

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI, MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, JAN ALBRECHT,
SŁAWOMIR JANUSZEWSKI

WPLYW NIEDOKRWIENIA I NIEDOTLENIENIA NA BARIERE KREW-MÓZG U SZCZURÓW*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

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

Pomimo licznych prac doświadczalnych poświęconych zagadnieniu wpływu różnych typów niedostatku tlenowego na ośrodkowy układ nerwowy, informacje dotyczące uszkodzenia bariery krew-mózg w niedotlenieniu są skąpe i kontrowersyjne.

Crone (1963) wykazał, że nawet ciężka hypoksja prowadząca do strukturalnych uszkodzeń oun nie powoduje zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla inuliny i cukrozy. Gunn i wsp. (1962) na modelu niedokrwienia mózgu, a Spector (1962) oraz Hill i Spector (1963) na modelu encefalopatii ischemiczno-anoksyjnej stwierdzili występowanie obrzęku mózgu, mierzonego zawartością wody w tkance. Mossakowski i wsp. (1968) w okołoporodowej asfiksji noworodków małp, a Long i wsp. (1971) w częściowym niedokrwieniu rdzenia kręgowego u kotów wykazali tylko nieznaczne i krótkotrwałe uszkodzenie naczyniowo-mózgowych mechanizmów barierowych. Bakay i Bendixen (1964) oraz Bakay (1967) stwierdzili, że samo niedotlenienie nie wywołuje zaburzeń przepuszczalności bariery krew-mózg, wykazali natomiast masywne zmiany w przepuszczalności przy skojarzeniu niedotlenienia i hyperkapnii i to dopiero w warunkach określonego obniżenia ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi tętniczej i spadku pH tkanki nerwowej poniżej 6,75.

Celem przeprowadzonych badań była ocena transportu do mózgu związków chemicznych, znakowanych pierwiastkami promieniotwórczymi, w warunkach niedotlenienia i umiarkowanego niedokrwienia oraz w modelu Levina (1960), kojarzącym działanie obu czynników i porównanie stanu barierowych układów naczyniowo-mózgowych z obrazem histologicznym tkanki nerwowej. Uzupełnienie badań histochemicznym oznaczaniem glikogenu w mózgu podyktowane było faktem, że szereg autorów uważa jego pojawienie się za subhistologiczny wykładnik uszkodzenia oun (Mossakowski i wsp. 1968, Klatzo i wsp. 1970, Mossakowski i Zelman 1971).

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

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 300 szczurów rasy Wistar, obu płci, wagi 150 — 250 g, odżywianych dietą standardową. Doświadczenia przeprowadzono w 4 następujących grupach:

- 1) grupa zwierząt kontrolnych nie poddanych żadnym zabiegom
- 2) grupa zwierząt z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej
- 3) grupa zwierząt z obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych
- 4) grupa zwierząt z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej przetrzymywanych dodatkowo w atmosferze z obniżoną zawartością tlenu (według metody opisaną przez Levina — 1960).

Zwierzętom grupy 2 i 3 podwiązywano w narkozie eterowej jednostronnie lub obustronnie tętnicę szyjną wspólną. Zwierzęta grupy 4 po zabiegu operacyjnym jak w grupie 2, umieszczano w komorze ze stałym przepływem mieszaniny gazów o składzie 96% azotu i 4% tlenu. Skład mieszaniny gazowej ustalono drogą pomiarów objętościowych z kontrolą ciśnienia cząstkowego tlenu elektrodą Clarka. W momencie wystąpienia bezdechu zwierzęta przenoszono do atmosfery normalnego powietrza do chwili powrotu spontanicznego oddychania (tylko w kilku przypadkach zachodziła konieczność zastosowania sztucznego oddychania metodą zewnętrzną), następnie umieszczano ponownie w komorze niskotlenowej, w której przetrzymywano je przez standardowy łączny okres 30 minut.

Dla oceny wpływu ostrej krótkotrwałej hypoksji część zwierząt przetrzymywano przez 5 minut w komorze zawierającej mieszaninę gazów, składającą się z 99% azotu i 1% tlenu.

W wybranych przedziałach czasowych wszystkie zwierzęta usypiano eterem, ważono i zabijano przez przecięcie serca (po uprzednim otwarciu klatki piersiowej). Przed zabiciem zwierząt pobierano 1,2 ml krwi z lewej komory serca.

Zwierzęta zabijano w następujących grupach czasowych: 10, 30 i 60 minut, 2, 3, 4, 5, 24, 48 i 72 godziny od momentu wywołania stanu patologicznego.

Zastosowano następujące związki znakowane: $^{99m}\text{TcO}_4$ otrzymywany z kolumn molibdenowych, produkcji firmy Amersham, Anglia; $^{75}\text{SE-l}$ -selenometioninę produkcji Centralnego Instytutu Badań Jądrowych, NRD; Na^{131}J , ^{131}J -albuminę ludzką, ^{131}J -4-J-antypirynę oraz Na^{82}Br , produkcji Instytutu Badań Jądrowych w Świerku.

Związki promieniotwórcze o radioaktywności 4—40 μCi wstrzykiwano do żyły udowej w objętości 0,3 — 0,7 ml. W większości doświadczeń

prorowadzonych do 5 godzin czas krążenia izotopu w ustroju zwierzęcia był równy czasowi trwania stanu patologicznego. U zwierząt z dłuższym przeżyciem i w niektórych doświadczeniach do 5 godzin przy użyciu Na^{131}J , czas krążenia izotopu wynosił 2 godziny, niezależnie od czasu trwania stanu patologicznego.

Do pomiarów radioaktywności pobierano 1 ml krwi oraz mózg wraz z pniem i mózdzkiem. Mózg dzielono wzdłuż spoidła wielkiego na 2 półkule i określano ciężar każdej z nich. Radioaktywność krwi, oddzielnie radioaktywność prawej i lewej półkuli mózgu mierzono w scyntylicyjnym liczniku studzienkowym z konwencjonalnym zestawem aparatów w czasie zapewniającym 3% dokładność statystyczną. Uzyskane wyniki wyrażono w formie następujących wskaźników: radioaktywności właściwej krwi i obu półkul mózgowych, odsetka podanej dawki przypadającej na 1 g tkanki każdej półkuli mózgu, stosunku radioaktywności właściwej każdej półkuli mózgu do radioaktywności właściwej krwi, odsetka podanej dawki w całkowitej krwi zwierzęcia i odsetka podanej dawki przypadającej na 1 g tkanki każdej półkuli mózgu z uwzględnieniem ciężaru ciała zwierzęcia. Oznaczano także stosunki ciężaru, radioaktywności mierzonej i radioaktywności właściwej lewej półkuli mózgu do prawej.

W dodatkowej grupie zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym określono całkowitą objętość krwi w stosunku do wagi ciała oraz objętość krwi zalegającej w mózgu po śmierci zwierzęcia. Oznaczenia te przeprowadzono u 5 szczurów wagi 200—250 g przy użyciu ^{131}J -albuminy, która w warunkach prawidłowych nie przechodzi poza układ naczyniowy. Zwierzęta tej grupy uśmiercano w 15 minut po podaniu albuminy przez zmiażdżenie szyi, aby nie dopuścić do odpływu krwi z mózgu.

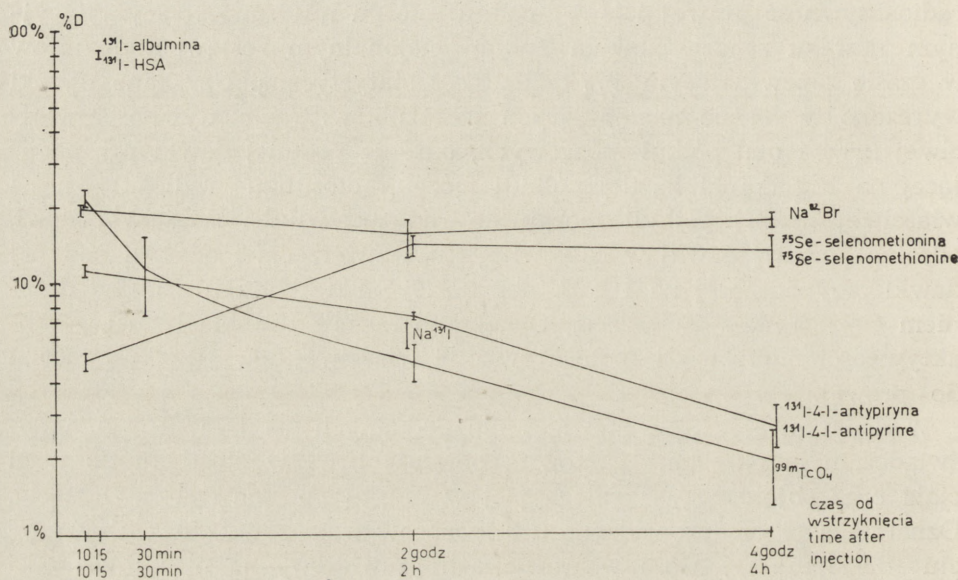
Badanie histologiczne mózgow oraz histochemiczne oznaczanie złogów glikogenowych przeprowadzono u 50 zwierząt w czasie 1—24 godziny w grupach czasowych analogicznych do stosowanych w badaniach izotopowych. Mózgi do badań histologicznych utrwalano *in situ* drogą przezsercowej perfuzji 10% zobojętnioną formaliną w roztworze soli fizjologicznej. Pobrane skrawki przeprowadzono w sposób standardowy do parafiny, preparaty barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyli i wg metody Heidenhaina. Glikogen oznaczano na skrawkach parafinowych pochodzących z mózgow utrwalonych w płynie Rossmana, wg metody opisanej przez Bulmera (1959).

