmian w ich stanie morfologiczno-czynnościowym (Kivalo, Rinne 1960; Kozik, Walczak 1959; Miętkiewski, Miśkowiak 1970; Murukami i wsp. 1970; Powlikowski 1966, 1967). Zmiany te związane są z pobudzeniem układu CRF-ACTH (Pawlikowski 1967). Wyniki dotychczasowych badań nad podwzgórzową lokalizacją ośrodka odpowiedzialnego za wydzielanie CRF są nadal dyskusyjne. Przypuszcza się, że decydują tu neurony środkowej części podwzgórza (Martini 1967; Szentagothai 1968, Traczyk 1966), a może również jądro nadwzrokowe i przykomorowe jak sugerują Arko i wsp. (1963), Kolaszyński i Pawlikowski (1968), Pawlikowski (1965, 1967).

Powyższe dane skłoniły mnie do podjęcia badań ultrastruktury neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego u zwierząt z niedoczynnością nadnerczy. Celem pracy było również badanie aspektów morfologicznych wytwarzania ziarnistości neurosekrecyjnych i ocena udziału w tej produkcji poszczególnych organelli perikarionu. Próbowano też określić, które z dwu badanych jąder podwzgórza odgrywa większą rolę w regulacji wydzielania ACTH przez przysadkę.

### MATERIAŁ I METODA

Doświadczenie wykonano w miesiącach zimowych (styczeń, luty) na 50 szczurach szczepu Wistar z hodowli losowej, samcach 2-miesięcznych o średniej wadze 200 g. Zwierzęta podzielono na III grupy doświadczalne:

*Grupa I:* zwierzęta po obustronnej adrenalectomii w liczbie: — 10 do badań w mikroskopie świetlnym, — 20 do badań w mikroskopie elektronowym. Obustronna adrenalectomia była wykonana w godzinach rannych (10—11) w narkozie eterowej z cięć przykręgosłupowych. Zwierzęta były badane: 6, 12, 24, 48 godzin oraz 3, 5 i 6 dni po zabiegu.

Badań nie kontynuowano powyżej 6-ciu dni, ponieważ z doświadczeń naszej pracowni wynika, że w 2 tygodnie po adrenalectomii u szczurów ulegają rozrostowi zawiązki kory nadnerczy rozmieszczone pozanadnerczowo w tkance tłuszczowej okołonerkowej i poziom sterydów we krwi powraca do normy. Jest to powszechnie znane zjawisko, typowe dla szczurów.

*Grupa II.* Kontrola 1: 5 zwierząt zdrowych przeznaczono do badań w mikroskopie świetlnym i 5 do badań w mikroskopie elektronowym.

*Grupa III.* Kontrola 2: 10 zwierząt poddano operacji pozorowanej bez usuwania nadnerczy: 5 do mikroskopu świetlnego i 5 do badań w mikroskopie elektronowym. U tych zwierząt w znieczuleniu eterowym wykonano cięcia przykręgosłupowe skóry, tkanki podskórnej oraz mięśni. Badano je po: 6, 24, 48 godzinach oraz 6 dniach po zabiegu. Wszystkie zwierzęta były poddane dekapitacji. Zwierzęta kontrolne grupy III dekapitowano razem z doświadczalnymi.

Materiał do badań morfologicznych w mikroskopie świetlnym: Mózg utrwalano w 10% formalinie, po odwodnieniu i zatopieniu w parafinie preparaty z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego barwiono hematoksyliną — eozyną i fuksyną aldehydową.

Materiał do badań w mikroskopie elektronowym. Po bardzo szybkim wyjęciu mózgu pobierano w kropli utrwalacza wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego. Wycinki te utrwalano w 5% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym o pH 7,4 przez 1 godzinę, a następnie w 1% OsO<sub>4</sub> w buforze fosforanowym o pH 7,4 przez 1 godzinę. Odwadniano w alkoholach i tlenku propylenu oraz zatapiano w Eponie 812 (A : B = 3 : 5). Ultracienkie skrawki krojono na ultramikrotomie f-my Reichert OmU2 a następnie kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu w temperaturze 37°C przez 45 minut oraz w odczynniku Reynoldsa (cytrynian ołowiu) wg metody Reynoldsa (1963) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Preparaty oglądane były w mikroskopie elektronowym JEM 7A i fotografowane na kliszach ORWO, EU-2.

## WYNIKI

### *Badania w mikroskopie świetlnym*

W preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną można wyróżnić dwa rodzaje komórek tzw. „jasne” i „ciemne” zarówno w jądrze nad-

wzrokowym jak i przykomorowym. We wszystkich grupach doświadczalnych nie stwierdzono zmian w porównaniu z kontrolą.

W preparatach barwionych aldehydową fuksyną wg Gomoriego zarówno w neuronach jądra nadwzrokowego jak i w neuronach jądra przykomorowego stwierdzono nieznaczny wzrost ilości ziarnistości neurosekrecyjnych w 12 i 24 godz. po wykonaniu zabiegu

### *Badania w mikroskopie elektronowym*

Wśród neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego spotykano nieliczne neurony odpowiadające obserwowanym w mikroskopie świetlnym komórkom „ciemnym”. Ponieważ ich obraz ultrastrukturalny nie zmieniał się zarówno u zwierząt kontrolnych jak i doświadczalnych, w dalszej części opisu ograniczono się jedynie do opisu komórek „jasnych”.

#### Kontrola 1 (zwierzęta zdrowe)

##### Jądro nadwzrokowe

Komórki jądra nadwzrokowego ułożone są blisko siebie w grupach po kilka. Oddziela je przestrzeń około 100—200 Å. Między grupami komórek widoczne są nieliczne wypustki gleju, kapilary i duża ilość włókien niezmielinizowanych oraz nieliczne zmielinizowane. Spotyka się też synapsy typu akso-somatycznego i akso-dendrycznego. Kształt komórek jest owalny lub okrągły. Jądro komórki duże, jasne, owalne lub okrągłe, chromatyna jądrowa drobnoziarnista, nierównomiernie rozproszona, jąderko o dużej gęstości elektronowej, (ryc. 1). Jądro otoczone podwójną błoną z widocznymi gdzieniegdzie porami. Zewnętrzna błona pokryta jest na niewielkich odcinkach pojedynczymi ribosomami. W niektórych miejscach można prześledzić ciągłość między zewnętrzną błoną jądrową a siateczką ergastoplazmatyczną.

Siatka ergastoplazmatyczna wypełnia większą część powierzchni perikarionu i wykształcona jest w postaci długich równoległych kanałów, w niektórych neuronach rozmieszczona w obwodowych częściach perikarionu (ryc. 2). Zewnętrzne błony siatki ergastoplazmatycznej pokryte są gęsto rybosomami. Zauważa się kanały siatki ergastoplazmatycznej niekiedy wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej, lub puste lecz lekko poszerzone. W komórkach, w których siatka ergastoplazmatyczna jest mniej regularna, spotyka się w obwodowych częściach perikarionu koncentrycznie ułożone, lub pojedyncze kanały z błon gładkich, wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej opisywane jako „tubules” (Knowles 1966).

Bezpośrednio w okolicy przyjądrowej znajduje się dobrze rozwinięty aparat Golgiego (ryc. 3, 4) zbudowany z błon gładkich ułożonych w długie równoległe kanały, z pęcherzyków i wakuoli różnej wielkości. Kanały, pęcherzyki i wakuole są optycznie puste, lub niektóre są wypełnione substancją homogenną o małej gęstości elektronooptycznej. W okolicy aparatu Golgiego a więc w strefie przyjądrowej spotyka się także pojedyncze ciała wielopęcherzykowe o wielkości 0,4 do 0,8  $\mu$ , oraz w dużych ilościach twory opisywane jako „coated vesicles”. Widoczna jest także duża ilość „odsnurowujących” się z wydłużonych cystern aparatu Golgiego pęcherzyków wypełnionych substancją o małej gęstości elektronowej przypominających niedojrzały neurosekret, oraz pęcherzyków o wielkości 800—1000 Å wypełnionych substancją o dużej gęstości elektronowej, będących prawdopodobnie właściwym neurosekretem. W okolicach aparatu Golgiego znajdują się liczne ciała gęste różnej wielkości (ryc. 3, 4). Mitochondria kształtu przeważnie okrągłego lub owalnego o różnej wielkości (zwykle około 1  $\mu$ ) są rozmieszczone nierównomiernie w perikarionie komórki. Zawierają dużą ilość poprzecznie ułożonych grzebieni i gęstą elektronowo macierz. W cytoplaźmie komórek widoczne są także liczne mikrotubule o szerokości od 100 do 300 Å i długości dochodzącej często kilku mikronów (ryc. 3).

#### Jądro przykomorowe

Neurony jądra przykomorowego ułożone są blisko siebie, występują zwykle w grupach otoczone ciasno neuropilem o dużej ilości niezmielinizowanych włókien i synaps akso-somatycznych i akso-dendrytycznych.

Jądra komórkowe są owalne lub wydłużone z lekkimi inwaginacjami, chromatyna jądrowa ziarnista równomiernie rozmieszczona w całym jądrze, jedynie przy błonie jądrowej można spotkać niewielkie zagęszczenia chromatyny powtarzające się dość regularnie (ryc. 5). Jąderko jest elektronowo-gęste, i zwykle pojedyncze. Błona jądrowa typowa, dwuwarstwowa, gdzieś zewnątrzna błona jądrowa przechodzi w kanały dobrze rozwiniętej siatki ergastoplazmatycznej, obficie usianej rybosomami. Kanały siatki mogą być równoległe ułożone w obwodowych częściach perikarionu komórki lub mniej regularnie rozproszone w cytoplaźmie. Pomiędzy blisko, równoległe ułożonymi kanałami siatki ergastoplazmatycznej, czasami gromadzi się bezpostaciowa substancja o małej gęstości elektronowej. Aparat Golgiego znajdujący się w pobliżu jądra jest zbudowany z niezbyt licznych spłaszczonych kanałów i wakuoli (ryc. 5). W jego okolicy spotyka się liczne pęcherzyki zawierające substancję o małej gęstości elektronowej i typowe ziarnistości neurosekrecyjne o średnicy od 750—1400 Å, otoczone pojedynczą błoną (ryc. 5).

W cytoplaźmie rozrzucone są nieregularne krótkie i długie mikrotubule (ryc. 5). Mitochondria różnokształtne, okrągłe, owalne, wydłużone, podkowiaste z gęstą macierzą i dużą ilością grzebieni ułożonych poprzecznie. Lizosomy i ciała gęste o różnych kształtach dość liczne. Niektóre zawierają dość duże kropłowate przejaśnienia.

Kontrola 2 — zwierzęta poddane operacji pozornej — bez usuwania nadnerczy.

#### Jądro nadwzrokowe i przykomorowe

Obrazy ultrastrukturalne neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego po operacji pozornej, nie różniły się zasadniczo od obrazów ultrastrukturalnych obserwowanych u zwierząt kontrolnych, zdrowych.

#### Jądro nadwzrokowe po adrenalektomii

W 6 godzin po wykonanym zabiegu nie spostrzega się większych odchyłeń od normy. Jądra komórek duże, owalne lub z inwaginacjami posiadają jąderka o dużej gęstości elektronowej. Siatka ergastoplazmatyczna dobrze rozwinięta. Aparat Golgiego o typowej budowie posiada rozszerzone kanały, liczne wakuole i pęcherzyki różnej wielkości wypełnione bezpostaciową substancją o niedużej gęstości elektronowej. Obserwuje się coated vesicles, ciała wielopęcherzykowe, liczne mitochondria okrągłe lub owalne oraz pojedyncze mikrotubule. W cytoplaźmie są także widoczne dość duże ciała gęste o różnej gęstości elektronowej (ryc. 6).

W 12 godzin po wykonanym zabiegu obrazy są podobne do opisanych w grupie po 6 godzinach od wykonania adrenalektomii.

W 24 godziny po wykonanym zabiegu stwierdza się jądra z głębokimi inwaginacjami o nierównomiernie zagęszczonej chromatynie tworzącej często skupienia przy błonie jądrowej. We wszystkich prawie komórkach są dobrze widoczne jedno lub dwa jąderka o dużej gęstości elektronowej. Aparat Golgiego dość dobrze rozwinięty. W jego okolicy można zauważyć pęcherzyki przypominające niedojrzałe ziarnistości neurosekrecyjne wypełnione substancją bezpostaciową o małej gęstości elektronowej. Zwraca jedynie uwagę zwiększona ilość tzw. ciałek gęstych i pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne (ryc. 7).

Dwa dni po wykonanym zabiegu jądro komórkowe wydaje się powiększone wypełniając dużą część perikarionu komórki. Pozostałe elementy komórkowe nie wykazują większych zmian w porównaniu z opisanymi w grupie poprzedniej.

Trzy dni po wykonanym zabiegu w komórkach jądra nadwzrokowego nie obserwuje się wyraźnych odchyień od normy. W niewielu komórkach spotkano dość duże (około  $3 \mu$ ), kuliste nieobłonione skupiska ziarnistości zwane ciałami jąderko-podobnymi (ryc. 8).

Pięć dni po wykonaniu adrenalektomii neurony jądra nadwzrokowego przypominają obrazy neuronów zwierząt kontrolnych. Tylko w nielicznych neuronach spostrzega się w błonach gładkich niewielkie nagromadzenie bezpostaciowej substancji w kanałach (ryc. 9).

Sześć dni po wykonanym zabiegu w komórkach jądra nadwzrokowego nie stwierdzono żadnych uchwytnych różnic ultrastrukturalnych w porównaniu z kontrolą.

### Jądro przykomorowe po adrenalektomii

W 6 godzin po wykonaniu zabiegu jądra komórek wykazują głębokie inwaginacje błony jądrowej. Zwracają uwagę liczne równoległe ułożone profile kanałów siatki ergastoplazmatycznej (ryc. 10). Aparat Golgiego w pobliżu jądra dość dobrze rozbudowany (ryc. 10), a w jego okolicy widoczne są pojedyncze ziarna neurosekrecyjne, ciała wielopęcherzykowe oraz ciała gęste i pojedyncze lizosomy. W tej grupie doświadczalnej stwierdzono również obecność ciała jąderko-podobnego.

W 12 godzin po wykonanym zabiegu zwraca uwagę obfita ergastoplazma, dość duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w cytoplazmie, ciała gęste, liczne mikrotubule (ryc. 11). We włóknach aksonalnych komórek jądra przykomorowego obecna jest także duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych tworzących kule Herringa (ryc. 12).

W 24 godziny po wykonaniu zabiegu spotyka się obrazy podobne do opisanych w grupie poprzedniej z tym, że stwierdza się znacznie częściej obecność ziarnistych tworów kulistych nazywanych ciałami jąderko-podobnymi pomiędzy cysternami siatki ergastoplazmatycznej (ryc. 13).

Po 2 i 3 dniach od wykonania zabiegu obserwuje się mniejszą ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w komórce w porównaniu z poprzednimi grupami doświadczalnymi. Zwiększa się jednak ilość siatki ergastoplazmatycznej (ryc. 14) a także błon gładkich wypełnionych bezpostaciową substancją o dużej gęstości elektronowej. Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych we włóknach aksonalnych jest mniejsza w porównaniu z poprzednimi grupami doświadczalnymi.

Po 5 i 6 dniach od wykonania zabiegu obrazy neuronów jądra przykomorowego przypominają obrazy kontrolne. Jednakże spotyka się także neurony, w których można zauważyć nagromadzenie bezpostaciowej substancji o dużej gęstości elektronowej, pomiędzy kanałami siatki endoplazmatycznej (ryc. 15). W niektórych włóknach aksonalnych komórek ją-



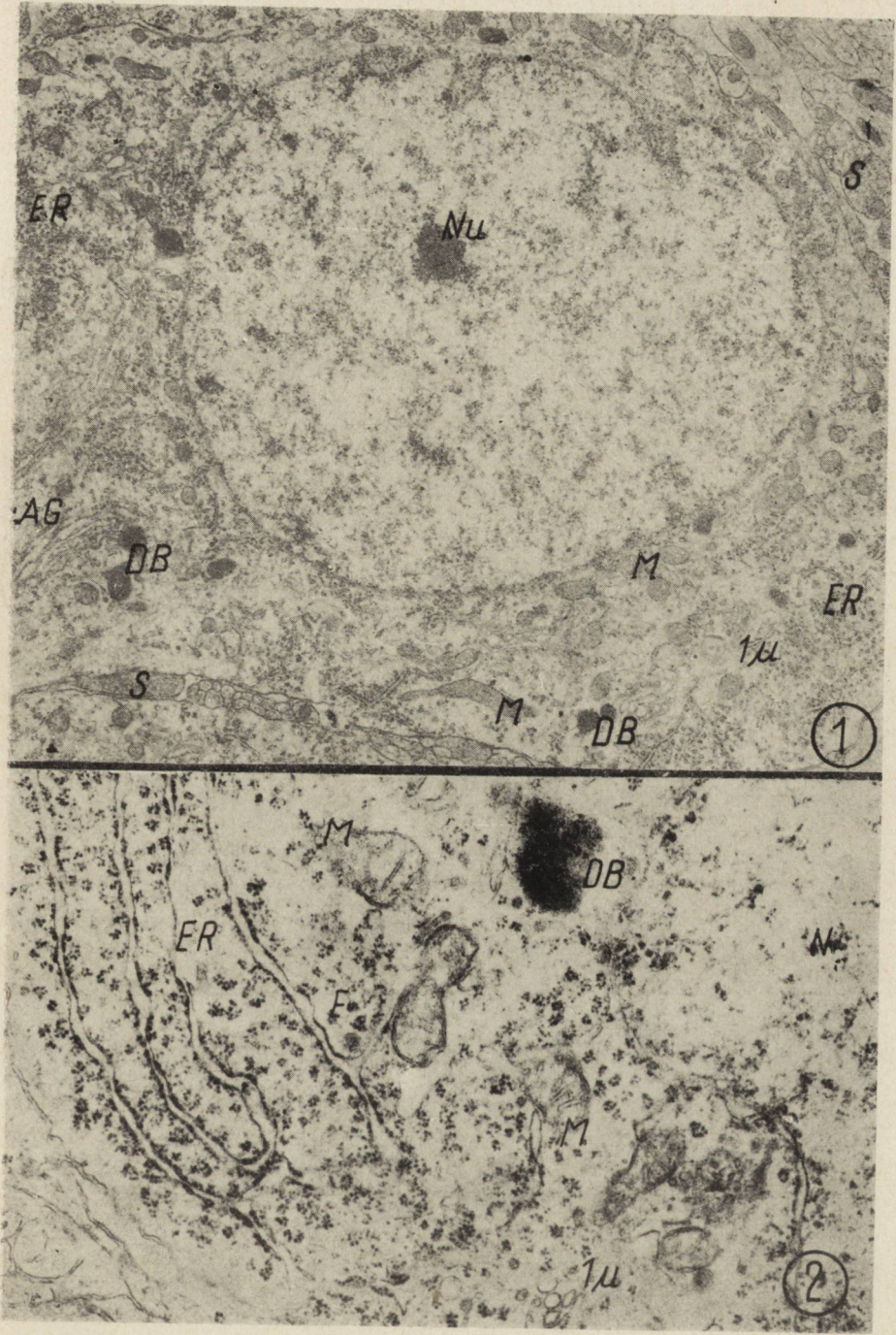
dra przykomorowego spotkać można ziarnistości neurosekrecyjne i pęcherzyki wypełnione substancją bezpostaciową o różnej gęstości elektro- nowej, wielkością odpowiadające ziarnistościom neurosekrecyjnym oraz puste pęcherzyki i twory opisywane jako „tubules” (ryc. 16).

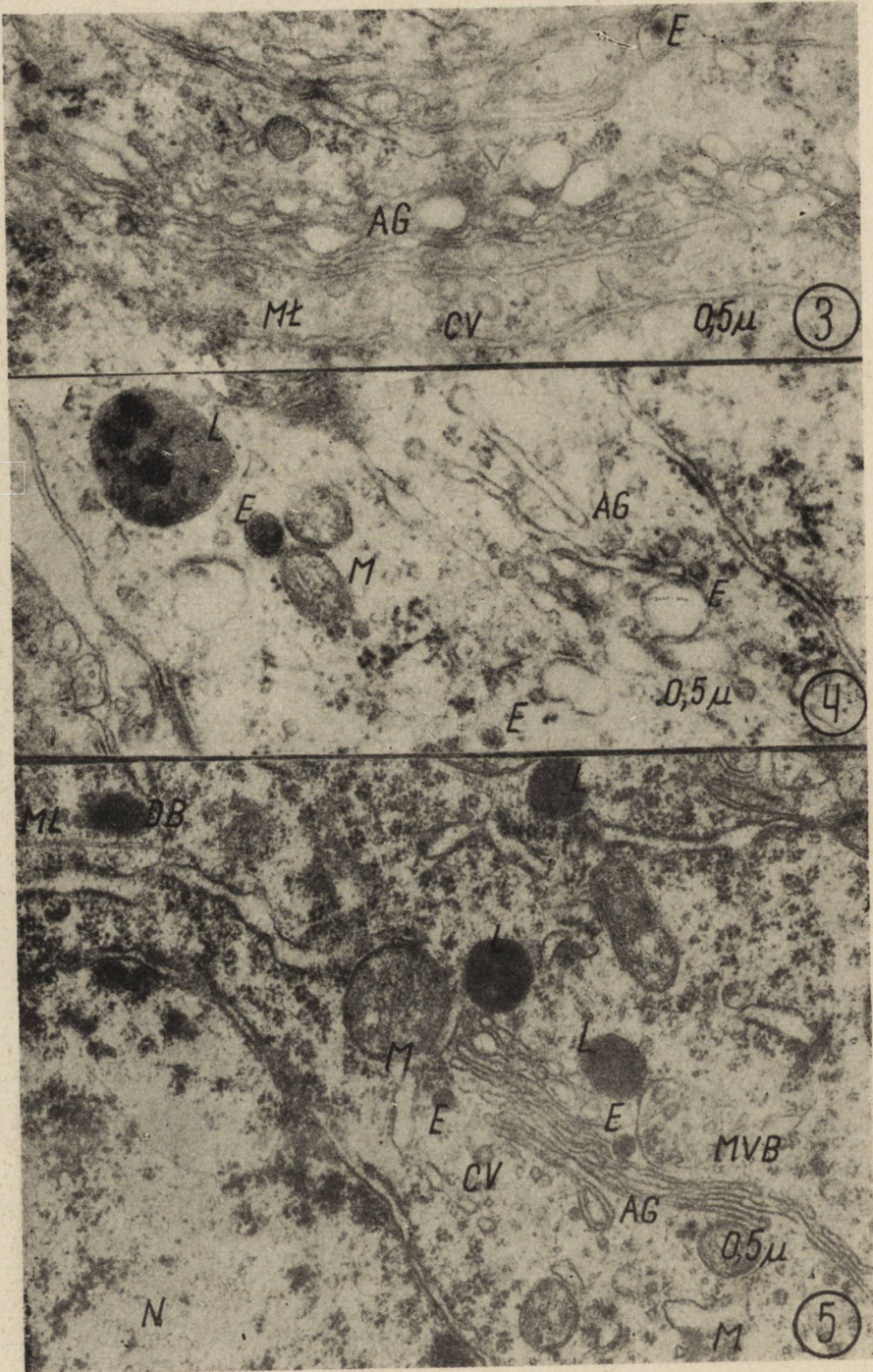
#### OMÓWIENIE

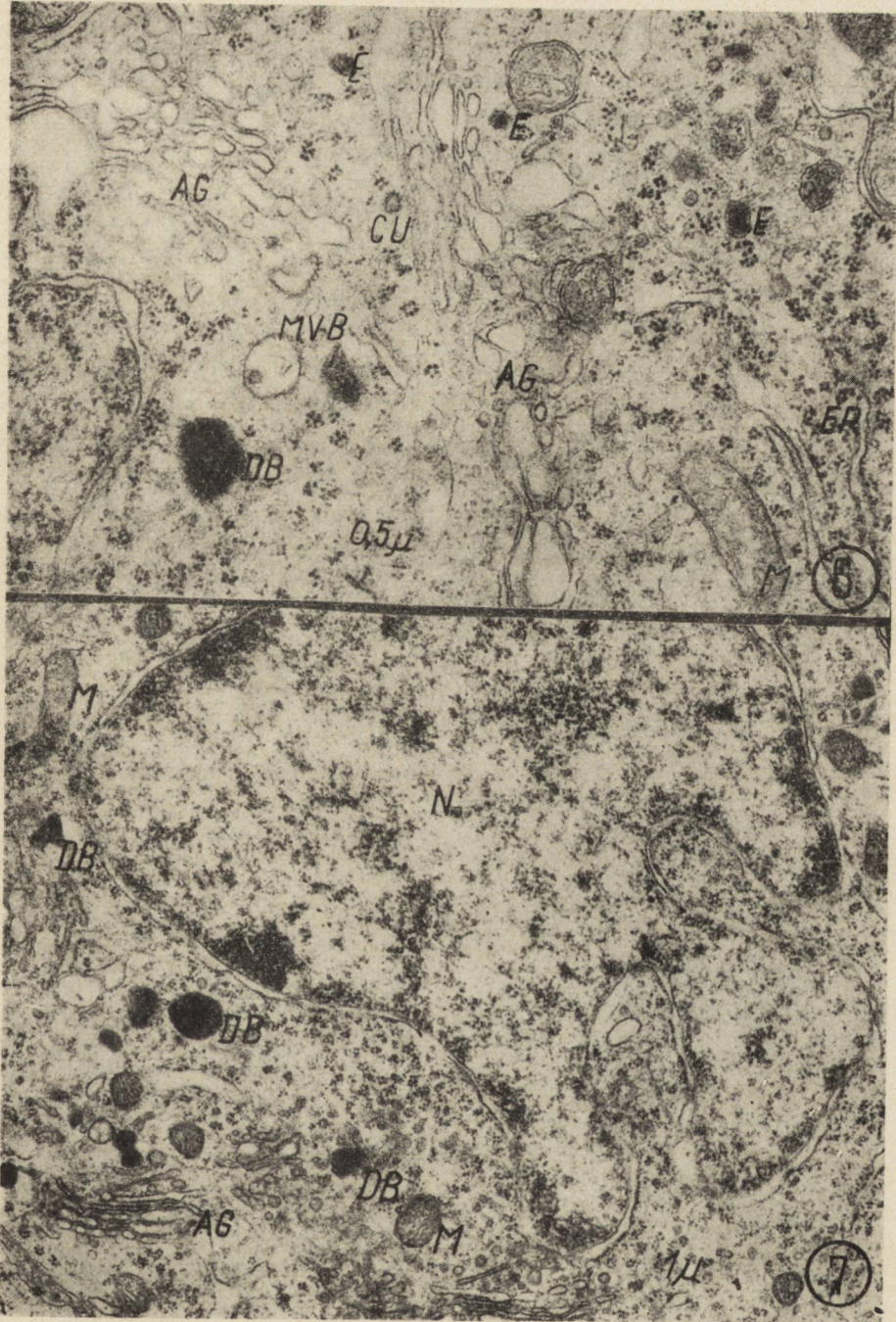
Interpretacja zmian morfologicznych spostrzeganych w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego jest trudna ze względu na to, że jądra neurosekrecyjne podwzgórza nie zawierają prawdopodobnie jednolitych pod względem czynnościowym populacji neuro- nów (Zambrano, de Robertis 1966, Streefkerk 1967, Picard 1970). Tylko pewien procent neuronów badanego jądra reaguje w danym doświadcze- niu podobnie. Pozostałe neurony mogą być niereaktywne. Należy tu brać pod uwagę opisywane przez Zambrano i de Robertisa (1966), oraz Pil- grima (1970), możliwości cyklicznego wydzielania przez neurony sekre- cyjne, podobnie jak to ma miejsce w wielu typowych gruczołach. Inter- pretacja zmian morfologicznych w ultrastrukturze jądra nadwzrokowe- go i jądra przykomorowego może dotyczyć dwu typów komórek: tzw. „jasnych” — komórek dużych o dużym okrągłym lub owalnym jądrze z równomiernie rozmieszczoną chromatyną z jednym lub dwoma jąder- kami i komórek „ciemnych” — nieco mniejszych od poprzednio opisa- nych, również z dużym jądrem o chromatynie nierównomiernie rozmie- szczonej, przeważnie z dwoma jąderkami. Z obserwacji własnych wyni- ka, że czynnymi neurosekrecyjnie są jedynie komórki „jasne”. Wyka- zują bowiem w przeciwieństwie do komórek „ciemnych” duże zmiany morfologiczne, stwierdzane także przez innych autorów (Nemetsek-Gan- sler 1965, Streefkerk 1967, Borowicz, Gajkowska 1972).

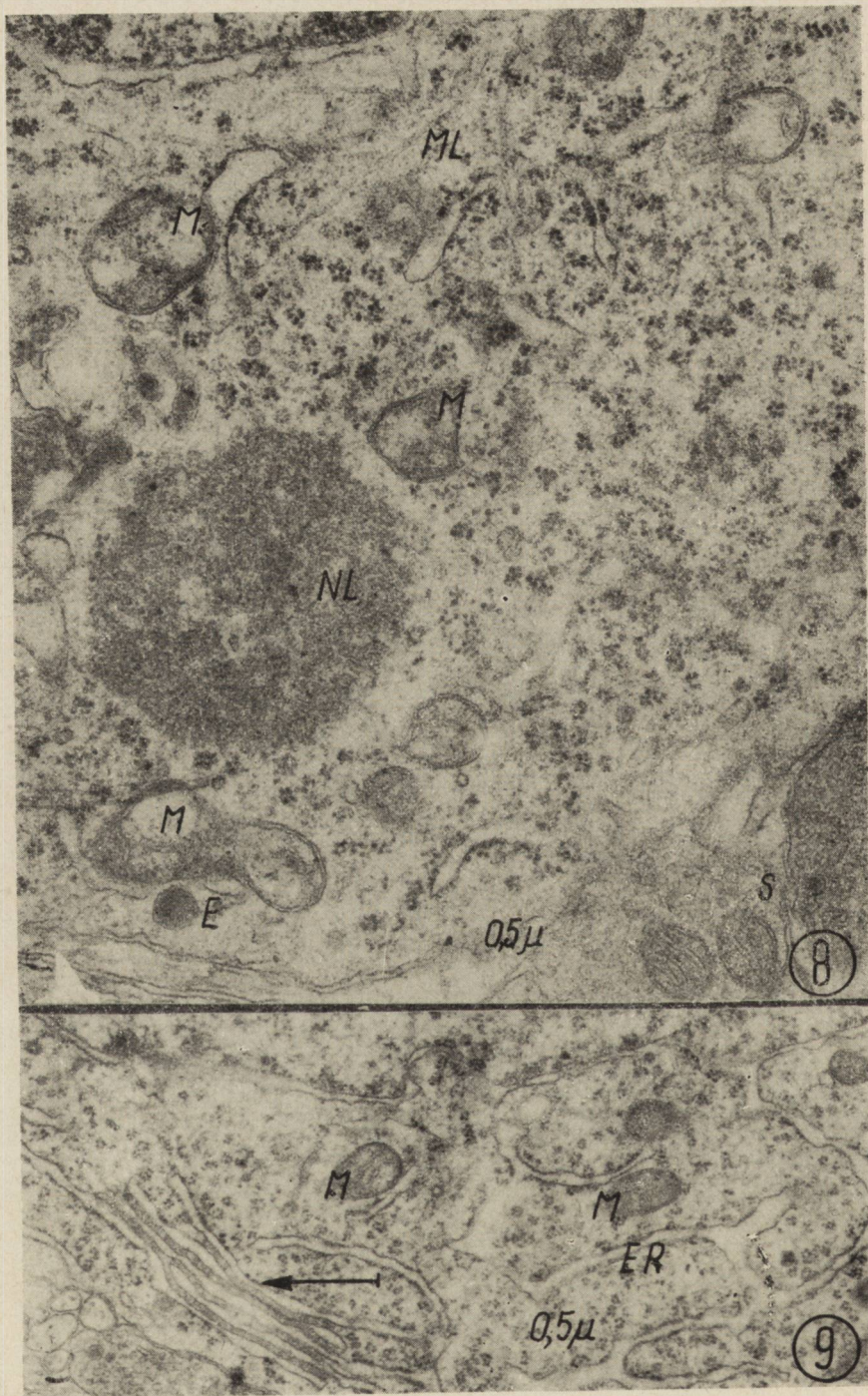
Niedoczynność nadnerczy spowodowana adrenalectomią doprowadziła do powstania tzw. sprzężenia zwrotnego długiego lub zewnętrznego. Po- legało ono na braku hamowania przez glikokortikoidy kory nadnerczy wydzielania podwzgórzowych czynników uwalniających. W konsekwen- cji nastąpić musiało zwiększone wydzielanie hormonu adrenokortikotro- powego (ACTH). Badania prowadzone przez Sipersteina (1963) Vernikos- -Danellis (1965), Akmayeva (1969) Stöhra (1969), Sipersteina i Millera (1970) wykazały, że niedoczynność nadnerczy powoduje zwiększone wy- dzielanie ACTH i jednocześnie przyczynia się do zmniejszenia liczby ziarnistości neurosekrecyjnych w układzie podwzgórzowo-przysadkowym. Jak wspomniano ziarnistości neurosekrecyjne wytwarzane w neuronach jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego mogą być nośnikiem nie tylko wazopresyny i oksytocyny, a także czynnika uwalniającego korti- kotropinę (CRF), (Pawlikowski 1967, Martini 1967, Miętkiewski i Miśko-

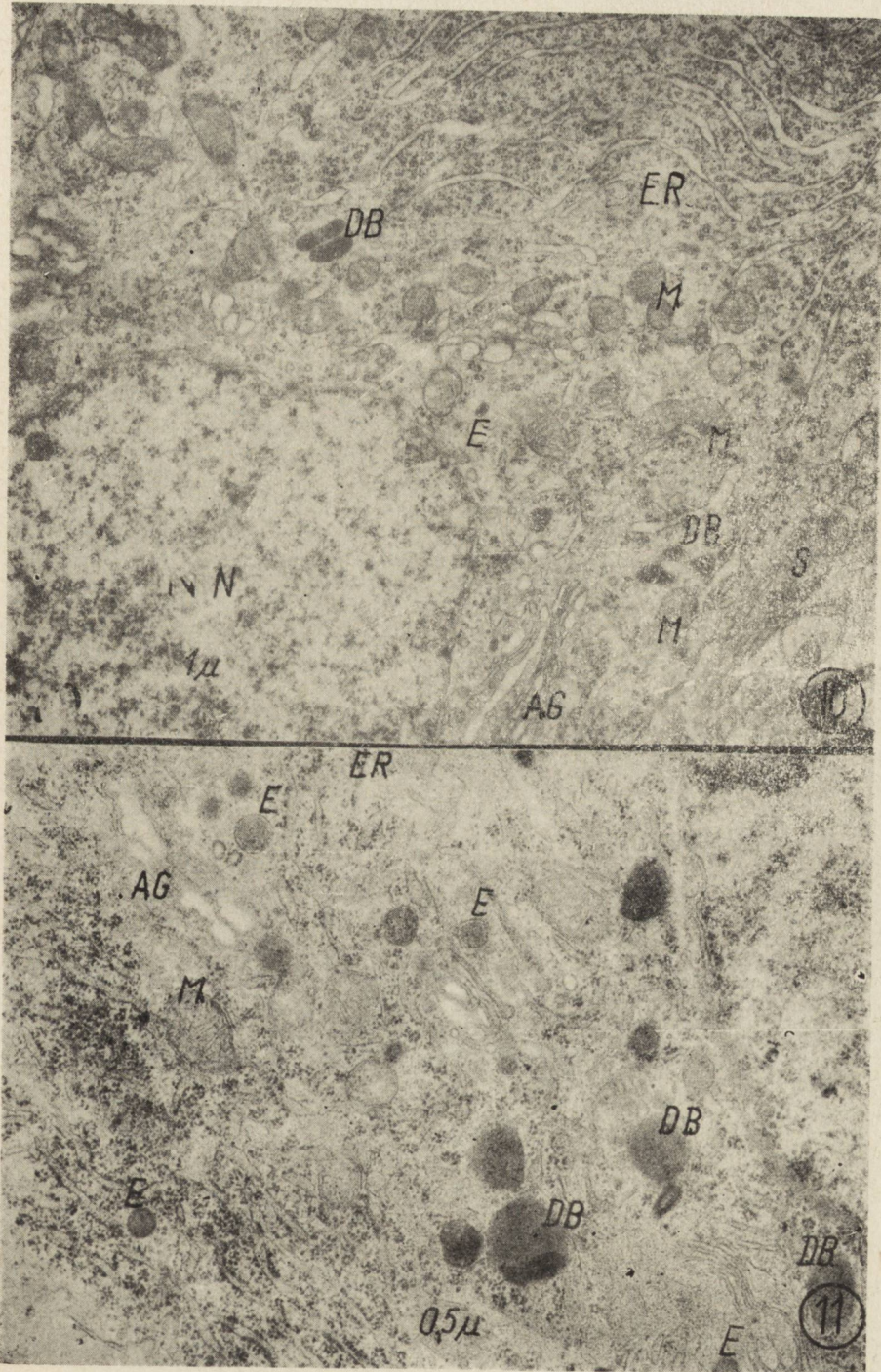
wiak 1970). Badania prowadzone przez De Vied (1961) Hodge i Yates (1966), De Vied i wsp. (1968), Hedge i Sulik (1969) wykazały, że wazopresyna odgrywa ważną rolę w regulacji przemiany wodnej ustroju, ponadto może mieć wpływ na syntezę i wydzielanie czynnika CRF, lub może wywierać działanie podobne do CRF. Pawlikowski (1965) i Stutinsky (1969) przypuszczają, że w razie dużego zapotrzebowania organizmu na ACTH układ neurosekrecyjny może przestawiać się głównie na produkcję CRF. Można by więc przypuszczać, że część ziarnistości neurosekrecyjnych w neuronach jądra przykomorowego może zawierać czynnik uwalniający kortikotropinę (CRF). Usunięcie nadnerczy spowodowało zaburzenie długiego łańcucha sprzężenia zwrotnego i w wyniku braku hamowania podwzgórza przez glikokortykoidy należało się spodziewać zwiększonej syntezy i wydzielania neurosekrety. Obrazy mikroskopowo-elektronowe, które obserwowałam głównie w neuronach jądra przykomorowego wydają się wskazywać na wzmoczoną syntezę ziarnistości neurosekrecyjnych w przypadku niedoczynności nadnerczy. Stwierdzone zmiany polegały na przeroście siatki ergastoplazmatycznej, gdzie następuje zapoczątkowanie syntezy białek (De Robertis 1968). Można było zauważyć także zwiększoną ilość ribosomów i poliribosomów. W niektórych miejscach między kanałami siatki ergastoplazmatycznej, lub w błonach gładkich gromadziła się dość duża ilość substancji bezstrukturalnej o dużej gęstości elektronowej. Obrazy aparatu Golgiego wskazywały również na jego uczynnienie. Aparat Golgiego składał się z licznych, mocno wydłużonych kanałów i dużych wakuoli. W jego okolicy znajdowały się liczne pęcherzyki opisywane przez Pilgrima (1969), jako niedojrzały neurosekrety. Pęcherzyki te utworzone z błon gładkich były wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej. Wg niektórych autorów pęcherzyki te mogą powstawać także z woreczków siatki ergastoplazmatycznej (Picard i wsp. 1972), jednakże z obserwacji własnych wynika, że pochodzą one raczej z błon gładkich aparatu Golgiego, za czym przemawiałaby ich duża ilość w obszarze aparatu Golgiego a niekiedy i bezpośredni kontakt z cysternami aparatu Golgiego. Obserwując aparat Golgiego w niedoczynności nadnerczy można stwierdzić, że zmiany morfologiczne polegają głównie na uaktywnieniu tzw. powierzchni „tworzenia” aparatu Golgiego (wg teorii GERL — Holtzman 1967), gdzie można prześledzić tworzenie się ziarnistości neurosekrecyjnych. W cysternach aparatu Golgiego następuje prawdopodobnie formowanie neurosekrety i otaczanie błonami (Sano i Knoop 1959, Palay 1960, Bern 1966, Zambrano i de Robertis 1966, Streefkerk 1967), a następnie ulega on oderwaniu tworząc ziarnistości neurosekrecyjne. Zaobserwowano również, że w miarę oddalania od perikarionu ku obwodowi komórki wzrasta rozmiar ziarnistości neurosekrecyjnych. Wzrost ten może być tłumaczony dwojako:

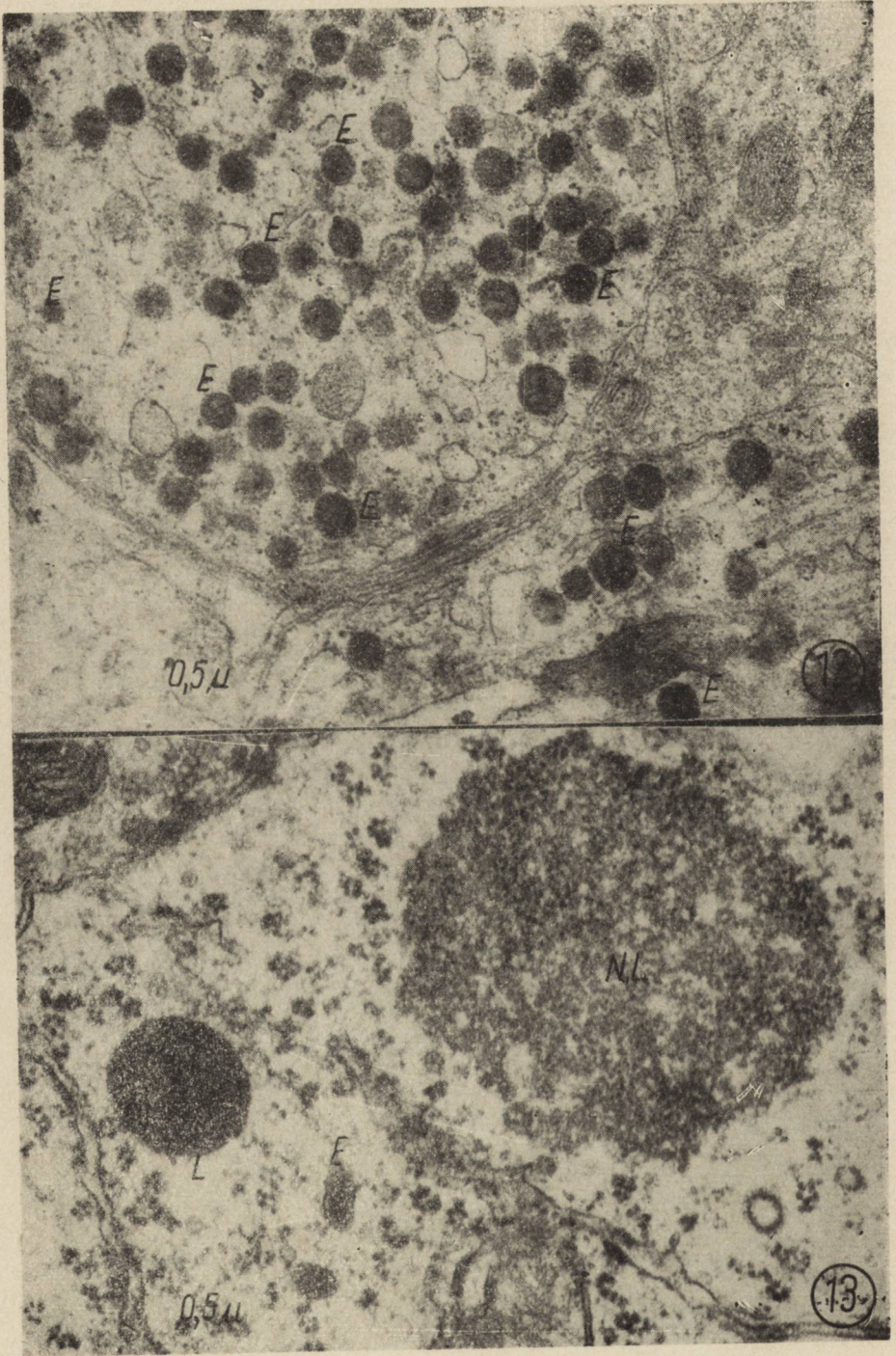




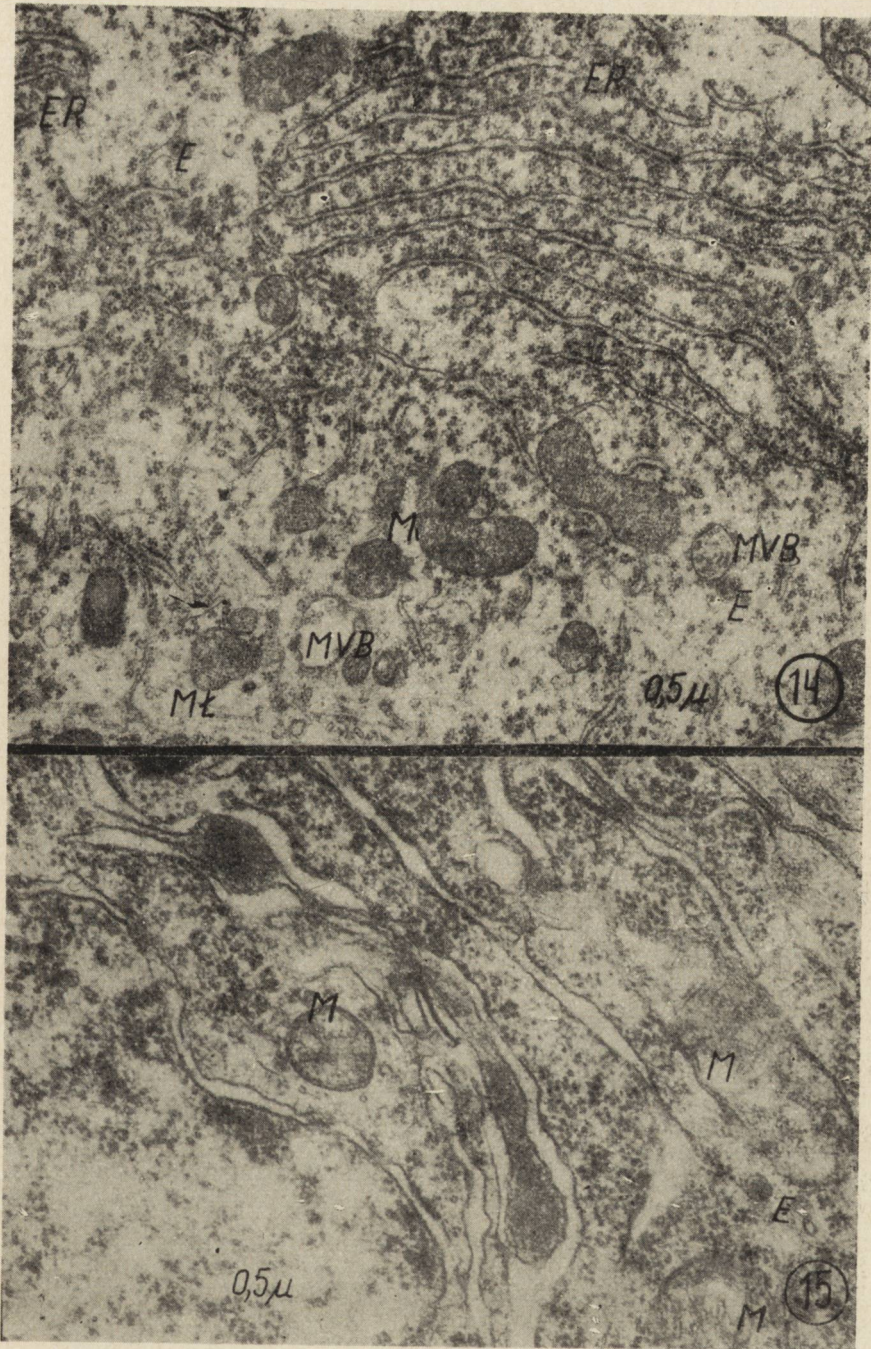


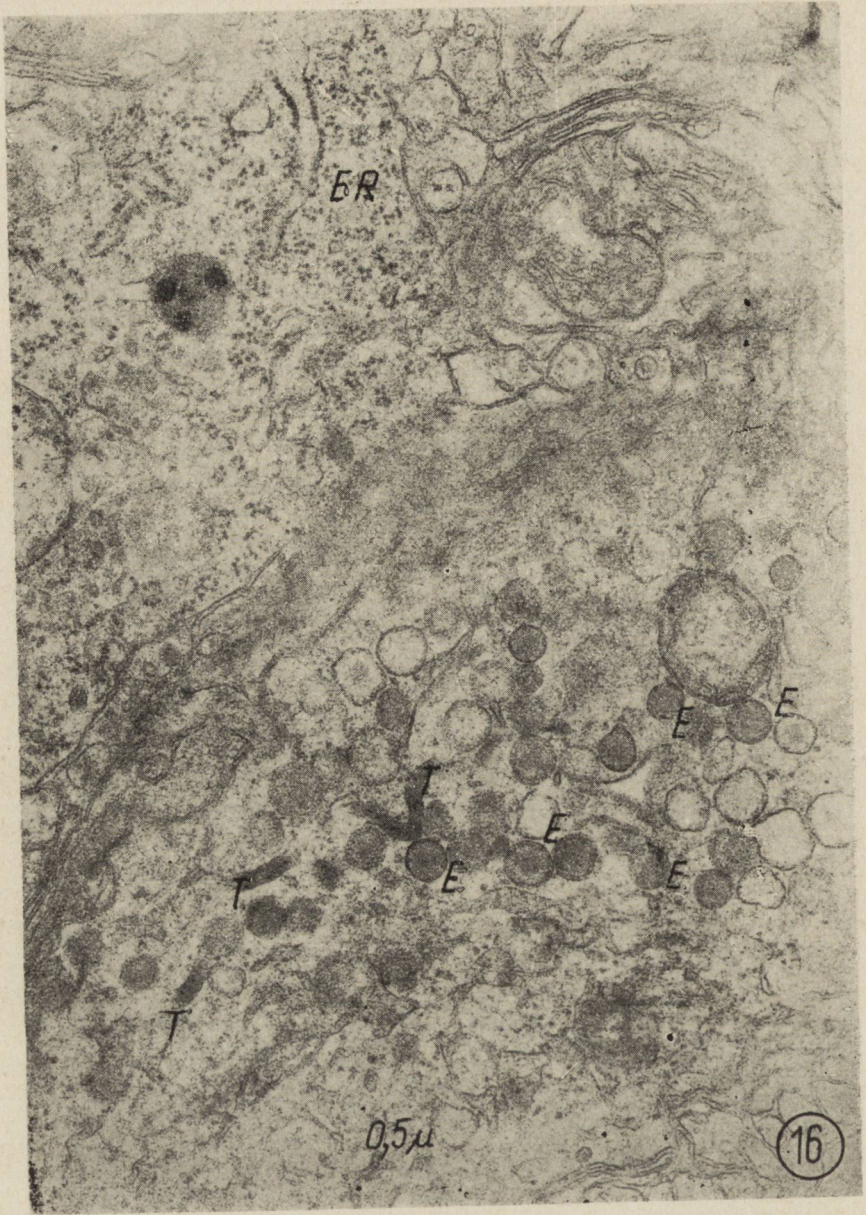












przywarstwianiem, zlewaniem się ziarnistości, lub ciągłą syntezą materiału neurosekrecyjnego w czasie przemieszczania się ku obwodowi (Zambrano, de Robertis 1968). Wg niektórych autorów ziarnistości neurosekrecyjne mogą pochodzić bezpośrednio z rozszerzonych kanałów siateczki gładkiej (Robertis 1968, Picard 1972, Norström i wsp. 1971). Zjawisko to obserwowano w wypadkach wzmożonej czynności neurosekrecyjnej. W neuronach jądra przykomorowego spotyka się w okolicy aparatu Golgiego dużą ilość coated vesicles różnej wielkości i różnej gęstości elektronowej. Niektóre z nich na podstawie wymiarów podobne są do „nieodjrzałego” neurosekretu wg Pilgrima (1969). Bodian (1966) i Bunt (1969), uważają jednakże, że są to pęcherzyki pinocytarne. Picard (1972) twierdzi, że mogą to być formy lizosomów. Liczne ciała wielopęcherzykowe, ciemne z gęstą macierzą przypominające lizosomy, oraz jasne, ograniczone pojedynczą błoną, spotykane w okolicy aparatu Golgiego, biorą prawdopodobnie udział w procesach przenoszenia i syntezy w komórce (Palay 1960, Cotte i Picard 1968). Obserwuje się także duże ilości ciałek gęstych, o różnych wymiarach, różnym kształcie i różnej gęstości elektronowej, spotykanych głównie w sąsiedztwie aparatu Golgiego. Niektóre z nich mogą zawierać jedno lub dwa przejaśnienia. Podobne struktury opisywano w komórkach jądra nadwzrokowego przy zwiększonej syntezie wazopresyny (Rehardt 1967). Jeżeli wymiary i kształt ciałek gęstych czy lizosomów odpowiadają wymiarom ziarnistości neurosekrecyjnych wówczas różnicowanie ich jest bardzo trudne, lub wręcz niemożliwe. Nie ma także możliwości morfologicznej oceny czy elektronowo-gęsty materiał zawarty w aparacie Golgiego jest przeznaczony do produkcji neurosekretu czy też lizosomu. Jedynie badania histochemiczne aktywności enzymatycznej mogłyby rozwiązać tę kwestię (Osinchak 1964, Ijima 1970).

W otoczeniu neuronów jądra przykomorowego widoczne są liczne włókna wypełnione neurosekretem przypominające ciała Herringa. Można sądzić, że jest to wynikiem wzmożonej czynności neurosekrecyjnej i szybkiego przesuwania ziarnistości neurosekrecyjnych z perikarionu, wzdłuż włókien szlaku przykomorowo-przysadkowego.

W neuronach jądra przykomorowego i nadwzrokowego obserwuje się sporadycznie ciała jąderko-podobne. Są to duże skupienia ziarnistości (około 3—5  $\mu$ ) nie posiadające błony otaczającej, luźno leżące w cytoplazmie. Opisane były po raz pierwszy przez Shimizu i Ishii w 1965 r. w podwzgórzu szczura. Enerström (1967) opisał je także w neuronach jądra nadwzrokowego sądząc, że mogą one stanowić materiał do produkcji ribosomów. Cotte i Picard (1968) przypuszczają, że jest to wydzielina jąderka. Ciała jąderko-podobne były także opisane bez interpretacji przez Krofsmeiera (1970) w jądrach nadwzrokowym i przykomorowym po podaniu antiandrogenu. Pawlikowski (1971) który znajdował je w neuro-

nach sekrecyjnych podwzgórza u szczurów adrenalektomizowanych, przypuszcza, że może to być neurosekret kwasochłonny. Ciała jąderko-podobne pojawiały się sporadycznie w neuronach jądra przykomorowego i nadwzrokowego zarówno w stanach nadczynności jak i niedoczynności nadnerczy. Nie sądzę jednak by mógł być to neurosekret kwasochłonny, ponieważ nie zauważyłam nigdy błon otaczających, nie znajdowałam go także we włóknach aksonalnych.

Na podstawie wykonanych badań można stwierdzić, że w niedoczynności nadnerczy spostrzega się wyraźniejsze zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra przykomorowego. Interpretacja zmian ultrastrukturalnych jest trudna, lecz może wskazywać na to, że przede wszystkim neurony jądra przykomorowego mogą mieć wpływ na regulację wydzielania ACTH.

#### WNIOSKI

1. Niedoczynność nadnerczy wywołuje znaczniejsze zmiany w neuronach sekrecyjnych jądra przykomorowego podczas gdy jądro nadwzrokowe wykazuje jedynie nieznaczne zmiany.
2. W niedoczynności nadnerczy obserwuje się zwiększenie syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych.
3. Zasadniczym elementem struktury cytoplazmy biorącym udział w produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych jest aparat Golgiego.
4. Przy wzmożonej produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych obserwuje się w okolicy aparatu Golgiego obecność „niedojrzałych” ziarnistości neurosekrecyjnych.
5. Obecność „niedojrzałych” ziarnistości w perikarionie oraz ziarnistości dojrzałych we włóknach aksonalnych wydaje się potwierdzać wcześniejsze sugestie o ostatecznym formowaniu ziarnistości neurosekrecyjnych w czasie ich przesuwania przez włókna szlaku podwzgórzowo-przysadkowego.
6. Substancja neurosekrecyjna produkowana w aparacie Golgiego jest otaczana (opakowywana) przez błony tego aparatu.
7. Przy zwiększonej produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych można niekiedy (aczkolwiek rzadko) obserwować bezpośrednio ich syntezę w błonach retikulum endoplazmatycznego z pominięciem aparatu Golgiego.
8. Wobec zaobserwowanego wyraźnie większego zaangażowania neuronów sekrecyjnych jądra przykomorowego w niedoczynności nadnerczy, można sądzić, że jądro przykomorowe może mieć istotny wpływ na regulację wydzielania ACTH w przysadce, a wobec tego najprawdopodobniej przynajmniej część ziarnistości neurosekrecyjnych jądra przykomorowego może być nośnikiem czynnika CRF.

Б. Гайковска

НАБЛЮДАЕМЫЕ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
В СУПРАОПТИЧЕСКОМ И ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОМ ЯДРАХ  
ПОДБУГРОВОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ  
НАДПОЧЕЧНИКОВ

## Резюме

В работе исследовались изменения в ультраструктуре супраоптического и паравентрикулярного ядер крысы при гипофункции надпочечников. Гипофункция надпочечников вызывалась двусторонней адренолечомией.

При гипофункции надпочечников отчетливо наблюдались изменения в ультраструктуре нейронов паравентрикулярного ядра. В нейронах супраоптического ядра эти изменения были выражены значительно слабее. Эти изменения указывают на усиленный синтез нейросекреторной зернистости, что проявляется в активировании так называемой поверхности „образования” аппарата Гольджи.

Усиленный синтез нейросекреторной зернистости при состоянии гипофункции надпочечников может указывать на то, что некоторые нейросекреторные зернистости могут быть также носителями кортикотропиносвобождающего фактора. Однако, обнаружение морфологического эквивалента кортикотропиносвобождающего фактора невозможно на основе лишь морфологических методов. В ультраструктуре нейронов паравентрикулярного ядра наблюдались большие изменения, чем в нейронах супраоптического ядра, что возможно указывает на то, что паравентрикулярное ядро играет более важную роль в регуляции выделения АКГГ.

B. Gajkowska

ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES IN THE SUPRAOPTIC AND  
PARAVENTRICULAR NUCLEI OF RAT BRAIN HYPOTHALAMUS IN ADRENAL  
HYPOFUNCTION

## Summary

The present work investigated the ultrastructural changes in the supraoptic and paraventricular nucleus of rat brain in adrenal hypofunction evoked by bilateral adrenalectomy.

Marked ultrastructural changes were observed in the ultrastructure of neurons of the paraventricular nucleus, the changes being less pronounced in the supraoptic nucleus. The changes pointed to the enhanced synthesis of neurosecretory granules activating the so-called „creation” surface of Golgi apparatus.

The increased synthesis of neurosecretory granules in adrenal hypofunction might indicate, that some of them might be CRF carriers. However, it is not possible to find the morphological equivalent of CRF basing exclusively on morphological methods. The higher intensity of changes found in the paraventricular nucleus suggest that the latter might play a more important role in the regulation of ACTH secretion.

## PIŚMIENNICTWO

1. Akmayev J. G.: Morphological Aspects of the Hypothalamic-Hypophysial system. I. Fibres Terminating in the Neurohypophysis mammals. Z. Zellforsch. 1969, 96, 609—624.

2. Bern H. A., R. S., Nishioka, J. R. Hagadorn: Association of elementary neurosecretory granules with the Golgi complex. *J. Ultrastructure Res.*: 1961, 5, 311—320.
3. Borowicz J., B. Gajkowska: Zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra nadwzrokowego szczura w wyniku odwodnienia organizmu. *Patol. Polska* 1972, XXIII, 2.
4. Bunt A. H.: Formation of coated and „synaptic vesicles within neurosecretory axon terminals of the Crustacean Sinus Gland. *J. Ultrastr. Research.*, 1969, 28, 411—421.
5. Cotte G. P. Picard: Etude ultrastructurale des neurones du noyau supra-optique du rat. Extrait du Bull. de L'Assoc. des Anatomistes. 53<sup>e</sup> Congrès, 1968. N<sup>o</sup> 41.
6. De Robertis E.: The effect of castration upon the ultrastructure of the rat hypothalamus. *Z. Zellforsch.* 1968, 86, 487—496.
7. Hedge G. A., A. G. Smelik: The action of Dexamethasone and vasopressin on hypothalamic CRF production and Release. *Neuroendocrinology.* 1969, 4, 242.
8. Kivalo E., V. K. Rinne: The relation between the hypothalamic neurosecretion and the corticotrophin release in experimental conditions. *Acta Endokr.* 1960, 34, 8.
9. Korfsmeier K.: Ultrastrukturelle Veränderungen in den neurosekretorischen Zentren des Hypothalamus und in der Eminentia mediana nach Behandlung mit cyproteronazetat. *Z. Zellforsch.* 1970, 110, 600—610.
10. Norstrom A., H. A. Hausson, J. Sjöstrand: Effects of colchicine on Axonal Transport and ultrastructure of the Hypothalamo-neurohypophyseal system: the Rat. *Z. Zellforsch.* 1971, 113, 271—293.
11. Nemetsek-Gansler H.: Zur Ultrastruktur der Hypophysen-Zwischenhirnsystems der Ratte. *Z. Zellforsch.* 1965, 67, 844—862.
12. Pawlikowski M.: Czynność neurosekrecyjna jąder nadwzrokowych i przykomorowych w przebiegu regeneracji nadnerczy. *End. Pol.* 1967, 18, 353—363.
13. Picard D.: La synchronisation fonctionelle des cellules neurosecretrices du noyau supraoptique du rat des hydrate etude ultrastructurale. *C. R. Acad. Sci* 1970, 271D, 847—850.
14. Picard D. M., Michel-Bechet M. A. Athonel: S. Rna-Granules Neurosecretoires, Lysosomes et Complexe GERL dans le Noyau Supra-Optique de Pol. Bipolarite des complexes Golgiens *Exp. Brain Research.* 1972, 13, 4, 331—335.
15. Pilgrim Ch.: Morphologische und funktionelle Untersuchungen zur Neurosekretbildung. Enzymhistochemische, autoradiographische, und elektronenmikroskopische Beobachtungen an Ratten unter osmotischer Belastung. *Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch.* 1969, 41, 1—79.
16. Pilgrim Ch.: Function of Lisosomes in neurosecretory Cells. — in *Aspects of Neuroendocrinol.* 1970, 349—350.
17. Rechart D.: Electron microscopic and histochemical observations on the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Acta physiol. scand.* 1960, suppl. 329, 1—19.
18. Shimizu H., S. Ishii: Electron microscopic observations on nucleolar extrusion in nerve cells of rat hypothalamus. *Z. Zellforsch.* 1965, 67, 367.
19. Siperstein E. R., K. J. Miller: Further cytophysiologic Evidence for the identity of the cells that produce Adrenocorticotrophic Hormon. *Endocrinology*, 1970, 86, 451—486.

20. Szentagothai J., Flerko B., Mess B., Halasz B.: Hypothalamic control of Anterior Pituitary, Akademiai Kiado. Eudapest, 1968.
21. Zambrano D., de Robertis E.: The ultrastructural changes in the neurohypophysis after destruction of the paraventricular nuclei in normal and castrated rats. Z. Zellforsch. 1968, 88, 496—510.

Pełne piśmiennictwo do pracy do wglądu w Redakcji i u autora.

Adres autorki: Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej. Polskiej Akademii Nauk, 00-784, Warszawa, Dworkowa 3.

### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Jądro nadwzrokowe. Kontrola. Duże jądro komórkowe o jasnej chromatynie i małym jąderku. Dobrze rozwinięty aparat Golgiego, ergastoplazma, liczne mitochondria, oraz ciała gęste. Wokół komórki liczne niezmielinizowane włókna i synapsy.

*Fig. 1.* Supraoptic nucleus. Control. Large cell nucleus with light chromatine and small nucleolus. Well developed Golgi apparatus, ergastoplasm, numerous mitochondria and dense bodies. Around the cell numerous non-myelinated fibres and synapses.

*Ryc. 2.* Jądro nadwzrokowe. Kontrola. Siatka ergastoplazmatyczna w postaci długich równoległych cystern w obwodowych częściach perikarionu.

*Fig. 2.* Supraoptic nucleus. Control. Ergastoplasmic reticulum in the form of long, parallel cysterns in peripheral parts of perikaryon.

*Ryc. 3.* Jądro nadwzrokowe. Kontrola. Typowy, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, zlokalizowany w strefie przyjądrowej. W jego okolicy liczne tzw. coated vesicles.

*Fig. 3.* Supraoptic nucleus. Control. Typical, well developed Golgi apparatus, localized in the perinuclear region. In its vicinity numerous so-called coated vesicles.

*Ryc. 4.* Jądro nadwzrokowe. Kontrola. Fragment komórki z aparatem Golgiego. „Odsznurowujący” się pęcherzyk, przypominający niedojrzałą ziarnistość neurosekrecyjną (strzałka), obecne także mitochondria i lizosom.

*Fig. 4.* Supraoptic nucleus. Control. Cell fragment with Golgi apparatus. Unlabeled vesicle resembling immature neurosecretory granules (arrow), visible mitochondria and lysosome.

*Ryc. 5.* Jądro przykomorowe. Kontrola. Fragment jądra komórkowego z zagęszczeniami chromatyny przy błonie jądrowej, oraz aparat Golgiego zbudowany z licznych wydłużonych cystern. W jego okolicy obecne pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne, „coated vesicles”, ciało wielopęcherzykowe i lizosomy. W cytoplazmie widoczne również mikrotubule.

*Fig. 5.* Paraventricular nucleus. Control. Fragment of cell nucleus with chromatine condensations at the nuclear membrane and Golgi apparatus composed of numerous elongated cysterns. In its vicinity single neurosecretory granules, „coated vesicles”, multivesicular body and lysosomes. In cytoplasm visible microtubules.

*Ryc. 6.* Jądro nadwzrokowe. 6 godz. po adrenalectomii. We fragmencie komórki widoczny aparat Golgiego, niektóre jego cysterny są poszerzone, w cytoplazmie obecne są „coated vesicles”, ciała wielcpęcherzykowe i ziarnistości neurosekrecyjne oraz ciała gęste.

*Fig. 6.* Supraoptic nucleus. 6 hrs after adrenalectomy. In the cell fragment visible Golgi apparatus, some of its cysterns elongated. In cytoplasm „coated vesicles”, multivesicular bodies, neurosecretory granules and dense bodies.

*Ryc. 7.* Jądro nadwzrokowe. 24 godz. po adrenalectomii. Jądro komórki z głębokimi inwaginacjami i zagęszczeniami chromatyny. W cytoplazmie widoczny aparat Golgiego, ciała gęste, pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne i mitochondria.

*Fig. 7.* Supraoptic nucleus. 24 hrs after adrenalectomy. Cell nucleus with deep invaginations and chromatine condensations. In cytoplasm visible Golgi apparatus, dense bodies, single neurosecretory granules and mitochondria.

*Ryc. 8.* Jądro nadwzrokowe. 3 dni po adrenalectomii. We fragmencie komórki widoczne tzw. „nucleolus-like body”, ziarnistości neurosekrecyjne, mitochondria i mikrotubule.

*Fig. 8.* Supraoptic nucleus. 3 days after adrenalectomy. In the cell fragment visible so-called nucleolus-like body, neurosecretory granules, mitochondria and microtubules.

*Ryc. 9.* Jądro nadwzrokowe. 5 dni po adrenalectomii. Substancja amorficzna w błonach siatki gładkiej (strzałka).

*Fig. 9.* Supraoptic nucleus. 5 days after adrenalectomy. Amorphic substance in smooth reticulum membranes (arrow).

*Ryc. 10.* Jądro przykomorowe. 6 godz. po adrenalectomii. Fragment jądra komórkowego, bardzo rozwinięta siatka ergastoplazmatyczna z dużą ilością poliribosomów i rybosomów, aparat Golgiego, ciała gęste, mitochondria i pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne.

*Fig. 10.* Paraventricular nucleus. 6 hrs after adrenalectomy. Fragment of cell nucleus, well developed ergastoplasmic reticulum with great number of polyribosomes and ribosomes, Golgi apparatus, dense bodies, mitochondria and single neurosecretory granules.

*Ryc. 11.* Jądro przykomorowe. 12 godz. po adrenalectomii. Dobrze rozwinięta ergastoplazma i zwiększona ilość ziarnistości neurosekrecyjnych i ciałek gęstych.

*Fig. 11.* Paraventricular nucleus. 12 hrs after adrenalectomy. Well developed ergastoplasm and increased number of neurosecretory granules and dense bodies.

*Ryc. 12.* Jądro przykomorowe. 12 godz. po adrenalectomii. We włóknach neuronów jądra przykomorowego widoczna duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych.

*Fig. 12.* Paraventricular nucleus. 12 hrs after adrenalectomy. In fibres of neurons of paraventricular nucleus visible great number of neurosecretory granules.

*Ryc. 13.* Jądro przykomorowe. 24 godz. po adrenalectomii. W cytoplazmie komórki widoczne „nucleolus-like body”, pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne i lizosom.

*Fig. 13.* Paraventricular nucleus. 24 hrs after adrenalectomy. In the cell cytoplasm visible „nucleolus-like body”, single neurosecretory granules and lysosome.

*Ryc. 14.* Jądro przykomorowe. 2 dni po adrenalectomii. Obfita ilość ergastoplazmy, liczne mitochondria i mikrotubule.

*Fig. 14.* Paraventricular nucleus. 2 days after adrenalectomy. Abundant ergastoplasm, numerous mitochondria and microtubules.



*Ryc. 15.* Jądro przykomorowe. 6 dni po adrenalectomii. Między cysternami siatki śródplazmatycznej substancja amorficzna o dużej gęstości elektronowej (strzałka).

*Fig. 15.* Paraventricular nucleus. 6 days after adrenalectomy. Between the cysterns of endoplasmic reticulum visible amorphous substance of high electron density (arrow).

*Ryc. 16.* Jądro przykomorowe. 6 dni po adrenalectomii. Włókno wypełnione ziarnistościami neurosekrecyjnymi różnej wielkości i różnej gęstości elektronowej. Między ziarnistościami widoczne pojedyncze „tubule”.

*Fig. 16.* Paraventricular nucleus. 6 days after adrenalectomy. Fibre filled with neurosecretory granules of diverse size and electron density. Between granules visible single tubules.

#### Objaśnienia

<b>N</b> — jądro komórki cell nucleus	<b>L</b> — lizosom lysosome
<b>Nu</b> — jąderko nucleolus	<b>MVB</b> — ciało wielopęcherzykowe multivesicular body
<b>AG</b> — aparat Golgiego Golgi apparatus	<b>E</b> — ziarnistość neurosekrecyjna neurosecretory granules
<b>ER</b> — ergastoplazma ergastoplasm	<b>Mt</b> — mikrotubule microtubules
<b>M</b> — mitochondria	<b>CV</b> — „coated vesicles” ciałko gęste
<b>NL</b> — ciałko jąderko-podobne	<b>DB</b> — dense body

AGNES DANIELEWICZ-KOTOWICZ

ZMIANY MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE  
W PRZYSADCE SZCZURA PO ADRENALEKTOMII  
ORAZ PO PODANIU ACTH

I. PŁAT GRUCZOŁOWY PRZYSADKI

Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN  
Kierownik: doc. dr J. W. Borowicz

Budowa mikroskopowo-elektronowa płata gruczołowego przysadki była opisywana przez wielu autorów, zarówno w stanach fizjologicznych, jak również w stanach patologicznych wywoływanych nadczynnością lub niedoczynnością nadnerczy, tarczycy i gonad. Badania te miały na celu zidentyfikowanie poszczególnych typów komórek oraz określenie ich czynności wydzielniczej. Do chwili obecnej istnieje wiele różniących się między sobą opisów komórek syntetyzujących i wydzielających ACTH. Niektórzy autorzy nie wyróżniają nawet odrębnego rodzaju komórek wydzielających ACTH, stwierdzając największe zmiany po adrenalectomii w komórkach wydzielających TSH.

Celem pracy było: prześledzenie zmian w komórkach płata gruczołowego przysadki po adrenalectomii i po podaniu ACTH, oraz wyróżnienie i scharakteryzowanie morfologiczne komórek syntetyzujących i wydzielających ACTH.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenie zostało wykonane na 60 szczurach samcach, o wadze 200 g, szczepu Wistar, z hodowli losowej; przeprowadzone w okresie miesięcy zimowych. Zwierzęta podzielono na cztery grupy:

- Kontrola A — 6 zwierząt zdrowych,
- Kontrola B — 16 zwierząt po operacji pozornej bez usuwania nadnerczy. Materiał pobierano po 6, 24, 48 godz. i 5 dniach po zabiegu.
- Zwierzęta po obustronnej adrenalectomii (22 zwierzęta). Obustronna adrenalectomia wykonana była z cięć przykręgosłupowych w narko-

zie eterowej. Materiał pobierano po 6, 12, 24, 48 godz., 3 i 5 dniach po zabiegu \*).

— Zwierzęta, którym podano jednorazowo, podskórnie ACTH produkcji Polfa w ilości 1 jm (16 zwierząt). Materiał pobrano 6, 12, 24, 48 godz. po podaniu ACTH.

Zwierzęta były dekapitowane. Przysadki po wyjęciu z jamy czaszki utrwalano w aldehydzie glutarowym i czterotlenku osmu, odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu oraz zatapiano w Eponie 812. Preparaty ultracienkie kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i odczynnikiem Reynoldsa. Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 7A, przy napięciu przyspieszającym 80 kV, na płytach fotograficznych ORWO Eu 2.

We wszystkich grupach wykonano kontrolę w mikroskopie świetlnym. Po rutynowym przeprowadzeniu do parafiny, przysadki barwiono hematoksyliną i eozyną.

#### WYNIKI

W badaniach w mikroskopie świetlnym nie stwierdzono różnic w obrazie komórek płata gruczołowego pomiędzy grupami kontrolnymi i doświadczalnymi.

##### *Kontrola A*

W płacie gruczołowym przysadki wyróżniono 5 typów komórek wydzielniczych: komórki wydzielające ACTH, STH, prolaktynę, gonadotropiny oraz TSH.

Przy identyfikacji komórek wydzielających ACTH opierano się przede wszystkim na opisach najbardziej zbliżonych do siebie (Siperstein, Allison 1965, Siperstein, Miller 1970, Pelletier i Racadot 1971).

Komórki wydzielające ACTH mają nieregularny kształt, gwiaździsty. Komórki te nie przylegają do naczyń krwionośnych, natomiast ich długie odgałęzienia zdążają w kierunku okolic przynaczyniowych.

Jądro komórkowe owalne, położone jest przeważnie mimośrodkowo. Siatka śródplazmatyczna zbudowana jest z równoległych, delikatnych błon, ułożonych na obwodzie komórki. Ribosomy występują zarówno w połączeniu z błonami jak i w postaci rozetek. Aparat Golgiego położony jest w okolicy przyjądrowej, średnio rozwinięty (ryc. 1, 2). Wydłużone

---

\*) Nie prowadzono badań przez dłuższy okres czasu, ponieważ po adrenalectomii u szczurów ulegają rozrostowi zawiązki kory nadnerczy, znajdujące się w tkance tłuszczowej okołonerkowej. Jest to zjawisko typowe dla szczurów. Z badań naszej Pracowni wynika, że po 2 tygodniach po adrenalectomii u szczurów zawiązki kory nadnerczy w tkance okołonadnerczowej są już rozwinięte i poziom steroidów we krwi wraca do normy.

mitochondria posiadają grzebień często o podłużnym przebiegu, macierz mitochondrialna ma niewielką gęstość elektronową. W cytolpazmie spotyka się pojedyncze twory lizosomalne o niejednorodnej budowie. Niezbyt liczne ziarnistości sekrecyjne wielkości około 2000 Å są ułożone wzdłuż błony cytoplazmatycznej komórki (ryc. 2), pojedyncze spotyka się w okolicy aparatu Golgiego. Ziarnistości sekrecyjne są obłone, okrągłe lub owalne, jednolicie gęste.

Komórki wydzielające STH mają kształt owalny, często są położone w sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Jądro komórkowe jest dość duże, położone w środku komórki, okrągłe lub owalne, zewnętrzna blaszka błony jądrowej często łączy się z kanałami siatki śródplazmatycznej szorstkiej, która jest miernie rozwinięta o wąskich kanałach. Aparat Golgiego, położony w okolicy przyjądrowej, składa się z wąskich, równoległych kanałów i niewielkich wakuoli. Mitochondria występują w dość dużej ilości, są owalne lub okrągłe, mają jasną macierz i dużą ilość poprzecznych grzebieli. W cytoplazmie występują pojedyncze twory lizosomalne o różnorodnej budowie, jednolicie gęste, czasami o wyglądzie figur mielinowych. Ziarnistości sekrecyjne, wielkości około 4000 Å są okrągłe, o dobrze widocznej błonie otaczającej i homogennej, elektronowo-gęstej zawartości (ryc. 3).

Komórki wydzielające prolaktynę, u szczurów samców, występują w niewielkiej liczbie. Są owalne lub okrągłe. Jądro komórkowe jest dość duże, położone w środku komórki, okrągłe lub owalne. Siateczka śródplazmatyczna o przewodzie błon szorstkich jest dość silnie rozwinięta. Aparat Golgiego, leżący w okolicy przyjądrowej jest miernie rozwinięty. Mitochondria są dość duże, okrągłe lub owalne. Macierz mitochondrialna jest jasna, grzebień są liczne. Twory lizosomalne są niezbyt liczne, nierównomiernie gęste, często o budowie podobnej do ciał wielopęcherzykowych. Ziarnistości sekrecyjne są niezbyt liczne, wielkości około 6000 Å, okrągłe, o dużej gęstości elektronooptycznej, otoczone pojedynczą błoną (ryc. 4).

Komórki gonadotropowe są kształtu owalnego, często sąsiadują bezpośrednio z okolicą okołonacyniową. Jądro komórkowe dość duże, okrągłe lub owalne, jest położone pośrodkowo. Siatka śródplazmatyczna jest bardzo silnie rozwinięta, występuje w postaci błon tworzących szerokie przestrzenie. Aparat Golgiego składa się z systemu bardzo wąskich kanałów, ułożonych równolegle oraz wakuoli. Mitochondria są nieliczne, owalne, mają stosunkowo gęstą macierz. Struktury o charakterze lizosomów występują pojedynczo w komórkach, są niejednorodnej gęstości. Ziarnistości sekrecyjne są wielkości około 2000 Å, otoczone pojedynczą błoną, niektóre mają bardziej gęsty środek (ryc. 5).

Komórki wydzielające TSH mają kształt owalny, niektóre sąsiadują z okolicą okołonaczyniową. Jądro komórkowe jest owalne. Siatka śródplazmatyczna jest dość silnie rozwinięta, składająca się z systemu błon ułożonych równolegle, tworzących szerokie kanały. Występuje więcej błon szorstkich niż gładkich. Aparat Golgiego jest silnie rozwinięty, błony aparatu Golgiego tworzą miejscami bańkowate rozszerzenia i pęcherzyki. Mitochondriów jest dużo, są okrągłe lub owalne, o gęstej macierzy. Występują pojedyncze twory lizosomalne, o dość jednolitym elektronowo-gęstym wyglądzie. Ziarnistości sekrecyjne są okrągłe, o dużej gęstości elektronowej, wielkości około 1400 Å (ryc. 6).

Charakterystyczne cechy komórek wydzielniczych płata gruczołowego przysadki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Cechy charakterystyczne komórek wydzielniczych płata gruczołowego przysadki<sup>1</sup>

Struktury komórkowe	Komórki wydzielające				
	ACTH	STH	prolaktynę	gonadotropiny	TSH
Kształt komórki	nieregularny, gwiaździsty	owalny	owalny lub okrągły	owalny	owalny
Jądro	położone mimośrodowo, owalne	położone pośrodkowo, owalne lub okrągłe	położone pośrodkowo, owalne lub okrągłe	położone pośrodkowo, owalne lub okrągłe	położone mimośrodowo, owalne
Aparat Golgiego	słabo rozwinięty	miernie rozwinięty	miernie rozwinięty	miernie rozwinięty	silnie rozwinięty
Siatka śródplazmatyczna	szorstka ułożona na obwodzie w postaci równoległych błon	szorstka miernie rozwinięta o wąskich kanałach	szorstka dość silnie rozwinięta	szorstka silnie rozwinięta, błony ograniczają szerokie przestrzenie	szorstka silnie rozwinięta, błony tworzą szerokie kanały
Mitochondria	wydłużone o jasnej macierzy	owalne lub okrągłe o jasnej macierzy	owalne lub okrągłe o jasnej macierzy	owalne o gęstej macierzy	owalne lub okrągłe o gęstej macierzy
Ziarnistości	2000 Å ułożone wzdłuż błony komórkowej, niezbyt liczne	4000 Å rozłożone w całej komórce, liczne	6000 Å nieregularnie ułożone, niezbyt liczne	2000 Å rozłożone w całej komórce, dość liczne	1400 Å rozłożone w całej komórce, dość liczne

### *Kontrola B (zwierzęta po operacji pozornej)*

Obraz mikroskopowo-elektronowy komórek płata gruczołowego przysadki po wykonaniu operacji pozornej nie różnił się od obrazów kontrolnych.

### *Grupa zwierząt po adrenalektomii*

Po adrenalektomii w płatach gruczołowych przysadki stwierdzono wystąpienie zmian ultrastrukturalnych wyłącznie w komórkach syntetyzujących i wydzielających ACTH.

Obraz mikroskopowo-elektronowy komórek wydzielających ACTH 6 godz. po adrenalektomii jest zmieniony w stosunku do kontroli. Zwraca uwagę rozbudowany aparat Golgiego, którego kanały są poszerzone. Po stronie wklęsłej aparatu Golgiego często widoczne są odrywające się pęcherzyki, zawierające materiał o różnej gęstości elektrono-optycznej. Zmieniony jest również charakterystyczny układ błon szorstkich siatki śródplazmatycznej, tzn. błony są ułożone mniej równolegle względem siebie. Kanały siatki szorstkiej są często poszerzone (ryc. 7). Ziarnistości sekrecyjne są liczniejsze. Znajdują się one zarówno przy błonie komórkowej jak i rozproszone w całej cytoplazmie.

Ultrastruktura komórek wydzielających ACTH 12 godzin po adrenalektomii jest podobna do opisanej po 6 godzinach po zabiegu. Zwraca uwagę jeszcze bardziej rozwinięty aparat Golgiego, w pobliżu którego znajdują się pęcherzyki zawierające materiał o różnej gęstości elektro-nooptycznej, czasami otoczone „halo” (ryc. 8).

Komórki wydzielające ACTH 24 godziny po adrenalektomii cechuje bardzo silnie rozwinięty aparat Golgiego, rozłożony w dużej części cytoplazmy. Zbudowany on jest z szerokich kanałów i pęcherzyków, w których znajduje się materiał o różnej gęstości elektro-nooptycznej. Siatka śródplazmatyczna tworzy szerokie kanały nierównomiernie rozłożone w cytoplazmie (ryc. 9). Nagromadzenie ziarnistości sekrecyjnych jest podobne jak po 6 i 12 godzinach po adrenalektomii.

Komórki wydzielające ACTH 48 godzin i 3 dni po adrenalektomii są powiększone. Wypustki tych komórek są poszerzone. Siatka śródplazmatyczna szorstka, rozproszona w całej cytoplazmie, jest zbudowana z błon tworzących szerokie kanały (ryc. 10). Bardzo rozbudowany aparat Golgiego jest widoczny w wielu miejscach komórki. Ziarnistości sekrecyjnych jest dużo. Ziarnistości te leżą zarówno przy błonie komórkowej jak i w innych częściach cytoplazmy.

Pięć dni po adrenalektomii komórki wydzielające ACTH wydają się mniejsze. Aparat Golgiego jest mniej rozwinięty. Błony szorstkie siatki śródplazmatycznej mają układ bardziej równomierny, chociaż są rozproszone w całej cytoplazmie. Ziarnistości sekrecyjne występują mniej lic-

nie niż w komórkach ACTH zwierząt poprzednich grup. Dość często spotyka się struktury o wyglądzie figur mielinowych oraz owalne twory o niejednorodnej gęstości elektronowej (ryc. 11).

### *Grupa zwierząt po podaniu ACTH*

W płacie gruczołowym przysadek zwierząt po podaniu ACTH stwierdzono zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym wyłącznie w komórkach syntetyzujących i wydzielających ACTH.

W 1 godzinę po podaniu ACTH w komórkach wydzielających ACTH widoczne są jedynie pojedyncze ziarnistości sekrecyjne, ułożone wzdłuż błony jądrowej. Aparat Golgiego jest mały, słabo rozwinięty (ryc. 12).

W porównaniu z obrazem poprzednim, 6 godzin po podaniu ACTH komórki wydzielające ACTH wykazują objawy wzmożonej syntezy materiału sekrecyjnego, a mianowicie: poszerzenie kanałów aparatu Golgiego, od którego odłączają się pęcherzyki, zawierające substancję o różnej gęstości elektronooptycznej. Wyraźnie zwiększona jest liczba ziarnistości sekrecyjnych, znajdujących się zarówno w części obwodowej cytoplazmy, jak również w okolicy aparatu Golgiego (ryc. 13).

W komórkach wydzielających ACTH 12 godzin po wstrzyknięciu ACTH w dalszym ciągu obserwuje się poszerzenie aparatu Golgiego i obecność w jego kanałach homogennej substancji o małej gęstości elektronooptycznej, oraz wakuoli zawierających substancję o dużej gęstości elektronowej. Nagromadzenie ziarnistości sekrecyjnych wydaje się mniejsze niż po 6 godzinach po podaniu ACTH.

Budowa komórek wydzielających ACTH 24 godziny po podaniu ACTH jest zbliżona do opisanej w komórkach grupy poprzedniej. W dalszym ciągu utrzymuje się poszerzenie kanałów aparatu Golgiego.

Obraz komórek syntetyzujących i wydzielających ACTH 48 godzin po podaniu ACTH nie różni się od obrazów kontrolnych (ryc. 14).

### OMÓWIENIE

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że obustronna adrenalectomia, jak również podanie ACTH zwierzętom zdrowym wywołują charakterystyczne zmiany tylko w jednym typie komórek płata gruczołowego przysadki. Można więc z dużym prawdopodobieństwem uważać te komórki za syntetyzujące i wydzielające ACTH.

Dotychczasowe próby ustalenia cech morfologicznych komórek syntetyzujących i wydzielających ACTH były wykonywane przeważnie na modelu niedoczynności nadnerczy (Siperstein, Allison 1965, Kurosumi, Kobayashi 1966, Siperstein, Miller 1970). Powstaje więc pytanie, czym

należy tłumaczyć rozbieżności w opisach tych komórek. Wydaje się, że przyczynia się do tego m. in. stosunkowo mała liczba komórek wydzielających ACTH w płacie gruczołowym przysadki, ponadto u zwierząt zdrowych komórki te są niezbyt duże z cienkimi wypustkami, które nie zawsze są dobrze widoczne w obrazach mikroskopowo-elektronowych. Niektórzy autorzy (Siperstein, Allison 1965, Siperstein, Miller 1970) opisywali przerosłe komórki znajdujące się po adrenalektomii, nazywając je „adrenalectomy cells”, a następnie szukali odpowiedników tych komórek w płatach gruczołowych przysadek zwierząt zdrowych. Ultrastruktura komórek opisanych przez Sipersteina i Millera (1970), nazwanych adrenalectomy cells, jest zbliżona do budowy komórek występujących po adrenalektomii w przedstawionej pracy. Charakterystyczną cechą komórek wydzielających ACTH jest ich nieregularny kształt i liczne wypustki. Komórki te nigdy nie przylegają do przestrzeni okołonaczyniowej, natomiast ich wypustki zdążają w kierunku naczyń krwionośnych. Są to dane zgodne z doniesieniami Sipersteina i Millera (1970), Pelletiera i Racadota (1971) oraz z badaniami immuno-enzymo-histochemicznymi Nakane'a (1970).

Drugim elementem, na podstawie którego starano się scharakteryzować komórki wydzielające ACTH, był kształt i wielkość ziarnistości sekrecyjnych. Kurosumi i Kobayashi (1966) uważają, że komórki wydzielające ACTH zawierają ziarnistości sekrecyjne otoczone „halo”. Pooley (1971), badając homogenaty z płatów gruczołowych przysadek znalazł komórki, które nazwał „haloed cells” — podobne do opisanych przez Kurosumi i Kobayashi (1966), jako wydzielające ACTH. W naszym materiale nie spotykano ziarnistości sekrecyjnych posiadających typowe „halo”. Jednakże w okolicy aparatu Golgiego można było niekiedy obserwować obłoniony materiał, przeważnie o niewielkiej gęstości elektrooptycznej otoczony „halo”.

Siperstein i Miller (1970) oraz Pelletier i Racadot (1971) uważają, że w komórkach wydzielających ACTH nigdy nie występują ziarnistości sekrecyjne otoczone „halo”. Stwierdzenie to nie wydaje się słuszne, ponieważ w różnych komórkach wydzielniczych w okolicy aparatu Golgiego spotyka się struktury otoczone „halo”. Bardzo często jednak nie ma możliwości (przy użyciu mikroskopu elektronowego) odróżnienia materiału sekrecyjnego od tworzących się lizosomów. Najbardziej prawdopodobnym wydaje się, że w komórkach wydzielających ACTH jak i we wszystkich komórkach wydzielniczych, materiał sekrecyjny znajdujący się w oderwanych od aparatu Golgiego pęcherzykach może, ale nie musi, być otoczony „halo”. Przymuszczalnie jest to zależne od stopnia „dojrzałości morfologicznej” ziarnistości sekrecyjnej. Natomiast Kurosumi i Kobayashi (1966) prawdopodobnie potraktowali pęcherzyki odrywające się



od kanałów aparatu Golgiego, wypełnione gęstym lub średniej gęstości elektrooptycznej materiałem, jako dojrzałe ziarnistości sekrecyjne. Wydaje się, że traktowali oni komórki wydzielające TSH jako komórki wydzielające ACTH. Aparat Golgiego w komórkach TSH jest bardzo rozbudowany i w jego okolicy można obserwować gęsty materiał otoczony „halo”.

