

D-13

C.165

eer 2



STOWARZYSZENIE NEUROPATHOLOGÓW POLSKICH

V.105

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

28,-

~~N. Chiro, M. S.~~

TOM XV

1977

ZESZ. 1

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XV

Styczeń-Marzec

Nr 1

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), Janusz Groniowski (Warszawa), Jerzy Kulczycki (Warszawa), Adam Kunicki (Warszawa), Tadeusz Majdecki (Warszawa), Mirosław Mossakowski (Warszawa), Ewa Osetowska (Mińsk Mazowiecki), Mieczysław Smialek (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, Mirosław 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 NERWACH OBWODOWYCH W RDZENIOWYM ZANIKU MIĘŚNI WERDNIGA-HOFFMANNA *

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. I. Hausmanowa-Petrusewicz

Opisywane przez licznych autorów zmiany w komórkach rogów przednich oraz w jądrach ruchowych nerwów czaszkowych w rdzeniowym zaniku mięśni Werdniga-Hoffmanna (choroba W-H) mają charakter zanikowo-zwyrodnieniowy. W mięśniach szkieletowych widoczny jest typowy obraz zaniku neurogennego; niektórzy autorzy rozważają płodowy charakter włókien mięśniowych w tym schorzeniu (Greenfield i Stern 1927, Adams i wsp. 1962, Fenichel i Engel 1963, Verger i wsp. 1970, Fidziańska 1974). W nielicznych opisach korzeni rdzeniowych podkreślano znaczne ścięczenie korzeni przednich, demielinizację włókien, rozplem tkanki włóknistej, a ostatnio także obecność wiązek gleju (Rothman 1909, Batten 1911, Kaumheimer 1913, Wälle i Hetz 1917, Holmos 1920, Michel 1923, Greenfield i Stern 1927, Byers i Banker 1961, Arnold 1963, Chou i Fakadej 1971, Chou 1973). Nie znaleziono zmian w korzeniach tylnych, natomiast w kilku przypadkach stwierdzono zmiany w komórkach zwojów kręgowych (Ajuriaguerre 1950, Radermecker 1951, Carpenter 1975, Marshall i Duchen 1975, Rafałowska 1975). W niezbyt licznych badaniach dotyczących nerwów obwodowych zwracano uwagę na ogromną przewagę cienkich włókien mielinowych, opisywano zmiany typu zwyrodnienia Wallera, wskazywano na proces demielinizacyjny włókien (Rothman 1909, Griffith i Spiller 1911, de Lange 1919, Michael 1923, Greenfield i Stern 1927, Byers i Banker 1961, Carpenter 1975). Baudouin (1907) podejrzewał opóźnienie procesu mielinizacji włókien.

Ze względu na niejednoznaczne dane dotyczące nerwów obwodowych w chorobie Werdniga-Hoffmanna wydawało się celowe prześledzenie jakie charakter mają zmiany we włóknach nerwowych, a także czy w za-

* Praca została wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.4.1.4.

kresie neuronu obwodowego nieprawidłowości ograniczają się wyłącznie do neuronu ruchowego. Interesujące wydawało się także jakie zmiany w nerwie powoduje czynnik uszkodzający działając na nerw w okresie jego rozwoju.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły wycinki nerwu łokciowego i nerwu łydkowego pobrane od dzieci w wieku 7 i 12 miesięcy, zmarłych z powodu choroby W-H oraz wycinki nerwu łydkowego pobrane przyżyciowo od chorych dzieci w wieku 2 i 6 lat. Kontrolę stanowiły wycinki nerwu łokciowego i łydkowego pobrane od 3-miesięcznego dziecka, zmarłego w wyniku wady serca i 8-miesięcznego dziecka zmarłego z powodu zapalenia płuc oraz wycinek nerwu łydkowego pobrany przyżyciowo od 6-letniego chorego na dziecięce porażenie mózgowe, w którym badanie mikroskopowo-elektronowe nie wykazało zmian (Jędrzejowska 1974).

Wycinek nerwu łokciowego długości 3 cm pobierano z cięcia na wysokości wyrostka łokciowego, tej samej długości wycinek nerwu łydkowego pobierano z cięcia na podudziu nieco powyżej kostki bocznej. Materiał sekcyjny pobierano w 4—12 godzin po zgonie.

Po pobraniu wycinek nerwu dzielono na dwie części. Jedną część wycinka utrwalano w 3% roztworze aldehydu glutarowego, po zabarwieniu osmem dobarwiano zmodyfikowaną metodą Pala-Kulczyckiego i zatapiano w eponie. Skrawki grubości 1—1,5 μ skrawano na ultramikrotomie. Z powiększonych do 900 x mikrofotografii obliczano liczbę włókien mielinowych na 0,1 mm² powierzchni pęczkowej, odsetek powierzchni pęczkowej zajmowanej przez włókna mielinowe oraz wykreślano histogram średnic włókien mielinowych. Rozpiętość średnic włókien cienkich i grubych ustalano w oparciu o zbiorczy histogram przypadków kontrolnych; średnica włókien cienkich wynosiła 1—6 μ , średnica włókien grubych powyżej 6 μ .

Celem uzyskania włókien izolowanych drugą część wycinka również utrwalano w 3% roztworze aldehydu glutarowego i barwiono osmem. Z każdego nerwu izolowano od 100 do 200 włókien, do oceny wybierano włókna składające się co najmniej z 4 międzywęzła. We wszystkich przypadkach, oprócz kontrolnego przypadku 6-letniego dziecka, wykreślano zależność długości międzywęzła od średnicy włókna wg sposobu podanego przez Fullerton i wsp. (1965). Średnicę włókien mierzono pod powiększeniem 600 x, długość międzywęzła pod powiększeniem 150 x. W preparatach czesanych tuby neuralne wypełnione osmofilnymi kulami uważano za wyraz rozpadu włókien w wyniku zwyrodnienia aksonalnego. Szczegóły metodyczne zawarte są w pracy Jędrzejowskiej i wsp. (1972).

WYNIKI

Nerw łokciowy

Gęstość włókien mielinowych na 0,1 mm² powierzchni pęczkowej w chorobie W-H wynosiła w przypadku nr 1 — 1424, w przypadku nr 2 — 1384, w przypadkach kontrolnych — 1683 i 1843. Odsetek powierzchni pęczkowej zajmowanej przez włókna mielinowe w chorobie W-H był znacznie niższy niż w przypadkach kontrolnych (tabela 1).

Tabela 1. Odsetek powierzchni pęczkowej przypadającej na włókna mielinowe

Table 1. Percentage of fascicular area occupied by myelinated fibres

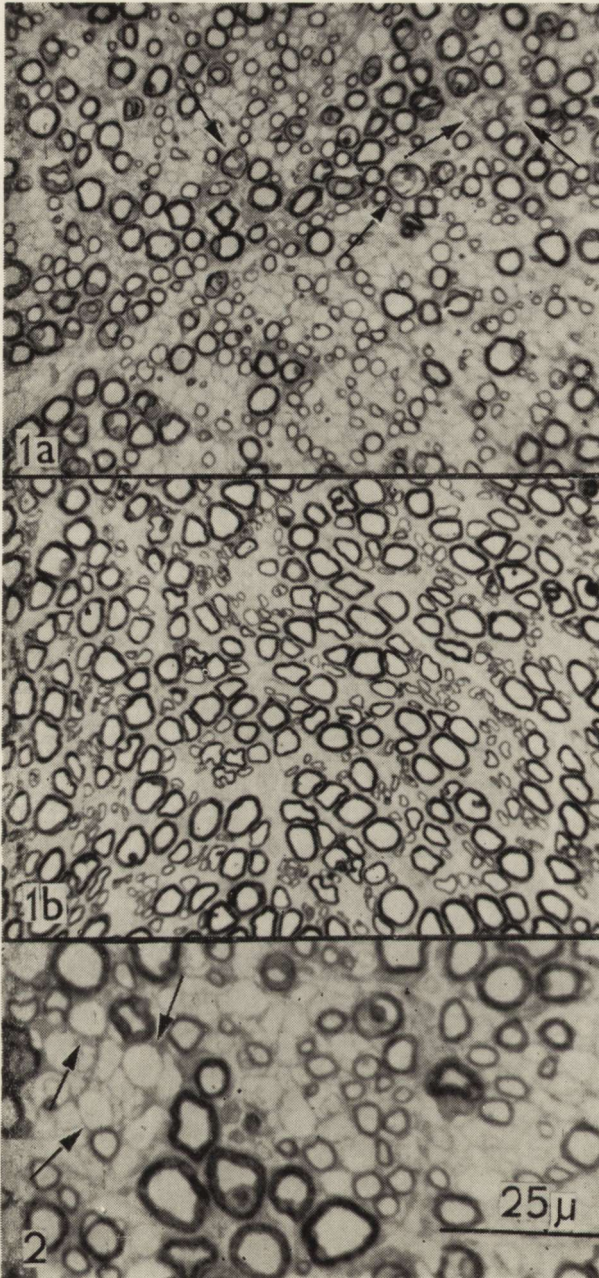
Nerw Nerve	Przypadki kontrolne Control			Choroba Werdniga-Hoffmanna Werdnig-Hoffmann disease			
	3	8	6	7	12	2	6
	mies. mths	mies. mths	lat yrs	mies. mths	mies. mths	lata yrs	lat yrs
Łokciowy Ulnar	46,8	59,6	—	31,5	28,6	—	—
Łydkowy Sural	36,4	40,2	24,4	24,7	19,5	31,0	33,2

Na przekrojach poprzecznych nerwów w przypadkach choroby W-H widoczne były włókna ze zmienioną strukturą aksonu i mieliny (ryc. 1). Ponadto obecne były włókna z osłonką mielinową nieproporcjonalnie cienką w stosunku do średnicy aksonu oraz niezabarwione struktury o nieregularnym kształcie, o średnicy do 5 μ (ryc. 2), szczególnie liczne w przypadku nr 1.

Histogram średnic włókien mielinowych zarówno w chorobie W-H jak i w przypadkach kontrolnych był dwuwierzchołkowy (wykres 1a i 1b), odsetek cienkich włókien w przypadkach choroby W-H był znacznie wyższy niż w przypadkach kontrolnych (tabela 2).

W preparatach czesanych w przypadkach chorobowych stwierdzano włókna z cechami rozpadu w wyniku zwyrodnienia aksonalnego (ryc. 3). Nie znaleziono włókien z odcinkową demielinizacją i remielinizacją. Włókna izolowane z przypadków kontrolnych nie wykazywały zmian strukturalnych (tabela 3).

Zarówno w przypadkach choroby W-H jak i w przypadkach kontrolnych długość międzywęzła była ujednoczona, niezależna od średnicy włókna (wykres 2). Dokładniejsze dane liczbowe dotyczące nerwu łokciowego w chorobie W-H i w przypadkach kontrolnych są przedstawione w tabelach 1, 2 i 3.



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Grube skrawki eponowe. Pal-Kulczycki. Pow. 440 \times . a. Przyp. 1, choroba Werdniga-Hoffmana, strzałki wskazują włókna ze zmienioną strukturą aksonu i mieliny. b. Przyp. 2, kontrola.

Fig. 1. Transverse section of ulnar nerve. Thick epon sections stained by Pal-Kulczycki meth. $\times 440$. a. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease, arrows indicate altered axons and myelin. b. Case 2, control.

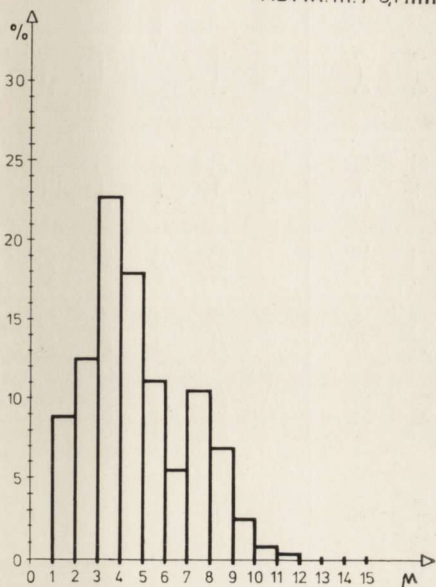
Ryc. 2. Przekrój poprzeczny nerwu łokciowego. Przypadek 1, choroba Werdniga-Hoffmana, strzałki wskazują duże aksony bez osłonki mielinowej. Preparatyka jak na ryc. 1. Pow. 900 \times .

Fig. 2. Transverse section of ulnar nerve. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease, large axons without myelin (arrows). Preparation as in Fig. 1. $\times 900$.

Nerw łydkowy

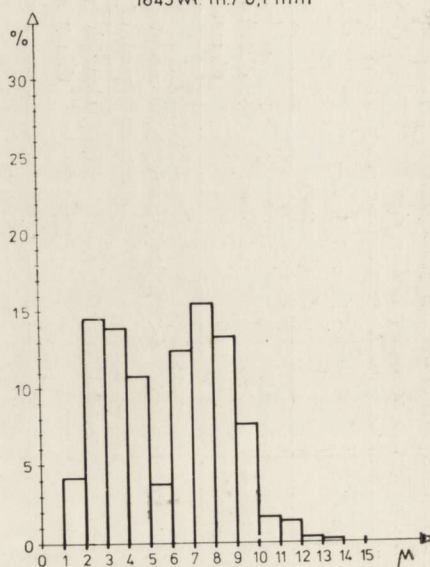
Gęstość włókien mielinowych na $0,1 \text{ mm}^2$ powierzchni pęczkowej w chorobie W-H wynosiła średnio 1497 (rozpiętość 1307—2105), w przy-

B.J. ♀ 7/12 - n. łokciowy
CHOROBA WERNIG-HOFFMANNA
1424 wł. m. / 0,1 mm²



Wykres 1a.

