

R A D O V I

KNJIGA LXXX

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 22

Urednik
GRUJICA ŽARKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

Tehnički urednik
ENES EKIĆ



SARAJEVO
1984

ABDULAH DŽUVIĆ, WOLFGANG DROMMER i MEHMEDALIJA IBROVIĆ

MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE RASTERELEKTRONSKO- MIKROSKOPSKE STRUKTURE GORNJE POVRŠINE HIPOKAMPUSA VUKOVA I PASA*

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 25. XI 1982. na osnovu recenzije
prof. dra A. Nikulina)

U V O D

Formacija hipokampusa, odnosno *Cornu ammonis*, na'azi se na bazi postranih moždanih komora i pripada, uz ostale dijelove, tzv. limbičkom sistemu, koji je i kod životinja odgovoran za mnoge emocionalne i visceromotorne reakcije. Tako za nemir, gnjev i agresivnost ljudi, on modulira emocionalne nadražaje, a ima i mnogobrojne, dijelom već potvrđene ili još neistražene, druge funkcije (6,17).

O istraživanjima gornje površine hipokampusa do sada se malo pisalo. S jedne strane, ni normalna anatomska struktura gornje površine hipokampusa kod različitih vrsta životinja, nije još sasvim poznata. S druge strane, patološke promjene u hipokampusu, koje su općenito relativno rijetke, najčešće su opisane samo pomoću svjetlosne mikroskopije, pri čemu su inflamatorne reakcije predstavljene kao posljedica virusnih infekcija (na primjer, kuga svinja, Aujezkijska bolest) ili uključna tjelešca kod Bornanske bolesti konja, odnosno bjesnoće (7), kao i tumori (spongioblastomi i spongioblastični glioblastomi).

Kod hidrocefalusa, uslijed povećana pritiska u postranim moždanim komorama, dolazi do gubljenja cilija na površini endodima (1).

Podaci iz literature, a i vlastita rasterelektronmikroskopska (REM) istraživanja (2, 3, 4, 10, 13, 15, 16, 17), pokazuju da pojedini areali gornje površine endodima hipokampusa različitih vrsta životinja, kao i različiti areali jedne te iste životinjske vrste, u odnosu na cilije i mikrovile, imaju različitu ultrastrukturu građu, odnosno ultra „teksturu”.

O dosadašnjim REM-istraživanjima gornje površine hipokampusa data su samo pojedinačna saopćenja i iznosi se da na ultra „teksturu” gornje površine endodima utječu različiti endogeni (hormoni) i eksogeni (rendgen-zraci) faktori (9,13), kao i vrsta i starost životinje (15).

* Referat na XXIV međunarodnom simpozijumu o bolestima zooloških i divljih životinja (Veszprém — Mađarska)

Međutim, kod pasa i vukova do sada nije u potpunosti upoznata ni normalna ultrastruktura gornje površine hipokampusa, što je razlogom da ne mogu biti prepoznate niti eventualne patološke promjene na njoj. To je razlog da smo se odlučili rasterelektronskomikroskopski istražiti komparativno slobodnu gornju površinu odgovarajućih i istih lokalizacija *Partis temporalis* i *Cornu rostrale* hipokampusa grupe zdravih i sasvim mladih pasa i vukova, iste starosti i iz istoga legla. Ova istraživanja predstavljaju istovremeno jednu bazu za eventualnu kasniju sigurniju procjenu patoloških procesa i stanja na tim lokalitetima.

MATERIJAL I METOD RADA

Eksperimentalna REM-istraživanja ultrastrukture gornje površine hipokampusa (*Cornu rostrale* i *Partis temporalis*) proveli smo na 5 vukova (2 mužjaka i 3 ženke) i 6 pasa (4 mužjaka i 2 ženke) križane pasmine. Životinje su klinički bile zdrave, u dobi od 10 dana, a poticale su iz istoga legla.

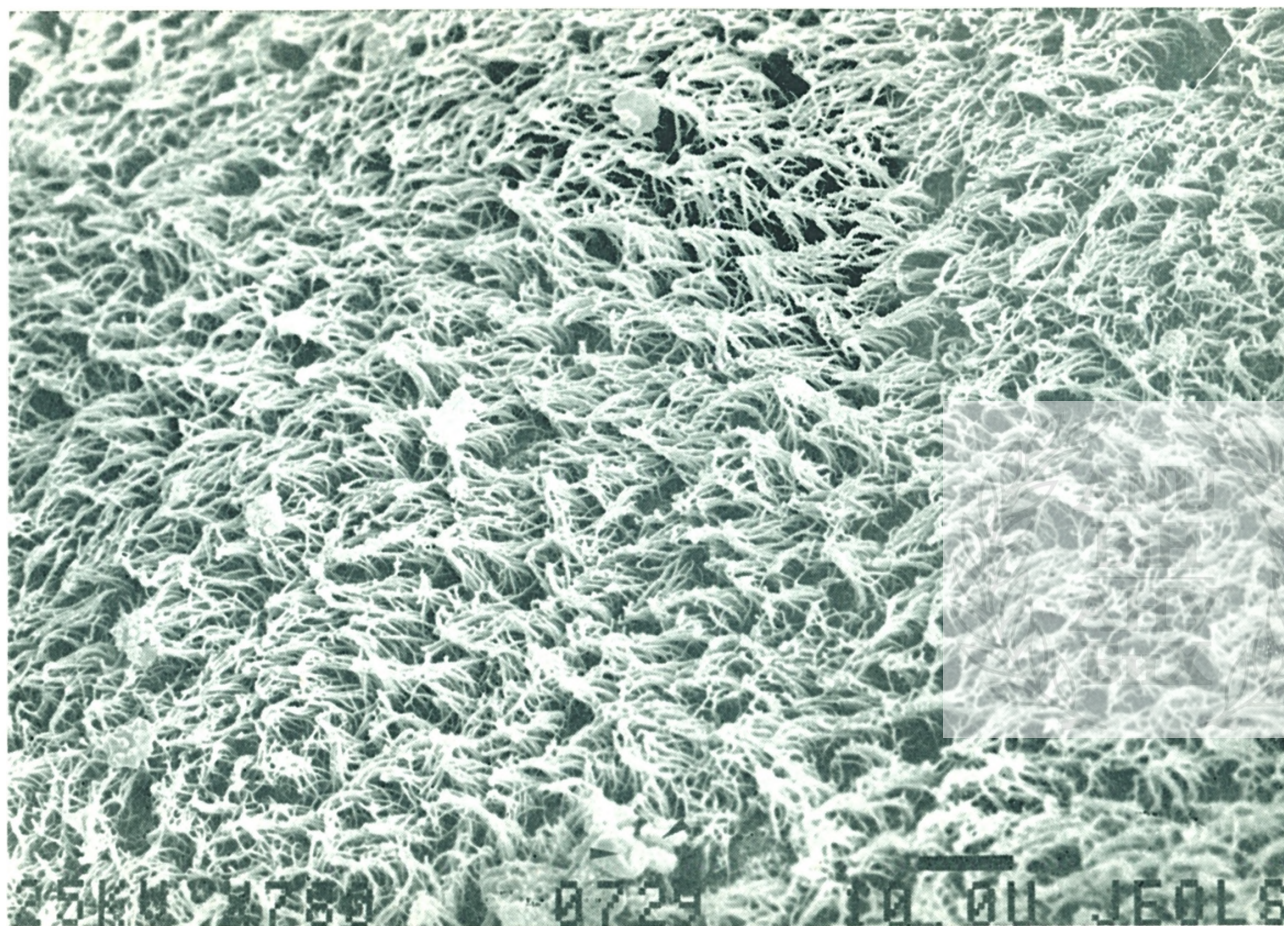
Životinje su usmrćene narcorenom. Neposredno nakon ustanovljenja smrti pristupili smo otvaranju glave, odstranjivanju mozga, pažljivom otvaranju postranih moždanih komora, pazeći pri tom da se ne ošteti gornja površina hipokampusa. Sada smo izapirali gornju površinu hipokampusa pomoću šprice s fiziološkom otopinom NaCl.

