

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ALICJA PRONASZKO-KURCZYŃSKA,
JAN KORTHALS, ARKADIUSZ WRUTNIAK

WPŁYW UMIARKOWANEGO NIEDOKRWIENIA
NA POZIOM GLIKOGENU W MÓZGU
W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA DOJRZAŁOŚCI
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO *)

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

Niedostatek tlenowy stanowi jeden z podstawowych czynników prowadzących do gromadzenia się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym. Mossakowski i wsp. (1968) opisali obfite gromadzenie się glikogenu w mózgach noworodków małych w warunkach okołoporodowej asfiksji. Spostrzeżenia te potwierdziły późniejsze oznaczenia ilościowe Rivery i wsp. (1970). To samo zjawisko w przypadku umiarkowanego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego opisali Ibrahim i wsp. (1970), Crowell i wsp. (1971), Mossakowski i Zelman (1971) oraz Long i wsp. (1972), którzy ponadto obserwowali gromadzenie się glikogenu w następstwie niedotlenienia prostego. W poprzedniej pracy (Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971) określiliśmy dynamikę gromadzenia się glikogenu w mózgu w następstwie dwustronnego podwiązania tętnic szyjnych u szczurów dorosłych. Zabieg ten wywołujący krótkotrwałe, przemijające niedokrwienie mózgu (Albrecht 1972) nie prowadzi do powstawania nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Mossakowski i Zelman (1971) zwrócili uwagę na istotne różnice w gromadzeniu się glikogenu w mózgach zwierząt dojrzałych i niedojrzałych.

Skłoniło to nas do przeprowadzenia analizy dynamiki gromadzenia się glikogenu i jego lokalizacji w mózgach zwierząt znajdujących się w różnych fazach dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego.

*) Praca wykonana w oparciu o pomoc finansową P. L. 480. Program U. S. Public Health Service. Agreement 05—004—1

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach białych rasy Wistar, obu płci, którym w wieku 1, 2, 3, 4 i 6 tygodni podwiązywano w narkozie eterowej obustronnie tętnice szyjne wspólne. Zwierzętom kontrolnym, nie poddanym zabiegowi operacyjnemu stosowano również narkozę eterową, przez taki sam okres czasu, jak w grupie doświadczalnej. Dodatkową grupę kontrolną stanowiły zwierzęta zdrowe, nie poddane żadnym zabiegom. Zwierzęta wszystkich grup wieku dekapitowano po upływie 6, 12, 24, 48, 72 i 120 godzin od podwiązania tętnic lub od zakończenia narkozy. Następnie mózg podlegał opracowaniu, którego charakter zależał od typu prowadzonych badań.

Wykonywano równolegle badania biochemiczne, histologiczne, histochemiczne (oznaczanie glikogenu) i ultrastrukturalne. Te ostatnie ograniczone były jedynie do wybranych grup czasowych.

Badania biochemiczne

Do oznaczeń biochemicznych pobierano oddzielnie obie półkule mózgu. W celu wyizolowania glikogenu stosowano technikę opisaną w poprzedniej pracy (Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971). Oznaczanie glukozy wykonano metodą kolorymetryczną wg Nelsona (1944), na fotometrze spektralnym „Specol” przy długości fali 540 nm. Stężenie glukozy odczytywano z krzywej wzorcowej, wykonanej z 10, 20, 40, 30 i 100 μg glukozy. Roztwór standardowy wynosił 100 μg glukozy na 1 ml. Zawartość glikogenu wyrażano w mg glukozy na 100 g tkanki. Wyniki poddano analizie statystycznej, stosując test Studenta. Obliczano odchylenie standardowe, zmienną losową t , oraz stopień prawdopodobieństwa. Każda grupa zarówno doświadczalna, jak i kontrolna liczyła co najmniej 5 zwierząt.

Badania morfologiczne

Badania morfologiczne obejmujące rutynowe barwienie hematoksyliną-eozyną i fioletem krezyłu oraz histochemiczne oznaczanie glikogenu wykonano na 75 mózgach szczurów, w tym 60 doświadczalnych i 15 kontrolnych.

Mózg po wydobyciu z czaszki dzielono dwoma cięciami, z których pierwsze prowadzono do przodu od skrzyżowania wzrokowego, a drugie do tyłu od ciał suteczkowatych na bloki, które następnie utrwalano w płynie Rossmanna, zatapiano w parafinie i skrawano w mikrotomie na skrawki grubości 10 μ .

Oznaczanie glikogenu wykonywano przy pomocy odczynu PAS z równoczesnym blokowaniem dimedonem wg sposobu opisanego przez Bulmera (1959). Swoistość odczynu histochemicznego sprawdzano przy pomocy trawienia diastazą.

Badanie mikroskopowo-elektronowe

Do badań mikroskopowo-elektronowych użyto 12 szczurów. Badania przeprowadzono na zwierzętach 1- i 4-tygodniowych z przeżyciem 48 godzin i 6-tygodniowych po przeżyciu 12 i 48 godzin. Na każdą grupę przypadały dwa zwierzęta po podwiązaniu tętnic szyjnych i 1 poddane wyłącznemu działaniu narkozy eterowej.

Zwierzęta dekapitowano, po czym szybko otwierano czaszkę i pobierano drobne wycinki tkanki z okolicy czołowo-ciemieniowej obu półkul mózgu. Pobrany materiał utrwalano przez 2 godziny w 4% roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym o pH 7,3, a następnie przez 1 godzinę w 2% czterotlenku osmu. Tkanekę odwadniano w etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie 812. Materiał krojono na ultramikrotomie f-my Reichert. Ultracienkie skrawki podbarwiano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Zwierzęta doświadczały po wyjściu z narkozy eterowej nie zdradzały na ogół objawów świadczących o uszkodzeniu układu nerwowego, poza obecnością u większości z nich obustronnej ptozy, której wystąpienie wiązano z uszkodzeniem współczulnych splotów tętniczo-szyjnych w czasie podwiązania *a. carotis*.

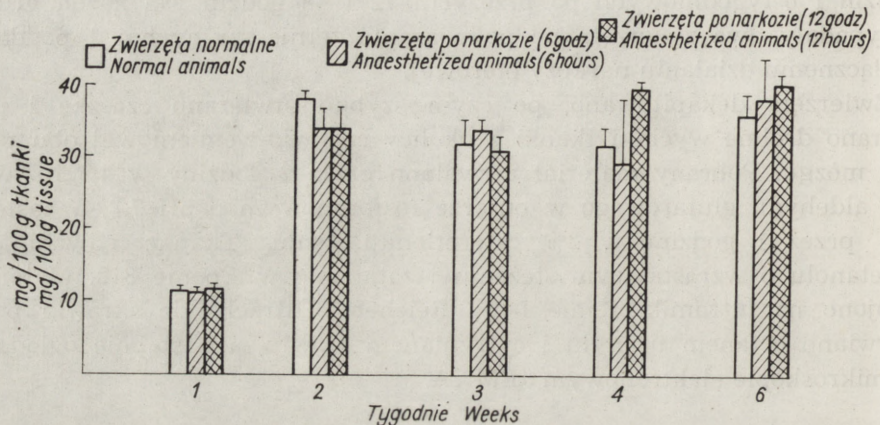
Jednakże u znacznego odsetka zwierząt, zwłaszcza w młodszych grupach wieku obserwowano często okresowe napady drgawek, z przewagą składowej tonicznej, występujące we wczesnych godzinach po zabiegu.

U szczurów 1-tygodniowych po podwiązaniu tętnic szyjnych obserwowano bardzo znaczne zahamowanie wzrostu.

Oznaczenia ilościowe

We wstępnej serii doświadczeń określono wpływ narkozy na zawartość glikogenu w mózgu. Ze względu na uprzednio stwierdzony, w grupie zwierząt dorosłych, statystycznie znamiennej wzrost zawartości glikogenu

jedynie w 12 godzinie po zastosowaniu narkozy (Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971) badania tej serii ograniczono do 6- i 12-godzinnych grup czasowych. Poza nieznacznymi zmianami w grupie zwierząt 4-tygodniowych w 12 godzinie po zastosowaniu narkozy, w żadnej z pozostałych grup wieku nie stwierdzono różnic w zawartości glikogenu w mózгах zwierząt poddanych narkozie w porównaniu ze zwierzętami bez narkozy (wykres 1). Spostrzeżenie to pozwoliło na potraktowanie w dalszych doświadczeniach zwierząt poddanych narkozie jako grupę kontrolną.