K.J. ♂ 8/12 - n. łokciowy
1843 wł. m. / 0,1 mm²



Wykres 1b.

Wykres 1. Histogram średnic włókien mielinowych nerwu łokciowego. a. Przyp. 1, choroba Werdniga-Hoffmanna. b. Przyp. 2, kontrola.

Diagram 1. Frequency distribution of diameters of ulnar nerve myelinated fibres. a. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease. b. Case 2, control.

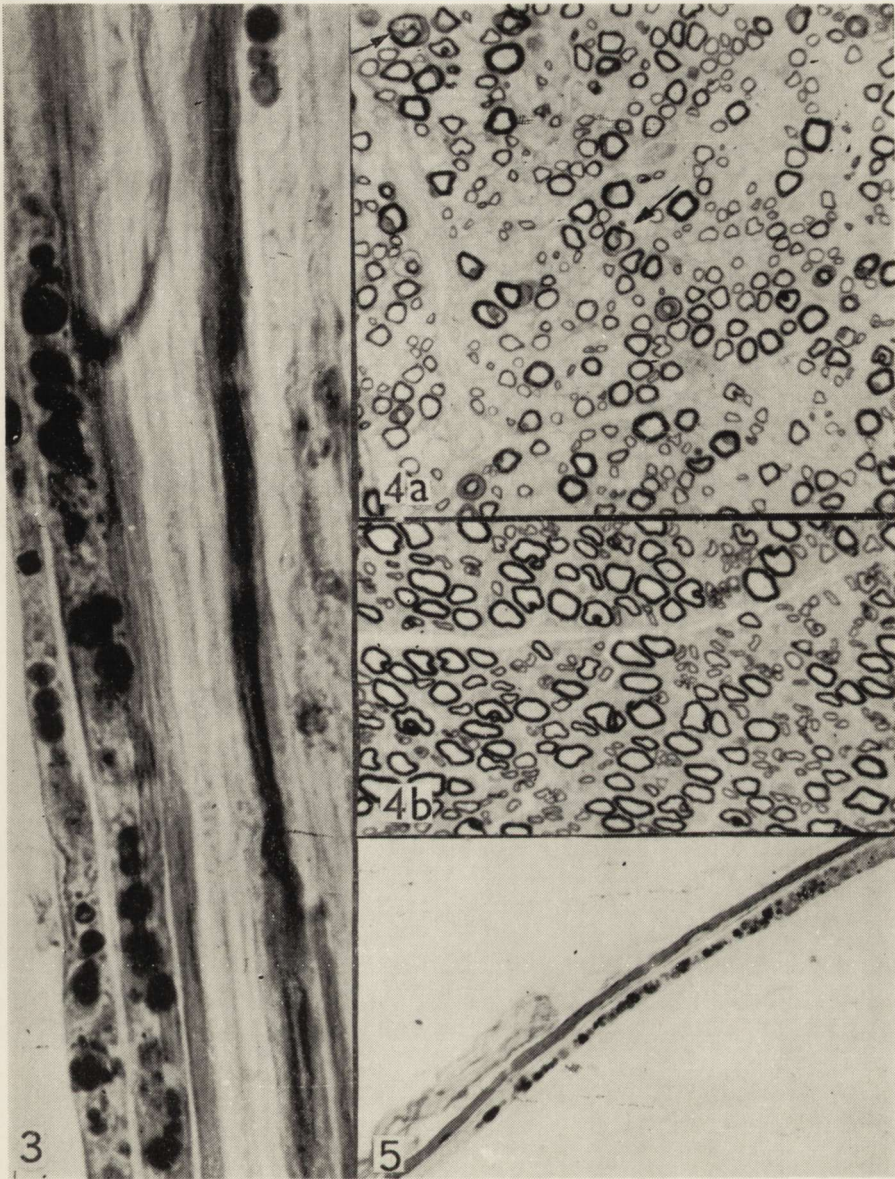
padkach kontrolnych średnio 1676 (rozpiętość 1285—2058). Odsetek powierzchni pęczkowej przypadającej na włókna mielinowe w nerwach chorych dzieci od 1-go roku życia był znacznie niższy niż w przypadkach kontrolnych (tabela 1).

Na przekrojach poprzecznych nerwów w przypadkach choroby W-H widoczne były nieliczne włókna ze zmienioną strukturą aksonu i mieliny (ryc. 4). W przypadku nr 1 i nr 2 były obecne ponadto włókna z osłonką mielinową zbyt cienką w stosunku do średnicy aksonu oraz owalne, niezabarwione struktury o średnicy do 5 μ. Histogram średnic włókien mielinowych nerwu 12-miesięcznego chorego dziecka (wykres 3) oraz nerwu kontrolnego pobranego od 3-miesięcznego dziecka był jednowierzchołkowy, w pozostałych przypadkach osobników chorych i przypadkach kontrolnych — dwuwierzchołkowy. Odsetek cienkich włókien w nerwach w chorobie W-H był wyższy niż w przypadkach kontrolnych (tabela 2).

W preparatach czesanych z nerwów w trzech przypadkach choroby W-H (ryc. 5) oraz w jednym przypadku kontrolnym stwierdzono włók-

Tabela 2. Gęstość włókien mielinowych na jednostkę powierzchni pęczkowej oraz podział włókien w zależności od ich średnicy
Table 2. Density of myelin fibres on the surface unit and their distribution according to diameter

Material	Wiek Age	Nerw łokciowy Ulnar nerve				Nerw łydkowy Sural nerve								
		Gęstość włókien miel. w 0,1 mm ² density of m.f. per 0,1 mm ²	% włókien % of fibres		histogram distribution of diameters m.f.		Gęstość włókien miel. w 0,1 mm ² density of m.f. per 0,1 mm ²	% włókien % of fibres		histogram distribution of diameters m.f.				
			d < 6 μ d > 6 μ zasięg (μ) spectrum		szczyt włókien peak of fibres			d < 6 μ d > 6 μ zasięg (μ) spectrum		szczyt włókien peak of fibres				
					cienkich thin μ	grubych thick μ					cienkich thin μ	grubych thick μ		
Przypadki kont- rolne Control	N. ♂ 3 mies. mths	1683	52,0	48,0	1—11	3—4	6—7	1684	89,1	10,9	1—9	2—3		
	K.I. ♀ 8 mies. mths	1843	47,5	52,5	1—14	2—3	7—8	2058	70,5	29,5	1—12	2—3	6—7	
	W.M. ♂ 6 lat yrs		nerwu nie pobrano nerve not taken						1285	60,5	39,5	1—11	2—3	7—9
Choroba Werdnig- Hoff- mann W-H disease	B.J. ♀ 7 mies. mths	1424	68,0	32,0	1—12	3—4	6—7	1307	82,0	18,0	1—19	3—4	6—7	
	G.A. ♀ 12 mies. mths	1384	74,9	25,1	1—11	2—3	7—8	2105	98,5	1,5	1—8	2—3		
	Z.S. ♂ 2 lata yrs		nerwu nie pobrano nerve not taken						1518	73,9	26,1	1—12	3—4	8—9
	N.B. ♀ 6 lat yrs		nerwu nie pobrano nerve not taken						1056	58,9	41,1	1—15	3—4	8—9



Ryc. 3. Włókna izolowane z nerwu łokciowego. Przyp. 1, choroba Werdniga-Hoffmanna. Zwyródnienie aksonalne. Pow. 900 X.

Fig. 3. Teased fibres from ulnar nerve. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease. Axonal degeneration. X 900.

Ryc. 4. Przekrój poprzeczny nerwu łydkowego. a. Przyp. 1, choroba Werdniga-Hoffmanna, strzałki wskazują włókna o zmienionej strukturze aksonu i mieliny. b. Przyp. 2, kontrola. Preparatyka jak na ryc. 1. Pow. 440 X.

Fig. 4. Transverse section of sural nerve. a. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease, arrows indicate altered axons and myelin. b. Case 2, control. Preparation as in Fig. 1. X 440.

Ryc. 5. Włókno izolowane z nerwu łydkowego. Przyp. 4, choroba Werdniga-Hoffmanna. Zwyródnienie aksonalne. Pow. 220 X.

Fig. 5. Teased fibre from sural nerve. Case 4, Werdnig-Hoffmann disease. Axonal degeneration. X 220.

Tabela 3. Zmiany histologiczne

Table 3. Histological changes

Nerw Nerve	Zwyrodnienie aksonalne — % włókien Axonal degeneration — % of fibres						
	Przypadki kontrolne Control			Choroba Werdniga-Hoffmanna Werdnig-Hoffmann disease			
	3 mies. mths	8 mies. mths	6 lat yrs	7 mies. mths	12 mies. mths	2 lata yrs	6 lat yrs
Łokciowy Ulnar	0,0	0,0	0,0	30,0	5,0	—	—
Łydkowy Sural	5,0	0,0	0,0	10,0	0,0	2,0	12,0

na z cechami rozpadu w wyniku zwyrodnienia. Nie znaleziono zmian typu odcinkowej demielinizacji i remielinizacji (tabela 3). Zarówno w przypadkach choroby W-H jak i w przypadkach kontrolnych długość międzywęźli była ujednoczona, niezależna od średnicy włókna. Dokładniejsze dane liczbowe dotyczące nerwu łydkowego w chorobie W-H i w przypadkach kontrolnych przedstawiają tabele 1, 2 i 3.

W grupie kontrolnej nerw łydkowy w przypadku nr 1 wyróżniał się obecnością włókien z cechami rozpadu oraz jednowierzchołkowym histogramem średnic włókien. Wyłoniło się pytanie jaka jest przyczyna zmian we włóknach i czy kształt histogramu nie jest wynikiem rozpadu grubych włókien. Podobny stopień rozpadu we wszystkich włóknach wskazuje na jednoczesność powstania uszkodzenia, co wobec prawidłowego obrazu nerwu łokciowego w tym przypadku sugeruje, że uszkodzenie miało prawdopodobnie charakter przypadkowy. Ze względu na to, że odsetek zmienionych włókien był niski (5%) nie wydaje się aby mógł zasadniczo wpłynąć na zmianę kształtu histogramu i jednowierzchołkowy histogram jest wynikiem gorszego rozwoju nerwu skórniego w stosunku do nerwu mieszanego w pierwszych miesiącach życia.

OMÓWIENIE

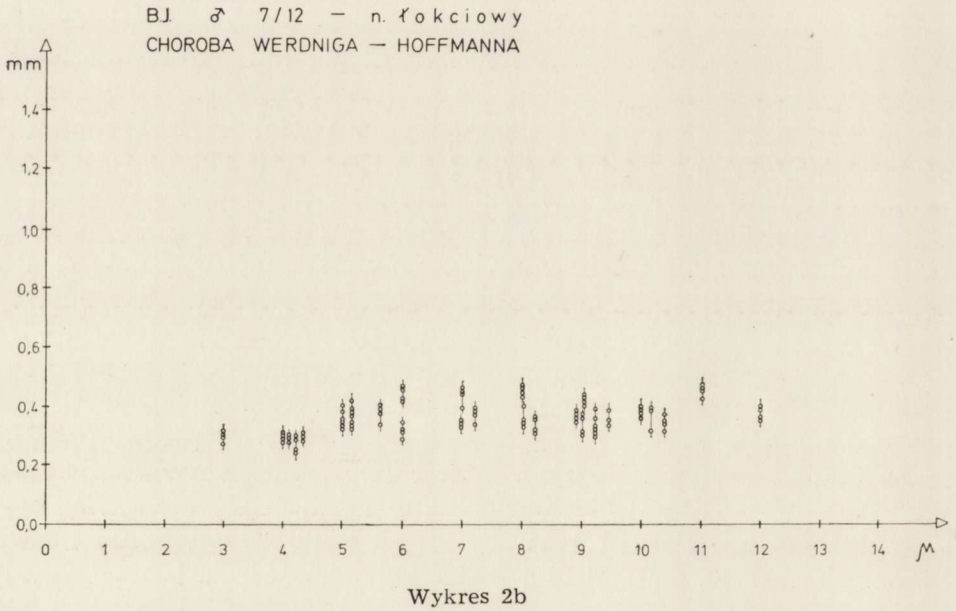
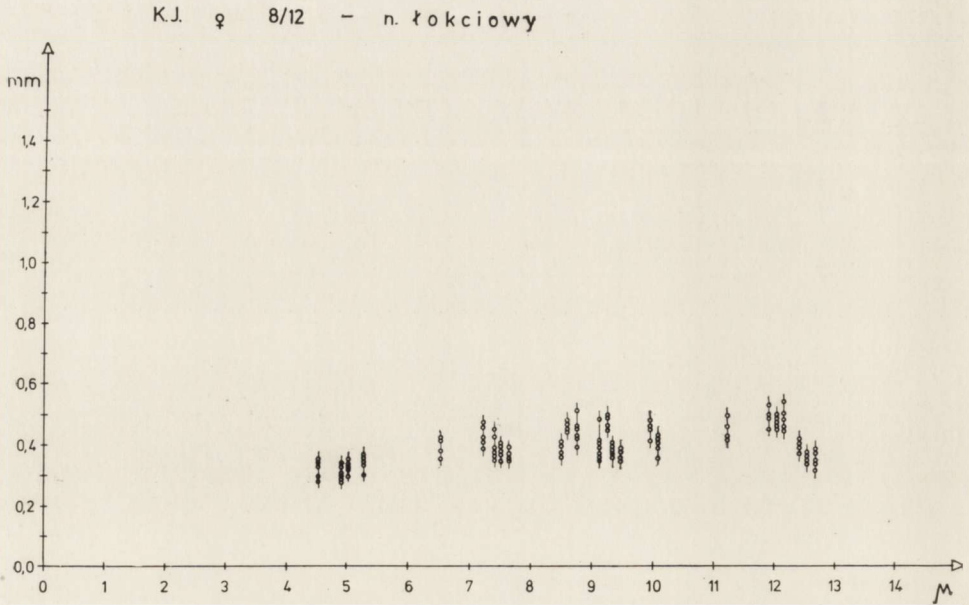
Z przeprowadzonych badań wynika, że nerw łokciowy pobrany od dzieci z chorobą W-H różni się od nerwu przypadków kontrolnych mniejszą gęstością włókien mielinowych na jednostkę powierzchni, mniejszym odsetkiem powierzchni pęczkowej zajmowanej przez włókna mielinowe, wyższym odsetkiem cienkich włókien, obecnością włókien rozpadających się w wyniku zwyrodnienia aksonalnego oraz włókien

