

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, MARIA OSTENDA,
ALICJA PRONASZKO-KURCZYŃSKA

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY
NACZYŃ WŁOSOWATYCH MÓZGU
W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

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

Obraz patomorfologiczny klinicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego sugeruje obecność zaburzeń przepuszczalności naczyń mózgu, jako istotnego czynnika patogenetycznego, kształtującego zespół uszkodzeń tkankowych (Mossakowski, 1966; Mossakowski i wsp., 1974; Śmiałek, Mossakowski, 1974). W warunkach doświadczalnej encefalopatii wątrobowej Mossakowski i wsp. (1970) wykazali zwiększoną przepuszczalność naczyń mózgu dla soli srebra, przy niezmienionym stanie bariery naczyniowo-mózgowej dla znaczników białkowych (kompleks błękitu Evansa z albuminą bydlęcą), a Ostenda i wsp. (1976) stwierdzili zwiększoną mikropinocytozę w śródbłonkach i poszerzenie złącz międzyśródbłonkowych w kapilarach kory mózgu jako zjawisko towarzyszące charakterystycznym uszkodzeniom astrocytów. Wydawało się przeto uzasadnione przeprowadzenie serii dalszych badań, mających na celu ustalenie w jakiej mierze obserwowane nieprawidłowości obrazu mikroskopowo-elektronowego naczyń włosowatych mózgu wiążą się z zaburzeniami ich przepuszczalności. Badania te obejmowały mikroskopowo-elektronową analizę przepuszczalności naczyń mózgu przy użyciu peroksydazy chrzanowej (Reese, Karnovsky, 1967) oraz ocenę umiejscowienia aktywności fosfataz nukleozydowych w elementach złącza naczyniowo-tkankowego (Torack, Barnett, 1964).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 3-miesięcznych szczurach szczepu Wistar, samcach, u których wywoływano marskość wątroby przy użyciu czterochlorku węgla (Mossakowski i wsp., 1970). Siedem zwierząt doświadczal-

nych otrzymywało 3 razy w tygodniu podskórnie iniekcje 50% czterochlorku węgla w płynnej parafinie w dawce 0,1 ml CCl_4 na 100 g wagi ciała przez okres 4 miesięcy (3 szczury) i 6 miesięcy (4 szczury). Trzy zwierzęta kontrolne przez taki sam okres czasu otrzymywały podskórnie płynną parafinę, trzech pozostałych nie poddawano żadnym zabiegom.

Ocena obrazu patomorfologicznego wątroby i mózgu, stanowiąca przedmiot poprzednich badań (Mossakowski i wsp., 1970; Ostenda i wsp., 1976) pozwoliła na wybór optymalnego czasu trwania doświadczenia. Badanie stanu przepuszczalności naczyń wykonano u 3 zwierząt doświadczalnych z 4-miesięcznym przeżyciem i u 2 z 6-miesięcznym przeżyciem oraz u 3 zwierząt kontrolnych, w tym u dwóch, którym wstrzykiwano parafinę. Badania histoenzymatyczne wykonano u 2 szczurów doświadczalnych z przeżyciem 6-miesięcznym i 2 zwierząt kontrolnych (1 szczur po iniekcjach parafiny).

Metoda badań przepuszczalności naczyń: Peroksydazę chrzanową podawano wg metody Reese'a i Karnovsky'ego (1967) w modyfikacji Westergaarda i Brightmana (1973). Stosowano peroksydazę firmy Sigma, typ II w dawce 100 mg/250 g wagi ciała, którą podawano do żyły ogonowej w 1 ml fizjologicznego roztworu chlorku sodu. Czas krążenia peroksydazy wynosił 5, 30 i 120 min. Zwierzęta zabijano stosując przezsercową perfuzję roztworem zawierającym 60 ml 25% aldehydu glutarowego, 120 ml buforu kakodylowego o pH 7,2 oraz 120 ml wody destylowanej z dodatkiem 1,5 g chlorku wapnia. Pobrany w całości mózg pozostawiono na noc w płynie o powyższym składzie, a następnie dzielono go cięciami prowadzonymi w płaszczyźnie czołowej na płyty grubości 1 mm, które pozostawiono w buforze Tris o pH 7,2 z dodatkiem 0,3 ml sacharozy na 80 ml płynu na okres 1 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płyty tkanki przenoszono na okres 2—3 godzin do płynu inkubacyjnego o składzie: bufor Tris-maleinowy o pH 7,6 — 40 ml, diaminobenzzydina 20 mg, glukoza 14,4 mg. Po inkubacji przeprowadzanej w temp. 4°C, pobierano pod kontrolą lupy skrawki z widocznym odczynem z pogranicza korowo-podkorowego okolicy czołowo-ciemieniowej, które następnie w sposób standardowy opracowywano do badań w mikroskopie elektronowym.

