

egr 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH



P.105

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

34, -

~~Nelina~~ ~~Pls~~

TOM XV

1977

ZESZ. 2

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XV

Kwiecień-Czerwiec

Nr 2

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Mirostlaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Smiatek* (Warszawa), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmina Zelman* (Warszawa)

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

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

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmina Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Halina Kroh*

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk.
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-54-10

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



MIECZYŚLAW SMIAŁEK

AKTYWNOŚĆ ODDECHOWA W UKŁADZIE
ASKORBINIAN-CYTOCHROM C NEURONÓW KORY AMONALNEJ
CHOMIKA MONGOLSKIEGO (*MERIONES UNQUICULATUS*)
W DOŚWIADCZALNYM NIEDOKRWIENIU MÓZGU

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

Szczególne wrażliwość neuronów kory amonalnej na niedotlenienie jest zjawiskiem znanym od dawna w piśmiennictwie neuropatologicznym, a zróżnicowana reakcja ugrupowań komórkowych położonych w poszczególnych jej odcinkach dała między innymi podstawę pojęcia tzw. wybiórczej wrażliwości neuronów (selective vulnerability). Badania nad doświadczalnym niedokrwieniem ośrodkowego układu nerwowego u chomików mongolskich (*Meriones unquiculatus*), stanowiących szczególnie dogodny model do oceny skutków zaburzeń ukrwienia mózgu, ze względu na obecność u około 35% populacji genetycznej uwarunkowanych nieprawidłowości w kształtowaniu pierścienia tętniczego Willizjusza, potwierdziły odcinkowe zróżnicowanie wrażliwości komórek piramidowych rogu Amona, przynosząc równocześnie szereg nowych i nieznanych dotychczas spostrzeżeń (Ito i wsp. 1975, Klatzo i wsp. 1974). Wykazano, że neurony odcinka H₂ rogu Amona w półkuli niedokrwionej ulegają chromatolizie, prowadzącej do typowego obrazu „schorzenia ischemicznego”, a następnie zanikowi. W późniejszym okresie obserwacji sektor H₂ rogu Amona pozbawiony jest całkowicie komórek nerwowych, zamiast których występują obficie komórki glejowe. Komórki nerwowe sąsiadującego sektora H₃ wykazują całkowicie odmienną reakcję. We wczesnym okresie po niedokrwieniu ulegają one tzw. centralnej tigrolizie, przypominającej obraz zwyrodnienia osiowego. W badaniach histochemicznych aktywności enzymów oksydacyjno-redukcyjnych i hydrolitycznych, centralna, pozbawiona ziarnistości Nissla część cytoplazmy komórkowej gromadzi obfite złożone produkty końcowego odczynu enzymatycznego. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe z kolei wykazują skupienie w tej części cytoplazmy licznych organelli subkomórkowych, wśród których dominują mitochondria i lizosomy (Bubis i wsp.

1976). W odróżnieniu od zwyrodnieniowego charakteru zmian w neuronach sektora H_2 , cechy nieprawidłowości strukturalnych neuronów sektora H_3 przemawiają za ich charakterem odczynowym. Poprawność tej oceny potwierdza fakt, że w późniejszych okresach obserwacji nie stwierdza się ubytków neuronalnych w sektorze H_3 , a obraz morfologiczny komórek nerwowych tej okolicy powraca do wyjściowego. Klatzo (1975) przypuszcza, że odrębność reakcji komórek nerwowych sektora H_2 i H_3 na niedokrwienie może być uwarunkowana różnicami ukrwienia poszczególnych odcinków rogu Amona. Nie wyłącza jednak możliwości zróżnicowanych właściwości metabolicznych obu ugrupowań komórek nerwowych.

W badaniach nad wybiórczą wrażliwością neuronów ośrodkowego układu nerwowego na różnego typu niedotlenienie, prowadzonych na izolowanych komórkach nerwowych wykazano, że stopień ich uszkodzenia zależy od ich aktywności oddechowej (Śmiałek, Kraśnicka 1975; Śmiałek 1976). Wydawało się przeto uzasadnione ustalenie w jakiej mierze ten właśnie czynnik uczestniczy w zróżnicowanej reakcji na niedokrwienie neuronów z poszczególnych odcinków zawoju hipokampa.

Bezpośrednim celem badań było porównanie aktywności oddechowej izolowanych neuronów sektora H_2 i H_3 rogu Amona, w obecności układu askorbinian — cytochrom c (oksydaza cytochromowa) w warunkach prawidłowych i w przejściowym niedokrwieniu mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 59 chomików, samców w wieku 10 tygodni, o ciężarze ciała około 70 g, u których wywoływano niedokrwienie lewej półkuli mózgu, poprzez zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej. W narkozie eterowej wyłaniano lewą tętnicę szyjną wspólną, którą zamykano antytraumatycznym zaciskiem na okres 15 minut (Klatzo i wsp. 1974). Następnie udrożniano tętnicę. Właściwą grupę doświadczalną stanowiły zwierzęta, które po wyjściu z narkozy wykazywały charakterystyczny zespół objawów klinicznych, świadczących o niedokrwieniu półkuli mózgu po stronie niedrożnej tętnicy szyjnej (Kahn 1972). Dla celów porównawczych (kontrolnych) wykorzystano również zwierzęta, u których nieobecność objawów klinicznych wskazywała na brak wspomnianej uprzednio anomalii naczyniowej, warunkującej skuteczność jednostronnego niedokrwienia mózgu. Podstawową grupę kontrolną, traktowaną jako normę stanowiły zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Zwierzęta doświadczalne zarówno z objawami klinicznymi, jak i bezobjawowe dekapitowano natychmiast po zwolnieniu zacisku tętnicy szyjnej wspólnej (czas „0”) oraz po 2 i 4 godzinach.

Materiał komórkowy do badań u wszystkich zwierząt pobierano z odpowiednich sektorów rogu Amona z obu półkul mózgowych. Skrawki z półkul mózgowych, pobrane na poziomie zawoju hipokampa umieszczano w oziębionym na lodzie roztworze 0,25 M sacharozy, zawierającym 0,002 M błękitu metylenowego. Pojedyncze neurony z sektora H₂ i H₃ rogu Amona izolowano z tkanki pod mikroskopem za pomocą włókna Kanthala o średnicy 18 μ (Hydèn, Pigoń 1960). Wyizolowany neuron umieszczano w ampułkowym mikronurku zawierającym środowisko inkubacyjne o następującym składzie: Na₂HPO₄ — KH₂PO₄ bufor o pH 7,4 — 37,5 mM, cytochrom c — $8,6 \times 10^{-2}$ mM, sodu askorbinian — 12,5 mM, AlCl₃ — 0,5 mM (Slater 1949, Potter 1957). Zużycie tlenu w układzie askorbinian — cytochrom c (aktywność oksydazy cytochromowej) mierzono w temp. 38° ± 0,002°C przy zastosowaniu techniki ampułkowego mikronurka Kartezjusza (Zeuthen 1953). Aktywność enzymu wyrażano w μl O₂ x 10⁻¹/godz./neuron.

Oznaczanie objętości wyizolowanych neuronów przeprowadzono według sposobu opisanego w poprzedniej pracy (Śmiałek 1976). Pojedyncze neurony po wydzieleniu z tkanki utrwalano w 1,5% roztworze aldehydu glutarowego o pH 7,4, a następnie w 2% roztworze OsO₄. Komórki zbierano na sączku z włókna szklanego, przeprowadzano przez szereg alkoholi i acetonów o wzrastającym stężeniu, napyłano węglem i złotem i badano w mikroskopie odbiciowym JEOL-Japan, JSM-S-1.

Objętość komórki w zależności od jej kształtu określano z wzorów na odcinek prosto ścięty paraboloidy obrotowej $V = \frac{1}{2}\pi h (R^2 + r^2)$ i beczki $V = \frac{1}{15}\pi l (2D^2 + Dd + 3/4 d^2)$. Objętość jądra neuronu obliczano w oparciu o pomiary mikroskopowe wg metody opisanej przez Eneströma i Hambergera (1968) z dwóch wymiarów elipsy. Różnica objętości neuronu i jądra stanowiła przybliżoną objętość cytoplazmy, którą wyrażano w μ³. Na tej podstawie przeliczano średnie zużycie tlenu na μ³ cytoplazmy komórki (μl O₂/godz./μ³). Przeliczenie to stwarzało możliwość porównania aktywności oddechowej w dwóch różnych rodzajach neuronów, różniących się całkowitą objętością i masą cytoplazmy.

WYNIKI

Objętość komórek piramidowych strefy H₃ (ryc. 1) obliczona na podstawie pomiarów z 6 neuronów wynosiła 454 μ³ ± 28. Po odjęciu od niej średniej objętości jądra komórkowego, cytoplazma zajmowała średnio 402 μ³. Neurony sektora H₂ (ryc. 2) miały objętość 171 μ³ ± 10 (obliczenie z 8 komórek), a ich cytoplazma 147 μ³.

Aktywność oddechową w obecności układu askorbinian — cytochrom c (aktywność oksydazy cytochromowej) w komórkach sektora H₂ i H₃ ro-



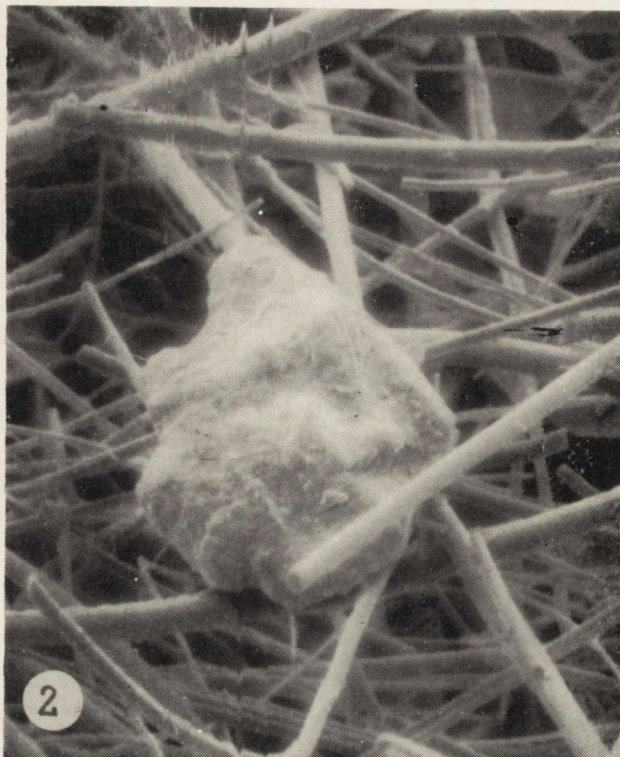
Ryc. 1. Komórka piramidowa strefy Sommera H₃ mózgu chomika mongolskiego. Mikroskop odbiciowy. Pow. 5600×.

Fig. 1. Pyramid cell from Sommer sector H₃ of the brain of Mongolian gerbil. Scanning microscope. × 5600.

gu Amona, stwierdzoną u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych zestawiono w tabelach 1 i 2.

Aktywność enzymu w normie (zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym) w neuronach sektora H₃ wynosiła $5,83 \pm 0,55 \times 10^{-4}$ $\mu\text{LO}_2/\text{godz.}/\text{neuron}$. Po uwzględnieniu średniej objętości cytoplazmy komórki, jego aktywność przyjmowała średnią wartość $1,45 \times 10^{-6}$ $\mu\text{l}/\text{godz.}/\mu^3$ cytoplazmy. W neuronach sektora H₂ uzyskano odpowiednio wartości: $6,56 \pm 0,61 \times 10^{-4}$ $\mu\text{LO}_2/\text{godz.}/\text{neuron}$ i $4,46 \times 10^{-6}$ $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\mu^3$ cytoplazmy.

Natychmiast po 15-minutowym zaciśnięciu lewej tętnicy szyjnej wspólnej (czas „0”) stwierdzono nieznamienną statystycznie tendencję stymulacji zużycia tlenu obustronnie w neuronach sektora H₃, a wyłącznie po stronie prawej (przeciwnej do niedrożnej tętnicy) w neuronach sektora H₂.



Ryc. 2. Komórka piramidowa strefy Sommera H_2 mózgu chomika mongolskiego. Mikroskop odbiciowy. Pow. 5600 \times .

Fig. 2. Pyramid cell from Sommer sector H_2 of the brain of Mongolian gerbil. Scanning microscope. $\times 5600$.

Po 2 godzinach od zabiegu operacyjnego, w neuronach sektora H_3 obu półkul stwierdzono istotny statystycznie przyrost aktywności oddechowej, wyższy w półkuli lewej, poddanej przejściowemu niedokrwieniu ($p \leq 0,01$). Komórki piramidowe sektora H_2 w półkuli z upośledzonym dopływem krwi, zareagowały znamionym statystycznie spadkiem aktywności oddechowej w układzie askorbinian — cytochrom c ($p \leq 0,05$). W półkuli przeciwnej stwierdzono również znamionny wzrost aktywności oddechowej ($p \leq 0,05$).

Po 4 godzinach od zabiegu operacyjnego u zwierząt, które nie wykazywały klinicznych objawów jednostronnego niedokrwienia mózgu, mimo podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej, w badaniach aktywności oddechowej neuronów strefy H_3 i H_2 obu półkul mózgowych nie obserwowano istotnych różnic w stosunku do normy. W grupie zwierząt doświadczalnych, wykazujących objawy jednostronnego niedokrwienia neurony sektora H_3 obustronnie wykazywały znamionny przyrost

Tabela 1. Aktywność oddechowa izolowanych komórek piramidowych strefy Sommera H₃ rozwoju hipokampa chomika mongolskiego w obecności układu askorbinian — cytochrom c (oksydaza cytochromowa) w normie oraz w następstwie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej lewej

Table 1. Respiratory activity of pyramidal cells isolated from H₃ Sommer region of hippocampal gyrus of Mongolian gerbil in the presence of the ascorbate — cytochrome c system (cytochrome oxidase) in normal conditions and following ligation of the left common carotid artery

Grupa doświadczalna (czas przeżycia) Experimental group (time of survival)	Półkula prawa Right hemisphere			Półkula lewa Left hemisphere		
	p	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$		P _b	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	p
„0” natychmiast po zabiegu „0” directly after operation	≥ 0.05	7.93 \pm 0.93 (5) ⁿ		≥ 0.05	7.08 \pm 1.10 (6)	≥ 0.05
2 godz. po zabiegu 2 hrs after operation	≤ 0.05	10.78 \pm 2.06 (6)		≥ 0.05	17.08 \pm 2.25 (7)	≤ 0.01
4 godz. po zabiegu 4 hrs after operation	≤ 0.01	17.87 \pm 3.05 (7)		≥ 0.05	21.89 \pm 3.77 (5)	≤ 0.01
4 godz. po zabiegu kontrolnym 4 hrs after sham operation	≥ 0.05	6.42 \pm 0.85 (5)		≥ 0.05	6.53 \pm 0.73 (6)	≥ 0.05
Kontrola — norma: Control — norm:		$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$ — $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$			5.83 \pm 0.55 (8)	
Kontrola — norma: Control — norm:		$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-6}/\text{h}/\mu^3 \text{ cyt.}$ — \bar{x}			1.45	

$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ — średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej
arithmetic mean \pm standard error of the mean

p — prawdopodobieństwo obliczone wg testu t Studenta w stosunku do normy
probability calculated by t Student's test in relation to norm

P_b — prawdopodobieństwo obliczone wg testu t Studenta w stosunku do półkuli przeciwnej
probability calculated by t Student's test in relation to contralateral hemisphere

n — liczba neuronów
number of neurons

zużycia tlenu w stosunku do grupy zwierząt badanych w 2 godziny po zabiegu, nie stwierdzono przy tym znaczących różnic między neuronami obu półkul. Neurony sektora H₂ półkuli niedokrwionej wykazywały w tej grupie czasowej znamiennej statystycznie spadek aktywności oddechowej ($p \leq 0,05$), a w półkuli przeciwnej istotny przyrost.

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań wskazują na zróżnicowanie kierunku i intensywności zmian w aktywności oddechowej neuronów sektora H₂ i H₃ kory amonalnej, rozwijających się w następstwie jednostronnego niedokrwienia mózgu (wykres 1). W skutecznie niedokrwionej półkuli mózgu (zwierzęta z klinicznymi objawami neurologicznymi) komórki piramidowe sektora H₃ reagowały każdorazowo znaczną stymulacją

Tabela 2. Aktywność oddechowa izolowanych komórek piramidowych strefy Sommera H₂ zwoju hipokampa chomika mongolskiego w obecności układu askorbinian — cytochrom c (oksydaza cytochromowa) w normie oraz w następstwie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej lewej

Table 2. Respiratory activity of pyramidal cells isolated from H₂ Sommer region of hippocampal gyrus of Mongolian gerbil in the presence of the ascorbate — cytochrome c system (cytochrome oxidase) in normal conditions and following ligation of the left common carotid artery

Grupa doświadczalna (czas przeżycia) Experimental group (time of survival)	Półkula prawa Right hemisphere			Półkula lewa Left hemisphere		
	p	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$		p _b	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	p
„0” natychmiast po zabiegu „0” directly after operation	≥ 0.05	7.71 ± 0.99 (6) ⁿ		≥ 0.05	6.16 ± 1.03 (7)	≥ 0.05
2 godz. po zabiegu 2 hrs after operation	≤ 0.05	11.52 ± 1.99 (6)		≤ 0.01	3.85 ± 0.70 (8)	≤ 0.05
4 godz. po zabiegu 4 hrs after operation	≤ 0.05	18.74 ± 3.11 (5)		≤ 0.01	4.28 ± 0.66 (6)	≤ 0.05
4 godz. po zabiegu kontr. 4 hrs after sham operation	≥ 0.05	7.42 ± 0.85 (5)		≥ 0.05	7.68 ± 0.72 (5)	≥ 0.05
Kontrola — norma Control — norm:	—	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{h}/\text{neuron}$	— $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$		6.56 ± 0.61 (7)	
Kontrola — norma: Control — norm:	—	$\mu\text{l O}_2 \times 10^{-6}/\text{h}/\mu^3 \text{ cyt.}$	— \bar{x}		4,46 (7)	

$\bar{x} \pm \text{S.E.M}$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej

arithmetical mean ± standard error of the mean

p — prawdopodobieństwo obliczone wg testu t Studenta w stosunku do normy

probability calculated by t Student's test in relation to norm

p_b — prawdopodobieństwo obliczane wg testu t Studenta w stosunku do półkuli przeciwnej

probability calculated by t Student's test in relation to contralateral hemisphere

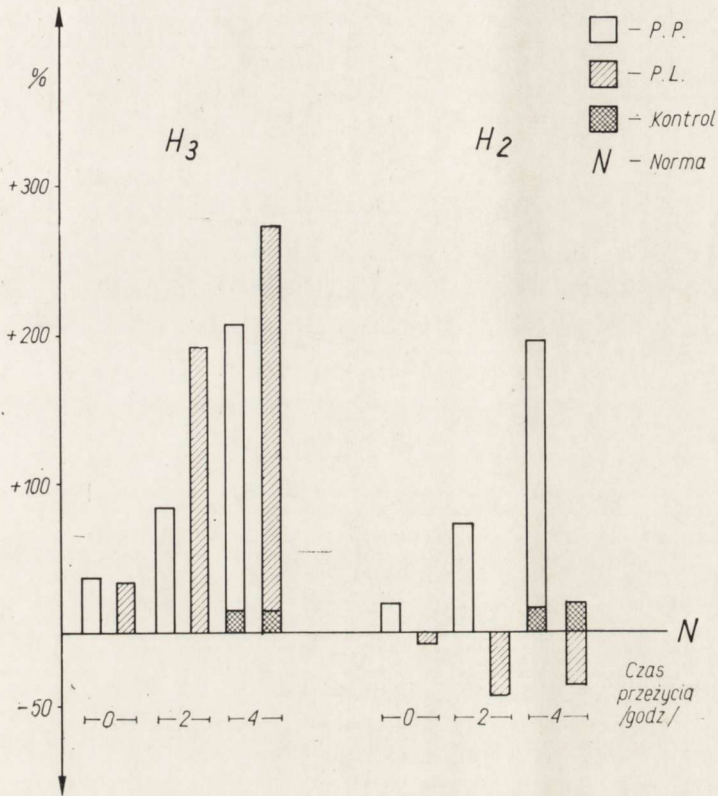
n — liczba neuronów

number of neurons

zużycia tlenu. W czwartej godzinie po zabiegu operacyjnym, w której zmiany aktywności oddechowej były najwyższe w stosunku do stwierdzonej u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, przyrost zużycia tlenu wyniósł około 275%. Stwierdzona stymulacja aktywności oddechowej neuronów sektora H₃ może być traktowana jako wykładnik zmian reaktywnych, opisanych w badaniach histologicznych, histoenzymatycznych i mikroskopowo-elektronowych (Ito i wsp. 1975, Klatzo 1975, Bubis i wsp. 1976). Zwiększenie aktywności oddechowej tkanki nerwowej w odpowiedzi na niedostatek tlenu jest zjawiskiem znanym. Śmiałek i Hamberger (1970) wykazali, że zarówno przejściowe niedotlenienie jak i niedokrwienie mózgu prowadziło do wzrostu zapotrzebowania mitochondriów na tlen, któremu towarzyszyło równoległe wzmożenie biosyntezy białka. Hamberger i Hyden (1963) obserwowali również zjawisko aktywacji oksydazy cytochromowej w izolowanych ko-

mórkach nerwowych pod wpływem ich niedotlenienia. Wydaje się przy tym, że zjawisko to należy wiązać z komórkowymi procesami kompensacyjnymi.

Komórki piramidowe sektora H_2 kory amonalnej skutecznie niedokrwionej półkuli mózgu każdorazowo reagowały spadkiem aktywności



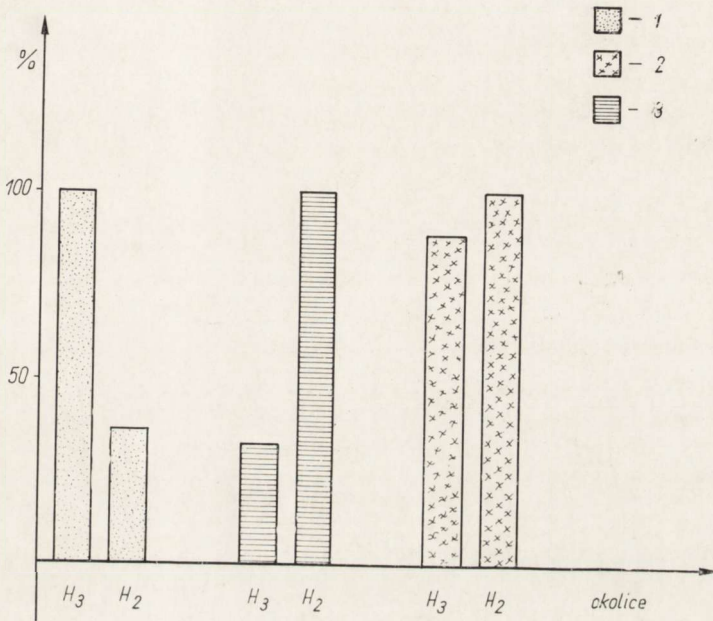
Wykres 1. Średnie procentowe różnice aktywności oddechowej neuronów kory amonalnej chomika mongolskiego w obecności układu askorbinian — cytochrom c w następstwie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej lewej. Oznaczenia: P.P. — półkula prawa, P.L. — półkula lewa, Kontrola — zwierzęta operowane bez cech niedokrwienia mózgu, N — norma.

Diagram 1. Mean percent differences in the respiratory activity of Ammon horn neurons in the presence of the ascorbate — cytochrome c system following ligation of the left common carotid artery. Denotations: P.P. — right hemisphere, P.L. — left hemisphere, Kontrola — control, operated animals without symptoms of brain ischemia, N — norm.

oddechowej w układzie askorbinian — cytochrom c. Spadek ten w drugiej godzinie po zabiegu operacyjnym wynosił około 41% w stosunku do normy, a w czwartej — około 35%. Stwierdzone obniżenie zużycia tlenu przez komórki piramidowe sektora H_2 może być z kolei traktowane jako

metaboliczny wykładnik zachodzących w nich procesów zwyrodnieniowych, opisanych w badaniach morfologicznych (Ito i wsp. 1975, Klatzo 1975).

Wydaje się, że stwierdzoną odmienność reakcji komórek nerwowych sektora H_2 i H_3 kory amonalnej na niedokrwienie odnieść należy do ich zróżnicowania metabolicznego, dotyczącego w pierwszej kolejności zapotrzebowania na tlen. Aktywność oddechowa w układzie askorbinian — cytochrom c w komórkach nerwowych sektora H_2 jest wyższa niż w neuronach sektora H_3 (wykres 2). Aktywność oddechowa tych ostatnich



Wykres 2. Stosunki procentowe objętości cytoplazmy neuronów oraz zużycie tlenu w układzie askorbinian—cytochrom c przez komórki piramidowe strefy Sommera H_3 i H_2 zawoju hipokampa chomika mongolskiego w normie. Oznaczenia: 1 — objętość cytoplazmy, 2 — $\mu\text{l O}_2/\text{godz./neuron}$, 3 — $\mu\text{l O}_2/\text{godz./}\mu^3$ cytoplazmy.

Diagram 2. Percent proportion of the cytoplasm volume of neurons and oxygen consumption in the ascorbate—cytochrom c system by pyramidal cells of Sommer sector H_2 and H_3 of hippocampal gyrus in normal condition. Denotations: 1 — cytoplasm volume, 2 — $\mu\text{l O}_2/\text{hour/neuron}$, 3 — $\mu\text{l O}_2/\text{hour}/\mu^3$ of cytoplasm.

stanowi w przeliczeniu na pojedynczą komórkę około 88,8%, a w przeliczeniu na μ^3 cytoplazmy zaledwie 32,4% aktywności neuronów sektora H_2 . Uwzględniając przybliżoną jedynie, ze względu na możliwe błędy techniki pomiarów, wartość oceny objętości komórek nerwowych i ich cytoplazmy należy uznać, że uzyskane dane wskazują na istotne różnice

zapotrzebowania na tlen w obu ugrupowaniach komórkowych. Wrażliwsze na niedokrwienie okazały się komórki o wyższym zużyciu tlenu. Spostrzeżenie to potwierdza poprzednie obserwacje dotyczące związku między wrażliwością komórek nerwowych na różnego typu niedostatek tlenowy i wysokością ich zapotrzebowania na tlen, zróżnicowanego w poszczególnych populacjach neuronów (Śmiałek, Kraśnicka 1975, Śmiałek 1976).

Na odrębną uwagę zasługuje występowanie zmian w obu grupach komórek nerwowych rogu Amona w półkuli przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej. Wyrażają się one wzrostem aktywności oddechowej zarówno komórek sektora H_3 i H_2 . Wzrost ten osiąga najwyższe wartości w 4 godzinie po zabiegu operacyjnym, wynosząc w przypadku komórek sektora H_3 — 206%, a sektora H_2 — 186% w stosunku do normy ustalonej u zwierząt nie operowanych. Zmiany te jednakowe w swoim charakterze ze stwierdzonymi w sektorze H_3 półkuli niedokrwionej świadczą o występowaniu zaburzeń metabolicznych w histologicznie nie uszkodzonej półkuli mózgu (Kahn 1972, Ito i wsp. 1975). Późniejsze badania biochemiczne wykazały w niej również zaburzenia metabolizmu węglowodanów (Mrsulja i wsp. 1975) i zawartości katecholamin (Mrsulja i wsp. 1976). Związek przyczynowy tych nieprawidłowości metabolicznych z przeciwstronnym, okresowym uniedrożnieniem tętnicy szyjnej jest niejasny. Klatzo (1975) przypuszcza, że w rachubę może wchodzić odruchowy mechanizm naczyniowy, zaburzający ukrwienie „niezmienionej” półkuli, lub też wtórne upośledzenie ukrwienia mózgu związane z obrzękiem półkuli uszkodzonej. Niezależnie od patomechanizmu stwierdzonych nieprawidłowości metabolicznych w półkuli przeciwległej do podwiązania tętnicy szyjnej, fakt ich występowania wskazuje, że nie może być ona traktowana jako kontrolny układ odniesienia, co sugerował w swojej pracy Kahn (1975). Na fakt ten w innego typu jednostronnych uszkodzeniach półkul mózgowych wskazują również spostrzeżenia Szydłowskiej i wsp. (1972).

Autor dziękuje pani Teresie Bok za znakomitą pomoc techniczną.

М. Смялек

ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ В СИСТЕМЕ АСКОРБАТ-ЦИТОХРОМ
С НЕЙРОНОВ КОРЫ АММОНОВА РОГА МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА
(*MERIONES UNQUICULATUS*) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Резюме

Исследовали дыхательную активность изолированных нейронов сектора H_2 и H_3 аммонового рога в присутствии системы аскорбат-цитохром с (цитохром-оксидаза) в нормальных условиях и при временном обескровливании мозга.

Исследования проводили на монгольских хомяках, у которых вызывали ишемию левого мозгового полушария посредством перекрытия на 15 мин. левой общей сонной артерии.

Дыхательную активность одиночного нейрона определяли в системе аскорбат-цитохром с, используя технику ампульного микроплавка Декарта.

Объем цитоплазмы изолированных нейронов в норме для зоны H_3 составлял в среднем $402 \mu^3$, а для зоны H_2 — $147 \mu^3$.

В контрольных условиях дыхательная активность нейронов сектора H_3 в пересчете на $1 \mu^3$ цитоплазмы составляла около 32,4% активности нейронов сектора H_2 .

Непосредственно после хирургической операции не установлено различия в дыхательной активности в нейронах из обоих мозговых полушарий. Через 2 часа в нейронах сектора H_3 обоих полушарий установлен статистически значимый прирост дыхательной активности, более высокий в полушарии с эффективной ишемией и составляющий через 4 часа около 275% по отношению к норме. Дыхательная активность нейронов зоны H_2 в мозговом полушарии со стороны перевязки снижалась (35—41%). В противоположном полушарии эти нейроны проявляли существенный прирост потребления кислорода в присутствии системы аскорбат-цитохром с, составляющий через 4 часа около 206%.

Различие в реакции нервных клеток сектора H_2 и H_3 коры аммонового рога на ишемию можно приписать их разной метаболической потребности в кислороде. Возрастание потребления кислорода нейронами противоположного полушария, без ишемии, может иметь связь с рефлекторным сосудистым механизмом, проводящим к недостаточному кровоснабжению этого полушария, или, вторично, с отеком мозга.

M. Smiałek

RESPIRATORY ACTIVITY IN THE ASCORBATE — CYTOCHROME C SYSTEM OF THE AMMON HORN CORTEX NEURONS OF MONGOLIAN GERBIL (*MERIONES UNQUICULATUS* IN EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA)

Summary

The study dealt with the respiratory activity of neuron isolated from the H_2 and H_3 sectors of Ammon horn in the presence of the ascorbate — cytochrome c system (cytochrome oxidase) in normal conditions and following transient brain ischemia. The investigations were performed on Mongolian gerbils, in which ischemia of the left cerebral hemisphere was produced by occlusion of the left common carotid artery for 15 minutes.

The average cytoplasm volumes of neurons isolated from sectors H_2 and H_3 were respectively 147 and $402 \mu^3$. The respiratory activity of single neurons was determined in the ascorbate — cytochrome c system by means of the Cartesian ampule microdiver technique.

In control conditions, the respiratory activity of the H_3 neurons calculated per μ^3 cytoplasm was about 32% that of the H_2 neurons. Directly after operation, the neurons of both cerebral hemispheres did not differ in their respiratory activity. This activity increased with time in the H_3 sector in both hemispheres, but more in that with effective ischemia, reaching after 4 hrs about 275% of the control level. The H_2 sector neurons in the ischemic hemisphere showed

a decrease in the activity by 35—41%, while those in the contralateral hemisphere were more active in oxygen consumption, the increase amounting to about 206% after 4 hrs. The differences in the reaction of H₂ and H₃ nerve cells to ischemia may be attributed to their different metabolic requirements for oxygen. The increased oxygen consumption by neurons in the hemisphere without effective ischemia is presumably related to a vascular reflex mechanism deteriorating blood supply to this hemisphere, or secondarily — to brain edema.

PISMIENICTWO

1. Bubis J. J., Fujimoto T., Ito U., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. V. Ultrastructural changes in H₃ sector of the hippocampus. *Acta neuropath.* W druku.
2. Eneström S., Hamberger A.: Respiration and mitochondrial content in single neurons of the supraoptic nucleus. *J. Cell Biol.* 1968, 38, 483—493.
3. Hamberger A., Hydèn H.: Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol.* 1963, 16, 521—525.
4. Hydèn H., Pigoń A.: A cytophysiological study of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cells of Deiters nucleus. *J. Neurochem.* 1960, 6, 57—72.
5. Ito U., Spatz M., Walker Jr. J. T., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta neuropath.* (Berl.) 1975, 32, 209—223.
6. Kahn K.: The natural course of experimental cerebral infarction in gerbil. *Neurology* 1972, 22, 510—515.
7. Klatzo I.: Some experimental aspects of cerebral ischemia. 1975, *The Nervous System*, D.B. Wower, Raven Pr. N.Y. 313—322.
8. Klatzo I., Ito U., Go G., Spatz M.: Observations on experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. In: J. Cervos-Navarro (Ed.), *Pathology of Cerebral Microcirculation*, Walter de Gruyter, Berlin, 1974, pp. 338—341.
9. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. II. Carbohydrate changes. *Acta neuropath.* 1975, 33, 91—103.
10. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. V. Behaviour of biogenic amines. *Acta neuropath.* 1976, 36, 1—8.
11. Potter V. R.: The homogenate technique. In: „Manometric Technique”. Ed. W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, Burgess, Min. 1957, 170—187.
12. Slater E. C.: The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations. *Bioch. J.* 1949, 44, 305—308.
13. Szydłowska H., Wiśniewski H., Śmiałek M., Rap M. Z., Zalewska T.: Badania doświadczalne nad zmianą zawartości wody w mózgu kota pod wpływem rozmiękania, zamrażania i krwotoku. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 65—77.
14. Śmiałek M.: Aktywność glikolityczna izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 289—300.
15. 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.

16. Śmiałek M., Kraśnicka Z.: Cytochrome oxidase activity in the isolated sensory neurons of the spinal root ganglia from chick embryo tissue culture in experimental anoxia. VII Intern. Congress of Neuropath., Budapest, Exc. Med. Amsterdam, Akademiai Kiadó, Budapest, 1975, 593—596.
17. Zeuthen E.: Growth as related to the cell cycle in single-cell cultures of *Tetrahymena piriformis*. *J. Embryol. exp. Morph.* 1953, 1, 239—249.

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

TERESA WIERZBA

WPŁYW NIEDOTLENIENIA NA MIKROKRAŻENIE W MÓZGU SZCZURA

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

Zarówno w patologii ludzkiej jak i w warunkach doświadczalnych niedotlenieniu towarzyszą zaburzenia krążeniowo-oddechowe, stanowiące następstwo upośledzenia czynności serca i układu oddechowego przez niedostatek tlenu. Zwolnienie czynności serca i obniżenie jego pojemności wyrzutowej oraz spadek układowego ciśnienia krwi obserwowano w przebiegu umiarkowanej hipoksji, wywołanej u królika obniżeniem pO_2 (Korner 1965), u szczurów — w modelu Levina oraz przebywających w atmosferze czystego azotu (Brown, Brierley 1968), w zatruciu tlenkiem węgla u szczurów (Korthals i wsp. 1973) oraz u małp (Ginsberg, Myers 1974). Ponieważ utrzymanie prawidłowego przepływu krwi w mózgu zależy m.in. od pojemności wyrzutowej serca i od wysokości układowego ciśnienia krwi, ich zaburzenia obserwowane w anoksji, prowadzą do zmniejszenia przepływu mózgowego (Brierley 1976). Brown i Brierley (1968) wykazali wtórny wpływ oligemii na rozwój zmian strukturalnych w mózgu szczurów przebywających w atmosferze czystego azotu oraz zależność pomiędzy występowaniem ischemicznych uszkodzeń tkanki nerwowej i zwolnieniem czynności serca w czasie niedotlenienia zwierząt. Opierając się na wynikach własnych prac doświadczalnych Brierley (1976) kwestionuje możliwość występowania wyłącznie anoksyjnych uszkodzeń mózgu i postuluje istotny udział zaburzeń krążenia mózgowego w patomechanizmie rozwoju zmian strukturalnych w następstwie niedotlenienia typu anoksyjnego.

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie wpływu krótkotrwałego prostego niedotlenienia na mikrokrażenie mózgu szczura w zależności od nasilenia i czasu trwania niedotlenienia.

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na 6-tygodniowych szczurach rasy Wistar, obu płci. Zwierzęta doświadczalne podzielono na trzy grupy, obejmujące

po 24 szczury. Szczury umieszczano pojedynczo w komorze (o pojemności 2 l), przez którą przepuszczano mieszaninę gazową o zmiennej zawartości N_2 i O_2 . Procentową zawartość poszczególnych gazów ustalano przy użyciu przepływomierza gazowego oraz sprawdzano w analizatorze O_2 . Zwierzęta pierwszej grupy poddawano działaniu mieszaniny gazowej o składzie 92% azotu i 8% tlenu. Zwierzęta drugiej grupy przebywały w komorze, przez którą przepuszczano mieszaninę gazową zawierającą 96% azotu i 4% tlenu. Czas niedotlenienia w obu grupach wynosił po 30 minut. Zwierzęta trzeciej grupy przebywały w komorze, przez którą przepuszczano 100% azotu do momentu wystąpienia bezdechu, który pojawiał się przeciętnie po 3 sekundach. Przetrzymano je w tym stanie przez następne 10 sekund, po czym wyjmowano z komory i pozostawiano w standardowych warunkach zwierzętarnianych do momentu uśmiercenia. Grupę kontrolną stanowiły szczury, w tym samym wieku nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Zwierzęta dekapitowano w grupach obejmujących po 3 szczury bezpośrednio po wyjęciu z komory (czas „0”), po 10 i 30 minutach oraz 1, 2, 4, 24 i 48 godzinach po niedotlenieniu. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszki utrwalono w 10% formalinie, a następnie dzielono na bloki cięciami prowadzonymi w płaszczyźnie czołowej na wysokości skrzyżowania nerwów wzrokowych, guza popielatego oraz na granicy mostu i opuszki. Mroźnikowe skrawki grubości 100 — 150 μ barwiono benzydynową metodą wg Pickwortha dla uwidocznienia sieci naczyń mózgu.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Zwierzęta I i II grupy przez pierwsze 10 minut przebywania w komorze hipoksyjnej wykazywały pobudzenie ruchowe oraz przyspieszenie czynności serca i oddechu, które stopniowo ustępowały miejsca objawom spowolnienia ruchowego, bradykardii i zwolnienia czynności oddechowej. Zaburzenia te ustępowały prawie natychmiast po wyjęciu zwierząt z komory. Szczury III grupy pozostawione w atmosferze czystego azotu, po kilku sekundach pobudzenia ruchowego wykazywały szybko narastające spowolnienie ruchowe oraz zaburzenia krążenia i oddechu, które przez około 30 sekund nasilały się, aż do bezdechu, poprzedzonego u niektórych zwierząt pojedynczymi napadami drgawek. U szczurów przeniesionych po 10 sekundach przebywania w tym stanie w komorze do normalnych warunków atmosferycznych powracała zwykle samoistnie czynność oddechowa, ustępowała sinica i ulegała normalizacji czynność serca. Przy braku spontanicznego powrotu czynności oddechowej, reanimacja zwykle była nieskuteczna.

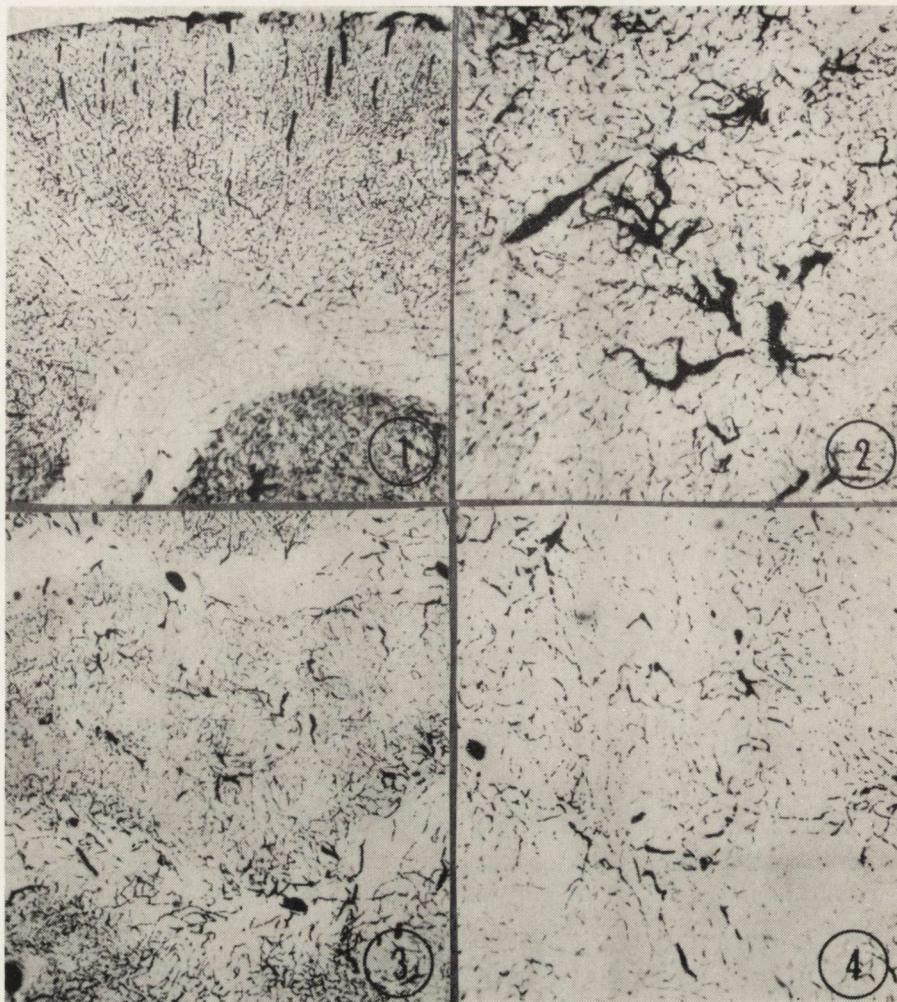
Obserwacje morfologiczne

Skrawki z mózgu kontrolnego szczura przedstawiają charakterystyczne zróżnicowanie układu i gęstości sieci naczyniowej kory i istoty białej (ryc. 1) oraz struktur podkorowych.

U zwierząt I grupy bezpośrednio po niedotlenieniu spostrzegano niewielkie zatarcie różnicy gęstości sieci naczyniowej pomiędzy korą i istotą białą. Układ żył istoty białej (głównie *truncus corporis callosi*, *commisura anterior* i *truncus olfactorius lateralis*) był bardzo wyraźny, a naczynia obficie wypełnione krwią. Pojedyncze naczynia żyłne dużego i średniego kalibru posiadały odgałęzienia o wężykowatym przebiegu (ryc. 2). Liczba naczyń widocznych na poszczególnych przekrojach oraz stopień wypełnienia ich krwią zwiększał się w 10 minucie po niedotlenieniu. W tym czasie pojawiały się w rogu Amona drobne plackowate pola o wyraźnie uboższej sieci naczyniowej. W 30 minucie po niedotlenieniu widoczne były w głębszych warstwach kory nieliczne naczynia żyłne posiadające pojedyncze, wężykowate odgałęzienia. W tym czasie owalne obszary gorszego ukrwienia były nadal widoczne w rogu Amona (ryc. 3 i 4), a ponadto pojawiały się w korze mózgowej. U zwierząt uśmiercanych po 1, 2 i 4 godzinach po niedotlenieniu charakter zmian nie ulegał zmianie, natomiast ich nasilenie zmniejszało się. W 24 godzinie po wyjęciu zwierząt z komory hipoksyjnej spostrzegano jeszcze pojedyncze naczynia żyłne małego i średniego kalibru przepełnione krwią, natomiast nie występowały już pólka z uboższą siecią naczyniową. Obraz sieci naczyniowej mózgu u szczurów badanych w 48 godzinie po niedotlenieniu nie różnił się od obrazu występującego u zwierząt kontrolnych.

Zmiany w obrębie sieci naczyniowej mózgu u zwierząt II grupy nie różniły się istotnie od nieprawidłowości spostrzeganych u szczurów I grupy. W czasie „0” obserwowano zatarcie różnicy gęstości sieci naczyniowej kory i istoty białej. W obu strukturach widoczne były naczynia dużego i średniego kalibru przepełnione krwią. Pojedyncze żyły z kilkoma widocznymi odgałęzieniami miały wężykowaty przebieg (ryc. 5). W 10 minut po niedotlenieniu obserwowano w rogu Amona na tle przepełnionej sieci włóscinkowej rozsiane pólka gorszego ukrwienia. W korze mózgowej ogniska o uboższej sieci naczyniowej pojawiały się w 30 minut po niedotlenieniu (ryc. 6). Obraz ten utrzymywał się jeszcze u zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem. Po 48 godzinach obserwowano pełną normalizację mikrokrążenia w mózgu badanych szczurów.

W III grupie zwierząt zmiany w układzie mikrokrążenia w mózgu miały taki sam charakter, natomiast dynamika ich rozwoju wykazywała niewielkie przesunięcie w czasie.



Ryc. 1. Mózg kontrolny. Typowy układ i gęstość sieci naczyniowej w korze mózgu i istocie białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Control brain. Typical pattern of vascular network in the cortex and cerebral white matter. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 2. Czas: „O”. Grupa I. Duże naczynia krwionośne z odgałęzieniami o krętym przebiegu na tle sieci włósniczek wypełnionych krwią. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

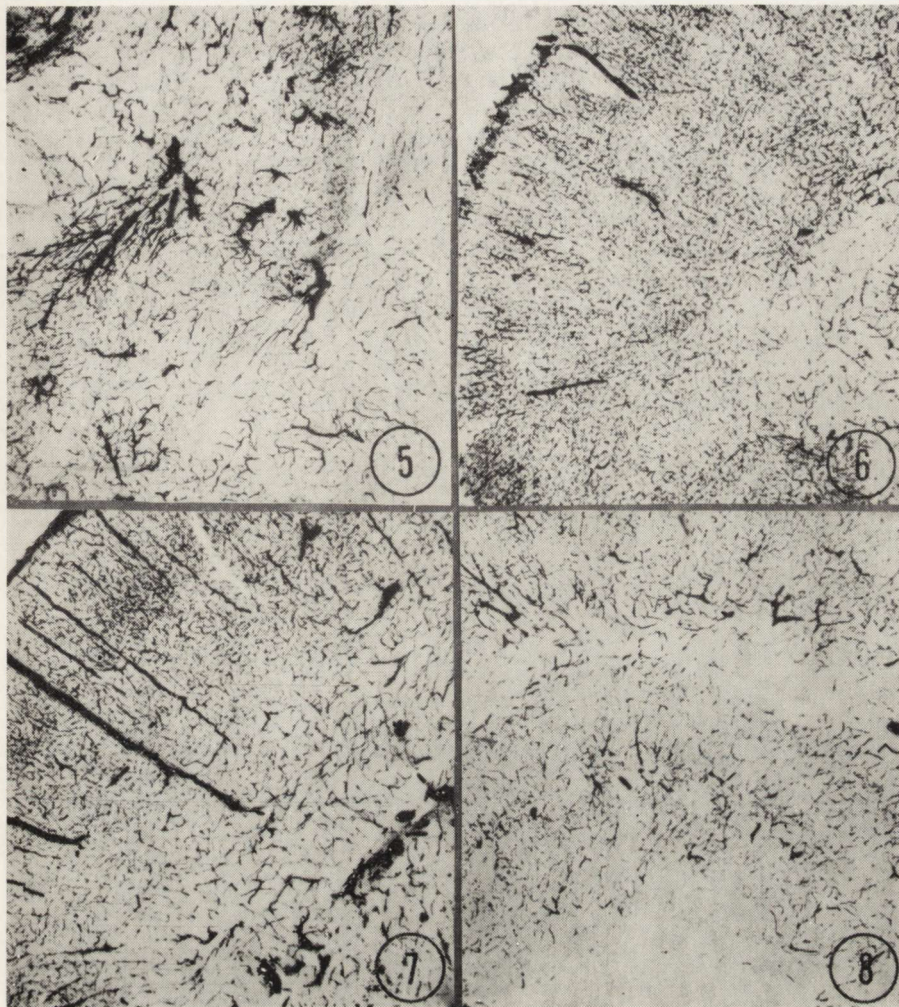
Fig. 2. Time: „O”. Group I. Large blood vessels with tortuous branches. In the background capillary network filled with blood. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 3. Czas: 30 min. Grupa I. W środkowej części rogu Amona plackowate pola o uboższej sieci naczyniowej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 3. Time: 30 min. Group I. In central part of Ammon horn patches of poor vascularisation. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 4. Obraz jak na ryc. 3. Pow. 100 ×.

Fig. 4. As Fig. 3. × 100.



Ryc. 5. Czas „O”. Grupa II. Zaburzenia mikrokrążenia we wzgórzu wzrokowym. Naczynia żylna przepelnione krwią. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 5. Time: „O”. Group II. Impairment of microcirculation in thalamus opticus. Venous congestion. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 6. Czas: 10 min. Grupa II. Niewielkie przekrwienie kory mózgu i istoty białej. W korze rozsiane owalne pola o gorszym ukrwieniu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 6. Time: 10 min. Group II. Moderate hyperemia of cerebral cortex and white matter. In the cortex dispersed oval areas of poor blood supply. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 7. Czas: 10 min. Grupa III. Znaczne przekrwienie kory mózgu i istoty białej. Zagęszczenie sieci naczyń włosowatych w III warstwie kory mózgu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 7. Time: 10 min. Group III. Marked hyperemia of cerebral cortex and white matter. Increased capillarisation of III-rd cortical layer. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 8. Czas: 30 min. Grupa III. Przekrwienie kory amonalnej. W centralnej części zawoju pola o uboższej sieci naczyniowej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 8. Time: 30 min. Group III. Hyperemia of Ammon cortex. In central part of the gyrus areas of poor vascularisation. Pickworth meth. × 60.