WYNIKI

Wstępna analiza objętości całej krwi w stosunku do wagi ciała zwierzęcia wykazała, że stanowi ona 7% tej wagi. Objętość krwi zalegają-

cej w mózgu jest bardzo mała i wynosi średnio 0,02 ml/g tkanki, przy zakresach 0,016 — 0,026 ml/g. Uzyskane dane posłużyły w dalszej części pracy do określenia udziału radioaktywności krwi zalegającej w mózgu w jego ogólnej radioaktywności.

Ryc. 1 przedstawia odsetek podanej dawki we krwi całkowitej zdrowych szczurów po podaniu poszczególnych związków radioaktywnych w różnym czasie po wstrzyknięciu izotopu.

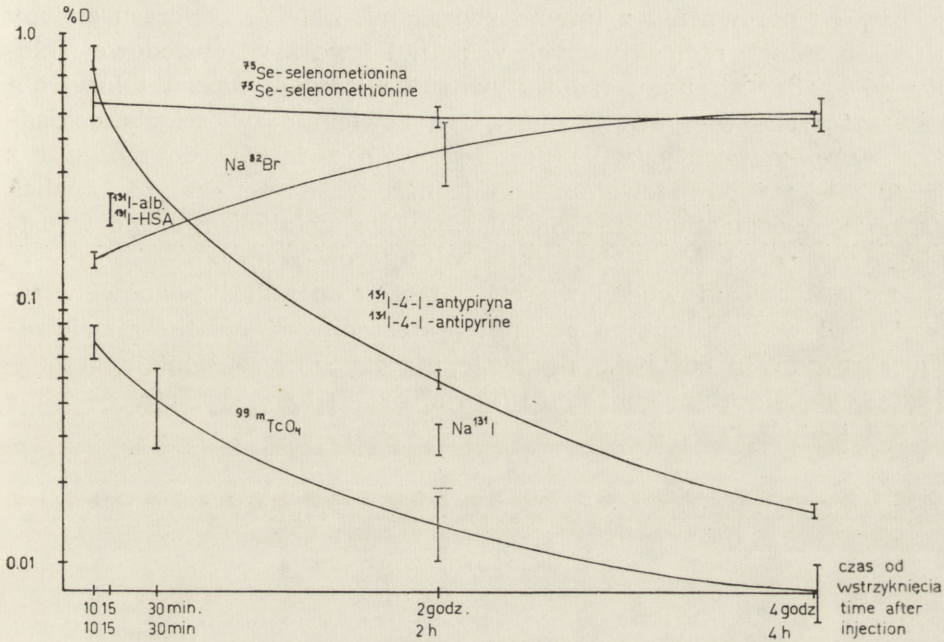


Ryc. 1. Odsetek dawki związków znakowanych w całej krwi jako funkcja czasu, u zdrowych szczurów po ich dożylnym wstrzyknięciu. Wartości średnie i odchylenia standardowe. Objętość całej krwi przyjęto jako 7% ciężaru ciała.

Fig. 1. Percent dose of the labelled compounds in the whole blood as a function of time in normal rats after i.v. injection. Mean values and standard deviations. Whole blood volume as a 7% body weight.

Radioaktywność krwi po 10 minutach od podania związku odzwierciedla głównie prędkość jego przechodzenia poza łożysko naczyniowe. Najszybciej opuszcza układ naczyniowy selenometionina, wolniej antypiryna, a jeszcze wolniej nadtechnetan i bromek. Najszybszy spadek radioaktywności krwi w funkcji czasu występuje po podaniu nadtechnetanu, nieco wolniejszy po podaniu antypiryny. Radioaktywność krwi po podaniu bromu utrzymuje się do 4 godzin w przybliżeniu na tym samym poziomie. Po podaniu selenometioniny radioaktywność krwi w przedziałach czasu 10 minut — 2 godziny wzrasta w przybliżeniu trzykrotnie, w dalszych czasach utrzymuje się na niezmiennym poziomie.

Ryc. 2 przedstawia stężenie poszczególnych związków w mózgu zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym w różnym czasie po ich podaniu.



Ryc. 2. Radioaktywność mózgu zdrowych szczurów jako funkcja czasu po dożylnym wstrzyknięciu związków znakowanych.

$\frac{\% D/g \times \text{ciężar ciała}}{100}$

Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 2. Radioactivity of the normal rat brain as a function of time after i.v. injection of the labelled compounds.

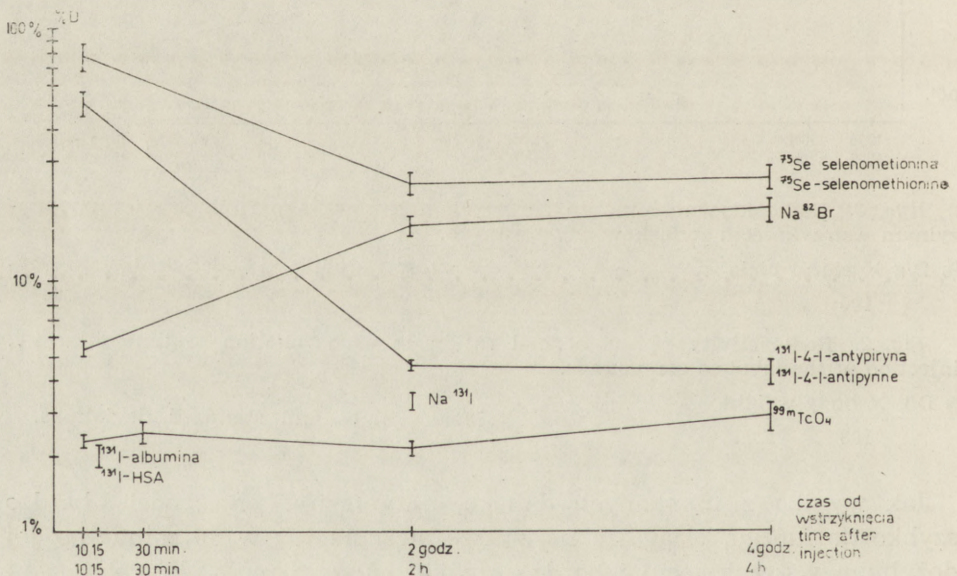
$\frac{\% D/g \times \text{body weight}}{100}$

Mean values and standard deviations.

Jak wynika z uzyskanych danych, antypiryna przechodzi bardzo szybko do mózgu, osiągając najwyższe stężenie już w 10 minut po jej dożylnym wstrzyknięciu i bardzo szybko opuszcza mózg. Również selenometionina przechodzi szybko do mózgu, jej stężenie w 10 minut od wstrzyknięcia jest jednak niższe niż antypiryny a radioaktywność mózgu w dalszych czasach utrzymuje się w przybliżeniu na stałym poziomie. Nadtechnetan przechodzi w minimalnych ilościach do mózgu. Jego stężenie jest niskie, a stwierdzana radioaktywność mózgu jest przede wszystkim wykładnikiem radioaktywności zawartej w nim krwi. Przechodzenie bromku jest znacznie wolniejsze i wzrasta do 4 godzin po

jego podaniu. Radioaktywność mózgu w 2 godziny po wstrzyknięciu Na^{131}J jest w przybliżeniu dwa razy wyższa w porównaniu z jego aktywnością po podaniu nadtechnetanu. Stosunkowo wysoka radioaktywność ^{131}J -albuminy zależna jest od jej wysokiej radioaktywności we krwi w porównaniu z innymi związkami. Zależne od czasu zmiany stężeń substancji radioaktywnych w mózgu i we krwi obwodowej skłoniły do analizy stosunku radioaktywności właściwej mózgu i krwi dla poszczególnych związków. Stosunek ten bowiem odzwierciedla dokładniej dynamikę przechodzenia poszczególnych związków do mózgu i z mózgu do krwi obwodowej, z tym jednak zastrzeżeniem, że analiza krzywych selenometioniny, związku aktywnie metabolizowanego w ustroju, wymaga odrębnej, dokładniejszej interpretacji.

Stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi w 10 minut po podaniu poszczególnych związków zwierzętom zdrowym przedstawia się następująco: ^{75}Se -selenometionina — 78,8%, ^{131}J -4-J-antypiryna — 51%, Na^{82}Br — 5,4%, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ — 2,3% i ^{131}J -albumina — 2%.



Ryc. 3. Stosunki radioaktywności właściwej mózg/krew jako funkcja czasu u zdrowych szczurów, po dożylnym wstrzyknięciu związków znakowanych.

$$\frac{\text{akt. własc. mózgu}}{\text{akt. własc. krwi}} \times 100$$

Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 3. Ratios of the specific radioactivity of brain blood as a function of time in normal rats, after i.v. injection of labelled compounds.

$$\frac{\text{spec. activity of brain}}{\text{spec. activity of blood}} \times 100$$

Mean values and standard deviations.

Analiza krzywych przedstawionych na ryc. 3 przemawia za nieznacznym przechodzeniem nadtechnetanu do mózgu, większym, lecz powolnym przechodzeniem bromku, oraz szybkiej dyfuzji antypiryny i jej redyfuzji z mózgu do krwi obwodowej. Charakter przebiegu krzywej selenometioniny w przedziale czasu 10 — 120 minut uwarunkowany jest znacznym przyrostem radioaktywności krwi obwodowej a nie spadkiem radioaktywności mózgu.

Stężenie związków znakowanych w mózgach szczurów po jednostronnym i obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych przedstawia ryc. 4.* Jak wynika z przedstawionych danych, nie stwierdza się statystycznie znamiennych różnic w stężeniu związków promieniotwórczych w mózgach szczurów zarówno po jednostronnym jak i obustronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej w porównaniu do grup kontrolnych. Różnice występujące w 2 podgrupach — 4 godziny po podwiązaniu obu tętnic dla nadtechnetanu i 24 godziny dla selenometioniny w tych samych warunkach doświadczalnych uwarunkowane są, jak się wydaje, podaniem wyższej dawki. Przemawia za tym brak statystycznie znamiennych różnic stosunku radioaktywności właściwej mózgu do krwi w porównaniu z grupą kontrolną.

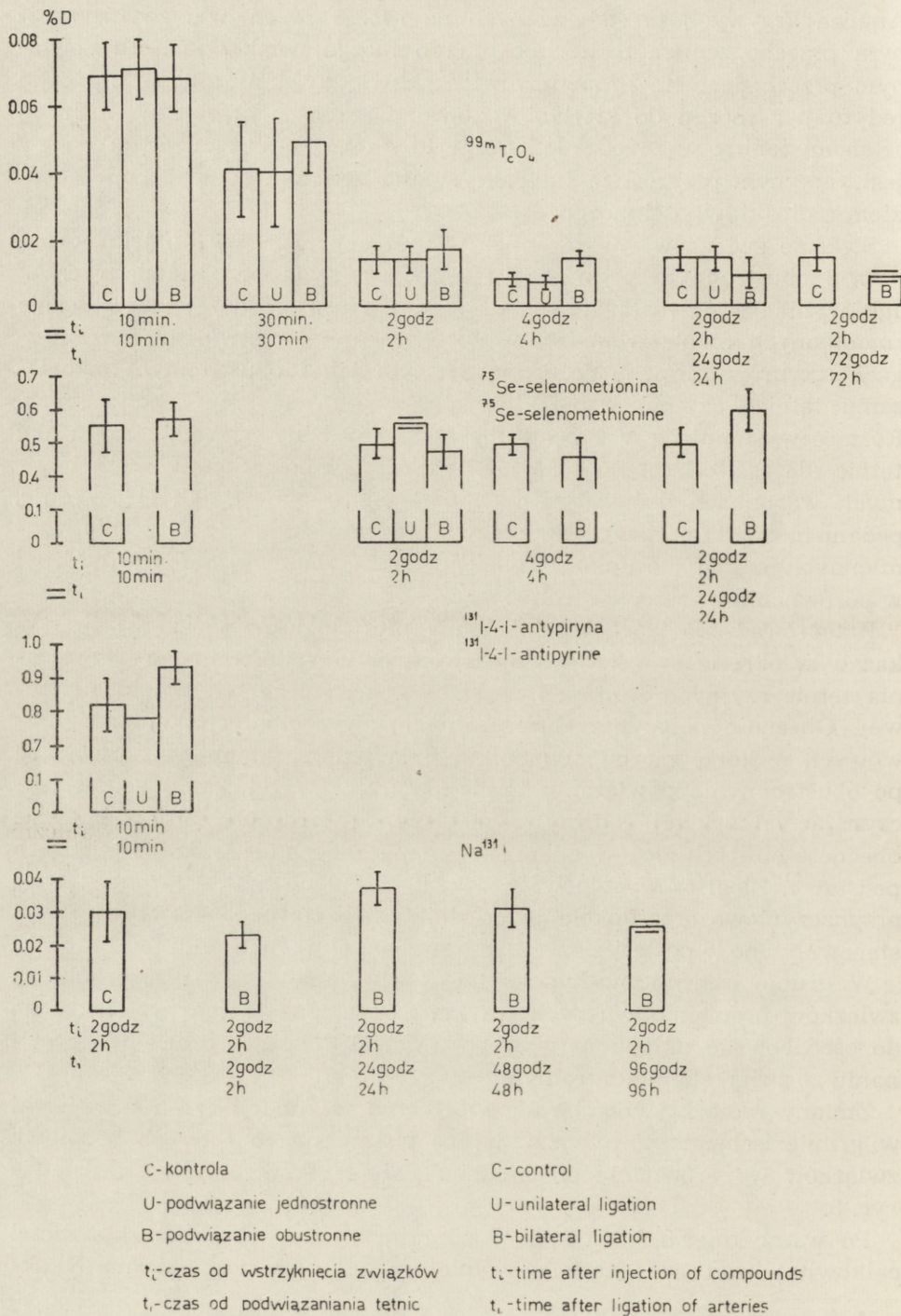
Przeprowadzone równoległe badania morfologiczne mózgow nie wykazały w okresie 1 — 24 godziny od jedno- lub obustronnego podwiązania tętnic szyjnych istotnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej. Obecność pojedynczych, rozsianych, zwyrodniałych komórek nerwowych w korze mózgu obu półkul była jedyną zmianą, obserwowaną po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych. W tej samej grupie, poczynając od drugiej godziny po zabiegu, stwierdzono histochemicznie obecność obfitych złogów glikogenu gromadzących się w korze i jądrach podstawy. Złogi te występowały w obu półkulach mózgu gromadząc się przynajmniej w postaci ziaren luźno rozsianych w neuropilu.

W grupie ischemiczno-hypoksyjnej zachowanie się poszczególnych związków promieniotwórczych we krwi obwodowej i ich przechodzenie do ośrodkowego układu nerwowego wykazały istotne różnice w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.

Zmiany radioaktywności całkowitej krwi w funkcji czasu u zwierząt w grupie ischemiczno-hypoksyjnej po wstrzyknięciu czterech badanych związków w porównaniu do zmian u zwierząt kontrolnych przedstawia ryc. 5.

Po wstrzyknięciu $^{99m}\text{TcO}_4$ i ^{131}J -antypiryny spadek radioaktywności całkowitej krwi jest znacznie wolniejszy w grupie ischemiczno-hypok-

* W grupie tej badanie ograniczono do 4 substancji radioaktywnych, a mianowicie $^{99m}\text{TcO}_4$, ^{75}Se -selenometioniny, ^{131}J -4-J-antypiryny i Na^{131}J .



Ryc. 4.

syjnej niż u zdrowych szczurow. U zwierząt, którym podano ^{75}Se -selenometioninę widoczny jest znacznie wolniejszy wzrost radioaktywności całkowitej krwi w czasie między 10 min. a 2 godz. od wstrzyknięcia związku w porównaniu z jej wzrostem w warunkach prawidłowych. Jedynie u zwierząt badanych z użyciem Na^{82}Br nie obserwuje się istotnych różnic w radioaktywności całkowitej krwi w porównaniu z warunkami prawidłowymi. W tej grupie doświadczalnej ulegają również najczęściej istotnym zmianom stosunki radioaktywności właściwej lewej półkuli mózgu (poddanej skojarzonemu działaniu czynników ischemicznych i hypoksyjnych) do radioaktywności właściwej krwi w funkcji czasu (ryc. 6), podczas gdy wartości dla półkuli prawej poddanej wyłącznie działaniu niedotlenienia nie wykazywały statystycznie znamienych różnic w porównaniu z grupą kontrolną.