Obserwacje przeprowadzano i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

Metoda badań histochemicznych: Zwierzęta zabijano przez dekapitację. Mózg wyjęty z jamy czaszki dzielono cięciami czołowymi na płyty grubości 1 mm, które utrwalano przez 2 godziny w temp. 4°C w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylowym, pH

7,2. Bloki tkanki płukano przez noc w 0,3% roztworze sacharozy w buforze kakodylowym, pH 7,2 w temp. 4°C. Następnego dnia pobierano skrawki z pogranicza korowo-podkorowego okolicy czołowo-ciemienniewej, dzielono je na bloczki o wymiarach 1 mm³ i umieszczano w płynie inkubacyjnym o następującym składzie: woda podwójnie destylowana 0,2 ml, 0,2 M bufor Tris-maleinowy, pH 7,2 — 2,0 ml, 25% siarczan magnezu (MgSO₄) — 0,1 ml, 2% azotan ołowiu (Pb/NO₃/₂) — 0,3 ml, odpowiedni substrat w ilości 2,5 mg/2 ml wody. Dla wykrycia aktywności poszczególnych hydrolaz do płynu inkubacyjnego dodawano następujące estry fosforanowe: adenozynotrójfosforan (ATP), guanozynotrójfosforan (GTP), cytydynotrójfosforan (CTP) oraz inozynodwufosforan (IDP) (Torack, Barnett, 1964).

Równocześnie z bloczkami przeznaczonymi do badań w mikroskopie elektronowym inkubowano wolno-pływające kriostatowe skrawki tkanki o grubości 14 μ, w których obserwowano okresowo w mikroskopie świetlnym czas wystąpienia i nasilenia odczynu histoenzymatycznego.

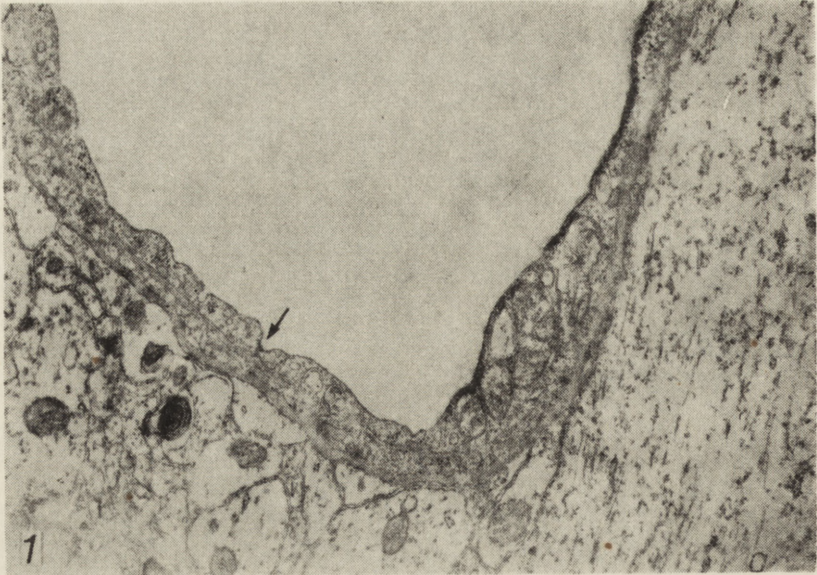
W oparciu o te spostrzeżenia ustalono optymalny czas inkubacji, wynoszący 1 godz. Po inkubacji bloczki płukano w 0,3% roztworze sacharozy, a następnie utrwalano dodatkowo przez kilka sekund w 2% roztworze czterotlenku osmu w buforze kakodylowym o pH 7,2 (Torack, Barnett, 1964). Bloki odwadniano w sposób rutynowy i zatapiano w Eponie 812. Materiał skrawano na ultramikrotomie. Niekontrastowane ultracienkie skrawki oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A. Skrawki, w których stwierdzono obecność produktu końcowego odczynu histoenzymatycznego kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu oraz oglądano powtórnie.