W czasie „0”, pierwszym obserwowanym odchyleniem od normy było zatarcie różnic gęstości sieci naczyniowej, między korą a istotą białą. W tym okresie pojedyncze naczynia, obficie wypełnione krwią występowały głównie w istocie białej, natomiast sieć włóścikowa kory była uboższa. Po 10 minutach naczynia żyłne substancji białej oraz dolnych warstw kory były poszerzone (ryc. 7) i wykazywały liczne odgałęzienia. Przekrwienie żyłne w 30 minucie po niedotlenieniu utrzymywało się nadal. Widoczne były także pola gorszego ukrwienia w rogu Amona (ryc. 8). Podobne zmiany widoczne były w korze mózgu szczurów badanych w 1 godzinę po niedotlenieniu. Naczynia żyłne o zmniejszającej się zawartości krwi oraz coraz mniejsza liczba pól o uboższej sieci naczyń krwionośnych, widoczne były u zwierząt w czasie 2, 4 i 24 godziny. W 48 godzinie po niedotlenieniu nie obserwowano żadnych nieprawidłowości mikrokrazenia mózgowego.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że krótkotrwałe proste niedotlenienie prowadzi u szczura do wystąpienia przejściowych, odwracalnych zaburzeń mikrokrazenia w mózgu. Charakter obserwowanych zmian był jednakowy u wszystkich szczurów, różniły się one natomiast w poszczególnych grupach doświadczalnych nasileniem i dynamiką rozwoju. Niezależnie od stopnia niedotlenienia w czasie „0” występowało w mózgu wszystkich zwierząt przekrwienie z poszerzeniem naczyń i przepelnieniem krwią sieci włóścikowej, któremu towarzyszyło pojawienie się rozszianych pól niedokrwienia najpierw w zawoju hipokampa, a potem również w obrębie kory mózgowej. Sekwencja pojawiania się tych ostatnich była niejednakowa: w pierwszej i drugiej grupie obserwowano je w 10 minut po niedotlenieniu, w III grupie w 30 minut od wyjęcia szczurów z komory hipoksyjnej i w czasie 24 godzin ustępowały one całkowicie (I i II grupa) lub prawie całkowicie. Niewielkie nasilenie zarówno ogniskowych jak i uogólnionych zaburzeń ukrwienia mózgu należy wiązać zapewne ze stosunkowo niewielkim nasileniem niedotlenienia i krótkim czasem trwania niedostatku tlenowego. W powstawaniu zaburzeń mikrokrazenia w mózgu badanych szczurów można przyjąć możliwość działania dwóch podstawowych czynników: wpływu ogólnoustrojowych zaburzeń hemodynamicznych na krążenie mózgowie oraz bezpośredni wpływ niedotlenienia na układ naczyniowy mózgu lub elementy zabezpieczające prawidłową czynność tego układu (Brierley 1972, Rosendorff 1974, Edvinsson 1975).

Przekrwienie sieci naczyniowej mózgu bezpośrednio po niedotlenieniu można traktować jako zjawisko kompensacyjne, związane z obniżeniem

przepływu krwi w mózgu w następstwie zwolnienia czynności serca i obniżenia ciśnienia krwi. Według Brierleya (1972) przy spadku ciśnienia tętniczego do 30 — 50% prawidłowego poziomu, przepływ krwi w mózgu utrzymuje się na stałym poziomie, a obniżenie ciśnienia perfuzyjnego jest kompensowane zwiększeniem wypełnienia naczyń.

Udział tego czynnika w kształtowaniu zaburzeń mikrokrążenia obserwowanych w naszym materiale mógłby tłumaczyć brak różnic pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi w pierwszym okresie po niedotlenieniu. W przeciwieństwie do krótkotrwałych zaburzeń ogólnoustrojowych, nieprawidłowości w zakresie mikrokrążenia utrzymywały się ponad 24 godziny po wyjęciu zwierząt z komory hipoksyjnej. Już po wyrównaniu czynności serca i oddechu pojawiały się w mózgach badanych szczurów rozsiane ogniska niedokrwienia, przy czym u zwierząt poddanych ostremu niedotlenieniu występowały one z opóźnieniem. Podobne ogniska obserwował Mossakowski (1974, 1975) u szczurów po zatruciu tlenkiem węgla i w modelu hipoksji krążeniowej u królika, tłumacząc ich obecność zaburzeniem mechanizmów autoregulacyjnych naczyń mózgowych. Zaburzenia tych mechanizmów można wiązać zarówno z bezpośrednim działaniem niedotlenienia na elementy nerwowe regulujące przepływ mózgowy (Rosendorff 1974), jak i z wtórnym wpływem zaburzeń metabolizmu tkanki nerwowej zainicjowanych przez ogólnoustrojowe nieprawidłowości hemodynamiczne, między innymi w zakresie amin katecholowych (Edvinsson 1975). Różnice w sekwencji pojawiania się obszarów niedokrwienia pomiędzy III i obu pozostałymi grupami zwierząt mogą być związane z innym przebiegiem zaburzeń w przypadku całkowitej i krótkotrwałej anoksji i dłuższego, częściowego niedotlenienia.

Wcześniejsze ujawnianie się ogniskowych nieprawidłowości mikrokrążenia w zawojach hipokampa wiązać należy ze znanymi od dawna właściwościami unaczynienia tej struktury.

Т. Вежба

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В МОЗГЕ КРЫСЫ

Резюме

При использовании бензидинового метода исследовано состояние микроциркуляции в мозге крыс, подвергнутых кратковременной апоксии. Эксперименты проводили в 3 группах. Первую группу подвергали действию газовой смеси, состоящей из 92% N₂ и 8% O₂, в течение 30 мин, вторая группа пребывала такое же время в атмосфере, содержащей 96% N₂ и 4% O₂. Животных третьей группы оставляли в атмосфере 100% азота до момента остановки дыхания и затем еще следующие 10 сек. Крыс убивали непосредственно после вынимания из гипоксической камеры, через 10 и 30 мин, а также через 1, 2, 4, 24 и 48 часов после гипоксии.

Показано, что кратковременное кислородное голодание приводит к преходящим обратимым нарушениям микроциркуляции, интенсивность и динамика которых зависят от степени и продолжительности аноксии. Появляющаяся непосредственно после кислородного голодания гиперемия сети капиллярных сосудов и переполнение венозных сосудов вероятно является показателем гемодинамических нарушений общей системы. Пятнистые поля местного малокровия, появляющиеся в более позднее время, вероятно можно связывать с нарушением механизмов авторегуляции сосудов мозга.

T. Wierzba

EFFECT OF HYPOXIA ON CEREBRAL MICROCIRCULATION IN RAT

Summary

The microcirculation in the brains of rats subjected to short-lasting anoxia was studied with benzidine method. The experiment was carried out on 3 groups of animals. The I group was subjected to 30 seconds action of gaseous mixture containing 92% of N₂ and 8% of O₂, the II group was kept for the same duration in the atmosphere containing 96% of N₂ and 4% of O₂. The rats of III group were left in the atmosphere filled with 100% of nitrogen until ~~apnea~~ and then for subsequent 10 seconds. The animals were sacrificed directly after their removal from hypoxia chamber, after 10 and 30 minutes, after 1, 2, 4, 24 and 48 hours following hypoxia.

It was established that short-lasting hypoxia leads to transient, reversible disorders of microcirculation. Their intensity and dynamics depend on the degree and duration of anoxia. Hyperemia of capillary net and congestion of veins occurring immediately after anoxia can be an exponent of generalized hemodynamic disturbances. Patchy areas of ischemia appearing in later period of experiment depend probably on the disorder of autoregulation mechanisms of cerebral blood vessels.

PIŚMIENICTWO

1. Brierley J. B.: Cerebral hypoxia. Greenfield's Neuropathology. Ed. W. Blackwood, J. A. Corselis, E. Arnold, Edinburgh 1976, 43—86.
2. Brierley M. D.: Pathology of cerebral ischemia. Cerebral Vascular Dis. 1972, 59—72.
3. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. Brit. J. Exp. Path. 1968, 49, 87—107.
4. David E., Levy M. D., James B.: Brief hypoxia-ischemia initially damages cerebral neurons. Neuropathology 1975, 32, 450—476.
5. Edvinsson L.: Neurogenic mechanisms in the cerebrovascular bed. Autonomic nerves amine receptors and their effects on cerebral blood flow. Acta physiol. Supp. 427, Lund 1975.
6. Ginsberg M. D., Myers R. E.: Experimental carbon monoxide encephalopathy in the primate. I. Physiologic and metabolic aspects. Arch. Neurol. 1974, 30, 202—209.

7. Ginsberg M. D., Myers R. E., McDonagh B. F.: Experimental carbon monoxide encephalopathy in the primate. II. Clinical aspects. Neuropathology and physiologic correlation. *Arch. Neurol.* 1974, 30, 209—217.
8. Hicks S. P.: Vascular pathology and acute and chronic oxygen deprivation. *W. Path. of the nervous system*. Ed. J. Minckler, McGraw-Hill Book Company 1968, vol. I.
9. Korthals J., Mossakowski M. J., Smiałek M.: Obraz histologiczny i strukturalny doświadczalnej encefalopatii u szczura. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 278—300.
10. Korner P. J.: The role of the arterial chemoreceptors and baroreceptors in the circulatory response to hypoxia of the rabbit. *J. Physiol.* 1965, 180—279.
11. Meyer J. S., Yoshida K., Sekamoto K.: Autonomic control of cerebral blood flow measured by electromagnetic flow meters. *Neurology* 1967, 17, 638—648.
12. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 573—581.
13. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—248.
14. Rosendorff C.: The neural control of cerebral blood vessels — a brief review and a new hypothesis. *W: Pathology of cerebral microcirculation*. Red. J. Cervos-Navarro, W. de Gruyter, Berlin 1974, 174—183.

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

MICHAŁ WALSKI

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE SYNAPS OKOLICY
HIPOKAMPA SZCZURÓW OBCIĄŻONYCH PADACZKĄ
AUDIOGENNĄ, PRZY UŻYCIU METODY CYNKOWO
JODOWO-OSMOWEJ

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Kierownik: doc. dr hab. J. Dymecki

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego CMDiK PAN, Warszawa

Kierownik: doc. dr hab. J. W. Borowicz

Badania ultrastrukturalne synaps centralnego układu nerwowego w dużej mierze wyjaśniły mechanizm działania transmiterów chemicznych. Opracowania Robertsona i wsp. (1963) oraz Gray'a i Guillery'ego (1966) dostarczyły szereg informacji morfologicznych dotyczących regionu synaptycznego. Akson kończy się rozszerzonym zakończeniem — kolbą synaptyczną, która ściśle przylega do błony postsynaptycznej, zwanej też błoną subsynaptyczną. Technika łupania materiału mrożonego (freeze — etching) zastosowana do badania struktury synaps, potwierdza słuszność wyników uzyskanych metodami rutynowymi w mikroskopie elektronowym (Moor i wsp., 1969; Akert, 1971), a mianowicie potwierdza, iż opisane pęcherzyki synaptyczne nie są tworem sztucznymi, spowodowanymi utrwaleniem ale w stanie naturalnym mają postać kulistą. Pęcherzyki synaptyczne są regularnie ułożone i według założeń Pfenningera i wsp. (1969) oraz Krnjeviča (1971), zajmują miejsca w punktach węzłowych sześciokątnej siatki. W ten sposób utworzony system kanałów ma kierować zawartość pęcherzyków na oznaczone miejsca w błonie presynaptycznej. Z badań biochemicznych i ultrastrukturalnych wiadomo, że pęcherzyki synaptyczne zawierają substancje przekąźnikowe, gotowe do uwolnienia do szczeliny synaptycznej (Cooper i wsp., 1970; Krnjevič, 1971). Problem chemicznej identyfikacji substancji przekąźnikowych jest już częściowo rozwiązany (Axelrod, 1974; Uchizono, 1975). Po zastosowaniu impregnacji cynkowo jodowo-osmowej oraz metody łupania materiału mrożonego, została podana wstępna charakterystyka morfologiczna pęcherzyków synaptycznych z zawartą w nich chemiczną substancją

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.4.1.3.3.6.

przebieżnikową (Martin i wsp., 1969; Akert i Sandri, 1970). Cechy morfologiczne pęcherzyków stworzyły podstawę dla klasyfikacji synaps.

Uchizono (1965; 1975) podzielił synapsy na pobudzające, odpowiadające typowi I według Gray'a, zawierające pęcherzyki okrągłe oraz hamujące, odpowiadające typowi II wg Gray'a, zawierające pęcherzyki spłaszczone.

Obecnie spłaszczenie pęcherzyków traktuje się jako artefakt wywołany wzmożonym ciśnieniem osmotycznym utrwalacza. Ta niedostatecznie zbadana „wrażliwość” określonej kategorii pęcherzyków jest cechą rozpoznawczą (Eccles, 1968; Kawana i wsp., 1969). Powszechnie akceptowany jest pogląd o strukturalnej specyficzności pęcherzyków zawierających transmitery synaptyczne (Uchizono, 1974; 1975), według którego forma opakowania transmitera jest zależna od jego właściwości chemicznych, odpowiadających za pobudzenie lub hamowanie.

Pęcherzyki synaptyczne zgrupowane są przeważnie w pobliżu błony presynaptycznej. Powierzchnia blaszek presynaptycznych i postsynaptycznych została dobrze uwidoczniła po zastosowaniu metali ciężkich a mianowicie po impregnacji bizmutowo-jodowej i „barwieniu” czerwieńią rutenową (Pfeninger i wsp., 1969; Tani i Ametani, 1971). Blaszkki presynaptyczne i postsynaptyczne powstają z czynnościowo-morfologicznego zróżnicowania zewnętrznej części błony komórkowej (Sotelo i Llians, 1972). Cotman i Taylor (1974) za pomocą konkanawaliny A wykazali na powierzchni błon synaptycznych receptory mannopyranosylu i glukopyranosylu. Autorzy ci uważają, że te grupy cukrowcowe związane są z postulowanymi specyficznymi miejscami receptyjnymi i towarzyszącymi im kanalikami dla przepływu jonów.

Akert (1971) uważa, iż najmniejsza niedokładność w przewodnictwie chemicznym informacji w synapsie, w następstwie nieprawidłowej budowy chemicznej transmitera lub jego nieprawidłowego rozładowania, może spowodować zaburzenia psychiczne lub neurologiczne.

Przeprowadzone przez nas badania miały na celu przeanalizowanie zmian zawartości substancji przebieżnikowej w pęcherzykach synaptycznych po pojedynczych lub gromadnych napadach padaczkowych oraz prześledzenie w jakim czasie po napadach padaczkowych następuje odbudowa neurotransmiterów. Dla uwidocznienia neurotransmiterów zawartych w pęcherzykach, zastosowano metodę cynkowo jodowo-osmową opisaną przez Akerta i Sandri'ego (1968), a zmodyfikowaną przez Kawana i wsp. (1969).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 21 szczurach (samce 12 tygodniowe) pochodzących ze stada, obciążonego uwarunkowaną genetycznie padaczką audiogenną. Stado otrzymano z Instytutu Fizjologii Akademii Nauk Me-

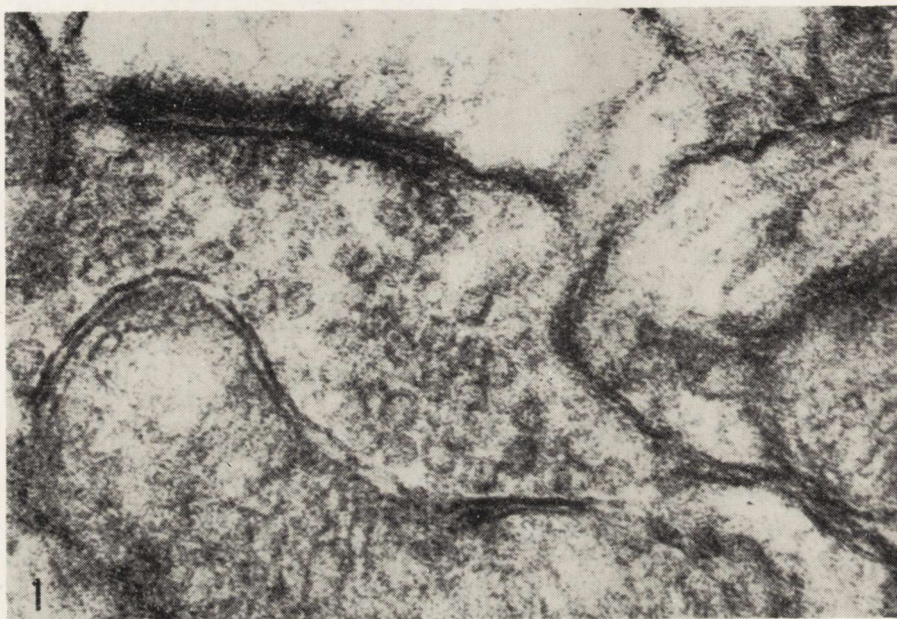
dycznych w Moskwie i hodowano selektywnie, dla uzyskania 100% reaktywności napadem padaczkowym na bodziec słuchowy. Napad padaczkowy wywoływano dźwiękiem dzwonka elektrycznego o mocy około 100 decybeli. Charakterystykę napadu i dokładny opis jego wywołania przedstawiono w pracy Dymeckiego i wsp. (1977). Dla prześledzenia dynamiki zmian po napadzie, zwierzęta doświadczalne podzielono na następujące 2 grupy: I grupa — pojedynczy napad audiogeny; materiał pobierano natychmiast po napadzie, po 30 minutach, po 60 minutach. II grupa — gromadny napad padaczkowy (wywoływano osiem napadów w ciągu czterech godzin); materiał pobrano natychmiast po ostatnim napadzie, po 30 minutach, po 60 minutach. Z każdej grupy doświadczalnej pobrano mózgi od trzech szczurów. Równocześnie pobrano materiał od trzech zwierząt kontrolnych, u których nie wywołano napadów padaczkowych. Należy zaznaczyć, iż podczas wywoływania napadów gromadnych u niektórych zwierząt nie udało się uzyskać wszystkich pełnych napadów drgawkowych. Te zwierzęta nie były zaliczane do grupy eksperymentalnej.

W narkozie dootrzewnowej (Eunarkon w dawce 40 mg/kg wagi ciała) otwierano klatkę piersiową i podawano płyn utrwalający do lewej komory pod stałym ciśnieniem 50 mm Hg, przy jednoczesnym otwarciu prawego przedsionka serca. Do perfuzji zastosowano roztwór 4% paraformaldehydu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,4 z dodatkiem 8% sacharozy. Paraformaldehyd został przygotowany według metody Karnovsky'ego (1965). Po przeprowadzeniu perfuzji pobierano z kory zwoju hipokampa wycinki, które utrwalano przez 2 godziny w 6% glutaraldehydzie przygotowanym na 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4 (Juraniec i wsp., 1974). Pobrany materiał z każdej grupy zwierząt został podzielony na dwie części. Część materiału była dotrwalana w 1% czterotlenku osmu przez okres 2 godzin. Materiał przeznaczony do impregnacji jodkiem cynku — osmem, był przenoszony do buforu Tris (Martin i wsp., 1969). Następnie prowadzono reakcję cynkowo-jodowo-osmową według metody Kawany i wsp. (1969). Materiał odwadniano według sposobu Schultza i Karlssona (1972) i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki dobarwiano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, oglądano i wykonywano dokumentację na mikroskopie elektronowym JEM-7A.

W celu obliczenia liczby pęcherzyków synaptycznych, wypełnionych oraz nie wypełnionych produktem reakcji cynkowo-jodowo-osmowej, z każdej badanej grupy wybrano przypadkowo dwadzieścia kolbek synaptycznych. Obliczenia wykonano na elektronogramach o powiększeniu 150 000 \times , przy zwróceniu uwagi na to, aby wszystkie pęcherzyki synaptyczne nadawały się do identyfikacji.

WYNIKI

W materiale grupy kontrolnej, nie impregnowanym metodą cynkowo-jodowo-osmową, pęcherzyki synaptyczne w synapsach pobudzających, którymi głównie się zajmujemy, mają kształt okrągły, wyraźne zgrubienie pre- i postsynaptyczne oraz szeroką szczelinę synaptyczną (ryc. 1). Po



Ryc. 1. Grupa kontrolna. Synapsa typu 1. Kolbka synaptyczna zawiera okrągłe pęcherzyki i mitochondrium. Szczelina synaptyczna utworzona przez błonę pre- i postsynaptyczną. Utrwalanie paraformaldehydowo-glutaraldehydowe. Pow. 120 000 X.

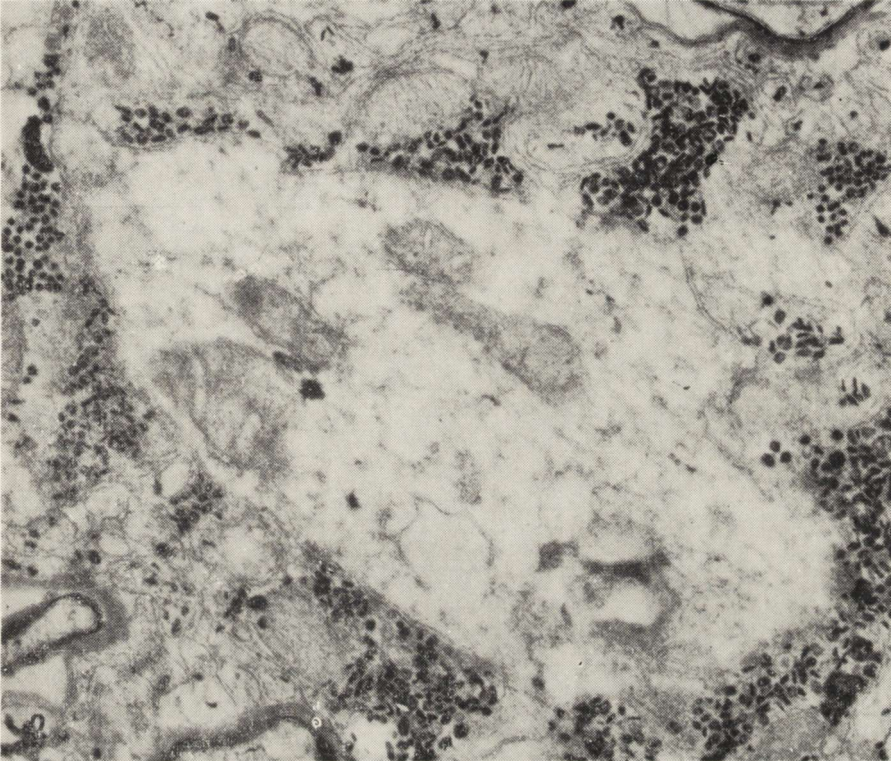
Fig. 1. Control group. Synapse type 1. Synaptic sack contains round vesicles and mitochondrium. Synaptic fissure formed by presynaptic and postsynaptic membrane. Paraformaldehyde-glutaraldehyde fixation. X 120 000.

impregnacji cynkowo-jodowo-osmowej w materiale kontrolnym około 97% pęcherzyków synaptycznych jest wypełnionych elektronowogęstym produktem reakcji (ryc. 2).

Grupa I. W grupie zwierząt, u których wywołano pojedynczy napad padaczkowy, a materiał pobrano bezpośrednio po napadzie zaledwie 54% pęcherzyków posiada w swym wnętrzu produkt reakcji. Pozostałe pęcherzyki sprawiają wrażenie pustych (ryc. 3, 4). W grupie, w której materiał pobrano 30 minut po pojedynczym napadzie, liczba pęcherzyków zawierających produkt reakcji zwiększyła się. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że 79% pęcherzyków wykazuje dodatnią reakcję cynkowo-jodowo-osmową (ryc. 5). Synapsy grupy doświadczalnej, w której materiał pobrano po 60 minutach, przypominają obrazy obserwowane

w kontroli. Analizowane struktury w 82% są wykontrastowane stosowanym przez nas wyznacznikiem (ryc. 6).

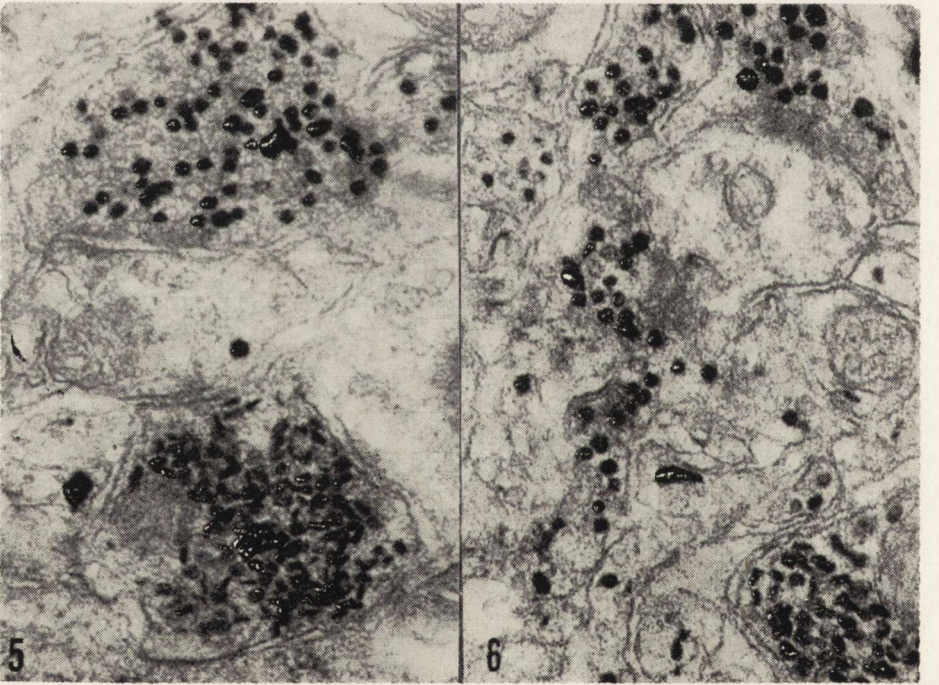
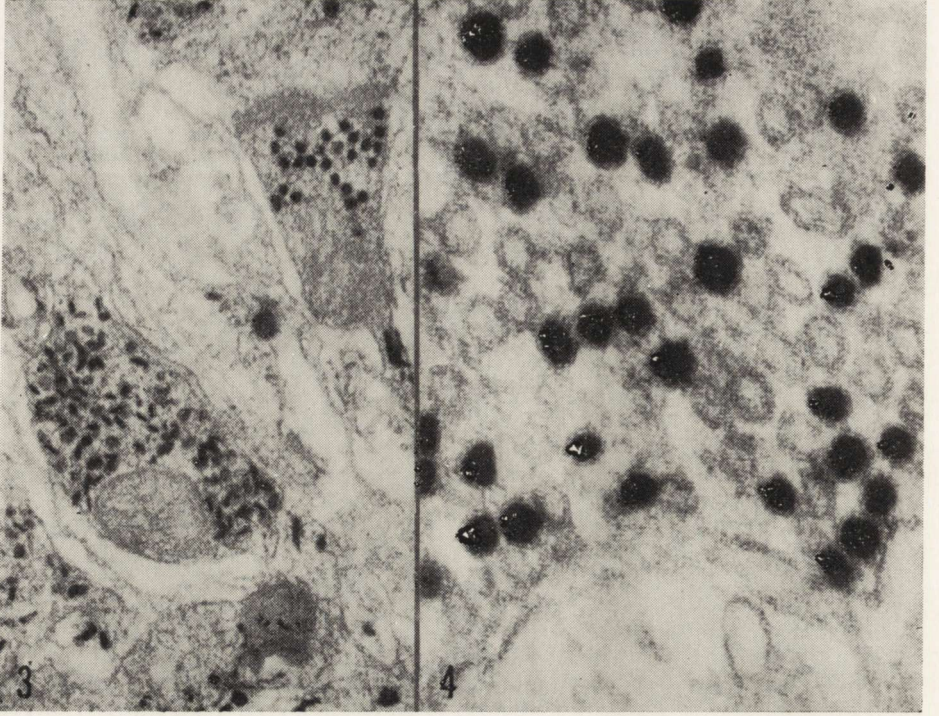
Grupa II. Grupa, u której wywołano napady gromadne i natychmiast po ostatnim napadzie pobrano materiał, prezentuje kolbki synaptyczne

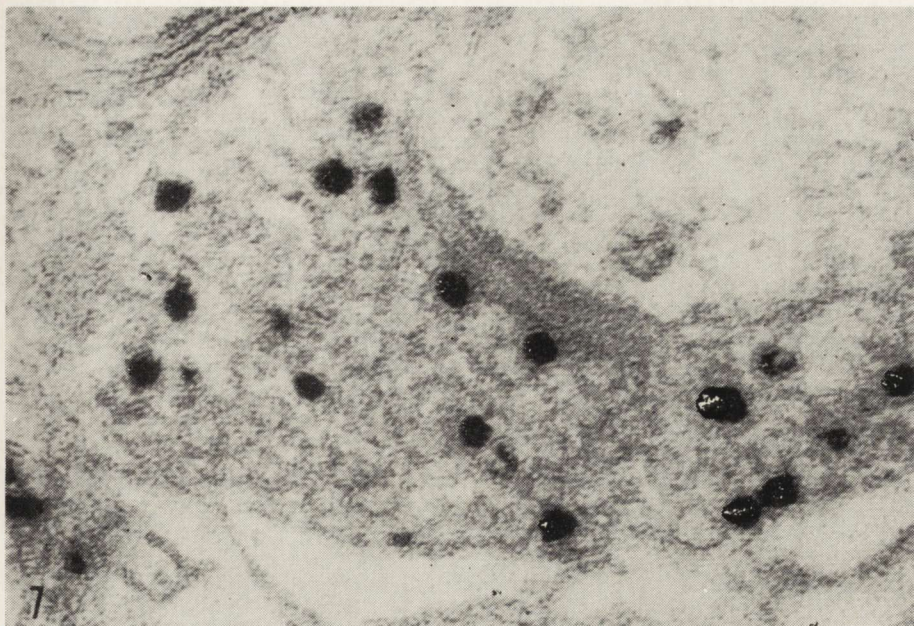


Ryc. 2. Grupa kontrolna. Produkt reakcji cynkowo jodowo-osmowej wypełnia pęcherzyki synaptyczne okrągłe i spłaszczone. Pow. 32 000 \times .

Fig. 2. Control group. Product of zinc iodine-osmium reaction fills the round and flattened synaptic vesicles. $\times 32\,000$.

o najwyraźniejszych zmianach. Większość pęcherzyków synaptycznych uległa opróżnieniu (ryc. 7). Widywano kolbki, w których tylko 2 lub 3 pęcherzyki były wypełnione wyznacznikiem. Z wykonanych obliczeń wynika, że zaledwie 9% wszystkich pęcherzyków synaptycznych zawierało w swym wnętrzu elektronowogęsty materiał. Porównując pęcherzyki synaptyczne tej grupy zwierząt z obserwowanymi w materiale kontrolnym stwierdzono, że niektóre z nich są powiększone (ryc. 8). Mitochondria posiadają rozdęte grzebienie i przejaśnioną macierz. Zaobserwowano rozwarstwienie błon kolbek synaptycznych, a niekiedy zatarcie ich struktury. W cytoplazmie komórek lub ich wypustkach, do których przylegają synapsy, widoczne jest gromadzenie ziarn glikogenu.





Ryc. 7. Grupa II, bezpośrednio po ostatnim napadzie. Duże zmiany zwyrodnieniowe w kolbce synaptycznej. Tylko pojedyncze pęcherzyki wypełnione produktem reakcji. Pow. 115 000 \times .

Fig. 7. Group II, immediately after last epileptic fit. Marked degenerative changes in synaptic sack. Only a few synaptic vesicles filled with reaction product. $\times 115\ 000$.

Ryc. 3. Grupa I, bezpośrednio po pojedynczym napadzie. Część pęcherzyków owalnych nie zawiera produktu reakcji. Pęcherzyki spłaszczone synapsy hamującej posiadają elektronowogęsty materiał. Pow. 42 000 \times .

Fig. 3. Group I, immediately after single seizure. Number of oval vesicles does not contain reaction product. Flattened vesicles of inhibitory synapse contain electron dense material. $\times 42\ 000$.

Ryc. 4. Grupa I, bezpośrednio po pojedynczym napadzie. Fragment synapsy pobudzającej. Połowa pęcherzyków synaptycznych nie zawiera produktu reakcji. Pow. 126 000 \times .

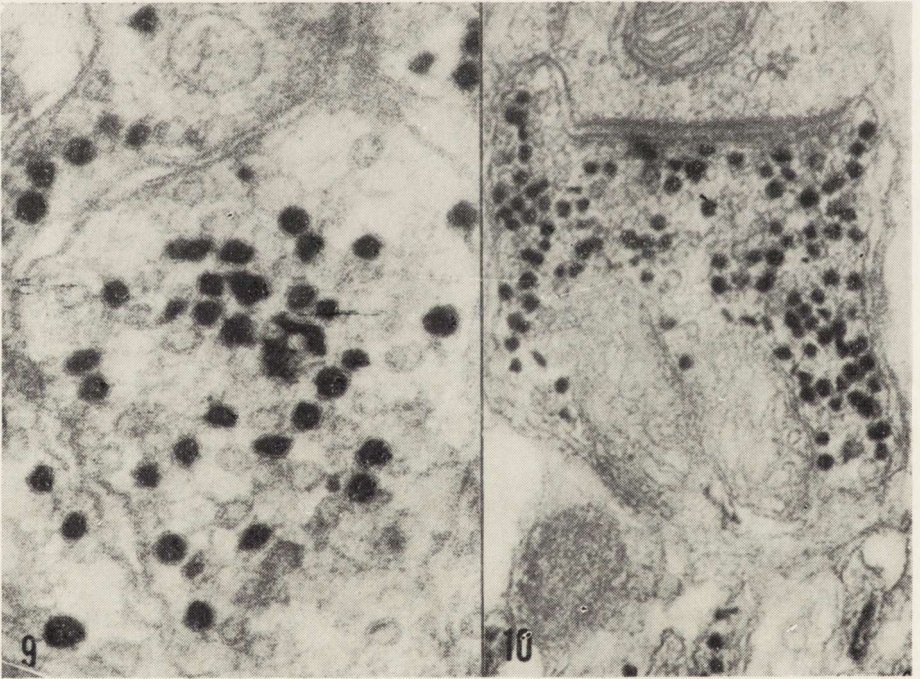
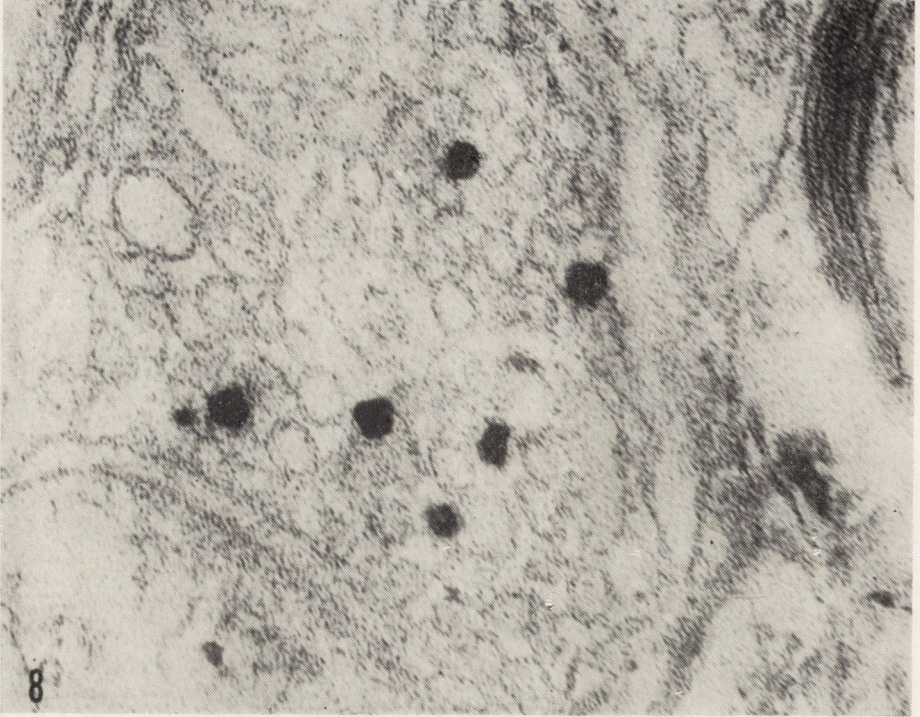
Fig. 4. Group I, immediately after single seizure. Fragment of excitatory synapse. Half of number of synaptic vesicles devoid of reaction product. $\times 126\ 000$.

Ryc. 5. Grupa I, 30 minut po pojedynczym napadzie. W kolbce synapsy pobudzającej część pęcherzyków nie jest wypełniona produktem reakcji. Pow. 50 000 \times .

Fig. 5. Group I, 30 minutes after single seizure. In the sack of excitatory synapse some vesicles are not filled with reaction product. $\times 50\ 000$.

Ryc. 6. Grupa I, 60 minut po pojedynczym napadzie. Pęcherzyki kolbek synaptycznych wypełnione substancją przekaźnikową. Pow. 50 000 \times .

Fig. 6. Group I, 60 minutes after single seizure. Vesicles of synaptic sacks filled with transmitter substance. $\times 50\ 000$.



W grupie zwierząt, u których pobrano materiał 30 minut po ostatnim napadzie drgawkowym, około 50% pęcherzyków jest ponownie wypełnionych produktem reakcji (ryc. 9). Kolbki synaptyczne posiadają mitochondria z wyraźnymi cechami obrzęku. Niekiedy są one tak bardzo zmienione, że tylko obrysy podwójnej błony stanowią cechę rozpoznawczą mitochondrium.

Materiał, który został pobrany w 60 minut po ostatnim napadzie wykazuje, że znaczna większość pęcherzyków jest wypełniona produktem reakcji. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że w przeanalizowanych 20 kolbkach presynaptycznych zastosowany wyznacznik wypełnił 78% pęcherzyków (ryc. 10). Po przeliczeniu liczb bezwzględnych na wartości procentowe przedstawiono je w formie wykresu.

Wykres 1. Liczba pęcherzyków synaptycznych wimpregnowanych przy pomocy metody cynkowo jodowo-osmowej wyrażona procentowo. C — grupa kontrolna, I — pojedynczy napad audiogeny, II — gromadny napad audiogeny, A — materiał pobrany bezpośrednio po ostatnim napadzie, B — pobrany po 30 minutach, C — pobrany po 60 minutach.

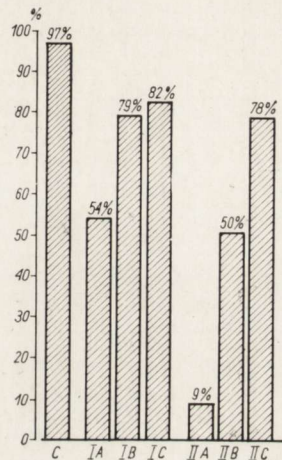


Diagram 1. Number of synaptic vesicles impregnated with zinc iodine-osmium method expressed in percent. C — control group, I — single audiogenic seizure, II — collective audiogenic seizure, A — material obtained immediately after last fit, B — obtained after 30 minutes, C — obtained after 60 minutes.

Ryc. 8. Grupa II, bezpośrednio po ostatnim napadzie. Duże pęcherzyki synaptyczne, zaledwie kilka pęcherzyków wimpregnowanych metalami ciężkimi. Rozwarstwienie błon otaczających kolbkę synaptyczną. Pow. 150 000 ×.

Fig. 8. Group II, immediately after last epileptic fit. Large synaptic vesicles and only few impregnated with heavy metals. Splitting of membranes of synaptic sack. × 150 000.

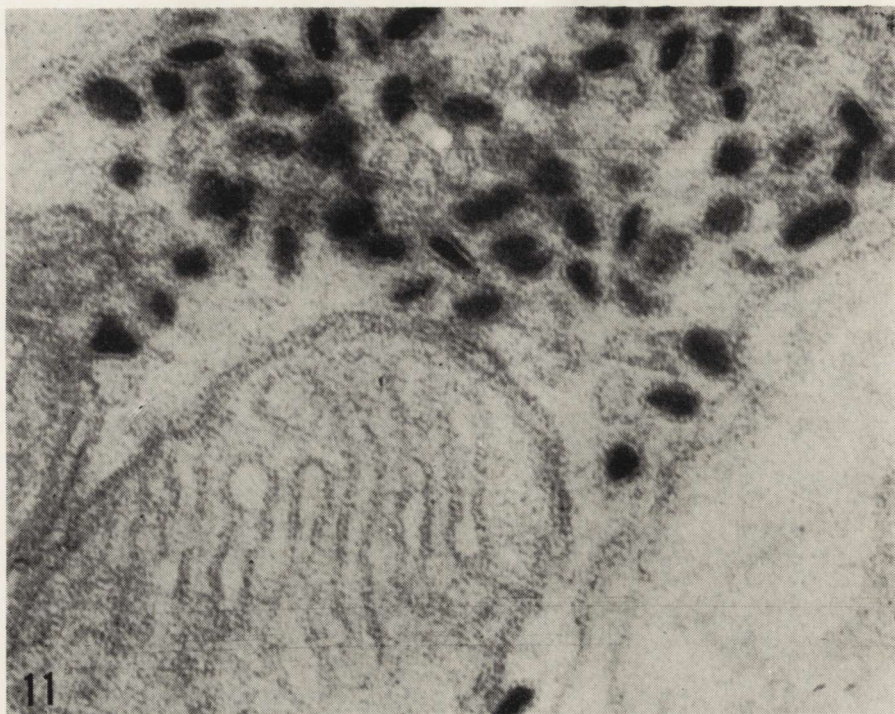
Ryc. 9. Grupa II, 30 minut po ostatnim napadzie. Liczne pęcherzyki synaptyczne pozbawione produktu reakcji. Pow. 115 000 ×.

Fig. 9. Group II, 30 minutes after last epileptic fit. Numerous synaptic vesicles devoid of reaction product. × 115 000.

Ryc. 10. Grupa II, 60 minut po ostatnim napadzie. Większość pęcherzyków w kolbce synaptycznej wypełniona produktem reakcji. Pow. 70 000 ×.

Fig. 10. Group II, 60 minutes after last epileptic fit. Majority of vesicles in synaptic sack filled with reaction product. × 70 000.

Synapsy hamujące w mózgach zwierząt, u których wywołano napady padaczkowe nie wykazują istotnych zmian w porównaniu z materiałem kontrolnym (ryc. 11). Pęcherzyki spłaszczone, zlokalizowane w kolbkach synaps hamujących wszystkich badanych grup, zawierały w swym wnętrzu elektronowogęsty produkt reakcji cynkowo jodowo-osmowej.



Ryc. 11. Grupa I, 30 minut po pojedynczym napadzie. Synapsa hamująca. Pęcherzyki spłaszczone wykontrastowane przy pomocy metody cynkowo jodowo-osmowej. Pow. 170 000 \times .

Fig. 11. Group I, 30 minutes after single seizure. Inhibitory synapse. Flattened vesicles contrasted with zinc iodine-osmium method. $\times 170\,000$.

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań dotyczyły morfodynamiki zmian w synapsach okolicy hipokampa szczurów, u których wywołano napady padaczkowe. Zastosowana metoda cynkowo jodowo-osmowa umożliwiła precyzyjne określenie zmian zawartości pęcherzyków synaptycznych.

W preparatach pochodzących od zwierząt kontrolnych, przy zastosowaniu impregnacji pęcherzyków synaptycznych metalami ciężkimi, uzyskano w 97% pęcherzyków dodatnią reakcję. Wyniki te przemawiają za wysokim stopniem specyficzności reakcji ujawniającej zawarty neu-

rotransmitter w pęcherzykach, które przy fizjologicznym przekazywaniu impulsów nerwowych ulegają ciągłemu opróżnianiu i regeneracji.

U zwierząt, u których wywołano jeden napad padaczkowy tylko 54% pęcherzyków synaptycznych bezpośrednio po napadzie wypełnionych jest produktem reakcji. Można sądzić, że pojedynczy napad padaczkowy spowodował opróżnienie się pęcherzyków, natomiast okres kilku minut pomiędzy zakończeniem napadu a utrwaleniem materiału jest zbyt krótki na całkowite zregenerowanie transmittera.

Materiał pobrany od zwierząt w 30 minut oraz 60 minut po napadzie padaczkowym wykazuje dynamiczną regenerację neurotransmitera. Okres 30 minut wystarczył, by 79% pęcherzyków posiadało w swym wnętrzu produkt reakcji histochemicznej, z czego można wnioskować, iż taka ilość transmittera jest przygotowana do ponownego podjęcia swoich funkcji przENOśnikowych. Porównanie liczby pęcherzyków zregenerowanych u zwierząt w 30 minut (79%) oraz 60 minut (82%) po napadzie nie wykazuje istotnej różnicy. Prawdopodobnie okres 30 minut po pojedynczym napadzie padaczkowym jest wystarczający dla prawie całkowitej odnowy neurotransmitera wyładowanego w pobudzeniu patologicznym.

Napad gromadny spowodował w badanym materiale cięższe zmiany. Bezpośrednio po napadzie gromadnym tylko 9% pęcherzyków synaptycznych wypełnionych jest wyznacznikiem. Przemawia to za prawie całkowitym rozładowaniem neurotransmitera po napadzie gromadnym. W tej grupie obserwowano ponadto pęcherzyki synaptyczne większe niż w materiale kontrolnym. Takie pęcherzyki obserwowali także Kawana i wsp. (1971), Juraniec i wsp. (1974) oraz Dymecki i wsp. (1977). Autorzy ci uważają, iż zmiana wielkości pęcherzyków jest charakterystyczna dla procesów zwyrodnieniowych zakończeń nerwowych. Akert i wsp. (1971) uzyskali analogiczne wyniki w materiale utrwalanym aldehydami jak i nie utrwalanym a następnie badanym przy pomocy techniki łupania na zimno. Te badania potwierdziły, iż obserwowane duże pęcherzyki nie są artefaktami powstałymi podczas utrwalania, ale są wynikiem wczesnych zmian zwyrodnieniowych. Napad gromadny powodował tak duże zmiany, że w 30 minut po wywołanym ostatnim wyładowaniu drgawkowym, zaledwie 50% pęcherzyków synaptycznych uległo odbudowie. Natomiast okres czasu 60 minut po napadzie gromadnym jest wystarczającym na prawie pełne odbudowanie neurotransmitera. Jak wykazały nasze obliczenia nie ma znamiennych różnic w liczbie pęcherzyków wypełnionych produktem reakcji cynkowo jodowo-osmowej, pomiędzy materiałem pobranym w 60 minut po napadzie gromadnym (78%) oraz w materiale pobranym w 60 minut po pojedynczym napadzie padaczkowym (82%).

Zmiany patologiczne obserwowano również w mitochondriach występujących w obrębie kolbek synaptycznych. Fakt ten świadczy, iż w wyniku napadu padaczkowego dochodzi również do uszkodzenia aparatu energetycznego komórki. De Robertis (1971) w modelu padaczki kardiazolowej, wykrył zmiany w strukturze synaps po napadzie padaczkowym. Uważa on, iż najwybitniejsze zmiany polegają na zmniejszeniu się liczby pęcherzyków synaptycznych oraz zwyrodnieniu mitochondriów. Warto przypomnieć, że w materiale pobranym w 60 minut po napadzie gromadnym widoczne były zmiany w budowie mitochondriów.

Na obecnym etapie zajęliśmy się synapsami pobudzającymi, ponieważ synapsy hamujące nie wykazały tak wyraźnej dynamiki opróżniania się, co może być traktowane jako wynik bardzo szybkiej regeneracji albo może być związane z niewrażliwością tego typu synaps na napad padaczkowy. Badanie synaps hamujących wymagałoby techniki szybszego utrwalania niż technika perfuzyjna, dla prześledzenia dynamiki zmian w synapsach bezpośrednio po napadzie.

WNIOSKI

1. Napad padaczkowy pojedynczy oraz gromadny, wywołuje wyładowanie neurotransmiterów w zakończeniach nerwowych. Po napadzie pojedynczym okres czasu 30 minut jest wystarczający dla prawie całkowitego ponownego wypełnienia pęcherzyków synaptycznych substancją przekaźnikową, natomiast po napadzie gromadnym, prawie całkowita regeneracja następuje dopiero po 60 minutach.

2. Po napadzie gromadnym w kolbach synaptycznych występują zmiany degeneracyjne pod postacią powiększenia pęcherzyków synaptycznych oraz obrzęku mitochondriów.

3. Metoda cynkowo jodowo-osmowa okazała się przydatna w ocenie funkcjonalnych zmian pęcherzyków synaptycznych i może mieć dużą wartość w prowadzeniu badań poznawczych i diagnostycznych.

M. Вальски

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПСОВ
В ОБЛАСТИ ГИПОКАМПА КРЫС С АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ ПРИ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИНК-ЙОД-ОСМИЕВОГО МЕТОДА

Резюме

Исследования касались синапсов, происходящих из области гиппокампа, у 21 крысы с аудиогенной эпилепсией. Использованный метод цинк-йод-осмиевой импрегнации содержимого синаптических пузырьков позволил провести наблюдения за их морфодинамикой. В контрольном материале около 97% синапти-

ческих пузырьков наполнено продуктом цинк-йод-осмиевой реакции, который, согласно литературным данным, соответствует передаточной субстанции. После эпилептического припадка всего лишь 54% пузырьков содержит продукт реакции. Тридцати минут после припадка достаточно для восстановления нейротрансмиттера. Массовый эпилептический припадок вызывает опоражнивание содержимого почти всех пузырьков. Наблюдали также значительное увеличение размеров синаптических пузырьков, что свидетельствует о дегенеративных изменениях. Массовый припадок является причиной того, что через 30 мин после вызванного последнего припадка всего лишь 50% содержимого синаптических пузырьков подвергается восстановлению. Почти полная регенерация нейротрансмиттера наступает лишь только через 60 мин после последнего припадка. Тормозящие синапсы не обнаружили такой четкой динамики опоражнения нейротрансмиттера.

