

epz 2
P105



STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XIV

1976

ZESZ. 1

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XIV

Styczeń—Marzec 1976

Nr 1

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

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

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

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

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

BARBARA GAJKOWSKA

ZMIANY MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE
JĄDRA NADWZROKOWEGO I JĄDRA PRZYKOMOROWEGO
PODWZGÓRZA MÓZGU SZCZURA PO PODANIU ACTH

Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

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

Obecny stan badań w zakresie uwalniania i regulacji ACTH oraz wpływu podwzgórza na ten proces wskazuje, że wyniosłość pośrodkowa jest ostatnim ogniwem złożonym z elementów nerwowych kontrolującym bezpośrednio płat nerwowy przysadki mózgowej. Wykazywany przez wielu autorów w wyniosłości pośrodkowej w pobliżu naczyń układu wrotnego neurosekret Gomori — pozytywny jest najprawdopodobniej również związany z mechanizmem uwalniania ACTH (Bock, Goslar, 1969; Bock i wsp. 1969; Norstrom, Hansson, 1973; Stör, 1967; Vandesande i wsp. 1974). Na podstawie wyników licznych badań doświadczalnych można sądzić, że neurosekret wydzielany w jądrach podwzgórza wpływa na regulację osi podwzgórzowo-przysadkowej.

Celem mojej pracy było prześledzenie zmian mikroskopowo-elektronowych w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym po jednorazowym podaniu ACTH zdrowym zwierzętom. Próbowano także określić udział obydwu badanych jąder w regulacji wydzielania ACTH przez przysadkę.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenie wykonano na 35 szczurach szczepu Wistar, samcach 2 miesięcznych o średniej wadze 200 g. Zwierzęta podzielono na 2 grupy doświadczalne: 1 grupa — zwierzęta kontrolne, zdrowe (10 szczurów), 2 grupa — zwierzęta zdrowe, którym podano jednorazowo, podskórnie 1 j.m. ACTH (25 szczurów). Wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego, identyfikowane w lupie, pobierano w kropli utrwalacza po 1, 6, 12, 24 i 48 godzinach po wstrzyknięciu ACTH. Materiał do badań w mikroskopie elektronowym przygotowywano według metody standar-

dowej. Wycinki jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego utrwalano w 1,5% aldehydzie glutarowym i 2% czterotlenku osmu, odwadniano w alkoholach o wzrastających stężeniach oraz zatapiano w Epon 812. Preparaty ultracienkie kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i odczynnikiem Reynoldsa. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A, przy napięciu przyspieszającym 80 kV, na płytkach fotograficznych ORWO EU 2. Wykonano również kontrolę w mikroskopie świetlnym barwiąc wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego hematoksyliną-eozyną oraz aldehydową fuksyną według Gomoriego.

WYNIKI

Badania w mikroskopie świetlnym

W preparatach przeglądowych z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego szczurów po podaniu ACTH nie stwierdzono wyraźnych różnic w porównaniu z kontrolą. W preparatach barwionych aldehydową fuksyną można było zauważyć ziarnistości neurosekrecyjne w ilościach takich jak w normie.

Badania w mikroskopie elektronowym

Kontrola. Jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe. Neurony jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego wykazują duże podobieństwo morfologiczne. W obydwu tych jądrach komórki są ułożone blisko siebie. Między grupami komórek widoczne są liczne synapsy typu akso-somatyicznego i akso-dendrytycznego oraz liczne naczynia włosowate. W neuropilu spostrzega się włókna niezmielinizowane i nieliczne włókna zmieelinizowane. Zarówno neurony jądra nadwzrokowego jak i jądra przykomorowego posiadają duże jądro komórkowe, owalne, okrągłe lub z niewielkimi inwaginacjami, wypełnione dość równomiernie chromatyną jądrową. Jądro komórkowe jest otoczone podwójną błoną jądrową. Przy wewnętrznej błonie jądrowej często gromadzi się chromatyna jądrowa, tworząc skupienia, natomiast zewnętrzna błona jądrowa może być pokryta pojedynczymi rybosomami, można również zauważyć jej ciągłość z błonami siatki śródplazmatycznej szorstkiej. W jądrach komórkowych widoczne są często dwa lub jedno duże jąderko o dużej gęstości elektro-nooptycznej.

Siatka śródplazmatyczna szorstka jest dobrze rozwinięta i składa się z licznych wydłużonych i wąskich kanałów pokrytych dużą ilością pojedynczych rybosomów. Pomędzy tymi kanałami znajdują się liczne polirybosomy. W niektórych neuronach jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego gromadzi się w kanałach szorstkiej siatki śródplazmatycznej bezpostaciowa substancja o małej gęstości elektro-nooptycznej. W sąsiedz-

twie jądra komórkowego znajduje się zwykle aparat Golgiego dobrze rozwinięty, zbudowany z licznych wydłużonych i wąskich kanałów, mniejszych kanalików i cystern. W strefie aparatu Golgiego obserwuje się dużą ilość pustych pęcherzyków oraz tworów określanych jako „coated vesicles”, spotyka się także liczne ciała wielopęcherzykowe o wielkości od 0,4 do 0,8 μ . Niektóre z pęcherzyków aparatu Golgiego o średnicy 300 Å—1300 Å są wypełnione substancją elektronowo-gęstą i być może stanowią ziarnistości neurosekrecyjne (Pawlikowski, 1967; Flamant-Durand, Dustin, 1971; Cannata, Moris, 1973). W cytoplazmie neuronów obu badanych jąder występują często okrągłe i owalne mitochondria o jasnej macierzy i licznych grzebieniach. Widoczne są także lizosomy oraz nieregularnie rozrzucone krótkie i długie mikrotubule.

Jądro nadwzrokowe po podaniu ACTH. Po 1-szej godzinie od wstrzyknięcia 1 j.m. ACTH w neuronach jądra nadwzrokowego spostrzega się zmiany polegające na występowaniu głębokich inwaginacji błony jądrowej i gromadzeniu się chromatyny w postaci większych agregatów tuż przy błonie wewnętrznej (ryc. 1). Aparat Golgiego wydaje się niezmienny, w jego okolicy spotyka się pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne i liczne lizosomy. Mitochondria i inne elementy strukturalne cytoplazmy są prawidłowe.

Po 6-ciu godzinach od wstrzyknięcia ACTH jądra komórkowe wykazują nadal głębokie inwaginacje. Widoczne są również poszerzenia między zewnętrzną i wewnętrzną błoną jądrową oraz dość liczne pory. Siateczka śródplazmatyczna szorstka w okolicy przyjądrowej występuje w postaci krótkich nieregularnych kanałów pokrytych rybosomami natomiast w brzeźnych partiach perikarionu kanały siateczki śródplazmatycznej szorstkiej ułożone są równolegle. Aparat Golgiego jest zbudowany z niewielkiej ilości rozdętych, optycznie pustych pęcherzyków (ryc. 2). W jego okolicy spotyka się pojedyncze „coated vesicles” i nieliczne drobne pęcherzyki wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej. W cytoplazmie zwraca jedynie uwagę zwiększona ilość tworów lizosomalnych. Liczne niezmielinizowane włókna, w których widoczne są pojedyncze mitochondria, mikrotubule oraz duża ilość synaps przylegają bezpośrednio do perikarionów i wypustek neuronów.

Po 12 godzinach od wstrzyknięcia ACTH w neuronach jądra nadwzrokowego zwraca jedynie uwagę dobrze rozwinięty (w porównaniu z poprzednimi grupami) aparat Golgiego, w którego okolicy spotyka się dużą ilość „coated vesicles” i pęcherzyków o elektronowo-gęstym rdzeniu. Są to prawdopodobnie ziarnistości neurosekrecyjne. W cytoplazmie widoczne są także dość liczne mikrotubule (ryc. 3).

Po 24 godzinach od podania ACTH, jądro komórkowe i ergastoplazma nie wykazują większych odchyień od normy. W niektórych neuronach

zwraca jedynie uwagę dobrze rozwinięty aparat Golgiego zbudowany z nielicznych wydłużonych kanalików i dużej ilości pęcherzyków i wakuoli.

48 godzin po wstrzyknięciu ACTH, obrazy neuronów jądra nadwzrokowego są podobne do obrazów neuronów zwierząt kontrolnych.

Jądro przykomorowe po podaniu ACTH. Po 1 godzinie od podania ACTH obserwuje się zmiany, które polegają na powstawaniu głębokich wgłobień w otoczkach jąder komórkowych. Zmianom ulega także aparat Golgiego, którego niektóre zbiorniki są poszerzone i puste. Siatka śródplazmatyczna szorstka, mitochondria i lizosomy nie wykazują odchyień od normy (ryc. 4). W nielicznych neuronach spotykano w cytoplazmie kuliste, nieoblone skupiska ziarnistości odpowiadające tzw. ciałom jąderkopodobnym (ryc. 5), opisanym po raz pierwszy przez Shimizu i Ishii (1965).

6 godzin po wstrzyknięciu ACTH w większości neuronów jądra przykomorowego zwraca uwagę aparat Golgiego, którego nieliczne kanały są rozdęte i puste. Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w komórce jest mała,

Ryc. 1. Jądro nadwzrokowe; 1 godz po podaniu ACTH. Fragment jądra komórkowego, nieliczne kanały aparatu Golgiego, w cytoplazmie liczne mitochondria, polirybosomy i pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 16.600 X

Fig. 1. Supraoptic nucleus 1 h after ACTH administration. Fragment of cell nucleus and a few Golgi apparatus channels, in cytoplasm numerous mitochondria, polyribosomes and single neurosecretory granules. X 16.600.

- | | |
|---|--|
| N — jądro komórki
cell nucleus | mvb — ciało wielopęcherzykowe
multivesicular body |
| AG — aparat Golgiego
Golgi apparatus | E — neurosekret
neurosecret |
| ER — siatka śródplazmatyczna
szorstka
rough endoplasmic reticulum | Mt — mikrotubule
microtubules |
| M — mitochondria | cv — pęcherzyki opłaszczone
coated vesicles |
| Db — ciało gęste
dense body | NL — ciało jąderko-podobne
nucleolus-like body |
| L — lizosom
lysosome | |

Ryc. 2. Jądro nadwzrokowe 6 godz. po podaniu ACTH. Aparat Golgiego poszerzony i optycznie pusty. W jego okolicy widoczne pęcherzyki opłaszczone i ciała gęste. Pow. 30.000 X.

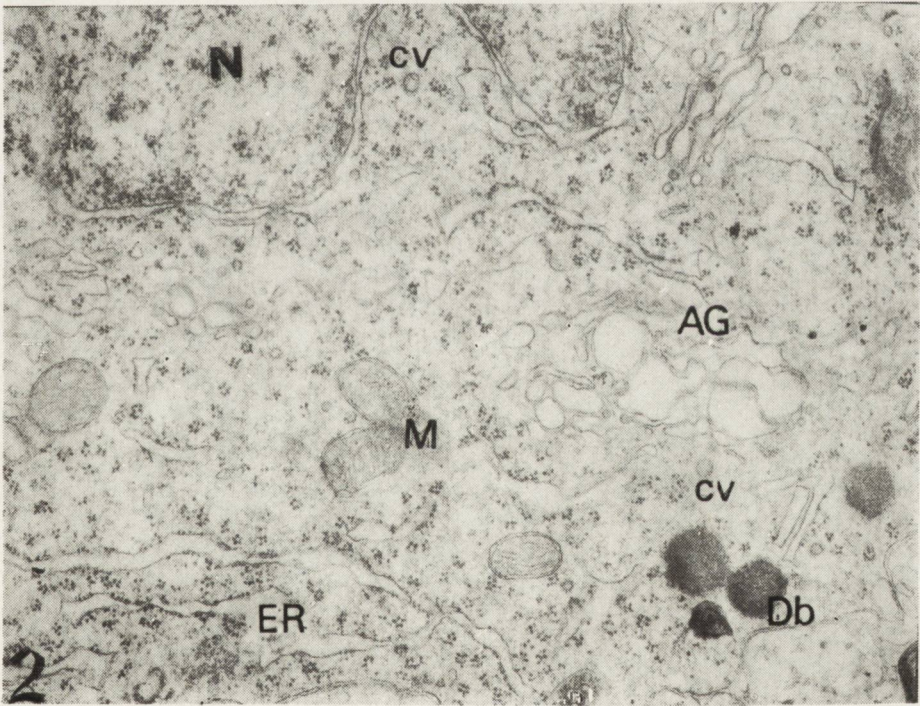
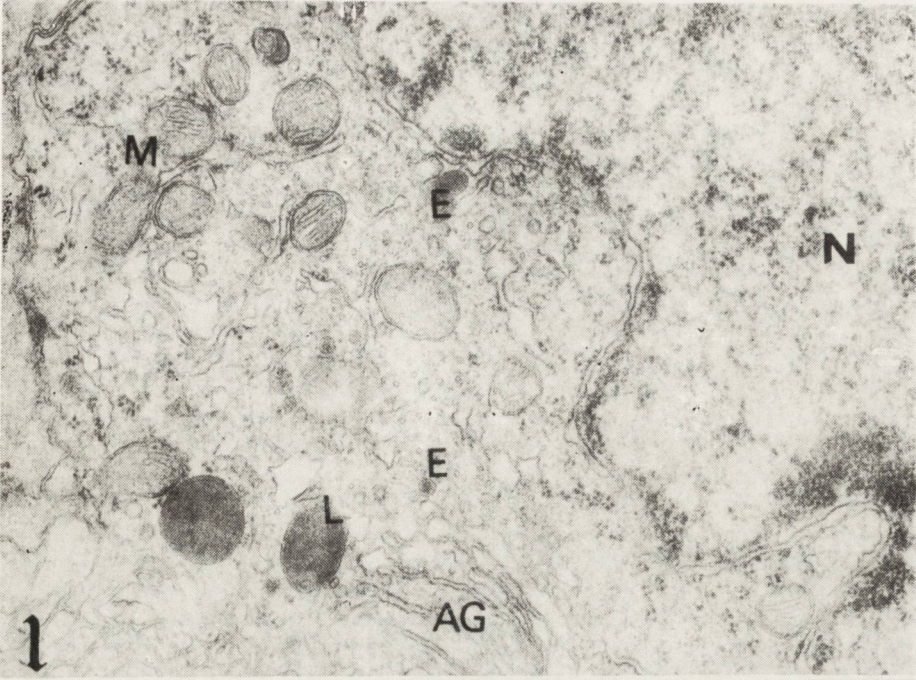
Fig. 2. Supraoptic nucleus 6 h after ACTH administration. Golgi apparatus dilated and optically empty. In its vicinity — coated vesicles and dense bodies. X 30.000.

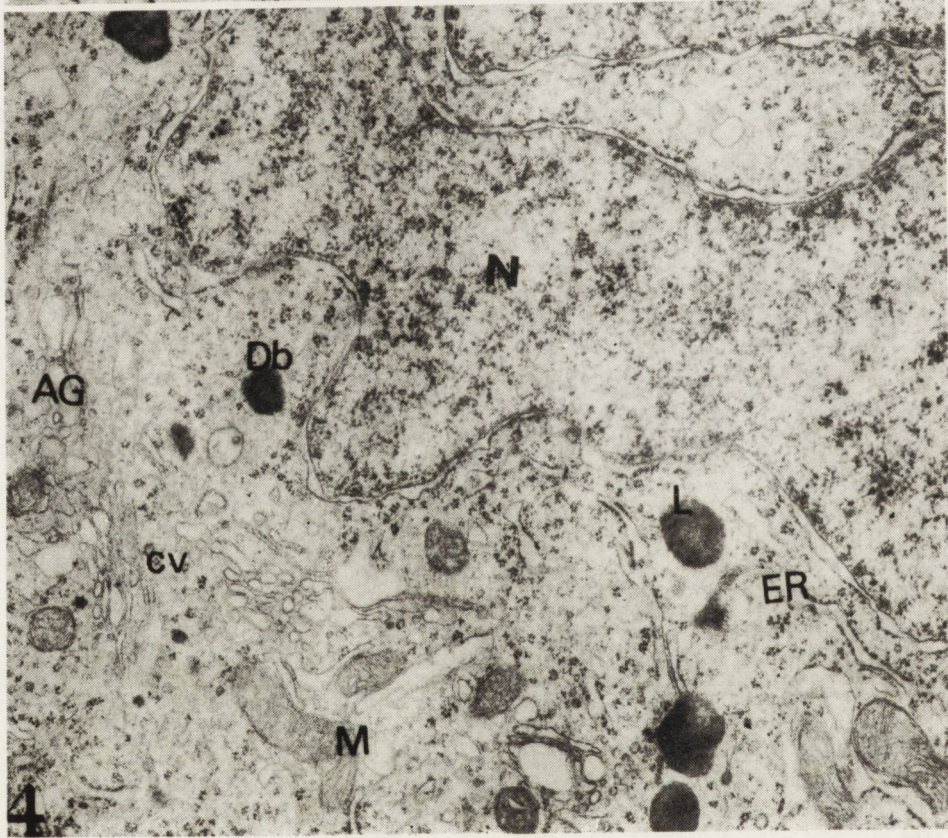
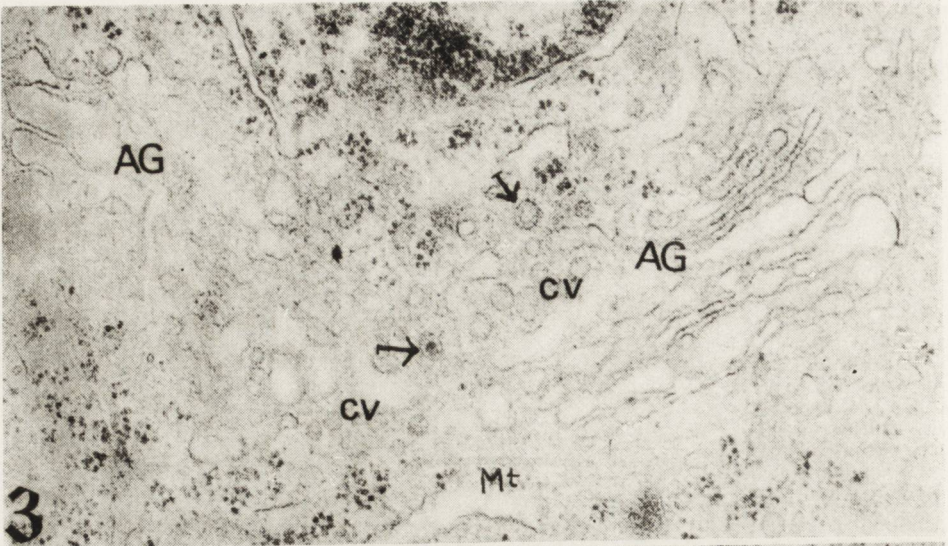
Ryc. 3. Jądro nadwzrokowe 12 godz. po podaniu ACTH. Aparat Golgiego dobrze rozwinięty, duża ilość „coated vesicles” i pęcherzyków przypominających „nieodjrzały” neurosekret (strzałki). W cytoplazmie widoczne mikrotubule i polirybosomy. Pow. 47.950 X.

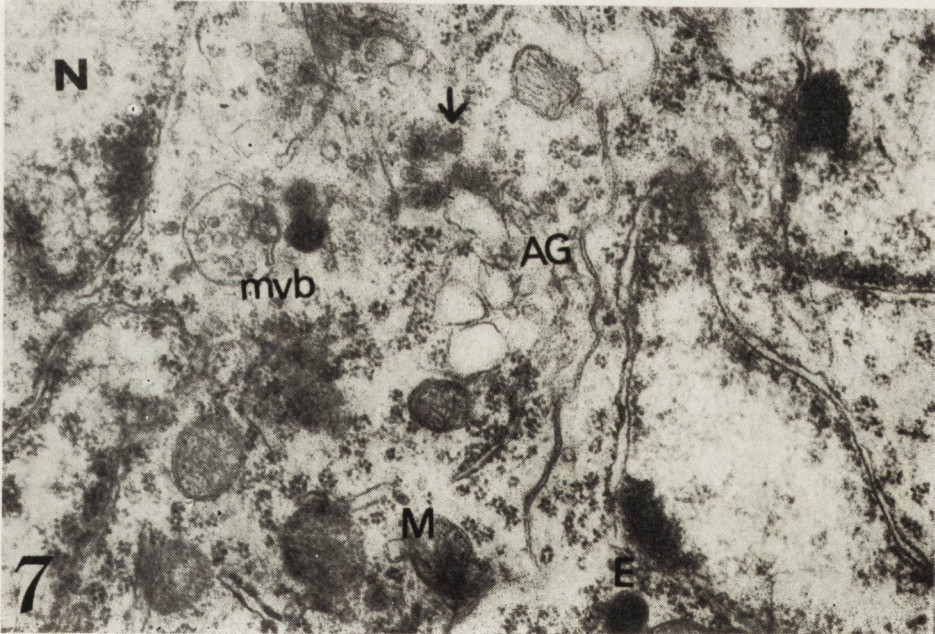
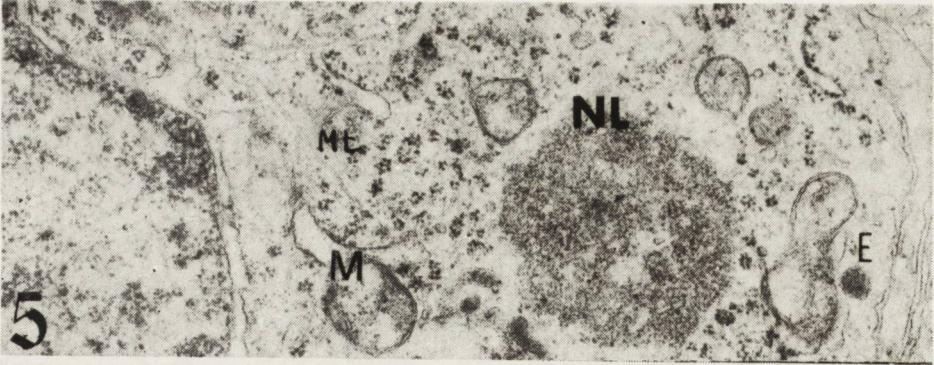
Fig. 3. Supraoptic nucleus 12 h after ACTH administration. Well developed Golgi apparatus, great number of „coated vesicles” and vesicles resembling „immature” neurosecret (arrows). In cytoplasm: microtubules and polyribosomes. X 47.950.

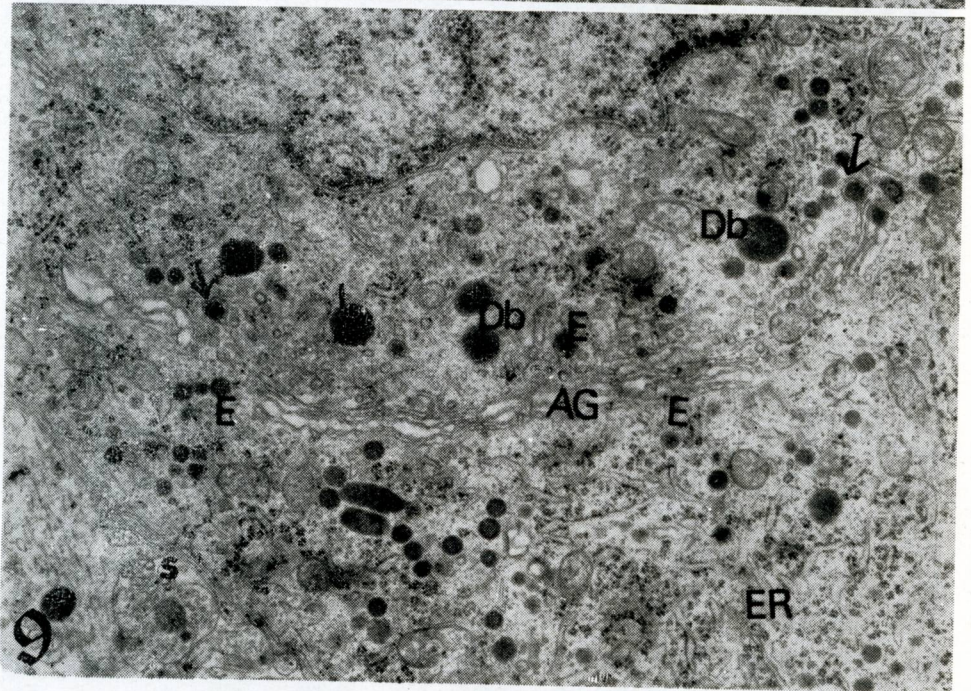
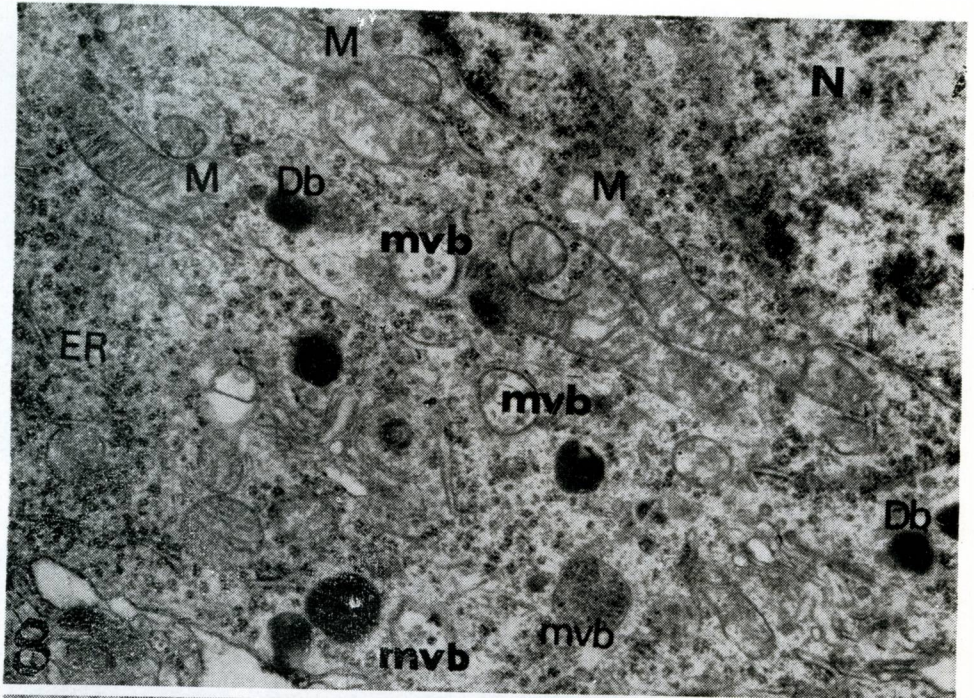
Ryc. 4. Jądro przykomorowe 1 godz. po podaniu ACTH. Jądro komórkowe z głębokimi inwaginacjami. Kanały aparatu Golgiego poszerzone i optycznie puste. W cytoplazmie liczne mitochondria i lizosomy. Pow. 18.000 X.

Fig. 4. Paraventricular nucleus 1 h after ACTH administration. Cell nucleus with deep invaginations. Channels of Golgi apparatus dilated and optically empty. In cytoplasm numerous mitochondria and lysosomes. X 18.000.









natomiast we włóknach aksonalnych zauważyć można gromadzące się ziarnistości neurosekcyjne (ryc. 6).

24 godziny po wstrzyknięciu ACTH, jądra neuronów wykazują jeszcze duże wgłobienia błony jądrowej. W okolicy aparatu Golgiego spostrzega się liczne pęcherzyki przypominające wielkością ziarnistości neurosekcyjne. Siateczka śródplazmatyczna szorstka i mitochondria nie wykazują odchyżeń od normy (ryc. 7). Zwraca jednak uwagę duża ilość różnych form lizosomów w cytoplazmie w postaci ciałek gęstych i ciał wielopęcherzykowych (ryc. 8). W niektórych neuronach obecne są także pojedyncze ciała jąderkopodobne.

48 godzin po wstrzyknięciu ACTH zwraca uwagę aparat Golgiego składający się z licznych wydłużonych cystern, wakuoli i pęcherzyków. W jego okolicy obserwuje się dużą ilość ziarnistości neurosekcyjnych, lizosomów (ryc. 9). Inne struktury znajdujące się w cytoplazmie nie wykazują większych odchyżeń od normy. W tym czasie spostrzega się także liczne ziarnistości neurosekcyjne we włóknach aksonalnych.

OMÓWIENIE

Praca miała na celu zbadanie ultrastruktury neuronów sekcyjnych jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza na modelu krótkotrwałej nadczynności nadnerczy. Nadczynność kory nadnerczy spowodowana podaniem ACTH wywołała stan zwany sprzężeniem zwrotnym

Ryc. 5. Jądro przykomorowe, 1 godz. po podaniu ACTH. W cytoplazmie kuliste nieobłonione skupisko ziarnistości, tzw. ciało jąderko-podobne. Pow. 27.800 X.

Fig. 5. Paraventricular nucleus 1 h after ACTH administration. In cytoplasm spherical uncoated accumulation of granules, so called nucleolus-like body. X 27.800.

Ryc. 6. Jądro przykomorowe, 6 godz. po podaniu ACTH. Przekrój włókna aksonalnego z licznymi ziarnistościami. Pow. 12.000 X.

Fig. 6. Paraventricular nucleus 6 h after ACTH administration. Cross-section of axon with numerous granules. X 12.000.

Ryc. 7. Jądro przykomorowe, 24 godz. po podaniu ACTH. Fragmenty jąder komórkowych z głębokimi inwaginacjami w dwu sąsiadujących ze sobą komórkach. W jednej z nich widoczne ziarnistości neurosekcyjne (strzałka). Pow. 30.000 X.

Fig. 7. Paraventricular nucleus 24 h after ACTH administration. Fragments of cell nuclei with deep invaginations in two neighbour cells. One of them contains neurosecretory granules (arrow). X 30.000.

Ryc. 8. Jądro przykomorowe, 24 godz. po podaniu ACTH. W cytoplazmie widoczna duża ilość ciał wielopęcherzykowych, ciałek gęstych i wydłużone mitochondria. Pow. 23.700 X.

Fig. 8. Paraventricular nucleus 24 h after ACTH administration. In cytoplasm numerous multivesicular bodies, dense bodies and extended mitochondria. X 23.700.

Ryc. 9. Jądro przykomorowe, 48 godz. po podaniu ACTH. Aparat Golgiego dobrze rozwinięty. „Odsznurowujący się” neurosekret (strzałki). Widoczna duża ilość ziarnistości neurosekcyjnych, ciałek gęstych i lizosomów. Pow. 46.200 X

Fig. 9. Paraventricular nucleus 48 h after ACTH administration. Well developed Golgi apparatus. „Unlacing” neurosecret (arrow) Numerous neurosecretory granules, dense bodies and lysosomes. X 46.200.

krótkim, lub wewnętrznym, polegający na hamującym działaniu hormonów przysadki na wydzielanie przez podwzgórze tzw. czynników uwalniających, głównie czynnika uwalniającego kortikotropinę (CRF). Szczyt działania farmakologicznego ACTH podanego podskórnie występuje 1 godzinę po wstrzyknięciu (Borowicz 1965). W tym okresie czasu powinno występować największe zahamowanie produkcji i wydzielania CRF w jądrach sekrecyjnych podwzgórza. Należało się więc spodziewać większego nagromadzenia w aksonach szlaku podwzgórzowo-przysadkowego niewydzielonych ziarnistości neurosekrecyjnych, które uważane są za nośniki nie tylko wazopresyny i oksytocyny, lecz także podwzgórzowych czynników uwalniających (Martini 1967, Pawlikowski 1967, Miętkiewski i Miśkowiak 1970, Vandesande i wsp. 1974). W badaniach mikroskopowo-elektronowych jądra nadwzrokowego i przykomorowego obserwowałam zmiany zarówno w obrębie perikarionów jak i wypustek aksonalnych neuronów tych jąder. Zmiany morfologiczne były bardziej nasilone w neuronach jądra przykomorowego niż jądra nadwzrokowego. Nie ograniczały się one tylko do okresu szczytu działania podanego ACTH, lecz utrzymywały się przez okres całej doby po wstrzyknięciu hormonu. Dopiero u szczurów badanych po 48 godzinach obrazy mikroskopowo-elektronowe neuronów jądra nadwzrokowego były podobne do obrazów neuronów oglądanych u zwierząt kontrolnych. W neuronach jądra przykomorowego zmiany utrzymywały się dłużej.

W obrębie perikarionu największe zmiany dotyczyły aparatu Golgiego, który ma podstawowe znaczenie dla syntezy substancji neurohormonalnej w komórce. Po pierwszej godzinie po podaniu ACTH aparat Golgiego nie wykazywał morfologicznych cech czynności, był słabo rozwinięty, o nielicznych pustych pęcherzykach, a w jego okolicy prawie nie spotykano ziarnistości neurosekrecyjnych. W późniejszych okresach czasu po podaniu ACTH, w okolicy aparatu Golgiego można było spotkać ciała wielopęcherzykowe i większą ilość lizosomów. Interpretacja tych zmian nie jest łatwa. Opierając się na badaniach Novikoffa (1967) oraz Picarda i wsp. (1972), można przypuszczać, że w wyniku zmniejszonej, czy też zwolnionej produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych spowodowanej nadczynnością kory nadnerczy, neurony jądra przykomorowego mogą przestawić się na produkcję lizosomów uczynniając tzw. stronę „dojrzewania” aparatu Golgiego. Znacznie większe niż w normie nagromadzenie ziarnistości neurosekrecyjnych obserwowałam we włóknach aksonalnych, począwszy od pierwszej godziny po wstrzyknięciu ACTH. Sugeruje to, że równocześnie ze zmniejszeniem syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych w perikarionie komórki, występuje również zwolniony przepływ wzdłuż aksonów. Podobnie interpretują wyniki swoich badań Holmes (1964), Reinhardt i wsp. (1969) oraz Boudier i wsp. (1970).

Z przeprowadzonych badań wynika, że podanie ACTH powoduje zmniejszenie syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych w obrębie perikarionu oraz gromadzenie się ich w aksonach szlaku podwzgórzowo-przysadkowego. Proces ten wydaje się bardziej zaznaczony w neuronach jądra przykomorowego niż w neuronach jądra nadwzrokowego. Jednorazowe podanie ACTH wywołało stan krótkotrwałej nadczynności nadnerczy powodując również zahamowanie wydzielania przez podwzgórzowe wielkomórkowe jądra tzw. czynników uwalniających, a głównie czynnika uwalniającego kortikotropinę.

WNIOSKI

1. Jednorazowe podskórne podanie ACTH prowadzi do powstania zmian w strukturze neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego.
2. Jednorazowe podanie ACTH powoduje zmniejszenie syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych.
3. Zasadniczym elementem struktury cytoplazmy ulegającym wyraźnym zmianom jest aparat Golgiego biorący udział w syntezie ziarnistości neurosekrecyjnych.
4. Wyraźniej zaznaczone i wcześniej obserwowane zmiany w ultrastrukturze neuronów jądra przykomorowego sugerują, że jądro przykomorowe ma większe znaczenie dla regulacji wydzielania ACTH.

Б. Гайковска

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СУПРАОПТИЧЕСКОМ И ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОМ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОДАЧИ АКТГ

Резюме

Были исследованы изменения в ультраструктуре супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса крысы при гиперфункции надпочечников. Гиперфункцию надпочечников вызывали одноразовым введением подкожно 1,0 мг АКТГ.

При гиперфункции надпочечников наблюдались легкие изменения в ультраструктуре нейронов паравентрикулярного ядра. Введение АКТГ снижало или приостанавливало синтез нейросекреторной зернистости в клетке, а также изменения в картине аппарата Гольджи. Изменения аппарата Гольджи указывали на активирование его поверхности „созревания”. Наблюдаемые в некоторых аксоновых волокнах накопления нейросекреторной зернистости возникали в результате их замедленного выделения. Те же изменения в супраоптическом ядре были значительно слабее выражены. Большие чем в нейронах супраоптического ядра изменения в ультраструктуре нейронов паравентрикулярного ядра, вероятно, указывают на то, что паравентрикулярное ядро играет более важную роль в регуляции выделения АКТГ.

B. Gajkowska

ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES IN SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI OF RAT BRAIN HYPOTHALAMUS FOLLOWING ACTH ADMINISTRATION

Summary

The study deals with the ultrastructural changes in supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus in adrenal hyperfunction induced by one-time subcutaneous administration of 0.1 i. u. of ACTH.

Adrenal hyperfunction was demonstrated to produce marked changes in the ultrastructure of neurons of paraventricular nucleus. Administration of ACTH probably caused a decrease of the rate or complete inhibition of the synthesis of neurosecretory granules and changes in the structure of Golgi apparatus. Changes within Golgi apparatus are indicative of activation of its „maturation” surface. Accumulation in a number of axons of neurosecretory granules resulted from their inhibited secretion. Changes in the neurons of supraoptic nucleus were much less pronounced, which may indicate the more important role of paraventricular nucleus in the regulation of ACTH secretion.

PIŚMIENICTWO

1. Bock R., Forstner R., Aus der Mühlen K., Stöhr PH. A.: Beiträge zur funktionellen Morphologie der Neurohypophyse. III Über die Wirkung einer Corticoid-oder ACTH-Behandlung auf das Auftreten „Gomoripositiver” Granula in der Zona externa infundibuli von Ratten und Mäusen nach beidseitiger Adrenalektomie oder Hypophysektomie. *Z. Zellforsch.* 1963, 96, 142—150.
2. Bock R., Goslar H.: Enzymhistochemische Untersuchungen an Infundibulum und Hypophysenhinterlappen der normalen und beidseitig adrenaletomierten Ratte. *Z. Zellforsch.* 1969, 95, 415—420.
3. Borowicz J. W.: Some ultrastructural changes in adrenal cortical cells of rat hypophysectomy and following ACTH administration. *Beitr. path. Anat.* 1965, 132, 4, 441—468.
4. Boudier I. L., Boudier J. A., Picard D.: Ultrastructure du lobe postérieur de l'hypophyse du rat et ses modifications au cours de l'excretion de vasopressine. *Z. Zellforsch.* 1970, 108, 357—380.
5. Cannata M. A., Morris J. F.: Changes in the appearance of hypothalamo-neurohypophysial neurosecretory granules associated with their maturation. *J. Endocrinol.* 1973, 57, 531—538.
6. Flamant-Durand J., Dustin P.: Studies on the transport of secretory granules in magnocellular hypothalamic neurons. *Z. Zellforsch.* 1972, 130, 440—454.
7. Holmes R. L.: Comparative observations on inclusions in nerve fibers of mammalian neurohypophysis. *Z. Zellforsch.* 1964, 474—492.
8. Martini L., Fraschini F., Motta M.: Schering Symposium on Endocrinology. Perg. Press. Oxford 1967.
9. Miętkiewski K., Miśkowiak W.: Wybrane zagadnienia z histochemii układu sekcyjnego podwzgórzowo-przysadkowego. Ośrodkowa Kontrola Przysadki. Łódź 1970.
10. Norström A., Hansson H. A.: Effect of colchicine on release of neurosecretory material from the posterior pituitary gland of the rat. *Z. Zellforsch.* 1973, 142, 443—463.

11. Novikoff A. B.: Enzyme localization with Wachstein-Meisel procedures: real or artifact. *J. Histochem. Cytochem.* 1967, 15, 353—354.
12. Pawlikowski M.: Czynność neurosekcyjna jąder nadwzrokowych i przykomorowych w przebiegu regeneracji nadnerczy. *Endokrynol. Polska* 1967, 18, 353.
13. Picard D., Michel-Bechet M., Athouël A. M., Rua S.: Granules neurosécrétoires, lysosomes et complexe GRL dans le noyau supra-optique du rat. Bipolarité de complexes Golgiens. *Exp. Brain Research* 1972, 14, 331—353.
14. Reinhard H. P., Henning L. Ch., Rohr K. P.: Morphometrisch ultrastrukturelle Untersuchungen der Hypophysen Hinterlappen der Ratte nach Dehydration. *Z. Zellforsch.* 1969, 162, 182—192.
15. Stör P. A.: Über quantitative Veränderungen Gomoripositiver Substanzen in Infundibulum und Hypophysenhinterlappen der Ratte nach beidseitiger Adrenalectomie. *Z. Zellforsch.* 1967, 94, 425—433.
16. Shimizu N., Ishii S.: Electron microscopic observation on the nucleolar extrusion in nerve cells of rat hypothalamus. *Z. Zellforsch.* 1965, 67, 367—372.
17. Vandesande F. J., De Mey, Dierickx K.: Identification of neurophysin producing cells. *Cell Tiss. Res.* 1974, 151, 187—200.

Adres autorki: Pracownia Mikroskopii Elektronowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniu 21.III.1975 r. odbyło się Walne Zgromadzenie Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich.

W wyniku wyborów do Zarządu Głównego weszli następujący koledzy: M. J. Mossakowski (przewodniczący), M. Wender (vice-przewodniczący), M. Smiałek (sekretarz), T. Majdecki (skarbnik), J. Kulczycki i J. Dymecki (członkowie Zarządu) oraz I. Zelman (naczelný redaktor Neuropatologii Polskiej).

Do Komisji Rewizyjnej wybrano kol. M. Dąmską, kol. J. Kałużę i kol. J. Alwasiaka.

* * *

W wyniku długotrwałych starań Zarządu Głównego SNP neuropatologia została podniesiona do rangi odrębnej podspecjalności. Szczegółowy program specjalizacji został opublikowany w broszurce „Programy specjalizacji” wydanej w r. 1973 przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego (str. 174). Program ten przewiduje, że o dopuszczenie do egzaminu z neuropatologii mogą ubiegać się osoby, które posiadają II^o specjalizacji z zakresu neurologii lub anatomii patologicznej oraz co najmniej 3-letni staż w pracowni neuropatologicznej; staż ten może być odbywany równocześnie ze stażem na II^o specjalizacji z neurologii lub anatomii patologicznej.

Pomimo usilnych starań Zarządu Głównego SNP nie udało się uzyskać zgody Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej na nadanie praw specjalistów doświadczonym neuropatologom o wieloletnim stażu, na zasadzie weryfikacji, analogicznie jak dokonało tego MZiOS w stosunku do samodzielnych pracowników nauki, którzy habilitowali się z neuropatologii.

Uzyskano jedynie zgodę na kwalifikowanie do egzaminu w drodze wyjątku kolegów, którzy nie posiadają wymaganego przepisami II^o specjalizacji z zakresu neurologii lub anatomii patologicznej, ale legitymują się długoletnim stażem z zakresu neuropatologii oraz I^o specjalizacji z wymienionych dyscyplin.

* * *

W wyniku pierwszego egzaminu tytuły specjalistów w zakresie neuropatologii uzyskały kol. Borowska-Lehman z Gdańska i kol. Z. Stocka-Muszyńska z Lublina.

W dniu 14 maja 1975 odbył się kolejny egzamin, który zdali pomyślnie następujący koledzy: J. Alwasiak z Łodzi, L. Iwanowski z Warszawy, A. Jędrzejewska-Iwanowska z Warszawy, B. Kurowska-Hoppe z Warszawy, S. Kasperek z Katowic, T. Majdecki z Warszawy, D. Markiewiczowa z Warszawy, W. Papierz z Łodzi, J. Rafałowska z Warszawy i E. Tarnowska-Dziduszko z Warszawy.

dok. na str. 40

ZUZANNA KRAŚNICKA, BARBARA GAJKOWSKA
MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI

EFFECT OF SHORT-LASTING ANOXIA ON *IN VITRO* CULTURE
OF CEREBELLUM

Department of Neuropathology, Medical Research Centre of Polish Academy
of Sciences

Head: Prof. M. J. Mossakowski, M. D., Ph. D.

Laboratory of Electron Microscopy, Medical Research Centre of Polish Academy
of Sciences

Head: Assoc. prof. J. W. Borowicz, M. D., Ph. D.

Morphological evaluation of the lesions of various structural elements of the nerve tissue caused by oxygen deprivation in *in vivo* conditions is difficult, owing to overlapping influences of various systemic and local factors, which accompany anoxia or result from it. The tissue culture conditions, despite their obvious limitations, resulting from methodological problems create a convenient experimental model for studying the effects of „pure” anoxia.

In our previous studies (Kraśnicka et al., 1974) the influence of short-lasting, transient anoxia on the cellular elements of the peripheral nervous system were investigated in detail. It seemed interesting to compare those results with observations concerning the effects of the same type of anoxia on cellular elements originating from the tissues of the central nervous system.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out on *in vitro* cultures of nerve tissue from cerebellum of newborn rats (Kraśnicka, Mossakowski, 1965).

Selected cultures 2, 3 and 4 week-old were kept for a period of 30 min in an atmosphere of 100 per cent nitrogen. The detailed description of nitrogen administration was given in a previous paper of Kraśnicka et al. (1974). Following anoxia cultures were kept in standard conditions for 1, 3 and 5 days and then elaborated technically for both light- and electron-microscopic examination.

For light-microscopic examination histological (Nissl and Bodian) and histochemical (Sudan black B, PAS and PAS-dimedon) techniques were used. In addition histoenzymatic reactions, revealing activities of UDPG-glycogen transferase, glycogen-phosphorylase a, lactic-, succinate-, and glucose-6-phosphate dehydrogenases were performed.

Cultures for electron-microscopic examination were prepared according to the technique described by Borowicz and Kraśnicka (1971). Ultrathin sections counterstained with uranyl acetate and lead citrate were examined in a JEM 7A electron microscope. Pictures were taken on ORWO EU 2 plates at an accelerating voltage of 80 KV.

Control material consisted of cultures of the same age as the experimental ones, kept in standard conditions for the whole period of their life.

RESULTS

Light microscopic studies

Two-week-old cultures

Obvious morphological abnormalities were noted as early as 24 hours following anoxia. They differed in their intensity depending on the type of cells and their location in the culture. Among the neuronal population the most advanced changes concerned Purkinje cells (Fig. 1). Their cytoplasm in Nissl staining was swollen and very often contained a number of small vacuoles. Tigrolysis was a very common feature in a great number of Purkinje cells. On the contrary, the granular neurons were much better preserved and the majority contained distinct tigroid granules distributed concentrically under the cell membrane. In Bodian's impregnation an abundant dense network of nerve fibres was visible (Fig. 2). No abnormalities in their morphological picture were noted. In some of the Purkinje cells intracytoplasmic neurofibrils, normal in their appearance were present. Sudan black B staining revealed significant damage to myelin sheaths. Granules of sudanophilic material varying in size and shape as well as larger „myelin halls” were irregularly distributed along the nerve fibres (Fig. 3).

The glial cells within the explanted tissue showed moderate enlargement of their cytoplasm, its swelling and pallor. In some glial cells small intracytoplasmic vacuoles were present. The most intensive changes concerned large glial cells situated in close vicinity of the Purkinje cells: they seemed to correspond to Pergman's glia. The morphological abnormalities in the glial population from the outgrowth zone were much more advanced, although their morphological pattern was essentially the same as in the glia localized within explanted tissue. The pathological

changes consisted in considerable swelling and pallor of cellular cytoplasm, its vacuolar degeneration and generalized fragmentation of cell processes. The glial nuclei were also enlarged and stained poorly with thionine. The above presented morphological abnormalities concerning both neuronal and glial populations, as well as myelin sheaths persisted during the whole observation period, that is till the 5th day following anoxia.

Throughout the entire period of observation the content of PAS-positive granular substances in all cellular elements of the cultures was greatly increased as compared with normal conditions. This being most pronounced in large astrocytes from the outgrowth zone. Granular glycogen deposits in neurons, mostly Purkinje cells, were present already 24 hours after the anoxic episode. On the 3rd and 5th days following anoxia the amount of glycogen granules in neurons decrease progressively. On the contrary, in glial cells intensive glycogen deposition was present during the whole observation period, although the polysaccharide material was accumulated only in some glial cells, mostly astrocytes, of both explanted tissue and the outgrowth zone.

The activity of glycogen-metabolizing enzymes was significantly higher in cultures submitted to anoxia than in the control ones. High activity of both glycogen phosphorylase a and UDPG-glycogen transferase persisted from the first till the last day of observation. Neurons manifested higher activity than oligodendrocytes and astrocytes situated within the explanted tissue. Glial cells in the outgrowth zone exhibited lower activity of both enzymes than the cellular population of the explant, however, this activity was much more intensive than in the corresponding cells in normal control cultures.

The nerve cells from the experimental cultures exhibited relatively high activity of all dehydrogenases under study, except succinic dehydrogenase, the activity of which was slightly reduced, mostly in Purkinje cells (Fig. 4) The activity of all oxidative-reducing enzymes in glial cells from the explanted tissue was lower than in neurons, however, it was better preserved than in astrocytes and oligodendrocytes present within the outgrowth zone.

Three- and four-week-old cultures

Older cultures showed less intensive morphological changes as compared with 2 week-old ones. The appearance of nerve cells in cultures stained by Nissl's and Bodian's methods did not essentially differ from the normal picture. Only in some Purkinje cells there was a slight decrease of Nissl's substance content at the 24th hour following anoxia. In

the 3rd and 5th day after anoxia even these changes became less evident. However, in cultures stained with Sudan black B severe myelin damage of various degree was observed; this involved almost all myelinated nerve fibres, except a few fibres with preserved normal myelin sheaths. Nerve cells still contained great amounts of PAS-positive substances. Glycogen accumulation in the nerve cell cytoplasm was less than in 2 week-old cultures, but significantly greater as compared with normal control cultures of appropriate age (Fig. 5). So was the activity of glycogen-metabolizing enzymes. The activity of oxidative-reducing enzymes seemed to be comparable with that observed in neurons from the control cultures (Fig. 6). Only succinic dehydrogenase activity was slightly weaker.

Oligodendrocytes and astrocytes situated within the explanted tissue also revealed less advanced morphological changes as compared with those from 2-week-old cultures. Only some large astrocytes from the direct vicinity of Purkinje cells were swollen, whereas the remaining glial population of the explant did not differ significantly from that from the control cultures. On the other hand, in the cultures stained with Sudan black B a great proportion of glial cells, mostly oligodendrocytes, contained in their cytoplasm numerous small sudanophilic granules. PAS-positive substances filled the cytoplasm of a great number of glial cells, while glycogen granules were present in perikarya and processes of only some astrocytes and oligodendrocytes. Glycogen metabolizing enzymes activity was higher than in normal glial population from the control cultures. The activity of oxidative-reducing enzymes was lower than in nerve cells, and only slightly reduced as compared with that of normal glial cells in tissue cultures.

The morphological and histochemical abnormalities of the same type involved also the glial population within the outgrowth zone, but here they were more advanced than within the explanted tissue. Generally, the pathological changes were more pronounced in cultures examined on the first day following anoxia than in later stages of the postanoxic period, with the exception of glycogen accumulation which increased in later phases of observation.

Electron-microscopic studies

Two-week-old cultures

On the first day following anoxia the pathological changes were found in all cellular elements of the cultures. In Purkinje cells, characterized by large nuclei with typical deep invaginations (Fig. 7), the amount of rough endoplasmic reticulum was distinctly reduced as compared with

their normal electron-microscopic picture. The canals of rough endoplasmic reticulum did not form any more the characteristic parallel systems. RER consisted of short fragments covered with scanty ribosomes. The number of polyribosomes was greatly reduced. Golgi apparatus was swollen and its canals and cisterns were usually distinctly dilated. Some of numerous round, oval or elongated mitochondria were swollen and contained pale matrix and shortened cristae. In peripheral areas of Purkinje cells cytoplasm numerous, irregularly distributed neurofilaments and neurotubules were present. In the cytoplasm of some Purkinje cells glycogen particles were seen.

The neurons of the cerebellar granular layer (Fig. 8) showed much less advanced pathological changes than the Purkinje cells. The rough endoplasmic reticulum of granular cells was very well developed, forming parallel systems typical for nerve cells. Slight abnormalities in the ultrastructure of the Golgi apparatus were observed, they consisted in widening of some of its canals and cisterns. Numerous mitochondria were characterized by dark matrix.

Some myelinated axons were swollen and contained scanty glycogen particles. Significant pathological changes were noted in the structure of all myelin sheaths present within the cultures (Fig. 8). Myelin laminae were split from each other at various depths of the myelin sheaths. In some places, on the contrary, they coalesced. In many fibres the laminar structure of the myelin sheaths become entirely obliterated.

Significant abnormalities were seen in the ultrastructure of the perikarya and processes of astrocytes (Figs 7, 8, 9). The pathological changes consisted of swelling of the cellular cytoplasm, decrease of rough endoplasmic reticulum, reduction of mitochondria and widening of the canals and cisterns of the Golgi apparatus. All these changes led to a watery appearance of the astrocytic cytoplasm. Almost all astrocytes showed a distinctly increased number of gliofibrils and various amounts of glycogen rosettes as well in the perikarya as in the processes (Fig 7, 9).

The most prominent changes of oligodendrocytes consisted in the presence of numerous lysosome-like structures and other structures of various size and electron density (Fig. 9) in their cytoplasm. Remarkable dilatation of Golgi apparatus canals and cisterns was a very common feature, whereas mitochondria and other subcellular organelles seemed to be unchanged. Noteworthy was the great amount of glycogen rosettes in the cytoplasm of oligodendrocytes (Fig. 10).

Three and five days following anoxia pathological changes similar to those described in the 24th hour of the postanoxic period were noted. On the 5th day after anoxia rough endoplasmic reticulum in Purkinje cells was less changed.

Three- and four-week-old cultures

In all cellular elements from older cultures the ultrastructural abnormalities were less intensive as compared with those described in 2-week-old cultures. Granular cells did not show any distinct abnormalities. Rough endoplasmic reticulum and mitochondria were well preserved and not damaged. Only in some Purkinje cells dilatation of canals and cisterns of the Golgi apparatus was noted (Figs 11, 12), with slight reduction of rough endoplasmic reticulum and free polyribosomes. Numerous myelinated axons were swollen, and characterized by watery appearance, reduction of subcellular organelles and slight swelling of their mitochondria (Fig. 12). Other axons apparently not damaged contained various amounts of glycogen particles (Fig. 13). Myelin sheaths showed

Fig. 1. Two-week-old culture, 3 days after anoxia. Purkinje cell with complete tigrolysis. Granular cells well preserved. Swollen glia around Purkinje cell. Toluidine blue. $\times 200$.

Ryc. 1. Hodowla 2-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Komórka Purkiniego z całkowitą tigrólizą. Komórki ziarniste dobrze zachowane. Wokół komórki Purkiniego obrzmiały glej. Błękit toluidyny. Pow. $200 \times$.

Fig. 2. Three-week-old culture, 3 days after anoxia. Nerve cells with well stained processes. Bodian's meth. $\times 400$.

Ryc. 2. Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Komórki nerwowe z wypustkami dobrze wyimpregnowanymi. Met. Bodian. Pow. $400 \times$.

Fig. 3. Four-week-old culture, 3 days after anoxia. Prominent damage of myelin sheaths. Sudan black B. $\times 400$.

Ryc. 3. Hodowla 4-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Znaczne uszkodzenie osłonek mielinowych. Sudan czarny B. Pow. $400 \times$.

Fig. 4. Two-week-old culture, 3 days after anoxia. Succinic dehydrogenase. Low enzyme activity in glial cells, better maintained in neurocytes. $\times 200$.

Ryc. 4. Hodowla 2-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Dehydrogenaza bursztynianowa. Aktywność enzymatyczna mniejsza w komórkach glejowych, lepiej zachowana w neurocytach. Pow. $200 \times$.

Fig. 5. Three-week-old culture, 3 days after anoxia. Glycogen transferase. High activity of the enzyme in neurocytes, lower in glia. $\times 400$.

Ryc. 5. Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Transferaza glikogenowa. Wysoka aktywność enzymatyczna w neurocytach, mniejsza w gleju. Pow. $400 \times$.

Fig. 6. Three-week-old culture, 3 days after anoxia. Lactic dehydrogenase. Enzyme activity close to the norm. $\times 200$.

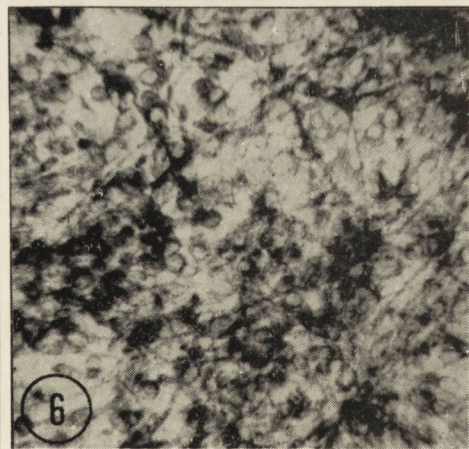
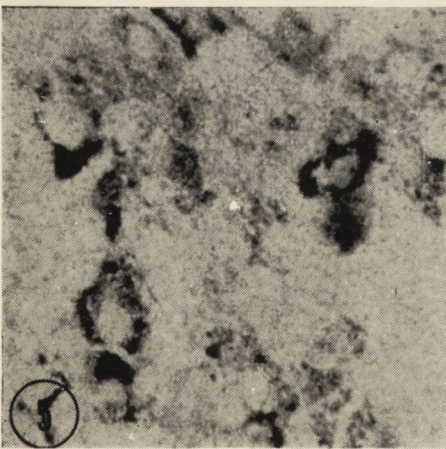
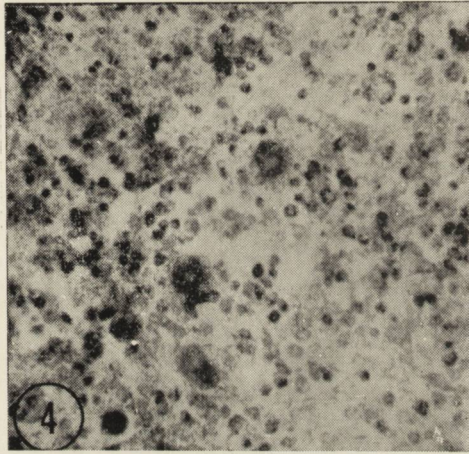
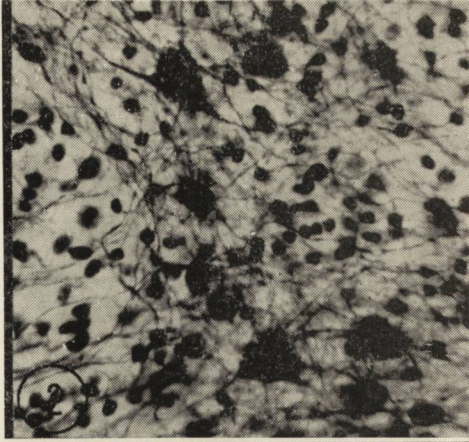
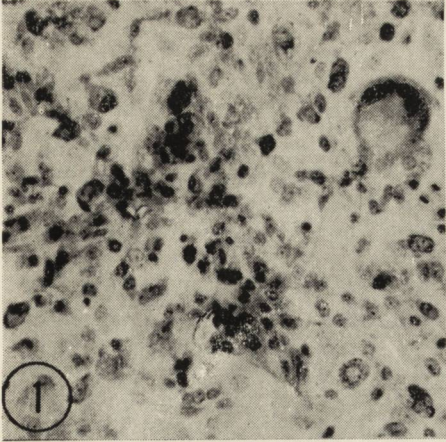
Ryc. 6. Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Dehydrogenaza mleczanowa. Aktywność zbliżona do normy. Pow. $200 \times$.