Za REM su od svih životinja uzimani odgovarajući isjecci (veličine $0,7 \times 0,7$ cm) istih lokalizacija *Partis temporalis* i *Cornu rostrale* i vršena je imerziona fiksacija u 5 postotnom kakodilatpuferisanom glutaraldehidu. Nakon naknadne fiksacije proba u 1 postotnoj otopini osmiumtetroksida, za 2 sata je uslijedilo izapiranje proba u kakodilatpuferu u trajanju od 4 sata (tri puta mijenjanje) i dehidriranje u alkoholu (30%, 50%, 70%, dva puta 90%, u trajanju od dva dana). Probe su ostavljene dva dana u octenokiselom amilesteru, a zatim je izvršeno sasušenje proba sa CO₂ u „Critical-Point” aparatu. Ovako pripremljene i sasušene probe su zbog kontrole pregledane stereomikroskopskom lupom radi eventualnih artefakata i njihova isključenja. Pomoću „Leitsilbera” probe su prilijepljene na držač objektiva za REM i preko njih je nanescena („sputtern”) zlatna prevlaka. Zlatna prevlaka je potrebna radi odbijanja elektronskih zraka, jer se u protivnome ne može dobiti optimalna predstava slobodne površine istraživnog bloka tkiva. Probe su držane u eksikatoru sa fosfornim pentoksidom, a REM-pretraživanja i snimanja ovako pripremljenih blokova hipokampusa vršena su na Jeol-JSM-35 C „scanning” elektronskom mikroskopu na 25 kV, uz povećanja od 760 do 19 200 puta.