Wykres 1. Porównanie zawartości glikogenu w mózgu szczurów nietkniętych i poddanych narkozie eterowej. Wysokość kolumn odpowiada średniej wartości uzyskanej z każdej grupy. Linie pionowe wyznaczają odchylenie standardowe.

Diagram 1. Comparison of glycogen content in the brain of normal and anaesthetized rats. The height of each column represents the mean of each group. Vertical bars represent an standard deviation.

Dla wyłączenia wpływu zabiegu na zawartość glikogenu w mózgu, przeprowadzono uzupełniającą serię oznaczeń na zwierzętach, u których wykonano tzw. zabieg rzekomy, polegający na wyizolowaniu tętnic szyjnych, bez ich podwiązania. Stwierdzono przy tym, że zawartość glikogenu w mózgu u zwierząt tej grupy nie różniła się od jego zawartości u zwierząt narkotyzowanych i nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

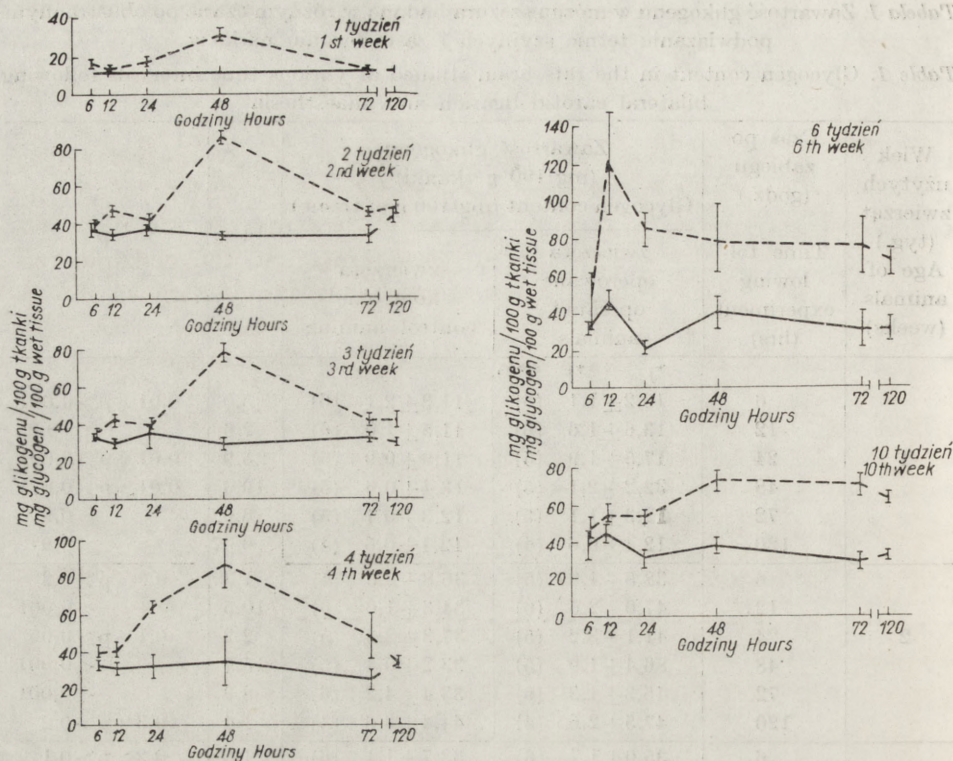
Poziom glikogenu w mózgu u zwierząt kontrolnych zmieniał się w miarę rozwoju. U szczurów 1-tygodniowych zawartość glikogenu wynosiła od 11,3 do 13,4 mg/100 g tkanki. U zwierząt 2-tygodniowych była ona już trzykrotnie wyższa, wynosząc od 33,2 do 44,4 mg/100 g tkanki. Na tym samym mniej więcej poziomie utrzymywała się w dalszych badanych grupach wieku, z wyjątkiem zwierząt 6-tygodniowych, wykazujących znaczne fluktuacje w poziomie wielocukru.

Tabela 1. Zawartość glikogenu w mózgu szczura badana w różnym czasie po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych i zastosowaniu narkozy

Table 1. Glycogen content in the rats brain studied at various time intervals following bilateral carotid ligation and anaesthesia

Wiek użytych zwierząt (tyg.) Age of animals (weeks)	Czas po zabiegu (godz.) Time following experiment (hrs)	Zawartość glikogenu (mg/100 g tkanki) Glycogen content (mg/100 g of tissue)			t	p
		zwierzęta operowane operated animals	zwierzęta kontrolne control animals			
1	6	*) 16,2±1,1 (6)	11,3±2,1 (6)	5,0	0,01 > p > 0,001	
	12	**) 13,6±1,6 (6)	11,5±1,0 (6)	2,6	p > 0,05	
	24	***) 17,5±1,9 (5)	11,9±0,9 (5)	5,9	0,01 > p > 0,001	
	48	32,2±2,1 (5)	13,4±0,6 (5)	19,3	0,01 > p > 0,001	
	72	12,3±1,1 (5)	12,3±0,7 (5)	0,02	> 0,9	
	120	12,4±0,6 (4)	12,4±0,6 (4)	0,07	> 0,9	
2	6	38,5±1,97 (5)	36,8±2,3 (5)	1,3	0,3 > p > 0,2	
	12	47,0±2,5 (6)	34,3±1,0 (6)	10,5	< 0,001	
	24	41,1±3,2 (5)	37,3±2,3 (5)	2,2	0,1 > p > 0,05	
	48	86,4±1,9 (5)	33,2±0,4 (5)	15,7	< 0,001	
	72	45,3±1,3 (6)	33,4±4,2 (6)	8,9	< 0,001	
	120	47,5±2,6 (4)	44,4±3,5 (4)	1,4	0,3 > p > 0,2	
3	6	35,0±1,7 (6)	33,7±1,1 (6)	1,6	0,2 > p > 0,1	
	12	41,9±2,4 (5)	29,5±1,3 (5)	10,0	< 0,001	
	24	40,0±2,7 (6)	35,1±6,6 (6)	1,8	0,2 > p > 0,1	
	48	79,4±4,5 (5)	28,9±1,6 (5)	23,6	p < 0,001	
	72	42,0±2,3 (4)	32,5±1,4 (4)	6,9	0,02 > p > 0,01	
	120	42,4±3,4 (6)	30,3±0,8 (6)	8,6	< 0,001	
4	6	39,5±4,1 (5)	32,9±2,0 (5)	3,2	0,05 > p > 0,02	
	12	40,5±3,7 (6)	31,1±3,2 (6)	4,7	0,01 > p > 0,001	
	24	64,1±2,8 (5)	31,9±6,2 (5)	11,6	< 0,001	
	48	87,1±13,9 (5)	34,0±13,3 (5)	6,2	0,01 > p > 0,001	
	72	48,0±12,5 (5)	24,5±5,3 (5)	3,9	0,02 > p > 0,01	
	120	33,6±1,4 (5)	34,1±1,3 (5)	0,06	> 0,9	
6	6	47,4±15,1 (7)	32,1±2,5 (7)	2,7	0,05 > p > 0,02	
	12	121,1±27,9 (7)	47,6±4,6 (7)	6,2	< 0,001	
	24	84,3±8,9 (5)	21,2±2,2 (5)	5,0	0,01 > p > 0,001	
	48	77,2±16,7 (7)	40,2±8,5 (7)	5,2	0,01 > p > 0,001	
	72	75,5±14,2 (6)	30,4±9,2 (6)	6,5	0,01 > p > 0,001	
	120	67,4±6,5 (4)	30,8±5,3 (4)	8,7	0,01 > p > 0,001	

*) średnia arytmetyczna
arithmetic mean**) odchylenie standardowe
standard deviation***) liczba zwierząt
number of animalst — zmienna losowa testu Studenta
Student's testp — prawdopodobieństwo
significance of difference



Wykres 2. Zmiany w zawartości glikogenu w mózgu szczurów w różnym wieku po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych i zastosowaniu narkozy. ——— zwierzęta kontrolne (narkoza); — — — — — zwierzęta operowane. Punkty przedstawiają średnie z 4—7 oznaczeń, pionowe linie wyznaczają odchylenia standardowe.