WYNIKI

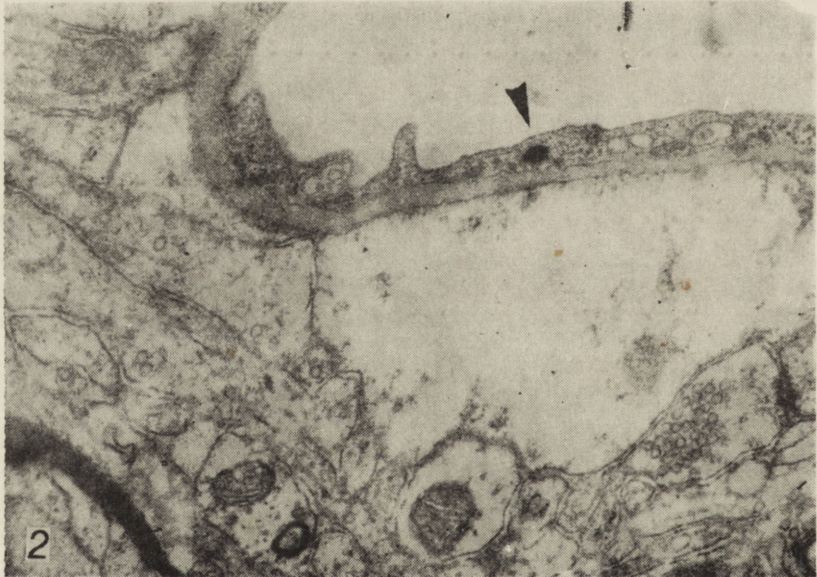
Badanie przepuszczalności naczyń włosowatych

U zwierząt kontrolnych zarówno tych, którym stosowano podskórnie iniekcje płynnej parafiny, jak i u nie poddanych żadnym dodatkowym zabiegom, po upływie 5 i 30 min. krążenia peroksydazy, stwierdzono obecność elektronowo-optycznie gęstych złogów w naczyniach włosowatych mózgu. Znajdowały się one na zwróconej do światła naczynia powierzchni śródbłonek i w drobnych zatokach pinocytarnych (ryc. 1) oraz w pojedynczych pęcherzykach pinocytarnych (ryc. 2). Nie stwierdzono ich w żadnym przypadku w błonie podstawnej naczyń, ani w przestrzeniach międzykomórkowych tkanki otaczającej naczynia.

U zwierząt doświadczalnych obu grup czasowych, zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym naczyń były identyczne, różniąc się jedy-



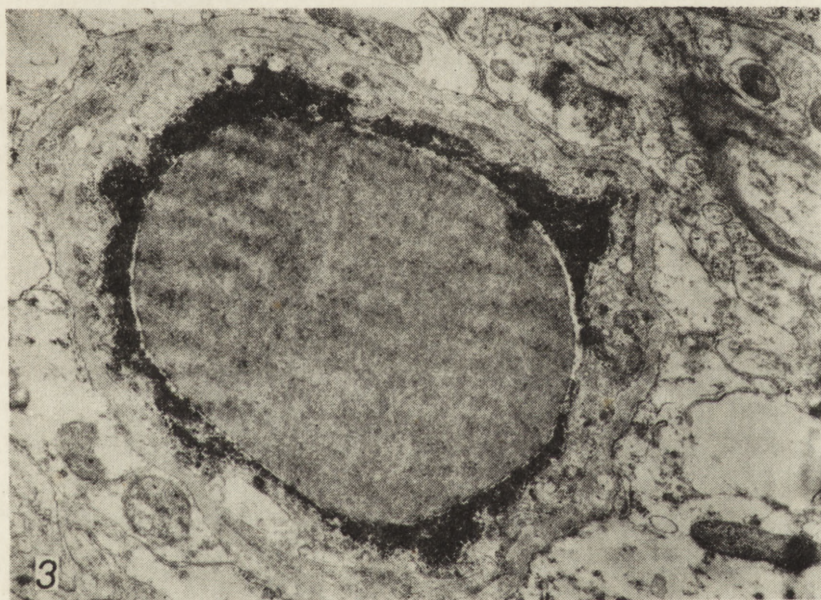
Ryc. 1. Szczur kontrolny, 5 min. krążenia peroksydazy. Optycznie gęste złoże na powierzchni śródbłónka i w zatoce pinocytarnej (strzałka). Pow. 15 000 ×
Fig. 1. Control rat, 5 min. peroxidase circulation. Electron-dense products on the abluminal endothelial membrane and in the pinocytotic pit (arrow). × 15 000