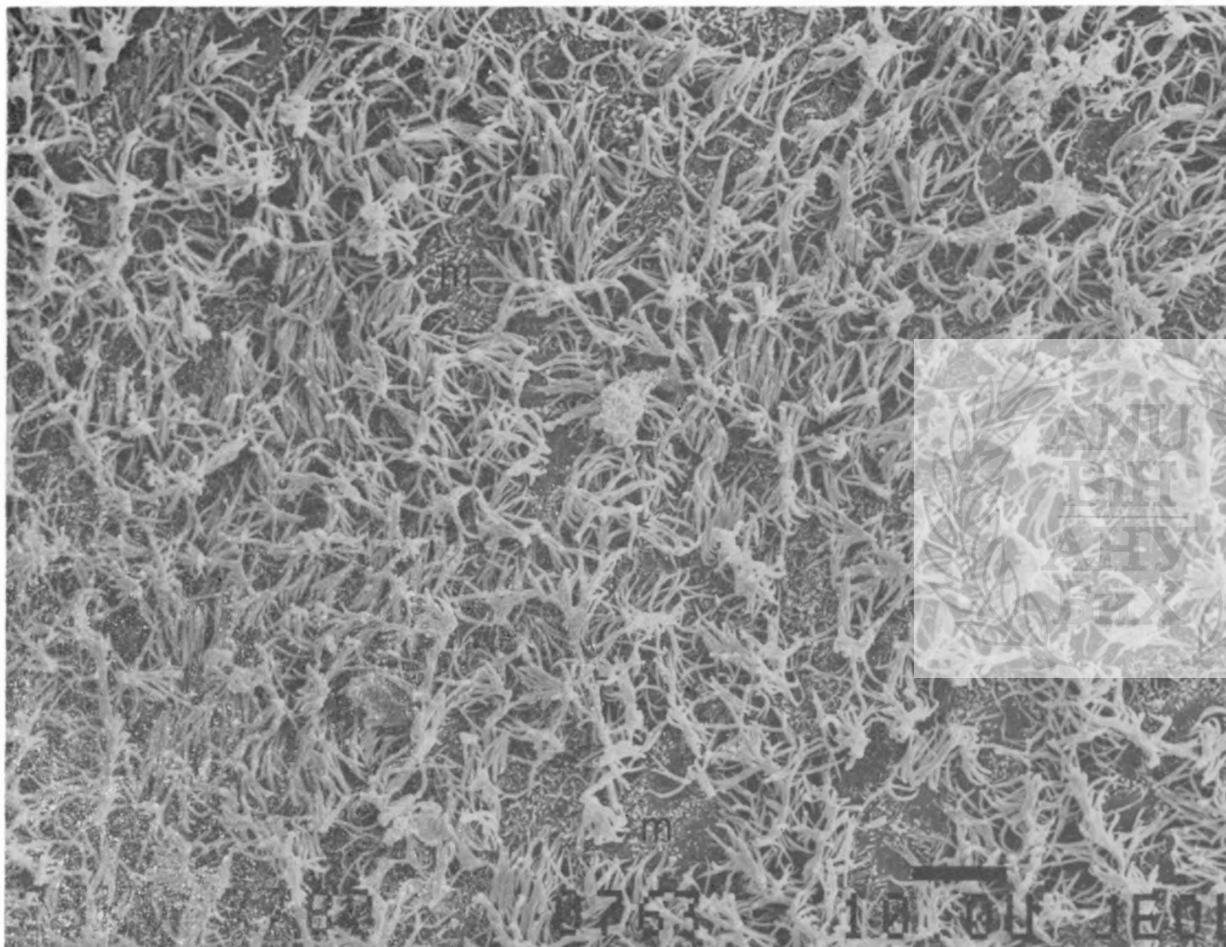
REZULTATI I DISKUSIJA

Rasterelektronskomikroskopskim pregledom, uz istovremeno sistematsko snimanje određenih i istih dijelova slobodne gornje površine hipokampusa (*Cornu rostrale* i *Pars temporalis*) svakog slučaja ponaosob, i štenadi i vučića, i upoređivanjem tih nalaza nastojali smo ustanoviti eventualne postojeće morfološke razlike između ove dvije životinjske vrste istoga roda, iste starosti i iz istoga legla.

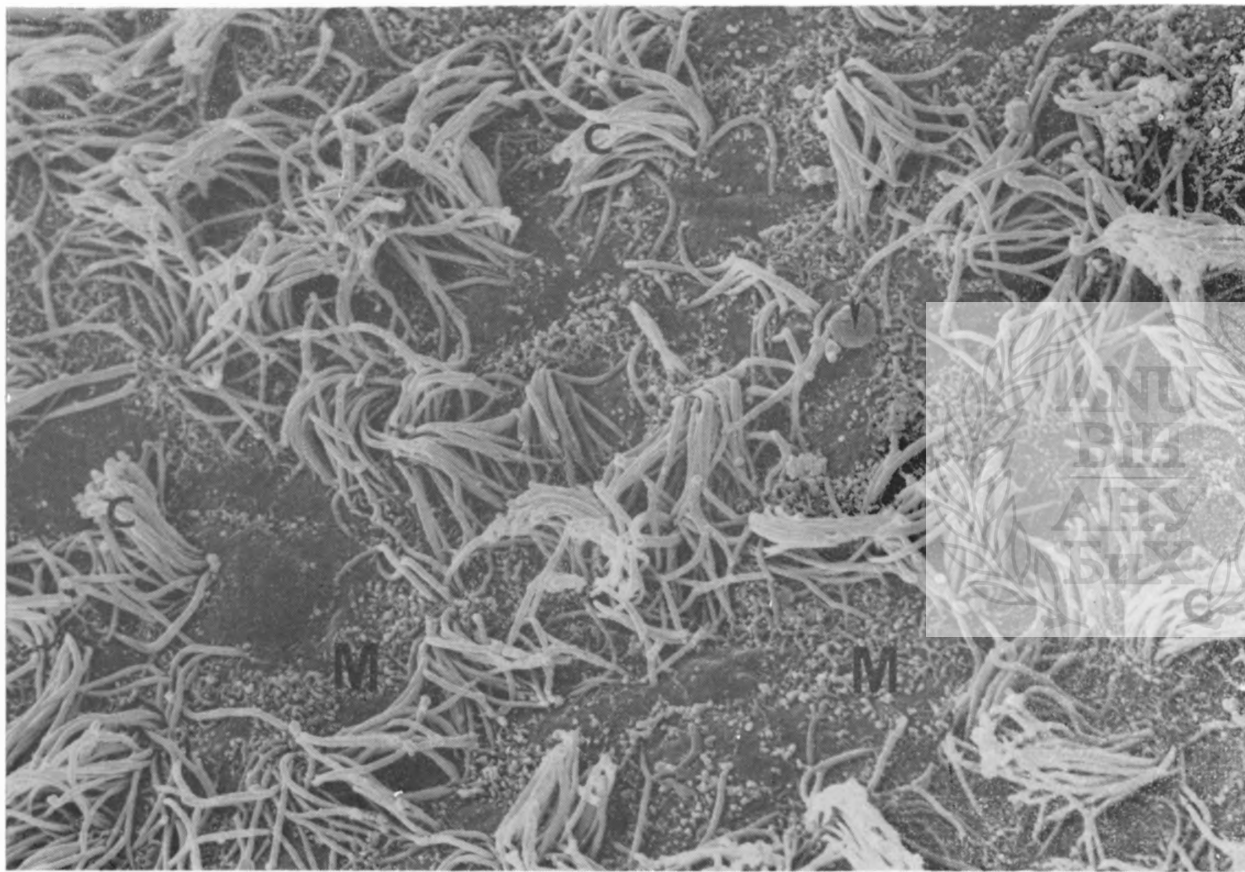
Kod obje životinjske vrste, na oba istraživana lokaliteta, gledano općenito, nalazili smo neznatne razlike u morfološkom izgledu površine. Naime, nalazili smo, kako u *Cornu rostrale* tako i u *Partis temporalis*, areale sa različito gustim rasporedom cilija, koje smo podijelili u tri grupe: sasvim gusti raspored cilija, manje