w preparatach czesanych
of myelinated fibres

Nerw Nerve	Odcinkowa demielinizacja — % włókien Segmental demyelination — % of fibres						
	Przypadki kontrolne Control			Choroba Werdniga-Hoffmanna Werdnig-Hoffmann disease			
	3 mies. mths	8 mies. mths	6 lat yrs	7 mies. mths	12 mies. mths	2 lata yrs	6 lat yrs
Lokciowy Ulnar				nie znaleziono not encountered			
Łydkowy Sural							

z osłonką mielinową nieproporcjonalnie cienką w stosunku do średnicy aksonu. Ponadto, na przekrojach poprzecznych nerwu chorych osobników widoczne były znacznie rozleglejsze niż w przypadkach kontrolnych, pozbawione włókien mielinowych przestrzenie, w których były obecne liczne niezabarwione struktury o regularnym, owalnym kształcie i średnicy dochodzącej niekiedy do 5μ . Jak wykazały badania mikroskopowo-elektronowe, obszary nie barwiące się osmem wypełnione były przez włókna bezmielinowe i kolagen, a owalne struktury niezabarwione odpowiadały aksonom nie posiadającym osłonki mielinowej (Hausmanowa-Petrusewicz, Fidziańska 1975). Wydaje się, że niezmielinizowane aksony o średnicy powyżej 3μ były artefaktycznie rozdęte, co jest częstym zjawiskiem w materiale sekcyjnym przeprowadzonym wg stosowanych przez nas metod (Thomas 1974). Nie jest wykluczone, że to samo dotyczyło aksonów posiadających nieproporcjonalnie cienką osłonkę mielinową. Mały odsetek powierzchni pęczkowej przypadający na włókna mielinowe w zestawieniu z wysokim odsetkiem cienkich włókien i nieco mniejszą rozpiętością histogramu średnic włókien może sugerować, że w chorobie W-H proces rozwoju włókien mielinowych jest opóźniony. Natomiast obecność włókien ulegających rozpadowi wskazuje na jednocześnie przebiegający proces zwyrodnienia aksonalnego. Ze względu na przewagę cienkich włókien w nerwach wydaje się, że opisywane uprzednio (Batten 1911, Griffith i Spiller 1911, Wälle i Hotz 1917, Holmes 1920, Greenfield i Stern 1927) ścieńczenie korzeni przednich i nerwów było raczej wynikiem zaburzeń rozwojowych włókien niż ich demielinizacji czy rozpadu.

Przyczyna i mechanizm powstawania zmian w chorobie W-H nie są w pełni wyjaśnione. Niemniej ze względu na to, że zmiany w obwodo-

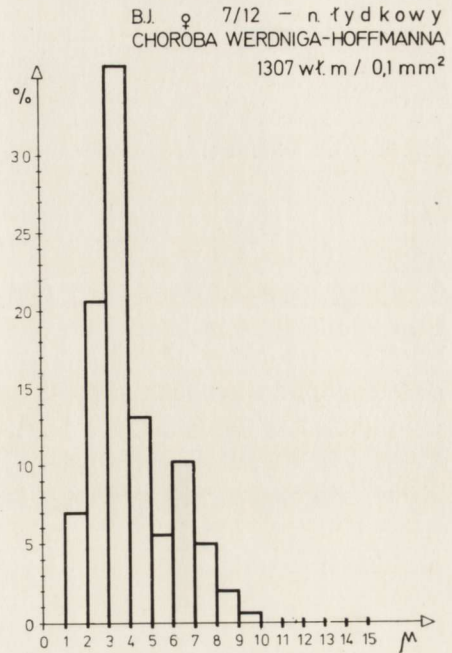


Wykres 2. Nerw łokciowy. Zależność długości międzywęźli od średnicy włókna.
b. Przyp. 1, choroba Werdniga-Hoffmanna. a. Przyp. 2, kontrola.

Diagram 2. Ulnar nerve. Internodal length of myelinated fibre plotted against diameter of widest internodal segment. b. Case 1, Werdnig-Hoffmann disease. a. Case 2, control.

Wykres 3. Histogram średnic włókien mielinowych nerwu łydkowego. Przyp. 2, choroba Werdniga-Hoffmanna.

Diagram 3. Frequency distribution of diameters of sural nerve myelinated fibres. Case 2, Werdnig-Hoffmann disease.



wym neuronie ruchowym wyrażone są najsilniej w rogach przednich wydaje się, że nieznaną czynnik chorobowy działa przede wszystkim na komórki rogów przednich. Uszkodzenie komórek ruchowych prowadzi do zwyrodnienia włókien nerwowych, którego następstwem są odnerwienie i zanik mięśni.

Przypuszczalnie każdy szkodliwy czynnik działający na komórkę w okresie rozwoju może opóźnić rozwój ciała komórki, a w następstwie rozwój jej wypustek. Niedojrzałość układu nerwowego może wtórnie powodować niedojrzałość układu mięśniowego w chorobie W-H, obserwowaną ostatnio przez niektórych autorów (Fenichel i Engel 1963, Verger i wsp. 1970, Fidziańska 1974).

Zarówno odnerwienie mięśni jak i opóźnienie ich rozwoju prowadzi do zmniejszenia wielkości obszaru unerwianego przez komórki ruchowe. Wiadomo, że na wielkość komórek, a tym samym włókien nerwowych, oprócz ogólnych czynników morfogenetycznych (w tym szczególnie czasu zróżnicowania komórki) oraz bodźców z wyższych pięter układu nerwowego, wpływa ilość bodźców dochodzących z obwodu (Detwiler i Lewis 1925, Fernand i Young 1951). Ta ostatnia zależność wiąże się z rozległością unerwianego przez komórkę obszaru. Badania doświadczalne wykazały, że zmniejszenie unerwianego pola we wczesnym okresie ży-

cia powoduje opóźnienie rozwoju włókien regenerujących w nerwie (Evans i Vizoso 1959). Można więc przypuszczać, że w chorobie W-H mniejsza ilość bodźców dochodzących z obwodu do komórki będącej w okresie rozwoju dodatkowo pogłębia opóźnienie wzrastania ciała komórki, a tym samym wzrastania jej aksonu. Istnieją pojedyncze doniesienia o obecności dużej liczby małych komórek w rogach przednich w chorobie W-H (Greenfield i Stern 1927, Malamud 1968). W przedstawionym materiale w przypadku 12-miesięcznego chorego dziecka stwierdzono w rogach przednich wysoki odsetek małych komórek nie wykazujących zmian w mikroskopie świetlnym (Rafałowska 1975), co korelowało z wysokim odsetkiem cienkich włókien w nerwie. Jeżeli wziąć pod uwagę, że grubość osłonki mielinowej jest zależna od grubości aksonu (Thomas 1955, Friede i Samorajski 1967, Gutrecht i Dyck 1970), a akson kontroluje rozwój osłonki mielinowej (Friede 1973), można oczekiwać, że opóźnienie rozwoju aksonu wpłynie na opóźnienie rozwoju osłonki mielinowej i w ten sposób przyczyni się do wzrostu w nerwie populacji cienkich włókien. Opisany powyżej mechanizm wydaje się tłumaczyć opóźnienie rozwoju włókien mielinowych nerwu łokciowego w chorobie W-H.

Jak wspomniano, rozpad aksonalny włókien należy uważać za konsekwencję zmian zwyrodnieniowych w komórkach rogów przednich. Różny odsetek zmienionych włókien może odzwierciedlać zarówno różny stopień ostrości podstawowego procesu, jak też budzić zastrzeżenia co do reprezentatywności badanych próbek.

Przeprowadzone badania wykazały występowanie nieprawidłowości w nerwie łydkowym w chorobie W-H jak też różnice obrazu nerwu łydkowego w zależności od wieku chorych osobników. Porównanie zmian występujących w nerwie łydkowym u chorych w wieku 7 i 12 miesięcy wykazało, że w obu nerwach charakter zmian był podobny i wyrażał się opóźnionym rozwojem włókien mielinowych, jak też ich rozpadem (mniej nasilonym w nerwie łydkowym aniżeli w nerwie łokciowym). Na opóźniony rozwój włókien nerwu łydkowego w porównaniu z przypadkami kontrolnymi, wskazywał niski odsetek powierzchni pęczkowej przypadający na włókna mielinowe, mniejsza rozpiętość histogramu średnic włókien mielinowych i wysoki odsetek cienkich włókien. Ponadto, histogram średnic włókien nerwu łydkowego chorego 12-miesięcznego dziecka był jednowierzchołkowy, przy czym w nerwie nie znaleziono zmian świadczących o rozpadzie włókien. Opóźnienie rozwoju włókien oraz ich zwyrodnienie aksonalne spowodowało różnicę gęstości włókien pomiędzy nerwem dziecka w wieku 7 miesięcy, a nerwem kontrolnym w podobnym wieku.

W odróżnieniu od omawianych powyżej nerwów czuciowych chorych osobników w wieku niemowlęcym, u chorych w wieku 2 i 6 lat rozpiętość średnic włókien mielinowych oraz odsetek cienkich włókien nie różniły się od wartości spotykanych w normie, o czym świadczy zarówno materiał kontrolny jak i badania przeprowadzone przez Gutrehta i Dyc-ka (1970). Obserwacje te sugerują, że opóźnienie rozwoju włókien wy- równuje się w późniejszym okresie. Natomiast w obu wspomnianych ner- wach stwierdzono obecność włókien rozpadających się w wyniku zwy- rodnienia aksonalnego.

Przyczyna zmian histologicznych w nerwie czuciowym w schorzeniu klasycznie uważanym za chorobę neuronu ruchowego jest niejasna. Być może w opóźnieniu rozwoju włókien mielinowych pewne znaczenie ma fakt, że choroba rozpoczynając się w wieku płodowym prowadzi do osła- bienia ruchów płodu w płynie owodniowym (Beevor 1902, Rosenberg 1906, Collier i Wilson 1908, Haberman 1910, Pearce 1920, Reuben i Ser- ver 1931, Pearn 1973), co z kolei wiąże się z osłabieniem dopływu bodź- ców z obwodu do zakończeń czuciowych nerwu w skórze. Jak wspom- niano powyżej dopływ bodźców z obwodu obok dopływu bodźców z wyż- szych piętér układu nerwowego jest niezbędny do osiągnięcia przez ciało komórki i jej włókna właściwych rozmiarów (Detwiler i Lewis 1925, Fernand i Young 1951, Bunge i Bunge 1966).

Równie trudno jest wytłumaczyć obecność zmian zwyrodnieniowych w nerwie łydkowym w chorobie W-H. Na możliwość występowania zmian typu zwyrodnienia aksonalnego we włóknach nerwu łydkowego ostatnio zwrócił uwagę Carpenter (1975). Zmiany takie mogą się wiązać z przypadkowym (urazowym lub uciskowym) uszkodzeniem nerwu, bądź występować w wyniku uszkodzenia komórek zwojów grzbietowych. Zmiany w komórkach zwojowych opisywano w pojedynczych przypad- kach (Ajurriaguere 1950, Radermecker 1951, Carpenter i wsp. 1975, Marshall i Duchen 1975). Uszkodzenie komórek zwojowych może zacho- dzić na tej samej drodze co uszkodzenie komórek rogów przednich, bądź też na drodze zwyrodnienia transneuronalnego.

Stwierdzenie zmian w pierwszym neuronie czuciowym stanowi popar- cie stanowiska autorów odstępujących od poglądu o wybiórczym uszko- dzeniu neuronu ruchowego w dziecięcym rdzeniowym zaniku mięśni typu W-H (Carpenter i wsp. 1975, Marshall i Duchen 1965). Niemniej sprawa nie jest jeszcze rozstrzygnięta i wszystkie przedstawione możli- wości powinny być dokładnie przebadane.

WNIOSKI

1. Nerwy obwodowe w chorobie W-H u osobników do 1 roku życia cechuje opóźnione dojrzewanie włókien mielinowych, widoczne zarówno

w nerwie mieszanym jak i w nerwie skórnym. Stopień niedojrzałości obu nerwów u osobników w 1 roku życia wydaje się podobny. Niedojrzałość nerwu czuciowego może wyrównać się w późniejszych latach życia. Brak materiału nie pozwala wypowiedzieć się na ten temat co do nerwu mieszanego.

2. We włóknach nerwowych stwierdzono zmiany pod postacią zwyrodnienia aksonalnego; są one bardziej nasilone w nerwie mieszanym (średnio 17,5%) aniżeli w nerwie skórnym (średnio 5%).

3. Zmiany w nerwach obwodowych stwierdzane w chorobie Werdniga-Hoffmanna potwierdzają pogląd o ich niedojrzałości i nakładającym się procesie zwyrodnienia aksonalnego.