U zwierząt badanych przy użyciu $^{99m}\text{TcO}_4$ obserwuje się po 2 godzinach znaczny, postępujący w czasie, wzrost radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych w porównaniu z poziomem radioaktywności w grupach kontrolnych. U zwierząt badanych ^{131}J -4-J-anty-piryną w przedziale czasu 45 minut — 2 godziny od ekspozycji na warunki niskotlenowe obserwuje się wolniejszy spadek radioaktywności półkuli lewej w porównaniu ze spadkiem radioaktywności mózgow zwierząt kontrolnych. Zwierzęta badane z użyciem ^{75}Se -selenometioniny wykazały po 10 minutach niższy poziom radioaktywności półkuli lewej, wzrastający po 1 godzinie powyżej poziomu radioaktywności mózgow w grupach kontrolnych. Dalszy przebieg krzywej zależny jest głównie od wolniejszego wzrostu radioaktywności krwi obwodowej w tych czasach.

U zwierząt badanych z użyciem Na^{82}Br różnice radioaktywności nie są tak wyraźne, jednakże w czasie 2 i 4 godziny po ekspozycji obserwuje się niższy poziom radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych.

Porównanie stężeń związków promieniotwórczych oraz ciężarów obu półkul w modelu ischemiczno-hypoksyjnym przedstawiono na ryc. 7

Ryc. 4. Stężenie związków znakowanych w mózgu szczura po jednostronnym i obustronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej i wstrzyknięciu dożylnym.

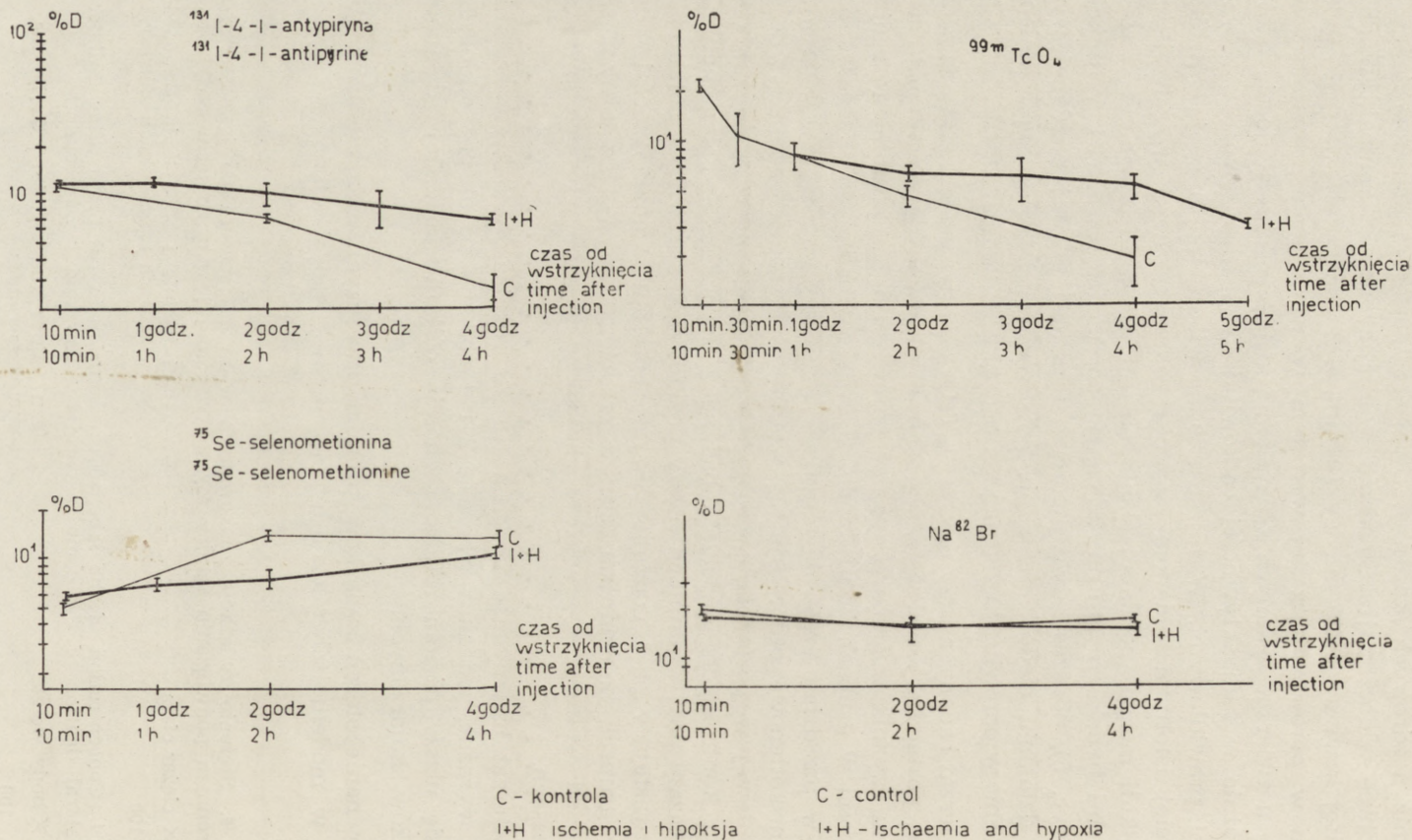
$\frac{\% \text{ D/g} \times \text{ciężar ciała}}{100}$

Wartości średnie i odchylenia standardowe, w niektórych przypadkach zakresy.

Fig. 4. Concentration of the labelled compounds in rat brain after unilateral and bilateral ligation of the common carotid artery and i.v. injection.

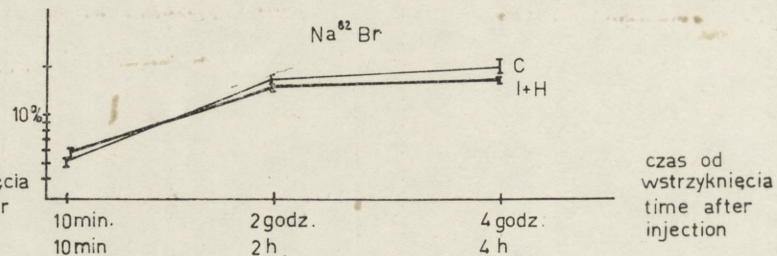
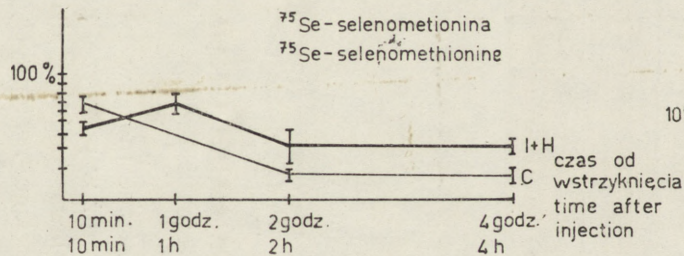
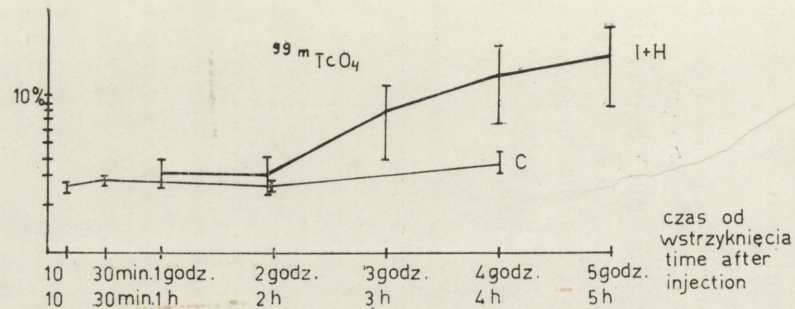
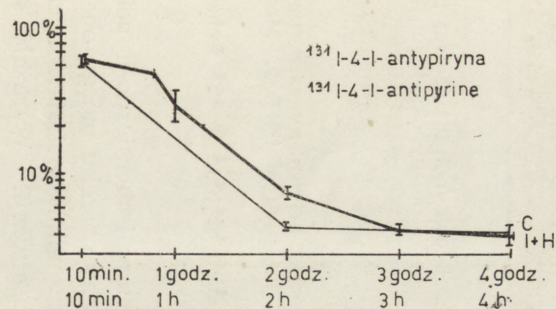
$\frac{\% \text{ D/g} \times \text{body weight}}{100}$

Mean values and standard deviations, in some cases ranges.