Diagram 2. Changes in glycogen content in the brain of rats at various age after bilateral carotid ligation and anaesthesia. ——— control animals (anaesthetized); — — — — — operated animals. The points present the means of 4—7 animals, verticals bars represent plus and minus one standard deviation.

Zawartość glikogenu w mózgu zwierząt doświadczalnych wzrastała znacznie w porównaniu do zwierząt kontrolnych we wszystkich grupach wieku (tabela 1 i wykres 2). Statystycznie znamienne różnice występowały po 24 godzinach u szczurów 1-tygodniowych, a po 12 godzinach od podwiązania tętnic szyjnych we wszystkich pozostałych grupach wieku. Maksymalny, 100% przyrost glikogenu u zwierząt 1, 2, 3 i 4-tygodniowych przypadał na 48 godzinę doświadczenia, po czym jego poziom spadał i zbliżał się, względnie osiągał poziom grupy kontrolnej w 120 godzinie doświadczenia. Narastanie zawartości glikogenu u zwierząt 1, 2 i 3-tygodniowych przebiegało w sposób ostry i przypadało zasadniczo na okres między 24 a 48 godziną po podwiązaniu tętnic szyj-

nych. Krzywa przyrostu glikogenu u zwierząt 4-tygodniowych miała przebieg łagodniejszy.

U szczurów 6-tygodniowych krzywa zmian zawartości glikogenu w mózgu przebiegała w sposób odmienny. Maksymalny przyrost glikogenu przypadał na 12 godzinę po podwiązaniu tętnic szyjnych, przy czym statystycznie znamienne różnice jego zawartości obserwowano już w 6 godzin po zabiegu. Zawartość glikogenu utrzymywała się na wysokim poziomie przez dalsze godziny doświadczenia i w 120 godzinie różniła się nadal znamienne od wartości grupy kontrolnej. Krzywa zawartości glikogenu w mózgu zwierząt 6-tygodniowych w tym przedziale czasu była podobna do krzywej uzyskiwanej u zwierząt dorosłych (wykres 2)*).

Obraz histologiczny

U większości zwierząt z podwiązanymi tętnicami szyjnymi nie stwierdzono istotnych odchyień od stanu prawidłowego w obrazie histologicznym mózgu. W przeciwieństwie jednak do zwierząt dorosłych, obecna była stosunkowo liczna grupa zwierząt, u których stwierdzono ogniskowe lub rozsiane uszkodzenia mózgu, w tym w 9 na 60 morfologicznie zweryfikowanych przypadków ogniska selektywnej lub całkowitej martwicy. Zwraçała przy tym uwagę większa częstość uszkodzeń morfologicznych w młodszych grupach wieku. Uszkodzenia o charakterze ognisk zupełnej lub selektywnej martwicy położone w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu były obecne wyłącznie u zwierząt 1- i 2-tygodniowych. U zwierząt 3-tygodniowych obserwowano jedynie rozsiane zwyrodnienia neuronalne i rozrzedzenia utkania w korze mózgu. W starszych grupach wieku należały one do rzadkości, a ogniska martwicy nie występowały w ogóle.

Obraz histochemiczny

Nieprawidłowe złoże glikogenowe pojawiały się we wszystkich grupach doświadczalnych po upływie 12 godzin od podwiązania tętnic szyjnych. Od 12 do 48 godziny doświadczenia ilość złożeń wzrastała we wszystkich grupach wieku, najwydatniej u zwierząt 4- i 6-tygodniowych. Po upływie 5 dni złoże glikogenowe, poza otoczeniem ognisk martwicy, w przypadkach w których one występowały, obecne były tylko u zwierząt 4- i 6-tygodniowych.

*) Dla porównania wykres 2 zawiera dane z grupy zwierząt 10-tygodniowych, stanowiących przedmiot poprzednio opublikowanego opracowania (Pronaszko-Kurczyńska : wsp. 1971).

Złogi glikogenu miały najczęściej charakter ziarnistości rozsianych luźno w neuropilu, z wyraźną tendencją do zagęszczeń okołonaczyniowych (ryc. 1), wokół jąder gleju (ryc. 2), a rzadziej dookoła komórek nerwowych (ryc. 3). Niekiedy złogi glikogenowe, zgromadzone w cytoplazmie i w wypustkach komórek glejowych, wyznaczały ich pełne zarysy, przypominając obrazy uzyskiwane w barwieniach impregnacyjnych (ryc. 4).

Miejszem predylekcyjnego gromadzenia się glikogenu była kora mózgu. Złogi wielocukru występowały w niej w postaci skupień ogniskowych, warstwowych lub rozlanych (ryc. 5). Korowa lokalizacja złogów była typowa dla wszystkich grup wieku, z wyjątkiem zwierząt 1-tygodniowych, u których gromadziły się one przede wszystkim w istocie białej (ryc. 6), rzadziej w jądrach podstawy (ryc. 7), a tylko wyjątkowo w korze mózgu.

W przypadkach występowania ognisk martwicy, niezależnie od wieku zwierząt, w ich brzegach były obecne obfite złogi glikogenowe, leżące luźno w neuropilu lub w przerosłych astrocytach (ryc. 8).

Obraz mikroskopowo-elektronowy

W obrazie mikroskopowo elektronowym charakterystyczne skupienia złogów glikogenu spostrzegano przede wszystkim w wypustkach astrocytów położonych bezpośrednio przy naczyniach lub w ich otoczeniu (ryc. 9). Nieco mniej obfite gromadzenie się glikogenu obserwowano w części perikarialnej astrocytów i na przebiegu ich wypustek nie wykazujących związku z naczyniami (ryc. 10). U szczurów 4- i 6-tygodniowych obserwowano również niewielkie złogi glikogenu w drobnych wypustkach nerwowych i synapsach (ryc. 11, 12), a sporadycznie także w większych dendrytach (ryc. 13). W pojedynczych przypadkach u zwierząt młodszych (4 tygodnie) poza złogami w astrocytach, obserwowano gromadzenie się glikogenu w perikariach i wypustkach oligodendrogleju istoty białej (ryc. 14).

Odkładaniu się glikogenu towarzyszyły minimalne uszkodzenia ultrastruktury komórek, przede wszystkim w postaci obrzmienia okołonaczyniowych wypustek astrogleju i występowania w nich różnej wielkości ograniczonych pojedynczą błoną wodniczek (ryc. 15).

OMOWIENIE

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że gromadzenie się glikogenu w tkance nerwowej w następstwie przejściowego niedokrwienia mózgu, wywołanego obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych

wspólnych (Albrecht 1972) jest niezależne od wieku zwierzęcia i związanego z nim stopnia rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Wzrost zawartości glikogenu w półkulach mózgu obserwowaliśmy we wszystkich grupach doświadczalnych. Mimo zróżnicowanego w zależności od wieku poziomu glikogenu w mózgu u zwierząt kontrolnych, rząd wielkości maksymalnego przyrostu glikogenu w następstwie niedotlenienia był zbliżony we wszystkich grupach.

Stopień dojrzałości układu nerwowego wpływa natomiast zarówno na dynamikę zmian w zawartości glikogenu, jak i na jego śródtkankową i śródkomórkową lokalizację. Uwzględniając dane otrzymane na materiale zwierząt dorosłych (Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971), wyróżnić można dwa typy dynamiki zmian w zawartości glikogenu w mózgu, w następstwie jego przejściowego niedokrwienia.