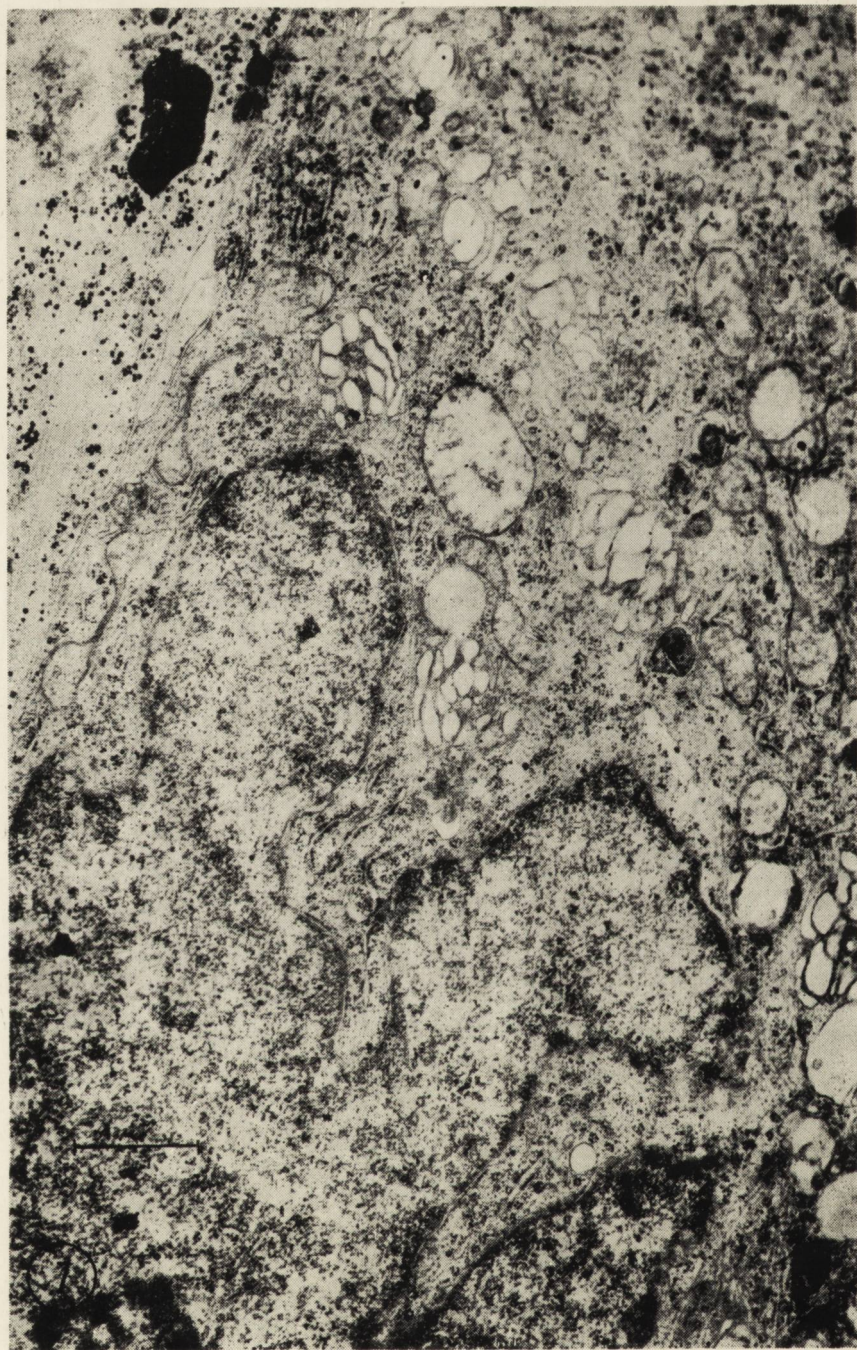
Fig. 7. Two-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragment of Purkinje cell. Nucleus with deep invaginations. Well developed Golgi apparatus with dilated canals, some mitochondria are swollen. Rough endoplasmic reticulum fragmented. Fragment of astrocyte with numerous glycogen granules.

Ryc. 7. Hodowla 2-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki Purkiniego. Jądro z głębokimi inwaginacjami. Rozbudowany aparat Golgiego z poszerzonymi kanałami, niektóre mitochondria obrzmiały. Siatka śródplazmatyczna szorstka zbudowana z krótkich odcinków. Powyżej fragment astrocyta z licznymi ziarnami glikogenu.

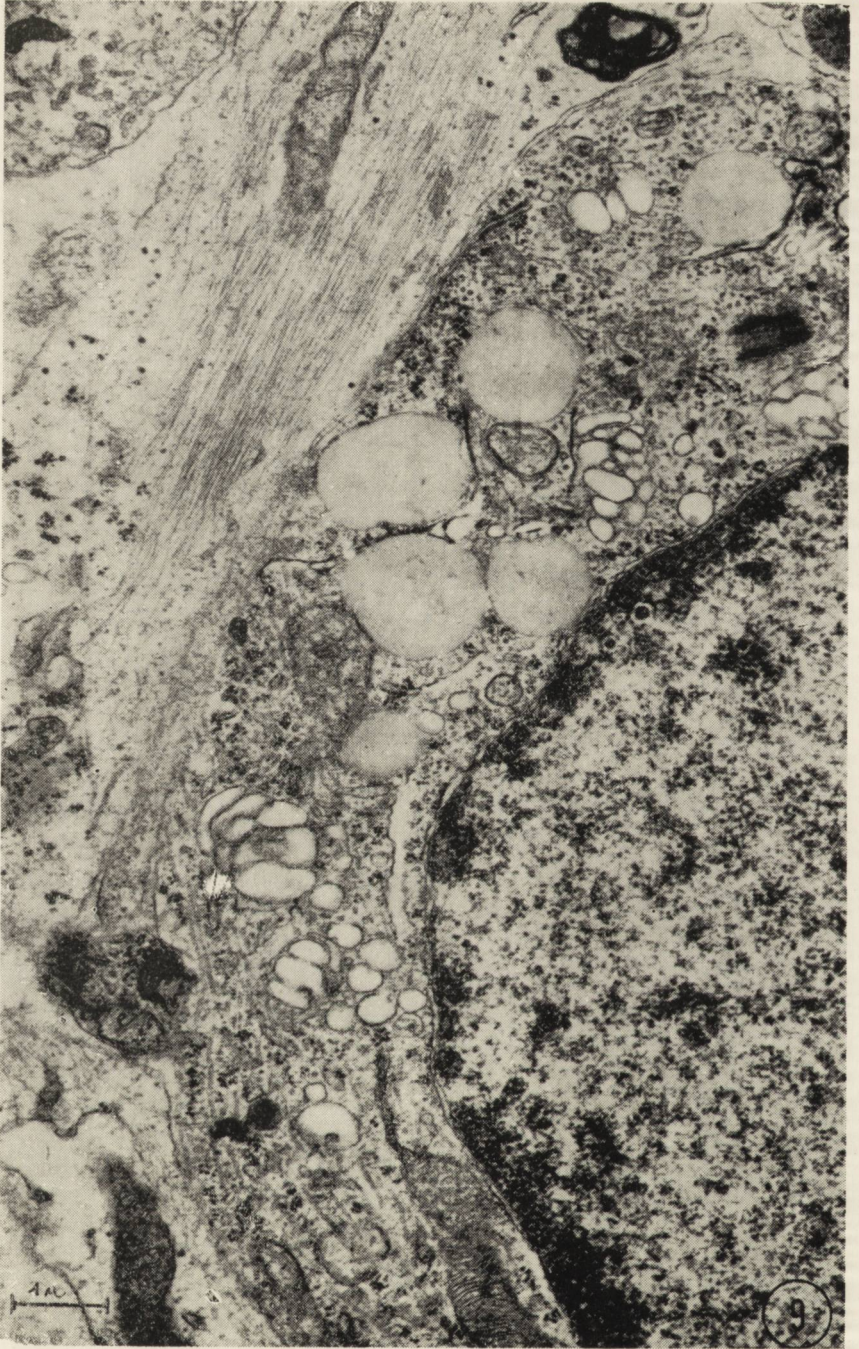
Fig. 8. Two-week-old culture, 1 day after anoxia. Fragment of granular cell with slightly dilated canals of the Golgi apparatus. Fragments of glial cells and numerous myelinated fibers displaying various degree of damage

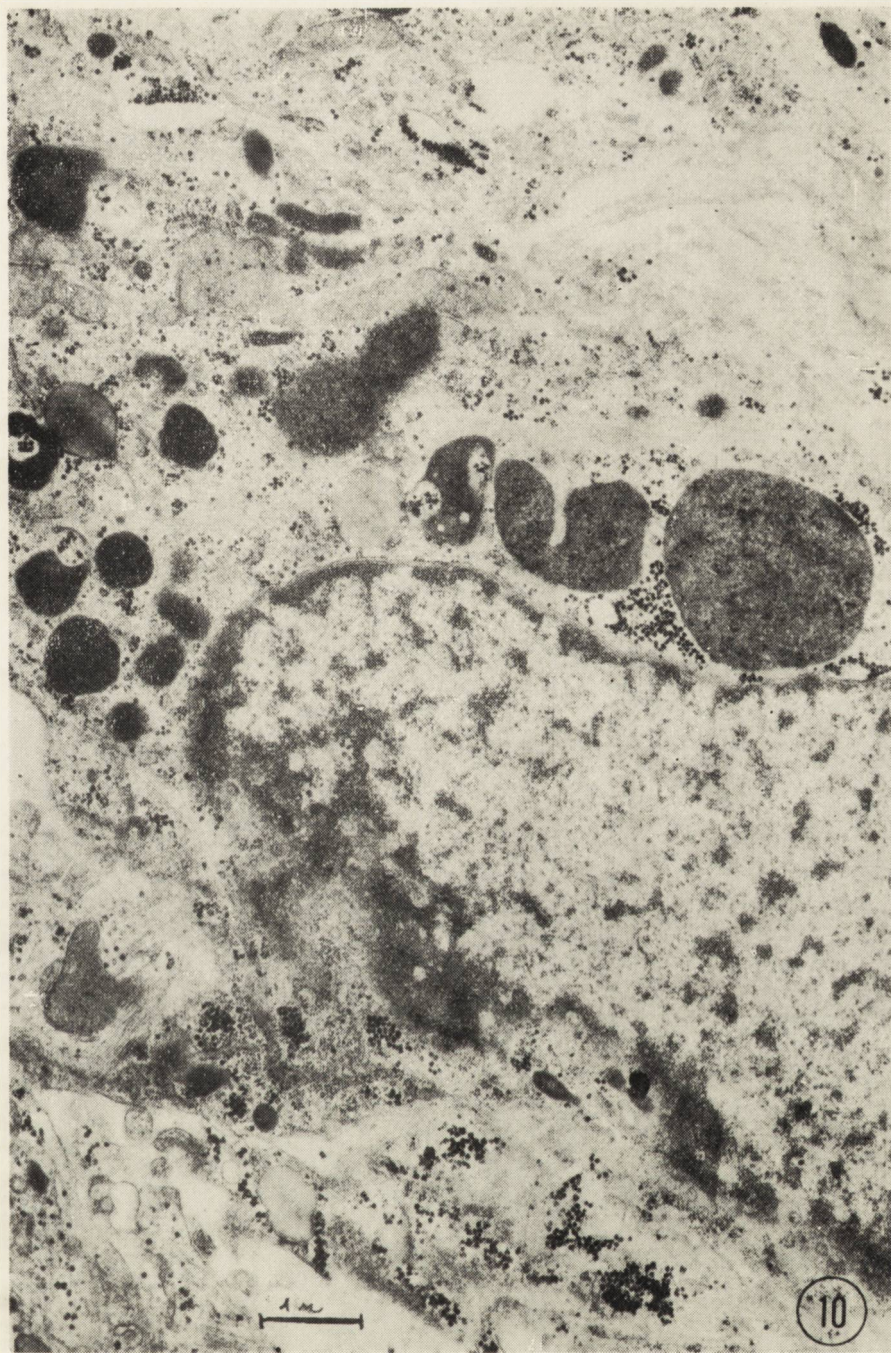
Ryc. 8. Hodowla 2-tygodniowa, 1 dzień po niedotlenieniu. Fragment komórki ziarnistej z nieznacznie poszerzonymi kanałami aparatu Golgiego. Obok fragmenty komórek glejowych i liczne zmielinizowane włókna o różnym stopniu uszkodzenia.

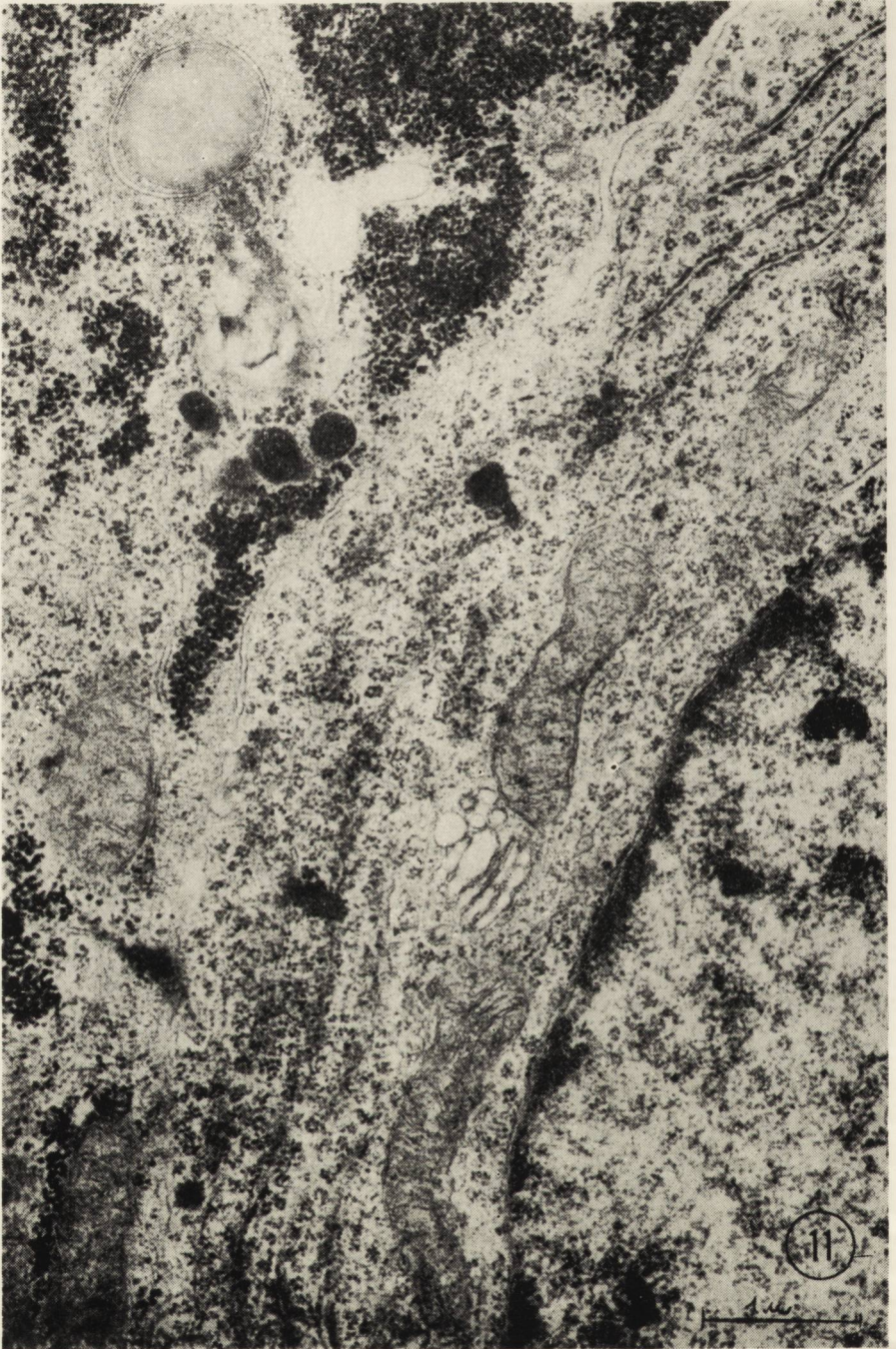




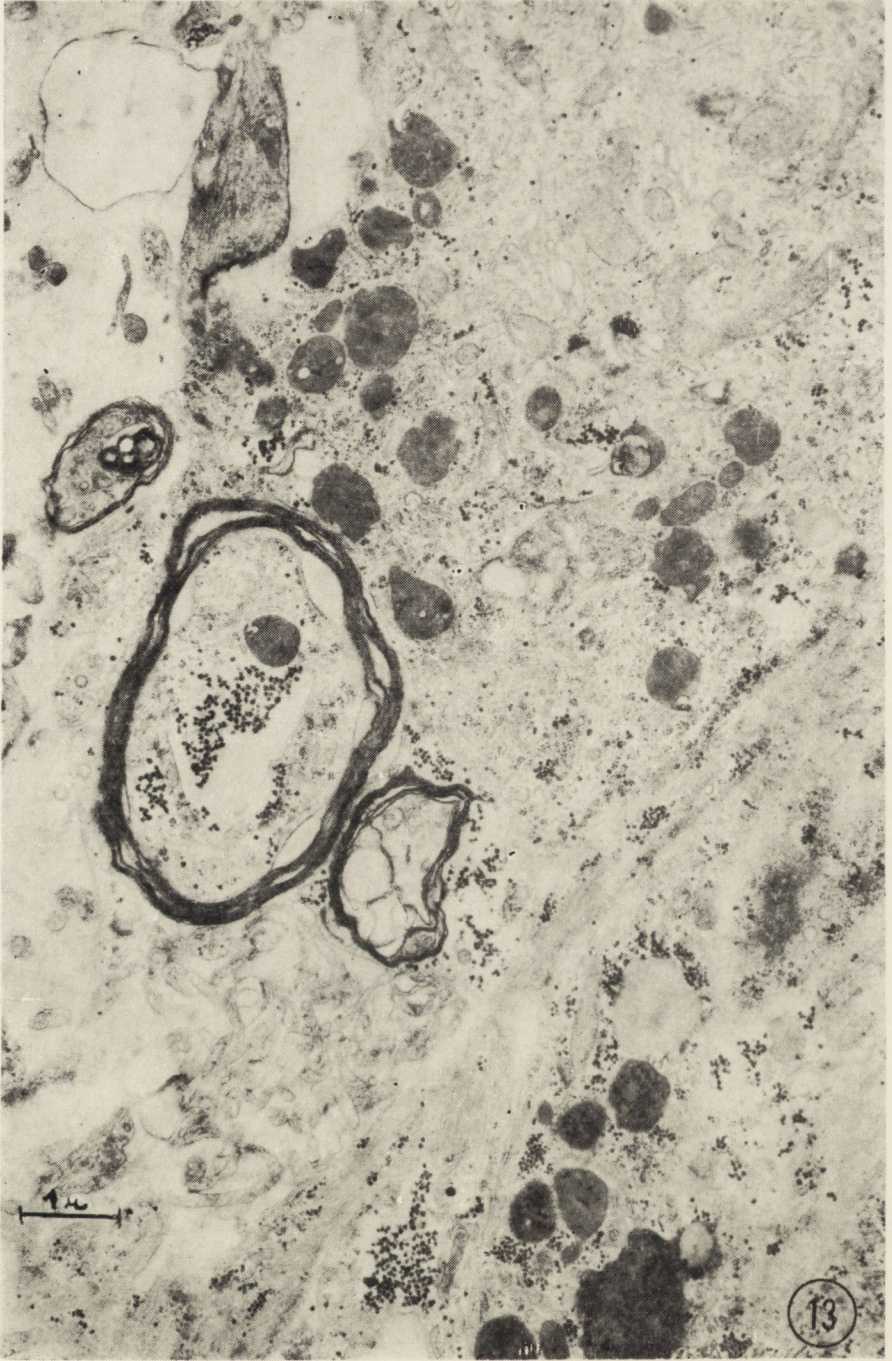












also lesser degree of damage than those in younger cultures (Figs 12, 13). Only a small number of fibres manifested disturbed laminar structure of myelin sheaths, owing to splitting and/or condensation of myelin laminae leading to abnormal shape of the fibres. Usually the myelinated nerve fibres were of normal size and shape, and were coated by myelin sheaths with regular, laminar structure.

Swelling of astrocytic cytoplasm was a very common feature, but its degree changed from cell to cell. The most intensive swelling involved cellular processes (Fig. 12). Astrocytes with less pronounced cytoplasmic swelling contained abundant glycogen granules (Fig. 11).

Oligodendrocytes from 3- and 4-week-old cultures reacted to anoxia in an essentially similar way as those from 2-week-old culture. Accumulation of various structures, characterized by varying electron density and presence of numerous lysosome-like structures in their cytoplasm was the leading ultrastructural abnormality. Various amounts of glyco-

Fig. 9. Two-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragment of astrocyte cytoplasm with numerous gliofibrills and glycogen rosettes. Oligodendrocyte with numerous structures of various electron density and with a dilated canals of the Golgi apparatus.

Ryc. 9. Hodowla 2-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Fragment cytoplazmy astrocyta z dużą ilością gliofibryli i glikogenu, pozostałe organelle nieliczne. Obok oligodendrocyt z dużą ilością tworów o różnej gęstości elektronooptycznej oraz z poszerzonym aparatem Golgiego.

Fig. 10. Two-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragment of oligodendrocyte with numerous lysosome-like structures and structures containing lipids. Numerous glycogen particles and gliofibrills are also seen.

Ryc. 10. Hodowla 2-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Fragment komórki oligodendrocyta z licznymi ciałami lizosomopodobnymi i tworami z zawartością lipidową; widoczne również liczne ziarna glikogenu i gliofibryle.

Fig. 11. Three-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragment of neurocyte with well developed rough endoplasmic reticulum. Some canals of the Golgi apparatus are slightly dilated. Elongated and normal mitochondria. Fragment of glial cell with great amount of glycogen.

Ryc. 11. Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Fragment neurocyta z dobrze wykształconą siatką śródplazmatyczną szorstką. Niektóre kanały aparatu Golgiego nieznacznie poszerzone. Mitochondria wydłużone. Obok fragment komórki glejowej z dużą ilością glikogenu.

Fig. 12. Three-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragment of swollen astrocytic process and fragments of nerve cells and axon with slightly damaged myelin.

Ryc. 12. Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Widoczny fragment obrzmiałej wypustki astrocyta, oraz fragmenty komórek nerwowych i akson z nieznacznie uszkodzoną mieliną.

Fig. 13. Four-week-old culture, 3 days after anoxia. Fragments of 2 oligodendrocytes with numerous structures of various electron density. Glycogen rosettes are present in their cytoplasm. Slight degree of myelin damage. Glycogen in cytoplasm in axon.

Ryc. 13. Hodowla 4-tygodniowa, 3 dni po niedotlenieniu. Fragmenty 2 oligodendrocytów z widocznymi tworami o różnej gęstości elektronooptycznej. W ich cytoplazmie obecny również glikogen. Nieznaczny stopień uszkodzenia mieliny. W cytoplazmie aksonu widoczny glikogen.

gen granules, accumulated among unchanged subcellular cytoplasmic organelles were also found (Fig. 13).

The above described changes in various types of cells in 3- and 4-week-old cultures were present in all the periods of observation. Their intensity did not undergo essential changes in the 1st, 3rd and 5th day following anoxia.

DISCUSSION

On the basis of our observation it can be assumed that short-lasting, transient anoxia causes structural and metabolic changes in all cellular elements of the examined portion of the central nervous systems. The character and the intensity of the described abnormalities depend on the age of the culture, type of cells and their location within the cultures.

The greatest intensity of pathological changes in all types of cells in 2-week-old cultures indicates the higher sensitivity of maturing nerve and glial cells to oxygen deficiency, than that of the mature ones. This phenomenon has been already pointed out in our previous studies concerning the reaction of glial cells to anoxia (Kraśnicka, Renkawek, 1972; Kraśnicka et al., 1973). The difference in the intensity of cellular damage between less severely altered glial cells from the explanted tissue and the more deeply impaired glial population from the outgrowth zone, observed in the present studies once more confirms this dependence. In interpretation of differences in the degree of structural and metabolic disturbances due to anoxia between nerve cells from younger and older cultures one additional factor has to be taken into consideration. Kraśnicka (1969) showed that neurons from the spinal root ganglia, when cultured *in vitro*, undergo during the two first weeks axonal degeneration, owing to their damage at the time of starting the cultures. This process finds its morphological expression in central tigrolysis and abundant glycogen accumulation. The same phenomenon may take place also when culturing tissue from the central nervous system. In that case the abnormalities seen in neurons from 2 week-old cultures may result from two superimposed processes — axonal reaction and influence of anoxia, whereas in older cultures they indicate a reaction of neurons to oxygen deficiency alone.

The pathological changes in neurons were generally less severe than in glial cells of both astrocytic and oligodendrocytic lines. The same phenomenon indicating lesser sensitivity of neurons as compared with that of glial cells to oxygen deficiency has been already described by Dolivo et al. (1967) and Rouiller et al. (1971) in their *in vitro* studies, as well as by Hills (1964), Bakay and Lee (1968) and Brown and Brierley (1971, 1973) in their experiments on animals. Essentially the same diffe-

rences in the reactivity of neurons, satellite cells and Schwann's cells were found in our previous studies on the influence of anoxia on root ganglia cultured *in vitro* (Kraśnicka et al., 1974).

The nature of the pathological changes varied to a great extent, depending on the type of cells. Among neuronal population the most prominent abnormalities concerned the Purkinje cells. They consisted in swelling of mitochondria, decrease of rough endoplasmic reticulum, reduction of the amount of free ribosomes and enlargement of canals and cisterns of the Golgi apparatus. The above mentioned ultrastructural abnormalities correspond well with the cellular alterations observed in light microscopy. Their nature was similar to the changes, described by numerous authors (Hager et al., 1960; Hager, 1963; Hills, 1964; Brown, Brierley, 1968, 1973) in various types of experimental anoxia in *in vivo* conditions. They were essentially the same, as neuronal impairments in our previous experiments on the peripheral nervous system (Kraśnicka et al., 1974). On the other hand, the morphological and ultrastructural picture of granular layer neurons does not differ from that in normal conditions, except for the slight dilatation of the Golgi apparatus canals in some of them.

Astrocytes displayed remarkable swelling of cytoplasm, involving mostly cellular processes, and reduction of all subcellular cytoplasmic organelles. Moreover, an increased amount of gliofibrils in the cytoplasm of some of astroglial cells was noticed. The degree of damage to the astrocytes observed in the studied material was less than that described in our previous papers (Kraśnicka, Renkawek, 1972; Kraśnicka et al., 1973).

The significant changes observed in oligodendrocytes consisted in an excessive accumulation in the cytoplasm of lysosome-like structures as well as structures, varying in electron density and containing lipid substances.

The abnormality common for all cellular elements was an extensive glycogen accumulation in the perikarya and processes, accompanied by a significant increase of glycogen—metabolizing enzyme activity. This phenomenon, indicating disturbances in intracellular glucose metabolism was identical with that observed in various types of oxygen insufficiency in experimental animals (Mossakowski et al., 1968; Pronaszko et al., 1972; Long et al., 1972) and in tissue culture conditions (Kraśnicka et al., 1974). Noteworthy is the accumulation of glycogen in those cells which showed less advanced structural impairment.

Comparison of the present observations, concerning cultures from the central nervous system, with the results of our previous studies on the

influence of anoxia on cultures from the peripheral nervous system (Kraśnicka et al., 1974) points out the identity of pathological changes involving oligodendrocytes and Schwann cells. It seems that short-lasting, transient anoxia damages most severely the cells responsible for myelin formation and maintenance. Concomitance of severe degenerative changes in oligodendroglia with prominent myelin sheaths abnormalities is strongly suggestive that in conditions of anoxia myelin damage results from the metabolic and structural alterations of the cells involved in its formation.

CONCLUSIONS

1. Short-lasting, transient anoxia causes metabolic and structural changes in all the cellular elements of the cerebellum cultured *in vitro*. The nature and intensity of pathological changes depend on the degree of tissue maturity and type of cells.
2. The impairment of glial cells is more intensive than that of neurons. The most prominent pathological changes concern oligodendroglial cells; this leading to damage of myelin sheaths.
3. The nature of pathological changes due to anoxia tissue culture conditions is essentially similar in tissues from the central and peripheral nervous system.

Z. Kraśnicka, B. Gajkowska, M. J. Mossakowski

WPLYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOTLENIENIA NA TKANKĘ NERWOWĄ HODOWANĄ *IN VITRO* (OBSERWACJE MÓZDŻKU W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM I ELEKTRONOWYM)

Streszczenie

Przebadano wpływ krótkotrwałej anoksji na elementy komórkowe ośrodkowego układu nerwowego. Badania prowadzono na tkance nerwowej pobieranej z mózdku noworodków szczurzych i przetrzymywanej w warunkach hodowli tkankowej. Hodowle w wieku 2, 3 i 4 tygodni poddawano działaniu anoksji przez 30 minut. Okres obserwacji po niedotlenieniu wynosił od 1 do 5 dni.

Stwierdzono, że krótkotrwałe, przejściowe niedotlenienie powoduje zmiany morfologiczne w neuronach i komórkach glejowych, przy czym intensywność obserwowanych zmian jest mniejsza w neuronach niż w gleju. Największe zmiany zaobserwowano w oligodendrocytach, występowały one we wszystkich grupach wieku. W hodowlach 2-tygodniowych stwierdzano znaczne i rozległe uszkodzenie mieliny, natomiast w hodowlach starszych nie wszystkie włókna wykazywały ten sam stopień demielinizacji. We wszystkich komórkach mózdku i we wszystkich badanych grupach stwierdzono nadmierne gromadzenie się glikogenu.

З. Красьни́ца, Б. Гайковска, М. Я. Моссаковски

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ
НА КУЛЬТУРУ НЕРВНОЙ ТКАНИ *IN VITRO*
(ИЗУЧЕНИЕ МОЗЖЕЧКА В ОПТИЧЕСКОМ
И ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПАХ)

Резюме

Было исследовано влияние кратковременной аноксии на клеточные элементы центральной нервной системы. Исследования проводились на нервной ткани, взятой из мозжечка новорожденных крысят и содержащейся в условиях тканевой культуры. Культуры в возрасте 2, 3 и 4 недели подвергались действию 30 минутной аноксии. Период наблюдения после гипоксии составлял от 1 до 5 дней.

Было обнаружено, что кратковременная, преходящая гипоксия вызывает морфологические изменения в нейронах и глиальных клетках. Интенсивность наблюдаемых изменений в нейронах была меньше, чем в глии. Самые большие изменения были обнаружены в олигодендроцитах и выступали во всех группах культуры. В 2 недельных культурах были заметны значительные и обширные повреждения миелина, в то время как в старших культурах не все волокна проявляли ту же степень демиелинизации. Во всех клетках мозжечка всех исследуемых групп было обнаружено чрезмерное скопление гликогена.

REFERENCES

1. Bakay, L.; Lee, J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain* 1968, 91, 697—706.
2. Borowicz, J. W.; Kraśnicka, Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych *in vitro* do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 9, 691—697.
3. Brown, A. W.; Brierley, J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat as defined by the optical microscope. *Brit. J. Exp. Path.* 1968, 49, 87—106.
4. Brown, A. W.; Brierley, J. B.: The nature and time course of anoxic-ischaemic cell change in the rat brain. An optical and electron microscope study. In: *Brain Hypoxia*. Ed. Brierley J. B. and Meldrum B. S., London, Heinemann 1971, 40—60.
5. Brown, A. W.; Brierley, J. B.: The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 23, 9—22.
6. Dolivo, M.; Foroglou-Kerameus, Ch.; Kocsis, M.; Rouiller, Ch.; Nicolescu, P.: Alterations et fonctionnement du tissu nerveux au cours de l'anoxie *in vitro*. *J. Physiol.* 1967, 59, 393.
7. Hager, H.; Hirschberger, V.; Scholz, W.: Electron microscopic changes in brain tissue of Syrian hamsters following acute hypoxia. *Aerospace Med.* 1960, 31, 379—387.
8. Hager, H.: Electron microscopical observations on the early changes in neurons caused by hypoxidosis and on the ultrastructural aspects of neuronal necrosis in the cerebral cortex of animals. In: *Selective vulnerability of the brain hy-*

- poxaemia, 125—136. Eds. J. P. Schadé and W. N. McMenemy, Oxford. Blackwell Scientific Co, 1963.
9. Hills, C. P.: The ultrastructure of anoxic-ischaemic lesions in the cerebral cortex of the adult rat brain. *Guys Hosp. Rep.* 1964, 113, 333—348.
 10. Kraśnicka, Z.; Mossakowski, M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—404.
 11. Kraśnicka, Z.: Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju zarodkowym. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 395—434.
 12. Kraśnicka, Z.; Renkawek, K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 507—518.
 13. Kraśnicka, Z.; Renkawek, K.; Gajkowska, B.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz ultrastrukturalny komórek glejowych hodowanych in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 399—404.
 14. Kraśnicka, Z.; Konowałow, H.; Gajkowska, B.: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje czuciowe hodowane in vitro. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 357—370.
 15. Long, M.; Mossakowski, M. J.; Klatzo, I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335—347.
 16. Mossakowski, M. J.; Long, M.; Myers, R. E.; de Curet, H. R.; Klatzo, I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 3, 500—516.
 17. Pronaszko-Kurczyńska, A.; Mossakowski, M. J.: Ostenda, M.; Korthals, J.: Zmiany w zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 281—294.
 18. Rouiller, Ch.; Nicolescu, P.; Orci, L.; Rufener, C.: The effect of anoxia on the ultrastructure of the superior cervical ganglion of the rat in vitro. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* 1971, 7, 269—292.

Authors' address: Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

ROMAN GADAMSKI, GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MARIANNA SIKORSKA

WPŁYW HIPOKSJI KRAŻENIOWEJ NA ZACHOWANIE SIĘ AMIN
KATECHOLOWYCH W MÓZGU KRÓLIKA.
BADANIA HISTOCHEMICZNO-FLUORESCENCYJNEZespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN
Kierownik: prof. dr M. J. Mossakowski

W bogatym piśmiennictwie poświęconym biochemicznemu skutkom niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, zaledwie pojedyncze doniesienia dotyczą zachowania się amin biogennych w tych warunkach, mimo to, że równocześnie podkreśla się możliwość ich istotnego udziału w rozwoju szeregu nieprawidłowości metabolicznych, stanowiących następstwo niedostatku tlenowego (Huťny 1970). Stupfel i Roffi (1961) wykazali spadek poziomu noradrenaliny w mózgu szczurów poddanych niedotlenieniu. Podobne zmiany w podwzgórzcu kotów opisali Debijadij i wsp. (1969). W roku 1971 Hurwitz i wsp. stwierdzili, że u szczurów poddanych 4-godzinnemu niedotlenieniu, obniżeniu poziomu noradrenaliny w mózgu towarzyszy spadek zawartości dopaminy. Chikvaidze i Melitauri (1974) wykazali w modelu hipoksji krążeniowej znaczny spadek zawartości noradrenaliny, adrenaliny, dopaminy i serotoniny w różnych strukturach anatomicznych mózgu królika, występujący bezpośrednio po niedokrwieniu i ich przyrost w późniejszych okresach poischemicznych.

W pracach wymienionych autorów ilościowej ocenie zmian zawartości amin biogennych w mózgu, nie towarzyszyły badania morfologiczne, które pozwoliłyby na ocenę ich lokalizacji w poszczególnych elementach strukturalnych tkanki nerwowej.

Wydawało się przeto celowe przeprowadzenie serii badań nad zachowaniem się katecholamin w następstwie niedotlenienia przy zastosowaniu techniki histochemiczno-fluorescencyjnej, umożliwiającej ocenę lokalizacji zmian w warunkach tego samego modelu w którym Chikvaidze i Melitauri (1974) wykazali ilościowe zaburzenia w stężeniu poszczególnych amin biogennych.

MATERIAŁ I METODY

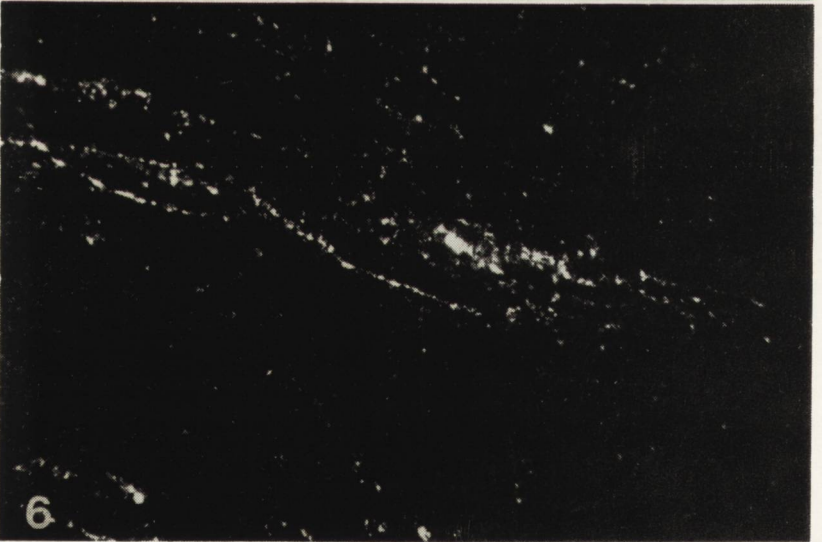
Badania przeprowadzono na 20 dorosłych królikach wagi 2,5 do 3,5 kg, u których w ogólnym znieczuleniu nembutalowym wywoływano 15-minutową hipoksję krążeniową wg metody opisanej przez Mchedlishvili (1973).

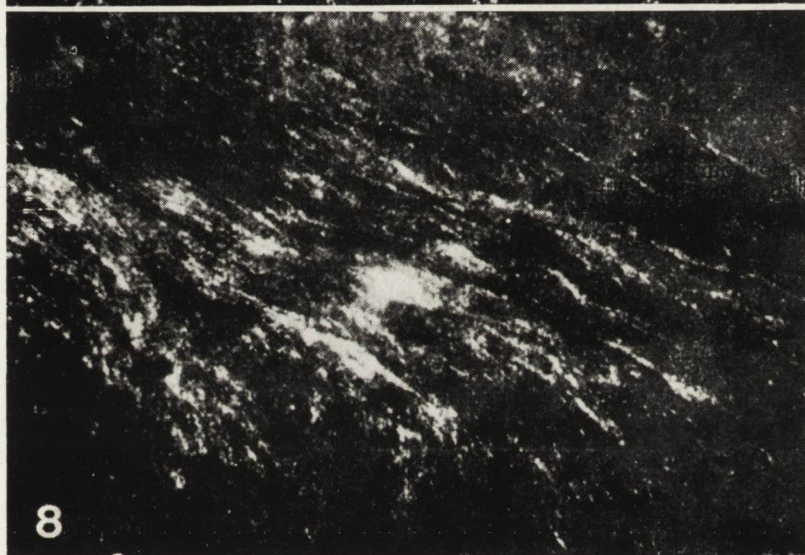
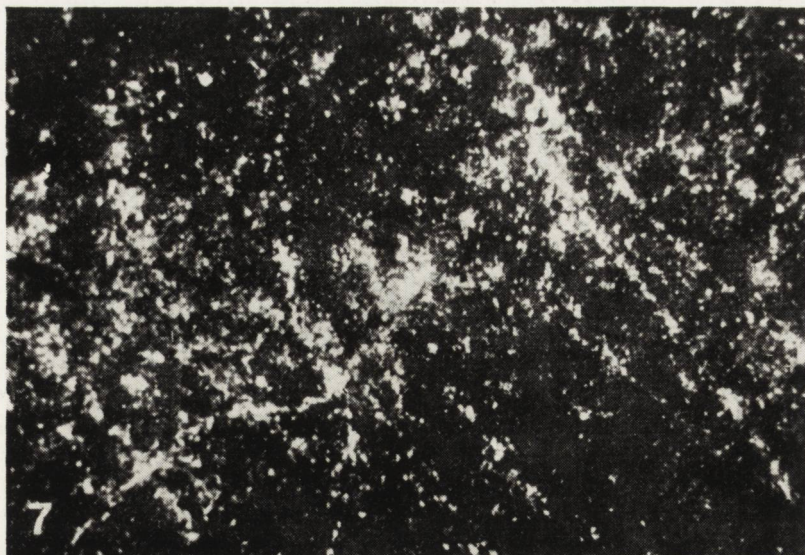
Zwierzętom po podaniu heparyny (0,3 ml/kg wagi ciała) upuszczano krew z prawej tętnicy szyjnej wspólnej do połączonego z nią zbiornika w objętości powodującej obniżenie obwodowego ciśnienia tętniczego krwi do ok. 20 mm Hg. Równocześnie przerywano dopływ krwi do mózgu poprzez tętnice szyjne wspólne. Na lewą tętnicę zakładano zacisk, a odcinek dogłowy prawej tętnicy podwiązywano na stałe. Zwierzętom wykonywano równocześnie obustronne otwory trepanacyjne w kościach ciemieniowych czaszki i nakłuwano oponę twardą. Po upływie 15 minut zdejmowano zacisk z lewej tętnicy szyjnej, a poprzez dosercowy odcinek tętnicy prawej wprowadzano ponownie upuszczoną krew. Retransfuzja krwi prowadziła do podwyższenia ciśnienia tętniczego do wartości zbliżonych do prawidłowych.

Króliki, po trzy w każdej grupie czasowej, badano bezpośrednio po hipoksji (w czasie „0”), a następnie po upływie 15 min., 1, 2, 4 i 12 godzin od zakończenia doświadczenia. Grupę kontrolną stanowiły 2 króliki, u których podwiązywano wyłącznie prawą tętnicę szyjną wspólną bez wykrwawiania.

Materiał do badań w mikroskopie fluorescencyjnym opracowywano wg metody opisanej przez Lindvalla i Björklunda (1974). U zwierząt wykonywano perfuzję 2% roztworem jednowodnego kwasu glioksalowego w buforze dwuwęglanowym Krebsa-Ringera o pH 7,0. Roztwór ten przed użyciem nasycało mieszaniną gazów o składzie: 95% O₂ i 5% CO₂, a następnie ochładzano do temperatury 0—4° C. Jeden litr przygotowywanego w ten sposób płynu perfuzyjnego podawano do lewej tętnicy szyjnej wspólnej domózgowo po podwiązaniu jej odcinka dosercowego i po przecięciu prawej żyły jarmowej. Z mózgowi wyjmowanych bezpośrednio po perfuzji pobierano bloki tkankowe grubości około 2 mm obejmujące korę mózgową, pole przegrodowe, prążkowie oraz podwzgórze i wzgórze wzrokowe. Bloczki tkanki zamrażano w suchym lodzie i krojono w kriostacie na skrawki grubości 10—20 μ. Bezpośrednio po skrojeniu skrawki wysuszano w strumieniu ciepłego powietrza przez okres 15 min., a następnie przenoszono je do zaciemnionego eksykatora zawierającego pięciotlenek fosforu. Czas wysuszania w eksykatorze (*in vacuo*) wynosił około 14 godzin. Następnie skrawki poddawano działaniu par kwasu glioksalowego. Dla przeprowadzenia tej części przygotowania materiału posługiwano się zestawem złożonym z dwóch eksykatorów próżniowych







Ryc. 1. Kontrola. Fluorescencja neuronów jądra ogoniastego i przykomórkowych części wypustek nerwowych. Pow. 200×.

Fig. 1. Control. Fluorescence of neurons of nucleus *caudatus* and of proximal segments of their processes. × 200.

Ryc. 2. Kontrola. Fluorescencja w komórkach istoty czarnej i w neuropilu. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Control. Fluorescence of cells of *substantia nigra* and of the neuropil. × 200.

Ryc. 3. Kontrola. Wzgórze wzrokowe. Silna fluorescencja we włóknach osiowych. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Control. *Thalamus opticus*. Strong fluorescence of axons. × 200.

Ryc. 4. Czas „0” (bezpośrednio po hipoksji). Osłabienie fluorescencji we włóknach osiowych wzgórza wzrokowego w porównaniu do kontroli (ryc. 3). Pow. 200 ×.

Fig. 4. Time „0” (immediately after hypoxia). Decrease of fluorescence of axons in *thalamus opticus* in comparison with that of control (Fig. 3). × 200.

Ryc. 5. Jedna godz. po hipoksji. Wzmożenie fluorescencji w neuropilu i we włóknach osiowych wzgórza wzrokowego w porównaniu do czasu „0” (ryc. 4). Pow. 200 ×.

Fig. 5. One hour after hypoxia. Increase of fluorescence of neuropil and axons in *thalamus opticus* in comparison with that obtained in time „0” (Fig. 4). × 200.

Ryc. 6. Jedna godz. po hipoksji. Osłabienie fluorescencji we włóknach osiowych obszaru przykomorowego podwzgórza w porównaniu do 2 godz. po hipoksji (ryc. 7). Pow. 200 ×.

Fig. 6. One hour after hypoxia. Decrease of fluorescence of axons in periventricular area of hypothalamus in comparison with that obtained 2 hours after hypoxia (Fig. 7). × 200.

Ryc. 7. Dwie godz. po hipoksji. Obszar przykomorowy podwzgórza. Wzrost intensywności fluorescencji we włóknach osiowych i w neuropilu. Intensywność fluorescencji podobna do obrazów kontrolnych. Pow. 200 ×.

Fig. 7. Two hours after hypoxia. Periventricular area of hypothalamus. Increase of fluorescence in axons and neuropil. Intensity of fluorescence similar to that obtained in control. × 200.

Ryc. 8. Dwie godz. po hipoksji. Intensywna fluorescencja w polu przegrodowym przypominająca obraz kontrolny. Pow. 200 ×.

Fig. 8. Two hours after hypoxia. Intensive fluorescence of *area septalis*, similar to that of control. × 200.

o pojemności około 1,5 l połączonych węzłem gumowym zamykanym odpowiednio skonstruowanym zaworem. Zestaw ten umieszczano w ciepłarnie w temperaturze 100°C. Do jednego eksykatora wkładano 4 g kwasu glioksalowego, uprzednio wysuszonego nad pięciotlenkiem fosforu. Naczynie szczelnie zamykano i pozostawiano w temp. 100°C na okres jednej godziny. Po upływie tego czasu do drugiego eksykatora wkładano skrawki naciągnięte na szkiełka podstawowe i podłączano ten eksykator do pompy próżniowej. Następnie otwierano zawór umieszczony w przewodzie gumowym, łączącym oba te naczynia, powodując tym sposobem przejście par kwasu glioksalowego do eksykatora zawierającego skrawki tkanki mózgowej. Traktowanie parami kwasu glioksalowego przebiegało w temperaturze 100°C przez okres 2 minut.

Preparaty zamykano w Entallanie lub wodnym roztworze gliceryny w stosunku 1:1 v/v i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss wyposażonym w wysokociśnieniową lampę rtęciową HBO-200 oraz filtry: BG-12 (wzbudzający) i OG-1 (barierowy). Zieloną fluorescencję amin katecholowych utrwalono na filmie ORWO UT-16.

WYNIKI

U zwierząt kontrolnych zieloną fluorescencję charakterystyczną dla amin katecholowych*) obserwowano w perikariach komórek nerwowych jądra ogoniastego (ryc. 1), istoty czarnej (ryc. 2), podwzgórza oraz wzgórza wzrokowego. W neuronach tych części mózgu ziarnista lub dyfuzyjna fluorescencja była zlokalizowana w cytoplazmie, a niekiedy również w przykomórkowych odcinkach wypustek nerwowych. W neuropilu widoczne było świecenie okrągłych, niewielkich tworów, które swoim wyglądem sugerowały przekroje poprzeczne włóknistych elementów tkanki nerwowej. W podwzgórzu i wzgórzu wzrokowym była widoczna ponadto silna fluorescencja w postaci różańcowatych ziarnistości ułożonych wzdłuż przebiegu pojedynczych włókien osiowych (ryc. 3). W korze mózgowej zielona fluorescencja amin katecholowych występowała w postaci gęsto utkanych siatkowatych tworów oraz ziarnistości rozmieszczonych w oczkach tej siatki.

W materiale doświadczalnym pobieranym bezpośrednio po niedotlenieniu (czas „0”) lokalizacja oraz charakterystyczne rozmieszczenie świecących elementów przypominało swoim wyglądem obrazy obserwowane u zwierząt kontrolnych. Zwraçało jednakże uwagę wyraźne osłabienie

W zastosowanej technice badań odczyn fluorescencyjny ujawnia obecność noradrenaliny i dopaminy.

intensywności fluorescencji. Stwierdzano większe rozczłonkowanie paciorkowato rozmieszczonych tworów widocznych wzdłuż przebiegu włókien nerwowych, zmniejszenie ilości fluoryzujących ziarnistości w neuropilu (ryc. 4) oraz mniejszą gęstość włóknistej siatki w korze mózgowej. U zwierząt grupy drugiej (15 min. po hipoksji) obserwowano wyraźne wzmoczenie intensywności fluorescencji w stosunku do czasu „0”. W cytoplazmie neuronów, zwłaszcza w jądrze ogoniastym, wzrastała liczba świecących ziarnistości w związku z czym materiał fluoryzujący wypełniał całkowicie cytoplazmę komórek, podobnie jak u zwierząt kontrolnych. Neurony i przykomórkowe odcinki wypustek nerwowych w podwzgórzu, wzgórzu wzrokowym i polu przegrodowym były wyraźnie zarysowane. Widoczna była również silna fluorescencja proksymalnych odcinków dendrytów bez uwidocznienia ich drzewkowatych rozgałęzień. We włóknach osiowych stosunkowo słabsze świecenie obserwowano jedynie w częściach przykomórkowych, podczas gdy ich odcinki obwodowe były wyraźnie widoczne w obrazie mikroskopowym. Często można było obserwować miejsca odejścia i przebieg ich bocznych odgałęzień. W pojedynczych włóknach osiowych na miejsce obserwowanych w czasie „0” drobnych różańcowato rozmieszczonych ziarnistości pojawiły się krótkie, przecinkowate twory, które często łącząc się ze sobą wyznaczały ciągly, nieprzerywany przebieg tych włókien. U zwierząt, które przeżyły jedną, a zwłaszcza 2 godziny po hipoksji intensywność fluorescencji amin katecholowych była wyraźniejsza od spotykanej u królików z 15-minutowym przeżyciem. Najwyraźniej było to widoczne we włóknach osiowych wzgórza wzrokowego (ryc. 5) w obszarze przykomorowym podwzgórza (ryc. 6, 7) oraz we włóknach pola przegrodowego (ryc. 8). U zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po hipoksji intensywność i rozmieszczenie fluorescencji były podobne, jak u zwierząt kontrolnych.

OMÓWIENIE

Histochemiczne badania lokalizacji amin biogennych, przeprowadzone w oparciu o fluorescencyjne metody Falcka (1962), Falcka i wsp. (1962) oraz Lindvalla i Björklunda (1974) wykazały, że komórki nerwowe zawierające aminy katecholowe i serotoninę są umiejscowione w określonych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. Neurony magazynujące noradrenalinę i serotoninę spotyka się najczęściej w rdzeniu przedłużonym, moście i śródmózgowiu, a rzadziej w podwzgórzu i wzgórzu wzrokowym (Björklund, Nobin 1973, Lindvall, Björklund 1974), natomiast komórki nerwowe wykazujące obecność dopaminy są umiejscowione głównie w prążkowaniu i istocie czarnej (Davis, Carlson 1973, Lindvall, Björklund 1974). Poza komórkami nerwowymi obecność amin kate-

cholowych stwierdzono również we włóknach osiowych. W ich przebiegu najintensywniejszą fluorescencję, sugerującą wyższą zawartość amin katecholowych, wykazano w ich częściach preterminalnych, co wiąże się prawdopodobnie z udziałem poszczególnych amin w przekazywaniu bodźców na poziomie zakończeń nerwowych.

W przeprowadzonej przez nas serii badań, w materiale doświadczalnym, obejmującym niektóre z opisanych powyżej obszarów ośrodkowego układu nerwowego, takie jak prążkowie, pole przegrodowe, podwzgórze, istota czarna, wzgórze wzrokowe i kora mózgowa obserwowano różnice w intensywności i rozmieszczeniu fluorescencji stanowiące następstwo hipoksji krążeniowej.

Słabsza i uboższa fluorescencja zarówno w perikariach komórek nerwowych jak i na przebiegu włókien nerwowych, występująca w badanych materiale bezpośrednio po niedokrwieniu (czas „0”), nasilała się bardzo znacznie w okresie poischemicznym, osiągając normalizację obrazu histochemicznego w 24 godzinie po zabiegu doświadczalnym. Różnice w intensywności fluorescencji sugerują zmiany w zawartości ujawnianych przy użyciu zastosowanej metody amin katecholowych. Za taką interpretacją obserwowanych zjawisk przemawiają wyniki badań Chikvaidze i Melitauri (1974), którzy w tym samym modelu doświadczalnym wykazali spadek zawartości katecholamin i serotoniny w czasie „0” oraz ich wzrost w okresie do 2 godzin po niedokrwieniu. Należy jednakże zwrócić uwagę na fakt, że Davis i Carlson (1973) nie stwierdzali istotnych zmian w zawartości serotoniny, dopaminy i noradrenaliny w mózgach szczurów poddanych 2-godzinnemu niedotlenieniu, wykazując równocześnie obecność istotnych zaburzeń w ich metabolizmie, a zwłaszcza w syntezie. Wyniki badań Davisa i Carlsona (1973) stoją w pozornej sprzeczności z naszymi obserwacjami, jak również z wynikami Chikvaidze i Melitauri (1974). Źródłem tej sprzeczności należy szukać zapewne w odmienności stosowanych modeli doświadczalnych — niedotlenienia w przypadku Davisa i Carlsona (1973) i niedokrwienia w stosowanym przez nas niedotlenieniu krążeniowym, których jedyną wspólną cechą jest ograniczenie dopływu tlenu do ośrodkowego układu nerwowego. Niedostatek tlenu prowadzi do obniżenia aktywności hydroksylazy 1-tyrozyny i β -hydroksylazy tryptofanu, które z kolei ogranicza syntezę amin biogennych (Davis, Carlson 1973).

Obserwowane przez nas zmniejszenie intensywności fluorescencji, stanowiące prawdopodobnie wykładnik obniżenia zawartości dopaminy i noradrenaliny nie jest zapewne wyłącznie następstwem niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, towarzyszącego jego niedokrwieniu.

Wiązać je należy również ze stosowanym upustem krwi i spadkiem ciśnienia tętniczego do wartości około 20 mm Hg oraz ze zjawiskiem wstrząsu hypowolemicznego. Następstwem wstrząsu hypowolemicznego jest zwiększone wydzielanie amin katecholowych przez nadnercza i wzrost ich stężenia w łożysku naczyniowym, prowadzący do skurczu obwodowych naczyń krwionośnych, który zabezpiecza właściwy poziom układowego ciśnienia krwi. Wstrząs hypowolemiczny pobudza czynność nie tylko obwodowego lecz prawdopodobnie również i ośrodkowego układu autonomicznego, prowadząc do zmniejszenia zawartości amin katecholowych zgromadzonych w cytoplazmie neuronów i zakończeń nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. Równocześnie wspomniane uprzednio obniżenie aktywności hydroksylazy 1-tyrozyny i β -hydroksylazy tryptofanu, spowodowane niedostatkim tlenu, towarzyszącemu niedokrwieniu, prowadzi do zahamowania biosyntezy amin biogennych, a tym samym unieumożliwia uzupełnienie ich zasobów. Współistnieniu tych dwóch mechanizmów należy przypisać obserwowany przez nas spadek intensywności fluorescencji bezpośrednio po zabiegu doświadczalnym.

Zapewne podobnie złożony jest mechanizm wzrostu zawartości amin biogennych w mózgu, wyrażający się w naszym materiale zwiększeniem intensywności fluorescencji w okresie poischemicznym. Retransfuzja krwi po zakończeniu doświadczenia, związana z przejściowym przekrwieniem czynnym ośrodkowego układu nerwowego (Mossakowski 1974) poprawia dopływ tlenu do mózgu, uruchamiając w okresie poischemicznym, zahamowaną w czasie niedokrwienia syntezę dopaminy i noradrenaliny. Wzrost syntezy badanych amin katecholowych może być również uwarunkowany zwiększeniem puli wolnych aminokwasów, stanowiących metaboliczne prekursorzy dopaminy i noradrenaliny (tyrozyna i tryptofan). Za tą możliwością przemawia stwierdzone przez Albrechta (1974) zahamowanie biosyntezy białek w mózgu w okresie poischemicznym hipoksji krążeniowej, jak również podkreślany przez Davisa i Carlsona (1973) fakt uwalniania aminokwasów z połączeń albuminowych w osoczu krwi przy jej nieznacznym nawet zakwaszeniu. Jest to tym bardziej możliwe, że hypowolemia stanowiąca istotny element stosowanego przez nas modelu doświadczalnego prowadzi do szeregu ogólnoustrojowych zaburzeń metabolicznych, których następstwem jest między innymi kwasica.

W interpretacji naszych spostrzeżeń uwzględnić należy również fakt zwrotnej regulacji syntezy amin katecholowych w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, jak również w rdzeniu nadnerczy. Zjawisko to może odgrywać istotną rolę w różnych procesach patologicznych, w tym również w niedotlenieniu.

Р. Гадамски, Г. Шуманьска, М. Сикорска

ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛЯЦИОННОЙ ГИПОКСИИ
НА ПОВЕДЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГЕ КРОЛИКА.
ГИСТОХИМИЧЕСКИ-ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

Гистохимически-флюоресцентные исследования, касающиеся изменений в локализации и концентрации допамина и норадреналина были проведены на мозге 20 кроликов, подвергаемых 15 минутной циркуляционной гипоксии. Животные исследовались во времени „0” (непосредственно по окончании гипоксии), через 15 минут, 1, 2, 4, 12 и 24 часа после гипоксии. Контрольную группу составляли 2 кролика, у которых перевязывали правую общую сонную артерию, но не вызывали гипоксию. Материал для исследований во флюоресцентном микроскопе обрабатывался по методу Lindvall и Björklund (1974). Было обнаружено, что интенсивность флюоресценции исследуемых катехоламинов изменяется в зависимости от времени переживания после гипоксии. Самая низкая интенсивность была во времени „0” и возрастала в период от 15 минут до 2 часов. Через 24 часа после гипоксии интенсивность флюоресценции катехоламинов напоминает контрольные картины. Типичная для допамина и норадреналина зеленая флюоресценция выступала в телах нервных клеток, в проксимальных частях дендритов, в осевых волокнах и особенно в их претерминальных частях. Флюоресценция в нейропиле была зернистой, что указывало бы на поперечный срез волокон.

R. Gadamski, G. Szumańska, M. Sikorska

EFFECT OF CIRCULATORY HYPOXIA ON RABBIT BRAIN CATECHOLAMINES.
HISTOCHEMICAL AND FLUORESCENCE STUDY

Summary

Histochemical and fluorescence study of changes in localization and concentration of dopamine and noradrenaline was carried out on the brains of 20 rabbits which were subjected to 15 min. circulatory hypoxia. Animals (3 in each group) were examined in time „0” i.e. immediately after hypoxia, in 15 min., and in 1, 2, 4, 12, 24 h. after hypoxia. Control group comprised 2 rabbits with ligated right common carotid artery, without hypoxia. Material for fluorescence microscope was studied according to Lindvall and Björklund (1974).

Intensity of fluorescence of studied catecholamines changed depending on the time of survival after hypoxia. The fluorescence was lowest in time „0” and increased in time since 15 min. up to 2 h. The intensity of fluorescence in 24 h. after hypoxia was similar to control. Green fluorescence typical for dopamine and noradrenaline was shown in perikarya of neurons, in proximal segments of dendrites, and in axons, particularly in their preterminal segments. Neuropil exhibited granular fluorescence suggesting transversally sectioned axons.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Poliribosomes of the rabbit brain in circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 665—669.
2. Björklund A., Nobin A.: Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping dopamine and noradrenaline cell groups in the rat diencephalon. *Brain Res.* 1973, 51, 193—205.
3. Chikvaidze V. N., Melitauri N. N.: Effect of ischemia on the regional distribution of biogenic amines in the brain of rabbits. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 671—682.
4. Davis J. N., Carlson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 783—790.
5. Debijadij R., Perović L., Varagić V., Stosic N.: Effect of hypoxia on the catecholamine content and some cytochemical changes in the hypothalamus of the cat. *Aerospace Med.* 1969, 40, 495—499.
6. Falck B.: Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. *Acta physiol. Scand.* 1962, 56, Suppl. 197.
7. Falck B., Hilarp N. A., Thieme G., Torp A.: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 1962, 10, 348—354.
8. Hurwitz D. A., Robinson S. M., Barofsky I.: Behavioral decrements and brain catecholamine changes in rats exposed to hypobaric hypoxia. *Psychopharmacol.* 1971, 19, 26—33.
9. Hutny J.: Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji. *Post. Biochem.* 1970, 16, 431—447.
10. Lindvall O., Björklund A.: The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochem.* 1974, 39, 97—127.
11. Mchedlishvili G. J.: Experimental model of controllable circulatory hypoxia (ischemia) of cerebral hemispheres. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 249—262.
12. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 573—581.
13. Stupfel M., Roffi J.: Action de l'anoxic et de differents taux de carbonique sur le contenu en noradrenaline et en adrenaline du cerveau de rat. *C. R. Séanc. Soc. Biol.* 1961, 155, 237—240.