Ryc. 5. Odsetek dawki związków znakowanych w całej krwi jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po ich dożylnym wstrzyknięciu. Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 5. Percent dose of the radioactive compounds in the whole blood as a function of time in normal rats and in the ischaemic-hypoxic model, after i.v. injection. Mean values and standard deviations.



C - kontrola
I+H - ischemia i hipoksja

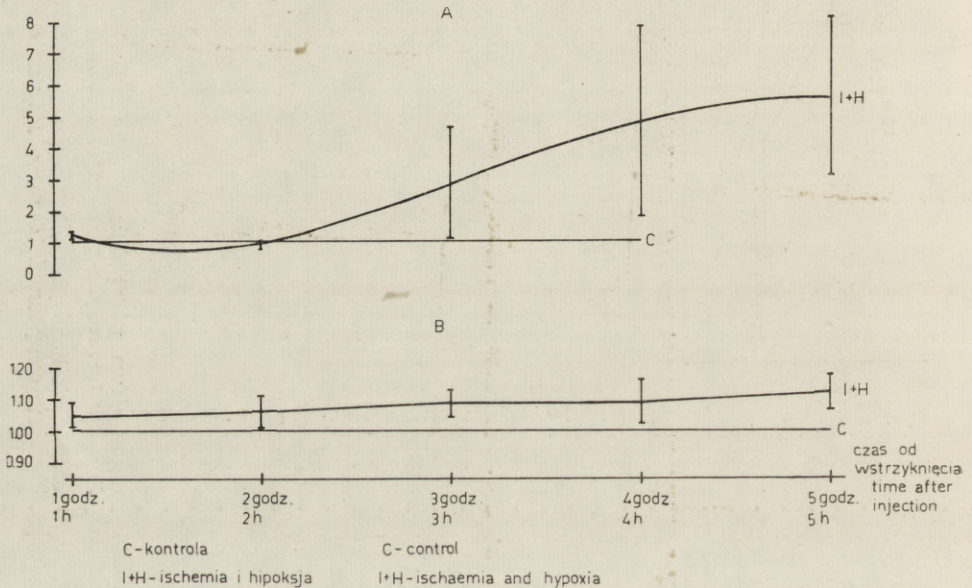
C - control
I+H - ischaemia and hypoxia

Ryc. 6. Stosunki radioaktywności właściwej mózgu (lewa półkula)/krew jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po dożylnym wstrzyknięciu związków. Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 6. Ratios of the specific radioactivity of brain (left hemisphere)/blood as a function of time in normal rats and in the ischaemic-hypoxic model, after i.v. injection of the compounds. Mean values and standard deviations.

na przykładzie różnic w stężeniu $^{99m}\text{TcO}_4$ wykazującego najwyraźniejsze zmiany.

U większości zwierząt stężenie $^{99m}\text{TcO}_4$ w półkuli lewej do 2 godz. od ekspozycji na warunki niskotlenowe było niższe w porównaniu ze stężeniem w półkuli prawej (poddanej wyłącznie działaniu hypoksji). W dalszych czasach stężenie nadtechnetanu w półkuli lewej wzrastało i przewyższało od 3 do 9 razy w poszczególnych badaniach, jego stężenie w półkuli prawej. Już po 1 godzinie od początku ekspozycji występował także u większości zwierząt wzrost ciężaru półkuli lewej, osiągający największe wartości po 5 godzinach.



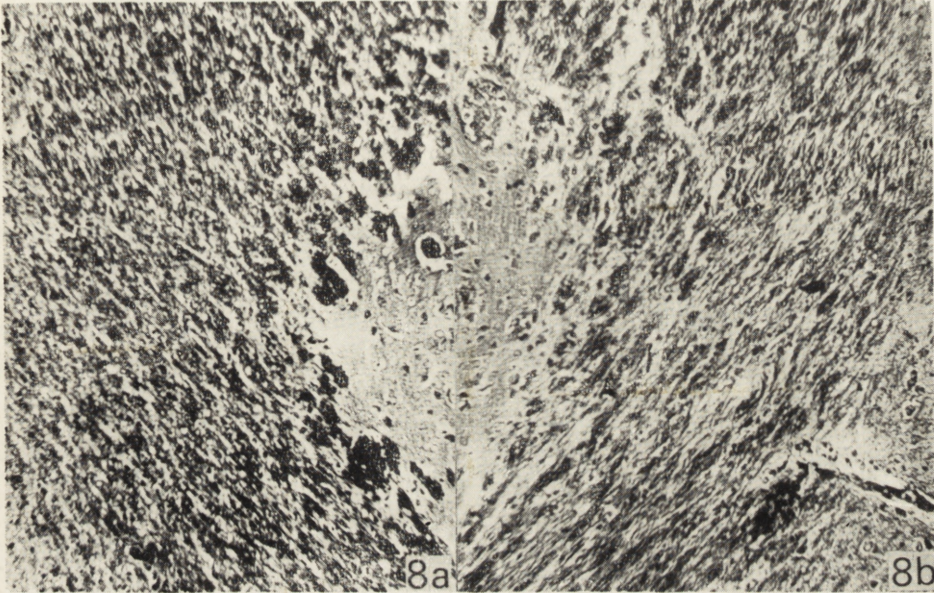
Ryc. 7. A. Stosunki radioaktywności właściwej półkuli lewej/półkuli prawej jako funkcja czasu u zdrowych szczurów i w modelu ischemiczno-hypoksyjnym, po dożylnym wstrzyknięciu $^{99m}\text{TcO}_4$. Wartości średnie i odchylenia standardowe.

B. Stosunki ciężarów półkuli lewej/półkuli prawej jako funkcja czasu w modelu ischemiczno-hypoksyjnym. Wartości średnie i odchylenia standardowe.

Fig. 7. A. Ratios of the specific radioactivity of left/right hemisphere as a function of time in the ischemic-hypoxic model, after i.v. injection of $^{99m}\text{TcO}_4$. Mean values and standard deviations.

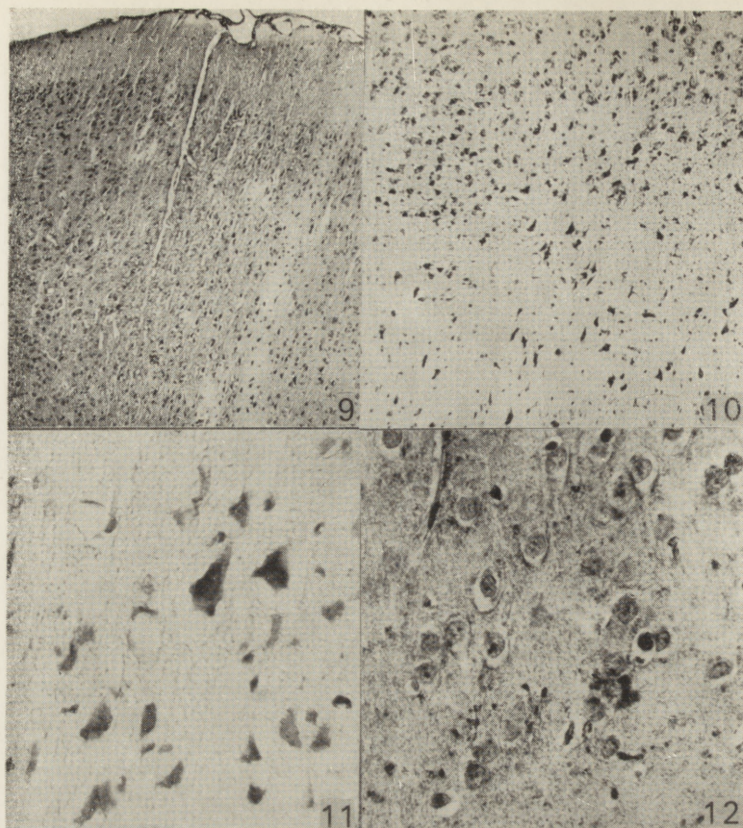
B. Weight ratios of left/right hemisphere as a function of time in the ischaemic-hypoxic model. Mean values and standard deviations.