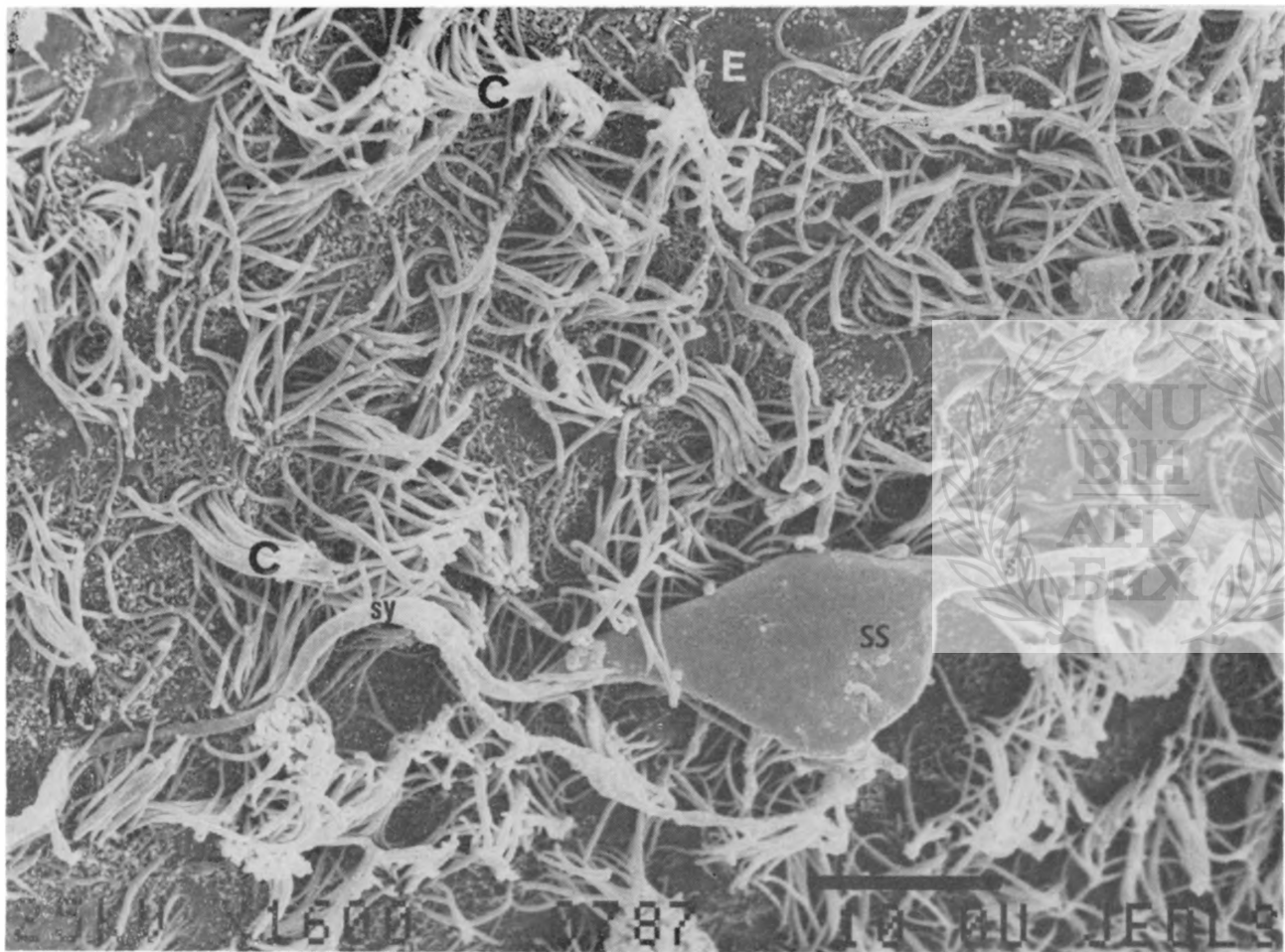
Slika 1. — Rasterelektronskomikroskopska slika površine hipokampusa 10 dana starog šteneta, sa gustim rasporedom ciliija: tri eritrocita zaostala na površini (strelica)
(povećanje 1248 $\times$)



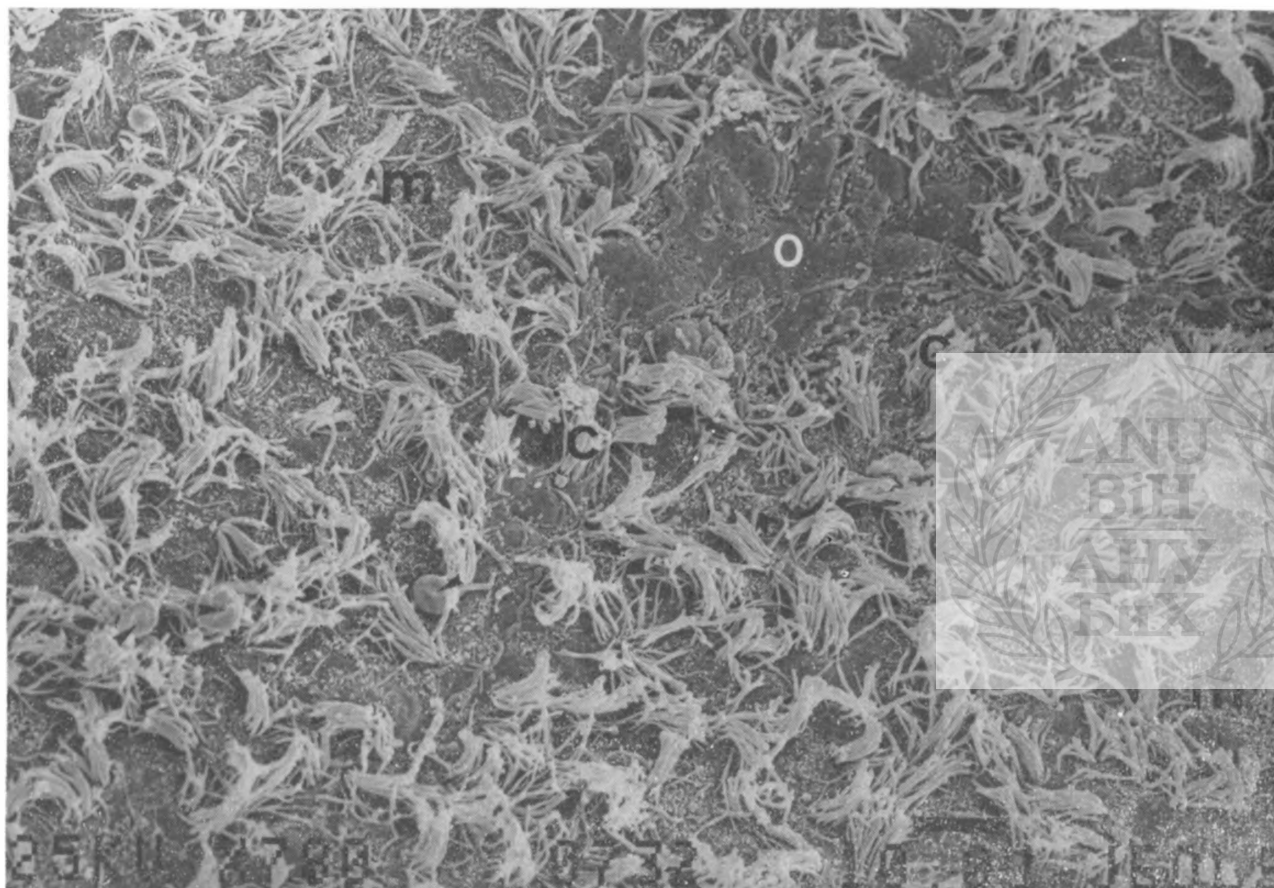
Slika 2. — Rasterelektronskomikroskopska slika areala površine hipokampusa (*Cornus rostrale*) sa nešto rjeđim rasporedom cilija grupiranih u guste „žbunove”: između cilija područja sa gustim mikrovilama (m); sinapse supraependimalnih stanica (sy) (Povećanje: 1248 ×)



