

CMPiK PAN  
Bibl.

cop 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM XIV

1976

ZESZ. 4

---

WARSZAWA

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

---

Tom XIV

Październik-Grudzień

Nr 4

---

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY WSPÓŁPRACY

*Ludo van Bogaert* (Antwerpia), *Werner Jänisch* (Halle), *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*, *Mirostlaw 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

HANNA DRAC

## ZMIANY HISTOLOGICZNE W NERWIE ŁOKCIOWYM I W NERWIE ŁYDKOWYM W STWARDNIENIU ZANIKOWYM BOCZNYM \*

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie  
Kierownik. prof. dr med. I. Hausmanowa-Petrusewicz

Zmiany w rdzeniu kręgowym w stwardnieniu zanikowym bocznym (SLA) są dobrze znane z licznych opisów, natomiast mniej informacji dotyczy korzeni rdzeniowych i nerwów obwodowych w tym schorzeniu. W korzeniach przednich opisywano zmiany o charakterze zanikowo-zwyrodnieniowym (Catola 1925; Friedman, Freedman 1950; Bunina 1963), obejmujące nawet około 50% grubych włókien (Swank, Putnam 1943). W nielicznych pracach dotyczących nerwów obwodowych w tym schorzeniu (Poussep, Rives 1926; Konowałow 1953; Dayan 1969) stwierdzono oprócz zaniku włókien, zmiany w obrębie osłonki mielinowej (Bertrand, van Bogaert 1925; Friedman, Freedman 1950; Dayan 1969).

Celem przedstawionej pracy była analiza zmian histologicznych występujących w stwardnieniu zanikowym bocznym we włóknach nerwu mieszanego i czuciowego.

### MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowił nerw łokciowy, pobrany w 10 przypadkach i nerw łydkowy, pobrany w 8 przypadkach od chorych w wieku 25—70 lat, zmarłych z powodu stwardnienia zanikowego bocznego. Kontrolę stanowiły nerwy pobrane od osób bez objawów uszkodzenia układu nerwowo-mięśniowego, zmarłych w wieku 24—60 lat z różnych przyczyn (tętniak mózgu, wypadek uliczny, zawał mięśnia sercowego, udar mózgowy).

Nerw łokciowy pobierano z cięcia na wysokości wyrostka łokciowego, nerw łydkowy z cięcia na podudziu, 3 cm powyżej kostki bocznej. W przypadkach stwardnienia zanikowego bocznego materiał pobierano

\* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.4.1.4.

4—12 godzin po zgonie. W przypadkach kontrolnych w 10—24 godzin po zgonie.

Po pobraniu wycinek nerwu dzielono na dwie części, jedną część wycinka utrwalano w 3—5% roztworze aldehydu glutarowego, barwiono osmem, dobarwiano zmodyfikowaną metodą Pala-Kulczyckiego i zatapiało w eponie. Skrawki grubości 1—1,5  $\mu$  skrawano na ultramikrotomie. Z powiększonych do 900 x mikrofotografii obliczano liczbę włókien mielinowych na 0,1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczkowej i wykresłano histogram średnic zewnętrznych włókien mielinowych.

Celem uzyskania włókien izolowanych drugą część wycinka nerwu pobierano do płynu Ringera. Następnie na szklanej płytce, pod kontrolą lupy dwuokularowej pincetami usuwano *epineurium*. Każdy z pęczków czesano kilkakrotnie cienkimi igiełkami, a następnie wyczerniano 1% kwasem osmowym. Po wypłukaniu w wodzie bieżącej umieszczano preparat w wodzie bidestylowanej i na 24 godz. wstawiano do lodówki. Po przeprowadzeniu nerwu przez wzrastające od 5—40% stężenie gliceryny, izolowano włókna na szkiełku podstawowym pod lupą dwuokularową za pomocą cienkich igiełek. W trakcie opracowywania materiału metoda izolowania włókien uległa pewnym modyfikacjom i nerwy z przypadków kontrolnych były utrwalane w 3% roztworze aldehydu glutarowego.

W przypadku SLA z każdego nerwu izolowano po 250 włókien, do oceny wybierano włókna składające się co najmniej z czterech międzywęźli. W czterech przypadkach SLA wykresłono zależność długości międzywęźli od średnicy włókna, wg sposobu podanego przez Fullerton i wsp. (1965). W tym celu średnicę włókien mierzono pod powiększeniem 600 x, długość międzywęźli pod powiększeniem 150 x. Szczegóły metodyczne zawarte są w pracy Jędrzejowskiej i wsp. (1972).

Uwagi metodyczne oraz kryteria oceny zmian: W zasadzie skrawki eponowe nie mogą stanowić podstawy do oceny rodzaju zmian histologicznych we włóknach nerwowych. Niekiedy jednak udaje się wykryć włókna zdemielinizowane (brak widocznej osłonki mielinowej) oraz remielinizujące (cienka w stosunku do średnicy włókna osłonka mielinowa). Zgrupowania cienkich włókien mielinowych sugerują proces regeneracji. Rozpiętość średnic włókien cienkich i grubych ustalono w oparciu o zbiorczy histogram przypadków kontrolnych. Średnice włókien cienkich wypadły w granicach 1—6  $\mu$ , średnice włókien grubych powyżej 6  $\mu$ .

W preparatach czesanych włókna rozpadły na owoidy oraz tuby neuralne wypełnione osmofilnymi kulkami uważano za wyraz ich zwyrodnienia aksonalnego. Włókna, które posiadały międzywęźla krótsze od pozostałych, z cienką w stosunku do średnicy włókna osłonką mielinową odpowiadały segmentom wtrąconym, powstającym w następstwie re-

mielinizacji po odcinkowej demielinizacji (Lubińska 1958). Włókna, w których wszystkie międzywęzła były nieproporcjonalnie krótkie w stosunku do ich średnicy, traktowano jako włókna regenerujące po zwyrodnieniu aksonalnym. Na przekrojach poprzecznych włóknom regenerującym odpowiadały zgrupowania cienkich włókien mielinowych.

## WYNIKI

*Nerw łokciowy*

Gęstość włókien mielinowych na 0,1 mm<sup>2</sup> powierzchni pęczkowej w SLA wynosiła średnio 777 (rozpiętość 591—1090), w przypadkach kontrolnych średnio 867 (rozpiętość 752—984). Widoczne były różnice gę-

*Tabela 1.* Zmiany histologiczne na przekrojach poprzecznych włókien nerwu łokciowego i nerwu łydkowego w SLA i w przypadkach kontrolnych

*Table 1.* Histological changes on the cross section of the ulnar and sural nerve fibres in SLA and control cases

Typ zmian Type of changes	Nerw łokciowy — nasilenie zmian Ulnar nerve — intensity of changes		Nerw łydkowy — nasilenie zmian Sural nerve — intensity of changes	
	SLA	Kontrola Control	SLA	Kontrola Control
	Włókna ze zmienioną strukturą aksonu i mieliny Fibres with axonal and myelin abnormalities	+++	±	++
Włókna zdemielinizowane Demyelinated fibres	++	±	+	±
Włókna regenerujące Regenerating fibres	+	++	±	+
Włókna remielinizujące Remyelinating fibres	++	+	++	+
± proces b. nikły slight changes				
+ proces miernego stopnia mild changes				
++ proces wyraźny much pronounced changes				
+++ proces nasilony advanced changes				

Tabela 2. Nerw łokciowy. Gęstość włókien mielinowych i zawartość włókien cienkich i grubych w SLA i przypadkach kontrolnych

Table 2. Ulnar nerve. Density of myelinated fibres and percentage of thin and thick fibres in SLA and control cases

Nr przypadku No of case	Płeć Sex	Wiek (lata) Age (years)	Gęstość włókien mielin. na 0,1 mm <sup>2</sup> pow. pęczk. Density of myelin fibres (0,1 mm <sup>2</sup> f.a.)	Włókna cienkie do 6 μ	Włókna grube powyżej 6 μ
				średnicy %	średnicy %
				Per cent of thin fibres (d < 6 μ)	Per cent of thick fibres (d > 6 μ)
1	m	25	1090	60.2	39.8
2	k	39	591	53.2	46.8
3	m	44	800	49.8	50.2
4	m	44	643	48.3	51.7
5	m	45	897	52.3	47.7
6	m	53	763	48.9	51.1
7	k	55	721	53.3	46.7
9	k	67	822	46.6	53.4
10	m	70	671	45.7	54.3
Średnio Mean value			777	50.9	49.1
K—1	k	24	984	51.9	48.1
K—2	m	29	752	47.6	52.4
K—3	m	60	866	35.3	64.7
Średnio Mean value			867	44.9	55.1

Tabela 3. Zestawienie zmian we włóknach nerwu łokciowego w SLA i w przypadkach kontrolnych

Table 3. List of changes in the fibres of ulnar nerve in SLA and control cases

Nr przypad- ku No of case	Płeć Sex	Wiek (lata) Age (years)	Liczba izolowanych włókien Number of teased fibres	Zwyrodnienie aksonalne		Odcinkowa demielinizacja i remieliniza- cja	
				Axonal degeneration		Segmental demyelination and remyelina- tion	
				Liczba włókien Fibres number	% włókien Fibres %	Liczba włókien Fibres number	% włókien Fibres %
1	m	25	250	25	10.0	9	3.6
2	k	39	250	27	10.8	12	4.8
3	m	44	250	12	5.8	2	0.8
4	m	44	250	47	18.8	10	5.2
5	m	45	250	41	16.4	16	6.4
6	m	53	250	41	16.4	19	7.6
8	m	55	250	24	9.6	37	14.4
9	k	67	250	51	20.2	3	1.2
10	m	70	250	57	22.8	6	2.4
Średnio Mean value				14.4		5.1	
K — 1	k	24	100	—	—	2	2.0
K — 2	m	29	200	4	2.0	5	2.5
K — 3	m	60	200	2	1.0	20	10.0
Średnio Mean value				1.0		4.8	

Tabela 4. Nerw lędźkowy. Gęstość włókien mielinowych i zawartość włókien cienkich i grubych w SLA i przypadkach kontrolnych

Table 4. Sural nerve. Density of myelinated fibres and percentage of thin and thick fibres in SLA and control cases

Nr przypadku No of case	Płeć Sex	Wiek (lata) Age (years)	Gęstość włókien mielin. na 0.1 mm <sup>2</sup> pow. pęczk. Density of myelin fibres (0.1 mm <sup>2</sup> f.a.)	Włókna cienkie do 6 μ średnicy % Per cent of thin fibres (d < 6 μ)	Włókna grube powyżej 6 μ średnicy % Per cent of thick fibres (d > 6 μ)
1	m	25	986	61.0	39.0
2	k	39	711	60.8	39.2
3	m	44	655	64.3	35.7
4	m	44	752	54.7	45.3
9	k	67	926	49.6	50.4
10	m	70	643	48.6	51.4
Średnio Mean value			779	56.5	43.5
K — 1	k	24	848	51.9	48.1
K — 2	m	29	686	47.6	62.5
K — 3	m	42	884	58.2	41.8
Średnio Mean value			806	52.9	47.1



Tabela 5. Zestawienie zmian we włóknach nerwu łydkowego w SLA i w przypadkach kontrolnych

Table 5. List of changes in the fibres of sural nerve in SLA and control cases

Nr przypadku No of case	Płeć Sex	Wiek (lata) Age (years)	Liczba izolowanych włókien Number of teased fibres	Zwyrodnienie aksonalne Axonal degeneration		Odcinkowa demielinizacja i remieliniza- cja Segmental demyelination and remyelina- tion	
				Liczba włókien Fibres number	% włókien Fibres %	Liczba włókien Fibres number	% włókien Fibres %
1	m	25	250	7	2.8	25	10.0
2	k	39	250	5	2.0	10	4.0
3	m	44	250	2	0.8	25	10.0
4	m	44	250	4	1.6	22	8.8
5	m	45	250	13	5.2	6	2.4
7	k	55	250	5	2.0	56	22.4
9	k	67	250	6	2.4	14	5.6
10	m	70	250	2	0.8	52	20.8
Średnio Mean value					2.2		10.5
K — 1	k	24	100	1	1.0	2	2.0
K — 2	m	29	150	1	0.7	7	5.0
K — 3	m	42	200	2	1.0	4	2.0
K — 4	m	60	200	5	2.5	14	7.0
Średnio Mean value					1.3		4.0

stości zarówno między poszczególnymi pęczkami jak i w obrębie tego samego pęczka tak w przypadkach SLA jak i w grupie kontrolnej.

Na przekrojach poprzecznych stwierdzono włókna ze zmienioną strukturą aksonu i mieliny (ryc. 1), włókna zdemielinizowane (ryc. 2), włókna remielinizujące (ryc. 3) oraz zgrupowania cienkich włókien odpowiadające włóknom regenerującym (ryc. 4). Ponadto w przypadku nr 2 obecne były zwyrodniałe włókna o średnicy 20—30  $\mu$  (ryc. 5). Podobne zmiany (z wyjątkiem opisanych w przypadku nr 2) obserwowane były również w materiale kontrolnym. Różnice w nasileniu zmian w SLA w porównaniu z grupą kontrolną przedstawia tabela 1. Histogram średnic włókien mielinowych w czterech przypadkach SLA wykazywał pewien ubytek włókien grubych.

We włóknach izolowanych stwierdzono różne etapy zwyrodnienia aksonalnego (ryc. 6). Nieliczne włókna wykazywały cechy odcinkowej demielinizacji (ryc. 7), znacznie liczniejsze włókna posiadały obszary remielinizowane, czasem dość rozległe (ryc. 8). W pojedynczych włóknach stwierdzało się nieregularność osłonki mielinowej. Nieliczne włókna odpowiadały kryteriom regeneracji po poprzedzającym rozpadzie aksonalnym. Włókna z cechami rozpadu aksonalnego oraz włókna remielinizujące spotykano w materiale kontrolnym, jednakże odsetek takich włókien był znacznie niższy niż w SLA. Dane liczbowe dotyczące powyższych zmian podane są w tabeli 2 i 3. Wykresy przedstawiające zależność długości międzywęzła od średnicy włókna wskazywały na obecność włókien z zaburzoną proporcją tych parametrów.

*Ryc. 1.* Przypadek nr 2. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Strzałki wskazują zmienione włókna. Gruby skrawek eponowy. Zmodyfik. met. Pala-Kulczyckiego. Pow. 440  $\times$ .

*Fig. 1.* Case No 2. Transverse section of ulnar nerve. Fibres with histological alterations (arrows). Thick epon section. Pal-Kulczycki modif. meth.  $\times$  440.

*Ryc. 2.* Przypadek nr 3. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Strzałki wskazują włókna zdemielinizowane. Skrawek eponowy. Zmodyfik. met. Pala-Kulczyckiego. Pow. 440  $\times$ .

*Fig. 2.* Case No 3. Transverse section of ulnar nerve. Demyelinated fibres (arrows). Epon section. Pal-Kulczycki modif. meth.  $\times$  440.

*Ryc. 3.* Przypadek nr 4. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Strzałki wskazują włókna remielinizujące. Skrawek eponowy. Zmodyfik. met. Pala-Kulczyckiego. Pow. 440  $\times$ .

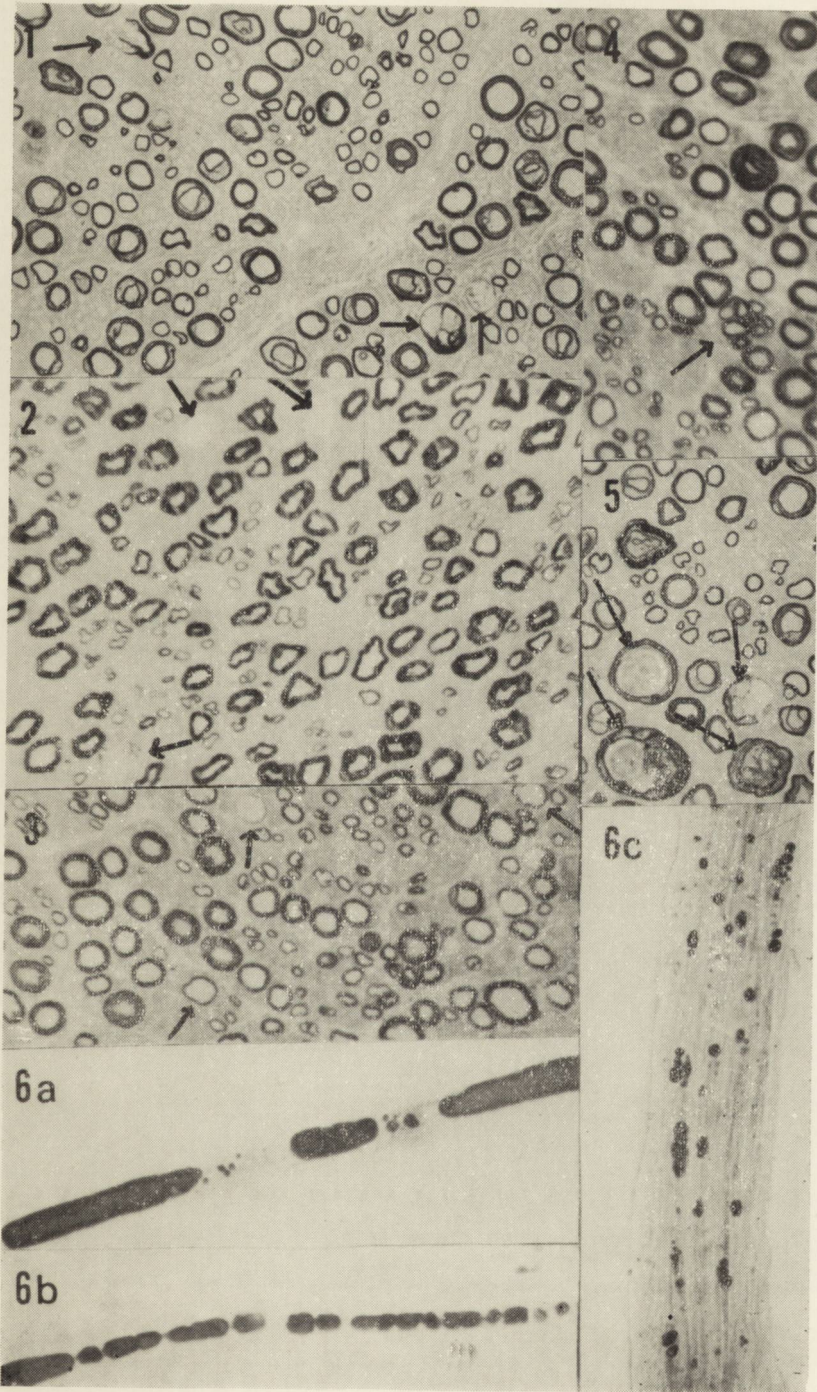
*Fig. 3.* Case No 4. Transverse section of ulnar nerve. Remyelinating fibres (arrows). Epon section. Pal-Kulczycki modif. meth.  $\times$  440.

*Ryc. 4.* Przypadek nr 4. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Grupa włókien regenerujących (strzałka). Skrawek eponowy. Zmodyfik. met. Pala-Kulczyckiego. Pow. 440  $\times$ .

*Fig. 4.* Case No 4. Transverse section of ulnar nerve. Group of regenerating fibres (arrow). Epon section. Pal-Kulczycki modif. meth.  $\times$  440.

*Ryc. 5.* Przypadek nr 2. Na przekroju poprzecznym nerwu łokciowego widoczne włókna, które uległy zwyrodnieniu (strzałki). Skrawek eponowy. Zmodyfik. met. Pala-Kulczyckiego. Pow. 440  $\times$ .

*Fig. 5.* Case No 2. Transverse section of ulnar nerve. Degenerated fibres (arrows). Epon section. Pal-Kulczycki modif. meth.  $\times$  440.



## OMÓWIENIE

W SLA dochodzi, jak wiadomo, do zmian zwyrodnieniowo-zanikowych perikarionu, a w ich następstwie do uszkodzenia aksonu, rozpadu i zaniku włókna. Przejawy zwyrodnienia aksonalnego (rozpad na owoidy, tuby wypełnione osmofilnymi kulkami) stwierdzono we wszystkich badanych nerwach w różnym odsetku włókien, a w niektórych przypadkach stwierdzano zmniejszenie gęstości włókien na jednostkę powierzchni pęczkowej. Różny w poszczególnych przypadkach odsetek włókien, wykazujących cechy zwyrodnienia aksonalnego mógłby odzwierciedlać różny stopień ostrości podstawowego procesu. Jednak należy wziąć pod uwagę, że liczba izolowanych włókien nie stanowi pełnej reprezentacji nerwu, a ponadto wśród włókien izolowanych z nerwu łokciowego może znajdować się różna liczba czuciowych włókien. Dwa ostatnie z wymienionych czynników mogą tłumaczyć brak równoległości między zmniejszeniem gęstości włókien na  $0,1 \text{ mm}^2$  powierzchni pęczkowej a odsetkiem włókien, wykazujących cechy zwyrodnienia aksonalnego (wg Sunderlanda i Bedbrooka, 1949, w nerwie łokciowym włókna ruchowe stanowią 46%). Zmiany stwierdzone w nerwie łokciowym dotyczą na ogół niezbyt dużej liczby włókien. Różnica gęstości oraz pewien odsetek zmienionych włókien, dopuszczalny w nerwie obwodowym zdrowego osobnika, wynosi wg różnych autorów od 1 do 12 (Sunderland i wsp. 1949; Buchthal, Rosenfalck 1966; Dyck i wsp. 1966; Swallow 1966; O'Sullivan, Swallow 1968; Ochoa, Mair 1969; Arnold, Harriman 1970).

W przypadkach opisanych w literaturze zwraca uwagę rozbieżność między dużym uszkodzeniem komórek rogu przedniego i korzeni przednich a względnie niewielkimi i niestałymi zmianami w nerwach obwodowych

Według niektórych autorów występowanie nieznacznych zmian w pniach nerwowych może być tłumaczone mieszanym składem nerwu obwodowego, wybiórczym zajęciem grubych włókien w SLA oraz zdolnością do regeneracji obocznej włókien (Wohlfart 1957; Arnold 1963; Malamud 1968).

Ubytek włókien grubych w naszym materiale dotyczył jedynie pojedynczych przypadków, a przejawy regeneracji były nikłe. Możliwość występowania regeneracji wiązała się prawdopodobnie z niejednoczasowym obejmowaniem przez proces chorobowy komórek ruchowych w danym odcinku rdzenia. Nikły stopień regeneracji włókien w pniu nerwu na poziomie łokcia nie przeczy stwierdzonej przez Cöersa i Woolfa (1959) nasilonej reinerwacji odnerwionych włókien mięśniowych. Według tych autorów reinerwacja odnerwionych włókien jest wynikiem powstawania końcowych odgałęzień obocznych z przeżywających włókien (Wohlfart 1957; Cöers, Woolf 1959).

We wszystkich przypadkach SLA w nerwie łokciowym znaleziono obok zmian aksonalnych zmiany typu odcinkowej demielinizacji. Zmiany dotyczące osłonki mielinowej we włóknach ruchowych nerwów obwodowych w SLA opisali m. in. Bertrand i van Bogaert (1925), Friedman i Freedman (1950). W naszych przypadkach SLA odsetek włókien wykazujących zmiany demielinizacyjne niekiedy przewyższał nieco odsetek zmian występujących w przypadkach kontrolnych. Nie stwierdzono równoległości między stopniem nasilenia zwyrodnienia aksonalnego i odcinkowej demielinizacji. Z uwagi na opisaną w ostatnich latach wtórną odcinkową demielinizację (Dyck i wsp. 1971; Thomas i wsp. 1971) wydaje się interesujący związek obu procesów, tj. czy demielinizacja w nerwie łokciowym w SLA jest pierwotna czy wtórna. Zgodnie z kryterium wtórnej demielinizacji, nieregularność osłonki mielinowej, demielinizacja okołoprzewężeniowa oraz demielinizacja typu „zgrupowania” sugeruje, że proces ten jest wtórny do zmian w aksonie. Zmiany takie obserwowano w badanych przypadkach, co może nasuwać podejrzenie, że demielinizacja w SLA jest wtórna, tj. pojawia się we włóknach wykazujących cechy zwyrodnienia aksonalnego. Dowody na poparcie tej hipotezy nie są pewne. Nie przeprowadzono badań mikroskopowo-elektronowych zdemielinizowanych włókien, jak również nie można się wypowiedzieć co do nasilenia zmian demielinizacyjnych w dalszym i bliższym odcinku nerwu łokciowego, które stanowi ważne kryterium wtórnej odcinkowej demielinizacji.