M. Walski

ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATIONS ON THE SYNAPSES OF THE HIPPOCAMPAL REGION OF THE RATS WITH AUDIOGENIC EPILEPTIC SEIZURES BY THE ZINC IODINE-OSMIUM METHOD

Summary

The study concerns the synapses of hippocampal region of 21 rats genetically conditioned with audiogenic epilepsy. The impregnation by means of zinc iodine-osmium method allowed to observe the morphodynamics of synaptic vesicles content. In control material about 97% of synaptic vesicles are filled with zinc iodine-osmium reaction product which according to literature data, corresponds to the transmitter substance. After epileptic seizure only 54% of sacks contain the reaction product. Thirty minutes after the seizure suffice for the reconstruction of neurotransmitter. Collective epileptic fit causes the evacuation of almost all vesicles. There was also observed marked enlargement of synaptic vesicles considered to be a sign of degenerative changes. Collective epileptic fit causes serious disturbances which in 30 minutes after last seizure are expressed by the reconstruction of only 50% of synaptic vesicles content. Almost complete regeneration of neurotransmitter occurs but in 60 minutes after the last seizure. Inhibitory synapses did not demonstrate such evident dynamics of neurotransmitter evacuation.

PIŚMIENNICTWO

1. Akert K., Sandri C.: An electron-microscopic study of zinc iodine-osmium impregnation of neurons. Staining of synaptic vesicles at cholinergic junctions. *Brain Res.*, 1968, 7, 286—295.
2. Akert K., Sandri C.: Identification of the active synaptic region by means of histochemical and freeze etching technique. W: *Excitatory synaptic mechanisms*. Ed. Andersen P., Jensen I. K. S., Oslo Universitetsforlaget, 1970
3. Akert K.: Struktur und Ultrastruktur von Nervenzellen und Synapsen. *Klin. Wschr.*, 1971, 49, 519—523.

4. Akert K., Cuenod M., Moor H.: Further observations on the enlargement of synaptic vesicles in degenerating optic nerve terminals of the avian tectum. *Brain Res.*, 1971, 25, 255—263.
5. Axelrod J.: Neurotransmitters. *Scient. Americ.*, 1974, 2, 58—70.
6. Bodian D.: An electron-microscopic characterization of classes of synaptic vesicles by means of controlled aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 1970, 44, 115—124.
7. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H.: The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York, London, Toronto, 1970.
8. Cotman C. W., Taylor D.: Localization and characterization of concanavalin A receptors in the synaptic cleft. *J. Cell Biol.*, 1974, 62, 236—246.
9. De Robertis E. D. P.: Studies on neurochemical changes in experimental epilepsy. *Triangle*, 1971, 10, 93—98.
10. Dymecki J., Narębski J., Markiewicz D., Tymicz J., Waczyńska W.: Przydatność szczepu myszy obciążonych genetycznie padaczką audiogenną jako modelu padaczki doświadczalnej. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1977, 27, 89—96.
11. Dymecki J., Karwacka H., Walski M.: Dynamika zmian w synapsach w przebiegu audiogennych napadów padaczkowych u myszy. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1977, 27, 81—88.
12. Eccles J. C.: Fizjologia synaps nerwowych. PZWL, Warszawa, 1968.
13. Gottlieb D. J., Cowan W. M.: On the distribution of axonal terminals containing spheroidal and flattened synaptic vesicles in the hippocampus and dentate gyrus of the rat and cat. *Z. Zellforsch.*, 1972, 129, 413—429.
14. Gray E. G., Guillery R. W.: Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 1966, 19, 111—182.
15. Grossman R. G., Williams V. F.: Electrical activity and ultrastructure of cortical neurons and synapses in ischemia. W: *Brain hypoxia*. Ed. Brieley J. B., Meldrum B. S. Synaptics International Medical Publications, London, 1971.
16. Juraniec J., Narkiewicz O., Wrzołkowa T.: Changes in axon terminals of the claustrum following cortical lesions — electron microscopic investigations. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 1—11.
17. Juraniec J., Wrzołkowa T., Narkiewicz O.: Types of synapses in the claustrum of the cat. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1974, 34, 233—252.
18. Karnovsky M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 137—138.
19. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc iodine-osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.*, 1969, 16, 325—331.
20. Kawana E., Akert K., Bruppacher H.: Enlargement of synaptic vesicles as early sign of terminal degeneration in rat caudate nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 1971, 142, 297—308.
21. Krnjevic K.: Synaptic transmission in the brain. *Klin. Wschr.*, 1971, 49, 519—523.
22. Martin R., Barlow J., Miralto A.: Application of the zinc iodine-osmium tetroxide impregnation of synaptic vesicles in cephalopod nerves. *Brain Res.*, 1969, 15, 1—16.
23. Moor H., Pfeninger K., Akert K.: Synaptic vesicles in electron-micrographs of freeze-etched nerve terminals. *Science*, 1969, 164, 1405—1407.
24. Pfeninger K., Sandri C., Akert K., Eugster C. H.: Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area. *Brain Res.*, 1969, 12, 10—18.

25. Robertson J. D., Bodenheimer T. S., Stage D. E.: The ultrastructure of mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains. *J. Cell Biol.*, 1963, 19, 159—199.
26. Schultz R. L., Karlsson U. L.: Brain extracellular space and membrane morphology variations with preparative procedures. *J. Cell Sci.*, 1972, 10, 181—195.
27. Sotelo C., Llians R.: Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. *J. Cell Biol.*, 1972, 53, 271—289.
28. Tani E., Ametani T.: Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J. Ultrastructure Res.*, 1971, 34, 1—14.
29. Uchizono K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system. *Nature (London)* 1965, 207, 642—643.
30. Uchizono K.: Structure and function of presynaptic inhibition. *Eight International Congress on Electron Microscopy, Canberra 1974*, 2, 280—281.
31. Uchizono K.: *Excitation and inhibition synaptic morphology*. Igoku Schoin LTD Tokyo, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York. 1975.

Adres autora: Instytut Biostruktury AM, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

BOGNA SCHMIDT-SIDOR, BARBARA LIPIŃSKA

WPŁYW DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANYCH W CZASIE CIĄŻY NAPADÓW PADACZKOWYCH NA MÓZG MYSZY W RÓŻNYCH OKRESACH ROZWOJU

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa
Kierownik Zakładu: doc. dr hab. Jerzy Dymecki

Występowanie padaczki u ludzi młodych wiąże się ze sprawą posiadania potomstwa. Wynikają z tego co najmniej 3 zagadnienia: dziedziczność choroby, wpływ napadów padaczkowych występujących u matki na rozwijający się płód oraz zagadnienie toksyczności i teratogenności leków przeciwdrgawkowych przyjmowanych w okresie ciąży przez kobietę chorą na padaczkę.

Znaczenie czynników genetycznych w padaczce uwidaczniają badania statystyczne, dotyczące występowania padaczki u bliźniąt. Z opracowanego dotychczas materiału obejmującego 250 par bliźniąt jednojajowych i około 500 par bliźniąt dwujajowych zgodność co do zachorowania na padaczkę wykazano u 60,8% par bliźniąt jednojajowych, a tylko w 12,2% u bliźniąt dwujajowych (Koch, 1966).

Zagadnienie wpływu napadów drgawkowych na przebieg ciąży i rozwój płodu oraz szkodliwości stosowanych w tym okresie leków przeciwpadaczkowych były przedmiotem badań katamnesticznych (Janz, Fuchs, 1964; Meadow, 1968, 1970; Speidel, Meadow, 1972), z których wynika, że wady rozwojowe oraz powikłania ciąży i porodu są rzadsze u kobiet, które w czasie ciąży nie były leczone lekami przeciwdrgawkowymi, niż w grupie kobiet otrzymujących te leki. Można by wnioskować, że leki przeciwpadaczkowe są bardziej niebezpieczne dla płodu niż napady padaczkowe matki w okresie ciąży. Może to jednak zależeć od ciężkości przebiegu padaczki.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy danych dotyczących wpływu doświadczalnych napadów drgawkowych u matki na przebieg ciąży i rozwój płodu. Celem pracy było zbadanie czy doświadczone napady padaczkowe, wywoływane u matki w czasie ciąży, powodują zmia-

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.4.1.3.3.6.

ny morfologiczne w mózгах potomstwa oraz czy zmiany te zależą od liczby i częstości napadów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na samicach myszy pochodzących ze szczepu obciążonego genetycznie uwarunkowaną padaczką audiogenną oraz na ich potomstwie z I i II ciąży.

Do doświadczenia użyto 32 samice w wieku 2,5 miesiąca. Od początku ciąży tj. od czwartego dnia po połączeniu z samcem, u samic wywoływano przy pomocy dzwonka elektrycznego uogólnione napady drgawkowe według metody opisanej przez Markiewicz i Ostrowską (1977).

W I grupie, liczącej 9 samic, napady wywoływano codziennie, a w grupie II liczącej 23 samice co drugi dzień. Wywoływanie napadów kończono w obu grupach na 2 dni przed spodziewanym porodem. Przeprowadzono obserwacje kliniczne dotyczące przebiegu ciąży i rozwoju potomstwa oraz badania morfologiczne mózgow myszy urodzonych w trakcie doświadczenia. Badania morfologiczne wykonano na 100 mózгах potomnych myszy w wieku 5, 10, 15, 20 i 30 dni. Zwierzęta w 5 i 10 dniu życia dekapitowano w narkozie eterowej; mózgi wraz z czaszką utrwalano przez 1 dzień w 10% formalinie, następnie wyjmowano z czaszki. Zwierzęta 15, 20 i 30 dniowe usypiano eterem, a mózg utrwalano przez dosercową perfuzję 10% formaliną. Jako grupę kontrolną dla obserwacji klinicznych użyto 32 ciężarne samice w wieku 2,5 miesiąca pochodzące z tego samego szczepu myszy, u których nie wywoływano napadów drgawkowych. Kontrolne badania morfologiczne przeprowadzono na 25 mózгах myszy tego samego szczepu w grupach wieku, odpowiadających myszom doświadczalnym.

Utrwalone mózgi zatapiano w parafinie. Mózgi myszy 5 i 10 dniowych skrawano seryjnie; 15, 20 i 30 dniowych badano na przekrojach przez obie półkule na poziomie skrzyżowania nerwów wzrokowych, wzgórza, śródmózgowia i mózdzku z opuszką. Skrawki barwiono H-E, fioletem krezyłu, metodą Klüver-Barrery i Weila.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Czas trwania ciąży u myszy z napadami drgawkowymi, wywoływanymi doświadczalnie, jest taki sam, jak u myszy tego samego szczepu bez napadów drgawkowych. W grupie I, w której napady drgawkowe wywoływano codziennie, wystąpiły liczne powikłania ciąży. W 2-ch przypadkach był to poród przedwczesny. Dwie myszy padły przy porodzie,

a pozostałe samice zagryzły swoje potomstwo. Tak więc z grupy myszy, u których w czasie I i II ciąży wywoływano napady drgawkowe codziennie, nie uzyskano potomstwa. Zmodyfikowano więc układ doświadczeń, zmniejszając częstotliwość napadów.

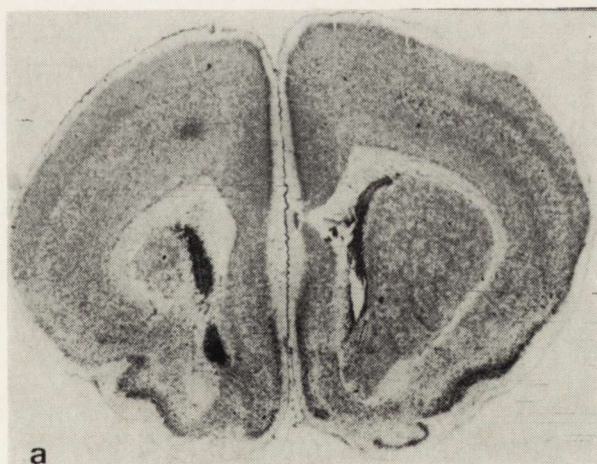
W grupie II liczącej 23 samice, u których w czasie I ciąży wywoływano napady drgawkowe co drugi dzień, padły 4 samice (2 przy porodzie, 2 w czasie napadu drgawkowego), w czasie II ciąży padła 1 samica (po porodzie). W czasie pierwszej ciąży od 23 samic uzyskano 119 myszy, a w czasie drugiej od 19 samic — 79. Zjawisko zagryzienia potomstwa w I ciąży wystąpiło w 7 miotach spośród 23, a w II ciąży w 10 miotach wśród 19. Zagryzione mioty w obu ciążyach i w obu grupach stanowią 47,9% miotów (w kontroli 5,5%).

Rozwój myszy urodzonych z I i II ciąży był prawidłowy. W wieku 3-ch dni porastały włosem, w tym samym czasie odchyłały się im uszka, oczy otwierały się w 10-tym dniu życia.

Obraz morfologiczny

W 4-ch pierwszych grupach wieku tj. w 5, 10, 15 i 20 dniu życia w badaniu morfologicznym stwierdzono zmiany świadczące o opóźnieniu rozwoju ośrodkowego układu nerwowego.

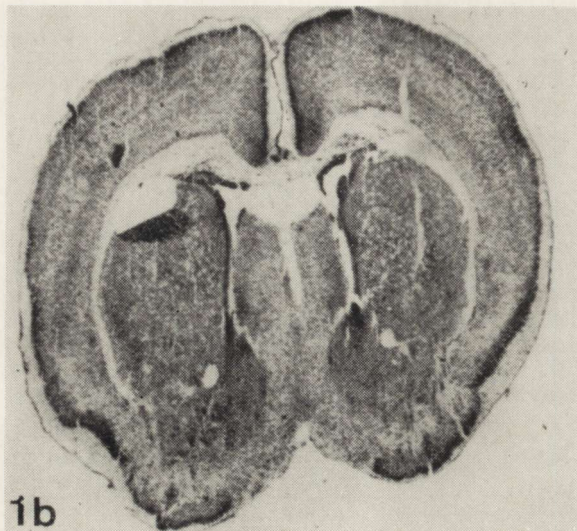
W grupie myszy 5-dniowych i 15-dniowych opóźnienie rozwoju wyrażało się mniejszymi wymiarami mózgu niż u zwierząt kontrolnych (ryc. 1a, b), bogatszą masą macierzy w półkulach mózgowych, grubszą warstwą



Ryc. 1a. Kontrola. Przekrój poprzeczny przez półkule mózgu myszy 5-dniowej. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.

Fig. 1a. Control. Transverse section of the brain hemispheres of 5 days old mouse. Cresyl violet. Magn. glass.

Obersteinera w mózdzku (ryc. 2a, b) oraz mniejszą dojrzałością kory nowej, za czym przemawiała bogatsza w komórki II warstwa kory, gęstsze ułożenie komórek nerwowych w korze oraz mniej dojrzałe komórki nerwowe w porównaniu z odpowiednimi strukturami u myszy kontrolnych (ryc. 3a, b; 4a, b).



Ryc. 1b. Przekrój poprzeczny przez półkule mózgu 5-dniowej myszy doświadczalnej. Cechy opóźnienia rozwoju mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe.

Fig. 1b. Experimental, 5 days old mouse. Transverse section of the brain hemispheres. Retardation of development. Cresyl violet. Magn. glass.

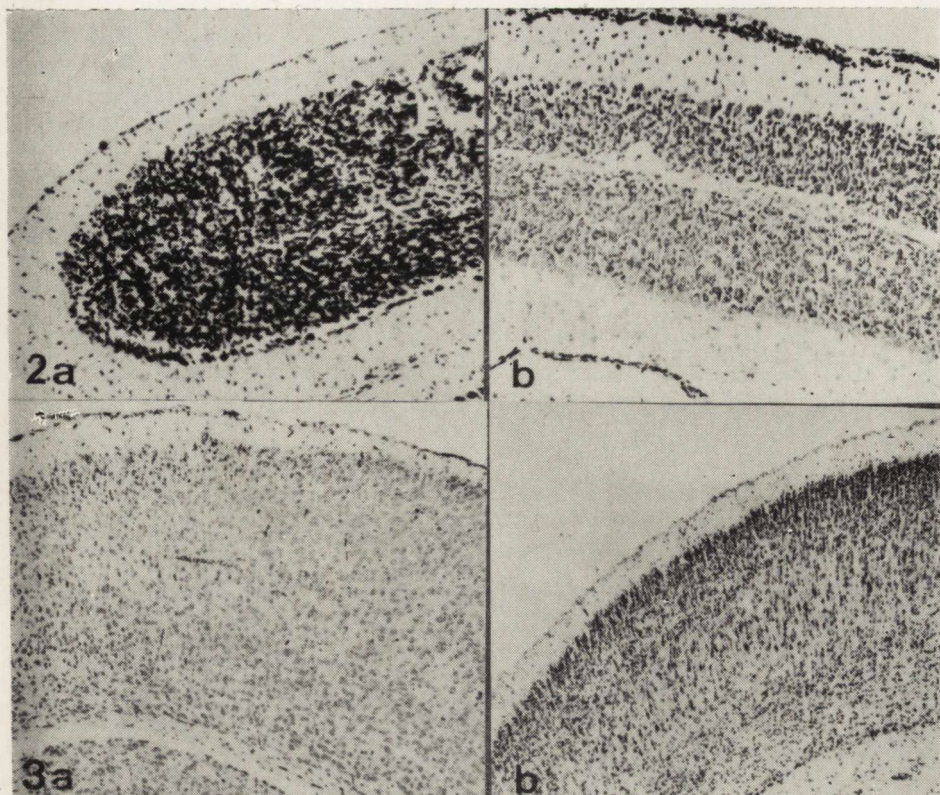
W grupie myszy 15 dniowych do objawów wymienionych wyżej dołączyły się objawy związane z opóźnieniem mielinizacji, a mianowicie obserwowano mniejszą ilość gleju mielinizacyjnego w spidle wielkim, w jego promienistości oraz mniej włókien zmielinizowanych w porównaniu z kontrolą (ryc. 5a, b).

W grupie myszy 20-dniowych jedynym objawem opóźnionego rozwoju jest mniejsza ilość gleju mielinizacyjnego i mniejsza ilość zmielinizowanych włókien w spidle i jego promienistości oraz w dolnych warstwach kory mózgowej.

Grupa myszy 30-dniowych nie różni się stopniem rozwoju od grupy kontrolnej.

Opisane zmiany stwierdzono w około połowie przypadków, a częstość występowania ich była podobna w obu ciężach.

W żadnej z badanych grup nie stwierdzono ubytków komórkowych, martwic, zmian krwotocznych ani nieprawidłowego ukształtowania struktur mózgowych.



Ryc. 2a. Kontrola. Mózdzek myszy 15-dniowej. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 2a. Control. Cerebellum of 15 days old mouse. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 2b. Mózdzek myszy doświadczalnej 15-dniowej. Przetrwiała warstwa ziarnista zewnętrzna Obersteiner'a. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 2b. Experimental, 15 days old mouse. Persistence of external, granular, cerebellar layer. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 3a. Kontrola. Kora mózgowa myszy 5-dniowej. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

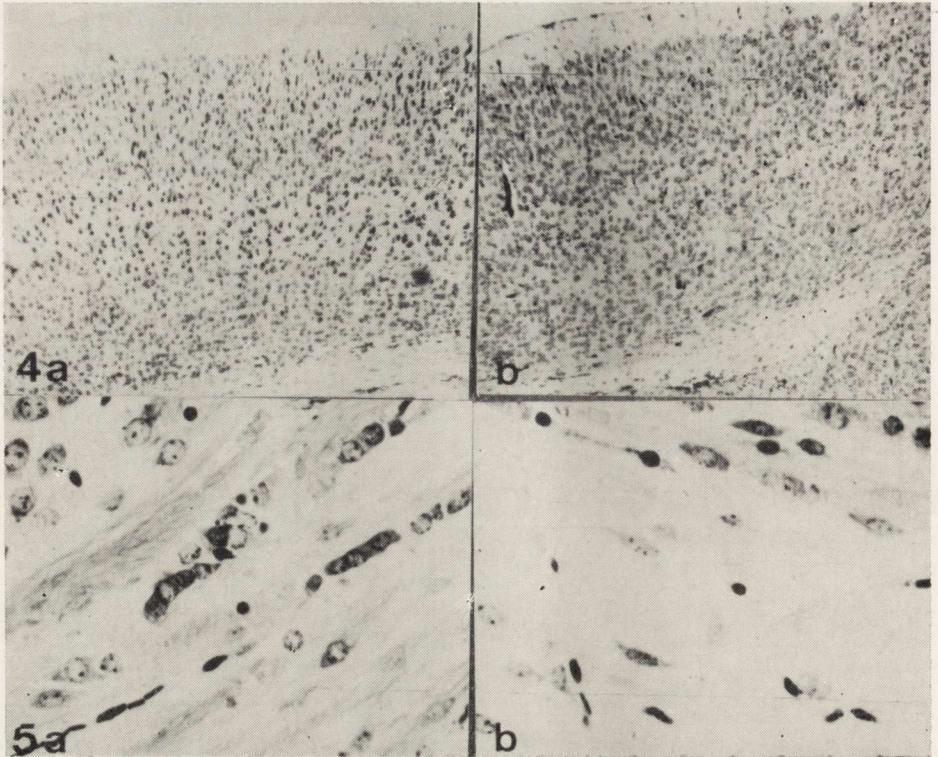
Fig. 3a. Control. Cerebral cortex of 5 days old mouse. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 3b. Kora mózgowa myszy doświadczalnej 5-dniowej. Opóźnienie rozwoju wyrażające się bogactwem komórkowym II warstwy kory i gęstszym ułożeniem komórek nerwowych w głębokich warstwach kory. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 3b. Experimental, 5 days old mouse. Cerebral cortex with features of developmental retardation: increased cellularity of II layer, denser arrangement of neurons in deep cortical layers. Cresyl violet. × 60.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z obserwacji klinicznych wynika, że myszy, u których doświadczalnie wywoływano w okresie ciąży napady padaczkowe, padają częściej w okresie okołoporodowym niż zwierzęta kontrolne. Śmierć myszy w czasie napadów drgawkowych obserwowali również Markiewicz i Ostrowska (1977).



Ryc. 4a. Kontrola. Kora mózgowia myszy 15-dniowej. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 4a. Control. Cerebral cortex of 15 days old mouse. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 4b. Kora mózgowia myszy doświadczalnej 15-dniowej z cechami opóźnionego rozwoju. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 4b. Experimental, 15 days old mouse. Cerebral cortex with features of retarded development. Cresyl violet. × 60.

Ryc. 5a. Kontrola. Mysz 15-dniowa. Głej mielinizacyjny i włókna zmielinizowane w spoidle wielkim. Klüver-Barrera. Pow. 400 ×.

Fig. 5a. Control. 15 days old mouse. Myelination glia and myelinated fibres in corpus callosum. Klüver-Barrera. × 400.

Ryc. 5b. Mysz doświadczalna 15-dniowa. Mała ilość gleju mielinizacyjnego i brak włókien zmielinizowanych w spoidle wielkim. Klüver-Barrera. Pow. 400 ×.

Fig. 5b. Experimental, 15 days old mouse. Small amount of myelination glia and lack of myelinated fibres in corpus callosum. Klüver-Barrera. × 400.

Zjawisko zagryzania potomstwa może być wynikiem wielu czynników, jak brak wody, nieodpowiednia temperatura i wilgotność, niewłaściwe odżywianie, niepokój, ujawnianie się genów letalnych. W naszym materiale zjawisko zagryzania objęło 47,5% miotów doświadczalnych (przy 5,5% w kontroli). Za zasadniczą przyczynę zagryzania potomstwa można uznać wywoływane w czasie ciąży napady padaczkowe, zwłaszcza, że w I grupie zwierząt, gdzie częstotliwość napadów była większa, wszystkie

mioty zostały zagryzione. Sprawą dyskusyjną pozostanie zagadnienie, czy przyczyną był niepokój samicy, czy też zagryzała ona swe potomstwo, bo było mniej wartościowe. Odpowiedź na to pytanie jest trudna, ponieważ badanie potomstwa bezpośrednio po porodzie jest niewskazane, gdyż budzi niepokój samicy. Inni autorzy (Randt, Derby, 1973) obserwowali wzmożone zagryzanie potomstwa u myszy niedożywionych w czasie ciąży, których młode wykazywały znaczny niedobór wagi mózgu.

Stwierdzone w badaniu morfologicznym opóźnienie rozwoju mózgu myszy pochodzących z ciąży powikłanych napadami drgawkowymi, można uznać za wynik zaburzeń hemodynamicznych, występujących w trakcie napadu drgawkowego matki. Z badań Meldruma i wsp. (1973) wiadomo, że dużemu napadowi padaczkowemu towarzyszy niedotlenienie. Stopień w jakim niedotlenienie w czasie napadu matki wpływa na niedotlenienie płodu nie jest znany i wymaga dalszych badań. Można przypuszczać, że powtarzanie się czynnika szkodliwego nawet o słabym nasileniu może doprowadzić do zaburzenia rozwoju. Działanie czynnika szkodliwego w okresie intensywnego podziału komórek i ich migracji, spowodowało opóźnienie dalszego rozwoju kory nowej. Opóźnienie mielinizacji należy w prosty sposób wiązać z opóźnieniem rozwoju komórek kory mózgowej. Badania McIlwaina (1966) wykazały, że mielinizacja rozpoczyna się po wykształceniu przez akson jego najdalszej synapsy, a więc po zakończeniu pewnego etapu rozwoju komórki nerwowej. Z badań Fischera (1973) oraz Maślińskiej (1972) wiadomo, że niedotlenienie w czasie życia płodowego opóźnia rozwój ośrodkowego układu nerwowego.

Z zestawień, dotyczących czynników wywołujących wady ośrodkowego układu nerwowego u dzieci (Mc Donald, 1962; Leck i wsp., 1968; Terplan, 1967; Eastman, 1962; Puder, 1964) oraz z badań katamnesticznych potomstwa kobiet chorujących na padaczkę (Janz, Fuchs, 1964; Speidel, Meadow, 1972) wynika, że padaczka nie wywołuje wad ośrodkowego układu nerwowego. Speidel i Meadow (1972) są zdania, że występowanie wad wrodzonych u dzieci matek, chorych na padaczkę, związane jest raczej z leczeniem kobiety w czasie ciąży lekami przeciwdrgawkowymi, niż z występowaniem napadów.

Padaczka matki nie bywa wymieniana jako przyczyna uszkodzeń okołoporodowych (Courville, 1959; Eastman, 1962; Puder, 1964; Eljaszewicz, 1964; Usoskin, Semenowa, 1964). Opisywano przypadki urodzenia zdrowych noworodków mimo przedłużającego się stanu epileptycznego u matki w okresie ciąży (Mc Clure, 1955; Neu, 1907 cyt. za Janzem i Fuchsem, 1964; Waldstein, 1928). Dokładne i wszechstronne badania katamnesticzne potomstwa kobiet chorych na padaczkę wykazałyby być może nieuchwytnie przy urodzeniu i we wczesnym okresie życia objawy opóź-

nienia rozwoju ośrodkowego układu nerwowego stanowiące tzw. zespół minimalnych uszkodzeń.

Przeprowadzenie analogii między wynikami doświadczeń prowadzonych na zwierzętach, w dodatku tak nisko postawionych w hierarchii rozwoju, jak mysz, a patologią ludzką jest niewątpliwie niedopuszczalne i trudno je przenosić na człowieka. Wydaje się jednak, że istnieje pewna zgodność naszych wyników, a także wyników podobnych badań prowadzonych na innych zwierzętach (Dąbska i wsp. 1976) z danymi dotyczącymi człowieka.

Można sądzić, że duże napady drgawkowe wywoływane u matki w czasie ciąży nie są przyczyną wad rozwojowych ośrodkowego układu nerwowego u myszy ani też nie wywołują nieodwracalnych uszkodzeń tkanki mózgu, natomiast powodują opóźnienie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, wyrównujące się około 30 dnia życia.

Б. Шмидт-Сидор, Б. Липиńska

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫХ ВО ВРЕМЯ
БЕРЕМЕННОСТИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИПАДКОВ НА МОЗГ МЫШИ
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

Резюме

У самок мыши с аудиогенной эпилепсией вызвали во время двух очередных беременностей припадки конвульсий.

Нейропатологическое исследование мозга у потомства показало отставание созревания центральной нервной системы, компенсируемое около 30 дня жизни. Не наблюдали ни аномалий в развитии мозга, ни вторичных изменений.

B. Schmidt-Sidor, B. Lipińska

EFFECT OF EXPERIMENTALLY INDUCED EPILEPTIC SEIZURES DURING
PREGNANCY ON THE MOUSE BRAIN AT VARIOUS PERIODS
OF DEVELOPMENT

Summary

Epileptic seizures were induced in mice conditioned with audiogenic epilepsy during two consecutive pregnancies.

Neuropathological investigation of the offspring brains showed some retardation of the development of the central nervous system which was compensated in about 30-th day of life. Neither cerebral malformations nor secondary changes in brain tissue were observed.

PISMIENNICTWO

1. Courville C. B.: Antenatal and perinatal circulatory disorders as a cause of cerebral damage. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1959, XVIII, 115—140.
2. Dąbska M., Danielewicz-Kotowicz A., Wilmowska-Pietruszyńska A., Maślińska D., Onyszkiewicz J.: The effect of seizures of pregnant rabbits on the

- development of foetal brain. Polsko-Gruzińskie Sympozjum „Brain ischemic”, Tbilisi, 1—5.IX.
3. Eastman N. J.: The obstetrical background of 753 bases of cerebral palsy. *Obst. Gynec. Surv.* 1962, 17, 459—500.
 4. Eljaszewicz G. P.: Opyty kliniko-anatomopatologiczeskowo analiza prziczn perinatalnej smiertnosti. *Wopr. Ochr. Mater. Det.* 1964, 9, z. 12, 59—60.
 5. Fischer I. — Informacja ustna.
 6. Janz D., Fushs U.: Are antiepileptic drugs harmful when given during pregnancy? *Germ. Med. Mth.* 1964, 20—22.
 7. Koch G.: Zur Erbllichkeit der Epilepsien. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 1966, 34, 247.
 8. Leck I., Record R. G., Mc Keovn R., Edwards J. H.: The incidence of malformations in Birmingham, England 1950—1959. *Teratology* 1968, 1, 263—280.
 9. Markiewicz D., Ostrowska D.: Zmiany podrgawkowe w mózgu myszy z padaczką audiogenną. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 107—117.
 10. Maślińska D.: Wpływ asfiksji śródmaciczej na mózg szczura. Warszawa 1973, (praca doktorska).
 11. Mc Clure J. H.: Idiopathic epilepsy in pregnancy. *Amer. J. Obst. Gynec.* 1955, 17, 296—301.
 12. Mc Donald A. D.: Maternal health in early pregnancy and congenital defect. Final report on a prospective injury. *Obst. Gynec. Surv.* 1962, 17, 548—550.
 13. McIlwain H.: *Biochemistry and the central nervous system*, 3rd ed: Boston, Little, Brown, 1966.
 14. Meadow S. R.: Anticonvulsant drugs and congenital abnormalities. *Lancet* 1968, II, 1296.
 15. Meldrum B. S., Horton R. W.: Physiology of status epilepticus in Primates. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 7—9.
 16. Meldrum B. S., Vigouroux R. A., Brierley J. B.: Systemic factors and epileptic brain damage. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 82—87.
 17. Puder H.: The effects of antenatal and obstetric care on antenatal and inter-natal foetal death. *Gebursth. u. Frauenhelik.* 1963, 23, 243—259.
 18. Randt C. T., Derby B. M.: Behavioral and brain correlations in early life nutritional deprivation. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 167—172.
 19. Speidel B. D., Meadow S. R.: Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. *Lancet* 1972, II, 7782.
 20. Terplan K. L.: Histopathologic brain changes in 1153 cases of the perinatal and early infancy period. *Biol. Neonat.* 1967, 11, 348—366.
 21. Usoskin I. I., Semenowa N. V.: Antenatal protection of the fetus in woman with organic affections of the central nervous system. *Wopr. Ochr. Mater. Det.*, 1964, 9, z. 5, 59—68.
 22. Zalewska-Rutczyńska Z.: Zagadnienie płodności i plenności u zwierząt laboratoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem myszy białej (*Mus musculus*). *Zwierzęta laboratoryjne* 1967, 5, 89—97.

Adres autorek: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, 02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
OLGA MULAREK, JADWIGA PANKRAC, JAN SĘDZIK

THE EFFECT OF INTOXICATION WITH METHYLNITROSOUREA ON THE LIPID COMPOSITION OF CEREBRAL MYELIN*)

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań, Poland
Head: Prof. M. Wender

The alkyl derivatives of nitrosoarea are chemical compounds capable of inducing irreversible cellular changes on a molecular level, mainly by virtue of their effects on nucleic acids and proteins. Neoplastic tumors of the central nervous system and of other organs as well as malformations have been reported to be the final result of action of these compounds. This very problem has been reviewed in details by Kirsch et al. (1972) and by Wollemann (1974).

The studies of Kroh (1973, 1976 a) have shown, that ethylnitrosoarea affects the cerebral white matter of experimental animals as well, when administered to pregnant mice. When administered to pregnant mice, the poison though not interfering with myelination process, happened to bring about demyelination in the mature brain and cerebellum of a significant number of mice intoxicated during intrauterine life. The affected animals displayed multifocal demyelination without any relationship to vascular system, and without notable cellular response round the demyelination foci.

The same author (Kroh 1976 b) reported about the delayed occurrence of multiple demyelinating foci and axonal lesions with presence of myelin katabolism deposits in brains of some mothers, injected during pregnancy with ethylnitrosoarea. The herewith described demyelinating process bare some resemblance to that observed in human pathology, when we are confronted with multiple, disseminated lesions of the myelin sheaths.

The pathomechanism of demyelination brought about by alkyl-nitrosoarea is entirely obscure but the elucidation of this particular mecha-

* This investigation was supported by the Polish Academy of Sciences, 10.4.2.02.3.3.

nism would surely contribute immensely to the understanding of essential aspects of demyelination in general. That is why we have undertaken a study on the effect of experimental methylnitrosourea poisoning on the myelin lipid composition.

MATERIAL AND METHODS

Adult BD IX rats of either sex, 200—300 g of body weight were injected intravenously once daily for 6 consecutive days with 3% water solution of methylnitrosourea (MNU) at doses of 60 mg of MNU per kg of body weight.

The lipid composition of the myelin fraction obtained from animals sacrificed 2, 3, 4, 6, 8 and 12 weeks following the last injection of MNU was studied.

Chemical procedure. The brains assigned for chemical determinations were processed as quickly as possible following decapitation. The white matter, separated from the whole brain according to macroscopic morphological criteria were used for isolating the myelin fraction according to the method described by Norton and Poduslo (1973). The white matter specimens were subjected to differential centrifugation in a discontinuous (0.32 and 0.85 M, pH 7.0) sucrose gradient using a swing-out head.

The isolated myelin fraction was washed three times with distilled water, each washing followed by centrifugation at $70\,000\times g$ for 20 min. The final sediment was dried in vacuum to constant weight.

The identity and purity of the obtained myelin fraction was checked by means of electron microscopy.

Lipids were extracted from the myelin fraction according to the method of Folch-Pi et al. (1957). The extracted total lipids were further separated by means of combined column and thin-layer chromatography. Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated and estimated by the chromatographic procedure after Svennerholm (1964). Cholesterol was quantitated after elution of the silica gel scrapings, using the method of Sperry and Webb (1950), and cerebrosides as well as sulfatides using the method of Radin et al. (1955). Phospholipids were separated by two dimensional chromatography according to the method described by Singh et al. (1971). The plates were coated with silica gel G (Merck), and developed in the first direction with chloroform : methanol : water (65:25:4). After drying the plates were hydrolyzed with 12% hydrochloric acid in methanol. The HCl and methanol were evaporated from the plate with a stream of nitrogen. Thereafter the plates were developed in the second direction with chloroform : acetone : methanol : glacial acetic

acid : water (5:2:1:1:0.5). The phosphorus content of the so separated, identified and scraped off spots was determined after elution using the method of Bartlett (1959).

Histological techniques. Frozen brain sections were stained with the method of Spielmeyer, with H + E, and with Sudan III. Sections embedded in celoidine were stained with the methods of Woelcke, Nissl and with H+E, and those embedded in paraffin — with the methods of Kanzler, Nissl and Klüver-Barrera.

RESULTS

Clinical findings. During the period of methylnitrosourea administration, after 3 or 4 injections, the animals made a sluggish, apathetic, slow appearance. Other neurological symptoms were not observed.

Histology. Dilatation of perivascular spaces along with spongy changes located almost exclusively in the cerebral and cerebellar white matter, were seen in brain specimens from all experimental groups (Fig. 1—3). The spongy vacuoles were sharply demarcated from the neigh-

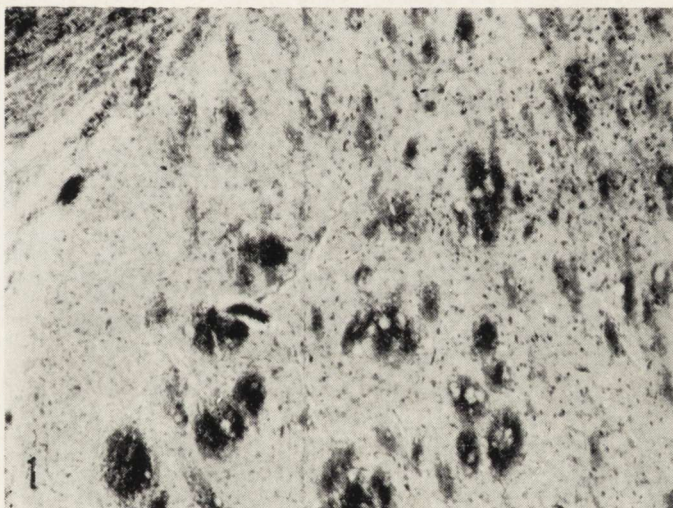


Fig. 1. BD IX rat, 12 weeks after MNU intoxication. Spongy changes in the internal capsule fibres. Spielmeyer. $\times 30$.

Ryc. 1. Szczur BD IX, 12 tygodni po zatruciu MNU. Zmiany gąbczaste we włóknach torebki wewnętrznej. Spielmeyer. Pow. $30 \times$.

bourhood and were not accompanied by a marginal reaction of the glia. The myelin stains did not reveal any demyelinating foci, and staining with Sudan III failed to demonstrate sudanophilic deposits.

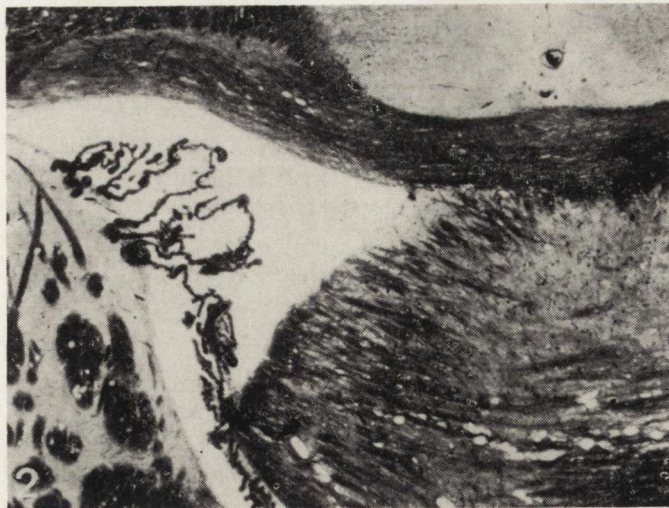


Fig. 2. BD IX rat, 4 weeks after MNU intoxication. Frontal section of the brain. Oedema in the transversal fibres of the pons. Woelcke. $\times 12$.

Ryc. 2. Szczur BD IX, 4 tygodnie po zatruciu MNU. Przekrój czołowy mózgu. Obrzęk we włóknach poprzecznych mostu. Woelcke. Pow. $12 \times$.

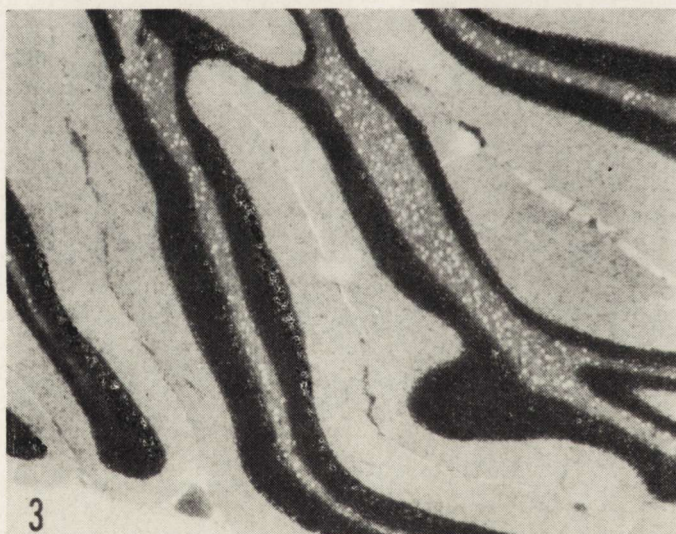


Fig. 3. BD IX rat, 6 weeks after MNU intoxication. Spongy alterations in the cerebellar white matter. H.—E. $\times 12$.

Ryc. 3. Szczur BD IX, 6 tygodni po zatruciu MNU. Zmiany gąbczaste w istocie białej mózdzku. H.—E. Pow. $12 \times$.

On single occasions, some focal rarefaction of the cerebellar granular layer was noticed. None of the experimental animals happened to develop malignant tumors.

Biochemistry. The lipid composition of the myelin preparations isolated from the intoxicated animals revealed a number of quantitative changes, some of them restricted only to particular experimental groups, and other persisting throughout the whole period of investigation.

The most impressive change, observed over the whole experimental period, was the striking decrease of the sphingomyelin content, which happened to drop to about 50% of control values. The myelin preparation of animals sacrificed during the early period following MNU treatment (2—3 weeks), revealed a considerable decline of total phospholipids, caused mainly by losses of plasmalogens, and the serine together with inositolphosphatid fractions.

At the time of 4 and 12 weeks following intoxication — an appreciable amount of cholesterol esters was demonstrable in the myelin fraction of the experimental animals (Table 1).

The alterations, when expressed in percentages of total myelin lipids revealed a considerable increase of the cholesterol esters content, ranging from 100 to 300% in almost all experimental groups. The other lipid constituents were showing the same direction of changes when expressed in g/100 g of tissue dry weight (Table 2).

In Table 3, there are presented quantitative changes of the individual phospholipid fractions, expressed in percentages of total phospholipids. Here again, the significant decline of the sphingomyelin fraction becomes apparent.

The proportions of the two main glycolipid classes (cerebrosides and sulfatides) constituting the total myelin glycolipids were shifted towards an increase of the relative percentage of cerebrosides on the expense of sulfatides. These changes were seen in all experimental groups covering the period of 2—8 weeks following the last injection of methylnitrosourea. In the myelin fraction isolated from animals sacrificed 3 months after treatment with MNU, these proportions did no longer deviate from control ones (Table 4).

DISCUSSION

The interest in the effects which methylnitrosourea exerts on the central nervous system originates from its strong neurotropic carcinogenicity. Thus, almost all studies dealing with derivatives of nitrosourea were concerned with this aspect of their metabolic effectiveness.

Table 1. Lipid composition of brain myelin in experimental MNU intoxication (in g/100 g of dry tissue)
Tabela 1. Skład lipidów mieliny mózgu w doświadczalnym zatruciu MNU (w g/100 g suchej tkanki)

Lipids Lipidy	Normal animals Norma	Time after intoxication Czas po zatruciu					
		2 weeks 2 tygodnie	3 weeks 3 tygodnie	4 weeks 4 tygodnie	6 weeks 6 tygodni	8 weeks 8 tygodni	12 weeks 12 tygodni
Cholesterol							
Cholesterol	6.7±0.28	6.1±0.28	6.4±0.25	6.8±0.16	6.9±0.38	6.7±0.44	6.6±0.08
Cholesterol esters							
Estry cholesterolu	0.2±0.01	0.3±0.04	0.3±0.03	<u>0.4±0.06</u>	0.1±0.17	0.3±0.02	0.5±0.06
Cerebrosides							
Cerebrozydy	7.1±0.29	6.4±0.48	7.8±0.17	7.5±0.08	8.9±0.36	7.9±0.16	6.6±0.17
Sulfatides							
Sulfatydy	2.1±0.05	<u>1.0±0.18</u>	<u>1.3±0.03</u>	1.7±0.10	2.1±0.23	1.8±0.09	1.9±0.05
Phosphatidyl acids							
Kwasy fosfatydowe	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.01	0.04±0.01	0.1±0.03	0.1±0.01	0.1±0.01
Sphingomyelins							
Sfingomieliney	1.2±0.15	<u>0.6±0.05</u>	<u>0.6±0.01</u>	<u>0.7±0.01</u>	<u>0.7±0.04</u>	<u>0.7±0.04</u>	<u>0.7±0.04</u>
Phosphatidyl choline							
Fosfatydylocholina	3.3±0.32	2.3±0.06	3.0±0.02	3.2±0.04	3.1±0.19	3.2±0.05	2.9±0.30
Lysophosphatidyl choline							
Lizofosfatydycholina	0.2±0.04	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.02	0.2±0.01
Phosphatidyl serine + phospho- inositides							
Fosfatydyloseryna + fosfoinozy- tol	1.2±0.04	<u>0.7±0.06</u>	1.1±0.05	1.4±0.05	1.3±0.08	1.4±0.06	1.0±0.04
Phosphatidyl ethanolamine							
Fosfatydyloetanolamina	1.2±0.07	0.9±0.05	1.0±0.01	1.0±0.04	1.0±0.06	1.1±0.05	0.9±0.06
Plasmalogen							
Plazmalogen	3.7±0.13	<u>2.7±0.06</u>	3.6±0.02	3.6±0.03	4.0±0.15	4.0±0.09	3.8±0.22
Total glycolipids							
Glikolipidy całość	9.2±0.34	7.6±0.60	9.0±0.13	9.3±0.16	<u>11.0±0.50</u>	9.7±0.32	8.5±0.16
Total phospholipids							
Fosfolipidy całość	11.0±0.39	<u>7.4±0.20</u>	9.5±0.05	10.1±0.22	10.3±0.49	10.7±0.26	9.7±0.37

Values are expressed as the mean ± standard error.
Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimation in each group: 6.
Liczba oznaczeń w każdej grupie: 6.

Significant differences underlined.
Istotne różnice podkreślono.

Table 2. Lipid composition of brain myelin in experimental MNU intoxication (in % of total myelin lipids)
 Tabela 2. Skład lipidów mieliny w mózgu w doświadczalnym zatruciu MNU (w % całkowitych lipidów mieliny)

Lipids Lipidy	Normal animals		Time after intoxication				
	Norma	Czas po zatruciu					
		2 weeks 2 tygodnie	3 weeks 3 tygodnie	4 weeks 4 tygodnie	6 weeks 6 tygodni	8 weeks 8 tygodni	12 weeks 12 tygodni
Cholesterol							
Cholesterol	24.8 ± 0.45	28.2 ± 0.71	25.4 ± 0.75	25.7 ± 0.36	24.6 ± 0.86	25.3 ± 0.91	26.1 ± 0.60
Cholesterol esters							
Estry cholesterolu	0.6 ± 0.05	1.3 ± 0.16	<u>1.2 ± 0.12</u>	<u>1.4 ± 0.19</u>	0.9 ± 0.06	<u>1.2 ± 0.09</u>	<u>2.0 ± 0.06</u>
Cerebrosides							
Cerebrozydy	26.2 ± 0.50	30.3 ± 1.09	<u>30.9 ± 0.68</u>	28.4 ± 0.19	<u>31.1 ± 0.22</u>	28.6 ± 0.44	26.1 ± 0.40
Sulfatides							
Sulfatydy	7.7 ± 0.12	5.5 ± 0.63	5.0 ± 0.15	6.4 ± 0.24	7.1 ± 0.30	6.3 ± 0.21	7.7 ± 0.56
Phosphatidyl acids							
Kwasy fosfatydowe	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.11	0.3 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.18	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.05
Sphingomyelins							
Sfingomieliny	4.3 ± 0.44	<u>2.7 ± 0.19</u>	<u>2.5 ± 0.08</u>	<u>2.6 ± 0.03</u>	<u>2.6 ± 0.09</u>	<u>2.7 ± 0.08</u>	<u>2.6 ± 0.14</u>
Phosphatidyl choline							
Fosfatydylocholina	12.2 ± 0.29	10.9 ± 0.44	11.9 ± 0.19	12.0 ± 0.25	11.0 ± 0.40	11.4 ± 0.18	11.6 ± 0.26
Lysophosphatidyl choline							
Lizofosfatydylocholina	1.0 ± 0.10	0.6 ± 0.04	0.4 ± 0.07	0.7 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.7 ± 0.05	0.7 ± 0.05
Phosphatidyl serine + phospho- inositides							
Fosfatydyloseryna + fosfoinozy- tol	4.6 ± 0.25	3.3 ± 0.16	4.3 ± 0.21	5.2 ± 0.17	4.4 ± 0.17	4.9 ± 0.24	3.8 ± 0.21
Phosphatidyl ethanolamine							
Fosfatydyloetanolamina	4.5 ± 0.30	3.9 ± 0.24	3.9 ± 0.17	3.9 ± 0.16	3.5 ± 0.16	4.1 ± 0.19	3.7 ± 0.14
Plasmalogen							
Plazmalogen	13.6 ± 0.54	12.8 ± 0.55	14.2 ± 0.12	13.6 ± 0.22	13.9 ± 0.42	14.3 ± 0.16	15.1 ± 0.22
Total glycolipids							
Glikolipidy całość	33.9 ± 0.53	35.8 ± 1.49	35.9 ± 0.60	34.8 ± 0.29	38.2 ± 0.50	34.9 ± 0.52	33.8 ± 0.56
Total phospholipids							
Fosfolipidy całość	40.7 ± 0.31	<u>34.7 ± 0.90</u>	37.5 ± 0.39	38.1 ± 0.56	36.3 ± 0.98	38.6 ± 0.53	38.1 ± 0.57

Values are expressed as the mean ± standard error.
 Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimation in each group: 6.
 Liczba oznaczeń w każdej grupie: 6.