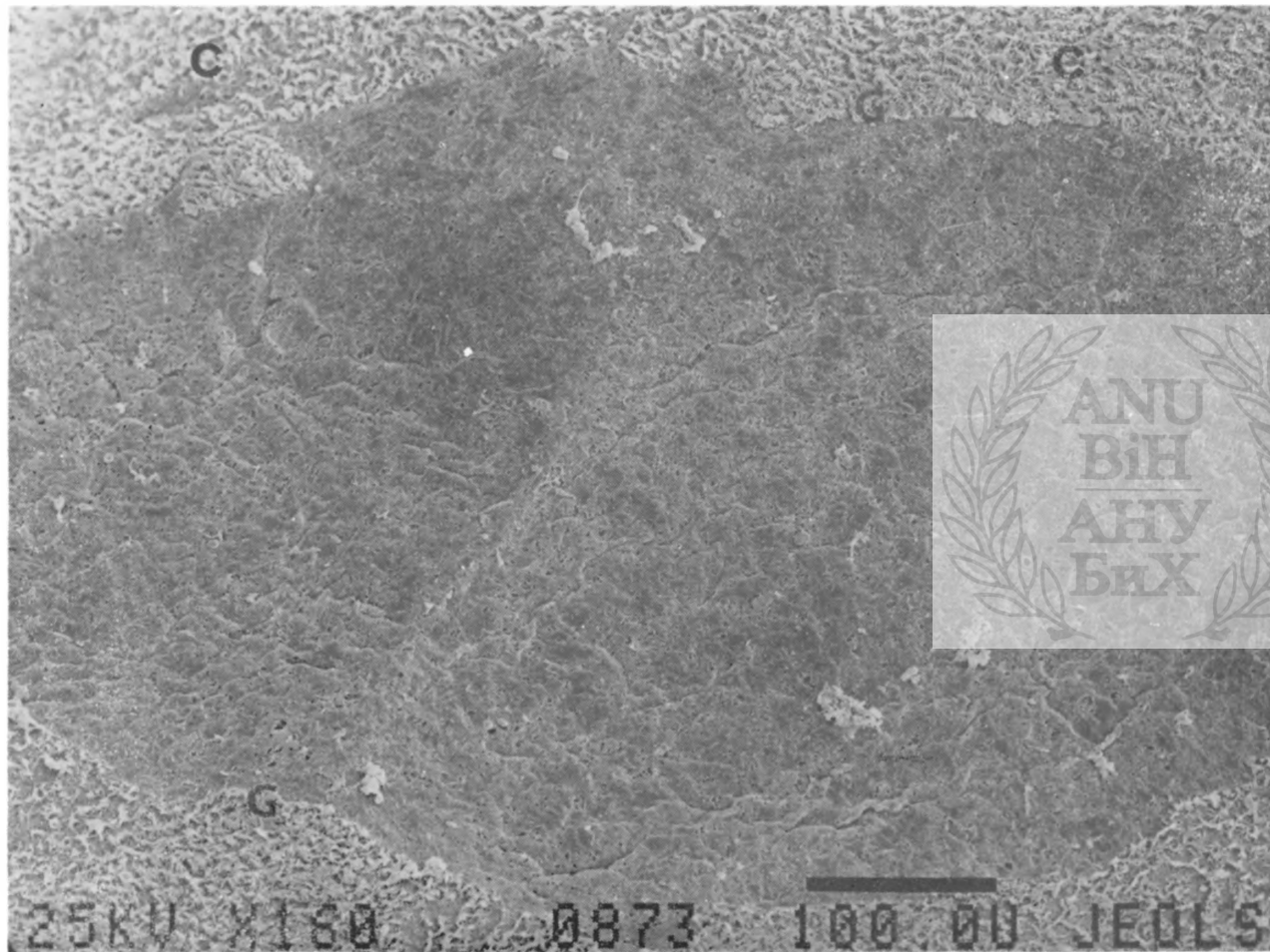
Slika 3. — Rasterelektronmikroskopska slika površine hipokampusa (*Pars temporalis*) 10 dana staroga vučića, sa cilijama grupiranim u „žbunove” (C); između cilija šestougona ili nepravilno ovalna područja bez cilija sa gustim mikrovilama (M) raspoređenim uglavnom na rubovima „razgolićenih” ependimalnih stanica (E); jedan zaostao eritrocit (strelica)
(Povećanje: 2560 ×)