W schorzeniu uważanym za chorobę neuronu ruchowego na szczególną uwagę zasługuje stwierdzenie zmian morfologicznych w pierwszym neuronie czuciowym. O możliwości zmian demielinizacyjnych w korzeniach tylnych i nerwach czuciowych w SLA pisali Bertrand i van Bogaert (1925), Friedman i Freedman (1950), Bunina (1963), Dayan i wsp. (1969). W badanym przez nas materiale zmiany w nerwie łydkowym wyrażały się współistnieniem zwyrodnienia aksonalnego z odcinkową demielinizacją. Odsetek włókien wykazujących zwyrodnienie aksonalne nie przekraczał wartości znalezionych w materiale kontrolnym, natomiast w większości przypadków zwracał uwagę wyższy niż w przypadkach kontrolnych odsetek zmian demielinizacyjnych. Interpretacja tego zjawiska jest trudna i nasuwa się pytanie jaki jest związek demielinizacji występującej w nerwie czuciowym z podstawowym procesem chorobowym oraz jaki jest jej charakter. Obserwowana demielinizacja rzadko miała charakter paranodalny, nieliczne włókna przedstawiały typ demielinizacji zgrupowanej. Kryteria wtórnej odcinkowej demielinizacji były więc spełnione w niewielkim stopniu. Gdyby ten rodzaj demielinizacji był wtórny do uszkodzenia aksonu, po dłuższym okresie czasu należałoby się spodziewać całkowitego zwyrodnienia włókna. Odsetek włókien, które uległy

zwyrodnieniu aksonalnemu oraz gęstość włókien w nerwie łydkowym w SLA nie różniły się istotnie od wartości stwierdzanych w materiale kontrolnym. Powyższe obserwacje wydają się przeczyć możliwości wtórnej demielinizacji w nerwie czuciowym w SLA.

Oceniając odcinkową demielinizację w nerwie łydkowym chorych na SLA Dayan i wsp. (1969) sugerują, że powstaje ona w wyniku działania na komórkę Schwanna czynników uwalnianych podczas rozpadu włókien nerwowych. W badanym materiale nie było równoległości zarówno pomiędzy stopniem nasilenia zmian aksonalnych w nerwie łokciowym i zmian demielinizacyjnych w nerwie łydkowym jak też równoległości między stopniem zmian aksonalnych w nerwie łokciowym oraz takich samych zmian w nerwie łydkowym. Ze względu na to, że duży odsetek zmian typu odcinkowej demielinizacji występował częściej u chorych z polineuropatyczną formą SLA, nasuwała się możliwość związku nasilonej demielinizacji z dużą urażliwością nerwu łydkowego u osobników z odsiebnym niedowładem.

#### WNIOSKI

1. W niektórych przypadkach SLA stwierdzono w nerwie łokciowym zmniejszenie gęstości włókien mielinowych na jednostkę powierzchni. Ubytek włókien był wynikiem ich zwyrodnienia aksonalnego i wykazywał pewną tendencję do włókien grubych.

2. Obok zwyrodnienia aksonalnego stwierdzono we włóknach nerwu łokciowego zmiany typu odcinkowej demielinizacji, prawdopodobnie wtórnej w stosunku do zmian w aksonie.

3. We włóknach nerwu łokciowego stwierdzono niewielkiego stopnia objawy regeneracji włókien po poprzedzającym zwyrodnieniu aksonalnym oraz silniej wyrażoną remielinizację włókien po uprzedniej odcinkowej demielinizacji.

4. W nerwie łydkowym stwierdzono przede wszystkim proces odcinkowej demielinizacji i remielinizacji. Odsetek włókien ze zmianami tego typu był wyższy niż w materiale kontrolnym, natomiast odsetek włókien ze zmianami aksonalnymi nie przekraczał wartości stwierdzonych w materiale kontrolnym.

5. Wydaje się, że odcinkowa demielinizacja w nerwie łydkowym ma charakter pierwotny i należy ją traktować jako zjawisko niezależne od podstawowego procesu chorobowego.

X. Драц

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКТЕВОГО И ИКРОНОЖНОГО НЕРВОВ  
ПРИ АМИОТРОФИЧЕСКОМ БОКОВОМ СКЛЕРОЗЕ

## Резюме

Целью работы была оценка гистологических изменений, наблюдаемых при боковом амиотрофическом склерозе в смешанном и афферентном нервах. Для исследований использовали локтевой нерв, взятый из 10 случаев и икроножный нерв, взятый из 8 случаев.

В ряде случаев было обнаружено уменьшение плотности миелиновых волокон на 0,1 мм<sup>2</sup> локтевого нерва. Убыль волокон была результатом аксональной дегенерации. Кроме того, в локтевом нерве были обнаружены изменения типа фрагментарной демиелинизации и ремиелинизации. По-видимому, демиелинизация в икроножном нерве носит первичный характер и не зависит от основного болезненного процесса.

H. Drac

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE ULNAR AND SURAL NERVE  
IN SCLEROSIS LATERALIS AMYOTROPHICA

## Summary

The aim of the work was to estimate the histological changes occurring in SLA in the mixed and sensory nerve. The ulnar nerve was collected in 10 cases and the sural nerve in 8 cases. Several cases revealed a decrease of density of myelin fibers on 1 sq. mm of the ulnar nerve. The loss of fibers resulted from their axonal degeneration.

Moreover, the ulnar nerve showed changes of segmental demyelination and remyelination type, presumably secondary to the axonal changes. Signs of fiber regeneration were hardly perceptible. In the sural nerve appeared both types of changes with a distinct predomination of segmental demyelination and remyelination. It seems that demyelination in the sural nerve is of a primary character, being independent from the basic pathological process.

## PISMIENNICTWO

1. Arnold N., Harriman D.: The incidence of abnormality in control human peripheral nerves studied by single axon dissection. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1970, 33, 55—61.
2. Bertrand J., Van Bogaert L.: Rapport sur la sclérose latérale amyotrophique. *Rev. Neurol.*, 1925, 1, 6, 779—806.
3. Buchthal F., Rosenfalck A.: Number and diameter of myelinated fibres in the median nerve. *Brain Res.*, 1966, 3, 85—94.
4. Bunina T. L.: Bokowej amiotroficzeskij skleroz.: Dissertacja, Moskwa, 1963.
5. Catola M. C.: Quelques remarques anatomo-pathologiques sur la moelle épinière d'un cas de sclérose latérale amyotrophique. *Rev. Neurol.*, 1925, 1, 6, 818—822.

6. Coërs C., Woolf A. L.: The innervation of muscle. Blackwell Scientific Publication, Oxford 1959.
7. Dayan A. D., Graveson G. S., Illis L. S., Robinson P. L.: Schwann cell damage in motoneuron disease. *Neurology (Minneapolis)*, 1969, 19, 242—246.
8. Dyck P. J., Lambert E. H.: Numbers and diameters of nerve fibres and compound action potential of sural nerve: controls and hereditary neuromuscular disorders. *Trans. Amer. Neurol. Ass.*, 1966, 91, 214—217.
9. Dyck P. J., Johnson W. J., Lambert E. H., O'Brien P. C.: Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. *Mayo Clin. Proc.*, 1971, 46, 6, 400—431.
10. Friedman A. P., Freedman D.: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 1950, III, 1—18.
11. Fullerton P. M., Gillait R. W., Lascelles R. G., Morgan-Hughes J. A.: The relation between fibre diameter and internodal length in chronic peripheral neuropathy. *J. Physiol. (Lond.)*, 1965, 178, 280—289.
12. Greenfield S.: *Neuropathology*, E. Arnold Ltd. London, 1963.
13. Jędrzejowska H., Sawicka E., Drac H., Glinka Z.: Metody badania histopatologicznego nerwów obwodowych. *Neuropat. Pol.*, 1972, 1, 87—98.
14. Konowałow N. W.: K etiologii bokowego amiotroficzskiego skleroza. *Zurn. Newropat. Psych.*, 1953, 53, 2, 83—91.
15. Lubińska L.: „Intercalated” internodes in nerve fibres. *Nature (Lond.)*, 1958, 181, 957—958.
16. Maalmud N.: *Neuromuscular system disease. W: Pathology of the nervous system* ed. J. Minckler. Mc Grow-Hill Book Company 712—719, 1968.
17. Ochoa J., Mair W. G. P.: The normal sural nerve in man. *Ultrastructure and number of fibres and cells. Acta neuropath. (Berl.)*, 1969, 13, 197—216.
18. O'Sullivan D. J., Swallow M.: The fibre size and content of the radial and sural nerves. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1968, 31, 464—470.
19. Poussep P., Rives A.: Contribution à la pathologie et à la pathogenie de la sclerose laterale amyotrophique. *Rev. Neurol.*, 1926, 1, 6, 834—840.
20. Sunderland S., Bedbrook A. M.: The case sectional area of peripheral nerve trunks occupied by the fibres representing individual muscular cutaneous branches. *Brain*, 1949, 72, 4, 613—624.
21. Sunderland S., Lavarack J. O., Ray L. J.: The caliber of nerve fibres in human cutaneous nerve. *J. Comp. Neurol.*, 1949, 91, 87—101.
22. Swallow M.: Fibre size and content of the anterior tibial nerve of the foot. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1966, 29, 205—213.
23. Swank R. L., Putman T. J.: Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Conditions. *Arch. Neurol. Psych. (Chic.)*, 1943, 49, 2, 151—177.
24. Thomas P. K., Hollinrake K., Lascelles P. G., Coërs L.: The polyneuropathy of chronic renal failure. *Brain*, 1971, 94, 4, 761—781.
25. Wohlfart G.: Collateral regeneration from residual motor nerve fibres in ALS. *Neurology (Minneapolis)*, 1957, 7, 124—134.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna AM, ul. Lindleya 4, 02-005 Warszawa.



ANNA KAMIŃSKA

WPŁYW ODNERWIENIA NA MIĘSIEŃ SZKIELETOWY SZCZURA  
W PROCESIE ONTOGENEZY \*

(DONIESIENIE WSTĘPNE)

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr I. Hausmanowa-Petrusewicz

W rozważaniu etiologii niektórych wczesno-dziecięcych chorób nerwo-mięśniowych, uważanych dotychczas za wyłącznie neurogenne coraz częściej brane są pod uwagę zaburzenia procesu miogenezy i w rezultacie przetrwanie obrazu mięśnia płodowego (Hausmanowa-Petrusewicz i wsp. 1975).

Mięśnie szkieletowe różnych gatunków ssaków w chwili urodzenia znajdują się w niejednakowym okresie dojrzałości morfologicznej i histochemicznej. Mięśnie szczura po urodzeniu są na dość wczesnym etapie miogenezy (Engel, Karpati 1968; Hausmanowa-Petrusewicz i wsp. 1975; Zelena 1962) i dlatego w wielu pracach doświadczalnych służą jako model mięśnia płodowego. Z poprzednich prac wynika, że przecięcie nerwu obwodowego u nowonarodzonych zwierząt opóźnia dojrzewanie mięśnia szkieletowego (Boëthius 1971; Brooke i wsp. 1971; Engel, Karpati 1968; Karpati, Engel 1967; 1968; Shafiq i wsp. 1972; Zelena, Hnik 1957; Zelena 1962). Poszczególni autorzy nie są jednak zgodni ani co do czasu, w którym zdrowy mięsień szkieletowy szczura osiąga pełną dojrzałość, ani co do możliwości różnicowania się włókien na typy po odnerwieniu. Rozbieżności te stanowiły bodziec do podjęcia naszej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto nowonarodzone szczury rasy Wistar. W 12—18 godzin po urodzeniu, w hibernacji (6 minut w temp. 4°C) dokonywano przecięcia i usunięcia 2—3 mm odcinka prawego nerwu kulszowego, bocznie od kręgosłupa na wysokości krętarza większego kości udowej. Lewa,

\* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.4.1.

nieoperowana noga służyła jako kontrola. Biorąc pod uwagę ewentualne zmiany obrazu morfologicznego mięśni zdrowej nogi na skutek jej nadmiernego obciążenia pobrano także mięśnie zdrowych szczurów, pochodzących z tego samego miotu co operowane. Mięśnie od zdrowych zwierząt pobierano w 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 i 28 dniu po urodzeniu, natomiast od zwierząt operowanych w 7, 10, 14, 21 i 28 dniu po odnerwieniu. Każdą grupę stanowiły 3 szczury. Grupa kontrolna i operowana liczyły po 19 zwierząt.

Mięśnie do badania pobierano w całości, przyżyciowo w znieczuleniu thiopentalem, zamrażano w izopentanie, umieszczano na korkach i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 10  $\mu$ . Skrawki barwiono hematoxyliną-eozyną, metodą trichromu (TRI) wg Gomoriego w modyfikacji Engla (Engel, Cunningham 1963) oraz wykonywano reakcję na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (DHB) (Pearse 1972), zredukowanego nukleotydu dwufosfopirydyny (DPNH) (Pearse 1972), adenzynotrójfosfatazy miofibrylarnej o pH 9,4 (ATPaza) (Padykula, Herman 1955) oraz adenzynotrójfosfatazy z preinkubacją kwaśną, o pH 4,35 (K-ATPaza) (Brooke, Kaiser 1969).

Za włókna w stadium miotuby uważano: 1) w barwieniu H-E włókna z centralnie położonym jądrem, 2) w barwieniu trichromem Gomoriego i ATPazach włókno ze szczeliną w środku, 3) w odczynach na enzymy

*Ryc. 1.* Liczne włókna z centralnie położonym jądrem. Luźny układ włókien. 1 dzień życia. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 1.* Numerous fibres with central nucleus. Loose arrangement of fibres. 1st day of life. HE.  $\times$  400.

*Ryc. 2.* Znacznie mniejsza ilość włókien posiada centralnie położone jądro. Układ włókien bardziej zwarty. 5 dzień życia. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 2.* Lesser number of fibres with central nucleus. More compact arrangement of fibres. HE.  $\times$  400.

*Ryc. 3.* Brak różnicowania aktywności. Liczne włókna z podwyższoną aktywnością enzymatyczną w części środkowej. 1 dzień życia. DHB. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 3.* Lack of differentiated enzymatic activity. Numerous fibres exhibit enhanced activity in central parts. 1st day of life. SDH.  $\times$  400.

*Ryc. 4.* Wiele włókien ze szczeliną w części centralnej. Niewielkie różnice w aktywności enzymatycznej włókien. 1 dzień życia. K-ATPaza. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 4.* Many fibres with central fissure. Some differences in enzymatic activity of fibres. 1st day of life AC-ATPase.  $\times$  400.

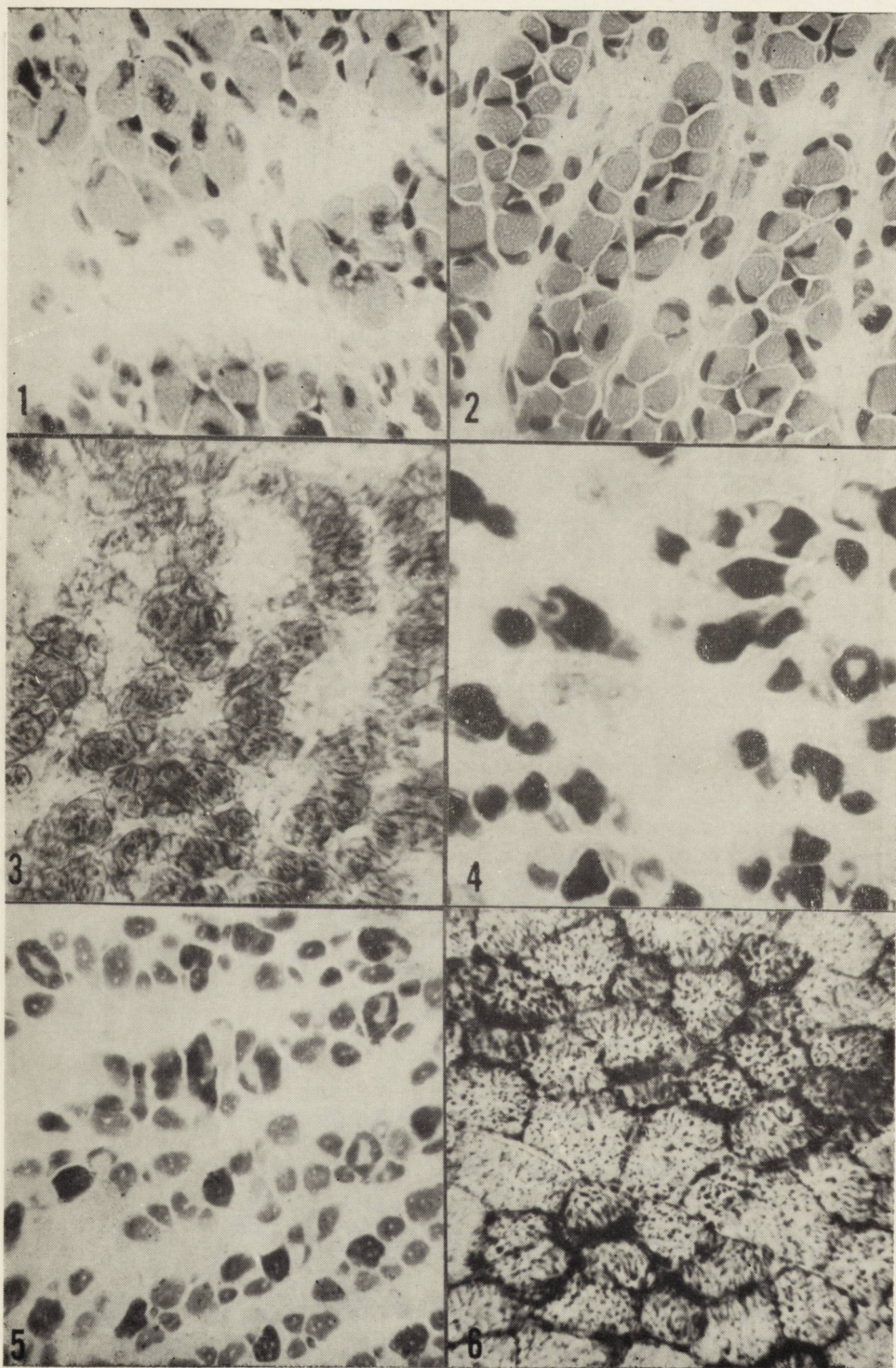
*Ryc. 5.* Liczne włókna ze szczeliną w części centralnej. Różnicowanie na dwa typy aktywności. 5 dzień życia. ATPaza. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 5.* Numerous fibres with central fissure. Differentiation into two types of enzymatic activity. 5th day of life ATPase.  $\times$  400.

*Ryc. 6.* Wyraźne różnicowanie włókien na typy. 10 dzień życia. DPNH. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 6.* Distinct differentiation of fibres into types. 10th day of life. DPNH.  $\times$  400.

*Ryc. 7.* Liczne włókna z centralnie położonym jądrem. 7 dni po odnerwieniu. HE. Pow. 400  $\times$ .





utleniające — zależnie od wysokości przekroju — włókna z brakiem aktywności lub z podwyższoną aktywnością w części centralnej.

Do badań wybrano głowę przysrodkową mięśnia brzuchatego łydki ponieważ u dorosłego szczura mięsień ten jest złożony z trzech typów włókien bez wyraźnej przewagi któregoś z nich i w związku z tym metabolicznie jest on najbardziej zbliżony do mięśni ludzkich. W każdym preparacie oceniano 200 włókien.

#### WYNIKI

W obrazie morfologicznym i histochemicznym mięśni zwierząt grupy kontrolnej oraz lewej nogi zwierząt operowanych nie stwierdzono różnic, oceniano je więc łącznie. Ocenę mięśnia odnerwionego rozpoczęto od 7 dnia po operacji, ponieważ mięsień w tym okresie osiąga dojrzałość morfologiczną.

Grupa kontrolna. Bezpośrednio po urodzeniu w głowie przysrodkowej mięśnia brzuchatego łydki u szczura około 35% włókien znajduje się w stadium miotuby (ryc. 1). Ilość tych włókien stopniowo się zmniejsza (ryc. 2), tak że około 6—7 dnia życia obserwuje się jedynie pojedyncze miotuby, najczęściej na obwodzie pęczków lub w pobliżu przegród łącznotkankowych. Układ mięśnia, początkowo luźny, w 7 dniu staje się bardziej zwarty; zmniejsza się znacznie przestrzeń między włóknami. Do

*Fig. 7.* Numerous fibres with centrally located nucleus. 7 days after neurectomy. HE.  $\times 400$ .

*Ryc. 8.* Włókna o różnej średnicy, nieregularnym kształcie, z których część posiada jądro w części środkowej. 10 dni po odnerwieniu. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 8.* Fibres of varying diameters and of irregular shape; some of them show central nucleus. 10 days after neurectomy. HE.  $\times 400$ .

*Ryc. 9.* Włókna o nieregularnym kształcie i różnej średnicy. Wiele włókien ma centralnie położone jądro. 14 dni po odnerwieniu. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 9.* Fibres of irregular shape and varying diameters. Many fibres with centrally located nucleus. 14 days after neurectomy. HE.  $\times 400$ .

*Ryc. 10.* Włókna przerosłe i zanikłe, nieregularnie przemieszane. Zarówno włókna zanikłe jak i przerosłe mają centralnie ułożone jądro. 21 dni po odnerwieniu. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 10.* Intermingled hypertrophied and atrophied fibres. Both kinds of fibres show central nucleus. 21 days after neurectomy. HE.  $\times 400$ .

*Ryc. 11.* Włókna przerosłe i zanikłe, nieregularnie przemieszane. Zarówno włókna zanikłe jak i przerosłe mają centralnie ułożone jądro. 28 dni po odnerwieniu. HE. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 11.* Intermingled hypertrophied and atrophied fibres. Both kinds of fibres show central nucleus. 28 days after neurectomy. HE.  $\times 400$ .

*Ryc. 12.* Włókna zanikłe i przerosłe, nie ma różnicowania aktywności enzymatycznej. 28 dni po odnerwieniu. ATPaza. Pow. 400  $\times$ .

*Fig. 12.* Atrophied and hypertrophied fibres, no differentiation of the enzymatic activity. 28 days after neurectomy. ATPase.  $\times 400$ .

3 dnia życia nie obserwuje się różnic aktywności włókien mięśniowych w odczynach na enzymy utleniające (ryc. 3), niewielkie zróżnicowanie wykazuje jedynie odczyn na ATPazę kwaśną (ryc. 4). Około 5 dnia pojawia się nieznaczne zróżnicowanie aktywności enzymów utleniających i ATPazy zasadowej (ryc. 5). W siódmym dniu mięsień brzuchaty łydki u szczura jest zróżnicowany na typy metaboliczne chociaż zupełnie zwarty, dojrzały układ włókien pojawia się około 10 dnia (ryc. 6). Pojawienie się zróżnicowania metabolicznego odpowiada w czasie przekształceniu włókien ze stadium miotuby w dojrzałe włókna mięśniowe.

Grupa doświadczalna. W 7 dniu życia w mięśniu odnerwionym 28% włókien znajduje się w stadium miotuby (ryc. 7). Ilość ta stopniowo zmniejsza się (ryc. 8 i 9) do 12% w 28 dniu życia (ryc. 11). W okresach późniejszych (21 i 28 dni po odnerwieniu) obok włókien zanikłych pojawiają się włókna przerosłe (ryc. 10, 11 i 12); występują zmiany strukturalne włókien oraz przerost tkanki łącznej około- i śródściskowej. Do 4 tygodnia nie obserwuje się różnicowania włókien mięśniowych na typy.

W tabeli 1 przedstawiono odsetek włókien przyśrodkowej głowy mięśnia brzuchatego łydki u szczura w stadium miotuby w grupie kontrolnej i po odnerwieniu w kolejnych okresach rozwoju.

Tabela 1. Odsetek włókien przyśrodkowej głowy m. brzuchatego łydki u szczura w stadium miotuby w grupie kontrolnej i operowanej

Table 1. Percentage of fibres in the medial head of *m. gastrocnemius* at the stage of myotube in control and operated groups of rats

Wiek w dniach Age in days	Grupa kontrolna Control group	Grupa operowana Experimental group
1	35%	
2	24%	
3	26%	
4	17%	
5	5%	
6	pojedyncze miotuby single myotubes	
7	pojedyncze miotuby single myotubes	28
10	0	29
14	0	27
21	0	10
28	0	12

#### OMOWIENIE

Nie ma jednolitego poglądu odnośnie okresu, w którym mięsień szkieletowy szczura zyskuje pełną dojrzałość morfologiczną, histochemiczną

i elektrofizjologiczną. Wg Boëthiusa (1971) w mięśniu brzuchatym łydki potencjał spoczynkowy błony osiąga wartości prawidłowe (50—90 mV) około 5 dnia życia i równocześnie następuje transformacja miotuby w dojrzałe włókno mięśniowe. Dubowitz (1963) na podstawie wyników badań histochemicznych ocenia, że mięsień szkieletowy szczura osiąga dojrzałość między 7—10 dniem życia. Zelena i wsp. (1968) uważają, że proces ten jest zakończony w 14 dniu życia, a Engel i wsp. (1963), że w 21 dniu życia. Wyniki naszej pracy są najbliższe spostrzeżeniom Boëthiusa. Wydaje się, że do 7 dnia życia odbywa się stopniowe dojrzewanie włókna — przejście ze stadium miotuby do dojrzałego włókna mięśniowego i różnicowanie się włókien mięśniowych na typy.