Kształt ziarnistości sekrecyjnych komórek wydzielających ACTH jest okrągły lub owalny, zgodnie z doniesieniami Siperteina i Millera (1970), natomiast Nakayama i wsp. (1968) oraz Pelletier i Racadot (1971) uważają, że są one wyłącznie okrągłe. W badanym materiale spotykano zarówno okrągłe jak i owalne ziarnistości, chociaż znacznie częściej występowały postaci okrągłe. Charakterystyczne jest również ułożenie ziarnistości sekrecyjnych w komórce wydzielającej ACTH. Ziarnistości te leżą wzdłuż błony komórkowej, pojedyncze znajdują się w pobliżu aparatu Golgiego (Siperstein, Miller 1970, Pelletier, Racadot 1971).

W komórkach wydzielających ACTH istnieje typowe ułożenie błon szorstkich siatki śródplazmatycznej. Błony te leżą w części obwodowej cytoplazmy, tworząc wąskie, równoległe do siebie i do błony komórkowej kanały, co zgodne jest z obserwacjami Nakayama'y (1969), Sipersteina i Millera (1970) oraz Pelletiena i Racadota (1971). Siatka śródplazmatyczna szorstka jest stosunkowo dobrze rozwinięta, regularnie rozmieszczona w komórkach wydzielających polipeptydy, jak ACTH, STH i prolaktynę, natomiast w komórkach wydzielających glikoproteidy występuje w postaci nieregularnie ułożonych, rozszerzonych kanałów (Kurosumi, Oota 1966, Kurosumi, Kobayashi 1966, Farquhar, Reinhart 1954, Siperstein, Allison 1965, Pelletier, Racadot 1971). Jednakże ten regularny układ błon szorstkich w komórkach wydzielających ACTH występuje wyłącznie w stanie prawidłowej lub zmniejszonej czynności komórki, a więc w obrazach kontrolnych i po 1 godzinie po podaniu ACTH. Natomiast w stanie wzmożonej syntezy ACTH (po adrenalectomii) następuje przemieszczenie układu błon szorstkich ku środkowi komórki oraz poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej.

Po obustronnej adrenalectomii obserwowano w komórkach wydzielających ACTH zmiany w budowie aparatu Golgiego i w układzie błon szorstkich siatki śródplazmatycznej. Jednocześnie stwierdzono większe nagromadzenie ziarnistości sekrecyjnych. Natomiast po 5 dniach po adrenalectomii ziarnistości sekrecyjne są mniej liczne i obrazy komórek wydzielających ACTH zaczynają przypominać obrazy kontrolne.

Po podaniu ACTH — po 1 godzinie następuje przypuszczalnie zahamowanie tworzenia się ziarnistości sekrecyjnych, wyrażające się występowaniem jedynie pojedynczych ziarnistości oraz małym, słabo rozwiniętym aparatem Golgiego. Począwszy od 6 godziny od podania exogen-

nego ACTH stopniowo zwiększa się synteza ziarnistości sekrecyjnych, co wydaje się, można tłumaczyć krótkotrwałym działaniem ACTH. Po 48 godzinach obrazu budowy mikroskopowo-elektronowej komórek wydzielających ACTH nie odbiegają od kontrolnych.

#### WNIOSKI

1. Na modelu niedoczynności i nadczynności nadnerczy wyróżniono i scharakteryzowano morfologicznie odrębny typ komórek syntetyzujących i wydzielających ACTH. Charakterystycznymi cechami tych komórek są: gwiazdzisty kształt i liczne wypustki, słabo rozwinięty aparat Golgiego, błony szorstkie siatki śródplazmatycznej na obwodzie komórki, ułożone równolegle do błony komórkowej, rozmieszczenie ziarnistości sekrecyjnych wzdłuż błony komórkowej.

2. W niedoczynności nadnerczy w komórkach wydzielających ACTH stwierdza się wzmoczoną syntezę ziarnistości sekrecyjnych wyrażającą się powiększeniem całej komórki, rozbudową aparatu Golgiego, poszerzeniem kanałów siatki śródplazmatycznej oraz większym nagromadzeniem ziarnistości sekrecyjnych.

3. W stanie nadczynności nadnerczy (po 1 godzinie po podaniu ACTH) komórki wydzielające ACTH wykazują zmniejszoną aktywność sekrecyjną.

4. Niedoczynność i nadczynność nadnerczy powodują wystąpienie zmian w obrazie mikroskopowo-elektronowym wyłącznie w komórkach wydzielających ACTH. W innych komórkach wydzielniczych płata gruczołowego przysadki nie stwierdzono zmian w obrazie mikroskopowo-elektronowym.

А. Данелевич-Котович

#### НАБЛЮДАЕМЫЕ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИПОФИЗА ПОСЛЕ АДРЕНАЛЕКТОМИИ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АКТГ

##### I. Передняя доля гипофиза

##### Резюме

Изучались изменения в ультраструктуре клеток передней доли гипофиза крыс после односторонней адrenalectомии и после однократного введения подкожно 1 ем АКТГ. В передней доле гипофиза как после адrenalectомии, так и после введения АКТГ изменения в ультраструктуре отмечались лишь в одном типе секреторных клеток. Этот тип клеток определен как синтезирующий и выделяющий АКТГ. Картина этих клеток после адrenalectомии, указывает на увеличенный синтез секреторной зернистости. После введения АКТГ (через час) клетки, выделяющие АКТГ обнаруживали пониженную секреторную активность.

A. Danielewicz-Kotowicz

ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES IN RAT HYPOPHYSIS FOLLOWING  
ADRENALECTOMY AND ACTH ADMINISTRATION

## I. Glandular lobe

## Summary

Ultrastructural changes in the secretory lobe of rat hypophysis following bilateral adrenalectomy and one-time subcutaneous administration of 1 i.u. of ACTH were studied. Both after adrenalectomy and ACTH administration ultrastructural changes were found to appear exclusively in one type of secretory cells, defined as ACTH-synthesizing and secreting cells. After adrenalectomy, pictures were found in these cells indicative of an increased synthesis of secretory granulations. One hour after administration of ACTH the ACTH-secreting cells showed features of decreased secretory activity.

## PIŚMIENNICTWO

1. Farquhar M. G., Reinhart J. P.: Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology* 1954, 54, 516—522.
2. Kurosumi K., Oota Y.: Corticotrophs in the anterior pituitary glands of gonadectomized and thyroidectomized rats as revealed by Electron Microscopy. *Endocrinology* 1966, 79, 808—815.
3. Kurosumi K., Kabayashi X.: Corticotrophs in the anterior pituitary glands of normal and adrenalectomized rats as revealed by electron microscopy. *Endocrinology* 1966, 76, 745—759.
4. Nakane P. T.: Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1970, 18, 9—20.
5. Nakayama J., Nickerson P. A., Skelton F. R.: An electron microscopic study of the changes in ACTH and FSH — producing cells during development of methylandrostonedid hypertension on the rat. *J. Path.* 1970, 58, 3, 377—402.
6. Pelletier G., Racadot J.: Identification des cellules hypophysaires secretant l'ACTH chez rat. *Z. Zellforsch.* 1971, 116, 228—239.
7. Pooley A. S.: Ultrastructure and size of rat anterior pituitary secretory granules. *Endocrinology* 1971, 88, 2, 400—411.
8. Siperstein E. R., Allison V. P.: Fine structure of the cells responsible for secretion of adrenocorticotrophin in the adrenalectomized rat. *Endocrinology* 1965, 76, 1, 70—79.
9. Siperstein E. R., Miller K. J.: Further cytophysiologic evidence for the identity of the cells that produce adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 1970, 86, 451—486.

Adres autorki: Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00-784 Warszawa, Dworkowa 3.

## PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Kontrola. Fragment okolicy okołojądrowej komórki ACTH, słabo rozwinięty aparat Golgiego, pojedyncze ziarnistości sekrecyjne (S). Powiększenie 7140×.

*Fig. 1.* Control. Fragment of perinuclear region of ACTH cell, poorly developed Golgi apparatus, single secretory granules (S). × 7140.

*Ryc. 2.* Kontrola. Fragment wypustki komórki ACTH, widoczny charakterystyczny układ błon szorstkich siatki śródplazmatycznej. Pow. 22 200 ×.

*Fig. 2.* Control. Fragment of ACTH cell process, characteristic arrangement of rough endoplasmic reticulum membranes. × 22 200.

*Ryc. 3.* Kontrola. Fragment komórki STH, przylegającej do naczynia krwionośnego. Pow. 11 250 ×.

*Fig. 3.* Control. STH cell fragment adjacent to blood vessel. × 11 250.

*Ryc. 4.* Kontrola. Fragment komórki wydzielającej prolaktynę. Pow. 13 000 ×.

*Fig. 4.* Control. Fragment of prolactine-secreting cell. × 13 000.

*Ryc. 5.* Kontrola. Fragment komórki gonadotropowej. Pow. 13 000 ×.

*Fig. 5.* Control. Gonadotropic cell fragment. × 13 000.

*Ryc. 6.* Kontrola. Komórka TSH, widoczny dobrze rozwinięty aparat Golgiego. Pow. 13 200 ×.

*Fig. 6.* Control. TSH cell, well developed Golgi apparatus (AG) × 13 200.

*Ryc. 7.* 6 godzin po adrenalectomii. Komórka ACTH, widoczne poszerzone kanały błon szorstkich siatki śródplazmatycznej oraz ziarnistości sekrecyjne (S). Pow. 7800 ×.

*Fig. 7.* 6 hrs after adrenalectomy. ACTH cell, visible extended cisterns of rough endoplasmic reticulum membranes and secretory granules (S). × 7800.

*Ryc. 8.* 12 godzin po adrenalectomii. Fragment komórki ACTH, widoczne pęcherzyki otoczone „halo”. Pow. 18 200 ×.

*Fig. 8.* 12 hrs after adrenalectomy. ACTH cell fragment, visible vesicles surrounded by „halo”. × 18 200.

*Ryc. 9.* 24 godziny po adrenalectomii. Fragment okolicy przyjądrowej komórki ACTH, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, oraz duży aparat Golgiego (AG) z pęcherzykami otoczonymi „halo”. Pow. 29 100 ×.

*Fig. 9.* 24 hrs after adrenalectomy. Fragment of perinuclear region of ACTH cell, extended cisterns of endoplasmic reticulum and large Golgi apparatus (AG) with vesicles surrounded by „halo”. × 29 100.

*Ryc. 10.* 48 godzin po adrenalectomii. Komórka ACTH, poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej. Pow. 23 000 ×.

*Fig. 10.* 48 hrs after adrenalectomy. ACTH cell, extended cisterns of endoplasmic reticulum. × 23 000.

*Ryc. 11.* 5 dni po adrenalectomii. Fragment komórki ACTH, układ błon szorstkich siatki śródplazmatycznej bardziej równomierny. Pow. 12 300 ×.

*Fig. 11.* 5 days after adrenalectomy. ACTH cell fragment, more regular arrangement of rough endoplasmic reticulum membranes. × 12 300.

*Ryc. 12.* 1 godzina po podaniu ACTH. Komórka ACTH zbliżona do obrazów kontrolnych, widoczna jedynie pojedyncza ziarnistość sekrecyjna (S). Pow. 8 400 ×.

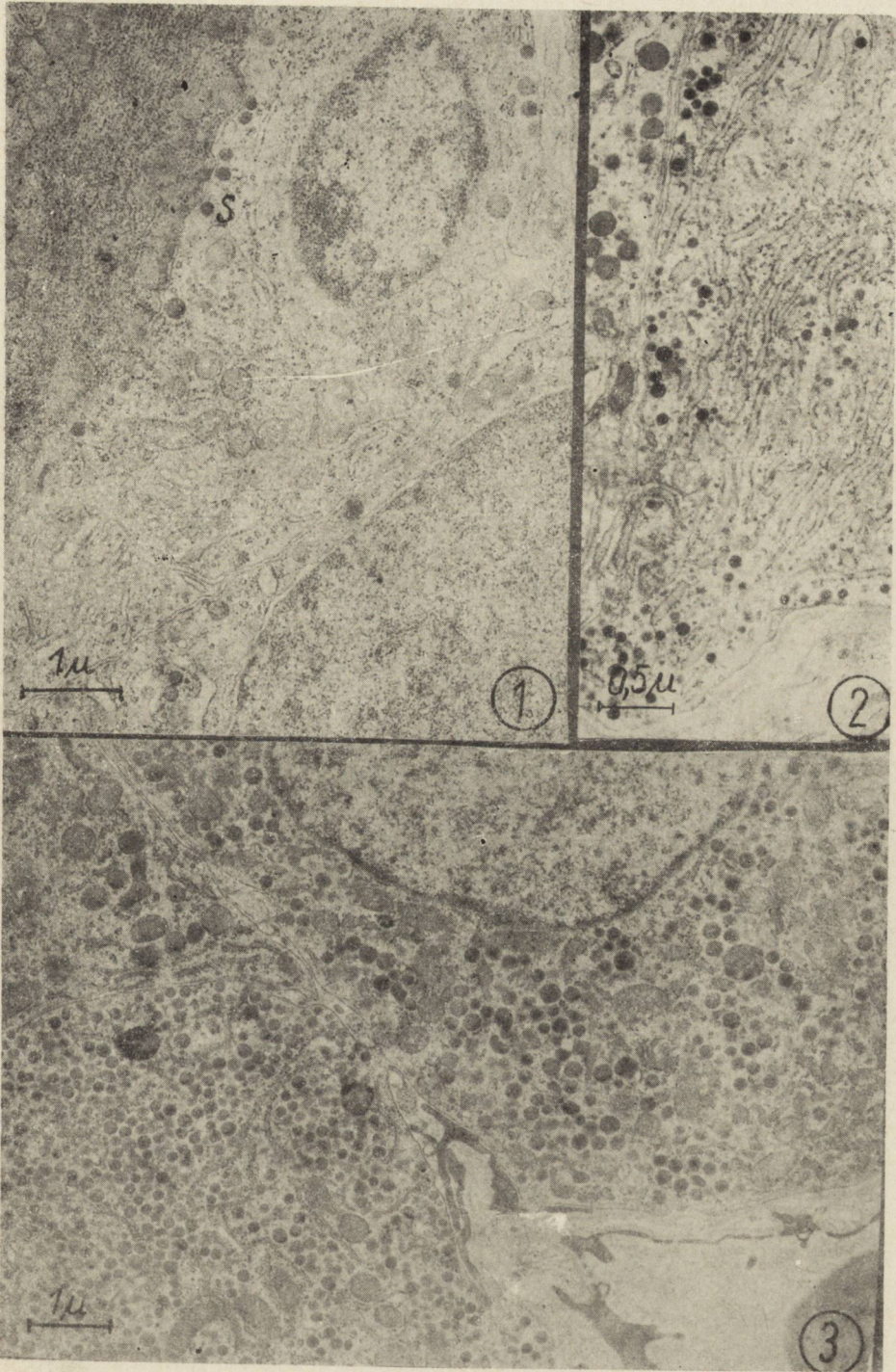
*Fig. 12.* 1 hr after ACTH administration. ACTH cell, resembling control pictures, visible only one secretory granule (S). × 8 400.

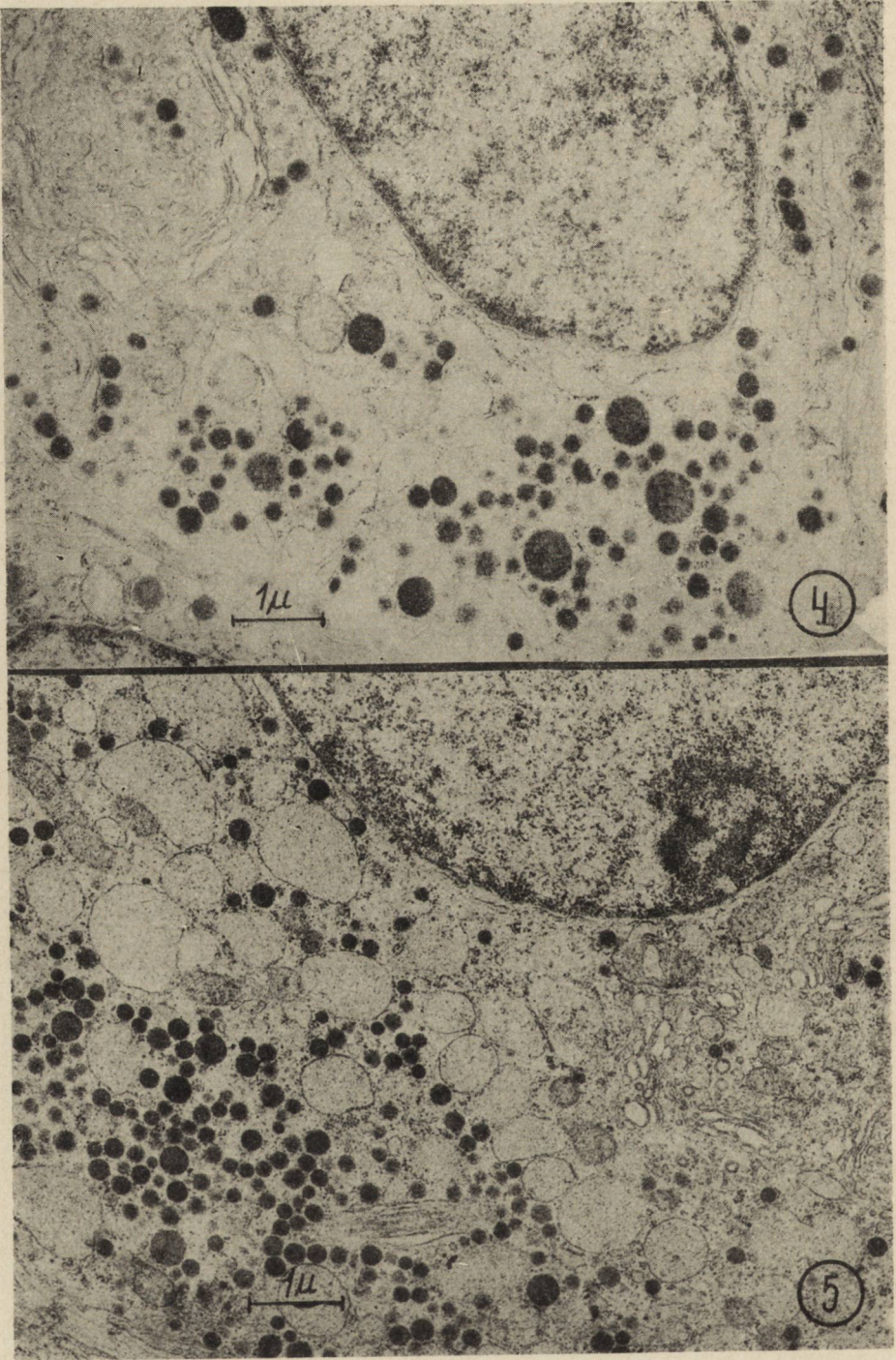
*Ryc. 13.* 6 godzin po podaniu ACTH. Komórka ACTH, duża liczba ziarnistości sekrecyjnych (S) ułożonych wzdłuż błony komórkowej oraz rozbudowany aparat Golgiego (AG). Pow. 13 500 ×.

*Fig. 13.* 6 hrs after ACTH administration. ACTH cell, great number of secretory granules (S) arranged along cell membrane and well developed Golgi apparatus (AG). × 13 500.

*Ryc. 14.* 48 godzin po podaniu ACTH. Budowa komórki ACTH jest zbliżona do kontroli. Pow. 30 000 ×.

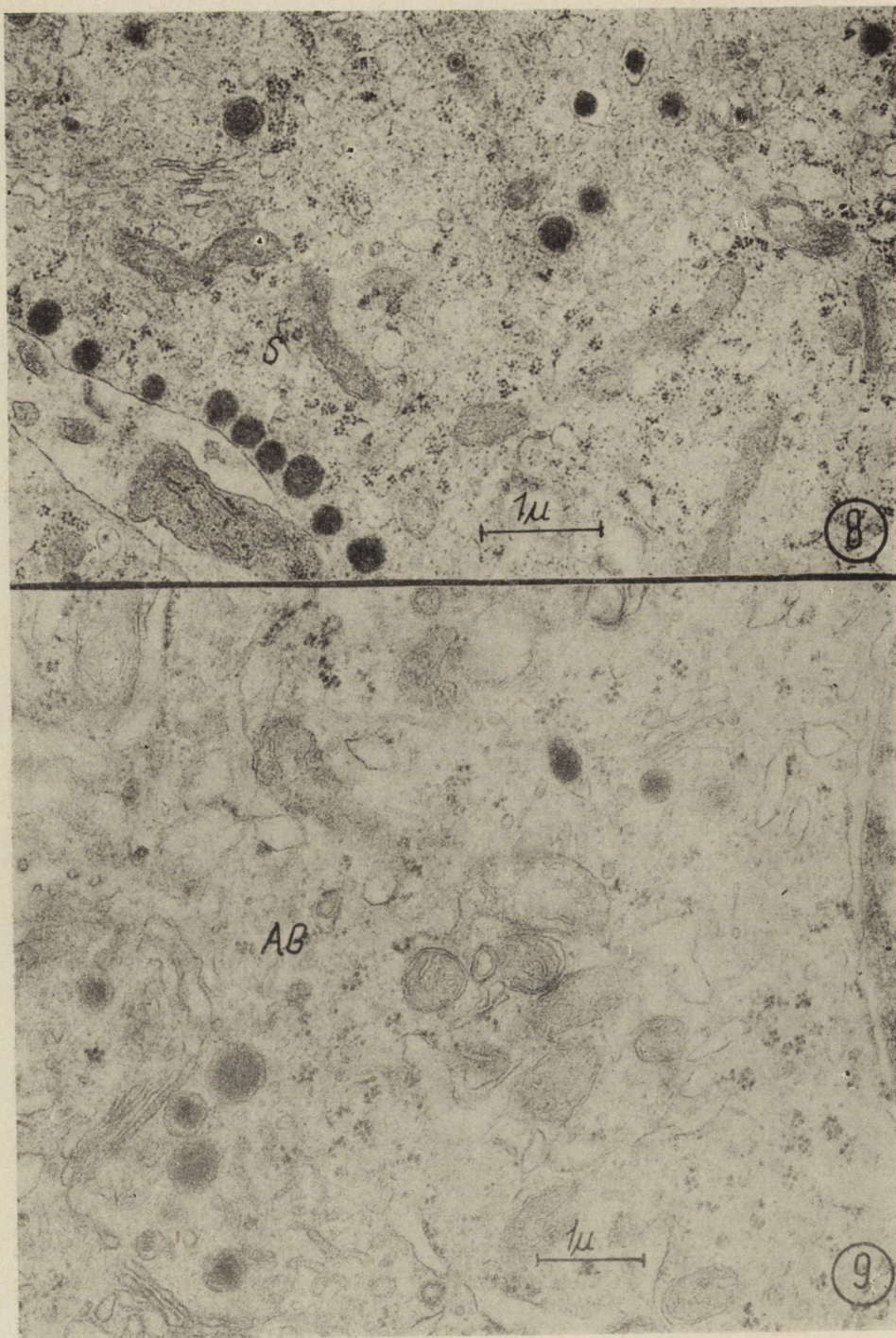
*Fig. 14.* 48 hrs after ACTH administration. The structure of ACTH cell resembling that of control cells. × 30 000.

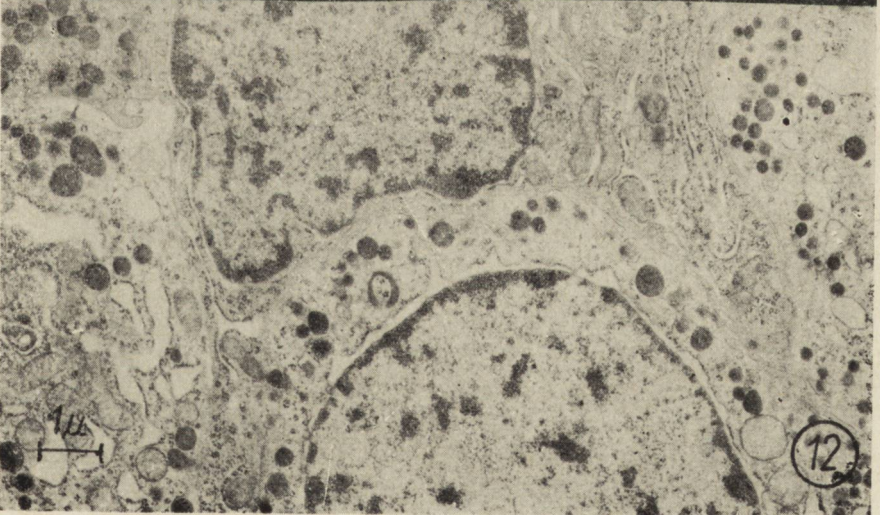
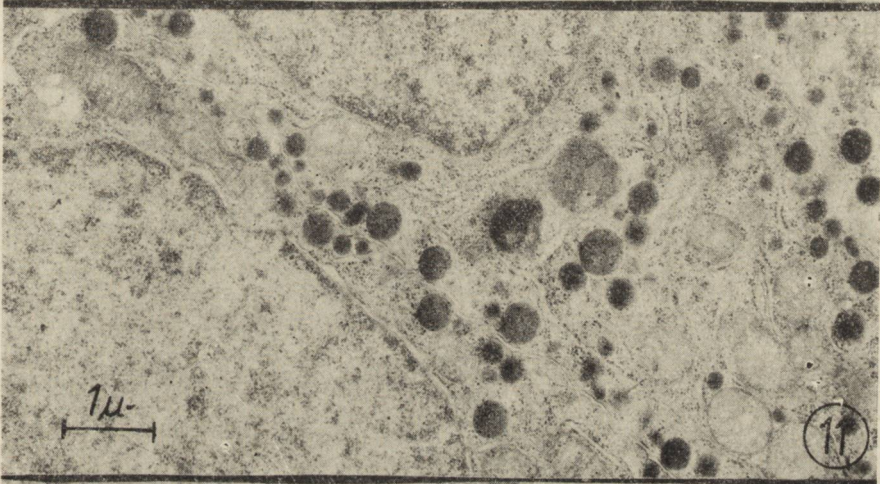
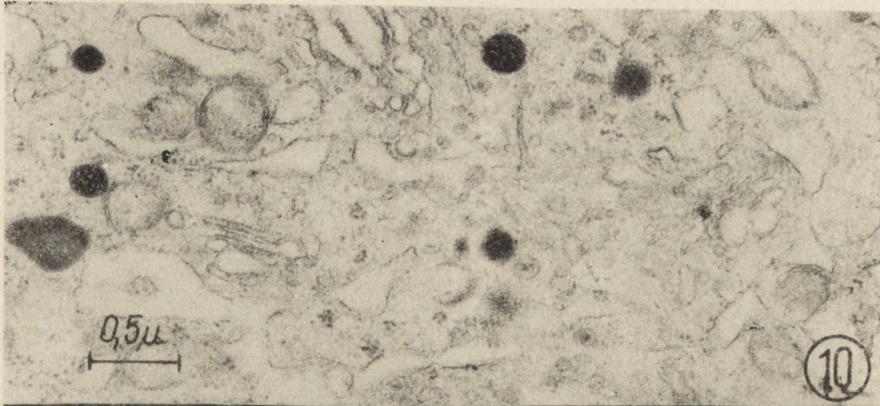


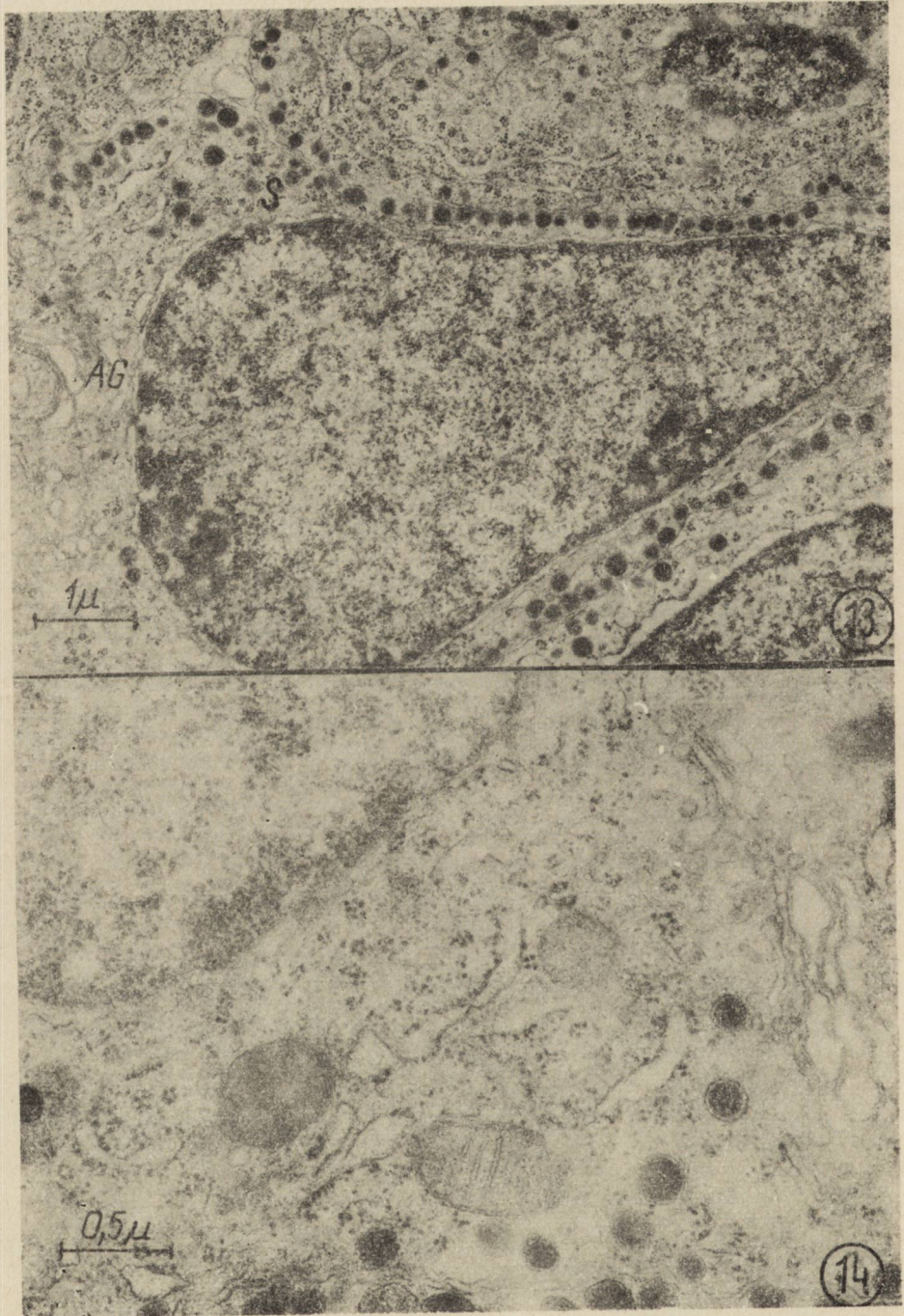












ZUZANNA KRAŚNICKA, HENRYK KONOWAŁOW \*), BARBARA GAJKOWSKA

## WPLYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOTLENIENIA NA ZWOJE CZUCIOWE HODOWANE *IN VITRO*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Kierownik: doc. dr J. Borowicz

Ocena uszkodzenia poszczególnych elementów strukturalnych tkanki nerwowej pod wpływem niedostatku tlenowego, w oparciu o doświadczenia prowadzone *in vivo* jest utrudniona przez współtowarzyszące odczynny tkankowe i przez sumowanie się różnorodnych czynników ogólnoustrojowych i miejscowych towarzyszących hipoksji lub stanowiących jej następstwo.

Zastosowanie modelu pozaustrojowej hodowli tkanki, mimo jej odrębności biologicznych wynikających z metody pozwala na ograniczenie wspomnianych niedogodności i umożliwia ocenę wpływu „czystego” niedotlenienia.

Poprzednie badania nad wpływem niedostatku tlenowego na hodowle zwojów międzykręgowych zarodków kurzych, prowadzono przy zastosowaniu długotrwałej anoksji, a ocenę zmian ograniczono do badań w mikroskopie świetlnym (Kraśnicka i wsp. 1971). Badania przeprowadzone na hodowli tkanki glejowej wykazały istotne różnice reakcji na przejściowe niedotlenienie w porównaniu z niedotlenieniem trwałym (Kraśnicka i wsp. 1967, Renkawek 1972, Kraśnicka i wsp. 1973). Skłoniło to nas do podjęcia badań nad wpływem krótkotrwałej przejściowej anoksji na elementy strukturalne zwoju międzykręgowego, pozwalające na ocenę charakteru i nasilenia ich uszkodzeń zarówno w okresie niedotlenienia jak i w czasie zdrowienia po incydencie anoksyjnym. Tak ustawione doświadczenie pozwala ponadto na próbę oceny wzajemnych zależności uszkodzeń poszczególnych elementów tkanki.

---

\*) Stypendysta Polskiej Akademii Nauk. Obecny adres: Zakład Patomorfologii Układu Nerwowego, Instytut Medycyny Doświadczalnej Akademii Nauk Medycznych ZSRR, Leningrad, al. Kirowa 69—71.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowlach zwojów międzykręgowych 9-dniowych zarodków kurzych. Hodowle przetrzymywano we flaszkach Carrela w warunkach standardowych, zmieniając medium odżywcze 2 razy w tygodniu (Kraśnicka 1969). Wyselekcjonowane hodowle 2-, 3-, i 4-tygodniowe przenoszono do zmodyfikowanych flaszek Carrela, przystosowanych do zmian środowiska gazowego (Kraśnicka i wsp. 1967). Hodowle przetrzymywano w atmosferze 100% azotu przez 30 minut, a następnie przenoszono je do prawidłowych warunków hodowlanych, w których pozostawały od 1 do 5 dni.

Do badań w mikroskopie świetlnym zastosowano metody histologiczne (Nissla i Bodiana) i histochemiczne (Sudan czarny B, PAS, PAS-dime-don). Badano także aktywność wybranych enzymów, reprezentujących różne tory metaboliczne glukozy, a mianowicie fosforylasy, transferazy glikogenowej (UDPG-G-aza), dehydrogenazy bursztynianowej (SDH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G-6-PDH) stosując technikę przedstawioną w poprzedniej pracy (Kraśnicka i wsp. 1971).

Do obserwacji w mikroskopie elektronowym pobierano hodowle 2-, 3- i 4-tygodniowe po upływie 1, 3, 5 dni po działaniu 30 min. anoksji. Materiał do badań opracowywano w sposób opisany przez Borowicza i Kraśnicką (1971), a następnie oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A. Zdjęcia wykonano na kliszach ORWO UE-2 przy napięciu przyspieszającym 80 kV.

Kontrolne badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykonano na hodowlach 2-, 3- i 4-tygodniowych prowadzonych w warunkach standardowych.

## WYNIKI

*Badanie w mikroskopie świetlnym*

Hodowle 2-tygodniowe. Zmiany patologiczne występują już w pierwszym dniu po działaniu anoksji. Są one nieznaczne i polegają przede wszystkim na obrzmieniu komórek nerwowych i wypustek osiowych oraz komórkowych elementów podporowych. W poszczególnych neuronach obserwuje się różne stadia tigrolizy. Rozdrobnienie grudek tigruidu jest zjawiskiem powszechnym. Natomiast całkowity rozpad substancji Nissla występuje tylko w części hodowli (ryc. 1). W cytoplazmie neurocytów spostrzega się również drobne wodniczki. Natomiast w barwieniu metodą Bodiana obserwuje się typowy przebieg wypustek aksonalnych i dobrze zachowany układ neurofibryli (ryc. 2). W hodowlach barwionych Sudanem czarnym B w przeciwieństwie do hodowli kon-

trolnych nie występują objawy mielinizacji. Komórki amficytarne i komórki Schwanna wykazują znaczne powiększenie jąder oraz gromadzenie ciał sudanofilnych w cytoplazmie.

Hodowle barwione metodą PAS wykazują zwiększoną zawartość substancji PAS-dodatnich w cytoplazmie wszystkich elementów komórkowych. Zastosowanie metody PAS-dimedon wykazuje obecność ziarnistości glikogenu w cytoplazmie niektórych neuronów już w pierwszej dobie obserwacji. Ziarna glikogenu są drobne, pyłkowate, równomiernie rozłożone w perikariach. Wokół nielicznych neuronów, których cytoplazma zawiera ziarnistości glikogenu spostrzega się amficyty wypełnione również podobnymi złoгами. Dodatnia reakcja na glikogen utrzymuje się przez cały okres poanoksyjny, a nawet nasila w trzecim dniu.

Enzymy metabolizujące glikogen (UDPG-G-transferaza i fosforylaza) wykazują aktywność przez cały okres obserwacji. Wysoką aktywnością charakteryzują się neurocyty w przeciwieństwie do amficytów i komórek Schwanna, w których jest ona jedynie śladowa.

Obserwuje się ponadto obniżenie aktywności SDH zwłaszcza w komórkach nerwowych. Aktywność LDH i G-6-PDH jest różna w poszczególnych neurocytach. W niektórych obserwuje się wzmożoną aktywność obu enzymów (ryc. 3). Wydaje się, że wpływ anoksji na niedojrzałe hodowle 2-tygodniowe wyraża się większym osłabieniem aktywności dehydrogenaz w komórkach podporowych w porównaniu ze stosunkowo dobrze zachowaną aktywnością komórek nerwowych.

Hodowle 3-tygodniowe wykazują mniej nasilone zmiany morfologiczne w porównaniu z hodowlami 2-tygodniowymi. Neurocyty charakteryzuje nieznaczny ubytek substancji Nissla, tylko niektóre z nich wykazują rozdrobnienie ziarn tigroidu (ryc. 4). W barwieniu metodą Bodiana obraz włókien nerwowych i neurofibryli nie odbiega od spostrzeganego w hodowlach prawidłowych.

W hodowlach barwionych Sudanem czarnym B już po 24 godzinach po anoksji obserwuje się uszkodzenie osłonek mielinowych, wyrażające się ich nierównomierną grubością i barwliwością. Komórki Schwanna przylegające do zmielinizowanego włókna nerwowego są znacznie obrzmiałe. W cytoplazmie komórek osłonkowych często występują ziarna sudanofilne (ryc. 5).

W preparatach barwionych metodą PAS wszystkie elementy tkankowe zwoju nerwowego zawierają znaczne ilości substancji PAS-dodatnich. W preparatach barwionych metodą PAS-dimedon zwraca uwagę gromadzenie się ziaren glikogenu w neurocytach przewyższające złoży występujące w komórkach z równoczesnych hodowli kontrolnych. Wzrost ilości ziaren glikogenu obserwuje się w całym okresie poanoksyjnym. Enzymy cyklu Leloir'a wykazują wzmożoną aktywność zarówno w komór-

kach nerwowych jak i w komórkach Schwanna. Wydaje się, że aktywność UDPG-G-transferazy jest wyższa od aktywności fosforylasy. Zjawisko to jest szczególnie wyraźne w neurocytach.

Nie stwierdza się natomiast zmian aktywności SDH w neuronach, jakie obserwowano w hodowlach 2-tygodniowych. Aktywność pozostałych enzymów oksydacyjno-redukcyjnych (LDH i G-6-PDH) nie wykazuje również istotnych odchyłeń w porównaniu z badaniami kontrolnymi (ryc. 6). Aktywność tych enzymów w amficytach i w komórkach Schwanna jest niższa niż w komórkach nerwowych.

**Hodowle 4-tygodniowe.** Obraz histologiczny hodowli 4-tygodniowych, poddanych 30-minutowemu niedotlenieniu wykazuje najmniej zaawansowane zmiany patologiczne w porównaniu z hodowlami młodszymi. Cytoplazma komórek nerwowych zawiera niewielkie i ograniczone ubytki tigroidu (ryc. 7), a układ neurofibryli jest prawidłowy (ryc. 8). Największe odchylenia od normy obserwuje się w preparatach barwionych na glikogen. W materiale kontrolnym dojrzałe neurocyty nie zawierają złogów glikogenu. Natomiast w materiale doświadczalnym w okresie poanoksyjnym, od 1 do 5 dnia, stwierdza się znaczne ilości glikogenu w pojedynczych komórkach (ryc. 9). Aktywność enzymów metabolizujących glikogen jest wysoka, a jej rozkład podobny jak w hodowlach 3-tygodniowych.

Istotne zmiany obserwuje się w preparatach barwionych Sudanem czarnym. Z. Zmielinizowane hodowle 4-tygodniowe poddane niedotlenieniu wykazują uszkodzenie osłonek mielinowych już po 24 godzinach. Najwcześniejsze zmiany wyrażają się obrzmieniem i nierównomiernym pogrubieniem osłonki mielinowej. W trzecim dniu po anoksji zmiany patologiczne nasilają się. Często dochodzi do fragmentacji osłonki i tworzenia kul mielinowych (ryc. 10). W piątym dniu zmiany o podobnym charakterze dotyczą większej liczby włókien nerwowych.

Aktywność badanych dehydrogenaz przez cały okres obserwacji nie wykazuje istotnych odchyłeń (ryc. 11, 12).

#### *Badanie w mikroskopie elektronowym*

**Hodowle 2-tygodniowe** wykazują zmiany zarówno w neuronach jak i amficytach i komórkach Schwanna.

W 24 godziny po anoksji w neuronach spostrzega się zubożenie szorstkiej siatki śródplazmatycznej w porównaniu do komórek z hodowli kontrolnych. Siatka śródplazmatyczna jest słabo rozwinięta, pokryta pojedynczymi rybosomami, zaś ilość polirybosomów jest zmniejszona. Obfitsza jest natomiast gładka siatka śródplazmatyczna. Aparat Golgiego jest bardzo dobrze rozwinięty, jego zbiorniki wypełnione są substancją homo-

genną o małej gęstości elektronooptycznej. Mitochondria są przeważnie obrzmiałe, a liczba grzebieni zmniejszona. Nieliczne mitochondria wykazują zagęszczenie macierzy. Zmiany te nasilają się w 3 i 5 dniu przeżywania hodowli po anoksji. Aparat Golgiego ulega znacznemu rozbudowaniu, zwiększa się ilość jego pęcherzyków, a zbiorniki ulegają poszerzeniu. Siatka śródplazmatyczna jest nadal skąpa i zbudowana z krótkich kanałków. Mitochondria są przeważnie obrzmiałe, a często pozbawione grzebieni (ryc. 13). Niektóre z mitochondriów zachowują jednak prawidłowy wygląd. W tym samym czasie w poszczególnych neuronach obserwuje się zwiększoną ilość ciał lizosomopodobnych oraz pojedyncze duże ciała wieloblaszkowe. W 3 dniu po działaniu anoksji w cytoplazmie niektórych neuronów obecne są liczne ziarna glikogenu o układach rozetkowych. Ich ilość nie zmniejsza się do 5 dnia po niedotlenieniu.

Cytoplazma komórek satelitowych 24 godziny po anoksji zawiera zwiększoną ilość ciał wtrętowych o znacznej gęstości elektronooptycznej. W 3 i 5 dniu po niedotlenieniu ich ilość wyraźnie wzrasta, pojawiają się również pojedyncze duże ciała wieloblaszkowe (ryc. 14). Szorstka siatka śródplazmatyczna zbudowana jest z krótkich kanałów pokrytych pojedynczymi rybosomami. Aparat Golgiego ulega rozrostowi, nieliczne mitochondria są małe, owalne lub okrągłe, o ciemnej macierzy i dość wyraźnych grzebieniach (ryc. 15).

W cytoplazmie komórek Schwanna obserwuje się znaczną ilość elektronooptycznie gęstych, różnokształtnych ciał wtrętowych. Podobnie jak w przypadku amficytów ich ilość zwiększa się w 3 i 5 dniu po działaniu anoksji (ryc. 16). W tym czasie szorstka siatka śródplazmatyczna występuje w postaci krótkich, pokrytych rybosomami kanałów. Niektóre komórki zawierają mikrotubule i mikrofilamenty. Mitochondria są nieliczne, wydłużone.

Już po upływie 24 godzin stwierdza się zmiany w budowie osłonek mielinowych. Występują zaburzenia w układzie blaszek mielinowych, polegające na rozwarstwieniu, zgrubieniu lub zlepieniu poszczególnych blaszek (ryc. 17).

**Hodowla 3-tygodniowa.** Neurony nie wykazują uchwytłych zmian (ryc. 18). Szorstka siatka śródplazmatyczna jest dość dobrze rozwinięta. Mitochondria w większości dobrze zachowane i nie uszkodzone. Zbiorniki aparatu Golgiego są lekko poszerzone, a w jego okolicy widoczna jest znaczna ilość struktur pęcherzykowych. W cytoplazmie niektórych komórek nerwowych zwraca uwagę dość duża ilość tworów okrągłych lub owalnych wypełnionych substancją homogeną o małej gęstości elektronooptycznej.



W komórkach satelitowych stwierdza się także obecność ciał wtrętowych, występujących w nieco mniejszej ilości niż w hodowlach 2-tygodniowych. W 3 i 5 dniu po niedotlenieniu zawartość tych ciał w cytoplazmie amficytów jest większa (ryc. 19).

Cytoplazma komórek Schwanna zawiera również ciała wtrętowe. Ilość ich wzrasta w 3 i 5 dniu po działaniu anoksji. Poza tym obserwuje się namnażanie blaszek podstawnych, układających się w równoległe pasma (ryc. 20). W pobliżu komórek Schwanna, obok dobrze wykształconych błon podstawnych sporadycznie stwierdzano delikatne włókienka o cechach ultrastrukturalnych przypominających kolagen (ryc. 21).

Ośłonki mielinowe wykazują zmiany w układzie blaszek. Obserwuje się ich zlepianie oraz rozwarstwienie dotyczące przeważnie powierzchniowych warstw osłonki. Większość wypustek osiowych jest prawidłowa.

Hodowla 4-tygodniowa. Tylko w 1 dniu po działaniu anoksji neurocyty wykazują poszerzenie zbiorników aparatu Golgiego oraz nagromadzenie struktur pęcherzykowatych w ich otoczeniu, podobne do opisanych w neuronach z hodowli 3-tygodniowej. W 3 i 5 dniu po niedotlenieniu w neuronach nie stwierdza się istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Mitochondria są liczne, duże (ryc. 22). Szorstka siatka śródplazmatyczna jest obfita, podobnie liczne są neurotubule. W 3 i 5 dniu po anoksji w cytoplazmie neurocytów obserwuje się nadal obfite ziarna glikogenu.

W cytoplazmie komórek satelitowych spostrzega się znaczną ilość tworów kulistych różnej wielkości, o nierównomiernej gęstości elektronooptycznej. Niektóre z nich wypełnione są substancją drobnoziarnistą, silnie rozprasającą elektrony, inne przypominają „dense bodies”. Sporadycznie występują ciała wielopęcherzykowe. Zbiorniki szorstkiej siatki śródplazmatycznej wypełnione są substancją homogenną o znacznej gęstości elektronooptycznej.

W cytoplazmie komórek Schwanna obserwuje się jedynie poszerzenie kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej, które wypełnione są substancją o podobnych właściwościach jak w amficytach. Ilość ciał wtrętowych jest znacznie mniejsza w porównaniu z hodowlami młodszymi (ryc. 23).

Ponadto stwierdza się różne stadia uszkodzenia osłonek mielinowych. Obok włókien z prawidłowo zachowanymi osłonkami spotyka się włókna, które wykazują zaburzenia w periodycznym układzie blaszek mielinowych. Dość często widać rozwarstwienie i poszerzenie przestrzeni pomiędzy blaszkami, niekiedy obserwuje się całkowite zatarcie struktury blaszek (ryc. 24).

## OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że przejściowe niedotlenienie zwojów czuciowych, przetrzymywanych w warunkach hodowli pozaustrojowej, prowadzi do uszkodzenia wszystkich ich elementów komórkowych — neurocytów, komórek satelitowych i komórek Schwanna. Stwierdzono przy tym wyraźną zależność nasilenia zmian patologicznych od wieku hodowli i typu komórek. Zastosowane warunki doświadczenia pozwalają odnieść stwierdzane nieprawidłowości do wpływu niedostatku tlenowego.

Neurocyty okazały się najmniej uszkodzonym elementem zwoju międykręgowego. Histologiczne cechy uszkodzenia wyrażające się tigrolizą i mikrowakuolizacją cytoplazmy występowały najwyraźniej w hodowlach 2-tygodniowych; w hodowlach starszych nie stwierdzano ich w ogóle (mikrowakuolizacja) lub miały znacznie mniejsze nasilenie (tigroliza). Wydaje się przy tym, że istotnym czynnikiem w tym przypadku jest stopień niedotlenienia, uzależniony od czasu przetrzymywania hodowli w warunkach beztlenowych. W poprzednich doświadczeniach (Kraśnicka i wsp. 1971) wykazano że przy 1-godzinnym niedotlenieniu mikrowakuolizacja cytoplazmy neurocytów występuje zarówno w hodowlach „młodych” jak i starszych. Mniejszą wrażliwość na niedotlenienie neurocytów w porównaniu z komórkami satelitowymi wykazali uprzednio Dolivo i wsp. (1967) oraz Rouiller i wsp. (1971) w badaniach nad wpływem anoksji na zwoje współczulne w warunkach hodowli *in vitro*. Podobnie Hills (1964), Bakay i Lee (1968) oraz Brown i Brierley (1971, 1972, 1973) w serii badań nad hipoksją ischemiczną *in vivo* wykazali bardziej zaawansowane zmiany patologiczne w komórkach glejowych niż w neurocytach.

Tigrolizę występującą najwyraźniej w hodowlach 2-tygodniowych i mniej zaawansowaną w hodowlach 3- i 4-tygodniowych uznać należy za uszkodzenie związane z przebytem niedotlenieniem, mimo to, że uwzględnić trzeba zwłaszcza w okresie najwcześniejszym możliwość zwyrodnienia osiowego związanego z uszkodzeniem wypustki osiowej w momencie pobierania materiału do hodowli (Kraśnicka 1969). Przemawia za tym porównanie obrazów stwierdzanych w materiale doświadczalnym i kontrolnym. Ultrastrukturalnym wykładnikiem tigrolizy stwierdzanej w mikroskopie świetlnym są zaburzenia struktury szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz zmniejszenie liczby polirybosomów obserwowane w mikroskopie elektronowym. Podczas gdy za ultrastrukturalny wykładnik zmian o charakterze mikrowakuolizacji cytoplazmy uznać należy zapewne obrzmienie cytoplazmatycznych struktur błoniastych, a przede wszystkim znaczne obrzmienie mitochondriów stanowiące dominujący element mikroskopowo-elektronowych nieprawidłowości struktury neuronów. Analogiczne zmiany w komórkach nerwowych mózgu szczura

stwierdzali Brown i Brierley (1968, 1973) w doświadczeniach nad hipoksją ischemiczną, uważając że mikrowakuolizacja cytoplazmy, związana z obrzmieniem mitochondriów stanowi najwcześniejszy morfologiczny objaw uszkodzenia neurocytu, poprzedzający jego typowe „schorzenie” ischemiczne. Stwierdzone przez nas obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w neurocytach wiązać należy zapewne z uszkodzeniem mitochondriów. Na podkreślenie zasługuje brak zmian w strukturze neurofibryli i uszkodzeń wypustek osiowych.

We wszystkich grupach czasowych hodowli zarówno w mikroskopie świetlnym jak i elektronowym stwierdzano gromadzenie się w cytoplazmie neuronów złogów glikogenu. Na ile ich obecność w hodowlach 2-tygodniowych może być uwarunkowana współdziałaniem dwóch czynników niedotlenienia i zwyrodnienia osiowego związanego z przecięciem aksonów, na tyle w hodowlach 3- a zwłaszcza 4-tygodniowych może być związane jedynie z przebytych niedotlenieniem. W równoczesnych hodowlach kontrolnych ulegają one bowiem w tym okresie znacznemu zmniejszeniu. Odkładanie glikogenu związane z reakcją aksonalną jest zjawiskiem przejściowym, a jego największe nasilenie przypada na 2 tydzień hodowli, zmniejszając się wyraźnie w późniejszych fazach wzrostu *in vitro* (Kraśnicka 1969). Gromadzenie się glikogenu w neurocytach w następstwie krótkotrwałej anoksji jest wykładnikiem zaburzeń w metabolizmie glukozy, stwierdzanym w różnych typach doświadczalnego niedotlenienia tkanki nerwowej zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* (Mosakowski i wsp. 1968; Klatzo i wsp. 1970, Ibrahim i wsp. 1970, Kraśnicka, Renkawek 1972). Większość wymienionych autorów zwraca uwagę na gleyową lokalizację złogów glikogenu oraz ich nieobecność w komórkach nerwowych. Long i wsp. (1972) zwracając uwagę na odkładanie się glikogenu wyłącznie w komórkach, które nie wykazują cech nieodwracalnego uszkodzenia, podkreślają, że występuje ono tylko w neurocytach wyposażonych w układy enzymatyczne niezbędne do jego syntezy. Ten typ komórek nerwowych reprezentują neurony zwojów międzykręgowych (Kraśnicka 1969), a gromadzeniu się wielocukru towarzyszą charakterystyczne zmiany aktywności enzymów metabolizujących glikogen.

Komórki satelitowe i komórki Schwanna wykazują bardziej zaawansowane cechy uszkodzenia niż neurony. W przeciwieństwie do komórek nerwowych zmiany patologiczne zarówno w amficytach jak i komórkach Schwanna występują we wszystkich grupach czasowych hodowli. Potwierdza to poprzednio wspomniane obserwacje Dolivo i wsp. (1967) oraz Rouillera i wsp. (1971), wskazujące na wysoką wrażliwość komórek satelitowych na niedotlenienie.

Zmiany patologiczne w komórkach Schwanna i amficytach wyrażają się gromadzeniem ziarnistości sudanofilnych w ich cytoplazmie, zaburze-

niami aktywności enzymów oksydacyjno-redukcyjnych, stwierdzanymi w mikroskopie świetlnym oraz obrzmieniem aparatu Golgiego, zubożeniem ilości mitochondriów i pojawianiem się obfitych śródplazmatycznych ciał wtrętowych, obserwowanymi w obrazach mikroskopowo-elektronowych. Wydaje się, że wspomniane ciała wtrętowe stanowią ultrastrukturalny odpowiednik ziarnistości sudanofilnych stwierdzanych w mikroskopie świetlnym.

Na szczególne podkreślenie zasługują zmiany w komórkach Schwanna, polegające na namnażaniu ich blaszek podstawnych, tworzących niekiedy równoległe układy oraz pojawianiu się w ich pobliżu delikatnych włókienek przypominających włókna kolagenowe. Spostrzeżenia te sugerują możliwość aktywnego udziału komórek Schwanna w kolagenozie. Podobną sugestią dotyczącą wytwarzania włókien kolagenowych przez komórki Schwanna przedstawiają Babel i wsp. (1970).

Równoczasowo ze zmianami w komórkach Schwanna występują zaburzenia mielinizacji i uszkodzenie osłonek mielinowych. Zaburzenia mielinizacji wyrażają się jej brakiem w hodowlach 2-tygodniowych w okresie po przebyciu incydencie anoksyjnym, podczas gdy w równoczesnych hodowlach kontrolnych na ten właśnie okres przypadają wczesne stadia formowania się osłonek. Uszkodzenia osłonek mielinowych występują w hodowlach już zmielinizowanych i polegają na zatarciu ich struktury, obrzmieniu i fragmentacji prowadzącej do całkowitego rozpadu. Pojawiają się one już po upływie 24 godzin od niedotlenienia i nasilają w dalszych okresach obserwacji. Uszkodzenie osłonek mielinowych w warunkach niedotlenienia jest zjawiskiem częstym. Jacob (1963) w badaniach porównawczych nad wpływem anoksji i zwyrodnieniem aksonalnym znajdował wcześniejszą i rozleglejszą demielinizację pod wpływem niedotlenienia, przy czym objawy demielinizacji występowały już w 24 godziny po incydencie anoksyjnym. Podobne spostrzeżenia poczyniono na ludzkim materiale sekcyjnym. Wichert (1966) obserwował demielinizację w 20 godzin po anoksji, a Scholz i Wechsler (cyt. za Jacobem 1963) stwierdzali objawy wczesnej pierwotnej demielinizacji w przypadku zatorów powietrznych.

Wyniki naszych badań, oparte o porównanie charakteru i nasilenia uszkodzeń komórek nerwowych i ich wypustek oraz komórek Schwanna sugerują, że w następstwie krótkotrwałego niedotlenienia w warunkach *in vitro* występuje pierwotne uszkodzenie osłonek mielinowych, u którego podłoża leżą strukturalne i metaboliczne uszkodzenia komórek Schwanna.

#### WNIOSKI

1. Krótkotrwała przejściowa anoksja zwojów międzykręgowych w hodowli pozaustrojowej wywołuje zmiany morfologiczne i metaboliczne we

wszystkich ich elementach strukturalnych, przy czym charakter i nasilenie zmian wykazują zależność od wieku hodowli i typu komórek.

2. Zmiany w komórkach nerwowych są mniej nasilone niż w amficytach i komórkach Schwanna oraz występują w największym nasileniu w najwcześniejszym okresie hodowli, podczas gdy w komórkach podporowych obecne są we wszystkich grupach czasowych doświadczenia.

3. Zaburzenia mielinizacji wyrażające się jej opóźnieniem oraz uszkodzenie osłonek mielinowych o cechach pierwotnej demielinizacji uwarunkowane są strukturalnym i metabolicznym uszkodzeniem komórek Schwanna.

З. Красницка, Г. Коновалов, Б. Гайковска

#### ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ НА СЕНСОРНЫЕ ГАНГЛИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ *IN VITRO*

##### Резюме

Целью настоящей работы было изучение влияния кратковременной и переходящей аноксии на нервную ткань, выдерживаемую в условиях культуры ткани. Исследования были приведены на культуре сенсорных ганглиев, изолированных из 9-дневных куриных эмбрионов. 2, 3 и 4-недельные культуры выдерживали в течение 30 минут в атмосфере азота, после чего переносили в нормальные для культур условия, в которых они оставались от 1 до 5 дней. Проведены гистологические, гистохимические и гистоэнзиматические исследования, которые дополнялись исследованиями в электронном микроскопе.

Установлено, что кратковременная аноксия вызывает нарушения во всех морфологических элементах сенсорного ганглия. Было показано качественное и количественное различие послеоаноксических нарушений в зависимости от типа клеток и возраста культуры. Самые большие нарушения обнаруживают нейроны в 2-недельных культурах, в то время как накопление гликогена наблюдается также и в более старых культурах. В клетках-спутниках и Шванновских клетках наблюдаются нарушения в каждый период роста культуры и самые достоверные из них проявляются в накоплении в цитоплазме включений, содержащих жировые вещества. Кроме того Шванновские клетки в 3- и 4-недельных культурах обнаруживают изменения в клеточной оболочке. Повреждение миелина вероятно зависит от нарушений, наблюдаемых в Шванновских клетках.

Z. Kraśnicka, H. Konowałow, B. Gajkowska

#### EFFECT OF SHORT-TERM ANOXIA ON SENSORY GANGLIA CULTURED *IN VITRO*

##### Summary

The aim of this work was to examine the effect of short-term transitory anoxia on the nerve tissue maintained in the conditions of tissue culture. The studies were performed on the cultures of sensory ganglia isolated from 9-day chick embryos. The cultures in the age of 2, 3 and 4 weeks were maintained for

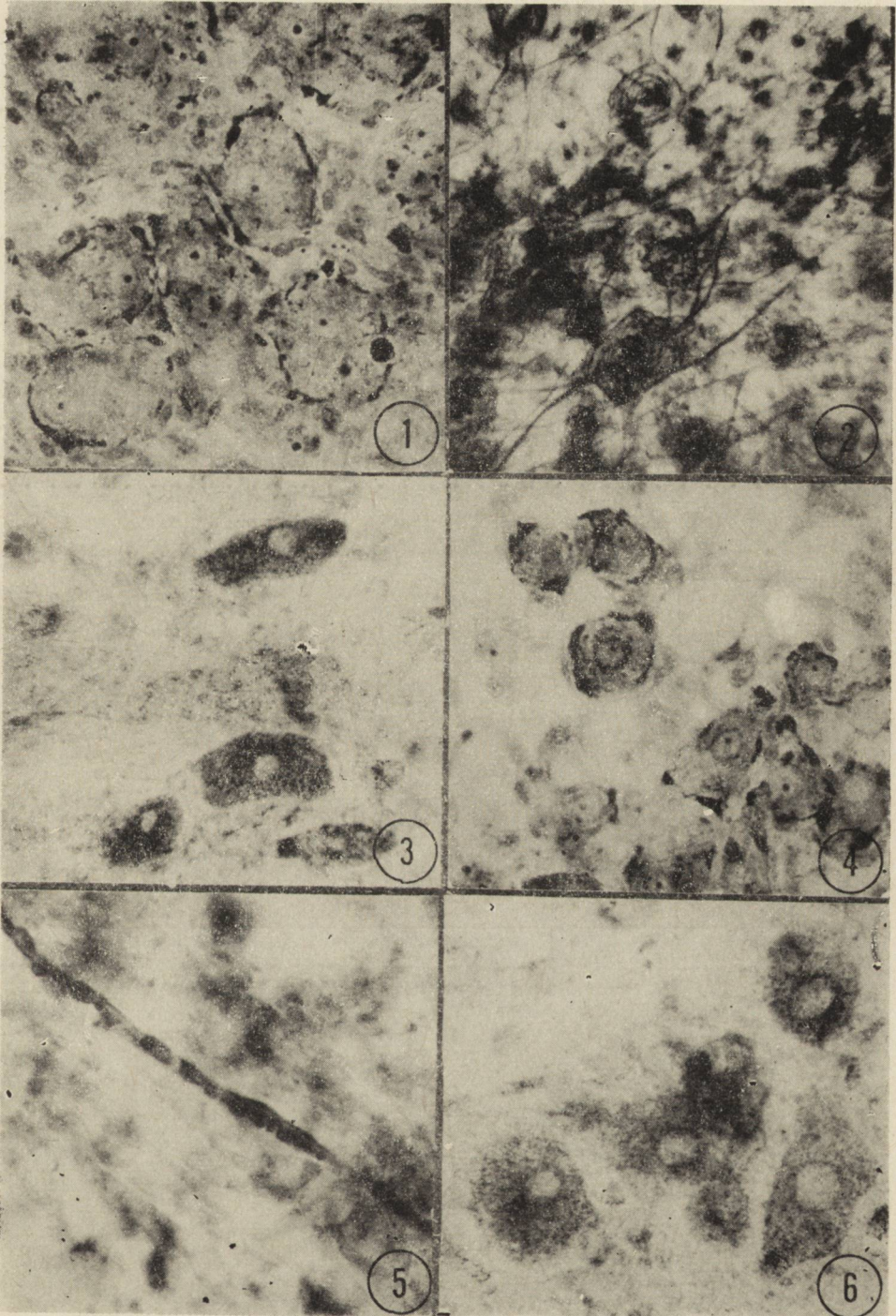
30 min. in nitrogen, whereupon they were transferred to normal conditions and cultivated for the period of 1—5 days. Histological, histochemical, histoenzymatic and electron microscopic studies were carried out. Short-term anoxia was found to produce changes in all morphological elements of the sensory ganglion. Quantitative and qualitative differences between the postanoxic lesions in the particular cell types were demonstrated, this being related to the age of the cultures. The neurocytes showed the most significant changes in the 2-week cultures, whereas glycogen accumulation was to be observed also in the older cultures. The satellite- and Schwann cells exhibited changes in each period of growth, the most significant of them consisting in the accumulation in the cytoplasm of inclusion bodies containing fatty substances. Moreover, the Schwann cells in 3- and 4-week cultures show changes in the cell membrane. The degradation of myelin appears to be related to the changes observed in the Schwann cells.

## PIŚMIENNICTWO

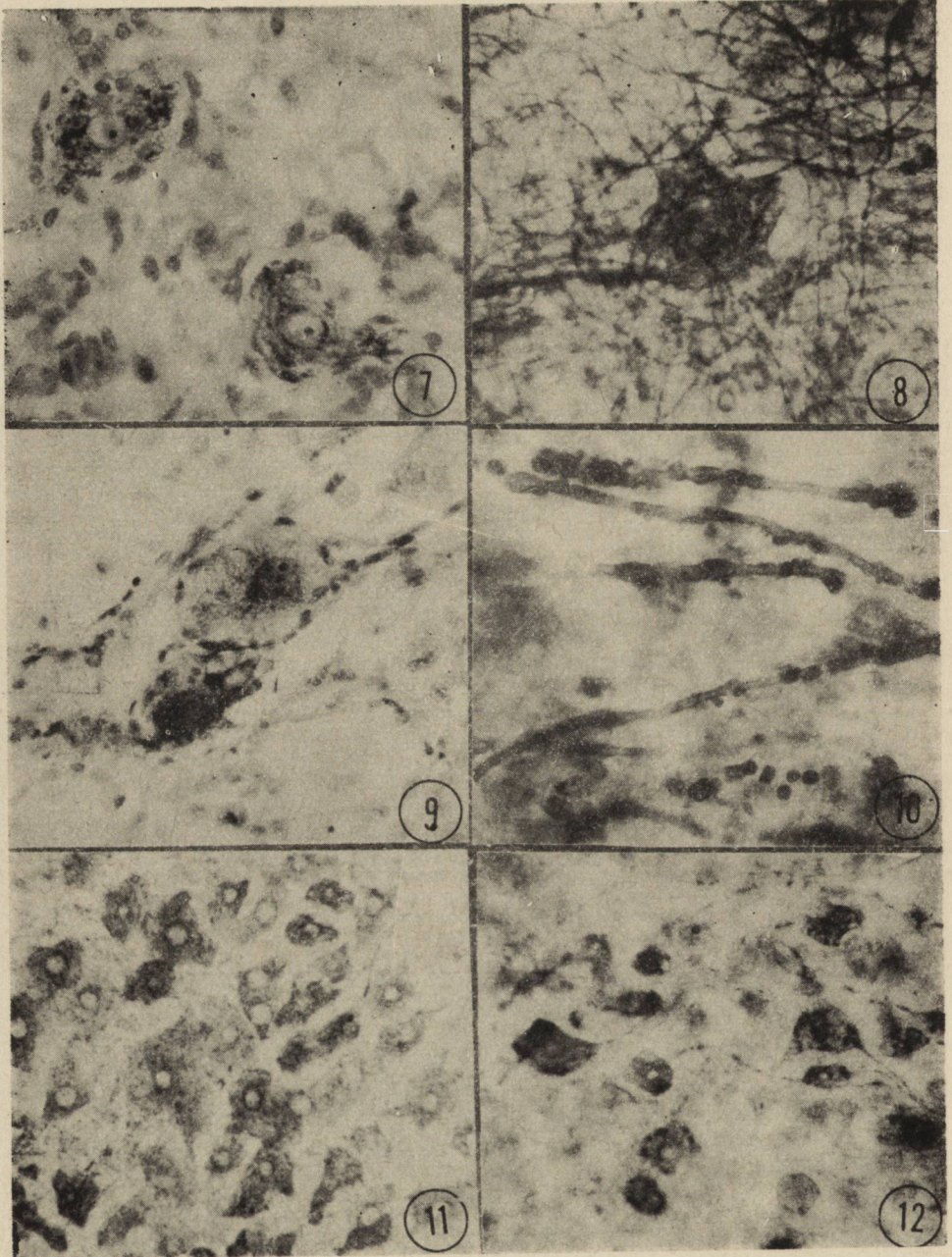
1. Babel J., Bischoff D., Spöndlin H.: Ultrastructure of the peripheral nervous system and sense organs. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1970
2. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain* 1968, 91, 697—706
3. Borowicz J. W., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych in vitro do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 9, 691—697
4. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat as dened by the optical microscope. *Brit. J. Exp. Path.* 1968, 49, 87—106
5. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature and time course of anoxic-ischaemic cell change in the rat brain. An optical and microscope study. In: *Brain hypoxia*. Ed. Brierley J. B. and Meldrum B. S., London, Heinemann 1971, 40—60
6. Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischemic cell change in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. *J. Neurol. Sciences* 1972, 16, 59—84
7. Brown A. W., Brierley J. B.: The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 23, 9—22
8. Dolivo M., Foroglou-Kerameus Ch., Kocsis M., Rouiller Ch., Nicolescu P.: Alterations et fonctionnement du tissue nerveux au cours de l'anoxie in vitro. *J. Physiol.* 1967, 59, 393
9. Hills C. P.: The ultrastructure of anoxic-ischaemic lesions in the cerebral cortex of the adult rat brain. *Guy's Hosp. Rep.* 1964, 113, 333—348
10. 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, 404—415
11. Jacob H.: Patterns of CNS vulnerability. CNS tissue and cellular pathology in hypoxaemic states. In: „Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia”. Ed. Schade, McMenemy, 1963, 153—163
12. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson V.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. *Proc. Vith Intern. Congress Neuropath., Paris*, Ed. Masson et Cie, 1970 351—365.

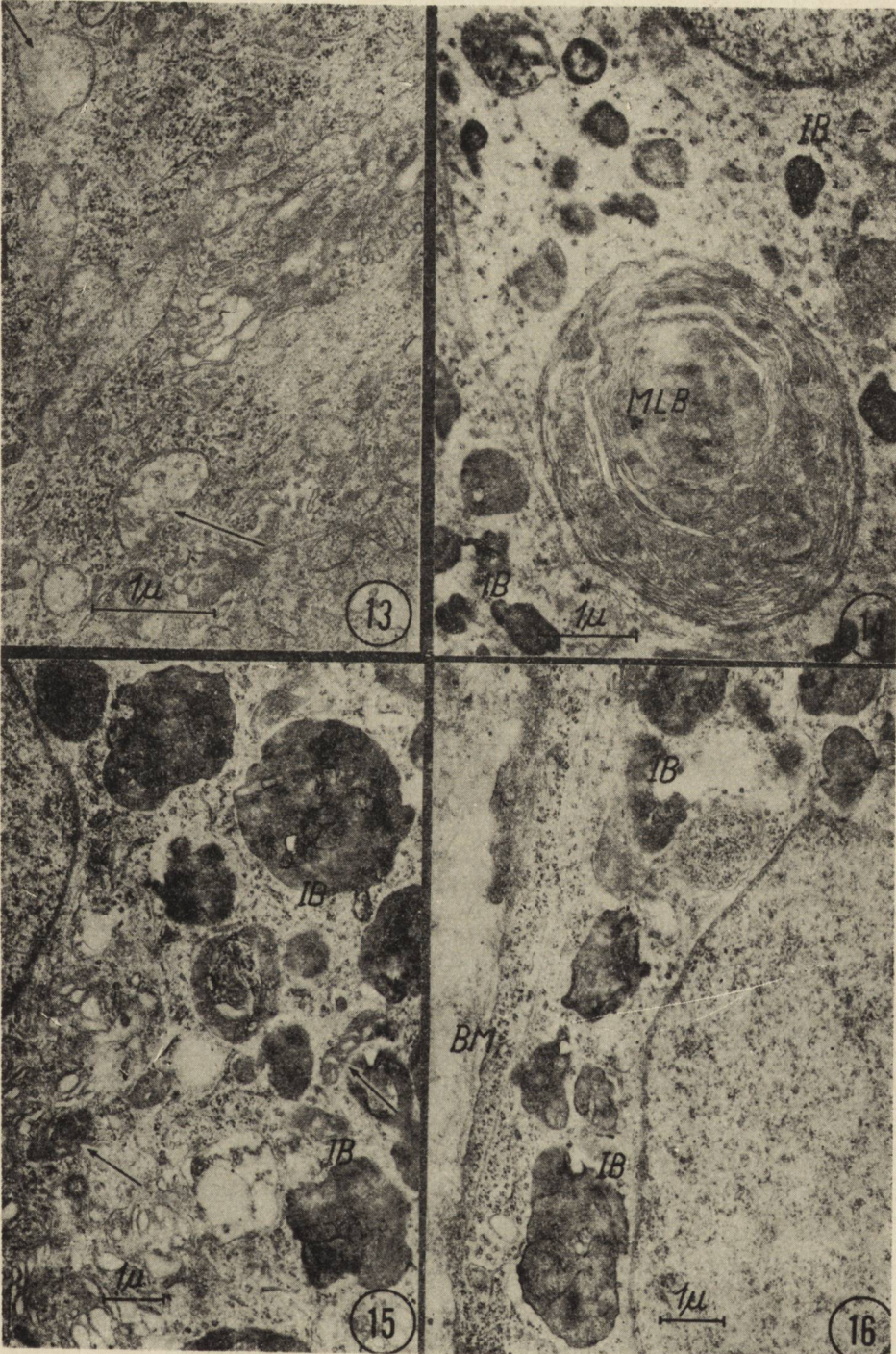
13. Kraśnicka Z.: Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju zarodkowym. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 395—434
14. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Obraz morfologiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 115—123
15. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J., Renkawek K.: Morphologie et histochemie de neurones de ganglions spinaux cultivés in vitro dans le conditions d'anoxie. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 93—101
16. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 507—518
17. Kraśnicka Z., Renkawek K., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz ultrastrukturalny komórek glejowych hodowanych in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 399—404
18. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335—347
19. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Rodriguez de Curet H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516
20. Rouiller 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
21. Scholz P., Wechsler C.: cyt. wg Jacob H. 1963, poz. 12
22. Wichert T. M.: Izmienienija w centralnoj nierwnoj systemie pri dlitelnoj circulatornoj gipoksiu. *Archiw Patologii* 1966, 21, 63—68

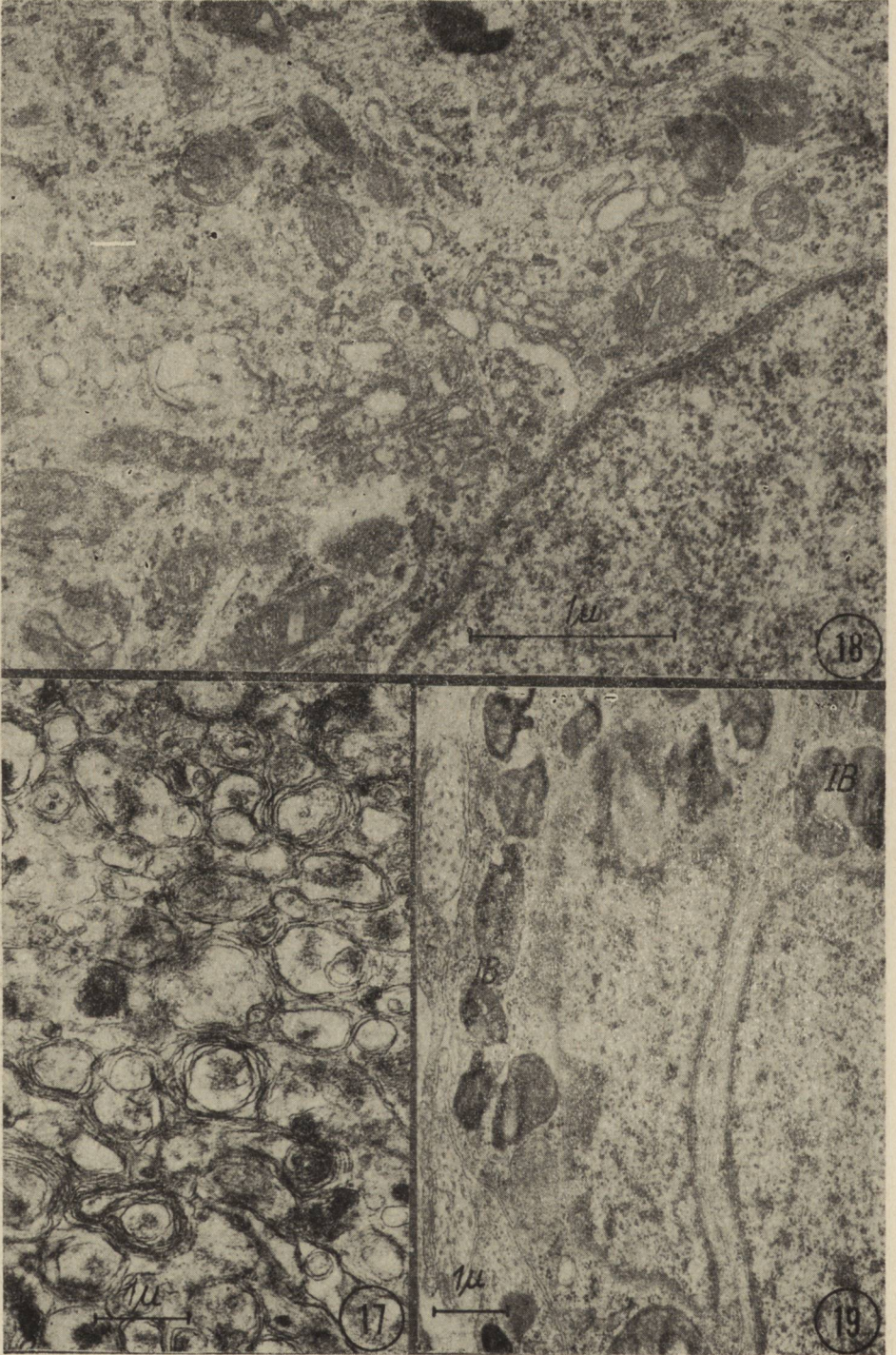
Adres doc. dr Z. Kraśnickiej — Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i IKlinicznej PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.

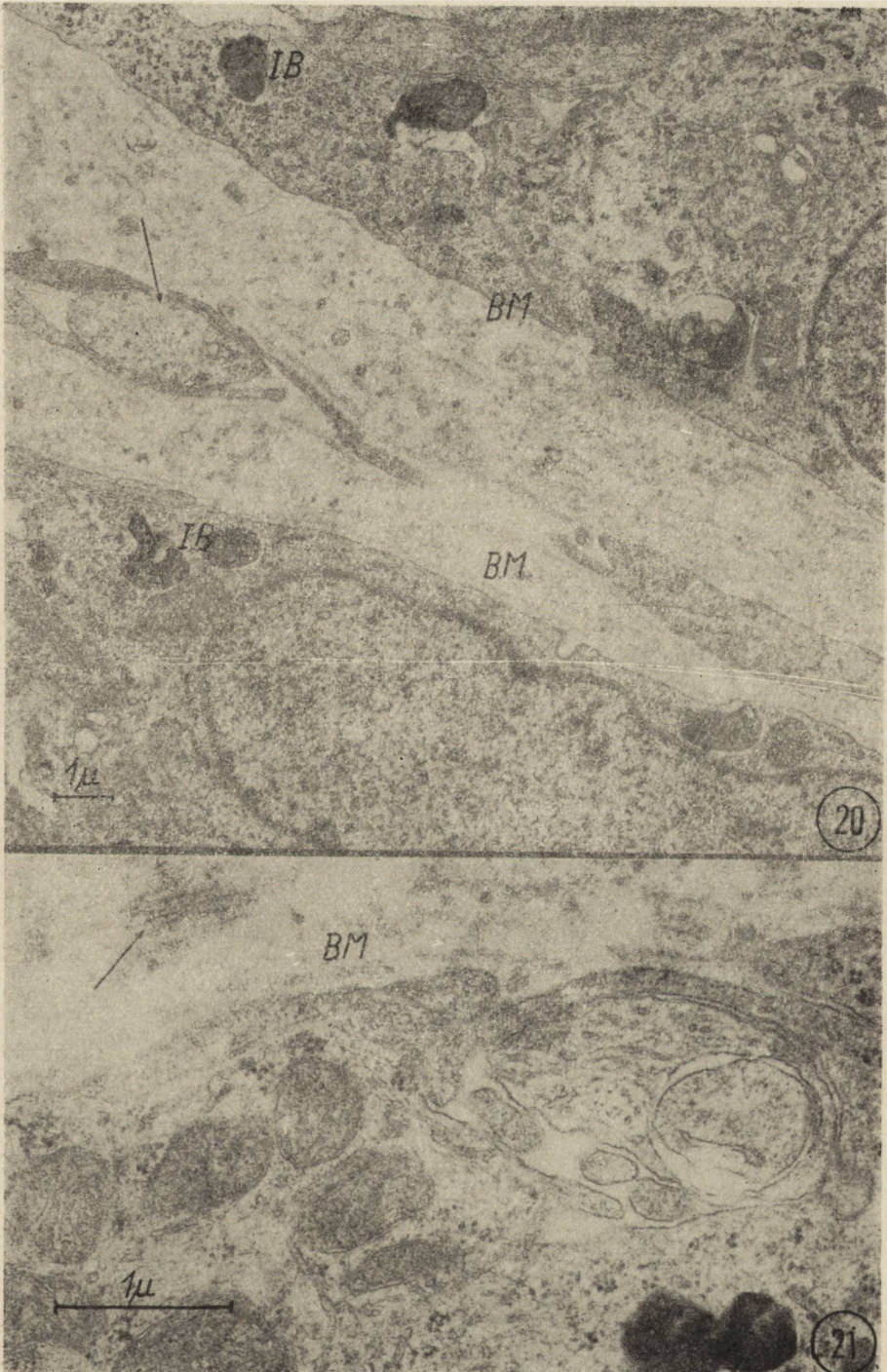


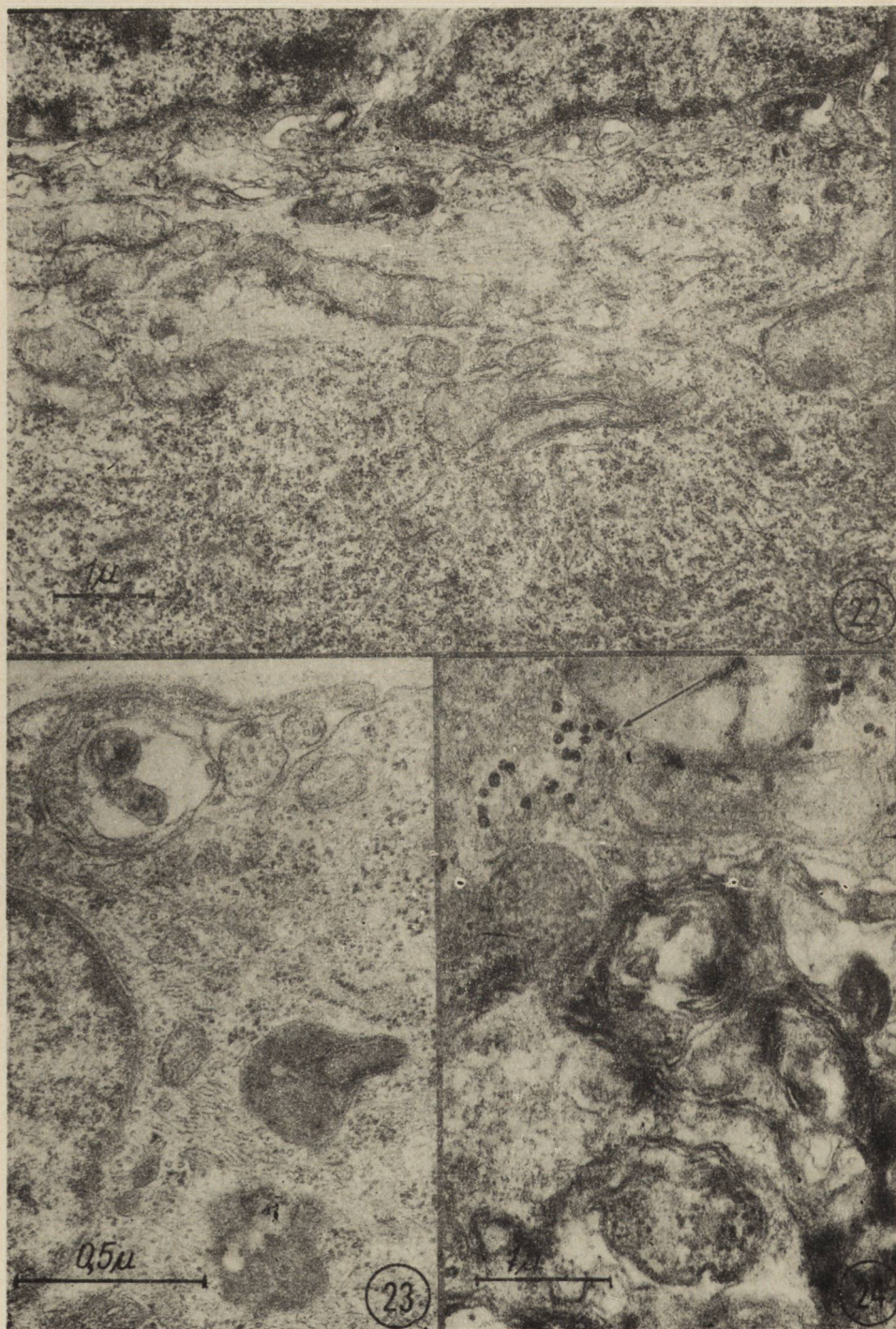












## PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Hodowla 2-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Znaczny rozpad tigroidu. Bł. toluid. Pow. 400 ×.

*Fig. 1.* 2-week culture, 3 days after anoxia. Marked disaggregation of tigroid. Toluid. blue. × 400.

*Ryc. 2.* Hodowla 2-tyg., 3 dni po niedotlenieniu. Dobrze wyimpregnowane aksony i neurofibryle. Met. Bodiana. Pow. 200 ×.

*Fig. 2.* 2-week culture, 3 days after anoxia. Well impregnated axons and neurofibrilles. Bodian meth. × 200.

*Ryc. 3.* Hodowla 2-tyg., 4 dni po niedotlenieniu. Wysoka aktywność LDH w neurocytach. Pow. 400 ×.

*Fig. 3.* 2-week culture, 4 days after anoxia. High LDH activity in neurocytes. × 400.

*Ryc. 4.* Hodowla 3-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Nieznaczne uszkodzenie komórek zwoju czuciowego. Bł. toluid. Pow. 200 ×.

*Fig. 4.* 3-week culture, 3 days after anoxia. Slight damage of sensory ganglion cells. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 5.* Hodowla 3-tygod., 1 dzień po niedotlenieniu. Obrzmienie mieliny, ziarnistości sudanofilne w komórce Schwanna. Pow. 1 000 ×.

*Fig. 5.* 3-week culture, 1 day after anoxia. Myelin swelling, lipid granules in Schwann cell. × 1 000.

*Ryc. 6.* Hodowla 3-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Pow. 400 ×.

*Fig. 6.* 3-week culture, 5 days after anoxia. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. 400 ×.

*Ryc. 7.* Hodowla 4-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Dobrze zachowane neurocyty z widoczną substancją Nissla, oraz obrzmienie jąder amficytów i komórek Schwanna. Pow. 400 ×.

*Fig. 7.* 4-week culture, 3 days after anoxia. Well preserved neurocytes with visible Nissl substance, swelling of amphicytes and Schwann cells nuclei. × 400.

*Ryc. 8.* Hodowla 4-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Wyimpregnowane włókna nerwowe i neurofibryle. Met. Bodiana. Pow. 400 ×.

*Fig. 8.* 4-week culture, 3 days after anoxia. Impregnated nerve fibres and neurofibrilles. Bodian meth. × 400.

*Ryc. 9.* Hodowla 4-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Neurocyty z dużą ilością ziaren glikogenowych. PAS-dimedon. Pow. 400 ×.

*Fig. 9.* 4-week culture, 5 days after anoxia. Neurocytes with large amounts of glycogen granules. PAS-dimedone. × 400.

*Ryc. 10.* Hodowla 4 tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Różne stadia uszkodzenia zmielinizowanych włókien. Pow. 1 000 ×.

*Fig. 10.* 4-week culture, 3 days after anoxia. Various stages of degradation of myelin fibres. × 1 000.

*Ryc. 11.* Hodowla 4-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Wyraźna aktywność SDH w neurocytach. Pow. 200 ×.

*Fig. 11.* 4-week culture, 3 days after anoxia. Significant SDH activity in neurocytes. × 200.

*Ryc. 12.* Hodowla 4-tyg., 5 dni po niedotlenieniu. Wysoka aktywność G-6-P-DH w neurocytach i wypustkach. Pow. 200 ×.

*Fig. 12.* 4-week culture, 5 days after anoxia. High G-6-P-DH activity in neurocytes and processes. × 200.

*Ryc. 13.* Hodowla 2-tygod., 3 dni po niedotlenieniu. Fragment neurocytu. Znacznie rozbudowany aparat Golgiego, uszkodzone mitochondria (strzałka).

*Fig. 13.* 2-week culture, 3 days after anoxia. Neurocyte fragment. Well developed Golgi apparatus, damaged mitochondria (arrow).

*Ryc. 14.* Hodowla 2-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki satelitarnej z olbrzymim ciałem wieloblaszkowym (MLB), obok drobne i liczne ciała wtrętowe (IB).

*Fig. 14.* 2-week culture, 5 days after anoxia. Fragment of satellite cell with giant multilamellary body (MLB), numerous small inclusion bodies (IB).

*Ryc. 15.* Hodowla 2-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki satelitarnej z dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego, nieliczne mitochondria (strzałka), duża ilość ciał wtrętowych (IB).

*Fig. 15.* 2-weeks culture, 5 days after anoxia. Fragment of satellite cell with well developed Golgi apparatus, few mitochondria (arrow), great number of inclusion bodies (IB).

*Ryc. 16.* Hodowla 2-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki Schwanna z dużą ilością ciał wtrętowych (IB), widoczna błona podstawna (BM).

*Fig. 16.* 2-weeks culture, 5 days after anoxia. Fragment of Schwann cell with great number of inclusion bodies (IB), distinct basal membrane is visible (BM).

*Ryc. 17.* Hodowla 2-tygod., 1 dzień po niedotlenieniu. Pęczek włókien w początkowym okresie mielinizacji. Liczne włókna wykazują zaburzenie w układzie blaszek mielinowych.

*Fig. 17.* 2-weeks culture, 1 days after anoxia. Fibres bundle in the initial stage of myelination. Numerous fibres showing disturbances in the arrangement of myelin lamellae.

*Ryc. 18.* Hodowla 3-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki nerwowej. Nieznacznie poszerzony aparat Golgiego. Szorstka siatka śródplazmatyczna o krótkich kanałach. Mitochondria o ciemnej macierzy i wyraźnych grzebieniach.