Typ „niedojrzały” występujący u zwierząt 1, 2 i 3-tygodniowych charakteryzuje się ostrym wzrostem zawartości glikogenu między 12 (—24) i 48 godziną doświadczenia i jego całkowitym powrotem do wartości kontrolnych po upływie 120 godzin. Podobny charakter przyrostu glikogenu w mózgu noworodków małych w następstwie okołoporodowej asfiksji obserwowali Rivera i wsp. (1970), z tym tylko, że w ich materiale maksymalny poziom wielocukru przypadają na 12 godzinę, podczas gdy w naszej serii na 48 godzinę doświadczeń.

Typ „dojrzały” reprezentuje krzywa przyrostu obserwowana u zwierząt dorosłych, charakteryzująca się łagodniejszym wzrostem poziomu glikogenu w przedziale czasu między 12 a 48 godziną doświadczenia i brakiem powrotu do wartości kontrolnych po upływie 5 dni. Dynamika zmian zawartości wielocukru w mózgach zwierząt 4- i 6-tygodniowych zajmuje pozycję pośrednią między typem dojrzałym i niedojrzałym. Zwierzęta 4-tygodniowe różnią się od młodszych grup wieku łagodniejszym przyrostem glikogenu w okresie między 24 a 48 godziną po niedokrwieniu, a krzywa *uzyskana w grupie zwierząt 6-tygodniowych zbliżona jest do krzywej zwierząt dorosłych, różni się jednak od niej szczytowym przyrostem przypadającym na 12 godzinę po zabiegu i statystycznie znamienne podwyższeniem poziomu wielocukru już w 6 godzinie.

Gromadzenie się glikogenu w następstwie przejściowego, wyrównującego się niedokrwienia mózgu, mimo nie wyjaśnionego w pełni jego mechanizmu stanowi niewątpliwie wykładnik zaburzeń metabolizmu glukozy. Proces dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego, zachodzący w przedziale czasu zamkniętym skrajnymi grupami wieku naszych doświadczeń wiąże się z licznymi zmianami metabolizmu tkanki nerwowej (Bernsohn i wsp. 1963, Bass i wsp. 1969, Eto, Suzuki 1972 a, b, Ghosh, Guha 1972, Wilson 1972), w tym również z przejściem przemiany glu-

kozy z toru heksozowo-monofosforanowego, charakterystycznego dla mózgu szczurów w pierwszych tygodniach życia pozamacicznego na tor glikolizy (Winick 1970, Balázs 1970). Na okres ten przypada również proces mielinizacji mózgu szczura, z wszystkimi zmianami metabolizmu tkanki nerwowej i jej składu chemicznego (Bass i wsp. 1968, Eto, Suzuki 1972 a, b). Wydaje się przeto uzasadnione wiązanie zróżnicowania dynamiki zmian w zawartości glikogenu w następstwie niedotlenienia mózgu z wyżej wymienionymi procesami metabolicznymi.

Niski poziom glikogenu w mózgu zdrowych 1-tygodniowych szczurów i opóźniony w czasie, w porównaniu z pozostałymi grupami zwierząt jego przyrost w następstwie niedokrwienia, może zależeć między innymi od niskiej w tym okresie rozwoju aktywności heksokinazy w mózgu. Znaczny przyrost poziomu glikogenu w mózgu zwierząt 2-tygodniowych, jest zgodny w czasie z wydatnym zwiększeniem aktywności heksokinazy (Wilson 1972).

Odrębności dynamiki zmian w zawartości glikogenu w mózgu u zwierząt 6-tygodniowych w następstwie niedokrwienia mogą mieć związek ze zmianami metabolicznymi uwarunkowanymi przypadającym na ten okres zakończeniem procesu biochemicznej mielinizacji. Na zależność gromadzenia się glikogenu w tkance nerwowej od fazy mielinizacji zwracali uwagę Mossakowski i wsp. (1968) na podstawie doświadczeń nad asfiksją okołoporodową u małp. Wskazywać na nią mogą również nasze obserwacje dotyczące różnic w lokalizacji złogów glikogenowych w mózgach zwierząt 1-tygodniowych w porównaniu z pozostałymi grupami wieku. Zwierzęta 1-tygodniowe, których mózg znajduje się w zaawansowanej fazie premielinizacyjnej (Bass i wsp. 1968) reprezentowały jedyną grupę wieku, w której glikogen gromadził się w gleju istoty białej, przy prawie całkowitym jego braku w korze mózgu. Ponadto zwraca uwagę fakt, że zmielinizowane pęczki włókien w zwojach podstawy nie zawierały zupełnie złogów glikogenu, podobnie jak zmielinizowana istota biała mózgow szarych szczurów dorosłych (Ibrahim i wsp. 1970, Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971).

W pozostałych grupach wieku przeważały złogi glikogenowe w formacjach szarych, a przede wszystkim w korze mózgu. Badanie histochemiczne ujawniło astrocytarną i neuropilową lokalizację złogów glikogenowych. Ta ostatnia, jak wynika z obrazów mikroskopowo-elektronowych, odpowiada również skupieniom wielocukru w obrzniętych wypustkach astrocytów. W przeciwieństwie do zwierząt dorosłych, u szczurów z dojrzewającym układem nerwowym, złogi glikogenu w stosunkowo niewielkiej ilości gromadzą się również w wypustkach komórek nerwowych i synapsach. Long i wsp. (1972) przypuszczają, że odkładanie się glikogenu zachodzi tylko w tych komórkach nerwowych, które posiadają

niezbędny dla syntezy glikogenu aparat enzymatyczny. Niewielkie skupienia ziarnistości glikogenu występowały również w komórkach gleju skąpowypustkowego. Zjawisko to podobnie jak w materiale Mossakowskiego i wsp. (1968) dotyczyło jedynie aktywnie mielinizujących się obszarów istoty białej półkul mózgu.

W naszym materiale zwraca również uwagę częste występowanie nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej w postaci rozległych pól martwicy zupełnej lub selektywnej oraz zwyrodnień komórek nerwowych, nie spotykanych prawie zupełnie u zwierząt dorosłych. Uszkodzenia te przeważają w najmłodszych spośród badanych grup wieku. Na zależność występowania nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej w następstwie jej niedokrwienia od wieku zwierzęcia w momencie zadziałania czynnika uszkodzającego zwrócił uwagę Myers i wsp. (1969) na materiale noworodków małp, którym w życiu płodowym podwiązano tętnice szyjne. Wydaje się, że zależność tę należy odnieść do niedostatecznie wykształconego układu krążenia obocznego, warunkującego u zwierząt dojrzałych wyrównanie zaburzeń krążenia w przypadku podwiązania tętnic szyjnych.

WNIOSKI

1. Obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u szczurów wywołujące krótkotrwałe niedokrwienie półkul mózgu, niezależnie od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego, prowadzi do wzrostu zawartości glikogenu w tkance nerwowej w okresie poniedokrwieniowym. Rząd wielkości maksymalnego przyrostu zawartości glikogenu w mózgu jest jednakowy we wszystkich badanych grupach wieku, podczas gdy zawartość glikogenu w mózgu zwierząt kontrolnych wykazuje wyraźne uwarunkowanie od wieku zwierzęcia.

2. Stopień dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego wpływa na dynamikę zmian zawartości glikogenu w mózgu w następstwie podwiązania tętnic szyjnych i na jego rozkład topograficzny.

3. Nieprawidłowe złogi glikogenu, stanowiące wykładnik zaburzeń w metabolizmie glukozy, gromadzą się przede wszystkim w cytoplazmie i wypustkach astrogleju, w mniejszym stopniu w drobnych wypustkach nerwowych i synapsach, a sporadycznie tylko w komórkach gleju skąpowypustkowego.

4. W młodych grupach wieku (1, 2 tygodnie) mechanizmy zabezpieczające wyrównanie zaburzeń w krążeniu w następstwie obustronnego podwiązania tętnic szyjnych są mniej sprawne, czego wyrazem jest powstawanie ogniskowych nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych, nie spotykanych u zwierząt z dojrzałym układem nerwowym.