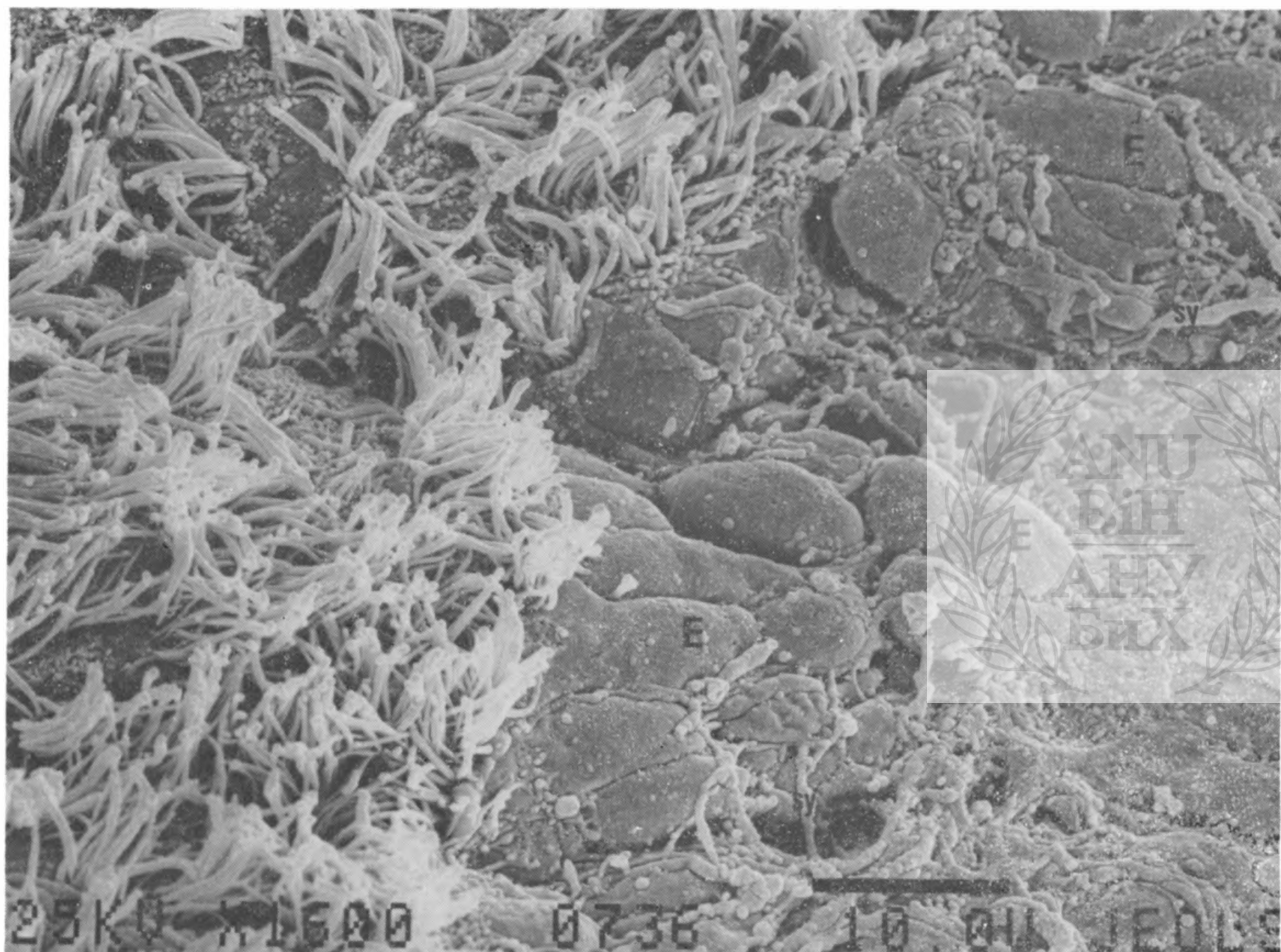
Slika 4. — Rasterelektronskomikroskopska slika površine hipokampusa 10 dana staroga šteneta: cilije u „žbunovima” (C); mikrovile (M); ependimalne stanice (E); supraependimalna bipolarna stanica (SS) sa dobro vidljivim sinapsama (sy)
(Povećanje: 2560 ×)



Slika 5. — Rasterelektronskomikroskopska slika površine hipokampusu (*Cornu rostrale*) 10 dana staroga vučiča, sa cilijama u zasebnim „žbunovima” (C): između cilija manji areali samo sa mikrovilama (M) razmještenim uglavnom na rubovima endotelialnih stanica; jedno „ogoljelo”, manje opsežno područje (O) bez mikrovila i cilija sa dobro vidljivim „razgolićenim” endotelialnim stanicama: eritrociti (strelica)
(Povećanje: 1248 ×)



Slika 6. — Rasterelektronmikroskopska slika „ogoljele” površine hipokampusa (*Cornu rostrale*) 10 dana staroga vučica, sa „razgolićenim” ependimalnim stanicama (E) i dijelovima sinapsi (sy)
(Povećanje: 2560 ×)



Slika 7. — Rasterelektronskomikroskopska slika opsežnog „ogoljelog” područja površine hipokampusa (*Cornu rostrale*) 10 dana staroga vučica: jasna i oštra granica (G) sa područjima gusto prekrivenim cilijama (C)
(Povećanje: 2560 ×)

gusti raspored cilija u „žbunovima” i dosta rijedak raspored cilija, takođe u zasebnim „žbunovima”. Najopsežnija su područja sa *vrlo gustim rasporedom cilija*, tako da nije bilo moguće promatrati površinu stanica ispod cilija, a i postojeći mikrovili su bili gotovo potpuno prekriveni cilijama (sl. 1). Ovako gusti raspored cilija je nađen i na površini ependima postranih komora miša (1). Svojom strukturom ovi lokaliteti podsjećaju na „tepih”, kao što je opisano i kod majmuna (15). Dobili smo utisak da je u našim materijalima gustoća i raspored cilija na određenim i istim lokalitetima, bila nešto izraženija kod vučica u odnosu na štenad.

Na drugim lokalitetima, *raspored cilija je nešto rjeđi* (sl. 2). I tu je samo mjestimično vidljiva gornja površina ependima zaposjednuta mikrovilama. Cilije su rasporedene u zasebne guste „žbunove” (jedan po stanici).

Međutim, na trećim lokalitetima *raspored cilija je dosta rjeđi*; one su takođe grupirane u zasebne „žbunove” (20—30 cilija u jednom „žbunu”), pri čemu se, takođe, najčešće nalazilo jedan „žbun” po svakoj stanici (sl. 4), što odgovara nalazima kod odraslih pasa (4). Ostala površina hipokampusa, između tako grupiranih i isprepletenih cilija, prekrivena je mikrovilama, koje su rasporedene uglavnom na rubovima stanica (sl. 3).

Najgušća koncentracija mikrovila je na granicama ependimalnih stanica, pa se dobija heksagonalni raspored mikrovila, kao što je to slučaj i kod odraslih pasa (4) ili kod ependimalnih stanica centralnog kanala miša (16). Prema tome., na ovim lokalitetima vide se i sasvim slobodne, glatke površine ependimalnih stanica bez mikrovila. Areali sa ovakvim rasporedom cilija, u našim materijalima, bili su nešto veći kod vučica u odnosu na štenad.

Supraependimalne nervne stanice (sl. 4), o čijem funkcionalnom značenju se još uvijek ne zna sve (13), kod obje vrste ispitivanih životinja bile su u nešto oskudnijem broju i različitih veličina. Sinapse supraependimalnih stanica najčešće nisu bile vidljive; prekrivene su cilijama ili upletene u njih. Na svojoj dužini one nisu iste širine, mjestimično su vretenasto, odnosno varikozno proširene, a njihova srednja debljina je neznatno veća kod istraživanih pasa nego kod vukova, kako je to vidljivo iz tabele 1.