*Fig. 18.* 3-weeks culture, 5 days after anoxia. Nerve cell fragment. Slightly dilated Golgi apparatus. Granular endoplasmic reticulum with short channels. Mitochondria with dark matrix and distinct cristae.

*Ryc. 19.* Hodowla 3-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragmenty dwóch komórek satelitarnych zawierające dużą ilość ciał wtrętowych (IB).

*Fig. 19.* 3-week culture, 5 days after anoxia. Fragments of two satellite cells containing great amounts of inclusion bodies (IB).

*Ryc. 20.* Hodowla 3-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragmenty dwóch komórek Schwanna. Namnożenie błony podstawnej (BM). W cytoplazmie ciała wtrętowe (IB) i mitochondria. Pomiedzy dwiema komórkami Schwanna widoczny akson otoczony przez wypustki komórki Schwanna (strzałka).

*Fig. 20.* 3-week culture, 5 days after anoxia. Fragments of two Schwann cells with multiplication of basal membrane (BM), in cytoplasm inclusion bodies (IB) and mitochondria. Between two Schwann cells axon surrounded by Schwann cell processes (arrow).

*Ryc. 21.* Hodowla 3-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki Schwanna otaczającej aksony. Dobrze wykształcona blaszka podstawna (BM). W pobliżu komórki Schwanna delikatne włókienka przypominające włókna kolagenowe (strzałka).

*Fig. 21.* 3-weeks culture, 5 days after anoxia. Fragment of Schwann cell surrounding axons. Well developed basal membrane (BM). In the vicinity of Schwann cell-tiny fibres resembling collagen fibres (arrow).

*Ryc. 22.* Hodowla 4-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki nerwowej o niezmięnionej strukturze. W sąsiedztwie dwie komórki satelitarne.

*Fig. 22.* 4-week culture, 5 days after anoxia. Nerve cell fragment of unchanged structure. In the vicinity two satellite cells.

*Ryc. 23.* Hodowla 4-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki Schwanna z dość dobrze zachowaną ultrastrukturą. Aksony otoczone przez wypustki komórki Schwanna.

*Fig. 23.* 4-week culture, 5 days after anoxia. Schwann cell fragment with relatively well preserved ultrastructure. Numerous axons surrounded by Schwann cell processes.

*Ryc. 24.* Hodowla 4-tygod., 5 dni po niedotlenieniu. Pęczek włókien nerwowych z zaburzoną strukturą blaszek mielinowych. W cytoplazmie komórki Schwanna liczne ziarna glikogenowe (strzałka).

*Fig. 24.* 4-week culture, 5 days after anoxia. Nerve fibres bundle with disturbed structure of myelin lamellae. Numerous glycogen grains in the Schwann cell cytoplasm (arrow).

BARBARA HOPPE

OBRAZ ZMIAN STRUKTURALNYCH I HISTOCHEMICZNYCH GLEJU  
HODOWANEGO *IN VITRO*  
PODDANEGO DZIAŁANIU TLENKU WĘGLA

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

Uszkodzające działanie tlenku węgla na organizm zwierzęcy jest związane z jednej strony z zahamowaniem transportu tlenu w następstwie wytwarzania hemoglobiny tlenowęglowej, z drugiej zaś z blokowaniem tlenowego metabolizmu wewnątrzkomórkowego na poziomie układu enzymów oddechowych.

Udział mechanizmu hipoksyjnego, wynikającego z wysokiego powinowactwa tlenku węgla do hemoglobiny, przewyższającego u człowieka 240-krotnie powinowactwo tlenu (Forbes 1970) jest ogólnie przyjęty w uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącego narząd o najwyższej, obok mięśnia sercowego, wrażliwości na działanie CO. Mniej jednoznaczne jest bezpośrednie cytotoksyczne działanie tlenku węgla na elementy miąższowe ośrodkowego układu nerwowego, podkreślane m. in. przez Bändera i Kiese (1955). Wiąże się to z nie wyjaśnionym zagadnieniem przechodzenia CO z krwi do tkanki nerwowej przez układ bariery krew—mózg, zwłaszcza wobec jego stosunkowo niskiej rozpuszczalności w surowicy krwi (Coburn 1970). Schwedenberg (1959) przypuszcza, że wolny tlenek węgla przedostaje się do tkanki nerwowej wraz z płynem obrzękowym, jednakże szereg badań doświadczalnych wskazuje, że obrzęk mózgu nie jest zjawiskiem stałym w zatruciu tlenkiem węgla (Miyagishi, Suwa 1969, Korthals i wsp. 1973). Graziani i Guariano (1956) nie stwierdzali tlenku węgla w mózгах zwierząt przetrzymywanych przez okres 30 minut w atmosferze tlenku węgla. Ponadto Ball i wsp. (1951) wykazali, że w warunkach *in vitro* wiązanie tlenku węgla z oksydazą cytochromową zachodzi jedynie przy bardzo znacznym obniżeniu zawartości tlenu.

Celem podjętych badań była ocena bezpośredniego cytotoksycznego działania tlenku węgla na elementy komórkowe tkanki nerwowej prze-



trzymywanej w warunkach hodowli pozaustrojowej, a więc w sytuacji wyłączającej działanie układów barierowych istniejących w układzie nerwowym *in situ* i eliminującej mechanizmy hipoksyjne, związane z upośledzeniem transportu tlenu. Stworzony układ doświadczalny zapewniał bowiem prawidłową zawartość tlenu w atmosferze hodowli.

#### MATERIAŁ. I METODY

Badania przeprowadzono na hodowlach tkankowych mózdzku jednodniowych noworodków szczurzych, prowadzonych rutynowo wg metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Hodowle 1-, 2- i 3-tygodniowe przetrzymywano przez zmienny okres czasu w zmodyfikowanych dwusztykowych flaszkiach Carrela w atmosferze mieszaniny gazowej o składzie: 20% — O<sub>2</sub>, 70% — N<sub>2</sub>, 10% — CO. Tlenek węgla otrzymywano metodą laboratoryjną przez rozkład kwasu szczawiowego, pH medium hodowlanego przed i po doświadczeniu wynosiło 7,2—7,4. Badania przeprowadzono w trzech grupach doświadczalnych:

Grupa I — hodowle przetrzymywane przez 1, 12 i 24 godziny w atmosferze tlenku węgla, a następnie bezpośrednio poddawane opracowaniu histologicznemu i histochemicznemu. Celem badań w tej grupie była ocena wpływu różnoczasowego przebywania hodowli w atmosferze CO na ich obraz morfologiczny i histochemiczny.

Grupa II — hodowle przetrzymywane przez 1 godzinę w atmosferze tlenku węgla, a następnie przenoszone na 1 i 24 godziny do warunków standardowych. W tej grupie chodziło o ocenę odwracalności zmian i dynamiki uszkodzeń wywołanych krótkotrwałym działaniem tlenku węgla.

Grupa III — stanowiąca uzupełnienie grupy II — hodowle przetrzymywane przez 7, 15 i 30 minut w atmosferze tlenku węgla a następnie przenoszone do warunków standardowych na 2, 4, 6, 24, 48, 72 i 96 godzin. Celem badań objętych tą grupą była ocena gromadzenia się glikogenu i zmian w aktywności enzymów metabolizujących glikogen.

Badanie histologiczne przeprowadzono na hodowlach barwionych błękitem toluidyny po ich uprzednim utrwaleniu w płynie Carnoya i impregnowanych sposobem Gallyasa.

Badanie histochemiczne obejmowało ocenę aktywności następujących enzymów oksydoredukcyjnych: dehydrogenaza mleczanowa, bursztynianowa, glutaminowa, glukozo-6-fosforanowa i oksydaza cytochromowa oraz hydrolitycznych: fosfataza kwaśna i esteraza nieswoista. Wszystkie odczyny histoenzymatyczne wykonywano wg metod podanych przez Pearse'a (1972).

W grupie II wykonano ponadto barwienia metodą PAS i PAS-dime-don (Bulmer 1959) oraz odczyny histochemiczne ujawniające aktywność fosforylazy a (Takeuchi, Kuriaki 1955) oraz UDPG-g-transferazy (Takeuchi, Glenner 1961). Wymienione wyżej odczyny stanowiły jedyny przedmiot badań w III grupie.

Wybrane hodowle grupy I i II poddano również badaniu w mikroskopie elektronowym\*). Hodowle utrwalano na szkiełkach w 3% roztworze aldehydu glutarowego w fosforanowym buforze Milloniga o pH 7,3 przez 1 godz., a następnie w 1% OsO<sub>4</sub> przez 1 godz. Utrwalone hodowle zdejmowano ze szkiełek, odwadniano w alkoholu i tlenku propylenu, po czym zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki krojono z wyselekcjonowanych pól ze środkowej części pasa wzrostu. Skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oglądano w mikroskopie elektronowym JEM — 7A.

Kontrolę doświadczenia stanowiły hodowle odpowiedniego wieku nie poddane działaniu CO.

#### WYNIKI

Grupa I. Uzyskane obrazy histologiczne, histochemiczne i mikroskopowo-elektronowe wykazywały uwarunkowanie zmian od czasu działania tlenku węgla i stopnia zróżnicowania hodowli. Jednogodzinne działanie tlenku węgla wywoływało najbardziej zaawansowane zmiany w grupie hodowli najmłodszych (1-tygodniowych). Należy przy tym dodać, że hodowle w tym okresie wzrostu są najtrudniejsze do oceny morfologicznej w mikroskopie świetlnym, ze względu na grubość eksplantatu, jego nieprzezierność, pokrycie makrofagami, skąpość strefy wzrostu i niskie zróżnicowanie jej elementów komórkowych. Zmiany histologiczne w grupie hodowli poddanych działaniu tlenku węgla przez 1 godzinę wyrażały się obrzmieniem wszystkich komórek glejowych (ryc. 1), zwłaszcza astrocytów, znacznego stopnia obniżeniem ich barwliwości i zdolności impregnacyjnych oraz zanikiem i uszkodzeniem wypustek komórkowych (ryc. 2). Astrocyty wykazywały zatarcie błony komórkowej, powiększenie jąder i zatarcie ich struktury, oraz zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy i wypustek. W oligodendrocytach najbardziej istotną zmianą było zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy oraz rozpad ich wypustek. Zwraçało uwagę wyraźne w porównaniu z kontrolą zmniejszenie liczby tych komórek. Mikroglej występujący w postaci

\*) Analiza obrazu mikroskopowo-elektronowego zmian stanowi przedmiot odrębnego opracowania: J. Korthals, B. Hoppe, H. Karwacka „Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową *in vitro*”. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 3, 315—322.

form pałeczkowatych, pełzakowatych i makroflagów wykazywał nieznaczne cechy obrzmienia oraz umiarkowane zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy i wypustek. Nieprzezierność eksplantatu uniemożliwiała ocenę neuronów.

Badanie histochemiczne wykazało obniżenie aktywności wszystkich enzymów oksydacyjno-redukcyjnych i hydrolitycznych we wszystkich postaciach gleju, w porównaniu do hodowli kontrolnych. Jednakże utrzymane były występujące w normie między poszczególnymi rodzajami gleju różnice w natężeniu reakcji enzymatycznych i rozmieszczeniu jej produktów.

W badaniu mikroskopowo-elektronowym stwierdzono zmiany patologiczną zarówno w części perikarialnej jak i w wypustkach astrocytów i oligodendrocytów. Polegały one na występowaniu licznych, stosunkowo niewielkich wodniczek, z których część była otoczona pojedynczą błoną, a część była nieobłonią. Często widoczna była ciągłość między wakuolami i światłem kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej.

Ten sam czas działania tlenu węgla na hodowle starsze (2 i 3-tygodniowe) prowadził do występowania zmian histologicznych i histoenzymatycznych, których charakter był identyczny jak w hodowlach młodszych, ale ich nasilenie wykazywało wyraźne zróżnicowanie. Hodowle w tym okresie czasu były lepiej zróżnicowane, z łatwością wyróżniało się poszczególne typy komórek glejowych, w eksplantacie możliwe było zidentyfikowanie komórek nerwowych różnego typu. Populacja komórkowa strefy wzrostu była bardziej obfita niż w hodowlach 1-tygodniowych. Najbardziej uszkodzone były komórki obwodowej strefy wzrostu, podczas gdy eksplantat i jego bezpośrednie otoczenie nie wykazywały istotnych zmian w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Sporadycznie obserwowano w neuronach położonych w obwodowej części eksplantatu tigrilizę i zmniejszenie barwliwości.

Dwunastogodzinne działanie tlenu węgla na hodowle najmłodsze prowadziło do znacznego nasilenia zmian opisanych poprzednio (ryc. 3). Zwraçało uwagę zmniejszenie ilości komórek przede wszystkim oligodendrocytów, oraz znikoma liczba mitoz w hodowli. Spotykano liczne komórki glejowe pozbawione wypustek i cytoplazmy, przypominające tzw. nagie jądra oraz liczne grudki materiału chromatynowego, stanowiące pozostałość po rozpadłych komórkach. Aktywność wszystkich badanych enzymów uległa wybitnemu obniżeniu, ponadto spotykano całe okszary komórek pozbawionych aktywności enzymatycznej. Zanikła różnica w stopniu nasilenia niektórych reakcji enzymatycznych między astro- i oligodendroglejem.

W hodowlach starszych, w przeciwieństwie do hodowli tych samych grup wieku poddanych 1-godzinnejmu działaniu tlenu węgla, zmiany

dotyczyły zarówno eksplantatu jak i całej strefy wzrostu i obejmowały wszystkie rodzaje komórek. Zmiany w gleju były identyczne jak w grupie 1-tygodniowej. Neurony wykazywały zaawansowaną tigrilizę (ryc. 4), obniżenie barwliwości i zwyrodnienie neurofibrili. W badaniu histoenzymatycznym stwierdzono znaczne obniżenie aktywności wszystkich enzymów w całej populacji komórkowej hodowli (ryc. 5).

24-godzinne działanie tlenu węgla prowadziło do prawie całkowitego zniszczenia komórek glejowych w hodowlach najmłodszych, a w starszych do równie zaawansowanego uszkodzenia strefy wzrostu hodowli. W eksplantatach hodowli 2- i 3-tygodniowych spotykano niewielką ilość zachowanych elementów komórkowych, wykazujących daleko zaawansowane zmiany typu opisanego powyżej (ryc. 6). Komórki te wykazywały jedynie śladową aktywność enzymatyczną (ryc. 7). W obrazach mikroskopowo-elektronowych stwierdzono występowanie dużych wakuoli, powstających prawdopodobnie w wyniku zlewania się mniejszych wodniczek. W licznych komórkach glejowych, które uległy wakuolizacji zdeintegrowana cytoplazma przybierała wygląd plastra miodu (ryc. 8).

Grupa II. Hodowle wszystkich grup wieku, przetrzymywane przez 1 godzinę w atmosferze tlenu węgla, a następnie 1 godzinę w atmosferze powietrza nie różniły się obrazem histologicznym i histoenzymatycznym od analogicznych grup badanych bezpośrednio po godzinnej ekspozycji.

Istotne różnice dotyczyły hodowli, których czas przetrzymywania w normalnej atmosferze przedłużono do 24 godzin. Niezależnie od okresu wzrostu hodowli natężenie zmian było mniejsze niż bezpośrednio po działaniu tlenu węgla. Największe uszkodzenie wykazywały oligodendrocyty (ryc. 9) i neurony (ryc. 10), najmniejsze komórki mikrogleju. Komórki glejowe miały wyraźniej utrzymaną błonę komórkową, mniej nasilone zmiany wodniczkowe w cytoplazmie (ryc. 11), mniejsze uszkodzenie jąder i wypustek. W hodowlach 2- i 3-tygodniowych zwracała uwagę obfitość makrofagów, makrofagopodobnych form glejowych (ryc. 12), sporadycznie spotykano natomiast wielojądrzaste komórki olbrzymie. Wśród pól uszkodzonych komórek glejowych, spotykano wyspy komórek niemal zupełnie prawidłowych. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, glutaminowej i oksydazy cytochromowej była nadal obniżona podobnie jak w hodowlach przetrzymywanych tylko przez 1 godzinę w warunkach prawidłowych, natomiast aktywność dehydrogenazy mleczanowej (ryc. 13) i glukozy-6-fosforanowej odbiegała tylko nieznacznie od obrazów stwierdzanych w hodowlach kontrolnych. Aktywność enzymów hydrolitycznych fosfatazy kwaśnej i esterazy nieswoistej wykazywała wyraźny wzrost, szczególnie zaznaczony w grupie hodowli 3-tygodniowych. W cytoplazmie i wypustkach astrocytów, a w mniejszym stopniu

oligodendrocytów i mikrogleju występowały obfite ziarnistości PAS-dodatnie, nie mające charakteru glikogenu. W żadnej serii tej grupy nie stwierdzono aktywności fosforylasy a ani UDPG-g transferazy.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym zwracała uwagę mała ilość wodniczek, stwierdzono natomiast wzrost zawartości ciał lizosomalnych w cytoplazmie komórek glejowych. W części mitochondriów przede wszystkim oligodendrocytów stwierdzono przejaśnienie macierzy i zanik grzebieni (ryc. 14).

Grupa III. W hodowlach 1- 2- i 3-tygodniowych poddanych przez 7 minut działaniu tlenu węgla, w drugim i trzecim dniu przetrzymywania w warunkach prawidłowych występowały złogi glikogenu, zlokalizowane w części perikarjalnej i w wypustkach przede wszystkim astrocytów. Znacznie rzadziej i mniej obficie stwierdzano je w oligodendrocytach i mikrogleju, a jedynie sporadycznie w komórkach nerwowych. Z jednodniowym wyprzedzeniem w stosunku do gromadzenia się glikogenu, w cytoplazmie komórek zawierających wielocukier ujawniała się histochemicznie aktywność UDPG-g transferazy. Zanikaniu ziarnistości glikogenu, towarzyszyła wysoka aktywność fosforylasy a, obecna w cytoplazmie perikariów i wypustek wszystkich komórek, w których gromadziły się złogi wielocukru.

Przy 15- i 30-minutowym przetrzymywaniu hodowli w atmosferze tlenu węgla w żadnym okresie przeżycia po zatruciu, nie stwierdzono złogów glikogenu.

#### OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki badań wskazują, że tlenek węgla podany do środowiska gazowego pozaustrojowej hodowli tkanki glejowej prowadzi do uszkodzenia wszystkich elementów komórkowych, przy czym nasilenie zmian zależy od stopnia dojrzałości i zróżnicowania hodowli, rodzaju komórek oraz czasu działania tlenu węgla.

Warunki hodowli pozaustrojowej wyłączające mechanizm hipoksyjny związany z blokowaniem transportu tlenu oraz działanie układów barierowych istniejących w ustroju *in situ*, pozwalają na wiązanie stwierdzonych uszkodzeń komórkowych z bezpośrednim cytotoksycznym działaniem tlenu węgla na tkankę. Zachowane stałe pH medium hodowlanego pozwala również na wyłączenie dodatkowego działania zmian stężenia jonów wodorowych, którego można by teoretycznie oczekiwać przy zastosowanych warunkach doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że podany w 10% objętości tlenek węgla wywierał działanie toksyczne, mimo że doświadczenie prowadzono przy prawidłowej zawartości tlenu w środowisku gazowym hodowli. Ball i wsp. (1951) zwracają uwagę na fakt, że względne powinowactwo oksydazy cytochromowej do

tlenku węgla jest 9,2 razy mniejsze niż do tlenu oraz że prawidłowa zawartość tlenu wydatnie zmniejsza efekt cytotoksycznego działania CO.

Obserwacje nasze wskazują, że najwrażliwsze na cytotoksyczne działanie tlenku węgla są hodowle młode, zawierające znaczny odsetek nie zróżnicowanych komórek glejowych. Zjawisko to potwierdza również rozkład uszkodzeń komórkowych w hodowlach 2- i 3-tygodniowych, w których najbardziej nasilone nieprawidłowości dotyczyły obwodowej, aktywnej strefy wzrostu. Analogiczną zależność stwierdziła Kraśnicka i wsp. (1967) oraz Kraśnicka i Renkawek (1972) w doświadczeniach nad wpływem anoksji na hodowle glejowe. Znajduje to również odpowiednik w patologii ludzkiej, wyrażający się bardzo znaczną wrażliwością niedojrzałego układu nerwowego na zatrucie tlenkiem węgla (Colmant, Wever 1963, Csermely 1963). Hodowle starsze zawierające większy odsetek zróżnicowanych dojrzałych komórek glejowych charakteryzowały się mniej nasilonymi bardziej zróżnicowanymi uszkodzeniami komórkowymi, przy najdłuższym nawet przebywaniu w atmosferze tlenku węgla. Wśród zróżnicowanej formacji komórkowych zwraca uwagę szczególnie wrażliwość oligodendrocytów wyrażająca się ich wcześniejszym i bardziej nasilonym uszkodzeniem w porównaniu z innymi elementami komórkowymi oraz wyraźnym zmniejszeniem się ich liczby w populacji komórkowej hodowli w miarę przedłużania czasu działania CO. Na wrażliwość oligodendrocytów w warunkach patologii ludzkiej zwrócili uwagę Seitelberger i Jellinger (1960), a w warunkach doświadczenia na zwierzętach Korthals i wsp. (1973 a). Wydaje się prawdopodobne, że wrażliwość oligodendrogleju na działanie tlenku węgla może odgrywać istotną rolę w patomechanizmie demielinizacji stanowiącej częste następstwo zatrucia CO. Nasilenie uszkodzeń gleju skąpowypustkowego zbliżone jest do natężenia nieprawidłowości strukturalnych komórek nerwowych. Zwraca przy tym uwagę zróżnicowanie wrażliwości poszczególnych typów neurocytów. Największe uszkodzenia stwierdzono w dużych neuronach jądra zębatego mózdzku i w komórkach Purkinjego, podczas gdy komórki nerwowe warstwy ziarnistej były wyraźnie mniej zmienione.

Uszkodzenie astrogleju, jakkolwiek bardzo znaczne, zwłaszcza przy długotrwałej ekspozycji na działanie tlenku węgla, jest mniejsze niż neuronów i oligodendrocytów. Nawet po 12-godzinnym przetrzymywaniu w atmosferze tlenku węgla obserwuje się, zwłaszcza w hodowlach starszych, mniej zmienione komórki gwiazdźiste. Spośród wszystkich elementów komórkowych hodowli najmniejszą wrażliwość wykazuje mikroglej. W okresie przetrzymywania hodowli w atmosferze tlenku węgla, obok namnażania się makrofagów i występowania zwyrodniałych postaci mikrogleju, stwierdzono zwiększoną liczbę form komórkowych po-

chodzenia mikroglejowego uważanych za postaci progresywne, w tym przede wszystkim komórki pałeczkowate. Stanowi to pełną analogię z zachowaniem się mikrogleju w warunkach anoksji i hipoksji *in vitro* (Kraśnicka, Renkawek 1969). Wrażliwość na działanie tlenu węgla poszczególnych typów komórek wykazuje pełną równoległość z intensywnością ich metabolizmu tlenowego.

Struktura uszkodzeń komórkowych wykazuje daleko idące podobieństwa mimo pewnych odrębności uwarunkowanych rodzajem komórek. Dotyczy to przede wszystkim występujących we wszystkich elementach komórkowych cech obrzmienia i zwyrodnienia wodniczkowego. Stanowią one wyraz zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej komórki i zmian w przepuszczalności ich błon komórkowych. W neuronach dochodzi ponadto do prawie całkowitej tigrólizy przy względnie dobrze utrzymanych neurofibrylach. Komórki glejowe, niezależnie od ich typu, charakteryzuje fragmentacja wypustek, aż do ich całkowitej utraty. W bardziej nasilonych stadiach uszkodzenia występuje rozpyływanie się cytoplazmy z powstawaniem struktur przypominających tzw. nagie jądra glejowe. Charakter i sekwencje czasowe narastania uszkodzeń wykazują pełną zbieżność z obrazem nieprawidłowości komórkowych obserwowanych we wspomnianych już doświadczeniach Kraśnickiej i wsp. (1967) oraz Kraśnickiej i Renkawek (1972) nad wpływem anoksji i hipoksji na tkankę glejową *in vitro*.

Opisanym zmianom histologicznym odpowiadało stwierdzone w badaniach mikroskopowo-elektronowych bardzo znaczne obrzmienie siatki śródplazmatycznej a mniej nasilone aparatu Golgiego i mitochondriów. Uszkodzenia te wykazują daleko idące podobieństwa do zmian stwierdzanych przez Webstera i Amesa (1965), Ronillera (1971), Browna i Brierleya (1972) oraz Yu i wsp. (1972a, 1972b) w różnych typach niedotlenienia tkanki nerwowej zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Na tle znacznego nasilenia zmian w śródkomórkowych strukturach błoniastych zwraca uwagę stosunkowo niewielkie uszkodzenie mitochondriów, występujące niemal wyłącznie w oligodendrocytach. Zróżnicowanie obrazu mitochondriów w gleju skopowypustkowym i gwiaździstym spostrzegali uprzednio Korthals i wsp. (1973a) w materiale *in vivo*. Wydaje się, że jest ono uwarunkowane odrębnością mitochondriów w różnych typach gleju podobnie jak postulowana przez Ybata i wsp. (1971) w stosunku do komórek nerwowych.

Zależność nasilenia uszkodzeń od czasu przebywania w atmosferze tlenu węgla obrazowały sekwencje zmian histologicznych i histochemicznych w komórkach w miarę przedłużania ekspozycji na działanie czynnika toksycznego. Na podkreślenie zasługuje przy tym fakt, że narastaniu zmian cytologicznych w miarę przetrzymywania hodowli w atmo-

sferze CO towarzyszył postępujący spadek aktywności badanych enzymów, aż do pełnego zaniku we wszystkich typach komórek. Zachowane przy krótkich czasach ekspozycji zróżnicowanie odczynów histoenzymatycznych, właściwe poszczególnym typom komórkowym (Renkawek 1972) ulegało całkowitemu zatarciu przy przedłużaniu czasu działania tlenu węgla.

Powrót hodowli do prawidłowej atmosfery gazowej na okres 1 godziny nie prowadził do żadnych zmian strukturalnych i histochemicznych. Natomiast przetrzymywanie hodowli w tych warunkach przez 24 godziny charakteryzowało się zmniejszeniem nasilenia uszkodzeń komórkowych, pojawieniem się form reaktywnych (takich jak komórki kometowate i komórki pałeczkowate), aktywizacją czynności żernych mikrogleju oraz normalizacją acz niepełną obrazu histoenzymatycznego. Ta ostatnia dotyczyła przede wszystkim aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glukozo-6-fosforanowej. Wzrost aktywności tych dehydrogenaz charakteryzuje reakcję glejową stanowiącą następstwo różnych typów niedotlenienia tkanki nerwowej (Domańska-Janik 1972). Aktywność enzymów mitochondrialnych, analogicznie jak w doświadczeniach Szumańskiej (1973) *in vivo*, pozostawała obniżona. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej i esterazy nieswoistej obserwowany w tym samym czasie odnieść należy do aktywizacji układu lizosomalnego w uszkodzonych komórkach, znajdującej swój wykładnik w obrazie mikroskopowo-elektronowym.

Odrębnego omówienia wymaga zachowanie się glikogenu w komórkach glejowych w następstwie zatrucia tlenkiem węgla. Gromadzenie się glikogenu, stanowiące choćby chociaż nieswoisty wykładnik uszkodzenia tkanki nerwowej (Mossakowski, Pener 1972) obserwowano w doświadczalnej encefalopatii tlenkowęgłowej (Śmiałek i wsp. 1973, Szumańska 1973) podobnie jak w innych typach niedostatku tlenowego (Mossakowski i wsp. 1968, Mossakowski i wsp. 1973). W naszym materiale jedynie 7-minutowa ekspozycja na działanie tlenu węgla z późniejszym przeniesieniem hodowli do prawidłowej atmosfery gazowej, prowadziła do krótkotrwałego gromadzenia glikogenu przede wszystkim w astrocytach. Złogi te występowały wyłącznie w komórkach nie wykazujących uszkodzeń strukturalnych. Potwierdza to poprzednie spostrzeżenia Kraśnickiej i Renkawek (1972) o zależności gromadzenia się glikogenu od stopnia uszkodzenia komórek. Pojawienie się glikogenu w warunkach hodowli tkankowej wskazuje, że gromadzenie się wielocukru w komórkach glejowych nie stanowi następstwa upośledzonego transportu glukozy lecz jest wyrazem zaburzonego ich metabolizmu. Zależności czasowe pomiędzy gromadzeniem się glikogenu i pojawieniem się aktywności enzymów biorących udział w jego przemianie sugerują, że mamy do czynienia z jego wzmożoną syntezą a nie obniżonym rozpadem.



## WNIOSKI

1. Tlenek węgla zawarty w środowisku gazowym pozaustrojowej hodowli tkanki glejowej prowadzi do uszkodzenia jej wszystkich elementów komórkowych nawet przy prawidłowej zawartości tlenu w mieszaninie gazowej.

2. Stopień uszkodzenia elementów komórkowych zależy od wieku hodowli warunkującego stopień jej dojrzałości i zróżnicowania, od rodzaju komórek oraz od czasu ekspozycji na działanie tlenku węgla. Największą wrażliwość wykazują obok neurocytów komórki oligodendrogleju, mniejszą astrocyty, a najmniejszą mikroglej.

3. Obraz cytologiczny i cytochemiczny uszkodzeń komórkowych zbliżony jest do nieprawidłowości wywołanych niedostatkami tlenu.

4. Przeniesienie hodowli do prawidłowej atmosfery gazowej po poprzedniej ekspozycji na działanie tlenku węgla prowadzi do zmniejszenia nieprawidłowości cytologicznych i cytochemicznych, oraz ujawnienia się cech odczynu tkankowego.

B. Хоппе

КАРТИНА СТРУКТУРНЫХ И ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЛИИ  
КУЛЬТИВИРОВАННОЙ *IN VITRO* ПОДВЕРГАЕМОЙ ДЕЙСТВИЮ  
ОКИСИ УГЛЕРОДА

Резюме

Целью работы являлась оценка цитотоксического влияния окиси углерода на глиальную ткань, культивируемую *in vitro*, то есть исключая влияние гипоксии, связанной с возникновением карбоксигемоглобина.

Исследования проводились на 1-, 2-, и 3-недельных культурах глиальной ткани мозжечка взятой у однодневных новорожденных крыс. Материал был разделен на три группы. Культуры I группы содержались в атмосфере CO в течение 1, 12 и 24 часов, затем непосредственно подвергались морфологическим и гистоэнзиматическим исследованиям. Культуры II группы подвергались воздействию CO в течении 1 часа и далее переносились в нормальную среду на 1 и 24 часа. Культуры в III группе после 30, 15 и 7 минутной экспозиции в присутствии CO, содержались в нормальной среде в течение 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 и 96 часов. Культуры I и II окрашивали толуидиновым синим; а также по методу Галлиаса и исследовали активность СДГ, МДГ, Гл-6-ФДГ и цитохромоксидазы, кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы. В культурах II группы дополнительно исследовалась активность гликогеновой синтетазы и фосфоорилазы. В культурах III группы проводилась только реакция PAS-димедон и исследование активности фосфоорилазы и синтетазы гликогена. Выбранные культуры I и II группы рассматривались дополнительно в электронном микроскопе.

Морфологические и гистохимические изменения были обусловлены степенью дифференцирования культуры и временем действия окиси углерода, причем самыми чувствительными оказались молодые недифференцированные глиальные клетки. Наблюдалась разбухлость всех глиальных элементов, осо-

бенно астроцитов, снижение окрашиваемости клеток, а также повреждение и атрофия их отростков. В культурах I группы и в культурах II группы, содержащихся в течение 1 часа в нормальной среде, было обнаружено снижение активности всех исследуемых окислительных и гидролитических ферментов, в культурах II группы, находящихся 24 часа в нормальной среде — рост активности гидролаз и лишь незначительное снижение активности МДГ и Гл-6-ФДГ. В культурах III группы, подвергаемых воздействию CO в течение 7 минут, присутствие гликогена отмечалось в 1-недельных культурах между 2—4 днем и в 2 и 3-недельных культурах между 3—5 днем после экспозиции. Гликоген выступал лишь в клеточных элементах без структурных изменений, прежде всего в астроцитах, реже в других формах глии. Присутствию гликогена предшествовало появление активности синтетазы гликогена а потом появление активности фосфоорилазы.

Микроэлектронное исследование показало наличие вакуолей в перикарионах и отростках астроцитов и олигодендроцитов, а также изменения в митохондриях и лизосомах.

B. Hoppe

#### THE STRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL PICTURE OF CARBON MONOXIDE GLIOPATHY *IN VITRO*

##### Summary

The aim of this work was to evaluate the cytotoxic effect of carbon monoxide on the glial tissue cultures at the exclusion of anoxic hypoxia which is connected with the formation of HbCO in the blood.

The studies were performed on 1-, 2-, and 3-week cultures of glial tissue derived from 1-day newborn rat cerebella. The cultures were divided into 3 groups. The cultures of the I group were maintained in CO for 1, 12 and 24 hrs and subjected to morphological and histoenzymatic examinations. The cultures of the II group were maintained in CO for 1 hr or 24 hrs. In the III group a 30-, 15-, and 7 minutes exposure to CO was followed by a transfer into the normal medium for 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 and 96 hrs. The cultures of the Ist and IInd were stained with toluidine blue and were tested for the activities of SDH, LDH, G-6-PDH, cytochrome oxidase, acid phosphatase and nonspecific esterase. In addition in group II the glycogen synthetase and phosphorylase activities were examined. In group III only the PAS-dimedone reaction and the tests for glycogen synthetase and phosphorylase were performed.

The selected cultures of groups I and II were subjected to electron-microscopic examination.

The morphological and histoenzymatic changes were dependent upon both the time of exposure to carbon monoxide and the degree of cell differentiation, whereby young, non-differentiated glial cells turned out to be most sensitive. The following morphological changes were observed: swelling of all glial cells and in particular astrocytes, decrease of staining capacity and impairment or loss of cellular processes. In the cultures of groups I and II maintained for 1hr in normal medium, a decrease of the activity of all oxidoreductases and hydrolases was stated and in the cultures of group II maintained in normal medium for 24 hrs an increase of the activity of hydrolases and only a slight decrease of that of LDH and G-6-PDH was observed.

In group III, in cultures exposed to CO for 7 minutes, glycogen grains appeared on the 3rd — 5th day in 1-week cultures. These grains were found to be locali-

zed mainly in astrocytes and occasionally in the other types of cells. Glycogen was only present in cells which did not show any structural changes.

The appearance of glycogen grains was preceded by enhanced glycogen synthetase activity and its disappearance followed by the appearance of increased phosphorylase activity. Electron microscopic examination revealed the presence of vacuoles both in perikarya and processes of astrocytes and oligodendrocytes and changes in mitochondria and lysosomes.

#### PIŚMIENICTWO

1. Ball E. G., Strittmatter C. F., Copper 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. 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.
4. Bulmer D.: Dimedone as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
5. Coburn R. F.: The carbon monoxide body stores. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1970, 174, 11—22.
6. Colmant H. J., Wever R.: Pränatal Kohlenoxydvergiftung mit „Organtot“ des Zentralnervensystems. *Arch. Psych. Z. ges. Neurol.*, 1963, 204, 271—287.
7. Csermely H.: Über die Pathogenese des Cerebrum Polycysticum. IV International Congress of Neuropathology 3 Thieme, Stuttgart 1963.
8. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 17—43.
9. Forbes W. H.: Carbon monoxide uptake via lungs. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1970, 174, 72—75.
10. Graziani G., Guariano A.: Il sistema nervoso centrale nella intossicazione acuta sperimentale da CO. *Fol. Med. Napoli*, 1956, 39, 457—470.
11. Korthals J., Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii tlenkowej u szczura. *Neuropat. Pol.*, 1973a, II, 279—300.
12. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1973b, 11, 3, 315—322.
13. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
14. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Obraz morfologiczny tkanki glejowej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.*, 1967, V, 115—123.
15. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Morfologia i histochemia mikrogleju w hodowli tkankowej prowadzonej w warunkach prawidłowych i patologicznych. *Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 73—90.
16. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 507—518.
17. 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.

18. 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.
19. Mossakowski M. J., Penar B.: Some aspect of the histochemistry of the reactive glia. *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 2, 317—325.
20. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 53—68.
21. Pearse A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied.* 2 Ed. Little, Brown and Comp., Boston 1972.
22. Renkawek K.: Różnice histochemiczne i histoenzymatyczne pomiędzy różnymi typami komórek glejowych w hodowli *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 2, 307—316.
23. Roniller Ch., Nicolescu P., Orci L., Rufner C.: The effect of anoxia on the ultrastructures of the superior cervical ganglion of the rat *in vitro*. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 1971, 7, 269—292.
24. Schwedenberg T. H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide poisoning. *J. Neuropath.*, 1959, 18, 597—636.
25. Seitelberger F., Jellinger K.: Zur Frage der CO—Leukoencephalopathie. *Wien. Klin. Wschr.*, 1960, 72, 422—429.
26. Szumańska G., Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 301—314.
27. Śmiałek M., Sikorski M., Korthals J., Bicz M., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPG-glucose: glycogen- $\alpha$ -4 glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath.*, 1973, 24, 222—231.
28. 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.
29. Takeuchi T., Kuriaki H.: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, 3, 153—160.
30. Takeuchi T., Glenner G. G.: Histochemical demonstration of uridine disphosphate glucoso-glycogen transferase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 11, 304—316.
31. Ybata Y., Piccoli F., Pappas G. D., Lajtha A.: An electron microscopic and biochemical study on the effect of cyanide and low Na<sup>+</sup> on rat brain slices. *Brain Res.*, 1971, 30, 137—158.
32. 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.
33. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. Neuroglia and blood vessels. II. *Acta Neuropath.*, 1972a, 22, 235—244.

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

## PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Hodowla glejowa 1-tyg. 1 godz. działania CO. Obrzmienie komórek glejowych szczególnie astrocytów, zatarcie granic międzykomórkowych, obniżenie stopnia barwliwości komórek. Bł. toluid. Pow. 200×.

*Fig. 1.* 1-week glial culture 1 hr of exposure to CO. Swelling of glial cells, especially of astrocytes, disappearance of intercellular borders, decreased of staining ability. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 2.* Hodowla glejowa 1-tyg. 1 godz. działania CO. Znacznego stopnia obniżenie zdolności impregnacyjnej komórek glejowych, zanik i uszkodzenie wypustek komórkowych. Met. Gallyasa. Pow. 200×.

*Fig. 2.* 1-week glial culture 1 hr exposure to CO. Marked decrease of impregnating capability of glial cells, disappearance and damage of cellular processes. Gallyas meth. × 200.

*Ryc. 3.* Hodowla glejowa 3-tyg. 12 godz. działania CO. Chromatoliza i tigróliza w zachowanych neuronach. Bł. toluid. Pow. 200×.

*Fig. 3.* 3-week glial culture 12 hrs exposure to CO. Chromatolysis and tygrolysis in preserved neurons. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 4.* Hodowla glejowa 1-tyg. 24 godz. działania CO. Jądra glejowe o dziwacznych kształtach, obkurczone. W resztkach cytoplazmy widoczne wodniczki. Bł. toluid. Pow. 200×.

*Fig. 4.* 1-week glial culture 24 hrs exposure to CO. Glial nuclei of bizarre shape, shrunken. Vacuoles visible in the remnants of cytoplasm. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 5.* Hodowla glejowa 3-tyg. 12 godz. działania CO. Wybitne obniżenie aktywności fosfatazy kwaśnej. W większości komórek glejowych brak produktu reakcji enzymatycznej. Pow. 100×.

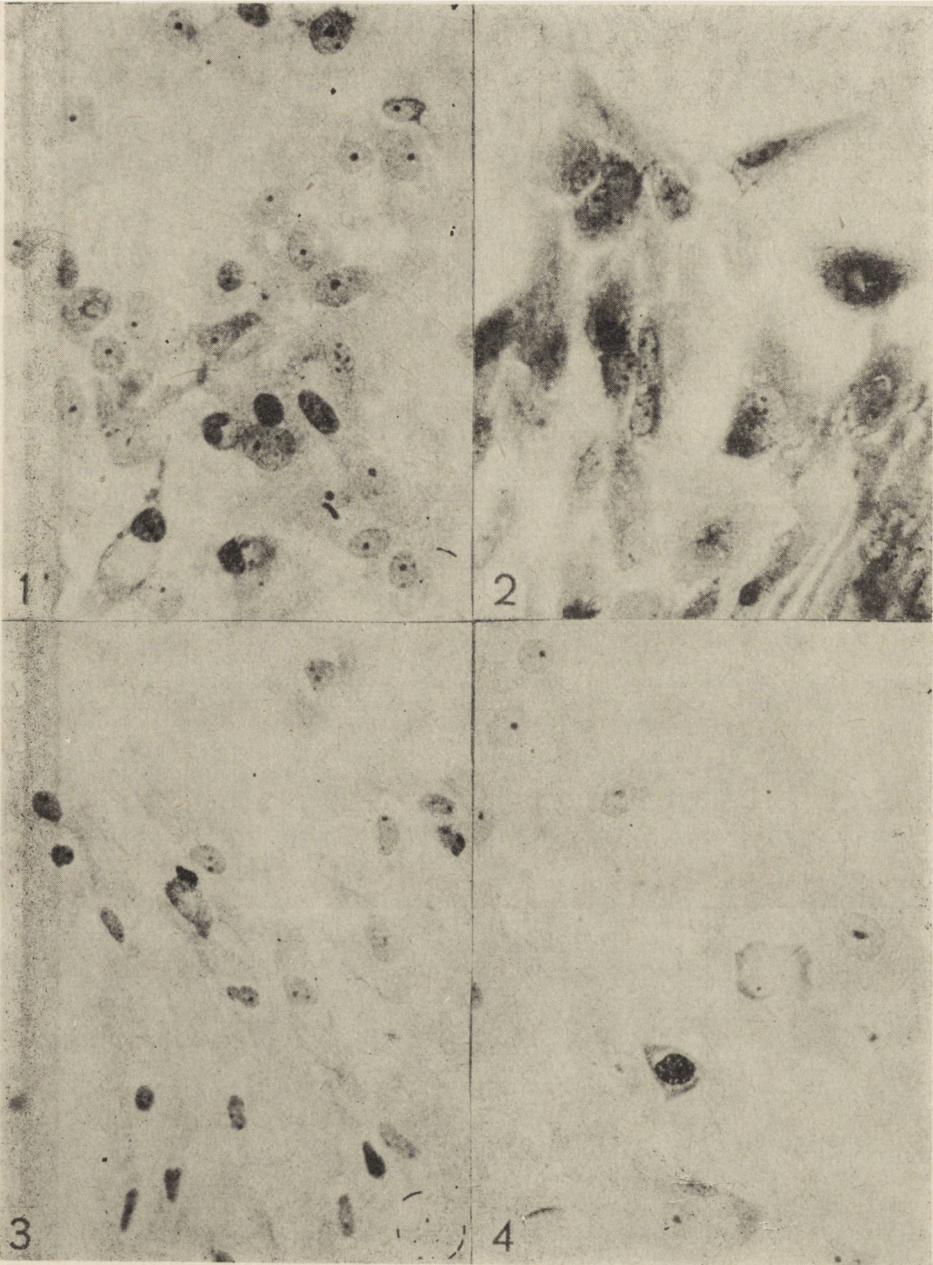
*Fig. 5.* 3-week glial culture 12 hrs exposure to CO. Markedly decreased acid phosphatase activity. In a majority of glial cells no granules of enzymatic reaction are to be seen. × 100.

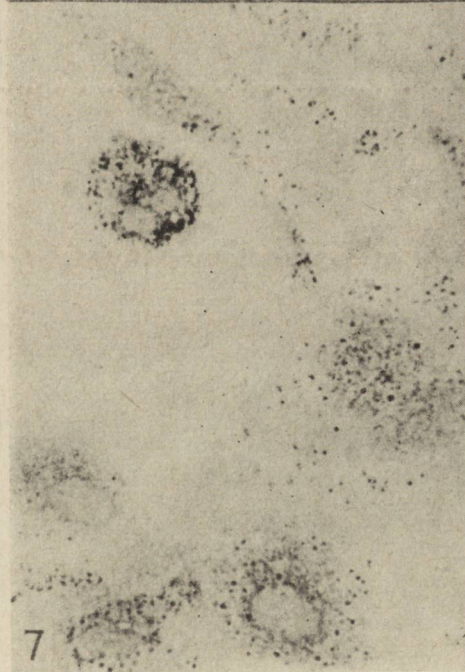
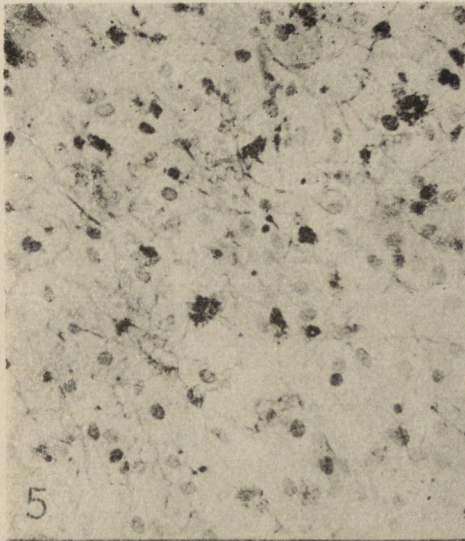
*Ryc. 6.* Hodowla glejowa 3-tyg. 24 godz. działania CO. Forma progresywna mikrogleju, zanik wypustek. Bł. toluid. Pow. 200×.

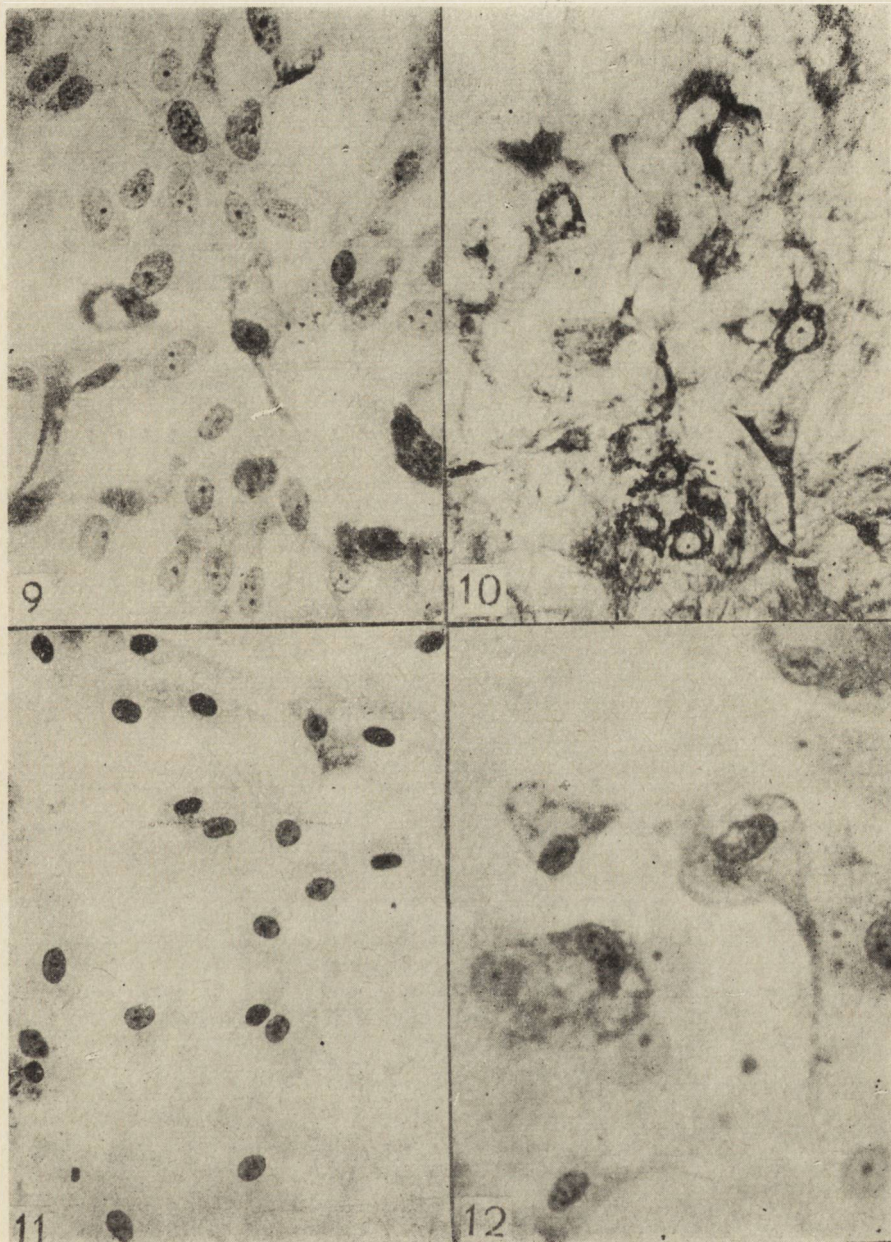
*Fig. 6.* 3-week glial culture 24 hrs exposure to CO. Progressive form of microglia, loss of cellular processes. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 7.* Hodowla glejowa 2-tyg. 24 godz. działania CO. Wybitne obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Pow. 400×.

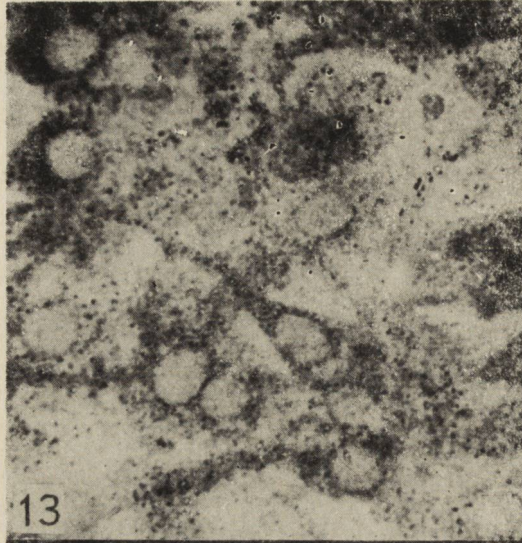
*Fig. 7.* 2-week glial culture 24 hrs exposure to CO. Marked decrease of lactic dehydrogenase activity. × 400.



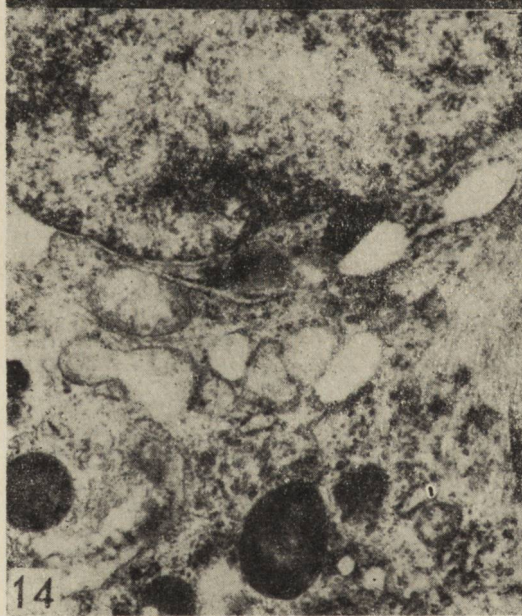








13



14

*Ryc. 8.* Hodowla glejowa 1-tyg. 24 godz. działania CO. Prawie całkowita dezintegracja struktur cytoplazmatycznych komórki. Pow. 10.500 ×.

*Fig. 8.* 1-week glial culture 24 hrs exposure to CO. Almost complete disintegration of the cytoplasmic structures of the cell. × 10.500.

*Ryc. 9.* Hodowla glejowa 3-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Zachowane oligodendrocyty wykazują cechy ostrego obrzęku. Bł. toluid. Pow. 200 ×.

*Fig. 9.* 3-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. Preserved oligodendrocytes show features of acute edema. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 10.* Hodowla glejowa 3-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Zachowane neurony wykazują nieregularny przebieg neurofibryli. Met. Gallyasa. Pow. 200 ×.

*Fig. 10.* 3-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. Preserved neurons show irregular arrangement of neurofibrilles. Gallyas meth. × 200.

*Ryc. 11.* Hodowla glejowa 2-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Mniejsze nasilenie zmian wodniczkowych w cytoplazmie astrocytów. Bł. toluid. Pow. 200 ×.

*Fig. 11.* 2-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. Astrocytes show less intensive vacuolar changes in cytoplasm. Toluid. blue. × 200.

*Ryc. 12.* Hodowla glejowa 3-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Forma kometowata astrogleju. Bł. toluid. Pow. 400 ×.

*Fig. 12.* 3-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. Comet-like form of astroglia. Toluid. blue. × 400.

*Ryc. 13.* Hodowla glejowa 3-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Wysoka aktywność dehydrogenazy mleczanowej w postaciach kometowatych i makrofagopodobnych astrogleju. Pow. 400 ×.

*Fig. 13.* 3-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. High activity of lactic dehydrogenase in comet-like and macrophage-like forms of astroglia. × 400.

*Ryc. 14.* Hodowla glejowa 3-tyg. 1 godz. działania CO; 24 godz. medium prawidłowego. Zwiększenie ilości ciał lizosomalnych. Wakuole wykazują związek z szorstką siatką endoplazmatyczną. Pow. 15.000 ×.

*Fig. 14.* 3-week glial culture 1 hr exposure to CO; 24 hrs of normal medium. Increased number of lysosome-like bodies. Vacuoles connected with rough endoplasmic reticulum. × 15.000.

MARIANNA SIKORSKA, WŁODZIMIERZ BICZ, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK  
MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI

## ATP, ADP, AMP CONCENTRATIONS IN RAT BRAIN FOLLOWING CARBON MONOXIDE INTOXICATION AND IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA

Department of Neuropathology of the Experimental and Clinical Medical Research  
Centre of the Polish Academy of Sciences  
Head: Prof. M. J. Mossakowski, M. D.

The phenomenon of transient glycogen accumulation and the increase of UDP glucose:glycogen glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.11) activity in the brain was observed to accompany experimental perinatal asphyxia in *Macaca mulata rhesus*, experimental brain ischemia in rats (Mossakowski et al., 1968; Pronaszko-Kurczyńska et al., 1972, Śmiałek et al., 1971) as well as carbon monoxide intoxication (Śmiałek et al., 1973).

In view of the well known facts pointing to a close relationship between the adenine nucleotides system and glycogen metabolism, it seemed reasonable to devote attention to the correlation between the level of these nucleotides and the phenomenon of glycogen accumulation in the central nervous system after hypoxia.

The fluctuations in ATP, ADP and AMP levels in the condition of brain hypoxia and ischemia may be one of the factors responsible for the changes in the glycogen metabolism (Broniszewska-Ardelt, Jongkind, 1971; Kirsch, Leitner, 1967; Lowry et al., 1964). Gatfield et al. (1966) demonstrated a decrease of the ATP level in some of the mouse brain structures under the influence of anesthetic drugs and ischemia. Brosnan et al. (1970) observed a decrease of the ATP level, with a concomitant rise of ADP and AMP concentrations in rat liver during ischemia. The effects of a number of anesthetics, hyperthermia and ischemia on the adenine nucleotides level in mouse brain were observed and discussed by Goldberg et al. (1966).

The aim of the present work was to compare the possible changes in ATP, ADP and AMP levels caused by carbon monoxide intoxication and in an experimental ischemic model.

## MATERIAL AND METHODS

In the experiments concerning carbon monoxide intoxication, 60 Wistar rats of both sexes aged 6 weeks were used. The animals were placed in a 60 — 1 chamber for 90 min. Air (1 l/min) with an admixture of CO was passed through the chamber continuously. During the first 30 min the air contained 1% CO.

At that time the blood carboxyhemoglobin level, as determined by the method of Whithead and Worthington (1961) reached the value of  $76.6 \pm 0.9\%$ . The blood HbCO level was maintained by CO inflow regulation up to the 60th min. Then it was interrupted and the rats were kept in the chamber with a continuous flow of air reducing CO concentration to the 90th min so that the blood HbCO level decreased to about 50% at the end of the experiment.

The animals were examined after 20, 30, 60 and 90 minutes stay in the chamber and after 1, 2, 4, 6 and 24 hrs they were transferred to normal conditions. The control group consisted of rats maintained in a normal atmosphere.

In experimental ischemia, 120 Wistar rats of both sexes, aged 4 weeks were used. The animals of the experimental groups were subjected to bilateral ligation of the carotid arteries under ether anesthesia. Besides, three control groups were used: a) animals not subjected to any treatment, b) animals under the same ether anesthesia as the operated rats and c) animals anesthetized and then subjected to operation, consisting in isolation of the common carotid arteries without ligation. The animals were examined directly after the experimental or control treatments and 1, 6, 24, 48 and 72 hrs later.

In both experimental models, the rats were sacrificed by decapitation and the heads were immediately frozen in liquid nitrogen.

Sample of the frozen brain hemispheres were then homogenized with 3 ml of cold 1.5 M PCA. The homogenate was centrifuged for 30 min at 15 000 rpm at 2°C. The supernatant was neutralized with 2 M potassium carbonate solution containing 0.5 M triethanolamine hydrochloride and thereafter supplemented with 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.5) to a final volume of 6 ml. The mixture was kept in ice for 10 min and centrifuged again for 30 min at 15 000 rpm at +2°C. ATP, ADP and AMP were assayed in the supernatant by the method of Adams (1963). Extinction at 340 nm was monitored on a Spectromom 202 spectrophotometer.

## RESULTS

In the brains of 6-week rats, which served as the control group for the CO intoxication model, the respective mean concentrations of adenine

nucleotides were found to be as follows: ATP —  $6.91 \pm 0.16$ , ADP —  $1.96 \pm 0.07$  and AMP —  $0.32 \pm 0.04$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue.

In the group of animals subjected to the action of CO for 20 minutes, the mean ATP concentration in the brain was  $5.58 \pm 0.50$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue. As compared with the control group, a statistically significant decrease of ATP concentration was noted ( $p \leq 0.05$ ), which paralleled the statistically insignificant rise in the ADP ( $2.06 \pm 0.19$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue) and AMP ( $0.41 \pm 0.03$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue).

After 30 minutes' exposure to CO, the brain concentrations of all the nucleotides approached the control values and were found to be: ATP —  $6.68 \pm 0.47$ , ADP —  $1.90 \pm 0.06$  and AMP —  $0.36 \pm 0.05$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue.

From the 60th minute on, a statistically significant increase of ATP concentration could be observed ( $7.99 \pm 0.28$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue,  $p \leq 0.01$ ). At that time, the concentrations of ADP and AMP were insignificantly lower than in the control brains and amounted to  $1.75 \pm 0.04$  and  $0.30 \pm 0.03$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue respectively.

In the two following experimental groups — kept in the chamber for 90 minutes and those which after 90 minutes exposure were left for 1 hr in a normal atmosphere, the ATP concentration remained at the level determined after 60 min exposure to CO. The concentration of ADP did not differ from normal, whereas the AMP level increased slightly but statistically insignificantly.

In the group of rats examined 2 hrs after removal from the chamber the mean ATP concentration in the brain was the highest as compared with that in all other groups amounting to  $8.87 \pm 0.37$ ; the increase was statistically significant in relation to the control ( $p \leq 0.001$ ). The ADP concentration in this group was  $1.98 \pm 0.08$  and that of AMP  $0.38 \pm 0.04$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue.

The highest AMP level ( $0.49 \pm 0.05$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue) was found in the group which after exposure to CO remained for 4 hrs outside the chamber. This increase was statistically significant in relation to the control ( $p \leq 0.05$ ). The mean ATP concentration in this group  $7.81 \pm 0.10$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue was lower than in the group of rats examined 2 hrs after exposure to CO, but still higher than in the control group ( $p \leq 0.01$ ). The ADP level in this group did not show a statistically significant deviation as compared with the control.

In the rats examined 6 hrs after they were taken out of the chamber the ATP level was slightly, but statistically insignificantly higher than in the control animals ( $7.23 \pm 0.16$ ). At that time mean concentrations of ADP and AMP also approximated the control values and were respectively:  $1.81 \pm 0.04$  and  $0.34 \pm 0.03$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue.

Table 1. ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following carbon monoxide intoxication ( $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue)Tabela 1. Stężenie ATP, ADP, AMP w mózgu szczura po zatruciu tlenkiem węgla ( $\mu\text{mole/g}$  świeżej tkanki)

Experimental conditions Warunki doświadczenia			ATP		ADP		AMP		Number of animals Liczba zwierząt	$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]^2} \frac{[\text{AMP}]}{[\text{K}]}$
A	B	C	$\bar{x} \pm m^*)$	$p^{**})$	$\bar{x} \pm m$	p	$\bar{x} \pm m$	p		
Control min	Kontrola min	hrs godz.	$6.91 \pm 0.16$		$1.96 \pm 0.07$		$0.32 \pm 0.04$		8	0.55
20			$5.58 \pm 0.50$	$\leq 0.05$	$2.06 \pm 0.19$	$\geq 0.05$	$0.41 \pm 0.03$	$\geq 0.05$	8	0.54
30			$6.68 \pm 0.47$	$\geq 0.05$	$1.90 \pm 0.06$	$\geq 0.05$	$0.36 \pm 0.05$	$\geq 0.05$	6	0.66
60			$7.99 \pm 0.28$	$\leq 0.01$	$1.75 \pm 0.04$	$\geq 0.05$	$0.30 \pm 0.03$	$\geq 0.05$	6	0.79
60	30		$7.94 \pm 0.56$	$\geq 0.05$	$1.86 \pm 0.09$	$\geq 0.05$	$0.34 \pm 0.03$	$\geq 0.05$	6	0.78
60	30	1	$7.55 \pm 0.37$	$\geq 0.05$	$2.05 \pm 0.16$	$\geq 0.05$	$0.41 \pm 0.05$	$\geq 0.05$	6	0.74
60	30	2	$8.87 \pm 0.37$	$\leq 0.001$	$1.98 \pm 0.08$	$\geq 0.05$	$0.38 \pm 0.04$	$\geq 0.05$	8	0.86
60	30	4	$7.81 \pm 0.10$	$\leq 0.01$	$1.73 \pm 0.06$	$\geq 0.05$	$0.49 \pm 0.05$	$\leq 0.05$	5	1.27
60	30	6	$7.23 \pm 0.16$	$\geq 0.05$	$1.81 \pm 0.04$	$\geq 0.05$	$0.34 \pm 0.03$	$\geq 0.05$	6	0.75
60	30	24	$6.95 \pm 0.12$	$\geq 0.05$	$1.94 \pm 0.03$	$\geq 0.05$	$0.36 \pm 0.02$	$\geq 0.05$	5	0.66

A — time of exposure to CO  
czas ekspozycji CO

B — time after cessation of CO  
czas po wyłączeniu CO

C — time of survival after exposure to CO  
czas przeżycia zwierząt po ekspozycji CO

\*)  $\bar{x} \pm m$  arithmetic mean  $\pm$  mean error of the mean  
średnia arytmetyczna  $\pm$  średni błąd średniej

\*\*\*) p probability  
prawdopodobieństwo

In the group of animals examined 24 hrs after cessation of exposure to CO, the mean concentrations of all the adenine nucleotides did not differ from the values obtained for the control group and were: ATP —  $6.95 \pm 0.12$ , ADP —  $1.94 \pm 0.03$  and AMP —  $0.36 \pm 0.02$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue.

On the basis of the obtained values an equilibrium constant was calculated expressed by the following formula:

$$K = \frac{(\text{ATP}) (\text{AMP})}{(\text{ADP})^2}$$

The K value for the control group was 0.55. After a 20 min exposure to CO the K value remained practically unchanged (0.54). From the 60th minute on, up to 4 hrs after cessation of exposure to CO, the K value increased up to 1.27. In the group examined 6 hrs after the animals were taken out of the chamber, K was already much lower and amounted to 0.75 and after 24 hrs it reached the value of 0.66, this approximating the values obtained for the control group.

In the group of rats aged 4-weeks, which were not subjected to any operation and formed the control group in the model of experimental ischemia, the mean concentrations of ATP, ADP and AMP in the brain were:  $6.34 \pm 0.39$ ,  $1.88 \pm 0.06$  and  $0.36 \pm 0.04$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue respectively. Anesthesia itself was found to increase the ATP level in the brain. This was most pronounced after 1 hr ( $8.80 \pm 0.41$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue). The effect of anesthesia on the ATP brain level disappeared within 24 hrs. The control operation did not produce significant changes in the adenine nucleotides levels as compared with normal values. In the time intervals examined the brain ATP level in rats of this group remained within the range of  $6.32 \pm 0.30$  —  $7.35 \pm 0.48$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue, thus none of the values showed a statistically significant difference as compared with normal and with the group subjected to anesthesia.

As to the experimental groups which comprised the animals examined 1, 6, 12, 24, 48 and 72 hrs from the moment of ligation, a marked tendency of ATP and ADP to decrease and of AMP to increase could be observed only after 6 hrs. These changes were very pronounced in 50% of cases. The mean brain ATP concentration in this group was  $4.70 \pm 0.74$ , that of ADP  $1.60 \pm 0.1$  and of AMP  $0.53 \pm 0.07$   $\mu\text{moles/g}$  fresh tissue. In the remaining animals, the nucleotides concentration was found to approximate the values in the control group. The significant dispersions between the results for individual animals in all these groups do not allow a statistical analysis of these observations.

## DISCUSSION

The model of carbon monoxide intoxication applied in these studies did not differ from that used in the previous work (Śmiałek et al., 1973). The degree of intoxication of the organism was controlled by the HbCO concentration in blood and the cytochrome oxidase activity of the crude brain mitochondrial fraction. Maximum inhibition (23%) of the enzyme activity was noted at the moment of transfer of the animals from the chamber to normal air.

The action of CO on the rats during the first 20 min resulted in a decrease of ATP concentration in the brain. A similar decrease of the level of high-energy compounds and among others ATP, both in brain and in other tissues, was observed to occur in the conditions of hypoxia (Gatfield et al., 1966; Brosnan et al., 1970). Comparison of the  $K = \frac{(ATP)(AMP)}{(ADP)^2}$  coefficient for the control group and that of animals examined after 20-min exposure to CO indicates that the observed decreases of ATP concentration and the shifts in the concentrations of AMP and ADP proceeded within the system controlled by the adenyl kinase (Brosnan et al., 1970). In the subsequent time intervals, that is from the 60th minute of CO action up to 2 hrs removal of the rats from the chamber, the ATP concentration increased, whereas those of ADP and AMP remained within the limits of the control group. The increased K value found at that time suggests, that in this case the changes in ATP concentration may have resulted not only from shifts within the system controlled by adenyl kinase, but also from disturbances of equilibrium within other metabolic pathways in the brain which involve ATP. This increase of ATP level may be caused among others factors by a reduced utilization of this nucleotide in protein and nucleic acid synthesis (Albrecht, 1972, 1973) or in the synthesis of fatty acids (Strosznajder et al., 1972; Łazarewicz et al., 1972).

In our further studies on the carbon monoxide intoxication model we noticed that the highest ATP level which became apparent 2 hrs after the rats had been taken out of the chamber, coincides in time which the maximum increase of UDP-glucose: glycogen glucosyltransferase activity, but precedes the highest increment of the glycogen level taking place two hours later. These facts suggest, that the changes in the glycogen level in rat brains following hypoxia may be causally related to the changes in ATP concentration. At present it is difficult to judge which enzymatic step of glycogen biosynthesis is stimulated by higher ATP concentration. It is probable that the reaction of the G-6-P-independent I form of glycogen synthetase is involved in this case. On the other hand, the possibility of phosphofructokinase inhibition which might cause



a shift of the concentration of the glycogen pathway metabolites in the direction facilitating the glycogen biosynthesis has to be taken into account. Another possibility is the activation of the phosphorylase involved in glycogen metabolism by increased AMP concentration, which could readily be observed in the 4th hr after the animals were removed from the chamber. The results obtained by Breckenridge et al. (1965) support this inference. When comparing the results in the two applied different models of central nervous system hypoxia, it is to be noted, that the dynamics of the transient glycogen accumulation, increase of the UDPglucose:glycogen glucosyltransferase activity, as well as of changes in ATP level are different in these two models.

Carbon monoxide causes a reduction of oxygen transport into brain of rats which is due to the block of hemoglobin. Damage to the respiratory chain through inhibition of the cytochrome oxidase activity strongly related to the O<sub>2</sub>/CO molecular concentration ratio (Chance et al., 1970), cannot be excluded. Insofar, there are not enough data available to distinguish the molecular mechanism in both models.

The authors wish to thank Miss Teresa Pańkowska and Miss Ewa Ohde for technical assistance.

М. Сикорска, М. Смялек, В. Бич, М. Я. Моссаковски

ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ АТФ, АДФ  
И АМФ В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ СО И ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Резюме

Целью работы было исследование уровня адениновых нуклеотидов АТФ, АДФ и АМФ в мозге крыс при отравлении СО и при экспериментальной ишемии, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. В модели с окисью углерода было использовано 60 крыс линии Вистар обоих полов в возрасте 6 недель. Животные исследовались через 20, 30, 60 и 90 мин. экспозиции в СО, и далее через 1, 2, 4, 6 и 24 часа после выхода животных из экспериментальной камеры.

В модели экспериментальной ишемии исследования проводились на 120 крысах линии Вистор, обоих полов в возрасте 4 недель. Уровень нуклеотидов исследовался через 1, 6, 24, 48 и 72 часа с момента перевязки артерий. Уровень нуклеотидов определялся по методу Адама (1963).

В модели с окисью углерода было обнаружено через 20 мин после воздействия СО статистически значимое падение уровня АТФ и далее постепенный его рост, наиболее выраженный через 2 часа. По истечении 24 часов уровень АТФ не отличался от нормы. Уровень АДФ не изменялся ни в одном из временных интервалов, — а в случае АМФ через 4 часа было обнаружено статистически значимое увеличение уровня этого нуклеотида.

Изменения уровня адениновых нуклеотидов не контролировались системой аденилат-киназы, поскольку величина  $K$  изменялась в реакции, контролируемой этим ферментом.

В модели экспериментальной ишемии отмечалось в 50% исследуемых случаев и только в группе животных, исследуемых через 6 часов с момента перевязки артерии, падение уровня АТФ и АДФ с одновременным ростом уровня АМФ.

M. Sikorska, W. Bicz, M. Śmiałek, M. J. Mossakowski

STĘŻENIA ATP, ADP I AMP W MÓZGACH SZCZURÓW  
PO ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA I W DOŚWIADCZALNEJ ISCHEMII

Streszczenie

Celem pracy było przebadanie poziomu ATP, ADP i AMP w mózgach szczurów po zatruciu CO i w doświadczalnej ischemii wywołanej obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych.

W modelu tlenowęglowym szczury rasy Wistar badano po 20, 30, 60 i 90 min. ekspozycji CO, a następnie po 1, 2, 4, 6 i 24 godz. od momentu wyjęcia zwierząt z komory doświadczalnej.

W modelu doświadczalnej ischemii poziom nukleotydów w mózgach szczurów rasy Wistar badano po upływie 1, 6, 24, 48 i 72 godz. od momentu podwiązania tętnic. Ilościowe oznaczenie stężeń nukleotydów wykonywano metodami enzymatycznymi wg Adama (1963).

W modelu tlenowęglowym stwierdzono statystycznie znamienne spadki poziomu ATP po 20 min działania CO, a następnie stopniowy jego wzrost, najwyraźniej zaznaczony po 2 godz. Po upływie 24 godz. poziom ATP nie różnił się od normy. Poziom ADP nie ulegał zmianie we wszystkich badanych czasach, natomiast w przypadku AMP stwierdzono statystycznie znamienne przyrosty poziomu nukleotydu tylko po 4 godz. Wartość stałej równowagi ( $K$ ) dla reakcji kontrolowanej przez układ kinazy adenylowej ulegała zmianie, co może wskazywać, że zmiany w poziomie nukleotydów adeninowych były kontrolowane nie tylko przez system tego układu enzymatycznego.

W modelu doświadczalnej ischemii jedynie w grupie zwierząt badanych po 6 godz. od momentu podwiązania tętnic w 50% badanych przypadków stwierdzono spadek poziomu ATP i ADP z równoczesnym wzrostem poziomu AMP.

REFERENCES

1. Adam, H.: In Method of enzymatic analysis. Ed. Bergmayer H. U., Ac. Press, N.Y., 1963, 539—573.
2. Albrecht, J.: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białka w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1973, 10, 3, 457—469.
3. Albrecht, J.: Rat brain polysomes in carbon monoxide hypoxia. *Abstr. Commun. Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.* 8, Amsterdam 1972, Abstr. No 531.
4. Breckenridge, B. McL., Norman, J. H.: The conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in brain. *J. Neurochem.* 1965, 12, 51—57.
5. Broniszewska-Ardelt, B., Jongkind, J. F.: Effect of hypoxia on substrate levels in the brain of the adult mouse. *J. Neurochem.* 1971, 18, 2237.

6. Brosnan, J. T., Krebs, H. A., Williamson D. H.: Effects of ischemia on metabolic concentrations of rat liver. *Bioch. J.* 1970, 117, 91—96.
7. Chance, B., Erecińska, M., Wagner, M.: Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity. *Am. N.Y. Acad of Sciences*, 1970, 179, 193—204.
8. Gatfield, P. D., Lowry, O. H., Schulz, D. W., Passonneau, J. V.: Regional energy reserve in mouse brain and changes with ischemia and anesthesia. *J. Neurochem.* 1966, 13, 185—195.
9. Goldberg, N. D., Passonneau, J. V., Lowry, O. H.: Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Neurochem.* 1966, 17, 3997—4003.
10. Kirsch, W. M., Leitner, J. W.: Glycolytic metabolites and cofactors in human cerebral cortex and white matter during complete ischemia. *Brain Research*, 1967, 4, 358—368.
11. Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., Schulz, D. W.: Effect of ischemia on brain substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 18—30.
12. Łazarewicz, J. W., Strosznajder, J., Gromek, A.: Effects of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria. *Bull. de l'Acad. Pol. des Sci.* 1972, XX, 8, 599—606.
13. Mossakowski, M. J., Long, D. N., Meyers, R. E., De Curet, H. H., Klatzo, I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
14. Pronaszko-Kurczyńska, A., Mossakowski, M. J., Ostenda, M., Korthals, J.: Changes in the glycogen content of the brain during experimental ischemia. *Pol. Med. J.* 1973, XI, 991—1003.
15. Strosznajder, J., Gromek, A., Łazarewicz, J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 3, 447—455.
16. Śmiałek, M., Sikorska, M., Mossakowski, M. J., Bicz, W.: UDPglucose:glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.11) and  $\alpha$ -1.4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.1) activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropath.* 1971, 19, 242—248.
17. Śmiałek, M., Sikorska, M., Korthals, J., Bicz, W., Mossakowski, M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose:glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase activity in rat brain in experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath.* 1973, 24, 22—231.
18. Whithead, T. P., Worthington, N.: The determination of carboxyhemoglobin. *Clin. Chir. Acta*, 1961, 6, 356—358.

Authors adress: Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research Centre, 00-784 Warszawa, 3 Dworkowa str.

MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

CYTOCHROME OXIDASE ACTIVITY IN ISOLATED GIANT  
CELL OF THE RETICULAR FORMATION FROM THE RAT  
BRAIN STEM FOLLOWING CARBON MONOXIDE INTOXICATION  
(CARTESIAN MICRO-DIVER TECHNIQUE)\*)

Department of Neuropathology, Medical Research Centre of Polish Academy  
of Sciences

Head: prof. M. J. Mossakowski, M.D., Ph.D.

Various experimental models of oxygen deficiency were observed to produce changes in the cytochrome oxidase activity. Spector (1963) noticed the decrease in the cytochrome oxidase activity in the brain hemisphere on the ligated side in the Levine's ischemic-hypoxic model. Hamberger and Hyden (1963) and Hamberger (1963) stated the increase of the aerobic oxidation of cytochrome c (cytochrome oxidase activity) in isolated neurons following hypoxia. Śmiałek and Hamberger demonstrated the increase of the cytochrome oxidase activity in brain mitochondria both in hypoxia and ischemia.

The aim of the work was to determine the cytochrome oxidase activity in the isolated single giant cells from the reticular formation of the rat brain stem following carbon monoxide intoxication using the Cartesian micro-diver technique.

MATERIAL AND METHODS

Thirty five Wistar rats of both sexes in the age of 6 weeks were exposed to CO (Śmiałek et al., 1973). The animals were placed in a 60 l chamber with a continuous flow of 1 l/min. of air containing an admixture of 1% CO. The animals were kept in the above conditions for 60 min., whereupon the CO inflow was stopped and the rats were left in the chamber with a continuous air flow for another 30 min. The animals were decapitated after 60 min. of exposure to CO and at 0, 2, 4, 6, 24, 48

\*) This work was supported under Grant PL 480, Agreement 05-004-1 sponsored by US Public Health Service.

and 72 hrs after removal from the chamber. The control group consisted of animals breathing fresh air.

The carboxyhemoglobin (HbCO) level in blood was assayed according to Whitehead and Worthington (1961).

The brain slices were placed in ice-cold 0.25 M sucrose solution containing 0.002 M methylene blue. The nerve cell was extracted from the tissue slice with a 18  $\mu$  thick stainless steel needle (AB Kanthal, Sweden).

A single neuron was sucked into the diver and incubated in a medium containing:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  —  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4, 37.5 mM cytochrome c  $8.6 \times 10^{-2}$  mM; Na ascorbate 12.5 mM;  $\text{AlCl}_3$  0.5 mM (Slater, 1949; Potter, 1957). The oxygen uptake was determined at  $38^\circ\text{C} \pm 0.002^\circ\text{C}$  using the Cartesian micro-diver technique according to Zeuthen (1953) in the ultrathermostat constructed in the Institute of Physical Chemistry of Polish Academy of Sciences in Warsaw.

The enzyme activity was expressed as the oxygen uptake in  $\mu\text{l} \times 10^{-3}$ /hour/neuron. The blank was measured in the same conditions in the absence of a nerve cell.

#### RESULTS AND DISCUSSION

During the experiments the blood HbCO level in the animals gradually increased up to the 20th min reaching the value of  $76.6 \pm 0.9\%$ . This level was maintained until cessation of CO inflow (the 60th min). At the

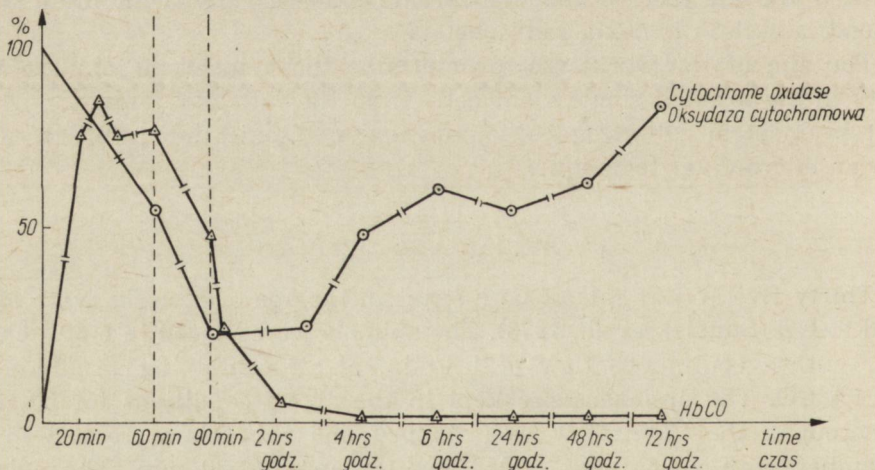


Fig. 1. Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation of the rat brain stem and HbCO concentration in blood following carbon monoxide intoxication.

Ryc. 1. Aktywność oksydazy cytochromowej w izolowanych komórkach olbrzymich tworzących siatkowatego pnia mózgu szczura i stężenie HbCO we krwi szczurów po zatruciu CO.

90th min (the moment the animals were transferred into the atmosphere of room air) HbCO level was about 50% ,at the 2nd hr 4% and in the next times about 1%.

Cytochrome oxidase activity in isolated giant cells of the reticular formation from the rat brain stem in the control group was considered as 100%. In the neurons examined after the 1 hr exposure a statistically significant decrease of the cytochrome oxidase activity was observed amounting to 58.3% of that of the control group. The lowest activity of the enzyme was noticed at the 90th min (21.6%). In the experimental groups examined after 2, 4, 6, 24 and 48 hrs, a gradual increase of the cytochrome oxidase activity was observed. However the results obtained in these groups were lower than in the control group, the differences being statistically significant. In the experimental group after 72 hrs the enzyme activity was found to approach the value of the control group (Table 1).

On the basis on the present studies it was stated that experimental carbon monoxide intoxication produced a transient decrease in the cytochrome oxidase activity in giant cells from the reticular formation of

Table 1. Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication

Tabela 1. Aktywność oksydazy cytochromowej w izolowanej komórce olbrzymiej tworzącej siatkowatego pnia mózgu szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Time of exposure to CO (min)	Time after exposure to CO (hrs)	Oxygen uptake $\mu\text{l} \times 10^{-3} / \text{hr} / \text{cell}$ $\pm \text{SEM}^*$ Zużycie $\text{O}_2$ $\mu\text{l} \times 10^{-3} / \text{godz.} / \text{neuron}$	Number of experiments	P
Czas ekspozycji CO (min).	Czas po wyłączeniu CO (godz.)		Liczba doświadczeń	
Control 0	0	$18.06 \pm 1.81$	10	
Kontrola				
60	0	$10.53 \pm 1.80$	5	$\leq 0.05$
90	0	$3.90 \pm 1.57$	5	$\leq 0.001$
90	2	$4.31 \pm 1.36$	5	$\leq 0.001$
90	4	$8.97 \pm 3.36$	5	$\leq 0.05$
90	6	$10.91 \pm 1.42$	5	$\leq 0.05$
90	24	$10.14 \pm 1.00$	8	$\leq 0.001$
90	48	$10.99 \pm 2.61$	5	$\leq 0.05$
90	72	$15.31 \pm 1.99$	5	$\geq 0.05$

\*) arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean  
średnia arytmetyczna  $\pm$  standardowy błąd średniej

p — probability according to the t Student's test  
prawdopodobieństwo wg testu t Studenta

the rat brain stem. This phenomenon may serve to explain the transient glycogen deposition in the rat brain following CO intoxication (Śmiałek et al., 1973). Glycogen deposits were to be observed especially in astrocytes in both perinatal asphyxia (Mossakowski et al., 1968) and in CO intoxication (Szumańska, 1973).

Considering the decrease in the oxygen consumption as a manifestation of disturbances of the aerobic glucose metabolism in the neuron, a hypothesis may be put forward, that the transient glycogen deposition in astroglia may result from the decrease of glucose consumption by neuron in consequence of carbon monoxide intoxication.

The author is indebted to Mrs Teresa Bok for her skillful technical assistance.

M. Śmiałek

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В ИЗОЛИРОВАННОЙ ГИГАНТСКОЙ КЛЕТКЕ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ СТВОЛА МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА  
(МОТОД КАРТЕЗИАНСКИХ МИКРОПОПЛАВКОВ)

Резюме

Целью работы было определение активности цитохромоксидазы в изолированных гигантских клетках ретикулярной формации ствола мозга крыс линии Вистар, в возрасте 6 недель, после отравления окисью углерода. Был использован метод экспериментального отравления окисью углерода (Śmiałek и др. 1973). Потребление кислорода изолированной нервной клеткой определяли методом картезианских микропоплавок по Зойтхену (1953).

Полученные результаты указывают на временное снижение кислородного обмена под влиянием временного отравления окисью углерода при максимальной концентрации  $\text{H CO}$  в крови около 75%. Торможение цитохромоксидазы проявляется наиболее ярко (78,4%) во время „0”, т.е. сразу после прекращения воздействия CO. Через 72 часа с момента удаления животных из камеры, дыхательная активность нейронов была близкой к норме. Принимая снижение поглощения кислорода нейроном за степень нарушения дыхательного обмена клетки, зависящего от притока глюкозы в мозг, можно выдвинуть гипотезу, что накопление гликогена в мозге может быть следствием уменьшенного потребления глюкозы нейроном под действием окиси углерода.

M. Śmiałek

AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ W IZOLOWANEJ KOMÓRCE OLBRZYMIJ SUBSTANCJI SIATKOWATEJ PNIA MÓZGU SZCZURA W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA TLENKIEM WĘGLA

(metoda mikronurka Kartezjusza)

Streszczenie

Celem pracy było oznaczenie aktywności oksydazy cytochromowej w izolowanych komórkach olbrzymich tworzących siatkowatego pnia mózgu szczurów rasy Wi-

star, w wieku 6 tygodni, w następstwie działania tlenku węgla. Zastosowano model doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla (Śmiałek i wsp. 1973). Zużycie tlenu przez izolowaną komórkę nerwową oznaczano metodą mikronurka Kartezjusza wg Zeuthena (1953).

Uzyskane wyniki wskazują na przejściowe obniżenie metabolizmu tlenowego neuronów pod wpływem przejściowego zatrucia tlenkiem węgla przy najwyższym stężeniu HbCO we krwi ok. 75%. Najbardziej zaznacza się zahamowanie aktywności oksydazy cytochromowej (78,4%) w czasie „0”, tj. natychmiast po zaprzestaniu działania CO. Po 72 godz. od momentu wyjęcia zwierząt z komory uzyskano zolizoną do normy aktywność oddechową neuronów.

Przyjmując obniżenie zużycia tlenu przez neuron jako stopień uszkodzenia tlenowych przemian oddechowych komórki, zależnych od dopływu glukozy do mózgu, można wysunąć hipotezę, że gromadzenie się glikogenu w mózgu może być następstwem zmniejszonego zużycia glukozy przez neurony w wyniku działania tlenku węgla.

#### REFERENCES

1. Hamberger, A.: Difference between isolated and vascular glia with respect to respiratory activity. *Acta Physiol. Scand.* 1963, vol. 58, suppl. 203, 1—58
2. Hamberger, A., Hyden, H.: Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol.* 1963, 16, 521—525
3. Mossakowski, M. J., Long, D. N., Myers, R. E., de Curet, H. R., Klatzo, I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 27, 500—516
4. Potter, VR.: The homogenate technique. In: „Manometric Technique”. Ed. W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, Burgess, Min. 1957, 170—187
5. Slater, E. C.: The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations. *Bioch. J.* 1949, 44, 305—308
6. Śmiałek, M., Hamberger, A.: The effect of moderate hypoxia and ischemia on cytochrome oxidase activity and protein synthesis in brain mitochondria. *Brain Res.* 1970, 17, 369—371
7. Śmiałek, M., Sikorska, M., Korthals, J., Bicz, W., Mossakowski, M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose:glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—231
8. Szumańska, G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—317
9. Whitehead, T. P., Worthington, N.: The determination of carboxyhemoglobin. *Clin. chim. Acta* 1961, 6, 356—358
10. Zeuthen, E.: Growth as related to the cell cycle in single-cell cultures of *Tetrahymena piriformis*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1953, 1, 239—249

Author's address: Dept. of Neuropath. Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 00-784 Warszawa, Dworkowa Str. 3.



ZBIGNIEW M. RAP, ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI, MARIANNA SIKORSKA

OCENA STANU BARIERY KREW—MÓZG I ZAWARTOŚCI  
WODY W MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM OSTRYM  
ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA \*)

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

W większości dotychczasowych opracowań poświęconych patomorfologii ośrodkowego układu nerwowego w ostrym zatruciu tlenkiem węgla podkreśla się obecność obrzęku mózgu, któremu szereg autorów przypisuje zasadniczą rolę w patomechanizmie występujących uszkodzeń osłonek mielinowych (Jacob 1958, Jacob i wsp. 1962, Schwedenberg 1959, Osetowska 1964). Zwraca uwagę fakt, że morfologiczne cechy obrzęku opisywano częściej w ludzkim materiale sekcyjnym niż w warunkach doświadczalnych (Meyer 1928, Jacob 1958, Schwedenberg 1959, Romanowa 1959, Osetowska 1964, Brucher 1967, Lapresle, Fardeau 1967, Hirano i wsp. 1968, Miyagishi, Suwa 1969, Preziosi i wsp. 1970, Śmiałek i wsp. 1973).

Związane z zatruciem tlenkiem węgla uszkodzenie mięśnia sercowego, zwłaszcza komory prawej, podkreślane przez Romanową (1959), Boura i wsp. (1967) oraz Preziosi i wsp. (1970), prowadzi do uogólnionych zaburzeń hemodynamicznych i przekrwienia żylnego, sprzyjających rozwojowi zmian obrzękowych w mózgu.

W poprzednio opublikowanych pracach, poświęconych następstwom ostrego doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla stwierdzono występowanie zróżnicowanych zaburzeń biochemicznych (Albrecht 1973, Śmiałek i wsp. 1973) oraz histochemicznych (Szumańska 1973), którym towarzyszyły jedynie nieznaczne histologiczne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, a w obrazie mikroskopowo-elektronowym tkanki obserwowano tylko obrzmienie okołonaczyniowych wypustek astrogleju i astrocytarne gromadzenie złogów glikogenu (Śmiałek i wsp. 1973). Korthals i wsp. (1973) stwierdzili natomiast, że występowanie niestałych i wyka-

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

zujących zmienne nasilenie cech obrzęku mózgu, było uwarunkowane ciężkością zatrucia.

Skłoniło to nas do przeprowadzenia badań nad stanem bariery krew—mózg i zawartością wody w mózgu w następstwie ostrego zatrucia tlenkiem węgla, pozwalających na ustalenie, czy w warunkach zastosowanego modelu doświadczalnego dochodzi do obrzęku mózgu i na wstępne określenie jego charakteru.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 115 szczurów rasy Wistar, obojga płci, wagi 150—250 g. Zwierzęta umieszczano w komorze o pojemności 60 l na okres 90 minut. Przez komorę w sposób ciągły przepływało powietrze w ilości 2 litrów/min., przy czym w ciągu pierwszych 60 min. przepływające przez komorę powietrze zawierało ok. 1% tlenu węgla. Przez pozostałe 30 min. przetrzymywania zwierząt w komorze, przepuszczano przez nią powietrze nie zawierające tlenu węgla. Zwierzęta doprowadzono do stanu śpiączki, trwającej 15—20 minut. Warunki doświadczenia odpowiadają tym, które zastosowano w grupie IV w badaniach Korthalsa i wsp. (1973).