М. Е. Массакowski, А. Пронашко-Курчиньска, Я. Кортхальс, А. Врутняк

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ АНЕМИЗАЦИИ НА УРОВЕНЬ ГЛИКОГЕНА В МОЗГУ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Авторы исследовали зависимость откладывания гликогена в мозгу вследствие умеренной анемизации от степени зрелости центральной нервной системы. Исследования проводились на крысах обоего пола, которым в возрасте 1, 2, 3, 4 и 6 недель обесторонне подвязывали общие сонные артерии. Животных убивали после 6, 12, 24, 48 и 120 часов от операции и оценивали содержание гликогена в мозгу биохимическими методами, а также при помощи гистохимических и электронномикроскопических исследований определяли его внутритканевую и внутриклеточную локализацию. Эти исследования дополнялись гистологической оценкой степени тканевых повреждений. Животные, подвергнутые исключительно воздействию эфирного наркоза или контрольной операции и не подвергнутые никакой операции были контрольным материалом.

На основании проведенных исследований авторы обнаружили, что независимо от возраста животных экспериментальных вследствие умеренной анемизации имеет место переходящее скопление гликогена в мозгу, подобное как это наблюдалось на материале взрослых животных. Возраст животных, а следовательно и степень зрелости центральной нервной системы, существенным образом влияет на динамику изменений и локализацию гликогеновых отложений.

Были выделены два типа увеличения содержания гликогена, а именно:

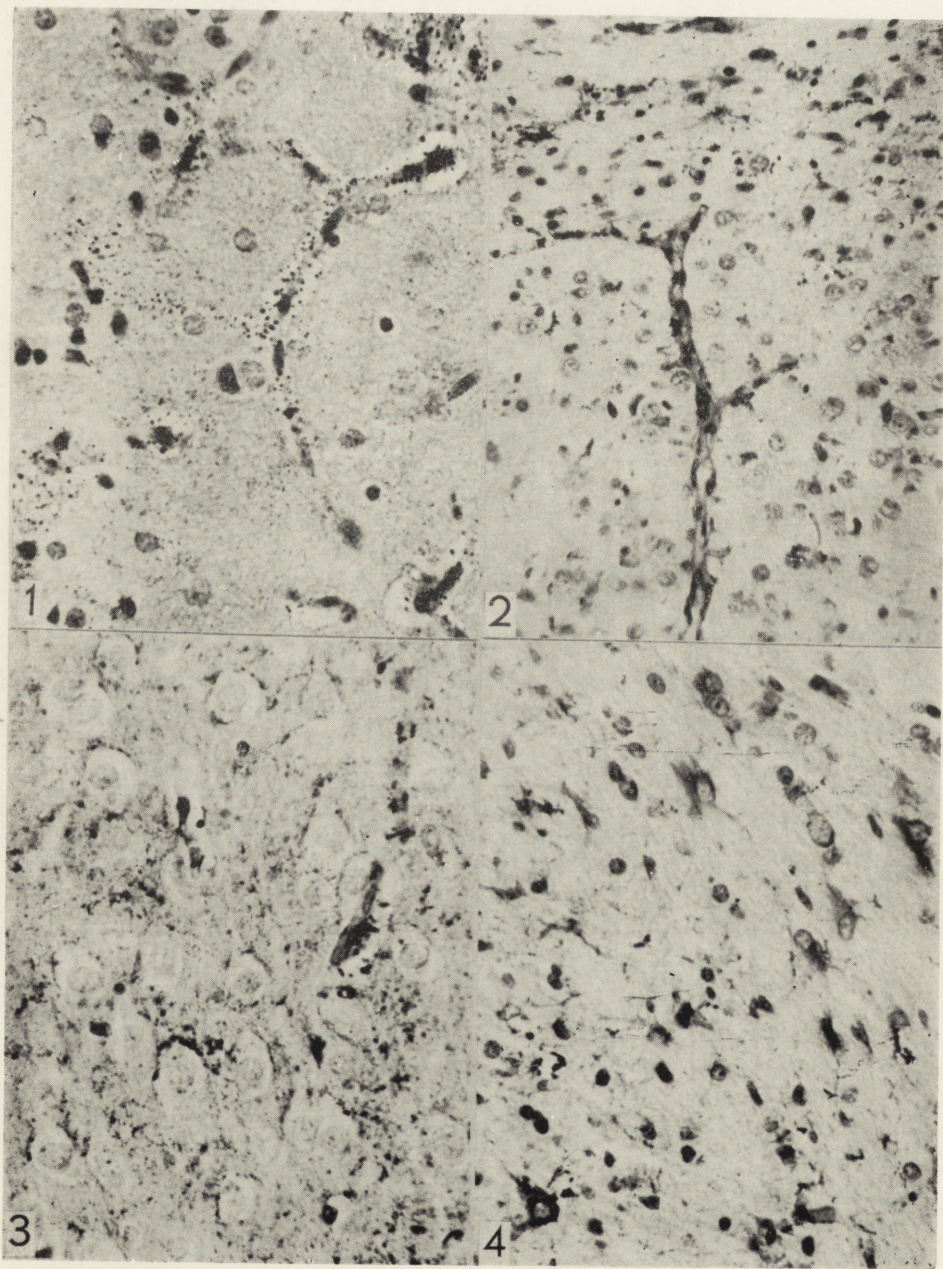
- „незрелый” тип, обнаруживающийся у 1, 2, 3-недельных животных, характеризующийся острым, кратковременным ростом уровня гликогена и его возвращением к контрольным величинам спустя 120 часов;
- „зрелый” тип, наблюдающийся у 10-недельных животных, характеризующийся более растянутым во времени приращением уровня полисахарида и отсутствием его возвращения к контрольным величинам спустя 120 часов.

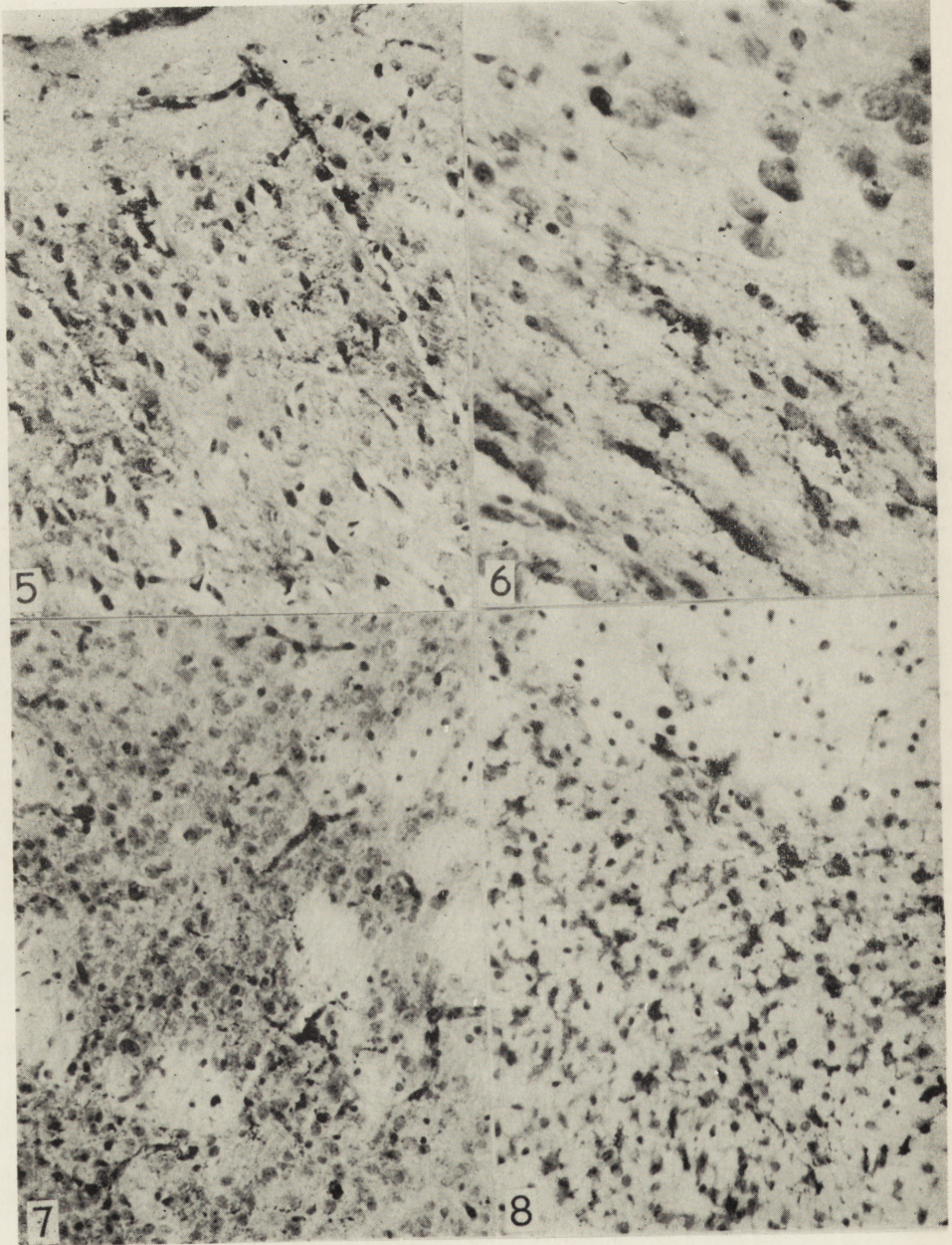
Изменения у 4- и 6-недельных животных представляют переход между „зрелым” и „незрелым” типом, причем однако, что отличительной особенностью 6-недельных животных является достижение максимального приращения гликогена уже спустя 12 часов от подвязки сонных артерий, в то время как у всех остальных возрастных групп оно приходило на 48 час опыта.