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

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO

OBRAZ MORFOLOGICZNY MÓZDŻKU W PRZEBIEGU PADACZKI

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego
Kierownik Zakładu: doc. dr med. hab. J. Lymceki

Zachowanie się mózdku w przebiegu padaczki było od dawna przedmiotem badań szeregu uczonych. Na najlżejszy stopień uszkodzenia mózdku, występujący w postaci schorzenia homogenizacyjnego komórek Purkinjego, pierwszy zwrócił uwagę Spielmeyer (1920, 1927). Spielmeyer, a także późniejsi badacze (Liebers 1928, Scholz 1929, 1933, 1956, 1973, Zimmermann 1938, Peiffer 1963, Normann 1964) uważali, że właśnie mózdek jest strukturą szczególnie podatną dla wystąpienia zmian ponapadowych i że obok rogu Amona ulega najczęściej uszkodzeniu, a czasami jego uszkodzenie występuje w sposób selektywny.

W większości prac z tego zakresu brak opracowania korelacji pomiędzy charakterem napadów padaczkowych i częstością ich występowania a strukturą i stopniem nateżenia zmian tkankowych. Zadaniem podjętej pracy była ocena zmian strukturalnych i topografii uszkodzeń mózdku w przebiegu padaczki w celu ustalenia korelacji tych zmian z typem i częstotliwością napadów klinicznych.

MATERIAŁ I METODA

Materiał obejmował 30 przypadków, w tym 20 kobiet i 10 mężczyzn, w wieku od 22 do 81 lat. Średni wiek dla całej grupy wynosił 46,7 lat. U 9 chorych pierwszy napad padaczkowy wystąpił przed 20 rokiem życia. Czas trwania choroby wahał się od roku do 39 lat ze średnią 16,6 lat. U wszystkich chorych występowały ataki typu „grand mal”; w 6 przypadkach o początku ogniskowym, u 4 chorych w połączeniu z napadami „petit mal” a u 17 chorych ze stanami pomrocznymi. U 17 chorych występowały w przebiegu choroby stany padaczkowe. Częstość napadów

wahała się od pojedynczych napadów dużych co kilka miesięcy do 10 i więcej w ciągu miesiąca. W 9 przypadkach łączono wystąpienie napadów padaczkowych z ciężkim urazem czaszki, w 3 przypadkach z miażdżycą mózgu, w 3 przypadkach z chorobą pasożytniczą.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono następujące odchylenia: w 3 przypadkach z 23 przebadanych obserwowano podwyższony poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym. Badanie EEG wykonane w 16 przypadkach u 15 chorych wykazywało zmiany napadowe rozlane, badanie PEG wykazało w 4 z 7 przebadanych przypadków wodogłowie wewnętrzne.

W przebadanej grupie 24 chorych zażywało względnie systematycznie leki (hydantoinal, luminal, misodinę), 6 chorych leczenie okresowo przerywało. Najczęstszą przyczyną zgonu był stan padaczkowy (14 przypadków) oraz zapalenie płuc (8 przypadków). W 3 przypadkach przyczyny nagłego zgonu nie udało się wyjaśnić badaniem sekcyjnym.

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki w płaszczyźnie czołowej przez półkule mózdzku z robakiem. Skrawki pobierano w serii nieciągłej. Metody barwienia: fiolet krezyłu, H.-E., van Gieson, Bielschowsky'ego, Spielmeijera, Kanzler-Arendta oraz sudan czarny B.

WYNIKI

Badanie makroskopowe mózgowia w 12 przypadkach wykazało objawy obrzęku mózgu z wklonowaniem migdałków mózdzku do otworu potylicz-

Ryc. 1. Rozległe ubytki komórek Purkinjego. Pobudzenie gleju Bergmanna. Nissl. Pow. 60 X.

Fig. 1. Extensive loss of Purkinje cells. Proliferation of Bergmanns glia. Nissl X 60.

Ryc. 2. Znaczne przerzedzenie warstwy ziarnistej. H.—E. Pow. 60 X.

Fig. 2. Significant rarefaction of granular layer. H.—E. X 60.

Ryc. 3. Plackowate wyłysienie w warstwie ziarnistej. Fiolet krezyłu. Pow. 100 X.

Fig. 3. Patchy nerve cell loss in cerebellar granular layer. Cresyl violet. X 100.

Ryc. 4. Przemieszczenie komórek Purkinjego do warstwy drobinowej. Bielschowsky. Pow. 200 X.

Fig. 4. Displacement of Purkinje cells into granular layer. Bielschowsky. X 200.

Ryc. 5. Rozdęte dendryty komórki Purkinjego. Bielschowsky. Pow. 400 X.

Fig. 5. Distended dendrites of Purkinje cell. Bielschowsky. X 400.

Ryc. 6. Kuliste i wrzecionowate rozdęcia aksonów komórek Purkinjego, obrazy pustych koszyczków. Bielschowsky. Pow. 200 X.

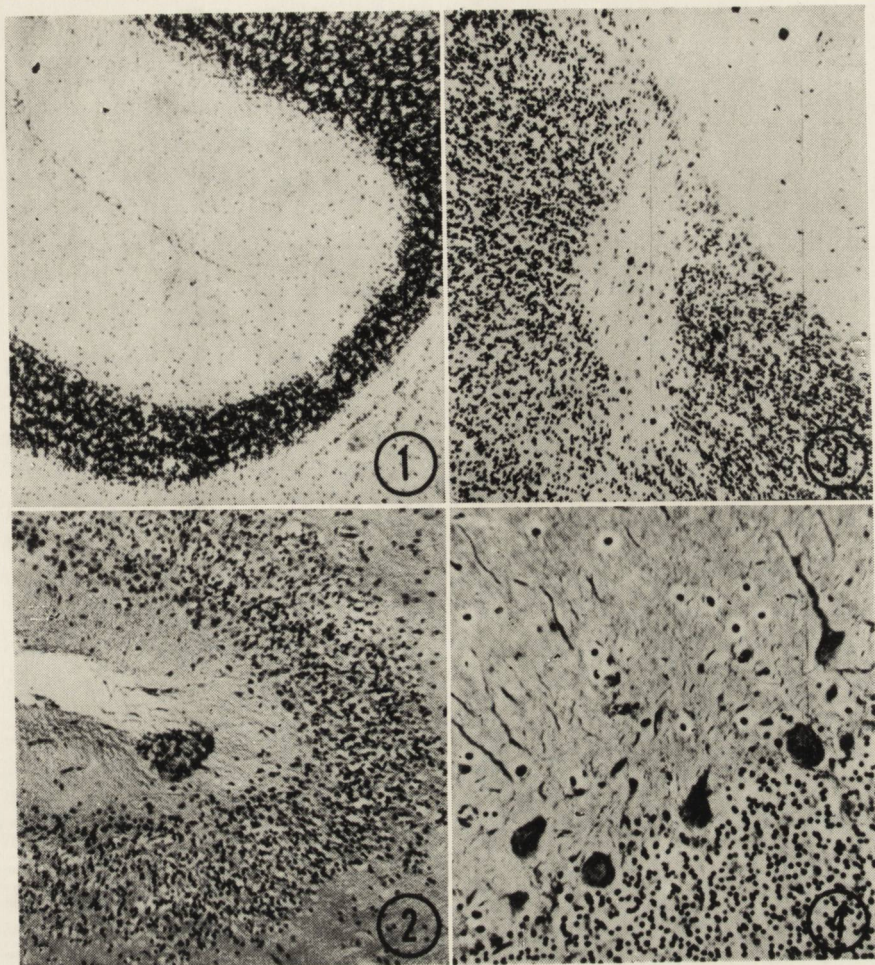
Fig. 6. Spherical and fusiform distension of Purkinje cells axons. Picture of empty baskets. Bielschowsky. X 200.

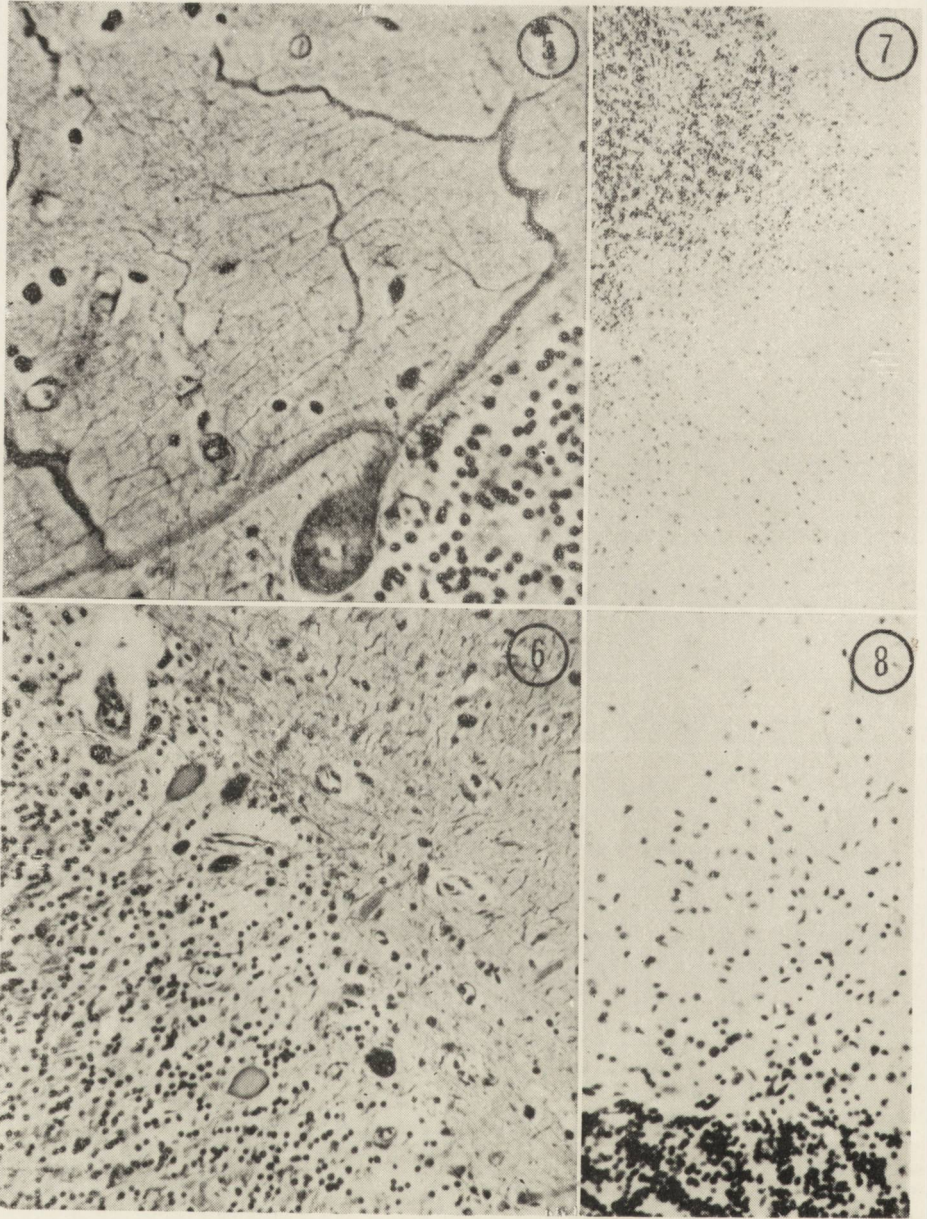
Ryc. 7. Rozplem komórek glejowych warstwy Bergmanna. Fiolet krezyłu. Pow. 100 X.

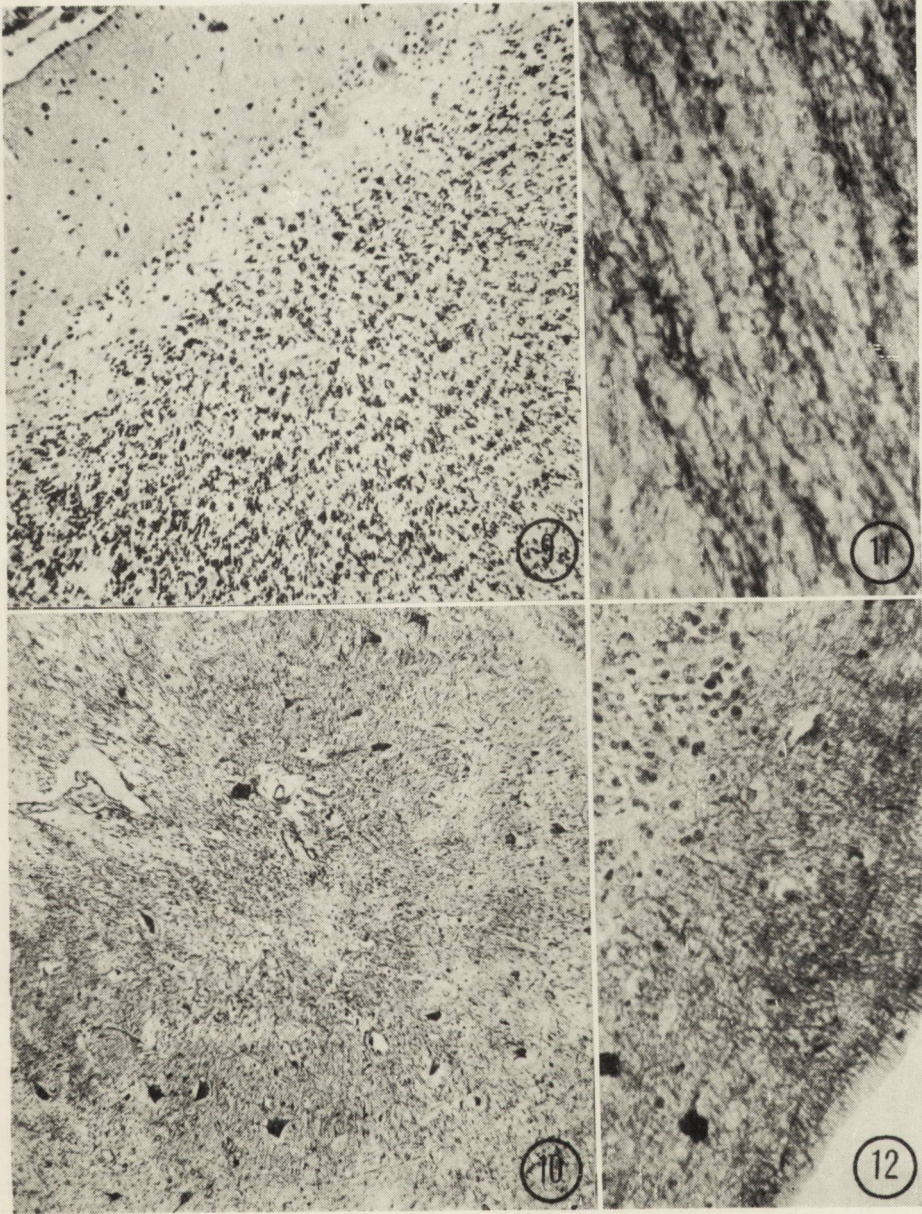
Fig. 7. Proliferation of glia in Bergmanns cells layer. Cresyl violet. X 100.

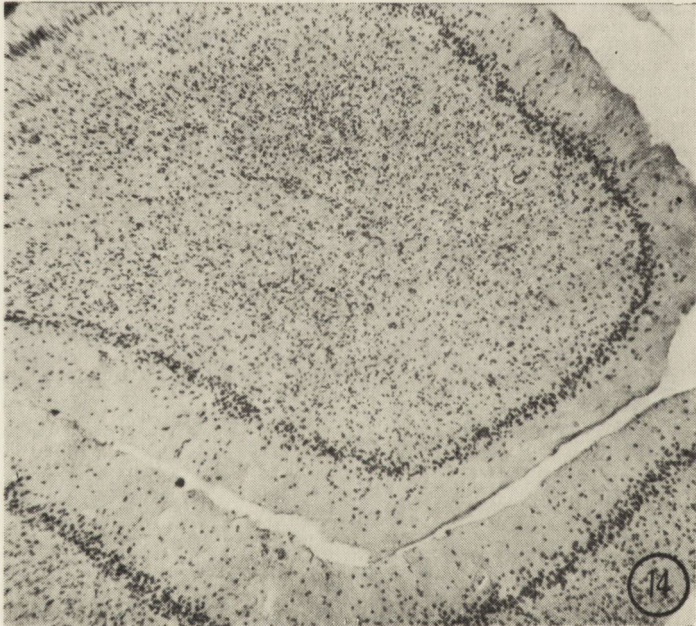
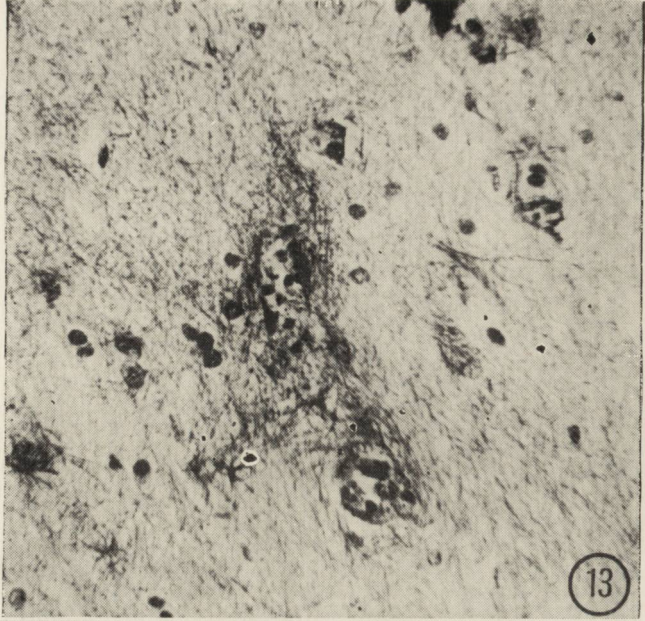
Ryc. 8. Krzaczkę glejowe w warstwie drobinowej. Nissl. Pow. 200 X.

Fig. 8. Glial shrubs in cerebellar molecular layer. Nissl. X 200.









nego. W 12 przypadkach obserwowano zaniki mózgu, najbardziej nasilone w płatach czołowych i ciemieniowych. W 3 przypadkach stwierdzono zmniejszenie objętości mózdzku ze skróceniem wysokości płacików, (głównie w obrębie części grzbietowej robaka) i zwężeniem istoty białej.

W badaniu mikroskopowym mózdzku *) we wszystkich przypadkach liczba komórek Purkinjego uległa redukcji, stopień nasilenia ubytków był jednak różny. Spostrzegano zaniki pojedynczych komórek Purkinjego, niekiedy ubytki obejmowały 1/3 ich liczby a czasami w obrębie poszczególnych płacików zachowane były tylko pojedyncze komórki Purkinjego. Te rozległe ubytki obserwowano przede wszystkim na dnie rowków i wokół rowków (18 przypadków) (ryc. 1), a na wypukłości listeczków obserwowano je rzadko (7 przypadków). Ubytkom komórek Purkinjego towarzyszyło z reguły przerzedzenie warstwy ziarnistej (ryc. 2) (18 przypadków) lub plackowate „wyłysienie” (ryc. 3) (8 przypadków), zwłaszcza w obrębie dna rowków. Zwężenie warstwy ziarnistej było obecne w 13 przypadkach, a warstwy drobinowej w 5 przypadkach. W 9 przypadkach obserwowano przemieszczenie komórek Purkinjego do warstwy drobinowej (ryc. 4), a w 3 przypadkach do warstwy ziarnistej. Zachowane komórki Purkinjego wykazywały często zmiany wsteczne. Najczęściej obserwowano schorzenie homogenizacyjne (27 przypadków), bardzo rzadko stłuszczenie (3 przypadki). Bardzo często obserwowano rozdęte dendryty, przypominające rogi renifera (ryc. 5), a w impregnacji srebrem widoczne było pogrubienie włókienek nerwowych. W obrębie aksonów komórek Purkinjego obecne były kuliste i wrzecionowate rozdęcia tzw. torpedy (ryc. 6). W miejscu ubytków komórek Purkinjego

Ryc. 9. Ogniskowe zgąbczenia w warstwie komórek Purkinjego, przechodzące na warstwę ziarnistą. H.—E. Pow. 100 X.

Fig. 9. Focal spongy changes in Purkinje cells layer extending into granular layer. H.—E. X 100.

Ryc. 10. Rozległe ubytki komórek nerwowych w jądrze zębatym. Zgąbczenia we wnętrzu. Bielschowsky. Pow. 100 X.

Fig. 10. Extensive loss of nerve cells in dentate nucleus. In hilus spongy changes. Bielschowsky. X 100.

Ryc. 11. Rozpad osłonek mielinowych w osiach listeczków mózdzku. Weil. Pow. 400 X.

Fig. 11. Disintegration of myelin sheaths in cerebellar folia. Weil. X 400.

Ryc. 12. Wzmószona glejoza włóknista podoponowa. Kanzler-Arendt. Pow. 200 X.

Fig. 12. Increased subpial fibrillary gliosis. Kanzler-Arendt. X 200.

Ryc. 13. Wzmószona glejoza włóknista okołonaczyniowa w istocie białej płacików. Kanzler-Arendt. Pow. 200 X.

Fig. 13. Increased fibrillary gliosis perivascularly in white mater of cerebellar folia. Kanzler-Arendt. X 200.

Ryc. 14. Niezupełna martwica listeczków. H.—E. Pow. 60 X.

Fig. 14. Incomplete necrosis of cerebellar folia. H.—E. X 200.

*) Szczegółowe badanie mózgow większości przypadków tej grupy jest przedmiotem doniesienia A. Jędrzejewskiej-Iwanowskiej.

obserwowano obrazy „pustych koszyczków”. W pojedynczych przypadkach liczba włókien pnących, kiciastych i równoległych uległa redukcji. Komórki warstwy ziarnistej tylko w 6 przypadkach były zmienione — obkurczone, nierównomiernie wybarwiają się.

Następnym elementem w strukturze procesu chorobowego był ogniskowy rozplem komórek glejowych warstwy Bergmanna (ryc. 7) oraz rozsia-ny rozplem i przerost mikrogleju. W 11 przypadkach obserwowano w warstwie drobinowej krzaczki glejowe (ryc. 8). Komórki warstwy Bergmanna układały się często w kilku rzędach i wybarwiały się bardzo jasno. W warstwie komórek Purkinjego i gleju Bergmanna występowało w 17 przypadkach ogniskowe zgąbczenie (ryc. 9), które w sposób groniasty przechodziło na warstwę ziarnistą.

W obrębie jądra zębatego w 24 przypadkach obserwowano bardzo znaczne ubytki komórek nerwowych, a zachowane neurony były obkurczone i wybitnie stłuszczały (ryc. 10). Zmianom tym towarzyszył rozplem astro- i mikrogleju.

W istocie białej zarówno w osi poszczególnych zawojów mózdzku jak i we wnętrzu jądra zębatego obserwowano spłowienie i rozpad osłonek mieliniowych (ryc. 11), głównie okołonaczyniowo. Wzmoczoną glejozę włóknistą w obrębie błon granicznych, podoponowo (ryc. 12), podwysciółkowo i okołonaczyniowo (ryc. 13) stwierdzono w 16 przypadkach. Zmiany stwardnieniowe w układzie tętnic mózdkowych obserwowano jedynie w 11 przypadkach, nie przekraczały one jednak III^o zmian. Zmiany okołonaczyniowe jak rozluźnienie struktury tkanki oraz jamki, występowały głównie w istocie białej wokół tętnic o średnicy powyżej 150 μ (w 21 przypadkach).

Podsumowując topografię zmian należy podkreślić, że w przeważającej liczbie przypadków nasilenie ubytków i schorzeń komórek Purkinjego było jednakowe w robaku jak i półkulach mózdzku, a tylko w 8 przypadkach zmiany w półkulach były bardziej nasilone niż w robaku. Listeczki położone głębiej, bliżej istoty białej płacików, były bardziej uszkodzone niż listeczki obwodowe. Nie znaleziono wyraźnych różnic w nasileniu zmian na powierzchni grzbietowej i brzusznej mózdzku.

Z przeprowadzonej korelacji między typem napadów i częstością ich występowania a opisanymi zmianami morfologicznymi wynika, że największe uszkodzenie tkanki było obecne w tych przypadkach, w których w czasie trwania schorzenia pojawiły się stany padaczkowe (17 przypadków). W tych przypadkach, niezależnie od częstości występowania pojedynczych napadów dużych, uszkodzenie parenchymy nerwowej było ciężkie. W mózdzku obserwowano znaczne, często rozległe ubytki komórek Purkinjego oraz przerzedzenie warstwy ziarnistej z odcinkowym rozplemem gleju warstwy Bergmanna i gleju Hortegi oraz występowa-

niem krzaczków glejowych. Często obserwowano schorzenia komórkowe i jamki okołonaczyniowe, a brzeżna glejoza włóknista była znaczna. W tej grupie pojawiły się też obrazy niezupełnej martwicy poszczególnych płacików (ryc. 14). Podobne nasilenie zmian obserwowano w 9 przypadkach z częstymi napadami dużymi, do 10 i więcej w ciągu miesiąca, w których nie występowały stany padaczkowe. W obu tych grupach więcej niż w połowie przypadków obserwowano ogniska zgąbczenia w obrębie warstwy komórek Pukinjego i gleju Bergmanna. Najmniejsze nasilenie ubytków komórek Purkinjego obserwowano w przypadkach, w których bardzo rzadko występowały duże napady (3—5 co kilka miesięcy) oraz w przypadkach, w których czas trwania schorzenia był stosunkowo krótki (do 4 lat). W miarę trwania choroby zwiększało się nasilenie uszkodzenia tkanki, zwłaszcza w przypadkach, w których pierwszy napad padaczkowy wystąpił po 40 roku życia. Nie znaleziono natomiast różnic w nasileniu uszkodzenia mózdzku pomiędzy przypadkami ze współistnieniem napadów dużych i stanów pomrocznych oraz przypadkami, w których obok dużych napadów występowały napady typu „petit mal”.

OMÓWIENIE

Zarówno typ zmian komórkowych jak i rozkład ubytków komórek Purkinjego oraz charakter reakcji glejowej, obserwowane w naszym materiale, sugerują podłoże ischemiczne uszkodzeń, jak podkreślała w swych pracach szkoła Spielmeyera. Wyjaśnienia tego zjawiska należy szukać po pierwsze w specyfice unaczynienia kory mózdzku, po drugie — w odmiennej wrażliwości poszczególnych elementów kory mózdzku na niedotlenienie (Scholz 1973). Warstwa komórek Purkinjego, jak wiadomo, z badań Jakuba (1928) i Uchimury (1929), jest pozbawiona własnej siateczki włóśniczek. W związku z tym staje się ona szczególnie wrażliwa na zakłócenia w krążeniu krwi w głównych pniach tętnicznych, które występują zarówno w czasie napadu jak i w okresie ponapadowym (Spielmeyer 1920, 1927). Uszkodzenie tej warstwy wyraża się obrzękiem wypustek Purkinjego, schorzeniem homogenizacyjnym czy przewlekłym a czasem zanikiem komórek Purkinjego. Pozostałe warstwy, z których każda oddzielnie posiada bardzo bogato rozwiniętą siatkę włóśniczek, lepiej kompensują te zaburzenia. Fakt ten tłumaczy, że uszkodzenie tych warstw było i w naszym materiale słabiej wyrażone. W grupie przypadków ze stanem padaczkowym czy z częstymi napadami dużymi uszkodzenie parenchymy w badanym materiale było bardziej nasilone w miarę trwania schorzenia. Sumowanie się działania czynnika szkodliwego doprowadziło w końcu do znacznych uszkodzeń ponapadowych i rozległych ubytków komórek Purkinjego, stanu zgąbczenia, przerzedzenia i zwięże-

nia warstwy ziarnistej, uszkodzenia osłonek mielinowych, wzmocnienia brzeżnej glejozy włóknistej, a nawet częściowego zaniku płacików, na co zwrócili uwagę w swoich badaniach doświadczalnych Schrappe (1955), Peiffer (1963, 1972), Scholz (1953, 1972), Dam (1972), Markiewicz i Ostrowska (1976) i inni. Spielmeyer wyodrębnił płacikowy zanik mózdzku jako zespół morfologiczny, specyficzny dla chorych cierpiących na padaczkę z długoletnim przeżyciem. Ustalone w późniejszych badaniach, podłoże naczyniowe tego zespołu tłumaczy lokalizację zaników płacikowych mózdzku odnosząc je do obszarów unaczynienia poszczególnych tętnic. Większe nasilenie uszkodzeń w centralnie położonych listeczkach w pobliżu istoty białej, obserwowano również w naszym materiale. Zastój krwi żyłnej, wywołany uciskiem naczyń oponowych w czasie napadu jest większy w głębokich odcinkach mózdzku, stąd też uszkodzenie parenchymy osiąga większe rozmiary w centralnie położonych listeczkach i płacikach.

Przesunięcie komórek Purkinjego do warstwy drobinowej, obserwowane w naszym materiale, chociaż opisywane sporadycznie (Scherer 1933, Meyer 1949, Scholz 1953) prawdopodobnie jest późnym następstwem obrzęku mózdzku, jak wykazał w swoich badaniach Jaburek (1936). Obserwowane w tych przypadkach przesunięcie komórek glejowych warstwy Bergmanna do warstwy drobinowej w innych częściach listeczków, rozdęte wypustki komórek Purkinjego, uszkodzenie osłonek mielinowych i wzmoczona okołonaczyniowa glejoza włóknista potwierdzają wspomnianą hipotezę. Koncepcja heterotopii przy przesunięciu komórek Purkinjego do warstwy drobinowej, wysuwana przez Vogta i Astwazaturowa (1912) nie znalazła potwierdzenia u późniejszych badaczy (Schob 1921, Gagel 1935, Meyer 1949), chociaż może być słuszna przy lokalizacji komórek Purkinjego w warstwie ziarnistej.

Uszkodzenie komórek nerwowych jądra zębatego, opisywane w piśmiennictwie (Peiffer 1963, Markiewicz, Dymecki 1968) występuje i w naszych przypadkach. W interpretacji tych zmian, poza udziałem zakłóceń w krążeniu krwi, należy wziąć pod uwagę możliwość zwyrodnienia transsynaptycznego (*degeneratio anterograda*) w następstwie uszkodzenia i zaniku komórek Purkinjego. Większe nasilenie zmian morfologicznych przy późniejszym początku choroby należy łączyć w naszym materiale z dosyć wysoką średnią wieku tej grupy (65 lat) i dodatkowym nakładaniem się zmian związanych z fizjologicznym starzeniem się tej struktury.

Uszkodzenie mózdzku w przebiegu padaczki i związane z tym wypadnięcie jego funkcji hamujących na korę mózgu w trakcie napadu może z kolei prowadzić do dalszego pogłębienia się uszkodzeń. Zmiany, a zwłaszcza ubytki komórek Purkinjego obserwowane w padaczce, próbowano łączyć również z toksycznym wpływem stosowanych leków, zwłaszcza dwufenylohydantoiny (Livingstone 1957, Haberland 1962, Kar-

kos 1972). Nie wszyscy autorzy zgadzają się z tą koncepcją i tak Dam (1970, 1972) nie znajdując zmian strukturalnych w mózdzku zwierząt doświadczalnych w czasie stosowania w dawkach leczniczych dwufenylohydantoiny, odrzuca jej wpływ toksyczny.

Zestawienie obrazu klinicznego z obrazem morfologicznym wykazuje w naszych przypadkach uderzającą rozbieżność między ciężkim uszkodzeniem struktur mózdzku a stosunkowo rzadko obserwowanym klinicznie zespołem mózdzkowym (7 przypadków). Spozrzegali to także inni autorzy (Scholz 1956, Peiffer 1963, Haberland 1962 i inni). Wyjaśnienia tego zjawiska należałoby szukać w dużej zdolności kompensacyjnej mózdzku, zwłaszcza przy powoli rozwijających się uszkodzeniach.

WNIOSKI

1. Mózdzek należy do struktur predylekcyjnie uszkodzonych w padaczce.
2. Proces chorobowy rozwija się głównie w warstwie komórek Purkiniego i w warstwie gleju Bergmanna.
3. Zmiany chorobowe kształtują się w podobny sposób w filogenetycznie odrębnych częściach mózdzku a ich topografia jest uzależniona od specyfiki angioarchitektoniki mózdzku.
4. Na nasilenie zmian morfologicznych w mózdzku największy wpływ ma występowanie stanów padaczkowych, częstotliwość napadów typu „grand mal” oraz czas trwania schorzenia.

E. Tarnowska-Dидушко

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА МОЗЖЕЧКА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

Резюме

Целью работы была оценка структуры и топографии изменений при эпилепсии для установления корреляции этих изменений с типом и частотой припадков.

Материал охватывал 30 случаев в возрасте от 22 лет до 81 года. Время продолжительности болезни колебалось от 1 до 39 лет. Частота приступов колебалась от одиночных больших приступов раз на несколько месяцев до 10 и более в течение одного месяца.

Было обнаружено, что структурные изменения развиваются, в основном, в слое клеток Пуркинье и касаются как цитоплазмы, так и отростков этих клеток. В 9 случаях наблюдалось перемещение клеток Пуркинье в зернистый слой, что является, по-видимому, более поздним последствием отека. Уменьшение количества клеток Пуркинье сопровождалось размножением глиальных клеток в слое Бергмана. Кроме того, наблюдалось повреждение миолиновых оболочек в белом веществе, увеличение волокнистого глиоза и очагового разрыхления коры мозжечка. Часто можно было наблюдать значительное уменьшение числа

клеток в зубчатом ядре. Локализация и характер изменений в коре мозжечка указывают на их ишемическое происхождение. Возникают они подобным образом в филогенетически различных структурах мозжечка и их топография связана, главным образом, с архитектурой сосудов этой структуры.

На интенсивность морфологических изменений больше всего влияют эпилептические состояния, частота приступов типа „grand mal”, а также длительность заболевания.

E. Tarnowska-Dziduszko

CEREBELLAR CHANGES IN THE COURSE OF EPILEPSY

Summary

The aim of the present study was to evaluate the character and topography of changes in cerebellum caused by epilepsy and to establish the dependence of structural abnormalities on the type and frequency of seizures. The material comprised 30 cases, 22-81 years of age. The duration of epilepsy was from 1 year up to 39 years. Frequency of epileptic fits varies from single attacks in several months up to 10 and more fits monthly.

It was found that structural abnormalities in cerebellum of epileptic patients develop especially in the Purkinje cells layer affecting cytoplasm and processes of these cells. Dislocation of Purkinje cells into granular layer was observed in 9 cases being probably the late consequence of brain edema. Loss of Purkinje cells was accompanied by proliferation of Bergmanns' glia. Further observations included damage of myelin sheaths in white matter, increase of physiological subpial, subependymal and perivascular gliosis and focal spongy changes in cerebellar cortex. Extensive losses of nerve cells were frequently noticed in dentate nucleus.

The character and localization of structural abnormalities in cerebellar cortex suggest their ischemic origin. The pathological changes develop in the like manner in phylogenetically different structures. The topography of these changes is determined chiefly by the cerebellar angioarchitectonics. The intensity of changes mainly depends on epileptic states, frequency of grand fits and the duration of illness.

PIŚMIENNICTWO

1. Cooke P. M., Snider R. S.: Some cerebellar influences on elektrycally induced cerebral seizures. *Epilepsia* 1955, 4, 19—24.
2. Dam M.: The number of Purkinje cells after diphenylhydantoin intoxication in monkeys. *Epilepsia* 1970, 11, 199—206.
3. Dam. M.: The density and ultrastructure of the Purkinje cells following diphenylhydantoin treatment in animals and man. *Acta Neurol. Scand.* 1972, Suppl. 49, Vol. 48.
4. Gagel O.: cyt. za Meyerem J. E.
5. Haberland C.: Cerebellar degeneration with clinical manifestation in chronic epileptic patients. *Psychiat. et Neurol. (Basel)* 1962, 143, 29—44.
6. Jaburek L.: Hirnödem und Hirnschwellung bei Hirngeschwülsten. *Arch. Psychiat.* 1936, 104, 518—547.
7. Jakob A.: Zum Problem der morphologischen und funktionellen Gliederung des Kleinhirns. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1928, 105, 217—233.

8. Jędrzejewska-Iwanowska A.: Obraz morfologiczny tworów siatkowatego międzymózgowia i pnia mózgu w padaczce. *Neuropat. Pol.*, 1976 w druku.
9. Karkos J.: Wpływ leków przeciwpadaczkowych na obraz morfologiczny mózdzku szczurów. *Neuropat. Pol.* 1973, 4, 427—439.
10. Liebers M.: Über Kleinhirnatrophien bei Epilepsie nach epileptischen Krampfanfällen. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1928, 739—759.
11. Livingstone S.: Drug therapy for childhood epilepsy. *J. Chron. Dis.* 1957, 6, 46—80.
12. Markiewicz D., Dymecki J.: Zmiany neuropatologiczne w padaczce z zaburzeniami zachowania i intelektu. *Neur. Neurochir. Pol.* 1968, 3, 351—363.
13. Markiewicz D., Ostrowska D.: Zmiany podgrawkowe w mózgu myszy z padaczką audiogenną. *Neuropat. Pol.* 1976 w druku.
14. Meyer J. E.: Über mechanische Lagerveränderungen der Purkinjezellen der Kleinhirnrinde. *Arch. Psychiat.* 1949, 181, 736—747.
15. Normann R. M.: The neuropathology of status epilepticus. *Med. Scien.* 1964, 4, 46—51.
16. Peiffer J.: Morphologische Aspekte der Epilepsie. W: *Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie.* J. Springer Berlin, 1963, 100, 1—185.
17. Peiffer J.: Zur Neuropathologie der Epilepsie. W: *Modern Problems of Pharmacopsychiatrie.* S. Karger — Basel, 1970, IV, 42—70.
18. Scherer H. J.: Beiträge zur pathologischen Anatomie des Kleinhirns III. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1933, 145, 335—405.
19. Schob F.: cyt. za Meyerem J. E.
20. Scholz W.: Genuine Epilepsie und Hirnprozess. *Klin. Wschr.* 1929, 231—7.
21. Scholz W.: Über die Entstehung des Hirnbefundes bei der Epilepsie. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1933, 145, 471—516.
22. Scholz W.: Selective neuronal necrosis and its topistic patterns in hypoxemia and oligemia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1953, 12, 249—280.
23. Scholz W.: Les lésions cérébrales reconstruées chez les épileptiques. *Acta Neurol. Psychiat. Belgica* 1956, I, 43—60.
24. Scholz W.: Cerebral changes due to convulsive disorders. W: *Pathology of the nervous system.* J. Mincler-M. Grow Hill-Comp., New York 1973, 2635—2655.
25. Schrappe O.: Frühschäden des Kleinhirns. *Arch. Psychiat. u. Neurol.* 1955, 193, 229—242.
26. Spielmeyer W.: Über einige Beziehungen zwischen Ganglienzellveränderungen und gliösen Erscheinungen besonders am Kleinhirn. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1920, 54, 1—39.
27. Spielmeyer W.: Die Pathogenese des epileptischen Krampfes. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1927, 109, 501—521.
28. Uchimura Y.: Über die Blutversorgung der Kleinhirnrinde und ihre Bedeutung für die Pathologie des Kleinhirns. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1929, 120, 774—783.
29. Vogt O., Astwazaturow M.: cyt. za Meyerem J. E.
30. Zimmermann H. M.: The histopathology of convulsive disorders in children. *J. Pediat.* 1938, 13, 859—890.

Adres autorki: Zakład Neuropatologii, Instytut Psychoneurologiczny, ul. Sobieskiego 1/9. 02-957 Warszawa.

dok. ze str. 10

W 1975 r. następujący koledzy uzyskali nagrody i wyróżnienia: — kol. J. Rafałowska z Kliniki Neurologicznej A. M. w Warszawie otrzymała nagrodę Rady Naukowej MZiOS za najlepszą pracę drukowaną w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej (wspólnie z K. Mroźkiem i A. Kamińską);

— kol. A. Fidziańska-Dolot otrzymała I nagrodę Polskiego Towarzystwa Neurologicznego za cykl badań ultrastrukturalnych w chorobach mięśni;

— kol. M. Ostenda otrzymała III nagrodę PTN za pracę nad histochemią wrzescion mięśniowych (wspólnie z H. Strugalską).

* * *

W maju 1975 przebywał w Polsce prof. Rudolf Fankhauser, dyrektor Instytutu Neurologii Porównawczej w Bernie (Szwajcaria). Na posiedzeniu Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich w dniu 17 maja prof. Fankhauser wygłosił referat, dotyczący aktualnych problemów neurologii i neuropatologii porównawczej ze szczególnym uwzględnieniem organizacji i programu badawczego Instytutu Neurologii Porównawczej w Bernie.

Jerzy Dymecki

ANTONI LEŻNICKI, MARIA RÓŻAŃSKA, JERZY DYMECKI

EFFECT OF AUDIOGENIC SEIZURES ON THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES OF THE MOUSE BRAIN- *)

Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, Warsaw

Head of Dept.: Doc. J. Dymecki M. D.

Department of Biochemistry, Institute of Biology, Copernicus University, Toruń,

Head of Dept.: Prof. P. Maślowski, Ph. D.

An epileptic seizure is a stereotyped reaction of the central nervous system (CNS) to various kinds of physical or chemical injuries and is characterized by violent electrical discharges involving single neurons or whole neuronal population. Morphological studies have revealed occasional degenerative changes in the epileptogenic region of the cortex (Dymecki, 1971). However, in spite of a great deal of morphological and electrophysiological research, the molecular mechanism underlying convulsive fits still remains virtually unknown. Also little is known of the biochemical changes in the CNS resulting from isolated or repeated epileptic fits. Many authors suggest that convulsive fits may be induced by disturbances in the ionic equilibrium, or else by some disorders in the metabolism of neurotransmitters of the CNS (Creutzfeldt, 1972; De Robertis, 1971; Donaldson et al., 1972; Wood and Peesker, 1972). Since the ionic equilibrium and the metabolism of neurotransmitters in the brain are controlled by appropriate enzyme systems, it is to be expected that neurochemical changes in the CNS connected with the occurrence of convulsive fits should concern these enzyme systems. On this assumption we decided to investigate the effect of convulsive fits on the activity of enzymes participating in the energy transformations of the CNS (Mg^{++} -ATPase, succinate decarboxylase), of those involved in metabolizing the neurotransmitters (glutamate dehydrogenase, acetylcholinesterase and monoamine oxidase) and in maintaining the ionic equilibrium (Na^+ - K^+ -ATPase). The studies were carried out on the model of audiogenic epilepsy in mice, which resembles most closely reflexive epilepsy in man.

*This work was carried out under project 09.4.1.3.3.6. supported by the Polish Academy of Sciences.

MATERIAL AND METHODS

The mice used for study were 2—3-month-old males with an inborn susceptibility to convulsive seizures in response to strong acoustic stimulus. Each animal in turn was placed in a plexiglass vessel 20 cm in diameter and 20 cm high, and exposed to the sound of an electric door-bell of about 100 dB intensity for 5—12 seconds. The experiments were carried out on three groups of animals: a) control, in which no seizures were evoked, b) subjected to a series of 12 seizures in one day (serial seizures) and c) exposed to one seizure daily for 30 days (isolated seizures).

After the last fit the animals were decapitated in the clonic phase, the brain (without the cerebellum) was removed and homogenized in 9 volumes of ice-cold distilled water (for determination of the activities of acetylcholinesterase and succinate dehydrogenase); 0.32 M sucrose solution (for assay of monoamine oxidase, Mg^{++} -ATPase and Na^+ - K^+ -ATPase activities), or of the medium for assay of glutamate decarboxylase. Prior to assays the homogenates were diluted to the appropriate concentration. The homogenates assigned for determination of Mg^{++} - Na^+ - K^+ -ATPase activity were centrifuged by the modified method of Kurokawa et al. (1965) in order to obtain a microsomal fraction and nerve endings-enriched fraction (Diagram 1).

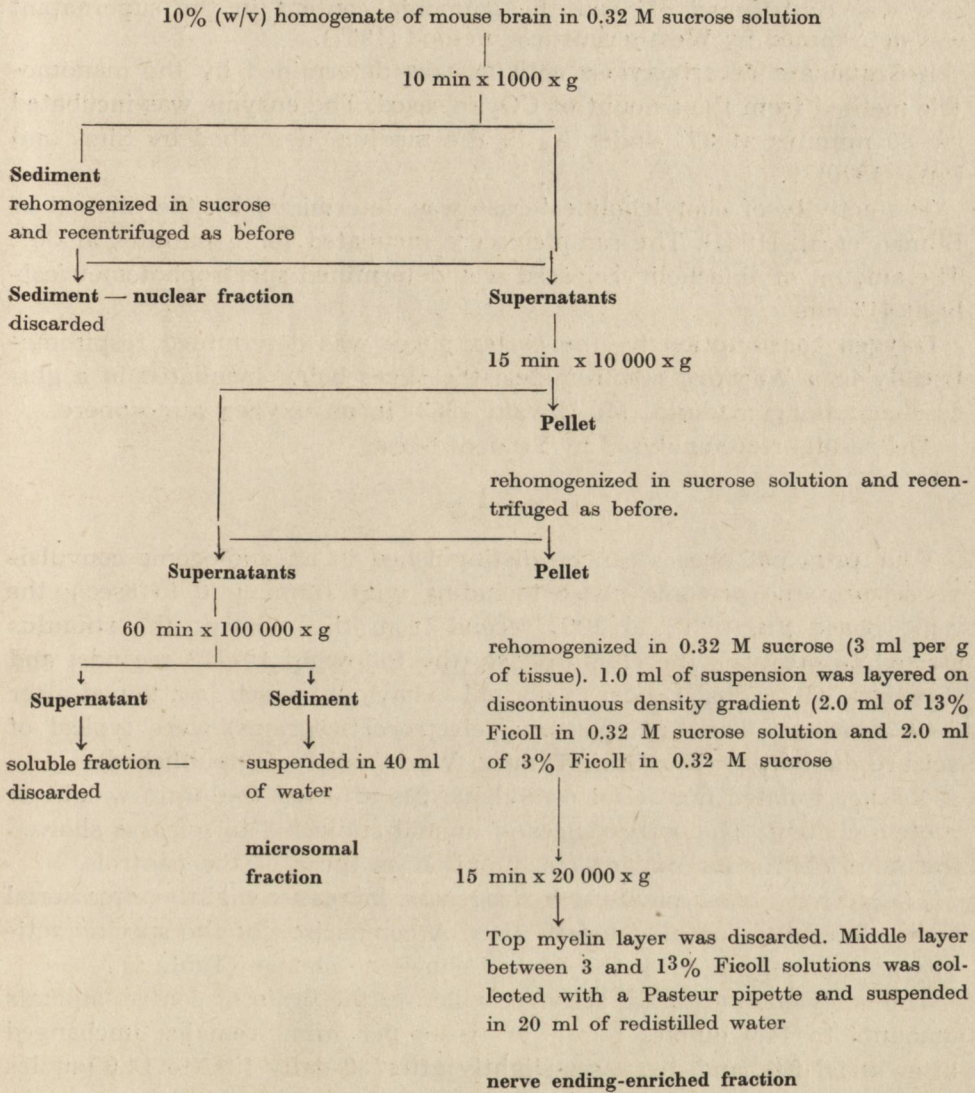
Protein in brain homogenates was determined by the biuret method in the presence of 5% of sodium deoxycholate. Protein content in the subcellular fraction was determined by the method of Lowry et al. (1951) with crystalline bovine serum albumin as standard.

Total Mg^{++} - Na^+ - K^+ -ATPase activity was determined in the incubation medium as described by Abdel-Latif et al. (1967). The samples were incubated for 10 minutes at 37°, after which the released inorganic phosphate (Pi) was determined according to Banerjee et al. (1970). Mg^{++} -ATPase activity was determined by the same procedure in a medium containing additionally 0.4mM ouabain. Na^+ - K^+ -ATPase activity was calculated from the difference between the total activity of Mg^{++} - Na^+ - K^+ -ATPase and that of Mg^{++} -ATPase.

Succinate dehydrogenase was assayed in an incubation medium containing 0.125 M succinate and 0.1% iodo-nitrotetrazolium chloride (INT) in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.4; 0.5% homogenates were used for the assays; the samples were incubated for 10 minutes at 37%. The reaction was stopped by adding a mixture of ethyl acetate: ethanol (1:1, v/v) containing 5% TCA; after shaking the samples the extracted INT-formazan was determined spectrophotometrically at 470 nm.

Diagram 1

Schemat 1



The activity of monoamine oxidase in the mitochondrial fraction of brain was determined from the amount of ammonia released. The mitochondrial fraction was obtained by centrifuging (30 min. \times 20 000 \times g). a 10% homogenate in 0.32 M sucrose, then the sediment was suspended in water (osmotic shock) and used for assays. The incubation mixture contained 2.5 mM tyramine solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5; the final volume of the samples being 0.5 ml. After incubating the

samples for 30 minutes at 37°, 0.5 ml of 2% sodium tungstate solution in 0.3 N sulphuric acid was added to each sample. The precipitated protein was centrifuged off and the ammonia content in the supernatant was determined by Weatherburne's method (1967).

L-Glutamate decarboxylase activity was determined by the manometric method from the amount of CO₂ released. The enzyme was incubated for 30 minutes at 37° under N₂ in the medium described by Sims and Pitts (1970).

The activity of acetylcholinesterase was determined by the method of Ellman et al. (1961). The samples were incubated for 5 minutes at 30°. The amount of thiocholin released was determined spectrophotometrically at 412 nm.

Oxygen consumption by the cortex slices was determined respirometrically in a Warburg respirometer; the slices being incubated in a glucose-containing medium (Mc Illwain 1963) in an oxygen atmosphere.

The results were analysed by Student t-test.

RESULTS

Four principal phases can be distinguished in an audiogenic convulsive seizure: the pretonic phase including wild running (0 to 6sec.), the tonic phase (from 6th to 20th second from the moment the stimulus started to operate), the clonic phase (the following 10—12 seconds) and the phase of gradual return to normal behaviour, which is attained after 3—4 minutes. The EEG patterns (electrocorticograms) were typical of seizure discharges (Narębski, Tymicz, Waczyńska — unpublished).

Neither isolated nor serial convulsive fits affected the brain weight or protein content. The cortex slices of animal subjected to seizures showed the same ability for oxygen consumption as those of the controls.

The activity of succinate dehydrogenase increases slightly after serial and isolated fits repeated for 30 days. A comparison of the specific activity of this enzyme with the control shows no change (Table 1).

The acetylcholinesterase activity, which in the brain of control animals amounts to 14.9 μ moles per g of tissue per min., remains unchanged after serial fits, and decreases slightly after 30 daily fits (to 14.0 μ moles per g of tissue per min.). The decrease in activity of this enzyme to 0.119 μ moles per mg of protein per min. after this kind of seizures is statistically significant when compared with the specific activity of the enzyme in control animals, which amounts to 0.128 μ moles per mg of protein per min (Table 2).

The activity of monoamine oxidase increases by 15% after serial fits; a similar increase was observed after 30 isolated fits, but was not statistically significant.

Table 1. Effect of audiogenic fits on succinate dehydrogenase and respiration of cortex slices from mouse brain

Tabela 1. Wpływ audiogennych napadów drgawkowych na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej oraz na oddychanie skrawków kory mózgu myszy

Group of animals Grupa zwierząt	Oxygen uptake (μ moles of O ₂ /min per 1 g of cortex) Zużycie tlenu (μ moles O ₂ /min/g kory)	Succinate dehydrogenase activity Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej	
		total activity (μ moles/min/g of tissue) całkowita (μ moles/min/g tkanki)	specific activity (μ moles/min/mg of protein) specyficzna (μ moles/min/mg białka)
Control, no seizures evoked Kontrolna, nie poddana napadom	1.07 ± 0.16 (14)	43.9 ± 2.8 (12)	0.36 ± 0.03 (12)
Subjected to a series of 12 seizures in one day Po jednej serii 12 napadów, wywołanych w ciągu dnia	1.06 ± 0.19 (14)	47.4 ± 3.5 (10)	0.34 ± 0.01 (10)
One seizure evoked daily during a one month Poddawana 1 napadom dziennie przez 30 dni	1.00 ± 0.14 (4)	49.7 ± 0.1 (4)	0.35 ± 0.02 (4)

The results are expressed as the mean ± S.D. with the number of animals used in parenthesis

Wyniki są wartościami średnimi ± odchylenie standardowe, w nawiasach podano liczbę zwierząt użytych w doświadczeniu.

Table 2. Effect of audiogenic seizures on neurotransmitter-metabolizing enzyme activities in mouse brain

Tabela 2. Wpływ audiogennych napadów drgawkowych na aktywność enzymów mózgu myszy, związanych z przemianami neurotransmiterów

Group of animals Grupa zwierząt	L-Glutamate decarboxylase activity (μ moles of CO ₂ /min/g of tissue) Aktywność dekarboksylazy L-glutaminianu (μ moli CO ₂ /min/g tkanki)	Acetylcholinesterase activity: total (μ moles/min/g of tissue) Aktywność acetylocholinesterazy: całkowita (μ moli/min/g tkanki)	activity: specific (μ moles/min/mg of protein) specyficzna (μ moli/min/mg białka)	Monoamine oxidase activity (μ moles of ammonia/min/g of tissue) Aktywność monoaminooksydazy (μ moli NH ₄ ⁺ /min/g tkanki)
Control, no seizures evoked Kontrolne, nie poddane napadom	1,00 ± 0,07 (10)	14,9 ± 0,11 (7)	0,128 ± 0,003 (7)	0,102 ± 0,007 (11)
Subjected to a series of 12 seizures in one day Poddana 1 serii 12 napadów w ciągu dnia	1,00 ± 0,17 (15)	14,9 ± 0,31 (4)	0,131 ± 0,006 (4)	0,117 ± 0,014 (9) P < 0,01
One seizure evoked daily during a month Poddawana 1 napadowi dziennie przez 30 dni	1,03 ± 0,12 (4)	14,0 ± 0,21 (4)	0,119 ± 0,002 (4) P < 0,001	0,118 ± 0,036 (4)

All results are expressed as the mean \pm standard deviation with the number of animals used in experiments in parenthesis.

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi \pm odchylenie standardowe; w nawiasach podano liczbę zwierząt użytych w doświadczeniu.

Table 3. Effect of audiogenic seizures on Mg^{++} -ATPase and Na^{+} - K^{+} -ATPase activities in microsomal fraction of the mouse brainTabela 3. Wpływ audiogennych napadów drgawkowych na aktywności Mg^{++} -ATPazy i Na^{+} - K^{+} -ATPazy z mikrosomalnej frakcji mózgu myszy

Group of animals Grupa zwierząt	Protein content in whole fraction (mg) Zawartość białka we frakcji (mg)	Total Mg^{++} - Na^{+} - K^{+} -ATPase activity Całkowita aktywność Mg^{++} - Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Total Mg^{++} -ATPase activity Całkowita aktywność Mg^{++} -ATPazy	Change of total Mg^{++} -ATPase activity as compared with control (%) Zmiany aktywności Mg^{++} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)	Total activity of Na^{+} - K^{+} -ATPase Całkowita aktywność Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Changes of Na^{+} - K^{+} -ATPase activity as compared with control (%)	Zmiany aktywności Na^{+} - K^{+} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)	Specific activity of Na^{+} - K^{+} -ATPase Aktywność specyficzna Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Changes of specific activity of Na^{+} - K^{+} -ATPase as compared with control (%) Zmiany aktywności specyficznej Na^{+} - K^{+} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)
Control, no seizures evoked Kontrolna nie poddana napadom audiogennym	7.52 ± 0.81 (9)	4.58 ± 0.43 (9)	2.17 ± 0.24 (9)	—	2.42 ± 0.58 (9)	—	0.320 ± 0.098 (9)	—	
Subjected to a series of 12 seizures in one day Po serii 12 napadów wywołanych jednorazowo w ciągu dnia	9.23 ± 0.85 (8)	5.05 ± 0.25 (8)	2.43 ± 0.18 (8) P < 0.05	+12	2.57 ± 0.17 (8)	+6	0.277 ± 0.020 (8) P < 0.1	-14	
One seizure evoked daily during a one month Poddana 1 napadowi dziennie przez okres miesiąca	6.47 ± 0.92 (16)	4.69 ± 0.29 (7)	2.35 ± 0.11 (7)	+8	2.40 ± 0.27 (7)	-1	0.330 ± 0.033 (7) P < 0.1	+3	

Total enzyme activity is expressed as μ moles of Pi released per minute, and specific activity as μ moles of Pi per minute, per mg of protein. The results are means \pm S.D. with the number of animals used in parenthesis.

Całkowite aktywności enzymatyczne w frakcji mikrosomalnej są wyrażone w μ molach Pi/min., aktywności specyficzne — w μ molach Pi/min/mg białka. Wyniki są wartościami średnimi \pm odchylenie standardowe, w nawiasach podano liczbę zwierząt użytych do doświadczeń.

In the microsomal fraction a slight increase in protein content was observed after 30 isolated daily fits; in either case the differences were statistically non-significant. Mg^{++} -ATPase activity in this fraction increased by 12% after serial fits, but showed no change after 30 isolated fits. The total activity of Na^+ - K^+ -ATPase in the microsomal fraction did not change significantly in any group of animals (Table 3).

In the synaptosomal fraction no change in protein content was observed in any group of animals (Table 4). Conversely to the corresponding microsomal enzyme, the Mg^{++} -ATPase of the nerve endings-enriched fraction shows a decrease in activity by 29% after serial seizures. The isolated 30 fits had no effect on the activity of the enzyme. The activity of Na^+ - K^+ -ATPase in this fraction shows a statistically non-significant decrease after serial fits, the specific activity of the enzyme shows no change (Table 4). After 30 isolated daily evoked convulsive fits there followed a significant increase in the activity of Na^+ - K^+ -ATPase in the whole fraction, from 3.30 μ moles of Pi/min. to 4.57 μ moles of Pi/min, i.e. a 38% increase. A similar increase (+41%) was found in the specific activity of the enzyme in animals of this group compared with the control group (Table 4).

DISCUSSION

Various models of experimental epilepsy are used to study the neurochemical changes connected with the occurrence of a convulsive seizure. Some of these models are obtained by mechanical or chemical irritation of the cortex (after topical application of alumina paste, tungstic acid gel, cobalt powder, penicillin, or ouabain), others by i.v. or i.p. injection of metrazol, hydrazides, allylglycine, mercaptopropionic acid, methionine sulphoximine and a number of other chemical compounds. In this type of models, however, artifacts are unavoidable because of the non-specific effects of convulsants: thus e.g. hydrazides affect to a larger or smaller extent all pyridoxal phosphate dependent enzymes; Co^{++} ions may affect the activity of enzymes containing — SH groups in their molecules. The model used in the present study was that of audiogenic epilepsy, considered by some authors the most physiological and resembling reflexive epilepsy (Simler et al., 1973). The electrocorticograms recorded during seizure in our laboratory showed a typical seizure-like pattern of the bioelectric discharges (Narebski, Tymicz, Waczyńska — unpublished). An additional advantage of the model selected for study is the fact that the seizure can be triggered at any time, which is essential for planning the experiment. Recovery after seizure proceeds at a relatively quick rate (in 3—4 minutes) what agrees with earlier reports of other authors (Ferrendelli, McDougal, 1971).