Wpływ odnerwienia na mięsień szkieletowy jest dobrze znany, częściej jednak przedmiotem badań były mięśnie dojrzałe, rzadziej mięśnie w okresie rozwoju, w którym równocześnie występuje zanik i wzrost tkanki mięśniowej. Wiadomo, że odnerwienie hamuje ale nie powstrzymuje dojrzewania włókien mięśniowych. Czynniki, które powodują wzrost mięśnia (przyrost wagi i powiększanie się wymiaru podłużnego) nie są jednak w stanie bez udziału unerwienia powstrzymać zaniku włókien (Zelena 1962). Engel i wsp. (1963) uważają, że odnerwienie dokonane bezpośrednio po urodzeniu powoduje opóźnienie dojrzewania i przetrwanie wielu włókien w stadium miotuby. Włókna te wg wspomnianych autorów należą do typu II, podczas gdy włókna typu I rozwijają się prawidłowo i są stosunkowo mniej zależne od unerwienia. Wg Shafiq'a i wsp. (1972) natomiast, odnerwienie powoduje opóźnienie dojrzewania i hamuje zupełnie różnicowanie na typy (5 tygodni po odnerwieniu).

Wyniki naszej pracy wskazują, że odnerwienie bezpośrednio po urodzeniu powoduje zahamowanie transformacji miotuby w dojrzałe włókno mięśniowe oraz brak różnicowania włókien na typy (do 4 tygodnia obserwacji).

A. Каминьска

ВЛИЯНИЕ ДЕНЕРВАЦИИ НА СКЕЛЕТНУЮ МЫШЦУ КРЫСЫ  
В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ

Резюме

Разработана морфологическая и гистохимическая картина икроножной мышцы после денервации путем перерезки седалищного нерва через 12—18 часов после рождения. Обнаружено, что нормальная мышца достигает полной морфологической и гистохимической зрелости на 7—10 день жизни, а денервация задерживает как переход волокон от стадии мьютубы до зрелого волокна, так и дифференцировку энзиматической активности. Работа является вступлением к дальнейшим исследованиям спинномозговой денервации.

A. Kamińska

EFFECT OF DENERVATION ON THE SKELETAL RAT MUSCLE  
IN THE PROCESS OF ONTOGENESIS. PRELIMINARY COMMUNICATION

The studies concerned the morphological and histochemical picture of rat gastrocnemius muscle, normal and after neurectomy through the section of sciatic nerve on 12—18 hours after birth. It was demonstrated that the normal muscle reaches complete morphological and histochemical maturity between 7th and 10th day of life, while neurectomy retards both the transformation of the fibre from the myotube stage to adult fibre and the differentiation of enzyme activity. The presented work is an introduction to further studies on spinal neurectomy.

## PISMIENNICTWO

1. Boëthius, J.: Electrophysiological and morphological development of leg and neck muscles in the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 1971, 81, 492—507.
2. Brooke, M. H., Kaiser, K. K.: Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, 17, 431.
3. Brooke, M. H., Williamson, E., Kaiser, K. K.: The behaviour of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1971, 25, 360—366.
4. Dubowitz, V.: Enzymatic maturation of skeletal muscle. *Nature (Lond.)*, 1963, 197, 1215.
5. Engel, W. K., Cunningham, G. G.: Rapid examination of muscle tissue. An improved trichome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology*. 1963, 13, 919—924.
6. Engel, W. K., Karpati, G.: Impaired muscle maturation following neonatal neurectomy. *Develop. Biol.*, 1968, 17, 713—723.
7. Hausmanowa-Petrusewicz, I., Fidziańska, A., Dobosz, I., Drac, H., Ryniewicz, B.: The foetal character of the lesions in the acute form of Werdnig-Hoffmann disease. Proceeding of IIIth International Congress on Muscle Disease, Newcastle upon Tyne. *Excerpta Medica*. 1975, Int. Series, Elsevier, Amsterdam, w druku.
8. Karpati, G., Engel, W. K.: Neuronal trophic function. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1967, 17, 542—545.
9. Karpati, G., Engel, W. K.: Correlative histochemical study of skeletal muscle after suprasegmental denervation, peripheral nerve section, and skeletal fixation. *Neurology*, 1968, 18, 681—692.
10. Padykula, H. A., Herman, E.: The specificity of the histochemical method for adenosinetriphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 1955, 3, 170—195.
11. Pearse, A. G. E.: *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Vol. 2. 3rd Ed. London. Churchill. 1972.
12. Shafiq, S. A., Asiedu, S. A., Milhorat, A. T.: Effect of neonatal neurectomy on differentiation of fiber types in rat skeletal muscle. *Exp. Neurol.*, 1972, 35, 529—540.
13. Zelena, I., Hnik, P.: Muscle atrophy in young rats. *Physiol. Behemoslov.*, 1957, 6, 2, 193—199.
14. Zelena, I.: The effect of denervation on muscle development. In: „The Dener-vated Muscle”. E. Gutman (ed.). *Czech. Acad. Sci.*, Prague. 1962, pp 103—126.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna AM, ul. Lindleya 4, 02-005 Warszawa.



MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, BARBARA GAJKOWSKA

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY  
USZKODZEŃ GLEJU WYWOŁANYCH CYJANKIEM SODU  
W HODOWLI POZAUSTROJOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Kierownik Pracowni: doc. dr J. Borowicz

Rola gleju w kształtowaniu obrazu patomorfologicznego doświadczalnej encefalopatii cyjankowej nie jest jednoznacznie określona. Hirano i wsp. (1967) zwracają uwagę, że we wczesnej demielinizacji spoidła wielkiego, wywołanej przez cyjanki proces patologiczny dotyczy pierwotnie włókien osiowych, a zmiany glejowe, występujące w późniejszych fazach ewolucji ogniska patologicznego, mają charakter wtórny. Analogiczny typ zmian i sekwencje czasowe ewolucji procesu chorobowego opisują Lessel i Kawabara (1974) w demielinizacji pozagałkowej nerwu wzrokowego, wywołanej u szczurów przez cyjanki. Baldy-Moulinier i wsp. (1973) z kolei podkreślają brak nieprawidłowości strukturalnych w tkance glejowej w zatruciu cyjankami, w przeciwieństwie do innych typów hipoksyjnego i anoksyjnego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Uszkodzenia gleju, obok nieprawidłowości struktury komórek nerwowych stwierdzali Hirano i wsp. (1967) w korowych ogniskach martwicy, towarzyszących pierwotnej demielinizacji w spoidle wielkim.

Ibrahim i wsp. (1963) zwracają uwagę na rozplem i przerost oligodendrocytów oraz ich aktywację metaboliczną, wyrażającą się wzmożeniem odczynów histochemicznych w okresie poprzedzającym rozwój ognisk demielinizacyjnych po zatruciu cyjankami. W związku z tym przypisują oni zmianom glejowym istotną rolę patogenetyczną w uszkodzeniu osłonek mielinowych.

Aktywację histochemiczną gleju w encefalopatii cyjankowej, łącznie z utrzymaniem wysokiej aktywności enzymatycznej w obrębie ognisk demielinizacyjnych stwierdzili poprzednio van Hutten i Friede (1963).

W przeciwieństwie do wymienionych powyżej autorów, Wender i wsp. (1972) wykazali spadek aktywności enzymatycznej w gleju, dotyczący zarówno enzymów oksydacyjno-redukcyjnych, jak i hydrolitycznych w ogniskach uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, występujący nawet w fazie poprzedzającej ich morfologiczne ukształtowanie. Wysoka aktywność enzymatyczna w otoczeniu ognisk patologicznych jak i w nich samych występująca w późnych okresach ewolucji procesu, implikuje wtórny, odczynowy charakter zmian w gleju i to zarówno astrocytarnym jak i skąpowypustkowym.

W celu określenia wrażliwości komórek glejowych na działanie cyjanków przeprowadzono cykl badań w warunkach hodowli pozaustrojowej. W poprzedniej pracy scharakteryzowano obraz uszkodzeń cytologicznych i cytochemicznych (Mossakowski 1976). Celem badań przedstawionych obecnie była mikroskopowo-elektronowa ocena uszkodzeń komórkowych, oraz ich konfrontacja z opisanymi poprzednio nieprawidłowościami, stwierdzonymi na poziomie mikroskopu świetlnego.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w warunkach identycznych jak w poprzedniej pracy (Mossakowski 1976).

Wyselekcjonowane hodowle organotypowe mózdzku noworodków szczurzych w 1, 2 i 3 tygodniu wzrostu poddawano 1-godzinnemu działaniu cyjanunku sodu, dodanego do medium odżywczego hodowli, w końcowym stężeniu  $10^{-3}$  M.

Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano hodowle bezpośrednio po zatruciu, oraz po upływie 1, 3 i 7 dni. Materiał opracowywano technicznie wg metody opisanej przez Borowicza i Kraśnicką (1971). Ultracienkie skrawki skrawano na ultramikrotomie LKB III, 8800, kontrastowano przy pomocy octanu uranylu i cytrynianu ołowiu i oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A przy napięciu przyspieszającym 80 KV. Zdjęcia wykonano na płytach ORWO EU 2.

Materiał kontrolny stanowiły hodowle tych samych grup czasowych prowadzone w standardowym środowisku odżywczym równolegle do hodowli doświadczalnych.

#### WYNIKI

Większość komórek glejowych, obserwowanych bezpośrednio po zatruciu w hodowlach 1- i 2-tygodniowych wykazuje znaczne cechy uszkodzenia. W hodowlach 3-tygodniowych liczba komórek z zaawansowanymi cechami dezintegracji strukturalnej jest mniejsza.

W obu typach neurogleju zwraca uwagę obfitość wielokształtnych wtretów śródplazmatycznych, o różnej gęstości elektronowej, oraz ciał

lizosomopodobnych (ryc. 1, 2), mniej licznych w populacji glejowej w hodowlach 3-tygodniowych.

Cytoplazma astrocytów jest przejaśniona, siatka śródplazmatyczna uboga, jej kanały znacznie poszerzone, pokryte skąpą ilością rybosomów (ryc. 1, 2, 3). Niekiedy towarzyszą temu stosunkowo liczne skupienia wolnych rybosomów (ryc. 2, 3). Maksymalnie poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej wypełnione są delikatnymi, kłaczkowatymi masami (ryc. 4). Znaczna ilość widocznych w cytoplazmie mitochondriów, wykazuje cechy obrznięcia, ich macierz jest jasna, a grzebień słabo widoczny (ryc. 3). Gliotubule są krótkie, pofragmentowane i nieregularnie rozrzucone w cytoplazmie. W licznych komórkach astrocytarnych zbiorniki i kanały zespołu Golgiego są poszerzone. Jądra komórkowe są mniej uszkodzone, zwraca jednak uwagę rozrzedzenie karioplazmy i brak ciągłości zewnętrznej błony jądrowej.

Zmiany w oligodendrocytach są niemal identyczne jak w astrogleju. Dominuje w nich uszkodzenie mitochondriów, przejawiające się przejaśnieniem macierzy i słabą widocznością grzebieni (ryc. 2), znaczne zużycie bądź przegrupowanie rybosomów oraz niekiedy bardzo duże poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej, wypełnionych podobnie jak w astrocytach kłaczkowatym materiałem o niskiej gęstości elektronowej.

W obu rodzajach neurogleju występują cechy bardzo znacznie wzmożonej pinocytozy (ryc. 4). Zjawisko to spostrzega się zarówno w komórkach z ciężkimi uszkodzeniami jak i w komórkach o mniej zaawansowanych zmianach patologicznych, występujących pojedynczo w hodowli 1-tygodniowej, liczniej w hodowlach 2-tygodniowych i obficie w 3-tygodniowych. W komórkach tych spotyka się stosunkowo liczne mitochondria nie wykazujące cech masywnego uszkodzenia, ich macierz jest ciemna, a grzebień dobrze utrzymane. Ilość wtrętów śródplazmatycznych i ciał lizosomopodobnych jest mała. Zespół Golgiego jest prawidłowo utrzymany, lub wykazuje tylko nieznaczne poszerzenie zbiorników i kanałów. Natomiast liczne kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej są znacznie poszerzone.

Po upływie 24 godzin od zatrucia obraz mikroskopowo-elektronowy komórek glejowych w hodowli 1-tygodniowej jest zasadniczo zbliżony do opisanego poprzednio, jakkolwiek nasilenie zmian patologicznych jest mniejsze. Mniej liczne ciała wtrętowe występują zarówno w cytoplazmie astrocytów jak i oligodendrocytów, częściej spotyka się natomiast typowe ciała lizosomopodobne (ryc. 5). Poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej jest mniej nasilone, jakkolwiek spotyka się nadal kanały znacznie poszerzone lub odcinkowo wręcz rozdęte (ryc. 5). W miejscach odcinkowego rozdęcia kanałów siatki szorstkiej ilość rybosomów

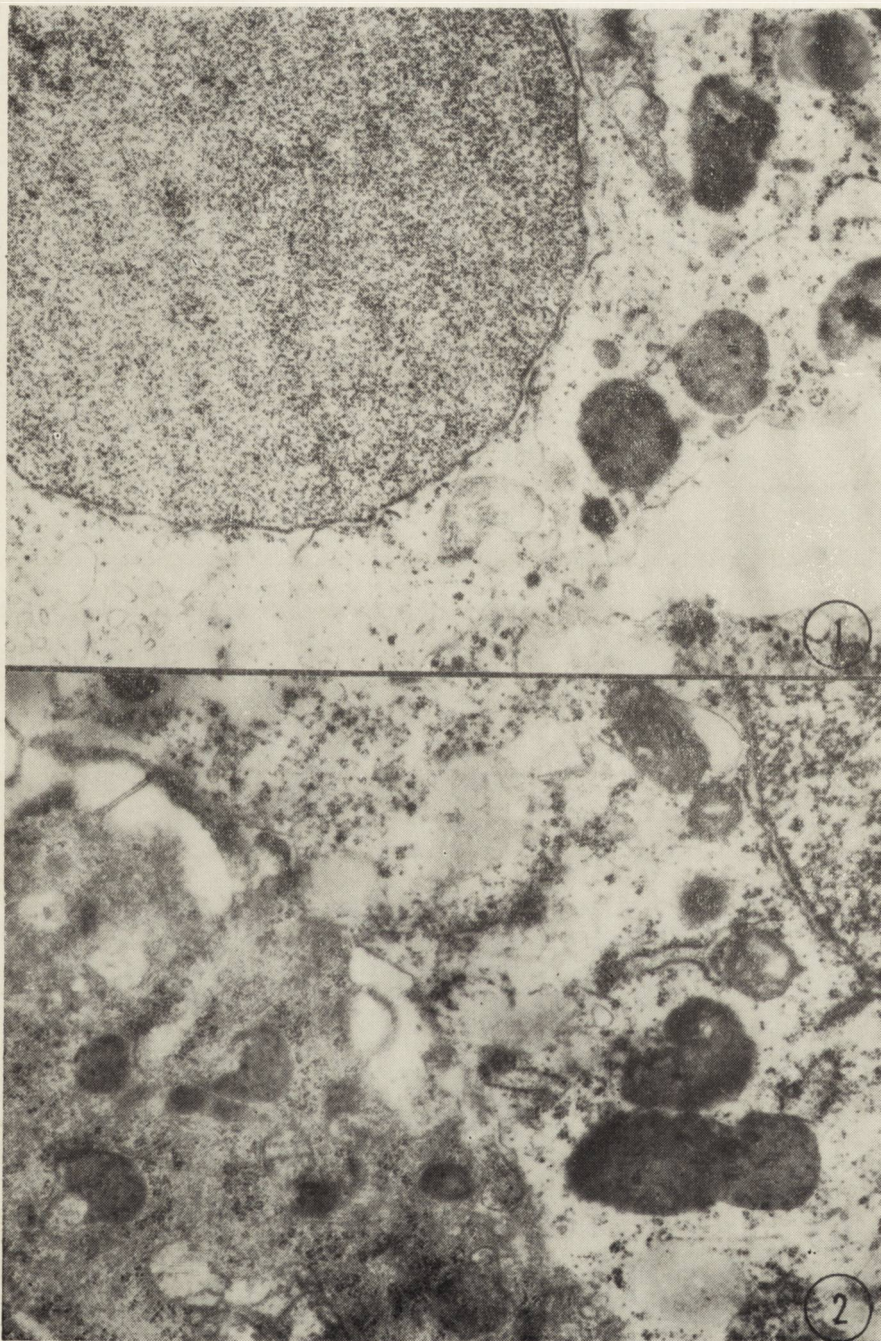
jest wyraźnie uboższa, obok nich spotyka się liczne ugrupowania wolnych rybosomów. Obserwuje się niekiedy znaczne poszerzenie zbiorników i kanałów rozbudowanego zespołu Golgiego (ryc. 6). Normalizacja obrazu mikroskopowo-elektronowego komórek glejowych w hodowli 2-, a zwłaszcza 3-tygodniowej jest wyraźniejsza niż w hodowli 1-tygodniowej. Nadal jednak spotyka się obrazy świadczące o wzmożonej aktywności pinocytarnej. We wszystkich typach komórek trzech grup czasowych hodowli zwraca uwagę znaczne uszkodzenie mitochondriów, wyrażające się bądź zubożeniem aparatu mitochondrialnego, bądź występowaniem mitochondriów o nieprawidłowych kształtach i rozmiarach i zartartym rysunku (ryc. 6), lub wreszcie obecnością rozdętych mitochondriów z niemal całkowitym zatarciem ich struktury wewnętrznej (ryc. 7). Uszkodzenia układu mitochondrialnego są znacznie bardziej nasilone w gleju skąpowypustkowym.

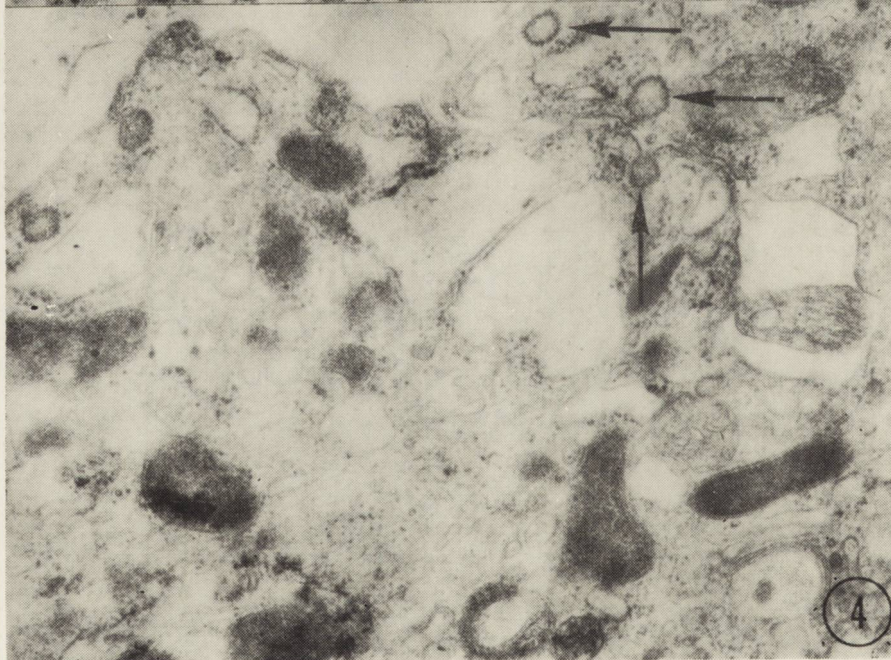
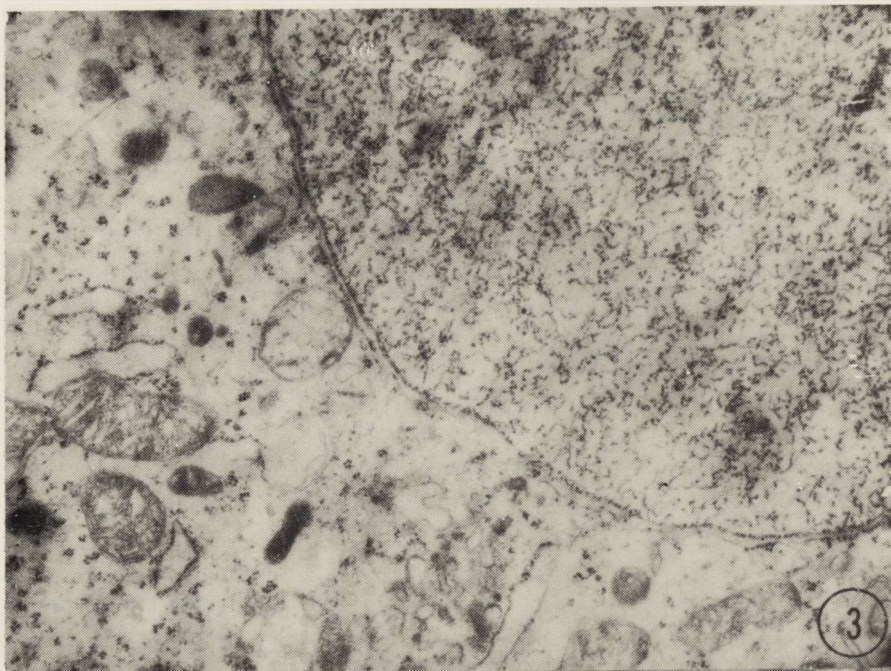
W trzecim dniu po zatruciu obserwuje się dalszą normalizację obrazu mikroskopowo-elektronowego obu typów komórek glejowych we wszystkich trzech grupach czasowych hodowli. Najbardziej nasilone zmiany patologiczne utrzymują się w hodowlach 1-tygodniowych. Wyrażają się one poszerzeniem kanałów siatki śródplazmatycznej, obecnością wtretów śródplazmatycznych i ciał lizosomopodobnych oraz nieprawidłową strukturą mitochondriów. Zmiany mitochondrialne utrzymują się również w stosunkowo licznych komórkach glejowych, zwłaszcza w oligodendrocytach w hodowlach 2-, a nawet 3-tygodniowych (ryc. 8). W licznych astrocytach spotyka się obfite gliotubule i gliofilamenty rozrzucone w cytoplazmie, lub ułożone w regularnych układach.