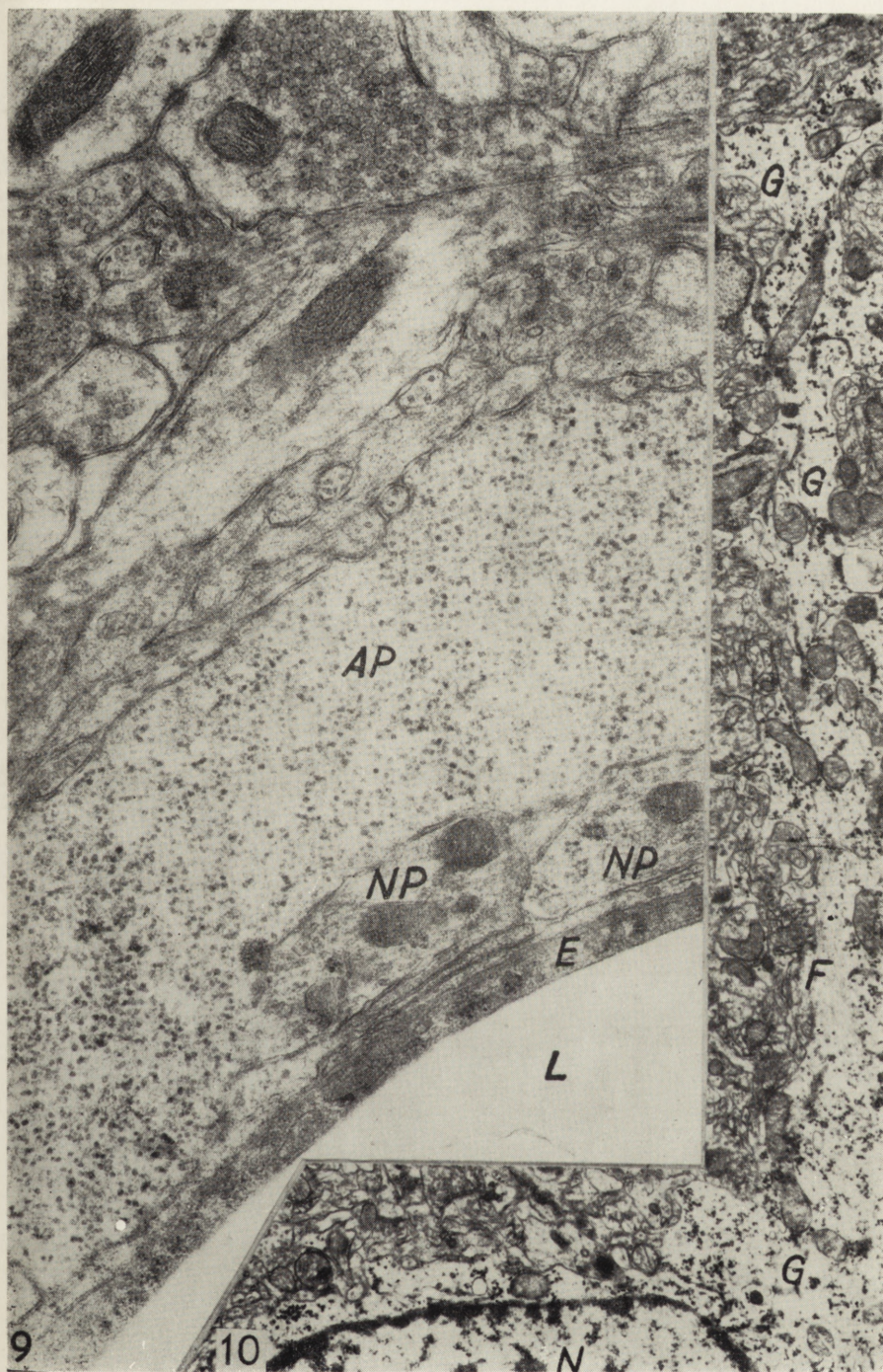
Во всех группах возраста, за исключением 1-недельных животных, гликоген скапливался в мозговой коре. У 1-недельных животных отложения полисахарида имелись почти исключительно в белом веществе и базальных ганглиях.

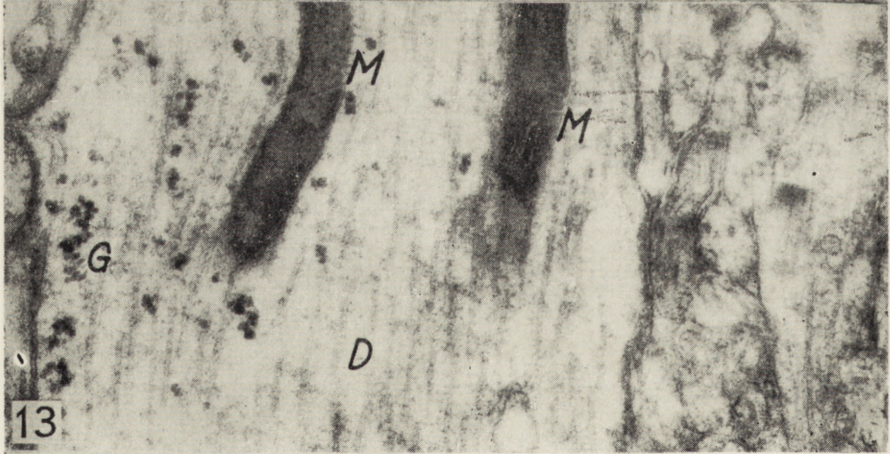
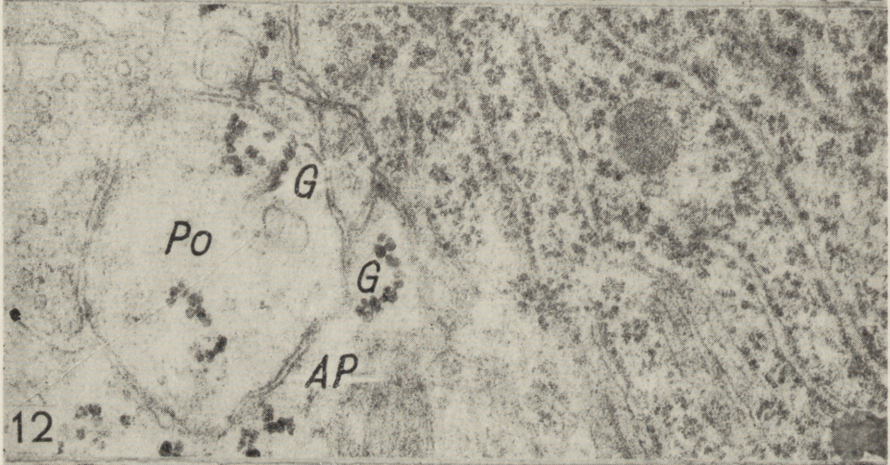
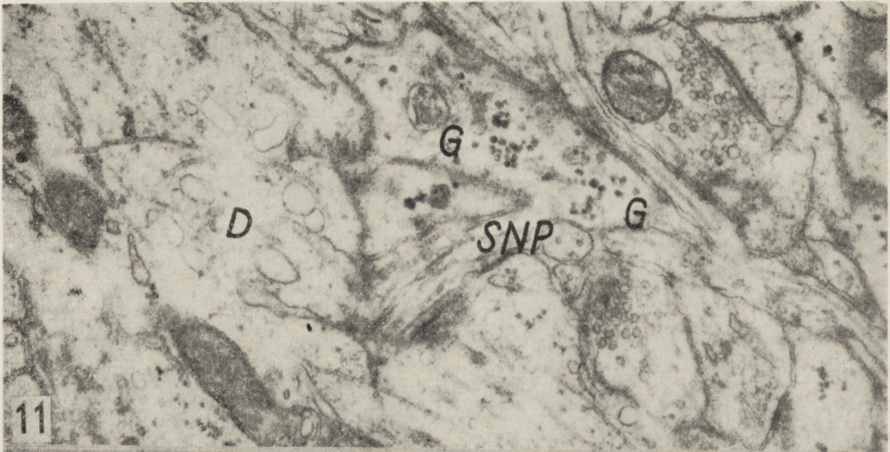
Электронномикроскопическое исследование позволило локализовать отложения прежде всего в клетках астроглии, а в старших возрастных группах кроме того в синапсах и мелких и иногда более крупных дендритах.