Significant differences underlined.
 Istotne różnice podkreślono.

Table 3. Phospholipids of brain myelin in experimental MNU intoxication (in % of total myelin phospholipids)
 Tabela 3. Fosfolipidy mieliny mózgu w doświadczalnym zatruciu MNU (w % całości fosfolipidów mieliny)

Phospholipids Fosfolipidy	Normal animals Norma	Time after intoxication Czas po zatruciu					
		2 weeks 2 tygodnie	3 weeks 3 tygodnie	4 weeks 4 tygodnie	6 weeks 6 tygodni	8 weeks 8 tygodni	12 weeks 12 tygodni
Phosphatidyl acid Kwasy fosfatydowe	0.9±0.17	1.4±0.34	1.1±0.15	0.9±0.28	1.0±0.38	0.9±0.19	1.0±0.25
Sphingomyelins Sfingomieliny	11.0±1.07	8.0±0.57	<u>6.3±0.27</u>	<u>6.9±0.07</u>	<u>6.9±0.18</u>	<u>6.5±0.27</u>	<u>7.3±0.35</u>
Phosphatidyl choline Fosfatydylocholina	30.3±0.64	31.0±0.60	31.6±0.26	31.4±0.43	30.1±0.83	29.9±0.52	30.2±0.59
Lysophosphatidyl choline Lizofosfatydylocholina	1.8±0.47	1.4±0.25	1.0±0.18	1.9±0.10	0.9±0.05	1.9±0.14	2.1±0.14
Phosphatidyl serine + phos- phoinositides Fosfatydyloseryna + fosfoinozy- tol	11.1±0.61	9.5±0.52	11.6±0.61	13.7±0.39	12.6±0.38	13.1±0.55	10.4±0.39
Phosphatidyl ethanolamine Fosfatydyloetanolamina	11.1±0.71	12.2±0.68	10.5±0.12	9.8±0.41	9.7±0.21	10.3±0.40	9.4±0.41
Plasmalogen Plazmalogen	33.8±1.38	36.5±0.80	37.9±0.39	35.3±0.39	38.8±0.45	37.4±0.48	39.6±0.53

Values are expressed as the mean ± standard error.
 Średnia ± średni błąd średniej.

Number of estimation in each group: 6.
 Liczba oznaczeń w każdej grupie: 6.

Significant differences underlined.
 Istotne różnice podkreślono.

Table 4. Glycolipids of brain myelin in experimental MNU intoxication (in % of total myelin glycolipids)

Tabela 4. Glikolipidy mieliny mózgu w doświadczalnym zatruciu MNU (w % całości glikolipidów mieliny)

Glycolipids Glikolipidy	Normal animals Norma	Time after intoxication Czas po zatruciu					
		2 weeks 2 tygodnie	3 weeks 3 tygodnie	4 weeks 4 tygodnie	6 weeks 6 tygodni	8 weeks 8 tygodni	12 weeks 12 tygodni
Cerebrosides Cerebrozydy	77.2 ± 0.26	86.5 ± 1.37	85.7 ± 0.61	81.5 ± 0.80	80.9 ± 0.66	81.4 ± 0.56	77.6 ± 0.57
Sulfatides Sulfatydy	22.8 ± 0.40	13.5 ± 1.37	14.3 ± 0.56	18.5 ± 0.80	19.1 ± 0.67	18.6 ± 0.56	22.4 ± 0.57

Values are expressed as the mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej.

Number of estimation in each group: 6.

Liczba oznaczeń w każdej grupie: 6

Significant differences underlined.

Istotne różnice podkreślono.

Considerations about mechanisms by means of which MNU induces the neoplastic growth of neuroglial or Schwann's cells are still under current discussion. It has been suggested that alkylnitrosoureas become somehow metabolically activated to yield final or intermediate carcinogenic compounds, affecting the metabolism of target cells.

Druckrey et al. (1965) have shown, that MNU when injected intravenously, gives rise to diazomethan, which is a strong alkylating agent, capable of methylating guanine, and thus changing the genetic code of nucleic acids. However, according to Viale (1972), the question of whether alkyl derivatives of nitrosourea effect selectively the metabolism of nucleic acids, or by virtue of their alkylating activity affect the overall protein metabolism more or less specifically — remains unsolved. Anyhow, Kleihues and Magee (1973) have proved that administration of N-methyl-N-nitrosourea to experimental animals has a prompt effect on the degree of methylation RNA and DNA of the nervous tissue.

The studies of Kroh (1973, 1976a, b) have directed our attention towards another effect of alkyl-nitrosourea in the central nervous system, i.e. to its damaging action on the myelin sheath.

Our own observations have revealed, but only in a part of the experimental animals (adult BD IX rats) treated with methylnitrosourea, the occurrence of morphological alterations in the myelin sheath, which resemble to some degree, those occurring after triethyl tin intoxication. The observed changes do not seem to be identical with genuine demyelinating processes, neither primary nor secondary ones. Hence, the observed alterations in the myelin lipid composition following methylnitrosourea treatment have to be regarded as independent of the morpholo-

gical changes in the sense that they are not the consequence of the structural alterations.

The chemical change which was most striking in this-experimental condition, and so far not reported in typical demyelinating processes, was the massive loss of sphingomyelins from the affected sheaths. Less characteristic was the increase in the cholesterol esters content of the myelin fraction in the course of the experiment.

The myelin sheath, being the specific site of location of the enzyme-cholesterol esterase with the pH optimum of 7.2 (Eto and Suzuki, 1973), is capable of synthesizing cholesterol esters. The question, however, as in other demyelinating processes remains open, what factors determine the rate of cholesterol esters esterification, and what are the biological implications from this chemical process.

The observations presented in this paper disclose some other effects of alkyl-nitrosoureas on the adult nervous system. They show evidently that beside the carcinogenic effect, methylnitrosourea is an effective agent, disturbing the lipid metabolism of membrane structures of the central nervous system as exemplified by the myelin sheath.

M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, O. Mularek, J. Pankrac, J. Sędzik

WPLYW ZATRUCIA METYLONITROZOMOCZNIKIEM NA SKŁAD LIPIDÓW MIELINY W MOZGU

Streszczenie

Dorosłym szczurom rasy BD IX podawano metylonitrozomocznik w dawce 60 mg/kg wagi ciała przez 6 kolejnych dni. Skład lipidów mieliny badano po 2, 3, 4, 6, 8 i 12 tygodniach od dnia ostatniego wstrzyknięcia metylonitrozomocznika.

Przeprowadzone badania doprowadziły do następujących wniosków: 1. U części zwierząt stwierdza się w istocie białej mózgu i mózdzku zmiany gąbczaste. 2. Frakcja mielinowa mózgu wykazuje w pierwszych 3 miesiącach po zatruciu obniżenie zawartości sfingomielin oraz zwiększenie zawartości estrów cholesterolu. 3. We wczesnym okresie po zatruciu (2 tygodnie po zakończeniu podawania metylonitrozomocznika) występuje spadek zawartości w mielinie frakcji zawierającej fosfatydył seryny i fosfoinozytol. 4. Zatrucie metylonitrozomocznikiem powoduje u dorosłych szczurów zaburzenia metabolizmu lipidów struktur błoniastych tkanki nerwowej.

М. Вендер, З. Адамчевска-Гонцежевич, О. Мулярек, Я. Панкрац, Я. Сендзик

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МИЕЛИНА МОЗГА

Резюме

Взрослым крысам расы BD IX давали метилнитрозомочевину в дозе 60 мг/кг веса тела в течение 6 очередных дней. Липидный состав миеллина исследовали через 2, 3, 4, 6, 8 и 12 недель после последнего введения метилнитрозомочевины.

Проведенные исследования привели к следующим выводам:

1. У части животных обнаруживаются губчатые изменения в белом веществе мозга и мозжечка;
2. Миелиновая фракция мозга в первые три месяца после отравления обнаруживает снижение содержания сфингомиелина, а также повышение содержания эфиров холестерина;
3. В ранний период после отравления (две недели после окончания дачи метилнитрозомочевины) имеет место снижение содержания в миелине фракции, содержащей фосфатидилсерин и фосфоинозитол;
4. Отравление метилнитрозомочевинной у взрослых крыс нарушает липидный метаболизм мембранных структур нервной ткани.

REFERENCES

1. Bartlett C.: Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 466—468.
2. Druckrey H., Ivankovic S., Preussmann R.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-methyl-N-nitrosos-harnstoff. *Z. Krebsforsch.* 1965, 66, 389—394.
3. Eto Y., Suzuki K.: Cholesterol esters metabolism in rat brain. A cholesterol ester hydrolase specifically localized in the myelin sheath. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 1986—1991.
4. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
5. Kleihues P., Magee P.: Alkylation of rat brain nucleic acids by N-methyl-N-nitrosourea and methyl methanosulfonate. *J. Neurochem.* 1973, 20, 595—606.
6. Kirsch W., Grossi-Paoletti E., Paoletti P. (Eds.): *The experimental biology of brain tumors.* Springfield-Illinois, Ch. Thomas, 1972.
7. Kroh H.: Ethylnitrosourea-induced microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. *Current Topics in Neuropathology. Selected papers 4th Danube Symposium on Neuropathology.* Ed.: K. Jellinger, Facultas Verlag Wien, 1973, 29—35.
8. Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Preliminary report. *Neuropat. Pol.* 1976a, 14, 115—119.
9. Kroh H.: Multiple demyelinating foci induced with ethylnitrosourea (ENU) in mouse brain. *International Symposium on: „Chemical brain injuries and brain tumors”,* Warsaw, 1976b, p. 21.
10. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 1973, 21, 749—757.
11. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determinations of cerebroside. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, 789—796.
12. Singh M., Spritz N., Geyer B.: Studies of brain myelin in the „quaking mouse”. *J. Lipid, Res.*, 1971, 12, 473—481.
13. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
14. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.* 1964, 11, 839—859.
15. Viale G.: Nucleic acid composition and metabolism in brain tumors. In: *Experimental biology of brain tumors* (Eds. Kirsch, W., Grossi-Paoletti, E., Paoletti, P.), Springfield-Illinois, Ch. Thomas, 1972, pp. 357—403.

16. Wender M., Adamczewska Z.: Lipidveränderungen im Gehirn bei Krankheiten, die mit Myelinschädigung verbunden sind. In: Neue Forschungsergebnisse des Hirnstoffwechsels und der Entmarkungsenzephalomyelitis, (Verf. Schmidt, R.), Halle-Wittenberg, 1974, 248—255.
17. Wollemann M.: Biochemistry of brain tumors, Akademiai Kiadó, Budapest, 1974.

Authors address: Department of Neurology, Academy of Medicine, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

MIECZYŚLAW WENDER, BOŻENA ZGORZALEWICZ, JAN SĘDZIK,
OLGA MULAREK, DANUTA TALKOWSKA

MYELIN PROTEINS IN EXPERIMENTAL INTOXICATION WITH METHYLNITROSOUREA

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań, Poland
Head: Prof. M. Wender

Methylnitrosourea (MNU), when applied *in vivo* is metabolized into derivatives which are capable of methylating various chemical constituents of the cell. Methylation of nucleic acids, which has been shown in various organs following administration of MNU is of particular interest in this respect.

The observed inhibition of protein synthesis (Kleihues and Magee, 1973) seemed to be causatively related to the methylating effect of MNU on nucleic acids. However, nothing is known so far about the effect of this compound on proteins of the central nervous system, especially on proteins of membrane structures, in particular on those of the myelin sheaths.

The observations made by Kroh (1973, 1976 a, b) that application of alkylnitrosoureas brings about demyelination in the brains of experimental mice prompted us to investigate the effect of MNU on the composition of myelin proteins. The elucidation of this question could obviously contribute to the cognition of the pathomechanism of action of MNU on the nervous system.

MATERIAL AND METHODS

MNU was applied intravenously to adult BD IX rats, at a dose of 60 mg/kg of body weight for six consecutive days. The experimental rats were sacrificed by decapitation at various intervals following the last injection of MNU (2, 3, 4, 6, 8 and 12 weeks).

Biochemical methods. The myelin fraction was isolated from the forebrain homogenates by means of discontinuous sucrose gradient centri-

*) This investigation was supported by the Polish Academy of Sciences, 10.4.2.02.3.3.

fugation (0.32 and 0.85 M sucrose solution, at pH 7.0). Centrifugation was performed in a swingout head, essentially as described by Norton and Poduslo (1973). The myelin fraction was washed three times with distilled water, each time followed by centrifugation at $75\,000 \times g$ for 20 minutes. The total protein content of the myelin fraction was determined using the method of Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as the standard protein.

Polyacrylamide gel electrophoresis. The myelin proteins were extracted with 2 ml/mg of myelin proteins of 0.4% sodium dodecylsulfate (SDS) in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). The protein extract was separated from the insoluble residue by means of centrifugation at $150\,000 \times g$ and then subjected to electrophoretic separation on a 12% polyacrylamide gel, prepared according to Waehneltd and Mandel (1972).

The gels were prepared immediately before use, by mixing at the below given proportions the following water solutions — containing in the vol. of 100 ml:

- A) 48 ml of 1N HCl, 36.6 g of Tris, 0.46 ml of N, N, N', N', tetramethylenediamine,
- B) 0.8 g of SDS,
- C) 48 g of acrylamide, 1.28 g of N, N' methylen-bis-acrylamide and 15 mg of $K_3[Fe(CN)_6]$,
- D) 140 mg of ammonium persulfate.

The electrophoretic glass tubes (5 mm diameter and 130 mm in length) were filled with a mixture of solutions A:B:C:D=1:1:2:4. A layer of buffer solution containing A:B:H₂O=1:1:6 was put on top of the gel. Polymerization was continued for 1 hr. The columns were loaded with 0.1 ml of the myelin protein extract equivalent to 30—50 μ g of protein.

The electrophoretic separation was run for 6 hrs at room temperature, the current intensity gradient ranging from 0.1—2.0 mA/per gel column. The buffer on the anodic side, being composed of 6.05 g of Tris and 25 ml of 1N HCl, and on the cathodic side, containing 3.16 g Tris, 1.97 g glycine and 0.5 g of SDS in 500 ml of H₂O.

The gels were stained with coomassie brilliant blue R 250 solution, made up of 2.5 g of the dye, 450 ml of methanol, 450 ml of H₂O and 90 ml of glacial acetic acid, according to Agrawal et al. (1972). The gels were rinsed with 7% acetic acid and 45% methanol alternatively.

The electrophoretically separated myelin protein fractions were quantitated by means of densitometry at 600 nm (Zeiss, Jena — GDR densitometer), and expressed as relative percentages.

Identification of the individual protein components were based on criteria described previously (Zgorzalewicz et al., 1974). The following

myelin proteins were evaluated: the small component of basic protein (SBP), the large component of basic protein (LBP), Agrawal protein (AP), the proteolipid Folch-Lees (PLP), the Wolfgram protein (WP) and the protein of higher molecular weight than the Wolfgram protein as HMW (Benjamins et al., 1976).

Histological techniques. Frozen brain sections were stained with the method of Spielmeyer, with H + E, and with Sudan III. Sections embedded in celoidine were stained with the method of Woelcke, Nissl and with H+E, and those embedded in paraffin with the techniques of Kanzler, Nissl and Klüver-Barrera.

RESULTS

The clinical and histopathological symptoms observed in the experimental animals were as described previously (Wender et al., 1977). The occurrence of spongy changes in the cerebral white matter and in the

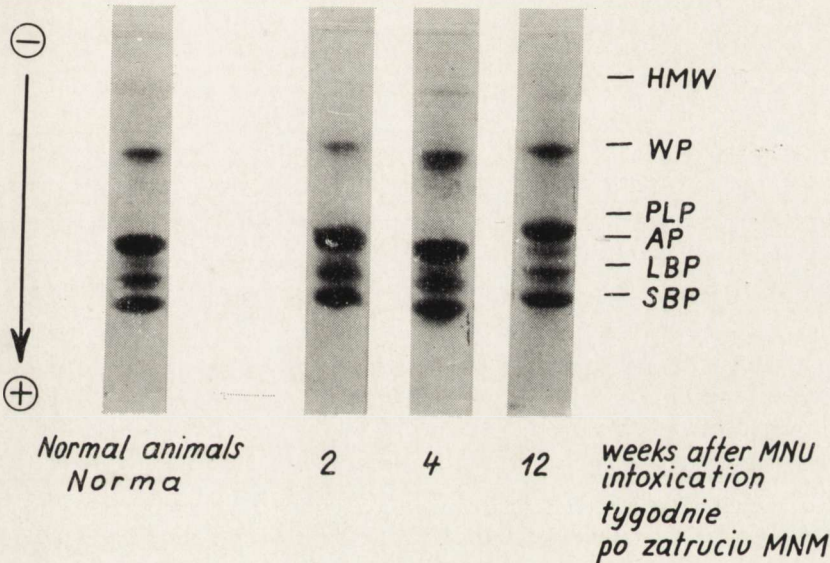


Fig. 1. Electrophoretic pattern of rabbit myelin proteins in methylnitrosourea (MNU) intoxication. Polyacrylamide gels stained with comassie blue. The myelin proteins symbolized as follows: HMW-high molecular weight protein, WP-Wofgram protein, PLP-proteolipid Folch-Lees, AP-Agrawal protein, LBP-large component of basic protein, SBP-small component of basic protein.

Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny białek mieliny królika w zatruciu metylonitrozomocznikiem (MNM). Żele poliakrylamidowe barwiono błękitem kumasyny. Oznakowanie białek mieliny: HMW-białko o wysokim c.mol., WP-białko Wolfgrama, PLP-proteolipid Folch-Lees, AP-białko Agrawala, LBP-białko zasadowe o wyższym c. mol., SBP-białko zasadowe o niższym c.mol.

cerebellum of many animals intoxicated with MNU should be mentioned as the most outstanding pathological feature.

Biochemical findings. The electrophoretic pattern of myelin proteins from animals sacrificed at various time intervals (from 2—12 weeks) following MNU administration remained essentially unchanged, the apparent deviations not exceeding the dispersion of control values (Fig. 1). The protein composition of cerebral myelin in control and MNU-intoxicated rats is presented in Table 1.

The myelin fractions, from both control and experimental animals contained the high molecular weight protein component (HMW), which according to Waehneltd and Mandel (1972), like the Wolfgram protein, are not necessarily genuine myelin proteins, since during various purification procedures, the content of these proteins used to become significantly reduced. However, Benjamin et al. (1973, 1976), who investigated the protein patterns of myelin preparations obtained with different methods presented ample arguments speaking in favour of the assumption that the high molecular protein is a true myelin component.

DISCUSSION

Investigations of the biological effects of alkylnitrosourea derivatives were concerned mainly with their direct or indirect carcinogenic action, and were in the majority restricted to the nervous system. Kleihues and Magee (1973) have shown, that intraperitoneal application of MNU at a dose of 100 mg/kg of body weight inhibited protein synthesis in the liver and brain of the experimental animals. This inhibition was accompanied by a considerable disaggregation of liver polyribosomes and distinct increase in the number of ribosomal monomers and subunits. This very effect, however, was not observed in the adult rat brain, but it was demonstrable in the suckling rat brain, though less pronounced than in the liver. Kleihues and Magee (1973) were inclined to interpret the alterations in the polyribosomal profile as a reflection of the inhibitory effect of MNU on protein biosynthesis rather than in terms of undue methylation of ribosomal RNA.

The assumed inhibition of protein synthesis (Kleihues and Magee, 1973) along with demyelination reported by Kroh (1973, 1976 a, b) as resulting from intoxication of experimental mice with alkylderivatives of nitrosourea seemed to substantiate our interest in the myelin protein pattern following MNU treatment. Furthermore, many other pathological conditions leading to myelin decomposition have been shown to be accompanied by considerably reduced contents of myelin basic proteins (Gerstl et al., 1970, Althaus et al., 1973, Palo et al., 1973).

Table 1. Protein composition of brain myelin in experimental MNU intoxication (in % of total proteins)

Tabela 1. Skład białek mieliny w encefalopatii wywołanej zatruciem metylnitrozomocznikiem (w procentach całości białek)

Myelin protein fraction Frakcja białkowa mieliny	Normal animals Norma	Time after intoxication Czas po zatruciu				
		2 weeks 2 tygodnie	4 weeks 4 tygodnie	6 weeks 6 tygodni	8 weeks 8 tygodni	12 weeks 12 tygodni
Small component of basic protein (SBP) Białko zasadowe o niższym c. mol. (SBP)	22.0±3.0	21.7±0.9	26.2±1.3	25.0±1.3	21.2±1.0	21.7±1.7
Large component of basic protein (LBP) Białko zasadowe o wyższym c. mol. (LBP)	14.7±2.4	17.4±0.9	15.6±0.4	15.5±0.7	14.2±0.9	15.8±1.0
Agrawal protein (AP) Białko Agrawala (AP)	8.4±1.2	8.4±0.4	8.1±1.4	6.8±0.4	7.0±0.4	7.1±0.6
Folch-Lees proteolipid (PLP) Proteolipid Folch-Lees (PLP)	30.2±3.7	30.7±2.5	37.0±4.4	33.5±0.8	32.1±1.1	31.9±0.8
Wolfgram protein (WP) Białko Wolfgrama (WP)	19.3±1.1	16.7±2.1	13.1±3.1	14.4±2.6	19.0±2.0	18.6±1.0
High molecular weight protein (HMW) Białko o wysokim c. mol. (HMW)	5.4±0.2	5.1±0.5	0	4.8±0.4	6.5±0.5	4.9±0.4

Values are expressed as the mean ± standard error

Średnia ± średni błąd średniej

Number of estimation in each group: 6

Liczba oznaczeń w każdej grupie: 6

However, the investigations of myelin proteins in MNU treated rats did not show any apparent deviations in the electrophoretic myelin protein pattern. In our previous study (Wender et al., 1977) we have shown that intoxication with MNU of adult rats brings about considerable changes in the lipid composition of the affected myelin membranes. It thus would appear that out of the two basic structural components of myelin membranes i.e. proteins and lipids, MNU affects evidently only the lipid metabolism.

M. Wender B. Zgorzalewicz, J. Sędzik, O. Mularek, D. Talkowska

BIAŁKA MIELINY W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU
METYLONITROZOMOCZNIKIEM

Streszczenie

Wykonano badania wpływu zatrucia dorosłych szczurów rasy BD IX metylonitrozomocznikiem w dawce 60 mg na kg wagi ciała na skład białek mieliny mózgu, określony drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Zwierzęta doświadczalne badano w okresie od 2 do 12 tygodni po zatruciu.

Przeprowadzone badania w zestawieniu z poprzednimi naszymi obserwacjami dotyczącymi lipidów mieliny doprowadziły do następujących wniosków: 1. Zatrucie dorosłych szczurów rasy BD IX metylonitrozomocznikiem nie wywołuje zmian w składzie białkowym mieliny. 2. Spośród dwóch podstawowych składników strukturalnych błon mielinowych, to jest białek i lipidów, metylonitrozomocznik zaburza w uchwytym stopniu tylko metabolizm lipidów.

М. Вендер, Б. Згожалевич, Я. Сендзик, О. Мулярек, Д. Тальковска

БЕЛКИ МИЕЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ
МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ

Резюме

Исследовали влияние отравления взрослых крыс расы BD IX метилнитрозомочевинной в дозе 60 мг на 1 кг веса тела на состав белков миеллина мозга, определенный путем электрофореза на полиакриламидном геле. Опытных животных исследовали в период от 2 до 12 недель после отравления.

Проведенные исследования в сопоставлении с предыдущими нашими наблюдениями, касающимися липидов миеллина, привели к следующим выводам: 1. Отравление взрослых крыс расы BD IX метилнитрозомочевинной не вызывает изменений в белковом составе миеллина. 2. Из двух основных структурных компонентов миелиновых мембран, т.е. белков и липидов, метилнитрозомочевина заметно нарушает только метаболизм липидов.

REFERENCES

1. Althaus M., Pilz N.: The protein composition of myelin in multiple sclerosis and orthochromatic leucodystrophy. *Z. Neurol.* 1973, 205, 229—241.
2. Benjamins J., Gray M., Morell P.: Metabolic relationship between myelin subfractions: entry of proteins. *J. Neurochem.* 1976, 27, 571—575.
3. Benjamins J., Miller K., McKhann G.: Myelin subfractions in developing rat brain: characterization and sulphatide metabolism. *J. Neurochem.* 1973, 20, 1589—1603.
4. Gerstl B., Eng Z., Tavastjerna M., Smith J., Kruse S.: Lipids and proteins in multiple sclerosis white matter. *J. Neurochem.* 1970, 17, 677—690.
5. Kleihues P., Magee P.: Inhibition of protein synthesis by n-methyl-n-nitrosourea in vivo. *Biochem. J.* 1973, 136, 303—309.

6. Kroh H.: Ethylnitrosoarea-induced microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. *Current Topics in Neuropathology. Selected papers 4th Danube Symposium on Neuropathology.* Ed.: K. Jellinger, Facultas Verlag Wien, 1973, 29—35.
7. Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosoarea (ENU). Preiminary report. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 115—119.
8. Kroh H.: Multiple demyelinating foci induced with ethylnitrosoarea (ENU) in mouse brain. *International Symposium on: „Chemical brain injuries and brain tumors”*, Warsaw, 1976, p. 21.
9. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—275.
10. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 1973, 21, 749—757.
11. Palo J., Savolainen H., Kivalo E.: Comparison between the proteins of human brain myelin in subacute sclerosing panencephalitis, amyotrophic lateral sclerosis and malignant diseases. *J. Neurol. Sci.* 1973, 18, 175—181.
12. Waehneltd T., Mandel P.: Isolation of rat brain myelin, monitored by polyacrylamide gel electrophoresis of dodecyl sulfate-extracted proteins. *Brain Res.* 1972, 40, 419—436.
13. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Mularek O., Pankrac J., Sędzik J.: The effect of experimental intoxication with methylnitrosoarea on the lipid composition of rat cerebral myelin. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 219—230.
14. Zgorzalewicz B., Neuhoff V., Waehneltd T.: Rat myelin proteins. Compositional changes in various regions of the nervous system during ontogenetic development. *Neurobiology* 1974, 4, 264—276.

Authors address: Department of Neurology, Academy of Medicine, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

MIROSLAW B. KOZIK, JOZEF SZCZECH, EUGENIUSZ SOSIŃSKI

ZMIANY HISTOENZYMATYCZNE W MÓZGU W PRZEBIEGU
DOŚWIADCZALNEJ INTOKSYKACJI KALOMELEM*)

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
AM w Poznaniu
Kierownik: doc. dr M. B. Kozik

Zarówno w ostrych jak i przewlekłych zatruciach rtęcią podkreśla się znaczne lub nawet dominujące zmiany patologiczne w układzie nerwowym w porównaniu ze zmianami w innych narządach (Weber, 1972; Chang i wsp., 1973). Toksyczne działanie tego pierwiastka na układ nerwowy zależy w znacznym stopniu od jego postaci i połączeń organicznych lub nieorganicznych (Steinwall i Olsson, 1969; Pierce i wsp., 1972; Dhar, 1973). Przyjmuje się zazwyczaj, że związki rtęci łatwo rozpuszczalne w wodzie są bardziej toksyczne niż połączenia trudno rozpuszczalne (Schilling-Siengalewicz, 1952; Dadlez, 1954; Moeschlin, 1960). Z tych względów kalomel jako trudno rozpuszczalny związek rtęci był uznawany przez szereg lat za mało toksyczny i stosowany w leczeniu robaczyc (Dadlez, 1954; Moeschlin, 1960). Spotykana w przebiegu stosowania chlorku rtęciowego tzw. choroba kalomelowa (Franconi cyt. wg Moeschlina, 1960) lub nerwica Feera (cyt. wg Moeschlina, 1960) były traktowane jako wynik osobniczej nadwrażliwości na ten preparat.

W badaniach doświadczalnych na szczurach zaobserwowano jednak, że kilkakrotne dożołądkowe wprowadzenie kalomelu prowadzi do rozległych zaburzeń aktywności enzymatycznej w całym rdzeniu kręgowym (Kozik i Wyglądalska, 1976). W tym świetle zrozumiące zainteresowanie budzi prześledzenie zmian histoenzymatycznych w mózgu po wprowadzeniu toksycznych dawek kalomelu do przewodu pokarmowego. Opracowanie tego zagadnienia wydaje się tym bardziej celowe, że w dostępnym piśmiennictwie takich opracowań nie znaleziono (Voigt i Adebahr, 1963; Anderson, 1966; Timm i wsp., 1966; Chang i wsp., 1972; Mukai, 1972).

*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4.2.02.

MATERIAŁ I METODY

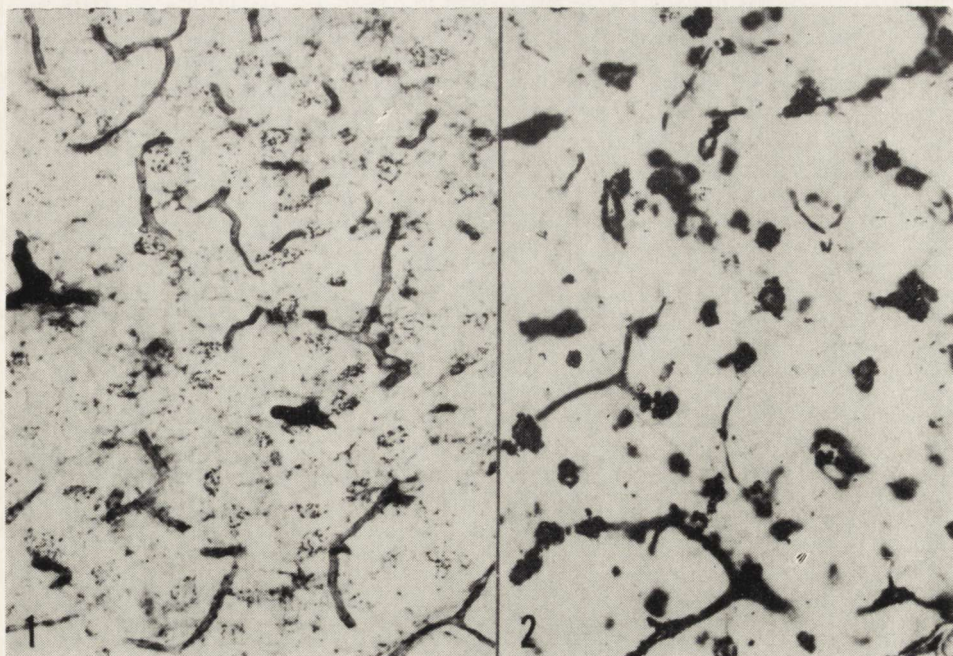
Badania przeprowadzono na 31 dojrzałych szczurach szczepu Wistar, samicach i samcach, o ciężarze ciała od 150 do 200 g, które podzielono na dwie grupy doświadczalne: pierwsza grupa obejmująca 12 zwierząt otrzymywała kalomel w 5% roztworze wodnym podawany przy pomocy odpowiedniej kaniuli dożołądkowej w dawce jednorazowej 0,05 g przez 4 kolejne dni, natomiast drugiej grupie liczącej 13 szczurów podawano tym samym sposobem kalomel w 1,2% roztworze wodnym przez 10 dni stosując dawkę jednorazową równą 0,012 g. Grupę kontrolną stanowiło 6 szczurów prawidłowych. Po przeprowadzeniu doświadczenia szczury obu grup. eksperymentalnych oraz zwierzęta kontrolne uśmiercano w narkozie eterowej i wyjmowano mózgowie do badań histoenzymatycznych. Pobrany materiał utrwalano przez 16 godz. w płynie Bakera w temp. 4°C, a następnie cięto skrawki na mikrotomie do zamrażania. Wolnopływające skrawki poddawano reakcji histochemicznej dla wykazania aktywności następujących hydrolaz: tiaminowej pyrofosfatazy — (EL. 2.5.1.3.*) według metody Novikoff'a i Goldfischer'a (1961), inkubacja w temp. pokojowej, przez 30 min.; esterazy niespecyficznej — (EL. 3.1.1.) wg metody Nachlas'a i Seligmann'a (1949), inkubacja w temp. 37°C, przez 15 min.; acetylocholinesterazy — (EL. 3.1.1.7.) wg metody Gerebtzoff'a (1953); inkubacja w temp. 37°C, przez 120 min.; butyrylotiocholinesterazy — (EL. 3.1.1.8.) wg metody Gerebtzoff'a (1953), inkubacja w temp. 37°C, przez 180 min.; fosfatazy zasadowej — (EL. 3.1.3.1.) wg metody Gomoriego, inkubacja w temp. 37°C przez 30 min.; fosfatazy kwaśnej — (EL. 3.1.3.2.) wg metody Gomoriego, inkubacja w temp. 37°C, przez 50 min.; adenozynotrójfosfatazy — (EL. 3.6.1.3.) wg metody Wachstein'a i Meisel'a (1957), inkubacja w temp. 37°C, przez 45 min.

WYNIKI

Tiaminowa pyrofosfataza (TPPaza)

Grupa kontrolna. Aktywność TPPazy w warunkach prawidłowych jest widoczna głównie w ścianach naczyń krwionośnych oraz w cytoplazmie neuronów w postaci ziaren i blaszek wyznaczających aparat Golgiego (ryc. 1). Stopień aktywności TPPazy zwykle jest większy w dużych komórkach piramidowych w porównaniu z neuronami ziarnistymi. Szczególnie wysoką aktywność TPPazy przejawiają niektóre neurony podwzgórza oraz komórki ruchowe jąder nerwów czaszkowych w moście i rdzeniu przedłużonym. W mózdzku natomiast umiarkowaną aktyw-

*) EL. — numer listy enzymów (Florin i Stotz, 1973).



Ryc. 1. Aktywność TPPazy w aparacie Golgiego komórek nerwowych i w ścianach naczyń włosowatych kory mózgu. Grupa kontrolna. Pow. 140 \times .

Fig. 1. Activity of TPPase in Golgi apparatus of neurons and in the walls of capillaries in cerebral cortex. Control group. \times 140.

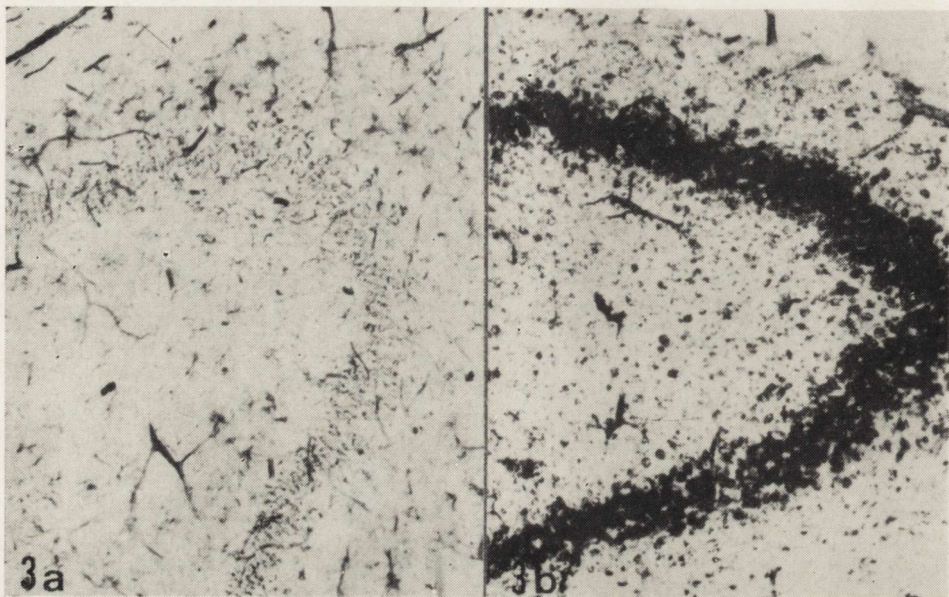
Ryc. 2. Silny wzrost aktywności TPPazy w komórkach nerwowych i w naczyniach kory mózgu. I grupa doświadczalna. Pow. 140 \times .

Fig. 2. Strong increase of TPPase activity in nerve cells and in the vessels of cerebral cortex. \times 140.

ność tego enzymu wykazują komórki Purkiniego i pojedyncze komórki warstwy drobinowej. W stanach prawidłowych na ogół nie występuje odczyn enzymatyczny dla TPPazy zarówno w neurogleju jak i w mezo-
gleju. U pojedynczych szczurów niekiedy udaje się zaobserwować słabą aktywność TPPazy w niektórych astrocytach protoplazmatycznych.

I grupa doświadczalna. Po czterokrotnym podaniu kalomelu wszystkie neurocyty zarówno kory jak i zwojów podstawy charakteryzują się znacznym wzrostem aktywności TPPazy (ryc. 2). Odczyn dla tego enzymu pojawia się również w wielu astrocytach istoty białej i miejscami w oligodendrogleju. W mózdzku wzrasta aktywność TPPazy w komórkach Purkiniego i pojawia się wyraźny odczyn w warstwie ziarnistej i drobinowej. Również w obrębie mostu i rdzenia przedłużonego obserwuje się wzrost aktywności omawianego enzymu w neurocytach i pojawienie się wyraźnego odczynu w astrogleju.

II grupa doświadczalna. W wyniku dłuższego stosowania kalomelu wzrost aktywności TPPazy występuje w stopniu nieco mniejszym niż w pierwszej grupie doświadczalnej. W tych warunkach zwraca przede wszystkim uwagę silna aktywność TPPazy w korze amonalnej (ryc. 3a i b) oraz pojawienie się odczynu w oligodendrogleju spoidła



Ryc. 3a. Aktywność TPPazy w komórkach piramidowych rogu Amona. Grupa kontrolna. Pow. 80 \times .

Fig. 3a. Activity of TPPase in pyramidal cells of Ammon's horn. Control group. \times 80.

Ryc. 3b. Silny wzrost aktywności TPPazy w komórkach nerwowych pola H₂ rogu Amona. II grupa doświadczalna. Pow. 180 \times .

Fig. 3b. Strong increase of TPPase activity in neurons of H₂ sector of Ammon's horn. II experimental group. \times 180.

wielkiego i sklepienia. Ponadto spotyka się występowanie umiarkowanej aktywności TPPazy w astrocytach protoplazmatycznych, szczególnie w ich przynaczyniowych wypustkach. W mózdku obserwuje się wzrost aktywności TPPazy w komórkach Purkiniego i pojawienie się odczynu enzymatycznego w warstwie ziarnistej.

Niespecyficzna esteraza (NsE).

Grupa kontrolna. W korze mózgu wyraźna aktywność NsE jest widoczna w dużych komórkach piramidowych i częściowo w neuropilu. Silna aktywność tego enzymu występuje w fibrocytach opon miękkich,

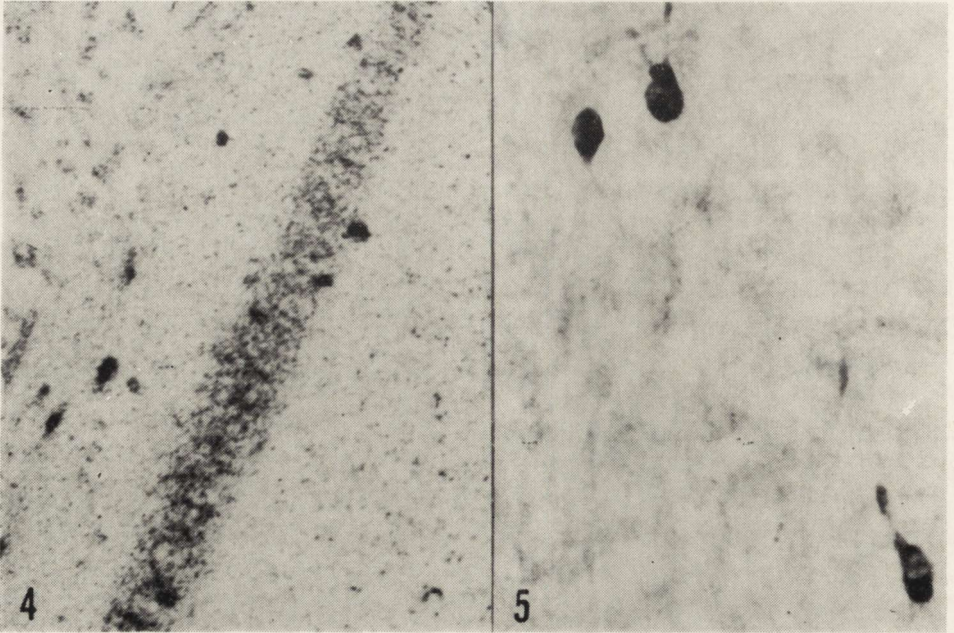
splotach naczyńniastych oraz w pericytach. W zwojach podstawy wyraźny odczyn enzymatyczny można zaobserwować tylko w dużych komórkach nerwowych, szczególnie w obrębie grzbietowej części jądra bocznego wzgórza. W korze amonalnej umiarkowaną aktywność przejawiają komórki piramidowe i neurocyty opaski zębatej. Wyraźną aktywność NsE widać też w komórkach Purkinjego i znacznie słabszą w warstwie ziarnistej kory mózdzku. W moście natomiast bardzo silną aktywność wykazują komórki nerwowe jądra n. V, VII i VIII oraz neurocyty jąder brzusznych mostu.

I grupa doświadczalna. W ostrym zatruciu kalomelem obserwuje się niewielki wzrost aktywności NsE w komórkach piramidowych rogu Amona (ryc. 4). W pozostałych ugrupowaniach neuronalnych stopień aktywności enzymatycznej nie ulega zmianie w porównaniu z grupą kontrolną. Zwraca jednak uwagę pojawienie się wyraźnej aktywności NsE w oligodendrocytach spoidła wielkiego (ryc. 4), sklepienia, istoty białej mózdzku i dróg piramidowych w moście oraz rdzeniu przedłużonym.

II grupa doświadczalna. Podostre zatrucie chlorkiem rtęciowym nie powoduje większych zmian aktywności NsE w porównaniu z pierwszą grupą. Wzrost odczynu enzymatycznego w komórkach nerwowych jest widoczny tylko w obrębie rogu Amona. Stopień wzrostu aktywności NsE w tej okolicy jest jednak nieco mniejszy niż w pierwszej grupie. Słaba aktywność NsE pojawia się także w oligodendrogleju spoidła wielkiego i dróg piramidowych. Zjawiska tego jednak nie obserwuje się w istocie białej mózdzku.

Acetylocholinesteraza (AChE).

Grupa kontrolna. Aktywność AChE w korze mózgowej występuje głównie w ścianach naczyń włosowatych oraz w pojedynczych dużych neurocytach tzw. hyperaktywnych (ryc. 5). W zakręcie obręczy odczyn enzymatyczny widoczny jest ponadto w neuropilu kory z wyjątkiem warstwy IV. W rogu Amona wyraźną aktywność AChE wykazują tylko dendryty komórek piramidowych i opaski zębatej, podczas gdy ciała neuronów pozbawione są tej właściwości. W zwojach podstawy zwraca uwagę znaczne zróżnicowanie nasilenia aktywności AChE w poszczególnych jądrach. W niektórych ugrupowaniach neuronalnych odczyn enzymatyczny występuje tylko w perikarionie (ryc. 6), w innych zarówno w perikarionie i neuropilu lub tylko w neuropilu. W korze mózdzku słaby odczyn dla AChE widoczny jest jedynie w zakończeniach włókien nerwowych w obrębie II warstwy. W moście i rdzeniu przedłużonym silną aktywność AChE wykazują neurocyty jąder nerwów czaszkowych.



Ryc. 4. Wyraźna aktywność NsE w komórkach piramidowych rogu Amona oraz w oligodendrogleju spoidła wielkiego. I grupa doświadczalna. Pow. 110 \times .

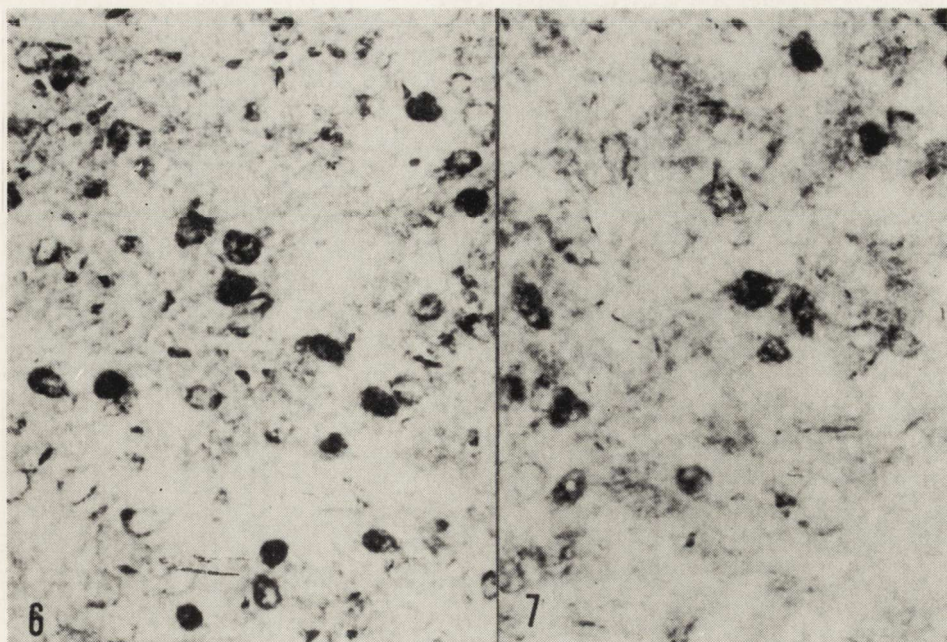
Fig. 4. Distinct activity of nonspecific esterase in pyramidal cells of Ammon's horn and in the oligodendroglial cells of corpus callosum. I experimental group. \times 110.

Ryc. 5. Bardzo silna aktywność AChE w pojedynczych neurocytach w korze mózgu. Grupa kontrolna. Pow. 180 \times .

Fig. 5. Very strong AChE activity in individual neurons in cerebral cortex. Control group. \times 180.

I grupa doświadczalna. Ostre zatrucie kalomelem prowadzi do spadku aktywności AChE w neuropilu i neurocytach jąder wzgórza wzrokowego (ryc. 7) i kory amonalnej. W korze mózgu zmniejsza się w tych warunkach liczba komórek hyperaktywnych. Znacznie natomiast słabsza jest aktywność AChE w neurocytach mostu i rdzenia przedłużonego. Zanika tu odczyn enzymatyczny w neuropilu przy równoczesnym osłabieniu aktywności AChE w perikarionie. Zjawisko to jest szczególnie nasilone w jądrach ruchowych tej okolicy. W obrębie mózdzku nie obserwuje się zmian aktywności AChE w porównaniu z grupą kontrolną.

II grupa doświadczalna. Zmiany odczynu enzymatycznego po 10 dniach stosowania kalomelu są mniejsze niż po czterodniowej intoksykacji. Zwraca jedynie uwagę nieco słabsza aktywność AChE w neurocytach wzgórza wzrokowego i nieznaczny spadek aktywności enzymatycznej w dendrytach pola h_1 kory amonalnej. W pozostałych zwojach podstawy aktywność AChE jest zbliżona do stanu prawidłowego. Niewielki spadek aktywności AChE obserwuje się także w moście i rdzeniu



Ryc. 6. Część grzbietowa jądra przyśrodkowego wzgórza wzrokowego. Silna aktywność AChE w cytoplazmie neuronów i słaby odczyn w neuropilu. Grupa kontrolna. Pow. 140 ×.

Fig. 6. Dorsal part of nucleus medialis thalami optici. Strong activity of AChE in the cytoplasm of nerve cells and weak reaction in neuropil. Control group. × 140.

Ryc. 7. Część grzbietowa jądra przyśrodkowego wzgórza wzrokowego. Wyraźny spadek aktywności AChE w komórkach nerwowych. I grupa doświadczalna. Pow. 140 ×.

Fig. 7. Dorsal part of nucleus medialis thalami optici. Significant decrease of AChE activity in nerve cells. I experimental group. × 140.

przedłużonym, natomiast w mózdzku 10-dniowe zatrucie kalomelem nie prowadzi do zmian aktywności AChE w porównaniu z grupą kontrolną.

Butyrylotiocholinesteraza (BuTJ).

Grupa kontrolna. W korze mózgu i mózdzku oraz w istocie białej aktywność BuTJ jest widoczna tylko w ścianach naczyń krwionośnych. W części grzbietowej jądra przyśrodkowego i bocznego wzgórza wzrokowego odczyn badanego enzymu występuje również w wielu neuronach.

I i II grupa doświadczalna. Zarówno ostre jak i podostre zatrucie kalomelem nie prowadzi do uchwytanych zmian w aktywności

BuTJ. W pojedynczych przypadkach można zaobserwować pojawienie się lekkiego dyfuzyjnego odczynu w neuropilu II warstwy kory mózdzku. Reakcja ta nie występuje jednak u wszystkich badanych zwierząt.

Fosfataza zasadowa (FZ)

Grupa kontrolna. Słabą dyfuzyjną aktywność FZ u szczurów prawidłowych obserwuje się w komórkach piramidowych rogu Amona, komórkach Purkiniego, w neurocytach części bocznej wężomózgowia (ryc. 8) oraz w jądrach n. V i VII. Poza tym słabą aktywność FZ wykazują naczynia włosowate w całym mózgowiu.

I i II grupa doświadczalna. Aktywność FZ oraz lokalizacja odczynu enzymatycznego nie zmieniają się po zatruciu kalomelem.

Ryc. 8. Dyfuzyjny odczyn FZ w neurocytach części bocznej wężomózgowia. Grupa kontrolna. Pow. 120 ×.

Fig. 8. Diffuse reaction for alkaline phosphatase activity in neurons of lateral part of rhinencephalon. Control group. × 120.

Ryc. 9. Kora mózgu. Wyraźna aktywność FK w komórkach nerwowych. Grupa kontrolna. Pow. 120 ×.

Fig. 9. Cerebral cortex. Significant activity of acid phosphatase in nerve cells. Control group. × 120.

Ryc. 10. Kora mózgu. Znaczny spadek aktywności FK w neurocytach. Zachowana aktywność enzymatyczna w pericytach. II grupa doświadczalna. Pow. 120 ×.