4. Przeprowadzone badania pozwalają sądzić, że choroba W-H nie ogranicza się wyłącznie do obwodowego neuronu ruchowego, ale dotyczy również pierwszego neuronu czuciowego, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż neuronu ruchowego.

X. Драц

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВАХ ПРИ СПИННОМОЗГОВОЙ АТРОФИИ МЫШЦ ВЕРДНИГА-ГОФМАНА

Резюме

Данные относительно изменений в периферических нервах при заболевании Вердника-Гофмана являются неоднозначными. Целью работы, кроме оценки гистологической картины периферических нервов при этом поражении, было ответить на вопрос, ограничиваются ли изменения в пределах периферического нейрона только двигательным нейроном или могут касаться также чувствительных нервов.

Исследовали локтевой нерв, взятый в двух случаях болезни В-Г у лиц в возрасте 7 и 12 месяцев, а также 2 и 6 лет. Контролем служили нервы в подобной возрастной группе. В нервах локтевом и икроножном у лиц до 1 года жизни обнаружили признаки, свидетельствующие о незрелости нерва, а также проявления процесса аксонального вырождения волокон. В икроножном нерве у лиц в возрасте 2 и 6 лет присутствовали только дегенеративные изменения.

Представляется, что некоторое влияние на задержку развития нервных волокон при болезни В-Г оказывает меньший приток импульсов с периферии, связанный с уменьшением величины иннервированной области и ослаблением движений плода. По-видимому задержка созревания чувствительного нерва может выровняться в более позднем возрасте.

Дегенеративные изменения в двигательных волокнах являются последствием дегенеративно-атрофических изменений в клетках передних рогов. Дегенеративные изменения в чувствительном нейроне могли бы быть результатом непосредственного действия болезнетворного фактора на ганглиозные клетки. Не исключено, что такие изменения могут возникать также в механизме транснейронального вырождения.

Обнаружение изменений в чувствительном нейроне подтверждает точку зрения авторов, высказывающихся в пользу обобщенного характера изменений при спинномозговой атрофии мышц В-Г.

H. Drac

HISTOLOGICAL CHANGES IN PERIPHERAL NERVES IN SPINAL
WERDNIG-HOFFMANN MUSCULAR ATROPHY

Summary

The aim of the work is the histological evaluation of peripheral nerves in Werdnig-Hoffmann disease and establishment whether the alterations in peripheral neuron are limited only to the motor neuron or affect also sensory nerves.

The study was carried out on the ulnar and sural nerves taken from the 7- and 12-month-old infants and from two children aged 2 and 6 years. Control investigations were performed on the nerves from the same age group of patients. It was established that both ulnar and sural nerves of infants presented the features of immaturity and the signs of axonal degeneration. Sural nerves of 2- and 6-years-old children exhibited only degeneration changes.

It seems that some influence on the delayed development of nerve fibres in Werdnig-Hoffmann disease is exerted by the lesser influx of peripheral stimuli caused by the decrease of the innervated area and weakened movements of the foetus. Delayed maturation of sensory nerve can be probably compensated later.

Degenerative changes in motor fibres are the effect of degeneration and atrophy of anterior horns neurons. Degenerative changes found in sensory neuron can be a result of immediate action of pathogenic factor on the ganglion cells or a result of transneuronal degeneration.

PISMIENNICTWO

1. Byers R. K., Banker B. O.: Infantile muscular atrophy. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1961, 5, 140—164.
2. Carpenter S., Karpati G., Rothman G., Watters G., Andermann T.: Pathologic involvement of sensory neurons in Werdnig-Hoffmann disease. *Neurol. (Minneapolis)* 1975, 25, 364.
3. Chou S. M., Fakadej A. V.: Ultrastructure of chromatolytic motor neurons and anterior spinal roots in a case Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1971, 30, 368—369.
4. Chou S. M.: Infantile spinal muscular atrophy: correlation between alteration in anterior spinal roots and muscle fiber atrophy. W: *Clinical studies in myology*. Ed. B. A. Kaculas. *Excerpta Med.* Amsterdam, 1973.
5. Evans D. H. L., Vizoso A. D.: Observation on the mode of growth of motor nerve fibers in rabbits during post-natal development. *J. Comp. Neurol.* 1951, 95, 429—459.
6. Fenichel G. M., Engel W. K.: Histochemistry of muscle in infantile spinal atrophy. *Neurology (Minneapolis)* 1963, 13, 1059—1066.
7. Fidziańska A.: Ultrastructural changes in muscle in spinal muscular atrophy Werdnig-Hoffmann. *Acta neuropath. (Berl.)* 1974, 27, 247—256.
8. Friede R. L., Samorajski T.: Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *J. Comp. Neurol.* 1967, 130, 223—231.

9. Friede R. L.: Principles of quantitative organization of peripheral nerve fibres and their relation to growth and pathological changes. *Neurol. (Minneapolis)* 1973, 204, 243—254.
10. Fullerton P. M., Gilliat R. W., Lascelles R. G., Morgan-Hughes J. A.: The relationship between fibre diameter and internodal length in chronic neuropathy. *J. Physiol.* 1965, 178, 26—28.
11. Greenfield J. G., Stern R. O.: The anatomical identity of the Werdnig-Hoffmann and Oppenheim forms of infantile muscular atrophy. *Brain* 1927, 1, 652—686.
12. Gutrecht J. A., Dyck P. J.: Quantitative teased fiber and histologic studies of human sural nerve during postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 1990, 138, 117—129.
13. Hausmanowa-Petrusewicz I., Fidziańska A.: The foetal character of the lesion in the acute form of Werdnig-Hoffmann disease. W: *Recent advances in myology. Proc. of the 11th Internat. Congress of Muscle Diseases*, Eds. Bradley W. G., B. Gardner, Medwin J., Walton N. *Excerpta Med.*, 1975.
14. Jędrzejowska H., Sawicka E., Drac H., Glinka Z.: Metody badania histologicznego nerwów obwodowych. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 87—98.
15. Malamud N.: Infantile progressive muscular atrophy. W: *Pathology of the nervous system*. Ed. Minckler J. McGraw-Hill Comp. New York, 1968.
16. Marshall A., Duchon L. W.: Sensory system involvement in infantile spinal muscular atrophy. *J. neurol. Sci.* 1975, 26, 349—359.
17. Norman R. M.: Infantile progressive spinal muscular atrophy of Werdnig-Hoffmann. W: *Greenfield's Neuropathology*. E. Arnold, London, 1963.
18. Pearn J. M.: Fetal movements and Werdnig-Hoffmann disease. *J. neurol. Sci.* 1973, 18, 373—379.
19. Radermecker M. J.: L'amyotrophie spinale de l'enfance (Werdnig-Hoffmann) comme hérédodégénérescence. *Rev. Neurol.* 1951, 84, 14—31.
20. Rafałowska J.: doniesienie nie publikowane, 1975.
21. Roy, Dubowitz V., Wolman L.: Ultrastructure of muscle in infantile spinal muscular atrophy. *J. neurol. Sci.* 1971, 12, 219—232.
22. Thomas P. K.: Growth changes in the myelin sheath of peripheral nerve fibres in fishes. *Proc. Roy. Soc.* 1955, 143, 380—391.
23. Verger P., Vital C., Guillard J. M., Vallat J. M.: Ultrastructural study of certain precocious neurogenic amyotrophies. *Pédiatrie* 1970, 25, 377—387.

U w a g a: W Piśmiennictwie podano tylko najważniejsze pozycje, pełny wykaz autorów, cytowanych w pracy jest do wglądu w Redakcji i u autorki.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna AM, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 6.

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MARIA SPATZ *)

HISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF EXPERIMENTAL
MICROENCEPHALY INDUCED BY METHYLAZOXYMETHANOL
ACETATE (MAMA)

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy
of Sciences

Head of Department: Prof. M. J. Mossakowski, M. D.

Several papers have been published recently dealing with the biologic effects of glucoside cycasin and of its aglycone (methylazoxymethanol — MAM) (Spatz, Laqueur 1968b, Spatz 1969, Jones et al. 1971). Both these compounds are extractable from seeds, roots and leaves of the palm-like plants: *Cycas circinalis*, which grows on the island Guam, and *Cycas revoluta*, which grows in Japan. The seeds of both plants have been and still are used as a source of food in some parts of the world; their toxic properties had been well known long before their chemical structure was established.

In 1955 Nishida et al. isolated cycasin from *Cycas revoluta*, and in 1956 Riggs isolated it from *Cycas circinalis*. MAM was synthesized by Matsumoto et al. (1965) as MAM acetate (MAMA), the biological properties of which are exactly the same as these of natural cycasin.

Both cycasin and methylazoxymethanol are hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic and neurotoxic, the type of dominant lesion being dependent on the dose applied (Kobayashi, Matsumoto, 1964, Spatz 1964). Acute toxicity is best observed in two target organs, the liver and the developing nervous system. A single intraperitoneal or oral dose of methylazoxymethanol (MAM) or of its synthetic acetate (MAMA), administered to pregnant rats on the 14th or 15th day of gestation induces congenital microencephaly (Spatz, Laqueur 1968a, 1968b, Spatz 1969). A characteristic and regularly observed effect of both compounds is connected with cellular damage in the subependymal matrix and subsequent failure of the cerebral hemispheres to develop normally (Spatz, Laqueur 1968a). It has been established that the diminution of the brain in experimental animals is essentially due to the suppression of deve-

*) This study was performed in collaboration with the Laboratory of Neuropathology and Neuromorphological Sciences, National Institute of Neurological Disease and Stroke, NIH, Bethesda, USA.

lopment of the neocortex and the Ammonal cortex. It is characteristic that the above changes are not accompanied by glial or inflammatory reaction (Haddad et al. 1969).

Our previous investigation using this model (Spatz et al. 1971) have shown biochemically and histochemically that there occur: changes in the content of lipids, particularly of phospholipids, and disturbances in the process of myelination in rats with cycasin-induced microencephaly. The results of these studies have induced us to make further histochemical investigations of developing microencephalic rat brains in order to evaluate the presence of glycogen, activity of glycogen metabolizing enzymes and of selected respiratory enzymes.

MATERIAL AND METHODS

A single intraperitoneal 20 mg/kg dose of MAMA was administered to pregrant experimental rats on the 15th day of gestation. The control rats were given a suitable amount of intraperitoneal saline. Fisher and Wistar female rats were used.

The studies were performed on 120 offspring of experimental female rats, sacrificed at the following ages: 7, 10 and 14 days and 1,6 and 10 months. Each age group comprised 6 experimental and 4 control animals.

Depending on the histological and histochemical procedures employed, the studies were performed on brains perfused with paraformaldehyde solution, or brains fixed in Rossman's solution, or on unfixed brains. The fixed tissue blocks were embedded in paraffin, while the unfixed brains were frozen in dry ice and cut in a cryostat into 14 μ sections.

Histopathological changes were evaluated using sections stained with cresyl violet. The histochemical examination performed on paraffin-embedded sections comprised the PAS reaction by the method of Mac Manus and Mowry (1958) and evaluation of glycogen using the PAS reaction after blocking the aldehyde groups with dimedone by the method of Bulmer (1959). Also, before the PAS reaction, diastase digestion by the method of Pearse (1974) was performed.

The activity of the following enzymes was evaluated: UDPG-g-transferrase, phosphorylase A, A + B and total, succinic (SDH), lactic (LDH) and glucose-6-phosphate (G-6-PDH) dehydrogenases. The histochemical techniques employed have been described previously (Szumańska, 1973).

Basing on previous observations (Spatz et al. 1971), particular attention was paid to the histochemical picture of the neocortex, the hippocampal cortex and the corpus callosum.

RESULTS

Morphological observations

An accurate description of the morphological picture of cycasin induced microencephaly has been published in a few papers (Haddad et al. 1969, Spatz, Laqueur 1968a, 1968b). That is the reason why the description below is restricted to the main features.

Macroscopic observations showed that there was a visible retardation of growth of the cerebral hemispheres on the 14th day of life, and a complete suppression of growth on the 28th to 30th day (Figs 1, 2). These changes affected all the offspring of a litter.

As far as the microscopic picture is concerned, at the age of 7 days there were disturbances in the differentiation of the individual layers of the neocortex (Figs 3, 4); while at the age of 14 days there was a distinct retardation in its organisation. In 1-month-old animals the prevailing feature was a marked decrease in the number of neurons in the neocortex. This decrease was even more marked in adult animals (Fig. 5). The same phenomenon was observed in the hippocampal cortex. As a result of the considerable underdevelopment of Ammon's horns the lateral ventricles became enlarged.

The corpus callosum also showed disturbances of development. They were, however, much less pronounced than in the grey matter and consisted of: retarded differentiation of the oligodendroglial separation of nerve fibres strands, and, occasionally for example in 1-week-old animals, accumulations of glial cells and infiltrations at the cortex-white matter borders (Figs 6, 7).

Histochemical observations

PAS-positive substances. In the control group at all ages there was a positive PAS diffusion reaction in the neuropil of the grey matter; this reaction was strongest in the Ammonal cortex. The PAS reaction in blood vessel walls was markedly stronger than in the neuropil (Fig. 8).

In all the experimental age groups the PAS reaction was markedly weaker than that for same regions of the brain in the corresponding control groups (Fig. 9). Also, regions with patches of spongy tissue were observed, mainly in the brain stem; here the PAS reaction was either considerably reduced, or absent (Fig. 10).

Neutral mucopolysaccharides. Localization of neutral mucopolysaccharides corresponded to that of PAS reaction but its intensity was somewhat weaker.