Ryc. 2. Szczur kontrolny, 30 min. krążenia peroksydazy. W śródbłónku pęcherzyk pinocyтары wypełniony optycznie gęstą masą (główka strzałki), przestrzeń międzykomórkowa pusta. Pow. 15 000 ×
Fig. 2. Control rat, 30 min. peroxidase circulation. Pinocytotic vesicle filled with electron-dense product visible in endothelium (arrow head), extracellular space remains empty. × 15 000

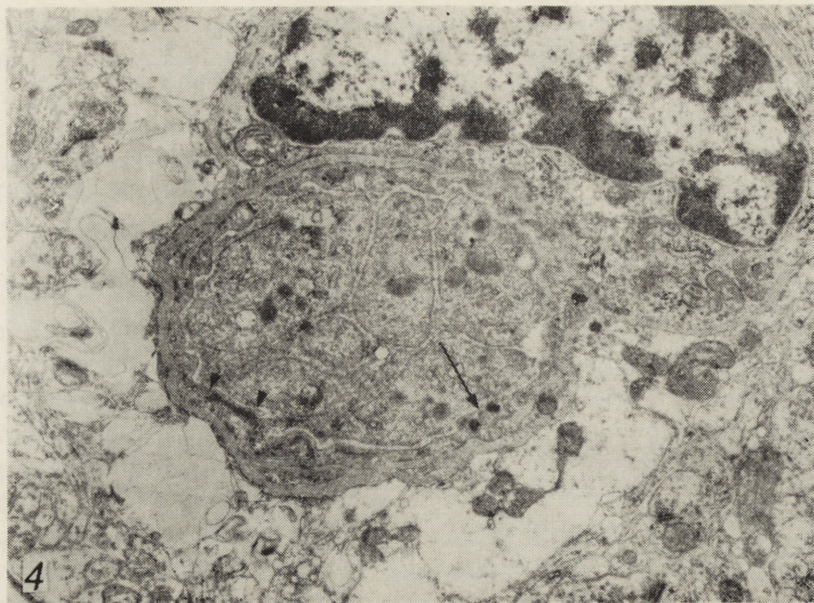
nie intensywnością i częstością występowania. Były one bardziej nasilone i występowały częściej u zwierząt po 6-miesięcznym okresie doświadczenia.

Po 5 minutach krążenia peroksydazy, w świetle drobnych naczyń stwierdzono obecność złogów gęstego elektronowo-optycznie materiału (ryc. 3). Impregnowały one powierzchnię komórek śródbłonka wnikając na krótkim odcinku do zespołów śródbłonkowych (ryc. 4). Wypełniały również zatoki pinocytarne śródbłonka a rzadko znajdowano je w niezbyt głęboko położonych pęcherzykach mikropinocytarnych. Po 30 min. krążenia peroksydazy gęste elektronowo-optycznie złoże stwierdzono natomiast w licznych pęcherzykach pinocytarnych, a częściowo również w kanałach złącz międzyśródbłonkowych. W tym przypadku pasmo złogów zatrzymywało się ostro na pewnym odcinku złącza nie wypełniając go na całej długości. W tym czasie pojawiały się również złoże w przestrzeniach międzykomórkowych w tkance otaczającej bezpośrednio naczynie. Po 2 godz. krążenia peroksydazy nie znajdowano elektronowo-optycznie gęstych złogów w świetle naczyń. Zespolecia międzyśródbłonkowe na krótkim zwykle odcinku, zwróconym do światła naczynia