Badania zwierząt przeprowadzono w następujących grupach czasowych:

- grupa I — tzw. „0” bezpośrednio po wyjęciu z komory
- grupa II — w 3 godz. po wyjęciu z komory
- grupa III — w 6 godz. po wyjęciu z komory
- grupa IV — w 12 godz. po wyjęciu z komory
- grupa V — w 24 godz. po wyjęciu z komory
- grupa VI — w 48 godz. po wyjęciu z komory
- grupa VII — kontrola (zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom)

#### *Badania bariery krew—mózg*

1. Przy użyciu 2% roztworu błękitu Evansa. Szczurom, przed umieszczeniem w komorze, wstrzykiwano do żyły ogonowej błękit Evansa w ilości 0,2 ml/100 g wagi ciała. Zwierzęta dekapitowano w poszczególnych grupach czasowych, a wyjęte mózgi poddawano wstępnej ocenie makroskopowej. Mózgi utrwalano w 10% formalinie, a następnie skrawki krojono przez obie półkule na mikrotomie mroźnikowym, badano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss. Fluorescencję kompleksu błękitu Evansa z białkami surowicy obserwowano w strumieniu światła lampy HBO-200 przy użyciu filtrów BG-12/4 i OG-9. Czarno-białe zdjęcia wykonano na filmie ORWO MP-27.

2. Przy użyciu  $^{131}\text{J}$  albuminy.  $^{131}\text{J}$  albuminę wstrzykiwano do żyły ogonowej w dawce 5  $\mu\text{Ci}$  przed umieszczeniem zwierząt w komorze doświadczalnej. Zwierzęta dekapitowano bezpośrednio po wyjęciu z komory, w czasie „0”, 6 i 24 godz. po wyjęciu z komory oraz w 24 godz. po czterokrotnej ekspozycji na działanie tlenu węgla w odstępach 24-godzinnych.

Czas krążenia związku znakowanego był równy czasowi przeżycia zwierząt, z wyjątkiem grupy z ekspozycją czterokrotną, w której związek podawano na 24 godz. przed zabiciem zwierząt. Zwierzętom przyżyciowo pobierano 1 ml krwi z prawej komory serca, a następnie dekapitowano je, wyjmowano mózgi i określano ich ciężar. Każdy mózg opłukiwano wodą w celu usunięcia krwi z jego powierzchni. Pobrane tkanki umieszczano na dnie probówek i określano ich radioaktywność w studziennym liczniku scyntylacyjnym  $\text{SE}_1$  współpracującym z przelicznikiem  $\text{Pt-67}$  i drukarką VAG. Radioaktywność próbek mierzono przez czas zapewniający dokładność statystyczną 1%. Ostateczne wyniki wyrażano jako stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi.

Badanie zawartości wody przeprowadzono w obu półkulach mózgu, mózdzku i pniu mózgu. Pobrany materiał po usunięciu spłotu naczyńiówkowego i pobraniu wycinka tkanki mózgowej do rutynowych badań histopatologicznych, ważono, a następnie suszono w temperaturze ok.  $100^\circ\text{C}$  do stałej wagi przez 7 do 10 dni.

Barwienia histologiczne wykonano na materiale utrwalonym w 10% formalinie stosując hematoksylinę-eozynę, fiolet krezyli i metodę Heidenhaina.

#### WYNIKI

Stan kliniczny zwierząt w początkowym okresie przebywania w komorze doświadczalnej charakteryzował się zmniejszoną ruchliwością i zaburzeniami statyki, w późniejszym okresie śpiączką. Zwierzęta były wiotkie, obserwowano u nich okresowo zaburzenia oddechowe. Pełną sprawność fizyczną odzyskiwały po upływie około 3 godz. od wyjęcia z komory.

W ocenie makroskopowej mózgow zwierząt poddanych działaniu tlenu węgla obserwowano wyraźne poszerzenie i nastrzyknięcie krwią naczyń opony miękkiej w okresie do 6 godz. od wyjęcia z komory.

W obrazie mikroskopowym, poza wyraźnym nastrzyknięciem krwią naczyń żylnych i rozwarstwieniem włókien nerwowych w istocie białej mózgu w bezpośrednim sąsiedztwie ścian komór bocznych i spoidle wielkim mózgu, nie stwierdzano istotnych nieprawidłowości strukturalnych (obserwacje dotyczą grup V i VI).

U zwierząt, którym wstrzyknięto błękit Evansa nie stwierdzano makroskopowo niebieskiego zabarwienia tkanki. W świetle mikroskopu fluorescencyjnego obserwowano czerwoną fluorescencję ograniczoną do światła naczyń i ich ścian (ryc. 1, 2) oraz splotu naczyńiówkowego. W zależności od wielkości naczynia, fluorescencja obejmowała wszystkie warstwy naczynia — arteriole i kapilary, a w większych ograniczała się tylko do błony sprężystej.

Również w badaniach izotopowych przy użyciu  $^{131}\text{J}$  albuminy we wszystkich grupach doświadczalnych nie stwierdzano statystycznie znamiennych różnic w radioaktywności mózgow badanych zwierząt w porównaniu z radioaktywnością mózgow zwierząt kontrolnych, świadczących o uszkodzeniu bariery krew-mózg. Uzyskane wyniki w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Radioaktywność mózgu szczura po dożylnym wstrzyknięciu  $^{131}\text{J}$  albuminy w ostrym zatruciu CO

Table 1. Radioactivity of rat brain after i.v. injection of  $^{131}\text{J}$  albumin in acute carbon monoxide intoxication

Czas po ekspozycji zwierząt w CO — godz. Time after exposure of animals to CO — hrs	Stosunek radioaktywności właściwych mózgu do krwi Ratio of the brain to blood specific activities	
	Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	Zwierzęta kontrolne Control animals
”0”	2,79 ± 0,34*) (7)**	2,55 ± 0,40 (6)
6	2,20 ± 0,35 (6)	2,39 ± 0,37 (6)
24	2,76 ± 0,43 (8)	2,68 ± 0,39 (6)
24 godz. po 4-krotnym zatruciu CO 24 hrs after the 4th intoxication	3,02 ± 0,11 (6)	2,68 ± 0,39 (6)

\*) średnia arytmetyczna ± odchylenia standardowe  
mean ± standard deviation

Dla wszystkich grup  $p > 0,05$   
For all the groups  $p > 0,05$

\*\*\*) liczba zwierząt  
number of animals

Zawartość wody w tkance nerwowej w badanych grupach zwierząt ulegała wahaniom (tabela 2). W mózgow zwierząt grupy I, zabijanych bezpośrednio po ekspozycji CO stwierdzono nieznaczny, ale statystycznie znamienny ( $p \leq 0,05$ ) spadek zawartości wody, wynoszący 0,6% w stosunku do kontroli. W następnych grupach doświadczalnych: II i III obserwowano powolny wzrost zawartości wody w tkance mózgowej, przy czym maksymalny przyrost — 2,6% — zanotowano w grupie IV, tj. po

Tabela 2. Zawartość wody w mózgach szczurów w następstwie doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla

Table 2. Content of water in rat brains after experimental carbon monoxide intoxication

Grupa Group	Czas po ekspozycji CO — godziny Time after exposure to CO — hours	Zawartość wody w % Content of water % $\bar{x} \pm m^*$	p**)
I	''0''	84,71 ± 0,17 (6***)	≤ 0,05
II	3	85,82 ± 0,15 (8)	≤ 0,05
III	6	86,16 ± 0,10 (6)	≤ 0,001
IV	12	87,92 ± 0,14 (5)	≤ 0,001
V	24	85,40 ± 0,14 (5)	≥ 0,05
VI	48	85,68 ± 0,21 (5)	≤ 0,05
VII	kontrola controla	85,35 ± 0,13 (7)	

\*) średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej (test Studenta)  
arithmetic mean ± standard error of mean (Students test)

\*\*\*) prawdopodobieństwo  
probability

\*\*\*\*) liczba zwierząt  
number of animals

12 godz. od momentu wyjęcia z komory. Przyrost ten jest statystycznie znamieny w stosunku do kontroli ( $p \leq 0,001$ ). W dalszych grupach: V i VI (24 i 48 godz po ekspozycji CO) nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości wody w stosunku do grupy kontrolnej.

#### OMÓWIENIE

Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że w zastosowanych warunkach doświadczalnych, ostre zatrucie tlenkiem węgla nie prowadzi do uszkodzenia naczyniowo-tkankowych mechanizmów barierowych dla wielkocząsteczkowych związków chemicznych. Zarówno błąkit Evansa w połączeniu z alkuminami surowicy krwi, jak i  $^{131}\text{J}$  albumina nie przechodzą poza ściany naczyń krwionośnych w żadnym z badanych czasów doświadczania. Przejściowe zwiększenie zawartości wody w mózgu osiąga wartości statystycznie znamienne w 6, a przede wszystkim w 12 godzinie po zatruciu. Mimo istniejącego przekrwienia tkanki wydaje się, że stwierdzany przyrost wody należy wiązać z jej pozanaczyniowym gromadzeniem się, ponieważ przypada on na inny okres doświadczania niż maksymalne objawy zastoju naczyniowego. Cechy przekrwienia mózgu występują w największym nasileniu, stwierdzanym w

obrazie makroskopowym, bezpośrednio po zakończeniu zatrucia; w tym czasie nie występuje wzrost zawartości wody w tkance. Mimo stosunkowo nieznacznego przyrostu wody można go uważać za wykładnik zmian obrzękowych i odpowiednik stwierdzanego w tych samych warunkach w obrazie mikroskopowo-elektronowym obrzmienia astrogleju (Korthals i wsp. 1973). Bliższa charakterystyka płynu obrzękowego jest niemożliwa ze względu na nie przeprowadzone oznaczenia zawartości elektrolitów.

Zbliżone do uzyskanych przez nas wyniki uzyskali Bakay i Bendixen (1963) w warunkach hipoksji skojarzonej z hiperkapnią, stwierdzając zwiększone gromadzenie się wody w tkance oraz podwyższoną wymianę jonów  $^{24}\text{Na}$  i  $^{32}\text{P}$  między tkanką nerwową i krwią przy nieprzechodzeniu  $^{125}\text{I}$  albuminy poza łożysko naczyniowe. W dalszych badaniach Bakaya i Lee (1968) oraz Bakaya i Kobayoshi (1970) stwierdzono ponadto przechodzenie  $^{14}\text{C}$ -sacharozy i  $^{14}\text{C}$ -inuliny do przestrzeni międzykomórkowych mózgu i  $^{203}\text{Hg}$ -chlormerodryny do perikariów i wypustek uszkodzonych komórek nerwowych. Zmianom tym towarzyszyły obrazy uszkodzenia strukturalnego neuronów i astrogleju. Występował również wzrost zawartości wody w tkance i morfologiczne cechy obrzęku ograniczone do istoty białej.

Analogiczne wyniki uzyskali Kapuściński i wsp. (1972) w doświadczeniach prowadzonych na modelu hipoksyjno-ischemicznym. Stwierdzali oni również przejściowe gromadzenie się wody w mózgu bez przechodzenia  $^{131}\text{I}$ -albuminy i  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  poza łożysko naczyniowe. Zmiany te autorzy wiążą ze zmniejszeniem mózgowego przepływu krwi i przekrwieniem biernym mózgu.

Zwiększona zawartość wody w tkance, przy równoczesnym braku zmian w przepuszczalności naczyń dla wielkocząsteczkowych znaczników barierowych, stwierdzone w naszym materiale wskazują, że ostre zatrucie tlenkiem węgla w zastosowanych warunkach doświadczalnych prowadzi do nieznacznego obrzęku mózgu, o charakterze zbliżonym do obrzęku cytotoksycznego wg klasyfikacji Klatzo (1968), analogicznie jak w przypadku przytoczonych powyżej doświadczeń nad następstwami hipoksji skojarzonej z hiperkapnią i zespołem hipoksyjno-ischemicznym. Obrzęk tego typu rozwija się w warunkach pierwotnych zaburzeń metabolizmu poszczególnych elementów strukturalnych tkanki nerwowej, bez uszkodzenia układu barierowego krew-mózg. Na taką możliwość w naszym przypadku wskazują stwierdzone poprzednio w identycznych warunkach doświadczalnych nieprawidłowości biochemiczne (Allbrecht 1973, Śmiałek i wsp. 1973, Śmiałek 1974).

Nie wyklucza to możliwości występowania w zatruciu tlenkiem węgla obrzęku o cechach obrzęku naczyniopochodnego, związanego z uszkodzeniem bariery krew-mózg, co między innymi sugeruje część badań



*Ryc. 1.* Fluorescencja (błękit Evansa w kompleksie z albuminami) w świetle i ścianach tętniczki beczkowejej i jej rozgałęzieniach. Kora ciemieniowa szczura, 3 godz. po ostrym zatruciu CO. Pow. 200×.

*Fig. 1.* Fluorescence (Evans blue-albumine complex) in lumen and walls of trabecular arteriale and its branches. Rat brain parietal cortex, 3 hrs following acute CO intoxication. ×200.



*Ryc. 2.* Przekrój poprzeczny przez naczynie żyłne istoty białej mózgu szczura w 6 godz. po ostrym zatruciu CO. Fluorescencja w świetle i ścianach naczynia. Pow. 200×.

*Fig. 2.* Cross section of a white matter vein 6 hrs after acute CO intoxication. Fluorescence in lumen and walls. ×200.

Korthalsa i wsp. (1973) prowadzonych w zmienionych warunkach doświadczalnych. Wskazują na to również dalsze analogie z przytoczonymi powyżej badaniami nad wpływem hipoksji z hiperkapnią oraz hipoksji skojarzonej z niedokrwieniem tkanki. Bakay (1967) uzyskiwał przerwanie bariery krew-mózg dla związków wielkocząsteczkowych w warunkach hipoksji skojarzonej z hiperkapnią przy osiągnięciu określonego progowego obniżenia ciśnienia cząsteczkowego tlenu, a wzroście dwutlenku węgla we krwi i spadku pH tkanki nerwowej poniżej 6,75. Kapuściński i wsp. (1972) obserwowali z kolei uszkodzenia bariery w hipoksyjno-ischemicznym modelu Levina (1960) w przypadku masywnych ognisk martwicy tkanki nerwowej.

W naszym materiale na podkreślenie zasługuje brak uszkodzeń bariery krew-mózg dla zastosowanych znaczników nie tylko w przypadku jednokrotnego zatrucia, lecz również przy czterokrotnym powtórzeniu w jednakowych odstępach, podczas gdy obserwacje Korthalsa i wsp. (1973) wskazują, że wielokrotne zatrucie tlenkiem węgla prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych tkanki i jej obrzęku, którego obraz morfologiczny sugeruje jego naczyniopochodny mechanizm. Jednakże obserwacje Korthalsa i wsp. (1973) dotyczyły zwierząt z cięższym zatruciem, charakteryzujących się między innymi śpiączką trwającą do 40 minut. Stanowi to argument za zależnością uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, w tym również zaburzeń bariery krew-mózg od ciężkości zatrucia tlenkiem węgla. Wyjaśnienie tych zależności wymaga odrębnych badań na zróżnicowanych modelach doświadczalnych.

#### WNIOSKI

1. Jednorazowe zatrucie szczurów tlenkiem węgla, prowadzące do stanu śpiączkowego zwierząt, trwającego przez 15—20 minut, przy maksymalnym poziomie 75% hemoglobiny tlenkowej we krwi nie wywołuje nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej, nie powoduje uszkodzenia bariery krew-mózg dla kompleksu błękitu Evansa z białkami surowicy krwi i dla  $^{131}\text{J}$ -albuminy, natomiast prowadzi do przejściowego zwiększenia zawartości wody w tkance, przypadającego na okres 6 i 12 godziny po zatruciu.

2. Czterokrotne zatrucie tlenkiem węgla w/w warunkach, powtórzone w odstępach 24-godzinnych nie zmienia stanu bariery krew-mózg dla  $^{131}\text{J}$ -albuminy.

3. Obrzęk mózgu występujący w wymienionych warunkach zatrucia CO jest zbliżony swoim charakterem do obrzęku cytotoksycznego, spotykanego w różnych typach niedotlenienia układu nerwowego.

Autorzy dziękują p. Teresie Pańkowskiej i p. Sławomirowi Januszewskiemu za pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczeń.



З. М. Рап, А. Капустински, М. Сикорска

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА  
И СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ В МОЗГЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ  
ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Проведена оценка состояния гематоэнцефалического барьера и содержания воды в мозге крыс в результате острого одноразового и повторных отравлений окисью углерода. Опыты проведены на 115 крысах линии Вистар обоих полов, выдерживаемых в течении 90 минут в камере, через которую пропускалась газовая смесь, содержащая 10% CO. Уровень карбоксигемоглобина у животных составил 70—75%. В течение 15—20 мин. животные находились в состоянии спячки. Животных убивали группами через 0, 3, 6, 12, 24 и 48 часов после удаления из камеры.

Состояние гематоэнцефалического барьера оценивалось с помощью комплекса, состоящего из альбумина и синего Эванса, флюоресцентного микроскопа и <sup>131</sup>I-альбумина для определения удельной радиоактивности ткани. Содержание воды определяли путем сравнения сухого и влажного весов ткани.

Исследования обнаружили, что ни в один срок после отравления не доходит до нарушения гематоэнцефалического барьера для примененных метчиков. В то же время через 6 и 12 часов после отравления наблюдалось статистически достоверное увеличение количества воды в ткани, исчезающее в более поздние периоды. Морфологический контроль не показал заметных структурных изменений.

Результаты исследований указывают, что в использованной экспериментальной модели временный отек ткани, выражающийся увеличением содержания воды, не обладает признаками отека сосудистого происхождения, а скорее схож с отеками, наблюдаемыми при других состояниях кислородной недостаточности.

Z. M. Rap, A. Kapuściński, M. Sikorska

EVALUATION OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND WATER CONTENT  
IN BRAIN IN EXPERIMENTAL ACUTE CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Summary

Evaluation of the blood-brain barrier and water content in rat following acute one-time and repeated carbon monoxide intoxication was carried out.

The experiments were performed on 115 rats of Wistar strain, of both sexes, kept for 90 min. in a chamber with continuous flow of a gas mixture containing 1% CO. The carboxyhemoglobine level in these animals was 70—75%. During the experiment the rats were in a comatose state for 15—20 min. The animals were decapitated in groups directly after cessation of the procedure (time „0”) and 3, 6, 12, 24 and 48 hrs thereafter.

The blood-brain barrier was evaluated with the use of an Evans blue-albumine complex in the fluorescence microscope and by means of specific tissue radioactivity measurments after administration of <sup>131</sup>I-iodoalbumine. The water content was determined by comparing the wet and dry weight of the tissue.

The studies revealed no damage of the blood-brain barrier for the employed markers at any time after the experiment. However, a statistically significant

increase of the water content in the tissue was observed to appear after 6 hrs, persist for another 6 hrs and recess in the later periods. Morphological examination showed no discernable structural lesions.

These results indicate, that the observed transient tissue edema, manifested by the increase of water content is not of a vasogenic type and resembles those occurring in other models of hypoxia.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566
2. Bakay L., Bendixen H. H.: Central nervous system vulnerability in hypoxic states. Isotopic uptake studies. W: „Selective vulnerability of the central nervous system in hypoxemia”. Ed. J. P. Schadé and W. H. McMenemey, Oxford; Blackwell Scientific 1967, 63—78
3. Bakay L.: Radio-isotopic studies in brain edema. W: „Brain edema”. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger, Springer-Verlag, Wien, New York 1967, 517—527
4. 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
5. Bakay L., Kabayashi T.: Cerebral isotope uptake in acute experimental hypercapnic hypoxia. *Exp. Neurol.* 1971, 32, 303—312
6. Bour H., Tutin M., Pasquier P.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. I. Clinical data with references to 20 fatal cases. W: „Progress in Brain Research”. Ed. H. Bour and M. A. Ledingham, Amsterdam 1967, 24, 1—30.
7. Brucher J. M.: Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. W: „Carbon monoxide poisoning” *Progr. in Brain Res.* Ed. H. Bour, J. M. Ledingham, Elsevier, Amsterdam 1967, 24, 96—100
8. Hirano H., Inoe J., Tanomi I.: Studies on the mode of action of carbon monoxide. II. Pattern of action of carbon monoxide. *Jap. J. Hyg.* 1968, 23, 286—292
9. Jacob H.: Das Zentralnervensystem bei Injektionen Intoxikationem und anderen Allgemein und Organerkrankungen. W: *Hdb. der Spec. Path. Anatomie.* Ed. C. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle, Springer, Berlin 1958, Bdt. 13/2A
10. Jacob H., Mumme C., Solcher H.: Entmarkung bei zerebralen Oödemschaden. *Arch. Z. ges. Neurol.* 1962, 203, 311—320
11. Kapuściński A., Goel Y., Lindsay R., Kapuścińska B., McDonald M. W.: Study on the mechanism and kinetics of brain edema induced by ischemia and hypoxia. A new ischemic-hypoxic model of cerebral edema. XIII Symp. Połud. Wschod. Sekcji Towarzystwa Medycyny Nuklearnej, Atlanta, Georgia 1972; Streszczenia referatów. *Southern Med. J.* 1972, 65, 1425
12. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów. *Neuropat. Pol.* 1972, 1, 45—64
13. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 23, 1—14
14. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny w ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenko-węglowej. *Neuropat. Pol.* 1973, XI, 3, 279—300

15. 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”. Progr. in Brain Res. Ed. H. Bour, J. M. Lendingham, Elsevier, Amsterdam 1967, 24, 96—100
16. Miyagishi T., Suwa N.: Electron microscopic studies on the cerebral lesions of rats in experimental carbon monoxide poisoning. Acta neuropath. (Berl.) 1969, 14, 118—125
17. Meyer A.: Experimentelle Erfahrungen über die Kohlenoxydvergiftung des Zentralnervensystem. Z. Neurol. 1928, 112, 187—212
18. Osetowska E.: Encefalopatia — CO. Neuropat. Pol. 1964, 2, 159—172
19. Preziosi J. M., Lindenberg C., Levy D., Christensen M.: An experimental investigation in animals of the function 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
20. Romanowa H. P.: Patologoanatomiczeskije izmienenija w gołownom mozgu sobak posle terminalnych sostojanij wyzwannych ostroj krowoteriej i otrawlenijem okisju ugleroda. Awtoferat disertacji na soiskanie uczionoj stiepieni kandidata medicinskih nauk. Moskwa 1959
21. Schwedenberg T. H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia. J. Neuropath. exp. Neurol. 1959, 18, 587—608
22. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose:glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. Acta Neuropath. (Berl.) 1973, 24, 222—231
23. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Neuropat. Pol. 1973, 11, 301—317

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

STANISŁAW KOŚMIDER, ADAM MISIEWICZ, JANUSZ PASIEWICZ

## WPŁYW WIĄZANIA TLENKÓW AZOTU GAZOWYM AMONIAKIEM NA WYSTĘPOWANIE ZMIAN W CENTRALNYM UKŁADZIE NERWOWYM

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Zawodowych Śl. AM w Zabrze

Kierownik: prof. dr med. W. Zahorski

Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej Śl. AM w Zabrze

Kierownik: prof. dr med. W. Niepołomski

W następstwie rozwoju przemysłu i motoryzacji wzrasta zanieczyszczenie atmosfery. Jednym z głównych składników zanieczyszczeń gazowych powietrza atmosferycznego są tlenki azotu (Mueller, Hitchcock 1969, Nieding i wsp. 1970). Powstają one z utleniania substancji organicznych zawartych w paliwach jak również w następstwie łączenia się tlenu atmosferycznego z azotem atmosferycznym w temperaturze pokojowej czy też pod wpływem oddziaływania fotonów promieni słonecznych o wysokiej energii (Ebel 1969). W normalnych warunkach na skutek ruchu powietrza i procesów dyfuzyjnych nie obserwuje się przekroczenia dopuszczalnych stężeń tych gazów w powietrzu atmosferycznym miast i wsi. W niesprzyjających warunkach atmosferycznych przy zwiększonej wilgotności powietrza, spadku temperatury, mgieł i zmniejszeniu ruchu powietrza i jego wymiany dochodzi do wzrostu stężeń zanieczyszczeń gazowych i pyłowych atmosfery i ich kumulacji, wielokrotnie opisywanych jako „katastrofy mgły” (Bradley i wsp. 1958, Speizer 1969, Watanabe 1965).

Wzrost stężenia zanieczyszczeń, zwłaszcza tlenków azotu i siarki, wykazuje korelację ze zwiększoną zachorowalnością na schorzenia układu oddechowego i krążenia (Lawther i wsp. 1964, Martin 1964). Toksyczność tlenków azotu uzależniona jest od ich stężenia i czasu ekspozycji. Tlenki azotu dostają się do organizmu drogą oddechową. Związki te reagują z wodą w drogach oddechowych tworząc kwas azotawy i azotowy, które pod wpływem zasad przechodzą w azotyny i zostają absorbowane do krwioobiegu. Największe zmiany w ustrojach żywych po ekspozycji na tlenki azotu obserwuje się w drogach oddechowych (Christopher i wsp. 1958, Freeman i wsp. 1968, Thomas i wsp. 1968, Wright 1969).

Wchłanianie azotany i azotyny mogą wywoływać również zaburzenia metabolizmu w innych tkankach.. Interesujące wydaje się zatem przesłedzenie zmian w centralnym układzie nerwowym po przewlekłej ekspozycji zwierząt na tlenki azotu.

Celem wykazania czy zmiany w układzie nerwowym są wynikiem działania kwaśnych komponent przeprowadzono ich neutralizację przy pomocy gazowego amoniaku. Badania te mają na celu ocenę skuteczności neutralizacji tlenków azotu amoniakiem w odniesieniu do neurotoksycznego działania tlenków azotu.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 110 świnkach morskich, samcach o ciężarze ciała 350—500 g, hodowli Centralnej Zwierzętarńi Doświadczalnej Śląskiej AM. Zwierzęta pozostawały przez cały okres doświadczenia na standardowej diecie.

Badane zwierzęta podzielono na 3 grupy:

*I grupę* — kontrolną stanowiło 50 świnek morskich pozostających w komorach toksykologicznych, ale otrzymujących do oddychania czyste powietrze, bez dodatkowych zanieczyszczeń;

*II grupę* stanowiło 30 świnek, które zatrutowano codziennie przez 8 godzin w ciągu 180 dni w komorach toksykologicznych, do których doprowadzano tlenki azotu w stężeniu 1 ppm. Tlenki azotu uzyskiwano w dużym aparacie Kippa. Wymagało to ciągłego kontrolowania stężenia tlenków azotu w komorze toksykologicznej. Temperatura w komorze toksykologicznej o objętości 1 m<sup>3</sup> była utrzymywana w czasie doświadczeń w zakresie 21—22°C. Wilgotność względna wahała się w granicach 65—70%. Ilość doprowadzonego do komory powietrza wynosiła 6.000 litrów na godzinę, co dawało 6 wymian powietrza w ciągu godziny. Taka wymiana zabezpieczała przed gromadzeniem się nadmiernej ilości produktów przemiany materii świnek morskich (CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub>) (Popow 1964). Zwierzęta ważono co tydzień przed umieszczeniem w komorze toksykologicznej.

*III grupa.* Aby ocenić pod względem toksykologicznym wartość metody wiązania tlenków azotu gazowym amoniakiem przeprowadzono drugą serię doświadczeń. Do mieszalnika, który stanowiła szklana rura reakcyjna umieszczona w płaszczu wodnym celem jej ochłodzenia do temperatury 10°C, wprowadzono tlenki azotu w ilości 1 ppm oraz amoniak w nieco większych ilościach niż to wynikało ze stosunków stechiometrycznych. Reakcja wiązania tlenków azotu przez gazowy amoniak zachodziła w temperaturze około 10°C. Powstające produkty reakcji były odprowadzane do komory, w której przebywały zwierzęta doświadczalne.

W czasie doświadczeń wykonywano dokładne oznaczenia tlenków azotu i amoniaku przed wprowadzeniem do rury reakcyjnej oraz w komorze toksykologicznej po przereagowaniu tlenków azotu z amoniakiem. Pomiarzy te miały na celu wykazanie czy dostarczony w nadmiarze amoniak przereagował z tlenkami azotu. Tlenki azotu oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika Grissa; uzyskane wyniki przedstawiono w przeliczeniu na  $N_2O_5$ . Stężenie amoniaku oznaczano przy pomocy metody Dutkiewicza (1971).

U zwierząt doświadczalnych i kontrolnych badano w surowicy aktywność aldolazy metodą Sibleya i Lehmingera w modyfikacji Brunsza i Pulsa (1954), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wg Cabauda i Wróblewskiego (1958), fosfoheksoizomerazy wg Orłowskiego (1958), fosfatazy kwaśnej i zasadowej wg Kinga (1956) oraz aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej wg Reitmana i Frankela (1957). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy testu t Studenta.

Zwierzęta zabijano przez wykrwawienie, sekcjonowano i pobierano wycinki z lewej półkuli mózgu do badań biochemicznych. Pobrane wycinki homogenizowano i oznaczano w nich aktywność uprzednio wymienionych enzymów w przeliczeniu na 1 gram świeżej tkanki. Do badań anatomopatologicznych pobierano wycinki z prawej półkuli mózgu, mózdzku oraz opon. Wycinki zatapiano w parafinie, skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną. Wybrane preparaty barwiono ponadto metodą van Gieson i Mallory'ego oraz fioletem krezyłu.

W pobranych do badań histochemicznych wycinkach z kory mózgu wykonywano odczyny na dehydrogenazę bursztynianową wg metody Novikoffa i wsp. (1961) w skrawkach świeżych zamrażanych w kriostacie. Czas inkubacji wynosił 60 minut w temp.  $37^{\circ}C$ . Aktywność adenozynotrójfosfatazy (ATP-azy) określano metodą Wachsteina Meisla (1957) po uprzednim utrwaleniu skrawków w płynie Bakera. Poza tym oznaczano aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej metodą Gomoriego wg Pearse'a (1960).

#### WYNIKI

Zwierzęta eksponowane przewlekłe na tlenki azotu wykazywały początkowo niepokój, a następnie wzmożoną agresywność. Obserwowano łamliwość włosów i ich wypadanie. Od początku doświadczenia stwierdzano przyspieszenie częstości oddechów, które utrzymywało się przez cały okres ekspozycji. Grupa zwierząt eksponowanych na produkty reakcji tlenków azotu z amoniakiem wykazywała jedynie nieznaczne przyspieszenie oddechu.

Przeprowadzone badania nad kinetyką reakcji tlenków azotu z amoniakiem wykazały, że nie cała ilość amoniaku dostarczonego do rury re-

akcyjnej przereagowała z tlenkami azotu. Część wolnego amoniaku stwierdzono w komorach toksykologicznych (0,3 mg/Nm<sup>3</sup> a tylko 0,85 mg/Nm<sup>3</sup> zostało związane z tlenkami azotu). Reakcja zachodziła w temperaturze około 10°C, natomiast w wyższej temperaturze nie obserwowano wiązania tlenków azotu przez amoniak. Kilkakrotnie przeprowadzone analizy wykazały następujący skład produktu reakcji NO<sub>2</sub> z NH<sub>3</sub>: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> — 66,7%, NH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> — 17,3%, NHO<sub>3</sub> — 16%.

Zwierzęta obu grup przeżyły 6-miesięczny okres doświadczeń i nie obserwowano wzrostu śmiertelności. Ciężar ciała zwierząt eksponowanych na tlenki azotu wzrastał średnio w ciągu 180 dni doświadczenia o 62 g, w tym czasie zwierzęta grupy kontrolnej przybierały na wadze średnio o 395 g. Zwierzęta eksponowane na produkty reakcji NO<sub>2</sub> z NH<sub>3</sub> wykazywały wzrost ciężaru ciała średnio o 120 g.

Aktywność aldolazy, dehydrogenazy mleczanowej, fosfoheksoizomerazy oraz fosfatazy zasadowej wzrastała znamienne statystycznie w surowicy krwi, natomiast w homogenatach mózgu aktywność fosfatazy zasadowej uległa obniżeniu, a wzrost pozostałych enzymów był nieznamien-

## T a b e

Aktywność niektórych egzymów w surowicy krwi zwierząt tlenków azotu z

Enzym	Zwierzęta zdrowe średnia arytm. $m_1 \pm \sigma$ Zakres od — do	Zwierzęta zatrutowane tlenkami azotu średnia arytm. $m_2 \pm \sigma$ Zakres od — do	Zwierzęta ekspono- wane na produkty reakcji tlenków azotu z amoniakiem średnia arytm. $m_3 \pm \sigma$ Zakres od — do
Aldolaza	145,0 ± 63,5 60,0 — 290,0	213,0 ± 57,7 180,0 — 290,0	177,0 ± 36,3 98,0 — 325,0
LDH	281,3 ± 128,8 100,0 — 500,0	341,0 ± 96,6 203,6 — 500,0	356,0 ± 96,6 200,0 — 460,0
Fosfoheksoizo- meraza	12,35 ± 2,62 8,55 — 16,20	14,01 ± 1,29 12,24 — 18,54	14,93 ± 1,20 12,60 — 16,38
Fosfataza kwaśna	5,92 ± 3,61 0,75 — 11,1	19,6 ± 3,21 10,2 — 26,4	6,2 ± 5,15 0,75 — 22,5
Fosfataza zasadowa	6,6 ± 2,77 3,4 — 11,1	22,6 ± 3,41 16,2 — 33,0	4,3 ± 2,77 0,75 — 12,0
Aminotransferaza asparaginianowa	40,6 ± 19,41 22,0 — 87,0	91,7 ± 40,9 24,0 — 151,0	30,0 ± 10,12 14,0 — 47,0
Aminotransferaza alaninowa	45,5 ± 12,71 28,0 — 72,0	82,0 ± 31,5 22,0 — 140,0	26,0 ± 13,51 10,0 — 68,0

ny statystycznie. Związanie tlenków azotu gazowym amoniakiem i eksponowanie zwierząt na powstałe produkty reakcji wywoływało mniejsze zaburzenia enzymatyczne niż pod wpływem samych tlenków azotu. Aktywność fosfatazy kwaśnej wzrastała po narażeniu zwierząt na tlenki azotu tak w surowicy krwi jak i w homogenatach mózgu. Aminotransferazy wykazywały wzrost aktywności w surowicy krwi i spadek w homogenatach mózgu po ekspozycji zwierząt na tlenki azotu. Wiązanie tlenków azotu amoniakiem prowadziło do obniżenia aktywności tych enzymów w surowicy krwi i w tkance mózgowej.

### Badanie histopatologiczne

W grupie zwierząt kontrolnych nie znaleziono w mózgu (ryc. 1) i mózdzku żadnych zmian patologicznych.

U zwierząt eksponowanych na tlenki azotu obserwowano prawie we wszystkich przypadkach przekrwienie opon miękkich oraz liczne nacieki z komórek limfoidalnych (ryc. 2), szczególnie wokół naczyń krwionoś-

#### la 1.

zdrowych, narażonych na tlenki azotu oraz produkty reakcji amoniakiem

Różnica między średnimi $m_1 - m_2$	Test znamienności różnic $t$	Znamienność statystyczna $\alpha$	Różnica między średnimi $m_2 - m_3$	Test znamienności różnic $t$	Znamienność statystyczna $\alpha$
68,0	3,7	$\alpha < 0,002$	36,0	2,6	$\alpha < 0,01$
59,7	1,7	$\alpha < 0,05$	15,0	0,55	nieznamienne
1,66	2,6	$\alpha < 0,01$	0,92	2,5	$\alpha < 0,01$
13,68	13,2	$\alpha < 0,001$	13,4	11,1	$\alpha < 0,001$
16,0	17,4	$\alpha < 0,001$	18,3	20,8	$\alpha < 0,001$
51,1	5,5	$\alpha < 0,001$	61,7	7,2	$\alpha < 0,001$
36,5	5,3	$\alpha < 0,001$	56,0	8,2	$\alpha < 0,001$



Tabe

Aktywność niektórych enzymów w hemogenatach mózgu w przeliczeniu eksponowanych na tlenki azotu oraz produkty

Enzym	Zwierzęta zdrowe średnia arytmetyczna $m_1 \pm \sigma$ Zakres od — do	Zwierzęta zatrutowane tlenkami azotu średnia arytmetyczna $m_2 \pm \sigma$ Zakres od — do	Zwierzęta eksponowane na produkty reakcji tlenków azotu z amoniakiem średnia arytmetyczna $m_3 \pm \sigma$ Zakres od — do
Aldolaza	1726,0 ± 415,0 1080,0 — 2160,0	1768,0 ± 352,8 1080,0 — 2700,0	1728,0 ± 432,7 1080,0 — 2160,0
LDH	5722,0 ± 1313,6 3250,0 — 9600,0	5867,0 ± 2483,0 2240,0 — 9600,0	6122,0 ± 2158,0 3250,0 — 9600,0
Fosfoheksoizomeraza	24,6 ± 12,09 10,8 — 50,4	30,5 ± 11,98 16,2 — 45,0	28,0 ± 17,04 10,8 — 71,0
Fosfataza kwaśna	697,6 ± 90,40 700,0 — 950,0	905,6 ± 100,02 700,0 — 1050,0	841,4 ± 99,2 725,0 — 1050,0
Fosfataza zasadowa	1194,0 ± 170,0 900,0 — 1600,0	1040,0 ± 162,2 900,0 — 1400,0	1261,0 ± 169,9 900,0 — 1600,0
Aminotransferaza asparaginianowa	4320,0 ± 396,4 3320,0 — 5120,0	4196,0 ± 396,0 3520,0 — 4650,0	3973,0 ± 529,8 2990,0 — 5120,0
Aminotransferaza alaninowa	1642,0 ± 388,0 1030,0 — 2160,0	1477,0 ± 416,0 730,0 — 1940,0	1168,0 ± 618,0 400,0 — 2890,0

nych (ryc. 3). Podobne zmiany tylko o mniejszym nasileniu obserwowano u 8 zwierząt eksponowanych na produkty reakcji.

#### Badania histochemiczne

U zwierząt eksponowanych na tlenki azotu obserwowano nieznaezny spadek nasilenia odczynu na dehydrogenazę bursztynianową w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast u świnek morskich narażonych na tlenki azotu łącznie z amoniakiem odczynu na dehydrogenazę bursztynianową były takie same jak u świnek grupy kontrolnej. Odczyn na fosfatazę kwaśną wzrastał (ryc. 4) po ekspozycji zwierząt na tlenki azotu w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspozycja świnek morskich na produkty reakcji  $\text{NO}_2 + \text{NH}_3$  powodowała mniejszy wzrost odczynu niż narażenie na same tlenki azotu. W korze mózgowej świnek morskich narażonych na wdychanie tlenków azotu odczynu na fosfatazę zasadową w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 5) uległy ogólnie osłabieniu (ryc. 6). Jednak u niektórych zwierząt w okolicy podoponowej obserwowano na ograniczonych odcinkach charakterystyczny wzrost reakcji (ryc. 7).

la 2.

na 1 gram świeżej tkanki u zwierząt zdrowych,  
reakcji tlenków azotu z amoniakiem

Różnica między średnimi $m_1 - m_2$	Test znamienności różnic t	Znamienność statystyczna $\alpha$	Różnica między średnimi $m_2 - m_3$	Test znamienności różnic t	Znamienność statystyczna $\alpha$
42,0	0,33	nieznamienne	40,0	0,3	nieznamienne
145,0	0,2	nieznamienne	255,0	0,38	nieznamienne
5,9	1,6	nieznamienne	2,5	0,6	nieznamienne
208,0	7,02	$\alpha < 0,001$	64,2	2,3	$\alpha < 0,02$
154,0	3,05	$\alpha < 0,01$	221,0	4,9	$\alpha < 0,001$
124,0	1,1	nieznamienne	223,0	9,2	$\alpha < 0,001$
165,0	1,3	nieznamienne	309,0	1,9	$\alpha < 0,05$

Wzrost nasilenia odczynu był w tych obszarach bardzo znaczny. W trzeciej grupie zwierząt odczyn na fosfatazę zasadową były w przybliżeniu takie same jak u świnek grupy kontrolnej. Odczyn na ATP-azę w korze mózgu świnek eksponowanych na tlenki azotu łącznie z amoniakiem nie były jednorodne. Zarówno w jednej jak i drugiej grupie doświadczalnej obserwowano obszary z osłabioną reakcją i obszary, w których odczyn były silniejsze niż u zwierząt kontrolnych. W badanym materiale nie znaleziono podstaw dla ustalenia wpływu stosowanych warunków doświadczalnych na aktywność ATP-azy w korze mózgu.

#### OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że przewlekła ekspozycja zwierząt na tlenki azotu w stężeniu 1 ppm wywołuje zaburzenie metabolizmu. Tlenki azotu ulegają wchłonięciu do krwiobiegu w drogach oddechowych i powodują zmiany w innych narządach. Uzyskane wyniki sugerują, że tlenki azotu hamują syntezę białka, czego dowodem może być

obserwowane zahamowanie przyrostu wagi ciała zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. W badaniach doświadczalnych i klinicznych wykazano spadek poziomu białka we krwi oraz obniżenie poziomu białek odpornościowych po ekspozycji na tlenki azotu (Kośmider i wsp. 1973). Obserwowany wzrost aktywności aldolazy, dehydrogenazy mleczanowej, fosfoheksoizomerazy oraz fosfatazy zasadowej w surowicy krwi po ekspozycji zwierząt na stosowane gazy może wskazywać na zaburzenie przemiany glikolitycznej i stanowić podstawę obserwowanych zaburzeń metabolizmu tkanki łącznej. W tkance mózgowej stwierdzono również wzrost aktywności tych enzymów z wyjątkiem fosfatazy zasadowej, jednak nieznamienny statystycznie. Wyniki te sugerują, że obserwowane zaburzenia przemiany węglowodanowej dotyczą innych tkanek poza ośrodkowym układem nerwowym. Wiązanie tlenków azotu amoniakiem hamuje w znacznym stopniu te zaburzenia. Obserwowany we krwi i w mózgu wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej może wskazywać na nasilenie procesów katabolicznych w następstwie działania tlenków azotu. Aktywność aminotransferaz zachowywała się odmiennie we krwi i w mózgu. We krwi obserwowano wzrost ich aktywności natomiast w mózgu spadek. Aktywatorem tych enzymów jest witamina B<sub>6</sub> (pirydoksal) i spadek aktywności aminotransferaz w mózgu może być wynikiem niedoboru tej witaminy w centralnym układzie nerwowym po ekspozycji na tlenki azotu. Niżegorodow i Markotskij (1969) wykazali spadek stężenia witaminy B<sub>6</sub> w tkankach po narażeniu na działanie kwaśnych komponent spalin.

Zmniejszenie nasilenia odczynu na dehydrogenazę bursztynianową w mózgu zwierząt po ekspozycji na tlenki azotu może wskazywać na zaburzenie transportu elektronów i zaburzenie oddychania tkankowego. Związanie tlenków azotu amoniakiem normalizuje aktywność tego enzymu w mózgu.

Wykazany zaburzeniom metabolicznym towarzyszą zmiany morfologiczne w centralnym układzie nerwowym. Po ekspozycji na tlenki azotu stwierdzono nacieki z komórek limfoidalnych oraz przekrwienie w oponach miękkich. Neutralizacja tlenków azotu amoniakiem zmniejszała zarówno zaburzenia metaboliczne jak i zmiany histopatologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym.

#### WNIOSKI

1. Tlenki azotu zaburzają przemianę glikolityczną u świnek morskich.
2. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej we krwi i w mózgu na skutek działania tlenków azotu może wskazywać na nasilenie procesów katabolicznych.

3. Spadek odczynu na dehydrogenazę bursztynianową w mózgu zwierząt eksponowanych na tlenki azotu może wskazywać na zaburzenie transportu elektronów.

4. Obniżenie aktywności aminotransferaz w mózgu po przewlekłym zatruciu tlenkami azotu może być wynikiem niedoboru witaminy B<sub>6</sub> spowodowanym działaniem tych gazów.

5. Zmiany histopatologiczne w mózgu dotyczą głównie naczyń krwionośnych.

6. Neutralizacja tlenków azotu amoniakiem zmniejsza w dużym stopniu nasilenie zaburzeń metabolicznych i zmian morfologicznych.

C. Космидер, А. Мисевич, Е. Пасевич

#### ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ОКИСЕЙ АЗОТА АММИАКОМ НА ПОЯВЛЕНИЕ НАРУШЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

##### Резюме

Одним из основных газообразных составных загрязнений атмосферного воздуха являются окиси азота. До сих пор не было выяснено точно их нейротоксическое действие. Поэтому было исследовано влияние окисей азота на центральную нервную систему, после их хронического воздействия на животных. Кроме этого исследовалась эффективность нейтрализации окисей азота газообразным аммиаком.

Исследования проводились на 110 морских свинок: 30 животных в течение 6 месяцев подвергалось воздействию окисей азота концентрацией в 1 ппм, 30 морских свинок в течение 6 месяцев подвергалось воздействию продуктов реакции, полученных в результате связывания окисей азота газообразным аммиаком, 50 животных составляло контрольную группу. В крови и в гомогенатах мозга определялась активность альдолазы, лактатдегидрогеназы, фосфогексоизомеразы, кислой и щелочной фосфатазы, а также аспарагиновой и алининовой аминотрансферазы. На ферментах мозга были выполнены гистохимические реакции на янтардегидрогеназу, на кислую и щелочную фосфатазы, а также АТФ-азу. Были также проведены гистопатологические исследования.

Было показано, что окиси азота нарушают гликолитический обмен, усиливают в мозге катаболические процессы и тормозят процесс дыхания. Наблюдаемое в мозге снижение активности аминотрансфераз может быть результатом нехватки витамина В<sub>6</sub>, вызванной инактивацией этого вещества окисями азота. Морфологические изменения в мозге касались в основном кровеносных сосудов. Нейтрализация окисей азота газообразным аммиаком достоверно уменьшает нарушения — метаболические и гистопатологические.

S. Kośmider, A. Misiewicz, J. Pasiewicz

#### EFFECT OF BINDING OF NITROGEN OXIDES WITH GASEOUS AMMONIA ON THE OCCURRENCE OF CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

##### Summary

Nitrogen oxides are the main gaseous impurities of the atmospheric air. Since their neurotoxic effect has not yet found final explanation in the present work the

action of nitrogen oxides on the central nervous system of animals after prolonged exposure was examined. In addition the efficiency of neutralization of nitrogen oxides with gaseous ammonia was investigated.

The studies were carried out on 110 guinea pigs: 50 animals constituted control group, 30 were exposed for 6 months to nitrogen oxides in a concentration of 1 ppm, 30 guinea pigs were exposed for 6 months for the reaction products obtained following the binding of nitrogen oxides with gaseous ammonia. The activities of aldolase, lactate dehydrogenase, phosphohexoisomerase, aspartate- and alanine aminotransferase, acid- and alkaline phosphatase were assayed both in blood and in brain homogenates. In brain tissue samples histochemical reactions for succinic dehydrogenase, acid- and alkaline phosphatase and ATP-ase were performed. In addition histopathological examination was carried out.

Nitrogen oxides were shown to disturb glycolysis, to enhance the catabolic processes in brain and to exhibit respiration. The observed decrease in the activity of aminotransferases in brain may have resulted from the vitamine B<sub>6</sub> deficiency caused by inactivation of this compound by nitrogen oxides. The morphological changes in brain mainly involved the blood vessels.

Neutralization of nitrogen oxides by gaseous ammonia markedly reduces the metabolic and histopathological disturbances.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bradley W. H., Longan W. P., Martin A. E.: The London fog of Dec. 2-nd — 5-th, 1957. Annual Report of the Office of the Ministry of Health. H.M.S.O. 156, 1958.
2. Bruns F., Puls W.: Die Aktivität der Serumaldolase bei Erkrankungen der Leber. Ein neuer enzymatischer Test. *Klin. Wschr.* 1954, 32, 656—662.
3. Cabaud P. G., Wróblewski F.: Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. *Amer. J. Clin. Path.* 1958, 30, 234—236.
4. Christopher S., Darke A., Warrack J. N.: Bronchiolitis from nitrous fumes. *Thorax*, 1958, 13, 327—333.
5. Dutkiewicz T., Byczkowski St.: Ćwiczenia z chemii toksykologicznej. P.Z.W.L., Warszawa, 1971, 251—253.
6. Ebel R. H.: *W Advances in environmental sciences and technology.* Wiley Interscience, New York 1969, 1, 206—208.
7. Freeman G., Crance S. C., Stephens R. J., Furiosi N. J.: Environmental factors in emphysema and a model system with NO<sub>2</sub>. *Yale J. Biol. and Med.* 1968, 40, 556—570.
8. King E. J., Wootton J. D.: *Microanalysis in medical biochemistry.* J.L.A. Churchill, London 1956.
9. Kośmider St., Misiewicz A., Drożdż M., Feluś E., Ludyga K.: Wpływ wiązania tlenków azotu gazowym amoniakiem na odporność w badaniach doświadczalnych. *Arch. Immun. et Ther. Exper.* — w druku.
10. Lawther J. J., Waller R. E., Coulson J.: Air pollution and bronchitis. II Intern. Symposium Groningen Royal vancouverum. Publ. Assen (Netherlands). 1964, 319—322.
11. Martin A. E.: Mortality and morbidity statistics and air pollution. *Proc. Roy. Soc. Med.* 1964, 57, 969—975.

12. Mueller P.K., Hitchcock M.: Air quality criteria; toxicological appraisal for oxidant, nitrogen oxides and hydrocarbons. *J. Air Pollut. Control. Ass.* 1969, 9, 670—681.
13. Nieding G., Krekeler K., Smidt U., Muysers K.: Akute Wirkung von 5 ppm NO<sub>2</sub> auf die Lungen und Kreislauffunktion der gesunden Menschen. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 1970, 27, 234—238.
14. Niżegorodow V. M., Markotskij J. L.: Dieistwie ugleroda i okisłow azotie na sostoianie obezpechnosti i potrebnosti organizma żywotnogo w witamine B<sub>6</sub>. *Gig. i Sanit.* 1969, 34, 96—102.
15. Novikoff A. B., Woo-Young-Ship, Drucker J.: Mitochondrial localization of oxidative enzymes: Staining results with two tetrazolium salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961, 9, 47—51.
16. Orłowski M.: O istnieniu i oznaczaniu aktywności fosfoheksoizomerazy w płynie mózgowo-rdzeniowym. *Pol. Tyg. Lek.* 1958, 13, 1421—1423.
17. Pearse A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied.* J. a. A. Churchil L. T. D. London 1960.
18. Popow W. A.: *Proc. of the Unions Conference on the Sanitary protection of the atmosphere (Russian).* Medgiz, Moskwa, 1964.
19. Reitman S., Frankel S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Path.* 1957, 28, 56—63.
20. Speizer F.: An epidemiological appraisal of the effects of ambient air on health: Particulates and oxides of sulfur. *J. Air Pollution Control. Assoc.* 1969, 19, 647—659.
21. Thomas H. W., Mueller P. K., Lyman R. L.: Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, 1968, 199, 532—534.
22. Wachstein H., Meisel E.: A comparative study of enzymatic staining reactions in the rat kidney with necrobiosis induced by ischemia and nephrotoxic agents (Mercurhydrin and DL Serine). *J. Histochem. Cytochem.* 1957, 3, 204—209.
23. Watanabe H.: Air Pollution and its health effects in Osaka Japan. Reprint presented at the 58th Annual Meeting Air Pollution Control Assoc. Toronto, 1965, 65—68.
24. Wright J.: An appraisal of epidemiologic data concerning the effect of oxidants, nitrogen dioxide, and hydrocarbons upon human population. *Air Pollution Control Assoc.* 1969, 9, 679—686.

Adres autorów: Klinika Chorób Wewnętrznych i Zawodowych Śl. Akademii Medycznej, 41-800 Zabrze, ul. 3-go Maja 13/15.

## PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Opony miękkie i kora mózgu u zwierzęcia grupy kontrolnej. H.-E. Pow. 160 ×.

*Fig. 1.* Pia mater and cerebral cortex. Control animal. H.-E. × 160.

*Ryc. 2.* Nacieki z komórek limfoidalnych w oponach miękkich mózgu zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. H.-E. Pow. 400 ×.

*Fig. 2.* Lymphoidal cells infiltrates in pia mater. Animal exposed to nitrogen oxides. H.-E. × 400.

*Ryc. 3.* Nacieki z komórek limfoidalnych wokół naczyń opon miękkich mózgu u zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. H.-E. Pow. 400 ×.

*Fig. 3.* Perivascular infiltrates composed of lymphoid cells in pia mater of animal exposed to nitrogen oxides. H.-E. × 400.

*Ryc. 4.* Wzrost odczynu na fosfatazę kwaśną w korze mózgu zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. Pow. 375 ×.

*Fig. 4.* Increase of acid phosphatase reaction in cerebral cortex of animals exposed to nitrogen oxides. × 375.

*Ryc. 5.* Odczyn na fosfatazę zasadową w korze mózgowej zwierząt grupy kontrolnej. Pow. 150 ×.

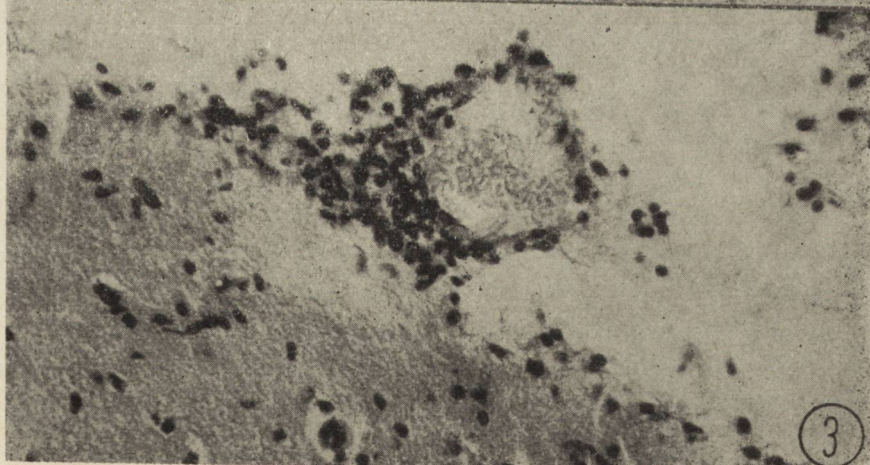
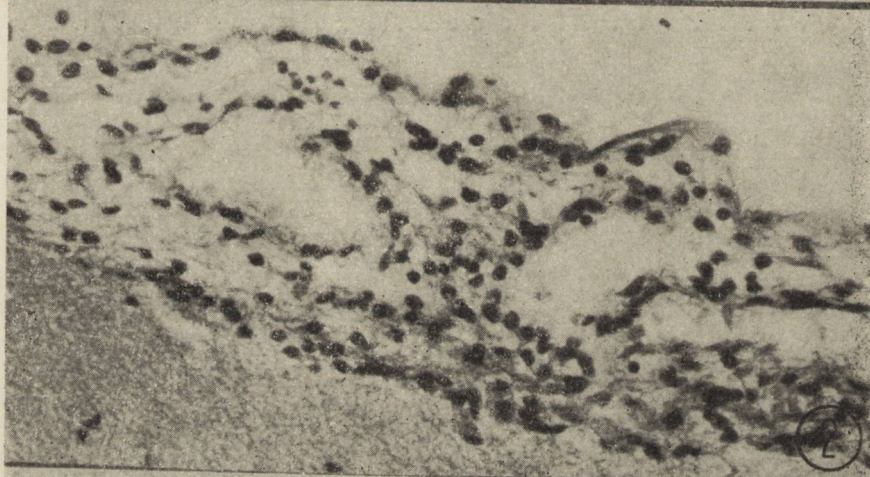
*Fig. 5.* Alkaline phosphatase reaction in cerebral cortex of control animals. × 150.

*Ryc. 6.* Osłabienie odczynu na fosfatazę zasadową w korze mózgu zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. Pow. 150 ×.

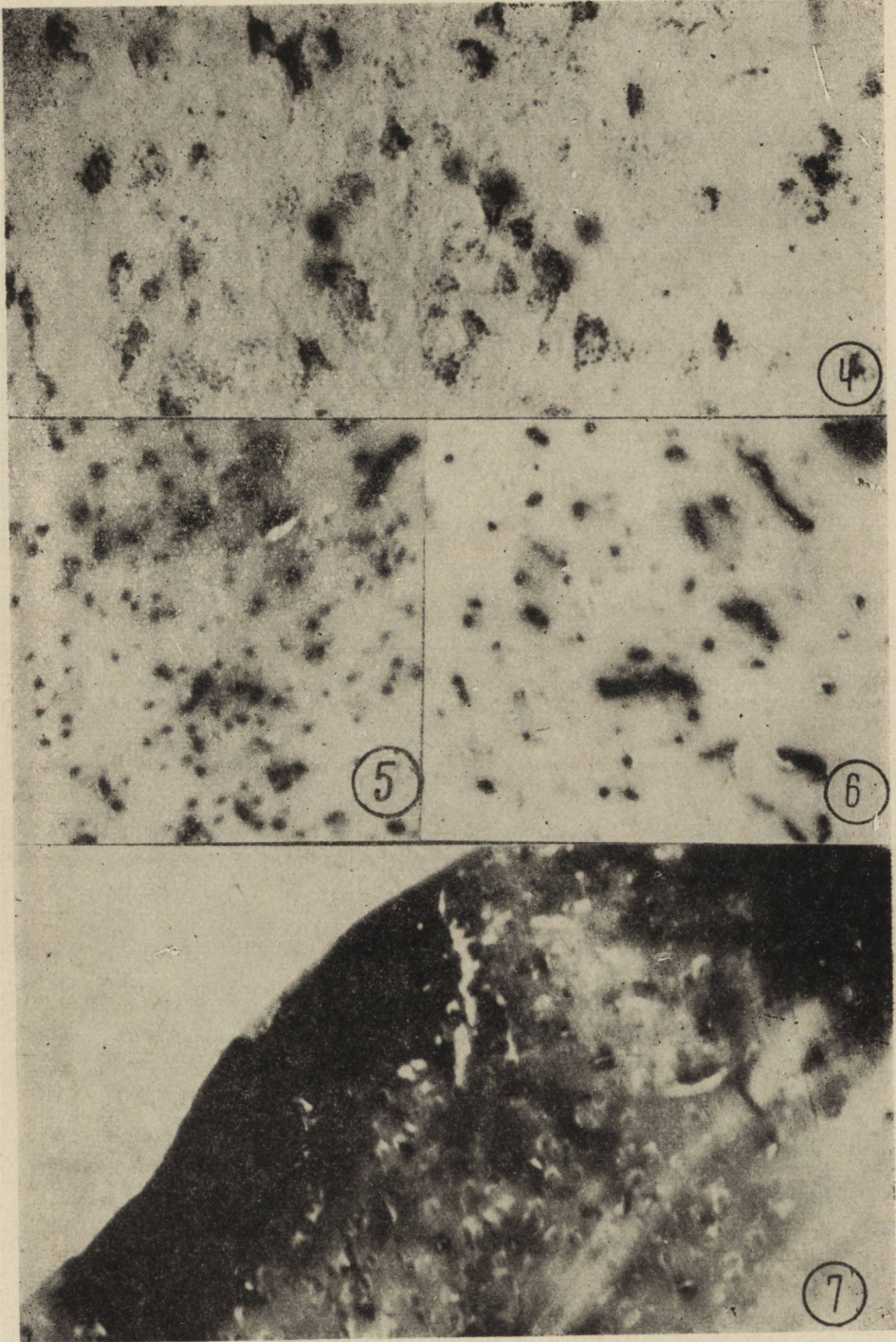
*Fig. 6.* Decrease of alkaline phosphatase reaction in cerebral cortex of animals exposed to nitrogen oxides. × 150.

*Ryc. 7.* Widoczny podoponowo wzrost nasilenia odczynu na fosfatazę zasadową w korze mózgu zwierząt eksponowanych na tlenki azotu. Pow. 150 ×.

*Fig. 7.* Subpially visible increase of alkaline phosphatase reaction in cerebral cortex of animals exposed to nitrogen oxides. × 150.







IRMINA B. ZELMAN, JERZY SZEWCZYKOWSKI, JERZY JURKIEWICZ,  
ZBIGNIEW CZERNICKI

## PATOMORFOLOGIA W DOŚWIADCZALNYM UCISKOWYM OBRZĘKU MÓZGU U KOTÓW

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr med. M. J. Mossakowski

Zespół Neurochirurgii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr med. A. Kunicki

Obrzęk mózgu stanowi od dawna przedmiot szczególnego zainteresowania zarówno neuropatologów jak i klinicystów. Szereg istotnych informacji pozwalających na pogłębienie znajomości obrzęku mózgu, sposobu jego powstawania i szerzenia się oraz dynamiki rozwoju wniosły badania nad strukturą i funkcją barier mózgowych, prowadzone przy użyciu nowoczesnych technik badawczych, przede wszystkim mikroskopii elektronowej i izotopów. Badania te wykazały, że wzrost zawartości wody w mózgu, prowadzący do zwiększenia jego objętości i w konsekwencji do ciasnoty śródczaszkowej może być spowodowany zaburzeniem przepuszczalności układu naczyniowego lub też zaburzeniem funkcji błon komórkowych. Stwierdzenie to stało się podstawą dla wyodrębnienia dwóch postaci obrzęku mózgu: naczyniopochodnego i cytotoksycznego (Klatzo 1967) o różnym obrazie strukturalnym i odmiennych zaburzeniach (biochemicznych (Klatzo 1967, Bakay 1967, Zülch 1967). Niektórzy badacze kwestionują celowość takiego podziału uważając, że w większości przypadków obrzęk elementów komórkowych wyprzedza obrzęk naczyniopochodny (Hager 1972).

Badania nad powstawaniem i szerzeniem się obrzęku mózgu oraz towarzyszących mu odczynów tkankowych utrudnia bardzo fakt nakładania się wtórnych zmian, związanych przede wszystkim z przemieszczeniem mózgu, zaburzeniami krążenia mózgowego i zastojem krwi, spowodowanym uciśnięciem dużych zewnątrzmożgowych pni naczyniowych oraz wynikające z tego konsekwencje metaboliczne (niedotlenienie, zakwaszenie tkanki, zaburzenie transportu metabolitów — Hossmann i Olsson 1971).

Skłoniło to nas do przeprowadzenia doświadczeń w czasie nie przekraczającym 24 godziny od momentu zadziałania czynnika obrzękorodnego zakładając, że ten okres obserwacji pozwoli na prześledzenie wczesnej fazy rozwoju zmian w mózgu. Jako model obrzęku wybrano metodę opracowaną przez Ishii i wsp. (1959), polegającą na wprowadzeniu balonika wypełnionego do określonej objętości płynem lub powietrzem do przestrzeni nadtwardówkowej i naśladującej warunki występujące w patologii ludzkiej w przypadku krwiaka nadtwardówkowego. Cytowani autorzy w swoich doświadczeniach stosowali 24 godzinny ucisk i badali jego następstwa w czasie do 2 tygodni po dekompresji, natomiast naszym zamierzeniem była ocena wczesnych zmian strukturalnych w mózgu rozwijających się w czasie bezpośredniego działania czynnika uszkadzającego oraz próba ustalenia patomechanizmu rozwijającego się w tym wypadku obrzęku mózgu. Wyniki badań morfologicznych miały stanowić równocześnie punkt wyjścia dla dalszych ukierunkowanych badań, prowadzonych na tym samym modelu doświadczalnym.

#### MATERIAŁ I METODA

Doświadczenia przeprowadzono na 60 kotach obu płci, różnego wieku i rasy, wagi ciała od 2.700 do 3.800 g. W znieczuleniu ogólnym nembutalem podawanym dootrzewnowo w dawce 40 mg/kg wagi ciała zwierzęcia wypreparowywano obie tętnice udowe i wprowadzano do nich cewniki, których końce znajdowały się na wysokości aorty zstępującej. Cewnik umieszczony w lewej tętnicy udowej połączony był przez przekażnik z manometrem wskazującym wysokość ciśnienia tętniczego krwi. Cewnik w prawej tętnicy udowej służył do pobierania krwi do oznaczeń gazometrycznych.

W czaszce kota wykonywano trzy otwory trepanacyjne pozostawiając nie uszkodzoną oponę twardą: dwa symetryczne w prawej i lewej okolicy ciemieniowej oraz jeden w okolicy potylicznej lewej. W otworach ciemieniowych umieszczano końcówki połączone poprzez czujniki z elektromanometrami rejestrującymi ciśnienie śródczaszkowe z przestrzeni nadtwardówkowych nad prawą i lewą półkulą. W otworze potylicznym umieszczano wkręt metalowy, w którym umieszczano końcówkę z lateksowym balonikiem. Kończówkę łączono drenem plastikowym ze strzykawką lekarską wypełnioną wodą. Balonik napełniano stopniowo podając co 10 minut 0,2 ml płynu do łącznej objętości od 0,5—2,0 cm<sup>3</sup>, w zależności od stanu klinicznego zwierzęcia. Część kotów pozostawała na oddechu spontanicznym część prowadzono na oddechu kontrolowanym. U tych zwierząt wykonywano tracheotomię i stosowano pompę oddechową o częstości 24 oddechy na minutę i objętości powietrza 50—70 cm<sup>3</sup>, w zależ-

ności od wyników pomiarów gazometrycznych. Koty prowadzone na oddechu kontrolowanym otrzymywały na początku i w trakcie doświadczenia dożylnie tubokurarynę w ilości 4,5 mg. Czas przeżycia zwierząt wynosił od 1 do 24 godzin. Najliczniejsza była grupa 2 — godzinna, będąca równocześnie przedmiotem równoległe prowadzonych badań biochemicznych (A. Gromek i wsp. 1972) i mikroskopowo-elektronowych (Jurkiewicz 1973).

Badania morfologiczne przeprowadzono na skrawkach topograficznych przez obie półkule pobieranych z kilku poziomów mózgu oraz pnia mózgowego z mózdzkiem. Materiał po utrwaleniu w formalinie, przeprowadzono w sposób standardowy do parafiny. Metody barwienia: hematoksylina — eozyna, fiolet krezylu, van Gieson, Heidenhain, Kanzler-Arendt i PAS. Ponadto skrawki mrożone impregnowano wg metody Cajala.

#### WYNIKI

U kotów, które poddano zabiegowi obserwowano objawy świadczące o wzroście ciśnienia śródczaszkowego. W trakcie wypełniania balonika płynem występowały u zwierząt doświadczalnych zaburzenia oddechowe, pojawiające się również w późniejszym okresie doświadczenia, prowadzące niekiedy do śmierci. W kilka, kilkanaście godzin po napełnieniu balonika częściej obserwowano ostre zaburzenia krążenia, których nie udawało się opanować. Analiza kliniczna uwzględniająca stały pomiar obwodowego ciśnienia krwi, ciśnienia śródczaszkowego oraz pomiary gazometryczne stanowi przedmiot oddzielnego opracowania.

Badania makroskopowe. Mózgi kotów, którym wprowadzono balonik do przestrzeni nadtwardówkowej wykazywały asymetrię oraz wgłębienie w obrębie lewej półkuli, odpowiadające miejscu ucisku (ryc. 1). W oponach miękkich tej okolicy oraz obustronnie ponad płatem ciemieniowymi spotykano drobne wynacznienia. Ich lokalizacja odpowiadała umiejscowieniu otworów trepanacyjnych. Na powierzchni mózgowia stwierdzano poszerzenie i spłaszczenie zakrętów, najbardziej nasilone w miejscu bezpośredniego ucisku i jego otoczeniu, nie zawsze proporcjonalne do objętości balonika, na ogół większe u zwierząt z dłuższym czasem przeżycia. U niektórych zwierząt widoczne były na powierzchni podstawnej mózgu ślady wklínowania. Na przekrojach poprzecznych stwierdzano zwężenie układu komorowego oraz przemieszczenie struktur prawej i lewej półkuli (ryc. 2 i 3). Spotykano również niewielkie zmiany krwotoczne, najczęściej w korze i istocie białej lewego płata potylicznego, rzadziej obustronnie, niekiedy drobne pojedyncze krwotoczki, w śródmózgowiu, moście, wzgórzu lub innych strukturach.

**Badanie mikroskopowe.** U kotów z przeżyciem do 2 godzin od momentu wypełnienia balonika stwierdzono w miejscu działania ucisku na tkankę i jego bezpośrednim otoczeniu przekrwienie sieci włosniczek, silne wypełnienie krwią naczyń żylnych, krwinkotoki i drobne obrączkowate krwotoczki. Były one obecne również w istocie białej, zwłaszcza na pograniczu korowo-podkorowym. Neurony w korze tej okolicy wykazywały objawy uszkodzenia w postaci tigrolizy bądź to obkurczenia i wczesnego stadium zmian ischemicznych. U niektórych kotów podobne zmiany, ale o mniejszym natężeniu obserwowano również drugostronnie. W okolicy potylicznej lub ciemieniowo-potylicznej mielina wykazywała lekkie zblednięcie, włókna mielinowe miały jednak przebieg i wygląd prawidłowy. W pozostałych obszarach mózgu poza przepełnieniem żył i pozanaczyniową obecnością nielicznych erytrocytów, nie stwierdzono istotnych odchyleń.

U kotów z uciskiem balonika do 6 godzin ogniskowe zmiany były bardziej nasilone. W korze poddanej bezpośrednio działaniu balonika widoczne były ubytki i bardziej nasilone uszkodzenie komórek nerwowych (ryc. 4). Zblednięcie mieliny po stronie ucisku było rozleglejsze i bardziej wyraźne. Widoczne było uszkodzenie włókien mielinowych (ryc. 5) z towarzyszącym odczynem astrocytów protoplazmatycznych (ryc. 6). Również po stronie przeciwległej widoczne było porozsuwanie włókien mielinowych. W dalszym ciągu obserwowano objawy zastoju żylnego, zarówno w jednej jak i drugiej półkuli. Ściany naczyń wykazywały niewielkie rozluźnienie struktury, miejscami zatarcie rysunku i obrzęk śród-błonków.

Obraz morfologiczny mózgow zwierząt, które przeżyły do 12 godzin nie ulegał zasadniczym zmianom wykazując narastanie ogniskowych i uogólnionych uszkodzeń. W tym czasie w najbardziej dotkniętej istocie białej płata potylicznego lewego stwierdzano rozplem astrocytów włókniastych (ryc. 7), kora natomiast wykazywała zaawansowaną wakuolizację (ryc. 8). Zarówno po stronie ucisku jak i w przeciwległej półkuli występował ogniskowo odczyn podoponowego gleju astrocytarnego (ryc. 9). W polach zblednięcia mieliny po stronie ucisku, a ogniskowo również drugostronnie obserwowano porozsuwanie włókien mielinowych i poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych. Spotykano również okołonaczyniowe rozrzedzenie struktury tkanki; wokół pojedynczych naczyń występował rozlany odczyn PAS-dodatni. Astrocyty wykazywały większe nasilenie zmian dotyczących ciał komórkowych i wypustek.

U zwierząt, które przeżyły 16—24 godziny obraz zmian w istocie białej był najwyraźniejszy (ryc. 2 i 3), ale i w tej grupie zwierząt nie obserwowano dużego uszkodzenia osłonek mielinowych. W istocie białej obu półkul występowały rozsiane ogniska gąbczastego rozluźnienia struktury

ry (ryc. 11), po stronie ucisku w okolicy ciemieniowo-potylicznej widoczne było rozlane zblednięcie istoty białej z odpowiadającym mu obrazem charakterystycznego porozsuwania włókien mielinowych (ryc. 12). W obu półkulach obserwowano objawy zastoju oraz obszary wykazujące przekrwienie sieci kapilarów (ryc. 10 i 13).

#### OMÓWIENIE

Uciskowy model obrzęku mózgu jest na ogół niechętnie stosowany przez eksperymentatorów. Przyczynia się do tego duża śmiertelność zwierząt, spowodowana ostrą niewydolnością oddechową i krążenia. Zaburzenia tego typu obserwowaliśmy czasami już po wprowadzeniu pierwszych 0,2—0,4 ml płynu. Zwracali na nie również uwagę Ishii i wsp. sugerując, że są one następstwem mechanicznego ucisku i przemieszczenia struktur mózgowych. U zwierząt, które przeżyły zabieg zaburzenia oddechowo-krążeniowe, zwłaszcza utrzymujące się przez dłuższy okres czasu, mogą wpływać modyfikująco na obraz morfologiczny i rozwój obrzęku mózgu. Potwierdzeniem tego dodatkowego wpływu w naszym doświadczeniu były bardziej nasilone i rozleglejsze uszkodzenia kory i istoty białej u kotów, które prowadzono na spontanicznym oddechu.

Ishii i wsp. stosowali w swoim doświadczeniu stały 24 godzinny ucisk i badali jego skutki w czasie 24 godzin — 14 dni po usunięciu balonika. Stwierdzili oni obecność obrzękowopochodnego uszkodzenia tkanki z gromadzeniem się płynu w przestrzeniach okołonaczyniowych w obrębie uciśniętej półkuli. Kontrola izotopowa z zastosowaniem znakowanej dwujodofluoresceiny wykazała maksymalny wzrost radioaktywności uszkodzonej półkuli 48 godzin po rozpoczęciu ucisku. Po 5—6 dniach poziom izotopu był prawidłowy.

W naszym doświadczeniu stosowano różny czas ucisku, nie przekraczający 24 godzin i zabijano zwierzęta bezpośrednio po opróżnieniu balonika. W tych warunkach można było prześledzić dynamikę rozwoju procesu w trakcie działania ucisku z pominięciem ewentualnych następstw dekompresji (Klintworth 1965, Weinstein i wsp. 1964).

Zmiany makroskopowe występujące u naszych zwierząt doświadczalnych w postaci asymetrii mózgu, odkształcenia uciśniętej półkuli, zwężenia komór i przemieszczenia struktur anatomicznych są typowe dla uciskowego modelu obrzęku mózgu i były opisywane przez innych eksperymentatorów (Ishii i wsp. 1959, Riverson i wsp. 1966). Zmiany mikroskopowe w naszym materiale były stosunkowo niewielkie, co tłumaczy krótki czas przeżycia zwierząt. Charakter zmian strukturalnych w mózgu i dynamika ich rozwoju odpowiadały obrazom obserwowanym we

wczesnych stadiach obrzęku mózgu na innych modelach doświadczalnych (Klatzo i wsp. 1959), Wechsler (1965), Kałuża (1971).

Ogniskowe uszkodzenie płata potylicznego w postaci zmian neuronalnych, rozluźnienia struktury tkanki i wycieczek były następstwem bezpośredniego działania ucisku. Natomiast zastój żylny i przekrwienie sieci włósczkowej oraz rozlane dyskretne zmiany w istocie białej, głównie w obrębie uciśniętej półkuli (zblednięcie mieliny, porozsuwanie włókien, obrzęk osłonek, wczesny odczyn gleju komórkowego) stanowią następstwo pierwotnych zaburzeń hemodynamicznych w obrębie układu naczyniowego mózgu.

Perret i Kernohan (1943) jako przyczynę obrzęku mózgu towarzyszącego procesom ekspansywnym sugerowali, poza miejscowym toksycznym działaniem guza, możliwość uszkodzenia ośrodków naczynioruchowych w mózgu oraz bezpośredni ucisk żył i kapilarów prowadzący do zastoju i uszkodzenia ścian naczyniowych. Langfitt i wsp. (1964), podobnie jak Ishii i wsp. (1967) uważają zastój spowodowany porażeniem ścian naczyniowych za pierwotną przyczynę obrzmienia mózgu w przypadku doświadczalnego zwiększenia ciśnienia śródczaszkowego. Dalszy rozwój obrzęku zależy od czasu trwania uszkodzenia naczyń i wysokości skurczowego ciśnienia krwi (Klatzo 1972, Johansson i wsp. 1970).

Sugestie wspomnianych autorów pozwalają na następującą interpretację uzyskanych przez nas wyników: ogniskowe działanie ucisku na półkulę mózgu kota powoduje zaburzenie funkcji układu naczyniowego na skutek mechanicznego działania bądź to na ośrodki naczynioruchowe podwzgórza lub pnia bądź bezpośrednio na receptory ścian naczyniowych (Ishii i wsp. 1967). Prowadzi ono do zastoju żylnego i przekrwienia sieci włósczkowej z objawami wczesnych zmian strukturalnych (obrzęk śródbłonek i innych elementów ścian naczyniowych, krwinkotoki) w ścianach naczyń. Nie udało się nam stwierdzić obecności wolnego płynu w tkance, co sugeruje, że w badanym okresie czasu bariera krew—mózg dla białek nie była uszkodzona. Natomiast istnieje szereg przesłanek morfologicznych wskazujących na zwiększone przechodzenie płynu poza układ naczyniowy (zblednięcie mieliny, porozsuwanie włókien, obrzęk osłonek, odczyn astrogleju, poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych), gromadzącego się zarówno w obrębie elementów komórkowych jak i poszerzonych przestrzeni międzykomórkowych. Sugestie te potwierdziły badania prowadzone na tym samym modelu przez Gadamskiego i wsp. z błękitem Evansa oraz badania mikroskopowo-elektronowe (Jurkiewicz i wsp.).

Nasilenie zmian morfologicznych po stronie działania ucisku sugeruje działanie dwóch czynników w obrębie tej półkuli: uogólnionych zaburzeń krążenia mózgowego i ogniskowego działania balonika. Doświadczenia

Ishii i wsp. (1959) z 14-dniowym przeżyciem kotów po dekompresji i jednostronnymi zmianami w obrębie uciśniętej półkuli świadczą o odwrotnym charakterze części zaburzeń oraz istotnej roli ogniskowego czynnika w kształtowaniu się ostatecznego obrazu zmian morfologicznych.

#### WNIOSKI

1. Wprowadzenie balonika wypełnionego płynem do przestrzeni nadtwardówkowej prowadzi do wystąpienia dwojakiego rodzaju zmian strukturalnych w mózgu: ogniskowych, będących następstwem bezpośrednio działania ucisku i rozlanego niewielkiego uszkodzenia obu półkul mózgowych.

2. Zmiany uogólnione dotyczą przede wszystkim układu naczyniowego i mają charakter naczyniowopochodnych uszkodzeń tkanki.

3. W patomechanizmie uszkodzeń strukturalnych istotną rolę odgrywają zaburzenia hemodynamiczne prowadzące do zaburzeń w ukrwieniu tkanki.

И. Б. Зельман, Е. Шевчиковски, Е. Юркевич, З. Чернички

#### ПАТОМОРФОЛОГИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПРЕССОРНОМ ОТЕКЕ МОЗГА У КОШКИ

##### Резюме

Были проведены морфологические исследования центральной нервной системы кошек с экспериментальным супрадуральным нажимом. Животным вводился в супрадуральное пространство латексный пузырек, который заполнялся водой максимально до объема 2 мл и оставлялся на период от 1 до 24 часов. Животные убивались непосредственно после декомпрессии.

Макроскопически была обнаружена асимметрия мозга, сужение и деформация желудочков, а также перемещение анатомических структур. Микроскопические изменения, как на месте нажима так в обоих полушариях мозга, были небольшими, что объясняется коротким временем проживания экспериментальных животных. Было обнаружено очаговое повреждение нейронов, разрыхление структуры ткани и кровяные излияния, имеющиеся также в примыкающем белом веществе. В обоих полушариях был обнаружен венозный застой и гиперемия капиллярной сети, а в белом веществе, прежде всего на стороне нажима, побледнение миелина, разрыхление волокон, а также ранняя реакция астроцитной глии.

Вероятно, рост внутричерепного давления, вызванный нажимом пузырька приводит к нарушению функции сосудистой системы с симптомами венозного застоя и гиперемии капиллярной сети, что ведет к нарушениям кровоснабжения и к ранним структурным изменениям в ткани. Величина нарушений на стороне воздействия нажима указывает на суммирование действия двух факторов в пределах сжатого полушария: гемодинамических нарушений и отека, распространяющегося от места введения пузырька.



I. B. Zelman, J. Szewczykowski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki

PATHOMORPHOLOGY IN EXPERIMENTAL BRAIN EDEMA  
CAUSED BY SUPRADURAL COMPRESSION

Summary

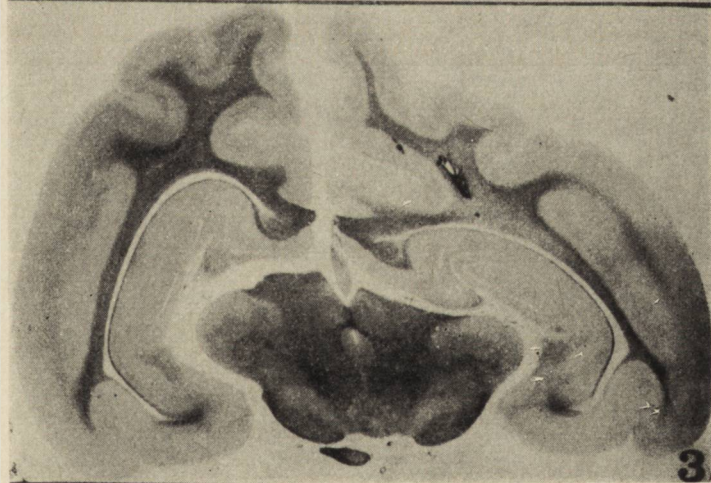
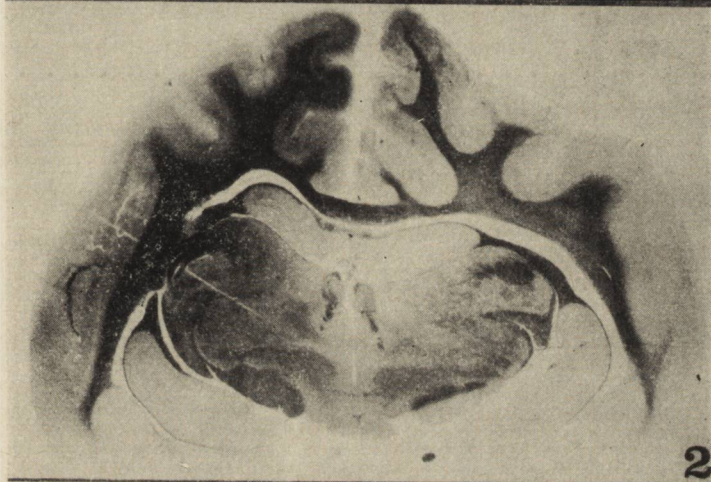
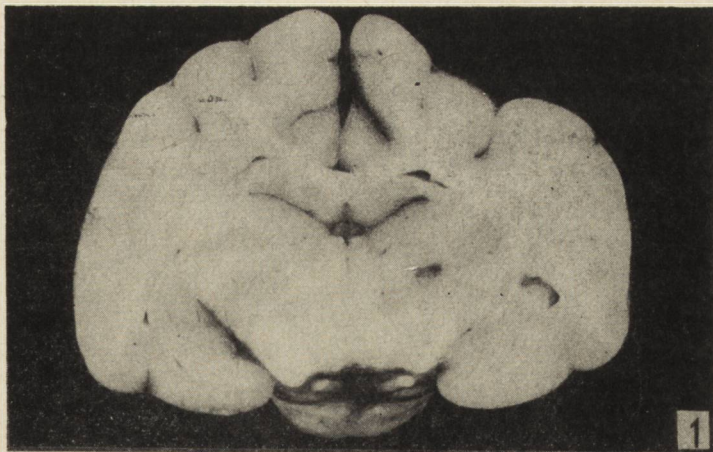
Morphological studies on the central nervous system were performed in cats with experimental extradural compression. Latex balloon was introduced into the supradural space and filled with water maximally to the final volume of two ml. The animals were allowed to survive for 1—24 hrs and sacrificed directly after decompression.

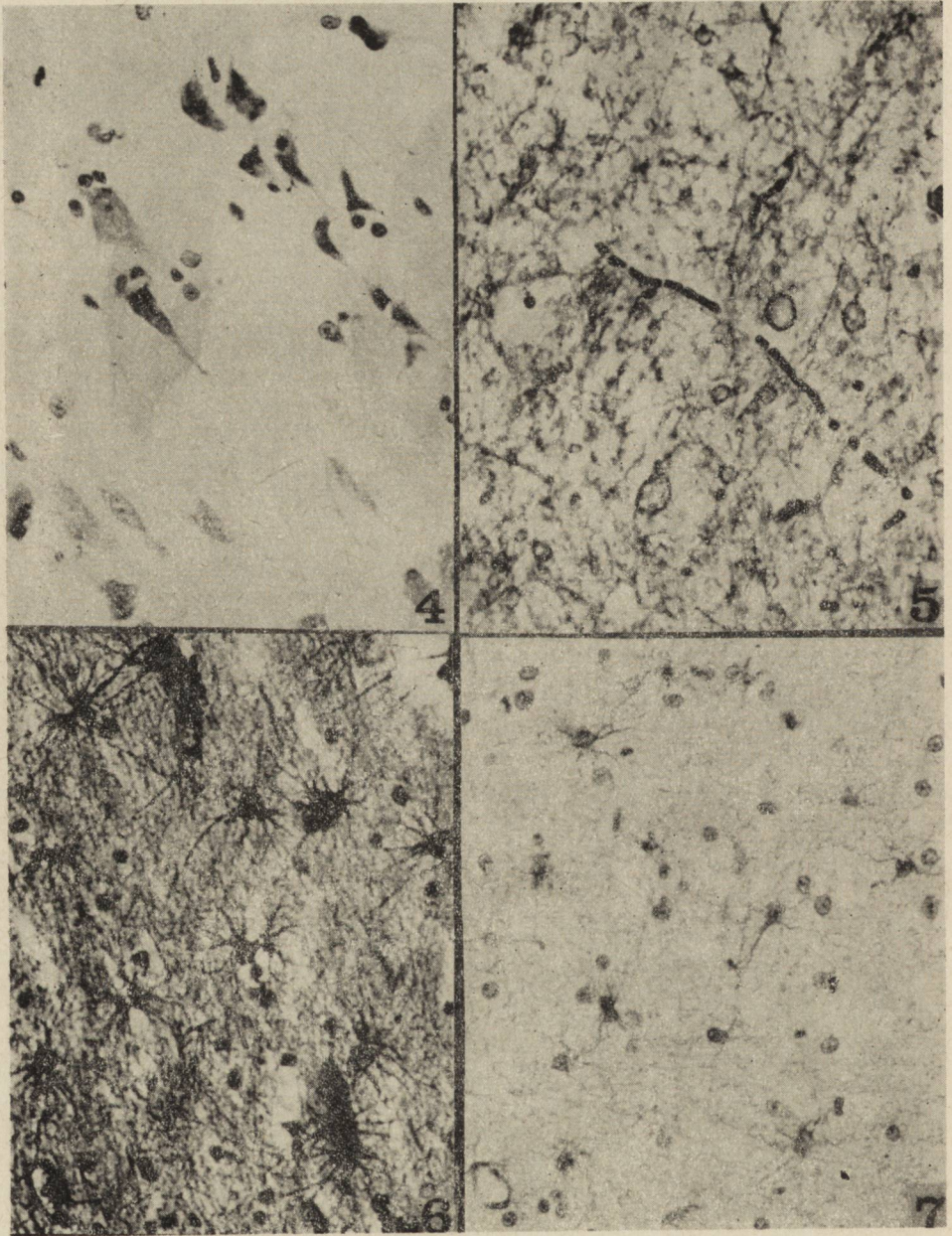
Macroscopic observations revealed brain asymetry, narrowing and deformation of ventricles and translocation of anatomical structures. Microscopic changes both in the compression region and disseminated in brain hemispheres were limited to slight tissue impairment, what may be related to the short survival time of experimental animals. The focal changes observed in compressed area included degeneration of neurons, loosening of tissue structure and extravasation of blood, being also present in the adjacent white matter. In both hemispheres one could observe venous stasis and hyperemia of the capillary net and in the white matter, mainly on the compressed side, separation of myelin fibres and early astroglial reaction.

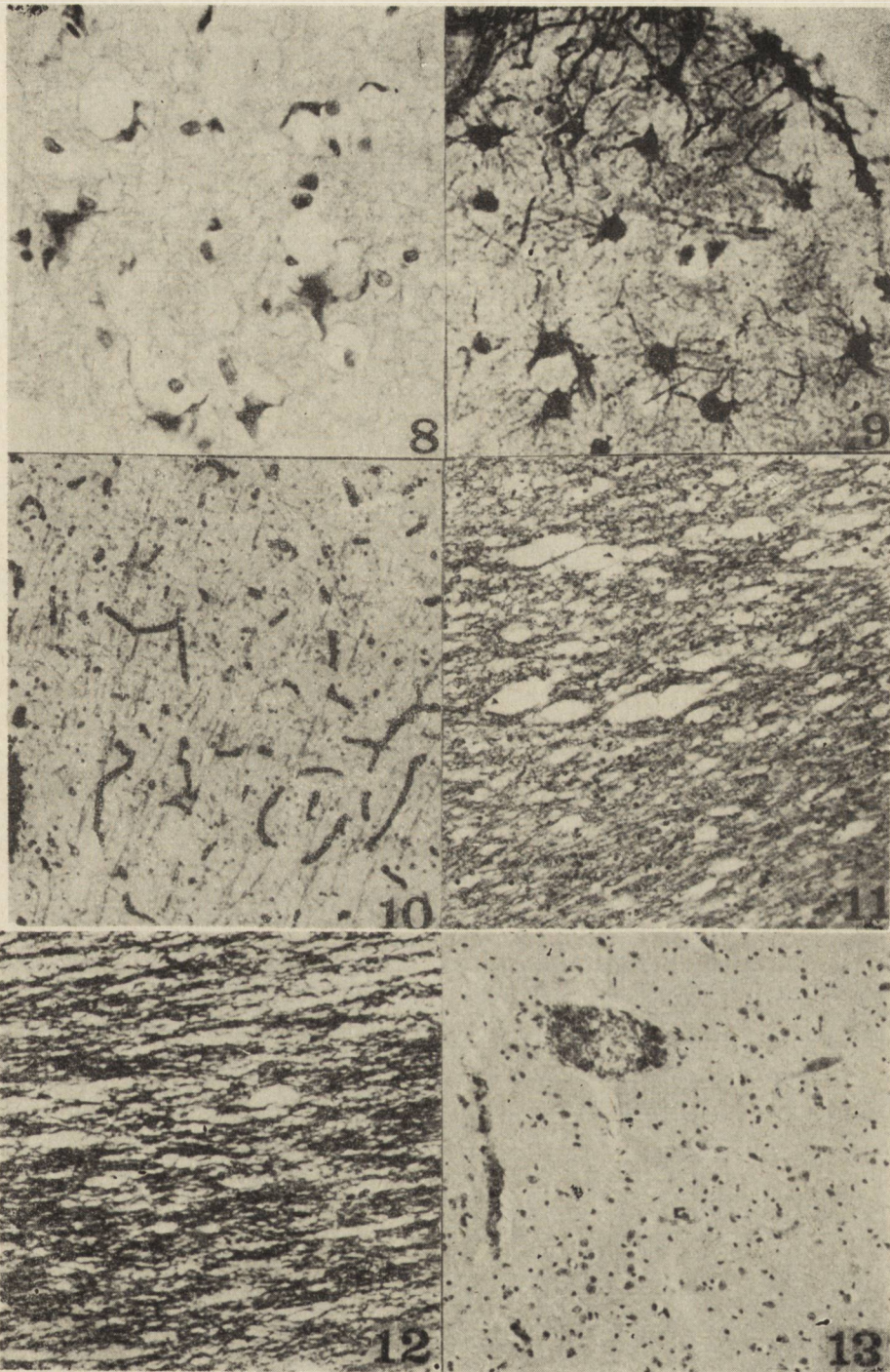
The increase of intracranial pressure produced by balloon implantation appears to bring about disturbances in function of the vascular system with symptoms of venous stasis and capillary congestion, which led to disturbances in blood supply and early structural changes in the brain tissue. Intensification of changes on the compressed side suggest a combined action of two factors within the compressed hemisphere: hemodynamic disturbances and edema developing from the place of balloon implantation.

PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L.: Radio-isotopic studies on brain edema. W *Brain Edema*. Ed. Klatzo I., Seitelberger F., Springer Verlag, New York 1967, 517—529.
2. Gromek A., Czajkowska D., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Kunicki A.: Właściwości biochemiczne mitochondriów w warunkach doświadczonego obrzęku mózgu u kotów — w druku.
3. Hager H.: The contributions of electron microscopy to the pathomorphologic characterization of cerebral edemas. Proc. Al III-lea Simpozion National de Neuropatologie. Bukareszt 1972.
4. Hossmann K., Olsson Y.: Influence of ischemia on the passage of protein tracers across capillaries in certain blood—brain barrier injury. *Acta neuropath.* (Berl.) 1971, 18, 113—122.
5. Ishii S., Hayner R., Kelly W. A., Evans P. J.: Studies of cerebral swelling. II. Experimentally cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. *J. Neurosurgery*, 1959, 16, 152—162.
6. Ishii S., Tsuji H., Ozawa K., Kondo Y., Evans J. P.: Brain edema. Some clinical and experimental correlations. W *Brain Edema*. Ed. Klatzo I., Seitelberger F., Springer Verl. New York 1967, 32—66.
7. Johansson B., Choh-Luh Li, Olsson Y., Klatzo I.: The effect of acute hypertension on the blood-brain barrier to protein tracers, *Acta neuropath.* (Berl.), 1971, 16, 117—124.







8. Jurkiewicz: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w doświadczalnym obrzęku mózgu u kota. Posiedzenie naukowe CMDiK, styczeń 1973.
9. Kałuża J.: Experimental brain edema. Comparison of the brain wound and cryogenic necrosis. *Acta Medica Polona*, 1971, 12, 487—502.
10. Klatzo I., Piraux A., Laskowski E.: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1958, 17, 548—564.
11. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1967, 12, 1—14.
12. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of brain edema. W: Steroids and brain edema. Ed. Reulen H. J., Schurmann K., Springer Verl. New York, Heidelberg 1972, 1—8.
13. Klintworth G. K.: The pathogenesis of secondary brain stem hemorrhages as studied in an experimental model. *Amer. J. Pathol.*, 1965, 47, 525—536.
14. Langfitt T. W., Weinstein J. D., Kassel N. F.: Cerebral vasomotor paralysis produced by intracranial hypertension. *Transact. of Am. Neurol. Assoc.* 1964, 214—215.
15. Perret G., Kernohan J. W.: Histopathologic changes of the brain caused by intracranial tumors. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1943, 2, 341—343.
16. Reihardt M.: Zur Entstehung des Hirndrucks bei Hirngeschwülsten und anderen Hirnkrankheiten und über eine bei diesen zu beobachtende besondere Art von Hirnschwellung. *D. Z. Nervenheilk.* 1905, 28, 306—355.
17. Riverson E., Kleihues P., Schultze B., Wechsler W.: Experimenteles Hirnödeme nach epiduraler Kompression, *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50 Tg. 1966, 441—446.
18. Wechsler W., Riverson E., Schröder J. M., Kleihues P., Palmeiro J. F., Hossmann K. A.: Electron microscopic observations on different models of acute experimental brain edema. W *Brain Edema*. Ed. Klatzo I., Seitelberger F., Springer Verl. New York 1967, 598—614.
19. Weinstein J. D., Longfitt T. W., Kassel N. F.: Vasopressor response to increased intracranial pressure. *Neurology*, 1964, 14, 1118—1131.
20. Zülch K. J.: Neuropathological aspects and histological criteria of brain edema and brain swelling. W *Brain Edema*. Ed. Klatzo I., Seitelberger F., Springer Verl. New York 1967, 95—116.

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

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Czas ucisku 2 godz. Wgłębienie na powierzchni wypukłej lewej półkuli mózgu, nieznaczne przemieszczenie uciśniętej półkuli. Skrawek nieutrwalony. Pow. ca 6 ×.

*Fig. 1.* Compression — 2 hrs. Deformation of compressed hemisphere and insignificant translocation of cerebral structures. Segment without fixation. Ca × 6.

*Ryc. 2.* Czas ucisku 18 godz. Widoczna asymetria mózgu i przemieszczenie struktur. Po stronie ucisku rozlane zblednięcie mieliny w istocie białej przechodzące na spoidło wielkie. Met. Heidenhaina. Pow. ok. 6 ×.

*Fig. 2.* Compression — 18 hrs. Asymetry and translocation of brain structures. On the compressed side diffuse myelin pallor extending into corpus callosum. Heidenhain meth. Ca × 6.

*Ryc. 3.* Czas ucisku 18 godz. Odkształcenie i przemieszczenie uciśniętej półkuli. Zblednięcie mieliny i drobny wrzecionowaty krwotok w istocie białej lewej półkuli mózgu. Met. Heidenhaina. Pow. ok. 6 ×.

*Fig. 3.* Compression — 18 hrs. Deformation and translocation of compressed hemisphere. Myelin pallor and small haemorrhage in the white matter of left cerebral hemisphere. Heidenhain meth. Ca × 6.

*Ryc. 4.* Czas ucisku 6 godz. Ogniskowe uszkodzenie neuronów kory w miejscu działania ucisku. Fiolet krezyłu. Pow. 240 ×.

*Fig. 4.* Compression — 6 hrs. Focal neuronal damage in the compressed cortical area. Cresyl violet. × 240.

*Ryc. 5.* Czas ucisku 6 godzin. Uszkodzenie włókien mielinowych w uciśniętej półkuli. Met. Heidenhaina. Pow. 240 ×.

*Fig. 5.* Compression — 6 hrs. Damage of myelin fibres in compressed hemisphere. Heidenhain meth. × 240.

*Ryc. 6.* Czas ucisku 6 godz. Wczesny odczyn astrocytów protoplazmatycznych w istocie białej prawego płata potylicznego. Impregnacja met. Cajala. Pow. 360 ×.

*Fig. 6.* Compression — 6 hrs. Early reaction of protoplasmic glia in the white matter of noncompressed hemisphere. Cajal impregnation. × 360.

*Ryc. 7.* Czas ucisku 12 godz. Rozplem astrocytów włóknistych w uszkodzonej istocie białej lewej półkuli. Widoczne rozluźnienie struktury tkanki. Metoda Kanzler-Arendta. Pow. 120 ×.

*Fig. 7.* Compression — 12 hrs. Proliferation of Fibrillary glia in damaged white matter. Loosening of tissue structure is seen. Kanzler-Arendt meth. × 120.

*Ryc. 8.* Czas ucisku 12 godz. Wakuolizacja kory w miejscu ucisku. Widoczne bardzo zaawansowane uszkodzenie neuronów. H.-E. Pow. 240 ×.

*Fig. 8.* Compression — 12 hrs. Vacuolization of the compressed occipital cortex. Advanced damage of nerve cells. H.-E. × 240.

*Ryc. 9.* Czas ucisku 12 godz. Ogniskowy odczyn astrocytów podoponowych w korze płata skroniowego nieuciśniętej półkuli mózgu. Impregnacja met. Cajala. Pow. 360 ×.

*Fig. 9.* Compression — 12 hrs. Focal reaction of subpial astrocytes in temporal cortex. Noncompressed hemisphere. Cajal impregnation. × 360.

*Ryc. 10.* Czas ucisku 16 godz. Przekrwienie naczyń w korze płata czołowego nieuciśniętej półkuli mózgu. Met. Heidenhaina. Pow. 120 ×.

*Fig. 10.* Compression — 16 hrs. Blood vessels congestion in the frontal lobe of the left noncompressed hemisphere. Heidenhain meth. × 120.

*Ryc. 11.* Czas ucisku 20 godz. Ogniskowe zmiany pseudogąbczaste w istocie białej nieuciśniętej półkuli mózgu. Met. Heidenhaina. Pow. 240 ×.

*Fig. 11.* Compression — 20 hrs. Focal pseudo-spongy changes in the white matter of noncompressed hemisphere. Heidenhain meth. × 240.

*Ryc. 12.* Czas ucisku 20 godz. Porozsuwanie włókien mielinowych w uciśniętej półkuli mózgu. Met. Heidenhaina. Pow. 240 ×.

*Fig. 12.* Compression — 20 hrs. Separation of myelin fibres in the compressed white matter. Heidenhain meth. × 240.

*Ryc. 13.* Czas ucisku 16 godz. Poszerzone, wypełnione krwią naczynie żyłne we wzgórzu. H.-E. Pow. 120 ×.

*Fig. 13.* Compression — 16 hrs. Wiedened overfilled venous vessel in thalamus. H.-E. × 120.

ROMAN GADAMSKI, JERZY JURKIEWICZ, ZBIGNIEW CZERNICKI

STAN BARIERY KREW—MÓZG  
WE WCZESNYM DOŚWIADCZALNYM OBRZĘKU MÓZGU  
U KOTÓW \*)

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Zespół Neurochirurgii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr A. Kunicki

Nieprawidłowości bariery krew—mózg stanowią zasadniczy element naczyniopochodnego obrzęku mózgu (Klatzo 1968). Badanie stanu przepuszczalności naczyniowo-mózgowego układu barierowego pozwala nie tylko na ocenę podstawowego mechanizmu patogenetycznego obrzęku, lecz również na określenie miejsca jego pochodzenia, dynamiki narastania, dróg rozchodzenia się, a w pewnej mierze stopnia jego nasilenia (Wiśniewski 1965, Steinwall, Klatzo 1966, Kałuża 1972). Znany jest szereg metod oceny zaburzeń naczyniowo-mózgowych mechanizmów barierowych, opartych o zastosowanie białkowych znaczników. Do najpospolitszych należy znakowanie indykatorów izotopami (Ishii i wsp. 1959, Wiśniewski 1965, Herrmann, Neuenfeldt 1972) lub użycie połączonych w kompleks z białkami takich związków jak fluoresceina (Klatzo, Miquel 1960, Klatzo i wsp. 1962), błękit trypanu (Hamberger, Hamberger 1966, Edvisson i wsp. 1971), lub błękit Evansa (Mossakowski i wsp. 1968, Olsson i wsp. 1971).

Celem podjętych badań było prześledzenie zachowania się stanu bariery krew—mózg w stosunku do kompleksu złożonego z albumin osocza i błękitu Evansa w doświadczalnym obrzęku mózgu wywołanym przez ucisk półkuli mózgu, za pomocą nadtwardówkowego balonika, wypełnionego płynem wg sposobu opisanego przez Ishii i wsp. (1959).

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych autorów, oceniających stan naczyniowo-mózgowego układu barierowego w okresie po 24 godzinnym działaniu czynnika uszkodzającego, badania nasze ograniczyliś-

---

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

my do czasu trwania ucisku, to jest do okresu, w którym dochodzi do powstawania i narastania obrzęku (Zelman i wsp. 1974, Borowicz i wsp. 1974).

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 16 dorosłych kotach, obu płci, u których wywoływano miejscowy ucisk mózgu przez nadtwardówkowo umieszczony balonik o pojemności 1 cm<sup>3</sup> na okres od 2 do 12 godzin. Dokładny opis przygotowania i techniki zabiegu operacyjnego oraz przebiegu doświadczenia przedstawiono w pracy Zelman i wsp. (1974). Przez cały okres doświadczenia zwierzęta znajdowały się na oddechu kontrolowanym przy użyciu pompy Palmera. Pojemność wyrzutową pompy wynoszącą 50—60 cm<sup>3</sup> ustalano w oparciu o poprzednio wykonane badania gazometryczne. W okresie doświadczenia przeprowadzono stały pomiar ciśnienia tętniczego krwi zwierząt za pomocą elektromanometru EK4 poprzez dostosowany transducer połączony z kaniulą wprowadzoną przez tętnicę udową do części zstępującej aorty.

Zwierzęta w zależności od czasu trwania ucisku podzielono na 4 grupy. W grupie pierwszej ucisk trwał 2 godziny, w grupie drugiej — 4, w trzeciej — 6 i w czwartej — 12 godzin. Na 2 godziny przed zakończeniem doświadczenia wszystkim zwierzętom podawano dożylnie 2% roztwór błękitu Evansa w roztworze fizjologicznym NaCl w ilości 3 ml/kg wagi ciała. Koty w większości uśmiercano drogą ostrego skrwawienia przez przecięcie obu tętnic szyjnych wspólnych. U części zwierząt (co najmniej 1 zwierzę na grupę czasową) wykonano przezsercową perfuzję 10% zobojętnioną formaliną. Bezpośrednio po śmierci zwierząt wyjmowano mózgowie w całości i utrwalano je przez okres 1 doby w 10% zbuforowanej formalinie. Mózgowia krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości około 3 mm, na których makroskopowo określano lokalizację błękitnych przebarwień tkanki, obecność ognisk krwotocznych a także rodzaj i stopień przemieszczeń struktur nerwowych półkuli uciśniętej w stosunku do analogicznych struktur półkuli przeciwległej. Następnie bloki zanurzano w wyżej wspomnianym roztworze formaliny na przeciąg dalszych 48 godzin. Utrwaloną tkankę skrawano w mikrotomie mroźniowym na skrawki grubości 10 μ, montowano je w 50% roztworze glicerolu i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss, wyposażonym w wysokociśnieniową lampę HBO 200 oraz filtry OG-1 i BG-12/4. Miejsca wyzwalające czerwoną fluorescencję utrwalano na filmie ORWO — UT16.

#### WYNIKI

Stan kliniczny zwierząt oraz ocena parametrów badań uzupełniających obrazujących ten stan stanowi przedmiot odrębnego opracowania. Ze



względu na stwierdzoną zależność obrazów morfologicznych mózgu od stanu ciśnienia krwi w niniejszym opracowaniu uwzględniono jego charakterystykę. U połowy badanych zwierząt ciśnienie tętnicze krwi spadało nieznacznie w najwcześniejszym okresie doświadczenia, a następnie podnosiło się samoistnie do wartości zbliżonych dla ustalonej normy, utrzymując się na tym samym poziomie do końca doświadczenia niezależnie od czasu jego trwania. U pozostałych zwierząt początkowy spadek ciśnienia był znaczny, sięgający wartości 40 mm Hg. Po upływie 1—1,5 godziny podnosiło się ono również samoistnie do poziomu około 50—60 mm Hg i pozostawało niezmiennione do końca doświadczenia niezależnie od stosowanych środków farmakologicznych, takich jak Dextran, Cardiamid i Coffeina.

### *Badanie neuropatologiczne*

**O b r a z   m a k r o s k o p o w y.** U wszystkich zwierząt stwierdzono niebieskie zabarwienie opon miękkich. Po ich zdjęciu na wypukłej powierzchni uciśniętej półkuli mózgu widoczne było zagłębienie odpowiadające wielkością średnicy balonika, a także spłaszczenie szczelin i wygładzenie zawojów kory mózgu, stwierdzane obustronnie, choć bardziej nasilone po stronie ucisku. Struktury podkorowe uciśniętej półkuli były przemieszczone w stosunku do analogicznych struktur półkuli przeciwległej. Zmiany te nasilały się w miarę przedłużania się czasu doświadczenia. W pojedynczych przypadkach stwierdzono drobne wynacznienia położone w podkorowej istocie białej w bezpośrednim otoczeniu ucisku.

Występowanie i rozległość niebiesko zabarwionych obszarów tkanki nerwowej stanowiących makroskopowy wykładnik zmienionego stanu bariery krew—mózg, wykazywało wyraźne zróżnicowanie w zależności od czasu trwania ucisku. W najwcześniejszym okresie pola niebieskiego zabarwienia tkanki były ograniczone wyłącznie do miejsca bezpośredniego ucisku (ryc. 1). W miarę wydłużania się czasu jego trwania pole przebarwienia tkanki zajmowało rozleglejsze obszary półkuli, a ponadto pojawiały się dodatkowe ogniska niebieskiego zabarwienia zarówno w półkuli uciśniętej jak i przeciwległej. Te ostatnie występowały jedynie w 6—12-godzinnej grupie doświadczenia. Ogniska nieprawidłowego zabarwienia tkanki stwierdzane zarówno na powierzchni zewnętrznej półkul jak i na ich przekrojach poprzecznych charakteryzowały się nieregularnym kształtem oraz zmienną wielkością i obejmowały zarówno istotę szarą jak i białą półkul mózgu nie wykazując żadnej predylekcji lokalizacyjnej. Ogniska wskazujące na uszkodzenie bariery krew—mózg w śródmózgowiu występowały bardzo rzadko i stwierdzono je wyłącznie w czwartej (12-godzinnej) grupie doświadczalnej. W żadnym z badanych

czasów nie stwierdzono natomiast niebieskiego zabarwienia tkanek mózgu i rdzenia kręgowego.

Z ogólnej liczby 16 badanych zwierząt, makroskopowe cechy uszkodzenia bariery krew—mózg były widoczne u 12 kotów. To zróżnicowanie wykładników zaburzeń barierowych nie wykazywało związku z czasem trwania ucisku. Istotny natomiast wpływ na wystąpienie lub niewystąpienie niebiesko zabarwionych pól miało ciśnienie krwi w okresie krążenia znacznika barierowego. Obecność pól nieprawidłowego zabarwienia tkanki obserwowano jedynie u zwierząt, u których ciśnienie krwi w okresie dwóch ostatnich godzin doświadczenia zbliżone było do prawidłowego, lub też było obniżone do poziomu nie niższego niż 80 mm Hg. Zwierzęta, u których nie stwierdzono nieprawidłowego zabarwienia tkanki reprezentowały grupę, w której ciśnienie układowe krwi w okresie krążenia barwnika spadało do poziomu 40—50 mm Hg.

**Obraz mikroskopowy.** U wszystkich badanych zwierząt obserwowano żywo-czerwoną fluorescencję w świetle naczyń krwionośnych, o ile preparaty zostały wykonane z materiału nieperfundowanego. W materiale pochodzącym od kotów z obniżonym ciśnieniem tętnicznym krwi do poziomu 40—59 mm Hg fluorescencja światła naczyń była mniej intensywne, a sieć naczyńniowa wydawała się uboższa w porównaniu z materiałem pochodzącym od zwierząt, u których ciśnienie w czasie doświadczenia miało wartości zbliżone do normy.

Czerwoną fluorescencję błękitu Evansa poza naczyniami krwionośnymi obserwowano wyłącznie w skrawkach pochodzących z obszarów mózgowia wykazujących makroskopowe cechy uszkodzenia bariery krew—mózg.

Obraz mikroskopowy pozwalający na ocenę stopnia nasycenia tkanki nerwowej stosowanym w doświadczeniu indykatozem, a także stwarzający możliwość określenia lokalizacji barwnika w poszczególnych elementach tkanki był podobnie jak obraz makroskopowy wyraźnie zróżnicowany w zależności od czasu trwania ucisku.

U zwierząt grupy pierwszej czerwona fluorescencja była widoczna w ścianach większych naczyń krwionośnych oraz w przylegającej do nich tkance nerwowej. Przy czym obserwowana w tym czasie przynacyniowa dyfuzyjna fluorescencja, występująca w uciśniętych obszarach kory mózgu, była najintensywniejsza w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń i zmniejszała się stopniowo aż do zupełnego zaniku w miarę oddalania się od niego. W grupie drugiej (ucisk 4-godzinny) dyfuzyjna forma fluorescencji występowała rzadziej, a na jej miejsce pojawiały się czerwono świecące owalne twory, ułożone wokół naczyń, które wielkością i umiejscowieniem sugerowały gromadzenie się wskaźnika w perycytach (ryc. 3). W tym okresie również pojawiała się czerwona fluorescencja w neuro-

cytach i w neuropilu, nie wykazująca bezpośredniego związku z naczyniami krwionośnymi (ryc. 4). Fluorescencja w neurocytach była szczególnie intensywna u zwierząt grupy trzeciej i czwartej (ucisk 6- i 12-godzinny). W tym okresie czerwone świecenie obejmowało zarówno perikaria komórek nerwowych, jak i przykomórkowe części ich wypustek (ryc. 5). Fluorescencja w neuropilu miała na ogół charakter dyfuzyjny. Stwierdzało się tu również świecące nitkowate i owalne struktury sugerujące swoim wyglądem przekroje wypustek komórkowych.

Obraz mikroskopowy ognisk położonych w odległych częściach półkuli uciśniętej i w półkuli przeciwległej nie różnił się od obrazów stwierdzanych w obszarach bezpośrednio sąsiadujących z miejscem ucisku tkanki (ryc. 6).

Poza fluorescencją spotykaną w korze mózgu i w podkorowych formacjach szarych, pozanaczyniowe świecenie znacznika barierowego stwierdzano również w istocie białej. Pojawiło się ono u zwierząt z 2-godzinnym uciskiem i ulegało nasileniu w kolejnych grupach doświadczenia. Fluorescencja była najintensywniejsza w podkorowej istocie białej, położonej bezpośrednio pod miejscem ucisku lub w okolicach z nimi sąsiadujących (ryc. 7). Podobnego charakteru ogniska, choć mniej intensywne w późniejszych okresach doświadczenia stwierdzano również w półkuli nie uciśniętej.

Zwracał uwagę charakterystyczny, odmienny niż w formacjach szarych obraz mikroskopowy istoty białej, wyrażający się pasmowatym, równoległym do układu włókien nerwowych, rozkładem substancji fluoryzujących oraz ich gromadzenie się w intensywniej świecących tworach uformowanych, odpowiadających najprawdopodobniej perikariom i wypustkom komórek glejowych (ryc. 8). Na podkreślenie zasługiwał ponadto fakt występowania silniejszej fluorescencji w ścianach naczyń krwionośnych istoty białej w porównaniu do naczyń kory i szarych struktur podkorowych.

Nieco odmiennie kształtował się obraz fluorescencji w otoczeniu obszaru ucisku tkanki u tych zwierząt, u których występowały tu ogniska krwotoczne, położone w okolicy złącza korowo-podkorowego. Struktury tkanowe w ich sąsiedztwie wykazywały intensywną, rozlaną fluorescencję tła z widocznymi w nim jaskrawiej świecącymi naczyniami krwionośnymi i elementami komórkowymi tkanki nerwowej.

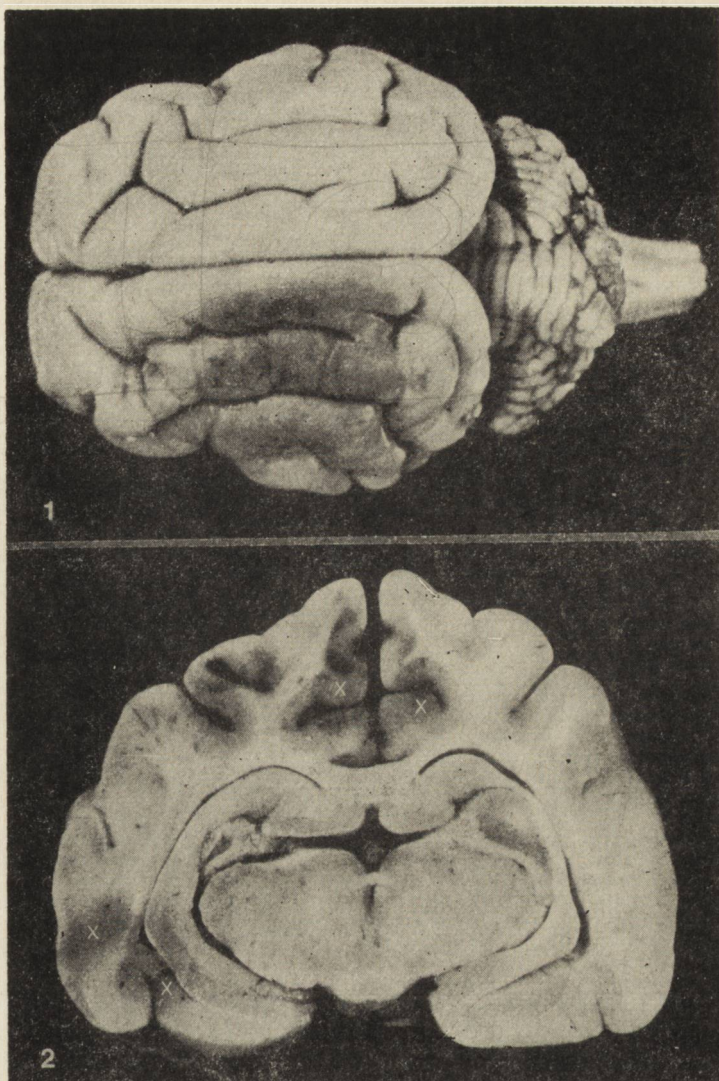
#### OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań wskazują, że miejscowy ucisk półkuli mózgu, wywołany nadtwardówkowym balonikiem o pojemności 1 ml, wypełnionym płynem, prowadzi do zmian w stanie naczyniowo-mózgo-

wych mechanizmów barierowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Zmiany te obecne już po 2-godzinym ucisku w miarę przedłużania się czasu jego trwania nasilają się i ulegają uogólnieniu. Towarzyszą one stosunkowo niewielkim uszkodzeniom strukturalnym tkanki, stwierdzanym zarówno w mikroskopie świetlnym jak i elektronowym (Zelman i wsp. 1974, Borowicz i wsp. 1974) oraz nieprawidłowościom histochemicznym, wśród których dominują cechy obrzęku tkanki nerwowej lub jej odczynu na obrzęk. Stwierdzone zaburzenia bariery krew—mózg, ich znaczne nasilenie w istocie białej, oraz charakterystyczny rozkład znacznika barierowego wśród jej struktur włóknistych pozwala zaszeregować występujący obrzęk jako obrzęk naczynicpochodny wg klasyfikacji Klatzo (1968).

W badanym materiale stwierdza się zmiany zarówno o charakterze miejscowym jak i uogólnionym. Zmiany miejscowe lokalizacyjnie związane są z uciśniętą okolicą półkuli mózgu. Pojawiają się one najwcześniej i wykazują największe zaawansowanie we wszystkich okresach doświadczenia. Mimo odrębnego mechanizmu patogenetycznego są one zbliżone swoim charakterem do zmian opisywanych w przypadkach martwicy kriogennej w doświadczeniach Klatzo (1962), Wiśniewskiego (1965) i Kałuży (1972). Odrębność mechanizmu patogenetycznego w naszym przypadku wynika z odmiennego modelu doświadczalnego. W tzw. „cold lesion” dochodzi do miejscowej martwicy tkanki i związanego z tym ogniskowego uszkodzenia bariery krew—mózg w jej obrębie i sąsiedztwie. Rozszerzanie się wynaczynionego barwnika jest uwarunkowane rozchodzeniem się płynu obrzękowego, a jego obszar wykazuje wyraźną zależność zarówno od rozległości obrzęku jak i czasu krążenia znacznika. W przypadku zastosowanego przez nas modelu doświadczalnego, w którym nie obserwuje się miejscowej martwicy tkanki, wydaje się, że ograniczony ucisk tkanki prowadzi do upośledzenia krążenia w uciśniętym obszarze półkuli i związanego z nim uszkodzenia mechanizmów bariery naczyniowo-mózgowej. Rozszerzanie się pola wynaczynionego barwnika znacznikowego w miarę przedłużania trwania ucisku wobec jednakowego we wszystkich grupach doświadczalnych czasu jego krążenia wydaje się uzasadnione wiązać nie tyle z rozprzestrzenianiem się obrzęku, choć i tego czynnika nie można całkowicie wyłączyć, ale ze zwiększaniem się pola uszkodzonej bariery krew—mózg.

Taki charakter mają również niewątpliwie uogólnione zmiany barierowe, wyrażające się występowaniem mnogich ognisk wynaczynienia znacznika, niezależnych od opisanych uprzednio zmian miejscowych i zlokalizowanych zarówno w odległych częściach uciśniętej półkuli jak i w półkuli przeciwległej. Przy czym podkreślić należy, że charakter mikros-

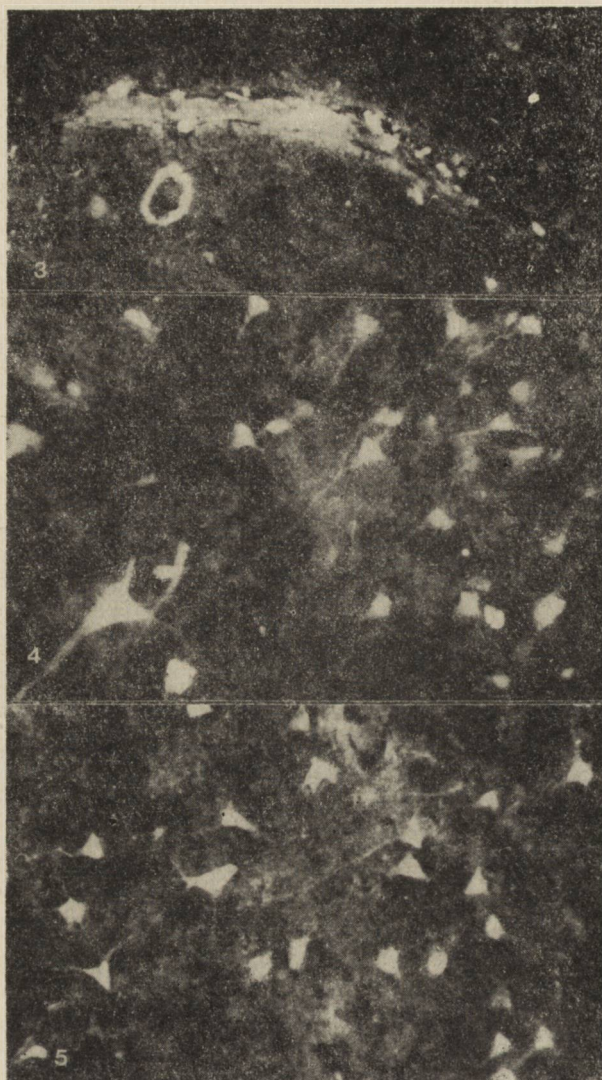


*Ryc. 1.* Ograniczone zabarwienie na powierzchni zewnętrznej półkuli mózgu w miejscu ucisku i w jego sąsiedztwie. Ucisk 4 godz.

*Fig. 1.* Limited staining on the external surface of cerebral hemisphere in the implantation place and in its neighbourhood. 4 hrs after implantation.

*Ryc. 2.* Wieloogniskowe, plackowate (patchy) zabarwienie tkanki nerwowej obu półkul mózgu z przewagą półkuli nie uciśniętej. Przekrój poprzeczny na wysokości ciał kolankowatych bocznych. Ucisk 6 godz.

*Fig. 2.* Multifocal patchy staining of nerve tissue of both cerebral hemispheres with the preponderance of the non-implanted one. Cross section on the level of lateral geniculate bodies. 6 hrs after implantation.



*Ryc. 3.* Przynaczyniowa fluorescencja w postaci tworów przypominających wielkością i umiejscowieniem pericyty. Ucisk 4 godz.

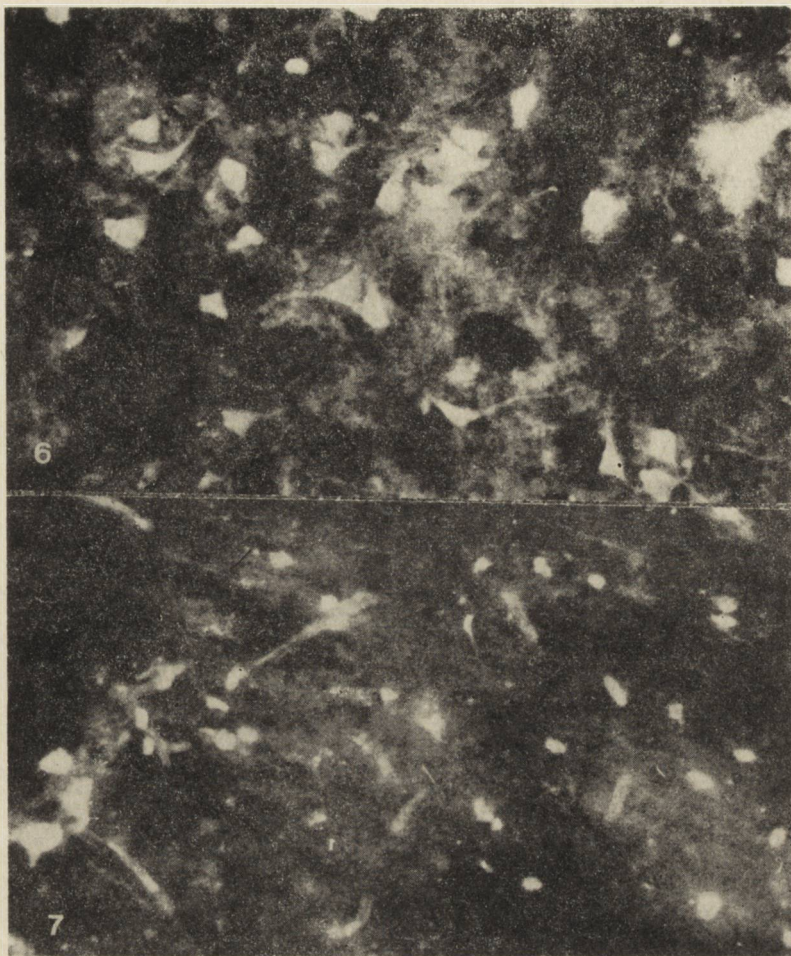
*Fig. 3.* Perivascular fluorescence in the form of bodies, resembling pericytes by size and localization. 4 hrs after implantation.

*Ryc. 4.* Fluorescencja komórek i neuropilu kory mózgowej po stronie ucisku. Ucisk 4 godz.

*Fig. 4.* Fluorescence of cells and neuropile of cerebral cortex on the side of balloon implantation. 4 hrs after implantation.

*Ryc. 5.* Intensywna fluorescencja w neurocytach oraz neuropilu kory mózgowej półkuli prawej (nie uciśniętej). Ucisk 12 godz.

*Fig. 5.* Intensive fluorescence in neurocytes and neuropile of cerebral cortex in the right (non-compressed) hemisphere. 12 hrs after implantation.

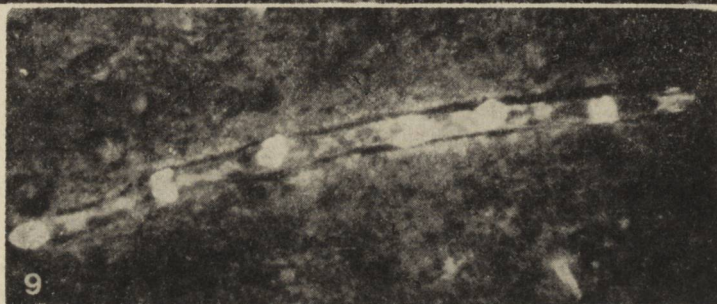
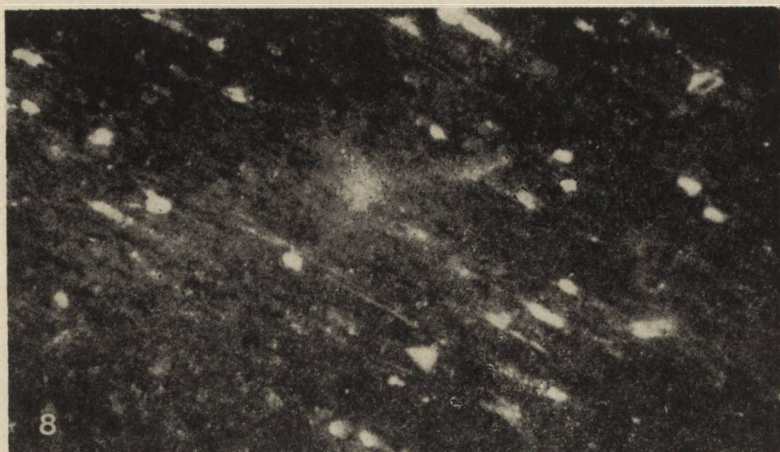


*Ryc. 6.* Fluorescencja komórek i neuropilu kory mózgu po stronie prawej (nie uciśniętej). Ucisk 6 godz.

*Fig. 6.* Fluorescence of cells and neuropile of cerebral cortex on the right non-compressed side. 6 hrs after implantation.

*Ryc. 7.* Dyfuzyjna fluorescencja w podkorowej istocie białej półkuli uciśniętej. Ucisk 2 godz.

*Fig. 7.* Diffuse fluorescence in subcortical white matter in the compressed hemisphere. 2 hrs after implantation.



*Ryc. 8.* Fluorescencja w głębszych warstwach istoty białej półkuli uciśniętej. Świecące twory układają się wzdłuż przebiegu włókien nerwowych. Ucisk 6 godz..

*Fig. 8.* Fluorescence in deeper layers of white matter of the compressed hemisphere. Fluorizing bodies arranged along the nerve fibres. 6 hrs after implantation..

*Ryc. 9.* Autofluorescencja pericytów ułożonych wzdłuż przebiegu naczynia. Ucisk 2 godz.

*Fig. 9.* Autofluorescence of pericytes arranged along the vessel. 2 hrs after im-plantation.



kopowo-fluorescencyjny odległych ognisk wynacznienia barwnika był identyczny ze zmianami w miejscu ucisku stwierdzanymi w drugiej i dalszych grupach doświadczalnych. Mechanizm ich powstawania wydaje się być ściśle związany z doświadczalnie wywołanymi warunkami ciasnoty śródczaszkowej, spowodowanej zarówno samą obecnością balonika, jak i narastającym obrzękiem mózgu uciśniętej półkuli, którego zasięg tkankowy mógł być większy niż wskazywał na to obszar wynacznienia znacznika barierowego (Wiśniewski 1965). Warunki ciasnoty śródczaszkowej w przypadku kota pogłębiają specyficzne stosunki anatomiczne, związane z istnieniem skostniałej przegrody dzielącej jamę czaszki na dwie odrębne niejako przestrzenie. Wzmoczone ciśnienie śródczaszkowe z kolei mogło prowadzić do uogólnionych zaburzeń hemodynamicznych, których wykładniki stwierdzono w badaniach Zelman i wsp. (1974). Te z kolei warunkowały upośledzone ukrwienie tkanki i prowadziły do zaburzeń barierowych. Oczywiście nie można również wykluczyć możliwej roli ogólnoustrojowych zaburzeń hemodynamicznych, związanych z zabiegiem operacyjnym i warunkami przebiegu doświadczenia.

Na ewentualny wpływ czynników związanych z upośledzeniem ukrwienia mózgu na rozwój stwierdzanych zmian barierowych obok wyników badań biochemicznych przeprowadzonych na tym samym modelu doświadczalnym (Gromek i wsp. 1973) może wskazywać podobieństwo obrazów mikroskopowo-fluorescencyjnych do stwierdzanych w warunkach hipoksji krążeniowej (Gadamski Szumańska 1974) i w okołoporodowej asfiksj noworodków (Mossakowski i wsp. 1968). Ich cechą charakterystyczną odmienną niż w przypadkach obrzęku naczyniopochodnego w martwicy kriogennej jest obfite gromadzenie się znacznika barierowego w cytoplazmie komórek nerwowych. Pod tym względem stwierdzone w naszym materiale obrazy zbliżone były do przypadków chemicznego uszkodzenia bariery krew—mózg (Steinwall, Klatzo 1966). Śródneuralne gromadzenie się kompleksu białko — błękit Evansa wskazuje, że oprócz uszkodzenia naczyniowo-mózgowych mechanizmów barierowych dochodzi ponadto do zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej neurocytów. Zwraca przy tym uwagę fakt, że zjawisko to wykazuje opóźnienie w stosunku do zmian w przepuszczalności naczyń. W najwcześniejszej grupie doświadczalnej nie obserwowano śródneuralnego gromadzenia się znacznika. Występował on w tym okresie jedynie w ścianach naczyń krwionośnych, w ich bezpośrednim otoczeniu oraz rozchodził się swobodnie między pasmami włókien istoty białej, gromadząc się tu również w cytoplazmie i wypustkach komórek glejowych. Zwraca przy tym uwagę charakterystyczne nasiąkanie znacznikiem barierowym ścian naczyń krwionośnych, wykazujące pełną równoległość z gromadzeniem się wśród ich utkania substancji PAS-dodatnich (Szumańska i wsp. 1974). Podobne zja-

wisko obserwowali Ostenda i Nowakowski (1968) w następstwie naświetlania promieniami gamma.

Brak oznak uszkodzenia bariery krew—mózg u zwierząt z obniżonym ciśnieniem tętniczym, stanowi potwierdzenie poprzednich spostrzeżeń Klatzo (1968) dotyczących roli układowego ciśnienia tętniczego krwi w powstawaniu i szerzeniu się obrzęku naczyniopochodnego.

Nie wyjaśniony jest charakter komórkowej lokalizacji barwnika gromadzącego się w postaci kulistych tworów okołonaczyniowych. Liczne spośród nich swoją wielkością i umiejscowieniem w stosunku do ściany naczyniowej mogą sugerować pericyty. Jednakże przeczy temu porównanie materiału doświadczalnego z kontrolnym. Pericyty u kotów wykazują bowiem żywą żółtą autofluorescencję, którą z łatwością można odróżnić od czerwonej fluorescencji znacznika. Wydaje się przeto, że tworzy te analogiczne do obserwowanych przez Steinwalla i Klatzo (1966) w chemicznym uszkodzeniu bariery są bądź poszerzonymi wypustkami astrocytów bądź też luźnymi przynaczyniowymi skupieniami kompleksu białka z błękitem Evansa. W rozstrzygnięciu tego zagadnienia mogłoby być pomocne badanie mikroskopowo-elektronowe.

Występująca w badanym materiale dyfuzyjna fluorescencja wokół ognisk krwotocznych nie jest związana z uszkodzeniem mechanizmów barierowych lecz z przerwaniem ciągłości ściany naczyń krwionośnych leżących bezpośrednio pod uciskiem. Wydostająca się z łożyska naczyniowego krew razem z krążącym w niej indykatorem, przenika do sąsiadującej z ogniskiem krwotocznym tkanki nerwowej, dając w niej zjawisko bezpośredniej fluorescencji nie związanej wyraźnie z żadnymi elementami komórkowymi mózgu.

#### WNIOSKI

1. Ograniczony nadtwardówkowy ucisk półkuli mózgu prowadzi do uszkodzenia naczyniowo-mózgowych mechanizmów barierowych ośrodkowego układu nerwowego, zarówno miejscowych jak i uogólnionych.

2. W powstawaniu zaburzeń barierowych istotną rolę odgrywają zaburzenia hemodynamiczne miejscowe i ogólnomózgowe, związane z bezpośrednim uciskiem tkanki oraz z narastającą ciasnotą śródczaszkową.

3. Zaburzenia barierowe wykazują zależność charakteru, rozległości i umiejscowienia od czasu działania czynnika uszkadzającego.

4. Wysokość układowego ciśnienia tętniczego krwi wywiera istotny wpływ na ujawnianie się cech uszkodzenia bariery krew—mózg.

Р. Гадамски, Е. Юркевич, З. Черницки

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕДЕНИЯ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА  
У КОШКИ ПРИ РАННЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ

Резюме

Авторы провели исследование изменений проницаемости сосудистой системы для белков при раннем экспериментальном отеке мозга у кошки. Отек вызывался путем давления пузырька, введенного в супрадуральное пространство. Исследования проводились после 2, 4, 6 и 12 часов давления. Синий Эванса вводился за 2 часа до окончания опыта. Изменения оценивались макроскопически и под флуоресцентным микроскопом.

Было показано, что применяемая экспериментальная модель приводит к увеличению проницаемости гемато-энцефалического барьера для примененной метки. У кошек, проживших 2 часа, были заметны излияния синего Эванса в месте давления пузырька на ткань, охватывающие кору и подкорковое белое вещество. У животных, проживших 6 и 12 часов, поля с синей окраской были видны в обоих полушариях в областях, отдаленных от места давления.

В измененных полях, видимых в микроскопе, была обнаружена в флуоресцентном микроскопе красная флуоресценция вокруг сосудов, а у животных, проживших дольше также в нейропиле и в нейронах.

Топография и характер наблюдаемых изменений указывает на существенное участие гемодинамических нарушений в процессе увеличенной проницаемости гемато-энцефалического барьера.

R. Gadamski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki

STUDIES ON THE BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY  
IN CATS IN EARLY EXPERIMENTAL EDEMA

Summary

The authors have examined changes in the permeability of the vascular system for proteins in early experimental brain edema in the cat. Edema was produced by epidural balloon implantation. The examinations were performed 2, 4, 6 and 12 hours after implantation. Evans blue was introduced 2 hrs before the end of each experiment. The changes were evaluated macroscopically and in a fluorescence microscope.

The present experimental model was shown to increase the blood-brain barrier permeability for the applied marker. In the cats with a 2 hrs survival, extravasation of Evans blue was observed in the area of balloons compression on the tissue, comprising the cortex and the subcortical white matter. In the animals with 6- and 12-hrs survival, blue-stained areas were visible in both hemispheres in regions distant from the implantation area.

In the areas of changes visualized macroscopically, observations in a fluorescence microscope revealed red fluorescence around the vessels and in the animals with longer survival — also in neuropile and neurons.

The topography and character of the observed changes suggest significant participation of hemodynamic disturbances in the process of increased blood-brain barrier permeability.

## PIŚMIENICTWO

1. Borowicz J., Jurkiewicz J., Czernicki Z., Gajkowska B.: Badania mikroskopowo-elektronowe mózgu kota we wczesnym obrzęku doświadczalnym. *Neuropat. Pol.* w druku.
2. Edvinsson L., Nielsen K. C., Owman Ch., West K. A.: Alternations in intercranial pressure, blood-brain barrier and brain edema after sub-chronic implantation of a cannula into the brain of conscious animals. *Acta physiol scand.* 1971, 82, 527—531.
3. Gadamski R., Szumańska G.: Zachowanie się bariery krew—mózg w następstwie krążeniowej hipoksji. *Neuropat. Pol.* 1974, w druku.
4. Gromek A., Majewska D., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Kunicki A.: Właściwości biochemiczne mitochondriów w warunkach doświadczalnego obrzęku mózgu u kotów. *Bull. Acad. Pol. Scien. Sec. Scien. Biol.* 1973, 10, w druku.
5. Hamberger A., Hamberger B.: Uptake of catecholamines and penetration of trypan blue after blood-brain barrier lesions. *Z. Zellforsch.* 1966, 70, 386—392.
6. Herrmann H. D., Neuenfeldt D.: Development and regression of a disturbance of the blood-brain barrier and edema in tissue surrounding a circumscribed cold lesion. *Exp. Neurol.* 1972, 34, 115—120.
7. Ishii S., Hayner R., Kelly W. A., Evans J. P.: Studies of cerebral swelling. II. Experimental cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. *J. Neurosurg.* 1959, 16, 152—166.
8. Kałuża J.: Experimental brain edema. Comparison of the brain wound and cryogenic necrosis. *Acta Med. Pol.* 1971, 12, 487—502.
9. Klatzo I., Miquel J.: Observations on pinocytosis in nervous tissue. *J. Neuro-path. exp. Neurol.* 1960, 19, 475—487.
10. Klatzo I., Miquel J., Otenasek R.: The application of fluorescein labeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. *Acta Neuropath.* 1962, 2, 144—160.
11. Klatzo I.: Application of fluorescence microscopy to the study of the nervous system. *The Central Nervous System. International Academy of Pathology Monograph No 9*, 1968, 319—334.
12. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Rodriguez de Curret H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
13. Olsson Y., Crowell R. M., Klatzo I.: The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 18, 89—102.
14. Ostenda M., Nowakowski W.: Zmiany lokalizacji niektórych enzymów oksydo-redukcyjnych i pojawienie się ciał PAS-dodatnich w mózgach noworodków szczyrzych po napromienieniu promieniami gamma. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 285—294.

15. Steinwall O., Klatzo I.: Selective vulnerability of the blood-brain barrier in chemically induced lesions. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1966, 25, 542—559.
16. Szumańska G., Gadamski R., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Tężycka J.: Zmiany histochemiczne w mózгах kotów w następstwie ucisku nadtwardówkowego. *Neuropat. Pol.* 1974, 3, 447—460.
17. Wiśniewski H.: Badania nad przepuszczalnością bariery krew-mózg, krew-płyn mózgowo-rdzeniowy i płyn mózgowo-rdzeniowy-mózg dla białek w warunkach fizjologicznych oraz bariery krew-mózg dla albumin w obrzęku mózgu. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 1—33.
18. Zelman I. B., Szewczykowski J., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Patomorfologia w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu u kota. *Neuropat. Pol.* 1974, 3, 425—434.

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

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, ROMAN GADAMSKI, ZBIGNIEW CZERNICKI,  
JERZY JURKIEWICZ, JOLANTA TEŻYCKA

ZMIANY HISTOCHEMICZNE W MÓZGU KOTA  
W DOŚWIADCZALNYM UCISKU NADTWARDÓWKOWYM \*)

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

W bogatym piśmiennictwie poświęconym doświadczalnemu obrzękowi mózgu stosunkowo nieliczne są prace omawiające zmiany histochemiczne towarzyszące różnym typom obrzęku. W opracowaniach tych, w znacznej części omawiających skutki obrzęku zwraca się uwagę na zróżnicowanie obrazu histochemicznego nieprawidłowości tkanekowych w zależności od rodzaju czynnika uszkadzającego (typu obrzęku), jego intensywności i czasu działania oraz fazy zdrowienia (Rubinstein i wsp. 1962, Torack, Barrnett 1964, Yonagihara i wsp. 1965, Torack 1965, Miquel, Haymaker 1965, Zeman, Kalsbeck 1967, Wolman, Bubis 1967, Canzullo i wsp. 1967, Ostenda, Nowakowski 1968, Rasmussen, Klatzo 1968, Kałuża 1972, Kozik 1972, Wender, Kozik 1973, Wender i wsp. 1973, Zelman, Szumańska 1973).

Skłoniło to nas do podjęcia badań nad obrazem histochemicznym wczesnego okresu doświadczalnego obrzęku mózgu, wywołanego nadciśnieniowym uciskiem mózgu, przy pomocy wypełnionego płynem balonika o określonej pojemności, wg metody opisanej przez Ishii i wsp. (1959). Z prac wyżej wymienionych autorów (Ishii i wsp. 1959, 1968) oraz prac Zelman i wsp. (1974) i Jurkiewicza i wsp. (1974) wiadomo, że we wczesnym okresie ucisku dochodzi do stosunkowo nieznacznych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej, stwierdzanych zarówno w mikroskopie świetlnym jak i elektronowym. Badania biochemiczne prowadzone na materiale z tego samego okresu ucisku wykazują szereg nieprawidłowości, wskazujących na zaburzony metabolizm tkanki (Gromek i wsp. 1973, Czernicki i wsp. 1973). Celem naszych badań histochemicznych by-

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

Ło poszukiwanie morfologicznych wykładników tych zaburzeń, przy czym badania celowo ograniczono do okresu narastania obrzęku mózgu (Gadamski i wsp. 1974).

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 10 dorosłych kotach, obu płci, wagi 2,5—3,5 kg. Przygotowanie operacyjne zwierząt, sposób wykonania zabiegu operacyjnego oraz technika przeprowadzenia ucisku nadtwardówkowego były identyczne, jak podano w pracy Zelman i wsp. (1974).

Użyte w doświadczeniu koty podzielono na 4 grupy w zależności od czasu trwania ucisku. W grupie I ucisk trwał 2 godz., w II — 4 godz., w III — 6 godz., a w IV — 12 godz. Materiał kontrolny stanowiły 2 koty, które przebywały w narkozie nembutalowej (40 mg/kg wagi) przez okres 2 i 12 godzin oraz 2 nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Zwierzęta uśmiercano drogą ostrego skrwawienia, przez przecięcie tętnic szyjnych wspólnych. Materiał do badań histoenzymatycznych pobierano z półkuli uciśniętej, z okolicy położonej bezpośrednio pod balonikiem, oraz z tego samego poziomu półkuli przeciwległej. Bloki tkanki natychmiast zamrażano w sproszkowanym suchym lodzie i skrawano w kriostatcie w temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$  na skrawki grubości 14  $\mu$ . Na skrawkach kriostatowych wykonano badanie niżej wymienionych enzymów:

Fosforylaza „całkowita” — Takeuchi, Kuriaki (1955) w modyfikacji Godlewskiego (1963)

UDPG-G-transferaza — Takeuchi, Glenner (1961)

Dehydrogenaza bursztynianowa — Novikoff (1963)

Dehydrogenaza mleczanowa — Hess i wsp. (1958)

Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanu — Hess i wsp. (1958)

Monofosfataza kwaśna — Barka (1965) w modyfikacji Burstona z użyciem naftolu AS-TR jako substratu

Pyrofosfataza tiaminowa — Novikoff, Goldfischer (1961) w modyfikacjach Głuszcza (1966) i Schiffera (1973).

Bloki tkanki pochodzące z bezpośredniego sąsiedztwa bloków pobieranych do badań histoenzymatycznych, utrwalano w płynie Rossmanna i zatapiało w parafinie. Na skrawkach parafinowych grubości 10  $\mu$  wykonywano odczyn PAS wg McManusa i Mowry (1958), preinkubację z diastazą wg Pearse'a (1972) oraz z wyprzedzającym blokowaniem grup aldehydowych diamedonem wg Bulmera (1958) dla wykazania glikogenu.

## WYNIKI

Obraz histochemiczny mózgow zwierząt kontrolnych, u których zastosowano narkozę nembutalową nie różnił się od obrazu stwierdzonego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Istotne natomiast zmiany stwierdzono w obrazie histochemicznym mózgow zwierząt doświadczalnych.

*Fosforylaza całkowita.* U zwierząt kontrolnych dodatni, silny odczyn histoenzymatyczny występował we wszystkich formacjach szarych i nieco słabszy w istocie białej. Wyraźne nasilenie ziarnistego odczynu występowało w bezpośrednim otoczeniu naczyń. W korze aktywność enzymatyczna była umiejscowiona w neuropilu, przy negatywnej reakcji w cytoplazmie większości komórek nerwowych, szczególnie wyraźnej w zawoju hipokampa (ryc. 1). W istocie białej aktywność była związana z włóknami nerwowymi, mniej wyraźnie z komórkami glejowymi. U zwierząt z dwugodzinnym uciskiem stwierdzało się zróżnicowanie odczynu w obu półkulach. Po stronie ucisku obserwowano prawie całkowity zanik aktywności enzymatycznej w strukturach szarych, z jej wyłącznym zachowaniem w otoczeniu naczyń neocortex i zawoju hipokampa. Aktywność w istocie białej była znacznie słabsza w porównaniu do kontroli. Po stronie przeciwległej do ucisku aktywność w formacjach szarych była niezmienną. W substancji białej po tej stronie obserwowano nieznaczny spadek aktywności w porównaniu do kontroli w okolicy bezpośrednio podkorowej oraz jej brak w głębszych warstwach.

W kolejnych grupach doświadczalnych (4, 6, 12 godz.) obserwowano wyraźne wzmożenie odczynu w substancji białej przy niemal całkowitym jej braku w formacjach szarych (ryc. 2). Jedynie w niektórych okolicach nowej kory oraz zawoju hipokampa stwierdzało się śladową aktywność w otoczeniu naczyń.

*UDPG-g-transferaza.* W grupie kontrolnej oraz w I grupie doświadczalnej nie stwierdzono dodatniego odczynu histochemicznego. W grupie 4-godzinnej słaby odczyn, w postaci okołonaczyniowo skupionych ziarnistości produktu końcowego, występował wyłącznie w półkuli uciśniętej. Przy dłuższym trwaniu ucisku (6 i 12 godz.) aktywność enzymu w formacjach szarych półkuli uciśniętej występowała zarówno przy naczyniach jak i w postaci luźno rozsianych ziaren w neuropilu, pojawiała się ponadto w otoczeniu drobnych naczyń w istocie białej. Po stronie nie uciśniętej aktywność UDPG-g-transferazy nie występowała w ogóle, lub była jedynie śladowa, zarówno w istocie białej, jak i szarej.

*Dehydrogenaza bursztynianowa.* U zwierząt kontrolnych umiarkowaną aktywność enzymu stwierdzano w strukturach szarych i nieco słabszą w istocie białej. W korze mózgu dodatni odczyn występował w neuropilu oraz stosunkowo nielicznych komórkach nerwowych (ryc. 3).



W istocie białej był związany z komórkami glejowymi, przede wszystkim oligodendrocytami. Po 2-godzinnym ucisku aktywność histoenzymatyczna była wyraźnie słabsza w półkuli uciśniętej, natomiast jej obraz po stronie przeciwległej nie zmieniał się w stosunku do kontroli. W następnych grupach czasowych stwierdzano nasilenie się odczynu zarówno w strukturach szarych jak i białych, największe w IV grupie doświadczalnej (ryc. 4). Wzrost nasilenia odczynu wyrażał się wystąpieniem większej liczby neuronów z dodatnim odczynem w cytoplazmie większym bogactwem ziarnistości dwuformazanu w neuropilu, szczególnie wyraźnym w otoczeniu naczyń. W istocie białej podkorowej większa liczba komórek glejowych wykazywała dodatni odczyn, podobnie obfitsze były złogi produktu końcowego reakcji w pojedynczych komórkach.

Należy podkreślić, że różnice w aktywności SDH między obu półkulami występowały jedynie w grupie 2-godzinnej zwierząt. W pozostałych grupach doświadczalnych różnic tych nie spostrzegano.

*Dehydrogenaza mleczanowa.* Silny ziarnisty odczyn występował w neuropilu i komórkach nerwowych formacji szarych oraz w gleju istoty białej (ryc. 5) u zwierząt kontrolnych. Minimalne osłabienie odczynu w korze mózgu po stronie uciśniętej utrzymywało się od 2 do 12 godziny ucisku. Wzrastał natomiast odczyn histochemiczny w komórkach glejowych istoty białej, zwłaszcza w astrocytach, szczególnie wyraźny w grupie IV (ryc. 6).

*Dehydrogenaza-6-fosforanowa.* W mózgach kotów kontrolnych bardzo silna aktywność enzymu występowała w komórkach glejowych istoty białej, słaba w neuropilu i stosunkowo licznych komórkach kory mózgu. W kolejnych grupach zwierząt doświadczalnych stwierdzono niewielki wzrost aktywności enzymu w neuropilu kory i w niektórych komórkach nerwowych oraz w komórkach glejowych istoty białej. Wzrastała również aktywność enzymatyczna stwierdzana w elementach komórkowych ścian naczyń. Zmiany te były poprzedzone nieznacznym przejściowym spadkiem aktywności enzymu w korze mózgu uciśniętej półkuli, obserwowanym w grupie 2-godzinnej.

*Fosfataza kwaśna.* W grupie zwierząt kontrolnych drobnoziarnisty dodatni odczyn występował w cytoplazmie komórek nerwowych. Najwyższą aktywność wykazywały komórki piramidowe kory (ryc. 7), oraz dwubiegunowe neurony roku Ammona. Zwracał uwagę równomierny rozkład produktów końcowych odczynu w cytoplazmie komórek nerwowych. W trzech pierwszych grupach doświadczenia (2, 4 i 6 godz.) aktywność enzymu w komórkach nerwowych kory mózgu w obu półkulach spadała, przy czym w miejsce równomiernego rozkładu produktów końcowych reakcji w całej cytoplazmie komórki obserwowano się ich skupienie na

jej obwodzie. Zmiany te w najmniejszym stopniu dotyczyły komórek piramidowych kory.

W grupie IV (12-godzinnej) stwierdzało się natomiast nasilenie odczynu histoenzymatycznego. W tym czasie produkty końcowe reakcji gromadziły się dodatkowo w przykomórkowej części wypustek neuronów oraz były widoczne w cytoplazmie komórek glejowych podkorowej istoty białej (ryc. 8).

*Pyrofosfataza tiaminowa.* U zwierząt kontrolnych oraz w I i II grupie doświadczalnej stwierdzało się silny odczyn histoenzymatyczny w komórkach nerwowych wszystkich struktur szarych.

W obu grupach doświadczalnych była widoczna zmieniona w stosunku do materiału kontrolnego śródkomórkowa lokalizacja produktów końcowych odczynu, które gromadziły się na obwodzie neuronów, pod ich błoną komórkową (ryc. 9). W późniejszych grupach czasowych obserwowano się postępujący spadek aktywności w neuronach kory mózgu, zwłaszcza po stronie uciśniętej. Przy czym nie ulegała zmianie śródkomórkowa lokalizacja produktów końcowych reakcji. Bardziej zróżnicowany był obraz histoenzymatyczny struktur zawoju hipokampa. Zróżnicowanie to było najwyraźniejsze w IV grupie doświadczalnej. Po stronie uciśniętej aktywność TPP-azy w piramidowych neuronach była niższa niż w komórkach kory mózgu po tej samej stronie. Po stronie nie uciśniętej w zawoju hipokampa występowały grupy komórek o bardzo wysokiej aktywności, obok neuronów z odczynem śladowym lub niemal zupełnie ujemnym.

Odczyn histoenzymatyczny w ścianie naczyń krwionośnych silny w grupie kontrolnej był osłabiony we wszystkich grupach doświadczalnych.

Zwracało uwagę pojawienie się odczynu w cytoplazmie komórek glejowych istoty białej podkorowej już w II grupie doświadczalnej, nasilającego się w miarę przedłużania czasu doświadczenia.

*Substancje PAS-dodatnie.* Dodatnią reakcję PAS w materiale kontrolnym stwierdzano w postaci dyfuzyjnego odczynu w neuropilu formacji szarych oraz w ścianach naczyń krwionośnych zarówno substancji szarej jak i białej. Dwugodzinny ucisk prowadził do uogólnionego wzmocnienia odczynu w ścianach naczyń (ryc. 10).

W kolejnych grupach doświadczalnych (2 i 4 godz.) dyfuzyjny odczyn PAS pojawiał się w bezpośrednim otoczeniu naczyń w formacjach szarych i białych, z wyraźną przewagą po stronie ucisku (ryc. 11). W grupie 12-godzinnej stwierdzało się największe okołonaczyniowe nagromadzenie substancji PAS-dodatnich, występujących zarówno w postaci dyfuzyjnej i ziarnistej. Przeważało ich umiejscowienie w podkorowej istocie białej i w korze amonalnej oraz w istocie szarej płata gruszkowa-

tego. Nagromadzenie substancji PAS-dodatnich przez cały okres doświadczenia było wyraźniejsze po stronie uciśniętej.

*Glikogen.* Obraz histochemiczny I grupy doświadczalnej był identyczny z obrazem stwierdzanym w grupie kontrolnej. W grupie zwierząt z 4-godzinnym uciskiem pojawiły się drobnoziarniste złogi glikogenu, położone wokół naczyń okolicy przykomorowej, w korze mózgu w uciśniętym obszarze półkuli, oraz nieznaczne w podkorowej istocie białej i zawoju hipokampa. W miarę przedłużania się ucisku nagromadzenie glikogenu nieznacznie zwiększało się. W grupie IV złogi glikogenu występowały w postaci grubych ziarnistości, zgrupowanych wokół naczyń, w cytoplazmie pojedynczych astrocytów podkorowej istoty białej oraz w istocie białej zawoju hipokampa (ryc. 12). W tym okresie również stwierdzano nieliczne ziarnistości glikogenu położone na przebiegu pasm włókien nerwowych obrzękłej istoty białej, nie wykazujące uchwytne-go związku z elementami komórkowymi.

#### OMÓWIENIE

Obraz histochemiczny ośrodkowego układu nerwowego z doświadczalnym uciskiem nadtwardówkowym wykazuje zróżnicowany zespół zmian, dotyczący większości wykonywanych odczynów.

Na specjalną uwagę zasługuje gromadzenie się substancji PAS-dodatnich pojawiających się w najwcześniejszych okresach doświadczenia w ścianach naczyń krwionośnych, a następnie w ich otoczeniu zarówno w istocie białej jak i szarej obu półkul z wyraźną przewagą półkuli uciśniętej. Wykonane odczyny histochemiczne nie pozwalają na pełną identyfikację substancji PAS-dodatnich, wydaje się jednak uzasadnione ich wiązanie z białkami surowicy krwi przede wszystkim glikoproteinami, przechodzącymi poza łożysko naczyniowe. Przemawia za tym ich lokalizacja i dynamika wykazująca daleko idącą równoległość ze zmianami dotyczącymi penetracji białkowego znacznika barierowego (Gadamski i wsp. 1974). Analogiczne zjawisko obserwowano w obszarach obrzęku mózgu, w przypadkach martwicy kriogennej kory (Klatzo i wsp. 1958, Kałuża 1972). Różnice dotyczące rozległości zmian i ich topografii stwierdzone w naszym materiale odnieść należy zapewne do odmienności modelu i innego czasokresu obserwacji.

Na tle intensywnego gromadzenia substancji PAS-dodatnich w tkance zwraca uwagę niewielka ilość złogów glikogenu, stanowiących najpospolitszy, choć nieswoisty wykładnik uszkodzeń tkanki nerwowej (Klatzo i wsp. 1970). Skąpe gromadzenie się glikogenu w naszym materiale w stosunku do innych modeli doświadczalnego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego należy zapewne wiązać z faktem stałego działania

czynnika uszkadzającego, podczas gdy akumulacja wielocukru występuje zazwyczaj w okresie zdrowienia tkanki (Mossakowski, Penar 1972) oraz z ograniczeniem czasu obserwacji do 12 godzin (gromadzenie glikogenu opisywano zazwyczaj w okresie późniejszym).

Zmiany aktywności UDPG-g-transferazy wykazywały pełną równoległość czasową i lokalizacyjną z gromadzeniem glikogenu, co sugeruje że odkładanie się wielocukru związane jest z jego syntezą a nie zahamowanym rozpadem. Bardzo demonstratywne odwrócenie obrazu aktywności fosforylasy całkowitej, wyrażające się brakiem odczynu w strukturach szarych w późniejszych okresach obserwacji z równoczesnym nasileniem reakcji w istocie białej jest niejasne. Wydaje się, że wzrost aktywności fosforylasy w istocie białej można wiązać z odczynem tkanki glejowej na gromadzenie się płynu obrzękowego. Do tego samego kręgu zjawisk należy zapewne obecność złogów glikogenowych oraz żywa aktywność enzymów oksydacyjno-redukcyjnych i hydrolitycznych w astrocytach istoty białej, analogiczna do zmian opisanych przez Rubinsteina i wsp. (1962).

Większe trudności interpretacyjne nastęrcza wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i glukozy-6-fosforanowej w korze mózgu w czasie trwania ucisku nadtwardówkowego. W świetle badań biochemicznych (Gromek i wsp. 1973), mikroskopowo-elektronowych (Borowicz i wsp. 1973) oraz fluorescencyjnych (Gadamski i wsp. 1974) wydaje się prawdopodobne, że żywszy odczyn histoenzymatyczny uwarunkowany jest ułatwioną penetracją substratu i Nitro BT do elementów strukturalnych obrzmiałej kory mózgu, w związku ze zmienioną przepuszczalnością błon komórkowych. Zwiększoną aktywność niektórych dehydrogenaz w neurocytach wykazujących cechy nieswoistych schorzeń stwierdzał również Kozik (1972) w różnych modelach doświadczalnego uszkodzenia mózgu. Pojawianie się wysokiej aktywności fosfatazy kwaśnej przede wszystkim o dyfuzyjnym charakterze odczynu w licznych komórkach nerwowych kory mózgu, stwierdzanej w późniejszym okresie doświadczenia może stanowić ponadto wykładnik uwalniania się enzymów lizosomalnych do cytoplazmy komórek.

Na podkreślenie zasługuje równoległość śródkomórkowego przemieszczenia produktów końcowych odczynów na TPP-azę i fosfatazę kwaśną, wyrażająca się ich skupianiem na obwodzie cytoplazmy komórki, a mająca stanowić wyraz współzależności reakcji aparatu Golgiego i aparatu lizosomalnego. Analogiczne zjawisko w innym typie uszkodzeń neuronalnych opisali poprzednio Szumańska i Rap (1971).

Omówione powyżej zmiany histochemiczne towarzyszyły stosunkowo niewielkim uszkodzeniom strukturalnym, obserwowanym w tych samych okresach czasu zarówno w mikroskopie świetlnym (Zelman i wsp. 1974)

jak i elektronowym (Borowicz i wsp. 1974). Badania morfologiczne wymienionych autorów wykazały, że dominującą zmianą są cechy narastającego obrzęku mózgu. Zmieniona przepuszczalność naczyń dla wysoko-cząsteczkowego znacznika barierowego, stwierdzona przez Gadamskiego i wsp. (1974) pozwala uznać występujący tu obrzęk naczyniopochodny według klasyfikacji Klatzo (1967).

Stwierdzone przez nas nieprawidłowości histochemiczne obok szeregu podobieństw, wykazują liczne odrębności w porównaniu do zmian opisanych w naczyniopochodnym obrzęku mózgu, wywołanym przez ogniskową kriogenną martwicę kory (Rubinstein i wsp. 1962, Kałuża 1972). Różnice te dotyczą zarówno lokalizacji zmian, jak i ich charakteru. Różnicę lokalizacji zmian uogólnionych w naszym materiale i zasadniczo miejscowych w przypadkach martwicy kriogennej, należy zapewne odnieść do odrębności obu modeli doświadczalnych. W przypadkach tzw. „cold lesion” obrzęk mózgu szerzy się w otoczeniu ogniska, a jego zasięg uwarunkowany jest czasem jaki mija od zadziałania czynnika uszkadzającego wywołującego ogniskowe uszkodzenie przepuszczalności naczyń (Wiśniewski 1965). Obraz nieprawidłowości histochemicznych pokrywa się z polem obrzęku. W zastosowanym przez nas modelu obok miejscowego działania ucisku wywieranego przez nadtwardówkowo umieszczony balonik dochodzi dodatkowy czynnik ciasnoty śródczaszkowej prowadzącej do uogólnionych zaburzeń hemodynamicznych (Zelman i wsp. 1974), warunkujących nieprawidłową przepuszczalność naczyń nie tylko w miejscu ucisku, lecz również w odległych obszarach uciśniętej półkuli i w półkuli przeciwległej (Gadamski i wsp. 1974). Wspomniane zaburzenia hemodynamiczne mogły prowadzić do uogólnionych zmian w ukrwieniu mózgu, za czym przemawia między innymi podobieństwo stwierdzanych nieprawidłowości odczynów histochemicznych, dotyczących niektórych enzymów oksydacyjno-redukcyjnych i hydrolitycznych do zmian opisywanych w przypadkach niedokrwienia mózgu, lub niedokrwienia związanego z niedotlenieniem (Becker 1961, Becker, Barron 1961, Domańska-Janik 1972). Udział dwóch czynników miejscowego ucisku i uogólnionych zaburzeń hemodynamicznych może zatem leżeć u podłoża uogólnionego charakteru zmian histochemicznych stwierdzanych w naszym materiale. Działanie czynnika miejscowego znajduje wyraz w większym nasileniu nieprawidłowości histochemicznych po stronie ucisku, zwłaszcza wyraźnym w najwcześniejszym okresie obserwacji, a utrzymującym się w znacznej części odczynów do końca doświadczenia.

Istotnym czynnikiem wyróżniającym przeprowadzony cykl doświadczeń, rzutującym niewątpliwie o odrębnościach odczynu histochemicznego tkanki, jest również ograniczenie obserwacji do najwcześniejszych

okresów narastania obrzęku i prowadzenie ich w czasie działania czynnika uszkadzającego, podczas gdy w większości innych doświadczeń badane są skutki jego działania.

#### WNIOSKI

1. Mechaniczny miejscowy ucisk mózgu, prowadzący do wzrostu ciśnienia śródczaszkowego i narastającego obrzęku mózgu o typie obrzęku naczyniopochodnego wywołuje bogaty zespół zmian histochemicznych, wyrażający się zmianą aktywności badanych enzymów oksydacyjno-redukcyjnych, hydrolitycznych i metabolizujących glikogen oraz gromadzenie się substancji PAS-dodatnich i glikogenu.

2. Zmiany histochemiczne i ich lokalizacja wykazują zależność od czasu trwania ucisku.

3. Charakter zmian, ich lokalizacja i dynamika sugerują, że stanowią one wyraz odczynu tkankowego na rozwijający się obrzęk mózgu oraz następstwo upośledzenia ukrwienia mózgu związanego z miejscowymi i ogólnymi zaburzeniami hemodynamicznymi.

G. Шуманьска, Р. Гадамски, З. Черницки, Е. Юркевич, И. Тенжицка

#### ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ КОШКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СУПРАДУРАЛЬНОМ ДАВЛЕНИИ

#### Резюме

Были проведены гистохимические исследования центральной нервной системы кошек с экспериментальным супрадуральным давлением, осуществляемым по методу Иши и др. (1959), продолжающимся 2, 4, 6 и 12 часов. Исследование охватывало оценку активности выбранных окислительно-восстановительных ферментов (СДГ, МДГ, Гл-6-ФДГ), гидролитических (ТПФ-аза-кислая фосфатаза), а также ферментов метаболизирующих гликоген (УДФГ-гл-трансфераза, общая фосфорилаза). Кроме этого были проведены гистохимические реакции на гликоген и вещества ПАС-положительные.

Было обнаружено, что в период увеличения отека выступают гистохимические изменения, касающиеся большинства выполняемых реакций. Эти изменения заключались в нагромождении веществ ПАС-положительных вокруг сосудов, увеличивающихся в период надавливания, а также в относительно позднем появлении залежей гликогена. Одновременно появлялась слабая активность УДФГ-гл-трансферазы, проявляющая территориальную и временную согласованность с гликогеном, а также поворот формулы активности фосфорилазы. Окислительно-восстановительные ферменты проявляли в начале падения, а в более поздний период — рост активности. Сходный характер имели изменения активности кислой фосфатазы с диффузионным типом реакции. Он сопровождался понижением активности нейронной ТПФ-азы с изменением внутриклеточной локализации продуктов гистоферментной реакции. Представленные изменения имели общий характер с преобладанием сжатого полушария.

Авторы считают, что гистохимические нарушения являются с одной стороны реакцией ткани на нарастание отека, а с другой стороны последствием гемодинамических нарушений ведущих к нарушению кровоснабжения мозга.

G. Szumańska, R. Gadamski, Z. Czernicki, J. Jurkiewicz, J. Teżycka

#### HISTOCHEMICAL CHANGES IN CAT BRAIN IN EXPERIMENTAL SUPRADURAL COMPRESSION

##### Summary

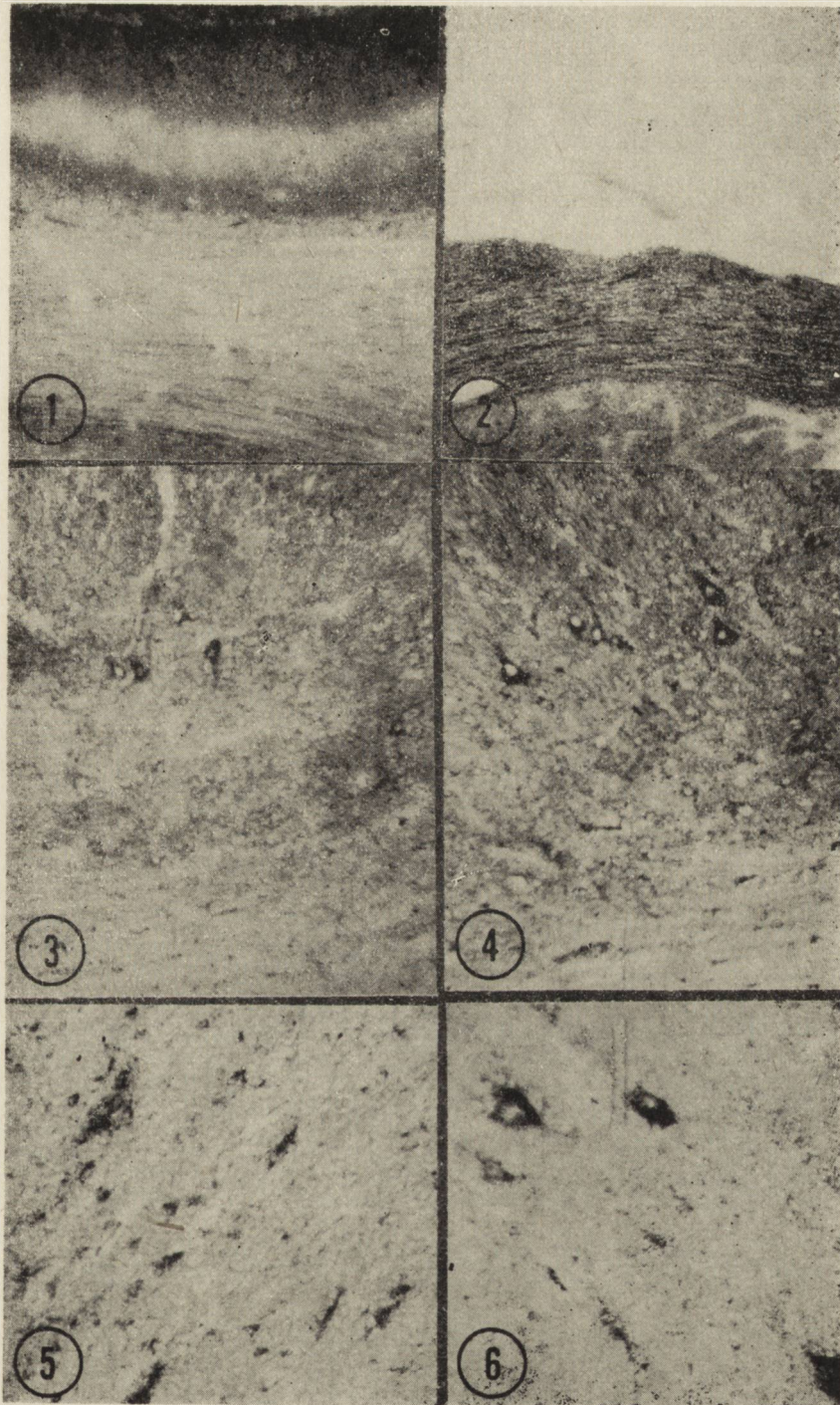
Histochemical studies were performed on the central nervous system of cats with experimental supradural compression, performed after Ishii et al. (1959) and lasting for 2, 4 6 and 12 hrs. The studies included examination the activity of a number of oxidoreducing (SDH, LDH, G-6-PDH), hydrolytic (TPP-ase, acid phosphatase) and glycogen metabolizing (UDPG-G transferase, total phosphorylase) enzymes. In addition, histochemical reactions for glycogen and PAS-positive substances were performed.

In the period of development of edema, histochemical changes were found to involve the majority of the reactions examined. These changes were manifested by accumulation of PAS-positive substances around vessels which increased during compression and by a relatively late appearance of glycogen deposits. This coincided with a weakly pronounced UDPG transferase activity showing topographic and time agreement with the appearance of glycogen and reversion of the phosphorylase activity pattern. The oxidoreducing enzymes showed initially a drop and later an increase of the activity. The changes in acid phosphatase activity, which gave a diffuse reaction, were of similar character. This was accompanied by the decrease of neuronal TPP-ase with the change of intracellular localization of the histoenzymatic reaction products. The changes were of a generalized character, prevailing on the side of the compressed hemisphere.

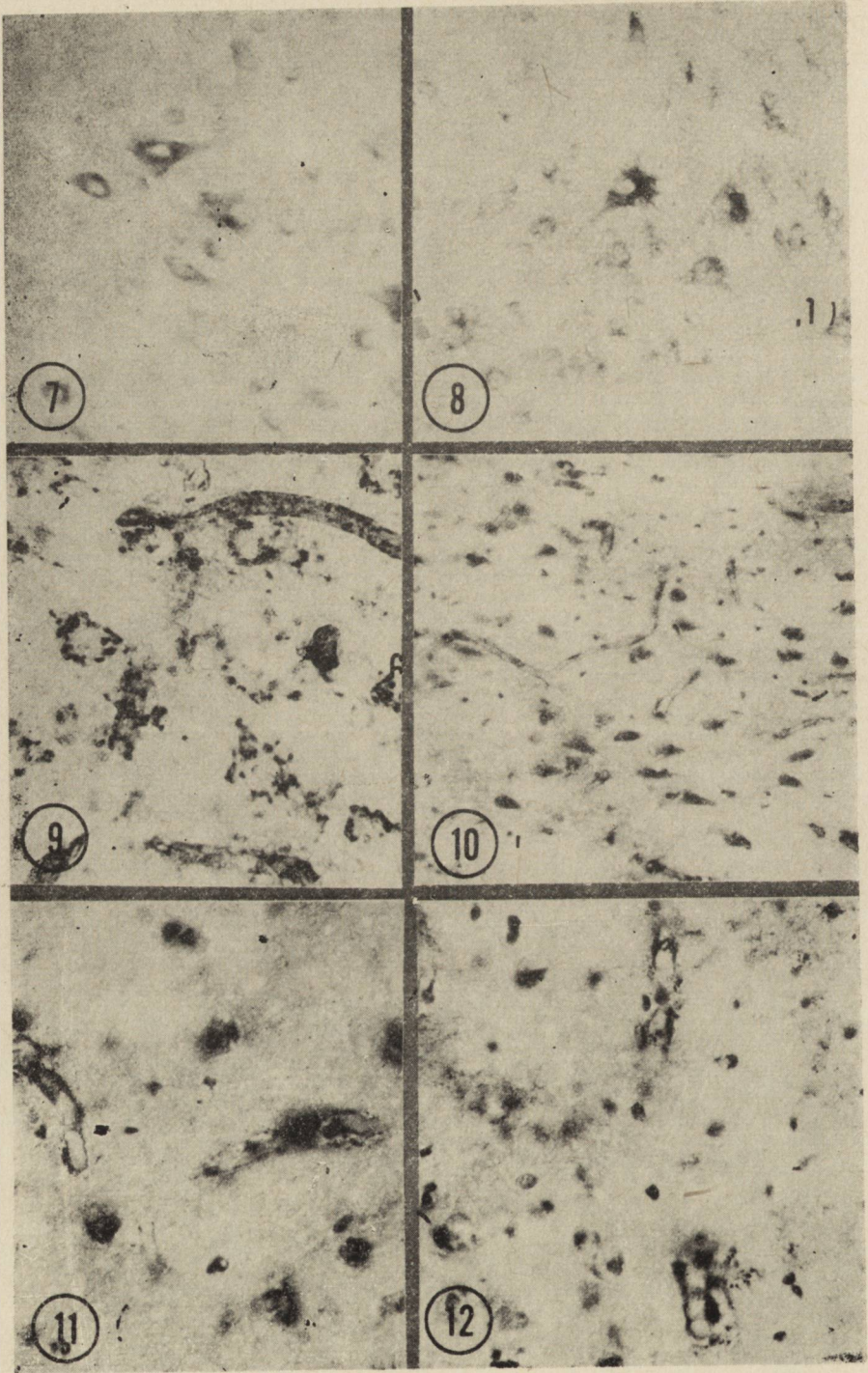
The authors suggest that the histochemical changes observed manifest on one hand the tissue reaction on developing edema and on the other the consequence of hemodynamic disturbances leading to the deterioration of blood supply to the brain.

##### PIŚMIENICTWO

1. Becker N. H.: The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in rats. II. Alternation in neuronal mitochondria identified by DPN and TPN — diaphorases. *J. Am. Path.* 1961, 38, 58, 587—597.
2. Becker N. H., Barron K. D.: The cytochemistry of anoxic-ischaemic encephalopathy in rats. I. Alternation of neuronal lysosomes identified by acid phosphatase activity. *Am. J. Path.* 1961, 38, 161—175.
3. Borowicz J., Jurkiewicz J., Czernicki Z., Gajkowska B.: Badania mikroskopowo-elektronowe mózgu kota we wczesnym obrzęku doświadczalnym. *Neuropat. Pol.* w druku.
4. Cazzullo C. L., Giordano P. L., Invernizzi G.: Histological and histochemical aspects of the early effects of roentgen irradiation on the nervous system of rabbits. *Brain Edema*, Springer-Verlag, Wien, New York 1967, 645—650.







5. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 17—43.
6. Gadamski R., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Badania nad zachowaniem się bariery krew-mózg w mózgu kotów we wczesnym obrzęku doświadczalnym. *Neuropat. Pol.* w druku.
7. Gromek A., Majewska D., Czernicki Z., Jurkiewicz J., Kunicki A.: Właściwości biochemiczne mitochondriów w warunkach doświadczalnego obrzęku mózgu u kotów. *Bull. Acad. Pol. Scien. Sec. Scien. Biol.* 1973, 10,
8. Ishii S., Haymer R., Kelley W. A., Evans J. P.: Studies of cerebral swelling. II. Experimental cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. *J. Neurosurgery*, 1959, 16, 152—166.
9. Ishii S., Tsuji H., Ozawa K., Kondo Y., Evans J. P.: Brain edema. Some clinical and experimental correlations. *Brain Edema*, Springer-Verlag, Wien, New York 1967, 32—66.
10. Kałuża J.: Experimental brain edema. Comparison of the brain wound and cryogenic necrosis. *Acta Med. Pol.* 1971, 12, 487—502.
11. Klatzo I., Piraux A., Laskowsky E. J.: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1958, 17, 548—564.
12. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 1—14.
13. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. *Proc. VIth Congress of Neuropath. Masson et Cie, Paris* 1970.
14. Kozik M.: Doświadczalny obrzęk neuronu w świetle badań histoenzymatycznych. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 1—16.
15. Mossakowski M. J., Penar B.: Some aspects of the histochemistry of the reactive glia. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 317—323.
16. Ostenda M., Nowakowski W.: Zmiany lokalizacji niektórych enzymów oksydo-redukcyjnych i pojawienie się ciał PAS-dodatnich w mózгах noworodków szczurzych po napromienieniu promieniami gamma ( $^{60}\text{Co}$ ). *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 285—294.
17. Rasmussen L. E., Klatzo I.: Protein and enzyme changes in cold injury edema. *Acta neuropath. (Berl.)* 1969, 13, 12—28.
18. Rubinstein L., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1962, 21, 116—136.
19. Szumańska G., Rap Z. M.: Rozmieszczenie glikogenu i aktywność niektórych enzymów w motoneuronach rdzenia kręgowego w zwyrodnieniu osiowym. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 111—126.
20. Torack R. H., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in blood-brain barrier. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1964, 23, 46—59.
21. Torack R. M.: The relationship between adenosinetriphosphatase activity and triethyltin toxicity in the production of cerebral edema of the rat. *Amer. J. Path.* 1965, 46, 245—251.
22. Wender M., Kozik M., Piechowski A.: Effect of chronic triethyltin intoxication on the morphological and histoenzymatic pattern of rat brain. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 323—328.

23. Wiśniewski H.: Badania nad przepuszczalnością bariery krew-mózg, krew-płyn mózgowo-rdzeniowy i płyn mózgowo-rdzeniowy-mózg dla białek w warunkach fizjologicznych oraz bariery krew-mózg dla albumin w obręku mózgu. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 1—33.
24. Wolman M., Bubis J. J.: *Histochemical study of different types of brain edema. Brain Edema.* Springer-Verlag, Wien, New York 1967, 479—488.
25. Zelman I., Szumańska G.: Zmiany histochemiczne w mózgu szczurów w encefalopatii ouabainowej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 441—453.
26. Zelman I., Szewczykowski J., Jurkiewicz J., Czernicki Z.: Patomorfologia w doświadczalnym uciskowym obręku mózgu u kota. *Neuropat. Pol.* XII, 3, 425—434.
27. Zeman W., Kalsbeck J.: *Histochemical aspects of brain edema. Brain Edema.* Springer-Verlag, Wien, New York 1967, 468—478.
28. Yonagihara T., Goldstein N., Svien H., Bahn R.: Study of experimental cerebral edema. *Trans. Am. Neurol. Ass.* 1965, 90, 136.

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

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Fosforylaza całkowita. Kot kontrolny. Silna aktywność enzymatyczna w substancji szarej zawoju hipokampa, słabsza w istocie białej podkorowej. Pow. 30×.

*Fig. 1.* Total phosphorylase. Control cat. Strong enzymatic activity in grey matter of hippocamp, less intense in subcortical white matter. ×30.

*Ryc. 2.* Fosforylaza całkowita 6 godzin po implantacji balonika. W substancji szarej odczyn negatywny, w istocie białej podkorowej odczyn silny. Pow. 100×.

*Fig. 2.* Total phosphorylase activity 6 hours after balloon implantation. Negative reaction in grey matter, and strong enzymatic activity in subcortical white matter. ×100.

*Ryc. 3.* Dehydrogenaza bursztynianowa. Kot kontrolny. Pogranicze kory mózgowej i istoty białej. Umiarkowany odczyn w neuropilu, zagęszczenie złożeń dwuformazanu w cytoplazmie komórek. Pow. 100×.

*Fig. 3.* Succinic dehydrogenase. Control cat. The border of cortex and subcortical white matter. Moderate activity in neuropile, condensation of diformazane granules in cells cytoplasm. ×100.