Glycogen. In the brains of 7, 10 and 14-day control animals there were abundant accumulations of glycogen in the epithelium of the choroid plexus, in the cells of the ependyma, and in the subependymal and submeningeal zones. There were numerous fine-grained polysaccharide accumulations in the neuropil of the mesencephalic and bulb raphe, and glycogen deposits in the neurons of Deiter's nucleus and in the neurons of mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve.

In 1-month-old and adult animals no glycogen was observed except fine granules appearing only in the epithelium of the choroid plexus, ependymal cells and in the subependymal zone. Occasionally, there were small accumulations of polysaccharide granules in the 1st layer of the cortex.

The location of glycogen deposits in the brains of experimental animals was almost exactly the same as in the control group, the only difference being that glycogen was observed in some cells of the putamen (Fig. 11) in the 7-day group, and that accumulations of glycogen were observed in the perivascular region in the 10-day and 14-day groups.

Fig. 1. Brain of the 1-month-old control rat.

Ryc. 1. Mózg szczura kontrolnego, 1-miesięcznego.

Fig. 2. Microencephaly induced with MAMA in 1-month-old rat.

Ryc. 2. Mikrocefalia u 1-miesięcznego szczura wywołana MAMA.

Fig. 3. Cerebral cortex of 7-days-old control rat. Cresyl violet. $\times 100$.

Ryc. 3. Kora mózgowia 7-dniowego szczura kontrolnego. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .

Fig. 4. Cerebral cortex of 7-days-old experimental rat. Disturbed differentiation of individual layers, regions with decreased or increased number of neurons. Cresyl violet. $\times 100$.

Ryc. 4. Kora mózgowia 7-dniowego szczura doświadczalnego. Zaburzenia w różnicowaniu warstw, ubytki oraz zagęszczenia komórek nerwowych. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .

Fig. 5. Cerebral cortex of adult experimental rat. Disturbed cytoarchitecture, decreased number and shrinkage of neurons. Cresyl violet. $\times 100$.

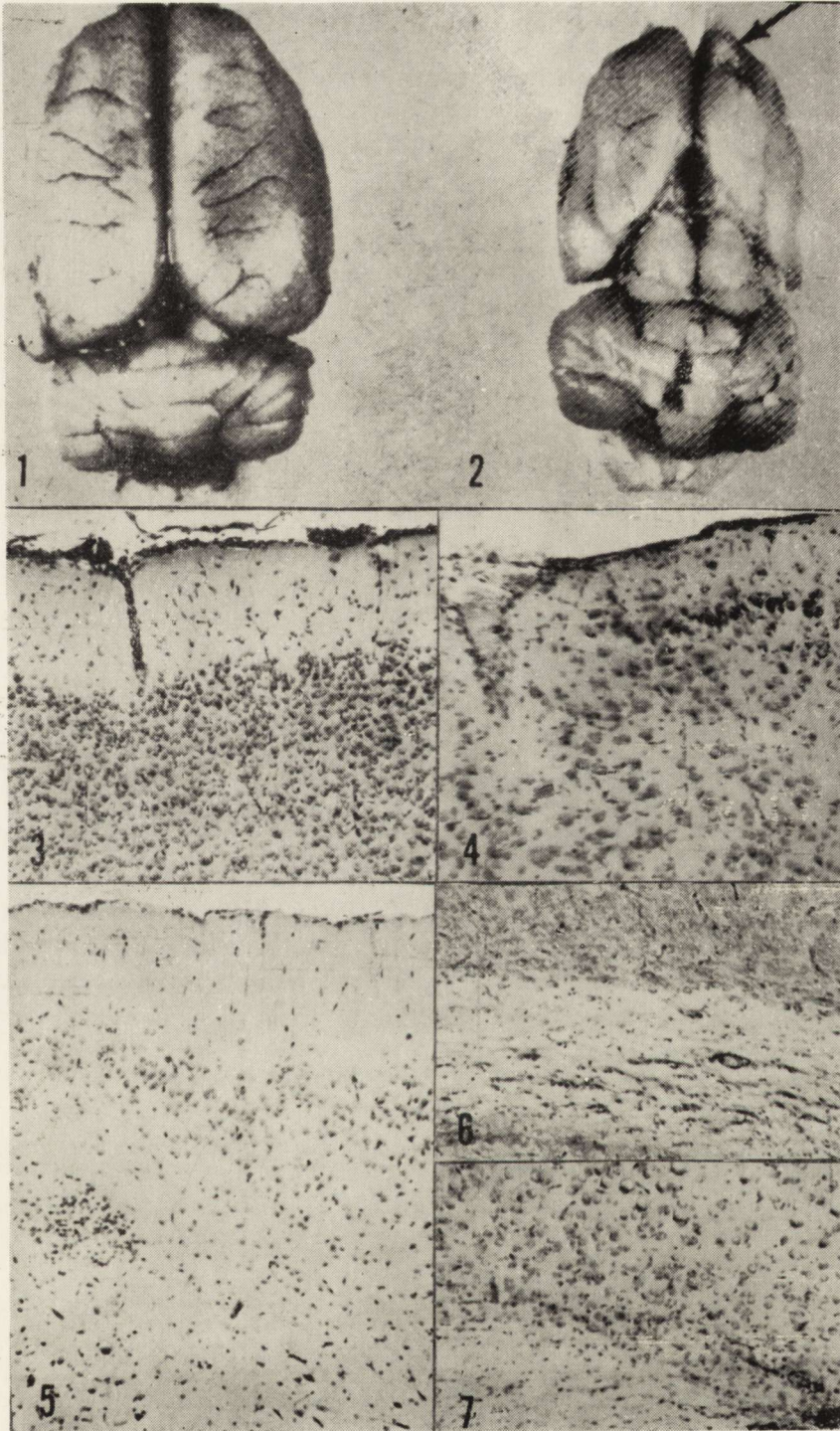
Ryc. 5. Kora mózgowia dorosłego szczura doświadczalnego. Zaburzenia cytoarchitektoniki, ubytki i obkurczenie neuronów. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .

Fig. 6. Corpus callosum of 1-month-old control rat. Correct arrangement of oligodendroglia along nerve fibres. Cresyl violet. $\times 100$.

Ryc. 6. Spoidło wielkie 1-miesięcznego szczura kontrolnego. Prawidłowy układ oligodendrogleju wzdłuż przebiegu włókien nerwowych. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .

Fig. 7. Corpus callosum of 1-week-old experimental rat. Increased number of glial cells and cellular infiltrations on the border of the cortex and white matter. Cresyl violet. $\times 100$.

Ryc. 7. Spoidło wielkie 1-miesięcznego szczura doświadczalnego. Zagęszczenie komórek glejowych i nacieki na pograniczu kory i istoty białej. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times .



Histoenzymatic observations

UDPG-g-transferase. There were no perceptible differences in the activity of this enzyme between control and experimental animals in all age groups.

No activity was observed in 7-day-old animals. UDPG-g-transferase activity appeared in 2-week-old animals in the form of fine-grained accumulations of the brownish-pink final enzymatic reaction product located in the cells of the choroid plexus and in the neurons of Deiter's nucleus and also in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve. No UDPG-g-transferase activity was observed in the remaining age groups.

Phosphorylase activity. In the brains of 1-week-old control animals phosphorylase A activity was demonstrated by coarse-grained violet polysaccharide deposits located in the epithelium of the choroid plexus, in the ependyma of the ventricles and in the submeningeal zone of the cortex. The remaining white and grey structures of the brain did not exhibit enzymatic activity. No phosphorylase B activity could be detected histochemically.

In the 2-week group there was weak phosphorylase A activity in the Ammonal cortex and in the corpus callosum. In the brain stem there were abundant deposits of final reaction product in those neuronal formations in which there were glycogen accumulations and UDPG-g-

Fig. 8. Hippocampal cortex. Adult control rat. Diffuse PAS-positive reaction in neuropil and a marked one in vascular walls. $\times 60$.

Ryc. 8. Kora zawoju hipokampa. Dorosły szczur kontrolny. Dyfuzyjny odczyn PAS w neuropilu i znacznie nasilony w ścianach naczyń. Pow. $60 \times$.

Fig. 9. Hippocampal cortex. Adult experimental rat. Markedly diminished PAS reaction. $\times 60$.

Ryc. 9. Kora zawoju hipokampa. Dorosły szczur doświadczalny. Znaczne osłabienie odczynu PAS. Pow. $60 \times$.

Fig. 10. Brain stem. Adult experimental rat. Spongy focus of tissue destruction. Negative PAS reaction inside the focus. $\times 200$.

Ryc. 10. Pień mózgu. Dorosły szczur doświadczalny. Plackowate ognisko zgąbczenia. Brak odczynu PAS w ognisku. Pow. $200 \times$.

Fig. 11. Putamen. 7-days-old experimental rat. Glycogen deposits in large neurons (arrows). Dimedon + PAS. $\times 200$.

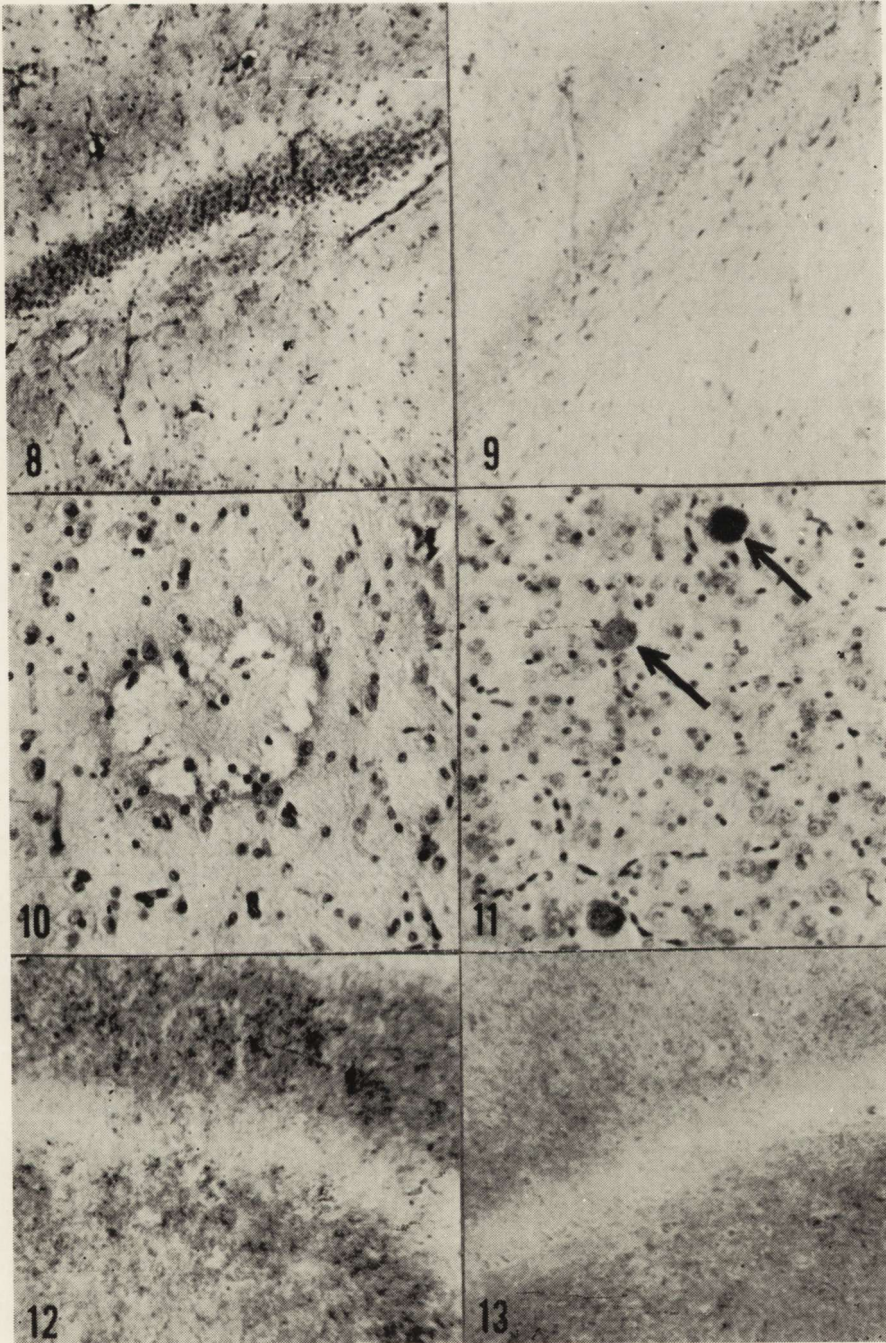
Ryc. 11. Łupina. 7-dniowy szczur doświadczalny. Złogi glikogenu w dużych komórkach nerwowych (strzałki). Dimedon + PAS. Pow. $200 \times$.

Fig. 12. Adult control rat. Activity of total phosphorylase in hippocampal gyrus. $\times 100$.

Ryc. 12. Dorosły szczur kontrolny. Aktywność fosforylasy całkowitej w zawoju hipokampa. Pow. $100 \times$.

Fig. 13. Adult experimental rat. Diminution of total phosphorylase activity in hippocampal gyrus. $\times 100$.

Ryc. 13. Dorosły szczur doświadczalny. Osłabienie aktywności fosforylasy całkowitej w zawoju hipokampa. Pow. $100 \times$.



-transferase activity. At this age there appeared phosphorylase A + B and total activity located in the same formations as phosphorylase A activity and additionally in the neocortex.

In 1-month-old and adult animals the pattern of phosphorylase activity was typical of an adult CNS, that is there was weak phosphorylase A activity in the grey matter and much stronger phosphorylase A activity in the white matter, much stronger phosphorylase A + B activity both in the grey and white matter, and a considerable increase in the reaction for total phosphorylase in the neuropil, neurons and glial cells, and in nerve fibres in the white matter.