Ryc. 3. Gliopatia wątrobowa, 4 mies. doświadczenia, 5 min. krążenia peroksydazy. Optycznie gęsta masa widoczna w fałdach i zagłębieniach śródbłonka oraz w pęcherzykach pinocytarnych. Przestrzenie międzykomórkowe puste. Pow. 10 000 X

Fig. 3. Hepatogenic gliopathy, 4 months of experiment, 5 min. peroxidase circulation. Electron-dense products in endothelial folds, saveoles and pinocytic vesicles. Extracellular space remains empty. X 10 000



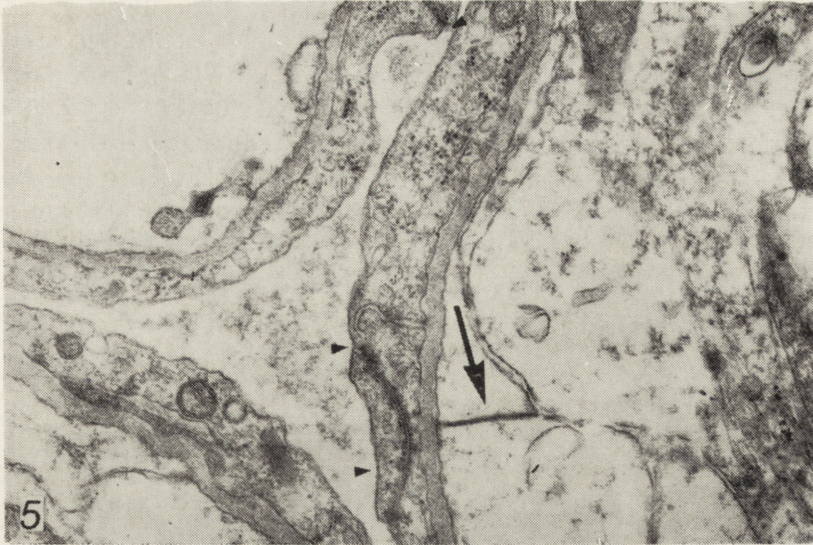
Ryc. 4. Gliopatia wątrobowa, 4 mies. doświadczenia, 5 min. krążenia peroksydazy. Naczynie otoczone przez obrzękłe wypustki astrocytów. Zespolecie międzyśródbłonkowe wypełnione optycznie gęstą masą w ograniczonym odcinku (główki strzałek). Pęcherzyk pinocytarny wypełniony taką samą masą (strzałka).
Pow. 10 000 \times

Fig. 4. Hepatogenic gliopathy, 4 months of experiment, 5 min. peroxidase circulation. The vessel surrounded by swollen astrocytic processes. Short segment of tight junction filled with electron-dense product (arrow heads). The same product inside pinocytotic vesicle (arrow). $\times 10\,000$

były wypełnione masami produktu reakcji (ryc. 5). Prawie w ogóle nie spotykano ich w pęcherzykach pinocytarnych, obficie gromadziły się natomiast w przestrzeniach międzykomórkowych w otoczeniu naczynia. Ciemne ziarnistości spotykano również w cytoplazmie astrocytów sąsiadujących z naczyniami.