U našim istraživanjima nismo našli ravnomjernu i sistematsku raspodjelu cilija na površini hipokampusa vukova i pasa; nalazili smo, uglavnom, različitu gustoću cilija u pojedinim arealima, koji se međusobno izmjenjuju, što je, prema podacima iz literature, u suglasnosti sa situacijom kod štakora, kunića, pasa i majmuna (4, 5, 10, 13). Prema podacima iz literature, cilije predstavljaju strukture koje su odgovorne za pokretanje i miješanje cerebrospinalne tečnosti (2, 10), ali je dubiozno da li pri tome neznatna razlika u gustoći cilija ima neko osobito značenje (10).

Pretpostavlja se da je funkcionalno značenje gustoće cilija na površini postranih komora ependima, zajedno sa komornim sistemom i likvorom, u tome što one stvaraju jedan sistem hlađenja mozga (1).

Kod četiri, od ukupno pet pretraženih vučica našli smo, i to samo na površini *Cornu rostrale* hipokampusa, manja do prilično prostrana ovalna ili nepravilno okruglasta područja, sa srednjim promjerom od $113 \times 62 \mu\text{m}$, koja su bez mikrovila i cilija (sl. 5, 6, 7). Granica između ovih ogoljelih područja i područja sa mikrovilama i cilijama, na površini hipokampusa je izrazito oštra i dobro vidljiva (sl. 7). Na graničnoj liniji ne postoji uža ili širi pojas sa mikrovilama, pa tek onda i zona sa cilijama, kao što je to slučaj kod eksperimentalnih štakora u situacijama šoka (5), nego ogoljela površina prelazi direktno u strukturu gornje površine hipokampusa sa mikrovilama i cilijama. Prema tome, ovakav nalaz treba razlikovati od nađenoga

pataloškog stanja u šok-situacijama (5). Na ovim „ogoljelim” arealima jasno su vidljive i „ogoljele” ependimalne stanice (sl. 6), kao i rjede supraependimalne stanice i njihove, različito debele sinapse, koje su u arealima sa gustim cilijama najčešće i prekrivene njima. Međutim, „ogoljele” areale gornje površine hipokampusa nismo našli ni u jednome slučaju kod štenadi, koja su bila iste starosti kao i vučići i iz istoga legla.

Prema podacima iz literature, „ogoljeli” areali nisu se našli ni kod kontrolnih štakora (5, 13), kontrolnih kunića (11), mačaka (14), niti kod ovaca (12).

Slični „ogoljeli” areali, sa „izgubljenim” cilijama nalaze se i na površini ependima postranih komora štakora sa eksperimentalno izazvanim hidrocefalusom, kao i kod drugih vrsta životinja sa genetskim ili umjetno izazvanim hidrocefalusom (1), a nađeni su i u transplantatu hipotalamusa fetusa štakora sa umnoženim i istaknutim supraependimalnim stanicama (8).

Pitanje je da li se areali slobodni od cilija i mikrovila moraju uvijek smatrati kao patološke promjene. Kod ispitivanih vučića nije se radilo o hidrocefalusu, a ipak su posjedovali areale slobodne od cilija. Nije li nalaz ovih slobodnih areala, bez cilija i mikrovila, specifičnost životinjske vrste?. Ne bi li zato trebalo detaljno i sistematski istražiti normalnu strukturu gornje površine hipokampusa pojedinih životinjskih vrsta prije nego što bi ovakav ili sličan nalaz bio interpretiran kao patološka promjena?

TABELARNI PRIKAZ SREDNJIH VRIJEDNOSTI POJEDINIHX
ELEMENTA NA POVRŠINI HIPOKAMPUSA VUKOVA I PASA

Srednje vrijednosti		Vukovi	Psi
Ependimalne nerv. stanice	dužina	16 μm	17 μm
	širina	10 μm	17 μm
Stan. nastavci	dužina	23 μm	25 μm
	širina	1,7 μm	1,9 μm
Nejasne stan. u arealima s manje gustim cilijama	dužina	8 μm	7,5 μm
	širina	5 μm	4,1 μm
Cilije	širina	0,30 μm	0,33 μm
	dužina	6,3 μm	6,8 μm
Dužina mikrovila		1,04 μm	1,06 μm
Sinapse supraependim. stanica	najšire	1,4 μm	1,7 μm
	najuže	0,7 μm	0,8 μm
„Microbläschen”		0,5 μm	0,46 μm
Slobodni „ogoljeli” areali	dužina	113 μm	
	širina	62 μm	
Nejasne stanice u slobodnim arealima	dužina	8 μm	
	širina	5 μm	

Iako smo u našim istraživanjima imali sasvim mlade životinje (10 dana stare), iste starosti, pa čak i iz istoga legla, ipak je ovdje teško decidno reći da li je, i u kojem stepenu, utjecao eventualno i faktor domestikacije na nađene pojedine, istina neznatne, ultrastrukturne morfološke razlike (kako je to vidljivo iz tabele)

gornje površine hipokampusa vukova i pasa, ili je to možda u vezi sa funkcionalnim kapacitetom kod ove dvije životinjske vrste, koje pripadaju istome rodu.

Opsežnija ili manje opsežna područja gornje površine *Cornu rostrale* hipokampusa vučica bez cilija i mikrovila mogla su se dobro uočiti, s obzirom na lokalizaciju i opsežnost, samo pomoću REM-metode. Nasuprot tome, pomoću „semi-dünnschnitt“- i „ultradünnschnitt“ metode ovakva područja bi bilo teško pronaći, odnosno to bi bilo moguće samo pomoću serijskog rezanja preparata.

Dalja istraživanja kod drugih vrsta životinja, morala bi dati odgovor da li ovi slobodni „ogoljeli“ areali, bez cilija i mikrovila, dolaze češće kod zdravih životinja nego što se to do sada smatralo, ili ih treba dovođiti u uzajamnu vezu sa patijskim promjenama, kao što je to, na primjer, slučaj kod hidrocefalusa (1), ili opet u situacijama šoka (5).