*Ryc. 4.* Dehydrogenaza bursztynianowa 12 godzin po implantacji balonika. Pograniczne kory mózgowej i istoty białej. Większe nagromadzenie ziarnistości dwuformazanu w neuropilu substancji białej i szarej i w komórkach. Pow. 100×.

*Fig. 4.* Succinic dehydrogenase activity 12 hours after balloon implantation. The border of grey and white matter. More intense accumulation of diformazane granules in cells and neuropile of grey and white matter. ×100.

*Ryc. 5.* Dehydrogenaza mleczanowa. Kot kontrolny. Ziarnisty dwuformazan w wypustkach oligodendrocytów w podkorowej istocie białej. Pow. 200×.

*Fig. 5.* Lactic dehydrogenase. Control cat. Granular deposits in oligodendroglial processes in subcortical white matter. × 200.

*Ryc. 6.* Dehydrogenaza mleczanowa 12 godzin po implantacji balonika. Istota biała podkorowa. Ziarniste złogi diformazanu w odczynowych astrocytach. Pow. 200×.

*Fig. 6.* Lactic dehydrogenase activity 12 hours after balloon implantation. Subcortical white matter. Granular diformazane deposits in progressive astrocytes. ×200.

*Ryc. 7.* Fosfataza kwaśna. Kot kontrolny. Umiarkowana aktywność enzymu w przyjądrowej części cytoplazmy komórek piramidowych. Pow. 200×.

*Fig. 7.* Acid phosphatase activity. Control cat. Moderate enzymatic activity in perinuclear region of pyramidal cells. ×200.

*Ryc. 8.* Fosfataza kwaśna 12 godzin po implantacji balonika. Wzmocnienie aktywności enzymatycznej w przyjądrowych częściach komórek nerwowych, pojawienie się aktywności w wypustkach. Pow. 200×.

*Fig. 8.* Acid phosphatase 12 hours after balloon implantation. Increase of enzymatic activity in perinuclear area of nerve cells, appearance of enzymatic activity in cell processes. ×200.

*Ryc. 9.* Pyrofosfataza tiaminowa 4 godziny po implantacji balonika. Przesunięcie produktów reakcji na obwód komórek. Stosunkowo silny odczyn w naczyniach. Pow. 400×.

*Fig. 9.* Thiamine pyrophosphatase 4 hours after balloon implantation. Displacement of the reaction products to cell periphery. Relatively strong reaction in blood vessels. ×400.

*Ryc. 10.* Reakcja PAS 2 godziny po implantacji balonika. Zawój hipokampa. Wrysowane ściany naczyń, reakcja w neuropilu śladowa. Pow. 200×.

*Fig. 10.* PAS-reaction 2 hours after balloon implantation. Outlined blood vessels walls, in neuropile only trace reaction. ×200.

*Ryc. 11.* Reakcja PAS 2 godziny po implantacji balonika. Przesiłekająca do podłoża z naczyń krwionośnych substancja PAS-dodatnia. Zawój hipokampa. Pow. 400×.

*Fig. 11.* PAS-reaction 2 hours after balloon implantation. PAS-positive substance from blood vessels infiltrating nerve tissue. Hippocamp. ×400.

*Ryc. 12.* Dimedon-PAS 12 godzin po implantacji balonika. Ziarnisty glikogen widoczny wokół naczyń krwionośnych oraz w neuropilu w pewnej odległości od naczyń. Zawój hipokampa. Pow. 400×.

*Fig. 12.* Dimedone-PAS 12 hours after balloon implantation. Granular glycogen deposits around blood vessels and in neuropile at some distance from blood vessels. ×400.

MIROSLAW KOZIK, EWA OŻARZEWSKA

## INKORPORACJA DL-FENYLOALANINY DO MÓZGU SZCZURA

### BADANIA AUTORADIOGRAFICZNE \*)

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM  
w Poznaniu

Kierownik: doc. dr hab. M. Kozik

Fenyloalanina jest aminokwasem występującym prawie we wszystkich białkach ustroju zwierzęcego. Dlatego też badania nad topografią i dynamiką jej wbudowywania do mózgu mogą stanowić przyczynek do bliższego poznania procesów czynnościowych w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego.

Z badań biochemicznych Mase i wsp. (1962) oraz Mokrasch'a (1962) wynika, że aminokwas ten *in vitro* wbudowuje się do białek tkanki nerwowej. Przy pomocy badań biochemicznych nie można jednak dokładnie określić różnic topograficznych w natężeniu inkorporacji fenyloalaniny. Możliwość taką stwarzają badania autoradiograficzne z użyciem fenyloalaniny znakowanej trytem ( $^3\text{H}$ ) lub węglem ( $^{14}\text{C}$ ). Z myślą o bliższym poznaniu topografii tego zjawiska podjęto niniejsze badania.

### MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, którym wstrzykiwano dootrzewnowo  $^3\text{H}$ -DL-fenyloalaninę o aktywności właściwej 41 mCi/g oraz  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaninę o aktywności właściwej 24,6 mCi/g. Zwierzęta podzielono na 5 grup doświadczalnych w zależności od dawki podanego izotopu. W poszczególnych grupach szczury otrzymywały aminokwas znakowany trytem lub węglem w dawce 1, 2, 5, 10 i 20  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała. Zwierzęta uśmiercano po 10 i 20 minutach oraz po 1, 10 i 24 godzinach od chwili dootrzewnowego wstrzyknięcia fenyloalaniny znakowanej pierwiastkami promieniotwórczymi. Do badań pobierano mózgowie, które utrwalano w alkoholu absolutnym z kwasem octowym

\*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego w grupie tematycznej 09.4.1.3.

w stosunku 95 : 5 przez 1 godz., a następnie w czystym alkoholu absolutnym przez 12 godzin. Wycinki zatapiano w parafinie, następnie cięto skrawki grubości 7  $\mu$ , które po odparafinowaniu pokrywano emulsją płynną NTB-2 bądź NTB-3 firmy Kodak i eksponowano w lodówce w temp.  $-4^{\circ}$  przez 12 dni.

Autoradiogramy wywoływano przez 5 min. w wywoływaczu  $^{19}\text{D}$ . Część autoradiogramów podbarwiano hemalaunem, część natomiast pozostawiono bez podbarwienia. Szczegółowe postępowanie techniczne oparto na zaleceniach podanych w podręczniku Rogersa (1967). W wykonanych autoradiogramach oceniano intensywność wbudowywania badanych izotopów porównując stopień zaczernienia emulsji nad badanym obiektem w materiale doświadczalnym i w skrawkach kontrolnych.

#### WYNIKI

W następstwie podania dootrzewnowego  $^3\text{H}$ -DL-feniloalaniny w ilości 1  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała zaobserwowano po upływie 1 godziny niewielką inkorporację izotopu tylko w niektórych strukturach mózgowia, a mianowicie w splocie naczyniastym, narządzie podspoidłowym, jądrach nadwzrokowym i przykomorowym oraz w rogu Amona. Stan taki utrzymuje się do 10 godzin od chwili wstrzyknięcia izotopu. Po 24 godz. ilość ziaren nad opisanymi strukturami zdecydowanie maleje. We wcześniejszych okresach po 10 i 20 minutach od chwili podania znakowanego aminokwasu nie udało się stwierdzić jego obecności w mózgu. Przy tej dawce izotopu również po upływie 1 godz. nie stwierdza się obecności ziaren zredukowanego srebra w obrębie kory mózgu i mózdzku (ryc. 1).

Feniloalanina zarówno znakowana  $^3\text{H}$  jak i  $^{14}\text{C}$  w dawce 2  $\mu\text{Ci/g}$  już po 10 min. wbudowuje się do opon miękkich, spłotów naczyniastych, gleju podwyściółkowego i warstwy ziarnistej mózdzku. Poza tym widoczne są ziarna zredukowanego srebra nad strukturami opisanymi uprzednio. Po upływie 1 godz. można wykazać obecność izotopu w neurocytach zwojów podstawy oraz w neurocytach i neuropilu kory mózgu. Zagęszczenie ziaren srebra w tych ostatnich strukturach nie jest jednak duże (ryc. 2). Zwraca uwagę brak inkorporacji w spoidle wielkim i w torebce wewnętrznej. Po 24 godz. od wstrzyknięcia znakowanej feniloalaniny zagęszczenie ziaren srebra ogólnie maleje, wyraźnie zachowane są jednak różnice pomiędzy poszczególnymi strukturami.

W grupie szczurów, które otrzymały  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-feniloalaninę w dawce 5  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała obserwuje się po 10 min. umiarkowaną inkorporację aminokwasu w niektórych tylko strukturach mózgu: w splocie naczyniastym, wyściółce komór, gleju podwyściółkowym, narządzie podspoidłowym, bocznych częściach wężomózgowia oraz w II i III warstwie kory mózdzku. Szczególnie intensywne wbudowywanie aminokwa-

su widoczne jest w szyszynce (ryc. 3). Po 20 min. wyraźnie wzrasta ilość zredukowanego srebra, zarówno pod względem gęstości ziaren jak i wyznakowanych obszarów. Największe nasilenie inkorporacji fenyloalaniny ma miejsce w okresie od 1 do 10 godz. od chwili wstrzyknięcia dootrzewnowego. W tym czasie obserwuje się obecność izotopu prawie we wszystkich strukturach mózgowia, głównie w neurocytach i w neuropilu (ryc. 4). Podobnie jak w poprzednich grupach istnieją różnice w stopniu zaczernienia poszczególnych obszarów (kora amonalna, podwzgórze, kora mózdzku). Na uwagę zasługuje w tej grupie zwierząt minimalna ilość ziaren w obrębie zmielinizowanych włókien nerwowych oraz w komórkach glejowych. Tylko w niektórych oligodendrocytach spoidła można zaobserwować niewielką inkorporację fenyloalaniny znakowanej trytem.

Istotne różnice we wbudowywaniu  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny pomiędzy istotą białą i szarą występują również w przypadku bardzo dużych dawek izotopu wynoszących 10 i 20  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała. W tych grupach doświadczalnych stwierdzono bardzo intensywną inkorporację fenyloalaniny do wszystkich prawie ugrupowań neuronalnych oraz do neuropilu, jednak w obrębie istoty białej ilość ziaren jest bardzo mała. Zwraća przy tym uwagę znaczne zagęszczenie ziaren nad komórkami jąder ruchowych nerwów czaszkowych (ryc. 5). Dopiero po wstrzyknięciu fenyloalaniny w dawce 20  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała widoczne są pasma ziarn w spoidle wielkim wyznaczające lokalizację niektórych oligodendrocytów (ryc. 6).

#### OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań zasługują na uwagę z kilku względów. Zgodnie z wcześniejszymi spostrzeżeniami własnymi (Kozik 1969a, 1971, Kozik i Ożarzewska 1972) DL-fenyloalanina znakowana  $^{14}\text{C}$  wstrzyknięta w dawce 1  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała minimalnie tylko wbudowuje się *in vivo* do ośrodkowego układu nerwowego. Natomiast w badaniach *in vitro* spostrzegano intensywną inkorporację znakowanych aminokwasów do białek mózgowych (Mase i wsp. 1962, Mokrasch 1962). Ograniczona inkorporacja *in vivo* być może związana jest z obecnością bariery naczyniowo-mózgowej, która w prawidłowych warunkach ogranicza przenikanie aminokwasów do tkanki nerwowej. Pogląd taki wyraża szereg autorów (Klatzo i wsp. 1962, Olszewski 1963, Cramer 1970). Jest również prawdopodobne, że małe ilości znakowanej fenyloalaniny wbudowują się przede wszystkim do wątroby i innych narządów charakteryzujących się intensywną przemianą białkową, w wyniku czego nie dochodzi do wyraźniejszej inkorporacji  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny do mózgu. Wyższe dawki badanego izotopu, począwszy od 2  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała wy-

kazują znamiennej inkorporację do określonych struktur układu nerwowego, przede wszystkim do neurocytów kory amonalnej, jądra wielkomórkowego podwzgórza, szyszynki, narządu podspoidłowego i spłotu naczyniastego. W innych strukturach mózgu inkorporacja badanego aminokwasu jest wyraźnie niższa i dotyczy głównie neurocytów i neuropilu.

Dynamika wbudowywania  $^{14}\text{C}$ -DL-fenylalaniny do mózgu cechuje się stopniowym nasilaniem procesu w ciągu pierwszej godziny od chwili dotrzewnowego wprowadzenia aminokwasu. Następnie obserwuje się jednakowe zagęszczenie ziaren zredukowanego srebra trwające do 10 godzin, później występuje powolny ubytek wbudowanego izotopu.

Zdaniem wielu autorów procesy czynnościowe w komórce nerwowej związane są z intensywną przemianą białkową (Altmann, Schuboth 1942, Netter 1949, Einarson, Krogh 1955, Dunn 1971). Wyrazem morfologicznym nasilonej przemiany białkowej ma być ubytek substancji Nissla spostrzegany w neuronie bezpośrednio po okresie pobudzenia ruchowego (Einarson, Krogh 1955, Dunn 1971). Pogląd taki w świetle przeprowadzonych przez nas badań autoradiograficznych wydaje się budzić wątpliwości. Nie obserwujemy bowiem tak szybkiego wbudowywania aminokwasu znakowanego izotopem promieniotwórczym, a zwłaszcza jego ubytku w neuronie, jakby należało się spodziewać sądząc z obrazów morfologicznych spotykanych podczas barwienia preparatów metodą Einarsona. Być może zmiany czynnościowe spostrzegane w neuronie (Altmann, Schuboth 1942, Einarson, Krogh 1955, Dunn 1971) związane są z przekształceniem strukturalnym rybonukleoproteidów lub z innymi procesami fizykochemicznymi a nie z gwałtownym katabolizmem białek.

Na podkreślenie zasługuje także zjawisko niejednakowej inkorporacji  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-fenylalaniny do poszczególnych formacji strukturalnych mózgu. Wyraźne różnice szybkości i intensywności wbudowywania znakowanej fenylalaniny w poszczególnych obszarach topograficznych mózgu można wyjaśnić powszechnie znanymi właściwościami fizykochemicznymi, odmiennymi w poszczególnych zespołach neuronalnych (Dixon 1954, Kozik 1969b, Wender, Kozik 1970).

Do szczególnie interesujących i nie wyjaśnionych spostrzeżeń należy wbudowywanie znakowanej fenylalaniny przede wszystkim do neurocytów i neuropilu. Dopiero duże dawki izotopu wynoszące  $20 \mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała pozwalają na autoradiograficzne wykazanie jego obecności w oligodendrocytach. Spostrzeżenie to trudno wytłumaczyć powszechnie przyjmowanym poglądem o odżywianiu neurocytów za pośrednictwem astrogleju protoplazmatycznego. Wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska wykracza poza ramy niniejszych badań, niemniej jednak wydaje się nam celowe zasygnalizowanie tego spostrzeżenia.



## WNIOSKI

1.  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalanina wbudowuje się przede wszystkim do ciała neuronu i dendrytów. Inkorporacja tego aminokwasu w wypustkach aksonalnych i w osłonkach mielinowych jest minimalna.

2. Komórki glijowe wykazują niewielką zdolność wbudowywania  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaniny. Takie zjawisko można zaobserwować w części oligodendrocytów po podaniu bardzo dużej dawki izotopu, wynoszącej 20  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała.

3. Dynamika inkorporacji badanego aminokwasu wskazuje na stopniowy wzrost wbudowywania  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaniny w ciągu pierwszej godziny od chwili podania dostrzewnowego. Maksymalne zaczerpienie emulsji utrzymuje się w czasie 1—10 godz. po wstrzyknięciu izotopu, potem stopniowo maleje w ciągu 24 godzin, ale nie znika całkowicie.

4. Zastosowanie badanego izotopu w dawce do 2  $\mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała większej powoduje rozległe wbudowywanie DL-fenyloalaniny do ośrodkowego układu nerwowego przy zachowaniu wyraźnych różnic topograficznych.

5. Do struktur przejawiających intensywną inkorporację  $^3\text{H}$ - i  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaniny należy zaliczyć komórki piramidowe i opaskę zębatą rogu Amona, narząd podspoidłowy, szyszynkę, jądro nadwzrokowe i przykomorowe, części boczne węchomózgowia oraz II i III warstwę kory mózgu.

М. Козик, Е. Ожажевска

## ВКЛЮЧЕНИЕ ФЕНИЛАЛАНИНА В МОЗГ КРЫСЫ

Авторадиографические исследования

## Резюме

Проведены авторадиографические исследования с использованием меченого  $^3\text{H}$ - и  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина для определения динамики включения этой аминокислоты в различные структуры центральной нервной системы. Исследования проведены на крысах линии Вистар, которым внутрибрюшинно вводился изотоп в дозах 1, 2, 5, 10 и 20  $\mu\text{Ci}^{10}/\text{г}$  веса тела и далее животных убивали в различное время от момента инъекции.

Установлено, что  $^3\text{H}$ - и  $^{14}\text{C}$ -DL-фенилаланин включается прежде всего в тело нейронов и дендриты. Включение этой аминокислоты в аксоновые отростки и миелиновые оболочки было минимальное. В течение первого часа после инъекции меченого фенилаланина наблюдается постепенное увеличение включения этой аминокислоты. Максимальное почернение эмульсии наступает в период от 1 до 10 часов после инъекции изотопа, затем постепенно уменьшается в течение 24 часов, но не исчезает полностью. К областям, проявляющим интенсивное включение  $^3\text{H}$ - и  $^{14}\text{C}$ -DL-фенилаланина, следует отнести пирами-

дальние клетки и зубчатую извилину аммониева рога, субкомиссуральный орган, эпифиз, супраоптическое и паравентрикулярное ядро, боковые части обонятельного мозга и II и III слои коры мозжечка.

M. Kozik, E. Ożarzewska

## PHENYLALANINE INCORPORATION INTO RAT BRAIN

### Autoradiographic studies

#### Summary

Autoradiographic studies were performed with the aim to determine the dynamics of incorporation of  $^3\text{H}$ - and  $^{14}\text{C}$ -labelled DL-phenylalanine into various structures of the central nervous system. The rats of Wistar strain were injected intraperitoneally with radioactive phenylalanine in doses of 1, 2, 5, 10 and 20  $\mu\text{Ci/g}$  body weight and thereafter they were decapitated at various time intervals. Both the  $^3\text{H}$ - and  $^{14}\text{C}$ -labelled phenylalanine were found to be incorporated mostly into dendrites and neuronal perikarya. The incorporation into axonal processes and myelin sheaths was very low. During the first hour after injections, a gradual increase of the incorporation was noticed. The maximal intensity of black patches appeared between 1st—10th hour after injection, whereafter it was observed to decrease gradually during the next 24 hrs. The areas of high phenylalanine incorporation included pyramidal cells and *fascia dentata* of Ammons horn, subcommissural structure, epiphysis, supraoptic and periventricular nuclei, lateral parts of rhinencephalon and the IIrd and IIIrd cortical layer of the cerebellum.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Altmann H. W., Schubote H.: Funktionelle und organische Schädigungen des Zentralnervensystems der Katze im Unterdruck-experiment. Beitr. path. Anat. 1942, 107, 3—10.
2. Cramer H.: Zur Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Phenylalanin i Proteine der Circumventricularen Organe bei Katzen und Meerschweinechen. Autoradiographische Untersuchung. Exp. Brain Res. 1970, 11, 343—355.
3. Dixon K. C.: Cytochemistry of cerebral grey matter. Quart. J. Exp. Physiol. 1954, 39, 131—151.
4. Dunn A. J.: The effect of electroconvulsive Shock on the synthesis of protein and RNA in mouse brain. Third Intern. Meeting of the Intern. Soc. for Neurochemistry, Budapest 1971, Akademiai Kiadó, Abstracts, str. 47.
5. Einarson L., Krogh E.: Variations in basophilia of nerve cells associated with increased cell activity and functional stress. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 1962, 18, 1—12.
6. Klatzo I., Miquel J., Otenasek R.: The application of fluorescein labelled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. Acta Neuropath. 1962, 2, 144—160.
7. Kozik M.: Histochemistry of Purkinje cells in experimental homogenisation necrosis. Pathol. Europ. 1969a, 4, 122—137.
8. Kozik M.: The effect of large dose of ionizing radiation on dehydrogenase activity in the brain. Folia Histochem. Cytochem. 1969 b, 7, 163—178.

9. Kozik M.: Degenerative changes of neurocytes in the light of autoradiographic investigations. *Path. Europ.* 1971, 6, 137—
10. Kozik M., Ożarowska E.: Dynamika inkorporacji fenyloalaniny  $^3\text{H}$  do ośrodkowego układu nerwowego. II Konferencja Neuropatologiczna, W-wa, marzec 1972, Streszczenia doniesień i referatów, str. 78.
11. Mase K., Takahashi Y., Ogata K.: The incorporation of ( $\text{C}^{14}$ ) glycine into the protein of guinea pig brain cortex selices, *J. Neurochem.* 1962, 9, 282—288.
12. Mokrasch C. L.: Incorporation of ( $\text{C}^{14}$ )-precursors into rat brain proteolipids in vitro. *Acta Neurol. Scand.* 1962, Suppl. 1, V. 38, 15.
13. Netter H.: Die Feinstruktur der Zelle als dynamisches Phänomen. *Verh. Dtsch. Ges Path.* 1949 (33 Tags). 8—18.
14. Olszewski J.: Autoradiography of the area postrema and hypothalamus after intravenous injection of iodinated radioactive proteins. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 22, 340—341.
15. Rogers A. W.: *Techniques autoradiography.* Elsevier, Amsterdam — London — New York 1967.
16. Wender M., Kozik M.: Studies of the histoenzymatic architecture of the Ammons horn region in developing rabbit brain. *Acta anatom.*, 1970, 75, 248—262.

Adres autorów: Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM. 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Autoradiogram kory mózdzku, 1 godz. po wstrzyknięciu fenyloalaniny w dawce  $1 \mu\text{Ci/g}$  ciężaru ciała. Brak inkorporacji. Preparat podbarwiony hematoxyliną. Pow.  $250\times$ .

*Fig. 1.* Cerebellar cortex, 1 hr after phenylalanine injection ( $1 \mu\text{Ci/g}$  body weight). Lack of incorporation. Hematoxylin staining.  $\times 250$ .

*Ryc. 2.* Kora mózgu, 1 godz. po wstrzyknięciu  $^3\text{H}$ -DL-fenyloalaniny w dawce  $2 \mu\text{Ci/g}$  wagi ciała. Zagęszczenie ziaren srebra nad neurocytami. Widoczna również inkorporacja w neuropilu. Autoradiogram nie barwiony. Pow.  $280\times$ .

*Fig. 2.* Cerebral cortex, 1 hr after  $^3\text{H}$ -DL-phenylalanine injection ( $2 \mu\text{Ci/g}$  body weight). Condensation of silver granules above neurocytes. Incorporation into neuropile. No staining.  $\times 280$ .

*Ryc. 3.* Szyszynka. Bardzo intensywne wbudowywanie  $^3\text{H}$ -fenyloalaniny po 10 min. od chwili wstrzyknięcia dootrzewnowego w dawce  $5 \mu\text{Ci/g}$ . Autoradiogram nie barwiony. Pow.  $50\times$ .

*Fig. 3.* Epiphysis. Very intensive  $^3\text{H}$ -phenylalanine incorporation 10 min. after intraperitoneal injection ( $5 \mu\text{Ci/g}$ ). No staining.  $\times 50$ .

*Ryc. 4.* Kora amonalna, 10 godz. po wstrzyknięciu  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaniny w dawce  $5 \mu\text{Ci/g}$ . Wyraźna inkorporacja w neurocytach pola  $h_3$  i w komórkach opaski zębatej. Autoradiogram nie barwiony. Pow.  $100\times$ .

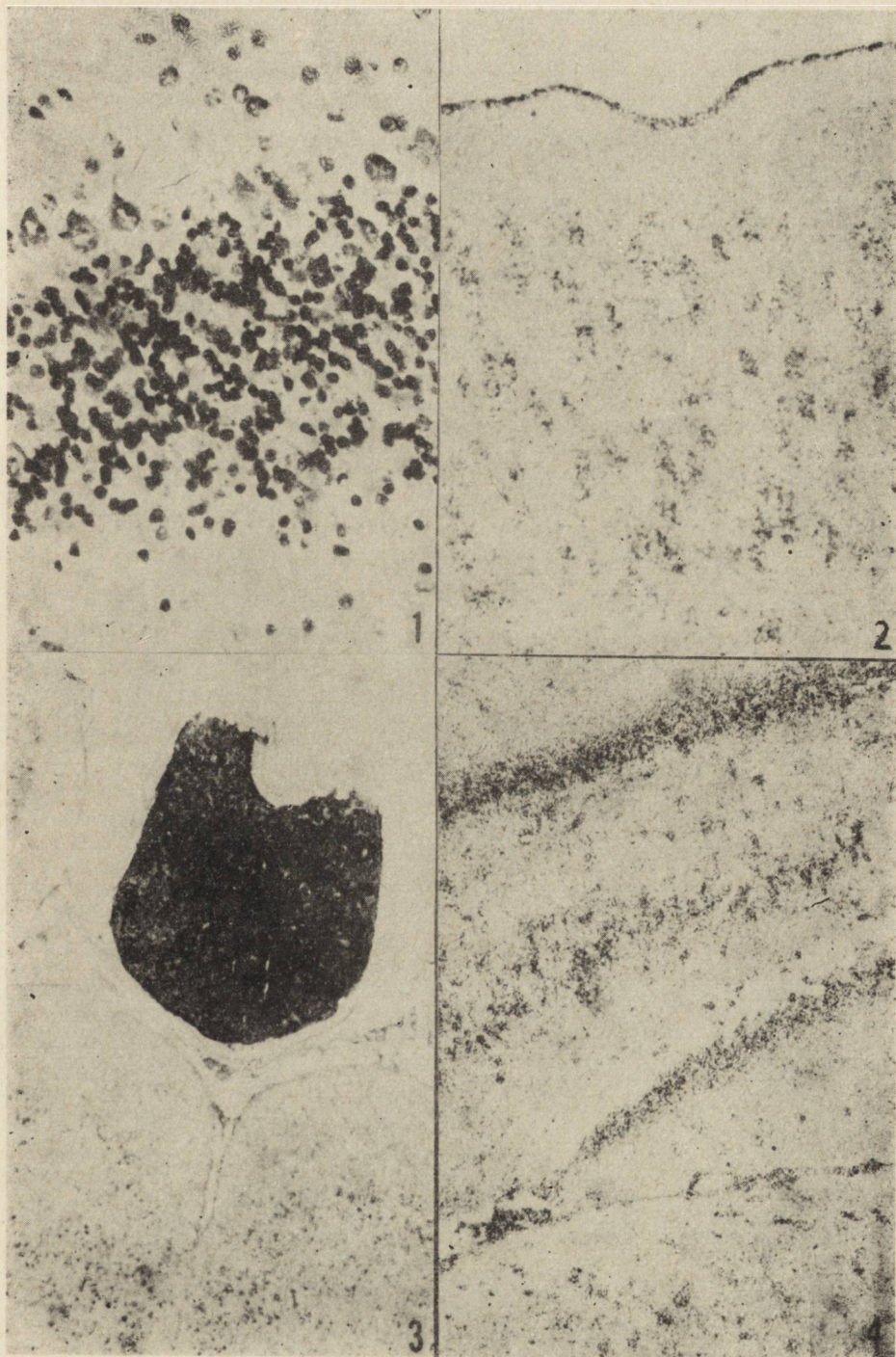
*Fig. 4.* Ammonal cortex, 10 hrs after  $^{14}\text{C}$ -DL-phenylalanine injection ( $5 \mu\text{Ci/g}$ ). Incorporation visible in neurocytes of the  $h_3$  region and in nerve cells of *fascia dentata*. No staining.  $\times 100$ .

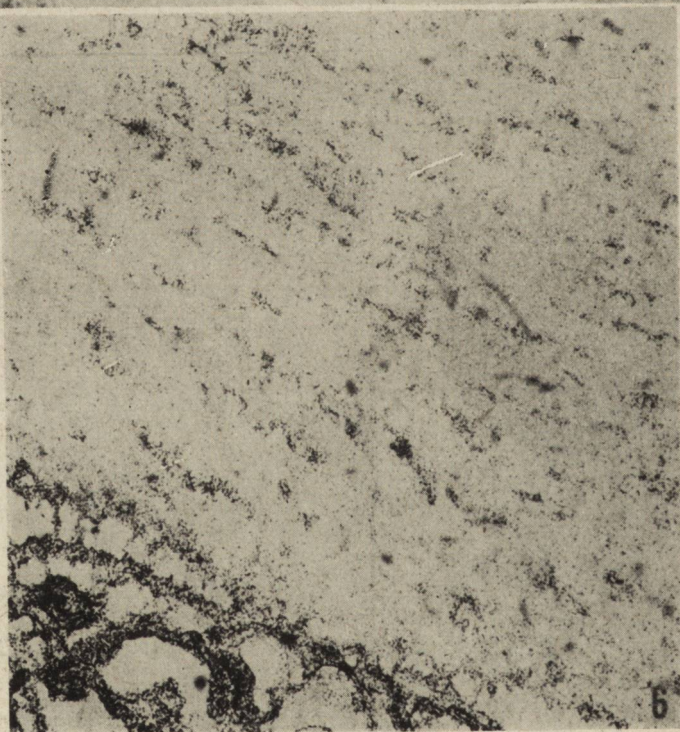
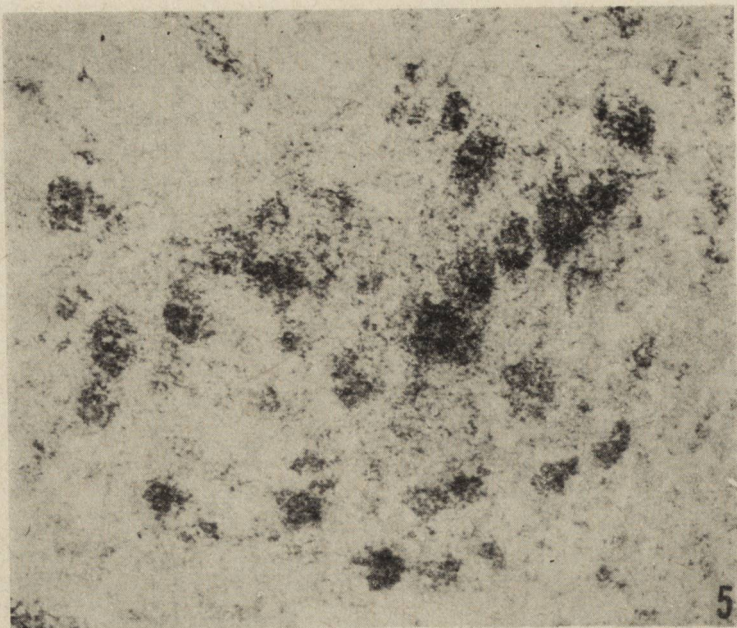
*Ryc. 5.* Jądro nerwu twarzewego. Znaczne zagęszczenie ziaren nad neurocytami oraz wyraźna inkorporacja w neuropilu. 20 min. po podaniu izotopu w dawce  $10 \mu\text{Ci/g}$ . Autoradiogram nie barwiony. Pow.  $300\times$ .

*Fig. 5.* Facial nerve nucleus. Marked condensation of silver granules above neurocytes and significant incorporation in neuropile. 20 min. after isotope administration. (10  $\mu$ Ci/g). No staining.  $\times 300$ .

*Ryc. 6.* Spoidło wielkie i splot naczyniasty, 1 godz. po wstrzyknięciu  $^{14}\text{C}$ -DL-fenyloalaniny w dawce 20  $\mu$ Ci/g. Wyrażna inkorporacja w oligodendrocytach oraz intensywne nagromadzenie ziaren srebra nad splotami naczyniastymi. Autoradiogram nie barwiony. Pow. 220 $\times$ .

*Fig. 6.* *Corpus callosum* and *plexus choroideus*, 1 hr after  $^{14}\text{C}$ -phenylalanine injection (20  $\mu$ Ci/g). Significant incorporation in oligodendrocytes and intensive accumulation of silver granules above *plexus choroideus*. No staining.  $\times 220$ .





HALINA WEINRAUDER, MIECZYSLAW ŚMIAŁEK

OCENA IMMUNOLOGICZNA WZBOGACONYCH FRAKCJI  
KOMÓRKOWYCH Z MÓZGU SZCZURA \*)

(DONIESIENIE WSTĘPNE)

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

W ostatnich latach wyizolowano szereg antygenów swoistych dla ośrodkowego układu nerwowego, których funkcje i lokalizacja nie zostały dotąd jednoznacznie wyjaśnione. Próby zlokalizowania swoistych dla mózgu antygenów przeprowadzano między innymi na frakcjach komórkowych uzyskiwanych drogą wirowania (Packman i wsp. 1971).

Celem pracy było określenie składu antygenowego wzbogaconych frakcji komórkowych mózgu szczura (mielina, glej, neurony) przy użyciu surowic odpornościowych przeciwko pełnym homogenatom mózgu zmielinizowanego i niezmielinizowanego.

MATERIAŁ I METODY

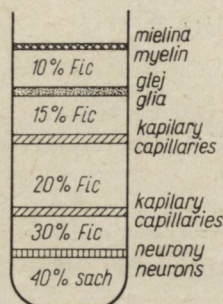
Otrzymywanie frakcji komórkowych: przy stosowaniu metody Blöstrand i Hambergera (1969) z modyfikacjami. Do pojedynczego badania używano mózgi 4 dorosłych szczurów poddane uprzednio perfuzji roztworem Ringera. Półkule mózgowie cięto na skrawki, a następnie homogenizowano przez 15-krotne przeciskanie w strzykawce plastikowej z siatką nylonową z oczkami o wymiarach 1000  $\mu$ . Następnie homogenat zawieszony w 2% roztworze Ficollu w 0,32 M sacharozie w 0,01 M buforze Tris-HCl pH 7,4, poddawano 4-krotnemu sitowaniu używając kolejno siatek nylonowych o wymiarach oczek około 1000  $\mu$ , 300  $\mu$  i 100  $\mu$  (siatka podwójna) i 50  $\mu$  (siatka podwójna). Otrzymaną zawiesinę wirowano przez 5 min. przy 150 g w temperaturze około 0°C. Osad zawieszano w 20% Ficollu i nakładano nieciągły gradient sacharozy i Ficollu. W próbówce o pojemności 35 ml na dno wlewano 5 ml 40% sacharozy, następnie 5 ml

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

30% Ficollu. Na tę warstwę nanoszono przygotowaną zawiesinę tkanki mózgowej w objętości 12 ml, a następnie 5 ml 15% i 5 ml 10% Ficollu. Wirowano w ultrawirówce VAG 601 (Janetzki) przy 56 000 g przez 2 godz. w temperaturze 0°C.

Frację wzbogaconą w neurony otrzymywano między 40% sacharozą i 30% Ficollem, frakcję glejową na pograniczu 15% i 10% Ficollu oraz mielinę na powierzchni. Sposób rozdziału przedstawia schemat 1.

*diag*



Schemat 1. Rozdział frakcji komórkowych po wirowaniu.

Diagram 1. Separation of cellular fractions after centrifugation.

Uzyskane frakcje oczyszczano przez zawieszenie w 0,32 M roztworze sacharozы i wirowanie przy 10 000 g przez 20 min. w temperaturze 0°C.

Do badań mikroskopowych używano frakcji nie oczyszczonych. Poszczególne frakcje sączone przez sączek Millipore po uprzednim utrwaleniu w 50% etanolu i barwiono: frakcję neuronalną i glejową fioletem krezyłu, a frakcję mielinową metodą Heidenhaina.

Badania immunochemiczne frakcji wykonano stosując test immunodifuzji wg Ouchterlony'ego w 1% agarze Noble (Difco) w buforze fosforanowym o pH 7,2 z dodatkiem EDTA. Frakcje uzyskane z wirowania zawieszano w buforze fosforanowym i homogenizowano w homogenizatorze szklanym.

Reakcje przeprowadzono przy użyciu surowic odpornościowych przeciwko pełnym homogenatom mózgu szczura 3-miesięcznego, 5-dniowego i 1-dniowego, absorbowanych surowicą normalną szczura. Oprócz frakcji komórkowych używano jako antygenów homogenaty mózgu szczura dorosłego, 5-dniowego i 1-dniowego oraz homogenaty wątroby i nerki szczura dorosłego.

Sposób otrzymywania surowic odpornościowych, absorpcji i przeprowadzenia odczynu opisano poprzednio (Weinrauder 1969).

#### WYNIKI

Obraz morfologiczny frakcji. Frakcja wzbogacona w neurony zawierała nieliczne komórki nerwowe z zachowanymi wypustkami osiowymi

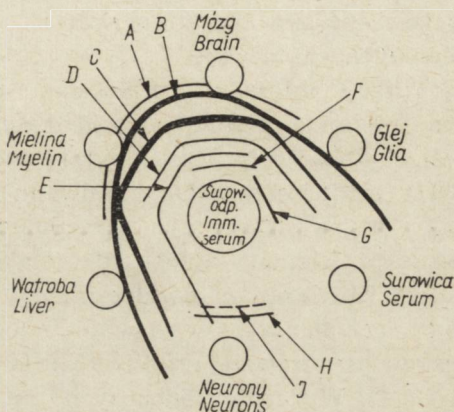


i dendrytami oraz znaczną liczbę komórek pozbawionych wypustek. Stwierdzano ponadto pojedyncze jądra komórkowe pozbawione cytoplazmy oraz zanieczyszczenia naczyniami włosowatymi. Poza tym obserwowano zanieczyszczenia fragmentami uszkodzonych komórek trudnych do zidentyfikowania oraz niewielką liczbą komórek glejowych (ryc. 1).

Frakcja wzbogacona w glej zawierała zarówno komórki astro-oligo- jak i mikrogleju oraz nieliczne zanieczyszczenia naczyniami włosowatymi, znacznie mniejsze niż we frakcji neuronalnej (ryc. 2).

*Schemat 2.* Linie precypitacyjne uzyskiwane przy użyciu materiału pochodzącego z czterech wirowań.

*Diagram 2.* Scheme of precipitation lines obtained with the material obtained from four centrifugations.



Frakcja mielinowa wykazywała nieznaczne zanieczyszczenie elementami glejowymi (ryc. 3).

Wyniki odczynu immunodyfuzji. Do odczynu użyto oddzielnie materiału pochodzący z czterech wirowań. Najmniejsze wahania wykazywała frakcja „mielinowa”, która w reakcji z surowicą przeciwko mózgowi dorosłego szczura dawała zawsze 5 lub 6 pasm precypitacyjnych. Frakcja „glejowa” reagowała także dodatnio we wszystkich przypadkach, wykazując obecność od 2 do 4 antygenów. Jednakże intensywność i położenie pasm zmieniało się nieco w zależności od wirowania. Z frakcją wzbogaconą w neurony uzyskano dodatni wynik tylko z materiałem pochodzącym z jednego wirowania. Była to pojedyncza linia, słabsza niż linie przy pozostałych antygenach, ale widoczna wyraźnie także po barwieniu. Niekiedy występowała druga linia precypitacyjna widoczna tylko na świeżych, nie wysuszonych i nie barwionych płytkach.

Typowy obraz reakcji immunodyfuzji przedstawia rycina 4 i schemat 2. Na schemacie tym dla uproszczenia przedstawiono zbiorczy obraz linii precypitacyjnych wynikający z porównania kilku płytek, na których użyto antygeny z frakcji pochodzących z różnych wirowań. Dla ułatwienia opisu linie precypitacyjne oznaczono kolejnymi literami poczynając od linii leżącej najbliżej zbiornika zawierającego frakcję mielinową.

Fracja mielinowa. We frakcji mielinowej znajdowały się dwa główne antygeny wspólne dla mózgu i wątroby. Występowały one zawsze w reakcji z mieliną, mózgiem i wątrobą i zostały oznaczone literami B i C. Antygen A — dość słaby — występował tylko w reakcji z mieliną i mózgiem. Trzecim antygenem wspólnym był antygen oznaczony literą E. Na niektórych płytkach obserwowano dodatkowe znacznie słabsze linie precypitacyjne występujące tylko w reakcji z mieliną, ale ich dokładna identyfikacja w przypadku tak dużej liczby pasm nie jest możliwa. Pasma D nie występowało w reakcji z antygenem wątrobowym, natomiast antygen ten znajdował się we frakcji mielinowej, glejowej i w homogenacie mózgu.

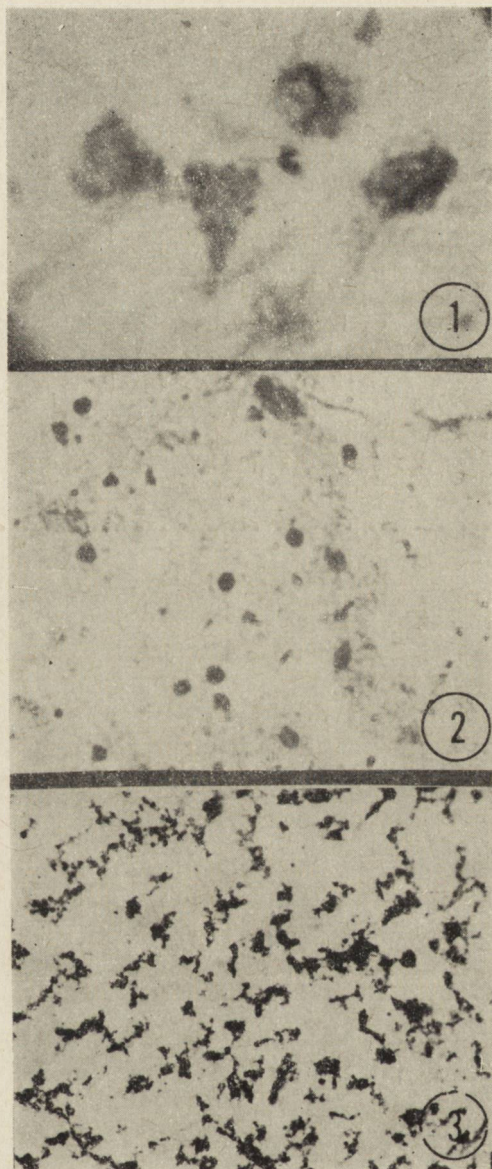
Frację mielinową przebadano także przy użyciu surowic przeciwko niezmielinizowanym mózgom 1-dniowego noworodka i szczura 5-dniowego. Reakcje te przedstawiają ryciny 5 i 6. W obu surowicach znajdowały się przeciwciała skierowane przeciwko jednemu antygenowi mieliny — jak się wydaje — wspólnemu z wątrobą. Pasma odpowiadające temu antygenowi było bardzo słabe i widoczne tylko na świeżych płytkach. Dla lepszego uwidocznienia różnic antygenowych frakcji mielinowej zachodzących w rozwoju przedstawiono reakcję tych samych antygenów z surowicą przeciwko homogenatowi mózgu dorosłego szczura (ryc. 7). Wyraźnie widocznych jest kilka pasm w reakcji z frakcją mielinową.

Fracja glejowa. We frakcji tej przy pomocy surowicy przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu wykryto 4 antygeny. Dwa z nich — pasma B i C — stanowiły omówione już antygeny wspólne z wątrobą występujące także we frakcji mielinowej. Pasma D odpowiada, jak można sądzić, antygenowi swoistemu dla mózgu, ponieważ nie występuje w reakcji z wątrobą, a jest widoczne w reakcji z homogenatem mózgu dorosłego szczura, frakcją glejową i mielinową. Ponadto w niektórych reakcjach pojawiała się pasma G, które nie miało swego odpowiednika we frakcji mielinowej i homogenacie mózgu. Pasma to było bardzo słabo widoczne.

Fracja neuronalna. Otrzymana przez nas frakcja neuronalna reagowała najslabiej. Przy zbiorniku zawierającym tę frakcję pojawiała się jedno pasmo (oznaczone literą H), dość słabe, krzyżujące się, bądź tworzące ostrogę z pasmem jednego z antygenów wątroby. Ponadto na świeżych płytkach widoczne było drugie pasmo, słabsze i nie tak ostre, które oznaczono na schemacie 2 literą I.

#### OMÓWIENIE

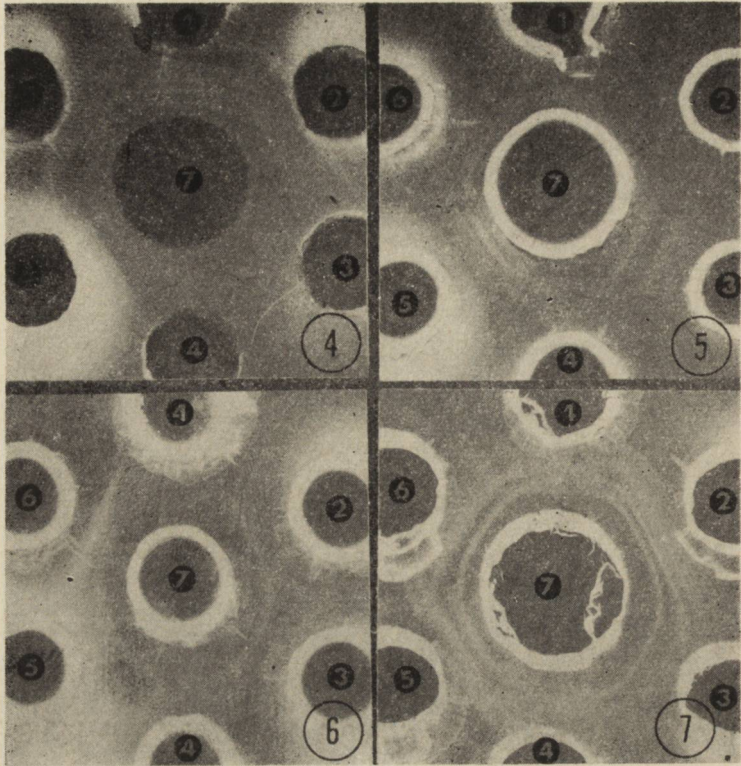
Stosując do odczynu immunodyfuzji z surowicą przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu frakcje uzyskane na drodze wirowania w niecią-



*Ryc. 1.* Wzbogacona frakcja neuronalna. Fiolet krezyłu. Pow. 1 200×.  
*Fig. 1.* Neuron enriched fraction. Cresyl violet. ×1 200.

*Ryc. 2.* Wzbogacona frakcja glejowa. Fiolet krezyłu. Pow. 400×.  
*Fig. 2.* Glia enriched fraction. Cresyl violet. ×400.

*Ryc. 3.* Frakcja mielinowa. Met. Heidenhaina. Pow. 400×.  
*Fig. 3.* Myelin fraction. Heidenhain meth. ×400.



*Ryc. 4.* Reakcja z surowicą przeciwko pełnemu homogenatowi mózgu dorosłego szczura. 1 — Mózg dorosłego szczura, 2 — frakcja glejowa, 3 — normalna surowica szczura, 4 — frakcja neuronalna, 5 — wątroba, 6 — frakcja mielinowa. W zbiorniku środkowym znajduje się surowica odpornościowa.

*Fig. 4.* Reaction with antiserum against complete adult rat brain homogenate. 1 — Adult rat brain, 2 — glial fraction, 3 — normal rat serum, 4 — neuronal fraction, 5 — liver, 6 — myelin fraction. In the central well immune serum.

*Ryc. 5.* Reakcja z surowicą przeciwko mózgowi 1-dniowego noworodka szczurzego. 1 — Frakcja mielinowa, 2 — normalna surowica szczura, 3 — mózg noworodka szczurzego, 4 — frakcja mielinowa, 5 — wątroba, 6 — mózg dorosłego szczura. W zbiorniku środkowym znajduje się surowica odpornościowa.

*Fig. 5.* Reaction with antiserum against the brain of 1-day newborn rat. 1 — Myelin fraction, 2 — normal rat serum, 3 — newborn rat brain, 4 — myelin fraction, 5 — liver, 6 — adult rat brain. In the central well immune serum.

*Ryc. 6.* Reakcja z surowicą przeciwko mózgowi szczura 5-dniowego, absorbowaną surowicą normalną. 1 — Frakcja mielinowa, 2 — mózg szczura dorosłego, 3 — mózg szczura 5-dniowego, 4 — frakcja mielinowa, 5 — wątroba, 6 — mózg szczura 1-dniowego. W zbiorniku środkowym znajduje się surowica odpornościowa dwukrotnie zagęszczona.

*Fig. 6.* Reaction with antiserum against 5-days rat brain after absorption with normal serum. 1 — Myelin fraction, 2 — Adult rat brain, 3 — 5-days rat brain, 4 — myelin fraction, 5 — liver, 6 — 1-day rat brain. In the central well two times concentrated immune serum.

*Ryc. 7.* Reakcja z surowicą przeciwko mózgowi szczura dorosłego. 1 — Frakcja mielinowa, 2 — mózg szczura dorosłego, 3 — mózg szczura 5-dniowego, 4 — frakcja mielinowa, 5 — wątroba, 6 — mózg szczura 1-dniowego. W zbiorniku środkowym znajduje się surowica odpornościowa.

*Fig. 7.* Reaction with antiserum against adult rat brain. 1 — Myelin fraction, 2 — adult rat brain, 3 — 5-days rat brain, 4 — myelin fraction, 5 — liver, 6 — 1-day rat brain. In the central well immune serum.

głym gradiencie Ficollu otrzymuje się wyraźne obrazy linii precipitacyjnych oraz pewne wzbogacenie ilości pasm w porównaniu z homogenatem całego mózgu. Najwyraźniejsza jest reakcja frakcji mielinowej, w której stwierdza się obecność przynajmniej trzech antygenów wspólnych z wątrobą, jednego antygenu stwierdzanego także we frakcji glejowej oraz jednego występującego tylko w reakcji z mieliną. Frakcja glejowa wykazuje obecność dwóch antygenów wspólnych z wątrobą, jednego wspólnego z mieliną i prawdopodobnie jednego występującego tylko w tej frakcji. Frakcja neuronalna zawiera jeden lub dwa antygeny, prawdopodobnie swoiste lub wykazujące częściową identyczność z antygenem wspólnym występującym w wątrobie, mózgu i frakcji mielinowej.

Przy ocenie lokalizacji komórkowej antygenów podstawowe znaczenie ma czystość otrzymywanych frakcji. W naszym materiale stwierdzono niewielkie zanieczyszczenie mieliny elementami glejowymi, nieznaczne zanieczyszczenie frakcji glejowej kapilarami i znacznie większe zanieczyszczenie kapilarami frakcji neuronalnej. W tej ostatniej stwierdzono także zanieczyszczenie elementami uszkodzonych komórek niemożliwych do zidentyfikowania.

Blömstrand i Hamberger (1969) stosując tę samą metodę wirowania stwierdzali zanieczyszczenie mieliny materiałem pochodzącym z wypustek osiowych i komórkami glejowymi. Nie spostrzegali natomiast zanieczyszczenia frakcji glejowej (lub bardzo niewielkie) neuronami, jakkolwiek nie wykluczają, że niezidentyfikowane zanieczyszczenia tej frakcji mogą pochodzić z neuronów. Frakcja neuronalna była zanieczyszczona nielicznymi kapilarami, komórkami glejowymi i wolnymi jądrami neuronów. Rose (1967) stwierdził 11% zanieczyszczeń glejowych we frakcji neuronalnej. W pracy opublikowanej w roku 1969 Rose i Sinha zidentyfikowali 64% komórek we frakcji neuronalnej jako neurony i 64% komórek glejowych we frakcji neuropilu. Warecka (1972) stosując do wirowania metodę Rose i oznaczając ilościowo zanieczyszczenia frakcji stwierdziła, że neuropil zawiera głównie komórki glejowe, a zanieczyszczenia są bardzo niewielkie. Yanagihara i Hamberger (1971) nie oceniając ilościowo czystości frakcji przyjęli dane liczbowe zawarte w pracy Nortona i Poduslo (1970) — niższą niż 90% czystość frakcji neuronalnej i wyższą niż 50% dla frakcji glejowej. Autorzy ci stwierdzali zanieczyszczenia frakcji neuronalnej kapilarami i jądrami pozbawionymi cytoplazmy, natomiast frakcji glejowej mieliną, zakończeniami nerwowymi i materiałem nie zidentyfikowanym.

W świetle przytoczonych danych wydaje się, że stosując metodę wirowania w nieciągłym gradiencie Ficollu można otrzymać frakcje komórkowe w niewielkim stopniu zanieczyszczone.

W otrzymanej przez nas frakcji mielinowej stwierdziliśmy obecność przynajmniej trzech antygenów wspólnych z wątrobą. Dwa z nich stwierdzaliśmy także we frakcji glejowej. We frakcji neuronalnej, jeśli występują antygeny wspólne, wykazują one tylko częściową identyczność z antygenami wątroby. Nie możemy aktualnie wypowiedzieć się ostatecznie czy obecność niektórych z tych antygenów w mielinie jest spowodowana niskim stopniem czystości frakcji, czy też wspólnotą antygenową. Wydaje się jednak, że stwierdzone zanieczyszczenia są zbyt małe, aby dać tak wyraźną — wyraźniejszą niż w przypadku frakcji glejowej — reakcję.

Występowanie w mielinie antygenów wspólnych z innymi narządami stwierdzili Gregson i wsp. (1971) — surowica przeciwko oczyszczonej mielinie zawierała przeciwciała reagujące z nerką, wątrobą i śledzioną. Mc Millan i wsp. (1971) stwierdzili występowanie w mielinie antygenów wspólnych z synaptosomami i mitochondriami mózgu i wątroby. Surowica przeciwko mielinie dorosłego szczura reagowała także w pewnym stopniu z mózgiem noworodka, a pasma w gradiencie typowe dla mieliny stwierdzali ci autorzy w agregatach błon komórek glejowych, 7—9-dniowych niezmielinizowanych mózgów noworodków szczurzych. Mickey i wsp. (1971) oraz Whittingham i wsp. (1972) stwierdzili istnienie wspólnych antygenów w mielinie i błonach synaptycznych. Mihailović i Hydén (1969) wykazali odrębność antygenową gleju i neuronów. Swoisty antygen był zlokalizowany w neuronach, natomiast glej zawierał jedynie antygen wspólny ze śledzioną. Warecka i wsp. (1972) zlokalizowali swoistą alfa<sub>2</sub>glikoproteinę w neuropilu. We frakcji neuronalnej autorzy ci nie stwierdzili obecności antygenu swoistego, mimo 10-krotnie wyższego stężenia białka w tej frakcji w porównaniu z frakcją neuropilu. Według Wickremesinghe i Yates (1972) antygen swoisty jest zlokalizowany w astro- i oligodendrocytach, a także w osłonkach mielinowych.

Stosunkowo najwięcej danych dotyczy lokalizacji białek S-100 i 14-3-2 (Cicero i wsp. 1970; Hydén, Ewen 1966; Lightbody i wsp. 1970; Packman i wsp. 1971; Perez i wsp. 1970; Sviridov i wsp. 1972), ale także i w tym przypadku można mówić jedynie o przewodze występowania tych antygenów w gleju i neuronach.

Niniejsze doniesienie wskazujące na różnice składu antygenowego frakcji komórkowych mózgu szczura traktujemy jako wstępne. Planujemy wykonanie dalszych badań przy użyciu lepiej oczyszczonych frakcji komórkowych i subfrakcji otrzymanych z mózgu i wątroby oraz surowic odpornościowych absorbowanych w celu wyjaśnienia pochodzenia antygenów wspólnych oraz lokalizacji antygenów swoistych dla mózgu.

Praca została wykonana przy współudziale technicznym pań Haliny Nowickiej i Teresy Bok.

Г. Вейнраудер, М. Смялек

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОБОГАЩЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ  
ФРАКЦИЙ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

Резюме

С помощью иммунологических сывороток против миелинизированных и немиелинизированных мозгов крысы были исследованы в работе в реакции иммунодиффузии обогащенные фракции, полученные путем повторных центрифугирований гомогената мозга крысы в прерывном градиенте фикол-сахароза — „миелиновая“, „глиальная“ и „нейронная“ фракции. В полученных фракциях было отмечено увеличенное количество полос по сравнению с реакцией с гомогенатом мозга и наличие общих тканевых антигенов во всех оцениваемых фракциях. „Миелиновая“ Фракция в реакции с сывороткой против немиелинизированного мозга давала одну полосу, соответствующую, вероятно, общему с печенью антигену.

H. Weinrauder, M. Śmiałek

IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF CELL ENRICHED FRACTIONS  
OF RAT BRAIN

Summary

The myelin-, neuron- and glia cell enriched fractions obtained after centrifugation of rat brain homogenates in discontinuous Ficoll sucrose gradients were tested in the immunodiffusion reaction by means of immune sera against myelinated and non-myelinated rat brains. An increased number of bands in the fractions as compared with brain homogenates and the presence of tissue antigens common to all the fractions were stated. In the reaction with the serum against non-myelinated brain, the myelin enriched fraction gave one band probably corresponding to the antigen common to myelin and liver.

PIŚMIENNICTWO

1. Blomstrand C., Hamberger A.: Protein turnover in cell-enriched fractions from rabbit brain. *J. Neurochem.* 1969, 16, 1401—1407.
2. Cicero T. J., Cowan W. M., Moore B. W., Suntzeff V.: The cellular localization of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2. *Brain Res.* 1970, 18, 25—34.
3. Gregson N. A., Kennedy M. C., Leibowitz S.: Immunological reactions with lysolecithin-solubilized myelin. *Immunology*, 1971, 20, 501—512.
4. Hydén H., Mc Ewen B.: A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 354—358.
5. Lightbody J., Pfeiffer S. E., Kornblith P. L., Herschman H.: Biochemically differentiated clonal human glial cells in tissue culture. *J. Neurobiol.* 1970, 1, 411—417.
6. Mc Millan P. N., Mickey D. D., Kaufman B., Day E. D.: The specificity and cross-reactivity of anti-myelin antibodies as determined by sequential absorption analysis. *J. Immunol.* 1971, 107, 1611—1617.

7. Mickey D. D., Mc Millan P. N., Appel S. H., Day E. D.: The specificity and cross-reactivity of antisynaptosome antibodies as determined by sequential absorption analysis. *J. Immunol.* 1971, 107, 1599—1610.
8. Mihailović L. J., Hydén H.: On antigenic differences between nerve cells and glia. *Brain Res.* 1969, 16, 243—256.
9. Norton W. T., Poduslo S. E.: Neuronal soma and whole neuroglia of rat brain. A new isolation technique. *Science* 1970, 167, 1144—1146.
10. Packman P. M., Blömstrand C., Hamberger A.: Disc electrophoretic separation of proteins in neuronal, glial and subcellular fractions from cerebral cortex. *J. Neurochem.* 1971, 18, 479—487.
11. Perez V. J., Olney J. W., Cicero T. J., Moore B. W., Bahn B. A.: Wallerian degeneration in rabbit optic nerve: cellular localization in the central nervous system of the S-100 and 14-3-2 proteins. *J. Neurochem.* 1970, 17, 511—519.
12. Rose S. P. R.: Preparation of enriched fractions from cerebral cortex containing isolated metabolically active neuronal and glial cells. *Biochem. J.* 1967, 102, 33—43.
13. Rose S. P. R., Sinha A. K.: Some properties of isolated neuronal cell fractions. *J. Neurochem.* 1969, 16, 1319—1328.
14. Sviridov S. M., Korochkin L. J., Ivanov V. N., Maletskaya E. J., Bakhtina T. K.: Immunohistochemical studies of S-100 protein during postnatal ontogenesis of the brain of two strains of rats. *J. Neurochem.* 1972, 19, 713—718.
15. Warecka K., Möller H. J., Vogel H. M., Tripatzis J.: Human brain specific alpha<sub>2</sub>-glycoprotein: purification by affinity chromatography and detection of a new component; localization in nervous cells. *J. Neurochem.* 1972, 19, 719—725.
16. Weinrauder H.: Studies on cat brain antigens. I. Soluble precipitation protein antigens. *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl, VI*, 1969, XVII, 423—426.
17. Whittingham S., Bencina B., Carnegie P. R., McPherson T. A.: Properties of antibodies produced in rabbits to human myelin and myelin basic protein. *Int. Arch. Allergy* 1972, 42, 250—263.
18. Wickremesinghe H. R., Yates P. O.: Immunological properties of normal neural tissues. *J. neurol. Sci.*, 1972, 225—242.
19. Yanagihara T., Hamberger A.: Effect of diphenylhydantoin on protein metabolism in neuron and neuroglial fractions of central nervous tissue. *Exp. Neurol.* 1971, 32, 152—162.

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



EWA OSETOWSKA, ANNA TARASZEWSKA

## NOSÓWKA NERWOWA I TOKSOPLAZMOZA — INTERFERENCJA DWÓCH RÓŻNYCH PROCESÓW ZAPALNYCH MÓZGU

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

Kierownik Ośrodka: prof. dr med. E. Osetowska

Obie wymienione w tytule jednostki chorobowe są w ostatnich latach przedmiotem żywego zainteresowania neurologii i neuropatologii doświadczalnej i porównawczej. Pokrewne właściwości antygenowe i patogenne wirusa odry i wirusa nosówki (Gillespie, Karzon 1960, Roberts 1965, Warren i wsp. 1960) stały się dla medycyny weterynaryjnej punktem wyjścia do poszukiwania nowych, skuteczniejszych szczepionek przeciwko nosówce (Górski 1973). W nosówce naturalnej psa upatruje się właściwości doskonałego modelu porównawczego dla rozwiązania skomplikowanych zagadnień podostrych zapaleń mózgu u ludzi, zwłaszcza w świetle prac wskazujących na patogenetyczną rolę wirusa odry, lub wirusa odropodobnego (Feldman i wsp. 1972) w kształtowaniu się morfologicznego obrazu *encephalitis scleroticans subacuta* (Liègeois i wsp. 1969, van Bogaert, Osetowska 1970).

Innego typu zainteresowanie wywołuje toksoplazmoza. Jej rozpowszechnienie w przyrodzie i cykl przemian naturalnych wyjaśnione zostało w ostatnich latach wybitnym współudziałem kota mniej lub bardziej domowego. Wyniki tych badań podsumowane w pracy Desmonts (1971), a w piśmiennictwie polskim przez Krzyżanowską-Woźniakowską (1971), tłumaczą sposób przedostawania się toksoplazmy do organizmu płodów ludzi i zwierząt i jej nieoczekiwane ujawnianie kliniczne w życiu pozapłodowym pod wpływem dodatkowych czynników szkodliwych. Bezobjawowe, przewlekłe zakażenie toksoplazmozą wydaje się być (poza innymi lokalizacjami narządowymi) specjalnym przywilejem ośrodkowego układu nerwowego. Na współudział toksoplazmozy w podostrych zapaleniach mózgu u człowieka zwrócili uwagę Hommes i Prick (1966). Występowanie jej wraz z nosówką nerwową spostrzegane było przez Campbella i wsp. (1955), a przez Hartleya (1956) oceniane jako powikłanie występujące w około 12% przypadków nosówki nerwowej. W materiale no-

sówkowym, z którego zostały wybrane przypadki do niniejszej pracy, toksoplazmoza i nosówka występowały z pewnością równocześnie tylko w 4,4% przypadków.

Analizę tych przypadków wykorzystujemy dla: 1) wyjaśnienia niektórych postaci morfologicznych nosówki nerwowej, 2) przypomnienia skomplikowanej patogenetyki demielinizacji towarzyszącej nosówce naturalnej i 3) dla zwrócenia uwagi na odmienne kształtowanie się morfologii zapalenia mózgu wywołanego przez dwa różne czynniki zakaźne pomimo niewątpliwej interferencji obu procesów w przebiegu klinicznym.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowi 6 przypadków, wybranych spośród 72 psów z nosówką nerwową serii belgijskiej (Liègeois i wsp. 1969) oraz 63 psów serii polskiej (Osetowska, Taraszewska 1969). Cztery psy pochodzenia belgijskiego były wykorzystane uprzednio w pracach Scherera i Collet (1939) oraz Gastaut i wsp. (1957). Torbiel końcową z toksoplazmami, nie zauważoną przy uprzednich badaniach neuropatologicznych, znaleziono nieomal przypadkowo i pod tym kątem widzenia przejrano raz jeszcze cały materiał belgijski i polski.

Materiał belgijski opracowany był w technice celoidynowej i parafinowej, materiał polski — w parafinowej. Barwienie histologiczne wymieniono w opisach rycin. Dla wszystkich sześciu przypadków przeprowadzono powtórnie szczegółowe badania morfologiczne z uwzględnieniem topografii procesów zapalnych o różnych strukturach.

#### WYNIKI

U wszystkich psów stwierdzono obecność uszkodzeń charakterystycznych dla nosówki nerwowej. W korze półkul zmiany te miały charakter wzmożonej satelitozy i grudek neuronofagicznych *in statu nascendi* dookoła uszkodzonych neuronów (ryc. 1), niekiedy tylko przerzedzenia neuronów z zaznaczonym zgębczeniem podłoża (ryc. 2). W istocie białej szczególnie pnia mózgowego i rdzenia występowało typowe dla nosówki wzmożenie rysunku drobnych naczyń żylnych i włosowatych z minimalnym naciekiem komórkowym (ryc. 3). W istocie białej półkul mózgowych oraz na pograniczu istoty białej i struktur szarych, o bardziej niż w korze rozproszonym układzie neuronów, obserwowano zagęszczenie gleju komórkowego, grudki glejowe oraz zaznaczone nacieki przy naczyniach żylnych (ryc. 4). W barwieniach na mielinę najczęściej spotykano gąbczaste przerzedzenia i ubytki w postaci „kropel deszczu” — charakteryzujące uszkodzenia mielinę w istocie białej w polach podkorowych (ryc. 5). W dwóch przypadkach stwierdzono nacieki okołozylne i zagęszczenie gleju komórkowego w skrzyżowaniu i pasmach wzrokowych (ryc. 6).

W strukturze opisanych zmian zapalnych występowały limfocyty, w większych mufkowatych naciekach także plazmatocyty, mikroglej, astrocyty, proliferujące i pobudzone śródbłonki, rzadziej makrofagi. Zmiany w układzie oligodendrogleju towarzyszyły uszkodzeniom w długich drogach nerwowych.

We wszystkich przypadkach oprócz zmian charakterystycznych dla zapalenia wirusowego spotykano bądź to na tych samych, bądź na innych poziomach uderzająco nasilone nacieki zapalne, przekształcające się lub przedstawiające już wykształcone ziarniniaki zapalne. W przypadku 255/37 ogniska składające się z nacieków limfocytarnych, plazmatocytarnych, proliferujących składników ścian naczyń, z zaznaczoną obecnością leukocytów występowały podkorowo w okolicy ciemieniowej, w istocie białej torebki wewnętrznej, głównie jednak w moście i opuszcze. Największemu skupieniu nacieków wyspowych odpowiadała ostro odgraniczona demielinizacja, przypominająca ogniska występujące w stwardnieniu rozsianym u człowieka (ryc. 7 i 8). W przypadku 50/53 zagęszczenia nacieków zapalnych w rdzeniu i pniu mózgowym miały typową dla nosówki lokalizację brzeżną (ryc. 9, 10). Jednak zamiast rozproszonego nacieku „miotłkowatego”, jaki demonstrowała rycina 3, w przypadku tym już w powiększeniach lupowych zwracały uwagę wysepkowate skupienia ziarniny zapalnej, które wskutek gęstego ułożenia zlewały się w pozornie jednolity „margines”. Szczególnie ciekawy jest przypadek 179/55, w którym niemal wszystkie przebadane poziomy wykazywały bardzo słaby, rozlany proces chorobowy o strukturze klasycznej nosówki. Natomiast na poziomie śródmózgowia nieco poniżej i bocznie od wodociągu występował ponadto klasyczny ziarniniak zapalny, z małą martwicą w centrum, cebulastym układem komórek śródbłonkowych i fibroblastów oraz rozległym, intensywnym polimorficznym naciekiem na obwodzie (ryc. 11). Podobny ziarniniak znaleziono w przypadku 102/55 na poziomie mózdkowym. W przypadkach polskich (W 31/63 i 363/64) ogniska ziarniny zapalnej występowały podobno w korze półkul oraz w jednym przypadku we wzgórzu w pobliżu wyściółki komory III-ej. W drugim przypadku można mówić tylko o nacieku zapalnym rozproszonym w pobliżu większych naczyń tętniczych na różnych poziomach kory mózgowej (ryc. 12). Obecność licznych leukocytów różniła te nacieki od dyskretnych zmian nosówkowych. We wszystkich przypadkach stwierdzono w tkance mózgowej obecność tzw. torbiele końcowych (*cystis terminalis*) zawierających toksoplazmy (ryc. 13—16). Stosunek ilościowy cyst i ognisk zapalnych był różny. W przypadku 255/37 i 179/55 znaleziono pojedyncze torbiele na pojedynczych preparatach w brzeżnych partiach ziarniny. Szczególnie ilustratywny był pod tym względem przypadek 102/55, w którym ziarniniak znajdował się w mózdku, natomiast cy-

sta końcowa w małej, kilkukomórkowej wysepce nacieku zapalnego w istocie szarej rdzenia piersiowego (ryc. 16). Natomiast w przypadku 50/53 znajdowano bardzo liczne cysty w środku wyseppek zlewającego się nacieku (ryc. 10). Równie liczne cysty znaleziono w przypadkach polskich w czynnych naciekach zapalnych. Ryciny 13—16 przedstawiają torbiele końcowe ze skrawków parafinowych, w których wypadają one bardziej „fotogenicznie”. Cysty ze skrawków celoidynowych znacznie grubszych (ryc. 10) nie pozwalają na fotograficzną dokumentację ich struktury wewnętrznej, uwidaczniającej się pod mikroskopem przy ciągłej regulacji śruby mikrometrycznej.

#### DYSKUSJA

Badania Gibsona i wsp. (1965) przeprowadzone na gnotobiotycznych szczepionkach, zakażanych wyłącznie wirusem nosówki i zabijanych w odstępach 4-dniowych od zakażenia, pozwoliły na ustalenie obrazu nosówkowego zapalenia mózgu, niepowikłanego wpływami dodatkowych czynników zakaźnych. W osiem dni po zakażeniu w mózgu występowały zmiany w ścianach naczyń włosowatych i drobnych żył, których morfologia odpowiadała obrazom ilustrowanym ryc. 3 i 4. W 12 dni po zakażeniu zmiany naczyniowe ulegały stopniowemu zmniejszeniu. Natomiast wyraźnie nasilało się uszkodzenie neuronów, przechodzących przez stadia obrzęku, wakuolizacji, rozpadu i neuronofagii. Autorzy pracy znajdowali dość rzadko wtęty śródmózgowe i śródplazmatyczne w neuronach. W strukturze nacieku zapalnego poza limfocytami, plazmatocytami i mikroglejem występowały odczynowe astrocyty, w których autorzy nie znaleźli wtęty śródkomórkowych. Nie stwierdzono rozpadu osłonek mielinowych ani zgęszczenia istoty białej. Kliniczny przebieg choroby był tak łagodny, że zdaniem autorów przyżyciowe postawienie rozpoznania możliwe było tylko na podstawie stwierdzenia podniesionej ciepłoty ciała. Wnioski Gibsona i wsp. potwierdziły i przesądziły słuszność poglądów oryginalnych i cytowanych w pracach Innesa (1950), Frauchigera i Fankhausera (1957), Innesa i Saundersa (1962), Fankhausera i Luginbühla (1968). Postaci kliniczne i morfologiczne nosówki nerwowej rozwijają się w wyniku współdziałania różnych czynników zakaźnych, nagromadzonych w ustroju psa nie-laboratoryjnego i przesądzających odpowiednio przygotowanie („premedykację”) immunologiczną układu nerwowego. Postulowane jeszcze w roku 1950 przez Wirtha i Diernhofera wprowadzenie rozpoznania klinicznego „Staupekomplex” ujmuje istotę zagadnienia.

Przedstawiony przez Gibsona i wsp. obraz mózgu w nosówce niepowikłanej pozostawił wzorzec patologiczny, który w pewnych przypadkach, m. in. jak przedstawione wyżej, pozwala wyróżnicować dwa cha-

rakterystyczne zespoły zmian. Dyskretny zespół zapalenia wirusowego nie pokrywa się, lecz występuje obok nacieku z udziałem leukocytów i proliferacji granulomatycznej, stanowiących bardzo wymowny wyraz współdziałania drugiego czynnika zapalnego. Niezależnie od wyraźnej różnicy w charakterze morfologicznym obu procesów, nie można z pewnością wykluczyć ich wzajemnej interferencji. Zarówno w polach noszących znamiona dyskretnego zapalenia wirusowego, jak w „negatywie mielinowym” ziarniniaków pojawiają się uszkodzenia mieliny, obie procesowi nosówki niepowikłanej. Na ryc. 5 mają one cechy demielinizacji gąbczastej opisywanej często w neuropatologii kompleksu nosówki nerwowej. W demielinizacyjnych uszkodzeniach, towarzyszących granulomatycznemu naciekowi zapalnemu, ostre granice ognisk odpowiadają obrazowi „ostrego stwardnienia rozsianego” wyróżnionego przez Scherera (1939) u psa. Niewątpliwie i ten składnik obrazu morfologicznego spotykany rzadko i tylko w granulomatycznych postaciach nosówki zaliczyć można do „Staupekomplex”. W danej serii przypadków wyjaśnia się on współdziałaniem trzech szeregów antygenowych: wirusowych, toksoplazmicznych i auto-antygenów tkanki mózgowej, powstających pod wpływem jej rozpadu, zainicjowanego w obu procesach zapalnych.

Jakkolwiek demielinizacja jest tak uderzająco obecna w przedstawionym materiale, charakter tego materiału podkreśla raz jeszcze złożoną patogenезę rozpadu osłonek mielinowych w nosówce nerwowej. Zagadnieniem tym zajmowałyśmy się już uprzednio, wymieniając liczne możliwe czynniki patologiczne (Osetowska, Taraszevska 1969). Podjęli je stosunkowo niedawno Wiśniewski i wsp. (1972) usiłujący zagadnienie demielinizacji w nosówce nerwowej wyjaśnić w mikroskopie elektronowym. Otrzymane przez nich wyniki nie brzmią przekonująco nawet w podsumowaniu własnym autorów. Zakładają oni, że proces demielinizacji w nosówce nie jest specyficzny dla tego zakażenia wirusowego, ale że obecność wirusa nosówki, stwierdzonego w dużych ilościach w astrocytach w tkance mózgowej ma znaczenie czynnika inicjującego. W dalszym postępie demielinizacji odgrywają rolę procesy auto-immunogenne i być może zjawiska „krzyżowania antygenowego”. O ile patomechanizm immunologiczny jest w demielinizacji nosówkowej postulowany od lat i potwierdzany w badaniach w mikroskopie świetlnym charakterystycznymi cechami uszkodzeń tkankowych, o tyle wysuwana przez Wiśniewskiego i wsp. rola inicjująca wirusa nosówki obecnego w astrocytach budzi poważne zastrzeżenie. Największe zastrzeżenia budzi jednak dobór materiału do badań w ME: psy w wieku od 2 do 5 lat z nosówką konwencjonalną, a więc ze Staupekomplex, wyposażone zatem we wszystkie czynniki zakaźne, w które organizm psa może się wyposażyć w przebiegu życia. Wstępne badania w mikroskopie świetlnym skrawków ultracien-

kich ujawniły typowy obraz „nosówki wzbogaconej”. W takim obrazie obecność wirusa nosówki w astrocytach reaktywnych okresu późnego (psy badane w 12 dni do 6-ciu tygodni ujawnionego klinicznie ciężkiego zespołu neurologicznego) nie jest z pewnością jednoznaczna. Szczególnie nieprzekonywujące jest jego „działanie inicjujące” rozpad mieliny. Wątpliwości nasuwają się tu zarówno w świetle faktów znanych z przebiegu nosówki naturalnej i w zestawieniu z wynikami badań doświadczalnych Seamera i wsp. (1971), Zlotnika i wsp. (1971, 1973), Boultera i wsp. (1971), nad różnym znaczeniem obecności wirusa w tkance mózgowej, w zależności od okresu zakażenia, nasilenia reakcji immunologicznych i wpływów immuno-supresyjnych.

Nie ulega pomimo to wątpliwości, że laboratoria neuropatologiczne dysponujące dowolnie nowoczesnym wyposażeniem technicznym mogłyby definitywnie przesądzić rolę specyficzną wirusa nosówki w rozpadzie osłonki mielinowej. Nasuwałaby się tu nieodparcie sugestia zastosowania do badań w ME materiału gnotobiotycznego, analogicznego do użytego w doświadczeniach Gibsona. Otrzymane wyniki trzeba by dodatkowo potwierdzić zakażeniem wirusem nosówki odpowiedniej hodowli tkankowej i jej okresową kontrolą w ME na przestrzeni kilkudziesięciu dni, tak jak Feldmann i wsp. (1972) zrobili dla wirusa odry. Zaobserwowanie dla wirusa nosówki podobnej sekwencji zmian zachodzących w elementach neuro-ektodermalnych byłoby oddaniem *sum cuique* przeszło stuletniej dyskusji naukowej (Vix 1837 — notatki bibliograficzne nie publikowane ze zbiorów L. van Bogaerta) toczącej się dookoła złożonej etiologii uszkodzeń układu nerwowego u psa.

Na zakończenie wracamy do podsumowania spostrzeżeń, związanych z opublikowanym materiałem. W 6 przebadanych przypadkach patogenyza „granulomatycznej” postaci nosówki wydaje się niewątpliwa, w odróżnieniu od reszty przypadków grupy granulomatycznej serii Liégeois i wsp. Rozpoznanie neuropatologiczne było w naszych przypadkach łatwe (pomijając pracochłonność „rewizji” obu serii) dzięki odrębnej strukturze obu procesów (Frankhauser 1956) i obecności torbieni toksoplazmicznych. Wytyczną przewodnią przy szukaniu torbieni stała się dla nas obecność leukocytów w naciekach zapalnych. Przy interferencji obu wpływów zakaźnych nasilających reakcje tkankowe i przebieg kliniczny, zaskakującym stwierdzeniem była utrzymana „granica morfologiczna” obu procesów, których swoisty charakter nie uległ deformującemu zatarciu pomimo topograficznego sąsiedztwa.

Autorki dziękują prof. dr L. van Bogaertowi za pomocną dyskusję w interpretacji materiału histologicznego oraz za zezwolenie na wykorzystanie przypadków belgijskich. Zdjęcia z oryginalnych preparatów belgijskich wykonał w Polsce w roku 1969 p. Ryszard Szopiński.

Э. Осетовска, А. Тарашевска

НЕРВНАЯ ЧУМКА И ТОКСОПЛАЗМОЗ — ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ  
ДВУХ ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

## Резюме

Авторы представляют 6 собак с чумовым комплексом, составляющих 4,4% всего исследованного материала с чумкой. В нейропатологической картине наряду с типичным вирусным воспалением (фиг. 1—6) было отмечено присутствие тяжелых воспалительных окоლოსудистых инфильтратов с участием лейкоцитов и грануломатозной пролиферации (фиг. 7—12). На периферии зрелых грануломатов и среди менее плотных периваскулярных инфильтратов были найдены отдельные и многочисленные токсоплазматические кисты (фиг. 13—16). Эти случаи соответствуют морфологическим разновидностям нервной чумки, интерпретированной в литературе или как грануломатозная форма, или как „острый рассеянный склероз” у собаки. Несмотря на несомненную интерференцию различных инфекционных факторов, влияющую на тяжелое течение болезни и усиление демиелинизации, в микроскопической картине была сохранена „морфологическая граница” обоих процессов, специфика которых не подверглась деформирующему сглаживанию несмотря на топографическое соседство. Дополнительно упоминается сложный патомеханизм демиелинизации при чумке. Связь распада миелина с вирусной инфекцией чумки можно было бы выяснить опытным путем только на гнотобиотическом материале, свободным от „иммунопатологической премедикации”, неизбежно имеющей место у домашних собак.

E. Osetowska, A. Taraszewska

NERVOUS DISTEMPER AND TOXOPLASMOSIS — INTERFERENCE OF TWO  
INFECTIOUS PROCESSES

## Summary

The authors present 6 cases of dogs with distemper complex, which made 4,4% of the total distemper material examined. The neuropathological picture showed beside the typical viral inflammation (Figs. 1—6), the presence of severe inflammatory infiltrates with the participation of leukocytes and granulomatous proliferation (Figs. 7—12). On the periphery of mature granulomas and within looser infiltrates initiating close to the blood vessels, single and grouped toxoplasmic cysts were noticed (Figs. 13—16). The cases correspond to the morphological variant of nervous distemper, which are interpreted in the literature either as a granulomatous form or as „acute multiple sclerose” in dog.

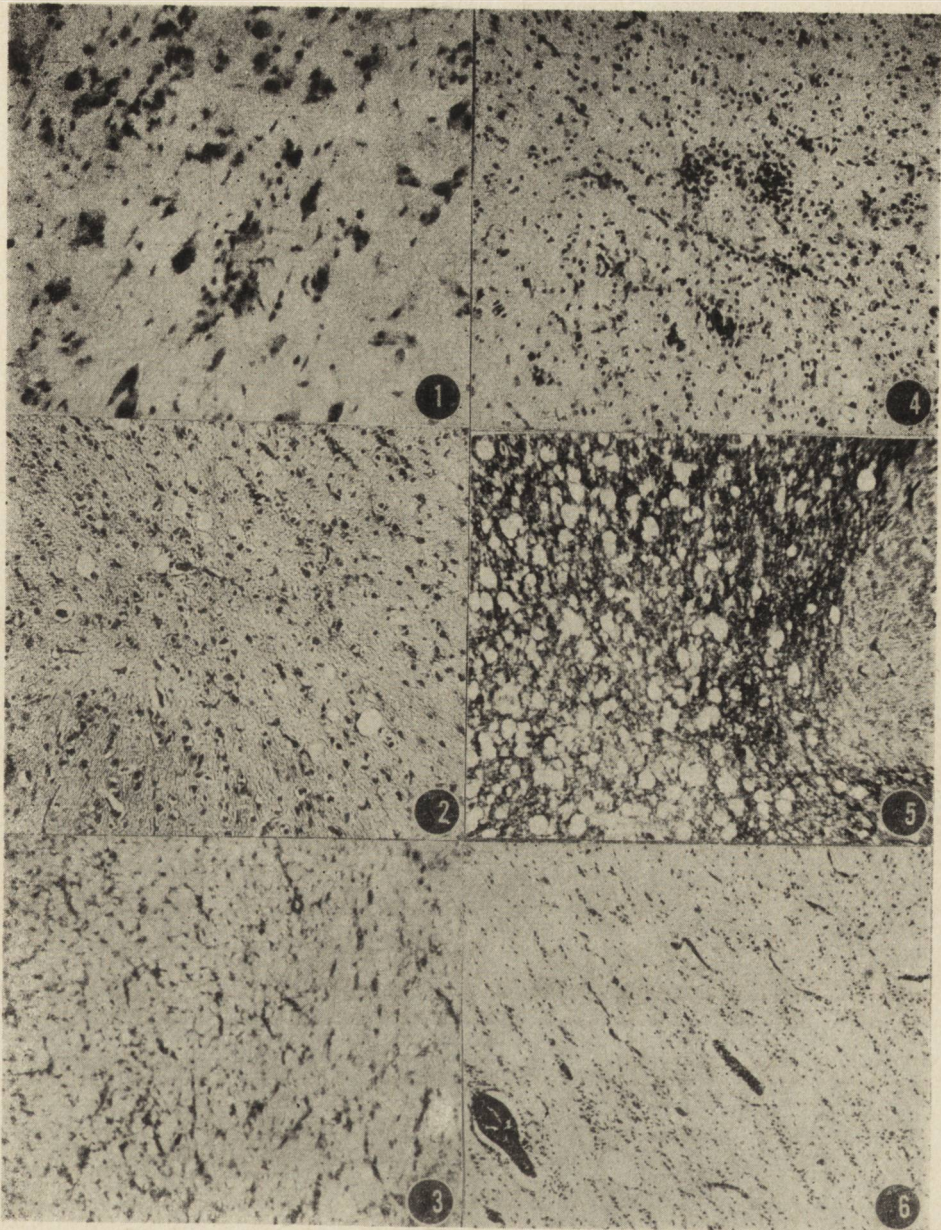
Despite the obvious interference of various infectious factors, which contribute to the severe clinical course and to the increased intensity of demyelination, the „morphological border” between both processes remained manifest in the morphological picture and their specific character has not undergone deforming effacement despite topographic neighbourhood.

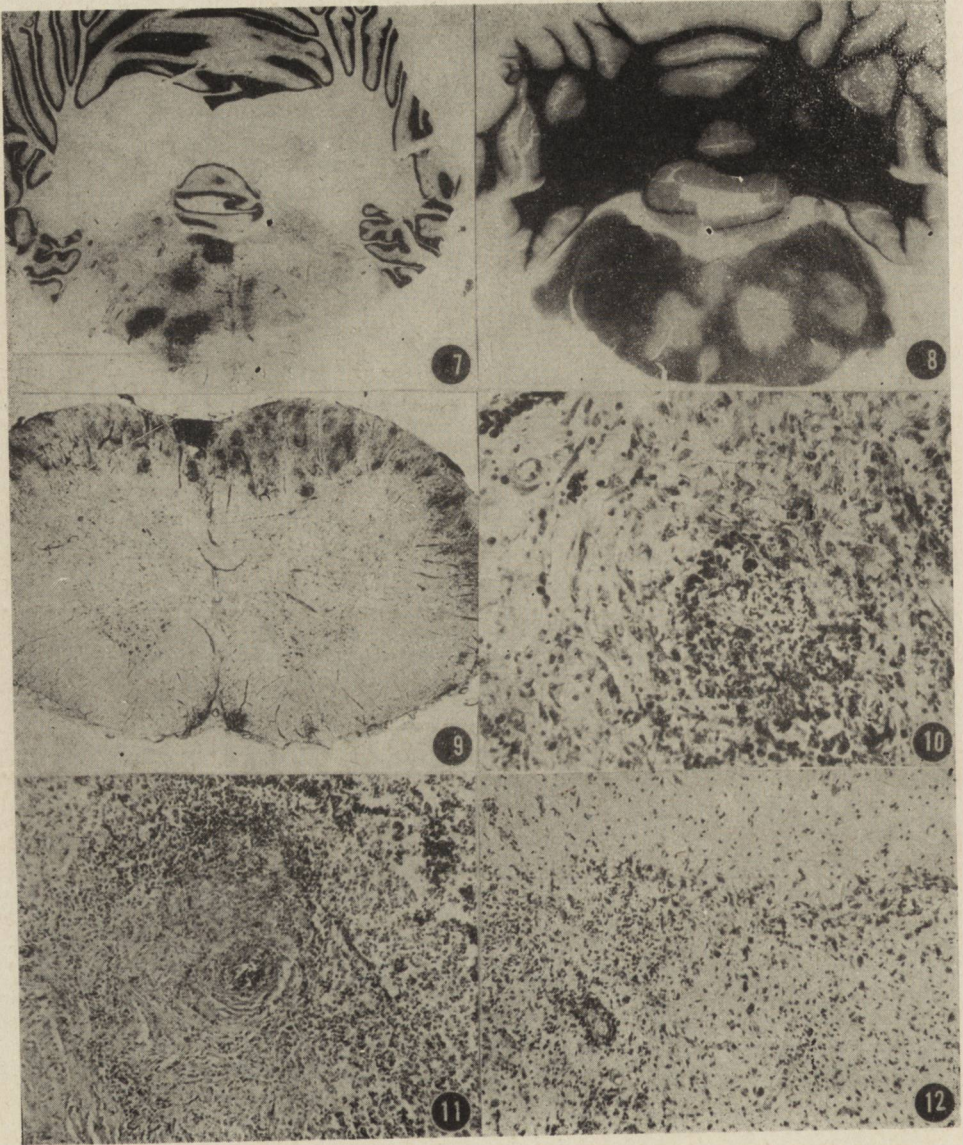
The complex pathomechanism of demyelination in distemper is briefly discussed. The relation of myelin disintegration to the infection with distemper virus could only be explained experimentally on a gnotobiotic material, free of „immunopathological premedication”, which occurs inevitably in home dogs.