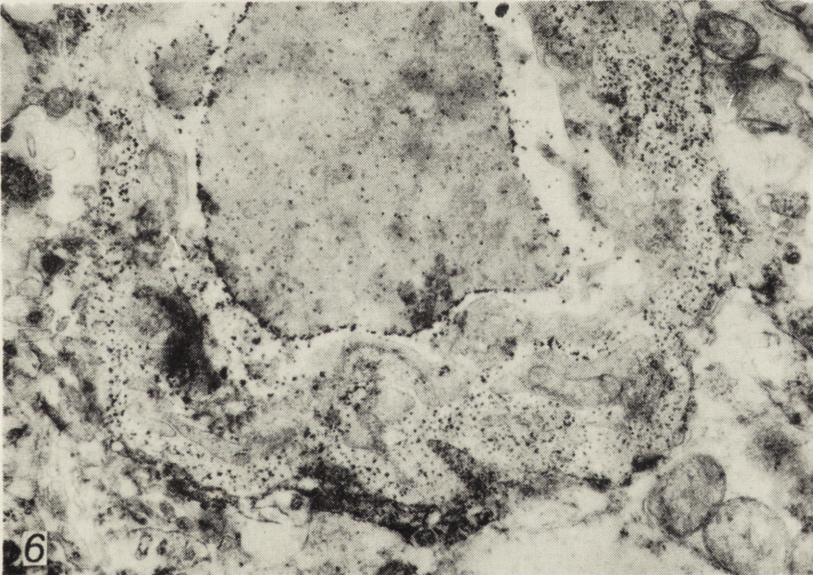
Badania histoenzymatyczne

U zwierząt kontrolnych końcowe produkty reakcji enzymatycznej gromadziły się przede wszystkim w błonie podstawnej naczyń włosowatych (ryc. 6). Ich gromadzenie się w przypadku zastosowania jako substratu ATP i IDP było silniejsze niż przy użyciu GTP i CTP. W tym przypadku obserwowano również odkładanie się produktów reakcji enzymatycznej w błonach otaczających wypustek glejowych. Przy użyciu każdego z substratów stwierdzono ponadto odkładanie się nierównomiernie rozmieszczonych złogów produktu końcowego reakcji na powierzchni błony jądrowej sąsiadujących z naczyniami astrocytów.



Ryc. 5. Gliopatia wątrobowa, 4 mies. doświadczenia, 2 godz. krążenia peroksydazy. Zespolecia międzysródbłonkowe na krótkim odcinku wypełnione produktem reakcji (główki strzałek). Optycznie gęste masy w przestrzeni międzykomórkowej (strzałka). Pow. 15 000 \times

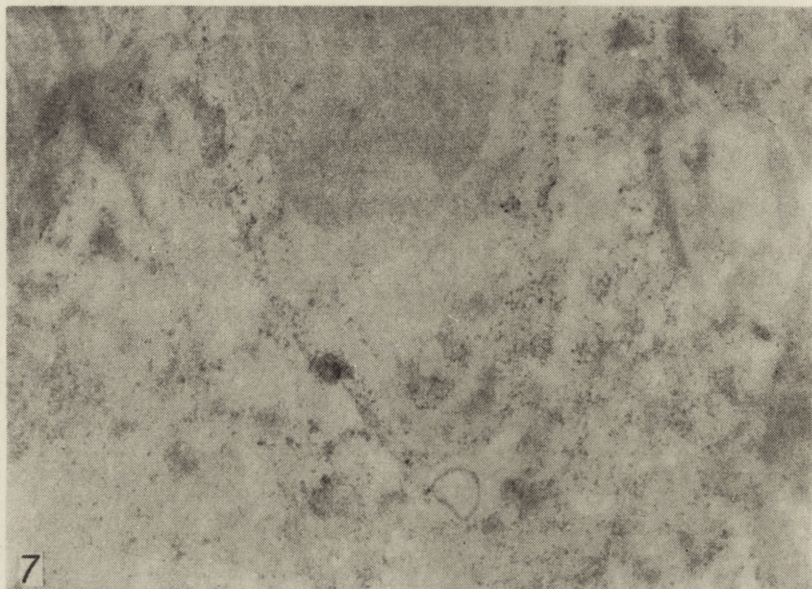
Fig. 5. Hepatogenic gliopathy, 4 months of experiment, 2 h peroxidase circulation. Short segments of tight junctions filled with reaction product (arrow heads). Electron-dense product in extracellular space (arrow). \times 15 000



Ryc. 6. Szczur kontrolny. Produkt reakcji enzymatycznej zlokalizowany głównie w błonie podstawnej naczynia. ATP. Pow. 15 000 \times

Fig. 6. Control rat. Product of enzymic reaction localized mainly in vascular basal lamina. ATP. \times 15 000

U szczurów doświadczalnych, zarówno z 4- jak i 6-miesięcznym przeżyciem stwierdzono zmianę w ultrastrukturalnej lokalizacji produktów reakcji enzymatycznej. Nie spostrzegano ich prawie zupełnie w błonie podstawnej kapilarów, gromadziły się natomiast obficie w śródbłonkach wyściełających naczynie (ryc. 7), nie wykazując uchwytne go zróżnicowania w zależności od zastosowanego substratu. Zwracał równocześnie uwagę fakt, że pęcherzyki mikropinocytarne w każdym przypadku wolne były od produktów reakcji enzymatycznej.