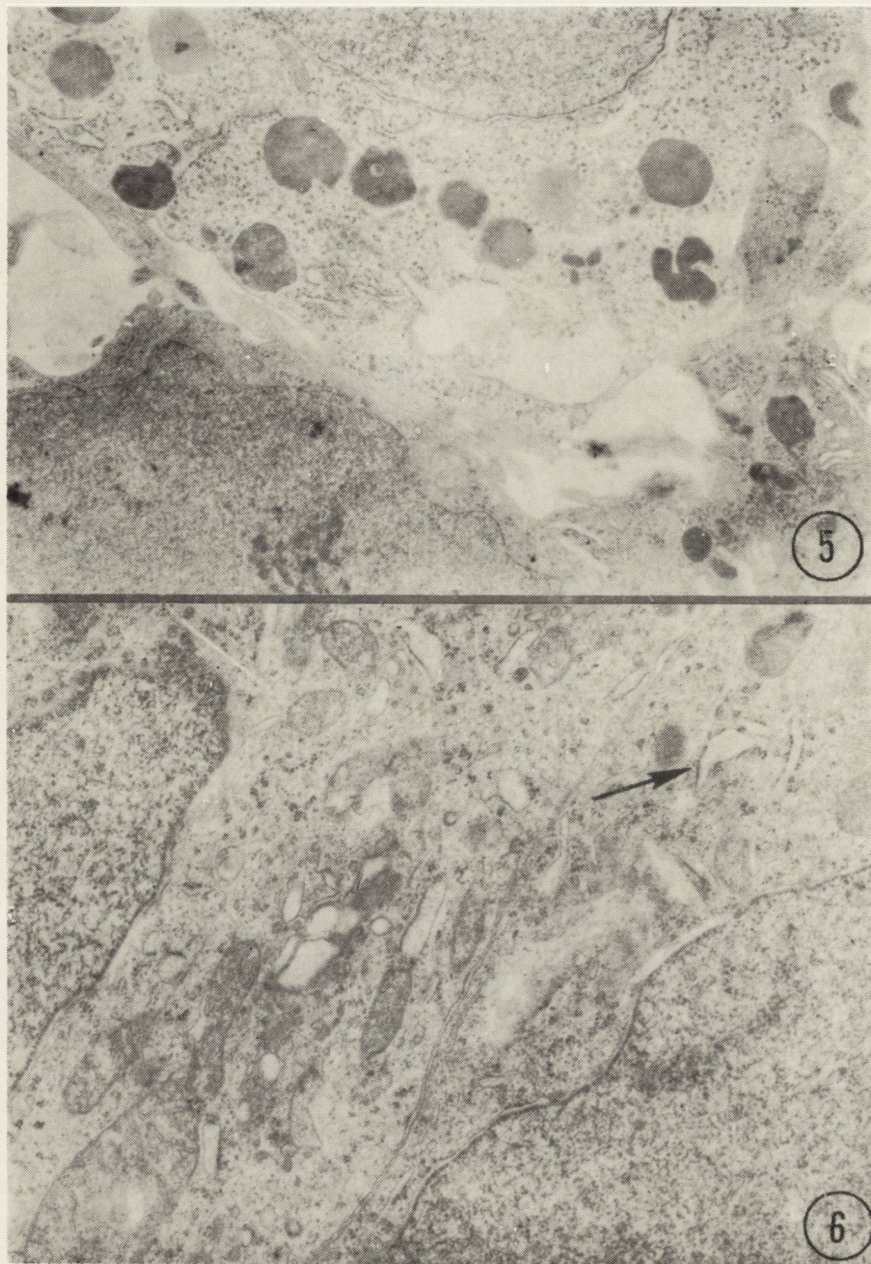
Po upływie 7 dni od zatrucia obraz mikroskopowo-elektronowy większości komórek glejowych w hodowlach z wszystkich trzech grup czasowych przypomina obrazy z materiału kontrolnego. Jednakże w hodowlach 1-tygodniowych nierzadko spotyka się nadal komórki z obfitymi ciałami wtretowymi w cytoplazmie i znacznie poszerzonymi kanałami szorstkiej siatki śródplazmatycznej odcinkowo pozbawionymi rybosomów (ryc. 9).

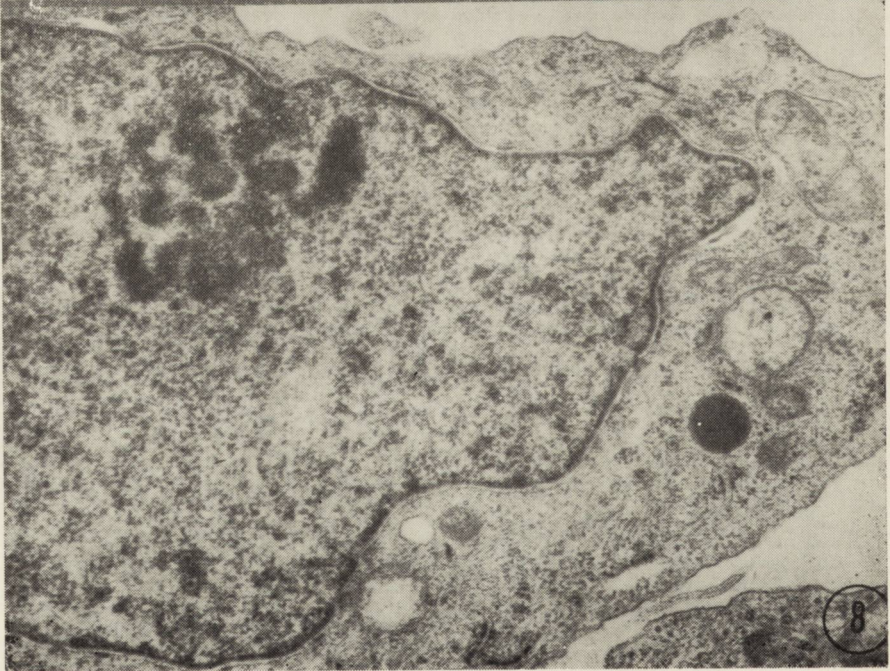
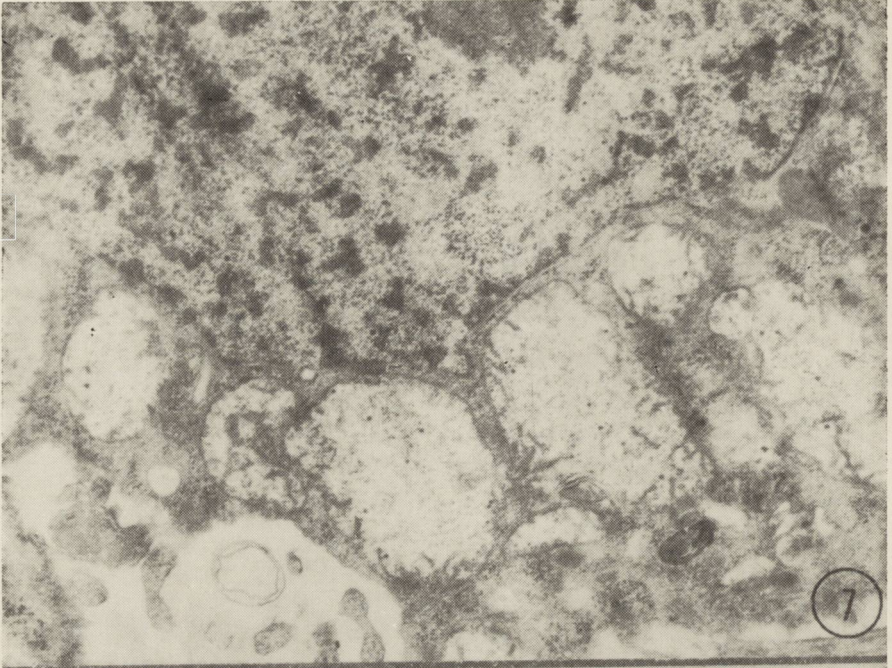
#### OMOWIENIE

Obserwacje dotyczące mikroskopo-elektronowego obrazu neurogleju poddanego krótkotrwałemu działaniu cyjanku sodu potwierdziły poprzednie spostrzeżenia cytologiczne i cytochemiczne (Mossakowski 1976). Wykazały one największą wrażliwość hodowli młodych z nisko zróżnicowaną populacją komórkową, wyrażającą się zarówno w nasileniu zmian patologicznych jak i w czasie ich utrzymywania się. Potwierdziły one również spostrzeżenia dotyczące indywidualnego zróżnicowania wrażli-

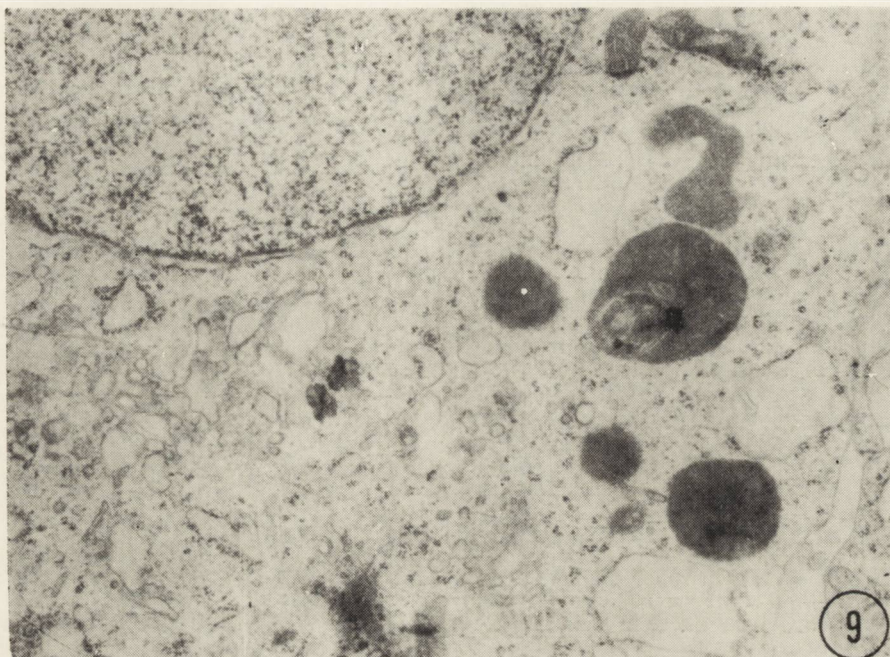












## PODPISY POD RYCINY

*Ryc. 1.* Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu. Fragment astrocytu o jasnej cytoplazmie. Widoczne nieliczne fragmenty szorstkiej siatki śródplazmatycznej i liczne ciała wtrętowe. Pow. 20.000  $\times$ .

*Fig. 1.* 1-week culture, directly after exposure to cyanide action. Fragment of astrocyte with pale cytoplasm. Scanty fragments of rough endoplasmic reticulum and numerous intracytoplasmic inclusions are seen.  $\times 20\ 000$ .

*Ryc. 2.* Hodowla 3-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu. Fragment astro- i oligodendrocytu. W komórce astrocytarnej widoczne są nieliczne fragmenty szorstkiej siatki śródplazmatycznej, ugrupowania wolnych rybosomów, ciała lizosomopodobne, obkurczone mitochondria oraz nieliczne ciała tłuszczowe. W oligodendrocytye widoczne są liczne ciała lizosomopodobne i obrzmiałe mitochondria. Pow. 20.000  $\times$ .

*Fig. 2.* 3-week culture, directly after exposure to cyanide action. Fragments of neighbouring astro- and oligodendrocyte. In astrocytic cytoplasm scanty fragments of rough endoplasmic reticulum, grouping of free ribosomes, lysosomes-like bodies, shrunken mitochondria and lipid droplets are present, while in oligodendrocyte swollen mitochondria and lysosome-like bodies prevail.  $\times 20\ 000$ .

*Ryc. 3.* Hodowla 2-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu. Fragment astrocytu, w którego cytoplazmie widoczne są poszerzone kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej, odcinkowo pozbawionej rybosomów, ugrupowania wolnych rybosomów i ciała lizosomo-podobne. Obok uszkodzonych mitochondriów widoczne są mitochondria niezmiennione. Pow. 24.000  $\times$ .

*Fig. 3.* 2-week culture directly after exposure to cyanide action. Fragment of astrocyte, in cytoplasm of which distended channels of rough endoplasmic reticulum, partially devoid of ribosomes, grouping of free ribosomes and lysosome-like bodies are seen. Besides damaged mitochondria, some unchanged mitochondria are present.  $\times 24\ 000$ .

*Ryc. 4.* Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu. We fragmentach astrocytów widoczne są liczne ciała lizosomo-podobne, gliofilamenty, znacznie poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej, wypełnione kłaczkowatą zawartością, oraz liczne pęcherzyki mikropinocytarne (strzałki). Pow. 24.000 ×.

*Fig. 4.* 1-week culture, directly after exposure to cyanide action. In fragments of two astrocytes numerous lysosome-like bodies, gliofilaments, distended channels of endoplasmic reticulum, containing floccular masses and abundant pinocytotic vesicles (arrows) are present. × 24 000.

*Ryc. 5.* Hodowla 1-tygodniowa w 24 godz. po zatruciu. Widoczny fragment sąsiadującego astrocytu i oligodendrocytu. W komórce astrocytarnej obecne są liczne ciała wtrętowe oraz znacznie rozdęte kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Pow. 16.000 ×.

*Fig. 5.* 1-week culture in 24th hr after exposure to cyanide action. Fragments of neighbouring astrocyte and oligodendrocyte are present. In astrocytic cytoplasm numerous inclusion bodies and some distended channels of rough endoplasmic reticulum are seen. × 16 000.

*Ryc. 6.* Hodowla 1-tygodniowa w 24 godz. po zatruciu. Widoczne fragmenty dwóch astrocytów o stosunkowo nieznacznie zmienionej strukturze. Zwraca uwagę olbrzymie mitochondrium położone obok licznych niezmiennych mitochondriów oraz wyraźnie poszerzone kanały aparatu Golgiego. Pojedyncze kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej nieznacznie poszerzone (strzałki). Pow. 16 000 ×.

*Fig. 6.* 1-week culture in 24th hr after exposure to cyanide action. Fragments of two astrocytes with relatively undamaged structure are seen. Giant mitochondrium between numerous unaltered mitochondria and distended channels of Golgi complex are present. Some channels of rough endoplasmic reticulum are slightly enlarged (arrows). × 16 000.

*Ryc. 7.* Hodowla 1-tygodniowa w 24 godz. po zatruciu. We fragmencie oligodendrocytu widoczne znacznie obrzmiałe mitochondria. Pow. 24.000 ×

*Fig. 7.* 1-week culture in 24th hr after exposure to cyanide action. In the fragment of oligodendrocyte greatly swollen mitochondria are seen. × 24 000.

*Ryc. 8.* Hodowla 3-tygodniowa, 3 dni po zatruciu. We fragmencie oligodendrocytu widoczne jądro z wyraźnym jąderkiem. W cytoplazmie obecny pojedynczy lizosom i nieliczne obrzmiałe mitochondria. Pow. 24.000 ×.

*Fig. 8.* 3-week culture, 3 days after exposure to cyanide action. In the fragment of oligodendrocyte nucleus with a distinct nucleolus is seen. Cytoplasm contains a single lysosome and scanty swollen mitochondria. × 24 000.

*Ryc. 9.* Hodowla 1-tygodniowa, 7 dni po zatruciu. Fragment astrocytu z dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego, dość licznymi ciałami lizosomopodobnymi i rozdętymi kanałami siatki śródplazmatycznej szorstkiej, odcinkowo pozbawionymi rybosomów. Pow. 20.000 ×.

*Fig. 9.* 1-week culture, 7 days after exposure to cyanide action. Fragment of astrocyte with a distinct Golgi complex, numerous lysosome-like bodies and distended channels of rough endoplasmic reticulum partially devoid of ribosomes. × 20 000.

wości poszczególnych komórek glejowych z tych samych grup czasowych i linii histogenetycznych.

Stwierdzone zmiany patologiczne w ultrastrukturze komórek glejowych dotyczyły przede wszystkim szorstkiej siatki śródplazmatycznej, wyrażając się znacznym poszerzeniem, a nawet odcinkowym rozcięciem jej kanałów z równoczesnym zmniejszeniem ilości rybosomów, oraz bardzo znacznym uszkodzeniem mitochondriów. W obu grupach nieprawidłowościom ultrastrukturalnym towarzyszyło nagromadzenie śródplazmatycznych ciał wtrętowych, o niewyjaśnionym charakterze chemicznym oraz występujące wyłącznie we wczesnym okresie po zatruciu objawy wzmożonej mikropinocytozy. Poszczególne typy zmian wykazywały nieco odmienne sekwencje czasowe oraz zróżnicowanie nasilenia w astrocytach i oligodendrogleju.

Najwcześniej obserwowane zmiany, utrzymujące się zresztą w pojedynczych komórkach hodowli 1-tygodniowej do końca obserwacji, dotyczyły siatki śródplazmatycznej. W tym samym czasie obficie występowały śródplazmatyczne ciała wtrętowe, których liczba zmniejszała się stopniowo wraz ze wzrostem zawartości typowych ciał lizosomopodobnych, oraz cechy wzmożonej aktywności mikropinocytarnej. Wydaje się prawdopodobne przyczynowe powiązanie tych zjawisk. Zmiany przepuszczalności błon komórkowych, sugerowane w oparciu o spostrzeżenia z mikroskopu świetlnego (Mossakowski 1976) i prawdopodobnie zależne od wykazanych przez Masurowsky'ego i Bunge (1971) oraz Ybatę i wsp. (1971) zaburzeń w aktywności ATP-azy błonowej, mogą leżeć u podłoża nieprawidłowości w strukturze siatki śródplazmatycznej, a być może również i nagromadzenia śródplazmatycznych ciał wtrętowych. Za taką zależnością może przemawiać ich pojawienie się bezpośrednio po 1-godzinnym zatruciu. Prawo do identyfikacji stwierdzanych w mikroskopie elektronowym śródplazmatycznych ciał wtrętowych ze skupieniami ziarnistości PAS-dodatnich, obserwowanymi w mikroskopie świetlnym (Mossakowski 1976) dać mogą dopiero odpowiednie badania histochemiczne. Niemniej równoczesność pojawiania się i znikania obu struktur sugeruje taką interpretację. Występowanie ziarnistości PAS-dodatnich w komórkach glejowych utrzymywanych w hodowli pozaustrojowej, Renkawek (1972) wiąże ze zmianami przepuszczalności błon komórkowych i uważa je za nagromadzone w cytoplazmie substancje białkowe bądź lipidowo-białkowe pochodzące ze środowiska odżywczego hodowli.

Uszkodzenia mitochondrialne, obecne bezpośrednio po zatruciu dominowały w 24 godzinie i w 3 dniu po zatruciu, wykazując pełną zgodność czasową z drastycznym spadkiem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej, stwierdzonym w badaniach na poziomie mikroskopu świetlnego (Mossakowski 1976). Przypadały one również

na ten sam okres, w którym Wender i wsp. (1972) stwierdzili obniżenie aktywności enzymatycznej w gleju istoty białej w doświadczeniach przeprowadzonych *in vivo*.

W świetle mikroskopowo-elektronowej oceny stanu mitochondriów w okresie bezpośrednio po zatruciu, wysoką aktywność enzymów mitochondrialnych stwierdzaną w tym czasie w badaniach cytochemicznych (Mossakowski 1976) rozpatrywać należy prawdopodobnie jako zjawisko związane z ułatwioną dostępnością użytego do odczynu histochemicznego substratu, w związku ze zwiększoną przepuszczalnością błon komórkowych i uszkodzoną strukturą mitochondriów (Kozik 1972). Być może w ten sam sposób należy interpretować wykazaną przez Ibrahima i wsp. (1963) aktywację enzymatyczną oligodendrogleju w spidle wielkim u zatrutych cyjankiem szczurów, występującą przed pojawieniem się wykładników jego demielinizacji.

Odrębności uszkodzeń ultrastrukturalnych astro- i oligodendrogleju w następstwie zatrucia cyjankami wyrażały się w dominowaniu obrzęknięcia cytoplazmy, poszerzenia siatki śródplazmatycznej, nagromadzenia ciał wtrętowych w komórkach gwiaździstych i uszkodzeń mitochondriów w gleju skąpowypustkowym. Zróznicowanie to wykazuje pełną analogię z odmiennością nieprawidłowości ultrastrukturalnych astro- i oligodendrocytów w przypadku zatrucia tlenkiem węgla w warunkach *in vivo* i *in vitro* (Korthals i wsp. 1973a, 1973b). Ciężkie uszkodzenie mitochondriów w oligodendrocytach przy słabiej wyrażonych zmianach w gleju gwiaździstym stanowi przyczynek popierający koncepcję Ybata i wsp. (1971) o odmiennych właściwościach mitochondriów w obu typach neurogleju.

Na odrębną uwagę zasługuje fakt, że już w okresie najcięższego uszkodzenia komórek — obok poszerzonych, pozbawionych rybosomów kanałów siatki śródplazmatycznej występowały obfite ugrupowania polirybosomalne. Te przegrupowania rybosomalne występujące w obu typach komórek glejowych w najwcześniejszej fazie po zatruciu mogą sugerować wzmożenie procesów biosyntezy białek, być może warunkujących odwracalność spostrzeganych uszkodzeń komórkowych.

Spostrzegane przez nas nieprawidłowości ultrastruktury komórek glejowych w ogólnym wzorcu zbliżone były do uszkodzeń spowodowanych niedotlenieniem zarówno *in vivo* (Brown, Brierley 1972, Yu i wsp. 1972) jak i *in vitro* (Kraśnicka i wsp. 1973), jak również do zmian rozwijających się w następstwie zatrucia tlenkiem węgla (Korthals i wsp. 1973a, 1973b). Podobieństwa dotyczące charakteru nieprawidłowości ultrastrukturalnych i dynamiki ich rozwoju związane są zapewne z ich zbliżonym mechanizmem patogenetycznym, wynikającym z niedostatku tlenu lub zaburzeń tlenowego metabolizmu komórki.

Różnice obrazu mikroskopowo-elektronowego w stosunku do spostrzeżeń Hirano i wsp. (1967) i Baldy-Moulinier i wsp. (1973) odnieść należy do zasadniczych odrębności modelu doświadczalnego.

М. Я. Моссаковски, Б. Гайковска

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЛИИ,  
ВЫЗВАННЫХ ЦИАНИСТЫМ НАТРИЕМ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

Исследования были проведены на органотипической культуре мозжечка новорожденных крыс, выдерживаемых в течение 1 часа в среде, содержащей цианистый натрий в концентрации 1 мМ. Культуры отравляли на 7, 14 и 21 день выдерживания их *in vitro*. Материал для исследований брали непосредственно после отравления, а также через 1, 3 и 7 дней после отравления.

Ультраструктурные изменения, касающиеся обоих типов глии были сильнее всего выражены в однонедельных культурах, исследуемых непосредственно после отравления и по истечении 24 часов. Они выражались в усиленной микропиноцитозной активности, набуханий цитоплазмы, расширения каналов эндоплазматической сети, повреждении митохондрий, а также в нагромождении плотных тел.

В астроцитах преобладали признаки измененной проницаемости клеточных оболочек, в то время как в олигодендроглии — повреждение митохондрий. На 7 день после отравления ультраструктурная картина возвращалась к норме, однако по-прежнему сохранялось увеличенное количество плотных тел в астроцитах и значительный отек митохондрий в олигодендроглии.

Обнаруженные электронно-микроскопические изменения напоминали нарушения, являющиеся следствием гипоксии и отравления окисью углерода. Тяжелые, сохраняющиеся после отравления повреждения олигодендроглии указывают на их участие в демиелизационных процессах, наблюдаемых при цианистой энцефалопатии.

M. J. Mossakowski, B. Gajkowska

ELECTRON MICROSCOPIC PICTURE OF GLIA LESIONS INDUCED  
WITH CYANIDE IN TISSUE CULTURE

Summary

The study was carried out on the organotypic cultures derived from newborn rats cerebellum. Seven, 14 and 21 days old cultures were kept for 1 hour in a medium containing 1 mM of sodium cyanide. Investigation was performed immediately after intoxication and 1, 3, 7 days afterwards.

Ultrastructural changes were present in both types of glial cells being most pronounced in 1 week old cultures observed immediately and 24 hours after intoxication. The alterations were characterized by increased micropinocytotic activity, swelling of cytoplasm, distension of endoplasmic reticulum channels, lesion of mitochondria and accumulation of dense bodies.

In astrocytes predominated the exponents of disturbed permeability of cellular membranes whereas in oligodendroglia — the damage to mitochondria. Ultrastructural picture became normalized in 7th day after intoxication but in astrocytes still persisted increased number of dense bodies while in oligodendroglia the marked swelling of mitochondria.

The observed ultrastructural changes closely resemble those caused by hypoxia and carbon monoxide intoxication. Severe, long-lasting abnormalities of oligodendroglia suggest its important role in the mechanism of myelin damage in cyanide encephalopathy.

#### PISMIENNICTWO

1. Baldy-Moulinier M., Humeau Cl., Sentein P., Passouant P.: Modification ultra-structurales primitives du cortex cerebral au cours de differents types d'anoxie cerebrale experimentale. *C. Rend. Soc. Biol. (Paris)* 1973, 167, 1886—1892.
2. Borowicz J. W., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych in vitro do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 22, 691—697.
3. Brown A. W., Brierley I. B.: Anoxic-ischemic cell changes in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. *J. neurol. Sci.* 1972, 16, 59—84.
4. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy. Electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 200—213.
5. Hutten van W., Friede R.: Histochemical studies of experimental demyelination produced with cyanide. *Exp. Neurol.* 1963, 4, 402—412.
6. Ibrahim M., Philander E., Briscoe B. S. jr., Bayliss O., Adams C.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy in the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1963, 26, 479—486.
7. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histochemiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowęglowej. *Neuropat. Pol.* 1973a, 11, 279—300.
8. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973b, 11, 315—322.
9. Kozik M.: Doświadczalny obrzęk neuronu w świetle badań histoenzymatycznych. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 1—15.
10. Kraśnicka Z., Renkawek K., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz ultrastrukturalny komórek glejowych hodowanych in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 398—404.
11. Lessell S., Kawabara T.: Fine structure of experimental optic neuropathy. *Inv. Ophthalm.* 1974, 13, 748—756.
12. Masurowsky E. B., Bunge R. P.: Pattern of myelin degeneration following rapid death of cells in cultures of peripheral nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1971, 30, 311—324.
13. Mossakowski M. J.: Morfologia i histochemia uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.* w druku.
14. Renkawek K.: The histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307—315.
15. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta histochem.* 1972, 43, 361—371.