Fig. 10. Cerebral cortex. Marked decrease of acid phosphatase activity in neurons. Enzyme activity preserved in pericytes. II experimental group. × 120.

Ryc. 11. Wzgórze wzrokowe. Wyraźna aktywność ATPazy w ścianach naczyń krwionośnych i w przynaczyniowych wypustkach astrogli. Grupa kontrolna. Pow. 120 ×.

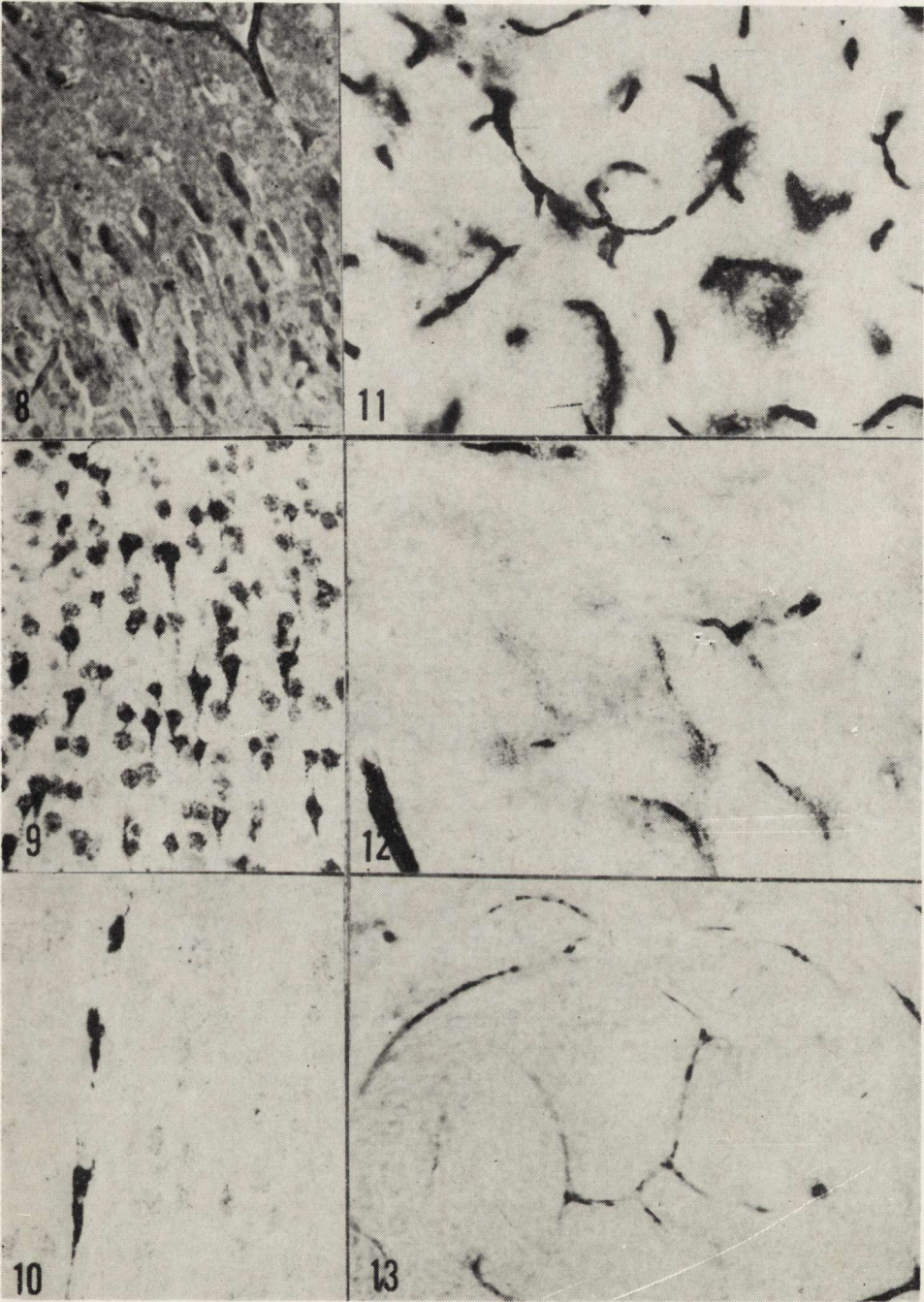
Fig. 11. Thalamus opticus. Significant activity of ATPase in blood vessel walls and in perivascular astroglial processes. Control group. × 120.

Ryc. 12. Wzgórze wzrokowe. Zanik aktywności ATPazy w naczyniach włosowatych i w przynaczyniowym astrogli. Odczyn enzymatyczny widoczny jedynie w ścianach większych naczyń krwionośnych. I grupa doświadczalna. Pow. 120 ×.

Fig. 12. Thalamus opticus. Loss of ATPase activity in capillaries and in perivascular astroglia. Enzymatic reaction visible only in the walls of larger blood vessels. I experimental group. × 120.

Ryc. 13. Płat skroniowy. Odcinkowy brak aktywności ATPazy w naczyniach włosowatych i przedwłosowatych. II grupa doświadczalna. Pow. 120 ×.

Fig. 13. Temporal lobe. Segmental loss of ATPase activity in capillaries and pre-capillaries. II experimental group. × 120.



Fosfataza kwaśna (FK)

Grupa kontrolna. W komórkach nerwowych kory mózgu i zwojów podstawy aktywność FK występuje w cytoplazmie w postaci różnej wielkości ziaren i nieregularnych złogów (ryc. 9). Aktywność wydaje się większa w dużych neuronach, szczególnie w komórkach piramidowych kory mózgu i rogu Amona, w porównaniu z małymi neurocytami. Ponadto słaby dyfuzyjny odczyn dla FK przejawiają pericyty i sploty naczyńniówkowe. W korze mózdzku wyraźną aktywność FK wykazują tylko komórki Purkinjego, natomiast warstwę ziarnistą i drobinową charakteryzuje słaby odczyn dyfuzyjny.

I grupa doświadczalna. Na pierwszy plan wysuwa się uogólniony spadek aktywności FK w neurocytach. Zjawisko to występuje szczególnie intensywnie w komórkach piramidowych rogu Amona oraz w zwojach podstawy. W tych ostatnich spotyka się obszary pozbawione zupełnie aktywności FK. Wydaje się również, że w splotach naczyńniówkowych aktywność FK jest mniejsza niż w grupie kontrolnej. Przy ogólnym spadku odczynu enzymatycznego w komórkach nerwowych, bardzo wyraźnie zaakcentowane są pericyty, w których aktywność FK po zatruciu kalomelem nie ulega zmianie.

W obrębie mózdzku zwraca uwagę znaczne osłabienie lub nawet często całkowity brak aktywności FK w komórkach Purkinjego. Zanika również aktywność FK w oligodendrocytach sklepienia.

II grupa doświadczalna. Cechą charakterystyczną podostrego zatrucia kalomelem jest również uogólniony spadek aktywności FK, jednak osłabienie odczynu enzymatycznego jest mniejsze niż w pierwszej grupie doświadczalnej. Osłabienie aktywności FK jest widoczne przede wszystkim w komórkach piramidowych kory mózgu (ryc. 10) i w dużych neuronach zwojów podstawy, szczególnie w obrębie skorupy i gałki bladej. Znaczne osłabienie aktywności FK ma miejsce również we wszystkich komórkach nerwowych płata skroniowego. W korze mózdzku występuje miejscami słaby odczyn w komórkach Purkinjego, natomiast w warstwie ziarnistej i drobinowej brak jakiegokolwiek reakcji enzymatycznej.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza)

Grupa kontrolna. Bardzo silna aktywność ATPazy widoczna jest przede wszystkim w splotach naczyńniówkowych. Wyraźną aktywność enzymatyczną przejawiają też wszystkie naczynia krwionośne zarówno w korze mózgu jak i w zwojach podstawy oraz w mózdzku. W ro-

gu Amona, przegrodzie przezroczystej i w zwojach podstawy obok aktywności ATPazy w naczyniach krwionośnych widać wyraźny dyfuzyjny odczyn w przynaczyniowych wypustkach astrocytów protoplazmatycznych (ryc. 11). Ponadto słaby dyfuzyjny odczyn enzymatyczny obserwuje się w jądrach wielu neurocytów podwzgórza i komórek Purkiniego.

I grupa doświadczalna. Podstawowym zjawiskiem obserwowanym w ostrym zatruciu kalomelem jest znaczne osłabienie lub nawet całkowity zanik aktywności ATPazy w ścianach wielu naczyń włosowatych. Proces ten jest szczególnie nasilony w korze płata skroniowego, w korze mózdzku, w dolnych warstwach pozostałych okolic mózgu, w spoidle wielkim, rogu Amona i wzgórzu wzrokowym (ryc. 12). Niekiedy obserwuje się zanik aktywności ATPazy tylko w pewnych odcinkach naczyń włosowatych lub przedwłosowatych, a w dalszym ich przebiegu odczyn enzymatyczny jest zachowany. Zanika również aktywność ATPazy w przynaczyniowych wypustkach astrocytów protoplazmatycznych.

II grupa doświadczalna. W wyniku 10-dniowego podawania kalomelu występuje również spadek aktywności ATPazy w ścianach naczyń krwionośnych, jednak stopień osłabienia odczynu i rozległość zmian są wyraźnie mniejsze. Aktywność ATPazy zanika głównie w naczyniach włosowatych płata skroniowego, kory mózdzku i spoidła wielkiego (ryc. 13). Natomiast w korze amonalnej i we wzgórzu wzrokowym nie obserwuje się żadnych zmian aktywności ATPazy. W wielu miejscach zwraca uwagę odcinkowy brak aktywności ATPazy w ścianie naczynia włosowatego (ryc. 13).

OMÓWIENIE

W przeprowadzonych badaniach na pierwszy plan wysuwa się zagadnienie spadku aktywności ATPazy, FK i AChE w przebiegu intoksykacji kalomelowej, przy równoczesnym wzroście aktywności TPPazy i częściowo NsE. Podobny charakter zmian enzymatycznych obserwowano również w rdzeniu kręgowym w wyniku podawania szczurom kalomelu (Kozik i Wyglądalska, 1976). Spadek aktywności ATPazy w ścianach naczyń krwionośnych występuje również w zatruciu sublimatem (Kozik i wsp., 1976). Zjawisko to naszym zdaniem jest wykładnikiem enzymatycznego uszkodzenia bariery naczyniowo-mózgowej w wyniku toksycznego działania związków rtęci na ośrodkowy układ nerwowy. Inni bowiem autorzy (Chang i Hartmann, 1972; Steinwall, 1970) wykazali, że zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne rtęci powodują uszkodzenie bariery naczyniowo-mózgowej.

We wcześniejszych badaniach własnych (Kozik i Wyglądalska, 1976) ustosunkowano się szczegółowo do zagadnienia zmian aktywności AChE i TPPazy w następstwie zatrucia szczurów chlorkiem rtęciowym. Wyłania się jednak pytanie, czy obserwowane zmiany aktywności histoenzymatycznej po zatruciu kalomelem są zjawiskiem pierwotnym czy wtórnym. W przyjętym modelu doświadczalnym wobec ogólnego zatrucia całego ustroju kalomelem udzielenie jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie nie jest łatwe. Wydaje się, że w rozważaniach tych pomocne mogą być badania Steinwall'a (1970), przeprowadzone na królikach. Autor ten drogą perfuzji przez tętnicę szyjną wewnętrzną wprowadzał do jednej półkuli roztwór sublimatu lub inny organiczny związek rtęci, a następnie badał przepuszczalność bariery naczyniowej i wbudowywanie glukozy oraz aminokwasów do tkanki nerwowej. W półkuli perfundowanej roztworem rtęci stwierdzono obniżone wbudowywanie cukrów i aminokwasów przy zwiększonej przepuszczalności bariery naczyniowej dla błękitu Evansa. Podobne wyniki uzyskano również przy stosowaniu innych związków rtęci (Steinwall i Olsson, 1969). Voigt i Adebahr (1963) oraz Chang i Hartmann (1972a) wykazali obecność rtęci w neurocytach w przebiegu doświadczalnej intoksykacji tym pierwiastkiem.

W świetle badań innych autorów (Voigt i Adebahr, 1963; Steinwall i Olsson, 1969; Chang i Hartman, 1972a) i własnych spostrzeżeń wydaje się, że kalomel (a być może też inne związki rtęci) powoduje bezpośrednie i pierwotne uszkodzenie bariery naczyniowo-mózgowej, a następnie wpływa na zmiany aktywności enzymatycznej w tkance nerwowej i glejowej. Zmiany enzymatyczne w mózgu mogą być spowodowane zarówno przenikaniem jonów rtęci do komórek nerwowych i glejowych przez uszkodzoną barierę jak i upośledzeniem transportu aminokwasów i węglowodanów. Ostateczne wyjaśnienie tego problemu wymaga dalszych, odpowiednio ukierunkowanych badań.

Oddzielnym i bardzo interesującym zagadnieniem jest spadek aktywności FK przy równoczesnym pojawieniu się w oligodendrogleju aktywności NsE. Organellami komórkowymi związanymi z aktywnością obu tych enzymów są lizosomy (Wachstein i wsp., 1961). Odmienny efekt obu reakcji histochemicznych może wskazywać, że w przebiegu intoksykacji kalomelowej nie dochodzi do uszkodzenia strukturalnego lizosomów. Być może kalomel lub jego metabolit działa w tych warunkach jako inhibitor FK i aktywator NsE. Rozumowanie takie nasuwa się wobec znanego aktywującego działania organicznych związków rtęci takich jak p-chlorobenzoesan rtęciowy lub octan fenylortęciowy na hydrolazy estrów kwasu octowego. Istnieje zatem możliwość, że wśród grupy badanych niespecyficznych esteraz ma miejsce uczynnienie acetyloesterazy (tzw. esterazy C). Spostrzeżenie to mogłoby ponadto wskazywać, że wprowadzony

do przewodu pokarmowego kalomel po wchłonięciu do krwiobiegu przechodzi w połączenie organiczne, ponieważ wśród aktywatorów hydrolazy estrów kwasu octowego nie wymienia się chlorku rtęciowego (Miętkiński i Malendowicz, 1967).

WNIOSKI

1. Doustne podawanie szczurom kalomelu prowadzi do spadku aktywności AChE, FK i ATPazy.

2. Zatrucie kalomelem powoduje wzrost aktywności TPPazy w neurocytach oraz pojawienie się odczynu dla tego enzymu w wielu komórkach neurogleju.

3. Doświadczalne zatrucie szczurów chlorkiem rtęciowym prowadzi do pojawienia się aktywności NsE w oligodendrocytach istoty białej.

4. Zmiany aktywności AChE, TPPazy, FK i ATPazy są większe po 4 dniach podawania kalomelu niż po 10-dniowej intoksykacji.

5. Aktywność FZ i BuTJ u szczurów nie ulega zmianie w przebiegu zatrucia chlorkiem rtęciowym.

6. Zmiany aktywności enzymatycznej w mózgu po zatruciu chlorkiem rtęciowym są następstwem pierwotnego uszkodzenia bariery naczyniowo-mózgowej.

М. Б. Козик, Я. Шчех, Е. Сосиньски

ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ КАЛОМЕЛЬЮ

Резюме

Проведены экспериментальные исследования токсического влияния каломели на ферментативную активность в мозге и мозжечке. Хлористую ртуть вводили крысам в желудок в течение 4 дней по 0,05 г или в течение 10 дней по 0,012 г. В результате проведенных исследований установлено значительное снижение активности ацетилхолинэстеразы, кислой фосфатазы и АТФазы при одновременном увеличении активности тиаминпирофосфатазы и, частично, неспецифических эстераз. В описываемых экспериментальных условиях не наблюдали изменений в активности щелочной фосфатазы и бутирилхолинэстеразы. В обсуждении сделана попытка интерпретации некоторых из произведенных наблюдений, а также высказано мнение, что изменения ферментативной активности после отравления каломелью являются следствием первичного нарушения сосудисто-мозгового барьера.

М. В. Kozik, J. Szczech, E. Sosiński

HISTOENZYMATIC CHANGES IN THE BRAIN IN THE COURSE OF EXPERIMENTAL INTOXICATION WITH CALOMEL

Summary

Experimental studies on the toxic effect of calomel on enzymatic activity of the cerebral and cerebellar tissue were performed. The drug was introduced to the rats stomach either for 4 days in 0.05 gm doses or in 0.012 doses for 10 days.

Intoxication resulted in marked decrease of acetylcholinesterase, acid phosphatase and adenosinetriphosphatase activity and in simultaneous increase of thiamine pyrophosphatase and some nonspecific esterase activity. The activity of alkaline phosphatase and butyrylthiocholine esterase did not exhibit any changes.

The authors discuss some of the findings; in their opinion the changes in enzymatic activity due to intoxication with calomel result from primary damage to blood-brain barrier.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson W. A. D.: *Patologia*. PZWL, Warszawa, 1966.
2. Chang L. W., Desnoters P. A., Hartmann H. A.: Quantitative cytochemical studies of RNA in experimental mercury poisoning. I. Changes in RNA content. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1972, 31, 489.
3. Chang L. W., Hartmann H. A.: Ultrastructural studies of the nervous system after mercury intoxication. I. Pathological changes in the nerve cell bodies. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972a, 20, 122—138.
4. Chang L. W., Hartmann H. A.: Blood-brain-barrier dysfunction in experimental mercury intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1972b, 21, 179—184.
5. Chang L. W., Opitz J. M., Pallister P. D., Gilbert E. F., Viseskul Ch: Minamata disease. A case report and comparative study. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1973, 26, 275—284.
6. Dadlez J.: *Farmakologia i toksykologia leków*. PZWL, Warszawa, 1954.
7. Dhar K.: *Metal ions in biological systems*. Plenum Press. New York-London, 1973.
8. Fanconi — cyt. wg Moeschlin'a (1960).
9. Feer — cyt. wg Moeschlin'a (1960).
10. Florin M., Stotz E. H.: *Enzyme nomenclature*. W: *Comprehensive biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, vol. 13, 1973.
11. Gerebtzoff M.: *Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases*. *Acta Anat. (Basel)*, 1953, 19, 366—379.
12. Kozik M. B., Sosiński E., Szczech J.: Aktywność fosfataz i esteraz w mózgu w następstwie ostrego zatrucia sublimatem. *Folia Histochem. Cytochem.* 1976.
13. Kozik M. B., Wyglądalska H.: Aktywność enzymatyczna hydrolaz w rdzeniu kręgowym szczurów po ostrym i podostrym zatruciu kalomelem. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1976.
14. Miętkiewski K., Malendowicz J.: Einfluss verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren auf die Lokalisation von unspezifischen Esterasen in der normalen sowie unter Wirkung von BeCl_2 stehenden Leberzelle. *Histochemie*, 1967, 11, 223—233.
15. Moeschlin S: *Zatrucia. Klinika i leczenie*. PZWL, Warszawa, 1960.
16. Mukai N.: An experimental study of alkylmercurial encephalopathy. *Acta neuropath.*, 1972, 22, 102.
17. Nachlas M., Seligmann A.: The histochemical demonstration of esterase. *J. nat. Cancer Inst.*, 1949, 9, 415—425.
18. Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1961, 9, 47—61.
19. Pierce P. E., Thompson J. F., Likosky W. H., Nickey L. N., Barthel W. F., Hinman A. R.: Alkyl mercury poisoning in humans. *Jama*, 1972, 220, 1439.

20. Schilling-Siengalewicz S.: Toksykologia. PZWL, Warszawa, 1952.
21. Steinwall O. J.: Observations on the effect of mercury compounds on the blood-brain barrier. VI Congress International de Neuropathologie, Comptes Rendus 106—107, Masson et Cie, Paris, 1970.
22. Steinwall O. J.: Olsson Y.: Impairment of the blood-brain barrier in mercury poisoning. Acta Neurol. Scand., 1969, 45, 369—375.
23. Timm F., Naundorf C., Craft M.: Zur Histochemie und Genese der chronischen Quecksilbervergiftung. Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., 1966, 22, 236—245.
24. Voigt C. E., Adebahr G.: Histochemische Untersuchungen über den Verbleib des Quecksilbers bei der experimentellen Sublimatvergiftung. Klin. Wschr., 1963, 41, 558—563.
25. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of heile canaliculi. Amer. J. Clin. Path., 1957, 27, 13—23.
26. Wachstein M., Meisel E., Falcon C.: Histochemistry of thiolacetic acid esterase: a comparison with non-specific esterase with special regard to the effect of fixatives and inhibitors on intracellular localization. J. Histochem. Cytochem. 1961, 9, 325—339.
27. Weber M. Zatrucia zawodowe substancjami nieorganicznymi. PZWL, Warszawa, 1972.

Adres autorów: Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Akademii Medycznej, 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

TEMATYKA POSIEDZEŃ NAUKOWYCH
STOWARZYSZENIA NEUROPATOLOGÓW POLSKICH
W ROKU 1976

31 styczeń:

M. Śmiałek: Aktywność oddechowa izolowanych neuronów OUN szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla (metoda mikronurka Kartezjusza)

J. Kałuża: Odmiany morfologiczne guzów OUN u dzieci

28 luty:

J. Kałuża: Mózg respiratorowy. Hipoteza czy rzeczywistość?

— Uroczystość Jubileuszowa z okazji 45-lecia Pracy lekarskiej Prof. dr med. Anatola Dowżenka

20 marzec:

J. Kałuża: Mózg respiratorowy. Hipoteza czy rzeczywistość? — dalszy ciąg dyskusji z posiedzenia w dniu 28.II.1976 r.

J. Borowska-Lehman, B. Kopacka, D. Kuklińska: Zmiany morfologiczne w OUN u myszy szczepionych zawiesiną Bordetella Pertussis

A. Jędrzejewska-Iwanowska, M. B. Gabryelewicz: Inwazyjny gruczolak przysadki z klinicznymi objawami akromegalii

29 maj:

J. Rafałowska: Przedstawienie materiału do dwóch przypadków klinicznych — Dyskusja

26 czerwiec:

W. Müller: Degenerative cell alterations in brain tumors Rasterelektronische Befunde an Verkalkungen in Hirn

23—25 wrzesień:

International Symposium on „Chemical Brain Injuries and Brain Tumors” — Polish Neuropathological Association and Neuropathological Society of GDR

30 październik:

M. Śniatała: Morfologia ultrastrukturalna neurogleju spoidła wielkiego w toku rozwoju ontogenetycznego

27 listopad:

I. B. Zelman, M. J. Mossakowski: Przypadek wścieklizny z mikroskopowo-elektrowym badaniem ciałek Negriego

18 grudzień:

S. Krajewski, T. Michalak: Badania immunomorfologiczne splotów naczyniówkowych u ludzi

L. Iwanowski: Splot naczyniasty jako element składowy bariery krew-mózg. Badanie w mikroskopie elektronowym

K. Renkawek: Obraz morfologiczny splotu naczyniastego i właściwości histoenzymatyczne komórek śródbłonnków naczyń w hodowli tkankowej

ZOFIA ZALEWSKA, IRENA RAKOWSKA, GRAŻYNA MATRASZEK,
DARIUSZ SITKIEWICZ

EFFECT OF DICHLORVOS ON SOME ENZYMES ACTIVITIES OF THE RAT BRAIN DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

I. CHOLINESTERASES

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy,
Medical Academy, Warsaw
Head: Assoc. Prof. W. Bicz

A number of organophosphorus esters were shown to produce a delayed neurotoxic effect in hen and several mammals (Aldridge, Barnes, 1966a, b; Johnson, 1970). This effect is apparently mediated by the phosphorylation of the active site of an esterase designed by Johnson as „neurotoxic esterase” (Johnson, 1969). In vivo studies showed that organophosphates, phosphonates and phosphoramidates are capable of „neurotoxic esterase” phosphorylation (Johnson, 1970, 1974). On the other hand, organophosphorus compounds are known to produce demyelination in the nerve tissue (Majno, Karnovsky, 1961; Porcelatti, 1967, 1971). It was therefore of interest to examine the effect of Dichlorvos (O,O-dimethyl-O-/2,2-dichlorovinyl/phosphate) on some enzymes activities, in particular esterases, in neonatal rat brain in the course and after the period of active myelinogenesis. Previous work in this laboratory dealt with the effect of organophosphorus insecticides on some esterases and mitochondrial oxidoreductases of the adult brain (Pachecka et al., 1975; Sitkiewicz, Zalewska, 1975).

The present study was designed to evaluate the effect of Dichlorvos on the acetylcholinesterase activity in the developing rat brain. In addition, activity of blood plasma cholinesterase was assayed.

*) This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences Research Programme No 10.4.2.0.2.3.5.

MATERIAL AND METHODS

Pregnant female rats weighing 250—270 g were used. The animals were divided into two groups and were repeatedly intoxicated with respectively 2% LD₅₀ (group I) and 10% LD₅₀ doses (group II) of Dichlorvos, during the last 7 days of pregnancy (14th—21st day). The insecticide was administered in 0.5 ml portions in oil. The LD₅₀ dose referred to was 56 mg/kg body weight. The control rats received 0.5 ml of oil at times corresponding to the administration of Dichlorvos. The enzyme assays were performed on the animals that were born one day after the last administration of the insecticide, in their 1st, 4th, 8th, 12nd, 16th, 32nd and 56th day of life.

The acetylcholinesterase and cholinesterase activities were measured spectrophotometrically according to Ellman et al., (1961) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 1 mM acetylthiocholine iodide and 0.2 mM DTNB. Acetylcholinesterase was tested in brain hemisphere homogenates and cholinesterase in blood plasma, immediately after sacrifice. Protein was measured by the biuret method (Layne, 1957) in deoxycholate — solubilized homogenates and by method of Lowry et al., (1951) in blood plasma.

Dichlorvos (DDVP) — O,O-dimethyl-O-/2,2-dichlorovinyl/phosphate 99.2% was obtained from Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. Other chemicals were analytical grade and were obtained from Polish Chemical Reagents (POCh, Gliwice, Poland).

RESULTS

Previous studies in this laboratory (Pachecka et al., 1975) revealed a very rapid decrease of the acetylcholinesterase activity following administration of Dichlorvos. The maximum inhibition was observed already 30 min after intoxication with a 50% LD₅₀ dose of insecticide. In the present study, the plasma cholinesterase activity was assayed each day during intoxication, 30 minutes before and after administration of Dichlorvos.

As shown in Table 1, the control cholinesterase activity varied from day to day. In all cases, however, an inhibition of the enzyme activity was observed 30 minutes after administration of 10% LD₅₀ of Dichlorvos, the activity values ranging from 50—70% of the control level. After 24 hrs, i.e. just before the next administration, this inhibitory effect was found to have partially, but not completely retreated. Considering that the

Table 1. Activity of blood plasma cholinesterase during intoxication of pregnant female rats with Dichlorvos (10% LD₅₀).

Tabela 1. Aktywność cholinesterazy osocza krwi ciężarnych samic podczas zatruwania dichlorfosem (10% LD₅₀)

Time of intoxication (days) Czas zatrucia (dni)	Activity of blood plasma cholinesterase (nmoles/min/mg protein) Aktywność cholinesterazy osocza krwi (nmole/min/mg białka)							
	Control Kontrola	Dichlorvos Dichlorfos						
		30 min. before insecticide administration 30 min przed podaniem insektycydu	30 min. after insecticide administration 30 min. po podaniu insektycydu					
0	9.06 ± 0.63	(24)						
1					4.27 ± 0.22	(6)		
2	9.79 ± 1.31	(9)	7.26 ± 1.11	(7)	p < 0.02	4.38 ± 0.64	(7)	p < 0.01
3			5.88 ± 0.31	(6)		3.71 ± 0.49	(7)	
4	8.50 ± 0.69	(9)	3.57 ± 0.64	(7)	p < 0.01	2.96 ± 0.25	(6)	p < 0.01
5			6.02 ± 1.38	(5)		3.05 ± 0.29	(7)	
6	13.53 ± 0.53	(4)	6.41 ± 1.01	(6)	p < 0.01	3.89 ± 0.50	(6)	p < 0.01

Results are expressed as mean values ± standard error of the mean. The number of animals is given in parentheses.

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± średnie odchylenie od średniej. W nawiasach podano liczbę zwierząt.

cholinesterase activity remained depressed also between the successive administrations of the insecticide, it is clear that the animals were poisoned throughout the last days of pregnancy.

Fig. 1 illustrates the changes of cholinesterase activity in the course of postnatal development of the offspring from control and of intoxicated mothers. In the former cases the blood plasma cholinesterase activity was found to increase during the first days of life, reaching the maximum value on the 8th day. Then the activity started going down until the adult level was obtained in the 32nd day of life.

The pattern of changes of the blood plasma cholinesterase activity in the rats from intoxicated mothers resembled the control pattern. The activity in one-day newborns from intoxicated mothers was identical to that in the control newborns. Thereafter the activity rapidly increased to a peak on the 4th day after birth.

The brain acetylcholinesterase activity continued to increase much longer than the blood cholinesterase and reached a maximum on the 32nd day of life. Thereafter the activity begun to decline until the 56th day when it finally dropped to the adult level (Pachecka et al., 1975; Sitkiewicz et al., 1976), which amounted to 70% that at the 32nd day and was 2.5 times higher than at birth.

Intoxication of mothers with either of the insecticide doses produced no dramatic effect on the acetylcholinesterase activity in newborns du-

ring the first month of life. A statistically significant drop ($p \leq 0.05$) of the activity became apparent in 42nd and 56th days animals and only in those of which mother received the higher dose (10% LD₅₀).

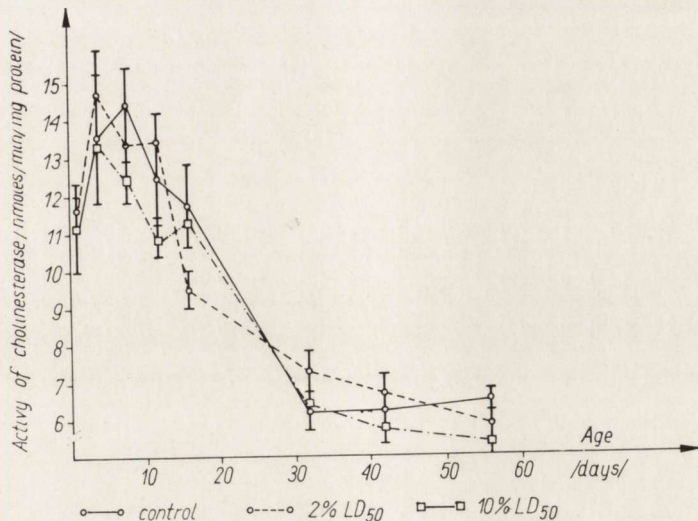


Fig. 1. Variation in blood plasma cholinesterase with age following Dichlorvos intoxication of pregnant rats. Levels are shown as mean values \pm standard error of the mean from 6 animals.

Ryc. 1. Zmiany aktywności cholinesterazy osocza krwi w zależności od wieku potomstwa w następstwie zatrucia ciężarnych szczurzyce dichlorfosem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej dla 6 szczurów.

DISCUSSION

The point in applying the present intoxication model, consisting in administration of Dichlorvos to mothers throughout the last trimester of pregnancy was that in this period, the development of fetal brain is characterized by proliferation and differentiation of the nerve cells (Rappoport et al., 1971). The enzymes were assayed in the period from the 1st up to the 56th day of life, when the brain already acquires both the morphological and metabolic maturity (Rappoport et al., 1971). This experimental approach allowed to evaluate both the direct and indirect effects of Dichlorvos and its metabolites on the acetylcholinesterase activity in the developing rat brain.

Acetylcholinesterase is a membrane-bound enzyme (Koeppen, 1969). To avoid losses that might accompany preparation of the postmitochondrion-

drial fractions, this esterase activity was determined in crude homogenates.

The observed pattern of ontogenetic changes of the acetylcholinesterase activity (a continuous increase during the first 30 days of life and then a slight decline) resembles that described by Altman et al. (1970), Ben-

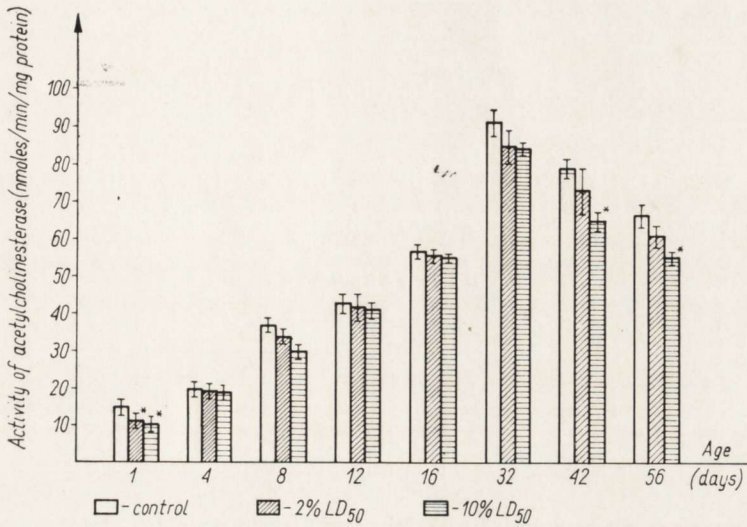


Fig. 2. Activity of acetylcholinesterase in the brain of the developing rat following Dichlorvos intoxication of pregnant rats. Levels are shown as mean values \pm standard error of the mean from 6 animals. * Statistical significance $p \leq 0.05$.

Ryc. 2. Aktywność acetylocholinesterazy w mózgu szczura podczas rozwoju po zatruciu ciężarnych szczurzyce dichlorfosem. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 6 szczurów. * Znamienność statystyczna $p \leq 0.05$.

net et al. (1958) and Metzler and Humm (1961) in the rat brain and by Apprison and Himwich (1954) in the rabbit brain. The age-dependent changes of this enzyme activity in the brain of offspring of intoxicated mothers were in essence similar to those in control rats. The only difference noted was a slight decrease of the enzyme activity in the experimental animals in the 1st, 42nd and 56th day of life. The effects on the 1st day might be due to the direct inhibition by Dichlorvos or its metabolites; this suggestion, however, requires experimental verification. Another possibility to be considered is the appearance of enzymatic changes as a result of disturbances (retardation) of the development of proteinaceous structures.

Parallel studies revealed the occurrence in the offspring of intoxicated females of disturbances in the activities of brain mitochondrial oxido-

reductases (Zalewska et al., 1977). This fact does not univocally prove that the insecticide and its metabolites easily penetrate the fetal brain. The observed changes may as well be attributed to the retarded development of the oxidoreduction systems in the brain.

Acknowledgments. The authors are greatly indebted to Doc. dr hab. med. W. Bicz for his kind interest and invaluable advice during these investigations. We also thank Mrs. B. Dyjak for her skilled technical assistance.

Z. Zalewska, I. Rakowska, G. Matraszek, D. Sitkiewicz

WPLYW DICHLORFOSU NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH UKŁADÓW ENZYMATYCZNYCH MOZGU SZCZURA PODCZAS ROZWOJU OSOBNICZEGO

I. Cholinesterazy

Streszczenie

Przebadano aktywności acetylocholinesterazy mózgu szczura oraz cholinesterazy osocza krwi potomstwa podczas rozwoju osobniczego od 1 do 56 dnia życia po zatruciu ciężarnych samic dichlorofosem. Oceniano także aktywność cholinesterazy osocza krwi ciężarnych samic podczas zatruwania dichlorofosem przez ostatnich 7 dni ciąży (pomiędzy 14 a 21 dniem). Oznaczenia aktywności enzymu wykonano każdego dnia 30 min przed i 30 min po podaniu insektycydu w dawce 10% LD₅₀. Aktywność acetylocholinesterazy oznaczano w pełnych homogenatach półkul mózgowych w 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 i 56 dniu życia potomstwa.

Stwierdzono obniżenie aktywności cholinesterazy osocza krwi samic ciężarnych (około 50—70%) w 30 min. po podaniu dichlorofosu. Po 24 godz. aktywność tego enzymu wykazywała tendencję do powrotu do normy, jednakże nigdy nie osiągnęła poziomu kontrolnego. U potomstwa samic zatrutowanych dichlorofosem nie obserwowano zmian aktywności acetylocholinesterazy i cholinesterazy w pierwszym okresie rozwoju osobniczego (do 32 dnia życia). W 42 i 56 dniu życia potomstwa samic zatrutowanych dichlorofosem w dawce 10% LD₅₀ stwierdzono niższą aktywność acetylocholinesterazy w mózgu. Zatrucie dawką 2% LD₅₀ nie powodowało istotnych zmian w aktywności obu badanych enzymów w okresie od 1 do 56 dnia życia potomstwa.

З. Залевска, И. Раковска, Г. Матрашек, Д. Ситкевич

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРОФОСА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ МОЗГА КРЫСЫ ВО ВРЕМЯ ОНТОГЕНЕЗА

I. Холинэстеразы

Резюме

Исследовано активность ацетилхолинэстеразы мозга крысы, а также холинэстеразы сыворотки крови потомства во время онтогенеза от 1 до 56 дня жизни после отравления беременных самок дихлорофосом. Оценивали также активность холинэстеразы сыворотки крови беременных самок во время отравления дихлорофосом в течение последних 7 дней беременности (между 14 и 21 днем).

Определение активности фермента проводили ежедневно за 30 мин до и через 30 мин после дачи инсектицида в дозе 10% LD₅₀. Активность ацетилхолинэстеразы определяли в полных гомогенатах мозговых полушарий в 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 и 56 день жизни потомства.

Установлено снижение активности холинэстеразы сыворотки крови беременных самок (около 50—70%) через 30 мин после дачи дихлорофоса. Через 24 часа активность этого фермента обнаруживала тенденцию возвращения к норме, однако никогда не достигала контрольного уровня. У потомства самок, отравленных дихлорофосом, не наблюдали изменений активности ацетилхолинэстеразы и холинэстеразы в первый период антогенеза (до 32 дня жизни). На 42 и 56 день жизни потомства самок, отравленных дихлорофосом в дозе 10% LD₅₀, обнаружена более низкая активность ацетилхолинэстеразы в мозге. Отравливание дозой 2% LD₅₀ не вызывало существенных изменений в активности обоих исследованных ферментов в период от 1 до 56 дня жизни потомства.

REFERENCES

1. Aldridge W. N., Barnes J. M.: Further observation on the neurotoxicity of organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1966 a, 15, 541—548.
2. Aldridge W. N., Barnes J. M.: Esterases and neurotoxicity of some organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 1966 b, 15, 549—554.
3. Altman J., Das G. D.: Postnatal changes in the concentration and distribution of cholinesterase in the cerebellar cortex of rats. *Exp. Neurol.* 1970, 28, 11—34.
4. Apprison M. H., Himwich H. E.: Relationship between age and cholinesterase activity in several rabbit brain areas. *Am. J. Physiol.* 1954, 179, 502—506.
5. Bennet E. L., Rosenzweig M. R., Krech D., Karlsson H., Dye N., Chlander A.: Individual, strain and age differences in cholinesterase activity of the rat brain. *J. Neurochem.* 1958, 3, 144—152.
6. Ellman G. L., Kourtney K. D., Anders Jr. W., Featherstone A. M.: New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, 88—95.
7. Johnson M. K.: A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.*, 1969, 111, 487—495.
8. Johnson M. K.: Organophosphorus and other inhibitors of brain „neurotoxic esterase” and the development of delayed neurotoxicity in hens. *Biochem. J.* 1970, 120, 523—531.
9. Johnson M. K.: The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 785—789.
10. Koeppen A. H., Barron K. D., Bernsohn J.: Redistribution of rat brain esterases during subcellular fractionation. *Biochim. Biophys. Acta* 1969, 183, 253—264.
11. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*. Colowick S. P., Kaplan N. O., Eds. Academic Press, New York, 1957, 3, 447—454.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
13. Metzler C. J., Humm D. G.: The determination of cholinesterase activity in whole brains of developing rats. *Science*, 1951, 113, 382—383.

14. Majno G., Karnovsky M. L.: A biochemical and morphological study of myelination and demyelination. III. Effect of organophosphorus compound (mipaflox) on the biosynthesis of lipids by nervous tissue of rats and hens. *J. Neurochem.* 1961, 8, 1—16.
15. Pachecka J., Suliński A., Ziółkowska G.: The activities of some esterases of the rat brain after intoxication by organophosphate insecticides Dichlorvos and Trichlorphon. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 455—462.
16. Porcelatti G.: The effect of organophosphorus compounds on nerve phospholipid metabolism. *Progr. Biochem. Pharmacol.*, 1967, 3, 49—58.
17. Porcelatti G.: Demyelinating cholinesterase inhibitors: lipid and protein metabolism. *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha A. Ed. Plenum Press, New York, London, 1971, 5, 439—478.
18. Rappoport D. A., Fritz R. R., Yamagami S.: Development, *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha A. Ed. Plenum Press, New York-London, 1971, 5, 439—479.
19. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: Effect of Ronnel and its oxygen analog on the succinate oxidation by rat brain and liver homogenates and mitochondria. *Post. Biochem. Physiol.* 1976, (in press).
20. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on the some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 463—469.
21. Zalewska Z., Wolna B., Sitkiewicz D., Bicz W.: Effect of Dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15. In press.

Authors address: Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, Banacha 1, 02-097 Warszawa.

EWA OSETOWSKA, FELIKS LUSZAWSKI, JAN SAWICKI

WPŁYW MUTACJI *pt* NA RÓŻNE OGNIWA „ZAMKNIĘTYCH”
OBWODÓW RUCHOWYCH *

I. PATOMORFOLOGIA NEOSTRIATUM, PALEOSTRIATUM I SUBSTANTIA
NIGRA U KRÓLIKA *pt*

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

W pierwszym usystematyzowanym cyklu prac poświęconym królikom *pt* (*pt* samiec, *pt/pt* samica, symbol genetyczny nadany „królikowi z Mińska Mazowieckiego” przez Lindsey’a i Fox’a, 1974) staraliśmy się 1. usystematyzować odmiany przebiegu klinicznego zespołu *pt*, wysuwając hipotezę supresji genetycznej wprowadzonej do rodziny przez jednego ze zdrowych ojców (Osetowska i wsp., 1975a), 2. przeprowadzić korelację objawów klinicznych z narastającym uszkodzeniem neuronów (Osetowska i wsp., 1975b; Taraszewska i Osetowska, 1975), 3. podjąć pierwsze próby weryfikacji neurochemicznych zespołu (Wald i wsp., 1976; Czartoryska i wsp., 1976), wreszcie 4. wyjaśnić fizyko-chemiczny charakter złogów neuro-aksonalnych, stanowiących jedną z patognomicznych zmian mózgowych królika *pt*. W badaniach w mikroskopie elektronowym, potwierdzonych analizą mikroradiograficzną, udało się je zidentyfikować jako związek wapnia ($\text{Ca}_3/\text{PO}_4/2$). Jego odkładanie się w obrębie neuro-aksonu poprzedzone jest zwyrodnieniem organelli, szczególnie uszkodzeniem mitochondriów (Taraszewska i wsp., 1976).

Głównym celem badań rozpoczętych w obecnym pięcioleciu jest ustalenie anatomicznego podłoża drżeń parkinsonoidalnych. Jeżeli w roku 1971 Fahn i wsp. wyrażali rozczarowanie, że ani badania Martin’a (1965) ani Denny-Brown’a nie dały wyjaśnienia „for Parkinsonian tremor”, i równocześnie podkreślali z żalem, że „clinical-chemical-pathological correlations of diseased states (Parkinsonian-E.O.), for which there are no suitable animal models, can only be accomplished by studying the

*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego. Temat 10.4.2.02.2.

human subject", to królik *pt* wydaje się właśnie idealnym modelem doświadczalnym dla wyjaśnienia drżeń typu parkinsonoidalnego (tym bardziej, że zespół *pt* nie zawiera równocześnie parkinsonoidalnej akinezji i sztywności).

Pojęcie zawarte w tytule nowego cyklu wymaga wyjaśnienia: „zamknięte” obwody ruchowe („closed” neuronal circuits) wprowadził do literatury neurologicznej Brodal (1963), ażeby zerwać definitywnie zarówno z pojęciem „ruchu spontanicznego”, jak i ze sztucznym podziałem układu ruchowego na „piramidowy” i „pozapiramidowy”. Funkcjonalnie istnieje stała interferencja w oddziaływaniu „stacji przełącznikowych” ruchu. Jeżeli wyraz „closed” — „zamknięty” został użyty przez Brodala w cudzysłowie, to dlatego, że od każdego zamkniętego obwodu odchodzą liczne kolaterale do jąder układów czuciowych i wegetatywnych.

Drugi cykl badań rozpoczynamy od ośrodków podkorowych i pniowych, tradycyjnie wiązanych z zespołem parkinsonizmu tj. od *neostriatum*, *paleostriatum* i *substantia nigra* oraz od ich połączeń, badanych na razie w granicach możliwości technicznych mikroskopu świetlnego.

MATERIAŁ I METODA

Badania wykonano na materiale 60 przypadków królików *pt* objawowych, w tym:

45 przypadków (38 samców i 7 samic) z przebiegiem klinicznym ostrym, trwającym od 3 tygodni do 3 miesięcy. Drżenia zrytmizowane, drobnofaliste, przy ruchach czynnych i podnieceniu grubofaliste, kolebiące całym tułowiem występowały w tej grupie pomiędzy 10 a 12-tym dniem życia. We wszystkich przypadkach w ciągu 1—10 dni od wystąpienia drżeń, pojawiły się niedowłady typu spastycznego, ze wzmożonymi odruchami. W 7 przypadkach faza drżeń była bardzo krótka, jedno-dwudniowa, zanikająca wraz z bardzo szybkim narastaniem niedowładów, aż do bezwładów 4 kończyn, w ustawieniu typu „samolot” (por. Osetowska i wsp., 1975b);

8 przypadków (tylko samce) z przebiegiem klinicznym podoстрыm od 3 do 6 miesięcy; z niedowładami kończyn i drzeniami utrzymującymi się aż do zgonu;

7 przypadków (4 samce i 3 samice) z przebiegiem chronicznym od 8 miesięcy do 1,5 roku. W tej ostatniej grupie niedowłady bądź to cofały się, bądź utrzymywały stacjonarnie, najczęściej w kończynach przednich. Drżenia drobnofaliste, zrytmizowane występowały z okresowymi nasileniami bez pobudzenia, natomiast stale podczas badania neurologicznego, przesadzania z klatki przy sprzątaniu itp.

W sumie na 60 przypadków pochodzących z materiału sekcyjnego lat 1976, 1975, 1974 wybranego wyłącznie na podstawie objawów klinicznych było 50 samców i 10 samic. Badane króliki reprezentowały głównie pokolenia IX, X i XI, z pojedynczymi przypadkami z pokoleń VII, VIII i XII.

Dwadzieścia królików w analogicznych grupach wieku, pochodzących z miotów mieszanych (nosicielka x królik zdrowy), naturalnie z przeważającą ilością samców, stanowiło materiał kontrolny. Jak już zaznaczono w poprzedniej pracy (Osetowska, Luszawski, 1976), tak dobrana grupa kontrolna przedstawia poza odmiennym genotypem i fenotypem właściwy odpowiednik biologiczny materiału doświadczalnego.

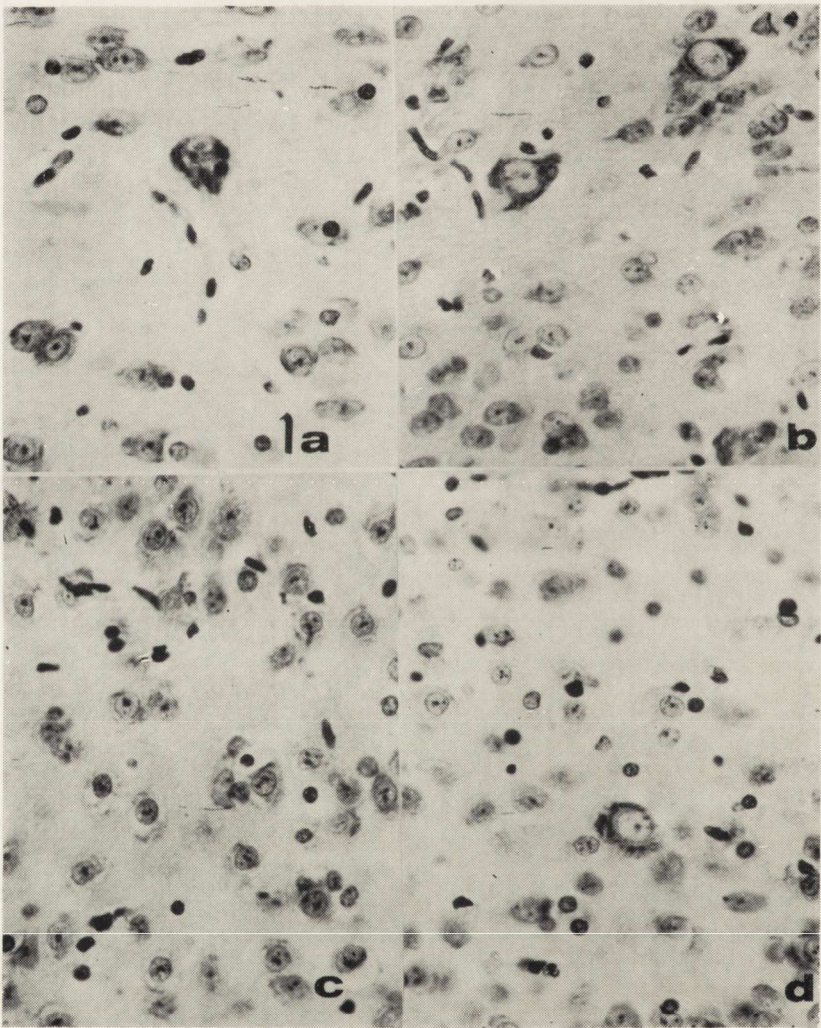
Króliki w chwili maksymalnego nasilenia objawów neurologicznych i/lub oznak ogólnego pogorszenia stanu klinicznego usypiano przez dożylnie podanie Eunarconu.