Ryc. 7. Gliopatia wątrobowa, 6 mies. doświadczenia. Produkt reakcji enzymatycznej znajduje się w śródbłonku włosniczki i w przylegającej błonie glejowej. ITP. Preparat niekontrastowany. Pow. 15 000 \times

Fig. 7. Hepatogenic gliopathy, 6 months of experiment. Product of enzymic reaction localized in vascular endothelium and in *membrana limitans gliae*. ITP. Uncontrasted grid. \times 15 000

OMÓWIENIE

W badanym okresie doświadczenia w mózгах zwierząt występuje charakterystyczny zespół zmian tkankowych, składający się na obraz encefalopatii wątrobowej (Mossakowski i wsp., 1970), a w obrazie mikroskopowo-elektronowym dominuje wzmożona pinocytoza w śródbłonkach kapilarów, poszerzenie złącz międzyśródbłonkowych i typowe uszkodzenie gleju astrocytarnego (Ostenda i wsp., 1976).

Zwiększone jest przenikanie soli srebra do tkanki z ich odkładaniem się w komórkach glejowych i niektórych ugrupowaniach neuronów, przy braku zmian przepuszczalności naczyń dla związków o wysokim

ciężarze cząsteczkowym (Mossakowski i wsp., 1970). Nasze obecne badania wskazują na uszkodzenie mechanizmów naczyniowo-mózgowych układu barierowego, którego wykładnikiem jest przechodzenie peroksydazy chrzanowej poza łożysko naczyniowe i jej gromadzenie w przestrzeniach międzykomórkowych w otoczeniu naczyń. W warunkach prawidłowych peroksydaza chrzanowa podana donaczyniowo nie przechodzi do tkanki nerwowej poza tzw. barierowymi obszarami (Reese, Karnovsky, 1967). Stwierdzone przez Westergaarda i Brightmana (1973) przechodzenie peroksydazy ze światła naczynia poprzez śródbłonki do jego głębszych warstw dotyczyło ograniczonego odsetka większych naczyń. W naszym przypadku zjawisko to występowało w większości naczyń włosowatych. Zwraca jednak uwagę fakt, że funkcja tzw. zespolień ścisłych (tight junctions) jest prawidłowo zachowana (Brightman, Reese, 1970). W żadnym bowiem przypadku nie obserwuje się wypełnienia kanałów złącz międzyśródbłonkowych na całej ich długości. Słup znacznika wypełniającego zespolenie zatrzymuje się na krótszym lub dłuższym odcinku złącza od strony światła naczyniowego. Wydaje się przeto uzasadnione przypuszczenie, że obecność peroksydazy w tkance poza światłem i ścianą naczynia włosowatego wiązać należy z jej transportem drogą pęcherzyków pinocytarnych, których liczba jest wyraźnie zwiększona w stosunku do materiału kontrolnego. Nie wyjaśniona pozostaje sprawa obecności elektronowo-gęstych złogów w cytoplazmie astrocytów otaczających naczynia. Można jedynie przypuszczać, że wobec głębokiego uszkodzenia astrocytów (Ostenda i wsp., 1976) dochodzi do przenikania peroksydazy przez zmienione patologicznie błony komórkowe.

U zwierząt kontrolnych lokalizacja aktywności badanych fosfataz jest identyczna z jej umiejscowieniem opisanym przez Toracka i Barnnetta (1964). Zmieniona lokalizacja aktywności enzymów u zwierząt doświadczalnych upodabnia naczynia kapilarne kory mózgu zwierząt z encefalopatią wątrobową do naczyń występujących w tzw. bezbarierowych obszarach i strukturach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak półko krańcowe, splot naczyniówkowy lub szyszynka (Torack, Barnett, 1964). Różnica rozmieszczenia aktywności badanych fosfataz w naczyniach różnych części ośrodkowego układu nerwowego stanowi według wymienionych autorów wykładnik zróżnicowania złącza naczyniowo-mózgowego w strukturach barierowych, związanego z odrębnościami jego funkcji transportowych. Zmiana lokalizacji aktywności badanych hydrolaz, biorących udział w procesach związanych z transportem przez błony biologiczne (Hokin, Hokin, 1961; Skou, 1962) może być traktowana jako wyraz zmian stanowiących podłoże nieprawidłowej przepuszczalności naczyń mózgowych.