16. Ybata Y., Piccoli F., Pappas G. D., Lajtha A.: An electron microscopic and biochemical study on the effect of cyanide and low  $\text{Na}^+$  on rat brain slices. *Brain Res.* 1971, 30, 137—158.
17. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. Neuroglia and blood vessels. II. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 235—244.

Adres autorów: Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dwor  
kowa 3, 00-784 Warszawa.

## KOMUNIKATY

W okresie od 18 do 20 października 1976 r. odbędzie się w Kazimierzu n. Wisłą XI Konferencja naukowo-szkoleniowa Komisji Mikroskopii Elektronowej Polskiej Akademii Nauk.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej  
Instytutu Biologiczno-Morfologicznego Akademii Medycznej w Lublinie,  
ul. Pstrowskiego 12, 20-007 Lublin, tel. 228-24

\* \* \*

W dniach od 21 do 23 kwietnia 1977 r. odbędzie się w Rostoku V doroczny Zjazd Towarzystwa Neuropatologicznego NRD. Tematem Zjazdu będą uszkodzenia o.u.n. towarzyszące chorobom wewnętrznym. Termin zgłoszenia uczestnictwa upływa 15 października 1976 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Doz. dr sc. med. P. Schröter,  
Nervenklinik des Bereiches Medizin  
der Wilhelm-Pieck-Universität  
Laboratorium für Neuropathologie,  
DDR — 25 Rostock 9 — Gehlsdorf,  
Gehlsheimer Str. 20



ANDRZEJ SULIŃSKI, ELŻBIETA SKALSKA, KRYSZYNA OBRUSIEWICZ

THE ACTIVITIES OF ACETYLCHOLINESTERASE,  
ALKALINE PHOSPHATASE AND ACID PHOSPHATASE  
OF THE RAT BRAIN FOLLOWING  
FENCHLORPHOS INTOXICATION \*

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy,  
Warsaw

Head: Assoc. Prof. W. Bicz

Many neurochemical studies indicate that insecticides, especially organophosphate compounds, have a great influence on some enzymes activities and metabolic processes in the central nervous system (Bajgar 1972, Barzu et al. 1973, Biczowa et al. 1975, Pachecka et al. 1975a, Sitkiewicz, Zalewska, 1975).

Previously we have stated that phosphoroorganic pesticides Dichlorvos and Trichlorphon change the activity of some brain hydrolases (Pachecka et al. 1975b).

The purpose of the present work was to evaluate the poisoning effect of thiophosphoroorganic pesticide Fenchlorphos (0,0-Dimethyl-0-/2,4,5-trichlorophenyl/phosphorothioate, Ronnel, Trolen) on acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7.—acetylcholine hydrolase), alkaline phosphatase (E.C.3.1.3.1.—orthophosphoric monoester phosphohydrolase) and acid phosphatase (E.C.3.1.3.2. — orthophosphoric monoester phosphohydrolase) activity in the rat brain.

MATERIAL AND METHODS

All tested enzymes were examined in a few experimental models: acute — single intoxication, 14-days'-manyfold intoxication and so-called „adaptative model”. Additional investigation of the dynamics of activity changes after single intoxication with 50% LD<sub>50</sub> dose was made for acetylcholinesterase. In our experiments male albino Wistar rats weighing

---

\* This work was partially supported by Grant from the Polish Academy of Sciences. Research Programme No 09.4.1.3.

200—220 g were used. Two weeks before experiments and during pesticide administration, standard diet and water *ad libitum* were given to rats. Fenchlorphos (purity min. 99%, obtained from Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences) was administered *per os* in oil suspension. As LD<sub>50</sub> dose were considered 1250 mg/kg body weight (Klarner 1966). Normal rats were used as controls. Animals were decapitated without anaesthesia.

For investigation of the dynamics of acetylcholinesterase activity changes, the pesticide was administered to rats in 50% LD<sub>50</sub> dose. The animals were sacrificed at different time after intoxication, the brain homogenates were prepared and enzyme activity was estimated.

In the acute, single intoxication model, pesticide in 50%, 10% or 2% LD<sub>50</sub> dose was administered. After 2 or 24 hours the rats were sacrificed and acetylcholinesterase (AChE), alkaline phosphatase (ALPh) and acid phosphatase (AcPh) activity in brain homogenates was measured.

In 14 days' manyfold experiments, pesticide was given in 2% or 10% LD<sub>50</sub> dose everyday for 14 days. On the 15th day the rats were sacrificed and enzymes activity was determined. In purpose to investigate the adaptation possibility of rat organism, the rats were intoxicated by the pesticide in 2% dose for 14 days. On the 15th day a single high dose (50% of LD<sub>50</sub>) was administered and after 2 hours the rats were sacrificed. The activities of tested enzymes were estimated in brain homogenates prepared as described previously (Pachecka et al. 1975b). Acetylcholinesterase activity was assayed by the Ellman method (Ellman et al. 1961), and phosphatases activity according to Bessey-Lowry (Linhard, Walter 1962) as was published before (Pachecka et al. 1975b). Protein content in the homogenates was determined by the conventional biuret method. Statistical analysis was performed by Dixon's Q-test and Student's t-test.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the first stage of the work the dynamics of changes of AChE activity in the rat brain resulting from single Fenchlorphos administration with 50% LD<sub>50</sub> dose was studied. Results of these experiments are presented in Diagram 1.

Thirty min after intoxication a decrease of AChE activity was already revealed. After 2 hours it reached about 50% of the control level. In the next period (8 and 12 hours) slow increase of the activity has been noticed. 24 hours after pesticide administration a decrease of the enzyme activity was observed again. It was more intensive than after 2 hours — the activity represented only about 40% of the control level. After 4 days

Table 1. The acetylcholinesterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase activities in the rat brain following single intoxication by Fenclorphos

Tabela 1. Aktywność acetylocholinoesterazy, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w mózgu szczura po jednorazowym zatruciu Fenclorfosem

Time after intoxication (hours) Czas po zatruciu (godziny)	Dose of pesticide Dawka pestycydu %LD <sub>50</sub>	Acetylcholinesterase activity nmoles/min/mg protein Aktywność acetylocholinoesterazy nmole/min/mg białka			Alkaline phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy alkalicznej nmole/godz/mg białka			Acid phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy kwaśnej nmole/godz/mg białka		
		$\bar{x} \pm s$	n	p	$\bar{x} \pm s$	n	p	$\bar{x} \pm s$	n	p
		2	Control Kontrola	51.5 ± 3.5	6		292.9 ± 11.3	7		1032.9 ± 64.2
	2	71.1 ± 3.6	6	≤ 0.05	229.8 ± 9.4	6	≤ 0.05	935.0 ± 44.6	6	≤ 0.05
	10	43.4 ± 4.5	6	≤ 0.05	246.2 ± 16.4	6	≤ 0.05	695.8 ± 40.3	6	≤ 0.05
	50	33.7 ± 3.0	6	≤ 0.05	250.8 ± 14.8	6	≤ 0.05	826.7 ± 67.6	6	≤ 0.05
24	Control Kontrola	51.2 ± 2.4	6		236.3 ± 12.8	6		789.2 ± 63.4	6	
	2	61.1 ± 2.4	6	≤ 0.05	224.6 ± 15.6	6	≥ 0.05	893.3 ± 77.8	6	≥ 0.05
	10	42.5 ± 2.5	6	≤ 0.05	337.8 ± 25.3	6	≤ 0.05	921.7 ± 55.4	6	≥ 0.05
	50	25.4 ± 3.0	7	≤ 0.05	309.1 ± 28.0	7	≤ 0.05	909.3 ± 14.7	7	≥ 0.05

$\bar{x} \pm s$ : arithmetic mean ± S.E.M.

n: number of experiments

p: probability

$\bar{x} \pm s$ : średnia arytmetyczna ± standardowy błąd średniej

n: liczba doświadczeń

p: prawdopodobieństwo

a remarkable increase of activity begins. However, after one week inhibition of the enzyme activity is still considerable and reaches 50% of the control level. The results described above allowed to define the time, when the enzyme assay following acute intoxication should be performed. The level of AChE activity inhibition is a right criterium of this choice. The times of 2 and 24 hours were chosen i.e. two moments in which two waves of activity decrease appeared.

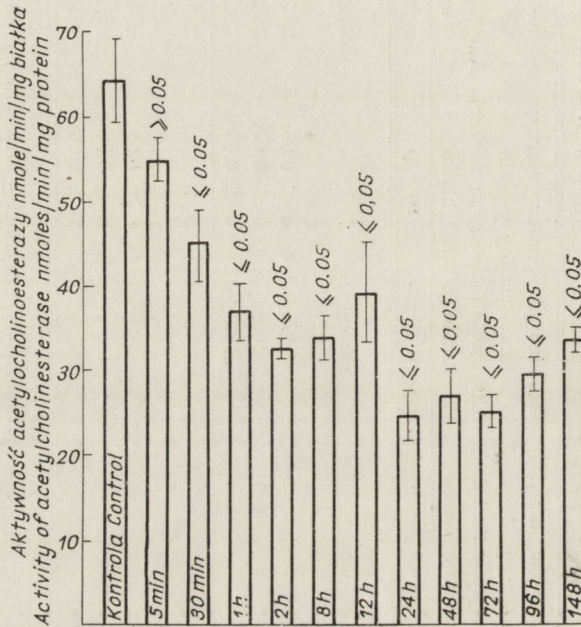


Diagram 1. The dynamics of changes of rat brain acetylcholinesterase activity following single intoxication with Fenchlorphos 50% LD<sub>50</sub> dose. Figures are means ( $\bar{x} \pm s$ ) of 6—14 rats each.

Wykres 1. Dynamika zmian aktywności acetylcholinoesterazy mózgu szczura po zatruciu Fenchlorfosem w dawce 50% LD<sub>50</sub>. Ryciny przedstawiają średnie ( $\bar{x} \pm s$ ) z 6—14 zwierząt każda.

Results obtained in acute intoxication experiments presents Table 1.

Two hours after intoxication with all studied doses, the AChE activity was changed; 50% and 10% of LD<sub>50</sub> doses caused a decrease of the activity down to about 65% and 80% of the control level, respectively, 2% of LD<sub>50</sub> dose caused an increase of the activity up to about 135%. In all cases the ALPh activity was statistically significantly decreased. The acid phosphatase activity in the same conditions also was inhibited. With 2% LD<sub>50</sub> dose the inhibition was insignificant.

Twenty four hours after Fenchlorphos intoxication the stimulation of AChE activity in case of the lowest dose of pesticide and inhibition in

case of the other two doses were observed. The effect on the AChE activity was similar up to 2-hours of the experimental time, however, in that case the stimulation was lower and inhibition higher. The alkaline phosphatase activity did not change after intoxication with 2% LD<sub>50</sub> dose and slightly increased after 10% and 50% LD<sub>50</sub> doses. The enhancement of AcPh activity noted with all investigated doses was statistically insignificant.

The influence of multiple pesticide administration on the activity of examined enzymes shows Table 2.

Table 2. The acetylcholinesterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase activity in the rat brain following multiple intoxication by Fenchlorphos

Tabela 2. Aktywność acetylocholinoesterazy, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w mózgu szczura po wielokrotnym zatruciu Fenchlorfossem

Dose of pesticide Dawka pestycydu %LD <sub>50</sub>	Acetylcholinesterase activity nmoles/min/mg protein Aktywność acetylocholinoesterazy nmole/min/mg białka			Alkaline phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy alkalicznej nmole/godz/mg białka			Acid phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy kwaśnej nmole/godz/mg białka		
	$\bar{x} \pm s$	n	p	$\bar{x} \pm s$	n	p	$\bar{x} \pm s$	n	p
	Control Kontrola	69.0 ± 7.1	5		295.3 ± 17.7	5		1101.0 ± 101.6	5
2	43.6 ± 3.9	6	≤ 0.05	307.9 ± 8.1	6	≥ 0.05	1105.0 ± 74.5	6	≥ 0.05
10	24.5 ± 1.3	8	≤ 0.05	244.3 ± 15.9	8	≤ 0.05	1190.0 ± 77.4	8	≤ 0.05

$\bar{x} \pm s$ : arithmetic mean ± S.E.M.       $\bar{x} \pm s$ : średnia arytmetyczna ± standardowy błąd średniej  
n: number of experiments                      n: liczba doświadczeń  
p: probability    p: prawdopodobieństwo

Fourteen days' Fenchlorphos administration in doses of 10% and 2% LD<sub>50</sub> caused a decrease of AChE activity up to 35% and 60% of the control respectively. The AlPh activity decreased after administration of 10% LD<sub>50</sub> dose. Lower dose was without effect. In contrast, AcPh activity was stimulated after application of the highest dose of pesticide. 2% LD<sub>50</sub> dose as in the case of AlPh remained without effect on AcPh activity.

The last part of our work comprised the investigation of the adaptation ability of rat organism. Table 3 shows the data from these experiments.

For comparison the results of two other kinds of experiments are presented. In the first the pesticide was administered in 2% LD<sub>50</sub> dose during 14 days, in the second a single 50% LD<sub>50</sub> dose was applied.

Table 3. The influence of pretreatment of rats with small doses of Fenchlorphos on its *in vivo* inhibitory effect on rat brain hydrolasesTabela 3. Wpływ podawania małych dawek Fenchlorfosu na jego efekt hamowania hydrolaz mózgu szczura *in vivo*

Fenchlorphos Pretreatment Zatrucie wstępne	Treatment Zatrucie	Acetylcholinesterase activity nmoles/min/mg protein Aktywność acetylocholinoes- terazy nmole/min/mg białka		Alkaline phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy alkaliez- nej nmole/godz/mg białka		Acid phosphatase activity nmoles/hr/mg protein Aktywność fosfatazy kwaśnej nmole/godz/mg białka	
		$\bar{x} \pm \bar{s}$	n	$\bar{x} \pm \bar{s}$	n	$\bar{x} \pm \bar{s}$	n
Control Kontrola	Control Kontrola	69.0 ± 7.1	6	295.3 ± 17.7	6	1101.0 ± 101.5	6
2%LD <sub>50</sub> x 14 days 2%LD <sub>50</sub> x 14 dni	$\frac{1}{2}$ LD <sub>50</sub> after 2 h po 2 godz.	28.9 ± 2.1	7	287.4 ± 17.2	7	1284.4 ± 82.5	7
no intoxication bez zatrucia	$\frac{1}{2}$ LD <sub>50</sub> after 2 h po 2 godz.	33.7 ± 3.0	6	250.8 ± 14.8	6	826.7 ± 67.6	6
2%LD <sub>50</sub> x 14 days 2%LD <sub>50</sub> x 14 dni	no intoxication bez zatrucia	49.6 ± 3.9	8	307.9 ± 8.1	8	1105.0 ± 74.5	8

$\bar{x} \pm \bar{s}$ : arithmetic mean ± S.E.M.  
n: number of experiments

$\bar{x} \pm \bar{s}$ : średnia arytmetyczna ± standardowy błąd średniej  
n: liczba doświadczeń

The data in Table 3 indicate, that AChE activity was lowered in an „adaptative experiment” similar to that observed after 2 hours in acute experiments, but the effect was higher. This inhibition was also higher than in the case of administration of pesticide in the period of 14 days in the dose of 2% LD<sub>50</sub>. It seems that it is due to synergistic effect of both doses. The alkaline phosphatase activity in the case of „adaptative model” did not change in contrast to the acute experiments. Acid phosphatase activity changes in this experiment, but instead of decrease as it was in the acute model, a slight enhancement of the enzyme activity was observed.

The investigations make possible the determination of the brain hydrolases activities in various states of intoxication. Presented results indicate that Fenchlorphos beside AChE inhibition, causes changes in ALPh and AcPh activity in rat brain. The action of the phosphatases activity can result in their increase or decrease depending on the model of intoxication. This may suggest that the mechanism of action of Fenchlorphos on acetylcholinesterase and phosphatase activities is different. Investigation of AChE activity after single pesticide administration makes evaluation of the effect of Fenchlorphos and its metabolites on the enzyme possible. Two phases of inhibition could be an effect of either pesticide or its metabolite (s) action. It is known that thiophosphates are metabolised to oxygen analogues which are more toxic than parental compounds (O'Brien 1960).

The results of acute intoxication as well as the dynamics of AChE activity changes, indicate that there is a fast penetration of pesticides into the brain. The strong inhibitory effect could be a result of a high affinity of Fenchlorphos to the brain lipids (Palut et al. 1971). These suggestions are supported by the results concerning the dynamics of inhibition of cholinesterase activity in rat plasma (Skalska et al. 1976). Altered activities of all tested enzymes after manyfold pesticide administration may be considered to be a symptom of metabolic changes in the nervous tissue following repeated intoxication. The results of the „adaptative experiment” may be the proof of some adaptative mechanisms of two investigated phosphatases.

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Mrs Tatiana Rychła.

A. Suliński, E. Skalska, K. Obrusiewicz

AKTYWNOŚĆ ACETYLOCHOLINOESTERAZY, FOSFATAZY ZASADOWEJ  
I FOSFATAZY KWAŚNEJ MÓZGU SZCZURA  
PO ZATRUCIU FENCHLORFOSEM

Streszczenie

Zbadano zachowanie się aktywności acetylocholinoesterazy (AChE), fosfatazy zasadowej (FZ) i fosfatazy kwaśnej (FK) w mózgu szczura po zatruciu Fenchlor-

fossem. Zastosowano 3 modele zatrucia: ostry — jednorazowy, 14 dniowy — wielokrotny oraz tzw. „adaptacyjny”. Dla AChE wykonano również badanie dynamiki zmian aktywności po zatruciu ostrym.

W modelu ostrym aktywność wszystkich badanych enzymów ulegała zmianom (inhibicji lub stymulacji) w zależności od enzymu i dawki pestycydu. Wykazano istnienie dwóch faz hamowania aktywności AChE (po 2 oraz 24 godzinach) związane prawdopodobnie z działaniem metabolitów Fenchlorfosu. Zahamowanie aktywności AChE utrzymuje się przez okres tygodnia. W modelu 14-dniowym zaobserwowano zahamowanie aktywności AChE i FZ, natomiast w przypadku FK — stymulację.

Wyniki doświadczenia „adaptacyjnego” mogą świadczyć o istnieniu mechanizmów przystosowawczych w odniesieniu do fosfataz.

A. Сулиньски, Е. Скальска, К. Обрусевич

АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ  
И КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В МОЗГЕ КРЫСЫ  
ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФЕНХЛОРФОСОМ

Резюме

Исследовали активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ), щелочной эстеразы (ЩФ) и кислой фосфатазы (КФ) в мозге крысы после отравления фенхлорфосом.

Были использованы 3 модели отравления: острое — однократное, 14-ти дневное — многократное и, так называемое, „адаптационное”. Для АХЭ были проведены также исследования динамики изменения активности при острых отравлениях.

Исследование динамики изменений активности АХЭ обнаружило существование двух фаз угнетения ферментативной активности (через 2 и 24 часа). Угнетение активности АХЭ удерживалось в течение недели. В острых моделях активность всех исследуемых ферментов изменялась — угнеталась или стимулировалась — в зависимости от дозы пестицида. В 14-ти дневной модели наблюдалось угнетение АХЭ и ЩФ и стимулирование КФ.

Результаты „адаптационного” эксперимента могут свидетельствовать о существовании приспособительных механизмов в отношении фосфатаз.

REFERENCES

1. Bajgar J.: Inhibition of AChE in different parts of the rat brain by isopropyl methylphosphone fluoride in vitro and in vivo experiments. *Biochem. Pharmacol.*, 1972, 21, 687—690.
2. Barzu T., Cuparencu B., Hantz A.: Action of organophosphorus compounds on cell organelles. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 185—189.
3. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenia ATP, ADP i AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem dichlorfossem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 259—272.
4. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone A. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88—95.
5. Klarner S.: Zastosowanie Ronnelu w weterynarii w świetle literatury. *Med. Wet.*, 1966, 11, 675—679.



6. Linhard K., Walter K.: Phosphatasen. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmayer H. U. (ed.). V-g Chemie, Weinheim 1962.
7. O'Brien R. T.: Toxic phosphorus esters, chemistry, metabolism and biological effects. Academic Press, N.Y., 1960, 231.
8. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach in vitro. Roczn. P.Z.H., 1975a, 26, 347—356.
9. Pachecka J., Suliński A., Ziółkowska G.: The activities of some esterases of the rat brain after intoxication by organophosphate insecticides Dichlorvos and Trichlorphon. Neuropat. Pol., 1975b, 13, 455—467.
10. Palut D., Grzymała W.: Wchłanianie, przemieszczanie w tkankach i wydalanie Fenclorfosu u szczura, Roczn. P.Z.H., 1971, 22, 591—594.
11. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznymi insektycydami dichlorfosem i trichlorfonem. Neuropat. Pol., 1975, 13, 273—281.
12. Skalska E., Suliński A., Obrusiewicz K.: Aktywność cholinoesterazy, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w osoczu krwi szczura w następstwie zatrucia Fenclorfosem. 1976 — in preparation.

Authors address: Department of Drug Metabolism Institute of Biopharmacy. Banacha 1, 02-097 Warszawa.

## KOMUNIKATY

W okresie od 26 czerwca do 1 lipca 1977 odbędzie się w Kopenhadze VIII Międzynarodowe Sympozjum na temat czynności mózgu, metabolizmu i krążenia mózgowego, zorganizowane przez Skandynawskie Towarzystwo Neuropatologiczne.

Termin nadsyłania streszczeń mija 20 stycznia 1977 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr N. A. Lassen,  
Dept. of Clinical Physiology,  
Bispebjerg Hospital  
23 Bispebjerg Bakke  
DK-2400 Copenhagen, Denmark

\* \* \*

W okresie od 25 do 27 maja 1978 odbędzie się w Schwerin (NRD) Sympozjum, poświęcone uszkodzeniom o.u.n. w wyniku diagnostyki i terapii, zorganizowane przez Towarzystwo Neurologiczne DDR.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr Hackenberg,  
Chefarzt der Abteilung für Neuropathologie,  
Bezirksnervenklinik Schwerin,  
27 Schwerin, Wismarsche Str. 393—395

*Jerzy Dymecki*

IRENA RAKOWSKA, ANNA DYBOWSKA, EWA MALATYNSKA,  
ANNA KIELDUCKA

THE ACTIVITIES OF SOME OXIDOREDUCTASES  
AND RESPIRATORY CONTROL IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA  
FOLLOWING FENCHLORPHOS INTOXICATION \*)

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy,  
Warsaw

Head: Assoc. Prof. W. Bicz

Thiophosphoroorganic insecticides are oxidized in mammals to their corresponding oxygen analogues (Plapp et al. 1958, Stiasni et al. 1965, Mucke et al. 1970, Yang et al. 1971). Previous studies in our Laboratory have indicated that oxygen analogue of Fenchlorphos (0,0-dimethyl-0,2,4,5-trichlorophenyl phosphate) markedly inhibits the cytochrome oxidase activity in the mitochondrial fractions of brain and liver (Sitkiewicz et al. 1976). In contrast to the parent compound the oxygen analogue caused *in vitro* uncoupling of the oxidative phosphorylation of brain or liver mitochondria (Sitkiewicz 1975). Toxicity of thiophosphoroorganic compounds is a reflection of the degradative metabolism and the formation of active metabolites, and not only related to the toxic activity of the parental insecticide but also to that of the metabolites formed (O'Brien 1965, Nolen 1970).

The aim of the work was to evaluate the effect of single and repeated intoxication with Fenchlorphos on the degree of coupling of oxidative phosphorylation and the cytochrome oxidase and on the succinate dehydrogenase activities in rat brain mitochondrial fractions.

MATERIAL AND METHODS

Male noninbred albino rats of 200 g body weight were used. In the experimental period the animals were fed a standard diet. The insecticide was administered *per os* in 1 ml oil solution in 2%, 5%, 10% and 50% LD<sub>50</sub> doses, the LD<sub>50</sub> dose being established as 1250 mg/kg of body weight (Gainess 1960). The rats were divided into 2 groups representing

\*) This work was supported in a part by Polish Academy of Sciences (Research Programme 09.4.1.3.).

2 intoxication models. In group I (single intoxication) Fenchlorphos was administered in 5%, 10%, 50% LD<sub>50</sub> doses and the animals were decapitated 2 or 24 hrs later. In group II (repeated intoxication) the insecticide was given in 2%, 5% and 10 % LD<sub>50</sub> doses during 14 consecutive days. The assays were performed next day after last administration of the insecticide. The control animals were given 1 ml oil at corresponding times.