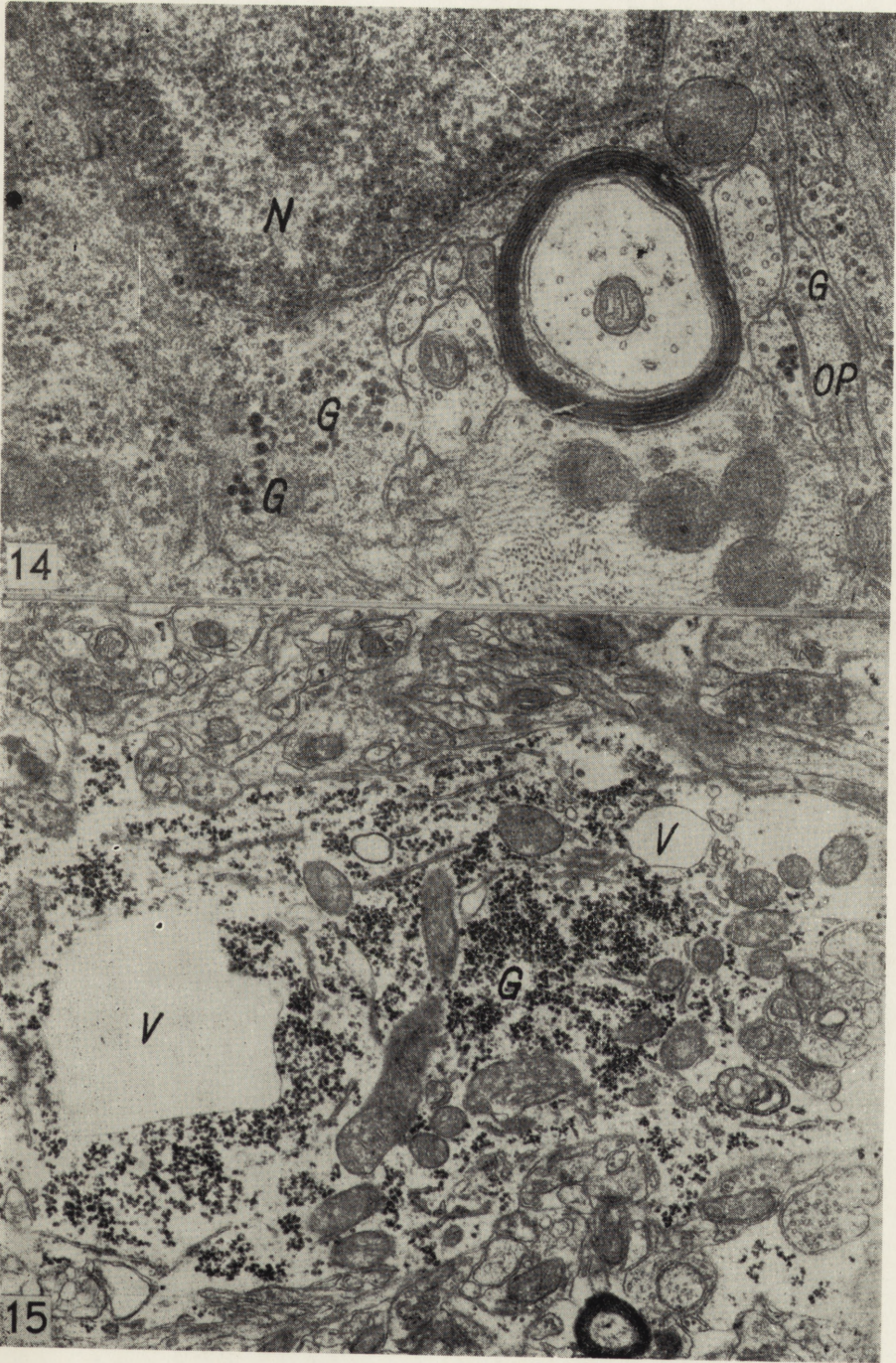
Авторы обращают внимание на частое нахождение очагов некроза в мозгах 1- и 2-недельных животных. Это явление авторы связывают с необразовавшейся к этому времени сетью коллатерального кровообращения, обуславливающей у более старых животных компенсацию нарушения кровообращения после обесторонней подвязки сонных артерий.











M. J. Mossakowski, A. Pronaszko-Kurczyńska, J. Korthals, A. Wrutniak

EFFECT OF MODERATE ISCHEMIA ON THE GLYCOGEN LEVEL IN BRAIN
ACCORDING TO THE DEGREE OF MATURITY OF THE CENTRAL
NERVOUS SYSTEM

Summary

The authors have studied the dependence of glycogen accumulation following moderate ischemia, on the degree of maturity of the central nervous system. The studies were performed on rats of both sexes, which in the age of 1, 2, 3, 4 and 6 weeks were subjected to bilateral ligation of the common carotid arteries. The animals were sacrificed after 6, 12, 24, 48 and 120 hrs following operation. The glycogen content in brain was assayed with biochemical methods and its tissue — and intracellular localization determined by means of histochemical and electron-microscopic examinations. These studies were supplemented with the histological estimation of the degree of tissue impairment. The animals subjected exclusively to anesthesia or sham operation and those not subjected to any operation constituted the control material.

Basing on the experiments performed the authors found that in consequence of moderate ischemia a transient accumulation of glycogen in brain occurs independently of the animals' age, as it was previously observed on the material from the adult rats. However, the age and thus the degree of maturity of the central nervous system, markedly effects both the dynamics of changes and localization of glycogen deposits.

Two types of the increase of the glycogen content in brain were distinguished: 1) "immature" type, occurring in 1-, 2- and 3-weeks-old animals, characterized by a sharp, short-lasting increase of the glycogen level and return to the control values after 120 hrs; 2) "mature" type, occurring in 10-weeks-old animals, characterized by a more stretched in time increase of the polysaccharide content and lack of return to the control values within 120 hrs.

The changes observed in 4-weeks- and 6-weeks-old animals constitute a transition between the "mature" and "immature" type. A distinct feature of 6-week-old animals is that in this group the maximal increase of the glycogen content is reached already within 12 hrs following operation, while in all the other groups it falls on the 48 th hr of the experiment.

In all the age groups but 1-week-old animals, glycogen accumulated in the cerebral cortex. In the latter group, the glycogen, deposits almost exclusively occurred in the white matter and basal ganglia.

The electron-microscopic examination allowed to localize the deposits first of all in the astroglial cells, and in the older groups in addition in synapses and small and then also bigger dendrites.