Stwierdzone przez nas zaburzenia przepuszczalności naczyń w encefalopatii pochodzenia wątrobowego mogą sprzyjać przechodzeniu do tkanki nerwowej nieprawidłowych produktów przemiany związanych z upośledzeniem czynności wątroby. Mogą być również odpowiedzialne za zwiększone gromadzenie się w mózgu substancji, których stężenie w prawidłowej tkance nerwowej regulowane jest przez wydolne naczyniowo-mózgowe mechanizmy barierowe. Można przypuszczać, że nadmierne gromadzenie się w mózgu miedzi u chorych z ostrym uszkodzeniem wątroby, stwierdzone przez Śmiałka i Mossakowskiego (1974) jest związane z upośledzeniem tych mechanizmów.

М. Я. Моссаковский, М. Остенда, А. Пронашко-Курчиньска

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА МОЗГОВЫХ КАПИЛЛЯРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕПАТОГЕННОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследованы изменения ультраструктуры мозговых сосудов при экспериментальной гепатогенной энцефалопатии у крыс. Цирроз печени вызывали путем подавания четыреххлористого углерода. Проницаемость мозговых капилляров исследовали при помощи пероксидазы из хрена. Проводили также оценку локализации активности нуклеозидных фосфатаз в стенке капилляров и их ближайшем окружении (capillary glia unit).

Изменения в мозгу установлены через 6 месяцев переживания. В это время отложения пероксидазы появлялись в межклеточных пространствах, прилегающих к сосудам. В сосудистой стенке пероксидаза находилась в пиноцитарных пузырьках, но не проходила через межэндотелиальные анастомозы. В этой же самой опытной группе установлены изменения локализации гидролаз в сосудистой стенке. Наивысшая их активность у контрольных животных имела место в основной мембране капилляров, а в опытной группе ее установили в эндотелии.

Наблюдавшиеся нами нарушения проницаемости сосудов при гепатогенной энцефалопатии могут быть ответственными за повышение накопления в мозгу неправильных продуктов обмена, образующихся вследствие дефективности функции печени.

M. J. Mossakowski, M. Ostenda, A. Pronaszko-Kurczyńska

ULTRASTRUCTURE OF BRAIN CAPILLARIES IN EXPERIMENTAL HEPATOGENIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The alterations in the ultrastructure of cerebral vessels in the course of experimental hepatogenic encephalopathy in rats were studied. Hepatic cirrhosis was produced by the administration of carbon tetrachloride. The permeability of cerebral capillaries was studied by means of horseradish peroxidase. The inve-

stigation concerned also the localization of nucleoside phosphatases in capillary-glia unit.

The changes in the brain were observed in animals after 4 months survival. At this time the presence of horseradish peroxidase was demonstrated in extracellular space adjacent to the vessels. Horseradish peroxidase appeared in pinocytotic vesicles but did not penetrate endothelial tight junctions. In the same experimental group the localization of hydrolytic enzymes in vascular walls changed. The highest enzyme activity in animals of the control group was demonstrated in basal lamina of capillaries whereas in experimental animals it was localized in endothelium.

The observed disturbance in vascular permeability in hepatogenic encephalopathy can be responsible for enhanced accumulation in the brain of abnormal metabolic products resulting from liver disorder.

PIŚMIENNICTWO

1. Brightman M. W., Reese T. S.: Tight junctions, gaps and fenestrae in the endothelium of normal and abnormal vertebrate brains. The Proceedings of a Symposium on the Blood-Brain Barrier. Oxford 1970. Truex Press pp. 5—12.
2. Hokin M. R., Hokin L. E.: Phosphatides and active transport with particular reference to the role of the phosphatidic acid on sodium transport. *Biochem. J.*, 1961, 81, 32.
3. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
4. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko-Kurczyńska A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 365—374.
5. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Kassur B., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrych uszkodzeniach wątroby. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 51—62.
6. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.
7. Reese T. S., Karnovsky M. J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 207—214.
8. Skou J. C.: Preparations from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of K^+ and Na^+ . *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 314—320.
9. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Morphological changes and quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma, due to acute impairment. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 259—268.
10. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1964, 23, 46—59.
11. Westergaard E., Brightman M. W.: Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J. Comp. Neurol.*, 1973, 152, 17—44.

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