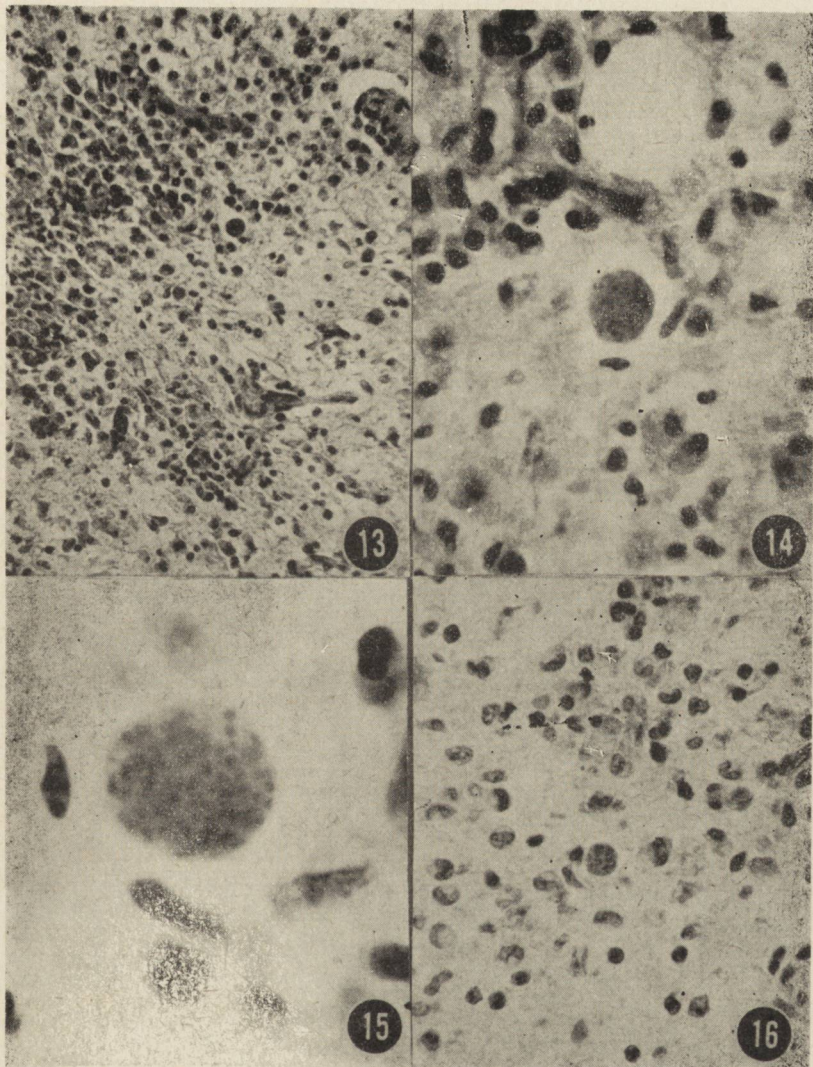
## PIŚMIENNICTWO

1. Boulter E. A., I. Zlotnik, H. B. Maber: A lethal respiratory infection of rabbits with a strain of Semiliki Forest Virus (SFV). *Br. J. exp. Path.* 1971, 52, 638—645.
2. Campbell R. S. F., W. B. Martin, E. D. Gordon: Toxoplasmosis as a complication of canine distemper. *Vet. Rec.* 1955, 67, 708—712.
3. Desmots G.: Une découverte importante: le cycle naturel du toxoplasme. *Presse Méd.* 1971, 79, 471—474.
4. Fankhauser R.: La toxoplasmose chez l'animal. *Arch. Suisse Neurol. Psych.* 1956, 77, 195—207.
5. Fankhauser R., H. Luginbühl: Pathologische Anatomie des zentralen und peripheren Nervensystems der Haustiere. Paul Parey, Berlin und Hamburg 1968.
6. Feldman L. A., C. S. Raine, R. D. Sheppard, M. B. Bornstein: Virus-host relationships in measles-infected cultures of central nervous tissue. *J. Neuro-path exp. Neurology.* 1972, 31, 624—638.
7. Frauchiger E., R. Fankhauser: Vergleichende Neuropathologie. Springer, Berlin, 1957.
8. Gastaut H., M. Bérard-Badier, E. Darraspen, L. van Bogaert: Etude anatomoclinique de dix-neuf chiens épileptiques. *Rev. Méd. vet.* 1957, 20, 593—612.
9. Gibson J. P., R. A. Griesemer, A. Koestner: Experimental distemper in gnotobiotic dog. *Path. Vet.* 1965, 2, 1—19.
10. Gillespie J. H., D. T. Karzon: A study of the relationship between canine distemper and measles in the dog. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 1960, 105, 547—551.
11. Górski J.: Próby uzyskania i ocena skuteczności heterologicznej (odrowej) szczepionki przeciw nosowce. *Pol. Arch. Wet.* 1973, 16, 121—132.
12. Hartley W. J.: Observations on mortality of young dogs in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 1956, 4, 147—154.
13. Hommes O. R., J. J. G. Prick: Subacute Encephalitis and Toxoplasma Infection. *Psych. Neurol. Neurochir. (Amsterdam)*, 1966, 69, 241—271.
14. Innes J.R.M.: Demyelinating diseases of animals. In „Multiple sclerosis and the demyelinating diseases”. 1/-98. Williams and Wilkins, Baltimore 1950.
15. Innes J. R. M., L. Z. Saunders: Comparative Neuropathology. Academic Press, New York and London 1962.
16. Krzyżanowska-Woźniakowska J.: Toksoplazmoza w świetle współczesnych poglądów. *Pol. Tyg. Lek.* 1971, 26, 1372—1375.
17. Liégeois F., L. van Bogaert, E. Osetowska: Sur la valeur nosologique de la topographie et de la structuration des lésions nerveuses en neuropathologie comparée. *Bull. Acad. Roy. Med. Belge.* 1969, VII Série, 9, 805—875.
18. Osetowska E., A. Taraszewska.: Demielinizacja w nosówce nerwowej u psów. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 99—112.
19. Roberts J. A.: A study of the antigenic relationship between human measles virus and canine distemper. *J. Immunol.* 1965, 94, 622—628.
20. Scherer H. J., Collet L.: Contribution á la neuropathologie du chien avec remarques sur la pathologie de la maladie de Carré. *J. Belge Neurol. Psych.* 1939, 39, 132—143.
21. Seamer J. H., E. A. Boulter, I. Zlotnik: Delayed onset of encephalitis in mice passively immunised against Semiliki Forest Virus. *Br. exp. Path.* 1971, 52, 408—414.









22. Van Bogaert L., E. Osetowska: Etude comparée de la maladie de Carré et des encéphalites de la rougeole. Proc. VIth International Congress of Neuropathologie. Masson et Cie., Paris 1970, 894—896.
23. Warren J., Nadel M. K., Slater E., Millian S. J.: The canine distemper-measles complex. Amer.J.vet.Res. 1960, 1, 111—117.
24. Wirth D., Diernhofer K.: Lehrbuch der inneren Krankheiten der Haustiere. F.Enke, Stuttgart 1950.
25. Wiśniewski H., Raine C.S., Kay W.J.: Observation on viral demyelinating encephalomyelitis (Canine distemper). Lab. Invest. 1972, 26, 589—599.
26. Zlotnik I., Carter C. B., Grant D. P.: The persistence of Louping ill Virus in immunosuppressed guinea-pigs. Br. J. exp. Path, 1971, 52, 395—407.
27. Zlotnik I., Grant D.P., Carter G.B., Batter-Hatton D.: Subacute sclerosing encephalitis in adult hamsters infected with Langkat Virus. Br.J.exp.Path. 1973, 54, 29—39.

Adres autorek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMDiK PAN, 05-300 Mińsk Mazowiecki, ul. Warszawska 126.

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1—6.* Zespół zapalenia wirusowego.

*Fig. 1—6.* Viral inflammatory syndrom.

*Ryc. 1.* Wzmoczona satelitoza i grudki neuronofagiczne tworzące się dookoła neuronów w korze. Celoidyna, fiolet krezyłu. Pow. 450×.

*Fig. 1.* Enhanced satellitosis and neuronophagic nodules formed around cortical neurons. Celloidin, cresyl violet. ×450.

*Ryc. 2.* Przerzedzenie neuronów i rozpoczynające się zgębczenie podłoża w korze. Parafina. H-E. Pow. 150×.

*Fig. 2.* Neuronal rarefaction and initial stage of spongy degeneration in the cerebral cortex. Paraffin. H-E. ×150.

*Ryc. 3.* Typowe dla nosówki nerwowej wzmoczenie rysunku drobnych naczyń i minimalne nacieki okołozylne w istocie białej rdzenia. Celoidyna. Fiolet krezyłu. Pow. 100×.

*Fig. 3.* Typical for nervous distemper enhancement of the profile of small blood vessels and minute perivascular infiltrates in the white matter of spinal cord. Celloidin. Cresyl violet. ×100.

*Ryc. 4.* Grudki glejowe na tle rozlanego zagęszczenia gleju w istocie białej. Parafina. Fiolet krezyłu. Pow. 150×.

*Fig. 4.* Glial nodules and diffuse glia condensation in the white matter. Paraffin. Cresyl violet. ×150.

*Ryc. 5.* Typowa dla nosówki nerwowej demielinizacja w postaci gąbczastych ubytków w podkorowej istocie białej. Parafina. Heidenhain. Pow. 100×.

*Fig. 5.* Typical for nervous distemper demyelination in the form of spongy losses in the subcortical white matter. Paraffin. Heidenhain. ×100.

*Ryc. 6.* Zagęszczenie gleju i zaczynające się nacieki okołonaczyniowe w nerwie wzrokowym. Celoidyna. Fiolet krezyłu. Pow. 100×.

*Fig. 6.* Glial condensation and newly formed perivascular infiltrates in the optic nerve. Celloidin. Cresyl violet. ×100.

*Ryc. 7—12* Zespół zapalenia granulomatycznego.

*Fig. 7—12* Granulomatous inflammatory syndrome.

*Ryc. 7.* Granulomatyczne skupiska na poziomie mostu. Przyp. 255/37. Celoidyna. Fiolet krezyłu. Wielkość naturalna.

*Fig. 7.* Granulomatous proliferation on the pons level. Case 255/37. Celloidin. Cresyl violet. Normal size.

*Ryc. 8.* „Negatyw” obrazu z *ryc. 7* w barwieniu na osłonki mielinowe, odpowiada tzw. postaci ostrego stwardnienia rozsianego u psa. Celoidyna. Woelcke-Heidenhain. Pow. lupowe.

*Fig. 8.* „Negative” of picture from *Fig. 7* in staining for myelin sheaths, corresponds to the form of the so-called acute multiple sclerosis in dog. Celloidin. Woelcke-Heidenhain. Magn. glass.

*Ryc. 9.* Granulomatyczne, świeże skupienia wysepkowe na obwodzie rdzenia, zlewające się w obrączkowaty naciek zapalny. Przyp. 50/53. Celoidyna. Fiolet krezyłu. Pow. 30×.

*Fig. 9.* Granulomatous fresh insular accumulations on the periphery of the spinal cord, confluent into a ring-like inflammatory infiltrate. Case 50/53. Celloidin. Cresyl violet. ×30.

*Ryc. 10.* Wycinek z *ryc. 9.* Torbiel końcowa toksoplazmy w środku ogniska zapalnego, poniżej druga torbiel nieco odkształcona. Pow. 450×.

*Fig. 10.* Detail from *Fig. 9.* Terminal toxoplasmic cyst in the centre of inflammatory focus, below another cyst, somewhat deformed. ×450.

*Ryc. 11.* „Dojrzały” ziarniniak o typowym „cebulastym” układzie elementów fibroblastycznych. Przyp. 179/55. Parafina. H-E. Pow. 100×.

*Fig. 11.* „Mature” granuloma with a typical „onion-like” arrangement of the fibroblastic elements. Case 179/55. Paraffin. H-E. ×100.

*Ryc. 12.* Rozlewający się odnaczyniowo naciek zapalny śródkorowy z udziałem leukocytów. Przyp. 363/64. Parafina. H-E. Pow. 150×.

*Fig. 12.* Intracortical inflammatory infiltrate with participation of leukocytes, developing from the vessel. Paraffin. H-E. ×150.

*Ryc. 13.* Torbiel końcowa w środku nacieku zapalnego z zaczynającą się proliferacją mezodermalną. Przyp. 31/63. Parafina. H-E. Pow. 150×.

*Fig. 13.* Terminal toxoplasmic cyst in the centre of inflammatory infiltrate with beginning mesodermal proliferation. Paraffin. H-E. ×150.

*Ryc. 14.* Torbiel końcowa w luźnym nacieku zapalnym na obwodzie ziarniniaka z *ryc. 11.* Pow. 600×.

*Fig. 14.* Terminal cyst in a loose inflammatory infiltrate on the granuloma periphery (from *Fig. 11*). ×600.

*Ryc. 15.* Torbiel końcowa wśród nielicznych komórek nacieku. Przyp. 102/55. Parafina. Fiolet krezyłu. Pow. 1000×.

*Fig. 15.* Terminal cyst among a few infiltrate cells. Case 102/55. Paraffin. Cresyl violet. ×1000.

*Ryc. 16.* Torbiel końcowa w otoczeniu licznych leukocytów. Wycinek z *ryc. 12.* Pow. 450×.

*Fig. 16.* Terminal cyst surrounded by numerous leukocytes (Detail from *Fig. 12*). ×450.

MARIA DĄMBSKA, JERZY KULCZYCKI, BOGNA SCHMIDT-SIDOR,  
JERZY GOERTZ

## AGENEZJA I HYPOPLAZJA SPOIDŁA WIELKIEGO

### ANALIZA MORFOLOGICZNA 12 PRZYPADKÓW

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

Klinika Neurologii AM w Szczecinie

Kierownik: prof. dr M. Jarema

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego

Kierownik: doc. dr J. Dymecki

Zakład Anatomii Patologicznej AM w Szczecinie

Kierownik: prof. K. Stojalowski

Rozwój ontogenetyczny spoidła wielkiego może ulegać zaburzeniom, których wynikiem jest całkowite lub częściowe niewykształcenie tej struktury mózgu. Powstałe odchylenie rozwojowe ogranicza się do ciała modzelowatego lub obejmuje również inne struktury związane rozwojowo lub czynnościowo z układem spoidłowym. Niekiedy towarzyszą mu nieprawidłowości w odległych okolicach układu nerwowego, a także w innych narządach.

Z dotychczasowych opracowań wynika, że niedokszałcenie lub nawet brak spoidła wielkiego nie odbija się wyraźnie i jednoznacznie na stanie neurologicznym i psychicznym pacjenta. Zazwyczaj obraz kliniczny i rokowanie determinuje dopiero obecność i nasilenie współistniejących wad rozwojowych.

Ustalenie zależności między całkowitym lub częściowym niewykształceniem spoidła wielkiego i współistniejącymi zaburzeniami rozwojowymi wydaje się interesujące zarówno dla poznania przebiegu procesów wadotwórczych w układzie nerwowym jak i rokowania klinicznego u obciążonych wadami osobników.

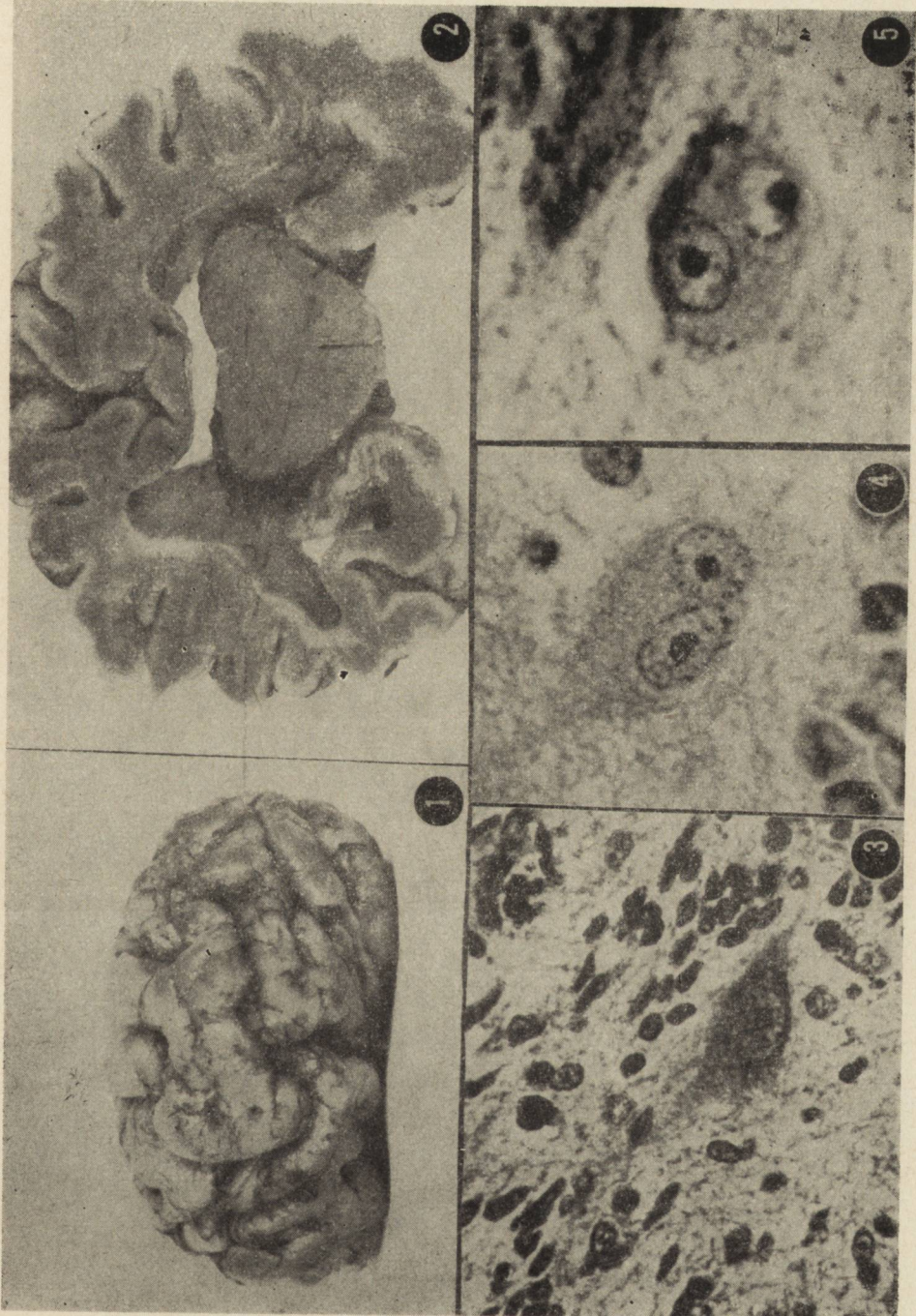
Niepełna znajomość etiopatogenezy zaburzeń rozwojowych skłoniła nas do przeprowadzenia analizy morfologicznej naszego materiału ze zwróceniem uwagi na zależność tych zaburzeń od przebiegu procesów rozwojowych ośrodkowego układu nerwowego.

## OPIS PRZYPADKÓW

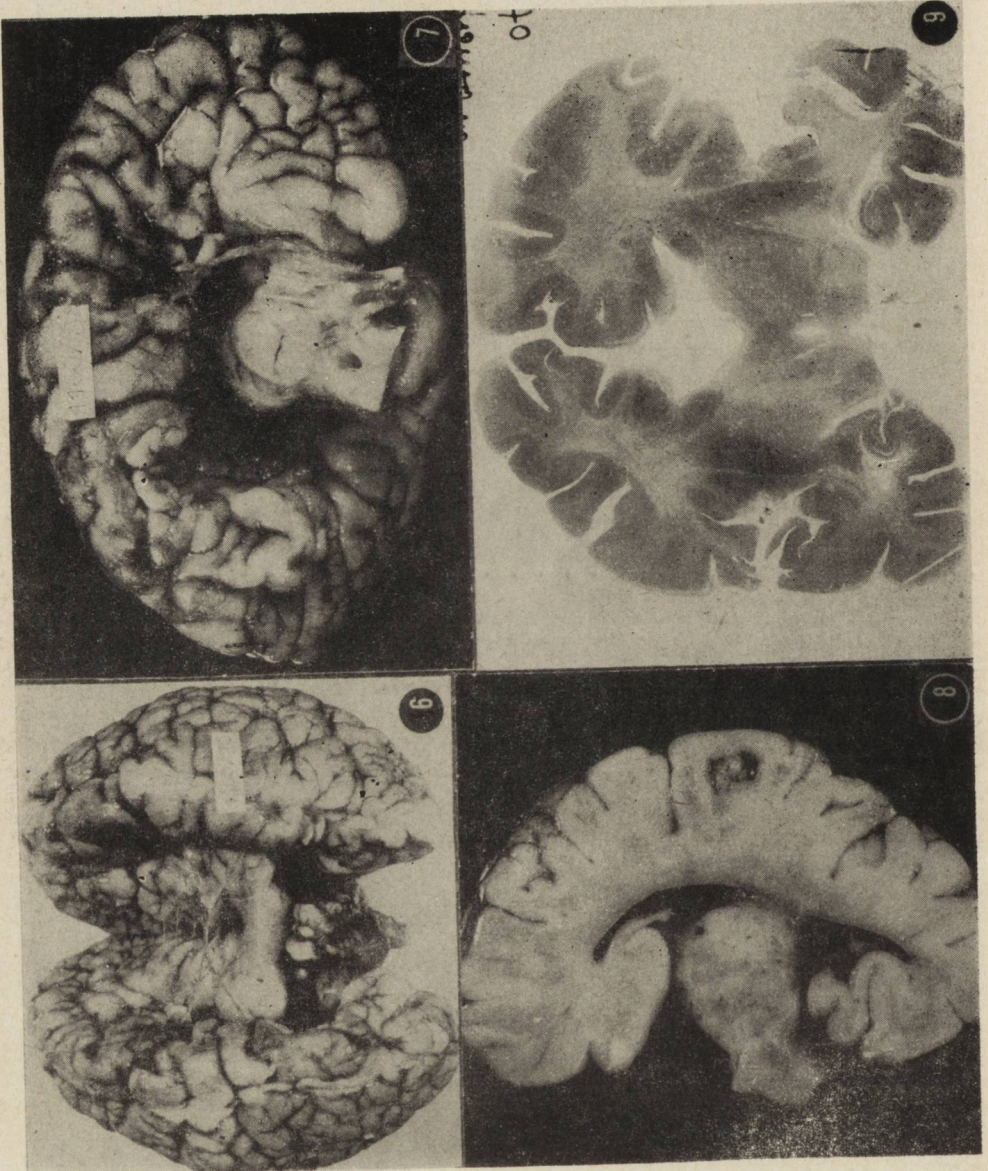
Zmiany występujące w 12 opracowanych przypadkach przedstawia tabela 1. Trzy przypadki dotyczyły niemowląt zmarłych między 1 a 5 dniem życia. Stwierdzono u nich holoprosencefalię charakteryzującą się zaburzeniem w podziale półkul mózgowych (ryc. 1). Podział ten rozpozynał się na poziomie tylnej części pojedynczego płata czołowego. Rogi przednie komór bocznych przedstawiały się jako poprzeczna szpara, natomiast rogi dolne i tylne w parzystych już płatach skroniowych i potylicznych były normalnie wykształcone (ryc. 2). Zwoje podstawy tworzyły wspólną masę, brak było komory III, w jednym przypadku w jej miejscu stwierdzono niewielką szparę wysłaną wyściółką. W nieprawidłowo ukształtowanych półkulach brak było całego układu spoidłowego przodomózgowia, a więc nie tylko spoidła wielkiego, ale również spoidła przedniego, sklepienia wraz ze spoidłem hipokampa, oraz przegrody przezroczystej. We wszystkich przypadkach stwierdzono zaburzenia rozwojowe w obrębie węchomózgowia. Temu powtarzającemu się zespołowi w dwu przypadkach towarzyszyły dyzgenезje wrzecionowatokomórkowe w obrębie jąder zębatych w mózdku (ryc. 3). W jednym z tych przypadków stwierdzono ponadto obecność dwujądrazstych neuronów w moście (ryc. 4, 5). U dwojga dzieci występował również niedorozwój gałek ocznych oraz rozszczep podniebienia, u wszystkich trojga — wady narządów wewnętrznych (serca, przepony) oraz palców rąk i nóg.

W następnych pięciu przypadkach agenezja spoidła wielkiego była całkowita, przy prawidłowo podzielonych półkulach (ryc. 6, 7). Dzieci te zmarły w pierwszych dwóch tygodniach życia. Agenezji spoidła wielkiego towarzyszył brak innych spoidel przodomózgowia. Komora III w dwóch przypadkach była szeroko otwarta ku górze, w dwóch była niedokształcona, w jednym przypadku otwarta ku podstawie mózgu (ryc. 8, 9, 10). We wszystkich przypadkach stwierdzono zaburzenia rozwojowe węchomózgowia, w trzech przypadkach jedynie brak opuszek i pasm węchowych, w dwóch pozostałych zmiany były większe, brak było warstwy komórkowej zakrętu zębatego (ryc. 11). W obrębie półkul mózgowych stwierdzono ponadto zaburzenia w różnicowaniu struktur szarych pod postacią heterotopii i nieprawidłowości w różnicowaniu pasma kory. W jednym przypadku stwierdzono, podobnie jak w grupie poprzedniej, dyzgenезje w jądrze zębatym. W czterech przypadkach występowały w układzie nerwowym zmiany należące do grupy dysrafii: przepuklina mózgowa (ryc. 12), rdzeniowa i dysrafia mózdku (ryc. 13). U dwojga dzieci istniały, podobnie jak w grupie poprzedniej, mnogie wady pozamózgowe.

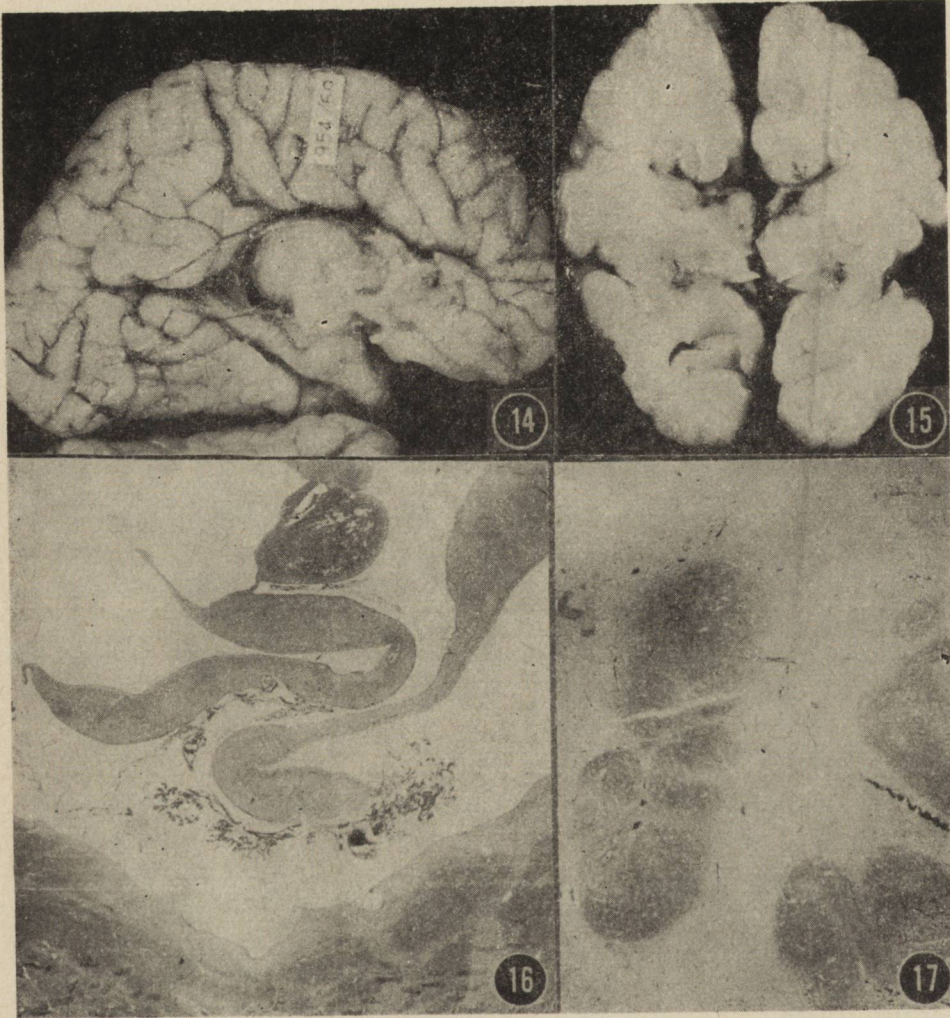
Ostatnie 4 przypadki charakteryzował częściowy niedorozwój spoidła wielkiego mózgu. Dzieci przeżyły od 1 do 9 miesięcy. W grupie tej za-







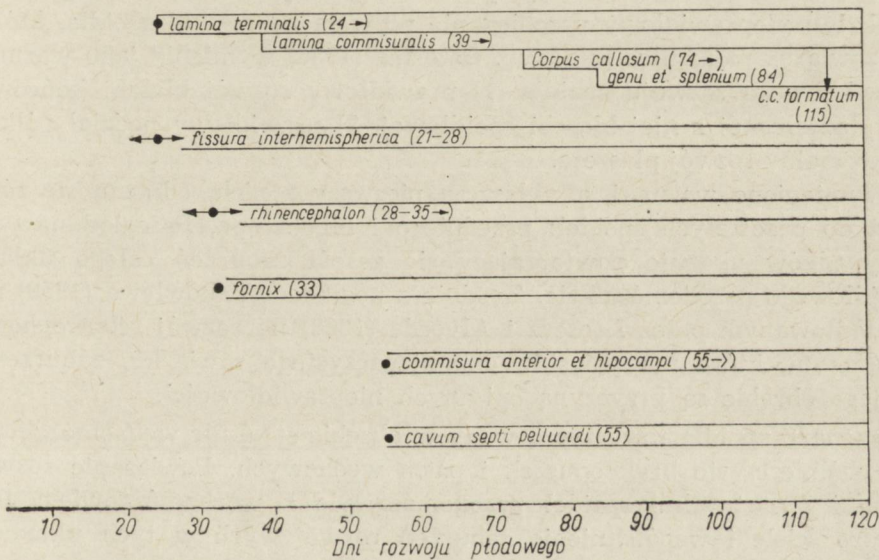




burzenia rozwojowe były łżejsze nie tylko w odniesieniu do *corpus callosum*, ale i pozostałych spoidel przodomózgowia, np. rozwój sklepienia był zaburzony w dwóch przypadkach (ryc. 14, 15, 16). Węchomózgowie wykazywało nieprawidłowości rozwojowe tylko w jednym przypadku. Zaburzenia migracji były niewielkie i polegały na nieprawidłowym wykształceniu zakrętów trzeciorzędowych. Obecność rozległych ognisk heterotopowych (ryc. 17) w istocie białej półkul stwierdzono tylko w jednym przypadku. W jednym przypadku obecna była dodatkowo przepuklina oponowa na poziomie lędźwiowym, w trzech przypadkach współistniały wady serca i innych narządów.

### OMÓWIENIE

Analiza przedstawionych 12 przypadków agenezji lub niedorozwoju spoidła wielkiego wskazuje, że powtarzają się w nich pewne zespoły współistniejących i współzależnych zaburzeń.



Schemat 1. Zestawienie rozwoju spoidła wielkiego i struktur z nim związanych w pierwszych 3 miesiącach życia płodowego.

Diagram 1. Development of the *corpus callosum* and connected structures in the first three months of fetal period.

Przypomnienie sekwencji rozwoju spoidła wielkiego i struktur z nim związanych (schemat 1) ułatwi wyodrębnienie nieprawidłowości, które mogą powodować zaburzenie ich rozwoju.

Zawiązek spoidła wielkiego powstaje wraz ze spoidłem przednim i spoidłem hipokampa w obrębie blaszki spoidłowej (*lamina commissuralis*), pochodzącej z blaszki końcowej (*lamina terminalis*). Proces ten rozpoczyna się w 4—5 tygodniu rozwoju zarodkowego. Wówczas kształtuje się blaszka końcowa (Ostertag 1956). W 6 i 7 tygodniu różnicuje się blaszka spoidłowa, można w niej wyodrębnić włókna spoidła przedniego i hipokampa (Loeser, Alvord 1968). Włókna spoidła wielkiego widoczne są nieco później, około 10 tygodnia rozwoju, najwcześniej w otoczeniu otworu międzykomorowego Monro. Spoidło wzrasta od przodu ku tyłowi, zakończenie jego rozwoju przypada na koniec 4 miesiąca życia płodowego (Larroche 1962, Loeser, Alvord 1968). Rozwój struktur spoidłowych zbiega się więc w czasie i jest ściśle powiązane z pojawieniem się symetrii dwubocznej mózgu czyli z powstaniem i wzrostem półkul mózgowych. Różnicowanie pęcherzyków półkulowych zaznacza się z końcem 4 tygodnia rozwoju i przebiega przez cały dalszy okres zarodkowy i płodowy. Zawiązek spoidła w obrębie *lamina commissuralis* stanowi niejako „drogę przejścia” dla aksonów kierujących się z jednej półkuli do drugiej. Ich brak lub nieprawidłowy przebieg nie pozwala na rozwój spoidła, którego zawiązek może ulec zanikowi. Ostertag (1956) wymienia jako warunki prawidłowego rozwoju spoidła: 1) prawidłowy rozwój blaszki końcowej i wykształconej z niej blaszki spoidłowej, 2) prawidłowy podział półkul, 3) normalny rozwój płaszcza.

Wymienione warunki, a zwłaszcza pierwszy z nich, odnoszą się również do pozostałych spoidel: przedniego i hipokampa. Przegląd naszych przypadków ukazuje powtarzający się zespół zaburzeń całego układu spoidłowego przodomózgowia. Zgodnie z poglądem Yakowlewa (1959) reprezentowanym przez Loesera i Alvorda (1968) na rozwój *telencephalon medianum*, które ma powstawać z nieparzystego zawiązku, zaburzenia w jego obrębie są przyczyną opisanych nieprawidłowości.

Agenezji spoidła towarzyszą wady w obrębie struktur wężomózgowia, szczególnie często brak opuszek i pasm wężowych. Powiązanie rozwojowe i strukturalne spoidel przodomózgowia z wężomózgowiem jest bardzo ściśle i współlistnienie zaburzeń rozwojowych w tych układach było niejednokrotnie opisywane (Morsier 1955).

Innym typem nieprawidłowości występującym szczególnie często w naszym materiale są różne formy zaburzeń migracji neuronów w półkulach mózgu. Trzeci z wymienionych powyżej warunków prawidłowego rozwoju spoidła przypomina, że wczesne (w 2—4 mies. rozwoju) i rozległe zaburzenia migracji neuronów w półkulach przed zakończeniem rozwoju *corpus callosum* mogą się przyczynić do jego wadliwego ukształtowania. Udział tego czynnika możemy podejrzewać w przypadku 10 (tabela 1). Drobne heterotopie, oraz rozwojowo późne (6—9 mies. rozwoju)

nieprawidłowości w uzwojeniu i budowie wewnętrznej kory należy oceniać jako zaburzenia wtórne w stosunku do braku spoidła, powodujących wadliwe połączenia międzypółkulowe.

Tabela 1. Zaburzenia rozwojowe stwierdzone w przebadanym materiale

Table 1. Developmental disturbances discovered in examined cases

	Nr przypadku Number of cases	21/63 PAN	721/68 PAM	201/69 PAM	13/69 PAN	11 60/70 IP	19/70 PAN	1183/71 IP	839/71 PAM	954/69 IP	48/69 PAN	709/71 PAM	655/71 PAM
Corpus callosum	Agenesia	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Hypoplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	Holoprosencephalia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Agenesia commissurae anterioris	+	+	+	+	+	+	?	-	-	+	-	-
	Agenesia s. hypoplasia fornicis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Agenesia s. malformatio septi pellucidi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vitia migrationis	Arrhinencephalia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	Heterotopiae profundae	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	Microgyria	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	Vitia corticis tardae	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	Alia	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dysraphia	Encephalocoele	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Meningocoele spin.	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
	Dysraphia cerebelli	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	Palatoshisis	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vitia cordis congenita	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	Malformationes multiples	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-

Nie ma uchwytnych powiązań przyczynowych między zaburzeniami rozwojowymi spoidła a wrzecionowatokomórkowymi dyzgenezjami w jądrze zębatym (które stwierdziliśmy w trzech przypadkach), a także wadami z grupy dysrafii (współistniejącymi w siedmiu przypadkach). Ustalenie momentu teratogenezy dla każdego z tych zaburzeń nie wskazuje również na istnienie powiązań czasowych między nimi a agenezją *corpus callosum*. Przy próbie systematyzacji zaburzeń organogenezy układu nerwowego Yakowlew (1959) potraktował dysrafię i holoprosencefalię z arinencefalią jako różne grupy wad.

Brak wyników badań genetycznych utrudnia ustalenie powiązań między współistniejącymi wadami w omawianych przez nas przypadkach. Holoprosencefalia z arinencefalią występują w przypadkach z trisomią 13—15 (Kakulos, Rosman 1965). Nie możemy wykluczyć tego zaburzenia kariotypu w przypadkach 1—3 naszej grupy. Morsier (1955) proponuje, aby agenezję *corpus callosum* przy podzielonych półkulach z współistniejącym brakiem opuszek węchowych również uznać za „zespół uwarunkowany genetycznie”, nie popiera jednak swej propozycji wynikami badań genetycznych.

W klasycznych przypadkach dysrafii nie stwierdzono dotąd występowania powtarzających się zaburzeń w kariotypie, wydaje się natomiast, że można mówić o rodzinnym występowaniu wad tej grupy pod wpływem dodatkowego oddziaływania czynników egzogennych (Polman 1950, Hoffman 1965). Znaczenie zewnątrzpochodnych uszkodzeń w patogenezie tego typu zaburzeń rozwojowych było niejednokrotnie podkreślane (Yakowlew 1959). W tych spośród naszych przypadków, w których stwierdziliśmy liczne wady układu nerwowego nie wiążące się w zespoły przyczynowo-skutkowe, podejrzewamy również uszkadzający wpływ czynników zewnątrzpochodnych, działających na układ nerwowy płodu w różnych okresach organogenezy.

Zebrany przez nas materiał składa się z przypadków, które zmarły w większości w pierwszych dniach po urodzeniu, najdłuższe przeżycie wynosiło 9 miesięcy. Z przeglądu 146 przypadków dokonanego przez Unterharmscheidta i wsp. (1968) wynika, że większość osobników z agenezją spoidła wielkiego wykazuje tylko niewielkie zaburzenia neurologiczne i żyje wiele lat. Analiza naszych przypadków w zestawieniu z materiałem Unterharmscheidta i wsp. (1968) wskazuje, że złożone zespoły wad, szczególnie powstałe we wczesnym okresie rozwoju są czynnikiem pogarszającym w sposób zasadniczy rokowanie co do życia dzieci.

М. Домбска, Е. Кульчицки, В. Шмидт-Сидор, Е. Герц

#### МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ 12 СЛУЧАЕВ С АГЕНЕЗИЕЙ ИЛИ ГИПОПЛАЗИЕЙ МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА

##### Резюме

Авторы проводят морфологический анализ 12 случаев с отсутствием или неполным развитием мозолистого тела относительно хода развития нервной системы. Было обнаружено, что определенные группы совместно выступающих нарушений развития повторяются. Полное отсутствие мозолистого тела выступает, как правило, наряду с нарушениями в развитии других комиссур переднего мозга, что можно рассматривать как проявление нарушений развития структур средней линии. Сопровождается оно нарушениями в области обонятельного мозга связанного в своем развитии и структурно с комиссурной си-

стемой. Нарушения и миграции нейронов в полушариях мозга можно иногда расценивать как первичные по отношению к нарушению развития мозолистого тела, но чаще их следует расценивать как вторичные. Наряду с нарушениями мозолистого тела имеют место нарушения, которые трудно связать с ними причинной зависимостью. Последние особенно часто принадлежат к группе дисрафии. В этих случаях можно предполагать влияние экзогенных факторов, воздействующих в течение более продолжительного времени в период внутриутробного развития нервной системы.

M. Dąbwska, J. Kulczycki, B. Schmidt-Sidor, J. Goertz

#### AGENESIA AND HYPOPLASIA OF CORPUS CALLOSUM

Morphological study of 12 cases

#### Summary

A morphological study of 12 cases of agenesia or hypoplasia of *corpus callosum* was performed with regard to the course of development of the central nervous system. The coexistence of some of the development disturbances was found to recur. Agenesia of *corpus callosum* appears as a rule together with anomalies in the development of the other prosencephalic commissures as an expression of the developmental disturbances of the midline structures. This is accompanied by malformations within rhinencephalon which is developmentally and structurally related to the commissural system. The disturbances in the migration of neurons in the cerebral hemispheres may sometimes be considered as primary, but more often as secondary with regard to hypoplasia of *corpus callosum*. Moreover, the disturbances of the commissural system were found to coincide with some anomalies which do not seem to be causally related to the former. These anomalies frequently belong to the group of dysraphia. In these cases, a long-term influence of exogenous factors during the embrional development of the central nervous system may be assumed.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Hoffman E. P.: The Problems of spina bifida and cranium bifidum. *Clinical Pediatrics*, 1965, 4, 709—716.
2. Kakulas B. A., Rosman N. P.: 13—15 Trisomy in eight cases of arrhinencephaly, 1965, 2, 717—718.
3. Larroche J. C.: Quelques aspects anatomiques du developpement cérébral. *Biol. Neonat.* 1962, 4, 126—153.
4. Loeser, J. D., Alvord E. C.: Agenesia of the corpus callosum, *Brain* 1968, 91, 553—570.
5. Morsier G.: Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques Agénésie des lobes olfactifs et des commissures calleuse et anterieur. La dysraphie olfacto-génitale. *Schweiz. Arch. Neurol. Psych.* 1955, 74, 309—361.
6. Ostertag B.: Die Einzelformen der Verbildungen. *Handbuch der Spez. Path. Anat. u. Histologie*, Springer — Verlag, Berlin 1956, XIII/4, 363—601.



7. Polman A.: An encephaly spina bifida and hydrocephaly. *Genetic*, 1950, 25—29.
8. Unterhamscheidt F., Jachnik D., Göff H.: *Der Balkenmangel*. Springer Verlag Berlin, 1968.
9. Yakowlew P. I.: Arrhinencephalies. *J. Neuropath. Exper. Neurol.*, 1959, 18, 22—55.

Adres autora: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3.

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Przyp. 201/68. Niepodzielone bieguny czołowe.

*Fig. 1.* Case 201/68. Undivided frontal poles.

*Ryc. 2.* Przyp. 201/68. Brak *corpus callosum* i *fornix*. Niepodzielone komory boczne. Wspólna masa zwojów podstawy, brak komory III.

*Fig. 2.* Case 201/68. Agenesis of *corpus callosum* and *fornix*. Undivided lateral ventricles. Common mass of basal ganglia, lack of the IIIrd ventricle.

*Ryc. 3.* Przyp. 721/68. Dysgenезja w jądrze zębatym w mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 300×.

*Fig. 3.* Case 721/68. Disgenesis in the nucleus dentatus in cerebellum. Cresyl violet. ×300.

*Ryc. 4 i 5.* Przyp. 721/69. Dwujądrazaste neurony w moście. H-E. Pow. 600×.

*Fig. 4 and 5.* Case 721/69. Binuclear neurons in pons. H-E. ×600.

*Ryc. 6.* Przyp. 1160/70. Całkowity brak spoidła przy podzielonych półkulach.

*Fig. 6.* Case 1160/70. Agenesis of corpus callosum. Hemispheres divided.

*Ryc. 7.* Przyp. 1160/70. Brak spoidła, sklepienia oraz zakrętu obręczy. Zwoje podstawy podzielone.

*Fig. 7.* Case 1160/70. Agenesis of *corpus callosum*, *fornix* and *gyrus cingulus*. Basal ganglia divided.

*Ryc. 8.* Przyp. 1160/70. Przy braku *corpus callosum* widoczny jedynie pęczek włókien podłużnych Probst.

*Fig. 8.* Case 1160/70. Agenesis of *corpus callosum*. Visible exclusively a bundle of longitudinal fibres (Probst).

*Ryc. 9.* Przyp. 19/70. Brak układu spoidłowego przodomózgowia. Zaburzenia w budowie zakrętu obręczy. Niedokształcona komora III. Pow. 1,5×.

*Fig. 9.* Case 19/70. Agenesis of the commissural system of prosencephalon. Structural disturbances in *gyrus cinguli*. Uncompletely developed IIIrd ventricle. ×1,5.

Ryc. 10. Przep. 13/69. Tępo zakończony pęczek włókien podłużnych w miejscu spoidła. Fiolet krezyłu. Pow. 10×.

Fig. 10. Case 13/69. Bluntly terminated longitudinal fibres bundle in place of corpus callosum. Cresyl violet. ×10.

Ryc. 11. Przep. 13/69. Róg Amona bez pasma komórkowego zakrętu obręczy. Fiolet krezyłu. Pow. 12×.

Fig. 11. Case 13/69. Ammon horn without cellular band of *gyrus cingulus*. Cresyl violet, ×12.

Ryc. 12. Przep. 1183/71. Przepuklina mózgowia w okolicy potylicy.

Fig. 12. Case 1183/71. Cerebral hernia in the occipital region.

Ryc. 13. Przep. 1183/71. Niespojenie mózdzku w linii robaka. H-E. Pow. 12×.

Fig. 13. Case 1183/71. Unjoined cerebellar hemispheres in the vermis line. H-E. ×12.

Ryc. 14. Przep. 954/69. Spoidło wielkie ograniczone do cienkiego pęczka włókien.

Fig. 14. Case 954/69. *Corpus callosum* limited to a thin bundle of fibres.

Ryc. 15. Przep. 954/69. Niedorozwój *corpus callosum*. Sklepienie i spoidło przednie dobrze ukształtowane.

Fig. 15. Case 954/69. Hypoplasia of *corpus callosum*. *Fornix* and anterior commissure developed.

Ryc. 16. Przep. 48/69. Spoidło kończy się dwoma odnogami na poziomie centralnej części zwojów podstawy. Brak *splenium*. H-E, Pow. 1,5×.

Fig. 16. Case 48/69. *Corpus callosum* terminating with two branches on the level of the central part of basal ganglia. Absence of *splenium*. H-E, ×1,5.

Ryc. 17. Przep. 48/69. Heterotopia w istocie białej i nieprawidłowe ukształtowanie pasma kory. H-E. Pow. 2×.

Fig. 17. Case 48/69. Heterotopy in the white matter and irregular arrangement of a band of cortex. H-E, ×2.

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO, DANUTA PIETROW, LUCJAN WELBEL

## PRZYPADEK GRANULOMATYCZNEGO ZAPALENIA MÓZGU

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego

Kierownik Zakładu: doc. dr med. J. Dymecki

I Klinika Psychiatryczna Instytutu Psychoneurologicznego

Kierownik Kliniki: prof. dr med. J. Jaroszyński

Celem pracy była analiza strukturalna i topograficzna zmian morfologicznych w bardzo rzadko występującej postaci zapalnego schorzenia układu nerwowego i konfrontacja obrazu patomorfologicznego z klinicznie obserwowanym zespołem zaburzeń psychicznych.

### OPIS PRZYPADKU

U chorego, od lat nadużywającego alkoholu, w 38 roku życia wystąpiła choroba reumatyczna, po roku objawy zespołu urojeniowego. W piątym roku schorzenia rozwinął się pełny zespół urojeniowo-depresyjny z zaburzeniami pamięci, które doprowadziły do przerwania zajęć zawodowych. W ciągu następnych 3 lat utrzymywały się objawy paranoidalne o różnym nasileniu. W 8 roku choroby pacjent przeżył kilkutygodniowy ostry epizod gorączkowy bez uchwytnej przyczyny. W ciągu następnych 7 lat miewał nawroty podwyższonej temperatury i bóle głowy, pogłębiały się zaburzenia pamięci. W 16 roku choroby został przyjęty do Kliniki Psychiatrycznej Instytutu Psychoneurologicznego z objawami zaburzenia przytomności typu delirijnego, które wkrótce przeszły w kilkugodzinny stan śpiączkowy. W trakcie 7 tygodniowego pobytu w Klinice obserwowano zaburzenia psychiczne w postaci zespołu amnestycznego o dość znacznym nasileniu. Somatycznie stwierdzono upośledzenie odżywiania, rozedmę płuc. Neurologicznie — dyskretne objawy rozsianego uszkodzenia mózgu. W 7 tygodniu pobytu na Oddziale chory nagle stracił przytomność, po godzinie wystąpiła seria uogólnionych napadów padaczkowych. Chory zmarł wśród objawów niewydolności krążenia w wieku 54 lat. Odchylenia w badaniach dodatkowych: OB okresowo podwyższony do 30/65, płyn mózgowo-rdzeniowy — podwyższona ilość limfocytów w 7 i 16 roku choroby do 9 w 1 mm. EEG (16 rok choroby):

zapis patologiczny o zmianach znacznego stopnia, rozlanych, pod postacią bardzo licznych pojedynczych i w seriach niekształtnych fal 3—6/sek. średnio- i wysokonapięciowych, na tle zmienionego rytmu podstawowego.

W toku obserwacji klinicznej rozpoznawano kolejno schizofrenię paranoidalną, psychozę reumatyczną i ostatecznie w Klinice Psychiatrycznej Instytutu Psychoneurologicznego nawracającą przewlekłą psychozę paranoidalną o podłożu organicznym (reumatyczną?, alkoholową?), zespół amnestyczny. Krwotok do ogniska rozmiękania?

Sekcja ogólna wykazała rozległe stłuszczenie mięśnia sercowego, obrzęk płuc oraz zmiany miażdżycowe w tętnicy głównej. W układzie siateczkowo-śródbłonkowym nie znaleziono zmian. W makroskopowym badaniu mózgu stwierdzono zbliźnowacenie jądra migdałowatego oraz rogu amona w prawej półkuli. Do badania mikroskopowego pobrano skrawki przez półkule, które po zatopieniu w parafinie krojono w serii nieciągłej. Zastosowane metody barwienia: hematoksylina-eozyna, fiolet krezyłu, błękit toluidyny, van Gieson, Weil, Kanzler-Arendt, Bielschowsky, Perdrau, PAS, karmin Besta, błękit alcjanu, kwaśny fiolet krezyłu.

Wynik badania mikroskopowego. Podstawowy element procesu chorobowego stanowi rozplem komórkowy rozlany (ryc. 1) lub grudkowy (ryc. 2) oraz wielorzędowe, mufkowate nacieki okołonaczyniowe (ryc. 3). W proliferacji komórkowej biorą głównie udział komórki wielokątne lub owalne z jasną, słabo barwiącą się protoplazmą i pęcherzykowatym jądrem (ryc. 4). Komórki te co najmniej trzykrotnie przekraczają wielkością limfocyty i wg Stammlera i Cervós — Navarro (1965) odpowiadają retikulocytom a przez Feigina (1969) określane są jako nieodróżnicowane komórki mezenchymalne. Cytoplazma tych komórek, zwłaszcza zgrupowanych w otoczeniu naczyń, zawiera drobne ziarenka wykazujące metachromazję gamma, barwiące się dodatnio metodą PAS, błękitem alcjanu oraz błękitem toluidyny. W ziarninie obecne są ponadto limfocyty, komórki plazmatyczne, w niewielkiej ilości fibroblasty i makrofagi oraz liczne progresywnie zmienione astrocyty protoplazmatyczne (ryc. 5).

Rozplem komórkowy obserwowano w ścianach naczyń różnego kalibru oraz w przestrzeni okołonaczyniowej w postaci wielorzędowego mankietu, który otaczał poszczególne naczynia i szerzył się ławicowo w głąb tkanki (ryc. 6) tracąc pozornie łączność z naczyniem. Jednak i wśród pól masywnej proliferacji komórkowej, zwłaszcza w ich częściach brzeżnych, widoczne było odnaczyniowe pochodzenie rozmnażających się komórek. W polach rozplemu komórkowego stwierdzono obecność włókien retikuliniowych (ryc. 7), bardziej licznych w otoczeniu naczyń oraz zgęszczenie tkanki, zwłaszcza w centralnych częściach obszarów proliferacji komórek mezenchymalnych (ryc. 8).

Opisane zmiany zlokalizowane były zarówno w istocie białej jak i w korze, głównie w obrębie struktury amonalnej, w grzbietowo-przyśrodkowych częściach wzgórza oraz w głowie i w trzonie jądra ogoniastego. Nasilały się one w kierunku okolicy podwysięiółkowej istoty białej, zmniejszały się w kierunku podwzgórza i części nakrywkowej pnia mózgu. W podwzgórzu grudkowe skupienia obserwowano głównie w jądrach suteczkowatych. Największe zmiany obserwowano w okolicy komór bo cznych i komory III, wodociągu Sylwiusza i komory IV. Ponadto w korze i w istocie białej zakrętu skroniowo-potylicznego i zakrętu obręczy były obecne grudkowe skupienia komórek. W pozostałych okolicach kory poszczególne naczynia drobnego i średniego kalibru otoczone były kilkurzędowymi naciekami, w których udział komórek retikulo-histocytarnych zmniejszał się, zwiększała się natomiast liczba limfocytów. Podobne zmiany obserwowano sporadycznie w oponach. Poza tym w III i V warstwie kory mózgowej stwierdzono ubytki komórek nerwowych, a na dnierowków zgąbczenie tkanki. Ilość komórek nerwowych we wzgórzu, łupinie, gałce bladej i w istocie siateczkowatej pnia mózgu uległa zmniejszeniu. Komórki barwikonośne istoty czarnej i *locus coeruleus* pozbawione były często barwika. Zachowane komórki kory mózgowej i struktur szarych podkorowych wykazywały często schorzenie przewlekłe lub stłuszczenie, sporadycznie obserwowano zmiany ciężkie. W istocie białej zakrętu hipokampa oraz w polach zgąbczeń spowodowanych rozplemem tkanki mezenchymalnej obserwowano spłowienie i częściowy rozpad osłonek mielinowych. W korze i istocie białej spotykano rozproszone komórki pałeczkowate, w okolicy podwysięiółkowej stwierdzono wzmożoną glejozę włóknistą oraz włókna Rosenthala. Naczynia drobnego kalibru w korze często były zwłókniałe, a w pniu mózgu zeszkliwiałe.

#### OMÓWIENIE

W ustaleniu rozpoznania braliśmy pod uwagę reumatyczne zapalenie mózgu i schorzenia o charakterze blastomatycznym jak *microgliomatosis* (Russel i wsp. 1948) lub „reticulum cell sarcoma” (Kernohan, Uihlein 1962).

W reumatycznym zapaleniu mózgu uszkodzenie układu naczyniowego jest uogólnione, nacieki nie są tak obfite i dominują w nich limfocyty i komórki plazmatyczne, a odczyn ze strony mikrogleju z tworzeniem charakterystycznych grudek (Costero 1949) jest bardziej nasilony. Reakcja granulomatyczna, o ile występuje, nie jest tak wybitna jak w naszym przypadku (Osetowska i Mandybur 1961, Osetowska 1966). Obraz uzupełniają zmiany o typie uogólnionej encefalopatii z martwicami.

W naszym przypadku nie wykazano również w ziarniniakach cech anaplazji właściwej procesom nowotworowym, ponadto znaczny udział lim-

focytów i komórek plazmatycznych w naciekach pozwolił na wykluczenie procesu blastomatycznego. Wytwórczy charakter reakcji tkankowej i skład ziarniniaków pozwoliły na rozpoznanie granulomatycznego zapalenia mózgu. Jest to pierwotny, przewlekły proces zapalny układu nerwowego, którego etiopatogeneza nie jest dotychczas ostatecznie wyjaśniona. Charakterystyczną cechą schorzenia jest tworzenie ziarniniaków zbudowanych z komórek mezenchymalnych, dominujących nad pozostałymi odczynami cechującymi proces zapalny (Wilke 1956, Cervós-Navarro 1958, Cervós-Navarro i wsp. 1960, Stammmler, Cervós-Navarro 1965, Dymecki i wsp. 1966). Zmiany zapalne zlokalizowane są w większości przypadków okołokomorowo, poza tym opisywano je w międzymózgowiu, w jądrach podstawy, w pniu mózgu, w półkulach mózgu oraz w oponach (Ayala 1934, Stammmler, Cervós-Navarro 1965, Stocka-Muszyńska 1970). Przyczyną zapalenia granulomatycznego mózgu, mieszczącego się w grupie klasyfikacyjnej alergicznych zapaleń ośrodkowego układu nerwowego (Osetowska 1968) może być czynnik wywołujący hiperergiczną czy alergiczną reakcję tkankową układu nerwowego (Brucher, Matthijs 1960, 1961) lub proces autoimmunologiczny (Stocka-Muszyńska 1970) objawiający się rozrostem komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego. Rozrost ten może być spowodowany przez zakażenie, najprawdopodobniej wirusowe (Berry, Borkowski 1959, Cervós-Navarro i wsp. 1960, Gautier i Guazzi 1961, Osetowska 1966 i inni).

W przedstawionym przypadku proces zapalny poprzedzony był chorobą reumatyczną, a w jego przebiegu pojawiały się wielokrotnie nie wyjaśnione epizody podwyższonej temperatury, które mogą wskazywać na udział czynnika infekcyjno-alergizującego. W przypadkach z wywiadem reumatycznym zwracano uwagę na przewagę zaburzeń psychicznych w obrazie klinicznym (Bruetsch 1949, Bruetsch, Clifford 1959, Costero 1949). Obserwowane w naszym przypadku stany deliryjno-komatyczne oraz pogłębiający się zespół amnestyczny były odpowiedzią na proces chorobowy toczący się w strukturach amonalnych i w tylnym podwzgórzu. Tego typu zespoły przy uszkodzeniu wymienionych struktur opisali Grünthal (1947), Uhle (1951), Orthner (1957), Delay i wsp. (1958) oraz Störing i wsp. (1962).

Obecne w naszym przypadku, dotychczas nie opisane, substancje metachromatyczne w komórkach siateczkowo-śródbłonkowych, mające cechy histochemiczne kwaśnych mukopolysacharydów mogą być interpretowane jako wyraz uszkodzenia układu enzymatycznego komórki przez czynnik egzogeny (Friede 1962), które może prowadzić do zaburzenia przemiany wewnątrzkomórkowej w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (Cammermeyer 1967).

Е. Тарновска-Дзидушко, Д. Петров, Л. Велбель

### СЛУЧАЙ ГРАНУЛОМАТИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

#### Резюме

Представлен случай пациента, у которого в 38 году жизни появился бредовой симптомокомплекс, к которому в дальнейшем добавились признаки деменции и временно нарушения сознания типа делириум. На 16 году болезни пациент умер после серии грандиозных эпилептических приступов.

Нейропатологическое исследование обнаружило многочисленные, периваскулярные, многоядные инфильтраты, образованные ретикулоцитами, лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами, а также гигантскими клетками. Сопутствовала им обильная астроцитарная и микроглиальная реакция. Самая большая выраженность воспалительных изменений имелась вокруг III желудочка, височного рога бокового желудочка, а также вокруг силвиего водопровода и IV желудочка.

Кроме описанных очаговых изменений наблюдалась рассеянная реакция микроглии в коре и в белом веществе, а также разные виды дегенерации нервных клеток.

В работе обсуждается патомеханизм изменений, а также связь морфологической картины с клиническим синдромом.

E. Tarnowska-Dziduszko, D. Pietrow, L. Welbel

### A CASE OF GRANULOMATOUS ENCEPHALITIS

#### Summary

A case of a patient is presented in whom in the age of 38 years a paranoid syndrom appeared, joined later by symptoms of dementia and periodically by conscience disturbances of deliric type. The patient died in the 16 years of the disease after a series of epileptic seizures. Neuropathological examination revealed numerous perivascular cuffings composed of reticulocytes, lymphocytes, plasmacytes, compound granular cells and giant cells. These infiltrates were accompanied by abundant astrocytic and microglial reaction. Inflammatory changes of the greatest intensity were observed in the vicinity of the IIIrd ventricle, temporal horn of the lateral ventricle as well as around the aqueduct and the IVth ventricle. Beside the above described focal changes, diffuse microglial proliferation in the cortex and white matter and various forms of degenerative changes in the neurons were observed.

The pathomechanism of the changes and the relation of the morphological picture to the clinical syndrome are discussed.

#### PISMIENNICTWO

1. Ayala M. G.: Syndrom végétatif: méningo-encéphalite hypothalmique stricte-ment limitée (hipothalmo-méningite), Rev. Neurol., 1934, 61, 975—978.
2. Berry R. C., Borkowski W. J.: An unusual subacute „granulomatous” encephalitis, J. Neuropath. and Exp. Neurol. 1959, 18, 336—337.

3. Brucher J. M., Matthijs E.: A propos d'une observation d'encephalite granulomateuse reticulo-histiocytaire, *Acta Neurol. Psychiat. Belg.* 1960, 60, 943—954.
4. Brucher J. M., Matthijs E.: A case of granulomatous reticulo-histiocytic encephalitis. w *Encephalitides*, Elsevier, Amsterdam 1961, 148—158.
5. Bruetsch W. L.: Sedimentation rate and white blood count in mental patients with rheumatic brain disease, *Amer. J. of Psychiat.*, 1949, 104, 20—26.
6. Bruetsch W. L., Clifford L. W.: Embolic cerebral sequel in rheumatic mental stenosis precipitating senile mental deterioration. *Amer. J. of Psychiat.* 1959, 116, 364—366.
7. Cammermeyer J.: Microglia cells in diffuse and granulomatous encephalitis in the rabbit, *Acta Neuropath. (Berlin)*, 1967, 7, 261—274.
8. Cervós-Navarro J.: Encephalitis granulomatosa reticulo-histiocitaria, *Trav. Inst. Cajal Invest. Biol.* 1958, 49, 123—134.
9. Cervós-Navarro J., Hübner G., Puckstein G., Stammli A.: Die Pathomorphologie der reticulo-histiocytären granulomatösen Encephalitis, *Frankf. Z. Path.* 1960, 70, 458—477.
10. Costero I.: Cerebral lesions responsible for death of patients with active rheumatic fever, *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1949, 62, 48—72.
11. Delay J., Brion S., Elissalde B.: Corpus mamillaires et syndrome de Korsakoff, *La Presse Medicale*, 1958, 83, 1849—1852; 1958, 88, 1965—1968.
12. Dymecki J., Wald I., Gadomska B.: Granulomatous encephalitis with multifocal demyelination, *Neuropat. Pol. Suppl. IV*, 1966, 730—733.
13. Feigin I.: Mesenchymal tissues of the nervous system, *J. Neuropath. Exp Neurol.* 1969, 28, 6—24.
14. Friede R. L.: An enzyme histochemical study of cerebral arteriosclerosis, *Acta Neuropath. (Berlin)*, 1962, 2, 58—72.
15. Gautier J. C., Guazzi G. C.: Reactions granulomateuses dans les encephalites primitives, *Rev. Neurol.* 1961, 104, 24—31.
16. Grünthal E.: Über das klinische Bild nach umschriebenem beiderseitigem Auf-fall der Ammonshornrinde, *Mshr. Psychiat. Neurol.* 1947, 113, 1—16.
17. Kernohan J. W., Uihlein A.: Sarcomas of the brain, *Ch. Thomas, Springfield USA* 1962.
18. Orthner H.: Pathologische Anatomie der vom Hypothalamus ausgelösten Bewusstseinstörungen, I *Congrès International des Sciences Neurologiques* 21—28. III.1957, Le Editions „Acta Medica Belgica” Bruxelles 1957, 77—96.
19. Osetowska E., Mandybur T.: Pierwotne reumatyczne zapalenie mózgu. *Pol. Tyg. Lek.* 1961, 23, 869—875.
20. Osetowska E.: Modalites et significations de reactions encephalitiques du type granulomateux, *J. Neurol. Science* 1966, 3, 382—398.
21. Osetowska E.: Zasady rozpoznawania i klasyfikacja neuropatologiczna zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych, *Neuropat. Pol.* 1968, VI, 109—120.
22. Russel D. S., Marshall A. H. E., Smith F. B.: Microgliomatosis. A form of reticulosis affecting the brain, *Brain* 1948, 71, 1—14.
23. Stammli A., Cervós-Navarro J.: Die retikulo-histiozytäre granulomatöse Encephalitis, *Fortsch. Neurol. Psychiat.* 1965, 33, 1—25.
24. Stocka-Muszyńska Z.: Granulomatyczne zapalenie mózgu, *Rozprawa doktorska*, Lublin 1970.
25. Störing G. E., Hauss K., Uhle G.: Zur topischen Diagnostik des amnestischen Symptomenkomplexes. *Psychiat. Neurol. (Basel)*, 1962, 143, 161—177.

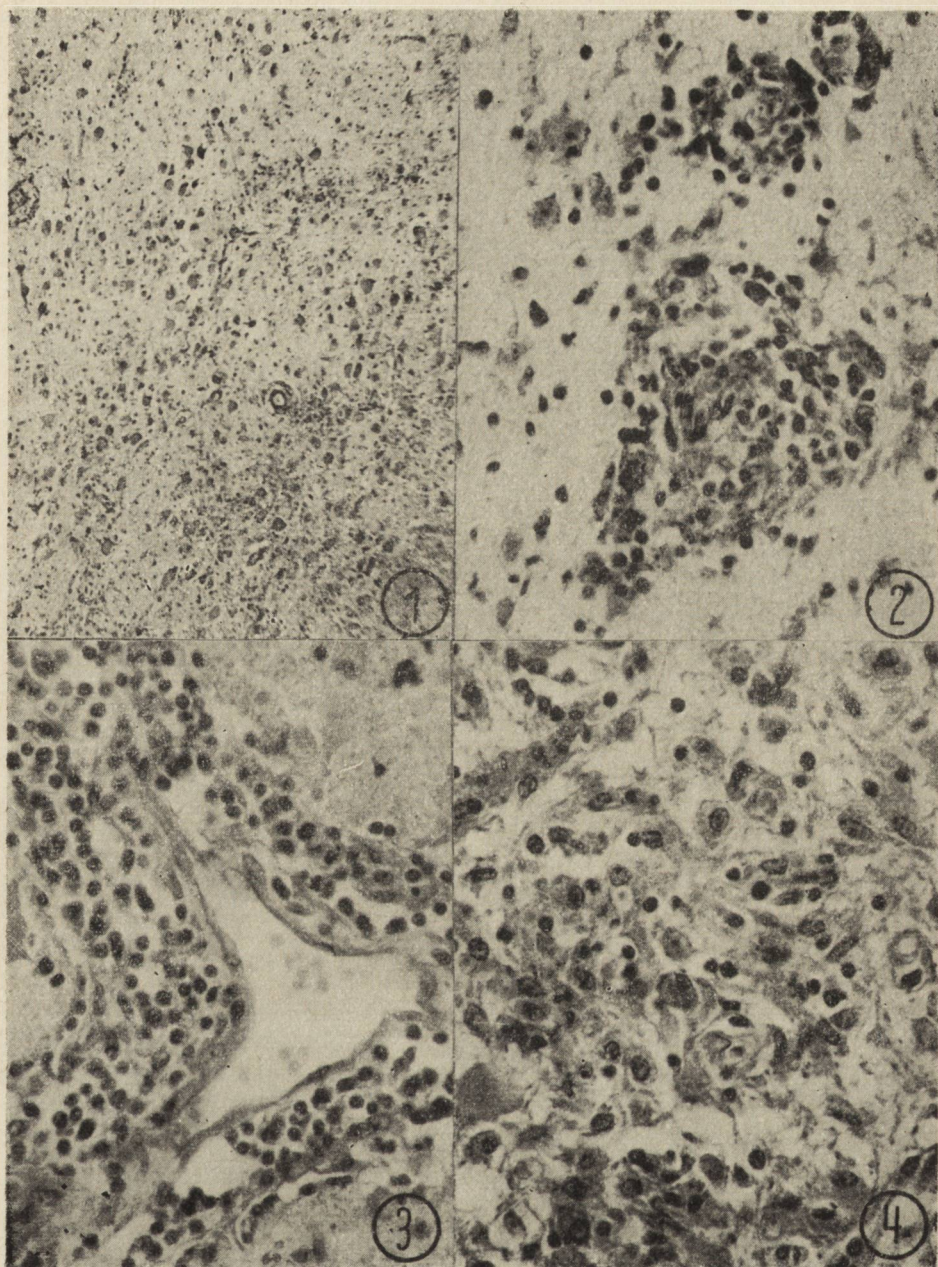


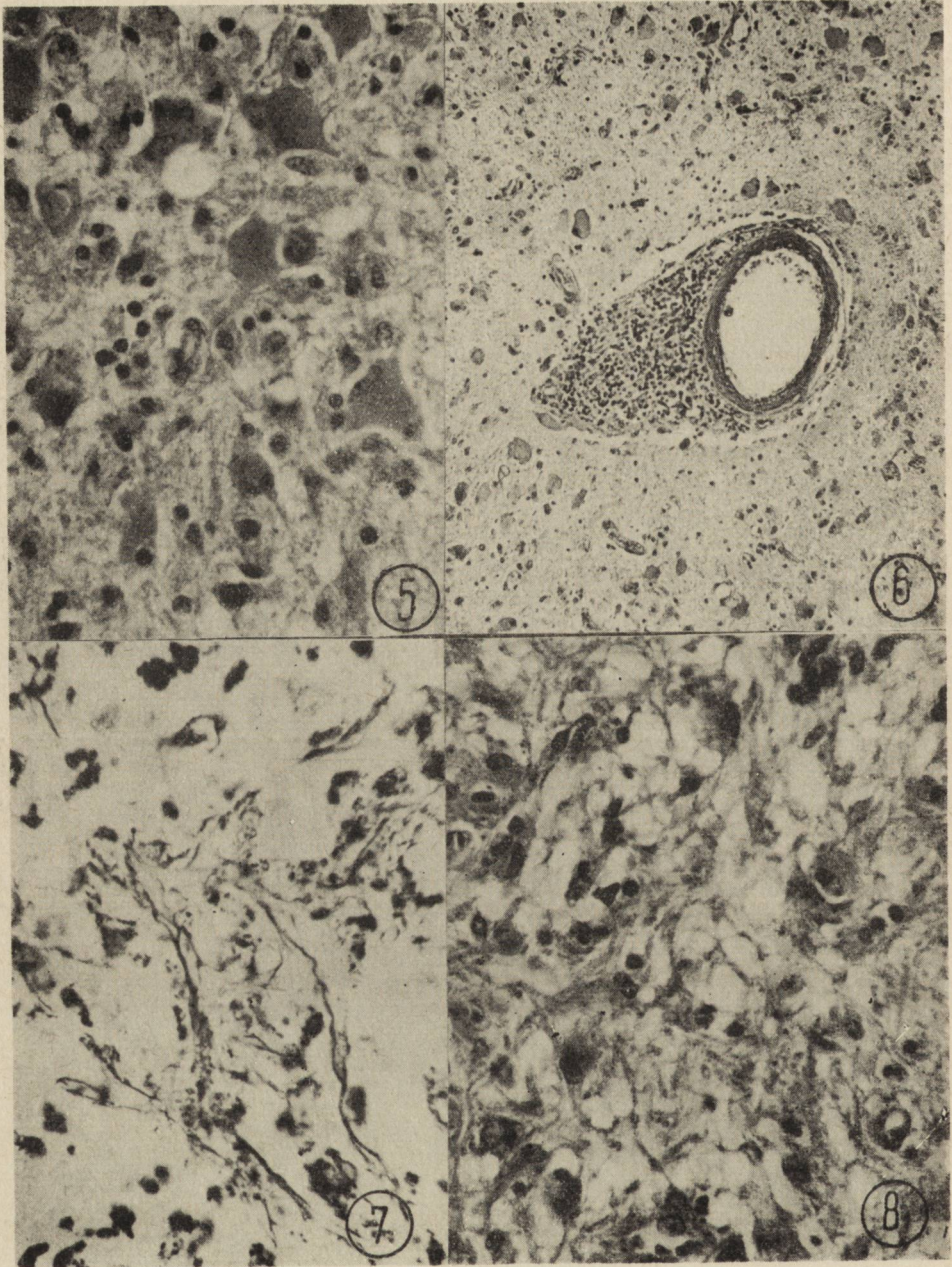
26. Uhle G.: Korsakow-Psychose nach doppelseitiger Ammonshornzerstörung mit transneuronaler Degeneration der Corpora mamillaria, Dtsch. Z. Nervenheilk, 1951, 165, 446—456.
27. Wilke G.: Die granulomatöse Encephalitis mit Bezug auf bekannte und unbekannte Ätiologie, Nervenarzt, 1956, 27/6, 244—251.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii. Instytut Psychoneurologiczny, 02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9.

## PODPISY POD RYCINY

- Ryc. 1.* Rozlany rozplę komórkowy w jądrze ogoniastym. H-E. Pow. 60×.  
*Fig. 1.* Diffuse cellular proliferation in the caudate nucleus. H-E. ×60.
- Ryc. 2.* Grudkowy rozplę komórkowy. Fiolet krezyłu. Pow. 400×.  
*Fig. 2.* Nodular cellular proliferation. Cresyl violet. ×400.
- Ryc. 3.* Wielorzędowe mufkowate nacieki okołonaczyniowe. H-E. Pow. 400×.  
*Fig. 3.* Perivascular inflammatory cuffs. H-E. ×400.
- Ryc. 4.* Przeważające w nacieku komórki wielokątne lub owalne ze słabo barwiącą się cytoplazmą i pęcherzykowatym jądrem. H-E. Pow. 400×.  
*Fig. 4.* Infiltrate with predominating polyangular or oval cells with weakly staining cytoplasm and vesicular nucleus. H-E, ×400.
- Ryc. 5.* Astrocyty protoplazmatyczne zmienione tucznie na pograniczu ogniska rozplę komórkowego. H-E. Pow. 400×.  
*Fig. 5.* Gemistocytic astrocytes on the border of cellular proliferation focus. H-E. ×400.
- Ryc. 6.* Ławicowe rozprzestrzenianie się nacieku od naczynia w głąb tkanki. H-E. Pow. 100×.  
*Fig. 6.* Penetration of infiltrate elements from vessel inside the tissue. H-E. ×100.
- Ryc. 7.* Włókna retikulinoe w polu rozplę komórkowego. Barw. met. Perdraua. Pow. 400×.  
*Fig. 7.* Reticulin fibres in the area of cellular proliferation, Perdrau stain. ×400.
- Ryc. 8.* Gąbczaste rozluźnienie struktury w centralnej części ziarniny. H-E. Pow. 400×.  
*Fig. 8.* Spongy tissue rarefaction in the central part of granuloma. H-E. ×400.





WITOLD RUDOWSKI, JÓZEF SCHIER, JERZY W. BOROWICZ,  
ZDZISŁAW KLAWE, MAREK SIELCZAK, JÓZEF KNAP

## TWO CASES OF CHEMODECTOMA OF THE CAROTID BODY

Department of Surgery, Institute of Haematology, Warsaw

Head: Prof. W. Rudowski, M. D.

Laboratory of Electron Microscopy, Experimental and Clinical Medical Centre,

Polish Academy of Sciences, Warsaw

Head: Assoc. Prof. J. W. Borowicz, M. D.

Non-chromaffin paraganglioma (*chemodectoma*) is a tumour originating from the non-chromaffin cells of paraganglia which belong to what is called the chemoreceptor system. The latter is particularly sensitive to changes of pH, alterations of partial pressure of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in blood and it contributes to the regulation of respiration (Fawcett, Bloom, 1967). This system includes the carotid glomus, tympanic body, aortic glomus, jugular, ciliary and coccygeal glomera (Hewitt et al., 1972). Paragangliomas develop at these sites and those situated in the carotid and jugular bodies closely below the middle ear are of the greatest clinical importance. The development of this tumour at other localisations may be explained by the presence of structures resembling paraganglia at these sites, or structures belonging to what is called the clear-cell system of Pages in the adventitia of blood vessels (Wodała, Siedlaczek, 1970). Biochemical and structural investigations of paraganglia have in recent years suggested the conclusion that the cells of these neoplasms secrete adrenaline nad noradrenaline (Grimley, Glenner, 1967). Sometimes tumours of the carotid body develop bilaterally or even in the members of the same family (Wilson, 1970). Kroll et al. (1964), described tumours of the carotid body in 12 members of a family, and in 9 of them deficiency of blood clotting factors VII and X was discovered additionally. The parasympathetic paraganglia develop from analogues of the parasympathetic system of the glossopharyngeal and vagus nerves (Rudowski, 1950, 1965).

Non-chromaffin paraganglioma is a rare neoplasm. Kowalczykova et al. (1965), found only 7 cases in autopsy material in the period 1956—1964. Drews (1969) observed only one chemodectoma in a material of

222 mediastinal tumours treated surgically in the years 1950—1969. A similar incidence was reported from other Polish and foreign centers (Bartoszewicz, Skokowski, 1969; Bross et al., 1969; Hewitt et al., 1972; Rudowski, 1950). According to Kowalczykova et al. (1965) only 16 reports on chemodectomas have appeared in the Polish literature since the first reported case of Skubiszewski in 1921 until 1965. From 1965, however, several new reports have been published including cases of pulmonary chemodectoma (Wodała, Siedlaczek 1970), middle-ear chemodectoma (Pliszczyńska-Brennenstahl, Czarkowska, 1970), mediastinal (Bross et al., 1969), as well as of the malignant form of this neoplasm (Jesipowicz et al., 1972; Witkowski, 1966).

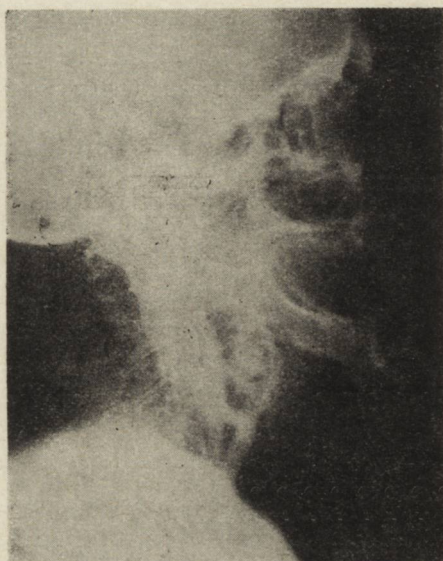
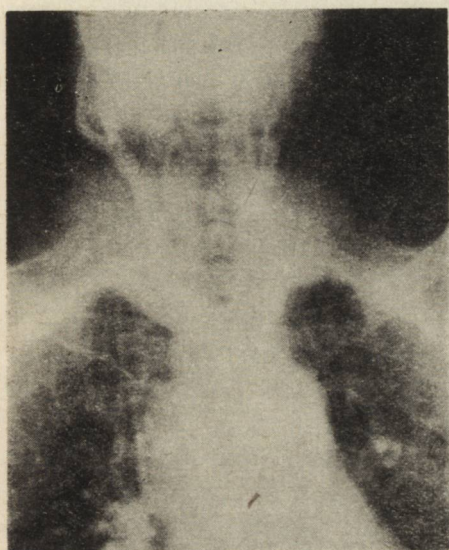
The infrequent occurrence of this tumour and lack of reports on the ultrastructure of chemodectomas in the Polish literature prompted us to describe two cases of carotid glomus *chemodectoma*.

#### CASES REPORT

Case 1.: Female patient W. D. aged 35 was admitted to the Department of Surgery, Institute of Hematology in Warsaw in a good general condition because of a tumour visible on the right side of her neck which caused only slight pains and an unpleasant sensation of „knocking” heard in the right ear. The tumour had been slowly increasing in size, for the last 10 years since it had been observed for the first time. From the onset of the disease the patient was treated by physicians from various branches of medicine. Three years before her admission to our Institute she had aspiration biopsy of the tumour and chronic lymphadenitis was diagnosed.

During examination the tumour was found to measure 8×4×3 cm. It was hard with a smooth surface and it reached under the angle of the mandible, while inferiorly it reached to the middle of the sternocleidomastoid muscle. It showed no pulsations, could not be shifted and was not tender on compression, however, pressure diminished its size and caused a cough reflex. Paresis of the right vocal chord was also disclosed. Because of diagnostic difficulties an explorative operation was carried out under topical anaesthesia. During the operation the tumour dimensions were found to be 6×3×3 cm and it was situated with its long axis parallel to the cervical blood vessels. Its colour was red-pinkish, its consistence spongy. It was found that the tumour was closely associated with the wall of the internal carotid artery and reached to the carotid foramen. This made impossible a radical removal of the tumour without ligation of the internal carotid artery. A biopsy specimen was taken for histological examination and the diagnosis was che-

modectoma with structural polymorphism (Z. Czechowska M. D., the specimen was examined also by the pathologist prof. J. Laskowski, M. D.). The operative and postoperative course was uneventful. After several months new symptoms appeared with headaches and dizziness. Selective angiography of the brachiocephalic trunk demonstrated a wide common carotid artery and a large tumour vascularized from the external carotid artery and probably by the right vertebral artery lying at the angle of the mandible. The blood supply to the tumour impaired the blood supply to the brain (Assoc. prof. R. Rajszyś, M. D.) (Fig. 1 and 2). During EEG examination focal changes were disclosed with some bursts of delta and theta waves in right frontotemporal leads.



*Figs. 1, 2.* Carotid angiograms. Description in text.

*Ryc. 1, 2.* Rentgenogramy tętnic szyjnych. Opis w tekście.

The patient had several follow-up clinical and EEG examinations, the latter failed to show any significant changes in relation to the initial findings (S. Zalejski, M. D.). In successive elective arteriographies of the right common carotid artery the previously noted changes were repeatedly observed with a slow progression of impairment of cerebral blood flow. In 1971 because of increasing clinical changes and enlargement of the tumour, it was decided to narrow the lumen of the common carotid artery below the tumour with a ligature. The procedure was well tolerated by the patient, the tumour decreased in size and the symptoms were somewhat alleviated. In EEG investigations the records were with-

out any significant difference as compared with the previous findings. Compression of the right carotid artery (Matas-Bonnel test) did not change the EEG tracings but compression of the left carotid artery was followed by a very unpleasant sensation with increased frequency of slow waves in both temporal leads (Assoc. prof. J. Bacia, M. D.).

**Operation.** A few months later, under general anaesthesia an incision was made from the base of mastoid process along the mandibular ramus at a distance of nearly 10 cm. Then the tumour was separated from the surrounding tissues. The internal carotid artery and the jugular vein were ligated. The tumour was removed. After the operation a transient Claude-Bernard-Horner syndrome developed associated with dysphagia, headaches and paresis of the right upper limb. Neurological examination revealed paresis of the IX, X, XII right cranial nerves and a left-sided pyramidal syndrome with increased deep reflexes. Laryngological examination showed paresis of the right vocal chord. Histological examination (Z. Czechowska, M. D.) demonstrated a structure closely resembling that observed previously but bands of hyaline tissue were perhaps more numerous while cells with clear cytoplasm were less numerous (Figs. 3, 4, 5). After the operation a slow regression of the clinical symptoms was noted. The patient was discharged home with some dysphagia, hoarseness and slight motor disturbances of the right upper limb. After 2 months of outpatient treatment hoarseness was the only complaint of the patient together with slight dysphagia. One year after the operation this state has remained unchanged. The patient has resumed her job.

**Case 2.:** Woman P. M. aged 66 was admitted to our Institute from another Department of Surgery where the diagnosis was: aneurysma of the right common carotid artery. For several years the patient has observed the presence of a tumour which increased slowly in size on the right side of her neck. Shortly before her admission to the hospital the patient began to experience a feeling as if a foreign body was stricking in her throat causing some dysphagia. On examination the abnormalities included the presence of an oval tumour with dimensions  $8 \times 5 \times 4$  cm situated on the right side of the neck below the mandibular angle. The consistence of the tumour was rather hard, its surface was smooth, it could be only slightly shifted in the antero-posterior direction. Laryngological examination confirmed the presence of a pulsating tumour on the right side of the neck without evidence of abnormalities in the lower pharynx and larynx. Carotid arteriography demonstrated the presence of a richly vascularized tumour measuring 4 cm in diameter situated near the bifurcation of the right carotid artery. The vascular pattern suggested a pathological type of vascularization. The tumour changed the



course of the carotid arteries (Assoc. Prof. R. Rajszys M. D.). EEG investigation revealed evident focal changes in the left temporal area. The test of Matas-Bonnel carried out twice on the right and once on the left side failed to cause any disturbances in the cerebral blood flow.

**Operation (1972).** Under general anaesthesia using an incision along the anterior margin of the sternocleidomastoid muscle was made and the tumour was exposed. It surrounded the mandibular angle. In the surgical field the size of the tumour was  $3 \times 4 \times 5$  cm, its consistence was rather compact, its colour was grey-yellow-pink. Very numerous blood vessels were visible in the capsule of the tumour, they were mainly veins. The tumour pulsated, this pulse was derived, however, from the carotid artery. The tumour was situated in the bifurcation of the common carotid artery and it could not be separated from the internal carotid artery. Therefore radical removal of the tumour was abandoned and partial resection of the lateral and anterior part was performed. An occluding ligature was put on the common carotid artery. The operative and postoperative course was uneventful.

**Histological examination (J. Łysakowska, M. D.)** established the diagnosis of chemodectoma. The structure of the tumour was fairly polymorphic. Besides areas of epithelioid cells with a well developed network of sinuous blood vessels intertwining within the parenchyma, foci of spindle-shaped cells were present. In some places numerous cells with larger nuclei resembling ink-spots were seen but without atypical features. Extensive areas of fibrosis and hyalinization suggested that the tumour had some tendency to self-regression (Figs. 6, 7, 8).

**Ultrastructural studies.** For electron-microscopic investigations a wedge-shaped fragment of tumour was obtained during the operation from the subcapsular region in case 2. The fragment was fixed in 5% glutaraldehyde in Millionig's phosphate buffer and then in 2% buffered  $\text{OsO}_4$  solution. After dehydration in increasing concentrations of ethanol and propylene oxide the material was embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut on Reichert Om-U2 ultramicrotome and after counterstaining with uranyl acetate and lead citrate (Reynold's reagent) they were studied under a JEM 7 A electron microscope and photographed on ORWO EU-2 plates.

Agglomeration of collagen fibers observed in most sections confirmed the data of histological examination. In many sections, however, we observed neoplastic cells grouped particularly around blood vessels. These cells usually of an irregularly oval shape had a large, more or less round nucleus (sometimes two nuclei were observed in one cell) with abundant

dense chromatin, having a tendency to place itself at the periphery of the nucleus. Mitochondria of typical appearance were not very numerous in the cells. Endoplasmic reticulum and Golgi's apparatus appeared unchanged. In the whole cytoplasm numerous accumulations of ribosomal granules were present together with scant structures resembling lysosomes (Figs. 9, 10, 11). In most cells very numerous secretory granules of the type of catecholamines were present in cytoplasm. They were round or oval in shape, very frequently they had a well-visible, single membrane around them. The interior of the granules was filled with a substance of high but not uniform electron density, sometimes separated by a narrow empty rim from the surrounding capsule (Fig. 9). The size of the granules varied, the darker ones reaching  $0.25 \mu$  while the clearer ones were usually larger reaching  $0.5 \mu$  (see figures). We have not observed any morphological evidence of penetration of the secretory granules outside the cell membrane. This may occur, however, as evidenced by Figs. 12 and 13 where secretory granules are seen outside the cells close below the endothelium of blood vessels. Figs. 13, and 14 show invasion of neoplastic cells into the lumen of blood vessels which was rather a rare finding in this case.

#### DISCUSSION

Both reported cases are characterized by a typical location of the lesion as well as typical clinical course. In both cases the carotid body was involved. The dynamics of the tumour growth differed, however, in both cases. In case W. D. aged 30 years the history of complaints was of several years duration and the clinical syndrome caused by compression of surrounding structures by the tumour was evident. In case M. P. aged 66 years the history was much longer, exceeding ten years and the associated manifestations were slight despite the large size of the tumour. This difference in the clinical course may be explained in part, by the histological findings. In the second case which showed a less dynamic course, the cellular structures typical of *chemodectoma* were associated with extensive areas of fibrosis and hyalinization suggesting that the tumour had some tendency to „extinction”.

It is worth stressing that neoplasms derived from the nervous tissues require specific „oncological” tactics which differ from certain principles of management of malignant neoplasms. In these cases multistage surgical treatment is not only regarded as an error, but is in some cases indicated. This was our management in case 1. The operation divided into two stages separated by a fairly long time period allowed to avoid closure of the common carotid artery before development of collateral circulation. A similar management was planned and begun in case

2 in which the tumour was removed as far it was technically possible and the common carotid artery was narrowed as a preparation for later radical removal of the tumour. The experience with case 1 suggests that partial removal of the tumour has no influence on the dynamics of tumour progression and its structural characteristics.

The observed electron-microscopic changes correspond generally to those reported by other authors (Grimley and Glanner 1967). Presence of catecholamine granules was observed in the subendothelial spaces of vessels. We had no occasion to see their secretion into the extracellular spaces and we could not trace their possible penetration into the vascular lumen. However, in numerous studies on neurosecretion in the hypothalamo-hypophyseal tract most authors observed only very rarely excretion of neurosecretory granules outside the cell although their presence in the perivascular spaces was observed much more frequently. It seems that this problem is difficult to explain by routine morphological investigations exclusively. The presence of neoplastic cells in the vessels in one of our cases may suggest possible development of metastases although histological examination showed only fibrosis of the tumour and tendency to regression.

It is not possible at present to establish whether the above mentioned hormonal activity of these tumours can cause clinical manifestations similar to those observed in cases of pheochromocytoma.

W. Rudowski, J. W. Borowicz, J. Schier, Z. Klawe, M. Sielczak, J. Knap

#### DWA PRZYPADKI PRZYZWOJAKA NIECHROMOCHŁONNEGO (CHEMODECTOMA) KŁĘBKA SZYJNEGO

##### Streszczenie

Omówiono dwa bardzo rzadkie przypadki przyzwojaka niechromochłonnego (*chemodectoma*) kłębka szyjnego w aspekcie kliniczno-patologicznym ze szczególnym uwzględnieniem ultrastruktury nowotworu. *Chemodectoma* obserwowano u dwóch pacjentek w wieku 35 i 66 lat. W obu przypadkach nowotwór rozwijał się z wolna, w ciągu lat i nasuwał liczne trudności diagnostyczne. W obu przypadkach guz uciskając na tętnice szyjne dawał narastające objawy niedostateczności krążenia mózgowego zarówno kliniczne, jak i elektroencefalograficzne. U obu chorych zabieg operacyjny, wykonany po próbie Matesa-Bonnella spowodował poprawę stanu chorych. Badanie histopatologiczne usuniętych guzów wykazało typowe utkanie przyzwojaka niechromochłonnego, z zaznaczoną tendencją do włóknienia w pierwszym przypadku.