The mitochondrial fractions were isolated by the method of Moore and Jobsis (1970). All preparations were carried out at 0°—4°C. Cerebral hemispheres were rinsed with the isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0,2 mM K EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) and the tissue was homogenized in a glass homogenizer with a Teflon pestle. The homogenate was centrifuged for 3 min at 3000 x g. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged again for 3 min at 30000 x g. Afterwards the pellet was resuspended in the isolation medium, and mitochondria were pelleted for 3 min at 30000 x g. Final mitochondrial pellet was suspended in the isolation medium to the protein concentration of 6—8 mg/ml.

Protein determination and enzymes activities determination were performed after solubilization of the mitochondrial fraction in 0.5% sodium deoxycholate. The cytochrome oxidase activity was assayed spectrophotometrically in a medium containing 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) and 125 mM HCl (Smith 1954). Cytochrome c was reduced by means of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and desalted on a Sephadex G-25 column (Yonetani, Ray 1965). The enzyme activity was expressed as the I order reaction rate constant per 1 mg protein.

The succinate dehydrogenase activity was determined by a spectrophotometric method in a medium containing: 0,1 M phosphate buffer pH 7,4, 1,5 mM potassium cyanide, 20 mM potassium succinate, 0,05 mM 2,6-dichlorophenolindophenol, 1,8 mM phenazine methasulphate (King 1963). The enzyme activity was expressed as nmoles of succinate oxidized by 1 mg protein/min. Protein was determined by the biuret method (Layne 1957).

Oxygen consumption was measured polarographically (Estrabrook 1967) using a stationary platinum-silver Clark's type oxygen electrode on the OH-102 polarograph (Radelkis, Hungary). The measurements were performed at a constant potential —0,6 V at 30°C. The medium for determination of oxygen consumption by brain mitochondria contained 300 mM mannitol, 10 mM HCl, 0,2 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7,4), 1 mg/ml bovine serum albumine and 1,5—2,0 mg mitochondrial protein. Respiration in state 4 was induced by addition of 3,3 mM potassium succinate. The active

respiration (state 3) was evolved by addition to the reaction mixture of 500  $\mu$ moles of ADP. ADP/O ratios were calculated by dividing the  $\mu$ moles of ADP added by the  $\mu$ atoms of oxygen consumed during state 3 respiration. Respiratory control ratio (RCR) was calculated from the respiration rate in state 3 divided by the respiration rate when the phosphorylation of ADP was completed.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of the cytochrome oxidase activity assay in the rat brain mitochondrial fractions following single and repeated intoxication of rats with Fenchlorphos are presented in Table 1.

Table 1. Activity of cytochrome oxidase in rat brain mitochondria following single and repeated Fenchlorphos intoxication

Tabela 1. Aktywność oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczura po jednorazowym i wielokrotnym zatruciu Fenchlorfosem

Model of intoxication Model zatrucia		Activity of cytochrome oxidase k/sec/mg protein Aktywność oksydazy cytochromowej k/sek/mg białka			
Insecticide administration Podanie insektycydu	Dose of insecticide in per cent of LD <sub>50</sub> Dawka w procentach LD <sub>50</sub>	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	n	p	%
Single; after 2 h Jednorazowo; po 2 godz.	Control Kontrola	1.30 ± 0.15	10		100
	5	1.43 ± 0.39	5	≥ 0.05	110.0
	10	1.83 ± 0.56	6	≥ 0.05	140.8
	50	1.63 ± 0.33	8	≥ 0.05	125.4
Single; after 24 h Jednorazowo; po 24 godz.	Control Kontrola	1.20 ± 0.08	13		100
	5	1.38 ± 0.23	7	≥ 0.05	115.0
	10	1.43 ± 0.29	5	≥ 0.05	119.2
	50	1.36 ± 0.34	10	≥ 0.05	113.3
Repeated for 14 days Wielokrotne — 14 dni	Control Kontrola	1.25 ± 0.10	9		100
	2	1.36 ± 0.10	5	≥ 0.05	108.8
	5	1.72 ± 0.30	6	≤ 0.05	137.6
	10	1.12 ± 0.34	6	≥ 0.05	89.6

$\bar{X} \pm S\bar{X}$  — arithmetic mean ± mean error of the mean  
średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

n — number of animals  
liczba zwierząt

p — probability  
prawdopodobieństwo

The enzyme activity was found to be increased two hours after administration of the insecticide at any dose, the strongest effect being noted with the 10% LD<sub>50</sub> dose. A similar effect was observed 24 hrs after intoxication. Although the statistical analysis revealed insignificance of the changes ( $0,1 \geq p \geq 0,05$ ), there was evident tendency towards stimulation of the activity. A statistically significant stimulatory effect, about 40 per cent, was observed to follow 14-days repeated administration of the insecticide in 5% LD<sub>50</sub> dose, but not in 2% or 10% LD<sub>50</sub> doses. Table 2 illustrates the effect of the above intoxication variants on the succinate dehydrogenase activity.

Table 2. Activity of succinate dehydrogenase in rat brain mitochondria following single and repeated intoxication with Fenchlorphos

Tabela 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej frakcji mitochondrialnej mózgu szczura po jednorazowym i wielokrotnym zatruciu Fenchlorfosem

Model of intoxication Model zatrucia		Activity of succinate dehydrogenase nmole/min/mg protein Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej nmole/min/mg białka			
Insecticide administration Podanie insektycydu	Dose of insecticide in per cent LD <sub>50</sub> Dawka w procentach LD <sub>50</sub>	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	p	%
Single; after 2 h Jednorazowo; po 2 godz.	Control Kontrola	21.2 ± 3.8	10		100
	5	21.8 ± 3.1	6	≥ 0.05	102.8
	10	24.1 ± 1.4	5	≥ 0.05	113.7
	50	9.4 ± 0.7	8	≤ 0.05	44.3
Single; after 24 h Jednorazowo; po 24 godz.	Control Kontrola	20.4 ± 2.3	12		100
	5	18.1 ± 3.9	6	≥ 0.05	88.7
	10	22.3 ± 1.3	6	≥ 0.05	109.3
	50	11.9 ± 0.9	11	≤ 0.05	58.3
Repeated for 14 days Wielokrotne — 14 dni	Control Kontrola	19.0 ± 2.3	8		100
	2	12.4 ± 1.4	5	≤ 0.05	65.2
	5	15.4 ± 0.15	5	≥ 0.05	81.2
	10	20.8 ± 0.95	5	≥ 0.05	109.5

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$  — arithmetic mean ± mean error of the mean  
średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

n — number of animals  
liczba zwierząt

p — probability  
prawdopodobieństwo

A marked inhibition of the enzyme activity after 2 and 24 hrs following single intoxication with 50% LD<sub>50</sub> dose was noted, about 55 per cent and 40 per cent respectively. Other doses (5% or 10% LD<sub>50</sub>) after single or repeated administration did not affect the succinate dehydrogenase activity. Repeated administration of 2% LD<sub>50</sub> dose led to a statistically significant drop of the activity by 35 per cent.

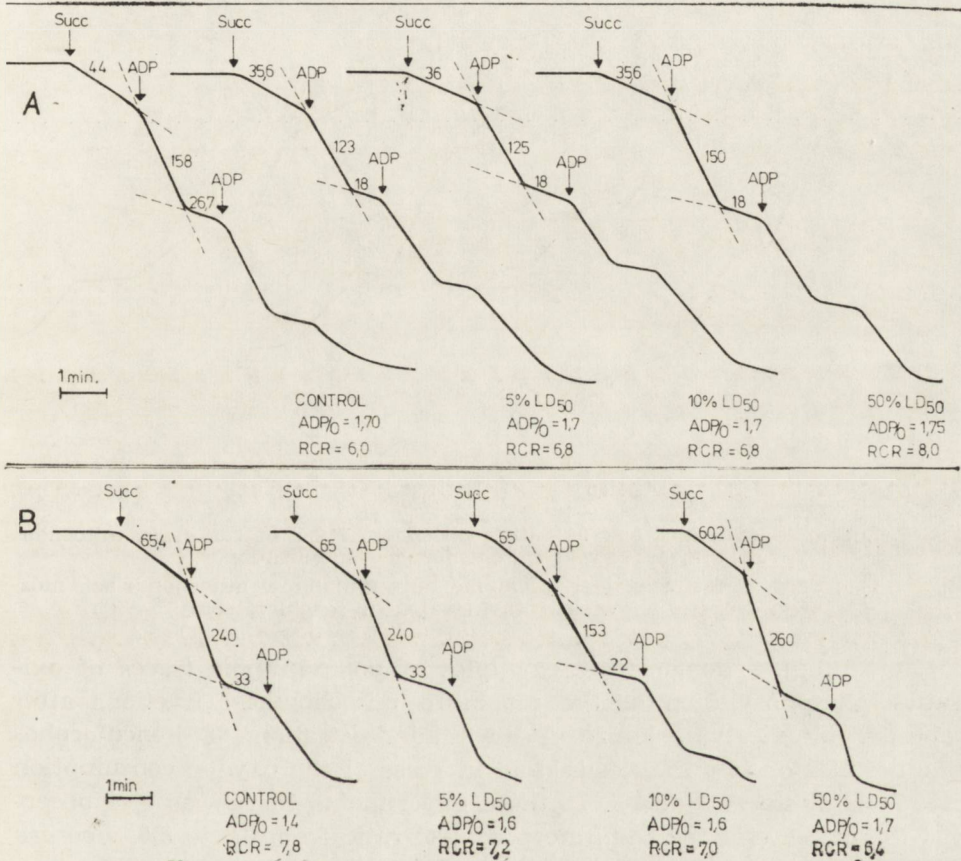


Fig. 1. Succinate oxidation and oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria after single Fenchlorphos intoxication. A — 2 hrs after insecticide administration, B — 24 hrs after insecticide administration.

Ryc. 1. Oksydacyjna fosforylacja i utlenianie bursztynianu w mitochondriach mózgu szczura po jednorazowym zatruciu fenchlorfosem. A — 2 godz. po zatruciu, B — 24 godz. po zatruciu.

Data in Figs. 1A and 1B demonstrate examples of polarographic traces of oxidative phosphorylation in the rat brain mitochondrial fractions after single intoxication. No difference in oxygen consumption in the presence of succinate in respiration states 3 and 4 was observed 2 hrs

after intoxication with either of the examined doses (Fig. 1A). Both the  $\Delta DP/O$  ratio and the RCR index remained unchanged with respect to the control values. As indicated in Fig. 1B twenty four hours after single intoxication with 10%  $LD_{50}$  dose the respiratory rate in state 3 decreased from 240  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$  (control rats) to 153  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$  (intoxicated rats). Other recorded parameters showed no significant deviation from the control animals.

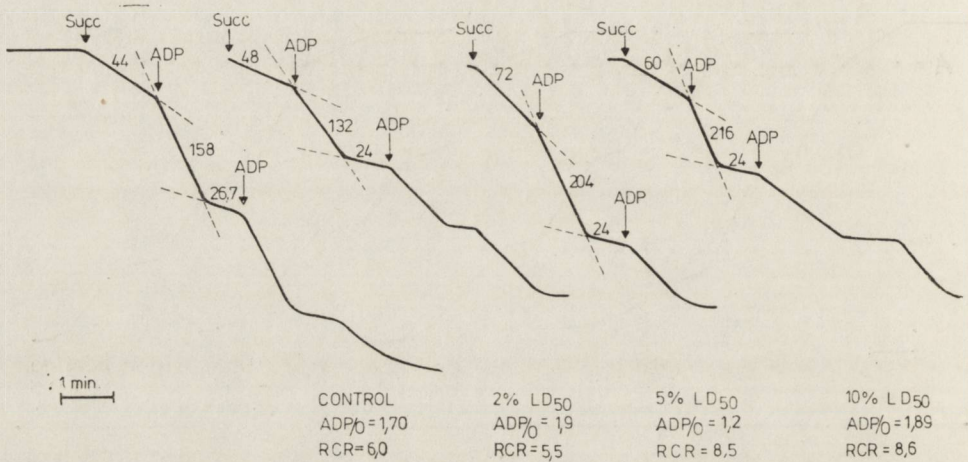


Fig. 2. Succinate oxidation and oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria after repeated Fenchlorphos intoxication.

Ryc. 2. Oksydacyjna fosforylacja i utlenianie bursztynianu w mitochondriach mózgu szczura po wielokrotnym zatruciu fenchlorfosem.

Data in Fig. 2 demonstrate examples of polarographic traces of oxidative phosphorylation of the rat brain mitochondrial fractions after repeated intoxication. Fourteen days administration of Fenchlorphos in a dose 5% or 10%  $LD_{50}$  caused an increase of the oxygen consumption rate in both states 3 and 4. In these experiments there was also observed the increase of the respiratory control ratio from 6,0 to 8,5, whereas ADP/O ratio was decreased from 1,7 to 1,2.

Single and repeated administration of Fenchlorphos in all applied doses caused an increase in the cytochrome oxidase activity in the solubilized brain mitochondrial fractions. High insecticide doses led to a decrease of the succinate dehydrogenase activity. In turn the application of low doses remained without effect on the enzyme activity after single administration, but appeared inhibitory when administered repeatedly.

Respiratory control and oxidative phosphorylation of brain mitochondrial fraction from intoxicated rats did not differ from the control. Com-



parison of the results concerning the enzyme activity with an ATP formation in the brain of intoxicated rats showed that the solubilization is the factor disclosing changes in the succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities. When the mitochondrial membranes remain unbroken (without solubilization) the changes are without biological significance. A similar phenomenon has been observed in experiments with other organophosphate insecticides. Intoxication with Dichlorvos (Biczowa et al. 1975) or Trichlorphon (Sikorska et al. 1975) did not change the respiratory capacity of the brain homogenates. However, a decrease of the cytochrome oxidase activity became apparent after solubilization of brain mitochondrial fraction (Sitkiewicz, Zalewska 1975).

The authors are greatly indebted to Prof. W. Bicz and dr D. Sitkiewicz for their kind interest and valuable advice during the investigations. We also thank Mrs. B. Dyjak for skillful technical assistance.

I. Rakowska, A. Dybowska, E. Malatyńska, A. Kiełducka

#### AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH OKSYDOREDUKTAZ I KONTROLA ODDECHOWA W MITOCHONDRIACH MÓZGU SZCZURA PO ZATRUCIU FENCHLORFOSEM

##### Streszczenie

Zbadano zachowanie się oksydacyjnej fosforylacji oraz aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej we frakcjach mitochondrialnych mózgu szczura po zatruciu zwierząt tiofosforoorganicznym insektycydem — fenchlorfosem. Insektycyd podawano doustnie w dawce 5%, 10% i 50% LD<sub>50</sub>. Badania biochemiczne wykonywano w 2 i 24 godz. po jednorazowym podaniu oraz po 14-todniowym zatruciu fenchlorfosem w dawkach 2%, 5% i 10% LD<sub>50</sub>.

Zarówno po jednorazowym jak i po wielokrotnym zatruciu stwierdzono podwyższenie aktywności oksydazy cytochromowej w solubilizowanych mitochondriach mózgu. Po jednorazowym zatruciu wysoką dawką insektycydu (50% LD<sub>50</sub>) obserwowano zahamowanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Podobny efekt stwierdzono po wielokrotnym podawaniu dawki 2% LD<sub>50</sub>. W obu zastosowanych modelach zatrucia nie obserwowano istotnych zmian w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji frakcji mitochondrialnej mózgu.

И. Раковска, А. Дыбовска, Е. Малатыньска, А. Келдуцка

#### АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФЕНХЛОРФОСОМ

##### Резюме

Исследовали окислительное фосфорилирование и активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриальной фракции мозга крысы при отравлении организма тиофосфоорганическим инсектицидом — фенхлорфосом.

Инсектицид подавали внутрeнне в дозе 5, 10 и 50% ЛД<sub>50</sub>. Биохимические исследования проводили через 2 и 24 часа после однократной подачи, а также после 14-дневного отравления фeнхлорфосом в дозах 2%, 5% и 10% ЛД<sub>50</sub>.

Как при однократном, так и после многократного отравления обнаруживалось увеличение активности цитохромоксидазы солюбилизованных митохондрии мозга. Активность сукцинатдегидрогеназы после однократного отравления высокой дозой инсектицидов (50% ЛД<sub>50</sub>) была подавлена. Такой же эффект был обнаружен после многократной подачи дозы 2% ЛД<sub>50</sub>. В обеих моделях отравления не было отмечено существенных изменений в процессе окислительного фосфорилирования митохондриальной фракции крысы.

#### REFERENCES

1. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenie ATP, ADP, AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem dichlorofosem (DDVP). *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 259—272.
2. Estrabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and ADP; the polarographic measurements of ADP/O ratios. In: *Methods in enzymology*, Ed. Estrabrook, Pullman, Academic Press, New York, 1967.
3. Gainess T. B.: The acute toxicity of pesticide to rats. *Toxicol. appl. Pharm.* 1960, 2, 88—99.
4. King T. E.: Reconstruction of respiratory chain enzymes systems. *J. Biol. Chem.* 1963, 238, 4032—4036.
5. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in enzymology*, Ed. Colowick S. P., Kaplan M. O., Academic Press, New York, 1957.
6. Moore C. L., Jobsis F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 138, 295—305.
7. Mucke W., Alt K. O., Esser H. O.: Degradation of <sup>14</sup>C-labeled Diazinon in the rat. *J. Agr. Food Chem.* 1970, 18, 208—212.
8. Nolen J., O'Brien R. D.: Biochemistry of resistance to Paraoxon in strains of houseflies. *J. Agr. Food Chem.* 1970, 18, 802—808.
9. O'Brien R. D.: The role of activating and degradating enzymes in determining species specificity of toxicants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1965, 123, 156—162.
10. Plapp F. W., Casida J. E.: Bovine metabolism of organophosphorus insecticides. Metabolic fate of 0,0-dimethyl-0-/2,4,5-trichlorophenyl/phosphorothioate in rats and cow. *J. Agr. Food Chem.* 1958, 6, 662—667.
11. Smith L.: A study of some oxidative of Bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 50, 285—298.
12. Sikorska M., Biczowa B., Bicz W., Skonieczna M.: Glycogen content, glycolysis and respiratory activity and ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following Trichlorphon intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 447—457.
13. Sitkiewicz D.: Procesy utleniania w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego i wątroby szczura w następstwie działania insektycydów tiofosforoorganicznych. Ph. D. thesis, Medical Academy of Warsaw, 1975.
14. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 463—469.
15. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: Effect of Trolen and its oxygen analog on the succinate oxidation by rat brain and liver homogenates and mitochondria. *Pest. Biochem. Physiol.* 1976 in press.

16. Stiasni M., Rehbinder D., Deckers W.: Absorption, distribution and metabolism of 0-/4-Bromo-2,4-dichlorophenyl/-0,0-dimethyl phosphorothioate (Bromophos) in the rat. *J. Agr. Food Chem.* 1967, 15, 474—478.
17. Yang R. S. H., Hodgson E., Dauterman W. C.: Metabolism in vitro of Diazinon and Diazooxon in rat liver. *J. Agr. Food Chem.* 1971, 19, 10—13.
18. Yonetani T., Ray G. S.: Studies on cytochrome oxidase, kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 3392—3398.

Authors' address: Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

## DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Na posiedzeniu Zarządu Głównego Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, które odbyło się 29 maja 1976, kontynuowano rozpoczęte na początku roku konsultacje z kierownikami terenowych ośrodków neurologicznych, mające na celu ustalenie stanu diagnostyki neuropatologicznej w poszczególnych województwach. Sytuację na terenie województwa wałbrzyskiego przedstawił doc. J. Hołyst, kierownik Oddziału Neurologiczno-Neurochirurgicznego Szpitala Górniczego w Wałbrzychu.

Prof. M. J. Mossakowski przedstawił projekt raportu o stanie diagnostyki neuropatologicznej, opracowanego dla Komitetu Nauk Neurologicznych PAN.

Następnie omówiono stan przygotowań do Polsko-Niemieckiego Sympozjum Neuropatologicznego, które ma się odbyć w Warszawie w dniach 23—25 września 1976 r.

Na koniec przedstawione zostało sprawozdanie z posiedzenia Rady Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego, które odbyło się w Cambridge w dniach 2—3 kwietnia 1976. SNP było reprezentowane przez prof. M. J. Mossakowskiego i doc. J. Dymeckiego.

\* \* \*

W posiedzeniu Zarządu Głównego SNP, które odbyło się 26 czerwca 1976, wzięła udział na zaproszenie Zarządu prof. dr med. Maria Kobuszevska-Farynowa. Przewidywano z nią sprawę form i zakresu szkolenia anatomopatologów w zakresie neuropatologii.

Członkowie Zarządu zapoznali się z opracowaną przez Sekretarza SNP ankietą w sprawie diagnostyki neuropatologicznej, która ma zostać rozesłana do wszystkich ośrodków neurologicznych, neurochirurgicznych i anatomopatologicznych oraz do odpowiednich towarzystw naukowych dla zebrania danych na temat stanu diagnostyki neuropatologicznej i potrzeb kadrowych, aparaturowych i szkoleniowych w zakresie dalszego rozwoju neuropatologii w kraju.

W związku z wyborem prof. M. J. Mossakowskiego na stanowisko Vice-przewodniczącego Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego zwolniło się jego miejsce jako delegata SNP w Radzie M.T.N. Na to wakujące stanowisko wybrany został prof. M. Wender.

*Jerzy Dymecki*

FOGNA SCHMIDT-SIDOR, ZBIGNIEW GENEROWICZ, GRAZYNA CHODERNA

PRZYPADEK OGROMNEGO POTWORNIAKA MÓZGU  
U 1-MIESIĘCZNEGO DZIECKA

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Kierownik Zakładu: doc. dr med. J. Dymecki

Oddział Chirurgiczny Miejskiego Szpitala Dziecięcego, Saska Kępa

Ordynator Oddziału: dr med. A. Przerwa-Tetmajer

Zakład Anatomii Patologicznej Miejskiego Szpitala Dziecięcego, Saska Kępa

Kierownik Zakładu: dr med. K. Wolska

Pierwszy zapis dotyczący potwornika pochodzi z tablic klinowych z Chaldei z 2000 r. p.n.e. i związany jest z symbolicznym znaczeniem, jakie przypisywali Chaldejczycy faktowi narodzin dziecka o 3 nogach, od którego to momentu rozpoczął się dobrobyt w kraju (Ballantyne 1894 cyt. za Grossem i wsp., 1951).

Willis (1962) określa potworniki jako prawdziwe guzy lub nowotwory złożone z wielu tkanek, z których część jest obca dla okolicy, w której rośnie guz. Definicja ta oparta jest na fakcie, że potworniki posiadają w pewnym stopniu zdolność nieskoordynowanego wzrostu i nie są jedynie wynikiem malformacji.

Potworniki śródczaszkowe należą do guzów rzadkich. W zestawieniach obejmujących przypadki potworników w grupie wieku 0—14 lat guzy wewnątrzczaszkowe stanowią od 1 do 5% (Wooley i wsp., 1967; Berry i wsp., 1969; Fraumeni i wsp., 1973).

Wśród wszystkich guzów wewnątrzczaszkowych potworniki stanowią mniej niż 1% (Zülch, 1956; Kunicki, 1960). Według Ingraham i Bailey'a (1946) częstość ich wzrasta do 15% jeżeli rozpatruje się materiał dziecięcy. Jednak w materiale Koosa i Millera (1971) obejmującym 700 przypadków wewnątrzczaszkowych guzów u dzieci, znajduje się tylko 1 przypadek potwornika, co stanowi zaledwie 0,14%.

Potworniki okolicy krzyżowo-guzicznej osiągając ogromne rozmiary mogą być przyczyną niestosunku porodowego (Gross i wsp. 1951; Waldhausen i wsp. 1963; Wilczyński 1970). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy doniesienia o podobnych zakłóceniach porodu spowodowanych przez potwornik mózgu co skłoniło nas do przedstawienia własnej obserwacji.