Mózg i rdzeń oraz narządy mięszkowe (w każdym przypadku) utrwalono w formolu. Błoczki tkankowe zatopione w parafinie krajano w seriach nieciągłych z poziomów *striatum* i *substantia nigra* (7—10 skrawków na poziom) i barwiono fioletem krezyłu, hematoksyliną-eozyną, metodą Heidenhaina, Holzera w mod. Kanzler-Arendta oraz Holmesa, w przypadkach zwapnień wątpliwych także Alizaryną S oraz metodą van Kossa.

WYNIKI

Neostriatum (skorupa, jądro ogoniaste). W przeważającej ilości materiału zmiany w *neostriatum*, szczególnie w skorupie są widoczne, ale stosunkowo mało nasilone: obserwuje się obraz tigrolizy w obrębie dużych komórek oraz zatarcie rysunku chromatyny jądrowej w komórkach małych; w podłożu widoczne są cienie komórek rozplywających się homogenicznie (ryc. 1a; przyp. z. 91/75). W poszczególnych przypadkach występuje w komórkach dużych zanik chromatyny jądrowej („puste jądra”), wakuolizacja protoplazmy od obwodu, co nie wyklucza jej pochodzenia od satelitów glejowych — jak to wynika z badań Taraszewskiej w mikroskopie elektronowym (materiał nie opublikowany) oraz zmiany obrzękowe i homogenne w komórkach małych (ryc. 2b; przyp. z. 68/75), z przewagą niedowładów nad fazą drzeń w przebiegu klinicznym. Wyraźniejsze zmiany obserwuje się w jądrze ogoniastym: tigrolizę przechodzącą w homogenizację protoplazmy komórek dużych; wybitne obrzękowe przejaśnienia i poszerzenia protoplazmy komórek małych doprowadzające często do tworzenia się pseudosyncytjów neuronalnych przez zatarcie granic zewnętrznej błony komórkowej (ryc. 1c, przyp. z. 85/75). W całym materiale widoczne jest wyraźne przejaśnienie

nie chromatyny jądrowej w komórkach małych (ryc. 1d, przyp. z. 229/74). Tylko w 3 przypadkach na 60 przebadanych znaleziono w *neostriatum* pojedyncze zwapnienia, znajdujące się zazwyczaj na pograniczu istoty białej i szarej, aczkolwiek niewątpliwie związane ze strukturą komórkową (ryc. 2a, przyp. 68/75). W układach pęczkowych włókien intrastriatalnych łączących *neostriatum* z gałką bladą oraz z istotą czarną nie znaleziono masywnych przejaśnień mielinowych; w dużych powiększeniach w impregnacji srebrowej widoczne są odkształcenia i owalne pogrubienia poszczególnych włókien oraz ich fragmentacja (ryc. 2b, przyp. z. 91/75).

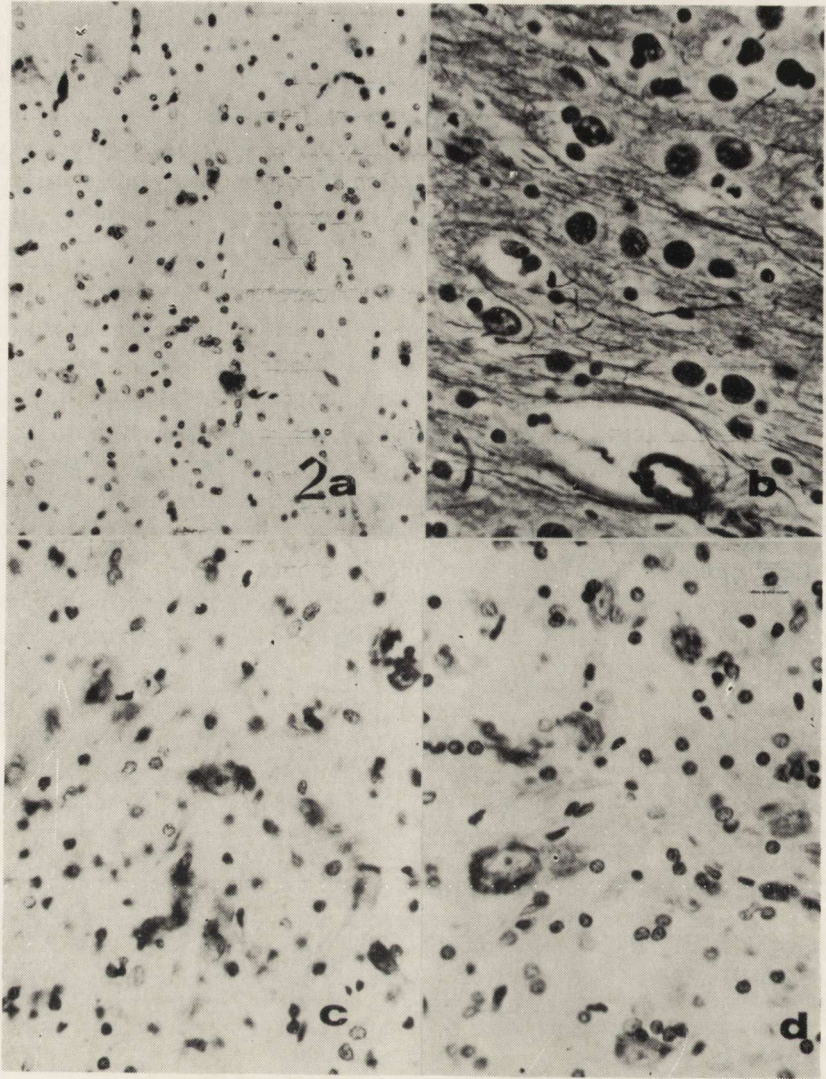


Paleostriatum. Zmiany zaobserwowane w gałce bladej są znacznie bardziej nasilone i powszechniejsze niż w *neostriatum*. W średniej wielkości wielobiegunowych komórkach dość rzadko rozrzuconych w bogato-włóknistym podłożu, występuje tigroliza, homogenne zacieranie się struktury śródkomórkowej (ryc. 2c, przyp. z. 50/75) i wyraźne przedzielenia chromatyny jądrowej. W gałce bladej uderza także duża ilość progresywnie zmienionych jąder gleju komórkowego (ryc. 2c, przyp. z. 229/74).

U królika nie istnieje ani cyto- ani mieloarchitektoniczny podział gałki bladej na część boczną i środkową. W części przyśrodkowo-dolnej oraz na pograniczu górno-bocznym gałki bladej i torebki wewnętrznej znajdują się dwie duże grupy komórek znacznie większych, określane przez Grünthal'a (cyt. za Gerhard, 1968), odpowiednio jako grupa komórek b i grupa a. W tych dużych neuronach występuje szczególnie wyraźnie zatarcie granic błony komórkowej, tigroliza, nasilająca się do homogenizacji, wakuolizacja protoplazmy i zanikanie chromatyny jądrowej. W podłożu, szczególnie w grupie a widoczne są cienie komórek ulegających całkowitemu bezodczynowemu zanikowi (ryc. 3a i 3b, przyp. z. 50/75 oraz z. 79/75). Na obu rycinach wyraźne są również zmiany w jądrach glejowych. W 18 przypadkach stwierdzono w najbardziej wewnętrznej części gałki bladej występowanie koncentrycznych zwapnień, leżących wśród pofragmentowanych i odkształconych włókien nerwowych (ryc. 3c, przyp. z. 68/75). Błazka rdzena boczna gałki bladej nie wykazuje podobnie jak *neostriatum* masywnej demielinizacji — tyl-

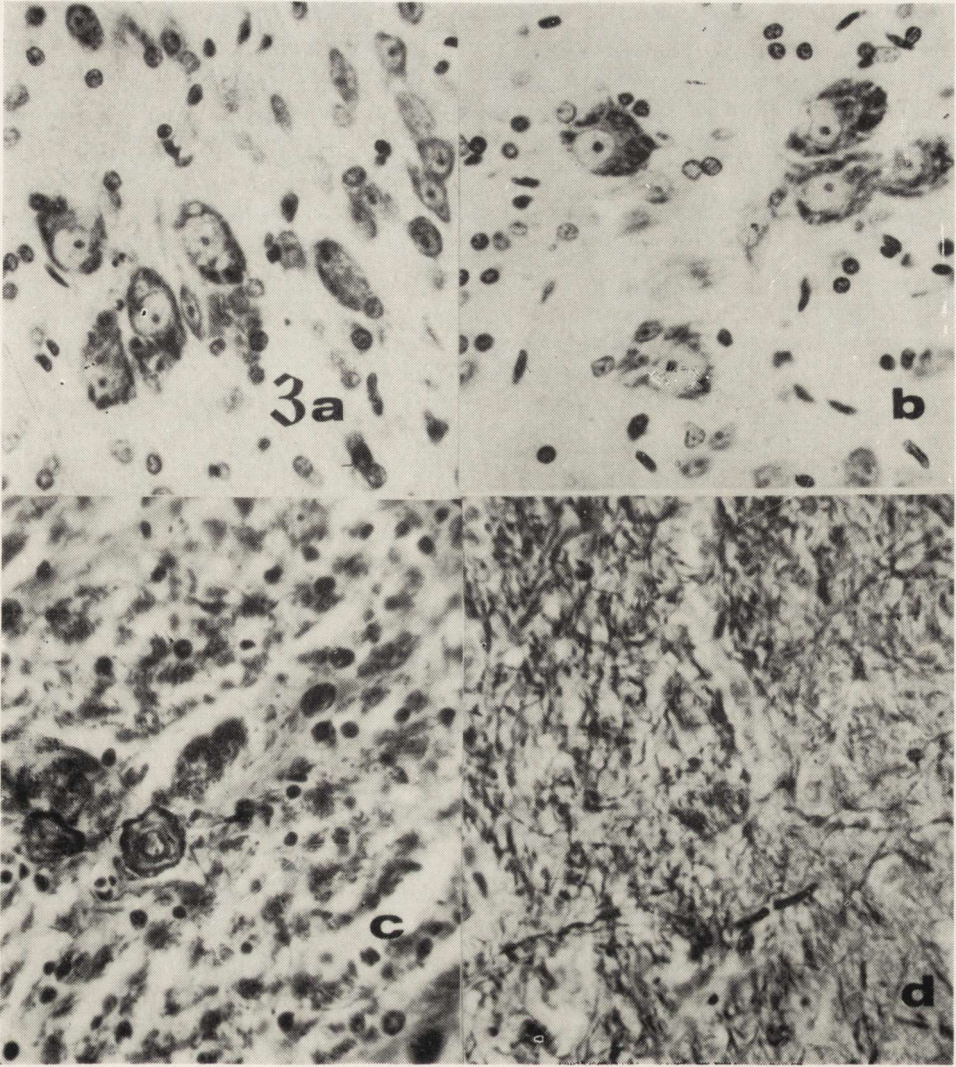
Ryc. 1. a. Skorupa. Umiarkowane zmiany neuronalne w postaci tigrolizy komórek dużych, zatarcia rysunku chromatyny jądrowej w komórkach małych; pojedyncze, homogenne cienie komórkowe w podłożu. b. Skorupa. „Puste” jądro w dużej komórce położonej niżej oraz wakuolizacja protoplazmy postępująca od obwodu. c. Jądro ogoniaste. Obrzękowe przejaśnienia protoplazmy komórek małych; obrzękle komórki wykazują tendencje do tworzenia pseudosyncytjów neuronalnych (grupy komórek w górnej i przyśrodkowej części ryciny). d. Jądro ogoniaste. Przerzedzenia chromatyny jądrowej w komórkach małych, w licznych neuronach tigroliza prowadząca do homogennego rozpiływania się w podłożu. a-d. Fiolet krezyłu. Pow. 400 X.

Fig. 1. a. Putamen. Tigrolysis in the large neurons, chromatolysis in the nuclei of the small cells; some „ghost” cells against the background. b. Putamen: „Empty” nucleus in the large neuron in upper part of the figure, peripheral vacuolization in the cytoplasm of large neuron in lower part. c. Nucleus caudatus. Edematous enlargement of the small neurons contributes to form neuronal pseudo-syncytia. d. Nucleus caudatus. Dispersed nuclear chromatin in the small neurons. Many cells undergoing homogenic lysis in the background substance. a-d. Cresyl violet. X 400.



Ryc. 2. a. Małe zwapnienia neuronalne na pograniczu jądra ogoniastego i torebki wewnętrznej. Fiolet krezyłu. Pow. 200 \times . b. Zmiany zwyrodnieniowe we włóknach nerwowych połączeń skorupa-gąłka błada. Holmes. Pow. 400 \times . c. Gąłka błada. Tigroliza i homogenizacja komórkowa. d. Gąłka błada. Pomiędzy zmienionymi neuronami liczne jądra glejowe zmienione progresywnie. c-d. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times .

Fig. 2. a. Small neuronal calcification on the borderline of *nucleus caudatus* and *capsula interna*. Cresyl violet. $\times 200$. b. Axonal degenerative changes in *putamen-pallidum* connection fibres. Holmes. $\times 400$. c. *Pallidum*. Tigrolysis and homogenic cellular changes. d. *Pallidum*. Among altered neurons many progressive glial nuclei c-d. Cresyl violet. $\times 400$.



Ryc. 3. a, b. Duże neurony gałki bladej w grupach b i a Grünthala. Wakuolizacja cytoplazmy, homogenne rozpyływanie się w podłożu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 \times . c. Gałka bladej. Dwa zwapnienia neuro-aksonalne w pobliżu torebki wewnętrznej. Holmes. Pow. 400 \times . d. Przerzedzenie i fragmentacja osłonek mielinowych w blaszce rdzennej bocznej gałki bladej. Heidenhain. Pow. 400 \times .

Fig. 3. a, b. Large pallidal neurons in the groups b and a of Grünthal. Vacuolization of cytoplasm, homogenic destruction. Cresyl violet. $\times 400$. c. Pallidum. Two neuro-axonal calcifications near the internal capsule. Holmes. $\times 400$. d. Rarefaction and fragmentation of the myelin fibres in the lamina medullaris lateralis pallidi. Heidenhain. $\times 400$.

ko w dużych powiększeniach obserwuje się fragmentację i obrzęk poszczególnych osłonek mielinowych (ryc. 3d — z. 79/75).

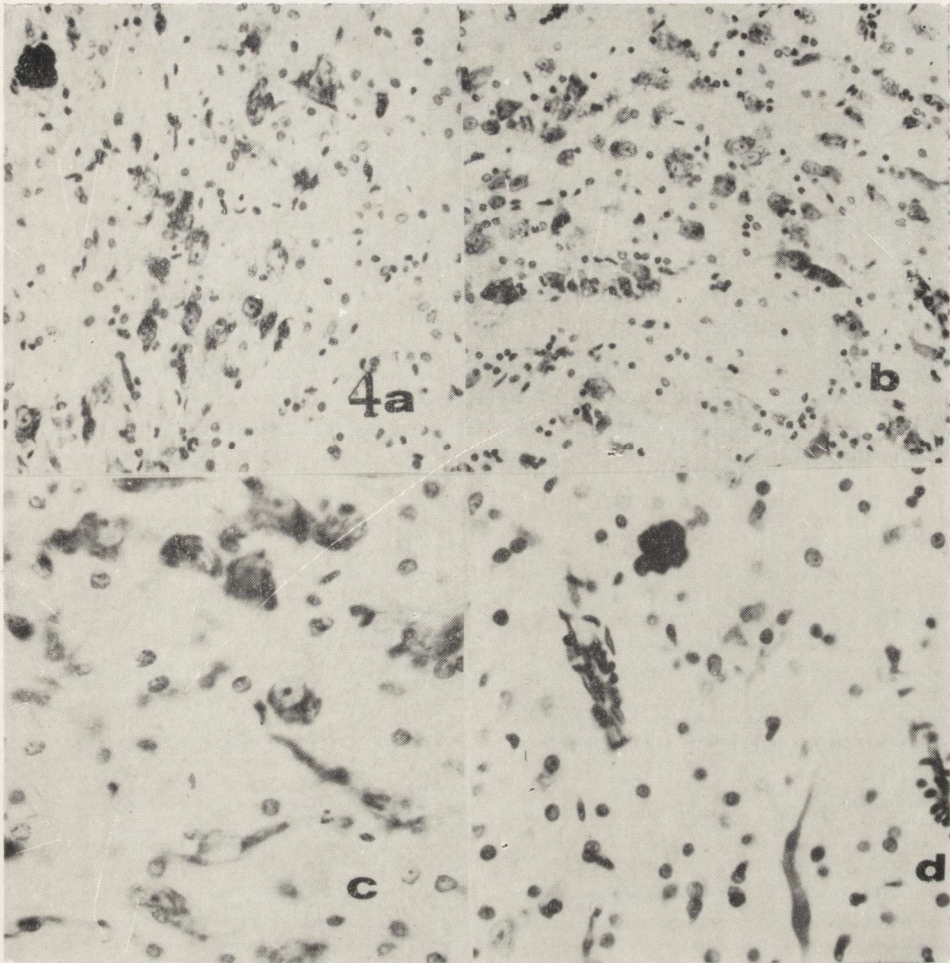
W porównaniu z materiałem kontrolnym najmniej charakterystyczne wydają się zmiany w *substantia nigra*. W części zbitej przeważają obrazy umiarkowanej tigrolizy oraz tendencja do przechodzenia neuronów w postaci obkurczone, hyperchromatyczne i „sklerotyczne” (ryc. 4a, przyp. z. 7/76). Neurony wykazują też stosunkowo niewielką tendencję do homogennego rozplywania się i zaników (ryc. 4b, przyp. z. 72/75 z przeżyciem przedłużonym do 1 roku i 4 miesięcy). Charakterystyczne rozplynięcie się chromatyny jądrowej spotyka się sporadycznie (ryc. 4c, przyp. z. 52/75).

W części siatkowatej jeszcze częściej niż w części zbitej występują niecharakterystyczne postaci neuronów sklerotycznych, pomimo ostrego przebiegu chorobowego (ryc. 4d, przyp. z. 245/74, przeżycie 7 tygodni). Na tej samej rycinie widoczne jest także zwapnienie należące do kompleksu komórkowego części siatkowatej istoty czarnej. Należy tu podkreślić, że w całym przebadanym dotychczas rutynowo materiale neuropatologicznym królika *pt*, tylko w 2 przypadkach znaleziono zwapnienia neuronalne w istocie czarnej.

Prążek istoty czarnej, w której przebiegają u królika dwukierunkowe włókna łączące z gałką bladą, wykazuje tylko sporadyczne uszkodzenia osłonek mielinowych. Pęczek ten zresztą także w warunkach prawidłowych barwi się nieco słabiej, niż sąsiadujące z nim zbite włókna konaru mózgu (Gerhard, 1968).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z trzech przebadanych struktur jądrowych największe i najbardziej charakterystyczne uszkodzenia w porównaniu z materiałem kontrolnym znaleziono w *paleostriatum*. Uszkodzenia widoczne w mikroskopie świetlnym w barwieniu metodą Nissla potwierdzają się w badaniach w mikroskopie elektronowym (Taraszewska — materiał nie opublikowany), w których stwierdzono zmiany w perikarionie neuronów z obecnością śródcytoplazmatycznych wakuoli, jak również poszerzenia i degeneracje organelli, odcinków niezmielinizowanych i zmielinizowanych aksonów. W powiększeniach 1000—1200 × (mikroskop fazowo-kontrastowy), Taraszewska obserwowała także liczne typowe sferoidy. Na znaczniejsze uszkodzenie *paleostriatum* wskazuje również obecność zwapnień neuronalnych, znalezionych w 33 z 60 przypadków (55%), w tym w 18 przypadkach w gałce bladej (54,5%), w 3 przypadkach w *neostriatum* poza tym głównie w tworze siatkowatym pnia mózgu. Nie uważamy wprowadzie śródneuronalnego odkładania się związków wapnia za podstawowe



Ryc. 4. a. Istota czarna. Tigroglia i zmiany sklerotyczne, mało charakterystyczne w części zbitej. Zwapnienie widoczne w górnej części ryciny należy już do tworów siatkowatego śródmózgowia. b. Królik z przeżyciem przedłużonym powyżej 1 roku. Stosunkowo małe zaniki neuronalne w części zbitej istoty czarnej. a-b. Fiolet kryzylu. Pow. 200 \times . c. Stosunkowo rzadko spotykany w istocie czarnej obraz neuronu z „pustym” jądrem. d. Część siatkowa istoty czarnej. Neuron z typowym obrazem sklerotycznego obkurczenia i wydłużenia, powyżej niego zwapnienie neuro-aksonalne, wyjątkowo spotykane w istocie czarnej. c-d. Fiolet kryzylu. Pow. 400 \times .

Fig. 4 a. *Substantia nigra*. Tigroglia and uncharacteristic sclerotic changes in the *pars compacta*. Calcification in the upper part of figure belongs to the reticular formation. b. The rabbit with survival over one year. The relatively scarce loss of neurons in *pars compacta* of *substantia nigra*. a-b. Cresyl violet. \times 200. c. Neuron with „empty nucleus” from *pars compacta* of *substantia nigra*. d. Reticular part of *substantia nigra*. Neuron with typical cellular sclerosis, shrunken and elongated, above-neuroaxonal calcification, extremely rarely seen in *substantia nigra*, c-d. Cresyl violet. \times 400.

ogniwo przyczynowe zakłócenia metabolizmu w układzie nerwowym królika *pt*, ale przyjmujemy to zjawisko jako kolejną „strzałkę” wskazującą na szlak tropienia podstawowych zaburzeń (Osetowska i wsp., 1976). Abstrahując chwilowo od zaburzeń przemiany, zatrzymamy się na możliwych implikacjach uszkodzenia gałki bladej w zespole *pt*. Drżenia typu parkinsonoidalnego nie otrzymano nigdy w doświadczalnych uszkodzeniach gałki bladej. Destrukcja stereotaktyczna gałki bladej u parkinsoników oraz w warunkach doświadczalnych powodowała zmniejszenie drżeń, jak również sztywności parkinsonoidalnej (Kaada, 1963). Martin (1965) na podstawie analizy kliniczno-neuropatologicznej 9 przypadków parkinsonizmu pozapalnego (po epidemii sprzed lat 40) uważa, że uszkodzenia gałki bladej w tym zespole powodują utratę współruchów postawy („postural reflexes”) i są odpowiedzialne za „objawy negatywne” parkinsonizmu, natomiast nie można im przypisać ani drżeń ani sztywności. Interpretacje Martin’a znalazły nieoczekiwane poparcie w badaniach doświadczalnych Matsunami i Cohena (1975) nad wyładowaniami w poszczególnych neuronach gałki bladej i jądra ogoniastego wywołanymi przez pobudzenie jądra przedścionkowego i drogi piramidowej u prymatów. Neurony jądra ogoniastego i gałki bladej działają razem jako jednostka funkcjonalna kontrolująca ruch powstający z impulsu korowego; równocześnie jednak połączenia somatyczne doprowadzające („afferent feed back”) mogą wyzwolić aktywność w zwojach podstawy w wyniku ruchu wywołanego obwodowo.

Taka rola gałki bladej koreluje dość dobrze z przebiegiem klinicznym zespołu *pt* i opisanymi wyżej uszkodzeniami. Zmiany neuronalne i zwapnienia w gałce bladej obserwowaliśmy także we wspomnianych wyżej przypadkach, w których faza drżeń została zredukowana do 1—2 dni; w innych przypadkach drżenia zmniejszają się wyraźnie lub zanikają po ustaleniu masywnych porażen. Eliminując gałkę bladą jako ośrodek odpowiedzialny za powstanie drżeń, nie mamy dostatecznych danych, ażeby wytłumaczyć jej rolę w niedowładach spastycznych. Połączenia korowo-rdzeniowe, odpowiadające drogom piramidowym u królików wyczerpują się na poziomie wysokiego rdzenia szyjnego i to w sznurach tylnych (Gerhard, 1968). Uszkodzenie tych dróg praktycznie nie ma wpływu na normalne ruchy królika. Natomiast niewątpliwie istnieją niższe połączenia tworzącego siatkowatego śródmózgowia, mostu i opuszki z neuronami rdzeniowymi. Odpowiednio włókna odprowadzające gałki bladej rzutują szeroko na jądra wzgórza oraz na nakrywkę śródmózgowia, gdzie dochodzą do dużych komórek tworzącego siatkowatego (Mehler, Nauta, 1974). Twór siatkowaty pnia stanowi u królika *pt* miejsce najczęstszej lokalizacji rozrzuconych na dużej przestrzeni zwapnień neuro-

aksonalnych, których wymiary sugerują bardzo często związki z dużymi neuronami. Natomiast inna projekcja gałki bladej tworząca zamknięty obwód ruchowy u małp-primatów mogłaby stanowić punkt specjalnego zainteresowania w naszym temacie: krótki zamknięty obwód podkorowy: część boczna gałki bladej (nie wyróżnicowana u królika) — jądro niskowzgórzowe — część środkowa gałki bladej, stanowi drogę, której wszystkie trzy komponenty są wybiórczo wrażliwe na doświadczalne zatrucia manganem, wywołujące między innymi parkinsonopodobne drżenia (Osetowska, 1971; Papavasiliou i wsp., 1975). Do analizy morfologicznej jądra niskowzgórzowego i jego połączeń powrócimy w następnych pracach. Połączenia nadrzędne *neostriatum* z gałką bladą są dobrze znane zarówno u człowieka, jak i u zwierząt doświadczalnych. Z badań morfometryczno-statystycznych Thörner'a i wsp. (1975) wynika, że ogólna ilość komórek gałki bladej u człowieka odpowiada przeciętnie ilości dużych neuronów prądkowia. Stwierdzenie to można przyjąć jako wykładnik współdziałania obu układów także i u zwierząt doświadczalnych. Nie można jednak przenosić go bezwzględnie na królika jeżeli uwzględni się różnice w wymiarach neuronów różnych ugrupowań gałki bladej królika, przy równoczesnym braku podziału cytomieloarchitektonicznego gałki bladej na część boczną i przyśrodkową. Wiadomo, że *neostriatum* królika zawiera endogenną dopaminę, a poziom jej w jądrze ogoniastym jest wyższy niż w skorupie oraz że znaczna ilość włókien nie-dopaminergicznych pochodzących z torebki wewnętrznej przechodzi do skorupy z pominięciem jądra ogoniastego. Udział tych włókien o nieznannej czynności może tłumaczyć niższe poziomy dopaminy w skorupie królika (Tennyson i wsp., 1972). Skądinąd zachodzi różnica w interpretacji przebiegu włókien prądków istoty czarnej, w której Gerhard umieszcza włókna nigro-pallidalne i pallido-nigralne. Według Hasslera (1974) u primatów dwukierunkowe drogi łączą z istotą czarną zarówno jądro ogoniaste jak i skorupę ale nie gałkę bladą. Drogi od istoty czarnej do obu części *neostriatum* są dopaminergiczne, podczas gdy drogi od *neostriatum* do istoty czarnej są przenośnikami GABA (gamma-aminobutyric acid), działającego jako neurotransmitter hamujący czynności ośrodkowego układu nerwowego u ssaków. Kolaterale zarówno od jądra ogoniastego jak i od skorupy przenoszą GABA do gałki bladej, w której osiąga on wysoki poziom (Kanazawa, Toyokura, 1974).

Jakkolwiek w naszym materiale neurony *neostriatum* wykazują wyraźne cechy uszkodzenia, są one mniej nasilone niż uszkodzenia w gałce bladej. Jeszcze mniej uszkodzeń wykazuje istota czarna. Uszkodzenia doświadczalne zarówno *neostriatum* jak i *substantia nigra* nie dawały również drżeń parkinsonopodobnych (Kaada, 1963), natomiast obniżenie poziomu dopaminy w *neostriatum* uzależnione od destrukcji istoty czar-

nej ma powodować akinezję i sztywność (Fahn i wsp., 1971), dwa objawy nie występujące u królika *pt*. Związki uszkodzonego *neostriatum* z jeszcze mocniej uszkodzoną gałką bładą wydają się więc współuczestniczyć przede wszystkim w rozwoju niedowładów i porażen spastycznych zespołu *pt*. Charakter tego oddziaływania nie jest jasny, wydaje się jednak wykluczać wszystkie trzy przebadane kompleksy jądrowe z udziału w powstawaniu drżeń.

Do wstępnych wyników dotyczących przemiany dopaminy w stadzie *pt* powrócimy w następnej pracy tego cyklu.

WNIOSKI

Przedstawione powyżej badania dają się streścić w dwóch wnioskach końcowych.

1) W fazach objawowych choroby u królika *pt* największe uszkodzenia wykazuje *pallidum*, mniej nasilone *neostriatum*, stosunkowo najmniej uszkodzona jest *substantia nigra*.

2) Zarówno uszkodzenia *pallidum* jak i *neostriatum* wskazują na ich związek z występowaniem niedowładów i bezwładów spastycznych.

Żadna z trzech przebadanych morfologicznie struktur nie wykazuje wyraźniejszych korelacji z występowaniem i nasilaniem się drżeń parkinsonopodobnych u królika *pt*.

E. Osetowska, Ф. Лушавски, Я. Савицки

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *pt* НА РАЗЛИЧНЫЕ ЗВЕНЬЯ „ЗАМКНУТЫХ” ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ

I. Патоморфология *neostriatum*, *paleostriatum* и *substantia nigra*

Резюме

Главной целью второго цикла исследований, проводимых на сравнительной модели кролика *pt*, является установление анатомической основы паркинсоноподобных дрожаний. Исследования *striatum* и *substantia nigra* проведены на прерывистой серии срезов, полученных из мозга 60 кроликов, в том числе 45 случаев с острым течением, 8 с подострым и 7 с хроническим течением, с обострениями. Установлены наибольшие повреждения в *pallidum*, меньше в *neostriatum*. Наименее поврежденной была *substantia nigra*. Корреляция морфологических результатов с клиническим течением и литературными данными указывают на возможную связь обнаруженных повреждений со вторым симптомом синдрома *pt*, неполным спастическим параличом. Эти повреждения не удается, однако, связать с паркинсоноподобными дрожаниями.

E. Osetowska, F. Luszawski, J. Sawicki

THE EFFECT OF *pt*-MUTATION ON VARIOUS LINKS OF THE „CLOSED”
MOTORIC CIRCUITSI. Pathomorphology of the neostriatum, paleostriatum and substantia nigra
in the *pt*-rabbits

Summary

The principal purpose of the second research cycle on the *pt*-rabbit's comparative model (hereditary paralytic tremor) is to establish the anatomical basis of the Parkinsonian-like tremor, the main symptom of this hereditary disease. In presented paper, first of the cycle, the investigations were carried out on 45 cases with acute course, 8 with subacute, 7 with chronic, recurrent course of the disease. Semicontinuous histologic sections concerned striatum and substantia nigra. The most impaired structure was pallidum; more discrete changes were manifested in neostriatum and in substantia nigra. The clinico-anatomical correlations and the pertinent references relate these changes rather in conjunction with spastic motoric paresis (second clinical symptom) than with the rhythmical, Parkinsonian-like tremor.

PIŚMIENNICTWO

1. Brodal A.: Some data and perspectives on the anatomy of the so-called „extrapyramidal system”. Report on 16th Congress of Scandinavian Neurologists. Munksgaard, Copenhagen 1963, 17—38.
2. Czarторыska B., Wald I., Taraszewska A.: VIII. Lipidy mózgu królika *pt*. Neuropat. Pol., 1976, 14, 265—272.
3. Fahn S., Libisch L. R., Cutler R. W.: Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea and tremor. J. Neurol. Sci., 1971, 14, 427—455.
4. Gerhard L.: Atlas des Mittel- und Zwischenhirns des Kaninchens. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968.
5. Hassler R.: Fiber connections within the extrapyramidal system. Confin. Neurol., 1974, 36, 237—255.
6. Kaada B. R.: The pathophysiology of Parkinsonian tremor, rigidity and hypokinesia. Report on 16th Congress of Scandinavian Neurologists. Munksgaard, Copenhagen, 1963, 39—51.
7. Kanazawa I., Toyokura Y.: Quantitative histochemistry of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the human substantia nigra and globus pallidus. Confin. Neurol., 1974, 36, 273—281.
8. Lindsey J. R., Fox R. R.: The biology of the laboratory rabbit, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1974.
9. Martin J. P.: The globus pallidus in post-encephalitic Parkinsonism. J. Neurol. Sci., 1965, 2, 344—365.
10. Matsunami K., Cohen B.: Afferent modulation of unit activity in globus pallidus and caudate nucleus: changes induced by vestibular nucleus and pyramidal tract stimulation. Brain Res., 1975, 91, 140—146.
11. Mehler W. R., Nauta W. J. H.: Connections of the basal ganglia and of the cerebellum. Confin. Neurol., 1974, 36, 205—222.

12. Osetowska E.: Metals. W: „Pathology of the nervous system” Ed.: J. Minckler Mc Graw Hill Inc. New York, 1971, Vol. II, 1644—1651.
13. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Badania doświadczalne nad chorobą dziedziczną ośrodkowego układu nerwowego na modelu królika *pt.* V. Obraz kliniczny w pokoleniach I—X. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1975a, 9, 578—596.
14. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: II. Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika *pt.* *Neuropat. Pol.*, 1975b, 13, 71—86.
15. Osetowska E., Luszawski F.: X. Zmiany starcze w mózgu królika zdrowego i w mózgu królika *pt.* *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 253—264.
16. Osetowska E., Taraszewska A., Luszawski F.: VI. Występowanie zwapnień neuronalnych u królika *pt.* w zależności od wieku i przebiegu klinicznego. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 85—95.
17. Papavasiliou P. S., Miller S. T., Cotzias G. C., Kraner H. V., Hsieh R. S.: Sequential Analysis: manganese, catecholamines and L-Dopa induced dyskinesia. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 215—219.
18. Taraszewska A., Osetowska E.: IV. Zmiany w mózgu królika *pt.* w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 283—290.
19. Taraszewska A., Osetowska E., Krücke W.: IX. Elektronenmikroskopische Untersuchung der intrazerebralen Verkalkungen bei dem erblichen paralytischen Tremor der *pt.*-Kaninchen. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 332—336.
20. Taraszewska A.: Badania ultrastruktury ośrodkowego układu nerwowego królika *pt.* w różnych okresach choroby (w przygotowaniu).
21. Tennyson V., Barret R. E., Cohen G., Coté L., Heikkila R., Mytilineou C.: The developing neostriatum of the rabbit: correlation of fluorescence histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels and (3H) uptake. *Brain Res.* 1972, 46, 251—285.
22. Thörner G., Lange H., Hopf A.: Morphometrisch-statistische strukturelle Analysen des Striatum, Pallidum und Nucleus Subthalamicus beim Menschen. II. Pallidum. *J. Hirnforsch.*, 1975, 16, 404—413.
23. Wald I., Wehr H., Harmak E., Albert K., Sawicki J.: VII. Niektóre wskaźniki biochemiczne w surowicy krwi u królika *pt.* *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 97—104.

Adres autorów: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMDiK PAN, 05-300 Mińsk Mazowiecki, ul. Warszawska 126 a.

STANISŁAW KRAJEWSKI, TOMASZ MICHALAK

BADANIA IMMUNOMORFOLOGICZNE SPLOTÓW NACZYNIÓWKOWYCH U LUDZI

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Zakład Immunopatologii Państwowego Zakładu Higieny

Kierownik Zakładu: prof. dr A. Nowosławski

Splot naczyńnkowy ze względu na duże podobieństwo strukturalne (Kefalides, Denduchis 1969) i antygenowe (McIntosh i wsp. 1975), oraz zbliżoną funkcję do kłębka nerkowego, stał się w ostatnich latach przedmiotem licznych badań immunomorfologicznych mających na celu identyfikację odkładanych, w przebiegu chorób o podłożu immunologicznym, kompleksów antygen-przeciwciała. Stwierdzono, że zdeponowane kompleksy immunologiczne mogą równolegle prowadzić do uszkodzenia kłębków nerkowych i splotu naczyńnkowego (McIntosh, Koss 1974), wskutek aktywizacji dopełniaczowo-zależnych mechanizmów litycznych (Dixon 1963).

Dotychczasowe badania udowodniły udział kompleksów antygen-przeciwciała w patogenezie zmian w kłębkach nerek i naczyniach w przebiegu niektórych chorób zwierząt i człowieka. Kompleksemię i zdeponowane kompleksy immunologiczne w tkankach wykryto u myszy zakażonych wirusem limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (Oldstone, Dixon 1967, Oldstone, Lampert 1973), wirusem dehydrogenazy mleczanowej (Porter, Porter 1971) i w mięsaku Moloney'a (Hirsh i wsp. 1969), u nerek zakażonych wirusem choroby aleuckiej (Porter i wsp. 1969), w zakaźnej niedokrwistości koni (Banks, Henson 1969) oraz w ostrej i przewlekłej chorobie posurowiczej u królików (Germuth i wsp. 1967, Koss i wsp. 1973; Brentiens i wsp. 1974).

W patologii ludzkiej złogi kompleksów immunologicznych zidentyfikowano w podoстрыm stwardniającym zapaleniu mózgu (LESS) (Dayan, Stokes 1972, Oldstone i wsp. 1975), w mononukleozie zakaźnej i chłoniaku Burkitt'a w zakażeniu wirusem Ebstein-Barr'a (Makojima i wsp. 1973), w nerkach i w naczyniach krwionośnych u chorych na wirusowe

zapalenie wątroby typu B (Nowosławski i wsp. 1972), w nerakch i splocie naczyńniówkowym u chorych z toczniem układowym rumieniowatym (SLE) (Atkins i wsp. 1972), w chorobach autoimmunizacyjnych — w zapaleniu nerek (McIntosh i wsp. 1975; Ozawa i wsp. 1976; Micanovic i wsp. 1976), w płynie i w tkance łącznej w przewlekłej chorobie reumatycznej (Natvig i wsp. 1974).

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było ustalenie w nie-selekcjonowanych przypadkach sekcyjnych, częstości występowania złożów IgG, IgM, IgA, włóknika i dopełniacza w splocie naczyńniówkowym ludzi.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na splotach naczyńniówkowych z komór bocznych mózgow dzieci (11 przypadków) i ludzi dorosłych (11 przypadków), które pobierano podczas rutynowo wykonywanych autopsji, w 17 — 36 godzin po śmierci. Wiek zmarłych w grupie dzieci zamykał się w granicach od 6 dni do 7 lat, w grupie dorosłych od 55 do 75 lat. Dane dotyczące płci, wieku chorych, podstawowego procesu chorobowego i przyczyny zgonu przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Pobrany materiał dzielono na dwie części, z których jedną przeznaczoną do badań morfologicznych utrwalano w buforowanej 10% formalinie (pH 7,4) i barwiono hematoksyliną-eozyną.

Materiał przeznaczony do badań immunofluorescencyjnych zamrażano w eterze naftowym oziębionym do -80°C w mieszaninie acetonu i suchego lodu. Kriostatowe skrawki po dokładnym wysuszeniu i utrwaleniu w acetonie, płukano przez 1 godz. w PBS, następnie inkubowano w komorze wilgotnej przez 30 minut ze zwierzęcymi globulinami przeciwko ludzkim immunoglobulinom (IgG, IgM, IgA), składnikowi C'3 dopełniacza i włóknikowi, znakowanymi izotiocjanianem fluoresceiny (FITC) (Clark, Shepard 1963). W czterech przypadkach (4, 6, 14 i 20) skrawki skrojone z zamrożonych bloków poddano elucji przy użyciu 0,15 M buforu glicyna-HCL, pH 2,2, posiadającego właściwości dysocjowania kompleksów immunologicznych (Brzosko 1966). Skrawki po wysuszeniu w temperaturze pokojowej płukano przez 1 godzinę w soli fizjologicznej buforowanej buforem fosforanowym o pH 7,6 (PBS), po czym zanurzano w buforze glicyna-HCL i płukano przez okres 2 godzin w temperaturze pokojowej na mieszadle elektromagnetycznym. Następnie skrawki płukano w dwóch zmianach PBS przez 5 minut i barwiono odczynnikami immunohistochemicznymi przeciwko ludzkiej IgG, IgM, IgA, komponentowi C'3 dopełniacza oraz włóknikowi.

Tabela 1. Dane kliniczne przypadków i zmiany anatomopatologiczne w splotach naczyńiówkowych dzieci

Nr przyp.	Wiek, płeć, rozpoznanie	Zmiany komórek nabłonka			Zmiany zrębu				
		Zwyrodnienie ziarnisto-wod- niczkowe	Obrzęk komórek wodniczki	Ścieńczenie, de- zintegracja, ubytki komórek	Obrzęk	Ciała piasz- czakowate	Nacieki	Zmiany naczyn	
								Włóknienie, pogrubienie ścian	Zastój
1.	7,5 lat, Ż. Choroba hodowców ptaków, zwłóknienie płuc	+	—	—	—	—	+	—	+
2.	6 tyg., Ż. Mnogie wady wrodzone	++	—	+	+	—	++ lipofagi i makrof.	+	++
3.	6 dni, M. Niewydolność krążeniowo- oddechowa	++	+	++	++ zmiany krwotocz.	—	++ leuk. lipofagi	+	+++
4.	4/12, M. Zachłyśnięcie, zapalenie płuc	++	+	++	—	—	—	—	+
5.	5/12, M. Zapalenie płuc, posocznica	+++	++	+	—	—	+	+	++
6.	2 tyg., M. Zapalenie płuc, zatrzymanie akcji serca, bezmocz, rozmiękanie mózgu	+++	+++	+++	++ wynaczynie- nie	—	++ leuk. limf. makrofagi	+	+++
7.	10 dni, Ż. Wrodzona wada serca	+++	++	++	—	—	++ leuk. limf. makrofagi	+	+++
8.	4/12, Ż. Niewydolność krążeniowo-odde- chowa po zachłyśnięciu	+++	+	++	++	+	+	+	++
9.	6 tyg., M. Wada serca	+	—	—	+	—	+	—	—
10.	10 dni, M. Toksemia, niedrożność jelit po zabiegu, zapalenie płuc	++	+	++	++	—	+	—	++
11.	4/12, M. Zapalenie ropne mózgu i opon, po- socznica	+++	++	++	+++	+	+	++	—

Tabela 2. Dane kliniczne i zmiany anatomopatologiczne w splotach naczyniówkowych od osób dorosłych

Nr przyp.	Wiek, płeć, rozpoznanie	Zmiany komórek nabłonka			Zmiany zrębu					Zmiany naczyń		
		Zwyrodnienie ziarnisto-wodnicz-kowe	Obrzęk komórek, wodniczki	Ścieńczenie, dezintegracja, ubytki komórek	Obrzęk	Rozplem komórek zrębu	Szkliwienie homogenizacja	Ciała piaszczakowate Pseudowapń(Ca)	Nacieki	Włóknienie pogrubienie ścian	Zastój	Ca
12.	Lat 55, M. Ropne zapalenie nerek, The płuc	++	—	++	—	—	+++	+++	+ leuk. makrofagi	+++	++	+
13.	Lat 69, M. Zapalenie odoskrzelowe płuc, miokardiopatia	—	+	—	—	—	+	+	—	+	++	+
14.	Lat 63, K. Mnogie przerzuty nowotw.	++	—	+	—	—	++	++	+ limf. leuk.	+++	—	+
15.	Lat 71, M. Przewlekłe serce płucne, krwawienie z przewodu pokarmowego	++	+	+++	—	++	+—	+++ Ca	+ limf.	++	—	++
16.	Lat 74, K. Zawał serca, zapalenie otrzewnej	+++	++	+	—	+	+	++ Ca	+ leuk.	++	—	++
17.	Lat. 75, K. Zawał serca	+	++	+	++	—	—	+	—	++	—	—
18.	Lat 69, K. Wada serca	+	++	+	+	+	+	+	—	++	—	++
19.	Lat 72, M. Zapalenie płuc	+	++	++	++	—	+++	+ Ca	—	++	—	++
20.	Lat 68, K. Cukrzyca, zapalenie płuc, wylew podpałęczyn.	+	++	++	+—	++	+	+ Ca	—	++	—	+
21.	Lat 69, K. Zator tętnicy płucnej	+	+	+++	+	—	++	+ Ca	—	+++	—	++
22.	Lat 69, K. Mocznicza	+	++	++	—	—	+	+	+ limf. leuk.	++	—	++

Kontrolę swoistości dysocjującego działania użytego buforu stanowiło barwienie skrawków niepłukanych i płukanych w PBS przez okres 3 godzin. Ocenę preparatów przeprowadzano w mikroskopie fluorescencyjnym „Ortholux” firmy Leitz.

WYNIKI

Grupa 1. Sploty naczyńńwkowe u dzieci

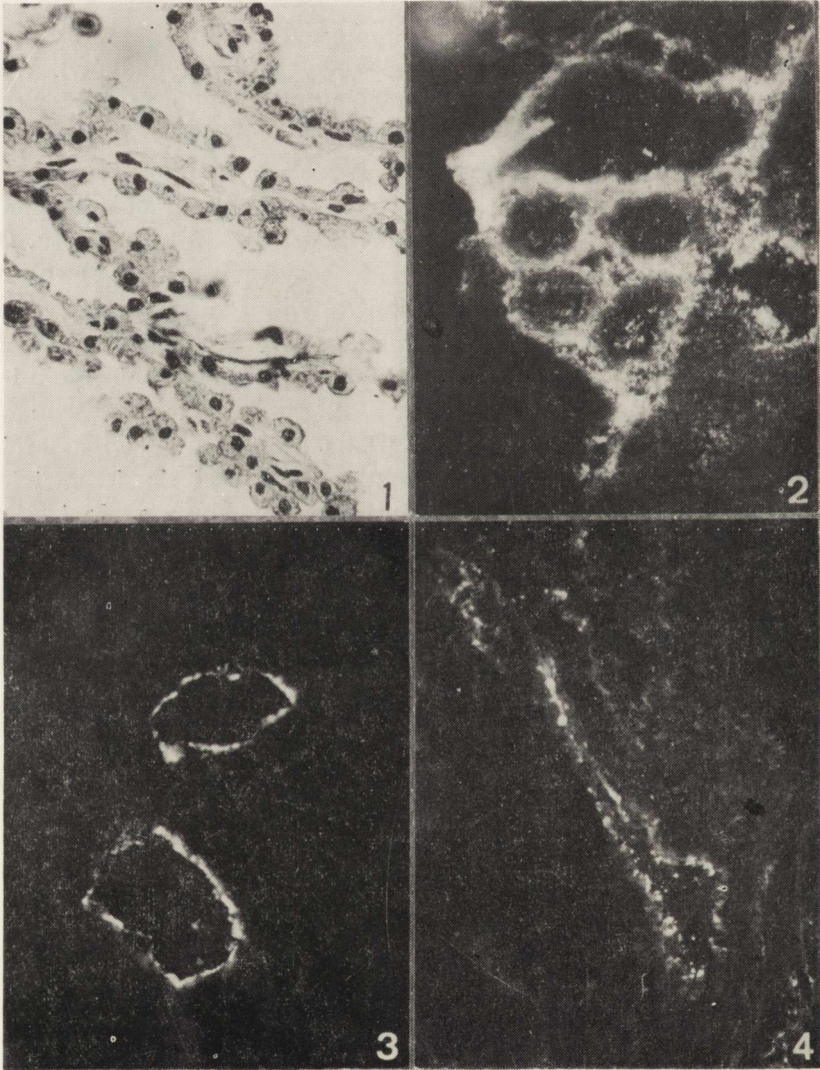
We wszystkich przypadkach stwierdzano w badaniu morfologicznym zwyrodnienie ziarnisto-wodniczkowe cytoplazmy komórek nabłonka splotu (ryc. 1). Nasilenie zmian w poszczególnych splotach było różne. Niekiedy obserwowano znaczne obrzmienie cytoplazmy komórek z przemieszczeniem ku obwodowi jąder komórkowych (6 przypadków). W licznych przypadkach (9) spotykano również ubytki komórek nabłonka lub jego ścieńczenie. W 3 przypadkach stwierdzono wynaczynienia do zrębu splotu z rozbiórką makrofagową i w 2 z nich obecność ziaren hemosyderyny. W jednym przypadku występowały makrofagi obładowane hemosyderyną, co przemawiało za przebytem krwotokiem do splotu. Objawy zastoju z nadmiernym wypełnieniem naczyń krwionośnych, obecnością pojedynczych limfocytów lub leukocytów w ich otoczeniu obserwowano w 9 przypadkach. W trzech splotach stwierdzono zmiany obrzękowe, wyrażające się poszerzeniem przestrzeni okołonaczyńńowych i rozluźnieniem zrębu okołonaczyńńowego. W 2 przypadkach obecne były zmiany w strukturze naczyń splotu. Błona środkowa w większości naczyń była pogrubiała, zwłókniała, a śródbłonek ulegał rozplemowi i znacznemu obrzmieniu. Sporadycznie spotykano pojedyncze złogi pseudowapnia organizujące się w ciała piaszczakowe.

W badaniach immunomorfologicznych we wszystkich splotach naczyńńwkowych stwierdzono obecność złogów IgG, IgM i włóknika, o zbliżonej lokalizacji i podobnej intensywności fluorescencji.

IgG przepajała intensywnie skrawki w całości. W niektórych spośród nich obserwowano nieliczne złogi, miejscowo akcentujące powierzchnię komórek śródbłonka i występujące w świetle naczyń krwionośnych (ryc. 2). Złogi IgM identyfikowane w komórkach śródbłonka lub na ich powierzchni, nie przekraczały granicy wyznaczonej przez błonę sprężystą wewnętrzną (ryc. 3). Złogów IgA w badanych splotach nie stwierdzono. Włóknik obecny był wyłącznie w świetle naczyń krwionośnych, w postaci drobnoziarnistych lub bryłkowatych złogów (ryc. 4) lub też mas przepajających zakrzepy. Komponent C'3 dopełniacza, występował w ilościach śladowych, jedynie w 2 przypadkach (nr 4 i 6) jego lokalizacja była podobna do rozmieszczenia złogów IgM i włóknika (ryc. 5).