В. Рудовски, Е. В. Борович, Ю. Шир, З. Кляве, М. Сельчак, Ю. Кнап

#### DWA SLUCZAJA XEMODEKTOMY SZEJNEGO KLUBKA

##### Резюме

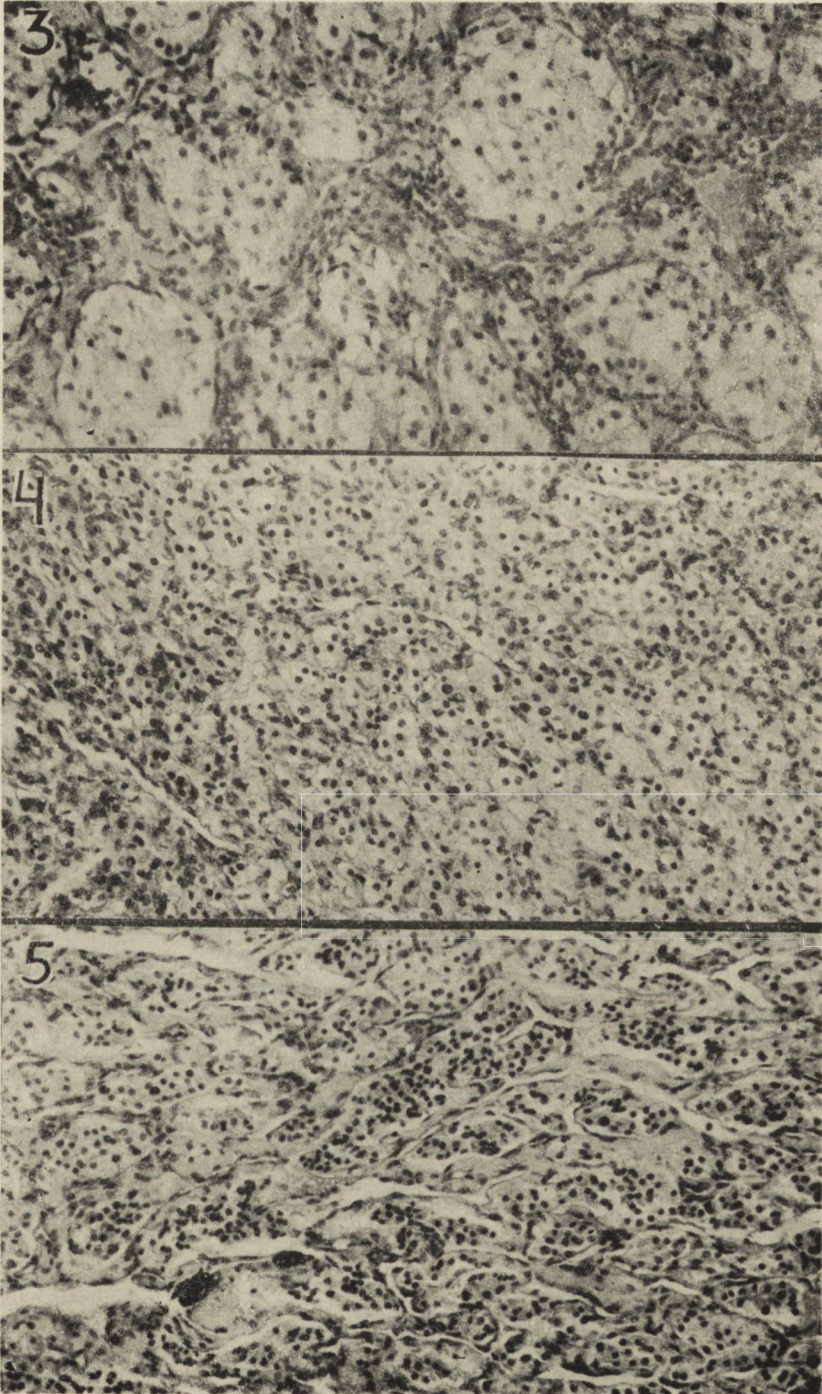
Описываются 2 очень редких случая хемодектомы шейного клубка в клинико-патологическом аспекте с особым учетом ультраструктуры опухоли. Хемо-

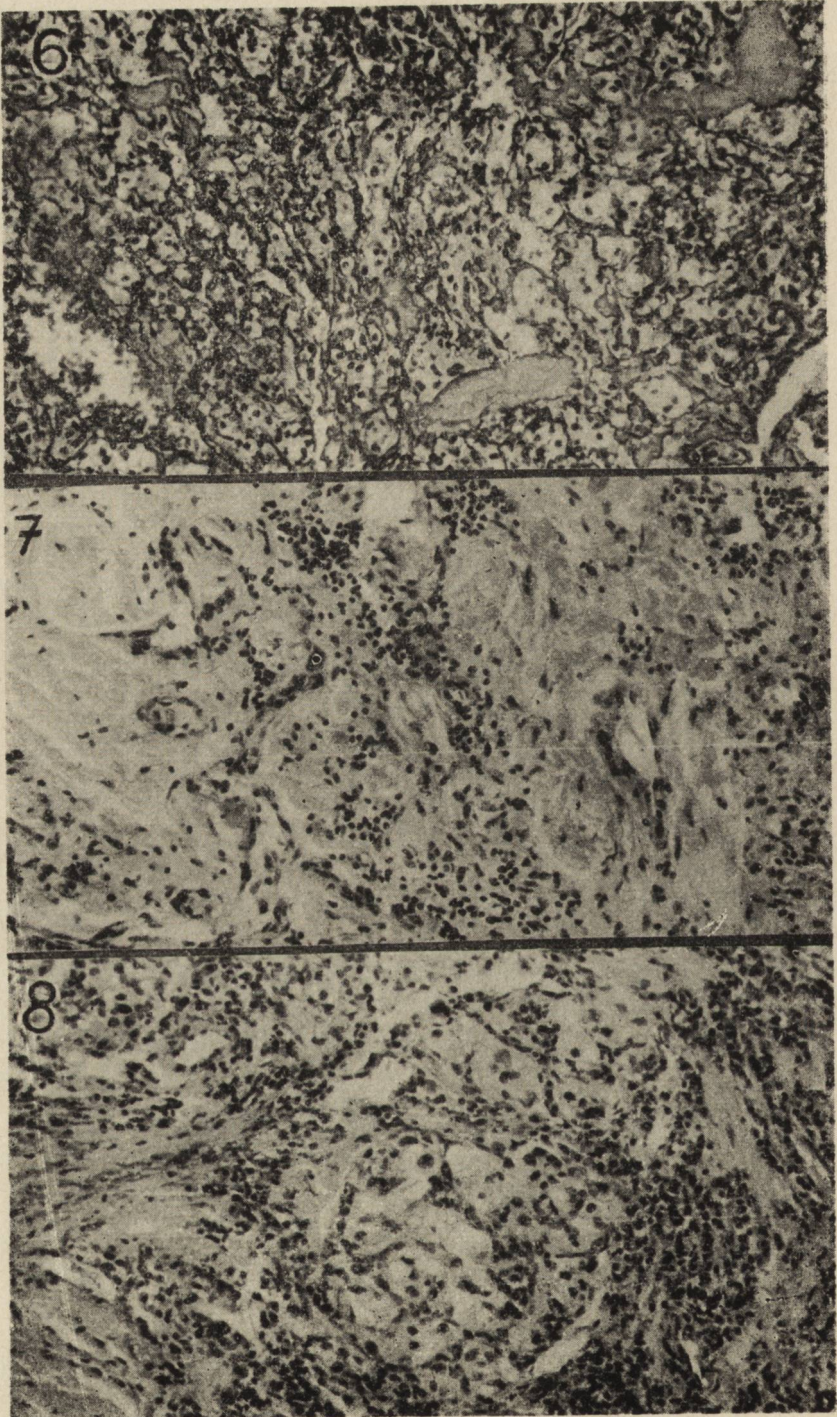
дектома наблюдалась у 2 больных в возрасте 35 и 66 лет. В обоих случаях опухоль нарастала медленно, в течение лет и создавала диагностические трудности. В обоих случаях опухоль, надавливая на шейные артерии, приводила к нарастанию, как клинических так и электроэнцефалографических симптомов недостаточности мозгового кровообращения. У обеих больных хирургическое вмешательство после пробы Matas-Bonnela привело к улучшению состояния больных. Гистопатологические исследования удаленных опухолей выявили типичную структуру хемодектомы, с наметившейся тенденцией к фибрилляции в I случае.

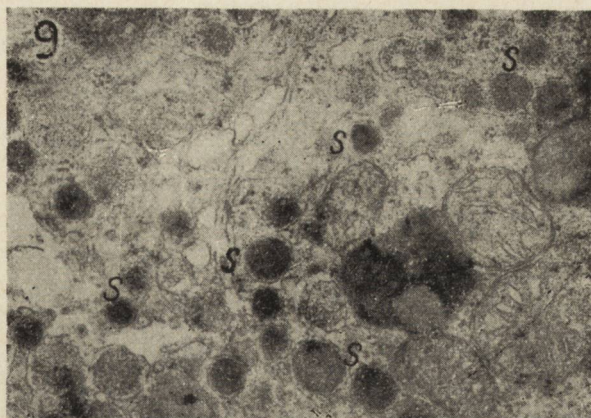
## REFERENCES

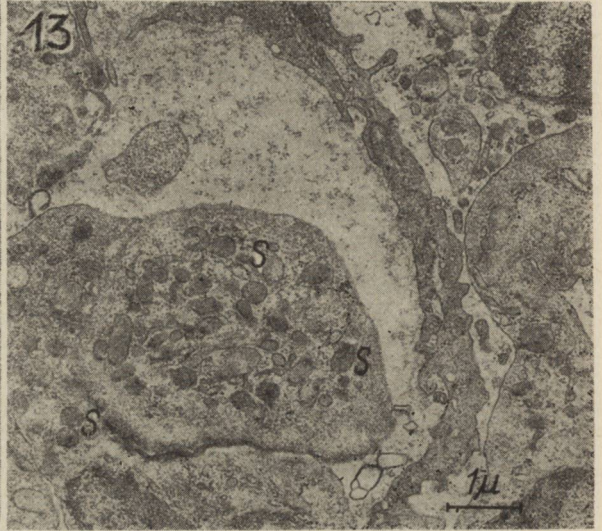
1. Bartoszewicz T., Skokowski J.: Spostrzeżenia w leczeniu chorych z guzami śródpiersia. In: Pamiętnik XIII Zjazdu Tarakochirurgicznego. Białystok 12—13. 09.1969. Polfa, Warszawa, 458—464.
2. Bross W., Wręzlewicz W., Rogalski E., Kaniowski T., Kustrzycki A., Moszczyński L., Czereda T.: Guzy śródpiersia w materiale własnym. Ibid, 440—447.
3. Drews R.: Klinika i leczenie guzów śródpiersia. Ibid, 414—442.
4. Fawcett D., Bloom E.: Histologia, PZWL, Warszawa, 1967.
5. Grimley P. M., Glenner G. G.: Histology and ultrastructure of carotid body paragangliomas. Comparison with the normal gland. Cancer, 1967, 20, 1473—1479.
6. Hewitt R. L., Ichnocse H., Weichert R. F., Drapanas T.: Chemodectomas. Surgery, 1972, 71, 275—282.
7. Jesipowicz M., Sawa A., Cholewa J.: Złośliwa postać chemodectoma płuca. Pol. Przegl. Chir., 1972, 44, 191—193.
8. Kowalczykowska J., Niezabitowski A., Szczudrawa J., Tomasiak B.: Obraz morfologiczny i kliniczny ciałek przyzwojowych układu współczulnego. Nowotwory, 1965, 2, 115—122.
9. Kroll A. J., Alexander B., Cochios F., Packet L.: Hereditary deficiencies in clotting factors VII and X associated with carotid body tumors. New Engl. J. Med., 1964, 270, 6—13.
10. Pliszczyńska-Brennenstuhl M., Czarkowska D.: Rzadki przypadek przyzwojaka chromochłonnego ucha środkowego. Pol. Tyg. Lek., 1970, 25, 301—303.
11. Rudowski W.: Nowotwory kłębka szyjnego. Patol. Polska, 1950, 3/4, 535—546.
12. Rudowski W.: Nowotwory obwodowego układu nerwowego. In: Patologia i Klinika nowotworów (H. Kołodziejska ed.). PZWL, Warszawa, 1965, 594—602.
13. Skubiszewski L.: Histogeneza nowotworów kłębka szyjnego. Praca z Zakładu Anatomii Patol. Uniwersytetu Warszawskiego. Nowotwory, 1921, 74—84.
14. Wilson H.: Carotid body tumors. Familial and bilateral. Ann. Surgery, 1970, 171, 843—848.
15. Witkowski F.: The problem of malignancy of the carotid body and similar structure. Acta Med. Pol., 1966, 1, 43—50.
16. Wodała E., Siedlaczek A.: Chemodectoma płuca. Pol. Przegl. Chirurg., 1970, 42, 1109—1115.

Prof. W. Rudowski's adress: Klinika Chirurgiczna, Instytut Hematologii, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 5.











## PODPISY POD RYCINY

*Fig. 3. Case 1. Chemodectoma. H-E.  $\times 250$ .*

*Ryc. 3. Przyp. 1. Chemodectoma. H-E. Pow.  $250\times$ .*

*Fig. 4. Case 1. Chemodectoma. Solid structure of tumor. H-E.  $\times 250$ .*

*Ryc. 4. Przyp. 1. Chemodectoma. Lite utkanie guza. H-E. Pow.  $250\times$ .*

*Fig. 5. Case 1. Chemodectoma. Fairly numerous bands of hyaline tissue. Single giant cells. H-E.  $\times 250$ .*

*Ryc. 5. Przyp. 1. Chemodectoma. Dość liczne pasma tkanki szklistej. Pojedyncze komórki olbrzymie. H-E. Pow.  $250\times$ .*

*Fig. 6. Case 2. Chemodectoma. Argentaffin fibrils around epithelioid cells.*

*Ryc. 6. Przyp. 2. Chemodectoma. Włókienka srebrochłonne oplatające epitelioidalne komórki.*

*Fig. 7. Case 2. Chemodectoma. Extensive areas of hyalinization. H-E.  $\times 250$ .*

*Ryc. 7. Przyp. 2. Chemodectoma. Rozległe pole szkliwienia guza. H-E. Pow.  $250\times$ .*

*Fig. 8. Case 2. Chemodectoma. Focus composed of large cells with clear cytoplasm. H-E.  $\times 250$ .*

*Ryc. 8. Przyp. 2. Chemodectoma. Ognisko zbudowane z dużych komórek o wodnej cytoplazmie. H-E. Pow.  $250\times$ .*

*Fig. 9. Fragment of cytoplasm of a cell in the chemodectoma with visible mitochondria, lysosomal structures and numerous secretion granules of unequal size and electron density, frequently with narrow empty rims separating the central part from the membrane.  $\times 26\ 000$ . S — secretory granules.*

*Ryc. 9. Fragment cytoplazmy komórki chemodectoma z widocznymi mitochondriami, strukturami lizosomalnymi oraz liczne ziarnistości sekrecyjne nierównej wielkości i gęstości elektronowej często z wąskim pustym rąbkim oddzielającym część centralną otaczającej błony. Pow.  $26\ 000\times$ . S — ziarnistości sekrecyjne.*

*Fig. 10. A large fragment of two neighbouring neoplastic cells with typical nuclei and cytoplasmic structures. Secretion granules are also visible.  $\times 27\ 000$ .*

*Ryc. 10. Duży fragment dwu sąsiadujących komórek nowotworowych z typowymi jądrami i strukturami cytoplazmy. Widoczne są również ziarnistości sekrecyjne. Pow.  $27\ 000\times$ .*

*Fig. 11. Fragments of two neighbouring neoplastic cells. On the left side many considerably polymorphic secretion granules, on the right side a fragment of a binucleated cell.  $\times 27\ 000$ .*

*Ryc. 11. Fragment dwu sąsiadujących komórek nowotworowych. Po stronie lewej obfita ilość ziarnistości sekrecyjnych o dużym polimorfizmie, po stronie prawej fragment komórki dwujądrowej. Pow.  $27\ 000\times$ .*

*Fig. 12. Secretion granules in extracellular space below the endothelium of a capillary vessel.  $\times 27\ 000$ .*

*Ryc. 12. Ziarnistości sekrecyjne w przestrzeni pozakomórkowej, pod śródbłonkami naczyń włosowatych. Pow.  $27\ 000\times$ .*

*Fig. 13. Neoplastic cells growing into the lumen of a capillary vessel. Upper right — single secretion granules in subendothelial space.  $\times 13\ 600$ .*

*Ryc. 13. Wrastanie komórek nowotworowych do światła naczynia włosowatego. W górnym prawym rogu pojedyncze ziarnistości sekrecyjne w przestrzeni podśródbłonkowej. Pow.  $13\ 600\times$ .*

*Fig. 14. Fragment of Figure 13. Details of structures of cells growing into the lumen of the vessel.  $\times 26\ 000$ .*

*Ryc. 14. Fragment ryciny 13. Szczegóły struktur komórek wrastających do światła naczynia. Pow.  $26\ 000\times$ .*

ALICJA KĘDZIA

## ZLEWISKO ŻYLNIE DOŁU I BRUZDY BOCZNEJ MÓZGU

Zakład Anatomii Prawidłowej Instytutu Biostruktury AM, we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr Cz. Niżankowski

Naczynia żyłne dołu i bruzdy bocznej mózgu z uwagi na lokalizację w tej okolicy niezwykle ważnych wg Konorskiego (1969) ośrodków mogą jak: projekcyjne pole słuchowe, pole słowno-słuchowe, słowno-kinestetyczne, pole dla gnozi oralnej, spełniają ważną rolę w sprawnym funkcjonowaniu tych struktur.

Znajomość morfologii i patologii układu żylnego jest jeszcze bardzo uboga. Ogniskowe i uogólnione reakcje systemu żylnego, w wyniku schorzeń naczyń mózgowych, są mało przebadane. Skąpe dane na ten temat pochodzą z prac Gvozdanovic (1956), Laine i Delandtsheer (1956), Hassler (1967), Vuia i Alexianu (1968).

Żyły mózgu odznaczają się dużym bogactwem formy i topografii, różnym stopniem rozwoju: Kłosowski (1951), Goetzen (1964), a także istnieniem szczególnych mechanizmów wyrównawczych pod postacią lakun, syfonów i zastawek: Sattler (1959), Hempel i Elmohamed (1968).

W pracach nad układem żylnym mózgowia występują dysproporcje pomiędzy wynikami osiągniętymi nad badaniami jego żył wewnętrznych (wchodzącymi w skład dorzecza żyły wielkiej mózgu), a żyłami zewnętrznymi. Żyły wewnętrzne mózgu zbadano szczegółowo: Schlesinger (1939), Johanson (1952), Ferner (1958), Lazorthes (1961), Bekow (1965), Krayenbühl i Yasargil (1965), Goetzen (1964, 1965, 1969, 1970). Żyłami zewnętrznymi mózgu zajmował się: Grzybowski (1929), Delmas i Pertuiset (1949, 1950), Lazorthes (1961), Krayenbühl i Yasargil (1965), Bekow (1965). Goetzen wykazał istnienie szeregu zespołów między układem zewnętrznym i wewnętrznym mózgu i podał opis ich budowy i topografii.

Analiza dostępnego piśmiennictwa wskazuje na fakt, że morfologia naczyń żylnych dołu i bruzdy bocznej mózgu nie została dotychczas dokładnie poznana. Dane na ten temat są skąpe, wycinkowe — uderza ubóstwo opracowań tego zagadnienia. Rozbieżność wniosków cytowanych

autorów dotyczy nie tylko mianownictwa naczyń żylnych tej okolicy, lecz także opisów ich zakresu naczyniowego i topografii.

Celem przeprowadzonych badań było: 1) oznaczenie kierunków odpływu krwi żylnych z dołu i bruzdy bocznej mózgu, 2) analiza anatomiczna zlewiska naczyń żylnych dołu i bruzdy bocznej mózgu, zawierająca: ocenę budowy żył, wyodrębnienie zespołów krążeniowych — w skład których wchodziły dopływy, pnie doprowadzające i ich ujścia, pomiary kątów ujść żył, uchodzących do zatoki strzałkowej górnej, oznaczenie typów żylnych z wprowadzeniem do nich własnego mianownictwa, 3) porównanie rozwoju sieci żylnych w obu półkulach, 4) oznaczenie najlepiej i najslabiej drenowanych okolic mózgu.

#### MATERIAŁ I METODA

Naczynia żyłne dołu i bruzdy bocznej mózgu przebadano na 104 półkulach mózgowych ludzkich, osobników dorosłych zmarłych w różnym wieku, u których w wywiadach nie stwierdzono chorób naczyniowych mózgu. Żyły mózgu badano przy użyciu polskiego lateksu syntetycznego LBS 3022 (Niżankowski Cz., Kędzia A.) Lateksem wypełniano żyłę wielką mózgu i żyły uchodzące do zatok: strzałkowej górnej, poprzecznej, jamistej, klinowo-ciemieniowej, skalistych. Mózgowie konserwowano w w płynie Bakłuszinskiego (cyt. wg Jarosławcewa 1961), następnie preparowano skalpelem *in situ*.

#### WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że krew żylna z dołu i bruzdy bocznej mózgu odpływa w trzech zasadniczych kierunkach: górnym, dolnym i tylnym. Górny kierunek odpływu reprezentowany jest przez żyły wchodzące w skład dorzecza zatoki strzałkowej górnej. Dolny kierunek odpływu stanowią żyły wchodzące w skład obszaru naczyniowego zatok: poprzecznej, jamistej, skalistej górnej i klinowo-ciemieniowej. Tylny kierunek odpływu utworzony jest przez żyłę środkową głęboką mózgu i — jej przedłużenie — żyłę podstawną, uchodzącą do zatoki prostej.

#### *Górny kierunek odpływu*

Żyły należące do tej grupy uchodzą do zatoki strzałkowej górnej, obszar ich drenażu obejmuje wypukłą powierzchnię mózgu i sięga aż do bruzdy bocznej mózgu. Liczba tych żył wg danych (Briusowa 1951, Lazorthes 1961, Krayenbühl, Yasargil 1965, Bekow 1965) waha się od 4 do 19. W badanym materiale dominowała liczba żył zamykająca się w

granicach od 6 do 10 żył. Minimalną liczbę żył częściej spotykano w obrębie prawej półkuli, co prawdopodobnie wiąże się z procesem głębokiej redukcji, występującym w obrębie półkuli niedominującej. Towarzyszy mu zwiększanie się kalibru zredukowanych naczyń mózgowych. Przebieg i kształt żył uchodzących do zatoki strzałkowej górnej jest ściśle związany z okolicą mózgu, w której przebiegają. Zależność ta, zawsze wyraźna i stała, pozwala zgodnie ze zdaniem Pertuiset i Delmas (1949), Briusowej (1951), Klosowskiego (1951), Bekowa (1965) wyróżnić grupę żył czołowych, środkowych i ciemieniowo-potylicznych.

Największą zmiennością pośród żył uchodzących do zatoki strzałkowej górnej odznaczają się żyły czołowe. W piśmiennictwie spotykano różne opisy żył czołowych — jedni (Delmas, Pertuiset 1949), wyróżniali przednią i tylną grupę żył czołowych, inni (Bekow 1965, Briusowa 1951) wprowadzali bardziej szczegółowy podział tych żył.

Te rozbieżności wyników badań cytowanych autorów wiążą się z istnieniem wielu typów żył czołowych i różnym stopniem ich ukształtowania. Na podstawie przeprowadzonych badań wprowadzono następujący podział tych żył:

— Żyły czołowo-podstawne (*venae fronto-basilares*), opis ich podany został przez Bekowa i Krayenbühla — obejmują swoim zasięgiem rejon podstawnych części zakrętów czołowych. W 39% stwierdzono ich brak, rolę ich przejmowała bogato rozwinięta żyła środkowa głęboka mózgu. Żyły tej grupy odznaczają się wielokierunkowością dróg przepływu i odpływu krwi żyłnej.

— Żyła czołowa dolna (*vena frontalis inferior*), obszar jej drenażu obejmuje zakręt czołowy dolny, w niektórych przypadkach może stanowić jeden z głównych pni żylnych płata czołowego. Bekow określał żyły o tym zakresie unaczynienia mianem żyły czołowej przedniej. W 61% stwierdzono jej dobry rozwój w obrębie lewej półkuli, brak jej zaznaczał się w 7% przypadków. Po stronie półkuli niedominującej była znacznie słabiej rozwinięta i w 13% przypadków stwierdzono jej brak.

Wiąże się to — być może — z rozwojem ruchowych pól mowy i koniecznością zapewnienia sprawniejszych dróg odpływu krwi żyłnej. Potwierdzeniem tego faktu byłby bardzo częsty związek żyły czołowej dolnej z żyłą środkową powierzchowną mózgu, zwłaszcza po stronie półkuli dominującej.

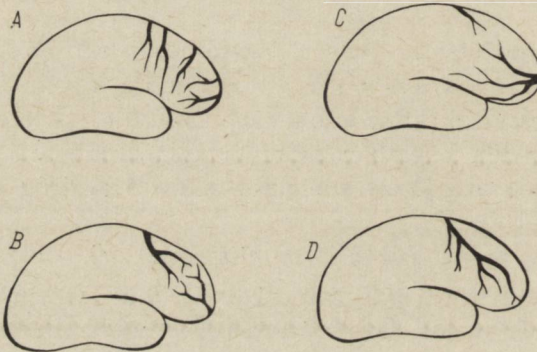
— Żyła czołowa środkowa — *vena frontalis media* — opisywana przez Bekowa i Briusową, przebiega zmiennie. Rozpoczyna się u górnego brzegu bruzdy bocznej mózgu i biegnie wstępująco przez środkową część zakrętów czołowych. Lepszym stopniem rozwoju i większą częstością występowania odznacza się po stronie półkuli dominującej. Po stronie lewej w 13% stwierdzono jej brak, po prawej w 25%. Pozostaje

ona w ścisłym związku z rozwojem żyły czołowej dolnej lub tylnej (ryc. 1).

-- Żyła czołowa tylna — *vena frontalis posterior* — wg Bekowa drenuje tylne części trzech zakrętów czołowych. Jej dobry rozwój stwierdzono po stronie prawej w 52%, po lewej w 42%, w 30% obustronnie zaznaczał się jej brak. Przy dobrym rozwoju żyły przedśrodkowej, spotykanym częściej po stronie lewej, żyła ta jest znacznie zredukowana lub w ogóle nie występuje.

— Żyła czołowa górna — *vena frontalis superior* — zbiera krew z jednoimiennych zakrętów, jest mniej więcej symetrycznie rozwinięta w obu półkulach. Czasami bukietowato zbiega się w jeden wspólny pień naczyniowy, w innych przypadkach reprezentowana jest przez pojedyncze naczynie.

Na podstawie charakterystycznego układu żył czołowych w stosunku do zatoki strzałkowej górnej wprowadzono własny podział tych żył przedstawiony na schemacie 1 A, B, C i D.



Schemat 1. Podział żył czołowych w zależności od ich układu. A. Układ, w którym żyły czołowe biegną niemal prostopadłe do zatoki strzałkowej górnej. Lewa półkula 64%. Prawa półkula 63%. B. Układ, w którym żyły czołowe biegną niemal równoległe do zatoki strzałkowej górnej. Lewa półkula 25%. Prawa półkula 14%. C. Typ pośredni — prostopadły i równoległy. Lewa półkula 11%. Prawa półkula 17%. D. Żyły czołowe zespolone we wspólną magistralę. Lewa półkula —. Prawa półkula 6%.

Diagram 1. Classification of frontal veins relating their arrangement. A. The arrangement in which the frontal veins run nearly perpendicular to sagittal superior sinus. Left hemisphere 64%. Right hemisphere 63%. B. The arrangement in which the frontal veins run nearly parallel to sagittal superior sinus. Left hemisphere 25%. Right hemisphere 14%. C. Intermediate type: perpendicular and parallel. Left hemisphere 11%. Right hemisphere 17%. D. Frontal veins being anastomosed in a common vessel. Left hemisphere —. Right hemisphere 6%.

A — Żyły wchodzące w skład tego układu biegną rzędem przez zakręty czołowe i zachowują skośny przebieg od tyłu i dołu ku przodowi i górze. Żyła czołowa dolna, środkowa i tylna są dobrze rozwinięte i każ-

da z nich uczestniczy w wytworzeniu żyły środkowej powierzchownej mózgu. Opisany układ żył czołowych reprezentowany był najliczniej, bo w 64% po stronie półkuli prawej (ryc. 2).

B — W tym układzie można wyróżnić żyłę czołową dolną i górną. Mogą one być rozwinięte równomiernie lub naprzemiennie (ryc. 3).

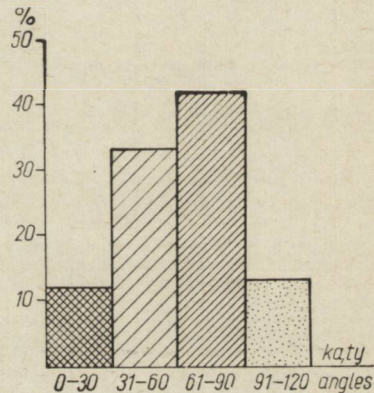
C — Część naczyń położona jest na dnie bruzd, inne przecinają zakręty czołowe. Żyła czołowa dolna, środkowa tylna i górna są w różnym stopniu rozwinięte.

D — Reprezentowany jest przez dużą pojedynczą żyłę czołową, biegnącą wstępująco ku górze i tyłowi. Uchodzą do niej dopływy w formie grzebieniasto przebiegających naczyń.

Wykonano także pomiary kątów ujścia żył czołowych do zatoki strzałkowej górnej. Stwierdzono, że w 50% zawarty jest w przedziale od 61—90, a w 30% poniżej kąta 60, sporadycznie przekraczał wartość 90°.

Schemat 2. Kąty ujść żył czołowych do zatoki strzałkowej górnej.

Diagram 2. Angles of frontal veins ostia into superior sagittal sinus.



Bekow (1965) uważa, że żyły czołowe wlewają się do zatoki strzałkowej górnej pod kątem ostrym.

Żyły zakrętów przyległych do bruzdy środkowej.

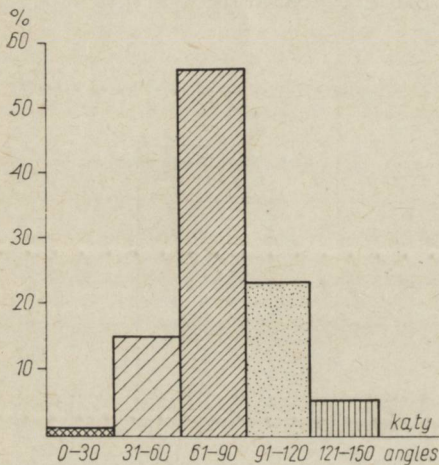
Żyły zakrętów przedśrodkowego i zaśrodkowego, z uwagi na ich niezwykle ważne praktycznie i teoretycznie znaczenie, wyodrębniono w oddzielną grupę. Należy do nich żyła przedśrodkowa, środkowa i zaśrodkowa (ryc. 4).

Żyła przedśrodkowa — *vena precentralis* — wykazuje ścisły związek z żyłą środkową powierzchowną mózgu. Rozpoczyna się w obrębie tylnych części zakrętów czołowych i zakrętu przedśrodkowego. W około 10% stwierdzono jej brak. Żyła przedśrodkowa brała udział obustronnie, zwłaszcza po stronie lewej, w odpływie krwi z bruzdy bocznej mózgu w stopniu największym spośród żył centralnych — w 75%.

Żyła środkowa — *vena centralis* — układa się na dnie jednoimiennej bruzdy, swoim zasięgiem obejmuje zakręty środkowe. Po stronie półkuli dominującej była znacznie silniej rozwinięta, co prawdopodobnie łączy się z rozwojem gnostycznych pól ruchowych. Obserwowano często brak żyły środkowej, po stronie lewej nie występowała w 25%, po prawej w 35%.

Żyła zaśrodkowa — *vena postcentralis* — należy do najbardziej stałych spośród żył środkowych. Potwierdzają to spostrzeżenia Briusowej (1951), Bekowa (1965). Brak jej zaznaczał się w badanym materiale tylko w 4%. Zakres naczyniowy tej żyły obejmuje górne części zakrętu zaśrodkowego i górną część płacika ciemieniowego górnego.

Żyły środkowe w 56% w badanym materiale uchodzą pod kątem 60—90°, w 25% przekraczają kąt 90°, w pozostałych przypadkach poniżej kąta 60°.



Schemat 3. Kąty ujść żył środkowych do zatoki strzałkowej górnej.

Diagram 3. Angles of medial veins ostia into superior sagittal sinus.

Żyły środkowe uchodzą do zatoki prostej wg danych Bekowa pod kątem prostym.

### Żyły ciemieniowo-potyliczne

Żyły tej grupy odprowadzają krew z tylnych części górnego i dolnego płacika ciemieniowego oraz zakrętów potylicznych. Liczba tych żył jest niestała, najczęściej zamyka się w granicach od 2 do 3 naczyń. W badanym materiale wyróżniono trzy żyły ciemieniowo-potyliczne: przednią, środkową i tylną.

Żyła ciemieniowa przednia — *vena parietalis anterior* — odznacza się największą stałością występowania. Obejmuje swoim zasięgiem górną, często dolny płacik ciemieniowy oraz tylne części płata skroniowego, odprowadza krew żylną z rejonu bruzdy bocznej mózgu.

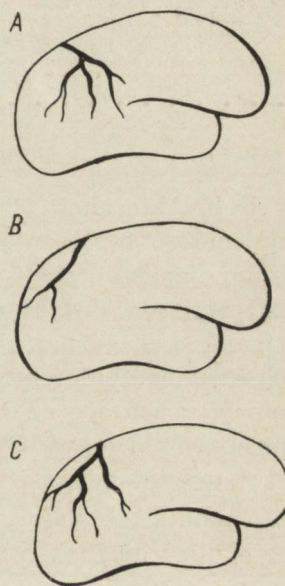
Żyła ciemieniowa środkowa — *vena parietalis media* — należy do najbardziej zredukowanych naczyń żylnych tej okolicy. W 29% obserwowano jej brak. Odznacza się zmiennym przebiegiem — może obejmować środkowe części płata ciemieniowego i tylne skroniowego, do zaledwie górnej części płacika ciemieniowego.

Żyła ciemieniowa tylna — *vena parietalis posterior* — zbiera krew z przednich części płata potylicznego, często położona jest na pograniczu obydwu płatów. Obszar jej jest miejscem przylegania różnokierunkowych obszarów żylnych — dorzeczca zatoki strzałkowej górnej i zatoki prostej.

Na podstawie charakterystycznego układu żył ciemieniowo-potylicznych w odniesieniu do zatoki strzałkowej górnej wprowadzono własny podział tych żył przedstawiony na schemacie 4 A, B i C.

Schemat 4. Podział żył ciemieniowo-potylicznych w zależności od ich układu. A. Układ prostopadły do zatoki strzałkowej górnej. Lewa półkula 76%. Prawa półkula 44%. B. Układ równoległy do zatoki strzałkowej górnej. Lewa półkula 8%. Prawa półkula 14%. C. Układ pośredni: prostopadły i równoległy. Lewa półkula 16%. Prawa półkula 42%.

Diagram 4. Classification of the parieto-occipital veins relating their arrangement. A. The arrangement perpendicular to superior sagittal sinus. Left hemisphere 76%. Right hemisphere 44%. B. The arrangement parallel to superior sagittal sinus. Left hemisphere 8%. Right hemisphere 14%. C. Intermediate arrangement: perpendicular and parallel. Left hemisphere 16%. Right hemisphere 42%.



A — Żyły ciemieniowe: przednia, środkowa i tylna wykazują tendencję do wytwarzania krzaczastych formacji, zaobserwowanych przez Briusową (ryc. 5).

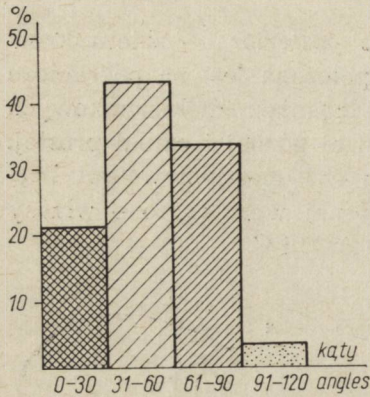
B — Zwraca uwagę znaczna redukcja naczyń tylnych tej okolicy, tworzą one magistralę żylną, układającą się równoległe do zatoki strzałkowej górnej. Żyły po stronie półkuli niedominującej wykazywały pewną tendencję do redukcji.

C — Żyła ciemieniowa przednia i środkowa układały się prostopadle do zatoki strzałkowej górnej, a górna żyła ciemieniowa równoległe.

W badanym materiale kąty ujść żył ciemieniowo-potylicznych w 64% są zawarte poniżej kąta 60, w 33% w granicach od 60—90 stopni.



Według zdania Lazorthesa (1961), Hempla i Elmohameda (1968) żyły potyliczne wlewają się do zatoki strzałkowej górnej pod kątem ostrym i w przeciwnym kierunku.



Schemat 5. Kąty ujść żył ciemieniowo-potylicznych do zatoki strzałkowej górnej.

Diagram 5. Angles of parieto-occipital veins ostia into superior sagittal sinus.

#### *Dolny kierunek odpływu krwi żyłnej*

Dolny kierunek odpływu krwi żyłnej z okolicy dołu i bruzdy bocznej mózgu reprezentowany jest przez żyły uchodzące do zatoki poprzecznej, jamistej, skalistej górnej i klinowo-ciemieniowej. Żyły tej grupy pozostają w ścisłym związku z rozwojem obszaru naczyniowego zatoki strzałkowej górnej. W badanym materiale stwierdzono dominowanie obszaru naczyniowego zatoki poprzecznej po stronie prawej: żyły skroniowe uchodzące do zatoki poprzecznej występowały po prawej w 63%, po stronie lewej w 58%.

Żyły skroniowe wg danych Delmas i Pertuiset (1949), Briusowej (1951), Kraysenbühl i Yasargil (1965) wykazują tendencję do grupowania się w okolicy bieguna przedniego i tylnego płata skroniowego.

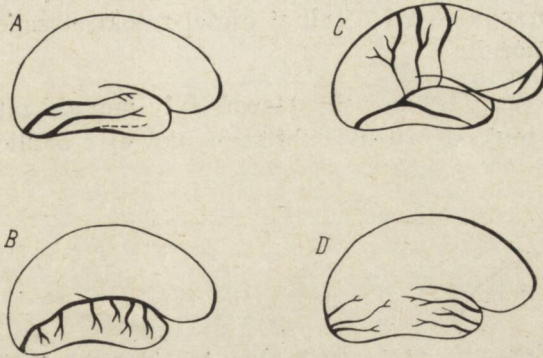
Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono klasyfikację żył skroniowych, uchodzących do zatoki poprzecznej, stosując zmodyfikowany podział podany przez Bekowa, przedstawiony na schemacie 6 A, B, C, D.

A — Wśród nich można było wyróżnić żyłę skroniową górną, środkową i dolną. Nazwy te odpowiadały obszarowi drenażu i były zgodne z topografią tych żył. Obszar zakrętu skroniowego dolnego stanowi rejon zespalania dwóch różnokierunkowych obszarów żylnych: dorzecza zatoki strzałkowej górnej i zatoki prostej.

B — Grzybowski (1929) uważa, że mianem żyły zespalającej dolnej powinno się określić żyłę biegnącą od wyspy do zatoki poprzecznej. Testut (1921) z uwagi na brak połączeń żylnych między żyłą zespalającą dolną,

a zatoką strzałkową górną proponuje taką postać nazwać „forme incomplete” (ryc. 6).

C — Zespolecie typu Labbého charakteryzuje się istnieniem rozległych zespoleń między zatoką strzałkową górną a żyłą zespalającą dolną. W ten



Schemat 6. Typy żył skroniowych uchodzących do zatoki poprzecznej. A. Żyły skroniowe przebiegające równoległe do zakrętów skroniowych. Lewa półkula 23%. Prawa półkula 29%. B. Żyła zespalająca dolna (żyła Labbe'go). Lewa półkula 10%. Prawa półkula 8%. C. Zespolecie typu Labbe'go. Lewa półkula 15%. Prawa półkula 9%. D. Przednie żyły skroniowe uchodzą do zatoki jamistej, tylne do poprzecznej. Lewa półkula 10%. Prawa półkula 17%.

Diagram 6. Types of temporal veins flowing into transversal sinus. A. Temporal veins running parallel to temporal gyri. Left hemisphere 23%. Right hemisphere 29%. B. Inferior anastomotic vein (Labbe's vein). Left hemisphere 10%. Right hemisphere 8%. C. Labbe type anastomosis. Left hemisphere 15%. Right hemisphere 9%. D. Anterior temporal veins flowing into cavernous sinus, posterior ones into transversal sinus. Left hemisphere 10%. Right hemisphere 17%.

sposób trzy zatoki; poprzeczna, jamista i strzałkowa górna uzyskują bezpośrednie połączenia. Testut taką postać nazywa „forme complete” (ryc. 7). Grzybowski za zespolecie typu Labbého uważa żyły biegnące w okolicy 2/3 przednich i 1/3 tylnej części zatoki strzałkowej górnej do zatoki poprzecznej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zarówno żyła zespalająca dolna, jak i zespolecie typu Labbého występowały w większej ilości przypadków po stronie półkuli dominującej.

D — Typ pośredni: przednie żyły skroniowe uchodzą do zatoki jamistej, tylne do zatoki poprzecznej. Występował po lewej w 10% przypadków, po prawej w 17%.

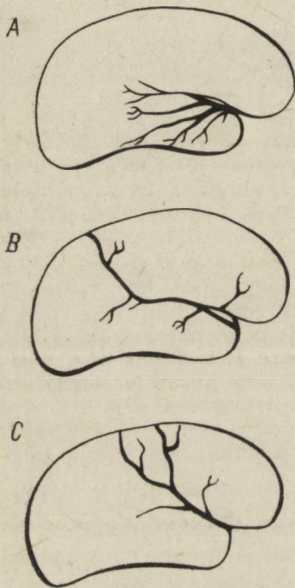
Typy żył skroniowych uchodzących do zatoki jamistej, skalistej górnej i klinowo-ciemieniowej

Żyły skroniowe tej grupy są reprezentowane głównie przez żyłę środkową powierzchowną mózgu. Stanowi ona wg Bekowa linię umowną rozdziału dopływu zatoki strzałkowej górnej i zatoki poprzecznej. Odnacza się dużym bogactwem formy i topografii, istnieniem szeregu zspoleń. Żyły uchodzące do ww zatok podzielono na trzy grupy co zilustrowano schematem 7 A, B, i C.

A — Żyły uchodzące do ww zatok wytwarzają charakterystyczną formę wachlarza, promieniście pokrywają przednie części zakrętu skroniowego górnego i środkowego (ryc. 8).

B — Żyła zespalająca górna wg definicji Grzybowskiego (1929) biegnie od granicy 2/3 przednich i 1/3 tylnej części zatoki strzałkowej górnej do bruzdy bocznej mózgu.

C — Mianem tym Grzybowski nazwał żyły łączące zatokę strzałkową górną na przestrzeni od bruzdy śródcieniowej z okolicą bruzdy bocznej mózgu.



*Schemat 7. Typy żył skroniowych uchodzących do zatoki jamistej, skalistej górnej i zatoki klinowo-ciemieniowej. A. Żyły uchodzące wachlarzowato do zatoki jamistej, skalistej górnej, klinowo-ciemieniowej. Lewa półkula 19%. Prawa półkula 10%. B. Żyła zespalająca górna. Lewa półkula 10%. Prawa półkula 12,5%. C. Zespolenie typu Trolarda. Lewa półkula 13%. Prawa półkula 14,5%.*

*Diagram 7. Types of temporal veins flowing into cavernous, superior petrosus and sphenoparietal sinuses. A. The veins flowing fanwise into cavernous, superior petrosus and sphenoparietal sinuses. Left hemisphere 19%. Right hemisphere 10%. B. Superior anastomotic vein. Left hemisphere 10%. Right hemisphere 12,5%. C. Trolard type anastomosis. Left hemisphere 13%. Right hemisphere 14,5%.*

*Tyłny kierunek odpływu krwi żyłnej z okolicy dołu i bruzdy bocznej mózgu*

Reprezentowany jest przez żyłę środkową głęboką mózgu i jej przedłużenie żyłą podstawną (ryc. 9, 10).

W piśmiennictwie brak jest opracowań morfologii i topografii obszaru naczyniowego żyły środkowej głębokiej mózgu. Skąpe doniesienia na ten temat pochodzą z prac Schlesingera (1939), Delmas i Pertuiset (1949), Kłósowskiego (1951) i Goetzena (1964). Żyła środkowa głęboka mózgu cechuje się wielokierunkowością dróg przepływu i odpływu krwi żyłnej. Na podstawie obserwacji własnych wydzielono cztery jej typy. Kryterium podziału stanowił stopień rozwoju tej żyły.

## Typy żyły środkowej głębokiej mózgu

Typ	Półkula lewa	Półkula prawa
jednogałęziowy	13,5%	23,1%
dwugałęziowy	44,2%	48,1%
trójgałęziowy	17,3%	11,5%
bogaty rozwój układu powierzchniowego a redukcja głębokiego	25,0%	17,3%

Typ jednogałęziowy występował w badanym materiale częściej po stronie prawej. W opisywanym typie żyła środkowa głęboka mózgu ma charakterystyczny łukowaty kształt, drenuje zakręty wyspy za pomocą licznych, promieniście zbiegających się żył, tworząc obfite zespolenia z żyłą środkową powierzchnną mózgu. Podobne zespolenia korowe spotykano w obrębie kory dolnego zakrętu skroniowego z żyłą skroniową dolną i w okolicy zakrętów oczodołowych z żyłami podstawno-czołowymi. Zasięg gałązek głębokich żyły środkowej głębokiej mózgu był ograniczony do dolnej powierzchni jądra soczewkowatego, przedmurza i ciała migdałowatego. W okolicy istoty dziurkowanej przedniej naczynia te zbiegały się w ilości od 8—12 żył w formie wachlarza.

Typ dwugałęziowy charakteryzował się obecnością żyły węchowej, która pozostaje w ścisłym związku z rozwojem żył czołowo-podstawnych. Żyła węchowa zbiera krew z odnogi przedniej torebki wewnętrznej, dolnej powierzchni jądra ogoniastego oraz spoidła przedniego. Dopływy głębokie właściwego pnia żyły środkowej głębokiej mózgu pokrywają skorupę i gałkę bladą, ciało migdałowate, przedmurze oraz spoidło przednie. Żyła środkowa głęboka mózgu należy w tym typie do najlepiej rozwiniętych naczyń żylnych na podstawie mózgu (ryc. 11).

Typ trójgałęziowy stanowi formę przejściową do następnej grupy, gdzie obszar naczyniowy żyły środkowej głębokiej mózgu jest zastąpiony przez żyły powierzchniowe. Zasięg gałązek głębokich jest ograniczony do podstawnej części jądra ogoniastego, skorupy, częściowo gałki bladej. Opisywana forma trójgałęziowa jest reprezentowana przez zredukowane naczynia żyłne układem gałązek przypominających trójnóg lub wachlarz (ryc. 12)

Typ z bogatym rozwojem układu powierzchniowego a redukcją głębokiego. Żyła środkowa głęboka mózgu stanowi samodzielne naczynie żyłne uchodzące do zatoki klinowo-ciemiieniowej. Formie tej towarzyszy żyła zespalająca górna, żyła zespalająca dolna, obfita sieć żył czołowo-podstawnych oraz żył skroniowych górnych i dolnych (ryc. 13).

*Dodatkowe drogi odpływu krwi żyłnej z dołu i bruzdy bocznej mózgu*

Żyły odpływu występują w tych przypadkach, w których tylna droga odpływu za pomocą żyły środkowej głębokiej mózgu i jej przedłużenia żyły podstawnej jest bardzo słabo rozwinięta. W 37,5% stwierdzono w badanym materiale występowanie żyły mostowej (ryc. 14), która przejmowała funkcję zredukowanej żyły podstawnej i stwarzała możliwość odpływu krwi żyłnej do zatok podstawy. W 26,9% przypadków żyła mostowa przedłużała się w żyłę mózdkową (ryc. 15), drenującą kłaczek, migdałek, płacik dwubrzuścowy, płacik prosty i półksiężycowaty górny. O tego rodzaju drogach odpływu wspomina König (1950) i Michajłow (1968). Obecność tego rodzaju żył może stanowić źródło poważnych krwawień przy zabiegach operacyjnych w okolicy kąta mostowo-mózdkowego.

## OMÓWIENIE

Okolica dołu i bruzdy bocznej mózgu jest miejscem zespalandia się żył wchodzących w skład dorzecza naczyniowego zatoki strzałkowej górnej, poprzecznej, jamistej klinowo-ciemieniowej i zatoki prostej. Po obu stronach półkul najliczniejszy udział w wytworzeniu zlewiska w obrębie dołu i bruzdy bocznej mózgu biorą udział żyły czołowe — 33%, w drugiej kolejności zaznacza się wpływ żył skroniowych — 22%, i centralnych — 19%. Żyła zespalaająca górna występowała w 10%, żyła zespalaająca dolna w 12,5% po lewej, a w 8% po prawej. Żyły ciemieniowo-potyliczne uczestniczyły sporadycznie w wytworzeniu zlewiska dołu i bruzdy bocznej mózgu. Delmas uważa natomiast, że najistotniejsze znaczenie w odpływie krwi żyłnej z okolicy dołu i bruzdy bocznej mózgu należy przypisać żyłom skroniowym i centralnym.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że za pomocą licznych zespołów krew żylna z okolicy dołu i bruzdy bocznej może odpływać równocześnie w trzech różnych kierunkach: górnym, dolnym i tylnym. Miejscem najczęstszego zespalandia się żył tworzących zlewisko w obrębie dołu i bruzdy bocznej mózgu, jest okolica wieczka i wyspy. Innymi okolicami, w których stykają się żyły odprowadzające krew w różnych kierunkach są: 1) podstawne części płatów czołowych: żyły czołowo-podstawne (górny kierunek odpływu) łączą się z żyłami wchodzącymi w skład dorzecza naczyniowego żyły podstawnej (tylny kierunek odpływu), 2) biegun skroniowy — miejsce łączenia się żyły skroniowej dolnej (dolny kierunek odpływu) z żyłą środkową głęboką mózgu (tylny kierunek odpływu), 3) okolica płacika ciemieniowego górnego — żyły ciemieniowo-potyliczne (górny kierunek odpływu) z dużą żyłą mózgu (kierunek tylny odpływu).

Wyodrębniono także w układzie żylnym mózgu miejsca najslabiej

drenowane. Należy do nich rejon podstawnych części płata czołowego, miejsce styku płata potylicznego i skroniowego, a także okolica tylnych części płacika ciemieniowego górnego. Te okolice mózgu stanowią miejsce styku obszarów żylnych o różnych kierunkach odpływu krwi. Vuia i Alexianu (1968) uważają, że pierwsze uszkodzenia mózgu w warunkach patologicznych pojawiają się na poziomie stref granicznych „zones limitrophes”, mianem tym określają odcinki mózgowia o najslabiej wykształconych zespoleniach żylnych. Zjawisko występowania ognisk martwiczych na strefach pogranicznych można wytłumaczyć przeprowadzając analogię do opisanych przez Zülcha (1961, 1962) obszarów ostatnich łąk w mózgowiu. Wg Dowżenki (1964) i Dymeckiego (1966) głównym powodem występowania zmian patologicznych w tych odcinkach mózgowia są wahania ciśnienia oraz zaburzenia hemodynamiczne.

#### *Analiza rozwoju sieci żylniej w obu półkulach mózgowych*

Przeprowadzono także analizę rozwoju sieci żylniej w obu półkulach. Stwierdzono uderzającą różnicę pomiędzy półkulą dominującą a niedominującą.

a). W obrębie półkuli dominującej obserwowano najlepsze wykształcenie się naczyń żylnych w okolicy zakrętu czołowego dolnego, zakrętu przedśrodkowego oraz przednich części zakrętu skroniowego górnego. W badanym materiale występował po stronie półkuli lewej szczególnie dobry rozwój żyły czołowej dolnej, żyły przedśrodkowej, a także znacznie częstsza niż po stronie przeciwległej obecność żyły zespalającej dolnej. W okolicy wieczka wytwarza się duży węzeł żylny powstający z promienistego zbiegu żył, stwarzając możliwość wielokierunkowego odpływu krwi żylniej. Lokalizacja wg Konorskiego (1969) po stronie półkuli dominującej pola słowno-kinestetycznego, projekcyjnego pola słuchowego, pola dla someztezji oralnej stwarza konieczność optymalnego odpływu krwi żylniej z wymienionych struktur. Uzyskane dane są zgodne z obserwacjami Delmas i Pertuiset (1949), Lazorthes (1961), Krayenbühla i Yasargila (1965) i Sattlera (1959).

b). Po stronie półkuli niedominującej zauważono pewną tendencję do redukcji naczyń żylnych z równoczesnym zwiększeniem się ich światła. W niektórych przypadkach żyły płata czołowego i potylicznego zespały się we wspólną magistralę. Żyła zespalająca dolna występowała częściej po stronie półkuli prawej. Stwierdzono także pewną przewagę hasenu naczyniowego zatoki poprzecznej po stronie półkuli niedominującej. Wyniki te potwierdzają spostrzeżenia Krayenbühla i Yasargila (1965), Bekowa (1965) i Lazorthesa (1961).

## WNIOSKI

1. Okolica dołu i bruzdy bocznej mózgu odznacza się wielokierunkowością dróg przepływu i odpływu krwi żyłnej.
2. Bruzda boczna mózgu stanowi miejsce spływu żył czołowych, centralnych, skroniowych, rzadko ciemieniowo-potylicznych.
3. Do najślabiej drenowanych okolic mózgu należy rejon podstawnych części płata czołowego, miejsca styku płata potylicznego i skroniowego oraz wypukła powierzchnia płata potylicznego.
4. Po stronie półkuli dominującej zaznacza się przewaga sieci żyłnej w zakresie dolnego zakrętu czołowego, zakrętu przedcentralnego.
5. Półkula prawa wykazuje tendencję do redukcji ilości naczyń mózgowych kosztem zwiększenia się ich kalibru.
6. Żyła środkowa głęboka mózgu należy do ważnych dróg odpływu krwi żyłnej z podstawy mózgowia, stanowi miejsce styku układu żylnego wewnętrznego z zewnętrznym.

A. Кендя

## ВЕНОЗНЫЙ БАССЕЙН ЛАТЕРАЛЬНОЙ ЯМЫ И ЛАТЕРАЛЬНОЙ БОРОЗДЫ МОЗГА

Резюме

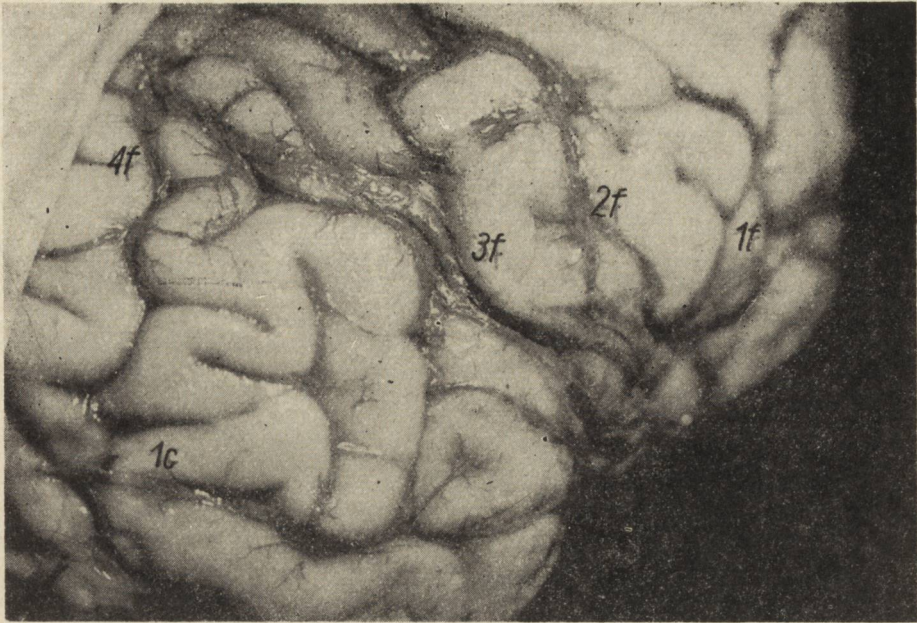
Исследования проводились на 104 полушариях мозга взрослых особей, умерших в различном возрасте. Целью работы являлось исследование венозных сосудов бассейна латеральной борозды мозга. Были определены три главных направления оттока крови из этой области: верхний, нижний и задний. Верхнее направление оттока представлено лобными венами, средними и теменно-затылочными, составляющими бассейн сегитальной верхней пазухи. Нижнее направление оттока составляют височные вены, входящие в состав сосудистой области поперечного синуса, пещеристой и каменной верхней пазух. Заднее направление оттока представлено средней глубокой веной мозга и ее продолжением — основной веной. Область оперкулума, островка, частей основания лобной доли и височной доли, а также область верхней и нижней теменной доли являются местами слияния путей оттока венозной крови разного направления. Наблюдалось также резкое различие между доминантным и недоминантным полушариями. На стороне доминантного полушария в области нижней лобной извилины, передней центральной и в передних частях верхней височной извилины отмечалась сильно развитая венозная сеть. Объединяющая нижняя вена выступала чаще всего в исследуемом материале с левой стороны. На стороне недоминантного полушария наблюдалась тенденция к редукции мозговых сосудов с одновременным увеличением их размера. Наблюдалось также преобладание сосудистого бассейна поперечного синуса.

A. Kędzia

## THE VENOUS DRAINAGE AREA OF THE LATERAL FOSSA AND SULCUS OF THE CEREBRUM

Summary

The study was carried out using 104 cerebral hemispheres from adult subjects who died at various age. The study was intended to examine the morphology



Ryc. 1.



Ryc. 2.

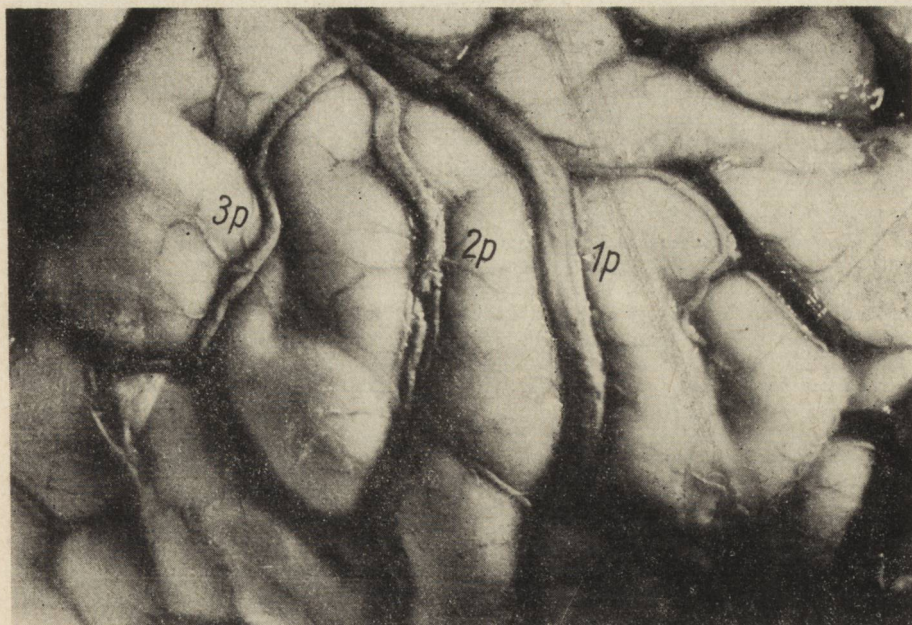




Ryc. 3.



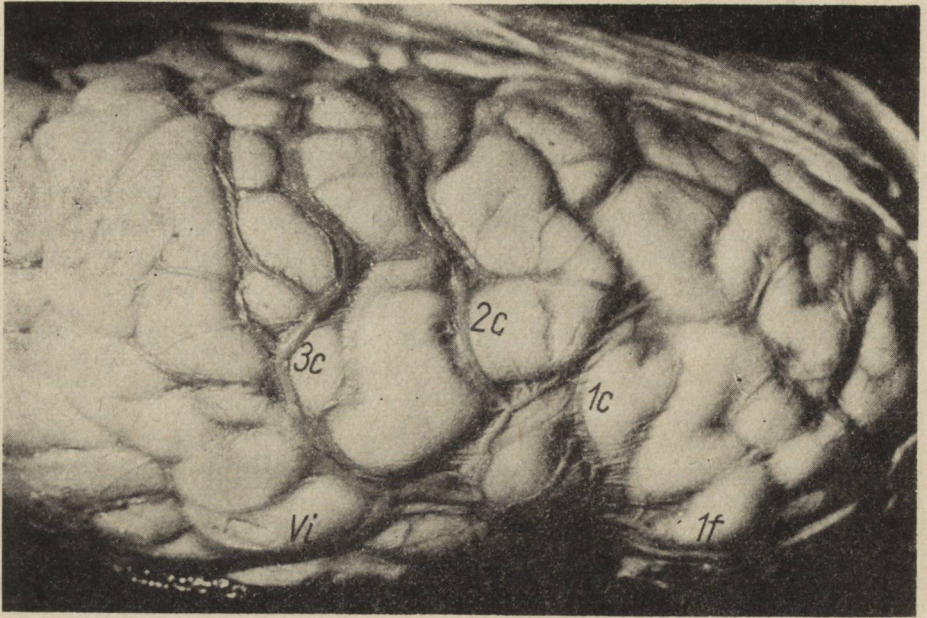
Ryc. 4.



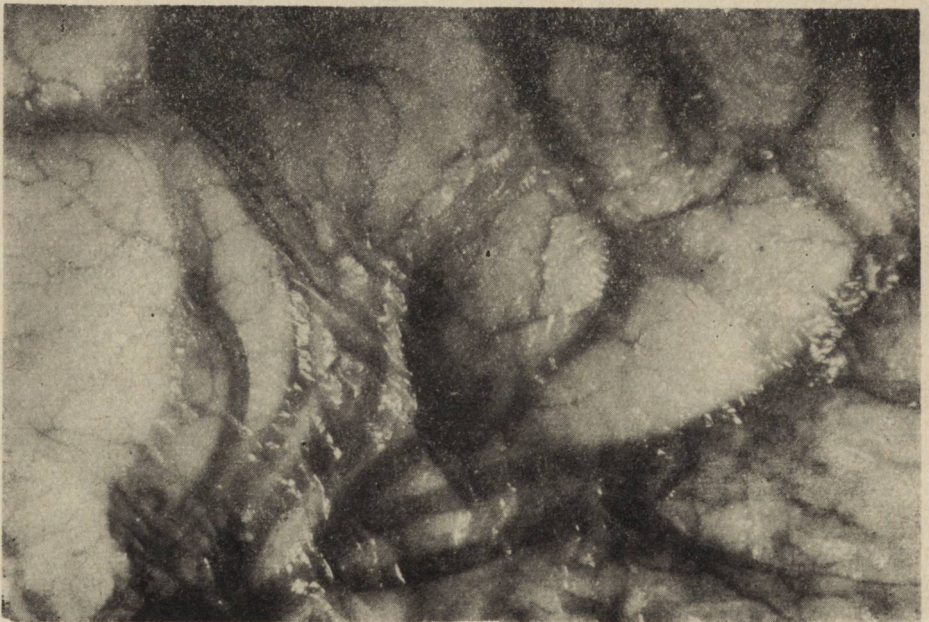
Ryc. 5



Ryc. 6



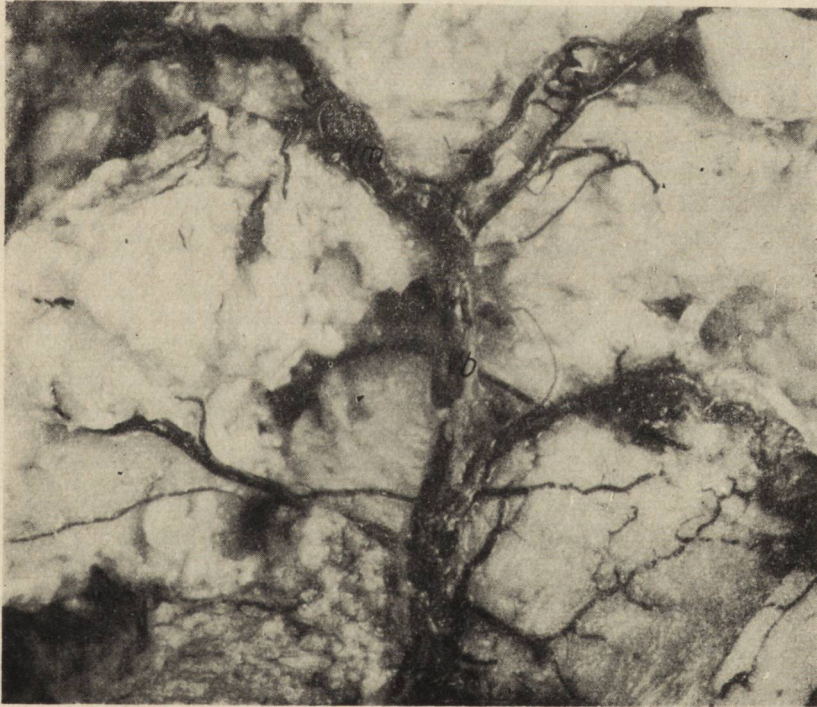
Ryc. 7



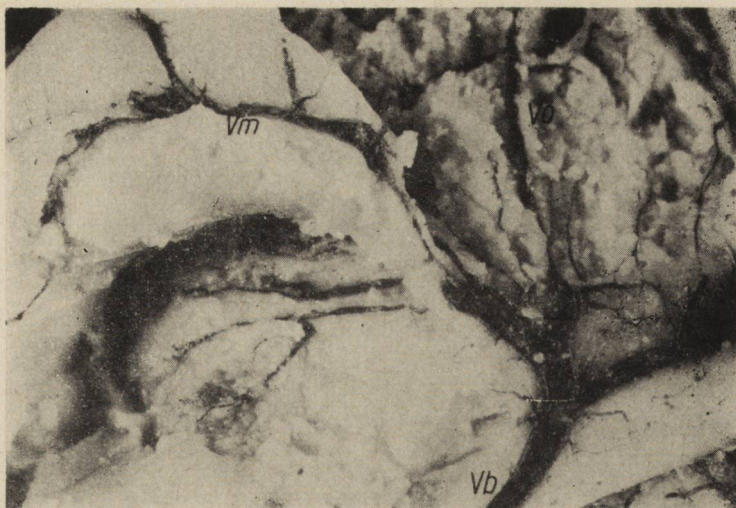
Ryc. 8



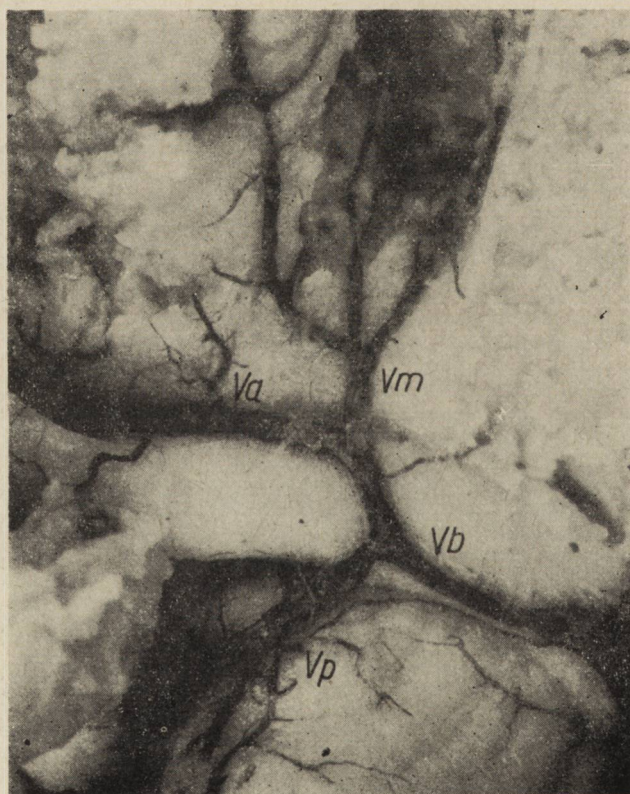
Ryc. 9



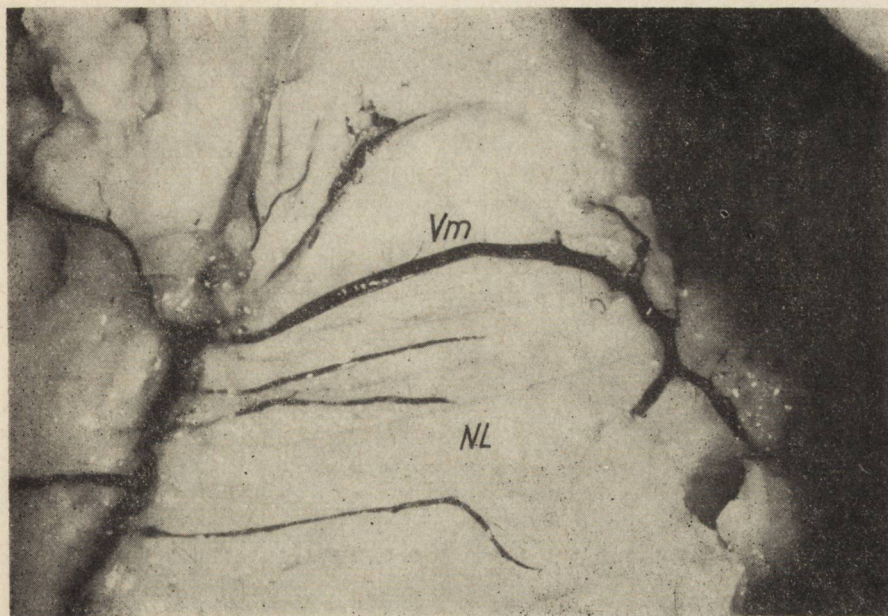
Ryc. 10



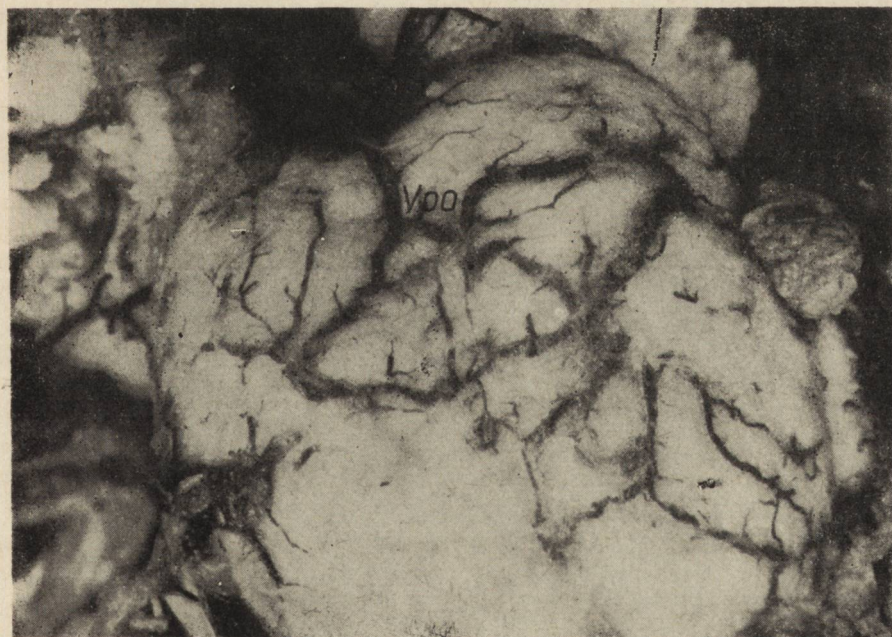
Ryc. 11



Ryc. 12



Ryc. 13



Ryc. 14



Ryc. 15

of the venous vessels forming the drainage of the lateral sulcus of the cerebrum. Three main directions of the venous blood drainage were found in this region: superior, inferior and posterior. The superior direction of the drainage is represented by frontal, medial and parieto-occipital veins belonging to the superior sagittal sinus drainage basin. The inferior direction is made by temporal veins belonging to the vessel area of the transversal, cavernous and petrosus superior sinuses. The posterior direction of drainage is represented by the medial profound vein of the brain and basal vein being the continuation of the former. The region of operculum, insula, basal parts of frontal and temporal lobe and the region of the superior and inferior parietal lobule are the locations of anastomose multidirectional paths of venous blood drainage.

Striking difference was also found to exist between the dominating and non-dominating hemispheres. In the dominating hemisphere the abundance of venous network was observed in the frontal inferior, precentral and anterior part of temporal superior gyrus. In the non-dominating hemisphere, a tendency of the cerebral vessels to reduction in quantity with a concurrent increase in their lumina were observed. The vessel basin of transversal sinus also predominated. In the material under study, the anastomotic inferior vein prevailed on the left side.

#### PIŚMIENNICTWO \*

1. Bakłuszyński, cyt. wg Jarosławcewa B.: *Anatomiczeskaja technika*. Kirgiskij Gosudarstwiennyj Uniwersytet, Frundze 1961
2. Bekow D.: *Atlas weneznoy sistemy gołownowo mozga czelowieka*. Moskwa 1965
3. Briusowa S.: *Angiografia mozga*. Izdat. AMN. Moskwa 1951
4. Delmas A., Pertuiset B.: *Les veines du cortex cerebral-Distribution générale, variations, types veineux de distribution*. Comp. Rend. de l'Ass des anat., XXXVI, Reu., Lyon 1949, 11—13, 185—193.
5. Delmas A., Pertuiset B.: *Les veines du lobe temporal*. Rev. Oto-Neuro-Opht., Lyon 1951, 23, 4, 224—230.
6. Dowżenko A.: *Patogeneza niedokrwienia tkanki nerwowej w miażdżycy tętnic mózgowych*. Neurol. Neurochir. Psych. Pol., 1964, 2, 235—242.
7. Dymecki J.: *Zawały na pograniczu rejonów unaczynienia mózgowego, ich cechy morfologiczne i warunki powstawania*. Neurol. Neurochir. Psych. Pol., 1966, 3, 307—315.
8. Ferner H.: *Die inneren Hirnvenen des Menschen und ihre Zustromgebiete*. Verhandlungen der Anat. Anz. (Ergänzunschaft), 1958, 105, 237—244.
9. Goetzen B.: *Żyły wewnętrzne mózgu człowieka. Część 1*. Folia Morphol., 1964, 15, 1, 41—63.
10. Goetzen B.: *Żyły wewnętrzne mózgu człowieka. Część 2*, Folia Morphol., 1964, 15, 2, 141—150.
11. Goetzen B.: *Żyły wewnętrzne mózgu człowieka. Część 3*, Folia Morphol., 1964, 15, 2, 151—156.
12. Goetzen B.: *Atlas neuropatologiczny*. T. II, PZWL, Warszawa 1970.
13. Grzybowski J.: *O układzie żylnym mózgu człowieka*. Archiwum Nauk Biol. Tow. Nauk. Warszawskiego, 1929, III, 4—18.

\* Pełne piśmiennictwo do niniejszej pracy do wglądu w Redakcji i u autorki.



14. Hassler R.: Venous anatomy of human hind brain. Arch. of Neur. 1967, 16, 4, 404—409.
15. Hempel K., Elmohamed A.: Mundungs und Verlausrinzip der venosen intrakraniellen Gefasse. Anat. Anz., 1968, 123, 2, 213—222.
16. Johanson C.: The cerebral phlebogram by carotid angiography in cases of central brain tumours. Acta Radiol., 1952, 40, 8—9.
17. Kłosowski B.: Cirkulacja krwi w mozgu. Medgiz, Moskwa, 1951.
18. Konorski J.: Integracyjna działalność mózgu. PZWL, Warszawa 1969.
19. König P.: Zur Kenntnis des Verhalten der ausseren Gehirnenen zu den Hirnhäuten. Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch., 1950, 6, 605—610.
20. Krayenbühl H., Yasargil M. G.: Die zerebrale Angiographia. G. Thieme, Stuttgart 1965.
21. Lazorthes G.: Vascularisation et circulation cerebrales. Masson et Cie, Paris 1961.
22. Michajłow S.: Anasomozy głębokich wan gołownego mozga w normie i pri nektorych patologiczeskich sostojanijach. Archiw. Anatomii Gist. i Embr., 1968, 4, 3—9.
23. Niżankowski, Kędzia A.: Polski lateks syntetyczny LBS 3022 jako masa iniekcyjna w technice anatomicznej, praca w druku — Polimery w medycynie.
24. Sattler J.: Die Venöse (Sinus) System des Gehirns., Morphologie und Physiologie. Anat. Anz. 1959, 106, 396—408.
25. Schlesinger D.: The venous drainage of the brain with special reference to the Galenic system. Brain, 1939, 62, 274—292.
26. Testut L.: Traite d'Anatomie humaine. T. II, Doin G., Paris 1921.
27. Vuia O., Alexianu U.: Insuffisance veineuse du cerveau. Jour. of the Neurol. Sciences, 1968, 7, 495—509.
28. Zülch K. J.: Neure Anshauungen über die Entstehung der cerebralen insulte. Livre Jubilaire Dr L. van Bogaert. Bruxelles, 1962.

Adres autorki: 50-139 Wrocław, ul. Szewska 18/3.

#### PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Topografia żył czołowych. Widoczna żyła czołowa dolna 1f, żyła czołowa środkowa 2f, żyła czołowa tylna 3f, żyła czołowa górna 4f, żyła przedśrodkowa 1c. Charakterystyczny promienisty zbieg tych żył w okolicy wieczka. Półkula prawa.

*Fig. 1.* Topography of frontal veins. Visible inferior frontal vein 1f, medial frontal vein 2f, posterior frontal vein 3f, superior frontal vein 4f, precentral vein 1c. Characteristic radial conjunction of these veins in the operculum region. Right hemisphere.

*Ryc. 2.* Topografia żył czołowych o układzie niemal prostopadłym do zatoki strzałkowej górnej. Widoczna żyła czołowa dolna 1f, żyła czołowa środkowa 2f. Półkula prawa.

*Fig. 2.* Topography of frontal veins arranged nearly perpendicular to superior sagittal sinus. Visible inferior frontal vein 1f, medial frontal vein 2f. Right hemisphere.

*Ryc. 3.* Ilustracja żył czołowych o układzie zbliżonym do równoległego w stosunku do zatoki strzałkowej górnej. Widoczne: 1f — żyły czołowe dolne, żyły czołowe górne — 4f. Półkula lewa.

*Fig. 3.* Illustration of frontal veins arranged nearly parallel with respect to superior sagittal sinus. Visible 1f — inferior frontal veins, superior frontal veins 4f. Left hemisphere.

*Ryc. 4.* Żyła przedśrodkowa 1c i żyła środkowa mózgu 2c łączą się we wspólny pień. Równoległe do nich biegnie żyła czołowa tylna 3f i żyła zaśrodkowa 3c. Półkula prawa.

*Fig. 4.* Precentral vein 1c and central vein 2c of the cerebrum joining to a common stem. Parallel to them is the posterior frontal vein 3f and postcentral vein 3c. Right hemisphere.

*Ryc. 5.* Układ żył ciemieniowo-potylicznych zbliżony do prostopadłego w stosunku do zatoki strzałkowej górnej. Żyła ciemieniowa przednia 1p, żyła ciemieniowa środkowa 2p i żyła ciemieniowa tylna 3p wytwarzają charakterystyczną bukietową formację. Półkula prawa.

*Fig. 5.* The arrangement of parieto-occipital veins nearly perpendicular with respect to superior sagittal sinus. Anterior parietal vein 1p, medial parietal vein 2p and posterior parietal vein 3p make the characteristic bouquet-wise appearance. Right hemisphere.

*Ryc. 6.* Promienisty zbieg żył czołowych, centralnych w okolicy wieczka. Widoczna żyła zespalająca dolna Vi. Półkula lewa.

*Fig. 6.* Radial conjunction of frontal veins and central veins in the operculum region. Visible the inferior anastomotic vein Vi. Left hemisphere.

*Ryc. 7.* Zespolenie typu Labbé'go: żyła czołowa dolna 1f, żyła przedśrodkowa 1c, środkowa 2c, zaśrodkowa 3c łączą żyłę zespalającą dolną Vi z zatoką strzałkową górną. Półkula prawa.

*Fig. 7.* Labbé's type anastomosis: inferior frontal vein 1f, precentral vein 1c, central vein 2c, postcentral vein 3c connect the inferior anastomotic vein Vi with the superior sagittal sinus. Right hemisphere.

*Ryc. 8.* Wachlarzowaty przebieg żył skroniowych w okolicy bruzdy bocznej mózgu. Półkula lewa.

*Fig. 8.* Fan wise conjunction of temporal veins in the region of the lateral sulcus of the cerebrum. Left hemisphere.

*Ryc. 9.* Przebieg żyły środkowej głębokiej mózgu Vm w okolicy wyspy, żyła podstawna Vb. Półkula prawa.

*Fig. 9.* The course of medial profound vein of the cerebrum Vm in the insula region, basal vein Vb. Right hemisphere.

*Ryc. 10.* Żyła środkowa głęboka mózgu Vm przedłuża się w żyłę podstawną Vb. Półkula prawa.

*Fig. 10.* Medial profound vein of the cerebrum Vm is continued by the basal vein Vb. Right hemisphere.

*Ryc. 11.* Obszar naczyniowy żyły środkowej głębokiej mózgu — typ dwugałęziowy, właściwy pień żyły środkowej głębokiej mózgu *Vm*, żyła węchowa *Vo*, żyła podstawna *Vb*. Widoczne dopływy głębokie z części dolnej jądra soczewkowatego i ogoniastego, promieniście zbiegające się w okolicy istoty dziurkowanej przedniej. Półkula prawa.

*Fig. 11.* The vascular area of the medial profound vein of the cerebrum — two-branch type. Proper stem of medial profound vein of the cerebrum *Vm*, olfactory vein *Vo*, basal vein *Vb*. Visible the deep affluents from the inferior part of lenticular and caudate nuclei which radially converge in the region of anterior perforated substance. Right hemisphere.

*Ryc. 12.* Typ trójgałęziowy żyły środkowej głębokiej mózgu *Vm*. Dobrze rozwinięte żyła przednia mózgu *Va*, żyła tylna mózgu *Vp*, uchodzące do żyły podstawnej *Vb*. Półkula lewa.

*Fig. 12.* Three-branch type of median profound vein of the cerebrum *Vm*. Well developed anterior vein of the cerebrum *Va*, and posterior vein of the cerebrum *Vp*, both draining into basal vein *Vb*. Left hemisphere.

*Ryc. 13.* Żyła środkowa głęboka mózgu *Vm* uchodzi do zatoki klinowo-ciemieniowej. Widoczne dopływy głębokie z części dolnej jądra soczewkowatego *NL*. Półkula lewa.

*Fig. 13.* The medial profound vein of the cerebrum flows into sphenoparietal sinus. Visible are the deep affluents from the bottom part of lenticular nucleus *NL*. Left hemisphere.

*Ryc. 14.* Silnie rozwinięta żyła mostowa *Vpo*.

*Fig. 14.* Well developed pontic vein *Vpo*.

*Ryc. 15.* Żyła mostowa *Vpo* przedłuża się w żyłę mózdzkową *Vc*. Półkula lewa.

*Fig. 15.* Pontic vein *Vpo* continued by cerebellar vein *Vc*. Left hemisphere.

## T R E Ś Ć

B. Gajkowska: Zmiany mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza mózgu szczura w niedoczynności nadnerczy	329
A. Danielewicz-Kotowicz: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w przysadce szczura po adenalektomii i po podaniu ACTH. I. Płat gruczołowy przysadki	345
Z. Kraśnicka, H. Konowałow, B. Gajkowska: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje czuciowe hodowane in vitro	357
B. Hoppe: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego in vitro poddanego działaniu tlenku węgla	371
M. Sikorska, W. Bicz, M. Śmiałek, M. J. Mossakowski: Stężenia ATP, ADP i AMP w mózgach szczurów po zatruciu tlenkiem węgla i w doświadczalnej ischemii	387
M. Śmiałek: Aktywność oksydazy cytochromowej w izolowanej komórce olbrzymiej substancji siatkowatej pnia mózgu szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla	397
Z. Rap, A. Kapuściński, M. Sikorska: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartości wody w mózgu w doświadczalnym zatruciu tlenkiem węgla	403
S. Kośmider, J. Misiewicz, J. Pasiewicz: Wpływ wiązania tlenków azotu gazowym amoniakiem na występowanie zmian w centralnym układzie nerwowym	413
I. B. Zelman, J. Szewczykowski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki: Patomorfologia w doświadczalnym uciskowym obrzęku mózgu u kotów	425
R. Gadamski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki: Stan bariery krew-mózg we wczesnym doświadczalnym obrzęku mózgu u kotów	435
G. Szumańska, R. Gadamski, Z. Czernicki, J. Jurkiewicz, J. Teżycka: Zmiany histochemiczne w mózgu kota w doświadczalnym ucisku nadtwardówkowym	447
M. Kozik, E. Ożarowska: Inkorporacja fenyloalaniny do mózgu szczura. Badania autoradiograficzne	461
H. Weinrauder, M. Śmiałek: Ocena immunologiczna wzbogaconych frakcji komórkowych w mózgu szczura	469
E. Osetowska, A. Taraszewska: Nosówka nerwowa i toksoplazmoza — interferencja dwóch różnych procesów zapalnych mózgu	477
M. Dąbska, J. Kulczycki, B. Schmidt-Sidor, J. Goertz: Agenezja i hypoplazja spoidła wielkiego. Analiza morfologiczna 12 przypadków	487
E. Tarnowska-Dziduszko, D. Pietrow, L. Welbel: Przypadek granulomatycznego zapalenia mózgu	497
W. Rudowski, J. Schier, J. Borowicz, Z. Klawe, M. Sielczak, J. Knap: Dwa przypadki przyzwojaka niechromochłonnego kłęбка szyjnego	505
A. Kędzia: Zlewisko żyłne dołu i bruzdy bocznej mózgu	515

## СОДЕРЖАНИЕ

Б. Гайковска: Наблюдаемые в электронном микроскопе изменения в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах подбугровой области мозга крысы при недостаточности надпочечников . . . . .	329
А. Данелевич-Котович: Наблюдаемые в электронном микроскопе изменения гипофиза после адреналектомии и после введения АКТГ. I. Передняя доля гипофиза . . . . .	345
З. Красницка, Г. Коновалов, Б. Гайковска: Влияние кратковременной гипоксии на сенсорные ганглии культивированные <i>in vitro</i> . . . . .	357
Б. Хоппе: Картина структурных и гистохимических изменений глии культивированной <i>in vitro</i> подвергаемой действию окиси углерода	371
М. Сикорска, М. Смялек, В. Бич, М. Я. Моссаковский: Изменения концентраций адениновых нуклеотидов АТФ, АДФ и АМФ в мозге крысы после отравления СО и при экспериментальной ишемии . . . . .	387
М. Смялек: Активность цитохромооксидазы в изолированной гигантской клетке ретикулярной формации ствола мозга крысы после отравления окисью углерода (метод Картезианских микроплавок) . . . . .	397
З. М. Рап, А. Капустински, М. Сикорска: Оценка состояния гемато-энцефалического барьера и содержания воды в мозге при экспериментальном остром отравлении окисью углерода . . . . .	403
С. Косьмидер, А. Мисевич, Е. Пасевич: Влияние связывания окисей азота аммиаком на появление нарушений в центральной нервной системе . . . . .	413
И. Б. Зельман, Е. Шевчиковски, Е. Юркевич, З. Черницка: Патоморфология при экспериментальном прессовом отеке мозга у кошки . . . . .	425
Р. Гадамски, Е. Юркевич, З. Черницки: Исследования поведения гемато-энцефалического барьера у кошки при раннем экспериментальном отеке . . . . .	435
Г. Шуманьска, Р. Гадамски, З. Черницки, Е. Юркевич, И. Тенжицка: Гистохимические изменения в мозге кошки при экспериментальном сипрадуральном давлении . . . . .	447
М. Козик, Е. Ожажевска: Включение фенилаланина в мозг крысы. Авто-радиографические исследования . . . . .	461
Г. Вейнраудер, М. Смялек: Иммунологическая оценка обогащенных клеточных фракций из мозга крысы . . . . .	469
Э. Осетовска, А. Тарашевска: Нервная чумка и токсоплазмоз — интерференция двух инфекционных процессов . . . . .	477
М. Домбска, Е. Кульчицки, В. Шмидт-Сидор, Е. Герц: Морфологический анализ 12 случаев с агенезией или гипоплазией мозолистого тела . . . . .	487
Е. Тарновска-Дзидушко, Д. Петров, Л. Вельбель: Случай грануломатического энцефалита . . . . .	497
В. Рудовски, Е. В. Борович, Ю. Шир, Э. Кляве, М. Сельчак, Ю. Кнап: Два случая хемодектомы шейного клубка . . . . .	505
А. Кендя: Венозный бассейн латеральной ямы и латеральной борозды мозга . . . . .	515

## CONTENTS

B. Gajkowska: Electron microscopic changes in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain hypothalamus in adrenal hypofunction	329
A. Danielewicz-Kotowicz: Electron microscopic changes in rat hypophysis following adrenalectomy and ACTH administration. I. Glandular lobe	345
Z. Kraśnicka, H. Konowałow, B. Gajkowska: Effect of short-term anoxia on sensory ganglia cultured in vitro	357
B. Hoppe: The structural and histochemical picture of carbon monoxide gliopathy in vitro	371
M. Sikorska, W. Bicz, M. Śmiałek, M. J. Mossakowski: ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia	387
M. Śmiałek: Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication (Cartesian micro-diver technique)	397
Z. Rap, A. Kapuściński, M. Sikorska: Evaluation of the blood-brain barrier and water content in brain in experimental acute carbon monoxide intoxication	403
S. Kośmider, J. Misiewicz, J. Pasiewicz: Effect of binding of nitrogen oxides with gaseous ammonia on the occurrence of changes in the central nervous system	413
I. B. Zelman, J. Szewczykowski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki: Pathomorphology in experimental brain edema caused by supradural compression	425
R. Gadamski, J. Jurkiewicz, Z. Czernicki: Studies on the blood-brain barrier permeability in cats in early experimental edema	435
G. Szumańska, R. Gadamski, Z. Czernicki, J. Jurkiewicz, J. Teżycka: Histochemical changes in cat brain in experimental supradural compression	447
M. Kozik, E. Ożarowska: Phenylalanine incorporation into rat brain. Autoradiographic studies	461
H. Weinrauder, M. Śmiałek: Immunological evaluation of cell enriched fractions of rat brain	469
E. Osetowska, A. Taraszewska: Nervous distemper and toxoplasmosis — interference of two infectious processes	477
M. Dąbmska, J. Kulczycki, B. Schmidt-Sidor, J. Goertz: Agenesis and hypoplasia of corpus callosum. Morphological study of 12 cases	487
E. Tarnowska-Dziduszko, D. Pietrow, L. Welbel: A case of granulomatous encephalitis	497
W. Rudowski, J. Schier, J. W. Borowicz, Z. Klawe, M. Sielczak, J. Knap: Two cases of chemodectoma of the carotid body	505
A. Kędzia: The venous drainage area of the lateral fossa and sulcus of the cerebrum	515

### WARUNKI PRENUMERATY

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

Instytucje 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.

Prenumeratorzy 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 — R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” CKPiW, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” BKWZ, Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

Sprzedaż egzemplarzy numerów zdezaktualizowanych, na uprzednie pisemne zamówienia, prowadzi R.S.W. „Prasa — Książka — Ruch” CKPiW, 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**