## OPIS PRZYPADKU

Dziewczynka L. C., ósme dziecko starszych, zdrowych rodziców. Dwoje dzieci zmarło z powodu zapalenia płuc. Ciąża bez powikłań, poród o czasie rozwiązany cięciem cesarskim z powodu niestosunku porodowego. Dziecko po urodzeniu reanimowano. Waga urodzeniowa 4000 g, długość 53 cm, obwód głowy 44 cm (norma — 36 cm), obwód klatki piersiowej 33 cm. Stwierdzono znacznego stopnia rozejście się szwów czaszkowych, brak odruchu wykrztusnego, obniżenie napięcia mięśniowego. Z powodu szybko narastającego obwodu głowy w drugiej dobie życia dziecko przeniesiono do oddziału chirurgicznego. W 21 dobie założono zastawkę Pudenza. Dren zastawki wielokrotnie ulegał zatkananiu przez tkankę mózgową. Mimo udrożniania zastawki ciśnienie śródczaszkowe nie zmniejszało się. Przy nakłuciach odbarczających uzyskiwano krwisty płyn. Obwód głowy wzrósł do 50 cm. Dziecko zmarło w wieku 1 miesiąca w stanie wyniszczenia, wśród zaburzeń oddechowych. Badania laboratoryjne: Płyn m.-rdz. krwisto-żółty, mętny, cytoza 115/3, limfocyty 70%, segmentowane 1%, komórki żerne 29%, białko 2420 mg%, cukier 20 mg%, chlorki 379 mg%. Nonne-Apelt (+), Pandy (+), Weichbrodt (—). Rtg czaszki: wodogłowie znacznego stopnia, zcieńczenie kości pokrywy czaszki, poszerzenie szwów czaszkowych i ciemiączek. Wentrykulografia: znacznego stopnia powiększenie komór bocznych. Komora III i IV nie uwidoczniły się. Na sekcji ogólnej stwierdzono ostry obrzęk płuc, zlewające zapalenie płuc, wyniszczenie.

Badanie makroskopowe mózgu: po otwarciu czaszki stwierdzono ogromny guz wypełniający prawie całkowicie jamę czaszki. Z płaszczka mózgowego zostały zachowane: podstawa płatów czołowych, skroniowych i prawego płata potylicznego oraz boczna część prawego płata ciemieniowego. Pień mózgu był cienki o znacznie wydłużonych konarach, móżdżek mały, spłaszczony. Opony były rdzawo podbarwione. Zawoje zachowanych części płaszczka mózgowego miały prawidłowy układ, były spłaszczone, rowki między nimi były płytkie. Na przekrojach czołowych grubość płaszczka mózgowego wynosiła od 0,1 do 0,5 cm. Tkanka mózgowa miała obniżoną spoistość i zatarty rysunek struktur, zwoje podstawy- niewidoczne na żadnym z przekrojów, sploty naczyńaste o rdzawym zabarwieniu. Powierzchnia wewnętrzna płaszczka mózgowego była ziarnista, wodociąg drożny, rysunek pnia i móżdżku zatarty.

Guz miał obwód 37 cm, był dobrze odgraniczony od tkanki mózgowej, nie naciekał jej, w żadnym miejscu nie był z nią zrośnięty. Powierzchnia guza była nierówna, kalafiorowata, pokryta lśniąca błoną. W części tylnej, w linii strzałkowej guz miał dość głęboką bruzdę. Na przekrojach guz był torbielowaty. Torbiele były wypełnione galaretowatą masą lub puste. Tkanka międzytorbielowa o spoistości chrząstki lub kości,

inne pola miały spistość tkanki mózgowej. Guz miał wygląd pstry z licznymi wylewami krwawymi.

Badanie histologiczne przeprowadzono na materiale utrwalonym w 10% formalinie, zatopionym w parafinie; metody barwienia: H-E, Klüver-Barrera, van Gieson. Wycinki pobrano z zachowanej części płaszcza mózgowego, opuszki, mózdzku, rdzenia szyjnego i piersiowego oraz z 6 poziomów guza.

Badanie mikroskopowe: powierzchnia guza pokryta jest cienką torbą łącznotkankową, od strony zewnętrznej w niektórych miejscach wysłaną komórkami śródbłonkowymi. Występujące w guzie torbiele wysłane są nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, w niektórych polach rogowaciejącym (ryc. 1), nabłonkiem oddechowym (ryc. 2), młodym nabłonkiem jelitowym z warstwą podśluzówkową i mięśniową (ryc. 3); liczne torbiele są wysłane dojrzałym nabłonkiem jelitowym (ryc. 4). W pobliżu układów odpowiadających cewie pokarmowej widoczne są nieliczne skupienia komórek mogących odpowiadać młodym komórkom wątrobowym. W jednym polu stwierdzono młodą tkanką płucną stopniem rozwoju odpowiadającą płucom 10-tygodniowego płodu (ryc. 5). Tkanka podporowa reprezentowana jest przez liczne twory chrzęstne i kostne, widoczne jest kostnienie na podłożu łącznotkankowym i chrzęstnym. Układ mięśniowy występuje w postaci mięśni gładkich i pojedynczych skupień mięśni prążkowanych. Gruczoły wydzielania wewnętrznego reprezentowane są przez utkanie warstwy pasmowatej kory nadnercza (ryc. 6). Sporą masę guza stanowi tkanka nerwowa występująca w kilku postaciach. Najliczniejsze są pola młodych komórek o układach odpowiadających nabłonkowi nerwowemu (ryc. 7), w niektórych polach widoczne są cewy przypominające budową pierwotną cewkę nerwową (ryc. 8). Bardziej dojrzałe elementy nerwowe występują w postaci małych, niedokształconych zakrętów zbudowanych z tkanki glejowej ze skupieniami bardzo młodych komórek. Od zewnątrz taki płacik ma czasami błonę łącznotkankową przypominającą oponę (ryc. 9). Trzecim elementem są liczne jamy wysłane komórkami przypominającymi ependymę; do światła tych jam sterczą czasami palczaste wyrostki lub brodawkowate twory odpowiadające budową splotowi naczyniastemu (ryc. 10). Z elementów obwodowego układu nerwowego występują skupienia komórek odpowiadające budową zwojom nerwowym z wychodzącymi z nich włóknami nerwowymi (ryc. 11). Oprócz wymienionych elementów neuroektodermalnych widoczne są rozety zbudowane z okrągłych komórek odpowiadające układom występującym w *retinoblastoma* (ryc. 12). Inną strukturą związaną z narządem wzroku jest pigmentowany nabłonek wyścielający małe torbiele (ryc. 8).

Zmiany wsteczne w guzie występują w postaci pól martwic, licznych bezpostaciowych zwapnień i obfitych wynacynień krwawych.

Zachowana tkanka nerwowa nie wykazuje nieprawidłowości rozwojowych, widoczne są jedynie zmiany wtórne w stosunku do toczącego się procesu: są to skupienia hemosyderyny w oponach, glejoza podoponowa i podwyściółkowa, znaczne uszkodzenie kory mózgowej z polami martwic, zgąbczenie istoty białej z ogniskami martwic z odczynem przerosłego astrogleju i obrzękiem oligodendrogleju. W wyściółce występują liczne ziarnistości wyściółkowe. W pniu, mózdzku i rdzeniu widoczne jest stosunkowo niewielkie zgąbczenie podłoża i uszkodzenie pojedynczych komórek nerwowych.

#### OMÓWIENIE

Wyniki badania sekcyjnego wyjaśniają obraz odmy czaszkowej, zmiany w płynie mózgowo-rdzeniowym i niepomyślny przebieg kliniczny, mimo zastosowania wczesnego leczenia operacyjnego.

Histologiczna budowa guza odpowiada potwórniakowi. W jego utkanie występują tkanki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych, przy czym stopień dojrzałości i zróżnicowania poszczególnych elementów jest różny; obok bardzo młodych struktur występują tkanki dojrzałe. Stosunkowo dużo jest młodej tkanki nerwowej, co w potwórniakach u dzieci starszych i ludzi młodych świadczy o złośliwości guza, natomiast u płodów i małych niemowląt obecność młodej tkanki nerwowej związana jest z wiekiem gospodarza i przy dłuższym przeżyciu tkanka taka może dojrzeć (Willis 1971).

*Ryc. 1.* Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący. HE. Pow. 100 ×.

*Fig. 1.* Cornified stratified squamous epithelium. HE. × 100.

*Ryc. 2.* Cewa o budowie oskrzela. HE. Pow. 60 ×.

*Fig. 2.* Bronchus-like tubule. HE. × 60.

*Ryc. 3.* Fragment ściany cewy o budowie niedojrzałego jelita. HE. Pow. 100 ×.

*Fig. 3.* Wall of the immature intestine-like tubule. HE. × 100.

*Ryc. 4.* Dojrzały nabłonek jelitowy. HE. Pow. 100 ×.

*Fig. 4.* Mature intestine epithelium. HE. × 100.

*Ryc. 5.* Tkanka płucna stopniem rozwoju odpowiadająca płucom 10-tygodniowego płodu. HE. Pow. 60 ×.

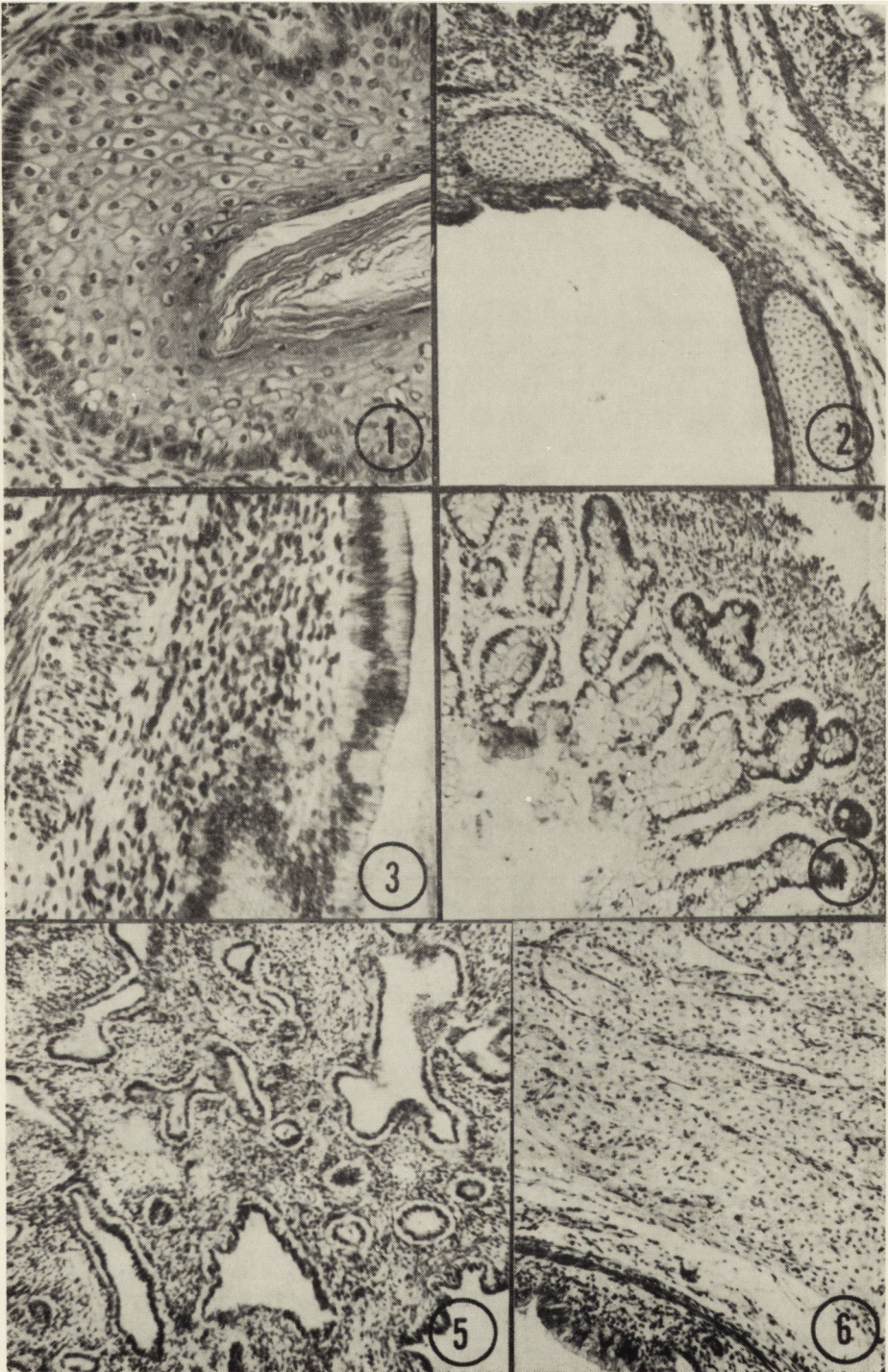
*Fig. 5.* Pulmonary tissue. Degree of its maturation corresponds to the 10-weeks-old foetus lungs. HE. × 60.

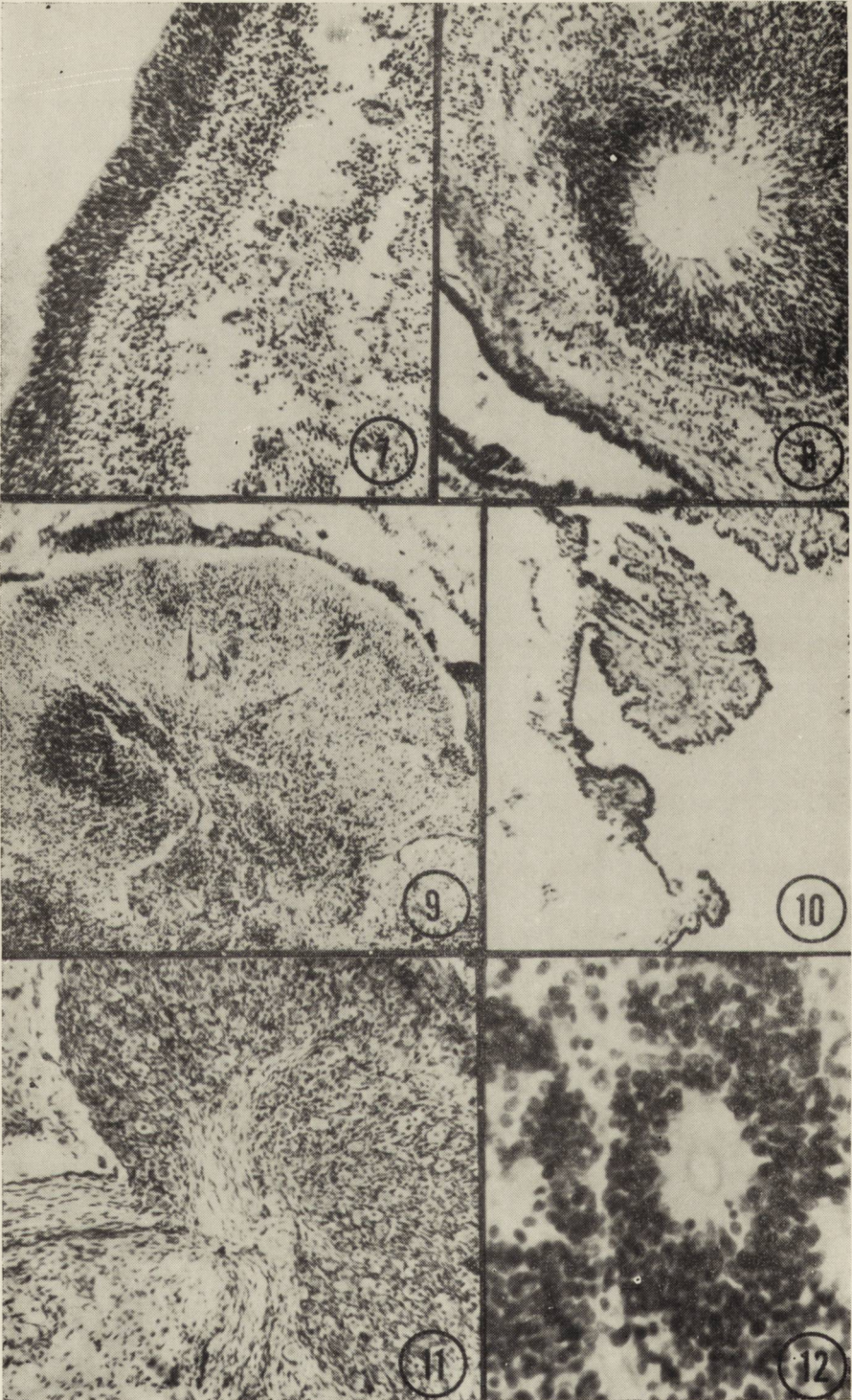
*Ryc. 6.* Tkanka o budowie warstwy pasmowatej kory nadnercza. HE. Pow. 100 ×.

*Fig. 6.* Tissue corresponding to the fascicular zone of the adrenal cortex. HE. × 100.

*Ryc. 7.* Ściana cewy wysłanej nabłonkiem nerwowym budową przypominającą ścianę pęcherzyków mózgowych płodu. HE. Pow. 60 ×.







Potworniaki w mózgu umiejscowione są najczęściej w okolicy szyszynki, a następnie w okolicy przysadki, blaszki czworaczej, w komorze III i IV (Russell i Rubinstein, 1963; Kernohan 1971). W naszym przypadku ustalenie punktu wyjścia guza jest niemożliwe z powodu bardzo dużego zniszczenia mózgu przez guz.

Szczególna budowa potworniaka, występowanie w nim niemal wszystkich możliwych tkanek, a czasami narządów, była powodem często fantastycznych poglądów na jego patogenезę. Rozpatrywano możliwość nieprawidłowego rozwoju płodu bliźniaczego, partenogenetycznego rozwoju komórek zarodkowych gonad gospodarza, czy też rozwoju przemieszczonych blastomerów. Poglądy te przeanalizował Askenazy (1907 cyt. za Nicholsonem, 1929) sugerując, że potworniaki wywodzą się z płodowych tkanek, które „wymknęły się” spod kontroli czynnika organizującego planowy rozwój zarodka (primary organizer). Za taką patogenезą potworniaków wypowiada się Willis (1937, 1962) i stwierdza, że przemawiają za tym wiek, w którym występują potworniaki, umiejscowienie, struktura i sposób wzrostu tych guzów.

Willis (1962) prawie całkowicie odrzuca możliwość występowania w potworniakach tworów mogących odpowiadać płodom. Na poparcie tego poglądu powołuje się na fakt niewystępowania w potworniakach kręgów, ani narządów choć posiadają one zazwyczaj większość tkanek. Z drugiej strony zdarza się, że nie występują w nich tkanki, które zawsze znajduje się u amorfotycznych płodów, jak np. skóra, czy tkanka szkieletowa; jednocześnie potworniaki posiadają czasami w nadmiarze jedną tkankę np. setki małych skupień tkanki nerwowej, torbieli jelitowych, czy oddechowych, których nigdy nie stwierdza się u amorfotycznych

*Fig. 7.* Tubular wall lined with neural epithelium of structural similarity to the wall of cerebral vesicles of the foetus. HE.  $\times 60$ .

*Ryc. 8.* Cewa wysłana nabłonkiem nerwowym. Obok cewa wysłana pigmentowanym nabłonkiem ocznym. HE. Pow.  $60 \times$ .

*Fig. 8.* Tubule lined with neural epithelium. Another tubule lined with pigmented ocular epithelium. HE.  $\times 60$ .

*Ryc. 9.* „Zakręt mózgowy” zbudowany z młodych elementów komórkowych przykryty bogatokomórkowym pasmem tkanki przypominającym oponę HE. Pow.  $\times 60$ .

*Fig. 9.* „Cerebral gyrus” composed of immature cellular elements covered with densely cellular meningeal-like band of tissue. HE.  $\times 60$ .

*Ryc. 10.* Twory o budowie splotu naczyniastego. HE. Pow.  $60 \times$ .

*Fig. 10.* Choroid plexus-like structures. HE.  $\times 60$ .

*Ryc. 11.* Niedojrzały zwój nerwowy. HE. Pow.  $60 \times$ .

*Fig. 11.* Immature neuronal ganglion. HE.  $\times 60$ .

*Ryc. 12.* Komórki tworzące układy retinoblastyczne. HE. Pow.  $200 \times$ .

*Fig. 12.* Cells forming retinoblastic structures. HE.  $\times 200$ .

tycznych płodów. Ważkim argumentem przeciwko uznaniu potworniaków za amorfotyczne płody jest występowanie w nich tkanki o różnym stopniu dojrzałości, możliwość stałego wzrostu z wytworzeniem nowych tkanek, przypadki zezłośliwienia guza i dawanie przerzutów.

Niektóre doniesienia wydają się potwierdzać możliwość występowania w utkaniu potworniaka tworów będących zawiązkiem płodu. Kimmel i wsp. (1950) opisali u 19-dniowego niemowlęcia potworniak mózgu wypełniający prawie całkowicie czaszkę, w którym rozpoznano 5 tworów mogących odpowiadać nieprawidłowo ukształtowanym płodom. Fakt ten, jak również stwierdzenie u dzieci z potworniakami różnych nieprawidłowości rozwojowych zarówno w miejscu rozwoju guza, jak i w innych narządach (Fraumeni i wsp. 1951) może stanowić przyczynek do zagadnienia w jakim stopniu potworniaki są wadą rozwojową, a w jakim prawdziwym nowotworem.

W naszym przypadku nie stwierdziliśmy nieprawidłowości w ukształtowaniu zachowanych części mózgu ani w innych narządach. Zaobserwowaliśmy natomiast dwa elementy morfologiczne opisane u noworodka bezmózgiego w guzku na szczycie głowy (Schmidt-Sidor i wsp. 1976). Były to zakręty mózgowie i postacie poronne splotu naczyniastego, zbudowane podobnie jak w przypadku wspomnianego wyżej dziecka bezmózgiego. Obie struktury opisywano w potworniakach niejednokrotnie, chcemy jedynie podkreślić, że w guzach tych występują elementy strukturalne, które stwierdza się w przypadku niewątpliwych zaburzeń rozwojowych i że powstanie potworniaków może wiązać się z nieprawidłowym zróżnicowaniem komórek zarodkowych.

Б. Шмидт-Сидор, З. Генерович, Г. Ходерна

#### СЛУЧАЙ ОГРОМНОЙ ТЕРАТОМЫ МОЗГА У МЕСЯЧНОГО РЕБЕНКА

##### Резюме

Представлен случай тератомы мозга у девочки, родившейся с помощью кесаревого сечения, произведенного в связи с невозможностью нормальных родов из-за большой головы ребенка. Несмотря на применение операционной декомпрессии размер головы увеличивался и ребенок умер в месячном возрасте при полном устоении.

При вскрытии была обнаружена огромных размеров тератома почти полностью заполняющая черепную полость. В опухоли наблюдались ткани походящие из всех трех зародышевых листков, в том числе большое количество нервной ткани в виде структур с различной степенью зрелости, ткань соответствующая коре надпочечников и легочной ткани в стадии развития, соответствующей легкому 10 недельного плода.

B. Schmidt-Sidor, Z. Generowicz, G. Choderna

## THE CASE OF ENORMOUS BRAIN TERATOMA IN A 1-MONTH OLD INFANT

## Summary

The work presents a case of brain teratoma in a girl born by Cesarean section because of delivery disproportion, caused by the large head of the newborn. In spite of decompressive treatment the head diameter was increasing and the infant died in a state of emaciation 1 month after birth.

Autopsy revealed an enormous teratoma, almost entirely filling the cranial cavity. In the tumour appeared tissues derived from all three embryonic germ layers, including a large amount of nervous tissue at different maturity stages, as well as a tissue corresponding to adrenal cortex and the pulmonary tissue at a developmental stage corresponding to the lungs of a 10-weeks old foetus.

## PIŚMIENICTWO

1. Berry C., Keeling J., Hilton C.: Teratomata in infancy and childhood, a review of 91 cases. *J. of Path.* 1969, 98, 241—252.
2. Gross R. E., Cattworthy H. W. Jr., Meeker I. A.: Sacrococcygeal teratomas in infants and children. *Surg. Gynec. Obstet.*, 1951, 92, 341—354.
3. Fraumeni J. F., Frederick P. L., Dalager N.: Teratomas in children: epidemiologic features. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973, 51, 1425—1430.
4. Ingraham F. D., Bailey O. T.: Cystic teratomas and teratoid tumors of the central nervous system in infancy and childhood. *J. Neurosurg.* 1946, 3, 511—532.
5. Kernohan J. W.: Tumor of congenital origin. *W: Pathology of nervous system.* Mc Graw-Hill Book Company, 1971, 145, 1929—1930.
6. Kimmel D. L., Moyer E. K., Peale A. R., Winborne L. W., Gotwals J. E.: A cerebral tumor containing five human fetuses. *Anat. Rec.* 1950, 106, 141—165.
7. Koos W. Th., Miller M. H. *Intracranial tumors of infants and children.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1971, 231—232.
8. Kunicki A.: 8 przypadków guzów szyszynki leczonych operacyjnie. *Neurol. Neurochir. Psychiat. Pol.* 1960, 4, 473—483.
9. Nicholson G. W.: The histogeny of teratomata. *J. Path. Bact.* 1929, 32, 365—386.
10. Russell D. S., Rubinstein L. J.: *Pathology of tumors of the nervous system.* Edward Arnold (Publ.) Ltd. 1963, 10—13.
11. Schmidt-Sidor B., Pietrow D., Jezierska K.: Przypadek anencephalii z heterotopowym umiejscowieniem tkanki nerwowej w płucu. *Neuropat. Pol.* 1976, w druku.
12. Waldhausen J. A., Kilman J. W., Vellios F., Battersley I. S.: Sacrococcygeal teratomata. *Surgery* 1963, 54, 933—949.
13. Wilczyński Z.: Olbrzymi potworniak okolicy krzyżowo-guzicznej płodu, przeskodą porodową. *PTL* 1970, 5, 182—183.
14. Willis R. A.: A further study of the structure of teratoma. *J. Path. Bact.* 1937, 45, 49—65.
15. Willis R. A.: The embryonic tumors and teratomas. *W: The borderland of embryology and pathology.* Butterworth, Washington 1962, 442—466.
16. Willis R. A.: Nervous tissue in teratomas. *W: Pathology of the nervous system.* Ed. Minkler J., Mc Graw-Hill Book Comp. 1971, 146, 1937—1943.