The location of phosphorylase activity in experimental animals was the same as in two control groups. However, one observed a marked time delay in the appearance of this activity.

The activity of phosphorylase A in 1-week-old experimental animals was weaker than that in the control group, although in the former there was additional activity in vessel walls. In the 2-week group the histochemical reaction for phosphorylase A activity showed trace activity in the grey matter and no activity in the white matter.

The activity of phosphorylase A in 1-month-old experimental animals, in respect of both location and intensity, corresponded to that of 14-day-old control animals. The pattern of phosphorylase activity in adult animals was similar to control except that the reaction for total phosphorylase activity was considerably weaker (Figs 12, 13).

Glucoso-6-phosphate dehydrogenase. In 1-week-old control animals the activity of this enzyme in grey matter structures of the brain was relatively high, particularly so in the neurons of Ammon's horn (Fig. 14). In 10- and 14-day-old animals this activity went up considerably in the neurons of the hippocampal cortex and in the neuropil of the neocortex, particularly in the IInd layer. Moreover the 2-week group exhibited strong activity in the large astrocytes situated at the cortex-white matter border. At this age, there was weak enzymatic activity in the oligodendroglia. In the 1-month group, the activity of this enzyme in the grey matter diminished considerably; while in the white matter there was an increase in the number of oligodendrocytes exhibiting enzymatic activity. In adult animals G-6-P dehydrogenase activity was relatively weak, as was shown by the weak diffusion reaction in the neuropil of the neocortex and cortex. Somewhat stronger was the activity observed in the glia of the white matter.

As in the control group, in 7-, 10- and 14-day-old experimental animals there was a progressive increase in G-6-P dehydrogenase activity.

However, this increase was not so pronounced as in the control group; for example, in 14-day experimental animals no enzymatic activity was observed in the subcortical glia, while in the control such activity was a very characteristic feature.

The situation changed in the 1-month group of experimental animals; here the activity of G-6-P dehydrogenase was much stronger than in the control group, particularly in the glial cells of the white matter and, to a lesser degree, in the grey matter (Fig. 15). In adult experimental animals the location and intensity G-6-P dehydrogenase activity were similar to those of control, but in the cortex and corpus callosum of the former there were patchy regions of decreased activity corresponding to regions of decreased number of neurons (Fig. 16).

Succinic dehydrogenase. The pattern of SDH activity in the developing brains of both control and experimental rats was almost inversely proportional to that of G-6-P dehydrogenase activity. In 7-day-old experimental and control animals the activity of SDH was barely detectable in the grey matter (Fig. 17) and somewhat stronger in the cells of the choroid plexus and the ependyma. In 2-week-old animals, both experimental and control, there was a slight increase of enzymatic activity in the grey matter, mainly in the deep layers of the neocortex and in the Ammonal cortex. There was still no activity in the white matter.

In the 1-month group of microencephalic and control animals the activity of SDH went up considerably, much more so in the microencephalic group; here the enzymatic reaction was located mainly in the glial cells of the white matter and in the deep layers of the cerebral cortex (Fig. 18). The enzymatic reaction in the cortex and Ammon's horns was as strong as in adult animals but in the experimental group it was stronger than in the control group, in which the monoformazan reaction prevailed. In adult animals, both experimental and control, there was high SDH activity in all the grey matter structures. There was a strong histochemical reaction in the neuropil and in the perikarial part of neurons, particularly in the deep layers of the cortex in the hypothalamic region and in the brain stem. The histochemical reaction of the glial cells of the white matter was considerably weaker. In the brains of experimental animals there were conspicuous patchy regions having a low or zero enzymatic activity in places with decreased number of neurons in the cerebral cortex and in the Ammonal cortex.

Lactic dehydrogenase. There were no significant differences in the activity of this enzyme between experimental and control ani-

mals in all the age groups except for the 1-month group. In 7-, 10- and 14-day-old animals the activity of LDH was weak in all the structures of the brain, though it was definitely stronger than that of SDH.

In 1-month-old animals the activity of LDH was markedly higher than control one, and approached activity occurring in adult animals. Strong histochemical reaction was observed in all the grey matter structures, the strongest being noted in glial cells.

A characteristic feature in adult experimental animals were minute centres of decreased or zero enzymatic activity in the cerebral and Ammonal cortex (Fig. 19).

Generally speaking, it should be stressed that in regions with a decreased number of cells or with disturbances in cell location, both in the white and grey matter, a decrease or lack of enzymatic activity was observed in all the tests mentioned above.

DISCUSSION

Our results indicate that experimental microencephaly with characteristic and permanent structural brain damage caused by methylazoxymethanol acetate is accompanied by abnormalities in the histochemical picture, which are the result of disturbances of certain metabolic pathways of the nervous tissue. It is obvious that the delayed or suppressed development of the cerebral hemispheres established by Spatz and Laqueur (1968a, b) must find expression in metabolic disturbances in the tissue.

Biochemical studies performed by the same authors have shown that content of lipids and phospholipids in the brains of microencephalic animals was down by 20—25%, which could be indicative of myelination disturbances in the nervous system. Subsequent studies (Spatz, Szumańska 1971) have confirmed this by showing that myelination is indeed

Fig. 14. One-week-old control rat. Strong glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neurons of Ammon's horn. $\times 100$.

Ryc. 14. 1-tygodniowy szczur kontrolny. Silna aktywność dehydrogenazy glukoz-6-fosforanu w komórkach nerwowych rogu Amona. Pow. $100 \times$.

Fig. 15. One-month-old experimental rat. Strong glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in glial cells of white matter; grey matter exhibits weaker activity. $\times 100$.

Ryc. 15. 1-miesięczny szczur doświadczalny. Silna aktywność dehydrogenazy glukoz-6-fosforanu w komórkach glejowych istoty białej i nieco niższa w istocie szarej. Pow. $100 \times$.

Fig. 16. Adult experimental rat. Uneven distribution (losses) of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cerebral cortex. $\times 200$.

Ryc. 16. Dorosły szczur doświadczalny. Nierównomierne rozmieszczenie (ubytki) dehydrogenazy glukoz-6-fosforanu w korze mózgowej. Pow. $200 \times$.

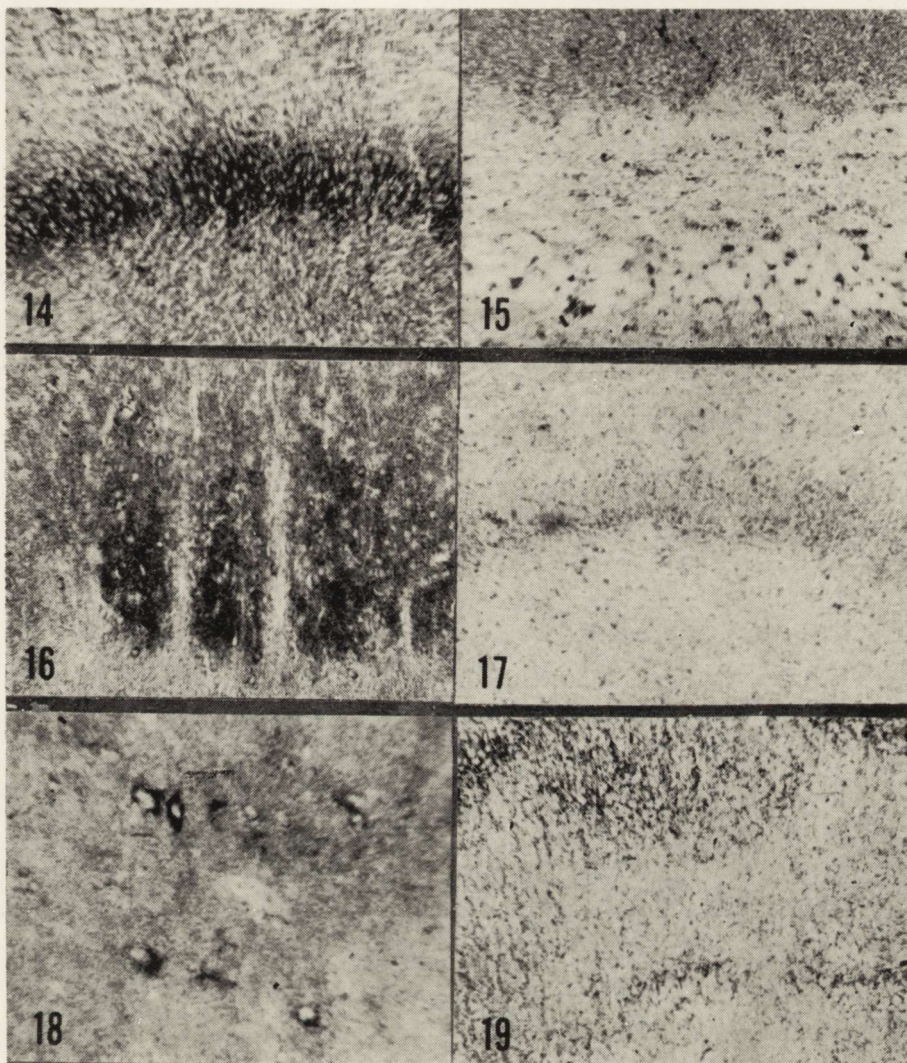


Fig. 17. One-week-old control rat. Weak succinic dehydrogenase activity in hippocampal gyrus. $\times 100$.

Ryc. 17. 1-tygodniowy szczur kontrolny. Słaba aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w zawoju hipokampa. Pow. $100 \times$.

Fig. 18. One-month-old experimental rat. High succinic dehydrogenase activity

in astrocytes of white matter and in neurons of lower cortical layers. $\times 200$.
Ryc. 18. 1-miesięczny szczur doświadczalny. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w astrocytach istoty białej i w neuronach głębszych warstw kory. Pow. $200 \times$.

Fig. 19. Adult experimental rat. Losses of lactic dehydrogenase activity in Ammon's cortex. $\times 100$.

Ryc. 19. Dorosły szczur doświadczalny. Ubytki aktywności dehydrogenazy mleczanowej w korze amonalnej. Pow. $200 \times$.

delayed. Confrontation of available histopathological and histochemical evidence has resulted in the supposition that the delay of myelination process is caused by insufficiency of the oligodendroglia, which, in turn, is a result of the initial cellular damage in the periventricular matrix.

Further evidence for this supposition has been provided by our present studies of animals with cycasin-induced microencephaly, in which we observed changes in the white matter and, what is more important, delayed differentiation of the myelination glia. This is fully reflected by the results of histoenzymatic tests, which show that the activity of the three investigated dehydrogenases in the white matter of 1-month-old animals is high. In 1-month control animals the activity of these enzymes was considerably lower.

Friede (1959) and Farkas-Bargeton and Thieffry (1967) have demonstrated that during the time of undisturbed development and maturation of the nervous system the activity of SDH in the white matter of the brain is minimal or absent altogether. Succinic dehydrogenase activity appears only during the stage of active myelination which in the case of a 1-month-old rat has already been practically completed. In adult animals the activity of SDH in the glial cells of the white matter is considerably lower than before and during the stage of myelination. Of a somewhat different character are the changes in G-6-PDH activity during the development of the nervous system. A characteristic feature of this dehydrogenase is its high activity during the earliest stages of post-natal development of the nerve system (Burt, Wenger 1961, Angeletti et al., 1964; O'Neill and Duffy, 1966; Lehrer et al. 1966) and a decrease in activity at maturity (Kuhlman and Lowry, 1966).

The conspicuous rise in the activity of both enzymes observed in the white matter of 1-month-old experimental animals, with much weaker activity in control rats, should be ascribed to the delay of metabolic processes connected with myelination in the brains of microencephalic animals. During this period one also observe a drop in the enzymatic activity of glial cells in the white matter. Worth mentioning is the analogous character of the increase of activity of the lactic dehydrogenase, whose activity in the glia parallels its differentiation and progressing myelination, and is also a mark of increased metabolism in the glycolytic pathway in the growing and differentiating tissues. The histochemical changes observed in our study point to a generalized delay of the „histochemical maturation” of white and grey matter structures. The most convincing expression of this delay is the delayed appearance

of phosphorylase activity in certain structures of the brain, and the distinctly weaker activity of G-6-P dehydrogenase during the early stages of development in microencephalic rats.

In adult animals these differences between control and experimental were more or less eliminated, although right to the end of our observation the experimental group had a weaker total phosphorylase activity.

Our observations concerning the presence of histochemically detectable glycogen deposits deserve a separate investigation. Spatz (1964) has shown that cycasin and its derivatives MAM and MAMA cause disturbances in the carbohydrate metabolism in the liver evidenced by a drop in glycogen content, which is connected with decreased G-6-PDH activity. These observations induced us to analyse the glycogen presence and the activity of glycogen-metabolizing enzymes. The results indicate that the accumulation of histochemically detectable glycogen, except for its presence in few large cells of the putamen and slight perivascular accumulations in the cortex of microencephalic brains, is virtually the same in both experimental and control brains. Accumulation of glycogen in the nervous tissue, which is a manifestation of histological damage (Miquel and Haymaker, 1965, Guth and Watson, 1968, Ibrahim et al. 1970, Farkas-Bargeton et al. 1972, Long et al. 1972) usually takes place immediately after the occurrence of damaging factor. Normally, glycogen accumulation is a temporary phenomenon. Therefore, in this study the possibility should be taken into account that the absence of glycogen accumulation may be due to the fact that the damaging effect of MAMA is of a long-term nature. Anyway, MAMA leads to selective necrosis of cells in the periventricular matrix. However, it cannot be excluded that the weaker PAS reaction noted in the experimental group in the neuropil of the grey matter, and connected with a lowered tissue content of neutral mucopolysaccharides, could mean that the synthesis of the latter is hindered. Bearing in mind their location, the patches of zero enzymatic activity noted all the enzymes investigated in both the cerebral and the Ammonal cortex is most probably related to the patchy decrease in the number of neurons in the histopathological picture, which are a result of cellular damage in the matrix. The abnormal picture formed as a result of this process is characterised by the absence of these structures which ought to have developed from the cells of the damaged part of the matrix. Maślińska (1973) has observed similar symptoms of histoenzymatic underdevelopment of the tissue, as well as absence of enzymatic activity in some brain structure, in newborn rats subjected to transplacental anoxia.