Grupa 2. Sploty naczyniówkowe u dorosłych

W każdym z badanych przypadków stwierdzano zmiany w obrazie morfologicznym komórek nabłonka. Miały one cechy zwyrodnienia ziarnisto-wodniczkowego, wakuolizacji, ścięczenia, a przy większym nasileniu procesu — dezintegracji komórek. W 4 przypadkach występowało rozluźnienie struktury zrębu z rozsunięciem włókien łącznotkankowych, świadczące o obrzęku podścieliska. Wokół niektórych naczyń krwionośnych spotykano pojedyncze leukocyty i limfocyty (5 przypadków) oraz makrofagi (1 przypadek). W odróżnieniu od splotów dziecięcych sploty



naczyniówkowe osób dorosłych zawierały liczne ciała piaszczakowate (ryc. 6). Występowały w nich również zmiany zwyrodnieniowe ścian naczyń, w postaci zwłóknienia, szkliwienia błony środkowej i przydanki, które często inkrustowane były złoгами pseudowapnia. W zrębie obserwowano rozplem komórek tkanki łącznej lub zwłóknienie, bądź też struktura włókien bywała zatarta w wyniku ich zeszkliwienia.

Obraz immunofluorescencyjny IgG i IgM w splotach osób dorosłych w zasadzie nie różnił się od opisanego w splotach u dzieci. Nie stwierdzono również złożeń IgA. Odrębności w stosunku do materiału dziecięcego polegały na intensywnej i bardziej rozległej autofluorescencji błon sprężystych ścian naczyń oraz włókien sprężystych tkanki łącznej zrębu (ryc. 7, 8). Ponadto występowała brązowawo-żółta autofluorescencja komórek wyściółki. Fluorescencja włókniaka była śladowa. Dodatkowym elementem zidentyfikowanym w 2 spośród badanych przypadków (nr 14, 21) były kuliste twory, wykazujące silną autofluorescencję, impregnowane IgG, a w jednym przypadku (nr 14) również komponentem C'3 dopełniacza. W tym samym przypadku (nr 14) zlokalizowano bryłkowate złoże komponentu C'3 dopełniacza w ścianach i świetle drobnych naczyń krwionośnych splotu.

Plukanie skrawków grupy 1 i 2 w PBS (jedno- i trzygodzinne) prowadziło do niewielkiego spadku intensywności fluorescencji złożeń immunoglobulin, komponentu C'3 dopełniacza i włókniaka w zrębie i ścianach naczyń. Wypłukiwały się natomiast złoże zlokalizowane w świetle naczyń.

We wszystkich 4 przypadkach (nr 4, 6, 14, 20), których kriostatowe skrawki poddano elucji buforem-glicyna HCl, pH 2,2, po uprzednim 1-godzinnym płukaniu w PBS stwierdzono znaczny spadek intensywności

Ryc. 1. Przypadek nr 1. Zmiany ziarnisto-wodniczkowe w komórkach nabłonka.
HE. Pow. 400 ×.

Fig. 1. Case No 1. Granular, vacuolar changes in the epithelial cells. HE. × 400.

Ryc. 2. Przypadek nr 5. Intensywne przepełnienie IgG ścian naczyń i zrębu. Pow.
400 ×.

Fig. 2. Case No 5. Intense imbition with IgG of vascular walls and stroma.
× 400.

Ryc. 3. Przypadek nr 4. Złoże IgM na powierzchni śródbłonkowej naczyń. Pow.
400 ×.

Fig. 3. Case No 4. Deposits of IgM on the endothelial surface of blood vessels. × 400.

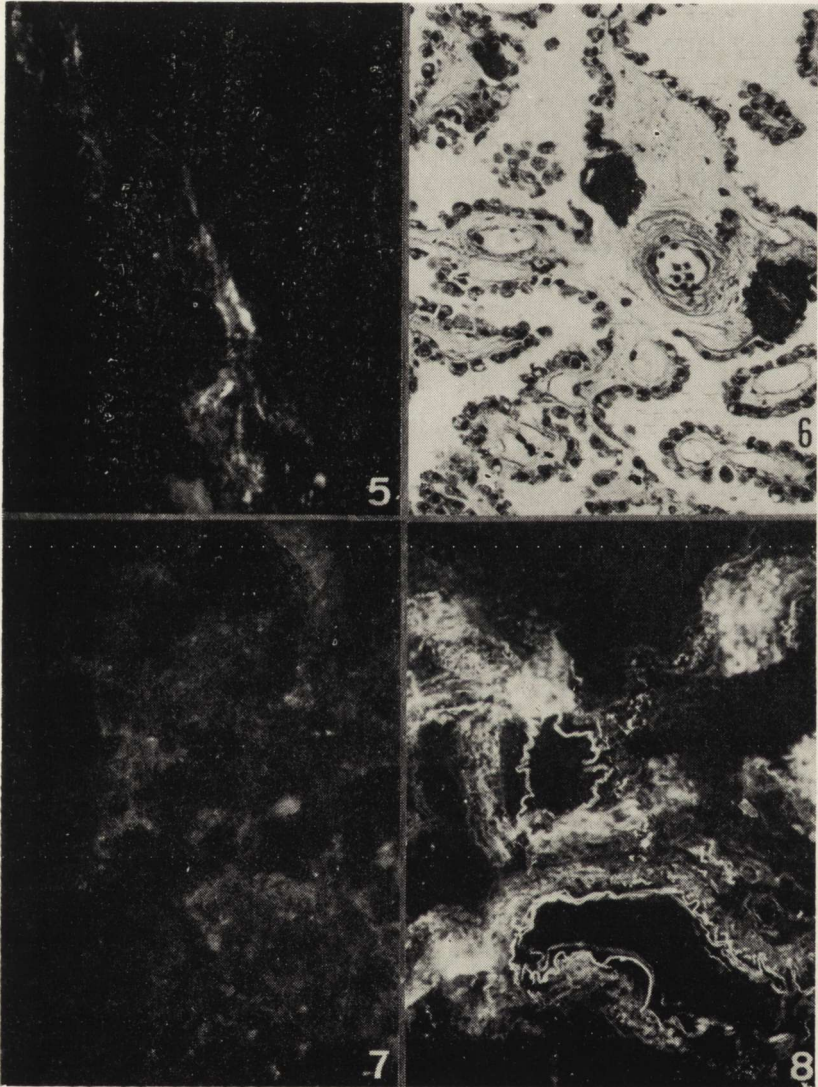
Ryc. 4. Przypadek nr 10. Drobnodziarnista i bryłkowata fluorescencja złożeń włókniaka na powierzchni śródbłonkowej i ogniskowo w ścianie naczyń krwionośnych.
Pow. 400 ×.

Fig. 4. Case No 10. Fine-grained and corpuscular fluorescence of fibrin deposits on the endothelial surface of blood vessels and locally in vascular walls. × 400.

ności fluorescencji złogów immunoglobulin i włókniaka. W 3 spośród nich (nr 4, 6, 14) nastąpiło całkowite wypłukanie złogów dopełniacza.

OMÓWIENIE

W przedstawionym, nieselekcjonowanym materiale sekcyjnym spłoty naczyniówkowe wykazywały podobny charakter zmian morfologicznych, pomimo różnicy wieku zmarłych i prawdopodobnie działania różnych czynników patogenetycznych (różne przyczyny zgonów). Ogólnie większe nasilenie zmian stwierdzano w przypadkach, w których dane



anamnestyczne wskazywały przebycie choroby zakaźnej. Cechą różniącą najbardziej obraz morfologiczny obu grup splotów była obecność zmian inwolucyjnych komórek nabłonka i zrębu, dominujących w splotach osób dorosłych. Charakteryzowały się one wzmożoną wakuolizacją cytoplazmy, spłaszczeniem i ubytkami komórek nabłonka, rozplemem komórek zrębu, zmianami włóknistymi i szklistymi ścian naczyniowych oraz tkanki łącznej podścieliska, w której spotykano liczne ogniskowe zwapnienia i ciała piaszczakowe. Podobne zmiany opisywali Dunn i Kernohan (1955), wiążąc je z procesami starzenia tkanki. Wydaje się zatem uzasadnione wiązać również z procesami inwolucyjnymi spostrzegany w badaniu immunomorfologicznym wzrost autofluorescencji splotów pochodzących od ludzi dorosłych. Na uwagę zasługuje obecność kulistych tworów spostrzeganych w 2 przypadkach ludzi dorosłych, silnie autofluoryzujących, wyimpregnowanych złogami IgG, a w jednym przypadku dodatkowo komponentu C'3 dopełniacza. Wydaje się, że mogły one odpowiadać ciałom piaszczakowym lub ogniskowym zwapnieniom zrębu. Rzadkie występowanie tego zjawiska w badaniu fluorescencyjnym w stosunku do ich częstości w preparatach histologicznych należy zapewne tłumaczyć możliwością wypłukania ciał piaszczakowych przy technicznym opracowywaniu materiału.

Zespół zmian morfologicznych, obserwowanych w badanych splotach naczyniówkowych zarówno w grupie dziecięcej jak i u ludzi dorosłych należy zapewne traktować jako wyraz nieswoistej odpowiedzi tkanek splotu na różnego rodzaju czynniki patogenne. Za taką interpretacją przemawiać mogą wyniki badań doświadczalnych Ma i wsp. (1931), któ-

Ryc. 5. Przypadek nr 6. Delikatne złogi komponentu C'3 dopełniacza na powierzchni śródbłonkowej i w ścianie naczynia. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Case No 6. Fine deposits of component C'3 of complement on the endothelial surface and in the vascular wall. × 400.

Ryc. 6. Splot naczyniówkowy osoby dorosłej. Przypadek nr 16. Zwłóknienie zrębu i naczynia krwionośnego. Liczne ciała piaszczakowate. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 6. Choroid plexus of adult person. Case No 16. Fibrosis of stroma and of blood vessel. Numerous psammomatous bodies. HE. × 200.

Ryc. 7. Splot dziecięcy. Przypadek nr 6. Niewielka autofluorescencja tkanki. Pow. 400 ×.

Fig. 7. Choroid plexus of child. Case No 6. Slight autofluorescence of tissue. × 400.

Ryc. 8. Silna autofluorescencja ścian naczyń i zrębu splotu osoby dorosłej. Przypadek nr 20. Pow. 400 ×.

Fig. 8. Strong autofluorescence of the blood vessel walls and of choroid plexus stroma in adult person. Case No 20. × 400.

rzy podając dokomorowo błękit trypanu, powietrze oraz płukane erytrocyty uzyskali obrazy morfologiczne podobne do stwierdzanych w naszym materiale.

Netsky i Shuangshoti (1970) uważają zmiany zwyrodnieniowe komórek nabłonka spłotów za wyraz fizjologicznego, ciągłego procesu dezintegracji części komórek na drodze wydzielania holokrynowego. Być może tym należy tłumaczyć rozpowszechnione w obu grupach wieku zmiany ziarnisto-wodniczkowe, wakuolizację komórek nabłonka i ich ubytki.

Splot naczyńiówkowy ze względu na funkcję filtracyjną i udział w produkcji płynu mózgowo-rdzeniowego, narażony jest na szkodliwe działanie substancji krążących w krwiobiegu. Jego „locus minoris resistentiae” stanowią włosniczki, których budowa ułatwia penetrację różnych substancji do tkanki spłotu. Są to kapilary o dużym przekroju i ścianie zbudowanej z cienkiej błony podstawnej, zasłaniającej pory 30 — 50 nm, między rzadko rozmieszczonymi komórkami śródbłonka (Maxwell, Pease 1956, Netsky, Shuangshoti 1970). Ten typ naczyń występuje w takich strukturach, w których zachodzi intensywny transport płynów, między innymi w kanalikach proksymalnych nerki, w kosmkach jelita, ciałku rzęskowym oka (Dohrmann 1970). Łatwo i szybko przechodzą przez nie substancje wielkocząsteczkowe, takie jak mioglobina i peroksydaza chrzanowa (Becker i wsp. 1967). Davis i Milhorat (1975) stwierdzili jednak, że podany do krążenia ogólnego cytochrom c (związek o mniejszej cząsteczce niż wymienione wyżej białka) w czasie 2 minut przedostaje się do zrębu spłotu naczyńiówkowego nie przechodząc jednak do płynu mózgowo-rdzeniowego ani do części szczytowej komórek nabłonkowych, które są uważane za substrat anatomiczny mechanizmów barierowych spłotu. Degradują one substancje w procesie heterolizy lub czynnie wydzielają do płynu mózgowo-rdzeniowego jak np. IgG w splocie kurczaka w procesie absorpcji (Klatzo i wsp. 1965). Wydaje się, że potwierdzeniem tych zjawisk w badanym materiale może być przepojenie wszystkich spłotów IgG, podczas gdy przepojen IgM, które są cząsteczkami większymi nie spostrzegano.

Struktura włosniczek i funkcja spłotu sprzyjają odkładaniu się krążących kompleksów antygen-przeciwciała, co udowodniono w przypadku tocznia rumieniowatego trzewnego — SLE (Atkins i wsp. 1972, Oldstone, Lampert 1973; Lampert, Oldstone 1973, 1974; Sher, Pertschuk 1974), jak również w zwierzęcym modelu SLE myszy NZB \times W/F₁, u których pojawiają się spontanicznie przeciwciała anty-DNA (Oldstone, Lampert 1973; Lampert, Oldstone 1973, 1974). Złogi IgG i komponentu C'3 dopełniacza stwierdzono zarówno w nerkach jak i splocie naczyńiówkowym w ostrej chorobie posurowiczej (Koss i wsp. 1973). Podobne obrazy osadzonych kompleksów w splocie obserwowano w zakażeniu wirusem limfocy-

tarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (Oldstone, Lampert 1973; Lampert, Oldstone 1974) oraz w antyimmunizacyjnym zapaleniu nerek w zespole Goodpasturea (McIntosh i wsp. 1975).

Kompleksy immunologiczne, aktywując dopełniacz powodują uwalnianie z komórek tłuszcznych i płytek krwi substancji farmakologicznie czynnych, które prowadzą do wzrostu przepuszczalności śródbłónka naczyń krwionośnych (Dixon 1963). Petz i wsp. (1971), Atkins i wsp. (1972) oraz Feely (1976) sugerują, że mechanizm ten jest odpowiedzialny za zmiany w składzie płynu mózgowo-rdzeniowego i występowanie zespołów neurologicznych i psychiatrycznych w przebiegu SLE.

W badanym materiale zjawisko to mogło dotyczyć trzech przypadków (nr 4, 6, 14) w których stwierdzono złogi IgG, IgM i C'3 dopełniacza, występujące najprawdopodobniej w postaci kompleksów immunologicznych, czego pośrednim dowodem są wyniki elucji przy użyciu buforu glicyna — HCl. Brak pełnych danych anamnestycznych i dodatkowych badań immunologicznych nie pozwala na ściślejsze wypowiedzenie się co do etiologii tych złogów, stwierdzonych w przebiegu choroby nowotworowej u 63-letniej kobiety, u 4-miesięcznego dziecka z zachłystowym zapaleniem płuc i u 2-tygodniowego noworodka z zapaleniem płuc i mózgowymi oraz nerkowymi powikłaniami po zatrzymaniu akcji serca. Obserwacje nasze różnią się od spostrzeżeń Atkinsa i wsp. (1972) i Sher i Pertschuka (1974), którzy złogi IgG stwierdzali wyłącznie w przypadkach SLE, nigdy w materiale kontrolnym. W przedstawionym materiale własnym intensywne przepojenie IgG, trwale związane z tkanką, nie ulegające wypłukaniu po jednogodzinnym działaniu PBS, obserwowano we wszystkich przypadkach. Rozbieżności te można tłumaczyć odmiennym doborem materiału.

Spostrzegana lokalizacja złogów immunoglobulin i dopełniacza w badanej serii nieselekcjonowanych przypadków, stanowiąca w założeniu grupę kontrolną, sugeruje udział procesów immunopatologicznych w indukowaniu zmian w tkance spłotów naczyńńwkowych. Przeprowadzenie dalszych badań wydaje się konieczne w celu porównania spektrum spostrzeganych zmian, ze zmianami w przypadkach z udowodnioną obecnością krążących kompleksów antygen-przeciwciała.

С. Краевски, Т. Михалык

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСУДИСТЫХ
СПЛЕТЕНИЙ У ЛЮДЕЙ

Резюме

Проведены иммуноморфологические исследования сосудистых сплетений боковых желудочков мозга с целью установления частоты появления отложений IgA, IgG, IgM, фибрина и комплемента. Источником материала служили неподобранные случаи взрослых людей (11) и детей (11).

В обеих группах установлено зернисто-гидропическое вырождение и набухание цитоплазмы клеток, утончение и потери эпителиальных клеток. В сплетениях у взрослых людей преобладали, кроме того, дегенеративные изменения стенок сосудов, разрастание и гиалинизация соединительной ткани стромы, увеличенное количество песчаноподобных тел и псевдокальциевых отложений.

Иммунофлуоресцентные исследования выявили во всех случаях наличие отложений IgG, IgM, а в трех случаях компонента C'3 комплемента. В строме сплетений, происходящих от взрослых людей, показана усиленная автофлуоресценция, которую можно связывать с установленными процессами старения.

Повсеместное появление отложений IgG и, прежде всего, компонента C'3 комплемента свидетельствует об отложении в ткани сосудистого сплетения иммунологических комплексов и о значительном участии иммунопатологических процессов в различных заболеваниях.

S. Krajewski, T. Michalak

IMMUNOMORPHOLOGICAL STUDIES ON CHOROID PLEXUS IN HUMANS

Summary

Immunomorphological studies were performed on choroid plexus of brain lateral ventricles in purpose to establish the incidence of deposits of IgA, IgG, IgM, fibrin and complement. Investigated material was obtained from nonselected cases of adult humans (11 cases) and children (11). In both groups of cases there was found granular, vacuolar degeneration and swelling of cytoplasm, thinning and loss of epithelial cells. Choroid plexuses taken from adults besides above changes exhibited degenerative alterations of blood vessel walls, proliferation and hyalinization of parenchymal connective tissue, increased number of psammomatous bodies and deposits of pseudocalcium. Immunofluorescence study demonstrated in all the cases the deposits of IgG and IgM, in 3 of them also C'3 component of the complement. Stroma of plexuses obtained from adults manifested increased autofluorescence, which may be connected with established ageing process.

Common incidence of IgG deposits, in particular of component C'3 of complement reflects the deposition of immunological complexes in choroid plexus tissue and the contribution of immunopathological processes in various diseases.

PIŚMIENNICTWO

1. Atkins Ch. J., Kondon J. J., Quismorio F. P., Friou G. J.: The choroid plexus in systemic lupus erythematosus. *Ann. Int. Med.* 1972, 76, 65—72.
2. Banks K., Henson J.: Glomerular deposition of gamma globulin and complement (C'3) in equine infection anemia. *Fed. Proc.* 1969, 28, 752—758.
3. Becker N. H., Novikoff A. D., Zimmerman H. M.: Fine structural observations of the uptake of intravenously injected peroxidase by rat choroid plexus. *J. Histochem.* 1967, 15, 160—165.
4. Brentjens J. R., O'Connell D. W., Pawlowski I. B., Andres G. A.: Extraglomerular lesions associated with deposition of circulating antigen-antibody complexes in kidneys of rabbits with Chronic Serum Sickness. *Clin. Immun. Immunopath.* 1974, 3, 112—126.
5. Brzosko W.: Immunopatologia zapalenia płuc u dzieci wywołanego przez *Pneumocistis carini*. Wyd. PZH. 1966.

6. Clark H. F., Shepard C. C.: A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 1963, 20, 642—644.
7. Davis D. A., Milhorat T. H.: The blood-brain barrier of the rat choroid plexus. *Anat. Rec.* 1975, 181, 779—790.
8. Dayan A. P., Stokes M. J.: Immune complexes and visceral deposits of measles antigen in Subacute Sclerosis Panencephalitis. *Brit. Med. J.* 1972, II, 374—376.
9. Dixon F. J.: The role of antigen-antibody complexes in disease. *Harvey-Lect., Acad. Press Inc. N. Y.* 1963.
10. Dohrmann G. J.: The choroidal plexus: a historical review. *Brain Res.* 1970, 3, 131—173.
11. Dunn J. Jr., Kernohan J. W.: Histologic changes within choroidal plexus of the lateral ventricle: their relation to age. *Proc. Mayo Clin.* 1955, 30, 607—615.
12. Feely R. H.: The neuropsychiatric features of Systemic Lupus Erythematoses. *J. Irish Med. Assoc.* 1976, 69, 29—30.
13. Germuth F. G., Senterfit L. B., Pollack A. D.: Immunocomplexes disease. Experimental acute and chronic glomerulonephritis. *John Hopkins Med. J.* 1967, 120, 225—251.
14. Hirsh M. S., Allison A. C., Harvey J. J.: Immuno complexes in mice infected neonatally with Moloney leukaeniogenic and murine sarcoma viruses. *Nature* 1969, 223, 739—740.
15. Kefalides N. A., Denduchis B.: Structural components of epithelial and endothelial basement membranes. *Biochem.* 1969, 8, 4613—4621.
16. Klatzo I., Wiśniewski H., Smith D. E.: Observations on penetration of serum protein into CNS. *Prog. in Brain Res.* 1965, 15, 73—88.
17. Koss M. N., Chernack W. J., Griswold W. R., McIntosh R. M.: The choroid plexus in Acute Serum Sickness. Morphologic, ultrastructural and immunohistologic studies. *Arch. Path.* 1973, 96, 331—334.
18. Lampert P. W., Oldstone M. B. A.: Host immunoglobulin G and complement deposits in the choroid plexus during spontaneous immune complex disease. *Science* 1973, 186, 408—410.
19. Lampert P. W., Oldstone M. B. A.: Pathology of choroid plexus in spontaneous immune complex disease and chronic viral infections. *Virchow's Arch. A. Path. Anat. Hist.* 1974, 363, 21—32.
20. Ma W. C., Schaltenbrand G., Cheng Y. L.: Zur Pathophysiologie des Plexus Choroideus. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1931, 117—119, 580—584.
21. Makojima T., Gunven P., Klein G.: Circulating EBV — associated antigen-antibody complexes in recurrent Burkitt's lymphoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 1973, 5, 1319—1321.
22. McIntosh R. M., Koss M. M.: The choroid plexus: immunologic injury and disease. *Ann. Int. Med.* 1974, 81, 111—113.
23. McIntosh R. M., Copack P., Chernack W. B., Griswold W. R., Weil R., Koss M. M.: The human choroid plexus and autoimmune nephritis. *Arch. Path.* 1975, 99, 48—51.
24. Maxwell D. S., Pease D. C.: The electron microscopy of the choroid plexus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1956, 2, 467—474.
25. Micanovic M., Rezakovic D., Basagic F., Brkic N.: Endemic (Balkan) nephropathy. *Lancet* 1976, 1, 541.
26. Natvig J. B., Munthe E., Melbye O. J., Koss E.: Studies on the immunology of rheumatoid inflammatory joint tissue. *Arch. Path. Micr. Scand* 1974, 248, 145—150.

27. Netsky M. G., Shuangshoti S.: Studies on the choroid plexus. *Neurosciences Res.* 1970, 3, 131—173.
28. Nowosławski A., Krawczyński K., Brzosko W., Madaliński K.: Tissue localization of Australian antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Amer. J. Path.* 1972, 63, 31—55.
29. Oldstone M. B. A., Dixon F. J.: Lymphocytic choriomeningitis: production of antibody by „tolerant” infected mice. *Science* 1967, 158, 1193—1194.
30. Oldstone M. B. A., Lampert P. W.: Immune complex disease in Chronic Virus Infection: involvement of the choroid plexus. *Adv. Biosci.* 1973, 12, 381—398.
31. Oldstone M. B. A., Bokisch V. A., Dixon F. J.: Subacute Sclerosing Panencephalitis: destruction of human brain cells by antibody and complement in autologous system. *Clin. Immun. Immunopath.* 1975, 4, 52—58.
32. Ozawa T., Mass M. F., Guggenheim St., Strauss J., McIntosh R. M.: Autologue immune complex nephritis associated with sickle cell trait: diagnosis of the haemoglobinopathy after renal structural and immunological studies. *Brit. Med. J.* 1976, 1, 369—371.
33. Petz L. D., Sharp G. C., Cooper N. R., Irvin W. S.: Serum and cerebral spinal fluid complement and serum autoantibodies in systemic Lupus Erythematoses. *Medicine* 1971, 50, 259—275.
34. Porter D., Larsen F., Porter H.: The pathogenesis of Aleutian disease of mink. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigens. *J. Exp. Med.* 1969, 130, 575—594.
35. Porter D., Porter H.: Deposition of immune complexes in the kidneys of mice infected with lactic dehydrogenase virus. *J. Immunol.* 1971, 106, 1264—1266.
36. Sher J. H., Pertschuk L. P.: Immunoglobulin G deposits in the choroid plexus of child with SLE. *J. Pediatr.* 1974, 18, 385—387.

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

JERZY KULCZYCKI, MARIA SZUBIŃSKA-MARLICZ

INTRAMEDULLÄRE KARZINOMETASTASE BEI EINER PATIENTIN MIT SYRINGOMYELIE

Neurologische Klinik der Pommerschen Medizinischen Akademie in Szczecin
Leiter der Klinik: Prof. Dr M. Jarema

Nur selten wurden bis jetzt intramedulläre metastatische Tumoren beschrieben. Die Literaturangaben bis zum Jahre 1972 überschreiten nicht die Zahl von 70 Fällen (Edelson u. Mitarb. 1972). Im Allgemeinen nimmt man jedoch an (Benson 1960, Weitzner 1969, Kawakami u. Mair 1973), dass die intramedullären Metastasen gar nicht so selten seien, sie können jedoch der Aufmerksamkeit entgehen, da die Sektion des Rückenmarks oft nicht ausgeführt wird. In den grösseren Statistiken der letzten Jahre bilden diese Tumoren nur 1,6 bis 3,4% aller Metastasen in's Rückenmark. Meistenfalls sind es metastatische Tumoren des Lungenkarzinoms, in weiterer Reihenfolge dann des Mamma- Colon- und Nierenkarzinoms (Barron u. Mitarb. 1959, Edelson u. Mitarb. 1972).

Das Interesse der Forscher erweckt der Weg, den die Karzinomzellen aus den entfernten Organen in's Nervengewebe des Rückenmarks zurücklegen. Man vermutet hier meistens 4 bis 5 verschiedene: 1) die Arterien, 2) die vertebralen Venen, 3) das Lymphsystem, 4) den Liquor cerebrospinalis (LCS) and 5) die direkte Infiltration der Meningen. Jede zitierte Möglichkeit ist im morphologischen Bilde schwer zu beweisen und besondere Skepsis erweckt die Verbreitung durch den LCS, da nur wenige der primären Hirntumoren sich auf diesem Wege weiterpflanzen (Greenberg u. Mitarb. 1965, Hofheinz 1931). Aus diesem Grunde, so glauben wir annehmen zu dürfen, ist der von uns gesehene Fall beachtungswert.

FALLBERICHT

Die 54 Jahre alte Patientin F. J. litt seit 20 Jahren an sich oft wiederholenden, schmerzosen und nicht heilenden Fingerverletzungen der rechten Hand, was mit Eitern und Abstossen von Knochensequestern verbunden war. 1970 wurde sie in die Neurologischen Klinik stationär aufgenommen, wo auf Grund partieller Empfindungslähmung von C₃ bis Th₅, einer Muskelatrophie der rechten Extremität und Abschwächung

der Tiefenreflexe eine Syringomyelie diagnostiziert wurde. Wegen einer nicht heilenden eitrigen Fistel am Handgelenk wurde der Patientin der rechte Unterarm amputiert. Drei Jahre später hospitalisierte man sie wiederum mit den Symptomen eines Hirntumors. Die Röntgenaufnahmen des Thorax zeigten rechtsseitig einen Lungentumor, wahrscheinlich ein bronchogenes Karzinom. Die Angiographie der Hirngefäße sprach für einen verdrängenden Prozess in der rechten fronto-parieto-temporalen Region. Einige Tage nach der Einweisung in die Klinik verstarb die Patientin.

Die Diagnose des bronchogenen Lungenkarzinoms wurde durch die Obduktion bestätigt. Bei der Zerlegung des Gehirns stelle man einen grossen, von der Umgebung scharf abgegrenzten Tumor körniger und zerfallender Konsistenz fest. Das neoplasmatISChe Infiltrat umfasste das Centrum semiovale der rechten Hirnhemisphäre sowie das Corpus callosum und erreichte das Lumen des Seitenventrikels (Abb. 1). Ein zweiter ähnlicher aber kleinerer Tumor befand sich im rechten Frontalpol. Die Sektion des Rückenmarks erwies längs des Hals- und Thorakalabschnittes eine makroskopisch sichtbare und mit dem Subarachnoidealraum kommunizierende Höhle deren Begrenzung etwas verfärbt war. Sie erstreckte sich über die Region des Zentralkanals, meistens ein wenig seitlich von der Mittellinie, bis zu den Hintersträngen.

Mikroskopisch waren die Hirntumoren aus Epithelialzellen, welche für den Spindelzellenkrebs charakteristisch sind, gebaut (Abb. 2). Die morphologischen Bilder waren mit denen des Lungentumors identisch.

Die Höhle im Hals- und Thorakalmark zeigte histologisch einen fibrogliösen Aufbau der Wände (Abb. 3). Hier fand man auf verschiedenen Schnitthöhen im schwammartigen Gliagewebe oberflächliche Zellinfiltrate (Abb. 4), welche aus den mit den Lungen- und Hirntumoren identischen Spindelkrebszellen gebildet wurden (Abb. 5). Diese Infiltrate tapezierten das Lumen der Höhle aus, oder sie gruppieren sich auch um Blutgefäße. In allen untersuchten Schnitthöhen des Rückenmarks waren diese neoplasmatISChe Zellen auf die Höhlenwände begrenzt; sie infiltrierten nirgends das Nervengewebe sowie auch die Meningen nicht. Frei von den Infiltraten waren auch die tiefer gelegenen Gefäße.

DISKUSION

Die neuropathologische Untersuchung des besprochenen Falles suggeriert intramedulläre neoplasmatISChe Metastasen, welche über den Liquor cerebro-spinalis stattgefunden haben. Die Möglichkeit dieses Weges entstand einerseits durch den Zerfall des mit dem Ventrikel kommunizierenden Hirntumors und andererseits durch die Verbindung der syringomyelischen Höhle mit dem Spatium subarachnoideale.

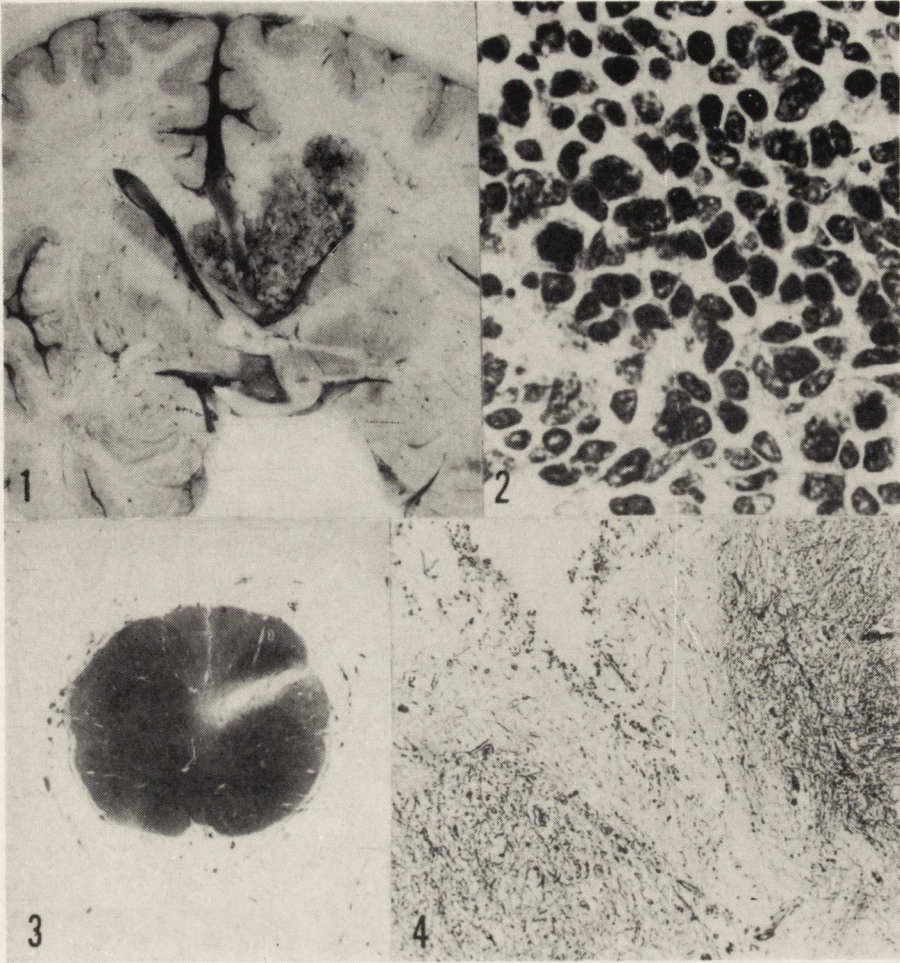


Abb. 1. Karzinommetastase in der rechten Hirnhemisphäre. Der Tumor wächst in's Ventrikelsystem ein.

Ryc. 1. Przerzut raka w prawej półkuli mózgu. Guz wrasta do komory bocznej.

Abb. 2. Histologisches Bild des Tumors von der Abb. 1. H-E. $\times 400$.

Ryc. 2. Obraz histologiczny guza z ryc. 1. H-E. Pow. 400 \times .

Abb. 3. Querschnitt des subbulbären Rückenmarks, wo die syringomyelische Höhle mit dem subarachnoidealen Raum kommuniziert. Heidenhain. $\times 6$.

Ryc. 3. Poprzeczny przekrój rdzenia kręgowego w odcinku podopuszki, w okolicy połączenia światła jamy syringomielicznej z przestrzenią podpajęczynówkową. Heidenhain. Pow. 6 \times .

Abb. 4. Ausschnitt der syringomyelischen Höhle. Auf ihren Wänden sind kleine Zellinfiltrate sichtbar. Heidenhain. $\times 100$.

Ryc. 4. Fragment jamy syringomielicznej. Na powierzchni jej ścian widoczne są drobne nacieki komórkowe. Heidenhain. Pow. 100 \times .

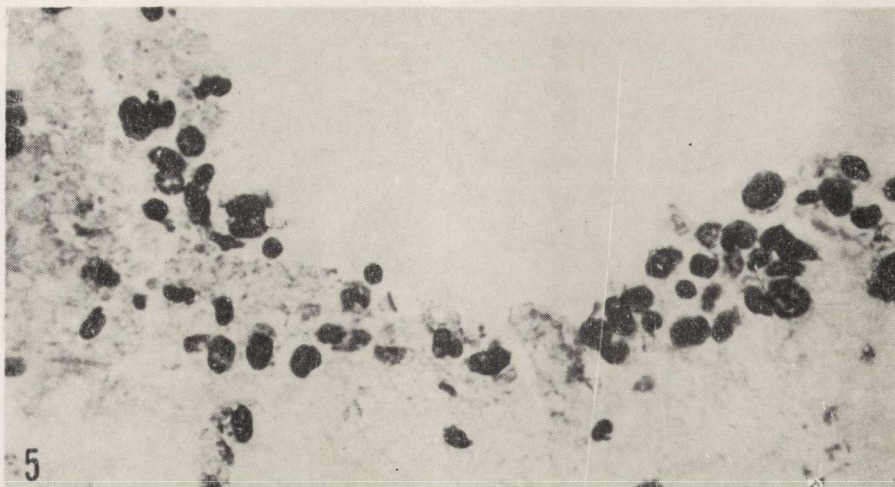


Abb. 5. Neoplasmatische Infiltrate in der Wand der intramedullaren Höhle. H-E. $\times 400$.

Ryc. 5. Nacieki nowotworowe w ścianie jamy śródrzeniowej. H-E. Pow. 400 \times .

Die Entstehung der bronchogenen Hirnmetastasen auf dem Blutwege lässt in unserem Falle keinen Zweifel aufkommen. Die oberflächliche Verteilung der neoplasmatischen Herde in der syringomyelischen Höhle bei fehlenden Tiefeninfiltraten spricht für den Liquorweg. Die weite Verbreitung in den Höhlenwänden lässt in Anbetracht des Fehlens der Infiltrate auf der Oberfläche der Rückenmarks die Vermutung aufkommen, dass der nicht ideal glatte Bau der gliösen Höhlenwand sozusagen einen *Locus minoris resistentiae*, einen anfälligeren Boden für die Implantation der neoplasmatischen Zellen darstellt.

Organische Läsionen des Rückenmarks können, wie es uns scheint die Entstehung und Entwicklung neoplasmatischen Metastasen begünstigen, trotzdem eine Koinzidenz beider Prozesse selten gesichert wird.

J. Kulczycki, M. Szubińska-Marlicz

ŚRÓDRDZENIOWY PRZERZUT RAKA U CHOREJ Z JAMISTOŚCIĄ RDZENIA

Streszczenie

Chora 54-letnia, cierpiąca od 20 lat na jamistość rdzenia, zmarła z powodu guza mózgu. Sekcyjnie stwierdzono raka płuc z przerzutami do prawej półkuli mózgu z częściowym zajęciem układu komorowego. W ścianach jamy syringomielicznej, która miała połączenie z przestrzenią podpajęczynówkową, znaleziono drobne nacieki komórek raka. Obrazy morfologiczne przemawiają za rozsiewem nowotworu na drodze płynu mózgowo-rdzeniowego, a ściany jamy w rdzeniu wydają się być podatnym podłożem dla implantacji przerzutów.

Я. Кульчыцки, М. Шубиньска-Марлич

СПИННОМОЗГОВОЙ МЕТАСТАЗ РАКА У БОЛЬНОЙ СИРИНГОМИЕЛИЕЙ

Резюме

54-летняя больная, в течение 20 лет страдающая сирингомиелией, умерла вследствие опухоли мозга. Секция установила рак легких с метастазами в правом мозговом полушарии с частичным захватом полостной системы. В стенках сирингомиелиновой полости, которая была связана с подпаутинным пространством, найдены мелкие инфильтраты раковых клеток. Морфологические картины свидетельствуют в пользу распространения опухоли путем спинномозговой жидкости, а стены полости в спинном мозге по-видимому являются восприимчивым субстратом для имплантации метастаз.

LITERATUR

1. Barron K. D., Hirano A., Araki S., Terry R. D.: Experiences with metastatic neoplasm involving the spinal cord. *Neurology (Minneap.)*, 1959, 9, 91—106.
2. Benson D. F.: Intramedullary spinal cord metastasis. *Neurology (Minneap.)*, 1960, 10, 281—287.
3. Edelson R. N., Deck M. D., Posner J. B.: Intramedullary spinal cord metastasis. *Neurology (Minneap.)*, 1972, 22, 1222—1231.
4. Greenberg A., Scatliff J. H., Selker R. G., Marschal M. D.: Spinal cord metastasis from bronchogenic carcinoma. *J. Neurosurg.*, 1965, 23, 72—75.
5. Hofheinz G.: Zur Kenntnis der metastatischen Karzinose des Zentralnervensystems, insbesondere des Rückenmarks. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1931, 117, 226—235.
6. Kawakami I., Mair W. G. P.: Haematomyelia due to secondary renal carcinoma. *Acta neuropath. (Berl)*, 1973, 26, 85—92.
7. Weitzner S.: Coexistent intramedullary metastasis and syringomyelia of cervical spinal cord. *Neurology (Minneap.)*, 1969, 19, 674—678.

Адрес автора: I Neurologische Klinik des Psychoneurologischen Institut, Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

KOMUNIKAT

W dniach 6—8 kwietnia 1978 roku odbędzie się w Poznaniu IV Konferencja Neuropatologiczna. Tematem Konferencji będzie:

- 1) Niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego;
- 2) Molekularne i ultrastrukturalne aspekty chorób układu nerwowego;
- 3) Tematy wolne.

Termin zgłaszania uczestnictwa upływa dnia 31 sierpnia 1977 r.

Termin nadsyłania streszczeń referatów — 31 grudnia 1977 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego Konferencji: Klinika Neurologiczna A.M., ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

KOMUNIKAT

W dniach 24 — 29 września 1978 r. odbędzie się w Waszyngtonie VIII Międzynarodowy Kongres Neuropatologów.

Zgłoszenie uczestnictwa w Kongresie należy przesyłać na adres Komitetu Organizacyjnego Kongresu: Henry de Forest Webster, M.D. Building 36, Room 4D-04. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 20014. U.S.A.

PIOTR RUSZCZEWSKI

NEUROREGULACJA MÓZGOWEGO PRZEPŁYWU KRWI
A WPŁYW NIEKTÓRYCH SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE CZYNNYCHPracownia Krążenia Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk

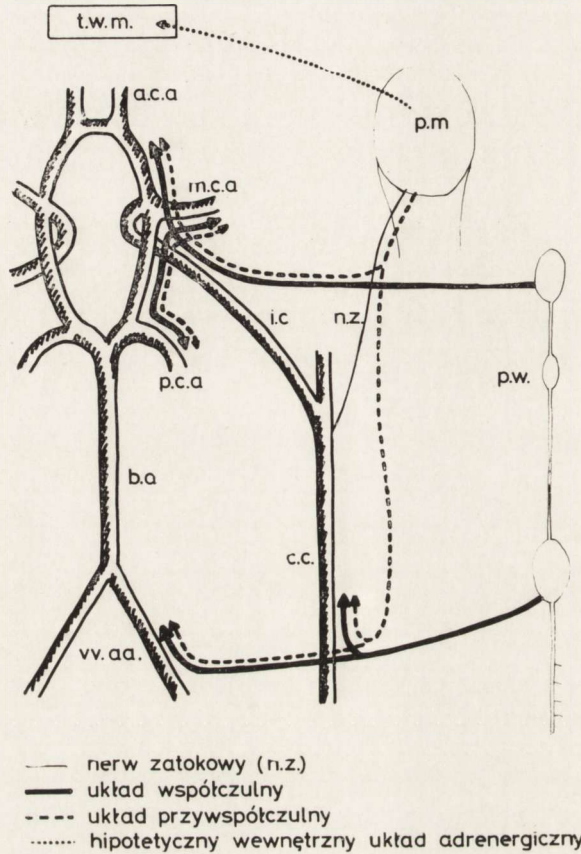
Kierownik Pracowni: prof. dr med. Z. Semerau-Siemianowski

Od dawna wiadomo, że naczynia krwionośne zaopatrujące mózg są unerwione przez włókna czuciowe i autonomiczne (Iwayama i wsp., 1970; Meyer i Welch, 1972; Ponte i Purves, 1974; Purves, 1972; Rosendorff, 1974). Tętnice opon miękkich, tętnice koła Willisa i tętnice wewnątrzmożgowe posiadają zarówno unerwienie cholinergiczne, jak i adrenergiczne. Część włókien współczulnych unerwiających naczynia mózgowie pochodzi ze zwojów szyjnych — są to włókna unerwiająca tętnice podstawy mózgu i tętnice opon miękkich. Włókna adrenergiczne zaopatrujące wewnętrzne tętniczki mózgowie nie mają związku z zewnątrzmożgowym układem współczulnym i najprawdopodobniej rozpoczynają się w pniu mózgu. Włókna cholinergiczne dochodzą do naczyń mózgowych od nerwu VII z nerwem skalistym większym (ryc. 1).

Oddziaływanie układu autonomicznego na mózgowy przepływ krwi

Funkcjonalne znaczenie układu autonomicznego dla regulacji mózgowego przepływu krwi (CBF) jest szeroko dyskutowane, jednak niektóre dane wydają się niepodważalne. Wiadomo np., że stymulacja układu cholinergicznego powoduje rozszerzenie, a stymulacja zewnątrzmożgowego układu adrenergicznego — zwężenie tętnic opon miękkich (Forbes i Wolff, 1928). Ponte i Purves (1974) ustalili, że stymulacja chemoreceptorów obwodowych krwią żylną powoduje wzrost regionalnego CBF, a baroreceptory zatoki szyjnej biorą udział w utrzymaniu CBF na stałym poziomie. Wykazali oni, że odnerwienie chemo- i baroreceptorów znosi reakcję CBF na hipoksję i na zmiany obwodowego ciśnienia krwi oraz znacznie ogranicza wpływ hiperkapnii na CBF. Wymienieni autorzy uważają, że kontrola odruchowa odgrywa dominującą rolę w reakcji naczyń mózgowych na hipoksję i wraz z innymi czynnikami bezpośrednio wpływającymi na mózgowie łożysko naczyniowe ($p_a\text{CO}_2$, pH, wpływy meta-

boliczne i ciśnienie perfuzyjne) może odgrywać rolę w określaniu rozmiaru reakcji naczyniowej na zmiany ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla we krwi tętniczej i układowego ciśnienia krwi. Podobne wyniki osiągnęli James i McDonell (1975). Wykazali oni wzrost CBF u psa po



Ryc. 1. Schemat prawdopodobnego unerwienia autonomicznego naczyń tętniczych mózgu: t.w.m. — tętnice wewnętrzne mózgu, p.m. — pień mózgu, a.c.a. — tętnica przednia mózgu, m.c.a. — tętnica środkowa mózgu, p.c.a. — tętnica tylna mózgu, i.c. — tętnica szyjna wewnętrzna, c.c. — tętnica szyjna wspólna, b.a. — tętnica podstawna, vv.aa. — tętnice kręgowe, p.w. — pień współczulny.

stymulacji izolowanych krążeniowo zatok szyjnych krwią hiperkapniczną pochodzącą z drugiego psa. W świetle powyższych badań wydaje się, że chemo- i baroreceptory obwodowe uczestniczą w regulacji CBF. Ostatnio Heistad i wsp. (1976) opublikowali dane, które przemawiają za brakiem wpływu chemoreceptorów obwodowych na CBF. Rozbieżności te mogą wynikać z innych metod oznaczania CBF, użycia różnych gatunków zwierząt i innych rodzajów narkozy.

Rola unerwienia sympatycznego jest w różnym stopniu uznawana przez poszczególnych badaczy. James i wsp. (1969), Harper i wsp. (1972), d'Alecy i Feigl (1972), Kobayashi i wsp. (1971) oraz Meyer i Welch (1972) stwierdzili istnienie reakcji skurczowej naczyń mózgowych po stymulacji układu współczulnego. Natomiast Traystman i Rapela (1975), Alm i Bill (1973) oraz Meyer i Klassen (1975) wykazali, że CBF nie zmienia się pod wpływem stymulacji układu współczulnego. Różnice poglądów można częściowo wytłumaczyć odmiennymi metodami oceny CBF lub różnicami gatunkowymi zwierząt używanych do badań. Dla oceny szybkich, stosunkowo nieznacznych i czasami tylko regionalnych zmian CBF mogą być używane tylko niektóre metody. Interpretację wyników dodatkowo komplikuje istnienie licznych połączeń pomiędzy naczyniami zewnątrz- i wewnątrz-mózgowymi. Naczynia te mogą całkowicie odmiennie reagować na wpływy neurogenne.

Wielu autorów zajmowało się określeniem roli jaką odgrywają w regulacji CBF receptory cholinergiczne oraz receptory adrenergiczne alfa i beta. Kuschinsky i wsp. (1974) oraz Wahl i wsp. (1974) na podstawie pomiarów średnicy tętnic opon miękkich ustalili, że stymulacja receptorów cholinergicznych za pomocą karbacholu powoduje rozkurcz naczyń, natomiast podawanie izoprenaliny powoduje w zależności od dawki rozszerzenie lub zwężenie, przy czym są to reakcje bardzo niewielkie w porównaniu z reakcją na karbachol i wskazują na większe znaczenie funkcjonalne układu cholinergicznego, niż beta-adrenergicznego. Herz i wsp. (1975) natomiast wykazali, że w warunkach prawidłowego wysycenia tlenem krwi tętniczej występuje skurcz tętnic opon miękkich pod wpływem izoprenaliny, natomiast w hipoksji podawanie izoprenaliny powoduje zwiększenie ich rozkurczu, co świadczy o zmieniającej się reaktywności naczyń opon miękkich w odpowiedzi na stymulację receptorów beta. Przyczyną tego zjawiska mogą być według powyższych autorów zmiany funkcji enzymów w następstwie hipoksji. Aubineau i wsp. (1973) ustalili, że izoprenalina powoduje znaczne zwiększenie przepływu krwi w obrębie jądra ogoniastego, bez istotnych zmian w przepływie przez ciało kolankowate boczne. Przedstawione dane obrazują różnorodność reakcji CBF na stymulację receptorów beta-adrenergicznych. Wydaje się, że stymulacja tych receptorów powoduje głównie zmiany regionalnego CBF polegające na wewnątrz-mózgowym przemieszczaniu się krwi zależnie od aktualnego stanu fizjologicznego lub patologicznego.

Przedmiotem licznych badań był wpływ blokady alfa-adrenergicznej na CBF. Według Frasera i wsp. (1972) oraz Corbetta i wsp. (1972) podawanie alfa-blokerów zmniejsza skurcz naczyń w hipokapnii lub prowadzi nawet do reakcji odwrotnej, natomiast według Hoffa i wsp. (1972)

w hipokapnii blokada alfa nie wywiera żadnego wpływu na reakcje naczyniowe. Fitch i wsp. (1975) w przekonujący sposób wykazali rozszerzenie dolnego zakresu autoregulacji pod wpływem blokady alfa, a z badań Skinhøja (1972) wynika, że zarówno stymulacja jak i blokada układu sympatycznego nie upośledza autoregulacji CBF. Wyniki badań Wahla i wsp. (1972, 1974), Kuschinsky'ego i wsp. (1974) oraz Kuschinsky'ego i Wahla (1975) wskazują na znaczenie funkcjonalne układu cholinergicznego i sympatycznego dla regulacji średnicy tętnic opon miękkich i brak znaczenia funkcjonalnego dla tych tętnic układu beta-adrenergicznego. Według Meyera (1975) blokada alfa-adrenergiczna zwiększa CBF i zmniejsza mózgowy opór naczyniowy (CVR), podczas gdy blokada beta-adrenergiczna zmniejsza CBF i zwiększa CVR.

Omawiając wpływ stymulacji układu autonomicznego na CBF nie można pominąć wyników Ingvara i Söderberga (1958), potwierdzonych przez Meyera i wsp. (1969). Wymienieni autorzy uzyskali zwiększenie całkowitego CBF za pomocą stymulacji elektrycznej tworzącego siatkowatego pnia mózgu i ustalili, że nie ma ono związku z czynnością zewnątrzmozgowego układu autonomicznego. Z kolei Shalit i wsp. (1967) wykazali, że uszkodzenia górnej części rdzenia przedłużonego, mostu i śródmózgowia znoszą reakcję CBF na CO₂.