17. Wooley M. M., Ginsburg S., Di Censo S., Snyder W. M., Mirabal V. Q., Landing B. H.: Teratomas in infancy and childhood. *Ztsch. Kinderchirurgie und Grenzgebiete*, 1967, 4, 289—303.
18. Zülch K. J., Christensen E.: *Pathologische Anatomie der raumbeengenden intrakraniellen Prozesse*. Springer Verlag. Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1956, 552—555.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego,  
02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9.

JANUSZ ALWASIAK, ZBIGNIEW POLIS, ZYGMUNT ZAWADZKI

## A CASE OF ENDODERMAL SINUS TUMOUR (YOLK SAC TUMOUR)

Scientific Research Centre Medical Academy, Łódź  
Head: Prof. dr L. Woźniak  
Department of Neurosurgery, Medical Academy, Łódź  
Head: Prof. dr J. Brzeziński  
Department of Neurology, Medical Academy, Łódź  
Head: Prof. dr A. Prusiński

Among neoplasms of germ-cell origin reproducing structures found in the early embryo, Schiller (1939) distinguished a tumour, morphologically and histogenetically related to tumours of the seminoma (*dysgerminoma*) and trophoblastic type, which he called *mesonephroma ovarii*. In 1940 Kazancigil introduced the term *papilloendothelioma*, and in 1950 Teilum used the term *mesoblastoma*. In the course of time Teilum's view concerning the histogenesis of this tumour changed. In 1959 he found a similarity between perivascular sinusoid structures and endodermal sinuses in rat placentas, described by Duval and introduced the term endodermal sinus tumour which he called later *mesoblastoma vitellinum* (Teilum 1965). The introduction of the latter term was justified by the presence in the tumour pattern of the primitive mesenchyma, exo-coelomic mesoblast and epithelial elements of the yolk sac. Huntington and Bullock (1970a, 1970b) prefer the more general and self-explanatory term yolk sac tumour or yolk sac carcinoma (Pierce et al., 1970), but W.H.O. Commission for histological typing of ovarian tumours support the name endodermal sinus tumour (Serov et al. 1973).

This tumour occurs in children and young adults. Average age according to different sources is 17.9 (Santesson, Marrubini 1957), 20.3 (Neubecker, Breen 1962), 23.3 (Teilum 1965). It is characterized by great malignancy and low sensitivity to X-ray therapy. It extends *via* lymphatic vessels, shows tendency to disseminate in peritoneal cavity and metastasize mainly in viscera and lungs. A relatively small number of described cases does not allow for evaluation of the frequency of brain involvement. On the other hand, not all authors distinguish this type of tumour from the embryonal carcinoma group which means that the real

number is probably greater. Among the reported about 100 cases of embryonal carcinoma and endodermal sinus tumour we have not found cases with brain metastasis.

#### CASE REPORT

Clinical course. E.C., a 12 year old girl (case history no 7701) was hit on the head with a ball. Next day she vomited and after a few minutes became unconscious. Her mother said that she had been operated 18 months before for tumour of the right ovary, which proved to be a dermoid cyst with foci of malignant neoplasm of the embryonal type (Fig. 1). On admittance to Neurological Clinic she was unconscious and her general condition was poor. Neurological examination showed right hemiparesis with exaggerated reflexes on the right side and Babiński's sign. Lumbar puncture revealed hemorrhagic cerebro-spinal fluid under increased pressure. She regained consciousness after the administration of hypertonic solution of glucose. Speech disturbances could then be observed. After a few hours her condition became worse again, she lost consciousness; her pulse slowed down and her left pupil became dilated. Babiński's sign was found bilaterally. She was transferred to the Neurosurgical Clinic. EEG record showed a left-sided focus of delta-waves in the fronto-motoric region. Angiography of the left carotid artery revealed a definite signs of a space occupying lesion in the parietal region. Immediately after angiography the patient was operated with the clinical diagnosis of posttraumatic hematoma, though the possibility of neoplasm could not be excluded. The cranium was opened in the left fronto-parieto-temporal region. Dura was tense and a subdural liquid hematoma was found. After the hematoma had been removed, blood clots could be seen in the damaged brain tissue and subarachnoid space which were connected with a hemorrhagic focus of mandarin size. The focus was removed. There were no postoperative complications; the neurologic disturbances disappeared quickly and on the 10-th postoperative day the girl could walk upheld. Three months after the operation the body temperature rose suddenly and the presence of liquid in the right pleura was found. Pleural puncture showed hemorrhagic liquid and

---

*Fig. 1.* Microscopic appearance of the ovarian tumour. HE.  $\times 125$ .

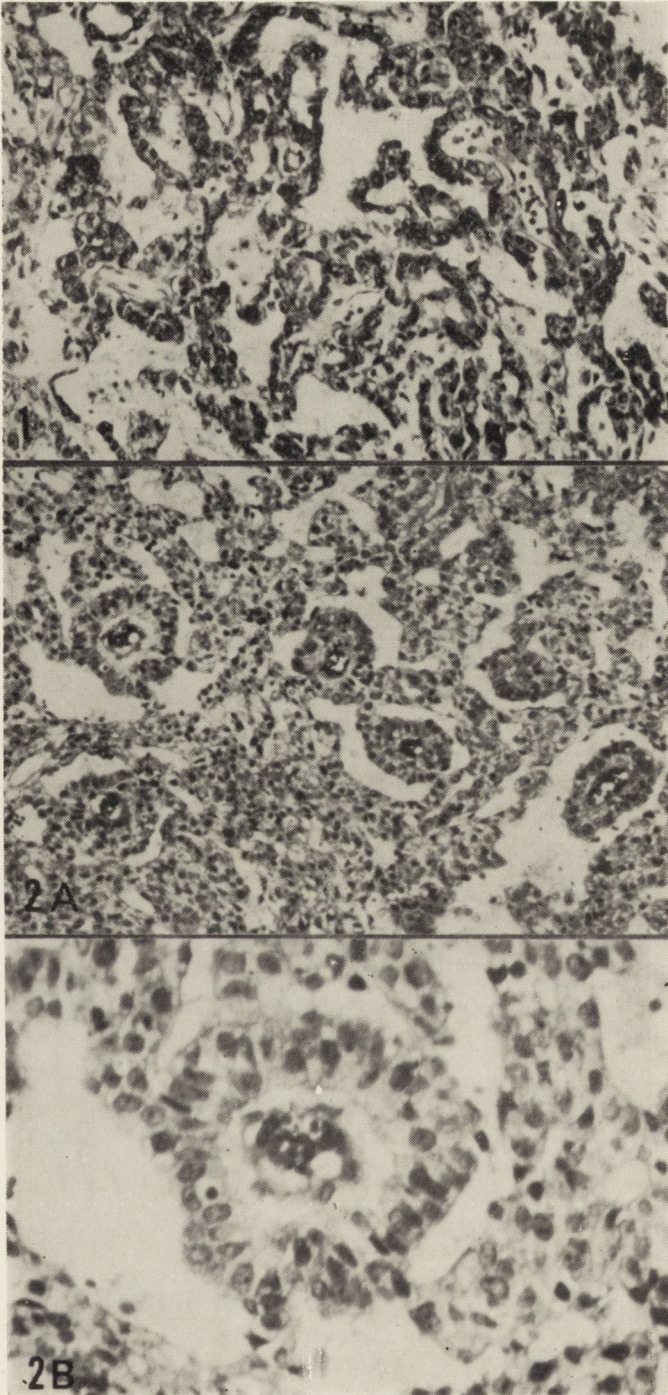
*Ryc. 1.* Obraz mikroskopowy guza jajnika. HE. Pow.  $125 \times$ .

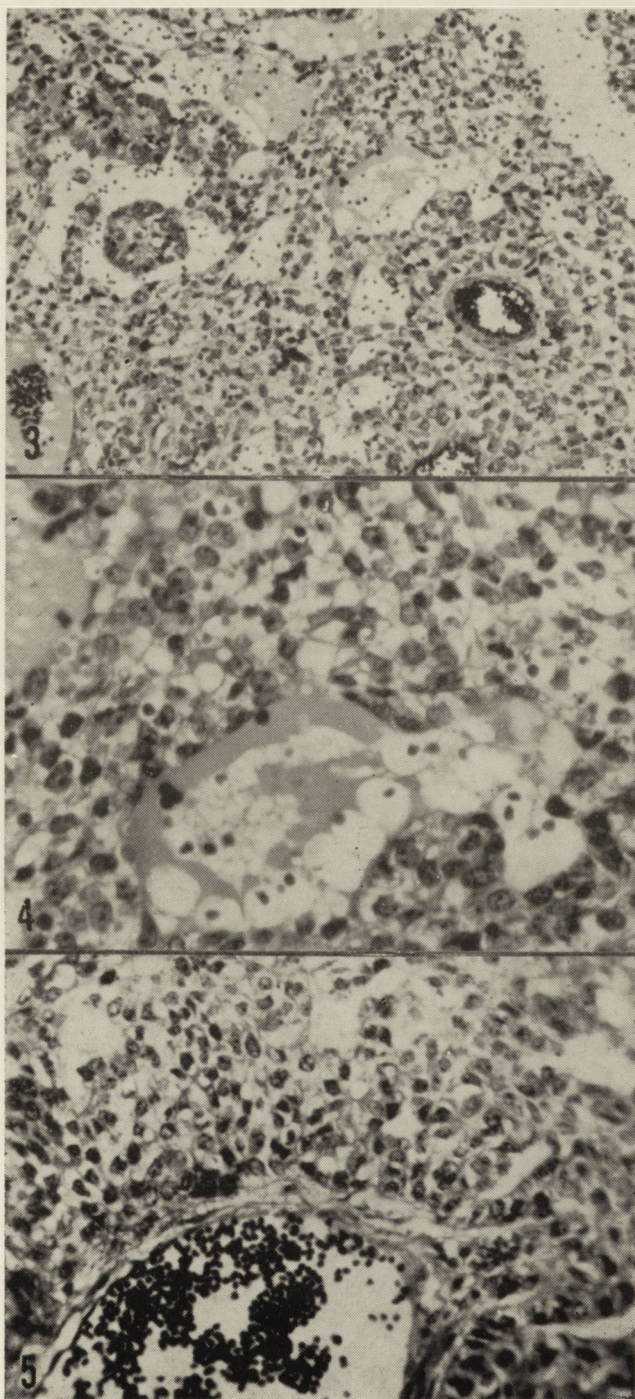
*Fig. 2* A and B. Microscopic appearance of the metastatic brain tumour. „Glomerulus-like units”. HE. A —  $\times 125$ , B —  $\times 330$ .

*Ryc. 2* A i B. Obraz mikroskopowy przerzutowego guza mózgu. Twory kłębuszkopodobne. HE. A — Pow.  $125 \times$ , B — Pow.  $330 \times$ .

*Fig. 3.* Cystic spaces with projecting *papillae*. HE.  $\times 125$ .







after its evacuation metastatic foci in the lung could be seen radiologically. The child's condition worsened rapidly, there appeared headache, vomiting, a protrusion of the site of decompression flap, and slight right hemiparesis which could suggest further metastatic foci in the brain. She was taken home in a very poor condition and died soon.

#### HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION

The specimen of operative material showed grayish-white strands among blood clots suggesting neoplasm. Microscopically this strands turned out to be fragments of malignant tumour of embryonal type. When compared with microscopic picture of the malignant parts of the ovarian tumour removed 1 year and 6 months earlier it showed considerable resemblance, though in brain metastasis the formation of structures found in extraembryonal membranes, especially extraembryonic mesoblast and yolk-sac endoderm, was distinctly prominent. It was characterized by the following patterns:

1. Glomerulus structures: small cavities, lined with flat or cuboid cells, with papillary projections covered with cuboid or columnar epithelium and thin-walled capillaries in the center, surrounded by soft connective tissue (Fig. 2). They corresponded to „glomerulus-like units” described by Schiller (1939).

2. System of different size cysts, lined with endothelium-like or cuboid cells, separated by tracts of loose connective tissue stroma with capillaries and few neoplastic cells (Fig. 3).

3. Areas of stellate mesodermal cells forming a loose vacuolated network, with wide cystic spaces, often contained hyalin, acidophilic and PAS-positive masses (Fig. 4).

4. Areas of dense, low differentiated cells, often surrounding larger blood vessels in a cuff-like manner (Fig. 5).

The whole picture corresponded to the description of endodermal sinus tumour (yolk sac tumour) of Teilum (1950).

#### DISCUSSION

The case seems to be interesting because of: 1) low incidence of tumour metastasis to the brain at such an early age; 2) rare occurrence of this

*Ryc. 3.* Przestrzenie torbielowate z wystającymi brodawkami. HE. Pow. 125 ×.

*Fig. 4.* Part of the tumour with reticulated pattern and small cysts containing acidophilic substance. HE. × 330.

*Ryc. 4.* Obszar guza o siateczkowej budowie z małymi torbielami zawierającymi kwasochłonną substancję. HE. Pow. 330 ×.

*Fig. 5.* Vessel with epithelial mantling. HE. × 300.

*Ryc. 5.* Naczynie otoczone mankietem komórek nabłonkowych. HE. Pow. 300 ×.

type of neoplasm of germ-cell origin and very rare localization of metastasis of this tumour in the brain; 3) rare manifestation of metastatic tumour in the form of intracranial hemorrhage.

As is well known malignant tumour metastasis to the brain occurs usually in the 4th and 5th decades of life, which is 4—9 per cent of all tumours operated in neurosurgical centers (Wisławski et al. 1964), while in children they are exceptionally rare.

Among the malignant ovarian tumours in girls the most common are embryonal carcinomas and malignant teratomas. The fact that only some authors distinguished endodermal sinus tumour from among embryonal carcinomas makes it difficult to determine exactly their epidemiological incidence. In the available literature we have not found any description of a case of endodermal sinus tumour with brain metastases. Nishiyama et al. (1966) point out that the central nervous system as a focus for metastases from neoplasms of the reproductive organs is unusual. Among 180 metastatic tumours of the brain, noted since 1949 till 1975 in the Neurosurgical Department of the Medical Academy in Łódź (Polis 1966), the case described above is the second germ tumour. The first one was chorionepithelioma in a 21 year old woman (Zierski et al. 1968).

The clinical course of the case under discussion was unusual and difficult to diagnose. Although the case history suggested metastasis to the brain, the occurrence of complaints in apparently full health one day after cranial trauma made us to suspect posttraumatic complications in the form of intracranial hemorrhage. In our opinion slight trauma caused hemorrhage from the damaged vessels in the area of neoplastic tissue. Another pathophysiological mechanism of nontraumatic subdural hematoma due to metastatic malignant disease is also possible. Braun et al. (1973) described an unusual complication of cancer metastasis to the central nervous system in the form of subdural hematoma due to obstruction of dural vessels by tumour cells. We have not found any tumour cells emboli in the vessels. Conspicuous is the similarity of the clinical course of our case to a fulminant form described mainly in cases of melanoma metastases, where death followed massive intracerebral and subarachnoid hemorrhages (Simionescu 1960).

J. Alwasiak, Z. Polis, Z. Zawadzki

#### ENDODERMAL SINUS TUMOUR (YOLK SAC TUMOUR)

#### Streszczenie

Przypadek dotyczy 12-letniej dziewczynki, która w 24 godz. po urazie miała objawy krwawienia śródczaszkowego, a przed 18 miesiącami była operowana z powodu guza jajnika. Po usunięciu krwiaka podwardówkowego wychodzącego z głą-

bi mózgu, znaleziono w usuniętym materiale wśród skrzepów krwi guz przypominający guz jajnika, odpowiadający budową endodermal sinus tumour (yolk sac tumour). Autorzy przedstawiają dane z piśmiennictwa dotyczące poglądów na histogenezę tego rzadkiego guza i wskazują na konieczność traktowania go jako odrębną jednostkę wśród grupy raków embrionalnych. Szczególną cechą przypadku jest przerzut nowotworu do mózgu pod postacią krwaka i w tak wczesnym wieku pacjentki.

Я. Альвасяк, З. Полис, З. Завацки

#### ENDODERMAL SINUS TUMOUR (YOLK SAC TUMOUR)

#### Резюме

Случай касается 12-ти летней девочки, у которой через 24 часа после травмы выступили сиптомы внутрочерепного кровотечения. 18 месяцами раньше она была оперирована по причине опухоли яичника. После удаления субсклерозной гематомы, выходящей из глубины мозга, в удаленном материале среди сгустков крови была найдена опухоль, напоминающая опухоль яичника, соответствующего строением endodermal sinus tumour (yolk sac tumour). Авторы приводят литературные данные, касающиеся взглядов на гистогенез этой редкой опухоли и указывают на необходимость его оценки как отдельной единицы среди группы эмбриональных раков. Особенной чертой случая является метастаза опухоли в виде гематомы и в столь раннем возрасте пациентки.

#### REFERENCES

1. Braun E. M., Burger L. J., Schlang H. A.: Subdural hematoma from metastatic malignant disease. *Cancer*, 1973, 32, 1370—1373.
2. Huntington R. W., Morgenstern N. L., Sargent J. A., Giem R. N., Richards A., Hanford K. C.: Germinal tumours exhibiting the endodermal sinus pattern of Teilum in young children. *Cancer*, 1963, 16, 34—47.
3. Huntington R. W., Bullock W. K.: Yolk sac tumours of the ovary. *Cancer*, 1970, 25, 1357—1367.
4. Huntington R. W., Bullock W. K.: Yolk sac tumour of extragonadal origin. *Cancer*, 1970, 25, 1368—1376.
5. Kazancigil T. R., Lagueur W., Ladewig P.: Papillo-endothelioma ovarii; report of 3 cases and dissension of Schiller's „mesonephroma ovarii”. *Amer. J. Cancer*, 1940, 40, 199—212.
6. Neubecker R. D., Breen J. L.: Embryonal carcinoma of the ovary. *Cancer*, 1962, 15, 546—556.
7. Nishiyama R. H., Batsakis J. G., Weaver D. K., Simrall J. H.: Germinal neoplasms of the central nervous system. *Arch. Surg.*, 1966, 93, 342—347.
8. Pierce G. B., Bullock W. K., Huntington R. W.: Yolk sac tumours of the testis. *Cancer*, 1970, 25, 644—658.
9. Poliss Z.: Metastatic tumours of the brain. Printed by Medical Academy in Łódź, Poland, 1966 (in Polish).
10. Santesson L., Marrubini G.: Clinical and pathological survey of ovarian embryonal carcinomas, including so-called „mesonephromas” (Schiller) or „mesoblastomas” (Teilum), treated at Radiumhemmet. *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 1957, 36, 399—419.

11. Schiller W.: Mesonephroma ovarii. *Amer. J. Cancer* 1939, 35, 1—21.
12. Serov S. F., Scully R. E., Sobin L. H.: *Histological typing of ovarian tumours*. W.H.O., Geneva, 1973.
13. Simionescu M.: Metastatic tumours of the brain. A follow up of 195 patients with neurosurgical considerations. *J. Neurosurg.*, 1960, 17, 361—373.
14. Teilmann I., Kassis H., Pietra G.: Primary germ cell tumour of the anterior mediastinum with features of endodermal sinus tumour. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1967, 70, 267—278.
15. Teilum G.: „Mesonephroma ovarii” (Schiller). An extraembryonic mesoblastoma of germ cell origin in the ovary and the testis. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1950, 27, 249—261.
16. Teilum G.: Endodermal sinus tumours of the ovary and testis: Comparative morphogenesis of the so-called mesonephroma ovarii (Schiller) and of extraembryonic (yolk sac allantoic) structures of the rat's placenta. *Cancer*, 1959, 12, 1092—1105.
17. Teilum G.: Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called „embryonal carcinoma” of the ovary. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1965, 64, 407—429.
18. Thiele J., Castro S., Lee K. D.: Extragonadal endodermal sinus tumour (yolk sac tumour) of the pelvis. *Cancer*, 1971, 27, 391—396.
19. Wiślawski J., Mazurowski W., Lewicki Z.: Metastatic tumours of the brain. *Nowotwory*, 1964, 14, 253—257 (in Polish).
20. Zierski J., Alwasiak J., Polis Z.: A case of cerebral metastases of chorionepithelioma. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1968, 2, 557—561 (in Polish).

Authors' address: Scientific Research Center of the Medical Academy, 91-425 Łódź, Sterlinga 5.

## T R E Ś Ć

H. Drac: Zmiany histologiczne w nerwie łokciowym i w nerwie łydkowym w stwardnieniu zanikowym bocznym . . . . .	421
A. Kamińska: Wpływ odnerwienia na mięsień szkieletowy szczura w procesie ontogenezy . . . . .	435
M. J. Mossakowski, B. Gajkowska: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej . . . . .	441
A. Suliński, E. Skalska, K. Obrusiewicz: Aktywność acetylocholinoesterazy, fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej mózgu szczura po zatruciu fenchlorfosem . . . . .	451
I. Rakowska, A. Dybowska, E. Malatyńska, A. Kiełducka: Aktywność niektórych oksydoreduktaz i kontrola oddechowca w mitochondriach mózgu szczura po zatruciu fenchlorfosem . . . . .	461
B. Schmidt-Sidor, Z. Generowicz, G. Choderna: Przypadek ogromnego potworkiaka mózgu u 1-miesięcznego dziecka . . . . .	471
J. Alwasiak, Z. Polis, Z. Zawadzki: Endodermal sinus tumour (yolk sac tumour) . . . . .	479

## C O D E R Ż A N I E

X. Драц: Гистологические изменения локтевого и икроножного нервов при амиотрофическом боковом склерозе . . . . .	421
A. Каминьска: Влияние денервации на скелетную мышцу крысы в процессе онтогенеза. Предварительное сообщение . . . . .	435
M. Я. Моссаковский, B. Гайковска: Электронно-микроскопическая картина повреждений глии, вызванных цианистым натрием в культуре ткани . . . . .	441
A. Сулинский, E. Скальская, K. Обрусевич: Активность ацетилхолинэстеразы, щелочной фосфатазы и кислой фосфатазы в мозге крысы при отравлении фенолхлорфосом . . . . .	451
I. Раковска, A. Дыбовска, E. Малатынская, A. Келдуцка: Активность некоторых оксидоредуктаз и дыхательный контроль митохондрий мозга крысы при отравлении фенолхлорфосом . . . . .	461
B. Шмидт-Сидор, Z. Генерович, G. Ходерна: Случай огромной тератомы мозга у месячного ребенка . . . . .	471
Я. Альвасяк, Z. Полис, Z. Завадки: Случай endodermal sinus tumour (yolk sac tumour) . . . . .	479

## C O N T E N T S

H. Drac: Histological changes in the ulnar and sural nerve in sclerosis lateralis amyotrophica . . . . .	421
A. Kamińska: Effect of denervation on the skeletal rat muscle in the process of ontogenesis. Preliminary communication . . . . .	435
M. J. Mossakowski, B. Gajkowska: Electron microscopic picture of glia lesions induced with cyanide in tissue culture . . . . .	441
A. Suliński, E. Skalska, K. Obrusiewicz: The activities of acetylcholinesterase, alkaline phosphatase and acid phosphatase of the rat brain following Fenchlorphos intoxication . . . . .	451
I. Rakowska, A. Dybowska, E. Malatyńska, A. Kiełducka: The activities of some oxidoreductases and respiratory control in rat brain mitochondria following Fenchlorphos intoxication . . . . .	461
B. Schmidt-Sidor, Z. Generowicz, G. Choderna: The case of enormous brain teratoma in a 1-month old infant . . . . .	471
J. Alwasiak, Z. Polis, Z. Zawadzki: A case of endodermal sinus tumour (yolk sac tumour) . . . . .	479

### WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:	
rocznie	— zł 100.—
półrocznie	— zł 50.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele — w terminach:

- do 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny
- do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienie w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy i instytucje 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 o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

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**