Badania morfologiczne mózgow zwierząt z grupy ischemiczno-hypoksyjnej wykazywały już w pierwszej godzinie cechy obrzęku mózgu obejmującego półkulę lewą (poddaną działaniu czynników skojarzonych) i narastającego w ciągu następnych godzin obserwacji. Wyrażały się



Ryc. 8a, Prawidłowy obraz istoty białej płata czołowego mózgu szczura kontrolnego.
 b. Istota biała płata czołowego mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 3 godziny po ekspozycji w warunki niedotlenienia. Zwraca uwagę zblednięcie osłonek mielinowych i porozsuwanie pasm włókien nerwowych. Heidenhain. Pow. 60 X.

Fig. 8a. Normal white matter of the frontal lobe of the brain in control rat.
 b. The white matter of the frontal lobe of the brain in a rat from ischemic-hypoxic group, 3 hours following exposure to the hypoxic conditions. Myelin sheaths are pale, nerve fibre bundles parted. Heidenhain, X 60.



Ryc. 9. Kora mózgu na pograniczu unaczynienia tętnicy przedniej i środkowej mózgu u szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 12 godzin po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. Znaczny ubytek komórek nerwowych w prawej części ryciny, obejmujący obszar unaczyniony przez tętnicę środkową mózgu. Hematoksylina-eozyna. Pow. 60 X.

Fig. 9. Brain cortex of the boarder of vascularization by the anterior and middle cerebral artery from the rat of the ischemic-hypoxic group, 12 hours after exposure to hypoxic conditions. Significant loss of nerve cells on the right side of the figure comprises the area vascularized by the middle cerebral artery. H — E, X 60.

Ryc. 10. Kora mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 24 godziny po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. Półkula mózgu lewa. Rozległy zanik neuronów warstwy III. Nieliczne zachowane komórki nerwowe zdeformowane, obkurczone i nadbarwliwe. Hematoksylina-eozyna. Pow. 100 X.

Fig. 10. Brain cortex of a rat from the ischemic-hypoxic group 24 hours after exposure to hypoxic conditions, left hemisphere. Extensive loss of neurons of the 3rd cortical layer. Few neurons preserved are deformed, shrunked and hyperchromatic. H — E. X 100.

Ryc. 11. Kora półkuli lewej mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 5 godzin po ekspozycji na niedotlenienie. Zwyródnienie i zanik komórek nerwowych warstwy V w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. Hematoksylina-eozyna. Pow. 400 X.

Fig. 11. Brain cortex of the left hemisphere of a rat from the ischemic-hypoxic group 5 hours after exposure to hypoxia. Degeneration of nerve cells and neuronal loss of the Vth layer in the area vascularized by the middle cerebral artery. H — E. X 400.

Ryc. 12. Obfite złogi glikogenowe w neuropilu kory prawej półkuli mózgu szczura z grupy ischemiczno-hypoksyjnej w 24 godziny po ekspozycji w warunkach niedotlenienia. PAS — dimedon. Pow. 400 X.

Fig. 12. Abundant glycogen deposits in neuropil of the right hemisphere cortex of a rat from the ischemic-hypoxic group 24 hours after exposure to hypoxic conditions. PAS — dimedone. X 400.

one powiększeniem półkuli uszkodzonej, któremu towarzyszyło rozlane zblednięcie osłonek mielinowych, porozsuwanie pasm włókien nerwowych, w istocie białej (ryc. 8a i b) oraz ostry obrzęk oligodendrogleju. Od trzeciej godziny doświadczenia obserwowano ponadto uszkodzenie neuronów w korze mózgu i jądrach podstawy w półkuli mózgu po stronie podwiązanej tętnicy. Zmiany te o charakterze chromatolizy lub obkurczenia i nadmiernej barwliwości neurocytów (ryc. 11) umiejscowione były w formacjach szarych położonych w obszarze unaczynienia tętnicy mózgu środkowej. Najwcześniejsze i najsilniej wyrażone uszkodzenia występowały w polach pogranicza unaczynienia tętnicy środkowej i przedniej mózgu. W okresach późniejszych stwierdzono w tych obszarach zmiany o charakterze martwicy selektywnej (ryc. 9 i 10) z tworzeniem pól stanu sitowatego. W półkuli prawej spostrzegano tylko pojedyncze rozsiane wyrodnijące neurony w korze mózgu, poza tym jej obraz nie odbiegał od obrazu grupy kontrolnej. Złogi glikogenu pojawiające się od drugiej godziny po ekspozycji zwierzęcia na warunki atmosfery niskotlenowej, gromadziły się w neuropilu kory i jąder podstawy niemal wyłącznie w półkuli prawej, przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej (ryc. 12), a w wyjątkowych tylko przypadkach w otoczeniu ognisk uszkodzenia po stronie lewej.

Na podkreślenie zasługuje fakt znacznego zróżnicowania natężenia uszkodzeń morfologicznych w półkuli lewej, od ciężkich i rozległych, obserwowanych w niektórych przypadkach już w okresach wczesnych do stosunkowo niewielkich i mało zaawansowanych nawet w okresach późniejszych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zastosowane w badaniach związki chemiczne, znakowane pierwiastkami radioaktywnymi wykazują istotne różnice w zachowaniu się w ustroju zwierzęcia, wynikające z ich struktury chemicznej, powinowactwa do różnych tkanek i narządów, drogi, szybkości i mechanizmu ich wydalania z ustroju lub włączania w jego procesy metaboliczne. Niektóre z nich nie podlegają w ogóle metabolizmowi w ustroju i stosunkowo szybko są z niego wydalane przez nerki np. antypiryna, lub gromadzone i wydzielane w różnych narządach i tkankach np. technet, który jest wydzielany w żołądku i błonach śluzowych innych narządów oraz gromadzony w tarczycy. Inne związki, np. selenometionina ulegają złożonym procesom metabolicznym i wbudowują się do białek całego organizmu. ^{131}J ulega metabolizmowi w tarczycy, a ^{82}Br wymienia się z chlorkami tkanek. ^{131}J -albumina krąży przez dłuższy okres czasu we krwi obwodowej.

Przechodzenie poszczególnych związków chemicznych z łożyska naczyniowego do mózgu zależy od zespołu czynników chemicznych, fizykochemicznych i metabolicznych, warunkujących mechanizm ich transportu do tkanki nerwowej oraz od ich stężenia we krwi obwodowej. Wszystkie z zastosowanych związków wykazują w warunkach prawidłowych charakterystyczną dla każdego z nich dynamikę gromadzenia się w ośrodkowym układzie nerwowym. Nadtechnetan, podobnie jak ^{131}J -albumina w warunkach nieuszkodzonej bariery naczyniowo-mózgowej praktycznie nie przechodzi do tkanki nerwowej. Jego radioaktywność w mózgu stanowi jedynie wykładnik radioaktywności krwi zalegającej w naczyniach. Pozostałe związki przechodzą do tkanki, przy czym swobodnie dyfundująca antypiryna stanowi wskaźnik przechodzenia wody, podczas gdy szybko gromadząca się w tkance nerwowej i utrzymująca wysokie stężenie selenometionina zostaje wbudowana do jej białek (Zalewska 1971, Albrecht i wsp. 1971). Przechodzenie ^{82}Br , stanowiącego wymiennik chlorków tkanki nerwowej, jest procesem powolnym i długotrwałym.

Stosunki charakterystyczne dla warunków prawidłowych nie ulegają zaburzeniu w przypadku jednostronnego i obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, jak również przy zastosowaniu przedłużonego umiarkowanego niedotlenienia oraz krótkotrwałego ostrego niedotlenienia (model Levina — półkula po stronie niepodwiązanej tętnicy szyjnej).

Brak zaburzeń barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych w warunkach jednostronnego podwiązania tętnicy szyjnej, traktowanego zresztą jako kontrola w stosunku do ischemiczno-hypoksyjnego modelu Levina, jest sprawą oczywistą. Nie spotykano w tej grupie żadnych zmian histologicznych ani odkładania się glikogenu w mózgu, co potwierdza morfologiczne i histochemiczne obserwacje innych autorów (Levin 1960, Brown i Brierley 1968, Ibrahim i wsp. 1970). Wyniki przeprowadzonych badań izotopowych wskazują ponadto na brak w tej grupie doświadczalnej objawów niedokrwienia mózgu w związku z możliwością wyrównania krążenia mózgowego poprzez połączenia z odgałęzieniami drugostronnej tętnicy szyjnej i mózgowymi rozgałęzieniami tętnic kręgowych.