Z A K L J U Č A K

Rasterelektronmikroskopska istraživanja gornje površine hipokampusa obavili smo na 5 vučica i 6 pasa. Kod obje vrste životinja na *Cornu rostrale* i *Pars temporalis* gornje površine hipokampusa, s obzirom na gustoću cilija, našli smo tri različita područja: a) areale sa vrlo gustim rasporedom cilija u vidu „tepiha“, b) areale sa nešto rjeđim rasporedom cilija grupiranim u guste „žbunove“ i to po jedan „žbun“ po stanici i c) areale gdje su cilije raspoređene u rjeđim odvojenim grupama, odnosno „žbunovima“, takode jedan „žbun“ po stanici. Između „žbunova“ cilija vidljive su endimalne stanice sa koncentracijom mikrovila na njihovim rubovima. Najprostraniji areali u našim istraživanjima bili su oni sa vrlo gustim rasporedom cilija u vidu „tepiha“. Dalje pojedinosti prikazane su na tabeli 1.

Kod vučica smo, uz to, samo u području *Cornu rostralis* hipokampusa, našli prostranije ili manje prostrane „ogoljele“ areale bez cilija i mikrovila. Naša istraživanja ukazuju da su ovi areali normalan, za ovu vrstu životinje tipičan nalaz.

U daljim istraživanjima trebalo bi ispitati mogućnost nastanka ovih areala kod patoloških promjena, na primjer kod hidrocefalusa, u šok-situacijama itd.

Z U S A M M E N F A S S U N G

MORPHOLOGISCHE KARAKTERISTIK RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STRUKTUR DER HIPPOCAMPUSOBERFLACHE BEI WÖLFE UND HUNDE

Rasterelektronenmikroskopisch bei beiden Tierspezies, wie in *Cornu rostrale* als auch in der *Pars temporalis*, finden sich einen unterschiedlich dichten Cilien-Besatz: dichte Cilien-Besatz, wenige dichte Cilien und aufgelockerten Cilienareale angeteilt.

Bei dem Wölfe, in *Cornu rostrale*, finden sich Cilien- und Mikrovilli-freien Areale.

Bei Hydrocephalus die Cilien an die Ependymoberfläche durch den erhöhten Ventrikuldruck verloren gehen.

Es ist die Frage ob diese cilienfreien Areale immer als pathologische Veränderungen angesehen werden müssen. Die untersuchten Wölfe zeigten keinen Hydrocephalus und besitzen ähnliche cilienfreien Areale. Es wäre möglich das diese cilienfreien Areale tierspezifisch sind und so mit eine genaue Untersuchung der normalen Oberflächenstruktur erfolgen muss bevor diese Befund als pathologische Veränderung, z. Beispiel Hydrocephalus oder bei Schocksituationen, interpretiert werden kann.

L I T E R A T U R A

- (1) Bannister, M., Chapman, S. A. (1980): *Ventricular Ependyma of Normal and Hydrocephalic Subjects: a Scanning Electronmicroscopic Study*. Develop. Med. Child Neurol. 22, 725—735.
- (2) David, H., Marx, I., Winkelmann, E. (1963): *Über die Wurzelfasern in zilienträgenden, Ependymzellen des Rückenmarks von Amblystoma mexicanum*. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 70 471—477.
- (3) David, E. Scott, Willis, K. Paull and Krobisch Dubley (1972): *A Comparative Scanning Electron Microscopic Analysis of the Human Cerebral Ventricular System*. Z. Zellforsch. 132, 203—215.
- (4) Drommer, W., Dilberović, F., Džuvic, A. (1977): *Vergleichende Transmissions und Rasterelektronenmikroskopische Befunde an der Hippocampusoberfläche sowie den Nervenzellen des Stratum Pyramidale*. Labirint, 125—132.
- (5) Drommer, W., Džuvic, A., Rosenbruch, M. (1981): *Opis rasterelektronsko-mikroskopske metode na primjerima promijenjene gornje površine Hippocampusa štakora nakon eksperimentalno izazvanog protrahiranog neurotoxin šocka*. Veterinaria, 30, 1, 23—31.
- (6) Ellenberger—Baum (1974): *Handbuch der vergleichende Anatomie der Haustiere*, 18 Auflage, Springer—Verlag Berlin Heidelberg, New York, 841.
- (7) Fankhauser, R., Luginbühl, H. (1968): *Pathologische Anatomie des Zentralen und peripheren Nervensystem der Haustiere*. Verlag Paul Parey in Berlin u. Hamburg, 253.
- (8) Gash, D., and Scott, E. David (1980): *Fetal Hypothalamic Transplants in the Third Ventricle of the Adult Rat Brain*. Correlative Scanning and Transmission Electron Microscopy Cell Tissue Res 211, 191—206.
- (9) Heinzmann, U. K., K.—H. Marquart u. H. Kriegel (1977): *Veränderungen an den lateralen Ventrikel des Mäusegehirns nach Röntgenbestrahlung*. Autoreferat von der 18. Tagung für Elektronenmikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Münster, 20—21.
- (10) Keyserlingk, D. G. v., Kraaz, W. (1975): *Rasterelektronisches Studium von Cyto- und Myeloarchitektur des Kaninchenhirns*. Verh. Anat. Ges. 69, 587—592.
- (11) Hetzel, W. (1977): *Unterschiede im Ependym von Lagomorpha und Primates: Rasterelektronenmikroskopische Beobachtungen am Cornu inferio des Seitenventrikels von Kaninchen und Affe*. Autoreferat von der 18. Tagung für Elektronenmikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Münster. 20.
- (12) Kozłowski, P. G., Scott, E. D., Dudley, K. G. (1973): *Scanning electron microscopy of the third ventricle of sheep*. Z. Zellforsch. 136, 169—176.
- (13) Mestres, P., Breipohl, W. (1976): *Morphologie and distribution of supraependymal cells in the third ventricle of the albino Rat*. Cell Tiss. Res. 168, 303—314.
- (14) Noack, W., Dumitrescu, L., Schweichel, J. U. (1972): *Scanning and electron microscopical investigations of surface structures of the lateral ventricles in the cat*. Brain Research, 46, 121—129.
- (15) Penelope, W., Coates (1977): *The third ventricle of Monkeys. Scanning Electron Microscopy of surface Features in Mature and Females* Cell Tiss. Res. 177, 307—316.
- (16) Smart, I. H. M. (1972): *Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse*. J. Anat. 111, 365—380.
- (17) Stephan, H. (1975): *Allosterie im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Bd. IV/9 (vom W. Bargmann), 1—998. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.

Prof. dr A. Džuvic i prof. dr M. Ibrić, Veterinarski fakultet — Sarajevo, Jugoslavija;
 Prof. dr W. Drommer, Institut für Pathologie, der Tierärztlichen Hochschule, 3000 Hannover,
 BR Deutschland.