Table 4. Effect of audiogenic seizures on Mg^{++} -ATPase and Na^{+} - K^{+} -ATPase activities in the synaptosome-enriched fraction of the mouse brainTable 4. Wpływ audiogennych napadów drgawkowych na aktywności Mg^{++} -ATPazy i Na^{+} - K^{+} -ATPazy we wzbogaconej w zakończenia nerwowe frakcji mózgu myszy

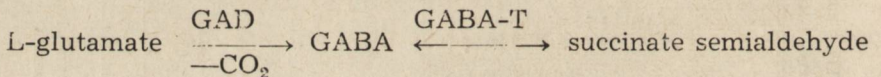
Group of animals Grupa zwierząt	Protein content in whole fraction (mg) Zawartość białka we frakcji (mg)	Total Mg^{++} - Na^{+} - K^{+} - ATPase activity Całkowita aktywność Mg^{++} - Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Total Mg^{++} -ATPase activity Całkowita aktywność Mg^{++} -ATPazy	Change of total Mg^{++} -ATPase acti- vity as compared with control (%) Zmiany aktywności Mg^{++} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)	Total Na^{+} - K^{+} -ATPase activity Całkowita aktywność Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Change of Na^{+} - K^{+} -ATPase activity as compared with control (%) Zmiany aktywności Na^{+} - K^{+} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)	Specific activity of Na^{+} - K^{+} -ATPase Aktywność specyficzna Na^{+} - K^{+} -ATPazy	Change of specific activity of Na^{+} - K^{+} - ATPase as compared with control (%) Zmiany aktywności specyficznej Na^{+} - K^{+} -ATPazy w porównaniu z kontrolą (%)
Control, no seizures evoked Kontrolna, nie poddana napadom drgaw- kowym	15.7 ± 2.75 (7)	6.48 ± 1.50 (7)	3.17 ± 0.68 (8)	—	3.30 ± 0.89 (8)	—	0.196 ± 0.036 (7)	—
Subjected to a series of 12 seizures in one day Po serii 12 napadów wywołanych jednorazowo w ciągu dnia	14.7 ± 1.05 (8)	5.12 ± 0.40 (8)	2.26 ± 0.14 (8) P < 0.01	-29	2.85 ± 0.32 (8)	-14	0.194 ± 0.010 (8)	-1
One seizure evoked daily during a one month Poddana 1 napadowi dziennie przez okres miesiąca	15.6 ± 1.97 (16)	7.54 ± 0.87 (16)	2.94 ± 0.74 (16)	-7	4.57 ± 0.44 (15) P < 0.001	+38	0.276 ± 0.028 (15) P < 0.001	+41

Total enzyme activity is expressed as μ moles of Pi released/min. per fraction, and specific activity as μ moles of Pi/min. per mg of protein. The results are means \pm S.D. with the number of animals used in parenthesis.

Aktywności całkowite podano w μ molach Pi/min./frakcję, aktywności specyficzne w μ molach Pi/min./mg białka. Wyniki są wartościami średnimi \pm odchylenie standardowe, w nawiasach jest podana liczba zwierząt użytych do doświadczenia.

Ultrastructural studies carried out by De Robertis et al. (1969, 1971) have shown that during a seizure evoked by administering metrazol or methionine sulphoximine, the astrocytes become considerably swollen owing to intake of water and electrolytes released from neurons, the swelling of the astrocytes results in constriction of the capillaries and transitory hypoxia of neurons; ultrastructural changes have also been observed in the nerve endings. No such investigations have been carried out as regards audiogenic seizure, but it seems that in this model of epilepsy changes in the CNS should be less drastic. In the present study no deleterious effect of audiogenic seizures on respiration of brain slices was found, which largely indicates normal metabolism (Table 1). The results of Ferrendelli and McDougal (1971) show that the disturbance of aerobic metabolism of the brain in an audiogenic seizure is of short duration. In the tonic-clonic phase there is an increase in anaerobic glycolysis and inhibition of aerobic metabolism. However, about 60 seconds after the start of operation of the epileptogenic stimulus the concentration of alpha-oxoglutarate returns to normal, and even shows a slight increase. Such temporary inhibition of aerobic metabolism has no effect on the activity of succinate dehydrogenase (Table 1).

Many authors believe that an important factor controlling the excitability of the nervous system is gamma-aminobutyric acid (GABA) (De Robertis, 1971; Wood, Peesker, 1972; Simler et al., 1973). This compound form as a result of irreversible decarboxylation of L-glutamic acid and is further converted to succinate semialdehyde:



Inhibition of the activity of L-glutamate decarboxylase (GAD) following the administration of hydrazides (Wood, Peesker 1972) results in a reduction of GABA concentration in the brain and leads to a release of convulsive seizure. The inhibition of the activity of GABA-alpha-oxoglutarate transaminase (GABA-T) as a results of the competitive action of n-dipropyl acetate seems, on the other hand, to protect the animals to a large extent against convulsive seizure (Simler et. al 1973).

Direct evidence as to whether or not the activity of glutamate decarboxylase became actually inhibited while the acoustic stimulus is in operation is impossible to obtain. The activity of this enzyme, as determined in the homogenates of the brains of animals subjected to seizures, did not differ from that in controls (Table 2). It must be stressed that GAD activity was assayed under standard conditions, in the presence of pyridoxal phosphate. It cannot be excluded that *in vivo* GAD activity may be controlled by the level of pyridoxal phosphate, which is loosely

bound to the enzymic protein. This presumption is supported by the fact that the administration of antivitamin B₆ (reducing pyridoxal phosphate level in the CNS) considerably increases the animal's susceptibility to convulsive seizures in spite of the apoenzyme GAD level remaining unchanged (Tapia et al., 1969). In order to get more information on this matter investigations are now being conducted on changes in the GABA and pyridoxal phosphate levels in various phases of audiogenic seizures.

No changes in acetylcholinesterase activity were found after serial fits, but after isolated daily fits repeated for 30 days the specific activity of the enzyme was found to be reduced by 7% (Table 2). This decline in activity may be connected with partial ultrastructural or molecular injury of the acetylcholinergic endings due to repeated violent discharges. Unlike the former enzyme, monoamine oxidase shows an increase of activity in the mitochondrial fraction after serial fits from 0.102 $\mu\text{mole/g}$ of tissue/min. to 0.117 $\mu\text{mole/g}$ of tissue/min. i.e. by 15% and a similar increase after repeated isolated fits (Table 2). The result obtained by Glebov et al. (1971) are different from ours: they found a decrease in MAO activity in all subcellular fractions of rat brain after an isolated electro-convulsive shock. It is difficult at present to account for this divergence, which may be due to the fact that the models of epilepsy studied in each case were different.

It seems that the change which involves the most serious consequences, is the disturbance of the ionic equilibrium in the CNS during seizure. A number of experimental facts point to the part played by transport $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in maintaining this equilibrium. This enzyme probably constitutes an integral part of the „sodium pump” (Skou, 1965; Hokin, 1969); in the brain it is bound to the microsomal (Jarnefeldt, 1961) and synaptosomal fraction (Kurokawa et al., 1965; Abdel-Latif et al., 1967).

After serial fits the protein level in the microsomal fraction was observed to increase by 22%, while the activity of $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$ increased by 12% (Table 3).

The total activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in this fraction increased by 6%, while the specific activity of the enzyme decreased by 14%. Isolated fits repeated for a month had no effect on the activity of either enzyme (Table 3). The protein level in the synaptosomal fraction shows no changes in animals subjected to audiogenic fits (Table 4). Unlike in the microsomal fraction, $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$ in the synaptosomal fraction shows a decline in activity after serial fits from 3,17 $\mu\text{moles of Pi/min}$ to 2.26 $\mu\text{moles of Pi/min}$, i.e. — 29%. A similar decrease in the activity of this enzyme was observed after electro-convulsive shocks by Glebov et al. (1971); after a lethal dose of metrazol, on the other hand, the changes in

activity were but slight (De Robertis et al., 1969). The differences may be due to the different effects of various convulsants on the mitochondrial membrane, with which the enzyme is bound.

The total activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in the synaptosomal fraction decreases after serial fits from 3.30 μmol s of Pi/min to 2.85 μmol s of Pi/min , although the specific activity of the enzyme remains unaltered (Table 4). Reports in the literature on the effects of convulsive fits (or of convulsants) on the activity of this enzyme are contradictory. Brown and Stone (1973) found no change in activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of dog brain after administering *in vivo* methionine sulphoximine and metrazol, while De Robertis et al. (1969) observed a significant increase in the activity of the enzyme 5 minutes after administering a lethal dose of metrazol. Hunt and Craing (1973) reported that at the site of cobalt lesion a 60% decrease in transport ATPase activity was observed, while in the contralateral epileptogenic mirror focus the enzyme activity remained unchanged. Since at the same time the nervous tissue in the epileptogenic focus was destroyed, the above mentioned authors believe that the decrease in $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity was due to nonspecific destruction of the nervous tissue, and had nothing to do with the convulsive fits the animals were subjected to.

The discrepancies in opinions as regards the effects of various convulsants on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity may stem from the fact that it was measured at various times after administering the drugs. On the whole, it seems that after a longer lapse of time from the moment of administering the convulsant the transport ATPase activity enhanced. This presumption is supported by the results obtained by Bignami et al. (1966) showing a 20% increase in the activity of the enzyme in question 16 hours after administering metrazol. Lewin and McCrimmon (1967), who induced the formation of an epileptogenic focus by freezing the cortex, also noted an increase in $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity 18 hours after inducing the lesion. In our studies a 41% increase in the specific activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was found in the synaptosomal fraction after 30 days of daily evoked isolated audiogenic seizures (Table 4). Since no increase in the protein content of this fraction was observed, it may be supposed that there occurs only a specific increase in the level of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Both in our case and in those of other authors mentioned above the increase in the activity of this enzyme takes place only some time after the convulsant has begun to act. It can, therefore, be suspected that the level of the synaptosomal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ is under hormone control. Walker et al. (1973) reported a considerable increase in c-AMP concentration in the brain during convulsive seizures. It is not unlikely that it is this compound that is responsible for the increase in

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in the synaptosomal membrane. Consequently, the increase in activity of this enzyme, which may result in an increased stability of the nerve-endings membranes, and so hinder release of the seizure, may be regarded as an adaptive response of the CNS to the convulsant stimulus. This presumption is supported by observations pointing to an increase in the resistance of mice to audiogenic seizure developed in the course of the experiment: towards the end of the experiment it was necessary to prolong the time of exposure to the stimulus from 8 to 12 seconds. This hypothesis, however, needs further studies to be confirmed.

A. Leźnicki, M. Różańska, J. Dymecki

WPLYW NAPADÓW PADACZKI AUDIOGENNEJ NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH ENZYMÓW MÓZGU MYSZY

Streszczenie

Badano wpływ napadów padaczki audiogennej na aktywność enzymów mózgu myszy, związanych z przemianami energetycznymi, z metabolizowaniem neurotransmiterów oraz utrzymaniem równowagi jonowej. Doświadczenia przeprowadzono na szczepie myszy genetycznie podatnych na audiogenne napady padaczkowe. Zwierzęta podzielono na 3 grupy: pierwszą, u której wywoływano serię 12 napadów w ciągu jednego dnia; drugą — u której wywoływano po 1 napadzie dziennie przez okres 30 dni oraz grupę kontrolną, u której nie wywoływano napadów.

Nie stwierdzono, by wywołane napady drgawkowe obniżały zdolność skrawków kory do oddychania, powodowały zmiany poziomu białka w mózgu lub wpływały na aktywność dehydrogenazy bursztynianu i dekarboksylazy L-glutaminianu. Aktywność specyficzna acetylocholinesterazy uległa obniżeniu o 70%, a aktywność specyficzna MAO zwiększała się o 16% po napadach wywoływanych przez miesiąc. Zwiększała się również aktywność mikrosomalnej $\text{Mg}^{++}\text{-ATPazy}$ o 8%, natomiast aktywność mikrosomalnej $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$ nie ulegała zmianom. We frakcji synaptosomalnej aktywność $\text{Mg}^{++}\text{-ATPazy}$ zmniejszała się po napadach o 70%. Specyficzna aktywność $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$ w tej frakcji nie zmieniała się po serii 12 napadów, wywołanych w ciągu jednego dnia, po napadach wywoływanych przez miesiąc wzrastała o 41%. Przedyskutowano możliwe przyczyny wzrostu aktywności tego enzymu.

A. Лезьницки, М. Рожаньска, Е. Дымецки

ВЛИЯНИЕ ПРИПАДКОВ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ МОЗГА МЫШЕЙ

Резюме

Исследовалось влияние припадков аудиогенной эпилепсии на активность ферментов мозга мышей, связанных с энергетическим обменом, с обменом нейротрансмитеров, а также сохранением ионного равновесия. Опыты проводились на линии мышей, генетически податливых и аудиогенным эпилептическим при-

падкам. Животных разделили на 3 группы: первую, у которой вызывали серию 12 припадков в течение одного дня; вторую, у которой вызывали по 1 припадку в день на протяжении 30 дней, и контрольную группу, в которой не вызывали припадков.

Вызванные судорожные припадки не снижали способности срезов коры к дыханию и не влияли на уровень белка в мозге и на специфическую активность сукцинатдегидрогеназы и декарбоксилазы L-глутаминовой кислоты. Специфическая активность ацетилхолинэстеразы снижалась на 7%, в то же время специфическая активность MAO увеличивалась на 16% после припадков, вызываемых в течение месяца. Увеличивалась также активность микросомной Mg^{++} — АТФ-азы (8%), в то время как активность микросомной $Na^+ — K^+ — АТФ-азы$ не изменялась. Активность Mg^{++} — АТФ-азы в синаптической фракции уменьшалась после припадков (7%); специфическая активность $Na^+ — K^+ — АТФ-азы$ в этой фракции не изменялась после однократной серии припадков, тогда как после припадков, вызываемых на протяжении месяца, увеличивалась на 41%. Обсуждаются возможные причины роста активности этого фермента.

REFERENCES

1. Abdel-Latif A. A., Brody J., Ramahi H.: Studies on sodium-potassium adenosine triphosphatase of the nerve endings and appearance of electrical activity in developing rat brain. *J. Neurochem.*, 1967, 14, 1133—1141.
2. Benerjee S. P., Dwosh I. L., Khanna V. K., Sen A. K.: Solubilization of guinea-pig kidney $Na^+ — K^+ — ATPase$ with Lubrol W and Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 211, 345—355.
3. Bignami A., Palladini G., Venturini G.: Effect of cardiazol on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of the rat brain in vivo. *Brain Res.*, 1966, 1, 413—414.
4. Brown D. J., Stone W. E.: Effects of convulsants on cortical adenosine triphosphatases. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 1461—1467.
5. Creutzfeldt O. D.: *Neurophysiologische Modelle der Epilepsie*. *Nervenarzt*, 1972, 43, 175—181.
6. De Robertis E., Alberici M., Rodriguez de Lores Arnaiz G.: Astroglial swelling and phosphohydrolases in cerebral cortex of metrazol convulsant rats. *Brain Res.*, 1969, 12, 461—466.
7. De Robertis E.: Studies on neurochemical changes in experimental epilepsy. *Triangle*, 1971, 10, 93—98.
8. Dymecki J.: *Patomorfologia zmian mózgowych w padaczce*. W: „Padaczka”, ed. Dowżenko A., PZWL, Warszawa, 1971, 28—41.
9. Ellman G. L., Courtney K. D.; Andres V., Featherstone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88—95.
10. Ferrendelli J. A., McDougal D. B.: The effect of audiogenic seizures on regional CNS energy reserves, glycolysis and citric acid cycle flux. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 1207—1220.
11. Glebov R. N., Shevtsov V. V., Grishankova E. V., Stalnaya I. D., Mezentsev A. N.: An investigation of the activity of ATP-ases and monoaminoxidase in subcellular fractions of rat brain in normalcy and in electroconvulsions. *Biul. Eksp. Biol. Med.*, 1971, 10, 36—38.

12. Hokin L. E.: On the molecular characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.*, 1969, 54, 327—342.
13. Hunt W. A., Craig C. R.: Alterations in cation levels and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -ase activity in rat cerebral cortex during the development of cobalt-induced epilepsy. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 559—567.
14. Jarnefeldt J.: Sodium stimulated adenosine triphosphatase in microsomes from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 48, 104—110.
15. Kurokawa M., Sakamoto T., Kato M.: Distribution of sodium-plus-potassium — stimulated adenosine triphosphatase in isolated nerve-ending particles. *Biochem. J.*, 1965, 97, 833—844.
16. Lewin E., McCrimmon A.: ATPase activity in discharging cortical lesions induced by freezing. *Arch. Neurol.*, 1967, 16, 321—325.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
18. Mc Illwain H.: Chemical exploration of the brain, Elsevier, Amsterdam, 1963.
19. Perez de la Mora M., Feria-Velasco A., Tapia R.: Pyridoxal phosphate and glutamate decarboxylase in subcellular particles of mouse brain and their relationship to convulsions. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 1575—1578.
20. Simler S., Ciesielski L., Maitre M., Randrianarisoa H., Mandel P.: Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain α -aminobutyric acid level. *Biochem. Pharm.*, 1973, 22, 1701—1708.
21. Sims K. L., Pitts F. N.: Brain glutamate decarboxylase — changes in the developing rat brain. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 1607—1612.
22. Skou J. C.: Enzymatic basis for active transport of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ across cell membranes. *Physiol. Rev.*, 1965, 15, 596—617.
23. Tapia R., Perez de la Mora M., Massieu G. H.: Correlative changes of pyridoxal kinase, pyridoxal 5' -phosphate and glutamate decarboxylase in brain during drug-induced convulsion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, 166, 257—266.
24. Walker J. E., Lewin E., Sheppard J. R., Cromwell R.: Enzymatic regulation of adenosine 3', 5' -monophosphate (cyclic AMP) in the freezing epileptogenic lesion of rat brain and in homologous contralateral cortex. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 79—85.
25. Weatherburne M. W.: Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analyt. Chem.*, 1967, 39, 971—974.
26. Wood J. D., Peesker S. J.: A correlation between changes in GABA metabolism and isonicotinic acid hydrazide -- induced seizures. *Brain Res.*, 1972, 45, 489—498.

Authors' address: Department of Biochemistry Institute of Biology, Copernicus University, 87—100 Toruń, Sienkiewicza str. 30/32.

MIECZYSLAW WENDER, HELENA FILIPEK-WENDER, JANINA STANISLAWSKA,
ANDRZEJ GONCERZEWICZ

CEREBRAL CHOLESTERYL ESTER COMPOSITION IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS *

Department of Neurology, Institute of Diseases of the Nervous System and
Sensory Organs

Department of Biochemistry, Institute of Physiological Sciences
Medical Academy, Poznań, Poland

The appearance of cholesteryl esters (CE) in the brain during demyelination has commonly been accepted as one of the characteristic biochemical events accompanying this pathological process. A comprehensive review of this problem has been presented by Adams et al. (1965). The accumulation of CE in the nervous tissue, which in normal conditions contains only trace amounts of these compounds, has been regarded as the final output of myelin lipid disintegration which is accomplished by the action of macrophages (Petrescu, 1969). The problem however seems to be somewhat more complex, as would appear from the observations made on triethyl-tin sulfate (TET) induced myelinopathy (Wender et al., 1973) and on experimental allergic encephalomyelitis (EAE), where cholesteryl esters are accumulated in conditions where there is no apparent myelin decomposition to be seen, where the lipomacrophage reaction is negligible and where sudanophilic deposits are not detectable.

In TET induced encephalopathy, the pathomorphological picture is essentially restricted to a cytotoxic edema in the white matter, rendering excess hydration of the myelin lamellae, where the fluid collects within the stratified myelin sheaths. In EAE instead, it is the inflammatory reaction that dominates in the pathomorphological picture in almost all animal species.

The mechanisms leading to esterification of cholesterol in the nervous system as well as the role played by CE are still badly understood. Since any more information about CE accumulation in the pathologically chan-

*) This investigation was supported by NIH PL. 480 Research Agreement No. 05-027-1.

ged nervous tissue may according to our believe contribute to a better understanding of mechanism responsible for the disintegration of myelin sheaths, we have undertaken a study on the CE composition of the brain affected by EAE, using a chromatographic technique which enables the separation of these esters according to the degree of unsaturation of their fatty acyl residues. We do hope that the knowledge of the fatty acid (FA) composition of CE appearing in the affected brain may, indirectly though, by evidencing changes in the CE composition that occur in the course of development of this experimental disease, improve our understanding of mechanisms underlying the formation of CE in the pathological brain.

MATERIAL AND METHODS

The experimental disease was evoked in guinea pigs by intradermal injection of lyophilized whole brain tissue supplemented with the Freund's adjuvant, as described by Kies et al. (1957). The animals were killed by decapitation at two different time intervals following injection of the antigen i.e. 14 days after immunization (the preparalytic stage of the illness) and 18—22 days after injection of the encephalitogenic mixture (the paralytic stage of EAE). The brains were instantly removed from the cranial vaults and specimens of the white and grey matters secured for chemical determinations. Macroscopic criteria for separation of the cerebral grey and white matter were adopted. The grey matter specimens consisted of all cerebral lobes and contained variable admixture of nerve fibres. The white matter specimens were derived from the corpus callosum, the radiate crown and portions of brain stem.

The experimental material from the paralytic stage of the illness was divided into two subgroups according to the intensity of inflammatory changes evidenced in histological slices derived from these specimens. One of these subgroups contained cases which demonstrated only moderate signs of inflammation i.e. either strong infiltrations in single brain regions or weak infiltrates present in several brain sections. The other group denoted as demonstrating strong inflammatory changes contained specimens which displayed scattered or diffuse infiltrates present in all or almost all brain regions, i.e. changes characteristic for this experimental disease.

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

Table 1. Cholesteryl ester content and composition in the cerebral white matter of guinea pigs with EAE

Tabela 1. Zawartość i skład estrów cholesterolu istoty białej mózgu świnek morskich z EAE

	Number of animals	Total CE in g/100 g of tissue dry weight Ogólna zawartość estrów cholesterolu w g/100 g tkanki suchej	Percent composition of cholesteryl esters Odsetkowy skład estrów cholesterolu					Fraction VI Fracja VI (5+6 ^d)
			Fraction I Fracja I (0 ^d)	Fraction II Fracja II (1 ^d)	Fraction III Fracja III (2 ^d)	Fraction IV Fracja IV (3 ^d)	Fraction V Fracja V (4 ^d)	
Normal animals Norma	10	0.11±0.01	13.6±1.4	16.4±1.7	7.4±0.9	32.0±2.5	11.7±0.8	18.9±2.1
Preparalytic period of EAE Okres przedporażenny EAE	10	0.41±0.03*	14.5±1.7	23.3±1.5*	7.2±0.6	31.5±1.4	11.2±0.3	12.3±1.5*
Paralytic period of EAE (total) Okres porażenny EAE (całość)	10	0.68±0.08*	16.9±1.8	26.8±3.2*	5.0±0.7*	34.3±3.1	9.3±1.4	7.7±1.0*
Paralytic period of EAE (intensive inflammatory changes) Okres porażenny EAE (silne zmiany zapalne)	5	0.33±0.06	16.4±1.9	25.5±2.8	6.1±0.8	32.6±2.2	10.9±2.2	8.5±1.0
Paralytic period of EAE (weak inflammatory changes) Okres porażenny EAE (słabe zmiany zapalne)	5	0.43±0.18	17.4±4.2	28.2±8.1	3.7±1.2	36.5±8.2	7.5±2.5	6.7±2.5

Mean ± SE

Średnia ± średni błąd średniej

* statistically significant at the level P<0.05

* statystycznie istotne na poziomie P<0.05

Fraction I — CE with saturated fatty acyl residues

Fracja I — EC z nasyconymi resztami acylowymi

Fraction II — CE with monoenoic fatty acyl residues

Fracja II — EC z jednokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction III — CE with dienoic fatty acyl residues

Fracja III — EC z dwukrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction IV — CE with trienoic fatty acyl residues

Fracja IV — EC z trzykrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction V — CE with tetraenoic fatty acyl residues

Fracja V — EC z czterokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction VI — CE with penta- and hexaenoic fatty acyl residues

Fracja VI — EC z pięcio- i sześciokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi.

Table 2. Cholesterol ester content and composition in the cerebral grey matter of guinea pigs with EAE

Tabela 2. Zawartość i skład estrów cholesterolu istoty szarej mózgu świnek morskich z EAE

	Number of animals Liczba zwierząt	Total CE in g/100 g of tissue dry weight Ogólna zawartość EC w g/100 g tkanki suchej	Percent composition of cholesteryl esters (CE) Odsetkowy skład estrów cholesterolu (CE)					
			Fraction I Frakcja I (0 ^d)	Fraction II Frakcja II (1 ^d)	Fraction III Frakcja III (2 ^d)	Fraction IV Frakcja IV (3 ^d)	Fraction V Frakcja V (4 ^d)	Fraction VI Frakcja VI (5+6 ^d)
Normal animals Norma	10	0.18±0.02	18.3±1.2	15.0±1.0	5.7±0.2	27.8±1.6	18.1±1.3	15.1±1.2
Preparalytic period of EAE Okres przedporażenny EAE	10	0.56±0.01*	20.3±2.2	22.1±1.1*	5.1±0.7	29.8±0.9	15.9±0.9	6.8±1.0*
Paralytic period of EAE (total) Okres porażenny EAE (całość)	10	0.61±0.12*	15.9±2.5	20.2±1.5*	5.1±0.6	32.5±1.9	15.9±1.5	10.4±2.7
Paralytic period of EAE (intensive inflammatory changes) Okres porażenny EAE (silne zmiany zapalne)	5	0.70±0.18	16.1±3.4	21.4±1.3	6.4±0.3	31.0±2.7	15.0±2.5	10.1±4.4
Paralytic period of EAE (weak inflammatory changes) Okres porażenny EAE (slabe zmiany zapalne)	5	0.52±0.19	15.4±5.4	18.5±3.9	3.6±1.2	34.3±3.9	17.4±2.6	10.8±5.2

Mean ± SE

Średnia ± średni błąd średniej

* statistically significant at the level P<0.05

* statystycznie znamienne na poziomie P<0.05

Fraction I — CE with saturated fatty acyl residues

Frakcja I — EC z nasyconymi resztami acylowymi

Fraction II — CE with monoenoic fatty acyl residues

Frakcja II — EC z jednokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction III — CE with dienoic fatty acyl residues

Frakcja III — EC z dwukrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction IV — CE with trienoic fatty acyl residues

Frakcja IV — EC z trzykrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction V — CE with tetraenoic fatty acyl residues

Frakcja V — EC z czterokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi

Fraction VI — CE with penta- and hexaenoic fatty acyl residues

Frakcja VI — EC z pięcio- i sześciokrotnie nienasyconymi resztami acylowymi.

Chemical methods. The grey and white matter specimens were dried to constant weight in a Nitrogen atmosphere *in vacuo* at $34 \pm 2^\circ\text{C}$. About 0.2 g of the dry tissue was homogenized in a mortar with quartz sand and extracted with chloroform: methanol 2 : 1 vol/vol. The so obtained lipid extract was partitioned with 0.2 volumes of 0.05 M KCl according to Folch-Pi et al. (1957). After separation of phases, the upper phase was discarded and the chloroform phase dried with anhydrous MgSO_4 , filtered and adjusted to a known volume. Aliquots of these extracts (0.1 ml for free cholesterol, and 0.4 ml for total CE) were taken for quantitative determination of the free cholesterol and total CE content after separation of these two components by means of TLC on silica gel (Merck) coated plates using hexane: ethyl ether: glacial acetic acid (80 : 20 : 1 and 90 : 10 : 1 vol/vol respectively) as the developing solvents. After elution of the cholesterol and of CE from the silica-gel scrapings, the sterol content in the eluates was determined essentially according to Sperry and Webb, as described by Vahouny et al. (1963).

The isolation and further separation of the individual CE according to the degree of unsaturation of the fatty acyl residues was accomplished by means of combined column and thin-layer chromatography essentially as described by Tichý (1971), except that the proportions at which from individual esters contributed to the total CE amount were derived from chemical determinations of the cholesterol content of individual ester fractions. For details, the reader is referred to our previous publication (Wender et al. 1973). To prevent autooxidation of the fatty acyl residues, all solvents used in the extraction as well as chromatographic procedures were flushed with Nitrogen and contained 1 mg% of butyryl-4-hydroxyanisol as an antioxidant.

RESULTS

The clinical and histopathological symptoms of the disease evoked by immunization with the brain antigen were identical with those of EAE displayed by guinea pigs described in our previous communication (Wender et al., 1972). The experimental animals immunized with the encephalitogenic mixture demonstrated the first clinical symptoms, such as loss of body weight and decrease of motility at the beginning of the third week after administration of the antigen. During the consecutive days they used to develop the full, typical paralytic syndrome with the hind legs affected most severely, with tremor and loss of sphincter control.

On microscopical examination, the characteristic picture of encephalomyelitis was revealed with monocyte infiltrates (predominantly) localized in the perivascular and subependymal regions as well as in the choroid

plexus. These inflammatory changes dominated in the cerebral white matter, especially in the corpus callosum. Perivascular demyelination with the presence of single phagocytes was observed only occasionally. Sudanophilic depositis could not be detected.

From the obtained results listed in Tables 1 and 2 it may be seen that the CE content increases almost fourfold as well in specimens from animals killed during the preparalytic phase of the illness as in those obtained in the paralytic stage.

The most evidently altered CE species were the monoenoic CE which contributed a significantly higher proportions to the total of CE present in the white matter, whereas the proportions of polyenoic esters decreased considerably as the pathological process developed.

Similar results were obtained in the grey matter specimens, where the total CE content was three times that in control brains and where the monoenoic esters were present at elevated, whereas the penta and hexaenoic one at declined percentages.

The changes in the CE spectrum as well as in the total CE content could not be appreciably correlated with the intensity of histological indices of the illness, i.e. with the intensity of inflammatory changes. The only relationship which could be observed was the considerably larger decrease of the penta and hexaenoic esters containing fraction in the white matter of animals with marked inflammatory reaction.

DISCUSSION

In spite of the fact, that it is only the free cholesterol which is believed to be present in myelinated nerve fibres, recent investigations have revealed that CE can also be isolated from the myelin of normal cerebral white matter (Fewster et al. 1970).

The metabolic role of the esterified form of cholesterol in the brain however remains obscure so far, though they may be found in the literature some indications suggesting that esterified cholesterol precursors are synthesized *de novo* by the nervous tissue (Ramsey et al., 1972). This could mean, that CE could function in the central nervous system as a precursor pool of cholesterol, that after enzymic hydrolysis becomes available for utilization by the cell, such as incorporation into cellular membranes. A transitory increase in the CE content of brains has been observed during the active myelination period (Eto and Suzuki, 1972). This could suggest, that the esterified form of cholesterol may take part in the process of myelinogenesis. Further observations of these authors (1973) on the localization of sterol ester hydrolase activity showing that

this enzyme is concentrated in the myelin fraction seem also to speak for the metabolic relationship of CE with the myelin sheaths.

As demonstrated by the results of investigations of Fewster et al. (1970), the increased amounts of CE found in demyelinated brain regions of MS cases are located outside the myelin sheaths. Since in this disease CE are found also in the apparently normal white matter (Wender et al., 1973) it cannot be agreed upon that esterified cholesterol is exclusively a product of action of esterifying enzymes of reactive macrophages. The same conclusion emerges from the observations made in EAE, that unlike in the normal white matter, in the experimental one, there are found appreciable amounts of CE. Furthermore their FA composition differs significantly from that found in control brains. It is of importance to stress that this altered composition and content of CE was neither accompanied by severe morphological changes in the myelin sheaths nor by any appreciable macrophage reaction.

The observations showing a considerable increase in the CE content and alterations in their FA composition in the cerebral grey matter, may additionally support our view, that the appearance of CE in the nervous tissue is due to an overall alteration in the cholesterol metabolism and is not only the result of myelin decomposition. The fact that in spite of the much smaller amount of myelin components in the cerebral grey matter — the CE content of this cerebral structure even exceeded that of the white matter, clearly indicates that CE are an extramyelin component.

It is interesting to point out that the presence of considerable amounts of CE in both, the grey and white cerebral matters could not be correlated with the appearance of sudanophilic deposits in histological preparations of either the grey or white matter.

Sudanophilic deposits encountered very frequently in the course of demyelinating processes in the nervous tissue have for long been considered as an exponent of CE (Petrescu, 1969, 1972), and this because so far, no other neutral lipid material has been found to accumulate in the central nervous system to an extent that would yield a positive staining with Sudan dyes. In view of our findings this opinion would appear as being not entirely correct, unless one would accept some limits as to the minimal concentration of CE that would yield a visible staining. Otherwise it should be assumed that sudanophilic deposits in addition to CE contain free fatty acids or triglycerides that may appear in demyelinated areas.

Our results demonstrating in EAE brains, not only significantly increased CE contents, but also a considerably altered compositions of these esters, i.e. changes in the proportions at which cholesterol is esterified

with different FA, seems to indicate that the neuroallergic process induces some alterations in the turnover of cholesterol. This assumption seems to be further supported by the already established disturbances in the overall lipid metabolism in EAE, where the occurrence of hyperlipemia and hypercholesterolemia has been reported (Kies et al., 1956, Wender, 1961). The exact mechanism however, involving the reaction antigen-antibody is obscure.

M. Wender, H. Filipek-Wender, J. Stanisławska, A. Goncerzewicz

SKŁAD ESTRÓW CHOLESTEROLU MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM ALERGICZNYM ZAPALENIU MÓZGU I RDZENIA (EAE)

Streszczenie

Zawartość i skład estrów cholesterolu mózgu badano u świń morskich z EAE. W wyniku badań stwierdzono, że doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia powoduje znaczny wzrost zawartości estrów cholesterolu tak w istocie białej jak i szerej mózgu, czemu towarzyszą znaczne zmiany w składzie tych estrów. Estry z jednonienasyconymi resztami acylowymi wykazują znaczny wzrost przy równoczesnym spadku odsetka estrów wielonienasyconych. To względne obniżenie zawartości estrów wielonienasyconych znajduje się w korelacji z postępem choroby.

Wzrostowi zawartości estrów cholesterolu mózgu z EAE nie towarzyszy reakcja makrofagów ani też obecność w chorym mózgu uchwytanych ilości złogów sudanofilnych. Stwierdzone zmiany interpretuje się jako wyraz ogólnych zaburzeń metabolizmu cholesterolu wywołanych przez reakcję neuroalergiczną.

М. Вендер, Х. Филипек-Вендер, И. Станиславска, А. Гонцежевич

СОСТАВ ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА (ЭАЭ)

Резюме

Исследовали содержание и состав эфиров холестерина мозга у морских свинок при ЭАЭ.

В результате исследований было установлено, что экспериментальное аллергическое воспаление головного и спинного мозга приводит как в белом, так и в сером веществе мозга к значительному росту содержания эфиров холестерина, который сопровождается значительными изменениями в составе этих эфиров. Отмечался значительный рост эфиров с одним ненасыщенным ацильным остатком при одновременном падении процента полиненасыщенных эфиров. Это относительное снижение содержания полиненасыщенных эфиров коррелирует с развитием болезни.

Рост содержания эфиров холестерина в мозге с ЭАЭ не сопровождается ни реакцией макрофагов, ни присутствием в больном мозге заметных количеств суданофильных отложений. Обнаруженные изменения интерпретируются как проявление общих нарушений метаболизма холестерина, вызванных нейроаллергической реакцией.

REFERENCES

1. Adams, C., Ibrahim, M., Leibowitz, S.: Demyelination. In: *Neurochemistry* (Elsevier, Amsterdam, 1965) pp. 437—487.
2. Alling, C., Svennerholm, L., Tichý, J.: Fatty acid composition of serum cholesteryl ester fraction isolated by thin-layer chromatography. *J. Chromat.* 1968, 34, 413—415.
3. Eto, Y., Suzuki, K.: Cholesterol esters in developing rat brain: concentration and fatty acid composition. *J. Neurochem.* 1972, 19, 109—115.
4. Eto, Y., Suzuki, K.: Cholesterol ester metabolism in rat brain. A cholesterol ester hydrolase specifically localized in the myelin sheath. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 1986—1991.
5. Fewster, M., Mead, J., Wolfgram F., Tourtelotte, W.: Cholesterol esters in myelin isolated from cerebral white matter of patients with multiple sclerosis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1970, 133, 795—800.
6. Folch-Pi, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
7. Grossi, E., Paoletti, P., Paoletti, R.: A gas-liquid chromatographic analysis of fatty acid composition of human normal and tumoral nervous tissue. 4th Int. Congr. Neuropath. München, 1961, vol. I, pp. 29—32.
8. Kies, M., Goldstein, N., Murphy, J., Roboz, E., Alvord E. Jr.: Occurrence of lipemia in experimental allergic encephalomyelitis. *Neurology (Minneapolis)* 1957, 7, 175—188.
9. Petrescu, A., Angheliescu, N., Florescu, I.: Histochemical studies in experimental allergic encephalomyelitis. Note II. Correlative data on histo- and biochemistry of lipids. The concept of demyelination. Al III-lea Simpozion de Neuropathologie, Bucuresti, 1972, pp. 157—158.
10. Petrescu, A.: Histochemistry of lipids in multiple sclerosis. *Wien. Z. Nervenheilk.* 1969, Suppl. II, 38—52.
11. Petrescu, A.: Biochemical correlation in demyelination. Al III-lea Simpozion de Neuropathologie, Bucuresti, 1972, pp. 136—138.
12. Ramsey, R., Aexel, R., Jones, J., Nicholas, H.: Formation of methyl sterols in brain cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 3471—3475.
13. Tichý, J.: Cholesterol esters in the white matter of adult human brain, serum and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 1967, 14, 555—559.
14. Vahouny, G., Borja, C., Weersing, S.: Radioactive and analytical determination of free and esterified cholesterol following micro-thin-layer silicic acid chromatography. *Analyt. Biochem.* 1963, 6, 555—559.
15. Wender, M.: Problems of lipid metabolism in experimental encephalomyelitis. In: VII Internat. Congress of Neurology, Rome, pp. 778—780, 1961.
16. Wender, M., Adamczewska, Z., Wajgt, A.: Cerebral lipids in a case with a clinically silent isolated plaque of multiple sclerosis type. *Europ. Neurol.* 1973, 9, 21—29.
17. Wender, M., Adamczewska, Z., Żórawski, A.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in experimental allergic encephalomyelitis. *Z. Neurol.* 1972, 201, 227—240.

18. Wender, M., Filipek-Wender, H., Stanisławska B.: Cholesteryl esters in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Europ. Neurol.* 1973, 10, 340—348.
19. Wender, M., Piechowski, A., Adamczewska, Z.: Biochemical investigations of the brain in triethyl-tin intoxication. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 223—234.

Authors' address: Prof. M. Wender, Department of Neurology, Medical Academy, 60-355 Poznań, Poland, 49, Przybyszewskiego str.

IRMINA ZELMAN, DANUTA SEROKOWA

PORÓWNAWCZE BADANIE ZMIAN MORFOLOGICZNYCH
W MÓZGACH ZWIERZĄT LABORATORYJNYCH
ZAKAŻONYCH SZCZEPEM USTALONEGO I ATENUOWANEGO
WIRUSA WŚCIEKLIZNY

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

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

Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. J. Kostrzewski

Zaadaptowanie i kolejne pasażę szczepów fixe i szczepu awianizowanego Flury wirusa wścieklizny do hodowli tkankowych dało w wyniku wysoce atenuowane szczepy (Aksjonowa i wsp. 1968, Koprowski 1966, Crawley 1972, Wiktor 1973). Szybko postępujący, w miarę liczby pasaży, proces atenuacji wymaga sprawdzania stabilności uzyskanych cech biologicznych oraz opracowywania kryteriów tej stabilności, szczególnie w odniesieniu do szczepów przeznaczonych do produkcji szczepionki. Należy sądzić, że jednym z kryteriów dla oceny stopnia patogenności i cech neurotropowych badanego szczepu wirusa wścieklizny może być charakter i nasilenie zmian zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym zakażonych zwierząt laboratoryjnych. Piśmiennictwo rabiologiczne z tego zakresu stanowią przeważnie fragmenty badań nad patogenezą, wykonywanych zwykle na jednym modelu zwierzęcym (Johnson, Mercer 1964; Johnson 1965; Murphy i wsp. 1973; Prejbisch 1965; Zlotnik, Grant 1973).

W ramach prowadzonych badań porównawczych nad charakterystyką biologiczną atenuowanego szczepu wścieklizny Wnukowo i szczepu fixe przeprowadzono badanie morfologiczne mózgow różnorodnych zwierząt laboratoryjnych zakażonych obu szczepami domózgowo i podskórnice. Celem podjętych badań była ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w zależności od szczepu wirusa, rodzaju użytych zwierząt oraz sposobu zakażenia. Porównanie zmian w mózgow różnorodnych zwierząt zakażonych w taki sam sposób tym samym szczepem wirusa mogłoby stanowić równocześnie podstawę dla określenia przydatności poszczególnych rodzajów zwierząt dla kontroli morfologicznej przy ocenie szczepu szczepionkowego.

MATERIAŁ I METODY

Do badania użyto szczep fixe wirusa wścieklizny pasażowany około 2200 razy przez mózg króliczy i namnażany do wszystkich badań w mózgu króliczym oraz szczep Wnukowo. Szczep ten, pochodzący od szczepu Sad został uzyskany w Instytucie Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu w Moskwie i stanowi 32—34 pasaż w temp. 32° przez pierwotne hodowle komórek nerki chomika syryjskiego (Aksjonowa i wsp. 1968). Wirusy zawieszano w fizjologicznym roztworze NaCl zawierającym 2% normalnej inaktywowanej surowicy króliczej. Dawki obu wirusów dla wszystkich zwierząt były jednakowe, obliczone na podstawie miana domózgowego dla myszy o wadze 9—11 g.

Badania przeprowadzono na myszach (9—11 g), szczurach białych (120 g), chomikach syryjskich (4—8 tyg.), świnkach morskich (250—300 g) i królikach (2,5 kg). Zwierzęta zakażano obu szczepami podskórnie i domięśniowo. Zwierzęta chore uśmiercano w okresie porażenia, a zwierzęta, które nie zachorowały — po miesiącu od momentu podania wirusa. Kontrolę stanowiły zwierzęta, którym wprowadzono w taki sam sposób równą objętość fizjologicznego roztworu NaCl z dodatkiem inaktywowanej surowicy króliczej.

W momencie kończenia doświadczenia, w płytkiej narkozie eterowej skrawkowano zwierzęta przez przecięcie serca i natychmiast wyjmowano z jamy czaszkowej mózg wraz z pniem i mózdzkiem oraz górnym odcinkiem rdzenia szynego. Materiał utrwalano w formalinie lub w płynie Zenkera. Błoczki z 5 poziomów mózgowia przeprowadzono do parafiny, skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną i fioletem krezyłu oraz na obecność ciałek Negriego wg metody Manna.

Charakterystykę pobranego materiału pod względem użytych dawek wirusów, sposobu zakażenia, okresu wylegania oraz ilości zwierząt w poszczególnych grupach podano w tabeli 1.

WYNIKI

Zwierzęta zakażone wirusem fixe

M y s z y. U wszystkich myszy zakażonych domózgowo wystąpił zespół objawów chorobowych świadczących o uszkodzeniu układu nerwowego. Badanie mikroskopowe wykazało u tych zwierząt proces zapalny oon z towarzyszącym zajęciem opon, którego nasilenie wykazywało duże wahania u poszczególnych osobników. Proces charakteryzowały rozlane i okołonaczyniowe nacieki w oponach mózgu i mózdzku (ryc. 1 i 2). Nacieki te, niezbyt obfite, składały się głównie z limfocytów, niekiedy z do-

mieszką histiocytów lub komórek wielojądrzastych. Podobny charakter miały okołonaczyniowe nacieki zlokalizowane śródtkankowo, występujące głównie wokół drobnych i średnich żył. Drugim elementem obrazu morfologicznego był odczyn mikrogleju z obecnością licznych pobudzonych i pałeczkowatych postaci występujących luźno w tkance i tworzących skupienia śródtkankowe, lub zagęszczenia okołonaczyniowe (ryc. 3 i 4). Stosunkowo rzadko spotykano typowe grudki neuronofagiczne. Porozsławane oligodendrocyty i rozluźnienie podłoża świadczyło o towarzyszącym obrzęku. Spotykano pobudzone i obrzękłe śródbłongi naczyń, zatarcie rysunku i rozluźnienie struktury ścian naczyń.

Największe zmiany stwierdzono w półkulach mózgu na poziomie wklęcia, zwłaszcza w zawojach hipokampa. U niektórych zwierząt występowały one także w strukturach podkorowych i w pniu w okolicy III i IV komory, w przykomorowej części oraz istocie białej płacików mózdzku, rzadziej w warstwie drobinowej.

Po zakażeniu podskórnym zachorowało 7 myszy. Badanie mikroskopowe u 3 zwierząt, które przeżyły nie wykazało zmian zapalnych. U myszy, które zachorowały struktura procesu była zasadniczo podobna, ale nasilenie i rozległość zmian były znacznie bardziej zróżnicowane. U niektórych zwierząt dominowało przekrwienie i obrzęk a udział komponenty zapalnej był minimalny. W niektórych przypadkach proces zapalny ograniczał się do rdzenia, pnia mózgowego i mózdzku (ryc. 5 i 6), w innych obejmował również półkule mózgu.

Szczury. Po szczepieniu domózkowym rozwinął się u wszystkich zakażonych zwierząt proces zapalny, najbardziej nasilony w półkulach mózgu, ale szerzący się aż do poziomu rdzenia szyjnego (ryc. 7 i 8). U niektórych zwierząt dominowały w obrazie okołonaczyniowe nacieki limfocytarne, niekiedy z domieszką leukocytów. Spotykano przechodzenie nacieku wzdłuż naczyń lub bezpośrednio przez ciągłość do tkanki nerwowej. Poza naciekami okołonaczyniowymi, obserwowano także okołonaczyniowe zagęszczenia gleju. Zarówno w korze jak i strukturach podkorowych stwierdzono liczne pałeczki mikrogleju, rzadziej grudki neuronofagiczne i zlokalizowane śródtkankowo pola rozplemu glejowego. U wszystkich szczurów stwierdzono wyraźny obrzęk tkanki, bardziej nasilony w półkulach mózgu. Topografia zmian u szczurów była podobna do opisanej u myszy, szczepionych domózkowo tym samym szczepem wirusa wścieklizny. Również i w tej grupie zwierząt największe zmiany stwierdzano na poziomie wklęcia, z tym, że udział pnia mózgowego i mózdzku był większy a różnice osobnicze w nasileniu procesu chorobowego bardziej nasilone.

Szczury zakażone podskórnice okazały się klinicznie niewrażliwe na zakażenie wirusem fixe. Badanie morfologiczne tej grupy u 2 szczurów

nie wykazało zmian, u 3 stwierdzono drobne rozsiiane nacieki limfocytarne w oponach i śródtkankowo na pograniczu rdzenia szynego i opuszki oraz nieznaczne zagęszczenie gleju komórkowego w tej okolicy.

Świnki morskie. Wszystkie świnki zakażone domózkowo zachorowały. W mózгах tych zwierząt stwierdzono uogólnione zmiany zapalne o bardzo dużym nasileniu z wyraźną predylekcją do struktur szarych. Przy akcentacji zmian na poziomie wklucia stwierdzono znaczne zmiany w miejscach odległych od urazu w półkulach mózgu oraz w pniu mózgowym. Obfite nacieki limfocytarne obserwowano także wokół dużych żył w rdzeniu szynym. Charakterystyczne były znaczne różnice w nasileniu procesu w poszczególnych strukturach. Zmiany śródtkankowe w postaci ławicowych zagęszczeń gleju i grudek neuronofagicznych występowały u świnek morskich często i w znacznej odległości od miejsca zakażenia. W tej grupie zwierząt zwracała również uwagę wyraźnie nasiloną komponenta krwotoczna, nie tylko z obecnością krwinkotoków ale i większych okołonaczyniowych krwotoczków oraz znaczne uszkodzenie podłoża tkankowego. W naciekach śródtkankowych często spotykano znaczną ilość detrytu z rozpadłych granulocytów.

W grupie świnek morskich zakażonych podskórnie zachorowały 3, dwie były klinicznie bezobjawowe. U świnek morskich chorych stwierdzono duże różnice osobnicze w nasileniu zmian: w jednym przypadku (ryc. 9 i 10), zmiany były uogólnione z przewagą uszkodzeń w obrębie pnia, w jednym ograniczały się do śródmózgowia i opuszki, w trzecim stwierdzono jedynie cechy przekrwienia i obrzęku. Spośród dwóch świnek, u których zakażenie przebiegło bezobjawowo, u jednej nie stwierdzono zmian morfologicznych, u drugiej znaleziono w pniu skąpe nacieki okołonaczyniowe i drobne ogniska rozplemu glejowego.

Chomiki syryjskie. U wszystkich chomików chorych po zakażeniu domózkowym stwierdzono bardzo duże zmiany zapalne w oponach miękkich i w mózgu w postaci obfitych kilkurzędowych nacieków okołonaczyniowych, śródtkankowych nacieków glejowych lub glejowo-mezodermalnych oraz rozplemu mikrogleju pałeczkowatego (ryc. 11 i 12). Udział komponenty obrzękowej i krwotocznej w procesie był znaczny.

U chomików chorych po zakażeniu podskórnym wyraźnie dominowały zmiany w niższych strukturach (rdzeń szynny, opuszka — ryc. 13), zmniejszające się w kierunku przodomózgowia. Nacieki zapalne w oponach były dosyć obfite i szerzyły się wzdłuż naczyń lub bezpośrednio do tkanki (ryc. 14). Proces oszczędzał całkowicie korę mózgową lub był w jej obrębie ograniczony do zakrętów hipokampa. Natomiast w korze mózdzku, a zwłaszcza w warstwie drobinowej spotkano ogniskowe odczyny glejowe z obecnością komórek pałeczkowatych oraz nacieki wokół drobnych żył i naczyń przedwłosowatych.

Króliki. U królików chorych po zakażeniu domózgowym zmiany zapalne ograniczały się do nacieków limfocytarnych w oponach miękkich oraz skąpych nacieków śródtkankowych, złożonych z kilku — kilkunastu limfocytów. Występowały one głównie w strukturach szarych, zarówno w półkulach jak i w pniu mózgu. Śródtkankowy odczyn obserwowano sporadycznie w postaci okołonaczyniowego zagęszczenia gleju lub drobnych grudek śródtkankowych. U królików chorych po zakażeniu podskórnym dominował obrzęk tkanki i przekrwienie, pobudzenie elementów ścian naczyniowych; skąpe nacieki limfocytarne obserwowano w oponach i śródtkankowo, a sporadycznie spotykano nieznaczne zagęszczenie gleju przy naczyniach.

II. Zwierzęta zakażone atenuowanym wirusem wścieklizny (Wnukowo)

Myszy. U myszy chorych po zakażeniu domózgowym zarówno zasadniczy wzorzec zmian tkankowych jak i ich topografia były podobne do obserwowanych u myszy zakażonych wirusem fixe. Zmiany zapalne stwierdzono u wszystkich chorych zwierząt z wyraźną przewagą uszkodzeń w półkulach mózgu. Nacieki zapalne okołonaczyniowe były nieco większe (ryc. 15), natomiast odczyny śródtkankowe występowały rzadziej i w mniejszym nasileniu. Charakterystyczną cechą tej grupy były wczesne zmiany martwicze w zakrętach hipokampa, symetryczne, o powtarzającej się lokalizacji (ryc. 17) z ławicowym naciekiem mikrogleju i granulocytów w zewnętrznej warstwie tej struktury. Również obrzęk śródtkankowy był u tych zwierząt bardzo nasilony.

U myszy chorych po zakażeniu podskórnym stwierdzono zmiany zapalne okołonaczyniowe i śródtkankowe w pniu, u jednej szerzące się również w kierunku przedomózgowia.

Szczury. W mózgach wszystkich szczurów zakażonych domózgowo stwierdzono uogólnione zmiany zapalne z przewagą uszkodzeń w półkulach mózgu, ale u niektórych zwierząt również z wyraźnie rozwiniętym procesem w pniu i mózdzku (ryc. 18). Obraz zmian tkankowych był zasadniczo podobny do stwierdzonego u szczurów zakażonych domózgowo wirusem fixe, z tym, że u niektórych zwierząt przeważały wyraźnie nacieki okołonaczyniowe nad śródtkankowym odczynem mikrogleju.

Po zakażeniu podskórnym u 3 szczurów nie stwierdzono zmian morfologicznych, u 2 obecne były pojedyncze rozproszone limfocyty w oponach na pograniczu rdzenia szyjnego i opuszki.

Świnki morskie. W porównaniu ze szczepem fixe zmiany zapalne u świnek morskich były mniej nasilone po domózgowym zakażeniu zwierząt (ryc. 19). Niekiedy ograniczały się jedynie do półkul mózgowych

z akcentacją po stronie wkłucia. Obrzęk tkanki, zmiany obrzękowopochodne i uszkodzenie naczyń było u tych zwierząt również bardzo nasilone (ryc. 20).

U świnek morskich szczepionych podskórnie nie stwierdzono zmian zapalnych.

Chomiki syryjskie. U chomików syryjskich po zakażeniu domózgowym charakter i nasilenie zmian kształtowały się podobnie jak u chomików zakażonych domózgowo wirusem fixe. U chomików chorych po zakażeniu podskórnym lokalizacja i nasilenie zmian zapalnych kształtowały się różnie. Proces ograniczał się wyłącznie do pnia lub obejmował również struktury podkorowe, a nawet korę. Duże różnice występowały w zakresie nacieków śródtkankowych, które wahały się od niewielkich zagęszczeń komórkowych aż do rozległych stosunkowo obszarów proliferacji komórkowej (ryc. 21 i 22). U chomików, które nie zachorowały zmian zapalnych nie stwierdzono.

Króliki. U królików, które zachorowały stwierdzono nacieki zapalne w oponach oraz skąpe nacieki śródtkankowe, zlokalizowane głównie w półkulach mózgu. Nieco większe nacieki obserwowano sporadycznie. Nie towarzyszył im odczyn śródtkankowy z wyjątkiem jednego królika, u którego występowało zagęszczenie gleju (naciek glejowy rozproszony) wokół zapalnie zmienionych naczyń.

U królików zakażonych podskórnie nie stwierdzono zmian zapalnych.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że domózgowe zakażenie zwierząt zarówno wirusem fixe jak i wirusem atenuowanym prowadzi do wystąpienia objawów klinicznych świadczących o uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego.

Po okresie wylęgania trwającym w przypadku wirusa ustalonego od 4 do 7 dni, a w przypadku wirusa atenuowanego od 7 do 11 dni, rozwija się w ciągu kilku-, kilkunastu godzin ciężki zespół neurologiczny prowadzący do zgonu często w okresie jednej doby od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych. Morfologicznym wykładnikiem uszkodzenia ośrodkowego jest zapalenie mózgu z towarzyszącym zajęciem opon miękkich. Proces charakteryzują rozlane i okołonaczyniowe nacieki oponowe, nacieki śródtkankowe, rozrost i rozplem gleju komórkowego, głównie mikrogleju z obecnością form pałeczkowatych oraz obrzęk i obrzękowopochodne zmiany w obrębie tkanki mózgowej. Zasadniczy wzorzec zmian strukturalnych był jednakowy u wszystkich użytych zwierząt i wspólny dla obu szczepów wirusa, przy istniejących wyraźnych różnicach gatunkowych i osobniczych w nasileniu procesu patologicznego. Również wzajemny

stosunek poszczególnych odczynów układał się różnie u poszczególnych osobników, ale przy ocenie grupowej można było dostrzec zaznaczające się różnice morfologiczne zależne od rodzaju użytych zwierząt i szczepu wirusa. Nie udało się nam znaleźć w badanym materiale ciałek Negriego.

W ocenie histologicznej naszego materiału pominięto zmiany komórkowe, stanowiące najwcześniejszy wykładnik strukturalny wirusowego zapalenia mózgu (Osetowska 1974). Zmiany tego rodzaju mające charakter niespecyficznego uszkodzenia komórek nerwowych mogą być właściwie interpretowane tylko w materiale perfundowanym i w okresie poprzedzającym uformowanie się właściwego odczynu zapalnego, w którym nakładają się wtórne zmiany na skutek miejscowych i ogólnoustrojowych zaburzeń (niedotlenienia, zaburzeń metabolicznych itp). Johnson (1965) badając na myszach szczep CVS wirusa wścieklizny, prześledził narastanie zmian w okresie inkubacji choroby. Przez pierwsze trzy dni po zakażeniu domózgowym nie stwierdził on żadnych zmian morfologicznych, przy obecności antygeny w komórkach nerwowych wykrywanego metodą fluorescencji. Czwartego i piątego dnia obecne były zmiany komórkowe, zwłaszcza w neuronach hipokampa i jądrach przegrody, pojedyncze grudki neuronofagiczne i ogniska rozplemu mikroglejowego. Uderzający był brak okołonaczyniowych nacieków śródkankowych i oponowych. Komórki nerwowe badane w mikroskopie elektronowym już po wystąpieniu zmian chorobowych nie wykazywały uszkodzenia organelli, natomiast widoczne było ich przemieszczenie przez skupienia cząsteczek wirusa w cytoplazmie. Tak widziany związek wirus-komórka nie różni się od obrazu endosymbiotycznego zakażenia komórek hodowli tkankowej, gdzie zakażenie nie zaburza normalnego podziału komórek i nie zmienia ich obrazu morfologicznego (Fernandez i wsp. 1964).

Ocena topografii zmian przy domózgowym zakażeniu zwierząt jest mało miarodajna ze względu na dodatkowe odczyny tkankowe związane bezpośrednio z urazem tkanki (Osetowska 1966). U zwierząt zakażonych domózgowo obu szczepami wirusa z reguły obserwowano największe nasilenie odczynów tkankowych na poziomie wkłucia, w półkulach mózgu, zwłaszcza w zawojach hipokampa i we wzgórzu. Pomimo to w strukturach podkorowych i w pniu zaznaczała się wyraźna predykcja procesu do określonych struktur szarych a nawet poszczególnych ugrupowań jądrowych.

Wśród zwierząt chorych po domózgowym zakażeniu obu szczepami wirusa najslabiej nasilone zmiany stwierdzono u królików, największe u chomików. W obu grupach zwierząt stwierdzono również mniejsze różnice osobnicze niż u szczurów, świnek morskich i myszy. Szczep atenuowany powoduje u zwierząt zakażonych domózgowo na ogół mniejsze zmiany

zapalne, prowadzi natomiast do większego uszkodzenia naczyń i wtórnych naczyniopochodnych uszkodzeń tkanki. Tego typu charakter mają prawdopodobnie symetryczne martwice w zawojach hipokampa obserwowane u myszy zakażonych domózkowo szczepem Wnukowo. Zmiany nekrotyczne w komórkach piramidowych tej okolicy stwierdzili również Zlotnik i Grant (1973) u myszy zakażonych w podobny sposób szczepem HEP.

Przy zakażeniu obwodowym zaznaczają się różnice w patogenności obu badanych szczepów w stosunku do tkanki mózgowej. Podczas gdy zakażenie domózkowe powodowało praktycznie 100% zachorowalność zwierząt doświadczalnych niezależnie od szczepu użytego wirusa, po zakażeniu podskórnym zespół kliniczny ujawnił się tylko w niektórych grupach zwierząt i nie u wszystkich osobników (tabela 1).