The authors emphasize a frequent appearance of necrotic foci in the brains of 1- and 2-weeks-old animals. This phenomenon is related to the undeveloped net of collateral circulation, which in the older animals determines the compensation of circulation disturbances following bilateral ligation of the common carotid arteries.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białek w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 457—465.
2. Balázs R.: Carbohydrate metabolism. W *Handbook of Neurochemistry*, ed. Lajtha 1970, Plenum Press, New York, s. 1—29.
3. Bass N. H., Netsky M. G., Young E.: Microchemical studies on postnatal development of rat cerebrum. 2. Formation of myelin. *Neurology*, 1969, 9, 405—414.
4. Bernsohn J., Barron K. D., Hess A. R., Hedrick M. T.: Alteration in properties and isoenzyme patterns of esterases in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 1963, 10, 783—794.
5. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain. Tech.* 1959, 34, 95—98.
6. Crowell R. M., Olsson Y., Klatzo I., Ommaya A. K.: Temporary Focal Ischemia in the Monkey. *Transact. Amer. Neurological Assoc.* Vol. 95, 1970, 229—231.
7. Eto Y., Suzuki K.: Cholesterol esters in developing rat brain concentration and fatty acid composition. *J. Neurochem.* 1972a, 19, 109—115.
8. Eto Y., Suzuki K.: Cholesterol esters in developing rat brain enzymes of cholesterol esters metabolism. *J. Neurochem.* 1972b, 19, 117—121.
9. Gosh S. K., Guha S. R.: Oxidation of monoamines in developing rat and guinea pig brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 229—231.
10. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.* 1970, 60, 403—415.
11. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335—347.
12. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers F. E., Rodrigez de Curet H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
13. Mossakowski M. J., Zelman I.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenu w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki*, Supl. 1, 37—50.
14. Myers R. E.: Brain pathology following fetal vascular occlusion. *Investigative ophthalmology*. Vol 8, 1969, II, 41—50.
15. Nelson N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944, 153, 375—380.
16. Pronaszko-Kurczyk A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.* 1971, IX, 281—296.
17. Rivera A. Jr., Brann A. W. Jr., Myers R. E.: Brain glycogen of the recovering asphyxiated monkey newborn. *Exp. Neurol.* 1970, 26, 309—315.
18. Wilson J. E.: The relationship between glycolytic and mitochondrial enzymes in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 223—227.
19. Winick M.: Nutrition and nerve cell growth. *Fed. Proc.* 1970, 29, 1510—1515.

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

PODPISY POD RYCINY

Ryc. 1. Ziarniste złoży glikogenu rozsiane w neuropilu kory mózgu z wyraźnym zagęszczeniem dookoła naczynia. Szczur 4-tygodniowy, 48 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 200 ×.

Fig. 1. Granular glycogen deposits within cortical neuropil. Perivascular polysaccharide aggregation. 4 week old rat, 48 hrs following bilateral carotid ligation. PAS-dimedon. × 200.

Ryc. 2. Złoży glikogenowe w neuropilu kory mózgu 3-tygodniowego szczura. Widoczne drobne skupienia ziaren glikogenu dookoła jąder astrogleju i wypełniające okołonaczyniowe wypustki astrocytów. 24 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 100 ×.

Fig. 2. Neuropil glycogen deposits within the cerebral cortex of a 3 week old rat, 24 hrs following carotid ligation. Small granular aggregations surrounding astrocytic nuclei and those filling perivascular astrocytic feet are visible. PAS-dimedon. × 100.

Ryc. 3. Okołoneuronalne złoży glikogenu w korze mózgu szczura 6-tygodniowego, 12 godzin po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 400 ×.

Fig. 3. Perineuronal glycogen accumulation within the cortex of a 6-week old rat, 12 hrs following carotid ligation. PAS-dimedon. × 400.

Ryc. 4. Złoży glikogenu wypełniające perikaria i wypustki astrocytów w korze mózgu szczura 4-tygodniowego, 48 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 200 ×.

Fig. 4. Glycogen deposits filling astrocytic perikarya and processes within the cortex of 4 week old rat, 48 hrs following carotid ligation. PAS-dimedon. × 200.

Ryc. 5. Nierównomiernie rozsiane złoży glikogenu w korze mózgu 2-tygodniowego szczura, 24 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 60 ×.

Fig. 5. Pachy distribution of glycogen deposits within the cortical neuropil in a 2 week old rat, 24 hrs following carotid ligation. PAS-dimedon. × 60.

Ryc. 6. Złoży glikogenu ograniczone do gleju istoty białej u 1-tygodniowego szczura w 24 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. Kora nie zawiera ziarnistości wielocukru. PAS-dimedon. Pow. 200 ×.

Fig. 6. Glycogen deposits limited to the white matter astrocytes and their extensions in a 1 week old rat 24 hrs following carotid ligation. Cortex apparently free of any polysaccharide deposition. PAS-dimedon. × 200.

Ryc. 7. Obfite złoży glikogenu rozsiane w istocie szarej zwojów podstawy u tygodniowego szczura, 48 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. Pęczki istoty białej wolne od złoży wielocukru. PAS-dimedon. Pow. 60 ×.

Fig. 7. Abundant glycogen deposits within basal ganglia of a 1 week old rat, 48 hrs following carotid ligation. Striopallidal bundles free of glycogen. PAS-dimedon. × 60.

Ryc. 8. Brzeg ogniska martwicy w korze mózgu 2-tygodniowego szczura z obfitymi złożami glikogenu, leżącymi luźno w tkance i skupionymi w cytoplazmie astrocytów. 120 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon. Pow. 60 ×.

Fig. 8. Margin of necrotic focus within the cortex of a 2 week old rat, 120 hrs following carotid ligation. Abundant glycogen deposits lying free in the tissue and filling cytoplasm of hypertrophied astrocytes are visible. PAS-dimedon. × 60.

Ryc. 9. Przynaczyniowa wypustka astrocytarna (AP) wypełniona licznymi ziarnami glikogenu. L — światło naczynia, E — komórka śródbłonka, NP — wypustka nerwowa. ME. Pow. 28.000 ×.

Fig. 9. Perivascular astrocytic process (AP) filled with numerous glycogen deposits. L — vascular lumen, E — endothelial cell, NP — process of nerve cell. E. M. × 28.000.

Ryc. 10. Liczne ziarna glikogenu (G) rozsiane w cytoplazmie i wypustce astrocytu. N — jądro, F — gliofilamenty. ME. Pow. 7.000 ×.

Fig. 10. Abundant glycogen grains (G) within astrocytic perikaryon and process. N — nucleus, F — gliofilaments. E. M. × 7.000.

Ryc. 11. Ziarna glikogenu (G) w drobnej wypustce nerwowej (SNP). D — dendryt. ME. Pow. 26.000 ×.

Fig. 11. Glycogen grains (G) in a small nerve cell process (SNP). D — dendrite. E. M. × 26.000.

Ryc. 12. Ziarna glikogenu (G) w części postsynaptycznej synapsy (Po) i wypustce astrocytu (AP). ME. Pow. 32.000 ×.

Fig. 12. Glycogen grains (G) in postsynaptic area (Po) and in astrocytic process (AP). E. M. × 32.000.

Ryc. 13. Złogi glikogenowe (G) w dużym dendrycie (D). M — mitochondria. ME. Pow. 31.000 ×.

Fig. 13. Glycogen rosettes (G) in a large dendrite (D). M — mitochondrium. E. M. × 31.000.

Ryc. 14. Złogi glikogenu (G) w cytoplazmie i wypustce (OP) oligodendrocytu istoty białej. N — jądro. ME. Pow. 33.000 ×.

Fig. 14. Glycogen deposition (G) within perikaryon and process (OP) of the white matter oligodendroglial cell. N — nucleus. E. M. × 33.000.

Ryc. 15. Wypustka astrocytu wypełniona licznymi ziarnami glikogenu (G) zawierająca wodniczki otoczone pojedynczą błoną (V). ME. Pow. 12.000 ×.

Fig. 15. Astrocytic process filled with glycogen grains (G) containing single membrane bound vacuoles (V). E. M. × 12.000.