Możliwości wyrównania krążenia mózgowego istnieją również u zwierząt w przypadku dwustronnego zamknięcia tętnic szyjnych. Temu zapewne należy przypisać fakt, że u zwierząt 3 grupy nie stwierdzaliśmy w badanych przedziałach czasu izotopowo uchwytne objawy niedokrwienia mózgu. Wydaje się jednak, że w tym przypadku należy liczyć się z krótkotrwałym, przejściowym niedokrwieniem, być może przypadającym na okres wcześniejszy przed pomiarami radioaktywności mó-

zgu, wykonanymi w 10 min. po założeniu podwiązki na tętnice szyjne. Za taką interpretacją przemawiają spostrzegane przez nas dyskretne, rozsiane zmiany zwyrodnieniowe neuronów kory mózgu oraz obecność złogów glikogenowych w formacjach szarych półkul mózgowych w obszarach, odpowiadających zakresowi unaczynienia tętnic mózgu środkowych. Wskazują na to również histochemiczne i biochemiczne badania innych autorów, dotyczące przede wszystkim gromadzenia się glikogenu w mózgu w następstwie obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych (Ibrahim i wsp. 1970, Pronaszko i wsp. 1971) oraz zmian w aktywności enzymów metabolizujących glikogen i niektórych dehydrogenaz (Ibrahim i wsp. 1970, Domańska-Janik 1972, Śmiałek i wsp. 1971). Wydaje się, że krótkotrwałe i przemijające niedokrwienie, dostateczne dla wywołania zaburzeń metabolicznych w tkance nerwowej, jest zbyt małe dla spowodowania istotnych nieprawidłowości strukturalnych i zaburzeń bariery krew-mózg.

Na odrębną uwagę zasługuje brak zaburzeń w barierowym mechanizmie naczyniowo-mózgowym w przypadku prostego niedotlenienia. W naszych badaniach tę grupę uszkodzeń reprezentują półkule mózgu przeciwległe do podwiązanej tętnicy szyjnej w modelu Levina w przypadku zastosowania mieszaniny gazowej o obniżonej zarówno do 4% jak i do 10% objętości tlenu. W półkulach tych stwierdzono dyskretne, rozsiane objawy uszkodzeń strukturalnych tkanki oraz obfite złogi glikogenu w korze i jądrach podstawy. Zastosowany czynnik uszkadzający w postaci niedotlenienia prostego o różnym czasie trwania, pogłębionego ogólnym spadkiem ciśnienia krwi, którego wykładnikiem są zmiany w radioaktywności krwi całkowitej, prowadząc do zaburzeń metabolicznych i powtarzalnych, choć dyskretnych uszkodzeń strukturalnych, nie wywoływał zmian przepuszczalności bariery krew-mózg dla zastosowanych związków chemicznych. Wskazuje to na fakt, że samo niedotlenienie, niezależnie od jego stopnia, w zastosowanych warunkach doświadczalnych, nie prowadzi do zaburzeń w barierowych mechanizmach naczyniowo-mózgowych. Potwierdza to zarówno poglądy Crone'a (1963), który nie znajdował zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla inuliny i cukrozy nawet w przypadkach ciężkiego niedotlenienia prowadzącego do strukturalnych uszkodzeń tkanki nerwowej, jak i Bakaya i Bendixena (1963) oraz Bakaya (1967), którzy nie obserwowali zaburzeń mechanizmów barierowych w niedotlenieniu przy zabezpieczonym dostatecznym odpływie dwutlenku węgla.

Istotne zmiany w przepuszczalności bariery krew-mózg spostrzegano w przypadku skojarzonego działania niedokrwienia i niedotlenienia w modelu Levina w półkuli mózgu po stronie podwiązania tętnicy szyjnej

wspólnej. Zmiany te, wyrażające się gromadzeniem nadtechnetanu w tkance nerwowej i wzroście stężenia ^{75}Se -selenometioniny, wskazują na głębokie uszkodzenie mechanizmów barierowych. Zwiększona retencja antypiryny w tkance mózgowej jest wykładnikiem narastającego obrzęku mózgu, na którego obecność wskazują zarówno spostrzeżenia histologiczne jak i różnice stosunków wagowych między półkulą mózgu prawą i lewą. Niewyjaśnione pozostaje zachowanie się Na^{82}Br w tej grupie doświadczalnej, jakkolwiek uzyskane wyniki wskazują również na zaburzenie jego transportu. Obniżony poziom radioaktywności półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych przy zastosowaniu Na^{82}Br może być związany z zakłóconą wymianą jonów Cl^- z jonami Br^- w przypadku narastającego obrzęku mózgu, prowadzącego do gromadzenia się chlorków w tkance nerwowej. Zmianom w przepuszczalności bariery krew-mózg towarzyszą tu ciężkie uszkodzenia strukturalne tkanki nerwowej w postaci rozlanego zwyrodnienia komórek nerwowych przechodzącego do martwicy selektywnej rozległych obszarów formacji szarych półkul mózgu położonych w zakresie unaczynienia tętnicy mózgu środkowej oraz wspomniane poprzednio objawy obrzęku. Rozkład i charakter zmian morfologicznych wskazują na niedokrwienny mechanizm uszkodzenia. Podstawową rolę tego czynnika uszkadzającego ośrodkowy układ nerwowy w omawianej grupie doświadczalnej wykazują również nasze spostrzeżenia izotopowe. Niższe stężenie ^{75}Se -selenometioniny w półkuli poddanej działaniu czynników skojarzonych w czasie 10 minut od ekspozycji zwierząt na niedotlenienie w porównaniu ze stężeniem w mózgach zwierząt kontrolnych oraz niższe stężenie $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ w tejże półkuli w porównaniu z jego stężeniem w półkuli przeciwległej w okresie do 2 godzin od początku ekspozycji wskazują, że uszkodzenie barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych poprzedzone jest okresem znacznego niedokrwienia lewej półkuli mózgu. Wydaje się przy tym, że niedokrwienie stanowi wynik sumowania się miejscowych zaburzeń hemodynamicznych, związanych z podwiązaniem tętnicy szyjnej oraz zaburzeń ogólnoustrojowych, prowadzących do ostrego upośledzenia krążenia i spadku ciśnienia krwi. Wskazuje na to odmienne zachowanie się poziomu radioaktywności całkowitej krwi w grupie doświadczeń przeprowadzonych na modelu Levina w porównaniu z grupą kontrolną. Wolniejszy spadek radioaktywności krwi u zwierząt badanych przy użyciu nadtechnetanu i antypiryny przemawia w sposób przekonujący za niedokrwieniem narządów i tkanek. Wolniejszy wzrost radioaktywności krwi między 10 minutą a 2 godziną u zwierząt badanych ^{75}Se -selenometioniną w porównaniu do przebiegu krzywej w grupach kontrolnych wskazywać może również nie tylko na znaczne zaburzenia hemodynamiczne lecz także na towarzyszące im nie-

prawidłowości w metabolizmie tego aminokwasu pod wpływem niedotlenienia. Wydaje się zatem, że dopiero skojarzenie ogólnoustrojowych i miejscowych zaburzeń hemodynamicznych stanowi czynnik uszkadzający zarówno strukturę tkanki nerwowej jak i stan przepuszczalności bariery krew-mózg, podczas gdy każdy z tych czynników zastosowany oddzielnie, nie wywiera wpływu uszkadzającego. Zmiany strukturalne tkanki w tym przypadku stanowią prawdopodobnie czynnik krytyczny, sprzyjający rozwojowi zaburzeń w przepuszczalności bariery krew-mózg. Można założyć bowiem, że procesy autolityczne tkanki nerwowej, ulegającej martwicy prowadzą do znacznego zakwaszenia środowiska tkankowego, odgrywającego w stosunku do mechanizmów barierowych analogiczną rolę jak hyperkapnia skojarzona z hypoksją u Bakaya i Bendixena (1963) czy van Harrevelda i Schade (1960) oraz van Harrevelda (1962). Analogiczne wnioski wypływają również z doświadczeń Gunna i wsp. (1962), Spectora (1961), Hillsa i Spectora (1963) oraz Mosakowskiego i wsp. (1968).

Dodatkowego wyjaśnienia wymagają stosunkowo znaczne rozrzuty wyników pomiarów radioaktywności mózgu u zwierząt grupy ischemiczno-hypoksyjnej mimo zwrócenia szczególnej uwagi na zachowanie jednakowych warunków prowadzenia doświadczeń. Spotykany w tym modelu doświadczalnym brak powtarzalności zmian i występujący częściej różny stopień ich nasilenia w jednakowych przedziałach czasowych, omawiane również w pracach innych autorów (Levin 1960, Brown-Brierley 1968, Domańska-Janik 1972) uwarunkowane są prawdopodobnie indywidualnymi różnicami możliwości wyrównania miejscowych zaburzeń hemodynamicznych, rozwijających się w następstwie podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przy poddaniu zwierzęcia niedotlenieniu. Różnice te wynikają zapewne z osobniczych różnic w ukształtowaniu połączeń obecnych między poszczególnymi dorzecznymi tętnic mózgowych.