Tabela 1. Domózkowe i podskórne zakażenie zwierząt badanymi szczepami

Zwierzę	Zakażenie domózkowe					Zakażenie podskórne				
	Dawka zakażająca ml ¹⁾	szczep fixe		szczep Wnukowo		Dawka zakażająca ml ²⁾	szczep fixe		szczep Wnukowo	
		liczba zwierząt zakaż./ liczba zwierząt chorych	okres wylegania dni	liczba zwierząt zakaż./ liczba zwierząt chorych	okres wylegania dni		liczba zwierząt zakaż./ liczba zwierząt chorych	okres wylegania dni	liczba zwierząt zakaż./ liczba zwierząt chorych	okres wylegania dni
Królik	0,2	5/5	5	5/5	11	5,0	5/3	14—19	5/0	—
Szczur	0,05	5/5	5—7	5/5	8	2,0	5/0	—	5/0	—
Świnka m.	0,1	5/5	4	5/5	7	3,0	5/3	6—11	5/0	—
Chomik	0,05	5/5	5	5/5	7	1,0	5/5	6—8	5/3	8
Myszy	0,03	10/10	5	10/10	7	0,1	10/7	9—10	10/3	10—14

- 1) Wirus fixe rozcieńczony 10^{-3}
 Wirus Wnukowo rozcieńczony 10^{-2}
 2) Wirus fixe rozcieńczony $10^{-1,3}$
 Wirus Wnukowo nierozcieńczony

Obraz histologiczny u zwierząt szczepionych podskórnie pod względem struktury procesu patologicznego nie różnił się w sposób zasadniczy od obrazów obserwowanych po zakażeniu domózkowym. Na podkreślenie zasługuje natomiast wyraźne przesunięcie akcentu topograficznego procesu w kierunku niższych odcinków układu nerwowego. Zespół patologiczny miał wyraźny charakter wstępującego zapalenia i wykazywał największe nasilenie w nakrywce opuszki i śródmózgowia bądź to zajmując wyłącz-

nie te struktury, bądź też szerząc się również na struktury podkorowe a nawet półkule mózgu.

Analogicznie do klinicznych wykładników zakażenia, również badanie mikroskopowe wykazało przewagę uszkodzeń u zwierząt zaszczepionych podskórnie wirusem fixe, wyrażającą się przede wszystkim większą liczbą osobników, u których stwierdzono obecność zmian zapalnych i częstokroć większym nasileniem uszkodzeń tkankowych. Poronne zmiany zapalne, pomimo braku objawów klinicznych, obserwowano również w tej grupie zwierząt znacznie częściej niż w grupie zwierząt zakażonych obwodowo szczepem Wnukowo. Ze względu na stosunkowo odległy okres pobierania materiału od momentu zakażenia trudno przesądzić czy zakażenie u zwierząt, u których nie stwierdzono zmian było rzeczywiście morfologicznie bezobjawowe czy też nastąpiło pełne *restitutio ad integrum*, podobnie jak w badaniach Nathanson i wsp. (1970) lub w badaniach Fischmana i Strandberga (1973). Fischman i Strandberg przy bezobjawowym zakażeniu szczepem HEP z morfologicznym obrazem *meningoencephalitis* po 60 dniach od momentu zakażenia nie stwierdzili zmian patologicznych w mózgach szczepionych zwierząt.

Wydaje się, że w naszym materiale warto również zwrócić uwagę na zwierzęta, które pomimo w pełni rozwiniętego zespołu klinicznego nie wykazywały wcale albo tylko minimalne zmiany zapalne. Wg Johnsona (1965, 1967) choroba przy zakażeniu wirusem wścieklizny jest raczej wynikiem fizjologicznej dysfunkcji komórek nerwowych niż cytopatogenicznego działania wirusa. Być może w poszczególnych wypadkach stopień tego zaburzenia jest tak znaczny, że prowadzi do śmierci zwierzęcia wcześniej zanim zdąży się wykształcić jakikolwiek odczyn zapalny.

W przeciwieństwie do wyników Johnsona, porównawcze badania morfologów japońskich Miyamoto i Matsumoto (1967) nad zmianami w mózgach myszy wywołanymi przez wirus atenuowany Flury HEP i wirus uliczny wykazały bardzo ciężkie uszkodzenie cytoplazmy i jąder komórkowych przez szczep Flury HEP przewyższające zmiany spowodowane przez wirus uliczny, chociaż szczep ten atenuowany poprzez pasażę na zarodkach kurzych nie jest patogenny dla zwierząt po zakażeniu parenteralnym a dla większości zwierząt i po zakażeniu domózgowym (Koprowski 1966; Koprowski i wsp. 1954).

Uzupełnienie naszych obserwacji o badania ultrastrukturalne oraz prześledzenie dynamiki rozwoju zmian morfologicznych w okresie poprzedzającym pełny rozwój zmian klinicznych, przynajmniej u niektórych zwierząt laboratoryjnych pozwoliłoby na pełniejszą charakterystykę zarówno obu badanych szczepów jak i wrażliwości tych zwierząt.

WNIOSKI

1. Domózgowe zakażenie zwierząt laboratoryjnych szczepem ustalonym wirusa wścieklizny oraz szczepem atenuowanym Wnukowo prowadzi do rozwoju zmian zapalnych w ośrodkowym, przy czym struktura i topografia procesu są podobne u wszystkich zwierząt i wspólne dla obu użytych szczepów.

2. Przy zakażeniu podskórnym występują różnice w patogenności wirusa fixe i wirusa atenuowanego na hodowli tkankowej w stosunku do tkanki nerwowej, przy czym wirus fixe jest bardziej patogenny dla użytych zwierząt laboratoryjnych.

3. Przy zakażeniu obwodowym proces zapalny ma charakter zapalenia wstępującego i wykazuje największe nasilenie w obrębie pnia mózgu.

4. Brak objawów klinicznych nie wyklucza obecności zmian zapalnych w mózgach szczepionych zwierząt.

5. Ze względów praktycznych nie należy używać królików do oceny morfologicznej patogenności szczepów szczepionkowych wścieklizny, ponieważ zmiany zapalne u tych zwierząt nawet w przypadku w pełni rozwiniętego zespołu klinicznego są mniej nasilone i najmniej charakterystyczne.

6. Ze względu na znaczne różnice indywidualne w odpowiedzi tkankowej, wskazane jest aby grupy szczepionych zwierząt obejmowały większą liczbę osobników.

И. Б. Зельман, Д. Серокова

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ
В МОЗГЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ЗАРАЖЕННЫХ ФИКСИРОВАННЫМ
И ОСЛАБЛЕННЫМ ШТАММАМИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Резюме

Целью работы была оценка морфологических изменений в мозге лабораторных животных, зараженных внутрицеребрально и подкожно фиксированным и ослабленным штаммами вируса бешенства. Для исследований были использованы: мыши, крысы, сирийские хомяки, морские свинки и кролики. Дозы обоих вирусов для всех животных были одинаковыми и рассчитанными на основе внутрицеребрального титра для мышей весом 9—11 г. Больные животные забивались в период паралича; животные, которые не заболели — через месяц после введения вируса.

Внутрицеребральное заражение вызывало 100% заболеваемость животных, независимо от штамма вируса. После подкожного заражения клинический синдром проявился в некоторых группах животных и не у всех особей. У животных с внутрицеребральным введением структура и топография процесса были сходными во всех исследуемых группах. Различия касались степени интенсив-

ности изменений, их обширности, а также взаимоотношения отдельных реакций. Самые большие изменения были обнаружены у всех животных на уровне укола. После периферического заражения проявились различия в патогенности обоих использованных штаммов с преимуществом повреждений после заражения фиксированным вирусом, а также более значительная дифференцировка интенсивности и обширности процесса у отдельных особей в группах. В случае развития воспаления структура процесса была похожа на таковую после внутри-церебрального заражения, но изменения концентрировались главным образом в области мозгового ствола. Ни у одного из исследуемых мивотных не были найдены тельца Негри.

I. B. Zelman, D. Serokowa

COMPARATIVE STUDIES ON PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN
BRAINS OF VARIOUS LABORATORY ANIMALS INOCULATED WITH FIXED
AND ATTENUATED STRAINS OF RABIES VIRUS

Summary

The aim of the study was to investigate pathomorphological changes in brains of various laboratory animals inoculated intracerebrally and subcutaneously with fixed and attenuated strains of rabies virus. Adult mice, rats, guinea pigs, syrian hamsters and rabbits were used. Dose of both virus strains was the same for all experimental groups, calculated on the base of the intracerebral titre for mice of 9—11 g of body weight. Animals which developed clinical symptoms of the disease were sacrificed in the paralytic period and those which did not develop symptoms — one months after inoculation.

The following results were obtained: intracerebral inoculation caused in experimental animals 100 per cent morbidity irrespective of virus strain used for inoculation. After peripheral inoculation there were observed marked differences in the morbidity of experimental groups and even of animals in the same group. In animals inoculated intracerebrally the structure and topography of the inflammatory process was generally similar in all experimental groups. Differences in intensity and extent of inflammatory reaction i.e. perivascular infiltration, glia proliferation and other, only were stated. Peripheral inoculation revealed that fixed virus strain is more virulent for nerve tissue of experimental animals and caused more abnormalities than attenuated one. Negri bodies were not discovered.

PISMIENNICTWO

1. Aksjonowa T. A., Selimow M. A., Rodin I. M.: Osnovy technologii, proizvodstva i kontrola inaktiwirowanoj i žiwoj kulturalnoj antirabicheskoj wacciny Instituta Poliomyelita i wirusnych encefalitow A.M.N. SSSR. Materiały XV Naucznoy Sesji Instituta Poliomyelita i wirusnych encefalitow, Moskwa, 1968, 175—177.
2. Crawley J. F.: The E RA strain of rabies vaccine. *Canad. J. Comp. Med.*, 1972, 36 (4) 339.

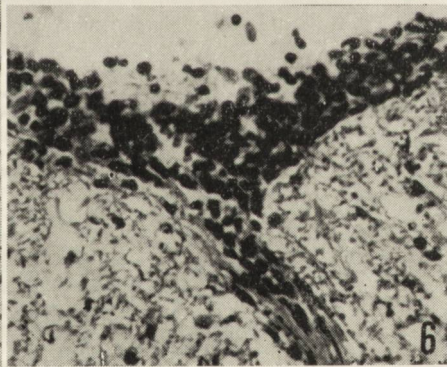
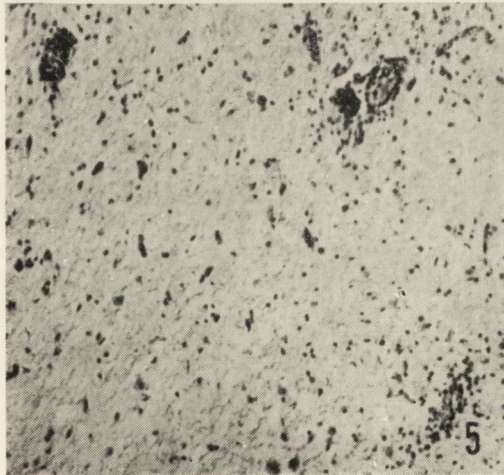
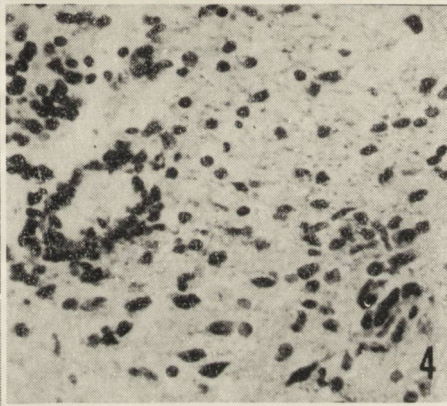
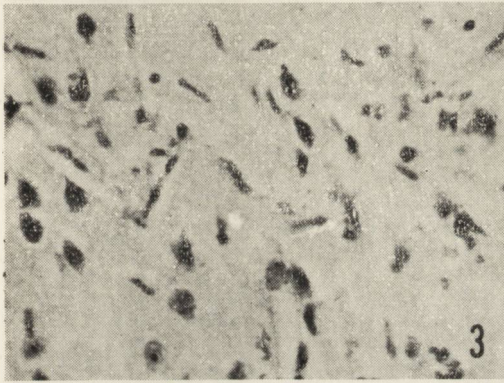
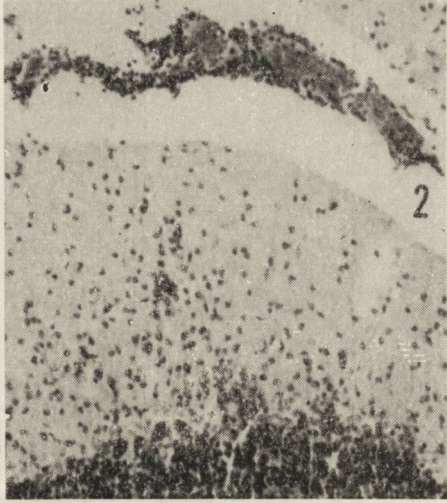
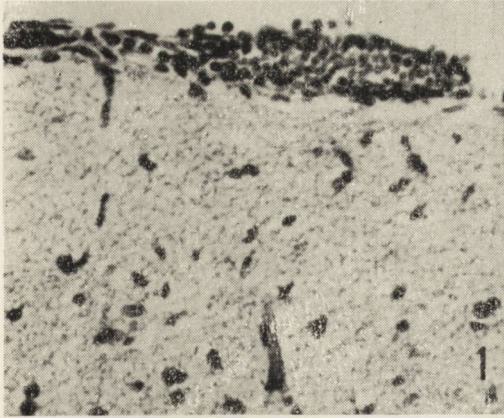
3. Fernandes M. V., Wiktor T. J., Koprowski H.: Endosymbiotic relationship between animal viruses and host cells. A study of rabies virus in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 1964, 120, 1099—1116.
4. Fischman H. R., Strandberg J. D.: Inapparent rabies virus infection of the central nervous system. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1973, 163, (9), 1050.
5. Johnson R. T., Mercer E. H.: The development of fixed rabies virus in mouse brain. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1964, 42, 449.
6. Johnson R. T.: Experimental rabies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1965, 24, 4, 662.
7. Johnson R. T.: Chronic Infectious Neuropathic Agents. Current topics in microbiology and Immunology, Springer Verlag, 1967.
8. Koprowski H., Black J., Nelsen D. J.: Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick-embryo. *J. Immunology*, 1954, 72, 94.
9. Koprowski H.: In vitro production of antirabies virus vaccine. Symposia Series in immunobiological standarization, vol. 1, S. Karger, 1966, 357—366.
10. Miyamoto K., Matsumoto S.: Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. Exp. Med.*, 1967, 125, 447.
11. Murphy F. A., Harrison A. K., Winn W. C., Bauer S. P.: Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. *Laboratory Investig.* 1973, 29, 1, 1—16.
12. Nathanson N., Cole G. A., Weiner L. P., Gilden D. H., Johnson R. T.: Diversity of pathological lesions produced by acute virus infections of the nervous system. Vith Intern. Congress Neuropath. Masson et Cie, Paryż, 1970.
13. Osetowska E., Wróblewska-Mularczyk Z.: Neuropatologia doświadczalnego kleszczowego zapalenia mózgu. I. Obraz mózgu po zakażeniu domózgowym. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 231—242.
14. Osetowska E.: Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych. PZWL, Warszawa, 1974.
15. Preibisch J.: Morfologia zmian i oznaczenia cytochemiczne kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) w mózgu królików przy doświadczalnym szczepieniu wirusami wścieklizny i szczepionką przeciwwściekliznową. I. Zmiany morfologiczne. *Polskie Archiwum Wet.*, 1965, 9, 1, 197—214.
16. Wiktor T. J.: Tissue culture methods. *Laboratory Techniques in rabies*, WHO, Geneva, 1973, 101—123.
17. Zlotnik I., Grant D. P.: The relationship between immunity and the pathology of the central nervous system of mice infected with the CVS strain of rabies. *Brit. J. Exp. Pathol.* 1973, 54, 534—552.

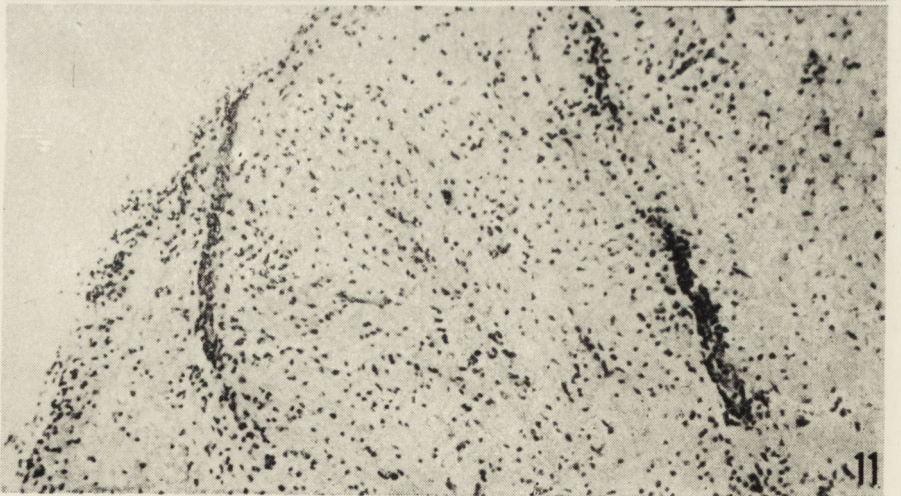
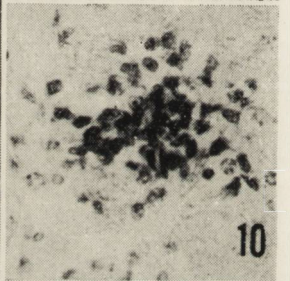
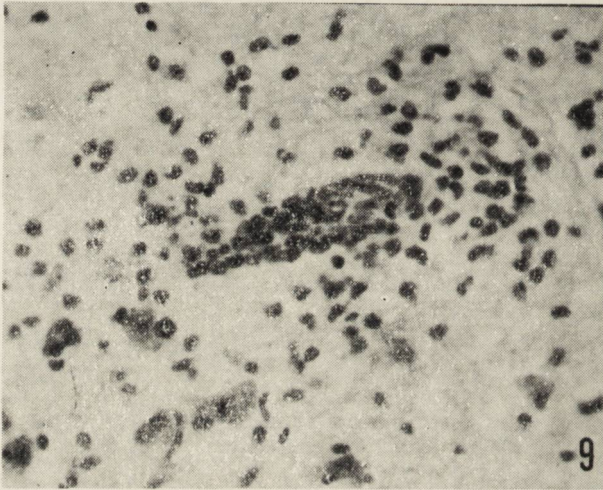
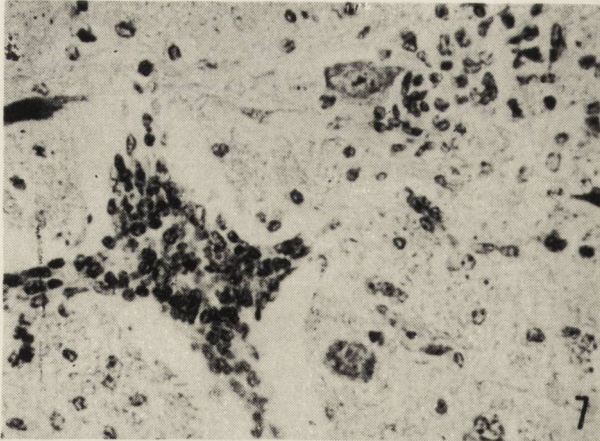
Adres autorek: Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

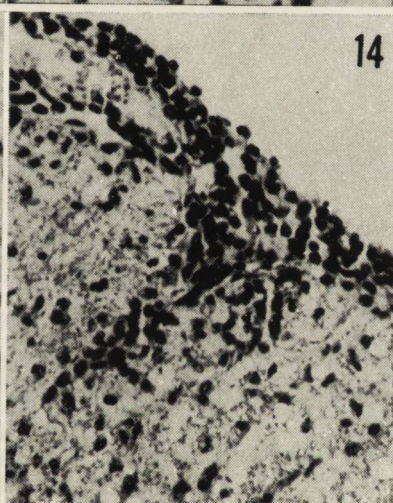
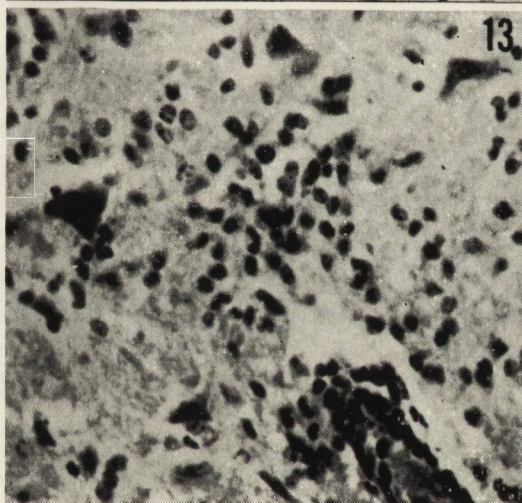
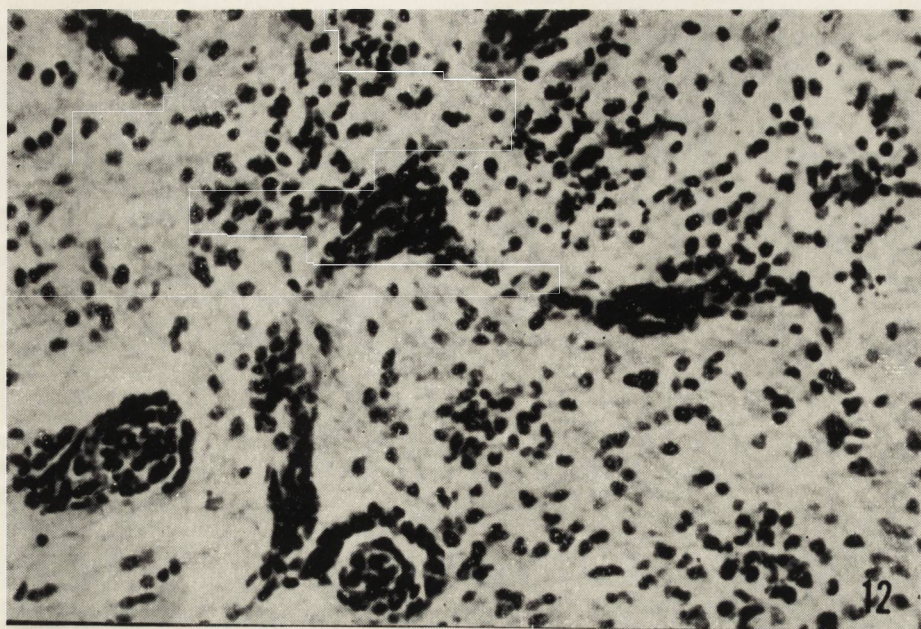
PODPISY POD RYCINY

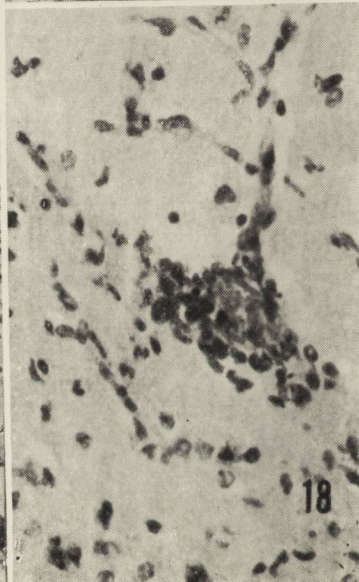
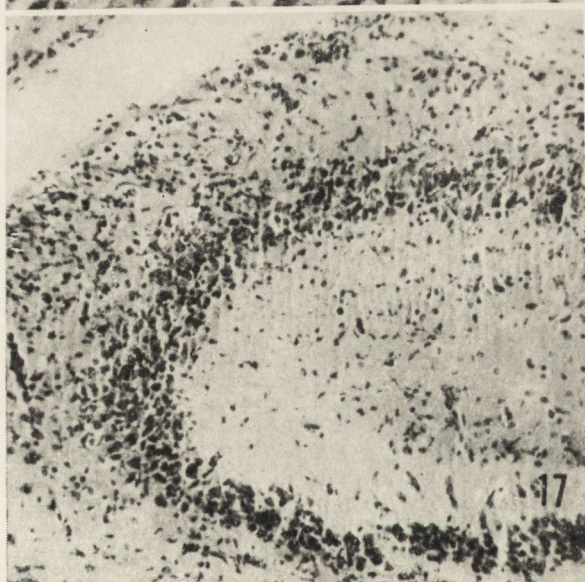
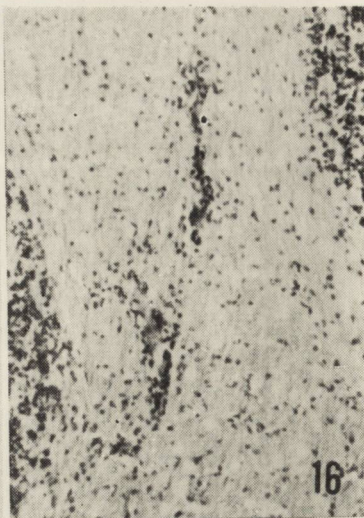
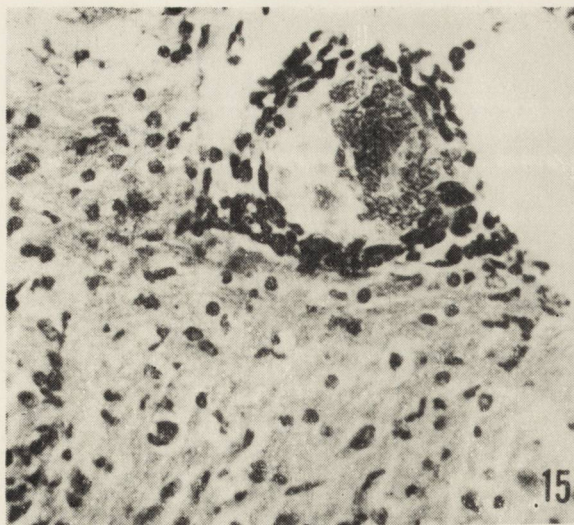
- Ryc. 1.* Mysz szczepiona domózgowo wirusem fixe. Naciek limfocytny w oponach mózgu. H.-E. Pow. 200 X.
- Fig. 1.* Mouse infected intracerebrally with fixed virus. Lymphocytic infiltrate in meninges. H.-E. X 200.
- Ryc. 2.* Mysz zakażona domózgowo wirusem fixe. Nacieki w oponach mózdzku i w warstwie drobinowej kory. H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 2.* Mouse infected intracerebrally with fixed virus. Inflammatory changes in meninges and molecular layer of cerebellum. H.-E. X 100.
- Ryc. 3.* Mysz zakażona domózgowo wirusem fixe. Rozplem gleju pałeczkowatego w korze. H.-E. Pow. 200 X.
- Fig. 3.* Mouse infected with fixed virus intracerebrally. Proliferation of microglia in cerebral cortex. H.-E. X 200.
- Ryc. 4.* Mysz szczepiona domózgowo wirusem fixe. Okołonaczyniowy naciek śródkankowy. Odczyn gleju naczyń przedwłosowatego. H.-E. Pow. 200 X.
- Fig. 4.* Mouse infected intracerebrally with fixed virus. Perivascular infiltrate in noninjected hemisphere. Proliferation of cells around precapillary vessel. H.-E. X 200.
- Ryc. 5.* Mysz zakażona podskórnie wirusem fixe. Odczyn zapalny w pniu mózgu H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 5.* Mouse infected subcutaneously with fixed virus. Inflammatory infiltrates in brain stem. H.-E. X 100.
- Ryc. 6.* Mysz zakażona podskórnie wirusem fixe. Naciek zapalny w oponie rdzenia penetrujący do tkanki. H.-E. Pow. 200 X.
- Fig. 6.* Mouse infected subcutaneously with fixed virus. Inflammatory infiltrate in meninges of spinal cord penetrating into nerve tissue. H.-E. X 200.
- Ryc. 7.* Szczur zakażony domózgowo wirusem fixe. Odczyn zapalny w opuszce. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 7.* Rat infected intracerebrally with fixed virus. Inflammatory changes in medulla. H.-E. X 400.
- Ryc. 8.* Szczur zakażony domózgowo wirusem fixe. Naciek zapalny wokół naczynia żylnego w rdzeniu szyjnym. H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 8.* Rat infected intracerebrally with fixed virus. Inflammatory infiltrate around venous vessel in spinal cord. H.-E. X 100.
- Ryc. 9.* Świnka morska szczepiona podskórnie, wirusem fixe. Naciek okołonaczyniowy, rozplem gleju i limfocytów rozproszonych wokół naczynia. Widoczne również pojedyncze leukocyty i mikroglej pałeczkowaty. H.-E. X 400.
- Fig. 9.* Guinea pig infected subcutaneously with fixed virus. Perivascular infiltrate. Inflammatory mesodermal and glial elements scattered around vessel. Multinuclear cells are seen also. H.-E. X 400.
- Ryc. 10.* Świnka morska szczepiona podskórnie wirusem fixe. Neuronofagia w opuszce. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 10.* Guinea pig infected subcutaneously with fixed virus. Neuronophagia in medulla. H.-E. X 400.
- Ryc. 11.* Chomik syryjski zakażony domózgowo wirusem fixe. Obfite nacieki okołonaczyniowe i śródkankowe w półkuli mózgu. H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 11.* Syrian hamster infected intracerebrally with fixed virus. Marked perivascular infiltrates and glia proliferation in cerebral cortex, on the level of inoculation H.-E. X 100.
- Ryc. 12.* Okołonaczyniowe nacieki zapalne, śródkankowe grudki glejowe. Widoczny udział leukocytów w procesie zapalnym. Chomik syryjski szczepiony domózgowo wirusem fixe. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 12.* Syrian hamster inoculated intracerebrally with fixed virus. Marked perivascular cuffs and interstitial glia nodules. Polynuclear cells in the tissue. H.-E. X 400.

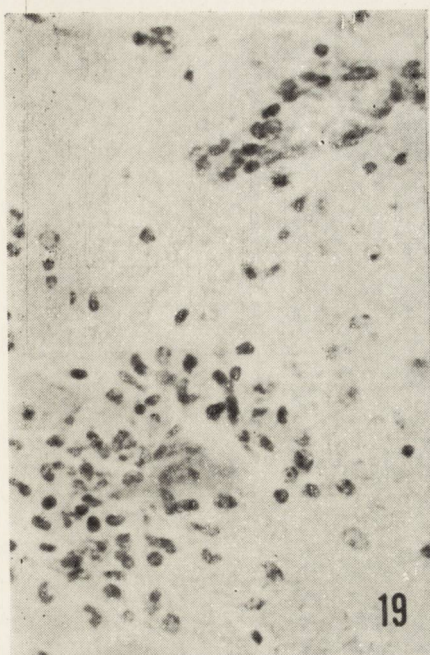
- Ryc. 13.* Chomik syryjski szczepiony podskórnie wirusem fixe. Odczyn zapalny w opuszce. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 13.* Syrian hamster inoculated with fixed virus subcutaneously. Inflammatory reaction in medulla. H.-E. X 400.
- Ryc. 14.* Chomik syryjski zakażony podskórnie wirusem fixe. Naciek oponowy penetrujący do tkanki w rdzeniu szyjnym. H.-E. Pow. 200 X.
- Fig. 14.* Syrian hamster inoculated with fixed virus subcutaneously. Meningeal infiltrate penetrating nerve tissue of cervical spinal cord. H.-E. X 200.
- Ryc. 15.* Mysz zakażona domózgowo wirusem atenuowanym. Naciezione naczynie oponowe. Rozplam pałeczek glejowych w korze. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 15.* Mice inoculated with attenuated virus intracerebrally. Infiltrated meningeal vessel. Proliferation of rod cells in cerebral cortex. H.-E. X 400.
- Ryc. 16.* Mysz szczepiona podskórnie wirusem atenuowanym. Nacieki okołonaczyniowe w istocie białej mózdzku. H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 16.* Mouse inoculated subcutaneously with attenuated virus. Perivascular infiltrates in white matter of cerebellum. H.-E. X 100.
- Ryc. 17.* Mysz zakażona domózgowo wirusem atenuowanym. Zmiany martwicze w roku amona. H.-E. Pow. 60 X.
- Fig. 17.* Mouse inoculated intracerebrally with attenuated virus. Early necrotic changes in ammon's horn. H.-E. X 60.
- Ryc. 18.* Szczur zakażony domózgowo wirusem atenuowanym. Okołonaczyniowy nacieki i obrzęk tkanki w opuszce. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 18.* Rat inoculated intracerebrally with attenuated virus. Perivascular infiltrate and edema in medulla. H.-E. X 400.
- Ryc. 19.* Świnka morska szczepiona domózgowo wirusem atenuowanym. Grudka neuronofagiczna w opuszce. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 19.* Guinea pig inoculated with attenuated virus intracerebrally. Glial nodule (neuronophagia) in medulla. H.-E. X 400.
- Ryc. 20.* Świnka morska zakażona domózgowo wirusem atenuowanym. Krwotoczek okołonaczyniowy w zwojach podstawy. H.-E. Pow. 100 X.
- Fig. 20.* Guinea pig inoculated with attenuated virus. Perivascular blood extravasation in basal ganglia. H.-E. X 100.
- Ryc. 21.* Chomik syryjski zakażony podskórnie wirusem atenuowanym. Rozproszony nacieki zapalny w warstwie drobinowej mózdzku. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 21.* Syrian hamster inoculated with attenuated virus. Scattered inflammatory infiltrate in molecular layer of cerebellum. H.-E. X 400.
- Ryc. 22.* Chomik syryjski szczepiony podskórnie wirusem atenuowanym. Odczyn zapalny w nakrywce mostu. H.-E. Pow. 400 X.
- Fig. 22.* Syrian hamster inoculated subcutaneously with attenuated virus. Inflammatory reaction in tegmentum of brain stem. H.-E. X 400.



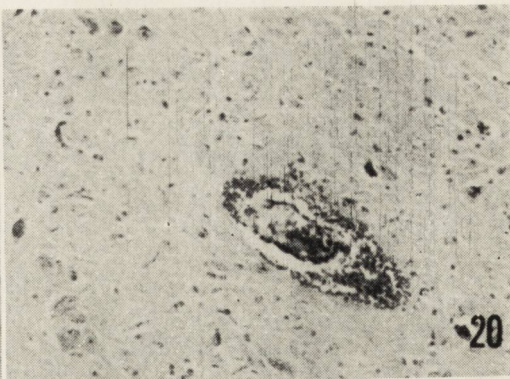




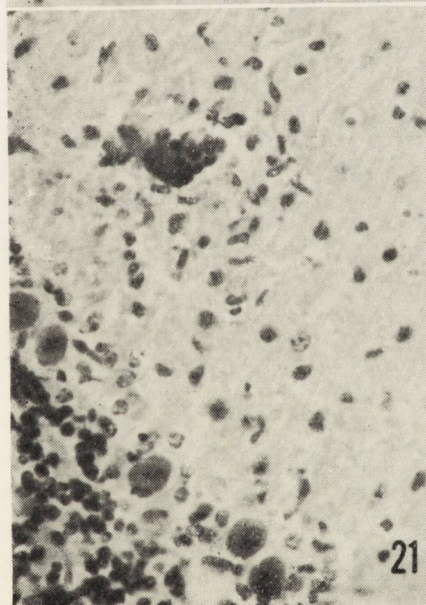




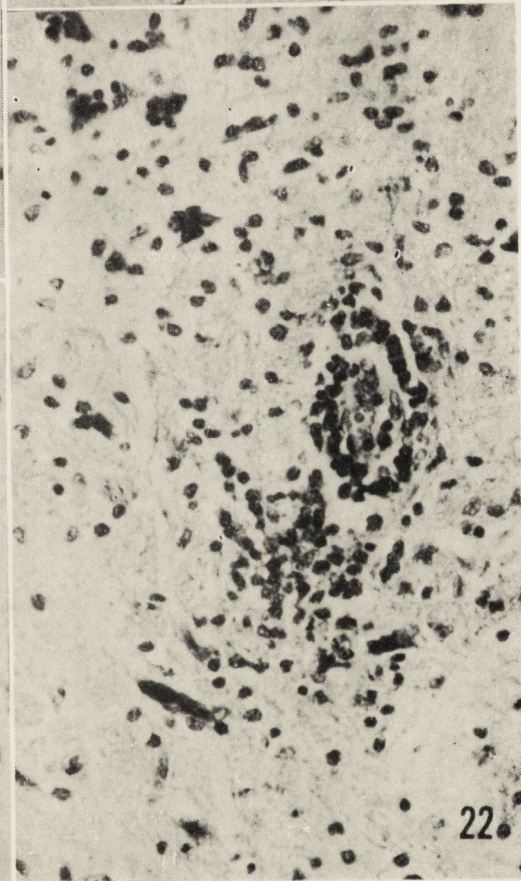
19



20



21



22

M. DAŃBSKA, F. TAYTSCH-KAPULKIN, Z. FERENS

ŚRÓDCIAŻOWE ZAKAŻENIE MYSZY WIRUSEM SINDBIS

Zespół Neuropatologii C.M.D. i K. PAN

Kierownik: prof. dr med. M. Mossakowski

Zakład Wirusologii PZH

Kierownik: prof. dr med. M. Kańtoch

W ostatnich latach pojawiają się doniesienia o śródciażowych zakażeniach przez coraz nowe rodzaje wirusów z grupy ARBO, a mianowicie *virus encephalitis Japonica B*, *St Louis*, *Venezuelan equine* (Anderson i Hansen 1970, Sperzel i wsp. 1972). W przebiegu badań nad infekcjami płodowymi i ich wpływu na niedojrzały układ nerwowy podjęliśmy próbę śródciażowego zakażenia myszy ARBO wirusem Sindbis należącym do grupy A. Jest on uważany za niepatogenny dla zwierząt dorosłych, a u noworodków powoduje zmiany zapalne w układzie nerwowym i w mięśniach (Johnson 1965).

Celem badań było ustalenie czy wirus Sindbis może być przekazywany drogą transłożyskową, a w przypadku zakażenia płodów stwierdzenie czy wywołuje on zmiany w ich układzie nerwowym.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenia wykonano na 40 myszach rasy Swiss, które zakażano między 13 a 15 dniem ciąży podając podskórnie 1 000 dawek DL_{50} zawiesiny wirusa. Badanie wirusologiczne przeprowadzono na mózgach 75 noworodków z 34 miotów bezpośrednio po urodzeniu (6 myszy ciężarnych padło) oraz na mózgach i macicach 20 matek, spośród tych od których pochodziły badane noworodki. Dla izolacji wirusa przygotowywano z badanych narządów zawiesiny 10%-owe, którymi zakażano noworodki mysie w wieku 48-72 godziny lub hodowle fibroblastów kurzych. Identyfikację wirusa przeprowadzano odczynem neutralizacji na wybranych losowo oseskach mysich lub przy pomocy odczynu zahamowania hemaglutynacji zakażonego płynu tkankowego z hodowli.

Neuropatologicznie przebadano mózgi 44 noworodków z 25 miotów (w pozostałych 9 miotach badania neuropatologicznego nie udało się przeprowadzić ze względów technicznych) i porównano je z grupą 5 noworodków zakażonych tym samym typem wirusa podskórnie dawką 1 000 DL₅₀ drugiego dnia po urodzeniu oraz z grupą kontrolną 5 zdrowych noworodków. Materiał zatapiano w formalinie i barwiono fioletem krezyłu i hematoksyliną-eozyną.

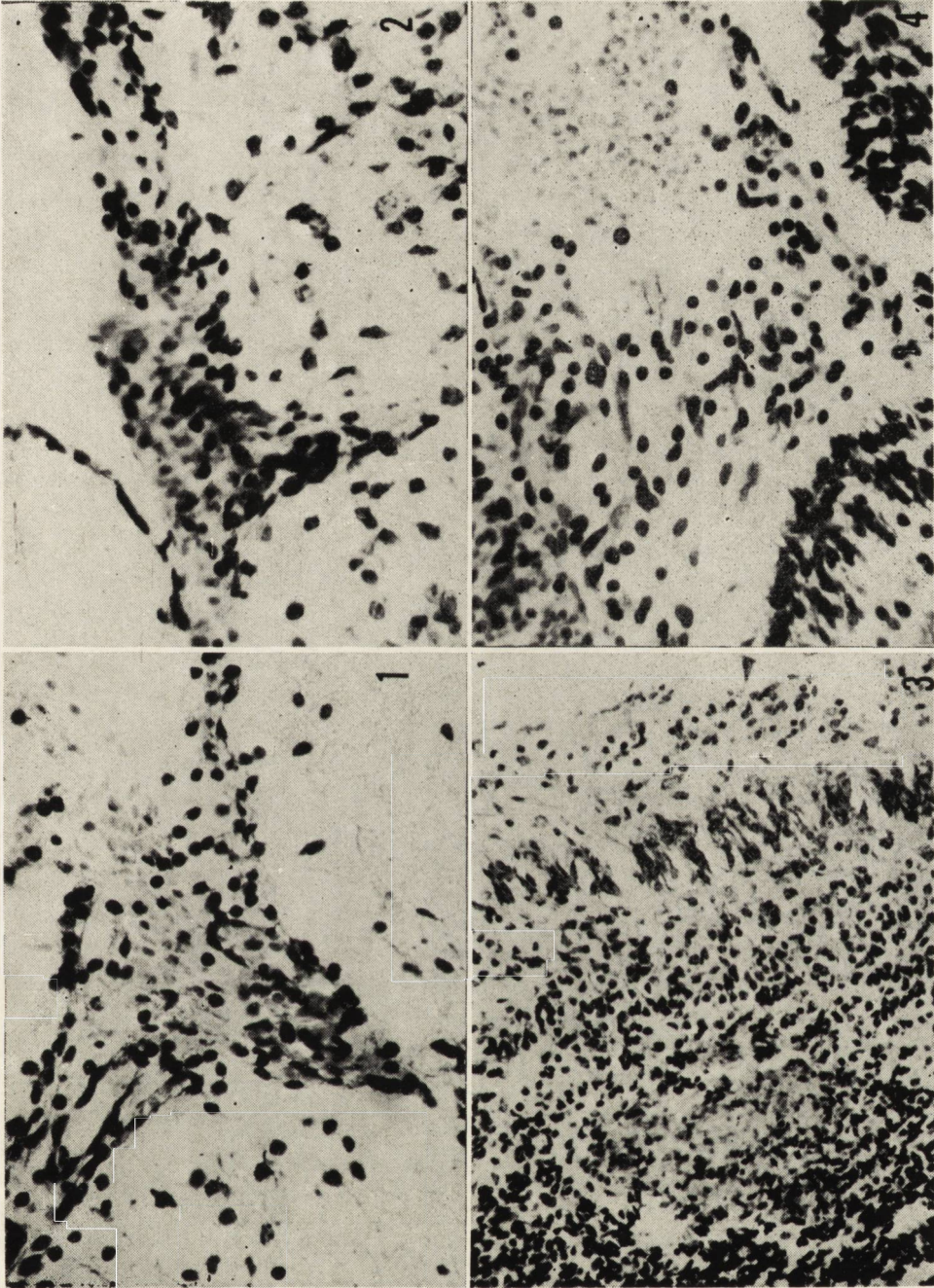
WYNIKI

Obserwacje kliniczne wykazały, że zakażenie wirusem Sindbis wywołuje objawy chorobowe takie jak niedowłady kończyn a nawet upadki samic ciężarnych. Zarówno klinicznie zdrowe, jak chore samice rodziły w przewidzianym terminie żywe potomstwo.

Badania wirusologiczne pozwoliły na wykrycie obecności wirusa w macicy i mózgu w 55% przypadków spośród przebadanych myszy —matek. Były to zwierzęta, które przyżyciowo zdradzały objawy chorobowe. W mózgach noworodków stwierdzono obecność wirusa w 16 spośród 75 przebadanych, a więc prawie w 20% przypadków. Pochodziły one z 7 spośród 34 miotów, czyli 20% miotów okazało się zakażonymi.

Badanie neuropatologiczne. W 14 przypadkach spośród przebadanych 44 stwierdzono zmiany zapalne w mózгах płodów po zakażeniu śródciążowym. Pochodziły one z miotów, w których stwierdzono przejście zakażenia na płody na podstawie badań wirusologicznych. W 7 przypadkach nacieki obejmowały opony, przechodziły wzdłuż naczyń na tkankę mózgową, widoczne były w splotach naczyniastych komór bocznych. Składały się w większości z komórek limfocytopodobnych, makrofagów i dużych komórek jednojądrzastych (ryc. 1, 2). Towarzyszyły im wybroczyny, głównie w gniazdach macierzy okołokomorowej, w wężomózgowiu (ryc. 3) i w oponach (ryc. 4). W dwóch przypadkach pochodzących z tego samego miotu nasilenie zmian naczyniopochodnych było szczególnie duże. Naciekom w tkance mózgowej towarzyszyły wtórne uszkodzenia i ubytki neuronalne w pniu i w korze mózgu. W dalszych 7 przypadkach zmiany zapalne ograniczały się do opon. W ich obrębie były różnie nasilone, od niewielkiego pomnożenia komórek jednojądrzastych do nacieków o składzie podobnym jak w przypadkach rozwiniętych zapaleń oponowo-mózgowych. Objawem towarzyszącym było w większości przypadków przekrwienie i wybroczyny w przestrzeni podpajęczynówkowej.

W mózгах 5 noworodków zakażonych po urodzeniu i dekapitowanych w 3 doby później, stwierdzono zespół zapalenia oponowo-mózgowego nieco bardziej nasilony niż po infekcji śródciążowej. Tylko w jednym przy-



- Ryc. 1.* Naciek zapalny w oponie złożony głównie z komórek limfocytopodobnych. Przyp. D 274/72. Fiolet krezyłu Pow. 400 ×.
- Fig. 1.* Inflammatory infiltrate in meninges mainly composed of lymphocyte-like cells. Case D 274/72. Cresyl violet. × 400.
- Ryc. 2.* Niewielki naciek w oponie wnikający wzdłuż naczynia do tkanki mózgowej. Przyp. D 272/ 72. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.
- Fig. 2.* Small infiltrate in meninges penetrating along blood vessel into cerebral tissue. Case D 272/72. Cresyl violet. × 400.
- Ryc. 3.* Wybroczyna do komórek macierzy w okolicy amonalnej. Przyp. D 59/73. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×.
- Fig. 3.* Ecchymosis into matrix cells in hippocampus region. Case D 59/73. Cresyl violet. × 200.
- Ryc. 4.* Naciek i wynaczynienia oponowe. Przyp. D 34/73. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×.
- Fig. 4.* Meningeal infiltrate and extravasations. Case D 34/73, Cresyl violet. × 400.

padku nacieków zawierały domieszkę leukocytów podzielonych, w pozostałych strukturach nacieków w obu grupach była podobna.

W mózgach noworodków z grupy kontrolnej zmian zapalnych nie obserwowano.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że wirus Sindbis może być przekazywany u myszy drogą transłożyskową. Wzbogaca on dużą grupę wirusów, których patogenność dla płodów przy zakażeniach matek w różnych okresach ciąży stwierdzono bądź u ludzi bądź u zwierząt doświadczalnych (Horstmann 1969, Spertzel i wsp. 1972). Dążąc w naszych badaniach do uzyskania żywych, a zakażonych noworodków oparliśmy się na doświadczeniach z innymi śródciażowymi infekcjami wirusowymi (Anderson i Henson 1970, Dąbska i wsp. 1974). Wybraliśmy model zakażenia podskórnego matek między 13 a 15 dniem ciąży, pozwalający zwykle na donoszenie potomstwa i objęcie procesem chorobowym licznych płodów w każdym z miotów. Ze względu na neurotropowe właściwości ARBO-wirusów ich obecność badaliśmy w mózgach noworodków.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnosić, że wirus Sindbis prowadzi do zakażeń śródciażowych w 20% przypadków i w podobnym procencie wywołuje zmiany o typie zapalenia oponowo-mózgowego. Charakter zmian zapalnych w mózgach noworodków był podobny do obserwowanych w innych płodowych infekcjach wirusowych m.in. wywołanych przez wirus Coxsackie B z grupy Enterowirusów (Dąbska i wsp. 1974). Na podkreślenie zasługuje nasilenie zmian krwotocznych towarzyszących naciekowi po zakażeniu wirusem Sindbis. Można je wiązać z kruchością naczyń obserwowaną w okresie ARBO-wiremii (Wróblewska 1969). Porównanie zmian u noworodków po zakażeniu śródciażowym i poporodowym nie wykazało istotnych różnic w strukturze nacieków. Prawdopodobnie od momentu zakażenia samicy na początku trzeciego tygodnia ciąży do momentu kształtowania się nacieków w układzie nerwowym płodów upływał okres wystarczająco długi, aby typ odczynów związany ze stopniem dojrzałości „zespołu zapalenia” był w obu grupach podobny. Nasilenie procesu było w grupie po zakażeniu noworodkowym większe, ale różnica ta mogła zależeć od momentu badania w okresie szczytowego rozwoju zapalenia oponowo-mózgowego.

Przeprowadzone badania pozwoliły ponadto na zaobserwowanie objawów chorobowych u pewnej liczby zakażonych samic. Wskazuje to na szczególną podatność myszy w okresie ciąży na infekcję wirusem Sindbis, który jak to już zaznaczono, zwykle nie jest patogenny dla myszy dorosłych. Dla wyjaśnienia tego zjawiska konieczne byłyby dalsze badania wirusologiczne.

М. Домбска, Ф. Таич-Капулькин, З. Ференс

ЗАРАЖЕНИЕ МЫШЕЙ ВИРУСОМ SINDBIS ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Резюме

Заражение мышей между 13 и 15 днем беременности подкожным введением суспензии вируса Sindbis вело к появлению признаков болезни и даже к падежу некоторых животных. Присутствие вируса в матке и в мозге зараженных мышей было обнаружено в 55% случаев. В мозге новорожденных наличие вируса было обнаружено в 20% случаев. У 14 из 44 исследованных новорожденных от зараженных матерей наблюдались явления менингоэнцефалита. Это сопровождалось гиперемией и геморрагией оболочек и паренхимы. Таким образом, исследования показали, что вирус Sindbis передается у мышей плацентарно.

M. DĄMBSKA, F. TAYTSCH-KAPULKIN, Z. FERENS

INFECTION OF MICE WITH SINDBIS VIRUS DURING PREGNANCY

Summary

Subcutaneous administration of Sindbis virus suspensions into mice between the 13th and 15th day of pregnancy leads to the appearance of neurological symptoms and in some cases to death. The presence of the virus in the uterus and brain of the infected mice was noted in 55% of cases and in the brain of newborns in 20% of cases. In 14 of 44 newborns from infected mothers meningo-cerebral inflammatory changes were observed, accompanied by hyperemia and extravasations into meninges and brain parenchyma. These results provide evidence that Sindbis virus may be transferred in mice transplacentally.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson A. A., Hanson R. P.: Experimental transplacental transmission of St. Louis encephalitis virus in mice. *Inf. Immunit.*, 1970, 2 (3), 320—325.
2. Dąmbska M., Ferens Z., Taytsch-Kapulkin Z.: The infection by Coxsackie B₃ virus in mouse during pregnancy. *Neuropat. Pol.* (w druku).
3. Horstmann D.: Viral infection in pregnancy. *Yale J. Biol. Med.*, 1969, 42, 99—112.
4. Johnson R. T.: Virus invasion of the central nervous system. *Am. J. Pathol.*, 1965, 46, 929—943.
5. Sperzel R. O., Crabbs C. L., Vaughn R. E.: Transplacental transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in mice, *Inf. Immunit.*, 1972, vol. 6, nr 3, 339—343.
6. Wróblewska-Mularczyk Z.: *Problemy zakażeń arbowirusowych*, PZH, Warszawa, 1969.

Adres doc. dr med. Marii Dąmbskiej: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 20-093 Warszawa.

EWA OSETOWSKA, ANNA TARASZEWSKA, FELIKS LUSZAWSKI

VI. WYSTĘPOWANIE ZWAPNIEŃ NEURONALNYCH U KRÓLIKA „PT” W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU I PRZEBIEGU KLINICZNEGO *)

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

Występowanie zwapnień neuronalnych jako jedną z cech charakterystycznych obrazu morfologicznego królika „pt” sygnalizowano już w pierwszych doniesieniach, dotyczących objawów klinicznych i typu dziedziczenia choroby (Osetowska 1967). Wstępne badania histochemiczne (Osetowska i wsp. 1973), kontynuowane nadal w Ośrodku jako rutynowe, określiły bliżej charakter złogów neuronalnych.

Doniesienie niniejsze ma na celu: 1) korelację występowania zwapnień z przebiegiem chorobowym i grupami wieku; 2) ściślejsze określenie topografii zwapnień oraz próbę interpretacji patogenetycznej tego objawu.

Analiza materiału klinicznego i mózgowego królika „pt” z tych punktów widzenia zmierza do uściślenia kryteriów doboru materiału przyżyciowego do badań zwapnień neuronalnych w ME.

MATERIAŁ I METODA

Pracę wykonano na 363 przypadkach objawowych, reprezentujących 10 pokoleń królika „pt”. Wiek badanych królików wynosił od 2 tygodni do 5 lat. Weryfikacja neuropatologiczna objęła wszystkie odmiany przebiegu klinicznego.

Obserwacje kliniczne i analizę genetyczną prowadzono opierając się na dokumentacji standardowej przedstawionej w doniesieniu V (Osetowska i wsp. 1975).

Badania morfologiczne mózgu wykonano w technice parafinowej i mrozikowej. Preparaty oceniano w mikroskopach świetlnych „Wild” (Szwajcaria) i „Zeiss” (NRD).

* Problem węzłowy 09.4.1.3, temat 4. Praca wykonana z pomocą finansową Grant PL 480, USA, NHI, Agreement 05-035-1.

Barwienia tkankowe: H-E, fiolet krezyłu, metoda Heidenhaina lub Spielmeijera, Holzera, van Gieson, impregnacja srebrowa wg Holmes'a. Rutynowe barwienia histochemiczne: PAS z testami kontrolnymi, PAS-Astra, błękit alcjanowy, czerwień Kongo, alizaryna red S, metody Turnbulla von Kossa (wg receptury Romeis 1968).

W obliczeniach grupowych i procentowych posługiwano się licznikiem MINTRON (electronic calculator, Minsung Electronics, LDT, Seoul).

WYNIKI

51 przypadków przedstawiało lekki poronny przebieg kliniczny ze skróconą fazą drżeń. Neuropatologicznie przypadki te odpowiadały grupie IA, B i C doniesienia II (Osetowska i wsp. 1975). W żadnym przypadku nie znaleziono zwapnień. Na 312 przypadków z wyraźnymi objawami klinicznymi zwapnienia znaleziono w 141, co stanowi 45,19% całego materiału. Wyniki dla poszczególnych grup w zależności od objawów zestawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Ciężki przebieg kliniczny z fazą drżeń i niedowładów

Table 1. Severe clinical course with tremor and paralysis

Wiek — Age	Przypadków Cases (total)	Przypadków z Ca Cases with Ca	%
Poniżej 2 miesięcy Under 2 months	80	35	43,75
2—6 miesięcy 2—6 months	127	75	59,06

Tabela 2. Przebieg stacjonarny z przewagą niedowładów

Table 2. Subchronic course with parietic symptoms

Wiek — Age	Przypadków Cases (total)	Przypadków z Ca Cases with Ca	%
6—12 miesięcy 6—12 months	39	9	23,0
Przebieg objawowy z poprawą i przedłużonym przeżyciem Symptomatic clinical course with improvement and long survival			
1—5 lat 1—5 years	66	22	33,3

Jak widać z powyższych danych najwyższy procent przypadków ze zwapnieniami występuje w grupie wieku powyżej dwóch miesięcy, z ciężkim pełnym przebiegiem klinicznym. Najwcześniejsze zwapnienia spoty-

kano u królików w wieku 19—21 dni, tj. w 10 i 12 dniu od wystąpienia drżeń. Nie zestawiono tabelarycznie zwapnień neuronalnych u samców i samic. Procentowo przedstawiają się podobnie, ale na ogół we wszystkich grupach uderza niemal dwukrotna przewaga samców, co do ilości bezwzględnej przypadków. Zjawisko to być może wynika z kształtowania się liczebności stada podstawowego, w którym zachowuje się przeciętnie 1 samca na 7 samic; poza tym w jednym z najchętniej stosowanych kojarzeń chorej genetycznie samicy ze zdrowym samcem otrzymuje się wyłącznie chore samce i samice nosicielki. Te ostatnie są ze stada często eliminowane, natomiast samce z ciężkim przebiegiem klinicznym powiększają odpowiednie dane liczbowe. Duża ilość zwierząt z poprawą kliniczną i przeżyciem przedłużonym znalazła hipotetyczne ale nader prawdopodobne wyjaśnienie w doniesieniu V (Osetowska i wsp. 1974).

Brak zwapniałych neuronów w pozostałych przypadkach z bardzo ciężkim przebiegiem klinicznym, szczególnie w najmłodszej grupie wieku należałoby tłumaczyć bardzo szybko postępującym rozpadem neuronów.

Morfologia zwapnień

Struktura i stopień „dojrzałości” złogów wapniowych przedstawia się różnie w poszczególnych przypadkach, na ogół można jednak znaleźć pewne odniesienia do czasu przeżycia. U królików bardzo młodych z ostrym przebiegiem przeważają złogi ciemno-granatowe w barwieniu H-E i fioletem krezyłu (ryc. 1a). Jednak takie złogi wybarwiają się na ogół dodatkowo (czarno) w metodzie von Kossa. Delikatne centralne przejaśnienie odpowiadające najpierw jądro neuronu, a potem już tylko jąderku obserwuje się w większości przypadków, dotyczących młodych zwierząt. W miarę postępującej mineralizacji komórka ulega stopniowemu przejaśnieniu aż do zupełnie przejrzystych złogów (ryc. 1b, c), przy czym niekiedy proces ten kształtuje się morfologicznie odwrotnie: centrum ulega przejaśnieniu, podczas gdy obwód komórki pozostaje ciemny. Pre-dylekcja złogów wapniowych do komórek ruchowych jest wyraźna, przy czym układ populacji neuronalnej w danym jądrze i porównanie z rozmiarami komórek niezwapniałych nie nasuwają trudności w odniesieniu struktury zwapniałej do neuronu. Przypuszczalne zwapnienia komórek glejowych spotykano stosunkowo rzadko w barwieniach komórkowych i bardzo rzadko w barwieniach histochemicznych. Dość wcześnie i wyraźnie ujawnia się koncentryczna struktura zwapniałych neuronów w impregnacji metodą Holmesa (ryc. 1d). Tylko w 20 przypadkach, odznaczających się bardzo dużą ilością zwapnień na różnych poziomach, obserwowano odkładanie się związków wapniowych w aksonach istoty białej.