Also worth mentioning is the occurrence in adult experimental animals of focal losses in the staining for neutral mucopolysaccharides. In respect of location and size, these focal losses correspond to the centres without myelin sheaths observed in previous studies (Spatz, et al. 1971).

Present findings confirm our previous observation concerning the occurrence of dispersed demyelination centres, occasional inflammatory infiltrations situated at the cortex-white matter border, which was questioned by Haddad et al. (1969). It should be stressed that Kroh (1973) has described morphological and histochemical changes of a similar type in animals with microencephaly induced by ethylnitroso-urea.

G. Szumańska, M. Spatz

WPLYW OCTANU METYLAZOKSYMETANOLU (MAMA) PODANEGO
SRÓDCIAŻOWO NA KSZTAŁTOWANIE SIĘ ZMIAN HISTOCHEMICZNYCH
W MÓZGU SZCZURA W RÓŻNYCH OKRESACH JEGO ROZWOJU

Streszczenie

Doświadczalne małomózgowie u potomstwa szczurów wywoływano poprzez podanie ciężarnym samicom octanu metylazoksymetanolu (MAMA). Samice otrzymywały ten związek w jednorazowej iniekcji w 15 dniu ciąży. Charakterystycznym, powtarzalnym efektem działania MAMA jest zmniejszenie rozmiarów półkul mózgowych u całego potomstwa w miocie.

Badano aktywność fosforylaza, UDPG-g-transferazy, dehydrogenazy mleczanowej, bursztynianowej i glukozy-6-fosforanowej oraz oceniano zmiany w zawartości glikogenu i substancji PAS-dodatnich w mózgu szczurów kontrolnych i doświadczalnych. Do badań pobierano mózgi zwierząt w różnym wieku (od 7 dni do 10 miesięcy). Wykazano, że w trakcie rozwoju osobniczego występuje wzrost aktywności fosforylaza, UDPG-g-transferazy i dehydrogenazy bursztynianowej oraz spadek aktywności dehydrogenazy glikozy-6-fosforanowej. Obserwowano również gromadzenie się obojętnych mukopolisacharydów i glikogenu.

W mózgu zwierząt doświadczalnych zmiany aktywności i lokalizacja w/w enzymów i substancji były takie same jak u zwierząt kontrolnych, występowało natomiast wyraźne opóźnienie w ich pojawieniu się w mózgu w procesie rozwoju osobniczego.

Г. Шуманьска, М. Шпац

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛАЗОКСИМЕТАНОЛОКТАНА (МАМА), ПОДАВАЕМОГО
ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ, НА КАРТИНУ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ
ИЗМЕНЕНИЙ В МОЗГЕ КРЫСЫ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ЕГО РАЗВИТИЯ

Резюме

Путем подачи беременным самкам метилазоксиметанолактана (МАМА) вызывали экспериментально микроэнцефалию у потомства крыс. Это вещество вводили самкам на 15 день беременности.

Характерным и повторяющимся эффектом воздействия МАМА было уменьшение размеров мозговых полушарий у животных всего помёта.

Исследовали активность фосфорилаз, УДЮГ-г-трансферазы, дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, а также определяли изменения в содержании гликогена и ПАС-положительной субстанции в мозге контрольных и экспериментальных животных. Для исследований брали мозг животных в возрасте от 7 дней до 10 месяцев. Обнаружено, что в процессе индивидуального развития растёт активность фосфорилаз, УДФГ-г-трансферазы и сукцинатдегидрогеназы, активность же дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата снижалась. Наблюдалось также накопление нейтральных мукополисахаридов и гликогена.

В мозге экспериментальных животных изменения в активности в/у ферментов и расположении веществ были такими же как у контрольных животных, в то же время появление их в мозге в процессе индивидуального развития наступало с заметным опозданием.

REFERENCES

1. Angeletti P. U., Liuzzi A., Levi-Montalcini R., Attardi D. G.: Effect of a growth factor on glucose metabolism by sympathetic and sensory nerve cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1964, 90, 445—450
2. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.* 1959, 34, 95—98
3. Burt A. M., Wenger B. S.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the brain of the developing chick. *Develop. Biol.* 1961, 3, 84—95
4. Farkas-Bargeton E., Thieffry S.: Etudes histoenzymologiques de la maturation du cerveau chez le rat. *Reg. Develop. Brain in Early Life.* Blackwell, 1967, 503—520
5. Farkas-Bargeton E., Olsson Y., Guth L., Klatzo I.: Glycogen reaction to cerebral stab wound during maturation of rat brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 158—169
6. Friede R. L.: Histochemical investigation on succinic dehydrogenase in the central nervous system. I. The postnatal development of the rat brain. *J. Neurochem.* 1959, 4, 101—110
7. Guth L., Watson P. K.: A correlated histochemical and quantitative study on cerebral glycogen after brain injury in the rat. *Exp. Neurol.* 1968, 22, 590—602
8. Haddad R. K., Rabe A., Laqueur G. L., Spatz M., Vasamis M. P.: Intellectual deficit associated with transplacentally induced microcephaly in the rat. *Science* 1969, 163, 88—90
9. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.* 1970, 60, 403—420
10. Jones M., Sweeley C., Yang M.: Effects of methylazoxymethanol glucoside (cycasin) and methylazoxymethanol acetate on the postnatal mouse cerebellum and spinal cord. *Amer. Ass. Neuropath.* 47 Annual Meeting, 1971, Abstracts.
11. Kobayashi A., Matsumoto H.: Methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin. *Fed. Proc.* 1964, 23, 1354—1355
12. Kroh H.: Ethylnitrosourea-induced microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. *Aktuelle Probleme der Neuropathologie; Current Topics in Neuropathology.* 4th Danube Symposium on Neuropathology, Wien, 3—5 Mai, 1973

13. Kuhlman R. E., Lowry O. H.: Quantitative histochemical changes during the development of the rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 1956, 1, 173—180
14. Lehrer G. M., Bornstein N. B., Weiss C., Furman M., Lichtman C.: Enzymes of the rat cerebellum developing „*in situ*” and „*in vitro*”. *Exp. Neurol.* 1970, 27, 410—425
15. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 335—347
16. Maślińska D.: Wpływ asfiksji śródmacicznej na mózg szczura. Ph. D. thesis, Warszawa, 1973
17. Matsumoto H., Nagahama T., Larsen H. O.: Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: a synthesis of methylazoxymethyl acetate. *Biochem. J.* 1965, 95, 13c
18. McManus J. F. A., Mowry R. W.: Effects of fixation on carbohydrate histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1958, 6, 309—316
19. Miquel J., Haymaker W.: Astroglia reaction to ionizing radiation emphasis on glycogen accumulation. *Proc. Brain Res.* 1965, 15, 89—114
20. Nishida K., Kobayashi A., Nagahama T.: Studies on cycasin, a new toxic glycoside of *Cycas revoluta* Thunb. *Bull. Agr. Chem. Soc.* 1955, 19, 77
21. O'Neill J. J., Duffy T. E.: Alternate metabolic pathways in newborn brain. *Life Sci.* 1966, 5, 1849—1857
22. Pearse A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied* 2 Ed. Little, Brown and Comp. Boston 1972
23. Riggs N. V.: Glucosylazoxymethane, a constituent of the seeds of *Cycas circinalis*. *L. chem. Ind.* 1956, 35, 926
24. Spatz M.: Effects of cycad meal and cycasin on histochemically demonstrable liver phosphatase and nonspecific esterases. *Fed. Proc.* 1964, 23, 1381—1382
25. Spatz M.: Toxic and carcinogenic alkylating agents from cycads. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1969, 163, 848—859
26. Spatz M., Laqueur G. L.: Transplacental chemical induction of microcephaly in two strains of rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968a, 129, 705—710
27. Spatz M., Laqueur G. L.: Evidence for transplacental passage of the natural carcinogen cycasin and its aglycone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968b, 127, 281—286
28. Spatz M., Szumańska G., Laqueur G. L.: Some biochemical and histochemical changes in MAM induced microcephaly in rats. *Amer. Ass. of Neuropath.*, 47 Annual Meeting, 1971 San Juan, Abstracts
29. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—314

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

JERZY W. BOROWICZ, AGNES DANIELEWICZ-KOTOWICZ,
RENATA MARYNIAK

ELECTRON-MICROSCOPIC CHANGES IN RAT HYPOPHYSIS INDUCED BY MORPHINE

I. ADENOHYPHYSIS

Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System,
Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences
Head: Ass. Prof. J. W. Borowicz

Synthesis and secretion of hormones from the glandular lobe of the hypophysis depends mainly on the releasing factors produced in the hypothalamus.

The effect of morphine on the central nervous system has been studied morphologically (Biscoe et al., 1972; Way et al., 1972; Borowicz et al., 1974; Borowicz and Gajkowska, 1975) and biochemically (Takamori, 1965, Dodge and Takamori, 1969; Eidelberg and Schwartz, 1970; George, 1971). The biochemical studies have indicated that following administration of large doses of morphine brain hypoxia is the main cause of the changes in the central nervous system. On the other hand, it is well known that morphine administration, particularly in large doses may cause the appearance of stress reaction and therefore, also increase of ACTH secretion from the glandular lobe of the hypophysis (Seyle, 1936; George and Way, 1955; Nikodijevic and Maichel, 1967). Chronic administration of this drug leads to development of tolerance (Bacq, 1971) and to a decrease of ACTH secretion (Briggs and Mundson, 1955, Wells et al., 1956).

The aim of this study was to follow electron-microscopic changes in the cells of the hypophysis under the effect of morphine giving special attention to the formation and secretion of secretory granules.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out on 21 rats, Wistar strain males, mean weight at the beginning of experiment 200 g. Animals were divided into 5 experimental groups:

Group 1 — control, healthy rats.

Group 2 — acute morphine poisoning — animals received *morphi-*

num hydrochloricum (Polfa) subcutaneously, in the dorsal region, in a single dose of 50 mg/kg of body weight. This dose did not cause the appearance of any disorders in circulatory and respiratory systems, and at the same time the rats showed somnolence and a diminished reaction to external stimuli. Glandular lobe of hypophysis was obtained for examination 1,5 hour after the injection of morphine.

Group 3 — chronic morphine intoxication — morphine was administered to animals each day, for 60 days in a dose of 5 mg/kg of body weight. Glandular lobe was obtained for examination directly after the last morphine injection.

Group 4 — 3 days of morphine withdrawal. The glandular lobe was obtained for examination from rats, as in group 3 but 3 days after the last morphine injection.

Group 5 — 12 days of morphine withdrawal — rats which received for 60 days 5 mg/kg of body weight of morphine. Glandular lobe was obtained for examination 12 days after the last injection of morphine.

Tissue samples from the glandular lobe of the hypophysis were fixed in 3% glutaraldehyde at pH 7,4 for 1 hour then in 2% OsO₄ pH 7,4 for 1,5 hour, dehydrated in increasing alcohol concentrations and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with saturated aqueous solution of uranyl acetate and Reynolds reagent. Pictures were taken in JEM 7 A electron microscope with the accelerating voltage 80 kV.

RESULTS

Group 1 — control. All types of secretory cells showed no changes and closely resembled those previously described in hypophysis of normal rats by Pelletier and Racadot (1971), Danielewicz-Kotowicz (1974).