Oddziaływanie substancji naczynioaktywnych na CBF

Wiele kontrowersji budzą wyniki badań nad wpływem na krążenie mózgowe substancji naczynioaktywnych, będących przekaźnikami synaptycznymi, a więc noradrenaliny (NA), adrenaliny (A) i dopaminy (DA). Zostało to uwidocznione w pracach poglądowych Lavyne i wsp. (1975) oraz Rosendorffa (1974). Z danych przytoczonych przez wymienionych autorów wynika (tab. 1), że dożylnie, dotętnicze, czy miejscowe, wewnątrzmozgowe podawanie neurotransmiterów wywołuje zwężenie lub rozszerzenie naczyń mózgowych, bądź też pozostaje bez wpływu na łożysko naczyniowe mózgu. Wydaje się jednak, że sprzeczne wyniki można tłumaczyć częściowo różnicami dawek badanych substancji stosowanych przez poszczególnych autorów. Ekstrom-Jödal i wsp. (1975) oraz Rosendorff (1972) stwierdzili, że małe dawki NA zwiększają CBF, natomiast większe — zmniejszają go i to zarówno przy podawaniu dotętnicznym, jak i miejscowym w okolicy podwzgórza. Charakterystycznym jest, że wpływ naczyniorozszerzający można było znieść przez podanie blokerów beta, a wpływ naczyniozwężający przez podanie blokerów alfa. Podobne dwukierunkowe działanie ustalił dla dopaminy von Essen (1973) — podawana w małych dawkach zmniejszała CBF, a w umiarkowanie większych — zwiększała. Pierwsza reakcja była znoszona przez

alfa-blokery, a druga przez blokery swoiste dla receptorów dopaminergicznych. Ponieważ podanie beta-blokerów nie wywiera wpływu na rozszerzenie naczyń (Ekstrom-Jödal i wsp., 1975) zależne od dopaminy, świadczy to o obecności receptorów dopaminergicznych w łożysku naczyniowym mózgu. Dodatkową niejasnością w działaniu substancji naczynioaktywnych na krążenie mózgowe jest istnienie bariery krew-mózg, która uniemożliwia przechodzenie katecholamin przez ścianę naczyniową. W ścianach naczyń włosowatych mózgu stwierdzono obecność monoaminooksydazy (MAO) i dekarboksylazy dwuhydroksyfenyloalaniny (Bertler i wsp., 1966). Podobne wyniki uzyskane przez różnych autorów przy dotętnicznym i miejscowym stosowaniu noradrenaliny w rejonie podwzgórza świadczą o swoistym działaniu amin katecholowych na receptory naczyniowe (Ekstrom-Jödal i wsp., 1975; Rosendorff, 1972). Nie bez

Tabela 1. Wpływ egzogennych katecholamin (adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy) na CBF. Modyfikacja według Lavyne i wsp. (1975).

Autor	Gatunek	Droga podania i dawka*	Metoda pomiaru	Wyniki
Häggendal 1967	Pies	i.v.NA 0,2—3,0	CBF Kr ⁸⁵	CBF ↓ o 40%
Essen 1972	Pies	i.v.NA 0,03—7,5 i.v.DA. 0,05—57,5	CBF Xe ¹³³	CBF ↓ maks. przy 2,0 CBF ↓ o 21% przy dużych dawkach
Ekstrom — Jödal 1973	Pies	i.v.NA 0,03—7,5 i.v.DA 0,05—57,4	CBF Kr ⁸⁵	CBF ↓ przy dużych dawkach, ↑ przy małych. CBF ↓ przy małych i ↑ przy większych dawkach
King 1952 Lluch 1973	Człowiek Koza	i.v.NA ok. 0,1—0,3 i.a.NA. do 5μg na dawkę	CBF N ₂ O HBF P.E.	CBF ↓ CBF ↓
Rosendorff 1971, 1973 Meyer 1964	Królik Małpa	i.h. NA od 1 do 200μg na dawkę i.v.NA ok. 0,1—2,0 i A ok. 0,5—5,0	rCBF Xe ¹³³ ICBF P.E.	rCBF ↓ przy dawkach od 10 do 200μg, ↑ przy 1μg ICBF ↑
Olesen 1972	Człowiek	i.v.NA ok. 0,03—0,5 i A ok. 0,08—0,14	rCBF Xe ¹³³	rCBF b.z.
Green 1956	Pies	i.a.NA i A do 10μg na dawkę	ICBF	ICBF b.z.
Greenfield 1968	Człowiek	i.a.NA ok. 0,04 i 0,11	ICBF P.E.	ICBF b.z.
Modrzejewski 1971	Pies	i.a.NA 2μg/kg i.a. A 2μg/kg	CBF FHTch	CBF ↓ o 20% CBF ↓ o 21%

Objaśnienie: * — dawki podano w μg/kg/min; i.v. — dożylna; i.a. — dotętnicza; i.h. — do podwzgórza; NA — noradrenalina; A — adrenalina; DA — dopamina; HBF — przepływ przez półkulę; rCBF — CBF regionalny; P.E. — przepływomierz elektromagnetyczny; ICBF — przepływ w tętnicy szyjnej wewnętrznej; FHTch — fotohemotachometr.

znaczenia może być fakt, że część brzuszna wyniosłości środkowej podwzgórza jest jednym z obszarów wyłączonych z działania bariery krew-mózg.

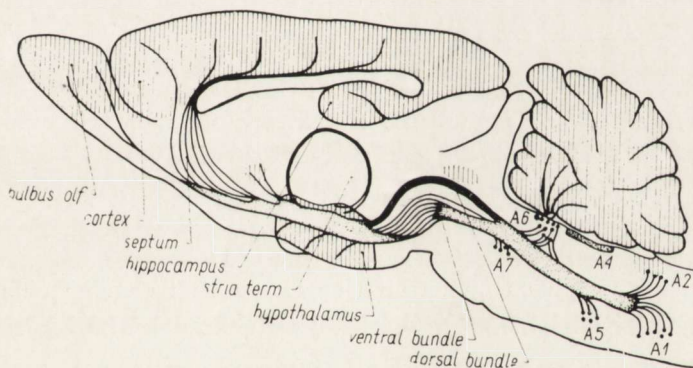
W badaniach nad działaniem serotoniny (5-HT) na CBF uzyskano również rozbieżne wyniki. Fenske i wsp. (1974) nie stwierdzili znamienych zmian CBF po dokomorowym podawaniu kotom 5-HT. Rosendorff (1972) przy miejscowym podawaniu 5-HT królikom stwierdził zwiększenie przepływu przez podwzgórze do 169% wartości kontrolnych, podczas gdy inni badacze obserwowali zmniejszenie CBF u kotów i małą, a zwiększenie u psów (cyt. wg. Rosendorffa, 1972). Essen (1973) oraz Ekstrom-Jödal i wsp. (1975) podają, że dożylna infuzja 5-HT powoduje u psów postępujące zwężenie naczyń mózgowych aż do osiągnięcia poziomu względnie stałego plateau. Mechanizm tej reakcji nie jest jasny, gdyż nie ulegała ona zmianie zarówno po podaniu metysergidu — antagonisty 5-HT, jak i alfa-blokerów. Modrzejewski (1971) w badaniach na psach stwierdził, że zmniejszenie CBF (o ok. 19%) powodowane przez serotoninę w dawce 2 g/kg nie występuje po podaniu alfa-blokera — fentolaminy.

Dane dotyczące wpływu prostaglandyn (PGs) na CBF nie są jednoznaczne. Denton i wsp. (1972) stwierdzili, że $PGF_{2\alpha}$ powoduje wzrost oporu naczyniowego u psów i małą, a PGE_1 zwiększa CBF u psów, a nie wywiera tego działania u małą. Welch i wsp. (1974a) wykazali rozszerzenie tętnic opon miękkich u kotów po podaniu PGE_1 , podczas gdy PGs typu F działały naczynioskurczowo i na tej podstawie uważają, że PGs mogą uczestniczyć w utrzymywaniu napięcia mięśniówki naczyń na stałym poziomie. Welch i wsp. (1974b) stwierdzili również, że dotętnicze podawanie PGE_1 powoduje u małą znaczne zwiększenie przepływu przez tętnicę szyjną zewnętrzną przy jednoczesnym zmniejszeniu przepływu w tętnicy szyjnej wewnętrznej i tłumaczą ten efekt przemieszczaniem się przepływu (stealing effect). W tych samych warunkach podawanie $PGF_{2\alpha}$ powodowało zmniejszenie się przepływu w obydwu tętnicach. Yamamoto i wsp. (1971) wykazali znaczny skurcz tętnic opon miękkich u psów po infuzji PGE_1 do tętnicy szyjnej wspólnej i nieco mniejsze, lecz też znamienne zwężenie tych tętnic po infuzji $PGF_{2\alpha}$. Stwierdzili również, że reakcja tętnic opon miękkich na PGE_1 nie ulega zmianie pod wpływem blokady alfa-adrenergicznej. Według Pickarda i wsp. (1976) indometacyna, bloker syntetazy PGs (Vane, 1971), powoduje zmniejszenie CBF u małą. Efekt ten może polegać na wpływie indometacyny na drobne tętnice wewnątrzmozgowe, co świadczyłoby o działaniu naczyniorozszerzającym endogennych PGs. Pickard i Mackenzie (1973) podali wcześniej wyniki świadczące o tłumieniu przez indometacynę naczyniorozszerzającej odpowiedzi krążenia mózgowego na hiperkapnię. Poglądu tego nie potwierdzają ostatnie badania Trzebskiego i wsp. (1976). Z przy-

toczonych danych wynika, że oddziaływanie PGs na krążenie mózgowe nie jest jednakowe i zależy zarówno od typu PGs, jak i od gatunku zwierzęcia. Nie jest wykluczone, że endogenne PGs pochodzące z tkanki mózgowej czy naczyniowej działają rozszerzająco na mikrokrażenie, a jeśli dostają się do krążenia mózgowego z obwodu, ich działanie może być inne. Według Lassena (1975) istnieje możliwość oddziaływania PGs, podobnie jak innych aktywnych biologicznie substancji, na metabolizm mózgu, co powoduje wtórne zmiany CBF.

Nowa hipoteza neuroregulacji CBF według Rosendorffa

Niejasności i sprzeczności dotyczące neuroregulacji krążenia mózgowego i wpływu neurotransmiterów na CBF stara się wyjaśnić Rosendorff (1974), podając nową hipotezę unerwienia autonomicznego naczyń mózgu. Rosendorff zakłada istnienie dwóch systemów adrenergicznych zaopartujących układ tętniczy mózgu. Jednym z nich jest system zewnętrzny (ryc. 1), którego włókna rozpoczynają się w zwojach szyjnych i zaopatrują naczynia zewnątrzmożgowe, takie jak tętnice koła Willisa i tętnice opon miękkich. Stymulacja tego układu powoduje skurcz wymienionych tętnic i zmniejszenie CBF. Reakcje układu zewnętrznego mogą być związane ze zmniejszeniem CBF spostrzeganym przy podawaniu większych dawek noradrenaliny, czy mniejszych dawek dopaminy.



Ryc. 2. Projekcja strzałkowa wewnętrznego układu adrenergicznego mózgu. (Hipotetyczny układ naczyniorozszerzający). Schemat Rosendorffa (1974).

Drugim układem adrenergicznym jest system wewnętrzny (ryc. 2), uwidoczniiony w badaniach histochemicznych Dahlströma i Fuxe oraz Ungerstedta (cyt. wg. Rosendorffa, 1974). Włókna tego układu rozpoczynają się na znacznej przestrzeni rdzenia przedłużonego i biegną przez podwzgórze do hipokampa i kory mózgowej. Szlaki noradrenergiczne nie są związane z zewnątrzmożgowymi zwojami współczulnymi i prawdopo-

dobnie unerwiają naczynia wewnątrzmożgowe. Stymulacja układu wewnętrznego powodowałaby rozszerzenie tych naczyń. Koncepcja Rosendorffa wyjaśnia wyniki Ingvara i Söderberga (1958), Meyera i wsp. (1969) oraz Shalita i wsp. (1967). Działanie naczyniorozszerzające układu wewnętrznego jest zgodne z wymienionymi uprzednio efektami działania noradrenaliny podawanej w małych dawkach dotętniczo lub miejscowo w rejonie podwzgórza oraz z działaniem umiarkowanie większych dawek dopaminy. Jak wiadomo, reakcje te, w przeciwieństwie do poprzednich, blokowane przez alfa-blokery, znoszone są przy blokadzie receptorów beta i swoistych receptorów dopaminergicznych. Zgodnie z wynikami Shalita i wsp. (1967) wewnętrzny system adrenergiczny może być aktywowany przez wzrastające ciśnienie parcjalne CO₂ we krwi tętniczej i powodować rozszerzenie naczyń wewnątrzmożgowych. Aktywacja wewnętrzna systemu adrenergicznego może być bezpośrednia, na poziomie pnia mózgu, lub pośrednia poprzez chemoreceptory obwodowe. W ten sposób dwutlenek węgla oprócz bezpośredniego wpływu na naczynia móżgowe i aktywacji naczyniorozszerzającego układu parasympatycznego aktywowałby też naczyniorozszerzający układ adrenergiczny.

Poparcie dla funkcjonalnego znaczenia wewnętrznego systemu adrenergicznego można znaleźć również w poglądach Meyera (1975), który uważa, że szybki wzrost CBF w czasie drgawek poprzedzających zmiany metaboliczne i przebiegający z zaburzeniami autoregulacji jest spowodowany rozszerzeniem naczyń sterowanym przez pień mózgu. Podobny charakter ma też zwiększenie CBF w trakcie REM-sleep (rapid eye movement). Zwyródnienie neuronów pnia mózgu i rdzenia kręgowego znajdowano również w móżgach ludzi z zaawansowanym i utrwalonym zespołem omdlenia ortostatycznego (Meyer, 1975). Objawy tego zespołu można zmniejszyć przez zastosowanie leczenia inhibitorami MAO i dopaminą. Niedawno opublikowane wyniki badań Rosendorffa i wsp. (1976) podają nowe dowody istnienia i funkcjonalnego znaczenia podwójnego układu adrenergicznego. Badacze ci ustalili, że stymulacja elektryczna pnia mózgu powoduje wzrost lokalnego CBF (lCBF) przez podwzgórze o około 17%, przy czym efekt ten znoszony był przez propranolol. Natomiast stymulacja układu adrenergicznego za pomocą tyraminy powodowała spadek lCBF o około 32%. Efekt ten nie występował po sympatektomii szyjnej, która nie wywierała żadnego wpływu na zmiany lCBF podczas stymulacji pnia mózgu.

Wpływy neurogenne na CBF w niektórych stanach fizjopatologicznych

Hipoksja. Ponte i Purves (1974) ustalili, że reakcja krążenia móżgowego na hipoksję jest w dużym stopniu uzależniona od chemorecepto-

rów obwodowych. Ich stymulacja krwią hipoksyczną powodowała wzrost rCBF w okolicy skroniowej. Odpowiedź ta była całkowicie zniesiona przy wewnątrzczaszkowym przecięciu nerwu VII. Wymienieni autorzy ustalili, że po obustronnym przecięciu nerwów zatokowych nie występuje odpowiedź naczyń mózgowych na niedotlenienie. Fakty te mogą świadczyć o wiodącej roli układu cholinergicznego w reakcjach naczyń mózgowych na hipoksję. Wielu autorów (cyt. wg. Olesena, 1974) podaje jednak dane, z których wynika, że nerwy zatokowe i aortalne, a także nerwy czaszkowe zawierające włókna parasympatyczne nie wywierają wpływu na CBF. Praca Heistada i wsp. (1976) wydaje się całkowicie przeczyć udziałowi układu cholinergicznego w reakcjach CBF na hipoksję i hiperkapnię. Z drugiej strony Herz i wsp. (1975) wykazali zmieniającą się reaktywność naczyń opon miękkich w hipoksji na podawanie izoprenaliny. Ekstrom-Jödal i wsp. (1975) nie potwierdzają tych spostrzeżeń, nie można jednak wykluczyć, że w hipoksji układ autonomiczny wywiera wpływ naczyniorozszerzający na układ tętniczy współdziałając tym samym z bezpośrednią reakcją naczyń mózgowych na niedotlenienie.

H i p e r k a p n i a. Podobnie jak w hipoksji, reakcja krążenia mózgowego na hiperkapnię wydaje się częściowo uzależniona od wpływów chemoreceptorów obwodowych, jednak przecięcie nerwów zatokowych (Ponte, Purves, 1974) nie znosi całkowicie odpowiedzi CBF na hiperkapnię. Oprócz bezpośredniego naczyniorozszerzającego wpływu CO₂ na naczynia mózgowe może tu oddziaływać hipotetyczny wewnętrzny system adrenergiczny, którego wejściem w tym przypadku byłyby chemoreceptory centralne (Shalit i wsp., 1967). Pogląd ten częściowo popierają wyniki Aubineau i wsp. (1973) wykazujące zwiększenie przepływu przez jądro ogoniaste w wyniku stymulacji beta-receptorów izoprenalina, podobnie jak i w wyniku hiperkapnii. Teorię tę popierają wyniki Gabrielyana i Harpera (1973), którzy wykazali, że noradrenalina podawana w czasie hiperkapnii zwiększa CBF. Zwiększenie CBF mogło wynikać ze wzrostu układowego ciśnienia tętniczego i mechanicznego zwiększenia przepływu mózgowego na skutek zaburzeń autoregulacji wywołanych przez hiperkapnię ale mogło też świadczyć o dodatkowym pobudzeniu naczyniorozszerzającego układu beta-adrenergicznego. Wielu autorów (cyt. wg. Olesena 1974) podaje sprzeczne dane odnośnie roli układu sympatycznego w reakcjach krążenia mózgowego na hiperkapnię. Stone i wsp. (1974) na przykład stwierdzili zmniejszenie naczyniorozszerzającej odpowiedzi na hiperkapnię przy przewlekłej sympatektomii, podczas gdy James i wsp. (1969) stwierdzili większe rozszerzenie naczyń mózgowych w hiperkapnii po ostrej sympatektomii.

H i p o k a p n i a. Udział układu współczulnego w reakcji CBF na hiperkapnię jest kontrowersyjny. Stwierdzano, że odpowiedź krążenia mózgo-

wego zależy od aktywności układu alfa-adrenergicznego, bądź wykazywano, że układ ten nie wpływa na nasilenie reakcji naczynioskurczowej (Corbett i wsp., 1972; Fraser i wsp., 1972; Hoff i wsp. 1972; Olesen, 1974). Ciekawe wyniki przedstawili Corbett i Eidelmann (1973), którzy stwierdzili, że u ludzi z całkowitym poprzecznym uszkodzeniem rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym, czyli z przerwana współczulną pętlą odruchową, odpowiedź krążenia mózgowego na hipokapnię jest znacznie zmniejszona. Przedstawione fakty sugerują udział zewnętrznego układu adrenergicznego w odpowiedzi CBF na hipokapnię. Zmniejszenie CBF w hipokapni pod wpływem dożylniej infuzji noradrenaliny, znane z pracy Gabrielyana i Harpera (1973), też może świadczyć o udziale układu współczulnego w tej reakcji.

Hipotonia. Według Ponte i Purvesa (1974) baroreceptory zatoki szyjnej i łuku aorty odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu przepływu mózgowego na stałym poziomie w warunkach obniżonego ciśnienia tętniczego. Ponte i Purves stwierdzili, że po przecięciu obu nerwów zatokowych i aortalnych, przepływ mózgowy w perfundowanym preparacie zmienia się równolegle z ciśnieniem perfuzji. W reakcji CBF na hipotonię powinny brać udział przede wszystkim nerwy naczyniorozszerzające. Istnieją jednak dane przemawiające za współudziałem w tych reakcjach naczyniozężającego układu współczulnego. Wyniki te są kontrowersyjne. Fitch i wsp. (1975) stwierdzili rozszerzenie dolnego zakresu autoregulacji przy blokadzie alfa, natomiast Stone i wsp. (1974) wykazali zawężenie granic autoregulacji przy przewlekłej sympatektomii. Wyniki Essena (1973) uzyskane przy podawaniu NA i DA oraz przy blokowaniu ich efektów obrazują dobre funkcjonowanie autoregulacji w tych warunkach. Rosendorff (1974) zastanawia się, czy i w jakim stopniu hipotetyczny system adrenergiczny może być odpowiedzialny za autoregulację CBF w warunkach hipotonii. Częściowej odpowiedzi na to pytanie dostarczają badania wykazujące istnienie zaburzeń autoregulacji u pacjentów z zaawansowanymi przypadkami zespołu omdlenia ortostatycznego i zwyrodnieniem neuronów autonomicznych pnia mózgu (cyt. wg. Meyera, 1975). Meyer (1975) przypomina, że testy autoregulacji u pacjentów z niedokrwieniem pnia mózgu, w obrębie którego znajdują się neurony mogące stanowić wewnętrzny układ adrenergiczny, wykazują większe zaburzenia niż na przykład u pacjentów z zawałem kory mózgowej.

Hiperoksja hiperbaryczna. Bean i wsp. (1971) ustalili, że wystąpienie drgawek podczas ekspozycji na zwiększone ciśnienie tlenu (HBT) jest bezpośrednio związane ze znacznym i nagłym zwiększeniem CBF. Schnakenburg i Nolte (1970) stwierdzili zmiany morfologiczne w pniu mózgu zwierząt poddanych toksycznemu działaniu HBT związane

z wystąpieniem u nich drgawek. W pniu mózgu znajdują się neurony o hipotetycznym działaniu naczyniorozszerzającym, a ponieważ pień należy do najlepiej unaczynionych struktur mózgowych (Landau, cyt. wg. Purvesa, 1972), są one szczególnie narażone na toksyczne działanie HBT. Wystąpienie paradoksalnej „anoksji” komórkowej spowodowanej toksycznym działaniem tlenu na metabolizm neuronów pnia oraz zmniejszenie poziomu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), stwierdzone w HBT (Wood, 1975), mogą być przyczyną szczególnego wzrostu aktywności tego układu, zwiększenia całkowitego CBF i wystąpienia drgawek. Za udziałem układu autonomicznego w powstawaniu objawów toksycznego działania tlenu w hiperbarii przemawia wiele danych. Schnakenburg i Nolte (1970) podają skrócenie „czasu utajonego” (pre-seizure time) drgawek przy zastosowaniu alfa blokera — fentolaminy, lecz Torbati i wsp. (1971) stwierdzili brak różnic w czasie utajonych drgawek u szczurów adrenalektomizowanych i kontrolnych poddanych działaniu HBT. Bean (1964) podaje, że adrenalektomia działa ochronnie w HBT, natomiast podawanie adrenaliny, ACTH lub kortyzonu pogarsza objawy toksyczne. Oliver i wsp. (1970) stwierdzili u myszy po podaniu rezerpiny w dawkach usuwających noradrenalinę z synaps układu współczulnego zwiększenie ilości napadów drgawek i skrócenie ich czasu utajonego oraz czasu przeżycia zwierząt. Te sprzeczności można częściowo wyjaśnić w oparciu o teorię podwójnego układu adrenergicznego unerwiającego naczynia mózgowe — wewnętrznego o działaniu naczyniorozszerzającym dla tętnic wewnątrzmożgowych i zewnętrznego — o działaniu naczyniozwążającym dla tętnic zewnątrzmożgowych.

Praca niniejsza wskazuje na znaczne rozbieżności poglądów dotyczących funkcjonalnego znaczenia unerwienia autonomicznego tętnic mózgowych. Dużo sprzeczności można wyjaśnić za pomocą teorii podwójnego układu adrenergicznego zaproponowanej przez Rosendorffa. Może ona stanowić uzupełnienie dla hipotezy podanej przez Harpera i wsp. (1972), którzy twierdzą, że duże tętnice zewnątrzmożgowe podlegają całkowicie kontroli neurogennej, a oporowe naczynia wewnątrzmożgowe podlegają całkowicie wpływom czynników bezpośrednio zmieniających CBF, natomiast strefę przejściową, podatną na jedne i drugie wpływy, stanowią tętnice opon miękkich. Teoria Rosendorffa daje się też pogodzić z trzema zasadniczymi funkcjami, jakie dla nerwów okołonaczyniowych mózgu zaproponował Purves (1972): 1) Współdziałanie i precyzyjna kontrola wpływu czynników regulujących stan napięcia mięśniówki naczyniowej; 2) Określenie szybkości z jaką ujawnia się odpowiedź krążenia mózgowego; 3) Udział w dostosowaniu odpowiedzi łożyska naczyniowego mózgu do zmian zachodzących w krążeniu układowym. Wszystkie te funkcje mogą być wykonywane przez układ cholinergiczny i podwój-

ny — zewnętrzny i wewnątrzmożgowy system adrenergiczny. Wzajemne oddziaływanie obu układów oraz wpływ czynników metabolicznych określają całkowity móżgowy przepływ krwi i jego wewnątrzmożgowe rozmieszczenie.

Autor składa serdeczne podziękowanie Pani doc. dr med. Krystynie Herbaczyńskiej-Cedro i Panu prof. dr med. Witoldowi Karczewskiemu za wnikliwą dyskusję pracy i cenne uwagi.

П. Рушчевски

НЕЙРОРЕГУЛЯЦИЯ МОЗГОВОГО ТОКА КРОВИ И ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Резюме

В работе обсуждены следующие вопросы: 1. Влияние парасимпатической и симпатической системы на мозговой ток крови (МТК); 2. Роль холинэргических, а также альфа- и бета-адренэргических рецепторов в регуляции МТК; 3. Роль мозгового ствола в регуляции МТК; 4. Действие норадреналина, адреналина и допамина на МТК; 5. Действие серотонина на МТК; 6. Действие простагландинов на МТК; 7. Гипотеза двойной адренэргической иннервации мозговых артерий; 8. Функциональное значение гипотетической адренэргической системы; 9. Нейрогенные влияния на МТК при гипоксии; 10. Нейрогенные влияния на МТК при гиперкапнии; 11. Нейрогенные влияния на МТК при гипокапнии; 12. Нейрогенные влияния на МТК при гипотонии; 13. Нейрогенные влияния на МТК гипербарической гипероксии.

P. Ruszczewski

NEUROREGULATION OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND THE INFLUENCE OF SOME BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Summary

Following problems are discussed: 1. Influence of parasympathetic and sympathetic system on cerebral blood flow (CBF). 2. Role of cholinergic and alpha- and beta-adrenergic receptors in CBF regulation. 3. Role of brain stem in the regulation of CBF. 4. Action of noradrenaline, adrenaline and dopamine upon CBF. 5. Action of serotonin on CBF. 6. Action of prostaglandins upon CBF. 7. Hypothesis of double adrenergic innervation of cerebral arteries. 8. Functional significance of hypothetic cerebral adrenergic system. 9. Neurogenic influence on CBF in hypoxia. 10. Neurogenic influence upon CBF in hypercapnia. 11. Neurogenic influence on CBF in hypocapnia. 12. Neurogenic influence on CBF in hypotonia. 13. Neurogenic influence on CBF in hyperbaric hyperoxia.

PIŚMIENNICTWO

1. d'Alecy L. G., Feigl R. O.: Sympathetic control of CBF in dogs. *Circ. Res.*, 1972, 31, 267—283.
2. Alm A., Bill A.: The effect of stimulation of the cervical sympathetic chain on retinal oxygen tension and on ureal, retinal and cerebral blood flow in cats. *Acta Physiol. Scand.*, 1973, 88, 84—94.

3. Aubineau P. F., Seylaz J., Sercombe R., Mamo H.: Evidence for regional differences in the effect of beta-adrenergic stimulation on CBF. *Brain Res.*, 1973, 61, 153—161.
4. Bean J. W.: Problems of oxygen toxicity. W: „Clinical application of hyperbaric oxygen”. Ed.: I. Boerema, Elsevier, Amsterdam, 1964.
5. Bean J. W., Lignell J., Coulson J.: Regional CBF, O₂ and EEG in exposure to oxygen at high pressure. *J. Appl. Physiol.*, 1971, 31, 235—242.
6. Bertler A., Falck B., Owman Ch., Rosengren E.: The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanism. *Pharm. Rev.*, 1966, 18, 369—385.
7. Corbett J. L., Eidelmann B. H.: Studies on cerebral circulation in man indicating presence of neurogenic control. *Proc. Aust. Assoc. Neurol.*, 1973, 9, 133—144.
8. Corbett J. L., Eidelmann B. H., Debarge O.: Modification of cerebral vasoconstriction with hyperventilation in normal man by thymoxamine. *Lancet*, 1972, 2, 461—463.
9. Denton I. C., White R. P., Robertson J. T.: The effects of PGs E₁, A₁ and F₂ alfa on the cerebral circulation of dogs and monkeys. *J. Neurosurg.*, 1972, 36, 34—42.
10. Ekstrom-Jödal B., von Essen C., Häggendal E., Ross B. E.: Effects of noradrenaline, serotonin and dopamine on CBF in the dog. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co, Springer-Verlag, Berlin 1975.
11. Essen von C.: Effects of monoamines on CBF in dogs. *Elanders Boktryckeri Aktielbolag, Göteborg* 1973.
12. Fenske A., Kreysch G., Tack A., Reulen H. J.: The influence 5-HT on brain oedema and microcirculation. W: „Pathology of cerebral microcirculation”. Ed.: J. Cervos-Navarro, Walter de Gruyter, Berlin, 1974.
13. Fitch W., Ferguson G. G., Sengupta D., Garibi J.: Autoregulation of CBF during controlled hypotension. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co, Springer-Verlag, Berlin 1975.
14. Forbes H. S., Wolff H. G.: The vasomotor control of cerebral vessels. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, Chicago, 1928, 19, 1057—1086.
15. Fraser R. A. R., Stein B. M., Pool J. L.: Adrenergic blockade of hypocapnic cerebral arterial constriction. *Stroke*, 1972, 2, 219—226.
16. Gabrielyan E. S., Harper A. M.: The action of NE on the rCBF. *Farmakol. i Toksikol.*, 1973, 36, 285—291.
17. Harper A. M., Desmukhi V. D., Rowan J. O., Jannet W. B.: The influence of sympathetic nervous activity on CBF. *Arch. Neurol.* 1972, 27, 1—6.
18. Heistad D. D., Marcus M. L., Erhardt J. C., Abboud F. M.: Effect of stimulation of carotid body chemoreceptors on total and regional cerebral flow. *Circ. Res.*, 1976, 38, 20—25.
19. Herz D., Baez S., Shulman K.: Reversal of response of guinea pig arterioles to isoproterenol during hypoxia. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co, Springer-Verlag, Berlin 1975.
20. Hoff J. T., Harper M., Sengupta D., Jannett B.: Effect of an adrenergic blockade on response of cerebral circulation to hypocapnia in the baboon. *Lancet*, 1972, 2, 1337—1339.
21. Ingvar D. H., Söderberg U.: Cortical blood flow related to EEG patterns evoked by stimulation of the brain stem. *Acta Physiol. Scand.*, 1958, 42, 130—141.

22. Iwayama T., Furness J. B., Burnstock G.: Dual adrenergic and cholinergic innervation of the cerebral arteries of the rat. *Circ. Res.*, 1970, 26, 635—646.
23. James I. M., MacDonell L. A.: The role of baroreceptors and chemoreceptors in the regulation of the cerebral blood flow. *Clin. Sci.*, 1975, 49, 465—471.
24. James I. M., Millar R. A., Purves M. J.: Observations on the extrinsic neural control of CBF in the baboon. *Circ. Res.*, 1969, 25, 77—93.
25. Kobayashi S., Waltz A. G., Rhoton A. L.: Effects of stimulation of cervical sympathetic nerves on cortical blood flow and vascular reactivity. *Neurology*, 1971, 21, 197—302.
26. Kuschinsky W., Wahl M.: Alpha-receptor stimulation by endogenous and exogenous norepinephrine and blockade by phentolamine in pial arteries of cats. *Circ. Res.*, 1975, 37, 168—174.
27. Kuschinsky W., Wahl M., Neiss A.: Evidence for cholinergic dilatatory receptors in pial arteries of cats. *Pflügers Arch.*, 1974, 347, 199—203.
28. Lassen N. A.: Neurogenic control of cerebral circulation. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co, Springer-Verlag, Berlin 1975.
29. Lavayne M., Wurtman R. J., Moskowitz M., Zervas N.: Brain catecholamines and CBF. *Life Sci.*, 1975, 16, 475—486.
30. Meyer J. S.: Evidence for neurogenic control of cerebral circulation. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co. Springer-Verlag, Berlin 1975.
31. Meyer J. S., Welch K. M. A.: Relationship of CBF and metabolism to neurological symptoms. W: „Cerebral blood flow”. Ed.: J. S. Meyer. Progress in Brain Research, v. 35, Elsevier Publ. Company, Amsterdam 1972.
32. Meyer N. W., Klassen A. C.: Regional brain blood flow during sympathetic stimulation. W: „Cerebral circulation and metabolism”. Ed.: T. W. Langfitt et Co., Springer-Verlag, Berlin 1975.
33. Meyer J. S., Nomura F., Sakamoto K., Kondo M.: Effect of stimulation of the brain-stem reticular formation on CBF and oxygen consumption. *EEG Clin. Neurophys.*, 1969, 26, 125—132.
34. Moźrzejewski E.: Zmiany ukrwienia i zużycia tlenu przez mózg pod wpływem neurohormonów i niektórych amin biogennych. *Acta Physiol. Pol.*, 1971, 22, 1—20.
35. Olesen J.: Neurogenic control of CBF. *Acta Neurol. Scand.*, Suppl. 57, 1974, 50, 44—47.
36. Oliver J. H., Little J. M., Pirch J. H.: Effects of reserpine and another drugs on the CNS and lethal effects of hyperbaric oxygen in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1970, 183, 215—223.
37. Pickard J. D., MacKenzie E. T.: Inhibition of prostaglandin synthesis and the response of baboon cerebral circulation to carbon dioxide. *Nature New Biology*, 1973, 245, 187—188.
38. Pickard J. D., Simeone F., Vinall P.: The effects of indomethacin on elements of the cerebral circulation in vitro and in vivo. W: „Adv. in Prostaglandin and Thromboxane Res.”. Ed.: B. Samuelsson, R. Paoletti, Raven Press, New York 1976.
39. Ponte J., Purves M. J.: The role of the carotid body chemoreceptors and carotid sinus baroreceptors in the control of cerebral blood vessels. *J. Physiol.*, 1974, 237, 315—340.

40. Purves M. J.: Physiology of the cerebral circulation. Cambridge University Press 1972.
41. Rosendorff C.: The measurement of 1CBF and the effect of amines. W: „Cerebral blood flow”. Ed.: J. S. Meyer, Progress in Brain Res., vol. 35, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1972.
42. Rosendorff C.: The neural control of cerebral blood vessels — a brief revue and a new hypothesis. W: „Pathology of cerebral microcirculation”. Ed.: J. Cervos-Navarro, Walter de Gruyter, Berlin 1974.
43. Rosendorff C., Mitchell G., Soriven D. R. L., Shapiro C.: Evidence for a dual innervation affecting local blood flow in the hypothalamus of the conscious rabbit. *Circ. Res.*, 1976, 38, 140—145.
44. Schnakenburg von K., Nolte H.: Brain tissue changes in experimental oxygen intoxication. *Aersp. Med.*, 1970, 41, 1013—1017.
45. Shalit M. N., Reinmuth O. M., Shimoyo S., Scheinberg P.: Carbon dioxide and cerebral circulatory control. *Arch. Neurol.* 1967, 17, 342—353.
46. Skinhøj E.: Studies on sympathetic control of cerebral circulation. *Acta Neurol. Scand.*, Suppl. 51, 1972, 48, 495.
47. Stone H. L., Raichle M. E., Hernandez M.: The effect of sympathetic denervation on cerebral CO₂ sensitivity. *Stroke*, 1974, 5, 13—18.
48. Torbati I. D., Harol D., Lavy S.: Influence of adrenalectomy on electrical activity of the brain under HPO. *Aersp. Med.*, 1971, 42, 658—660.
49. Traystman R. J., Rapela C. R.: Effect of sympathetic nerve stimulation on cerebral and cephalic blood flow in dogs. *Circ. Res.*, 1975, 36, 620—630.
50. Trzebski A., Religa A., Zieliński A.: Inhibition of prostaglandin synthesis and the effects of carbon dioxide, asphyxia, histamine and hyperosmolar solutions on vertebral artery blood flow in dogs. *Proc. Intern. Symposium „Pathophysiological, biochemical aspects of cerebral ischemia”*. Warszawa 1975.
51. Vane J. R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, 1971, 231, 232—235.
52. Wahl M., Kuschinsky W., Bosse O., Olesen J., Lassen N. A., Ingvar D. H., Mitchaelis J., Thureau K.: Effect of 1-norepinephrine on the diameter of pial arterioles and arteries in the cat. *Circ. Res.*, 1972, 31, 248—256.
53. Wahl M., Kuschinsky W., Bosse O., Neiss A.: Micropuncture evaluation of beta-receptors in pial arteries of cats. *Pflug. Arch.*, 1974, 348, 293—303.
54. Welch K. M. A., Knowless L., Spira P.: Local effect of prostaglandins on cat pial arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, 1974, 25, 155—158.
55. Welch K. M. A., Spira P. J., Knowless L., Lance J. W.: Effects of prostaglandins on the internal and external carotid blood flow in the monkey. *Neurology*, 1974, 24, 705—710.
56. Wood J. D.: Oxygen toxicity. W: „The physiology and medicine of diving and compressed air work”. Ed.: P. B. Bennett, D. H. Elliott, second edition, Bailliere, Tindal and Cassel, London 1975.
57. Yamamoto Y. L., Feindel W., Wolfe L. S., Katoh H., Hodge C. P.: Effects of prostaglandins on cerebral blood flow. *Europ. Neurol.* 1971, 6, 144—152.

Adres autora: Pracowania Krążenia Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniu 30 października 1976 r. odbyło się pierwsze powakacyjne posiedzenie Zarządu Głównego SNP.

W związku z rocznym wyjazdem szkoleniowym do USA Sekretarza Z.G. kol. M. Śmiałka, funkcje jego zgodził się w tym czasie pełnić kol. T. Majdecki.

Na posiedzeniu dokonano oceny poziomu naukowego i strony organizacyjnej Polsko-Niemieckiego Sympozjum Neuropatologicznego, które odbyło się w Warszawie od 23 do 25 września 1976 r. W trakcie Sympozjum ustalono z Zarządem Towarzystwa Neuropatologów NRD, że następne dwustronne Sympozjum odbędzie się w Berlinie w 1980 r. Na organizatora jego powołany został prof. H. Schultze. Głównym tematem będą zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu chorób narządów wewnętrznych.

Omówiono następnie propozycje zorganizowania Polsko-Węgierskiego Sympozjum Neuropatologicznego. Uzgodniono wstępnie, że Sympozjum mogłoby odbyć się jesienią 1977 r. w Poznaniu. Zaproponowano, aby tematem Sympozjum były choroby zapalne układu nerwowego. Upoważniono prof. M. Wendera do przeprowadzenia korespondencji i dokonania ostatecznych uzgodnień ze stroną węgierską.

Przypomniano również, że w okresie od 21 do 23 kwietnia 1977 r. odbędzie się w Rostoku Zjazd Towarzystwa Neuropatologicznego NRD poświęcony uszkodzeniom ośrodkowego układu nerwowego w chorobach narządów wewnętrznych i że w dniach od 25 do 27 maja 1978 r. kolejny zjazd tegoż Towarzystwa odbędzie się w Schwerin. Głównym tematem będą uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w wyniku działań diagnostycznych i terapeutycznych.

W związku z mającym się odbyć w okresie od 21 do 24 września 1977 r. w Białymstoku X Jubileuszowym Zjazdem Polskiego Towarzystwa Neurologicznego przekazano apel przewodniczącej PTN prof. I. Hausmanowej-Petrusewicz, o liczny udział neuropatologów oraz prośbę o zaproszenie kilku czołowych neuropatologów zagranicznych.

Do komisji Nagród SNP, która zbierze się w grudniu br. dokooptowano kol. Jerzego Dymeckiego.

* * *

W ostatnim tygodniu października bawił w Polsce dr Igor Klatzo, dyrektor Department of Neuropathology, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke w Bethesda (USA). Na posiedzeniu SNP w dniu 30 października 1976 przedstawił on wyniki ostatnio prowadzonych badań nad niedokrwieniem mózgu.

* * *

W roku 1977 odbędą się następujące kursy szkoleniowe z zakresu neuropatologii:

— dla neurologów, przygotowujących się do egzaminu specjalizacyjnego II° odbędzie się trzytygodniowy kurs w Zakładzie Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego od 3 do 22 października 1977.

Zespół Neuropatologii CMDiK PAN przeprowadzi również jednodniowy kurs doskonalący dla patomorfologów „Histopatologia guzów mózgu” w terminie od 12 do 17 grudnia 1977. Termin zgłoszeń upływa 1 września 1977.

* * *

Kol. M. Śmiałek adiunkt Zakładu Neuropatologii CMDiK PAN zdał w sesji jesiennej 1976 egzamin specjalizacyjny I° z zakresu neurologii.

Jerzy Dymecki

TREŚĆ

M. Śmiałek: Aktywność oddechowa w układzie askorbinian-cytochrom c neuronów kory amonalnej chomika mongolskiego (<i>Meriones unguiculatus</i>) w doświadczalnym niedokrwieniu mózgu	169
T. Wierzba: Wpływ niedotlenienia na mikrokrażenie w mózgu szczura	183
M. Walski: Badania mikroskopowo-elektronowe synaps okolicy hipokampa szczurów obciążonych padaczką audiogenną, przy użyciu metody cynkowo jodowo-osmowej	193
B. Schmidt-Sidor, B. Lipińska: Wpływ doświadczalnie wywołanych w czasie ciąży napadów padaczkowych na mózg myszy w różnych okresach rozwoju	209
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, O. Mularek, J. Pankrac, J. Sędzik: Wpływ zatrucia metylonitrozomocznikiem na skład lipidów mieliny w mózgu	219
M. Wender, B. Zgorzalewicz, J. Sędzik, O. Mularek, D. Talkowska: Białka mieliny w doświadczalnym zatruciu metylonitrozomocznikiem	231
M. B. Kozik, J. Szczech, E. Sosiński: Zmiany histoenzymatyczne w mózgu w przebiegu doświadczalnej intoksykacji kalomelem	239
Z. Zalewska, I. Rakowska, G. Matraszek, D. Sitkiewicz: Wpływ dichlorfosu na aktywność niektórych układów enzymatycznych mózgu szczura podczas rozwoju osobniczego. I. Cholinesterazy	255
E. Osetowska, F. Luszawski, J. Sawicki: Wpływ mutacji <i>pt</i> na różne ogniwa „zamkniętych” obwodów ruchowych. I. Patomorfologia <i>neostriatum</i> , <i>paleostriatum</i> i <i>substantia nigra</i> u królika <i>pt</i>	263
S. Krajewski, T. Michalak: Badania immunomorfologiczne splotów naczyniówkowych u ludzi	277
J. Kulczycki, M. Szubińska-Marlicz: Śródrzeniowy przerzut raka u chorej z jamistością rdzenia	291
P. Ruszczewski: Neuroregulacja mózgowego przepływu krwi a wpływ niektórych substancji biologicznie czynnych	297
Dział Kroniki i Informacji	312

СО Д Е Р Ж Н И Е

М. Смялек: Дыхательная активность в системе аскорбат-цитохром с нейронах коры Аммонова рога монгольского хомяка (<i>Meriones unquiculatus</i>) при экспериментальной ишемии мозга	169
Т. Вежба: Влияние гипоксии на микроциркуляцию в мозге крысы	183
М. Вальски: Электронно-микроскопические исследования синапсов в области гиппокампа крыс с аудиогенной эпилепсией при использовании цинк-йод-осмиевого метода	193
Б. Шмидт-Сидор, Б. Липиньска: Влияние экспериментально вызванных во время беременности эпилептических припадков на мозг мыши на разных стадиях развития	209
М. Вендер, З. Адамчевска-Гонцежевич, О. Мулярек, Я. Панкрац, Я. Сендзик: Влияние отравления метилнитрозомочевинной на липидный состав миелина мозга	219
М. Вендер, Б. Згожалевич, Я. Сендзик, О. Мулярек, Д. Тальковска: Белки миелина при экспериментальном отравлении метилнитрозомочевинной	231
М. Б. Козик, Я. Шчех, Е. Сосиньски: Гистоэнзиматические изменения в мозге в ходе экспериментальной интоксикации каломелью	239
З. Залевска, И. Раковска, Г. Матрашек, Д. Ситкевич: Влияние дихлорфоса на активность некоторых ферментных систем мозга крысы во время онтогенеза. I. Холинэстеразы	255
Е. Осетовска, Ф. Лушавски, Я. Савицки: Влияние мутации <i>pt</i> на различные звенья „замкнутых” двигательных цепей. I. Патоморфология <i>neostriatum</i> , <i>paleostriatum</i> i <i>substantia nigra</i>	263
С. Краевски, Т. Михаляк: Иммуноморфологические исследования сосудистых сплетений у людей	277
Я. Кульчыцки, М. Шубиньска-Марлич: Спинномозговой метастаз рака у больной сиригомиелией	291
П. Рушчевски: Нейрорегуляция мозгового тока крови и влияние некоторых биологически активных веществ	297
Отдел хроники и информации	312

CONTENTS

M. Smiałek: Respiratory activity in the ascorbate — cytochrome c system of the Ammon horn cortex neurons of Mongolian gerbil (<i>Meriones unquiculatus</i>) in experimental brain ischemia	169
T. Wierzba: Effect of hypoxia on cerebral microcirculation in rat	183
M. Walski: Electron microscopic investigations on the synapses of the hippocampal region of the rats with audiogenic epileptic seizures by the zinc iodine-osmium method	193
B. Schmidt-Sidor, B. Lipińska: Effect of experimentally induced epileptic seizures during pregnancy on the mouse brain at various periods of development	209
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, O. Mularek, J. Pankrac, J. Sędzik: The effect of intoxication with methylnitrosoarea on the lipid composition of cerebral myelin	219
M. Wender, B. Zgorzalewicz, J. Sędzik, O. Mularek, D. Talkowska: Myelin proteins in experimental intoxication with methylnitrosoarea	231
M. B. Kozik, J. Szczech, E. Sosiński: Histoenzymatic changes in the brain in the course of experimental intoxication with calomel	239
Z. Zalewska, I. Rakowska, G. Matraszek, D. Sitkiewicz: Effect of Dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during postnatal development. I. Cholinesterases	255
E. Osetowska, F. Luszawski, J. Sawicki: The effect of <i>pt</i> mutation on various links of the „closed” motoric circuits. I. Pathomorphology of the neostriatum, paleostriatum and substantia nigra in the <i>pt</i> rabbits	263
S. Krajewski, T. Michalak: Immunomorphological studies on choroid plexus in humans	277
J. Kulczycki, M. Szubińska-Marlicz: Intramedulläre Karzinommetastase bei einer Patientin mit Syringomyelie	291
P. Ruszczewski: Neuroregulation of cerebral blood flow and the influence of some biologically active substances	297
Chronicles and informations	312

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Neuropatologia Polska zamieszcza prace z zakresu neuropatologii klinicznej i doświadczalnej oraz dziedzin pokrewnych (neuroonkologii, neuroanatomii, neurochemii itp.).

Redakcja pisma przyjmuje do druku prace oryginalne i doniesienia kazuistyczne; prace poglądowe — przygotowane wyłącznie na zaproszenie Redakcji.

Neuropatologia Polska przyjmuje do druku prace w języku polskim, angielskim, francuskim i niemieckim.

Warunkiem przyjęcia pracy jest oświadczenie autora, że praca nie była drukowana w innym czasopiśmie oraz pisemna zgoda kierownika placówki/ek na jej opublikowanie.

Objętość pracy oryginalnej nie powinna przekraczać wraz z pełną dokumentacją (streszczenie, piśmiennictwo, tabele, wykresy, ryciny itp.) 20 stron, pracy kazuistycznej — 10 stron.

Prace należy przesyłać w 2 egzemplarzach w znormalizowanym maszynopisie (4-cm margines z lewej strony, 30 wierszy na stronę z zachowaniem podwójnego odstępu, bez odręcznych poprawek i podkreśleń).

Wykaz piśmiennictwa, ułożony alfabetycznie, powinien obejmować wyłącznie pozycje cytowane w pracy. W wykazie piśmiennictwa podaje się nazwiska i inicjały wszystkich autorów, tytuł pracy, nazwę czasopisma, rok, tom, pierwszą i ostatnią stronę publikacji. W przypadku źródeł książkowych — nazwisko(a) i inicjał(y) autorów, tytuł książki (ew. rozdziału), wydawcę, miejsce i rok wydania. W tekście należy podać nazwisko autora(ów) oraz rok publikacji. W przypadku, gdy autorów cytowanej pozycji jest więcej niż dwóch, należy podać nazwisko pierwszego autora ze skrótem „i wsp.”.

Ryciny ograniczone do niezbędnych powinny być oznaczone kolejnymi numerami. Wskazane jest zestawienie rycin w tablice zbiorcze o wymiarach 12,5 × 19 cm.

Redakcja prosi o nadsyłanie objaśnień i podpisów do tabel, schematów i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania koniecznych poprawek stylistycznych i zmniejszania ilości rycin bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca maszynopisów nadesłanych prac.

Redakcja prosi autorów o dokładne sprawdzenie tekstów apelując o zwięźłość, przejrzysty układ pracy oraz staranne przygotowanie materiału ilustracyjnego.

Autorzy otrzymują pierwszą korektę pracy. W korekcie Redakcja uwzględni jedynie błędy literowe oraz poprawki pomyłek drukarskich.

Autorzy prac zamieszczonych w *Neuropatologii Polskiej* otrzymują honorarium wg ustalonych stawek oraz 25 odbitek na koszt autora.

WARUNKI PRENUMERATY

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

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

- do 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny
- do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienie w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy i instytucje w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

*

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: 36668