Tabela 3. Topografia zwapniałych neuronów
Table 3. Topographic distribution of calcified neurons

Poziom Level	S. reticularis pontis et medullae oblon- gatae	S. reticularis mesencephali	Pallidum, pars med. gigantocel.	Thalamus, sub- thalamus, hypo- thalamus
Ilość przypad. Number of cases	112	78	55	48
%*)	79,43	55,32	39,01	34,04

*) Obliczono od 141 przypadków ze zwapnieniami
Calculated from 141 cases with calcifications

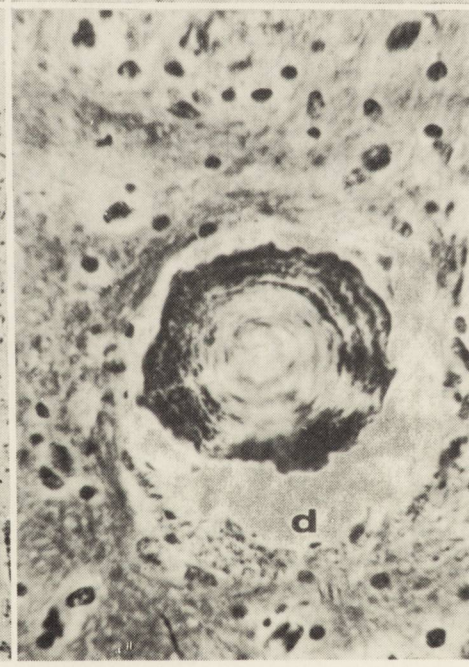
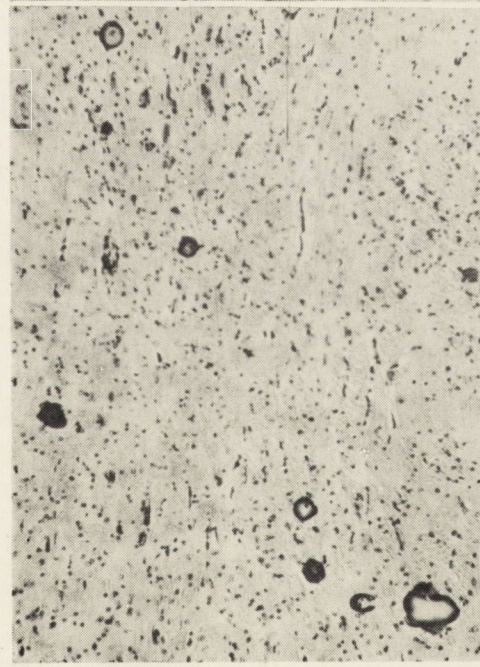
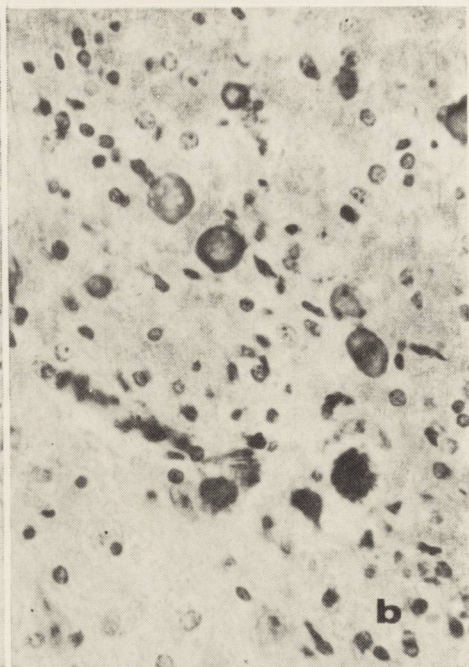
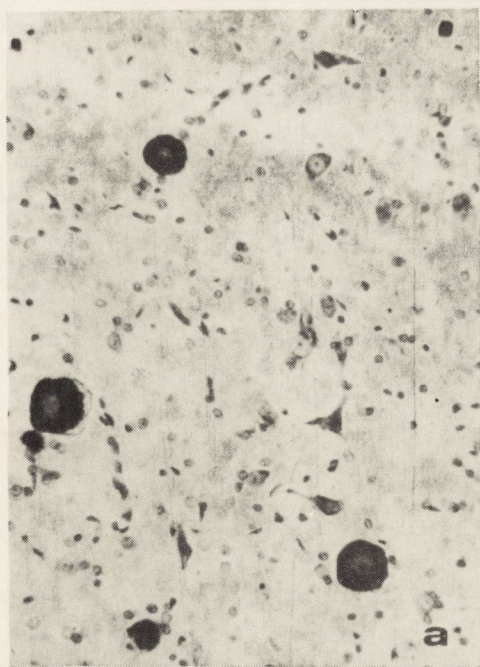
Tabela 4. Topografie sporadyczne
Table 4. Sporadic topographies

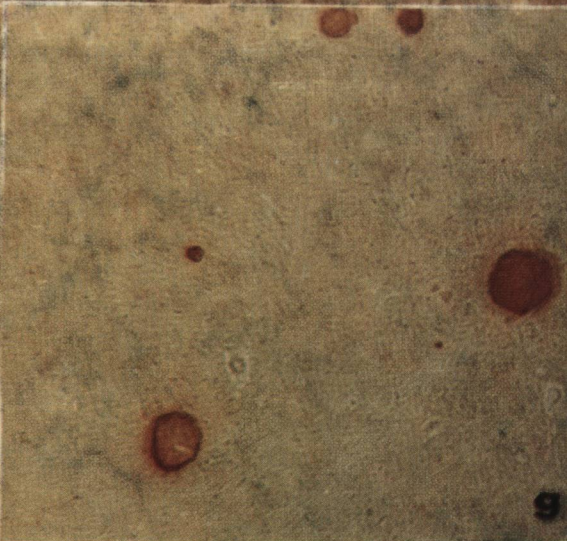
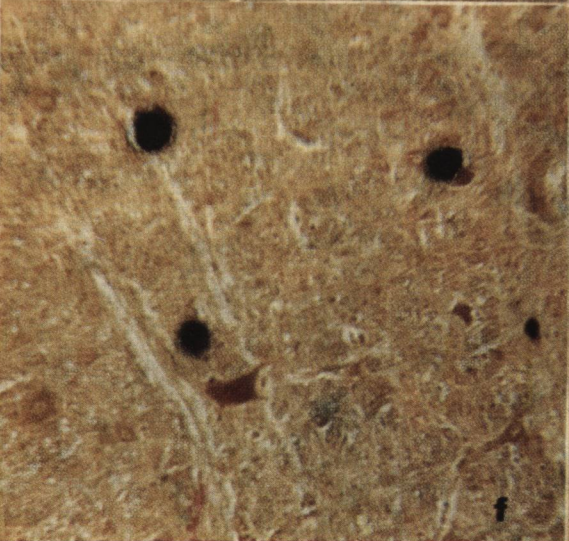
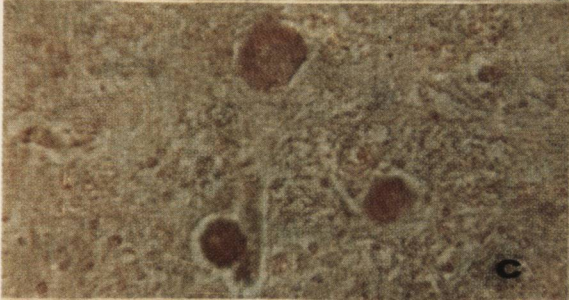
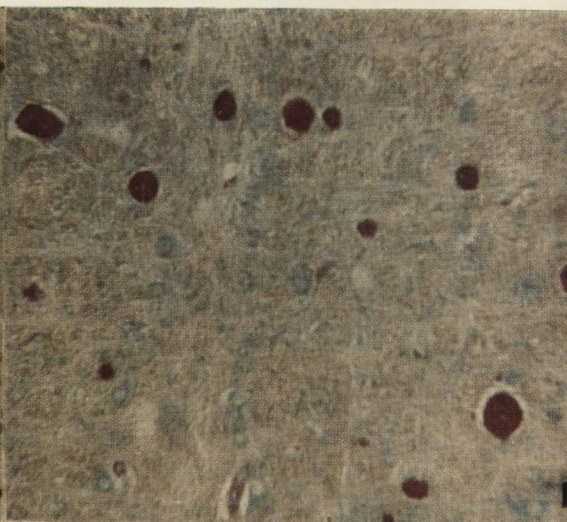
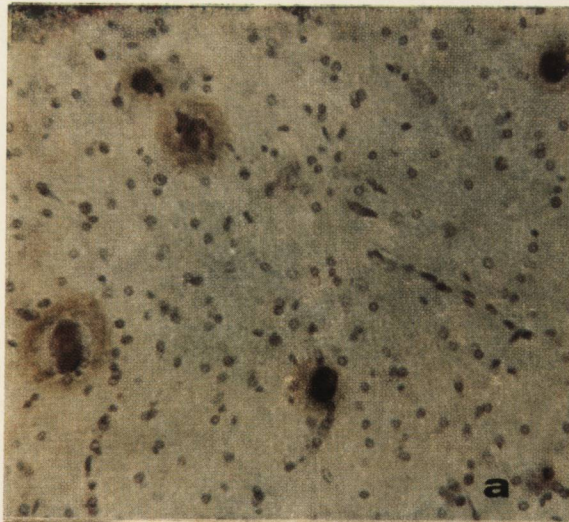
Poziom Level	S. alba paraneu- ronalis c. int. ansa lent. tract. opticus	-n. nervi craniales					VIII Deit	Neo- stria- tum	Cor- tex cere- bri	Nuclei profundi cerebelli
		III	IV	Vm	VI	VII				
Ilość przypad. Number of cases	20	9	6	21	1	2	3	18	3	5
%	14,1	6,3	4	14	0,7	1,4	2,1	12,77	2,1	3,55

Jednym z ciekawszych obrazów jest spotykane w niektórych przypadkach „halo” metachromatyczne, towarzyszące złogom wybarwiającym się fioletowo w fiolecie krezyłu (ryc. 2a). Złogi wybarwiają się ujemnie w metodach na kwaśne mukopolisacharydy (błękit alcjanu i PAS-Astra, ryc. 2b), na żelazo (ryc. 2c), lipidy (sudan czarny. B — ryc. 2e) amyloid-czerwień Kongo. Natomiast dają silnie dodatnie odczyny w metodach van Kossy i czerwieni alizaryny. Jakkolwiek dwie ostatnie metody uwa-

Ryc. 1. a) Przyp. z. 271/70. Wczesne zwapnienia w istocie siateczkowej opuszki. Fiolet krezyłu. Pow. 200 X; b) Przyp. z. 47/68. Zwapnienia w *neostriatum*. H.-E. Pow 200 X; c) Przyp. z. 212/72. Zwapniałe neurony w wewnętrznym segmencie *pallidum*. H.-E. Pow. 200 X; d) Przyp. z. 125/71. Koncentryczny układ związków wapniowych w neuronie ruchowym istoty siateczkowej śródmózgowia. Holmes. Pow. 400 X.

Fig. 1. a) Case z. 271/70. Early calcifications in reticular formation in medulla. Cresyl-violet. X 200; b) Case z. 47/68. Calcified neurons in *neostriatum*. H.-E. X 200; c) Case z. 212/72. Calcified neurons in the internal segment of *pallidum*. H.-E. X 200; d) Case z 125/71. Concentric arrangement of intraneuronal calcifications in *substantia reticularis mesencephali*. Holmes meth. X 400





za się za orientacyjne, przy ujemnych wynikach barwień wymienionych wyżej można przyjąć obecność w zwapniałych neuronach prostych związków wapniowych (metoda von Kossa: węglany i fosforany wapniowe). Zdaniem Romeisa (1968) alizaryna daje wynik dodatni tylko ze złoгами zawierającymi stosunkowo obfitą ilość związków wapniowych i stosunkowo rzadko wybarwia się pozytywnie w protoplazmie komórkowej. Toteż obrazy widoczne na ryc. 2f (von Kossa) i 2g przesądzą rozpoznanie „zwapnień” nie zaś „pseudo-zwapnień” w neuronach królika „pt”. W przypadkach o przeżyciu przedłużonym nie zmienia się charakter chemiczny złożeń, natomiast są one nieco odrębne morfologicznie: bardziej „dojrzałe”, drobniejsze, obkurczone, niekiedy widać pęknięcia przebiegające przez zwapniały neuron. Na ogół zwapnienia w najstarszej grupie wieku są stosunkowo mniej liczne w poszczególnych przypadkach. Nie jest to jednak regułą: w przypadku 36/68, z przeżyciem 1 rok i 4 miesiące obserwowano bardzo liczne złoże nie tylko na poziomach „konwencjonalnych” (por. niżej) ale nawet w tak rzadkich lokalizacjach jak kora półkul i jądra głębokie mózgu.

Zaledwie w 6 przypadkach znaleziono pojedyncze zwapniałe neurony na jednym poziomie, przy czym tylko w przypadku 60/66 krajany w serii ciągłej od bieguna czołowego do potylicznego, łącznie z pniem i mózdzkiem, możemy przyjąć z całą pewnością, że istotnie występował w nim pojedynczy zwapniały neuron w istocie siateczkowej śródmózgowia. Znacznie częściej spotyka się od kilku do kilkudziesięciu neuronów na różnych poziomach. W tabeli 3 i 4 zestawiono częstość występowania zwapnień w poszczególnych strukturach anatomicznych.

DYSKUSJA

Zwapnienia neuronalne u królika „pt” występują najczęściej w przypadkach z pełnym, ciężkim zespołem klinicznym, w grupach wieku do

Ryc. 2. a) Przyp. z. 47/68. Metachromatyczne „halo” dookoła zwapniałych neuronów. Fiolet kryzylu. Pow. 200 X; *b)* Przyp. z. 93/70. Zwapnienia na poziomie opuszki barwiące się ujemnie na obecność kwaśnych mukopolysacharydów. PAS-Astra. Pow. 200 X; *c)* i *d)* Przyp. z. 93/70. Ujemna reakcja na obecność żelaza w zwapniałych neuronach, dodatnia w przynaczyniowym mikrogleju. Turnbull. Pow. 200 X; *e)* Przyp. z. 300/70. Zwapniały neuron w istocie siateczkowatej śródmózgowia, negatywna reakcja na obecność lipidów. Sudan czarny B, Pow. 400 X; *f)* i *g)* Przyp. z. 93/71 i z 97/71. Dodatni odczyn na obecność związków wapnia. Von Kossa i czerwień alizaryny S. Pow. 200 X.

Fig. 2. a) Case z. 47/68. Metachromatic „halo” around early neuronal calcifications. Cresyl-violet. X 200; *b)* Case z. 93/70. Calcified neurons with negative acid mucopolysaccharide reaction. PAS-Astra X 200; *c)* and *d)* Case z. 93/70. Negative iron-reaction in the calcified neurons, positive in perivascular microglia. Turnbull meth. X 200; *e)* Case z. 300/70. Calcified neuron in reticular formation of mesencephalon, negative reaction with sudan black B. X 400; *f)* and *g)* Case z. 93/71 and z 97/71. Positive reaction after von Kossa and with alizarine red S. X 200.

2 miesięcy i powyżej dwóch miesięcy (odpowiednio 43% i 59% przypadków). Najrzadziej spotyka się je u zwierząt z zespołem poronnym, w którym faza drżeń jest słabo ujawniona lub w ogóle zastąpiona przez wcześniej rozwijające się, stacjonarne niedowłady. Nie znaleziono nigdy zwapnień przed wystąpieniem drżeń.

Po orientacyjnym wykluczeniu królika „pt” z kręgu zaburzeń przemiany purynowej oraz zaburzeń biochemicznych pokrewnych chorobie Wilsona, abetalipoproteinemii (Wald i wsp. 1976), jak również lipidoz spichrzających (Czartoryska i wsp. 1976), obraz chorobowy dziedzicznej drżączki porażnej narzuca nieuchronnie skojarzenia z zakłóconym metabolizmem endogennych amin katecholowych. W jednym z poprzednich doniesień (Taraszewska, Osetowska 1975) zwrócono uwagę, że drżenia występują i narastają u królika „pt” w tym samym czasie, w którym wychwył dopaminy osiąga najwyższe poziomy u królika prawidłowego (Tennyson i wsp. 1972). Jeżeli jednak zespół „pt” ocenić *per analogiam* z parkinsonizmem u człowieka, bezpośrednie związki przyczynowe drżeń i ewentualnego obniżonego poziomu dopaminy wydają się więcej niż wątpliwe. U parkinsoników podawanie L-Dopa eliminuje wyraźnie fazę akinetyczno-hipertoniczną, ale znacznie rzadziej wpływa dodatnio a nawet nasila drżenia spoczynkowe (Barbeau 1972, Lhermitte i wsp. 1973, Tissot i Ajuriaguerra 1973). Patofizjologia tych ostatnich pozostaje nadal praktycznie niewyjaśniona (Fahn i wsp. 1971). Poszukiwanie rozwiązania na drodze doświadczalnej doprowadziło m.in. Abramsky'ego i wsp. (1971) do przypomnienia znacznie wcześniejszej pracy Constasa (1962). Constas otrzymywał wybitne nasilenie drżeń u parkinsoników przez podanie adrenaliny. To spostrzeżenie nawiązuje do wąskiego punktu wspólnego pomiędzy naruszoną równowagą poziomu endogennych katecholamin adrenaliny (Kądziaława 1972) a wytępowaniem zwapnień śródkomórkowych. Po jednorazowym podaniu dożylnym adrenaliny królikom Cavallero i wsp. (1974) zaobserwowali w komórkach mięśni gładkich aorty występowanie zwapnień mitochondrialnych, uchwytnych w ME już w ciągu pierwszych godzin doświadczenia. Zjawisku temu nie towarzyszyło ani równoległe, ani późniejsze naruszenie prawidłowych poziomów metabolitów przemiany wapniowej w surowicy krwi.

Przy uwzględnieniu wszelkich różnic dzielących komórkę mięśni gładkich od neuronu, spostrzeżenia Cavallero i wsp. przedstawiają kilka interesujących zbieżności z naszymi obserwacjami. Po pierwsze wychwył i akumulacja jonu wapniowego przez komórkę ma charakter procesu czynnego, w przeciwieństwie do biernej inkrustacji wapniowej tkanek martwiczych. Na taki charakter zwapnień u królika „pt” wskazują zarówno wiek, jak i morfologia wapniejących neuronów. Po drugie u królika „pt” również nie ma morfologicznych wskaźników zaburzonej prze-

miany wapniowej w surowicy krwi. Jon wapnia wiązany jest wybiórczo przez neuron, przy braku złogów okołonaczyniowych, czy śródtkankowych (Kahl-Kunstetter 1968). Po trzecie w populacji komórkowej sąsiedniej, w której cytowani wyżej autorzy nie stwierdzili zwapnień, występowały wakuole autofagiczne, przerzedzenia cytoplazmiczne, homogenizacja prowadząca do postaci cieni komórkowych i tym podobne wykładniki morfologiczne śródkomórkowej dezorganizacji strukturalnej. Opisy te aż nazbyt żywo przypominają uszkodzenia komórkowe u królika „pt”. Cavallero i wsp. stwierdzili, że występowanie zwapnień poprzedzają objawy zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych, powodujące gromadzenie się płynu w przestrzeniach subendothelialnych i śródwłókienkowych. Zwiększoną przepuszczalnością nabłonków kanalików nerkowych tłumaczą także pojawianie się zwapnień w nerkach (kanalikach) królików doświadczalnych. Pomijając inne objawy zwiększonej przepuszczalności barier komórkowych u królika „pt”, od roku 1973, odkąd wprowadziliśmy regularne badanie mikroskopowe narządów spostrzegamy u królika „pt” częste występowanie zwapnień w nabłonkach kanalików i to zarówno u królików chorych jak nickiedy i u nosicieli.

Bezcelowe byłoby dalsze przytaczanie analogii, ponieważ w dotychczasowych badaniach królika „pt” brakuje nam właśnie owej „praprzyczyny”, jaką w doświadczeniach Cavallero i wsp. było egzogenne podwyższenie we krwi królików poziomu adrenaliny. Może tylko warto jeszcze wspomnieć, że zaburzenie przepuszczalności barier mózgowych w obrocie i wychwycie katecholamin jest i postulowane i stwierdzone doświadczalnie przez licznych autorów (Issidorides 1971, Sachs 1973).

Wracając na teren empirycznie sprawdzony t.j. do skrawka neuropatologicznego królika „pt” trzeba przypomnieć, że lokalizacja zwapnień nie jest związana wybiórczo i nawet rzadko bezpośrednio z układem nigrostriatalnym. Pozostaje jednak do niego w takim stosunku topograficznym w jakim pozostawały do siebie, zdegradowane terminologicznie przez Brodala (1963) i Mettlera (1968), ale jeszcze ściślej powiązane fizjologicznie, układy piramidowy i pozapiramidowy. Topografia zwapnień odpowiada na ogół dość wiernie okolicom mózgu, w których Fargalla (1973) stwierdził najbardziej intensywną wymianę jonów wapniowych. Do wyjątków w tej lokalizacji należy w naszym materiale stosunkowo częste i intensywne nagromadzenie zwapnień neuronalnych w przyśrodkowym wielkokomórkowym jądrze gałki bladej. Rola tej ostaniej od czasu jej detronizacji przez Martina (1965) i Mettlera (1968) w zespole parkinsonizmu pozostaje niejasna. W niektórych przypadkach królika „pt” z przeżyciem przedłużonym lub stacjonarnymi niedowładami masowe zwapnienia neuronalne w *globus pallidus*, przechodzące aż na aksony, w *capsula interna* i *ansa lenticularis* nasuwają skojarzenia z leczeniem operacyjnym

parkinsonizmu: w pewnych obserwacjach zniszczenie połączeń pomiędzy *pallidum* i *nucleus ventro-medialis thalami* eliminowało drżenia na zasadzie spowodowania niedowładu spastycznego (Kaada 1963). Nie ulega natomiast wątpliwości, że największą skłonność do wiązania jonów wapnia wykazują neurony typu motorycznego. W warunkach prawidłowych jest to wyjaśnione rolą jonu Ca, jako ogniwa przełącznikowego i śródkomórkowego transmittera (Wolf i wsp. 1972, Simkiss 1974) w drodze ku efektorowi obwodowemu. Niemniej wzmożone wiązanie jonu wapnia w związkach proteino-fosfolipidowych, przeprowadzających go wbrew gradientowi stężenia poza- i śródkomórkowego (Simkiss 1974) musi być znowu uwarunkowane podrażnieniem komórki (Ozawa 1973, Okada 1973, Carafoli i wsp. 1973), którego natury nie znamy. Z kolei w warunkach prawidłowych nie jest znany mechanizm opuszczania komórki przez jon Ca, ponieważ jego „wyrzucanie”, czy to w pęcherzyku pinocytarnym, czy w innym mechanizmie, byłoby znowu sprzeczne z różnicą gradientów (Simkiss 1974). W tym miejscu łatwiej prześledzić jest losy samobójczej „tezauryzmozy” w neuronie u królika „pt”. W komórce następuje wzmożona koncentracja jonu wapnia dzięki funkcji mitochondriów powodujących fosforylację ADP-azy do ATP-azy. Akumulacja Ca we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej neuronów i gleju została niedawno potwierdzona w badaniach Łazarewicza i wsp. (1974). W pewnym jednak momencie wiązanie wapnia przez neuron królika „pt” przekracza możliwość dalszego przekazywania go przez komórkę, której uszkodzenie tak jak zainicjowało wzmożoną akumulację jonu Ca, tak następnie dezintegruje mechanizm jego dalszych przemian. W ostatecznym efekcie neuron ulega mineralizacji, w której jego kształt i rozmiar zachowane są *mutatis mutandis* na podobieństwo skamielinowych amonitów.

Wszystkie powyższe spostrzeżenia i korelacje wydają się konwergować ku jakiejś wspólnej osi przyczynowej, brakuje im jednak nadal ogniwa spajającego. W zestawieniu rozmiarów objawów klinicznych i całokształtu uszkodzeń morfologicznych mózgowych u królika „pt” zwapniały neuron jest z pewnością zjawiskiem ubocznym. Niemniej w związku z cytowanymi pracami wydaje się, że może on odegrać rolę tkankowej strzałki wskazującej kierunek poszukiwań biochemicznych i biofizycznych, wyjaśniających podłoże dziedzicznej drżączki porażnej królika.

Э. Осетовска, А. Тарашевска, Ф. Лушавски

VI. ОТЛОЖЕНИЯ КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАХ У КРОЛИКА „пт”
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ БОЛЕЗНИ

Резюме

Отложения кальция в нейронах появляются чаще всего у кроликов „пт” в случаях (59%) с продленной фазой паркинсоноподобного дрожания. Нейроны

с кальциевыми отложениями не содержат кислых мукополисахаридов, железа, амилоида и липидных соединений. При окрашивании ализарином красным и по методу фон Косса они проявляют сильную положительную реакцию. Топографически отложения кальция относятся к двигательным нейронам ретикулярной формации мозгового ствола, паллидума, таламуса и гипоталамуса. Соответствие наличия отложений кальция с интенсивностью фазы тремора в покое наводит на мысль о возможности существования общей для обоих признаков биохимической основы. Среди катехоламинов адреналин, применяемый экспериментально, приводит к усилению дрожания у паркинсоников (Констас 1962) и к раннему появлению митохондриальных отложений кальция в аорте кроликов (Каваллеро и др. 1972). Авторы выдвигают гипотезу, что сходный фактор, вызывающий раздражение клеточных мембран двигательных нейронов, вызывает активный кальциевый псевдо-тезауризм. Нарастающая нейронная дезинтеграция препятствует передаче иона Ca^{++} периферическому эффектору, приводя к минерализации нейрона. Количественное проявление кальциевых отложений в клиническом и морфологическом процессе „pt” позволяет расценивать его лишь как побочное явление. Однако, оно могло бы играть роль тканевого показателя в поисках основных биохимических нарушений в наследственном дрожательном параличе у кролика.

E. Osetowska, A. Taraszewska, F. Luszawski

VI. NEURONAL CALCIFICATION IN „PT” RABBITS: DEPENDENCE ON AGE AND CLINICAL COURSE

Summary

Neuronal calcifications in „pt” rabbits were found to occur most frequently in cases with prolonged phase of Parkinson-like tremor (59%). The data concerning different age groups and clinical courses are listed in Table 1 and 2. Calcified neurons are characterized by the absence of acid mucopolysaccharides, iron, amyloid and lipids. They give a strongly positive reaction with alizarine red S and in von Kossa method. Topographically, the calcifications include motor neurons of reticular formation of brain stem, pallidum, thalamus and hypothalamus.

The frequency of occurrence in various localizations is illustrated in Tables 3 and 4. The coincidence of calcifications with intensification of the rest tremors' phase prompted the authors to discuss the possibility that the two symptoms might have a common biochemical background.

Among catecholamines, adrenaline applied experimentally causes both intensification of tremors' in parkinsonic patients (Constas, 1962) and early appearance of mitochondrial calcifications in rabbit aorta. (Cavallero et al., 1974). The authors put forward the hypothesis that a similar factor evoking excitation of cell membranes of motor neurons causes active calcium pseudotesaurismosis. Progressing neuronal desintegration hinders the transfer of Ca^{++} ion into the peripheral effector leading to neuronal mineralization. The frequency of calcifications in the clinical and morphological process of „pt” allows to consider them as a side effect only. They could, however, play the role of a tissue indicator in search of fundamental biochemical disturbances in hereditary paralytic tremor in rabbit.

PIŚMIENICTWO

1. Abramsky O., A. Carmon, S. Lavy: Combined Treatment of Parkinsonian Tremor with Propanol and Levodopa. *J. neurol. Sci.* 1971, 14, 491—494.
2. Barbeau A.: Corrélationes biochimiques et cliniques dans la maladie de Parkinson. *Rev. Neurol.* 1972, 127, 253—264.
3. Brodal A.: Some data and perspectives on the anatomy of the so-called „extrapyramidal system”. Report on the XVIth Congress of Scandinavian Neurologist. Munksgaard. Copenhagen 1963, 18—38.
4. Carafoli E., F. Crovetti: Interaction Between Prostaglandin E₁ and Calcium at the Level of the Mitochondrial Membrane. *Arch. Biochem.* 1973, 154, 40—46.
5. Cavallero C., L. G. Spagnoli, U. Di Tondo: Early Mitochondrial Calcifications in the Rabbit Aorta after Adrenaline. *Virchows Arch. A. Path. and Histol.* 1974, 362, 23—39.
6. Constan C.: The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on parkinsonian tremor. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1962, 25, 116—121.
7. Czartoryska B., I. Wald, A. Taraszewska: VIII. Lipidy mózgu królika „pt” *Neuropat. pol.* 1976 w druku.
8. Fahn S., L. R. Libsch, R. W. Cutler: Monoamines in the Human Neostriatum: Topographic Distribution in Normals and Parkinson's Disease and Their Role in Akinesia, Rigidity, Chorea and Tremor. *J. neurol. Sci.* 1971, 14, 427—455.
9. Faragalla F. F.: The Distribution and Exchange of Brain Calcium in Vivo in the Rat. *Exp. Brain Res.* 1973, 17, 206—215.
10. Issidorides M. R.: Neuronal Vascular Relationships in the Zona Compacta of Normal and Parkinsonian Substantia Nigra. *Brain Res.* 1971, 25, 289—299.
11. Kaada B. R.: The Pathophysiology of Parkinsonian Tremor, Rigidity and Hypokinesia. Report on the XVIth Congress of Scandinavian Neurologists. Munksgaard. Copenhagen 1963, 39—51.
12. Kahl-Kunstetter J.: Zwapnienia śródmózgowe w chorobach naczyniowych mózgu. *Neuropat. pol.* 1968, 6, 11—36.
13. Kądziaława K.: Aktualne poglądy na powstawanie i inaktywację biologiczną endogennych amin katecholowych. *Acta Physiol. Pol.* 1972, 23, supl. 4, 7—22.
14. Lhermitte F., A. Rosa, E. Comoy, C. Bohoun.: Mouvements anormaux provoqués par la L. Dopa et anomalies du métabolisme de la dopamine. *Rev. Neurol.* 1973, 129, 313—324.
15. Łazarewicz J. W., H. Haljamäe, A. Hamberger.: Calcium Metabolism in Isolated Brain Cells and Subcellular Fractions. *J. Neurochem.* 1974, 22, 33—45.
16. Martin J. P.: The Globus Pallidus in Post-Encephalitic Parkinsonism. *J. neurol. Sci.* 1965, 2, 344—365.
17. Mettler F. A.: Anatomy of the basal ganglia. In: P. J. Vinken, G. W. Bruyn (Eds) *Diseases of the basal ganglia.* Vol. 6. North-Holland Publ. Co. Amsterdam 1968, 1—55.
18. Okada K.: Effect of calcium and magnesium on spontaneous transmitter release accelerated by raised potassium. *Brain Res.* 1973, 53, 237—242.
19. Osetowska E.: Nouvelle maladie héréditaire du lapin de laboratoire. *Acta neuropath.* 1967, 8, 331—344.
20. Osetowska E., F. Luszawski, A. Taraszewska: II. Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika „pt”. *Neuropat. pol.* 1975, 13, 71—85.

21. Osetowska E., F. Luszewski, A. Taraszewska. Badania doświadczalne nad chorobą dziedziczną ośrodkowego układu nerwowego na modelu królika „pt”. V. Obraz kliniczny w pokoleniach I—IX. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1975, 9, 569—578.
22. Osetowska E., W. Krücke, B. Wuttke: Zerebrale Verkalkungen bei Kaninchen „pt” mit erblicher Erkrankung des ZNS. In: *Aktuelle Probleme der Neuropathologie*. Ed. K. Jellinger. Facultas-Verlag, Wien 1973, 125—129.
23. Ozawa E.: Activation of phosphorylase kinase from brain by small amounts of calcium ion. *J. Neurochem.* 1973, 20, 1487—1488.
24. Romeis B.: *Mikroskopische Technik*. R. Oldenburg Verlag, München-Wien 1968.
25. Sachs Ch.: Development of the blood-brain barrier for 6-Hydroxydopamine. *J. Neurochem.* 1973, 20, 1753—1760.
26. Simkiss K.: Calcium translocation by cells. *Endavour*, 1974, 33, 119—123.
27. Taraszewska A., E. Osetowska: IV. Zmiany w mózgu królika „pt” w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 283—290.
28. Tennyson V. M., Barret R. E., G. Cohen, L. Côté, R. Heikkila, C. Mytileneou: The Developing Neostriatum of the Rabbit: Correlation of Fluorescence Histochemistry, Electron Microscopy, Endogenous Dopamine Levels and (3H) Dopamine Uptake. *Brain Res.* 1972, 46, 251—285.
29. Tissot R., J. de Ajuriaguerra. Syndrome de Parkinson. *Nouvelle Presse méd.* 1973, 2, 315—316.
30. Wald I., H. Wehr, E. Harmak, K. Albert, J. Sawicki: VII. Niektóre wskaźniki biochemiczne w surowicy krwi królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 97—104.
31. Wolff D. J., Huebner J. A., F. L. Siegel: Calcium — binding Phosphoprotein of Pig Brain. Effects of Cations on the Calcium Binding. *J. Neurochem.* 1972, 19, 2855—2862.

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

IGNACY WALD*, HANNA WEHR*, EWA HARMAK*, KRZYSZTOF ALBERT,
JAN SAWICKI

VII. NIEKTÓRE WSKAŹNIKI BIOCHEMICZNE W SUROWICY KRÓLIKA „PT”**

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

Kierownik Ośrodka: prof. dr med. E. Osetowska

Zakład Genetyki Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Kierownik Zakładu: doc. dr med. I. Wald

Doniesienie poniższe stanowi kolejne ogniwo cyklu badawczego, którego plan oraz pierwsze prace z serii morfologiczno-klinicznej przedstawiono uprzednio na łamach Neuropatologii Polskiej (Osetowska, Luszawski 1975, Osetowska i wsp. 1975 A, B).

Podjęte w latach 1973/1974 badania biochemiczne miały na celu zdobycie orientacyjnych danych o zaburzeniach metabolizmu występujących w dziedzicznej drżączce porażnej królika. Zgodnie z porównawczym charakterem całego cyklu oparto się o analogie z metabolicznymi chorobami dziedzicznymi OUN człowieka o względnie znanej patogenezie i niejakim podobieństwie obrazu klinicznego.

Wybrano więc na początek do badań następujące wskaźniki:

a) ceruloplazmina w surowicy krwi — dla wyłączenia zaburzeń o typie choroby Wilsona (Bearn, 1972);

b) kwas moczowy w surowicy krwi — dla wykluczenia zaburzeń o typie zespołu Lescha-Nyhana (Seegmiller, 1972).

c) lipidy całkowite i cholesterol oraz lipoproteidy w surowicy dla wyłączenia zaburzeń o typie abetalipoproteinemii (Levy i wsp. 1966) lub innych znanych uogólnionych zaburzeń przemiany tłuszczowej.

MATERIAŁ I METODY

Oznaczenia wykonano w surowicy 54 królików w wieku od 3 do 9 miesięcy, w tym: 10 zdrowych samic (grupa 1), 14 zdrowych samców (gru-

*Autorzy z Zakładu Genetyki Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie.

** Problem węzłowy 09.4.1.3, temat 4. Praca wykonana w oparciu o pomoc finansową Grant PL 480, USA, N.I.H., agreement 05-035-1.

pa 2), 10 samic nosicielek (heterozygoty) (grupa 3), 10 chorych samców (grupa 4), 10 chorych samic (homozygoty) (grupa 5).

Króliki grupy 3—5 ze stada „pt” odpowiadają fenotypowo królikom rasy dużych szynszyli (Herman 1973). Wobec braku wystarczającej liczby zwierząt genetycznie zdrowych w stadzie badanym do grupy 1—2 wykorzystano króliki, odpowiadające wiekiem i pokrojem, z Przedsiębiorstwa Eksportowego Królików w Nasielsku.

Krew pobierano z żyły usznej.

Ceruloplazminę oznaczano jako aktywność oksydazową — metodą Ravina (1961).

Kwas moczowy oznaczano według Eichhorna i wsp. (1961).

Lipidy całkowite oznaczano metodą sulfowanilinową według Wodmana i Price'a (1972).

Cholesterol oznaczano metodą opartą na reakcji Liebermanna — Burcharda według Błaszczyszyna (1970).

Elektroforezę lipoproteidów wykonywano wg Leesa i Hatcha (1963). Do oceny wyników stosowano test „t” Studenta.

WYNIKI

Ceruloplazmina. Wyniki przedstawia tabela 1. Różnic istotnych statystycznie między poszczególnymi grupami nie stwierdzono.

Kwas moczowy. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Nie wykazują one również istotnych statystycznie różnic między grupami.

Lipidy całkowite. Rezultaty podano w tabeli 3. Nie stwierdza się istotnych różnic między grupami.

Cholesterol. Dane zestawiono w tabeli 4. W analizie ich uderza różnica między poziomem cholesterolu u nosicielek ($76,9 \pm 13,20$ mg/100 ml) a jego poziomem zarówno u zdrowych homo i hemizygot jak i chorych obojga płci wahającym się w granicach 40—55 mg/100 ml. Różnice między pozostałymi grupami są nieistotne statystycznie.

Lipoproteidy. Elektroforeza surowicy krwi wykonana u 33 królików nie wykazała różnic między rozkładem lipoproteidów u chorych i zdrowych.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki nie wskazują na to, by u królika „pt” występowały zaburzenia przemiany białkowo-miedziowej analogicznie do choroby Wilsona. Wprawdzie w nielicznych przypadkach choroby Wilsona stwierdzono prawidłowy poziom ceruloplazminy (Gibbs, Walshe 1971), przypuszcza się jednak, że wzrost taki wynika częściowo z dekompensacji czynności wątroby i znika po leczeniu penicylamina. Stałość wyników

Tabela 1. Poziom ceruloplazminy w surowicy krwi badanych zwierząt w jedn. Ravina

Grupa	n	Średnia arytmetyczna ±SD	Analiza różnic między średnimi											
			grupa 1		grupa 2		grupa 3		grupa 4		grupa 5			
			t	p	t	p	t	p	t	p	t	p		
Zdrowe samice	10	14,3±4,0	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Zdrowe samce	14	15,4±4,1	0,422	<0,70	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Nosicielki	10	18,5±7,0	1,573	<0,30	1,281	<0,30	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samce	10	17,8±4,6	1,741	<0,10	0,922	<0,40	0,251	<0,90	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samice	10	18,5±7,9	1,438	<0,20	1,183	<0,30	0,014	<0,99	0,221	<0,90	XXXXXX		XXXXXX	

Tabela 2. Poziom kwasu moczowego w surowicy krwi badanych zwierząt w mg/100 ml

Grupa	n	Średnia arytmetyczna ±SD	Analiza różnic między średnimi											
			grupa 1		grupa 2		grupa 3		grupa 4		grupa 5			
			t	p	t	p	t	p	t	p	t	p		
Zdrowe samice	10	1,4±0,4	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Zdrowe samce	14	1,7±0,6	0,885	<0,40	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Nosicielki	10	1,7±0,4	1,492	<0,20	0	<0,99	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samce	10	1,5±0,3	0,581	<0,60	0,548	<0,60	1,220	<0,30	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samice	10	1,6±0,3	1,176	<0,30	0,488	<0,70	0,432	<0,70	0,592	<0,60	XXXXXX		XXXXXX	

Tabela 3. Poziom lipidów całkowitych w surowicy krwi badanych zwierząt w mg/100 ml

Grupa	n	Średnia arytmetyczna ±SD	Analiza różnic między średnimi											
			grupa 1		grupa 2		grupa 3		grupa 4		grupa 5			
			t	p	t	p	t	p	t	p	t	p		
Zdrowe samice	10	495,1±103,8	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Zdrowe samce	14	473,4±140,4	0,277	<0,80	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Nosicielki	10	578,7±197,7	1,129	<0,30	1,442	<0,20	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samce	10	449,2±86,4	1,025	<0,40	0,323	<0,80	1,810	<0,10	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samice	10	453,8±115,1	0,804	<0,50	0,356	<0,80	1,646	<0,20	0,096	<0,99	XXXXXX		XXXXXX	

Tabela 4. Poziom cholesterolu w surowicy krwi badanych zwierząt w mg/100 ml

Grupa	n	Średnia arytmetyczna ±SD	Analiza różnic między średnimi											
			grupa 1		grupa 2		grupa 3		grupa 4		grupa 5			
			t	p	t	p	t	p	t	p	t	p		
Zdrowe samice	10	55,3±25,1	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Zdrowe samce	14	46,2±14,0	1,063	<0,30	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Nosicielki	10	76,9±13,2	2,288	<0,05	5,110	<0,001	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samce	10	44,1±14,7	1,148	<0,30	0,334	<0,80	4,964	<0,001	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	
Chore samice	10	50,9±17,1	0,434	<0,70	0,692	<0,50	3,616	<0,01	0,900	<0,40	XXXXXX		XXXXXX	

u badanych zwierząt sprawia wszakże, że nader mało prawdopodobne jest takie wytłumaczenie u nich prawidłowego poziomu tego związku.

Poziom kwasu moczowego we wszystkich grupach badanych zwierząt był prawidłowy i nie przewyższał wartości podawanych w piśmiennictwie (Harvey, 1962). Trudno się wypowiedzieć, czy wyniki wykluczają obecność zespołu analogicznego do zespołu Lescha-Nyhana u królika „pt”. Szlak końcowy przemiany puryn u królika jest odmienny niż u człowieka (u królika obecna jest urikaza) i kwas moczowy nie jest produktem końcowym lecz metabolitem pośrednim. Niemniej wszakże prawidłowy poziom kwasu moczowego w surowicy oraz niewystępowanie kamieni moczanych w materiale sekcyjnym są argumentami pośrednimi przeciwko analogii z zespołem Lescha-Nyhana. Bezpośrednim argumentem byłoby wykazanie prawidłowej aktywności fosforybozylotransferazy hipoksantyny i guaniny.

Wyniki dotyczące poziomu lipidów całkowitych i lipoproteidów nie świadczą na korzyść hipotezy o uogólnionym zaburzeniu przemiany lipidów w tym zespole. W szczególności brak wyraźnych różnic w rozkładzie lipoproteidów przemawia przeciw hipotezie o abetalipoproteinemii jako podłożu metabolicznym choroby. Średni poziom cholesterolu u wszystkich badanych grup królików mieścił się w granicach wartości prawidłowych podawanych przez Boyda (1942), był natomiast niższy od przedstawionych przez Zaorską (1974).

Nader niejasna jest jednakże różnica występująca pomiędzy grupą nosicielek a wszystkimi innymi grupami. Nie może ona być wytłumaczona wpływami genetycznymi, tzn. efektem dawki genu. Wątpliwe jest również tłumaczenie tych różnic ewentualnymi wtórnymi efektami patologicznymi, ponieważ nie stwierdzono u heterozygot ani objawów klinicznych ani odchyłeń morfologicznych. Wydaje się, że można by tłumaczyć obserwowane różnice odmiennością diety. Króliki stada „pt” otrzymują standardowy granulata „LSK” ale ponadto są okresowo żywiane mlekiem, warzywami oraz suszem wysokobiałkowej lucerny. Pozwala to przypuszczać z dużym prawdopodobieństwem, że żywienie w Ośrodku w Mińsku Mazowieckim jest wyżej kaloryczne (i cholesterolotwórcze) aniżeli u hodowców indywidualnych dostarczających króliki dla Przedsiębiorstwa Eksportowego. To tłumaczyłoby różnicę „na korzyść” nosicielek w porównaniu z królikami zdrowymi. Króliki chore natomiast ze względu na niedowłady są upośledzone w częstym dostępie do karmików. Upośledzenia tego nie jest w stanie wyrównać do poziomu nosicielek dokarmianie królików chorych przez personel pielęgniarstwa. Tak mogłaby powstać zbieżność wyników między zdrowymi i chorymi osobnikami. Sprawa ta wymaga wszakże sprawdzenia na bardziej jednolitym materiale grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki są negatywne, sądzymy wszakże, że ich wartość polega na dostarczeniu podstawowych informacji o wskaźnikach biochemicznych, wykluczających kolejno nasuwające się hipotezy patogenetyczne w interpretacji objawów klinicznych i morfologicznych u królika „pt”.

I. Вальд, X. Вер, E. Хармак, Я. Савицки

VII. НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА „pt”

Резюме

Работа была выполнена на 20 больных кроликах (10 больных самцов и 10 больных самок (гомозиготы)), 10 носителях, а также 10 здоровых самках и 14 здоровых самцах. В сыворотке крови определяли активность церулоплазмينا, уровень мочевой кислоты, общий уровень липидов и холестерина. Липопротеиды части кроликов разделяли в электрофорезе на бумаге.

Существенных различий между отдельными группами относительно уровня церулоплазмينا, мочевой кислоты и общих липидов сыворотки не было обнаружено. Электрофорез липопротеидов также не выявил различий. Концентрация холестерина в сыворотке больных животных не отличалась значимо от здоровых. Группа самок-носителей характеризовалась более высоким уровнем холестерина, чем другие группы. Предполагается, что причиной этого факта могут быть различия в способе питания.

Результаты работы указывают на то, что симптомы болезни, выступающие у кроликов „pt”, не являются следствием нарушений метаболизма, аналогичных генетически обусловленным болезням, известным в патологии человека: болезни Вильсона, синдрома Леш-Наен и абеталипопротеинемии.

I. Wald, H. Wehr, E. Harmak, K. Albert, J. Sawicki

VII. SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN BLOOD SERUM OF THE „PT” RABBIT

Summary

Material used for this study included 20 sick rabbits (10 ill males and 10 ill females — homozygotes), 10 female carriers, 10 healthy females and 14 healthy males. The activity of ceruloplasmin, uric acid level, cholesterol and total lipids were determined. In some rabbits paper electrophoresis was performed.

The study did not revealed significant differences in the ceruloplasmin, uric acid and total lipids levels in groups of investigated animals. The same was true for paper electrophoresis results. Cholesterol concentration in the blood serum of sick rabbits showed significant differences as compared with that which was obtained in healthy animals. The group of female carriers had greater cholesterol level than other rabbits. Probably this fact could be explained by the differences in feeding.

The results of this study indicate that clinical symptoms appearing in „pt” rabbits are not caused by metabolic disturbance, analogous to such a genetically determined human clinical syndroms as Wilson disease, Lesch-Nyhan syndrome or abetalipoproteinaemia.

PIŚMIENNICTWO

1. Bearn A. G.: Wilson's Disease. Metabolic basis of inherited disease Ed. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. McGraw Hill Company New York 1972, 1033—1050.
2. Błaszczyszyn M.: Badania nad izolowaniem leukocytów, granulocytów oraz nad oznaczaniem cholesterolu całkowitego w poszczególnych rodzajach leukocytów i surowicy krwi. *Problemy lekarskie* 1970, 9, 219—252.
3. Boyd E. H.: Species variation in normal plasma lipids estimated by oxidative micromethods. *J. Biol. Chem.* 1942, 143, 131—132.
4. Eichhorn F., Zelmanowski S., Lew E., Rutenberg A., Fancias B.: Improvement of the uric acid determination by the carbonate method for serum and urine. *J. Clin. Pathol.*, 1961, 14, 450—452.
5. Gibbs K., Walshe J. M.: Studies with radioactive copper (^{64}Cu and ^{67}Cu); The incorporation of radioactive copper into caeruloplasmin in Wilson's disease and in primary biliary cirrhosis. *Clin. Sci.*, 1971, 41, 189—202.
6. Harvey O. G.: *Biochemistry for veterinary students.* Blackwell Scientific Publication Oxford 1962, 135.
7. Herman W.: *Hodowla królików.* Państw. Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1973.
8. Lees R. S., Hatch F. T.: Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin-containing buffer. *J. Lab. Clin. Med.*, 1963, 61, 518—528.
9. Levy R. I., Fredrickson D. S., Laster R.: The lipoproteins and lipid transport in abetalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.*, 1966, 45, 531—541.
10. Osetowska E., Luszawski F.: I. „Prolegomena” do badań doświadczalnych nad chorobą dziedziczną układu nerwowego na modelu królika „pt”. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 61—70.
11. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: II. Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika „pt”. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 71—85.
12. Osetowska E., Taraszewska A., Luszawski F.: III. Zmiany w układzie wzrokowym u królika „pt”. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 87—92.
13. Ravin H. A.: An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J. Lab. Clin. Med.*, 1961, 58, 161—168.
14. Seegmiller J. E.: Molecular aspects of the Lesch — Nyhan syndrome. *Biochemie*, 1972, 54, 703—708.
15. Woodman D. D., Price C. P.: Estimation of serum total lipids. *Clin. Chim. Acta*, 1972, 38, 39—43.
16. Zaorska T.: Wartości prawidłowe wybranych składników krwi i moczu królików. *Zwierzęta Laboratoryjne*, 1974, 10, 25—34.

Adres doc. dr I. Walda: Zakład Genetyki Instytutu Psychoneurologicznego Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

STANISŁAW BIERNAT, ANDRZEJ KULIG, RAJMUND LEPERT,
TADEUSZ ORŁOWSKI

BADANIA PATOMORFOLOGICZNE MÓZGU PSÓW PO STOSOWANIU HEMODILUCJI I PEŁNEJ KRWI W KRAŻENIU POZAUSTROJOWYM W NORMOTERMII

Zakład Anatomii Patologicznej WAM w Łodzi

Kierownik: doc. dr hab. med. A. Kulig

II Klinika Chirurgiczna WAM w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. med. T. Orłowski

Stosowanie pełnej krwi do wypełnienia oksygenatora w aparacie do krążenia pozaustrojowego wywołuje szereg niekorzystnych następstw w ustroju. Najczęściej wymienia się wytrącanie w świetle naczyń agregatów mechanicznie uszkodzonych elementów upostaciowanych krwi, złogów zmienionych białek osocza, zatory tłuszczowe oraz powietrzne powstające ze spienionej krwi w oksygenatorze lub z tlenu uwolnionego z czerwonych krwinek, nadmiernie utlenowanych w obniżonej temperaturze (Brierley, 1963). Oprócz miejscowych zaburzeń w krążeniu zastosowanie pełnej krwi może wywołać niebezpieczne powikłania ogólne w postaci odczynów serologicznych oraz zakażeń wirusowych i bakteryjnych (Hegarty, Stahl, 1967).

Zastosowanie środków krwiozastępczych do krążenia pozaustrojowego usuwa niebezpieczeństwa związane z zastosowaniem pełnej krwi. Stwierdzono, że rozcieńczenie krwi roztworem dekstranu ułatwia krążenie włósniczkowe oraz w przypadku wstrząsu zwiększa wymianę między tkanką a krwią (Fischer, 1973; Heiss, Harles 1973; Sunder-Plassman i wsp. 1973). Stosowanie płynów krwiozastępczych obniża również koszty zabiegów operacyjnych wykonywanych z użyciem krążenia pozaustrojowego. Powstaje jednak problem, czy stosowanie hemodilucji oprócz niewątpliwych korzyści nie powoduje poważniejszych uszkodzeń narządowych, zwłaszcza w wyniku niedotlenienia tkanek związanego ze znacznym obniżeniem liczby krwinek czerwonych. Istnieją także trudności z przygotowaniem płynów krwiozastępczych, które mogą zapewnić odpowiednie ciśnienie onkotyczne i osmotyczne rozcieńczonej krwi. Coraz szersze stosowanie

hemodilucji w klinice stwarza konieczność przeprowadzania wszechstronnych badań nad wpływem jej na ustrój. Szczególne znaczenie mają badania porównawcze następstw stosowania krwi pełnej i środków krwiozastępczych w warunkach krążenia pozaustrojowego. Tematem niniejszej pracy są badania morfologiczne mózgow psów po stosowaniu do krążenia pozaustrojowego hemodilucji i pełnej krwi.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto 12 psów, mieszańców, wagi od 18-tu do 30-tu kg. Zwierzęta podzielono na trzy grupy obejmujące po cztery psy. Rozcieńczenie krwi do krążenia pozaustrojowego przeprowadzono przy pomocy płynu wieloelektrolitowego o składzie podanym przez Roe i wsp. (1965) z dodatkiem 10% dekstranu (40.000) w 0,9% roztworze chlorku sodu w ilości 500 ml na każde 2 litry płynu. U zwierząt grupy I krew rozcieńczono do wartości 10% wskaźnika hematokrytu, u zwierząt grupy II do wartości 20%. Zwierzętom grupy III — nie wykonywano hemodilucji lecz przeprowadzano perfuzję w krążeniu pozaustrojowym przy użyciu pełnej krwi pobranej na 2 godziny przed doświadczeniem od innego psa „dawcy” po uprzednim wykonaniu próby krzyżowej z krwią psa „biorcy”. Po 2-godzinnym stosowaniu krążenia pozaustrojowego psy uśmiercano. Mózgi utrwalano w 10% formalinie. Sekcje mózgu wykonywano metodą Spielmeijera pobierając wycinki z kory i ośrodków podkorowych lewej półkuli mózgu oraz z pnia mózgu, z robaka i lewej półkuli mózdzku. Zastosowano technikę parafinową. Preparaty barwiono HE, met. PAS z kontrolnym trawieniem diastazą, błękitem trwałym luksolu w modyfikacji Klüver-Barrera oraz kwaśną hematoksyliną fosforowo-wolframową (PTAH). W wybranych przypadkach sporządzano preparaty mroźkowe i barwiono je czerwiecią oleistą O.

WYNIKI

U zwierząt grupy I i II stwierdzano makroskopowo obrzęk opon a na przekrojach znaczną błądź mózgu, natomiast u zwierząt po zastosowaniu pełnej krwi mózgi były dobrze ukrwione i nie wykazywały większych zmian.

Badanie mikroskopowe u zwierząt grupy I uwidoczniało znaczny obrzęk opon miękkich, najsilniej wyrażony w głębokich bruzdach. W tych okolicach mózgu widoczny był także obrzęk warstwy drobinowej kory (ryc. 1). Śródbłonki naczyń kory były obrzmiałe i wpuklały się do światła powodując znaczne zwężenie łożyska włóscinkowego (ryc. 2 i 3). W cytoplazmie komórek śródbłonna stwierdzano niekiedy wodniczki. Ściany naczyń

włosowatych i przedwłosowatych były obrzmiałe i posiadały zatartą strukturę. Wokół naczyń stwierdzano puste przestrzenie i rozsuniecie okołonaczyniowego neuropilu (ryc. 5, 6). Poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych było największe w okolicach podkorowych i w strefie okołokomorowej istoty białej. W korze stwierdzano ujednostajnienie podłoża, w którym można było rozróżnić obrzmiałe wypustki komórek nerwowych (ryc. 3). Neurony były również obrzmiałe, o zatartych granicach komórkowych i obrysach jąder oraz wykazywały gorszą barwliwość. Stwierdzono także rozpad tigroidu, najbardziej nasilony w częściach okołojądrowych, w niektórych komórkach widoczna była wakuolizacja cytoplazmy (ryc. 4). Jądra komórkowe, przeważnie powiększone, posiadały przeredzoną chromatynę. Opisane zmiany dotyczyły przeważnie małych neuronów III i V warstwy kory oraz zakrętów hipokampa. Widoczne były duże różnice w nasileniu zmian nawet w sąsiadujących komórkach tej samej warstwy kory. W dużych komórkach piramidowych stwierdzano jedynie nieznaczne obrzmienie oraz niewielkiego stopnia tigrolizę. Tylko wyjątkowo spotykano zmiany typu ischemicznego. W cytoplazmie uszkodzonych komórek znajdowano niekiedy ciała PAS-dodatnie dające się trawić roztworem diastazy. W warstwie komórek zwojowych kory mózdzku widoczny był znaczny obrzęk, najbardziej nasilony wokół włóściczek. W komórkach Purkinjego stwierdzano uszkodzenie, które występowało najczęściej w postaci obrzmienia lub homogenizacji, niekiedy zmian wodniczkowych. Warstwa ziarnista kory mózdzku była rozluźniona.

Oceniając elementy glejowe stwierdzano jedynie obrzmienie astrocytów i komórek oligodendrogleju. Komórki wyściółki były obrzmiałe, stwierdzono również obrzęk istoty białej, zwłaszcza w strefie okołokomorowej. Barwienie na mielinę nie wykazało istotnych zmian, nawet w polach bardziej nasilonego obrzęku.

W mózgach psów grupy II, u których zastosowano mniejsze rozcieńczenie krwi, charakter zmian był podobny, stwierdzono jedynie mniejsze nasilenie obrzęku w istocie białej.

U zwierząt po stosowaniu pełnej krwi widoczne były ziarniste złogi wypełniające niektóre naczynia włosowate lub przedwłosowate (ryc. 7). Spotykano także wybitnie poszerzone puste włóściczki, w których nie udało się ujawnić zatorów tłuszczowych. W tkance mózgowej sąsiadującej z naczyniami zawierającymi złogi stwierdzono zmiany wyrażające się znacznym obrzękiem z obecnym niekiedy zgąbczeniem podłoża, oraz towarzyszącym uszkodzeniem ischemicznym komórek nerwowych. Opisane zmiany miały charakter ogniskowy i dotyczyły najczęściej kory mózgu i mózdzku, zwłaszcza na pograniczu istoty białej, natomiast w jądrach podkorowych, we wzgórzu i w pniu mózgu spotykano je bardzo

rzadko. W korze mózdzku stwierdzono ogniskowe przerzedzenie komórek warstwy ziarnistej oraz zmiany ischemiczne komórek Purkinjego (ryc. 8). Osłonki mielinowe w mózgach tej grupy zwierząt były na ogół zachowane, jedynie w ogniskach najbardziej nasilonego obrzęku zaznaczało się osłabienie barwliwości.

OMÓWIENIE

Analiza opisanych zmian w mózgu w następstwie hemodilucji pozwala wnosić, że najwcześniejsze uszkodzenie dotyczy naczyń, prowadząc do zmian w samej tkance mózgowej. Obrzmienie i zmiany wodniczkowe w komórkach śródbłonna naczyń, istotnej składowej bariery krew-mózg, rozwijające się pod wpływem niedotlenienia, prowadzą do wzmożonej przepuszczalności ścian (Baethmann, Van-Harreveld, 1973; Baethmann i wsp. 1974; Brown, Brierley 1968; Griffiths, Miller, 1974; Hossmann, Hossmann 1973). Obrzmienie śródbłonek i okołonaczyniowego neuropilu powoduje dodatkowo zwężenie światła naczyń włosowatych, odpowiedzialnych w przypadku zagęszczenia krwi i spadku ciśnienia towarzyszących wstrząsowi za zmiany w mikrokrążeniu (Feigin i wsp. 1973; Hossmann, Hossmann 1973). Uniemożliwiają one ponowne uruchomienie przepływu nawet po przywróceniu prawidłowego ciśnienia krwi. Stan ten określany przez Kowada „non reflow phenomenon” prowadzi do nieodwracalnych zmian w mózgu (cyt. za Salford i wsp. 1973). Dzięki usprawnieniu mikrokrążenia, hemodilucja daje korzystne efekty w leczeniu wstrząsów.

Zmiany w śródbłonku naczyń podczas hemodilucji są prawdopodobnie następstwem niedotlenienia w wyniku nadmiernego rozcieńczenia krwi lub nieodpowiedniej perfuzji, względnie skojarzenia obu tych czynników.

Ryc. 1. Obrzęk opon miękkich i warstwy drobinowej kory mózgu w obrębie głębokiej bruzdy w mózgu psa po hemodilucji. H.-E. Pow. 80 X

Fig. 1. Edema of pia mater and molecular layer of cerebral cortex at the depth of deep sulcus in dog brain after hemodilution. H.-E. X 80.

Ryc. 2. Obrzmiałe śródbłonki wpuklające się do światła naczyń, obrzmienie komórek i homogenizacja podłoża kory mózgowej po hemodilucji. H.-E. Pow. 400 X.