WNIOSKI

1. Jedno- i obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u dorosłych szczurów nie prowadzi do uszkodzenia barierowych mechanizmów naczyniowo-mózgowych, mimo, że zmiany morfologiczne i histochemiczne stwierdzone w przypadku obustronnego ich podwiązania wykazują objawy zaburzeń metabolicznych i dyskretnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej. Równocześnie w badanych przedziałach czasu nie stwierdza się uchwytanych metodami izotopowymi objawów niedokrwienia mózgu. Gromadzenie się glikogenu w tkance oraz obecność nieznacznych zwyrodnień neuronalnych w przypadkach obustron-

nego podwiązania tętnic szyjnych wskazują jednak na możliwość krótkotrwałego, przejściowego niedokrwienia, być może w okresie poprzedzającym najwcześniejsze pomiary radioaktywności.

2. Zastosowanie zarówno przedłużonego umiarkowanego niedotlenienia jak i krótkotrwałego głębokiego niedotlenienia nie prowadzi również do uszkodzenia bariery krew-mózg, mimo że towarzyszy mu ogólnoustrojowy spadek ciśnienia krwi, a stwierdzone zmiany morfologiczne i histochemiczne w tkance nerwowej świadczą o jej uszkodzeniu.

3. Skojarzone działanie czynników ischemiczno-hypoksyjnych prowadzi do masywnych uszkodzeń przepuszczalności bariery krew-mózg, którym towarzyszy narastający obrzęk mózgu i pogłębiające się uszkodzenia strukturalne tkanki.

4. Podstawową rolę w uszkodzeniu mechanizmów barierowych w encefalopatii ischemiczno-anoksyjnej odgrywa niedokrwienie tkanki nerwowej rozwijające się w następstwie skojarzenia miejscowych zaburzeń hemodynamicznych związanych z podwiązaniem tętnicy szyjnej i ogólnoustrojowym spadkiem ciśnienia krwi w wyniku hypoksji.

A. Капустиньски, М. Я. Моссаковски, Е. Альбрехт, С. Янушевски

ВЛИЯНИЕ ИСХЕМИИ И ГИПОКСИИ НА БАРЬЕР КРОВЬ-МОЗГ У КРЫС

Резюме

Исследовали влияние разных форм гипоксии на проницаемость гемато-энцефалического барьера и накопление в мозгу крысы ряда введенных внутривенно низко и высокомолекулярных химических соединений, меченных радиоактивными изотопами, такими как: $^{99m}\text{TeO}_4$, ^{75}Se — селенметионин, Na^{131}I , ^{131}I — человеческий альбумин, ^{131}I -4-J — антипирин, а также Na^{82}Br . В исследованиях, которые проводились на крысах расы Вистар обоого пола и веса 150—250 г, применялись следующие модели гипоксии: а) модель односторонней ишемии, заключающаяся в односторонней подвязке левой общей сонной артерии, в) модель обесторонней ишемии с подвязкой обеих сонных артерий, с) комбинированная гипоксическая ишемическая модель, заключающаяся в экспозиции животных с односторонней подвязкой общей сонной артерии в атмосфере со сниженным содержанием кислорода ($4\% \text{O}_2$, $96\% \text{N}_2$) в течение 30 мин.

Прослеживались изменения, имеющие место спустя разное время после операции и подачи изотопа. Параллельно проводилось наблюдение морфологических повреждений нервной ткани, появляющихся в аналогичных экспериментальных условиях.

Было обнаружено, что массивные повреждения проницаемости гемато-энцефалического барьера обнаруживаются только в эффекте сопряженного действия гипоксическо-ишемических факторов и им сопутствуют глубокие морфологические изменения и прогрессирующий отек мозга. Простая гипоксия или

ишемия не влияют на свойства барьера кровь-мозг по отношению во всем исследованным соединениям. Было обнаружено, что ишемия нервной ткани, развивающаяся в результате сопряженного эффекта локальных гемодинамических нарушений с общеорганическим падением кровяного давления, является основным фактором, повреждающим гемато-энцефалический барьер.

A. Kapuściński, M. J. Mossakowski, J. Albrecht, S. Januszewski

EFFECT OF ISCHEMIA AND HYPOXIA ON THE PERMEABILITY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN RAT

S u m m a r y

The effect of various forms of hypoxia on the permeability of the blood-brain barrier and accumulation in brain of a number of high and low molecular weight compounds labelled with radioactive isotopes was investigated. The radioactive compounds like $^{99m}\text{TcO}_4$, ^{75}Se -selenomethionine, Na^{131}I , ^{131}I -human serum albumin, Na^{82}Br , ^{131}I -4-I-antipyrine, were injected intravenously into albino „Wistar” rats of both sexes, weighing 150–250 g.

The following hypoxic models were employed: a) Unilateral ischemia consisting on unilateral ligation of the common carotid artery, b) bilateral ischemia with the ligation of both common carotid arteries, c) Ischemic-hypoxic hypoxia, consisting on the exposure of the animals with unilaterally ligated common carotid artery to the atmosphere with a low oxygen tension (4% O_2 and 96% N_2) for 30 minutes.

The changes occurring at various times after operation and isotope injection were followed. Paralelly, the observations were made of morphological lesions which appeared under identical experimental conditions.

Considerable disorders in the permeability of the blood-brain barrier, accompanied by intensive morphological changes and developing brain edema were noticed exclusively in consequence of the simultaneous application of the hypoxic and the ischemic factor. Simple hypoxia or ischemia remained without influence on the blood-brain barrier. Ischemia of the brain tissue, resulting from the association of local hemodynamic disorders with the general decrease of body blood tension was concluded to be the main factor impairing the blood-brain barrier.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J., Kapuściński A., Januszewski S.: Effect of partial ischemia and ischemic-hypoxic hypoxia on the activity of a cell-free protein synthesizing system from rat brain. *Bull. Acad. Sci. Pol. w druku.*
2. Bakay L., Bendixen H. H.: Central nervous system vulnerability in hypoxic states. Isotope uptake studies. In *Selective Vulnerability of the Central Nervous System in Hypoxia*. Ed. W. H. McMenemey and J. F. Schadé. Oxford. Blackwell Scient. Publ., 1963, 63–78.
3. Bakay L.: Radio-isotopic studies in brain edema. In *Brain Edema*. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger, Springer Verl., Wien. New York 1967, 517–529.
4. 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. Pathol.*, 1968, 49, 87–106.

5. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
6. Crone C.: The permeability of capillaries in various organs determined by use of the indicator diffusion method. *Acta Physiol. Scand.* 1963, 58, 292—305.
7. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropatologia Polska*, 1972, 10, 17—43.
8. Gunn C. G., Williams G. R., Parker J. T.: Edema of brain following circulatory arrest. *J. Surg. Res.*, 1962, 2, 141—143.
9. Hills C. P., Spector R. G.: Anoxia and cerebral water content in the adult rat. *Nature (London)*, 1963, 199, 393.
10. Ibrahim M.Z.M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity from several forms of hypoxia. *Amer. J. Pathol.*, 1970, 60, 403—420.
11. Klatzo I., Farkas-Bargeton E., Guth L., Miquel J., Olsson Y.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation. *Proc. VI Intern. Congress of Neuropathology*. Ed. Masson et Cie, Paryż 1970, 351—365.
12. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Pathol.*, 1960, 36, 1—17.
13. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in the central nervous system ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, w druku.
14. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Rodriguez de Curret H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1968, 27, 500—516.
15. Mossakowski M. J., Zelman I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedostatku tlenowego w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki*, suplement 1, 1971, 37—50.
16. Pronaszko A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 281—296.
17. Spector R. C.: Water content of the brain in anoxic-ischemic encephalopathy in adult rats. *Brit. J. Exp. Path.* 1961, 10, 604—616.
18. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDP-glucose: alfa-4-glucosyltransferase and alfa-1,4-glucan: orthophosphateglucosyltransferase activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1971, 19, 242—248.
19. Van Harreveld A., Schade P. J.: On the distribution and movements of water and electrolyte in the cerebral cortex. In: *Structure and Function of the Cerebral Cortex*. Elsevier Publ. Co. Amsterdam 1960, 253—256.
20. Van Harreveld A.: Water and electrolyte distribution in central nervous tissue. *Fed. Proc.*, 1962, 21, 659—664.
21. Zalewska T.: Badania nad wbudowywaniem ⁷⁵-Se-selenometioniny do białek ośrodkowego układu nerwowego królika. W przygotowaniu do druku.

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