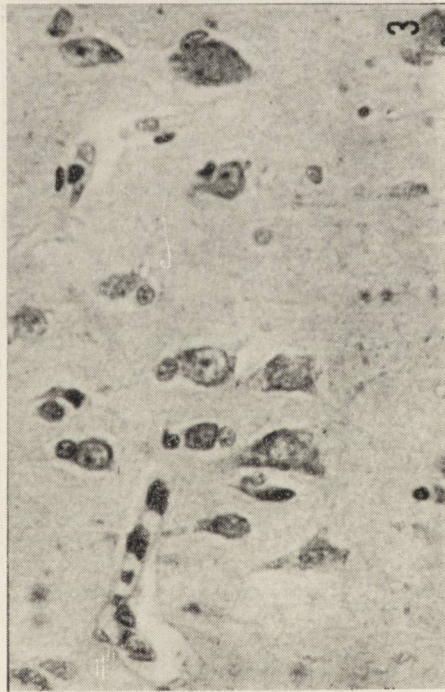
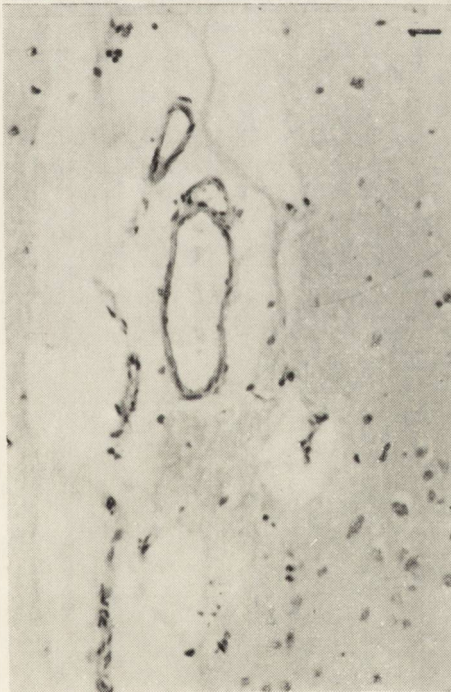
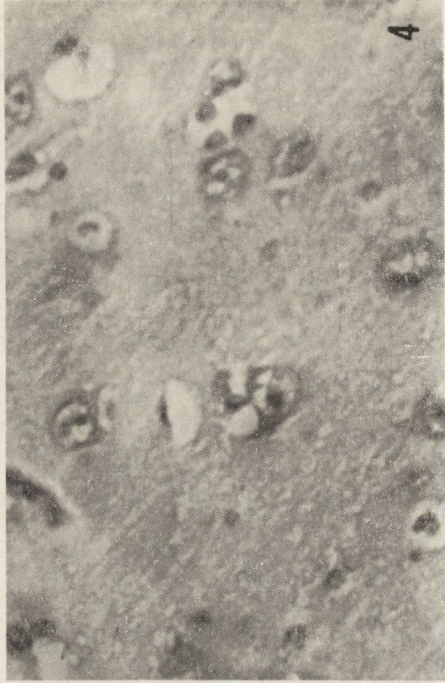
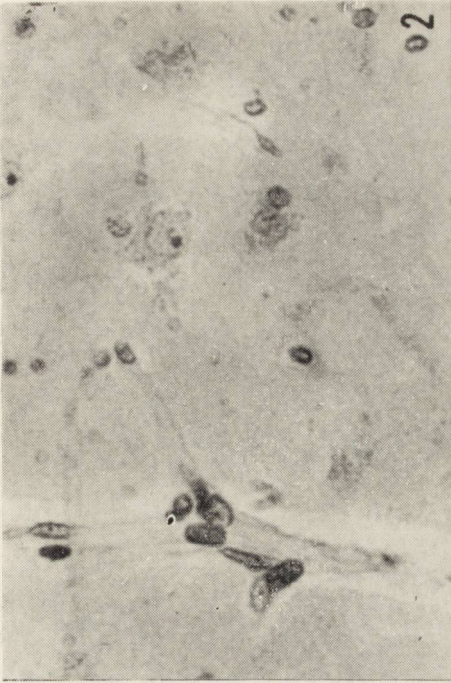
Fig. 2. Swollen endothelia invaginating into vessel lumina, swelling of cells and homogenization of structure in cerebral cortex after hemodilution. H.-E. X 400.

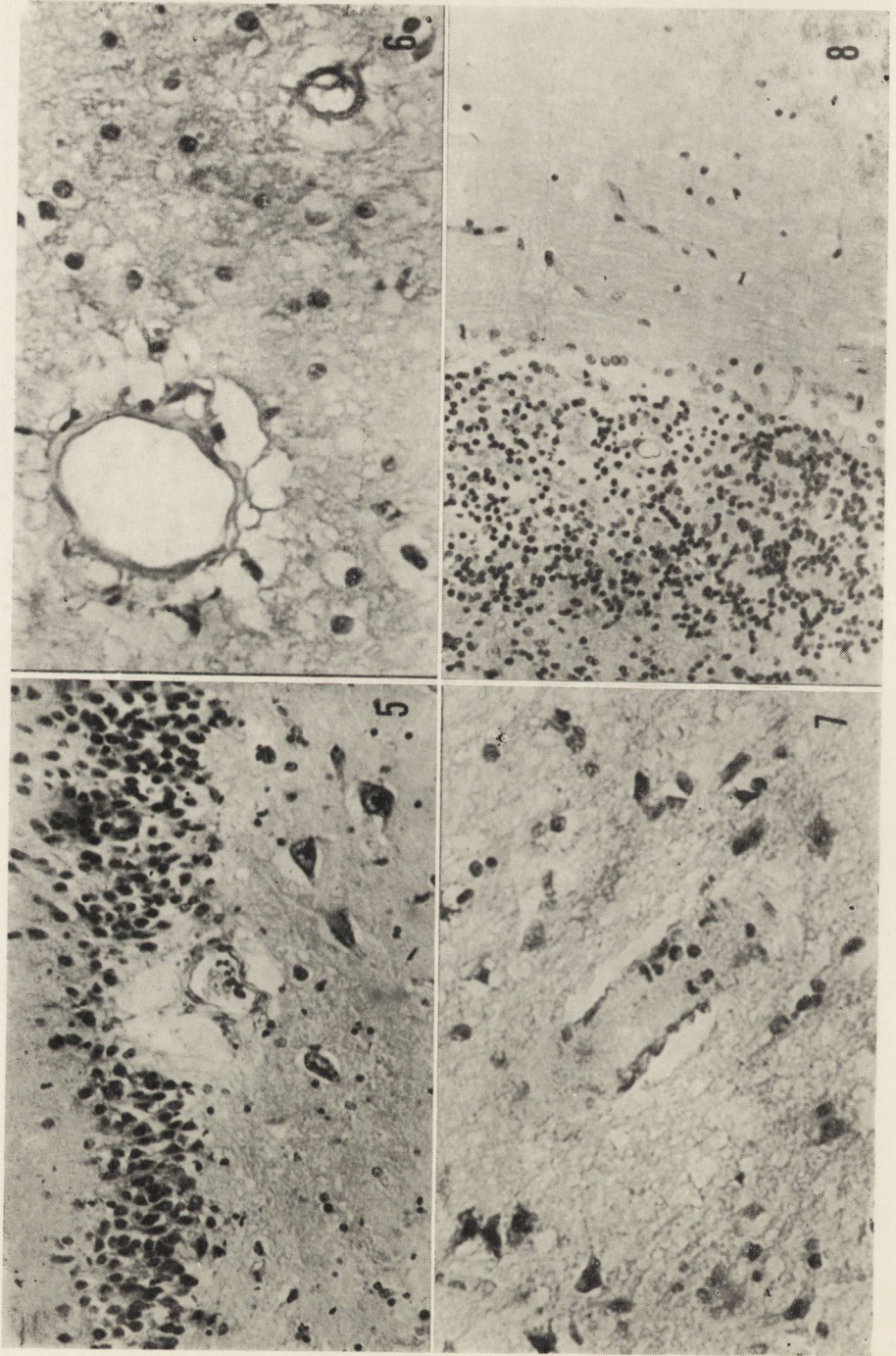
Ryc. 3. Obrzmiałe śródbłonki zamykają światło naczynia włosowatego. Obrzmienie i tigróliza neuronów, homogenizacja podłoża kory mózgowej po hemodilucji. H.-E. Pow. 400 X.

Fig. 3. Swollen endothelial cells close lumen of capillary vessel, swelling and tigrolysis of neurons, homogenization of structure in cerebral cortex after hemodilution. H.-E. X 400.

Ryc. 4. Zmiany wodniczkowe w neuronach jąder podkorowych po hemodilucji. H.-E. Pow. 360 X.

Fig. 4. Vacuolar changes in neurons of subcortical nuclei after hemodilution. H.-E. X 360.





Brak wyraźniejszych różnic w nasileniu zmian po stosowaniu hemodilucji do wartości hematokrytu 10 i 20% pozwala przypuszczać, że główną przyczyną niedotlenienia jest nieodpowiednia perfuzja. Przemawiają za tym również obserwacje innych autorów (Sandersona i wsp. 1972 i Wrighta 1972), którzy stwierdzili, że przepływ ciągły (stosowany w naszym doświadczeniu) w odróżnieniu od pulsującego nie zapewnia właściwego krążenia i prowadzi do zalegania płynu w tkankach. Wyrazem wzmożonej przepuszczalności naczyń w naszym materiale było poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych i rozluźnienie podłoża wokół naczyń. Zmiany te obserwowano wybiórczo, zwłaszcza na pograniczu warstwy drobino-wej kory mózdzku i kory zakrętu hipokampa oraz w warstwie drobino-wej głębokich rowków kory mózgu. Obrzęk ograniczony do pewnych okolic jak np. warstwa ziarnista i zwojowa kory mózdzku wg Lahl'a (1974) jest następstwem zaburzenia kurczliwości naczyń i ich zwiększonej przepuszczalności w tych obszarach. Podobny mechanizm obrzęku mógł mieć miejsce w naszym materiale z tym jednak, że obrzęk warstwy drobino-wej kory w głębokich rowkach należy odnieść do zaburzenia odpływu krwi z naczyń opon miękkich uciśniętych przez obrzękłe zakręty kory mózgu.

Obrzmienie i centralną tigrolizę neuronów oraz niekiedy obserwowane zwyrodnienie wodniczkowe należy uważać za wykładniki rozwijającego się niedotlenienia tkanki (Brown, Brierley, 1968; Dixon, 1965; Hossmann, Hossmann, 1973; Lahl, 1974; O'Brien i wsp. 1974). Obrzmienie neuronów jest wczesnym odczynem na zmiany w otaczającym środowisku i następstwem przenikania wody do komórki (Baethmann, Van-Harreveld, 1973; Feigin, Popoff, 1962; Hossmann, Kleihues, 1973). Woda może przepajać równomiernie całą komórkę lub gromadzi się tylko w niektórych strukturach cytoplazmy jak mitochondria lub ergastoplazma powo-

Ryc. 5. Znaczny obrzęk okołonaczyniowy i okołokomórkowy w korze zakrętu hipokampa po hemodilucji. H.-E. Pow. 160 X.

Fig. 5. Marked perivascular and pericellular edema in cortex of gyrus hippocampi after hemodilution. H.-E. X 160.

Ryc. 6. Obrzęk okołonaczyniowy w strefie okołokomórkowej istoty białej mózgu po hemodilucji. H.-E. Pow. 360 X.

Fig. 6. Perivascular edema in periventricular region of white matter after hemodilution. H.-E. X 360.

Ryc. 7. Naczynie krwionośne wypełnione przez agregaty z uszkodzonych elementów krwi w strefie podkorowej istoty białej mózgu po perfuzji pełną krwią. H.-E. Pow. 160 X.

Fig. 7. Blood vessel filled with aggregates of damaged blood elements in subcortical region of cerebral white matter after perfusion with blood. H.-E. X 160.

Ryc. 8. Ogniskowe przerzedzenie komórek warstwy ziarnistej kory mózdzku po perfuzji pełną krwią. H.-E. Pow. 120. X.

Fig. 8. Focal rarefaction of cells in granular layer of cerebellar cortex after perfusion with blood. H.-E. X 120.

dując powstanie wodniczek (Dixon 1965). W stanie niedotlenienia wzrasta ciśnienie osmotyczne w komórce. Jest to następstwem gromadzenia się metabolitów i większego stężenia elektrolitów w porównaniu z płynem tkankowym, w którym pod wpływem dilucji dochodzi do obniżenia zawartości sodu (Baethmann, Van-Harreveld, 1973; Dellasega, Grantham, 1973; Dixon, 1965). Niektóre komórki ssaków, a wśród nich także neurony posiadają samoregulacyjny mechanizm ograniczający nadmierny wzrost objętości. Pozwala to na wydalanie nadmiaru wody, jednak towarzyszy temu utrata elektrolitów, a zwłaszcza potasu co prowadzi do zaburzeń polaryzacji błon i ciężkiego uszkodzenia komórek (Dellasega, Grantham, 1973).

Według Cammermeyer'a (1973) rozpad tigroidu jest morfologicznym wykładnikiem reakcji komórki na niedotlenienie i następstwem procesów katabolicznych prowadzących do rozpadu układów polizomalnych komórki (Drawes, Gilboe, 1973). Zmiany te podobnie jak obrzmienie i zwyrodnienie wodniczkowe, nie są wyrazem ciężkiego uszkodzenia komórki. Nasilone zmiany w neuronach obserwowano tylko w tych okolicach mózgu, w których stwierdzano znaczne uszkodzenie naczyń i dotyczyły one niektórych typów komórek. Największe zmiany notowano w komórkach Purkinjego oraz w małych komórkach piramidowych III i V warstwy kory mózgowej. Należy podkreślić, że również u ludzi komórki te są bardzo wrażliwe na niedotlenienie, a uszkodzenie komórek Purkinjego występuje nawet po przejściowym obniżeniu ciśnienia krwi (Brown, Brierley, 1968). Nasilenie zmian w komórkach nerwowych sąsiadujących ze sobą nie było jednakowe, co można tłumaczyć różną aktywnością metaboliczną neuronów, odległością od naczyń oraz odmiennym nasileniem i czasem trwania stresu (Brierley i wsp. 1973, Brown, Brierley 1969; Dixon, 1965; Wright, 1972). Grown i Brierley (1965) oraz Salford (1973) wykazali, że nasilenie stresu powoduje uszkodzenie większej liczby neuronów. W neuronach jąder podkorowych i w pniu mózgu nie wykazano wyraźniejszych zmian, prawdopodobnie w związku z nieznacznym uszkodzeniem naczyń tych części mózgu. Wynika z tego, iż są to okolice stosunkowo najmniej narażone na uszkodzenie spowodowane hemodilucją. Neurony pnia, w odróżnieniu od kory mózgu, wykazują mniejszą wrażliwość na niedobór tlenu. Natomiast całkowity brak tlenu powoduje większe zmiany w neuronach pnia mózgu, ale wówczas zwierzę ginie zanim zdążą się rozwinąć zmiany morfologiczne w neuronach kory (Cantu, Ames 1969).

Ischemiczne uszkodzenie dużych komórek piramidowych rowija się stosunkowo wolniej niż małych neuronów (Salford i wsp. 1973). Potwierdzają to również nasze badania, chociaż w pojedynczych przypadkach nawet w dużych neuronach spotykaliśmy ciężkie zmiany ischemiczne.

Dotyczyło to niewielkiej liczby tych komórek, w których cytoplazmie stwierdziliśmy obecność glikogenu będącej wyrazem zaburzenia glikolizy, prawdopodobnie związane ze zmianą zawartości potasu w komórce (Dixon 1965).

W istocie białej mózgu wykazano rozpoczynający się obrzęk, który był wyraźniej zaznaczony w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń. Wczesne pojawienie się obrzęku w istocie białej zależy od jej struktury histologicznej. Włóknista struktura istoty białej sprzyja również rozprzestrzenianiu się płynu obrzękowego (Baethmann, Van-Harreveld 1973, Baethmann i wsp. 1974, Feigin i wsp. 1973, O'Brien i wsp. 1974). Obrzęk kory pojawia się w porównaniu z istotą białą później. Wynika to stąd, że przetrzelenie tkankowe w korze mózgu są znacznie większe, a w przypadku gromadzenia się płynu tkankowego dochodzi najpierw do obrzmienia wypustek, które utrudnia rozprzestrzenianie się obrzęku (Feigin i wsp. 1973). Utrzymanie prawidłowej struktury osłonek mielinowych wskazuje, że doświadczalna hemodilucja nie prowadzi do ciężkich zmian w mózgu. Potwierdza to obserwacje innych autorów, którzy stwierdzili, że w ostrym obrzęku mózgu nie dochodzi do wyraźnej destrukcji osłonek mielinowych (Feigin, Popoff, 1962).

Porównanie zmian patomorfologicznych w mózgach psów po hemodilucji do wartości hematokrytu 10 i 20% wykazało, że większe rozcieńczenie krwi tylko w niewielkim stopniu wpływa na nasilenie obrzęku, z czego wynika, że sama hemodilucja nie jest czynnikiem decydującym w powstawaniu zmian. Stwierdzone przez nas zmiany w mózgu zależą najprawdopodobniej od zastosowanej do krążenia pozaustrojowego aparatury wywołującej ciągłą perfuzję, która w odróżnieniu od pulsującej nie zapewnia odpowiedniego krążenia płynu tkankowego i prowadzi do niedotlenienia (Sanderson i wsp. 1972, Wright 1972).

Pod wpływem perfuzji pełną krwią powstawały bardziej nasilone zmiany niż po hemodilucji. Zmiany te były ogniskowe i występowały przeważnie w korze, co może sugerować ich mechanizm zatorowy (Baker, Moore 1974). Przyczyną zatorów mogły być strąty, które ujawniliśmy w niektórych naczyniach oraz prawdopodobnie zatory powietrzne, na co wskazuje obecność bardzo szerokich i pustych naczyń włosowatych, w których nie udało się wykryć ciał tłuszczowych.

WNIOSKI

1. Stosowanie hemodilucji o wartości hematokrytu 10 i 20% przez okres 2 godzin w warunkach krążenia pozaustrojowego w normotermii powoduje wzmożoną przepuszczalność naczyń włosowatych z następowym obrzmieniem neuronów, zwłaszcza III i V warstwy kory mózgowej, za-

krętu hipokampa i komórek kory mózdzku oraz wczesnym obrzękiem istoty białej.

2. Stwierdzone zmiany związane są prawdopodobnie z niedotlenieniem, do którego prowadzi nie tylko rozcieńczenie krwi, ale również (przede wszystkim) stosowanie aparatury dającej nieodpowiednią perfuzję tkanek.

3. Stosowanie pełnej krwi do krążenia pozaustrojowego powoduje powstanie śródnaczyniowych strąków i następnych zatorów powodujących zmiany ogniskowe, umiejscowione głównie w korze mózdzku i na pograniczu istoty białej i kory mózgu.

S. Бернат, А. Кулит, Р. Леперт, Т. Орловски

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЗГА СОБАК ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕМОДИЛЮЦИИ И ПОЛНОЦЕННОЙ КРОВИ В ИСКУССТВЕННОМ КРОВООБРАЩЕНИИ ПРИ НОРМОТЕРМИИ

Резюме

Авторы установили, что под влиянием гемодилюции наступает отечность эпителиа и отёк стенок капиллярных и прекапиллярных сосудов. Самые значительные повреждения сосудов наблюдались в мозге и мозжечке особенно на границе с белым веществом и в извилине гиппокампа. Сосудистым изменениям мозга сопутствовал околосоудистый отек. В нервных клетках обнаруживалась отечность, вакуольные изменения и тигролия, особенно в малых нейронах коры. Изменения, наступающие в мозге после гемодилюции были незначительными и обратимыми.

Применение гемодилюции до величин 10% гематокрита вызывало лишь незначительно больший отек по сравнению с разведением крови до 20% гематокрита. Фактором, вызывающим повреждение в мозге при гемодилюции, была, вероятно, гипоксия, которая в большей степени могла зависеть от аппаратуры для искусственного кровообращения, чем от степени разведения крови.

При употреблении полноценной крови при искусственном кровообращении наблюдались тромбы и закупорка мелких сосудов. Они приводили к тяжелым очаговым повреждениям мозга, особенно в коре мозжечка и на границе белого вещества и коры мозга.

S. Biernat, A. Kulig, R. Lepert, T. Orłowski

PATHOMORPHOLOGICAL STUDIES OF DOG BRAIN AFTER APPLICATION OF HEMODILUTION AND COMPLETE BLOOD IN EXTRACORPOREAL CIRCULATION IN NORMOTHERMIA

Summary

The authors demonstrated that hemodilution caused in dogs' brain swelling of endothelial cells and edema of precapillary and capillary vessels. The most severe impairment was present in cerebellar cortex, in particular at the border

with white matter, and in gyrus hippocampi. The vascular changes were accompanied by perivascular edema. Nerve cells exhibited swelling, tigrolysis and vacuolar changes. These changes were not intensive in small cortical neurons. Generally all brain abnormalities induced by hemodilution were slight.

Application of hemodilution to the hematocryt value of 10% produced only slightly more intensive edema as compared to that after dilution of blood to 20% hematocryt. The brain impairment after hemodilution was probably induced by hypoxia, which rather depended on the applied apparatus (non-pulsatile blood flow in intracorporeal circulation) than on the degree of hemodilution.

Application for extracorporeal circulation of complete blood produced emboli and clotting in small vessels, leading to focal impairment of the tissue, most intensive in cerebellar cortex and at the border of white matter and cerebral cortex.

PIŚMIENICTWO

1. Baethmann A., Van-Harreveld A.: Water and electrolyte distribution in gray matter rendered edematous with a metabolic inhibitor. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1973, 32, 408—423.
2. Beathmann A., Lanksch W., Schmiedek P.: Formation and treatment of cerebral edema. *Neurochirurgia* 1974, 17, 37—47.
3. Baker R. N., Moore K.: Experimental cerebral microembolism. Ultrastructural observation related to cerebral edema and nodular atrophy. 49-th Annual Meeting Freeport, Grand Bahamas *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1974, 33, 182.
4. Brierley J. B.: Neuropathological findings in patients dying after open heart surgery. *Thorax* 1963, 18, 291—304.
5. Brierley J. B., Meldrum B. S., Brown A. W.: The threshold and neuropathology of cerebral anoxic — ischemic cell change. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 367—373.
6. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic—ischæmic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *Br. J. exp. Path.* 1968, 49, 87—106.
7. Cammermyer J.: Ischemic neuronal disease of Spielmeyer. A revaluation. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 391—393.
8. Cantu R., Ames A.: Distribution of vascular lesions caused by cerebral ischemia. Relation to survival. *Neurology* 1969, 19, 128—132.
9. Dellasega M., Grantham J.: Regulation of renal tubule cell volume in hypotonic media. *Amer. J. Physiol.*, 1973, 224, 1288—1294.
10. Dixon K. C.: Ischemia and the neurone. *W. Neurochemistry*, C. W. M. Adams, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, 1965, str. 558—598.
11. Drewes L. R., Gilboe D. D.: Metabolic alterations in brain during anoxic—-anoxia and subsequent recovery. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 385—390.
12. Feigin I., Popoff N.: Neuropathological observations on cerebral edema. The acute phase. *Arch. Neurol.* 1962, 6, 77—86.
13. Feigin I., Budzilovich G., Weinberg S., Ogata J.: Degeneration of white matter in hypoxia, acidosis and edema. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1973, 32, 125—143.
14. Firscher E. G.: Impaired perfusion following cerebro-vascular stasis. *Arch. Neurol.* 1973, 29, 361—364.

15. Griffiths I. R., Miller R.: Vascular permeability to protein and vasogenic oedema in experimental concussive injuries to the canine spinal cord. *J. Neurol. Sc.* 1974, 22, 291—304.
16. Hegarty J., Stahl W.: Homologous blood syndrome. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1967, 53, 415—424.
17. Heiss W. D., Harles H. J.: Effekt von Hämodilution und Dehydration auf die regionale Hirndurchblutung. *Nervenarzt* 1973, 44, 166—169.
18. Hossmann K. A., Kleihues P.: Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol.* 1973, 29, 375—382.
19. Hossmann V., Hossmann K. A.: Return of normal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res.* 1973, 60, 423—438.
20. Lahl R.: Die Pathologie des ZNS bei der Tetrachlorkohlenstoffintoxication. *Zbl. allg. Pathol.* 1974, 118, 155—160.
21. O'Brien M. O., Jordan M. M., Waltz A. G.: Ischemic cerebral edema and the blood — brain barrier. *Arch. Neurol.* 1974, 30, 461—465.
22. Roe B., Hutchinson J., Swenson E.: High flow body perfusion with calculated hemodilution. *Ann. Thorac.* 1965, I, 581—590.
23. Salford L. G., Plum F., Brielrey J. B.: Graded hypoxia-oligemia in rat brain II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol.* 1973, 29, 234—238.
24. Sanderson J., Wright G., Sims F.: Brain damage in dogs immediately following pulsatile and non-pulsatile blood flows in intracorporeal circulation. *Thorax* 1972, 27, 275—286.
25. Sunder — Plassman L., Jesch F., Klovekorn W., Messfer K.: Limited hemodilution in haemorrhagic shock in dogs: effects on central hemodynamics and microcirculation in skeletal muscle. *Res. exp. Med.* 1973, 159, 167—182.
26. Wright G.: Ultrastructural changes in dog brains immediately following non-pulsatile extracorporeal circulation and prolonged anaesthesia. *Br. J. Exp. Pathol.* 1972, 53, 501—508.

Adres autorów: Katedra Anatomii Patologicznej WAM, Plac 9-go Maja, 1; 90-647 Łódź.

HALINA KROH

DEMYELINATION IN THE MOUSE BRAIN AFTER
TRANSPLACENTAL ADMINISTRATION
OF N-ETHYL-N-NITROSOUREA (ENU)

PRELIMINARY REPORT

Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of
Sciences

Head: Prof. dr M. J. Mossakowski

Neurotropic action of ethyl-nitrosourea (ENU) and methyl-nitrosourea (MNU) results in carcinogenic, teratogenic and cytotoxic effects. The cytotoxic action of both compounds is hardly known except for their acute lethal effect on rat proliferating cells in the subependymal matrix and the external granular layer of the cerebellar cortex at the perinatal age (Bosch et al., 1972).

In the CNS of mice in which the carcinogenic effect of ENU is not apparent, previous investigations (Kroh, 1973) showed in the newborn foci of necrosis in the periventricular matrix. In adult animals, besides lung tumors, microcephaly, malformations, loss of cortical cells and disturbances in layer arrangement were observed. The changes mentioned above were considered to be the result of direct damage of nondifferentiated matrix cells and of migrating cells. In mice older than 100 days we found in the central nervous system multiple demyelinating foci difficult to refer to the above changes.

The aim of this study is to analyse demyelinating foci and to follow the course of events. leading to demyelinating lesions.

MATERIALS AND METHODS

The offspring of female Swiss noninbred mice which were given 80 mg/kg of body weight of ENU by single i.v. injection on the 15th day of gestation were used in the study. ENU was dissolved in 0.9% NaCl, adjusted to pH 4.2 with 1% NaH_2PO_4 and injected immediately. The controls were injected with buffered NaCl solution. The animals were

sacrificed in two groups: the early group between 7—56 days and the late group — between 100—326 days of life. The animals were decapitated, their brains fixed in formalin. For the study, 36 experimental brains were chosen randomly from among 400 brains. Eight brains served as controls. The brains embedded in paraffin were cut serially, the sections were stained with cresyl violet, acc. to Heidenhain, Klüver-Barrera and with Schiff's reagent. Some samples were additionally stained acc. to the method of Bielschowsky, Holzer, with Sudan Black B, with PAS after dimedone digestion. Histochemical reactions were performed on frozen sections, shortly fixed in formalin, taken from the brains of other experimental and control mice. They were stained with Oil Red O, Sudan Black B in propylene glycol, Nile Blue (Cain) and for cholesterol (Schultz). Additionally they were examined in polarized light.

RESULTS

The weight of control brains by the 21st day of life was over 400 mg. At late age (200 days) they reached 450—470 mg. The weight of experimental ones in the late period fluctuated between 250—440 mg.

Up to 56 days of life there was no delay or disturbance of myelination in all the observed experimental cases (9).

In the late experimental group, foci of demyelination appeared in 24 out of 27 serially cut brains.

Histological stainings for myelin revealed foci, more distinct in the white than in the gray matter. They were localized at random in the cerebrum and cerebellum (Fig. 1). They bore no relation to any particular structure or the vascular net. The foci differed in number, shape, size and degree of destruction. The cellular reaction around or inside them was not visible.

Some foci appeared as comparatively well-defined areas exhibiting pronounced lack of staining of myelin sheaths. Inside these foci there remained some well-myelinated fibres, some partly preserved and partly fragmented. Demyelination did not follow the length of the fibre. In foci less advanced, some bundles of myelinated fibres were undulated and seemed to be distended by an invisible substance (Fig. 2).

The axons in both „shadow” and in fully developed foci were intact or affected to a various degree (Fig. 3). In some, only granular remnants were visible. The damage to the axial fibres varied depending on the destruction of the myelin sheaths, but they were rather less involved than the myelin.

Histochemical reactions revealed accumulation of Oil Red and Sudan Black B positive substances in small patches of the cortex and white

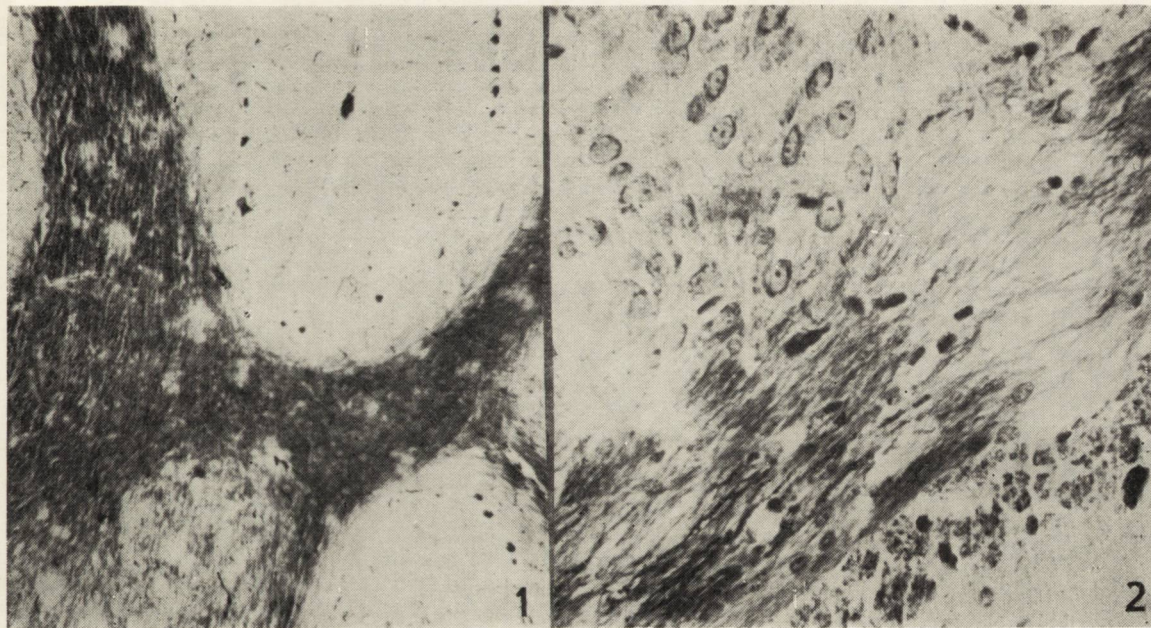


Fig. 1. Multiple foci of demyelination in cerebellar white matter. 222nd day of experiment. Heidenhain. $\times 100$.

Ryc. 1. Mnogie ogniska demielinizacji w istocie białej mózdzku. 222 dni doświadczenia. Heidenhain. Pow. 100 \times

Fig. 2. Two foci of demyelination in *corpus callosum* extending into cerebral cortex. 226th day of experiment. Klüver-Barrera. $\times 400$.

Ryc. 2. Dwa ogniska demielinizacji w spidzie wielkim przechodzące na korę mózgową. 226 dni doświadczenia. Klüver-Barrera. Pow. 400 \times .

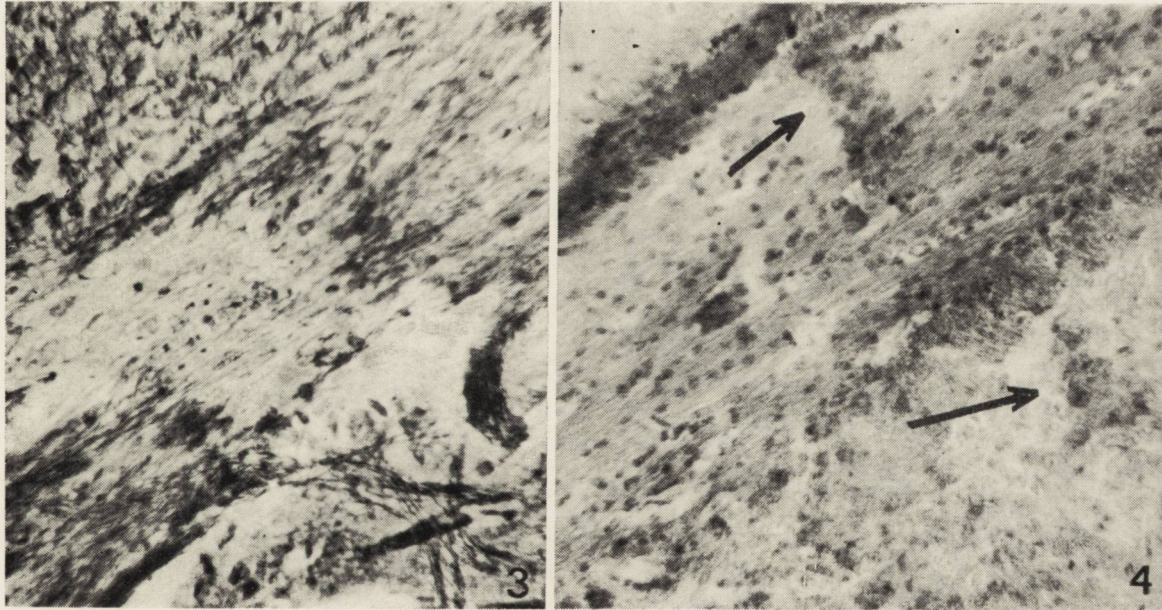


Fig. 3. Damaged axons in area of demyelination in *corpus callosum*. 280th day of experiment. Bielschowsky. $\times 400$.
Ryc. 3. Uszkodzenie włókien osiowych w ognisku demielinizacji w spoidle wielkim. 280 dni doświadczenia. Bielschowsky.
 Pow. 400 \times .

Fig. 4. Focal accumulation of neutral fat (arrows). 229th day of experiment. Oil red O. $\times 200$.
Ryc. 4. Ogniskowe nagromadzenie tłuszczów obojętnych (strzałki). 229 dni doświadczenia. Czerwień oleista O. Pow.
 200 \times .

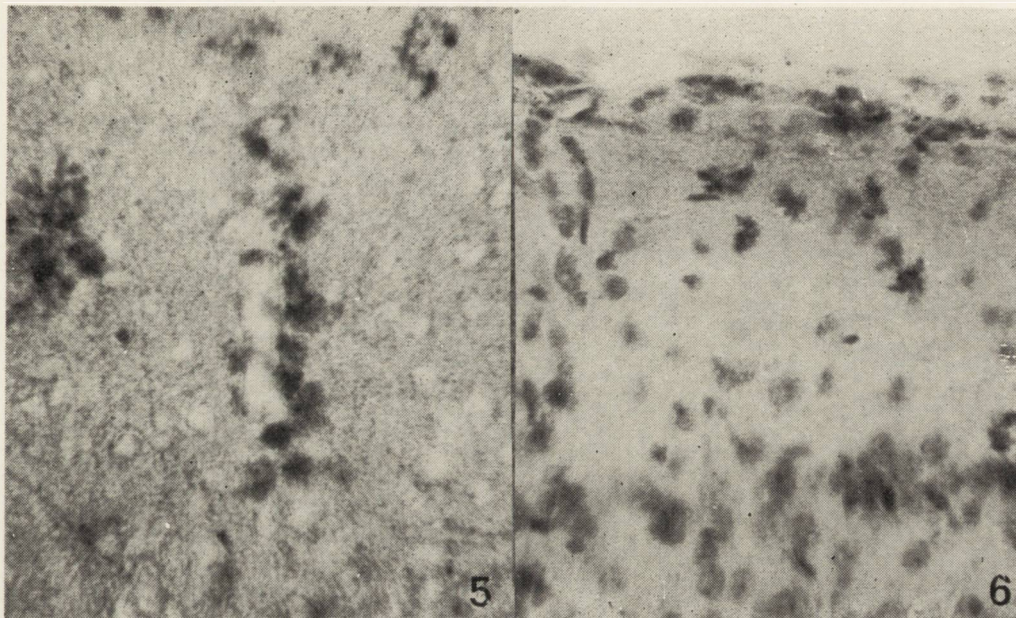


Fig. 5. Lipid accumulation in perivascular macrophages in the first cortical layer. 131st day of experiment. Sudan black B
 × 400.

Ryc. 5. Lipidy w przynaczyniowych makrofagach w pierwszej warstwie kory. 131 dni doświadczenia. Sudan czarny B.
 Pow. 400 ×.

Fig. 6. Accumulation of neutral fat in astrocytes of the Ist and IInd cortical layers. 278th day of experiment. Oil red. O
 × 400.

Ryc. 6. Nagromadzenie tłuszczów obojętnych w astrocytach pierwszej i drugiej warstwy kory. 278 dni doświadczenia. Czerwień oleista O. Pow. 400 ×.

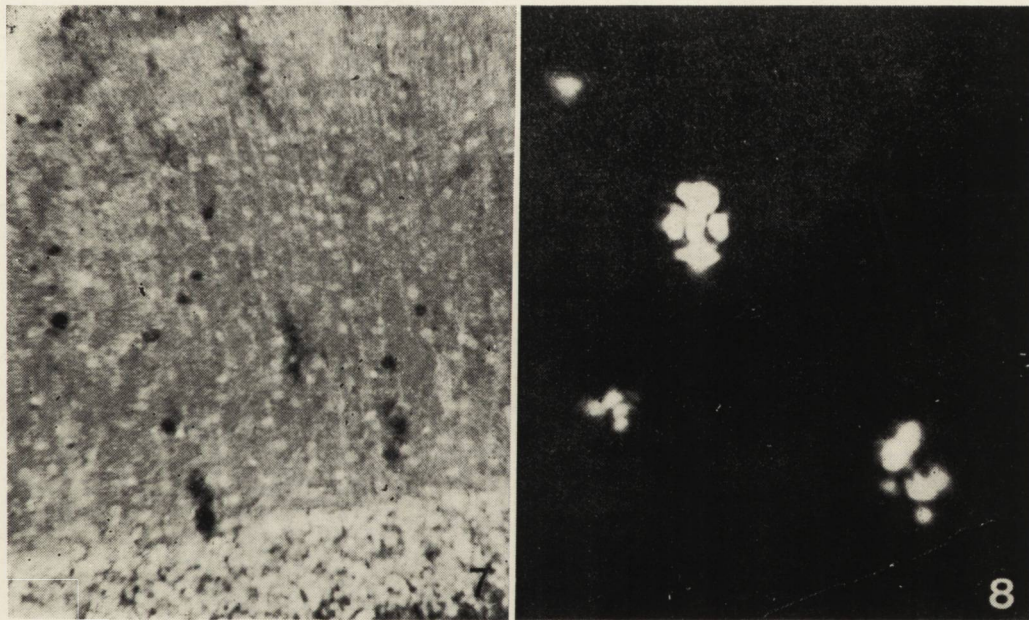


Fig. 7. Lipid containing macrophages along vessels of the cerebellar molecular layer. 131 st day of experiment. Sudan black B $\times 200$.

Ryc. 7. Makrofagi zawierające lipidy ułożone przynaczyniowo w warstwie drobinowej mózdzku. 131 dni doświadczenia. Sudan czarny B. Pow. 200 \times .

Fig. 8. Maltese cross birefringence in the white matter demyelinating focus. 229th day of experiment. Polarized light. $\times 900$.

Ryc. 8. Zjawisko krzyży maltańskich w ognisku demielinizacji w istocie białej. 229 dni doświadczenia. Światło spolaryzowane. Pow. 900 \times .

matter, the morphological structure of which was rather indistinct (Fig. 4). There were also unstained patches which often contained some kind of fibrous substance tending to stain pink-gray with Nile Blue.

In 3 cases the cells containing neutral fat and lipids were dispersed throughout the brain and grouped around the vessels (Fig. 5). The astrocytes, mainly in the Ist and IInd layer of the cerebral cortex, also contained these substances (Fig. 6). In two of the mentioned brains, Oil Red and Sudan-positive and -negative foci were present.

In the brains of animals about 300-days-old, the fat-containing dispersed cells were not observed except single cells localized perivascularly. At the time, along the vessels there accumulated substances exhibiting more distinct Sudan Black B than Oil Red O reaction. The substances were present mainly around the vessels of the Ist layer of the cerebral and cerebellar cortex; in the latter they were arranged perpendicularly to the surface of the gyri (Fig. 7). The same, but less advanced phenomenon, took place also in the brains of younger animals.

Cholesterol esters were visible in the foci showing diffuse staining with Oil Red. Their presence in these fields was verified by the occurrence of „maltese cross” birefringence in polarized light (Fig. 8).

There were no PAS-positive substances or glycogen accumulation in the „shadow” foci or in the foci showing full tissue destruction.

DISCUSSION

The results indicate that under the conditions of our experiment there occurs a dispersed demyelinating process, dominating over other changes. The breakdown products of myelin sheaths converted to neutral fat are removed by migrating macrophages and absorbed by astrocytes. The absorption of disintegrating myelin by astrocytes was lately demonstrated in EM by Lantos (1974). The manner of removal of the degenerated myelin and the chemical character of the breakdown products point at a rather typical demyelinating process.

Both the disseminated localization of demyelinating foci and lack of other pathological changes suggest the primary character of the lesions. The localization of the foci and their appearance, do not allow to refer the demyelinating process to the evident loss of neurons in the cerebral cortex, which resulted directly from damage to the matrix cells. The normal course of myelination and lack of visible damage to oligodendroglia point also to the beginning of demyelination in the mature brain.

The most convincing evidence that demyelinating lesions are not connected with a primary damage to the matrix cells was found in our unpublished material in which identical demyelinating foci were present

in the brains of the mother-mice of the offspring used in the present study, the former being mature at the moment of ENU injection.

Studies of the brain ultrastructure after ENU application to mature rats (Lantos, 1971) have demonstrated that the oligodendroglia undergoes lethal and sublethal damage within a few hours after injection. In our material, the normal course of myelination does not allow to admit such an interpretation.

At the present stage of investigation of this (so far unknown) effect of ENU administration, one cannot incline towards any conception concerning the induced demyelination or exclude any.

H. Kroh

DEMIELINIZACJA W MÓZGU MYSZY W NASTĘPSTWIE PRZEZŁOŻYSKOWEGO
DZIAŁANIA N-ETYLO-N-NITROZOMOCZNIKA (ENU)
DONIESIENIE WSTĘPNE

Streszczenie

Badania przeprowadzono na mózгах potomstwa myszy Swiss, którym podano w 15 dniu ciąży jednorazowo ENU w dawce 80 mg/kg wagi ciała. W 24 mózгах krojonych seryjnie (spośród 27 badanych) stwierdzono ogniska demielinizacji w późnym okresie doświadczenia (100—300 dni życia). Ogniska pełnej i częściowej demielinizacji występowały w mózgu i mózdzku, nie miały stałej lokalizacji ani związku z naczyniami i nie wykazywały odczynu komórkowego. Włókna osiowe w obrębie ognisk były niezmienione lub częściowo uszkodzone. Produkty rozpadu osłonek mielinowych w postaci tłuszczów obojętnych skupiały się w tkance o zartartej budowie, w makrofagach migrujących i leżących przynacznioowo oraz w astrocytach.

Pierwotny charakter uszkodzenia, rozsiana lokalizacja zmian oraz ich struktura wykluczają związek ognisk demielinizacji z opustoszeniami korowymi, powstałymi wskutek bezpośredniego uszkodzenia komórek macierzy okołokomorowej. Prawidłowy przebieg mielinizacji do 56 dnia życia i brak dostrzegalnego uszkodzenia oligodendrogleju wskazuje na późne rozpoczęcie procesu demielinizacji.

X. Крох

ПРОЦЕСС ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ В МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ЧЕРЕЗ ПЛАЦЕНТУ N-ЭТИЛ-N-НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ (ЭНМ)

Резюме

Исследования были проведены на мозге потомства мышей Swiss, которым на 15 день беременности однократно была подана ЭНМ в дозе 80 мг/кг веса тела. На серийных срезах мозга 24 из 27 исследованных животных были обнаружены очаги демиелинизации в поздние сроки эксперимента (100—300 дней жизни).

Очаги полной и частичной демиелинизации наблюдались в мозге и мозжечке без определенной локализации и связи с сосудами и не проявляли клеточной реакции. В области очагов аксоны были неизменными либо частично поврежденными. Продукты распада миелиновых оболочек в виде нейтральных жиров скоплялись в ткани с нечеткой структурой, в митрирующих, лежащих около сосудов макрофагах и в астроцитах. Первичный характер повреждений, рассеянная локализация изменений и их вид исключают связь этих изменений с уменьшением популяции нейронов коры, возникшими в результате непосредственного повреждения клеток перивентрикулярного матрикса. Нормально протекающий до 56 дня жизни процесс миелинизации и отсутствие заметных повреждений в олигодендроглии указывают на более позднее начало процесса демиелинизации.

REFERENCES

1. Bosch, D. A., Gerrits, O. P., Ebels, E. J.: The cytotoxic effect of ethylnitrosourea and methylnitrosourea on the nervous system of the rat at different stages of development. *Z. Krebsforsch.* 1972, 77, 308—318.
2. Kroh, H.: Ethylnitrosourea-induced, microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. *Ausgewählte Beiträge 4. Donausymposium für Neuropathologie, „Aktuelle Probleme der Neuropathologie“.* Ed. K. Jellinger, Facultas Verlag, Wien, 1973, 29—35.
3. Lantos, P. L.: The effect of a single dose of N-ethyl-N-nitrosourea on the fine structure of the brain of the rat. *Experientia*, 1971, 27, 1322—1323.
4. Lantos, P. L.: An electron microscope study of reacting astrocytes in gliomas induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats. *Acta neuropath.* 1974, 30, 175—181.

Author's address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 00-784 Warszawa, Dworkowa 3.

HALINA KROH, JAN ALBRECHT

BIOSYNTeza BIAŁKA W MÓZGU POTOMSTWA
PO PRZEZŁOŻYSKOWYM PODANIU ETYLONITROZOMOCZNIKA
(ENU) SAMICY SZCZURA

DONIESIENIE WSTĘPNE

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

Dotychczasowe badania wykazały, że pochodne nitrozomocznika powodują wybiórcze działanie rakotwórcze na układ nerwowy szczura. Wśród tych związków naczelną rolę zajmuje etylonitrozomocznik, zwłaszcza podany przezłożyskowo ciężarnym szczurzycom (Druckrey i wsp. 1966, Ivankovic, Druckrey 1968).

W poprzednich badaniach stanów przednowotworowych, wywołanych miejscowym działaniem metylocholantrenu wszczepionego do półkuli mózgu myszy, prześledzono włączanie ⁷⁵Se-selenometioniny do białek frakcji postmitochondrialnej mózgu *in vivo* i *in vitro* oraz transport tego aminokwasu przez barierę krew-mózg. Badania te nie wykazały istotnych różnic mogących świadczyć o zmianach w przebiegu tych procesów w okresie utajenia (Kroh, Albrecht 1973). Skłoniło nas to do przeprowadzenia badań na tkance mózgu poddanej działaniu ENU jako środka mającego specjalne powinowactwo do układu nerwowego.

MATERIAŁ I METODY

Do badań biochemicznych użyto 20 szczurów obydwu płci będących potomstwem szczurzyce rasy Wistar, którym w 15 dniu ciąży podano jednorazowo, dożylnie roztwór ENU w dawce 80 mg/kg wagi ciała.

Kontrolę stanowiły szczury w odpowiednim wieku, pochodzące od matek, które otrzymały w analogicznych warunkach sól fizjologiczną.

Badania przeprowadzono w grupach 4, 6, 8, 12, i 16 tygodni po podaniu

ENU. Każda grupa składała się z 4 zwierząt doświadczalnych i 3 kontrolnych, z wyjątkiem grupy 16-tygodniowej, która obejmowała 3 szczury.

Do kontroli histologicznej każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej użyto dodatkowe szczury (razem 10), pochodzące od matki doświadczalnej lub od matki kontrolnej. Skrawki histologiczne barwiono fioletem kryzylu, hematoksyliną-eozyną oraz metodą Heidenhaina. Przed badaniami biochemicznymi i histologicznymi mózgi były dokładnie ważone.

Szczurom przeznaczonym do badań biochemicznych wstrzykiwano do żyły udowej ^{75}Se -selenometioninę w dawce 10 μCi . Po 10 minutach od chwili wstrzyknięcia izotopu szczury dekapitowano, mierzono radioaktywność mózgu i krwi, a następnie izolowano frakcję białkową, strącającą się TCA i również dokonywano pomiaru jej radioaktywności w sposób opisany uprzednio (Albrecht 1972, Kroh, Albrecht 1973). Transport aminokwasu w biosyntezie białka oceniano dokonując obliczeń w sposób opisany uprzednio (Kroh, Albrecht 1973).

WYNIKI

Waga mózgów zwierząt doświadczalnych w porównaniu z mózgami zwierząt kontrolnych była znacznie niższa w poszczególnych grupach wieku, a krzywa wagi ustalała się od 6 tygodnia, podobnie jak w grupie kontrolnej. Makroskopowo mózgi wykazywały cechy mikrocefalii.

Mikroskopowo na przekrojach mózgów zwierząt doświadczalnych stwierdzono zaburzenia warstwowości kory płaszcza i przerzedzenia komórkowe, bez morfologicznych cech zaburzenia procesu mielinizacji. Wspomniane zaburzenia morfologiczne zostały szczegółowo opisane poprzednio (Kroh 1973).

Wyniki badań biochemicznych przedstawiono w tabeli 1. O stopniu wykorzystania aminokwasu do syntezy białka świadczy stosunek radioaktywności białek mózgu (Rb) do jego radioaktywności całkowitej wyrażony wielkością $Rb : R_c$. Za wykładnik transportu aminokwasu przyjęto stosunek radioaktywności właściwej mózgu (Rwm) do radioaktywności właściwej krwi (Rwk) wyrażony wielkością $Rwm : Rwk$.

Najwyższe wykorzystanie aminokwasu w syntezie białka obserwowano w grupie doświadczalnej 4-tygodniowej. W następnych tygodniach włączanie aminokwasu ustala się na niższym poziomie i ma podobnie jak w grupach kontrolnych tendencję malejącą. Poza grupą 4-tygodniową wykorzystanie selenometioniny w syntezie białek jest niższe w grupach doświadczalnych niż w odpowiednich grupach kontrolnych.

Transport aminokwasu poprzez barierę krew-mózg wykazuje w mózgach zwierząt grupy 4-tygodniowej wartości najwyższe, niemal dwukrotnie wyższe w porównaniu z odpowiednimi mózgami zwierząt kontrolnych

Tabela 1. Wykorzystanie ^{75}Se -selenometioniny do syntezy białka i transport aminokwasu przez barierę krew-mózg

Table 1. Utilization of ^{75}Se -selenomethionine for protein synthesis and transport of amino acid through the blood-brain barrier

Czas po ENU (tygodnie)	Rb : Rc x 100		Rwm : Rwk x 100	
	pR : tR x 100		sRe : sRb x 100	
Time after ENU (weeks)	doświadczalne experimental	kontrola control	doświadczalne experimental	kontrola control
4	41.0 ± 2.9 (4)* p ≤ 0.05	33.9 ± 4.7 (3)	1.74 ± 0.36 (4) p ≤ 0.05	1.09 ± 0.07 (3)
6	25.9 ± 2.6 (4) p ≥ 0.05	27.9 ± 1.0 (3)	0.97 ± 0.23 (4) p ≥ 0.05	0.99 ± 0.06 (3)
8	31.4 ± 1.5 (5) p ≥ 0.05	32.5 ± 3.0 (4)	0.85 ± 0.06 (5) p ≥ 0.05	0.83 ± 0.07 (4)
12	24.4 ± 3.3 (4) p ≥ 0.05	34.4 ± 7.0 (3)	0.93 ± 0.14 (4) p ≥ 0.05	0.81 ± 0.19 (3)
16	22.2 ± 1.7 (3) p ≥ 0.05	24.1 ± 2.7 (3)	0.82 ± 0.17 (3) p ≥ 0.05	0.83 ± 0.10 (3)

Wyniki uwzględniają średnie arytmetyczne ± odchylenia standardowe. Opracowanie statystyczne testem t Studenta. W nawiasach — liczba zwierząt.

Mean arithmetical values ± standard deviation. Statistic evaluation according to t — Student test. In parentheses — number of animals.

Rb : Rc wyraża stosunek radioaktywności białek mózgu do radioaktywności całkowitej mózgu, tj. włączanie aminokwasu do syntezy białka

pR : tR indicates the ratio of cerebral protein radioactivity to the total radioactivity of the cerebrum; i.e. the degree of amino acid utilization for protein synthesis

Rwm : Rwk wyraża stosunek radioaktywności właściwej mózgu do radioaktywności właściwej krwi, tj. wykładnik transportu poprzez barierę krew-mózg

sRe : sRb indicates the ratio of specific radioactivity of the cerebrum to the specific radioactivity of the blood; i.e. the degree of amino acid transport through blood-brain barrier

i z mózgami szczurów doświadczalnych w grupach następnych. W 6, 8, 12 i 16 tygodniu doświadczenia transport aminokwasu poprzez barierę krew-mózg nie różni się w grupach doświadczalnych i kontrolnych.

OMÓWIENIE

W przedstawionych wynikach na szczególne podkreślenie zasługuje fakt najwyższego włączania selenometioniny do białek w najwcześniejszym badanym okresie tj. w 4 tygodniu po wstrzyknięciu ENU, czyli w 3 tygodniu życia pozapłodowego. Wcześniejsze badania nie zostały przeprowadzone ze względu na niemożliwość wstrzyknięć dożylnych. Wysoki wskaźnik włączania aminokwasu w 4-tygodniowej grupie doświadczalnej

świadczy prawdopodobnie o końcowym etapie nasilonego procesu metabolicznego, żywszego niż w grupie kontrolnej.

W tej samej 4-tygodniowej grupie doświadczalnej zjawisku wysokiego włączania aminokwasu odpowiada wysoki wskaźnik transportu, również wyższy niż w odpowiedniej grupie kontrolnej. Wysoki wskaźnik syntezy białka w tym okresie można by prawdopodobnie przypisać właśnie zwiększonemu transportowi aminokwasu. Nie istnieje jednak prosta zależność pomiędzy transportem, a włączaniem ^{75}Se -selenometioniny. Świadczy o tym obniżenie wskaźnika włączania aminokwasu od 6 tygodnia doświadczenia w porównaniu z grupami kontrolnymi, podczas gdy wskaźnik transportu pomiędzy 6—16 tygodniem nie ulega zmianom i utrzymuje się na zbliżonym poziomie w grupach doświadczalnych i kontrolnych.

Powyższe dane wskazują, że istnieje korelacja pomiędzy wysokim wskaźnikiem transportu a wysoką syntezą białka w 4 tygodniu doświadczenia. W okresach późniejszych transport aminokwasu nie ulega zmianie, natomiast wyraźnie obniża się synteza białka u zwierząt doświadczalnych.

Obserwacje morfologiczne częściowo naświetlają te wyniki. Wybitne zmniejszenie wagi i wielkości mózgow, malformacje i obniżony przyrost masy mózgu ustalający się od 6 tygodnia świadczą o zahamowaniu rozwoju mózgow zwierząt doświadczalnych. Zmiany te można przypisać działaniu ENU na mózgi płodów w okresie gestacji.

Najwyższa synteza białka obserwowana w 4 tygodniu doświadczenia ustaje w okresie, w którym wg McIlwaina (1955) następuje zakończenie pierwszego okresu mielinizacji u szczura. Nie stwierdzono jednak zaburzeń mielinizacji u szczurów w okresie od 1—50 dnia życia (Kroh 1973), a więc nagłego obniżenia biosyntezy nie można wiązać z zaburzeniami mielinizacji.

Trudno przypuszczać również, że istnieje związek między mikrocefalią i zaburzeniami warstwowości a wysoką biosyntezą białek do 4 tygodnia doświadczenia i następnym obniżeniem jej poniżej wartości kontrolnych. Wydaje się wątpliwe, aby zaburzenia syntezy białek ujawniły się w tak późnym okresie, skoro czynnik uszkadzający działał w czasie migracji komórek (Kroh 1973), podobnie jak to wykazano na przykładzie działania metylnitrozomocznika (Kupfer, Kupfer 1971).

Х. Крох, Я. Альбрехт

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В МОЗГЕ ПОТОМСТВА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ
ЭТИЛНИТРОМОЧЕВИНЫ (ЭНМ) ЧЕРЕЗ ПЛАЦЕНТУ САМКИ КРЫСЫ

Резюме

Целью работы было выяснить, изменяется ли биосинтез белков мозга под влиянием ЭНМ, соединения, оказывающего избирательное канцерогенное влияние

на нервную систему. Были проведены биохимические исследования с одновременным морфологическим контролем на мозге потомства крыс, которым на 15 день беременности однократно вводили внутривенно ЭНМ в дозе 80 мг/кг веса тела. Исследовалось включение ^{75}Se -селенметионина в белки постмитохондриальной фракции мозга животных в период от 4—16 недель после введения ЭНМ. Оценивали транспорт аминокислоты через гематоэнцефалический барьер и степень использования ее в биосинтезе белка (Крох, Альбрехт 1973).

Исследуемые мозги обнаруживали признаки микроцефалии, нарушения в слоистой структуре и уменьшение количества клеток коры, без нарушений миелинизации. Самое большое использование аминокислоты в синтезе белков было обнаружено в 4 недельной группе. В течение последующих недель включение аминокислоты уменьшалось и было ниже, чем в соответствующих контрольных группах. Транспорт аминокислоты в мозг был в два раза выше у животных 4 недельной экспериментальной группы, чем у контрольной группы и экспериментальных крыс более поздних групп. У старших животных отсутствовала зависимость между транспортом и включением аминокислоты в ЦНС. Корреляция между показателем транспорта и ростом синтеза белка имеет место только на 4 неделе эксперимента.

Влияние на изменение биосинтеза белка и транспорт аминокислоты в более поздние недели жизни трудно отнести за счет дефекта нервной системы, возникшего в утробный период.

H. Kroh, J. Albrecht

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN THE BRAIN OF THE OFFSPRING AFTER
TRANSPLACENTAL APPLICATION OF ETHYLNITROSOUREA (ENU)
TO THE RAT

Summary

The aim of the study was the detection of changes in brain protein biosynthesis after application of ENU, the compound known for its teratogenic and carcinogenic effect on nervous system. Biochemical investigations were carried out on the brain of the offspring of rat females which were given at 15th day of gestation a single i.v. injection of ENU (80 mg/kg of body weight). Control morphological investigations were performed. Incorporation of ^{75}Se -selenomethionine into proteins of the postmitochondrial fraction isolated from rats brain at the period of 4—16 weeks after application of ENU was studied. Amino acid transportation and the amino acid utilization for the protein biosynthesis was estimated according to previously described method (Kroh, Albrecht, 1973).

Experimental brains showed microcephaly, cortical layers disturbances and loss of neurons. Myelination process proceeded normally. The highest utilization of amino acids to the protein biosynthesis was found in 4-weeks group. In following groups the amino acid incorporation decreased and was lower than in corresponding control groups. Transport of amino acid to the brain was two-fold higher in the animals of the 4th-week experimental group than in the control group and in the older experimental rats. In older animals no relationship between the transportation and incorporation of amino acid to the CNS was found. The correlation between

the high transportation index and the increased protein biosynthesis exists only in the 4-week group. The changes in protein biosynthesis and in amino acid transportation in more advanced age is difficult to ascribe to the malformations of the nervous system which were evoked during foetal life.

PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J.: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białka w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1972, X, 457—469.
2. Druckrey H. S., Ivankovic S., Preussman R.: Teratogenic and carcinogenic effect in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature* 1966, 210, 1378—1379.
3. Ivankovic S., Druckrey H.: Transplacentare Erzeugung malignen Tumoren des Nervensystems. Äthylnitroso-harnstoff (ÄNH) an BD IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.* 1968, 71, 320—360.
4. Kroh H., Albrecht J.: Protein biosynthesis in mouse brain in the period of latency and tumour growth after implantation of methylcholanthrene. *Neuropat. Pol.* 1973, XI, 389—397.
5. Kroh H.: Ethylnitrosourea-induced microcephaly in the brain of Swiss mice and Wistar rats. *Ausgewählte Beiträge 4. Donaussymposium für Neuropathologie*, Wien 1973, Facultas Verl.
6. Kupfer M., Kupfer G.: Über verschiedene Wirkungen von N-Methyl-N-Nitroso-Harnstoff bei Ratten. *Fertilitätstörungen und Missbildungen. Zbl. allg. Path.* 1971, 114, 458—475.
7. McIlwain H.: *Biochemistry and the central nervous system*. Ed. J. A. Churchill Ltd. London 1955.

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

HALINA KROH

CECHY MORFOLOGICZNE I HISTOCHEMICZNE DOŚWIADCZALNYCH GLEJAKÓW MÓZGU MYSZY

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Praca Seligmana i Sheara (1939) zapoczątkowała rozwój badań nad rakotwórczym działaniem węglowodorów aromatycznych na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Związki te okazały się dla niektórych gatunków zwierząt wysoce skutecznymi karcinogenami, przy czym najbardziej powtarzalne wyniki otrzymano u myszy po zastosowaniu metylocholantrenu. Wzbudzone chemicznie guzy mózgu u myszy wykazują szereg podobieństw strukturalnych do nowotworów OUN występujących u ludzi. W związku z powyższym przeprowadzono serię badań, mających na celu rozszerzenie i pogłębienie charakterystyki tych nowotworów i ustalenie bliższej korelacji z odpowiednimi cechami nowotworów samoistnych. Ponadto podjęto próbę znalezienia wykładników nowotworzenia w okresie utajenia.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na myszach newsobnych C₃H, R III i DBA, którym domózgowo wszczepiano ziarno metylocholantrenu (Mch). Mysiom kontrolnym wszczepiano grafit. Zwierzęta dekapitowano w odstępach 1—2 tygodniowych do 52 tygodnia doświadczenia, a myszy z nowotworami do 127 tygodnia. Badania przeprowadzono na mózgach i nowotworach *in situ* oraz tkance nowotworowej hodowanej *in vitro*, posługując się metodami histologicznymi, histochemicznymi, histoenzymatycznymi i mikroskopią elektronową. Poza barwieniami rutynowymi i specjalnymi wykonano na tkance odczyn PAS, oznaczanie mukopolisacharydów (Mps) obojętnych i kwaśnych, uzupełnione trawieniem neuraminidazą, hialuronidazą bakteryjną i jądrową, oraz oznaczanie glikogenu. Odczyny histoenzymatyczne obejmowały badanie aktywności fosfatazy kwaśnej (FK) i zasadowej (FZ), esterazy nieswoistej (EN), beta-glukuronidazy (BGI), aminopeptydazy (AP), oksydazy cytochromowej (O-cyt) oraz

dehydrogenaz bursztynianowej (BDH), mleczanowej (MDH) i glukozo-6-fosforanowej (G-6-FDH). Ilościowe badania biochemiczne, dotyczące aktywności metylaz przenoszącego RNA (t-RNA), przeprowadzono na homogenatach mózgu po implantacji Mch i na homogenatach tkanki nowotworowej przy zastosowaniu metod izotopowych z użyciem ^{14}C -adenozylometioniny *).

Do badań zmian z okresu utajenia nowotworowego użyto mózgi 208 myszy doświadczalnych i 47 kontrolnych. Materiał nowotworowy obejmował 164 przypadki.

Nowotwory klasyfikowano wg podziału Zülcha i Christensen (1956). Dla pełniejszej charakterystyki nowotworów klasyfikację powyższą uzupełniono kryteriami podziałów Kernohana i Sayre'a (1952) i Głuszcza (1972).

Wśród nowotworów stanowiących przedmiot niniejszego opracowania wyodrębniono dwie zasadnicze grupy — glejaków i glejako-mięsaków.

WYNIKI

Zmiany w OUN w okresie utajenia nowotworowego

Niezależnie od umiejscowienia i czasu trwania doświadczenia ziarno Mch lub grafitu wywoływało słaby, nieswoisty odczyn astrogleju, mikrogleju i komórek mezodermalnych. Typowym zjawiskiem było wytworzenie otoczki odczynowej wokół karcinogenu, składającej się z wymienionych komórek i włókien srebrochłonnych. W bliskim otoczeniu implantatu stwierdzano obrzęk śródbłonek wybitniejszy w grupie z Mch. Śródbłonki włóscinek otaczających karcinogen wykazywały obniżenie lub brak aktywności EZ. Wzmocniona aktywność FK, EN i AP oraz BG1 występowała w komórkach otoczki wokół Mch, oraz w odczynowych astrocytach i makrofagach w mózгах zwierząt doświadczalnych i kontrolnych. Substancje PAS-dodatnie i Mps obojętne obserwowano w cytoplazmie odczynowych astrocytów wokół otoczki. W polach obrzęku neuropil wykazywał dodatni dyfuzyjny odczyn na Mps kwaśne i obojętne.

Wczesne zmiany nowotworowe

Mikroguzy stwierdzono u 18 myszy pomiędzy 17—103 tygodniem doświadczenia. Komórki mikroguzów najczęściej nie miały cech wskazujących jednoznacznie na ich pochodzenie. W dwóch przypadkach wrzecio-

*) Dane techniczne dotyczące poszczególnych badań podano w pracach: Kroh 1969, 1970.; Kroh i wsp. 1973a, 1973b, 1975; Kroh Szumańska 1971; Kroh, Renkawek 1973; Renkawek i wsp. 1972; Szumańska, Kroh 1974, Kroh i wsp. 1976.

nowaty kształt komórek sugerował ich mezodermalne pochodzenie, w dwóch ogniska składały się z drobnych, anaplastycznych komórek luźno rozproszonych, porozdzielanych licznymi krwinkotokami; guzki te sprawiały wrażenie mikroglejaków. Śródbłonki naczyń znajdujących się w ogniskach rozplemu nowotworowego nie wykazywały aktywności FZ. Aktywność FK w cytoplazmie większości komórek była umiarkowana lub podwyższona.

Glejaki

Gwiaździki I^o, II^o III^o i płodowe stanowiły 23,78% guzów, glejaki wielopostaciowe — 18,90%, skąpodrzewiaki — 10,36%, wyściółczaki — 17,07%, glejaki złożone i mieszane — 7,31%, glejaki niezróżnicowane — 1,82%, glejaki niesklasyfikowane — 2,43%.

Gwiaździki. W grupie gwiaździaków przeważały guzy niskozróżnicowane: gwiaździk I^o — 1; gwiaździk II^o — 19; gwiaździk III^o — 14; gwiaździk płodowy — 5. Przeciętna przeżycia myszy niedekapitowanych wynosiła w przypadku gwiaździaków II^o — 50,7 tygodnia, III^o — 52,0, płodowych — 47,0.

Gwiaździki z wyjątkiem płodowych rosły naciekająco, zajmowały rozległe obszary mózgu, często szerząc się wzdłuż struktur anatomicznych. Wygląd komórek w poszczególnych rodzajach tych guzów jak również struktury pierwotne i wtórne przypominały gwiaździki występujące u ludzi. Hodowane *in vitro* gwiaździki zachowywały zasadnicze cechy cytologiczne guzów macierzystych, ale wykazywały nasilony polimorfizm. Badanie w mikroskopie elektronowym przeprowadzono tylko na materiale z hodowli *in vitro*. Cechą wspólną większości komórek była obecność gliofibryli rozproszonych w cytoplazmie perikariów i ułożonych pasmowato w wypustkach. W cytoplazmie nielicznych komórek obserwowano skupienia ciał wirusopodobnych.

Substancje PAS-dodatnie i Mps obojętne występowały jedynie w cytoplazmie gemistocytów. Przestrzenie międzykomórkowe centralnych części guzów zawierały Mps obojętne i kwaśne, z przewagą tych ostatnich. Trawienie neuraminidazą obniżało odczyn na Mps kwaśne i obojętne. Trawienie hialuronidazą jądrową znosiło, a bakteryjną obniżało odczyn na Mps kwaśne. Metachromazja substancji śródcytoplazmatycznej i międzykomórkowej ujawniała się w pH 5,8—7,4. Naczynia wszystkich guzów charakteryzowały się brakiem lub śladową aktywnością FZ. Komórki nowotworowe, niezależnie od stopnia ich zróżnicowania, wykazywały niską aktywność FK i EN. Aktywność BGl pojawiała się tylko w pojedynczych komórkach niżej zróżnicowanych guzów. Aktywność MDH była wybitna, niezależnie od typu gwiaździka, G-6-FDH — niska, zaś

BDH, jak i O-cyt. — śladowa. Aktywność dehydrogenaz w komórkach hodowanych *in vitro* była nieco wyższa niż w tkance *in situ*.

Glejaki wielopostaciowe. Przeciętna przeżycia — 52,9 tygodnia. Glejaki te w połowie przypadków naciekały istotę białą w sposób rozlany, w korze mózgu były natomiast dobrze odgraniczone. W polach korowych przeważało utkanie zbite, polimorficzne lub dysplastyczne, a w obszarze nacieczonej istoty białej i w pobrzeżu guza przeważały komórki anaplastyczne. Wygląd i układy komórek nowotworowych zależały w znacznym stopniu od budowy przerastanego podłoża. Nowotwory charakteryzowały się typowymi strukturami wtórnymi. Ogniska krwotoczne obserwowano częściej niż ogniska martwic. Przerost mięśniówki naczyń, rozplem śródbłonek i przydanki stwierdzono tylko w 20% guzów. Badania w ME ujawniły liczne komórki o torbielowato poszerzonych przestrzeniach okołojądrowych i otwartych porach otoczki jądrowej przez które wydobywała się chromatyna do cytoplazmy. Komórki z hodowli *in vitro* charakteryzowały się bogatym pofałdowaniem otoczki jądrowej i większą ilością chromatyny.

Odczyny na Mps były zbliżone do obserwowanych w gwiaźdzakiach. Międzykomórkowo występowała substancja dająca dodatnie odczyny na Mps kwaśne i obojętne. Śladowe ilości Mps obojętnych stwierdzano w komórkach olbrzymich i wielojądrzastych. Efekt trawienia enzymatycznego Mps był identyczny jak w gwiaźdzakiach. Metachromazja występowała przy pH 3,5. Naczynia nowotworów nie wykazywały aktywności FZ. Aktywność FK, BGI i MDH (najsilniejsza z 3 badanych dehydrogenaz) była najwyższa w komórkach wielojądrzastych i olbrzymich zarówno w tkance *in situ* jak i w komórkach *in vitro*.

Skąpodrzewiaki. Przeciętna przeżycia — 53,3 tygodnia. Tylko w 4 nowotworach przeważały komórki izomorficzne o jasnym „halo” i o typowym układzie plastra miodu. Częściej (5 guzów) przeważały komórki polimorficzne. Trzy guzy składały się z komórek globoidalnych, dysplastycznych, dwa z komórek anaplastycznych. Skąpodrzewiaki zawierały pola o przewodze poszczególnych rodzajów komórek. Skupienia komórek polimorficznych występowały zwykle w części centralnej. Kierunek nacieku, tworzenie układów histoformatywnych, sposób wzrostu były w znacznym stopniu zależne od struktury naciekanego podłoża. W połowie przypadków stwierdzano znaczny rozplem włóściczek, a w ich utkaniu niekiedy komórki olbrzymie.

Większość komórek izo- i polimorficznych charakteryzowała się obecnością Mps obojętnych. Występowały one obficie również w przestrzeniach międzykomórkowych w postaci przynaczyniowych jeziorek. Przynaczyniowe skupienia substancji amorficznej wykazywały silny odczyn na Mps kwaśne. Trawienie neuraminidazą nie zmieniało odczynu, a tra-

wienie hialuronidazą jądrową i bakteryjną obniżało odczyn podobnie jak w innych glejakach. Metachromatyczne zabarwienie substancji międzykomórkowej występowało w pH 3,5—7,4. W pH 7,4 pojawiała się metachromazja cytoplazmy komórek.

Wyściółczaki. Przeciętny czas przeżycia 38,3 tygodnia. Guzkowe bujanie wyściółki komór wskazywało w 8 przypadkach na punkt wyjścia nowotworu. W 9 przypadkach wyściółczaki były dobrze odgraniczone, w 12 rosły naciekająco. Rozety i pseudorozety tworzyły się w obszarach komórek izomorficznych, podczas gdy częściowo wykształcone układy występowały w polach komórek polimorficznych. Figury podziału były bardzo liczne. Wyściółczaki *in vitro* przypominały materiał macierzysty zarówno wyglądem komórek jak i obecnością układów promienistych i brukowych.

Cytoplazma komórek nowotworowych nie zawierała substancji PAS-dodatnich ani Mps. Mps kwaśne, nagromadzone w przestrzeniach międzykomórkowych, wytrawiały się typowo neuraminidazą oraz hialuronidazą bakteryjną i jądrową. Metachromatyczne zabarwienie substancji międzykomórkowej występowało w pH 3,5. Śródbłonki ścian naczyń nie ujawniały aktywności FZ lub tylko śladowo. Inne enzymy poza wysoką aktywnością MDH w komórkach *in vivo* i *in vitro* miały umiarkowaną aktywność.

Glejaki złożone i mieszane. Przeciętny czas przeżycia 37,1 tygodnia. W guzach złożonych z leżących obok siebie pól komórek pochodzących z różnych linii glejowych przeważało utkanie gwiazdzików. Obecność komponenty oligodendroglejowej lub wyściółczakowej prowadziła do powstawania skąpodrzewiako-gwiazdzików (4 przyp.) i wyściółczako-gwiazdzików (4 przyp.). Poszczególne składowe glejaków złożonych zachowywały charakterystyczne cechy cytologiczne i histofornatywne. W trzech przypadkach mieszane utkanie glejakowe występowało na pograniczu skąpodrzewiaków ortoplastycznych z gwiazdzikiem II^o i glejakiem wielopostaciowym. W pasmie przenikania się glejaków powstawały mieszane populacje komórkowe.

Glejaki niezróżnicowane. Przeciętny czas przeżycia 41,0 tygodni. Guzy cechowały się naciekającym sposobem wzrostu i nierównomiernym zagęszczeniem komórek o nadbarwliwych jądrach i skąpej cytoplazmie. Duża gęstość utkania powodowała zniekształcenie komórek. Naczynia były niezmiennione. Badanie w ME potwierdziło niestosunek jądra do cytoplazmy, wykazało obfitość nierównomiernie skupionej chromatyny i obecność gliofibryli, a w komórkach *in vitro* silnie pofałdowaną otoczkę jądrową.

Glejaki niesklasyfikowane. W 2 przypadkach z powodu małej ilości materiału udało się wykonać jedynie impregnację wg Ca-

jala i na tej podstawie zaliczono je do glejaków. W 2 innych komórki drobne, rozproszone nie tworzyły układów, a pomiędzy nimi obecne były ogniska krwotoczne. W jednym z nich śródbłonki nie wykazywały aktywności FZ, a aktywność FK w komórkach nowotworowych była umiarkowana. Wymienione cechy nie stanowiły dostatecznej podstawy do ścisłego zakwalifikowania guzów.

Glejako-mięsaki

Zależnie od przewagi lub równorzędnej reprezentacji jednej z tkanek podzielono je na trzy grupy: 1) glejaki z nowotworowym rozplemem elementów naczyń (13 przyp.), 2) guzy o ilościowo zbliżonym udziale tkanki z obu listków zarodkowych (12 przyp.) 3) mięsaki z towarzyszącym wzrostem nowotworowym gleju (5 przyp.).

Grupa 1. Czas przeżycia — 34,5 tygodnia. Utkanie podstawowe tworzyły gwiazdki II^o, III^o, glejaki wielopostaciowe i nieodróżnicowane. Źródłem rozplemu komórek mezodermalnych były ściany naczyń, zwłaszcza leżących w centralnych częściach guzów. Stopień rozplemu nie zależał od typu glejaka, ani obecności zmian wstecznych w guzie. Proliferyjące naczynia tworzyły zbite pasma komórek wrzecionowatych i olbrzymich.

Grupa 2 — Czas przeżycia — 47,5 tygodnia. W 10 mózgach utkanie glejaków i wrzecionowatokomórkowych mięsaków odoponowych stykało się bez wzajemnego przenikania. W 4 gwiazdziakach dodatkowo proliferowały ściany naczyń. Dwa nowotwory składały się z całkowicie wymienianych komórek glejakowych i mięsakowych bez komponenty mięsaka odoponowego.

Grupa 3. Czas przeżycia — 48,5 tygodnia. Wszystkie guzy były mięsakami wrzecionowatokomórkowymi, dobrze odgraniczonymi od otoczenia. W polach tkanki otoczonych przez nowotwór lub znajdujących się między jego zagonami, a czasem w komorach mózgu występowały komórki polimorficzne, dysplastyczne, globoidalne, odczynowe astrocyty, makrofagi, a między nimi małe ogniska martwicy i krwotoczne.

W hodowli glejako-mięsaków *in vitro* obserwowano dwa zasadnicze typy komórek: wrzecionowate z silnie wybarwionym jądrem oraz komórki o różnej ilości wypustek i bladych ziarnistych jądrach. Badanie w ME tkanki i komórek z hodowli potwierdziło występowanie dwóch rodzajów komórek. W komórkach większych, o jaśniejszej cytoplazmie obserwowano gliofibryle, a w pochodzących z hodowli niekiedy również skupienia ciał wirusopodobnych, identycznych z opisanymi w gwiazdziaku.

Komórki wrzecionowate wykazywały dodatnie odczyny na Mps obojętne. Odczyn komórek glejaków zależał od ich rodzaju. W naczyniach

niezależnie od utkania guza aktywność FZ nie występowała lub była śladowa. Śladowa aktywność AP widoczna była w ścianach naczyń i w gniazdach komórek mięsaków. Komórki wrzecionowate miały wysoką, zróżnicowaną aktywność FK, EN oraz MDH.

We wszystkich rodzajach glejaków i glejako-mięsaków części śródmózgowe wrastały w opony i przez otwór trepanacyjny przechodziły na sklepienie czaszki. W grupie 134 glejaków w 60 przypadkach występowała komponenta zewnątrzczaszkowa. Wśród 15 glejako-mięsaków — 12 guzów miało komponentę zewnątrzczaszkową.

Metylazy t-RNA w stanie utajenia nowotworowego i w guzach

Badania przeprowadzono wg metody podanej w pracy Kroh i wsp. (1976) na mózgach 17 myszy ze wszczepionym metylcholantrenem, pobranych między 23—89 tygodniem doświadczenia i na 17 mózgach zdrowych myszy, oraz na 7 guzach mózgu i odpowiednich mózgach kontrolnych. W próbach pochodzących od myszy w okresie utajenia stwierdzono w 8/9 przypadków podwyższenie aktywności właściwej enzymu w stosunku do mózgow kontrolnych, w odniesieniu do niezmetylowanego egzogenego t-RNA. W nowotworach (6 mięsaków, 1 wyściółczak) w 6/7 przypadków aktywność metylaz kilkakrotnie przewyższała wartości kontrolne.

OMÓWIENIE

Okres utajenia po domózgowej implantacji karcinogenu u myszy trwa ponad 200 dni i w tym czasie rozwija się zwykle odczyn komórkowy w otoczeniu karcinogenu (Zimmerman 1955, 1957). W naszym materiale stwierdzono stałe tworzenie otoczki komórkowej i brak lub obniżenie aktywności FZ w śródbłonkach naczyń wokół Mch. Powtarzalność zjawiska i jego brak w materiale kontrolnym pozwala na uznanie go za odczyn swoisty związany z obecnością karcinogenu. Brak aktywności FZ w naczyniach należy przypisać toksycznemu uszkodzeniu śródbłonków.

Wykładnikiem zmian zachodzących w tkance było również podwyższenie aktywności metylaz t-RNA w okresie po wszczepieniu Mch. Stopień metylacji egzogenego t-RNA nie zależał od czasu działania karcinogenu. Aktywność metylaz w okresie utajenia przewyższała znacznie aktywność w mózgach kontrolnych, była jednak kilkakrotnie niższa niż w tkance nowotworowej. Uzyskane wyniki dotyczące metylaz t-RNA w nowotworach potwierdzają obserwacje Viale i wsp. (1970, 1971) poczynione na nowotworach mózgu u ludzi oraz innych autorów na wzbudzonych nowotworach narządów wewnętrznych. Na specjalne podkreślenie zasługuje

występowanie tego zjawiska w okresie utajenia wskazujące na jego związek z procesem nowotworzenia.

Wysoka liczba wzbudzonych nowotworów potwierdza pogląd, że Mch wywiera silne działanie rakotwórcze na tkanki mózgu myszy. Na ogólną liczbę 408 zwierząt doświadczalnych guzy wystąpiły w 182 przypadkach, co stanowi 44,85%; w tym glejaków — 30,63%. Licząc od najwcześniejszego wystąpienia glejaka, odsetek glejaków wynosi 37,43, a łącznie z glejako-mięsakami 54,76.

Nasze obserwacje wskazują na dłuższy czas przeżycia myszy z glejakami (49,9 tyg.) oraz z glejako-mięsakami (43,5 tyg.) niż wynika z badań innych autorów. Nie stwierdzono różnic w czasie przeżycia zwierząt z glejakami „łagodnymi” i „złośliwymi”. Brak różnic najwyraźniej występuję w gwiaździakach II° (50,7 tyg.), skąpodrzewiakach (53,2 tyg) i glejakach wielopostaciowych (52,9 tyg.). Podobnie jak w statystykach ludzkich gwiaździaki i glejaki wielopostaciowe występowały najczęściej. Nie udało się ustalić zależności pomiędzy miejscem wszczepienia Mch, a rodzajem guza. Ustalenie pierwotnego położenia karcinogenu jest po rozwinięciu się guza często niemożliwe, a skład komórkowy mikroguzów nie daje wskazówek co do kierunku rozwoju przyszłego nowotworu. Wpływ umiejscowienia Mch na powstanie poszczególnych typów glejaków (Zimmerman 1957) znajduje jedynie potwierdzenie w przypadku wyściółczaków.

Obraz morfologiczny glejaków mysich w porównaniu z glejakami ludzkimi jest bogatszy. Dzięki obserwacjom całych przekrojów mózgu można było stwierdzić różnorodność typów komórek (np. w skąpodrzewiakach), różnorodność utkań leżących naprzemiennie (złożone glejaki, glejako-mięsaki) i różnorodność sposobu wzrostu w poszczególnych strukturach, a ponadto wpływ podłoża na kształtowanie się struktur pierwotnych. Wydaje się, że wszystkie cechy glejaków ludzkich są w nowotworach doświadczalnych bardziej nasilone i „karykaturalne”. Napotyka się również zjawiska rzadkie w patologii glejaków ludzkich np. ograniczony wzrost glejaka wielopostaciowego w korze.

Komórki guzów *in vitro* zachowywały cechy komórek macierzystych i tendencje do odtwarzania niektórych układów strukturalnych, ale miały większą domieszkę komórek polimorficznych, a odczyny enzymatyczne były na ogół bardziej nasilone. Widoczne w ME pofałdowanie otoczek jądrowych komórek *in vitro* oraz poszerzenie przestrzeni okołojądrowych i wylewanie się chromatyny przez pory otoczki obserwowane w komórkach glejaka wielopostaciowego *in vivo* można traktować jako wynik przyspieszonej wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej (Cervos-Navarro 1962). Występowanie gliofibryli, stwierdzone w naszym materiale w większości komórek glejaków *in vivo* i *in vitro*, opisywano zarówno w glejakach ludzkich jak i doświadczalnych (Luse 1958, 1960, Koestner i wsp.

1972). Gliofibryle występowały we wszystkich przebadanych w ME glejakach, niezależnie od stopnia zróżnicowania ich komórek. Obecność ciał wirusopodobnych w komórkach hodowanych *in vitro* uważamy za przypadkową.

We wszystkich rodzajach guzów obserwowano brak lub obniżenie aktywności FZ w ścianach naczyń. Zjawisko to stwierdzono w glejakach ludzkich i doświadczalnych u różnych zwierząt i wiąże się je (Samorajski, McCloud 1961) z uszkodzeniem bariery krew-mózg znanym z patologii glejaków ludzkich. Wzmoczone natężenie aktywności BGI występujące w niektórych gwiazdziakach związane było z niższym stopniem zróżnicowania tych guzów. Zachowanie się innych enzymów nie różniło się w sposób istotny od obserwowanych w guzach ludzkich i doświadczalnych u zwierząt.

Obecność substancji o charakterze mukopolisacharydów w przestrzeniach międzykomórkowych i cytoplazmie niektórych komórek w powiązaniu ze zmienionymi właściwościami naczyń nasuwa przypuszczenie, że naczynia o zmienionej przepuszczalności ułatwiają przenikanie Mps do miąższu glejaków. Ustalono, że kwas siąłowy jest składnikiem Mps obojętnych i kwaśnych, ale jego zawartość zależy od typu glejaka, a kwas hialuronowy i siarczany chondroityny A i C wchodzi w skład Mps kwaśnych wszystkich glejaków. Lokalizacja Mps upodabnia glejaki mysie do takich samych guzów ludzkich (Głuszc 1963).

PISMIENNICTWO

1. Cervos-Navarro J.: Elektronenmikroskopische Befunde an normalen und pathologischen Nervenzellkernen. Arch. Psych. u. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. 1962, 203, 575—598.
2. Głuszc A.: Badania histologiczne i histochemiczne glejaków mózgu ze szczególnym uwzględnieniem ich zrębu naczyniowego. Łódzkie Tow. Nauk. Prace Wydz. IV Nauk Lek. nr 47, Łódź 1963.
3. Głuszc A.: The grouping system of supratentorial gliomas according to their dominant biomorphological features. Acta Neuropath. (Berl.) 1972, 22, 110—126.
4. Kernohan J., Sayre G.: Tumors of the central nervous system. Armed Forces Inst of Pathology, Washington D. C. 1952.
5. Koestner A., Swenberg J., Wechsler W.: Experimental tumors of the nervous system induced by resorptive N-Nitrosourea compounds. Progr. exp. Tumor Res. 17, Karger, Basel 1972, 9—30.
6. Kroh H.: Preneoplastic changes in the central nervous system of mice induced by methylcholantrene. Neuropat. Pol. 1969, VII, 55—72.
7. Kroh H.: Morphological and histoenzymatic features of mouse gliomas induced by methylcholantrene. Folia Histochem. Cytochem. 1970, 8, 329—352.
8. Kroh H., Szumańska G.: Aktywność enzymów oddechowych w doświadczalnych nowotworach mózgu myszy. Neuropat. Pol. 1971, IX, 359—370.

9. Kroh H., Renkawek K.: Cytochemical distribution of beta-glucuronidase in experimental brain tumors and brain tissue in vivo and in vitro. *Histochemie* 1973, 34, 317—324.
10. Kroh H., Majdecki T., Renkawek K.: Ultrastructure of experimental brain gliomas in mice. *Z. Krebsforsch.* 1973, 80, 159—168.
11. Kroh H., Majdecki T., Groniowski J.: Electron microscopic observations on cell nuclei of experimentally induced gliomas in mice. Symposium Vorträge „Experimentelle Geschwülste des Nervensystems“. Halle 1973, w druku.
12. Kroh H., Matysiak Z., Albrecht J.: Activity of transfer RNA methylases in the mice brain after methylcholantrene implantation and in experimental tumors. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, w druku.
13. Luse S.: Ultrastructure of reactive and neoplastic astrocytes. *Lab. Invest.* 1958, 7, 401—417.
14. Luse S.: Electron microscopic studies of brain tumors. *Neurology* 1960, 10, 881—905.
15. Renkawek K., Kroh H., Kraśnicka Z.: Experimental gliomas cultured in vitro. Morphological and histochemical study. *Z. Krebsforsch.* 1972, 77, 247—256.
16. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain barrier. *Lab. Invest.* 1961, 10, 492—501.
17. Seligman A., Shear M.: Studies in carcinogenesis. VIII Experimental production of brain tumors in mice with methylcholantrene. *Am. J. Cancer* 1939, 37, 364—395.
18. Szumańska G., Kroh H.: Mucopolysaccharides and glycogen in chemically induced CNS gliomas. *Proc. VII Inter. Congr. Neuropath. Budapest, 1974, 1, 495—500.*
19. Viale G., Kroh H., Grosso G., Genta V.: Metilazione aspecifica dei t-RNA in tumori cerebrali. *Acta Neurol. (Bari)* 1970, 25, 182—183.
20. Viale G.: Transfer-RNA and transfer-RNA methylase in human brain tumors. *Cancer Res.* 1971, 31, 605—608.
21. Zimmerman H.: The nature of gliomas as revealed by animal experimentation. *Am. J. Path.* 1955, 31, 1—29.
22. Zimmerman H.: The contribution of experimental brain tumors to an understanding of human gliomas. *Proc. II Inter. Congr. Neuropath. 1955. I, 261—264.*
23. Zimmerman H.: The natural history of intracranial neoplasm with special reference to the gliomas. *Am. J. Surg.* 1957, 93, 913—923.
24. Zülch K., Christensen E.: *Handbuch der Neurochirurgie. Pathologische Anatomie der Raumbengenden intrakraniellen Prozesse.* Springer, Berlin 1956.

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

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

BADANIA NAD ISCHEMICZNO-HIPOKSYJNYM OBRZĘKIEM
MÓZGU PRZY UŻYCIU METOD IZOTOPOWYCH

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

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

Szczególne wrażliwość mózgu na niedotlenienie jest dobrze znana i obszernie opisana zarówno w aspekcie klinicznym jak i doświadczalnym. Natomiast nie jest wyjaśnione zagadnienie obrzęku mózgu towarzyszącego niedotlenieniu tkanki nerwowej. Według niektórych autorów niedotlenienie proste nie prowadzi do obrzęku mózgu (Bakay 1967, Kapuściński i Mossakowski 1973). Badania Bakaya i Lee wskazują (1968), że obrzęk mózgu rozwija się dopiero po skojarzeniu niedotlenienia z hiperkapnią przy określonym obniżeniu ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi tętniczej i obniżeniu pH tkanki nerwowej poniżej 6,75. Inni autorzy uważają, że zaburzenia hemodynamiczne krążenia mózgowego podczas niedotlenienia mózgu są istotną przyczyną rozwoju jego obrzęku (Hoff i Jellinger 1967, Kapuściński i wsp. 1972 b). Zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg i obrzęk mózgu w modelu niedokrwienia skojarzonego z niedotlenieniem (Lewin 1960) występowały w różnym nasileniu i tylko u niektórych zwierząt stwierdzano nieodwracalne uszkodzenia tkanki nerwowej (Kapuściński i wsp. 1972 a). W związku z powyższym w badaniach nad rozwojem obrzęku mózgu w warunkach niedotlenienia tkanki nerwowej zastosowano modyfikację modelu Lewina polegającą na obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych u szczurów i przetrzymywania zwierząt w warunkach niskotlenowych przez okres 20 minut.

Celem pracy była ocena występowania obrzęku mózgu u szczurów z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych poddanych niedotlenieniu oraz próba wyjaśnienia mechanizmu jego powstawania.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 162 dorosłych szczurach rasy Sprague-Dagley i Wistar. Doświadczenia przeprowadzono w 3 grupach: 1. zwierzęta z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych przetrzymywane w atmosferze niskotlenowej, 2. zwierzęta z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych, 3. zwierzęta prawidłowe nie poddawane żadnym zabiegom. Szczury pierwszej grupy po 3 godzinach od zabiegu zamknięcia tętnic umieszczano pojedynczo na okres 20 minut w komorze ze stałym przepływem mieszaniny gazów złożonej z 5% tlenu i 95% azotu. Po tym okresie szczury pierwszej grupy uśmiercano w następujących przedziałach czasowych: 20 minut tj. bezpośrednio po wyjęciu zwierząt z komory i 40, 80, 140, 200 minut oraz 6 godzin od rozpoczęcia niedotleniania. U szczurów drugiej grupy badano mózgowy przepływ krwi według metody Lassena i Ingwara (1961) wstrzykując do tętnicy szyjnej wewnętrznej ^{133}Xe w roztworze fizjologicznym soli. W celu oceny ukrwienia mózgu i czynnego transportu związków do mózgu, objętości krwi w mózgu oraz stanu bariery krew-mózg zastosowano następujące związki znakowane: ^{75}Se -selenometioninę, ^{51}Cr -albuminę, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ i ^{131}I -albuminę. Zastosowanie albuminy znakowanej różnymi izotopami było spowodowane odmienną charakterystyką widm energetycznych poszczególnych radionuklidów i możliwością ich pomiaru w jednej próbce. Radioaktywność mózgu i krwi mierzono w automatycznym liczniku scyntylacyjnym (zestaw firmy Nuclear Chicago) dla promieni gamma z kryształem NaJ(Tl) współpracującym z analizatorem energii promieniowania. Udział każdego izotopu określano drogą dyskryminacji wysokości impulsów przy zastosowaniu 50% szerokości okna na głównym szczycie energetycznym poszczególnych radionuklidów. Uzyskane wyniki pomiarów wyrażano jako stężenie radionuklidów w mózgu obliczane dla jego ciężaru mokrego i suchego. Zawartość wody w mózгах obliczano z różnicy ciężarów mokrych i suchych. Badania histologiczne mózgow przeprowadzono na skrawkach parafinowych barwionych hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu oraz wg metody Heidenhaina. Ponadto oceniano stan mikrokrążenia mózgowego na skrawkach mrożonych przy zastosowaniu metody benzydynamowej Pickwortha. Badania mikroskopowo-elektronowe mózgow przeprowadzono po ich utrwaleniu w 5% roztworze aldehydu glutarowego i 2% roztworze czterotlenku osmu zatapiając skrawki w Eponie 812. Ultracienkie skrawki podbarwiano octanem uranylu i winianem ołowiu wykonując ultrafotogramy przy użyciu mikroskopu elektronowego JEM-7-A na płytach ORWO E 42.

WYNIKI

Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych u szczurów powoduje krótkotrwałe zmniejszenie mózgowego przepływu krwi średnio do

wartości $19,4 \pm 4,03\%$ poziomu prawidłowego przepływu. Mózgowy przepływ krwi u tych zwierząt ulega poprawie osiągając wartość średnio $57,2 \pm 4,56\%$ poziomu prawidłowego przepływu po 1 godzinie od zamknięcia tętnic. Niedotlenienie zwierząt z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych powoduje ogólne niedokrwienie mózgu, co wyraża się niższym stężeniem ^{75}Se -selenometioniny w mózgach zwierząt bezpośrednio po wyjęciu z komory hipoksyjnej w porównaniu z poziomem u zwierząt drugiej grupy. Po 20 minutach od wyjęcia zwierząt z komory hipoksyjnej, stężenie selenometioniny w mózgach szczurów ulega zwiększeniu osiągając w 40 minucie od rozpoczęcia niedotlenienia wartości wyższe niż u zwierząt drugiej grupy. W późniejszych czasach stężenie selenometioniny w mózgach szczurów poddanych niedotlenieniu utrzymuje się jeszcze na wyższym poziomie w czasie 80 minut i powraca do wartości zbliżonych do prawidłowych w czasie 140 minut od rozpoczęcia niedotlenienia.

Bezpośrednio po wyjęciu zwierząt z komory hipoksyjnej występuje zwiększenie stężenia ^{51}Cr -albuminy w mózgu. W późniejszych czasach w okresie przebywania zwierząt w warunkach atmosferycznych z prawidłową zawartością tlenu, stężenie ^{15}Cr -albuminy w mózgach szczurów poddanych niedotlenieniu ulega zmniejszeniu osiągając najniższe wartości w 80 i 140 minucie od rozpoczęcia niedotlenienia.

Zawartość wody w mózgach szczurów po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych nie różni się od zawartości wody w mózgach szczurów prawidłowych. Natomiast u zwierząt które po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych poddano niedotlenieniu rozwija się odwracalny obrzęk mózgu z maksymalnym przyrostem wody w 80 minucie od rozpoczęcia niedotlenienia ($15,6 \pm 4,7\%$). Obrzęk ten zmniejsza się w 140 i 200 minucie, jednakże po 6 godzinach od wyjęcia zwierząt z komory hipoksyjnej, zawartość wody w mózgach utrzymuje się nadal na wyższym poziomie w porównaniu z poziomem u zwierząt 2 i 3 grupy.

Stosunki radioaktywności właściwych mózg-krew po dożylnym wstrzyknięciu $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ i ^{131}J -albuminy szczurom poddanym niedotlenieniu po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych nie wykazały statystycznie znamiennych różnic w porównaniu z wynikami w pozostałych dwóch grupach.

Badania histologiczne i mikroskopowo-elektronowe u zwierząt z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych poddanych niedotlenieniu wykazały cechy obrzęku mózgu z największym nasileniem zmian w 80 minucie od początku doświadczeń. Zmiany ultrastrukturalne wyrażały się obrzmieniem cytoplazmy i wypustek astrogleju oraz cytoplazmy oligodendrocytów, nieprawidłowościami w zakresie ich organelli oraz rozwarstwieniem blaszek mielinowych.

OMÓWIENIE

Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych u szczura nie prowadzi do nieodwracalnych zmian niedokrwiennych w mózgu. Zabieg ten wywołuje odruch z zatoki szyjnej powodujący podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi średnio o 15,8%, co wraz z mechanizmami regulacyjnymi krążenia mózgowego zabezpiecza wystarczające ukrwienie mózgu (Kapuściński, 1974). Poziom mózgowego przepływu krwi po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych u szczura jest wyższy od poziomu uważanego za krytyczny dla wywołania nieodwracalnych zmian w mózgu (Brodersen, 1973; Kapuściński 1974) i w pełni tłumaczy brak statystycznie znamiennych różnic w odniesieniu do prawidłowych zwierząt w badaniach przeprowadzonych uprzednio w tych samych warunkach doświadczalnych z użyciem innych związków znakowanych (Kapuściński, Mossakowski, 1973). U szczurów poddanych niedotlenieniu po obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych występują zaburzenia hemodynamiczne w krążeniu mózgowym, którym towarzyszy rozwój obrzęku mózgu. Podczas przebywania zwierząt w komorze hipoksyjnej zmniejsza się mózgowy przepływ krwi natomiast zwiększa się jej objętość co odpowiada stanowi przekrwienia biernego mózgu. W tym okresie zaczyna rozwijać się obrzęk znajdujący wykładnik we wzroście zawartości wody w mózgu. Po przeniesieniu zwierząt do warunków atmosferycznych z prawidłową zawartością tlenu występuje poischemiczne przekrwienie tętnicze obserwowane również przez innych autorów na innych modelach doświadczalnych (Sundt i Waltz, 1971; Baldy-Moulinier, 1974 i inni). Okresowi przejścia ze stanu przekrwienia biernego do stanu przekrwienia czynnego czyli poischemicznemu wzrostowi mózgowego przepływu krwi towarzyszy dalszy rozwój obrzęku mózgu u badanych zwierząt doświadczalnych, który osiąga szczyt w 80 minucie od rozpoczęcia niedotleniania zmniejszając się stopniowo w dalszych badanych czasach. Objętość krwi w mózgu zmniejsza się proporcjonalnie do stopnia narastania obrzęku mózgu. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z użyciem nadtechnetanu i znakowanej albuminy nie wykazały wzmoczonej przepuszczalności naczyń mózgowych dla tych związków, co wskazuje na cytotoksyczny charakter obrzęku mózgu w tym modelu. Badania wykonane przez Mchedlishvili i wsp. (1975) i Kapuścińskiego i wsp. (1975) wskazują na istotną rolę ogólnoustrojowych zaburzeń hemodynamicznych w rozwoju poischemicznego obrzęku mózgu. Zmiany niedokrwienne tkanki nerwowej można określić jako okres wstępny dla rozwoju obrzęku mózgu. Natomiast zaburzenia pomiędzy dopływem i odpływem krwi w mózgu są istotnym czynnikiem patogenetycznym rozwoju obrzęku mózgu. Z prac tych wynika, że wzrost układowego i mózgowego ciśnie-

nia żylnego na skutek niewydolności serca jest jedną z ważnych przyczyn rozwoju poischemicznego obrzęku mózgu.

WNIOSKI

1. Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych u szczurów powoduje krótkotrwale zmniejszenie mózgowego przepływu krwi średnio do wartości 19,4% poziomu prawidłowego przepływu. Mechanizmy regulacyjne krążenia mózgowego i układowego powodują kompensację ukrwienia mózgu zwiększając po 1 godzinie od zamknięcia tętnic mózgowy przepływ krwi średnio do wartości 57,2% poziomu prawidłowego przepływu. Zabieg ten nie prowadzi do powstania obrzęku mózgu i do rozwoju nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej.

2. Niedotlenienie szczurów z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych powoduje upośledzenie ukrwienia mózgu charakteryzujące się następującą dynamiką:

a) W okresie niedotlenienia występuje znaczne zmniejszenie mózgowego przepływu krwi z towarzyszącym przekrwieniem biernym.

b) Po okresie niedotlenienia ukrwienie mózgu ulega poprawie osiągając wartości wyższe niż u zwierząt kontrolnych.

c) W późniejszym okresie po niedotlenieniu ukrwienie mózgu osiąga poziom ukrwienia mózgu u zwierząt kontrolnych.

3. Niedotlenienie szczurów z obustronnym zamknięciem tętnic szyjnych wspólnych powoduje rozwój obrzęku mózgu. Obrzęk ten jest odwracalny i charakteryzuje go następująca dynamika:

a) Powstaje już w okresie niedotlenienia.

b) Narasta po okresie niedotlenienia osiągając szczyt pomiędzy 80 i 120 minutą od rozpoczęcia niedotleniania po czym w dalszych badanych czasach stopniowo zmniejsza się.

4. Rozwój obrzęku mózgu w stosowanym modelu doświadczalnym związany jest z zaburzeniami hemodynamicznymi w krążeniu mózgowym krwi.

5. Zwiększeniu zawartości wody w mózgu w warunkach tego modelu towarzyszy zmniejszenie objętości krwi w mózgu.

6. Bariera krew-mózg w powyższym modelu nie wykazuje wzmoczonej przepuszczalności dla nadtechnetanu i znakowanej albuminy co wskazuje na cytotoksyczny charakter wywołanego obrzęku.

PIŚMIENICTWO

1. Bakay L.: Radio-isotopic studies in brain edema. In: Brain edema. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer Verl., Wien, New York, 1967, 517—529.
2. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. Brain, 1968, 91, 697—706.

3. Baldy-Moulinier M., Humeau Cl.: Electron microscopic study of ischemic and histotoxic cerebral hypoxia. Correlation of ultrastructural changes and cerebral blood flow. In: Pathology of cerebral microcirculation. Ed. J. Cervós-Navarro. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1974, 307—314.
4. Brodersen P.: Critical levels of blood flow and oxygen utilisation in brain. Proc. of the 2nd Intern. Symp. on Nuclear Medicine, Karlovy Vary, 1971; Charles Univ. Prague, 1973, 231—235.
5. Hoff H., Jellinger K.: Brain edema as a neurological problem. In: Brain edema. Ed. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer Verl., Wien, New York, 1967, 3.
6. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Quantitative evaluation of transport of some labelled compounds into the rat cerebral tissue under normal conditions and during ischemia and hypoxia of brain. Proc. of the 2nd Intern. Symp. on Nuclear Medicine, Karlovy Vary, 1971; Charles Univ. Prague, 1973, 209—214.
7. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 45—64 a.
8. Kapuściński A., Goel Y. S., Lindsay R., Kapuścińska B. and McDonald M. W.: Study on the mechanism and kinetics of brain edema induced by ischemia and hypoxia. A new ischemic-hypoxic model of cerebral edema. Southeastern Chapter Soc. Nucl. Med., 13th Annual Meeting, 1972, Atlanta, Georgia. *Southern Med. J.*, 1972, 65, 1425 b.
9. Kapuściński A.: Significance of the circle of Willis in cerebral blood supply in ischemic conditions. (Research and clinical studies). The 1st World Congress of Nuclear Medicine, Tokyo-Kyoto, 1974. Proc. of the congress: Recent advances in nuclear medicine, Ohkawa Printing Co., Yokohama, 1176—1178.
10. Kapuściński A., Mchedlishvili G. I., Nikolaishvili L.: Development of the post-ischemic brain edema and its relation to circulatory disorders. Proc. of the 7th Intern. Symp. on Cerebral Blood Flow and Metabolism, Aviemore, 1975. *Blood Flow and Metabolism in the Brain*. Ed. M. Harper, B. Jennett, D. Miller, J. Rowan, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1975, 10, 21—25.
11. Lassen N. A. and Ingvar D. H.: The blood flow of cerebral cortex determined by radioactive Krypton⁸⁵. *Experientia*, 1961, 17, 24—43.
12. Levin S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J. Pathol.*, 1960, 36, 1—17.
13. Mchedlishvili G. I., Kapuściński A., Nikolaishvili L.: Role of circulatory changes in the formation of postischemic brain edema. *Intern. Res. Com. System., Medical Science*, 1975, 3, 45.
14. Sundt T. M. and Waltz A. G.: Cerebral ischemia and reactive hyperemia. Studies of cortical blood flow and microcirculation before, during and after temporary occlusion of middle cerebral artery of squirrel monkeys. *Circulation Res.*, 1971, 28, 426—433.

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

OCENA KSIĄŻKI

Stanley A. Feldman: MUSCLE RELAXANTS., W. B. Saunders Comp. Ltd.
London 1973

Książka ta została wydana jako pierwszy tom serii „Major Problems in Anaesthesia” (red. W. W. Mushin), jest ona jednak kierowana nie tylko do anestezyjologów, ale również neurologów i neurofizjologów. Literatura dotycząca środków działających na płytkę nerwowo-mięśniową używanych we współczesnej anestezyjologii jest ogromna, na ogół jednak są to prace cechujące się ujęciem wyłącznie klinicznym lub też przede wszystkim teoretycznym. Autor omawianej książki potrafił połączyć w przedstawieniu analizowanych zagadnień obie postawy: doświadczonego klinicysty-anestezjologa i kompetentnego eksperymentatora.

Książka składa się z 15 rozdziałów (190 stron), w której leki działające na płytkę nerwowo-mięśniową omówiono od strony mechanizmu ich działania, farmakologii i kliniki.

Pierwszy rozdział przedstawia współczesne poglądy na transmisję nerwowo-mięśniową mięśnia szkieletowego w warunkach prawidłowych z uwzględnieniem badań morfologicznych mikroskopowo elektronowych złącza nerwowo-mięśniowego, badań elektrofizjologicznych i biochemicznych. Stanowi on logiczny punkt wyjścia do analizy rodzajów bloków nerwowo-mięśniowych, będących przedmiotem następnego rozdziału. W tej części książki autor podaje podział bloków nerwowo-mięśniowych z omówieniem hipotez co do ich patomechanizmu. Zwłaszcza przejrzyste przedstawione jest zagadnienie tzw. bloku podwójnego (dual block), zwanego inaczej fazą II bloku nerwowo-mięśniowego, szczególnie istotnego w miastenii. Wiadomo, że cechą płytki nerwowo-mięśniowej w miastenii jest nie tylko jej nadmierna wrażliwość na leki kuraropodobne oraz względna oporność na środki depolaryzujące, ale również oddziaływanie na leki depolaryzujące tzw. blokiem podwójnym tj. łatwym przechodzeniem bloku depolaryzacyjnego (tzw. I faza bloku) w blok nie depolaryzacyjny (tzw. II faza bloku). Zjawisko to ma istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia hipotez co do patomechanizmu miastenii, jak też z punktu widzenia prawidłowego prowadzenia anestezji u chorych z miastenią lub z zespołem miastenicznym.

Obszerna część książki poświęcona jest lekom działającym na płytkę nerwowo-mięśniową, lekom z grupy środków depolaryzujących oraz środków kuraropodobnych. Autor na podstawie obszernej literatury omawia zagadnienie punktu uchwytu tych środków, podkreślając obok klasycznie przyjętego poglądu o ich działaniu na błonę postsynaptyczną, również ich wpływ na część presynaptyczną płytki, oraz pośrednie działanie na ośrodkowy układ nerwowy.

Wnikliwie, w oparciu o nowoczesne prace doświadczalne przedstawione jest zagadnienie receptorów błony postsynaptycznej z punktu widzenia wiązania się omawianych leków z substancją receptorową błony postsynaptycznej. Autor podkreś-

la, że stopień, a zwłaszcza długość ich działania zależy nie tylko od ich stężenia w surowicy, ale powinowactwa poszczególnych środków do substancji receptorowej płytki, wpływów jonowych (Ca, Mg), temperatury, pH, czynników hemodynamicznych i inn. Również rozpatrywane jest zagadnienie osobniczej wrażliwości na środki depolaryzujące i kuraropochodne.

Dość istotnym problemem jest zagadnienie interakcji pomiędzy różnymi środkami stosowanymi w anestezjologii. Wiadomo np., że działanie środków kuraropodobnych jest wybitniejsze przy jednoczesnym stosowaniu halotanu (Hughes 1970, Feldman, Tyrrell 1969) czy narkozy eterowej (Katz 1966). Przykładów takich autor przytacza wiele, próbując jednocześnie przedstawić hipotezy co do mechanizmu tych synergizmów.

Wyczerpująco jest przedstawione zagadnienie rozkładu i wydalania środków działających na płytkę nerwowo-mięśniową, z podkreśleniem czynności cholinesterazy i pseudocholinesterazy w warunkach prawidłowych i patologicznych. Omówiono również zagadnienie wiązania się omawianych leków z poszczególnymi frakcjami białek surowicy, co ma istotny wpływ na aktywność tych środków, a więc ich dawkowanie (autorem tego rozdziału jest M. A. Skivington).

Miastenia i zespoły miasteniczne, będące przedmiotem jednego z rozdziałów omówione są dość pobieżnie, niemniej jednak rozdział ten zawiera wiele informacji szczególnie przydatnych dla wyboru postępowania anestezjologicznego w tej grupie chorych.

Ostatnie podsumowujące rozdziały poświęcone są racjonalnemu używaniu środków działających na płytkę nerwowo-mięśniową, a więc wyborowi określonego leku i jego dawki w różnych sytuacjach klinicznych.

Książka oparta na bogatym i nowoczesnym piśmiennictwie i dużym doświadczeniu autora wnosi wiele cennych informacji, stanowiąc podsumowanie współczesnego stanu wiedzy co do teoretycznych i praktycznych aspektów farmakologii płytki nerwowo-mięśniowej i jest niewątpliwie wartościową i interesującą pozycją zarówno dla anestezjologów, jak i neurologów.

doc. dr med. *Barbara Emeryk*

KOMUNIKAT

Zgodnie z uchwałą Walnego Zgromadzenia Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich Redakcja Neuropatologii Polskiej postanowiła wprowadzić w czasopiśmie Dział Kroniki i Informacji. Redaktorem nowego Działu został doc. Jerzy Dymecki.

W Dziale Kroniki i Informacji będą zamieszczane wiadomości o kongresach i zjazdach neuropatologicznych, neurologicznych i anatomopatologicznych oraz informacje dotyczące życia naukowego i organizacyjnego środowiska neuropatologicznego w naszym kraju (uzyskane stopnie naukowe i specjalizacje, wyróżnienia i nagrody, informacje o działalności Zarządu Głównego SNP, otwarcie nowych placówek neuropatologicznych itd.).

Redakcja apeluje do wszystkich członków SNP o nadsyłanie wiadomości o ważniejszych wydarzeniach ze swojego terenu.

Informacje te należy kierować na adres Redaktora nowego Działu doc. J. Dymeckiego (Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Aleja Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa).

Redakcja
Neuropatologii Polskiej

T R E S Ć

B. Gajkowska: Zmiany mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza mózgu szczura po podaniu ACTH	1
Z. Kraśnicka, B. Gajkowska, M. J. Mossakowski: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na tkankę nerwową hodowaną <i>in vitro</i> (obserwacje mózdzku w mikroskopie świetlnym i elektronowym)	11
R. Gadamski, G. Szumańska, M. Sikorska: Wpływ hipoksji krążeniowej na zachowanie się amin katecholowych w mózgu królika. Badania histochemiczno-fluorescencyjne	23
E. Tarnowska-Dziduszko: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu padaczki	31
A. Leźnicki, M. Różańska, J. Dymceki: Wpływ napadów padaczki audiogennej na aktywność niektórych enzymów mózgu myszy	41
M. Wender, H. Filippek-Wender, J. Stanisławska, A. Goncerzewicz: Skład estrów cholesterolu mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (EAE)	57
I. Zelman, D. Serokowa: Porównawcze badanie zmian morfologicznych w mózgach zwierząt laboratoryjnych zakażonych szczepem ustalonego i atenuowanego wirusa wścieklizny	67
M. Dąbska, F. Taytsch-Kapulkin, Z. Ferens: Śródciażowe zakażenie myszy wirusem Sindbis	81
B. Osetowska, A. Taraszewska, F. Luszawski: VI. Występowanie zwapnień neuronalnych u królika „pt” w zależności od wieku i przebiegu klinicznego	85
I. Wald, H. Wehr, E. Harmak, K. Albert, J. Sawicki: VII. Niektóre wskaźniki biochemiczne w surowicy królika „pt”	97
S. Biernat, A. Kulig, R. Lepert, T. Orłowski: Badania patomorfologiczne mózgow psów po stosowaniu hemodilucji i pełnej krwi w krążeniu pozaustrojowym w normotermii	105
H. Kroh: Demielinizacja w mózgu myszy w następstwie przezłożyskowego działania N-etylo-N-nitrozomocznika (ENU)	115
H. Kroh, J. Albrecht: Biosynteza białka w mózgu potomstwa po przezłożyskowym podaniu etylnitrozomocznika (ENU) samicy szczura	121
H. Kroh: Cechy morfologiczne i histochemiczne doświadczalnych glejaków mózgu myszy. Streszczenie pracy habilitacyjnej	127
A. Kapuściński: Badania nad ischemiczno-hipoksyjnym obrzękiem mózgu przy użyciu metod izotopowych. Streszczenie pracy habilitacyjnej	137
Ocena książek nadesłanych	143
Dział Kroniki i Informacji	10 i 40

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Б. Гайковска: Электронно-микроскопические изменения в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса мозга крысы после подачи АКТГ	I
З. Красьниска, Б. Гайковска, М. Я. Моссаковски: Влияние кратковременной гипоксии на культуру нервной ткани <i>in vitro</i> (изучение мозжечка в оптическом и электронном микроскопах)	11
Р. Гадамски, Г. Шуманьска, М. Сикорска: Влияние циркуляционной гипоксии на поведение катехоламинов в мозге кролика. Гистонимически-флюоресцентные исследования	23
Е. Тарновска-Дидушко: Морфологическая картина мозжечка при эпилепсии	31
А. Лезьницки, М. Рожаньска, Е. Дымески: Влияние припадков аудиогенной эпилепсии на активность некоторых ферментов мозга мышей	41
М. Вендер, Х. Филипек-Вендер, И. Станиславска, А. Гонцезевич: Состав эфиров холестерина мозга при экспериментальном аллергическом воспалении головного и спинного мозга	57
И. Б. Зельман, Д. Серокова: Сравнительные исследования морфологических изменений в мозге лабораторных животных, зараженных фиксированным и ослабленным штаммами вируса бешенства	67
М. Домбска, Ф. Таич-Капилькин, З. Ференс: Заражение мышей вирусом Sindbis во время беременности	81
Э. Осетовска, А. Тарашевска, Ф. Лушавски: VI. Отложения кальция в нейронах у кролика „pt” в зависимости от возраста и клинической картины болезни	85
И. Вальд, Х. Вер, Е. Хармак, Я. Савицки: VII. Некоторые биохимические показатели сыворотки крови кролика „pt”	97
С. Бернат, А. Кулиг, Р. Леперт, Т. Орловски: Патоморфологическое исследование мозга собак после применения гемодилюции и полноценной крови в искусственном кровообращении при нормотермии	105
Х. Крох: Процесс демиелинизации в мозге мышей после воздействия через плаценту N-этил-N-нитрозомочевины (ЭНМ)	115
Х. Крох, Я. Альбрехт: Биосинтез белка в мозге потомства после введения этилнитромочевины (ЭНМ) через плаценту самки крысы	121
Х. Крох: Патоморфология экспериментальных опухолей головного мозга у мышей. Содержание диссертации на звание доцента	127
А. Капусьтиньски: Исследования ишемически-гипоксического отека, головного мозга при употреблении изотопных методов. Содержание диссертации на звание доцента	137
Рецензии	143
Отдел хроники и информации	10 i 40

CONTENTS

B. Gajkowska: Electron microscopic changes in supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain hypothalamus after administration of ACTH	1
Z. Kraśnicka, B. Gajkowska, M. J. Mossakowski: Effect of short-lasting anoxia on <i>in vitro</i> culture of cerebellum	11
R. Gadamski, G. Szumańska, M. Sikorska: Effect of circulatory hypoxia on rabbit brain catecholamines. Histochemical and fluorescence study	23
E. Tarnowska-Dziduszko: Cerebellar changes in the course of epilepsy	31
A. Leźnicki, M. Rożańska, J. Dymecki: Effect of audiogenic seizures on the activity of some enzymes of the mouse brain	41
M. Wender, H. Filipek-Wender, J. Stanisławska, A. Goncerzewicz: Cerebral cholesteryl ester composition in experimental allergic encephalomyelitis	57
I. Zelman, D. Serokowa: Comparative studies on morphological changes in brains of various laboratory animals infected with fixed and attenuated strains of rabies virus	67
M. Dąbska, F. Taytsch-Kapulkin, Z. Ferens: Infection of mice with Sindbis virus during pregnancy	81
E. Osetowska, A. Taraszewska, F. Luszawski: VI. Neuronal calcifications in „pt” rabbits: dependence on age and clinical course	85
I. Wald, H. Wehr, E. Harmak, K. Albert, J. Sawicki: VII. Some biochemical parameters in blood serum of the „pt” rabbit	97
S. Biernat, A. Kulig, R. Lejert, T. Orłowski: Pathomorphological studies of dog brain after application of hemodilution and complete blood in extracorporeal circulation in normothermia	105
H. Kroh: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)	115
H. Kroh, J. Albrecht: Protein biosynthesis in the brain of offspring after transplacental application of ethylnitrosourea (ENU) to the rat	121
H. Kroh: Morphological and histochemical features of mouse experimental gliomas. Summary of the Ph.D. thesis	127
A. Kapuściński: Studies on ischemic-hypoxic brain edema by means of isotope methods. Summary of the Ph.D. thesis	137
Books review	143
Chronicles and informations	10 i 40

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Redakcja nie zwraca maszynopisów nadesłanych prac.

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

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

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

WARUNKI PRENUMERATY

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

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

- do dnia 25 listopada na styczeń, 1 kwartał, I półrocze i cały rok następny,
- do dnia 10 każdego miesiąca (z wyjątkiem grudnia) poprzedzającego okres prenumeraty.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne oraz wszelkiego rodzaju inne zakłady pracy składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

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

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest droższa o 50% od prenumeraty krajowej, przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych RSW „Prasa-Książka-Ruch” ul. Wronia 23, 00-958 Warszawa.

Quarterly „Neuropatologia Polska” appearing since 1963, as an official Journal of Polish Association of Neuropathologists publishes papers in the field of: Clinical and Experimental Neuropathology, Neurooncology, Neurochemistry and Neuroanatomy.

Yearly subscription US \$ 12.— (prices in other currencies are the effective exchange rates in relation to the currency quoted above). Subscriptions from abroad should be paid to Ars Polona-Ruch account No 1595-006-71000 through the Bank Handlowy S.A. Warsaw, Poland.

Indeks 36668