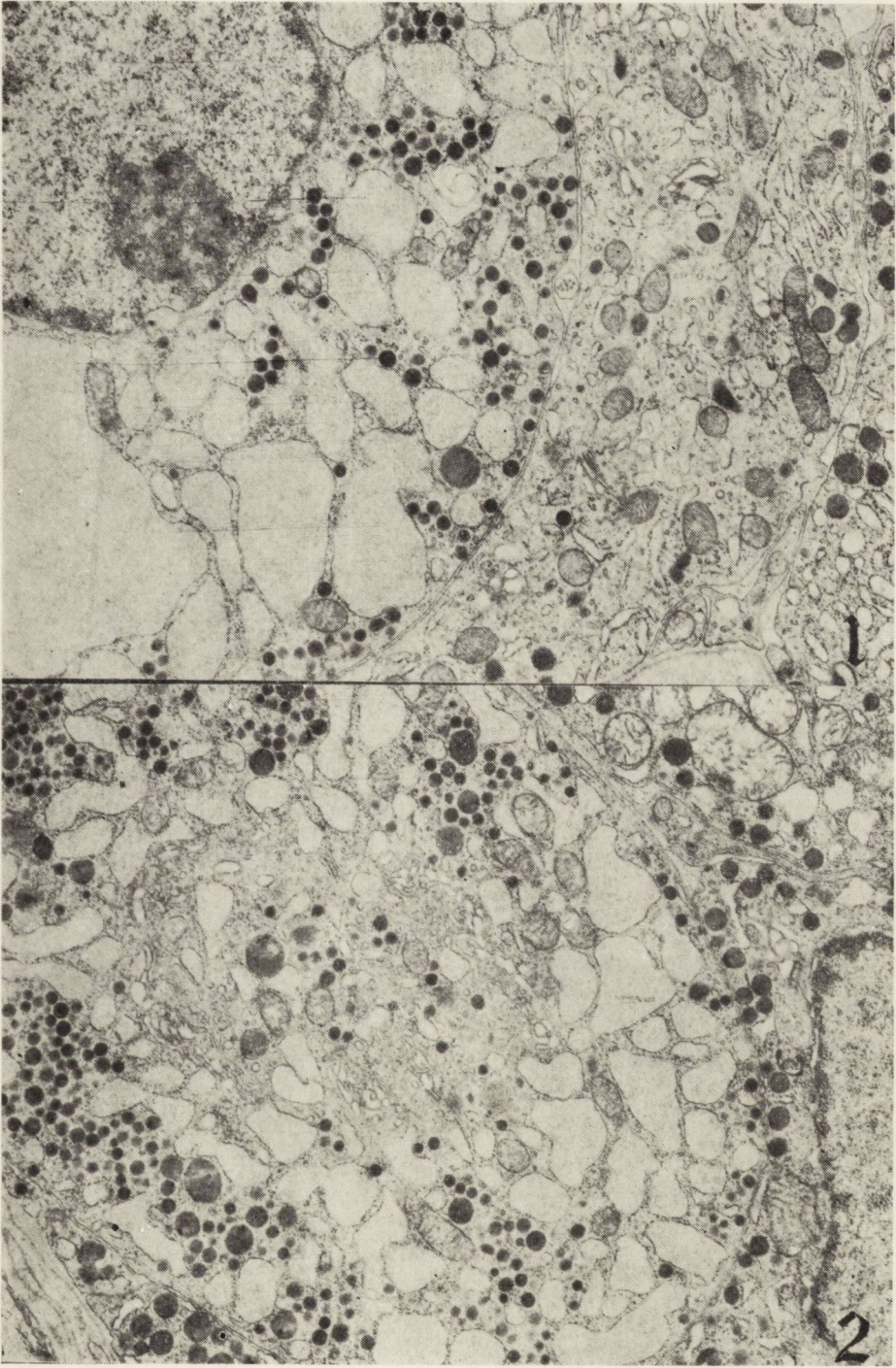
Group 2 — after acute morphine poisoning the most prominent electron microscopic changes in the glandular lobe of the hypophysis are found in the cells secreting gonadotropins. These changes mainly involve the rough endoplasmic reticulum; its channels are significantly dilated and form large spaces (Fig. 1).

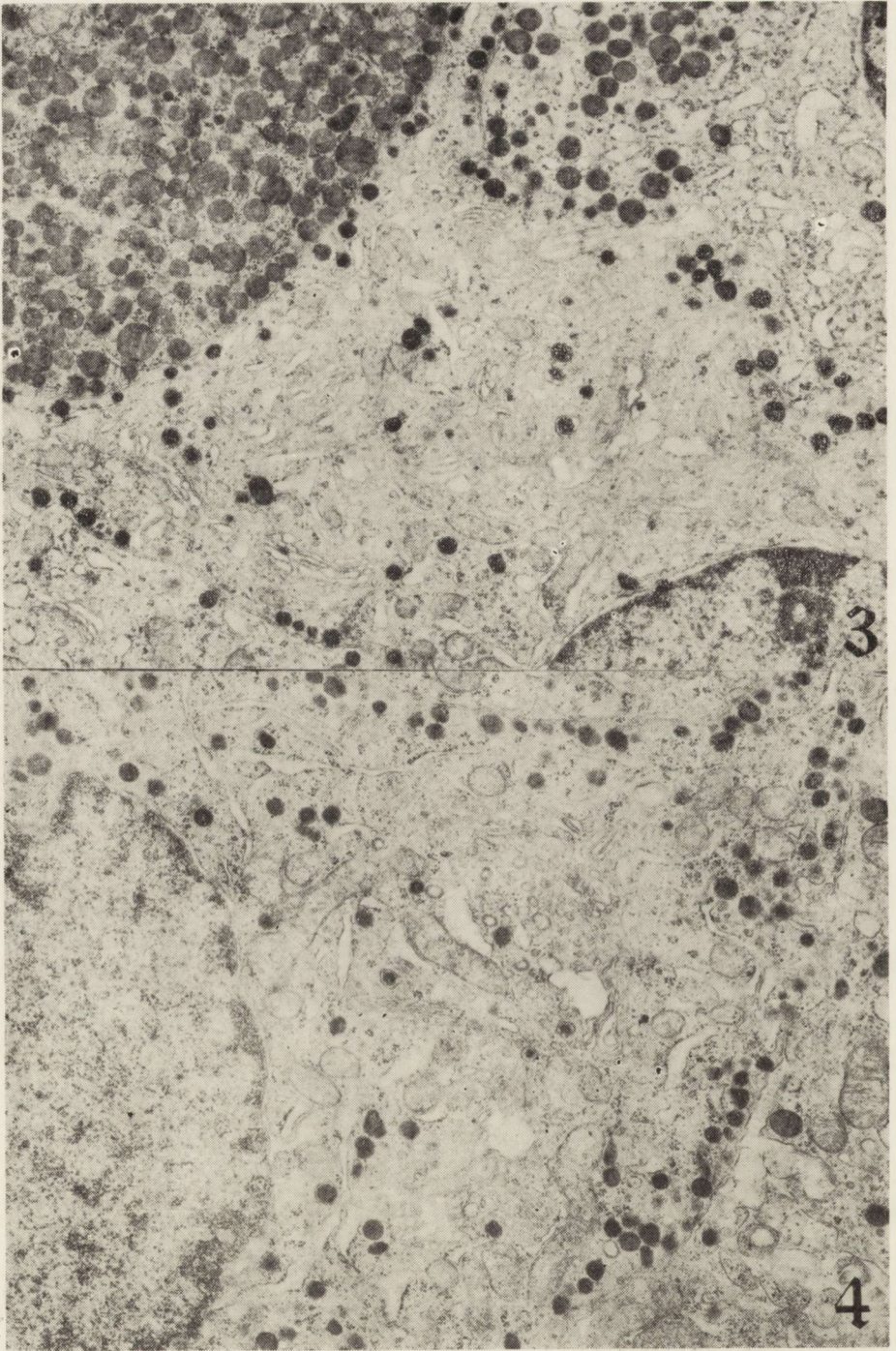
Fig. 1. Acute morphine poisoning. Gonadotropins secreting cell. Rough endoplasmic reticulum channels significantly dilated, the number of secretory granules smaller than in the norm. $\times 10\ 250$.

Ryc. 1. Ostre zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca gonadotropiny. Bardzo poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej, ilość ziarnistości sekretorycznych mniejsza niż w normie. Pow. $10\ 250 \times$.

Fig. 2. Acute morphine poisoning. Gonadotropins secreting cell. Dilated channels of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus consisting of numerous channels and small vesicles. $\times 10\ 250$.

Ryc. 2. Ostre zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca gonadotropiny. Poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej oraz aparat Golgiego zbudowany z licznych kanałów i małych pęcherzyków. Pow. $10\ 250 \times$.





The Golgi apparatus is better developed than in control and consists of narrow, short channels and large number of small vesicles (Fig. 2). The accumulation of secretory granules is slightly smaller than in the norm. In the cells secreting ACTH the changes also involve the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. The Golgi apparatus is very well developed, visible in several areas of the cell. In the vicinity of the Golgi apparatus granules surrounded by „halo” are observed. The rough endoplasmic channels are also dilated. The number of ribosomes is close to norm. The accumulation of secretory granules is similar as in the norm (Fig. 3, 4). The cells secreting STH, TSH and prolactin do not exhibit any prominent changes in the electron-microscopic structure.

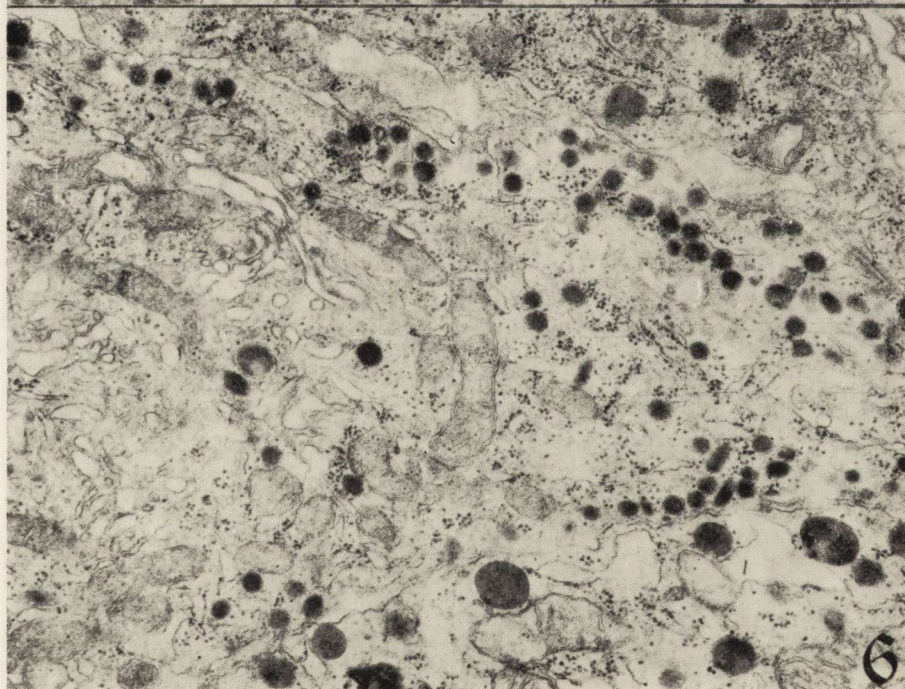
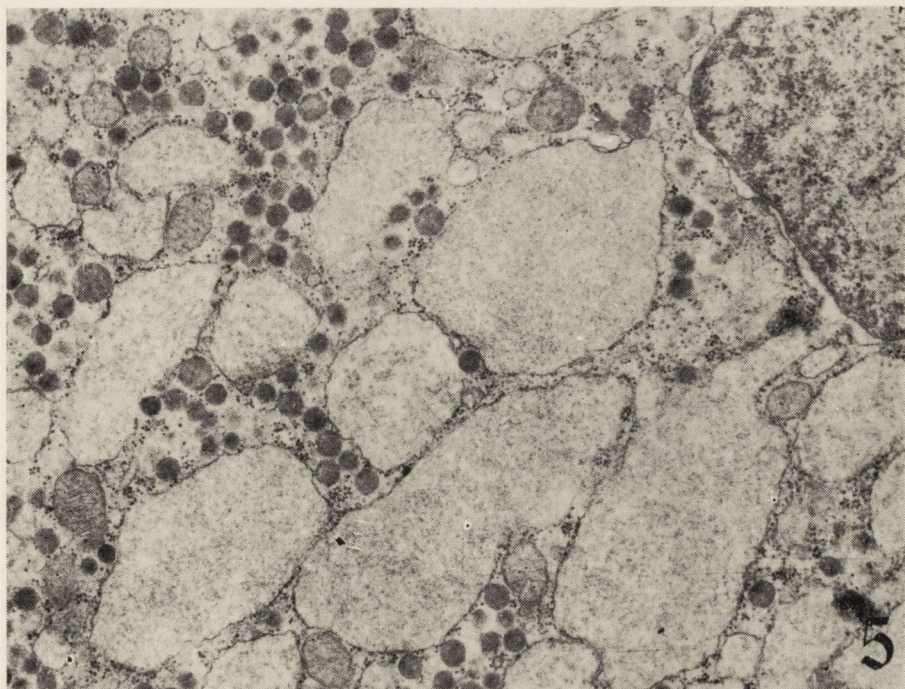
Group 3 — after chronic morphine poisoning electron microscopic changes in the cells of the glandular lobe have a similar character as following acute poisoning; however, they are less prominent. The most pronounced changes are observed in the cells secreting gonadotropins and they concern mainly the endoplasmic reticulum. The rough endoplasmic reticulum channels are dilated, filled with an amorphous material of low electron density. The number of secretory granules is slightly smaller than in the norm (Fig. 5). The changes observed in the ACTH secreting cells concern mainly the Golgi apparatus which is well developed. Its vesicles are numerous and sometimes filled with a material of high electron density. The rough endoplasmic reticulum channels are rather narrow, not dilated. The accumulation of secretory granules is similar as in controls and in animals after acute morphine intoxication (Fig. 6). The cells secreting STH are also characterized by dilated channels of the rough endoplasmic reticulum and well developed Golgi apparatus. The number of secretory granules is smaller than

Fig. 3. Acute morphine poisoning. ACTH-secreting cell. Golgi apparatus small, but more developed than in the norm with electron dense material in channels, in the vicinity of the Golgi apparatus numerous vesicles containing material of high electron density. In the left corner — STH-secreting cell. $\times 10\ 250$.

Ryc. 3. Ostre zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca ACTH. Aparat Golgiego mały, ale bardziej rozwinięty niż w normie, w jego kanałach materiał o dużej gęstości elektronowej, w pobliżu aparatu Golgiego liczne pęcherzyki zawierające materiał o dużej gęstości elektronowej. W lewym rogu — komórka wydzielająca STH. Pow. $10\ 250 \times$.

Fig. 4. Acute morphine poisoning. ACTH-secreting cell. Rough endoplasmic reticulum channels dilated, Golgi apparatus well developed with numerous vesicles filled with material of high electron density. $\times 12\ 750$.

Ryc. 4. Ostre zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca ACTH. Kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej poszerzone, aparat Golgiego dobrze rozwinięty z licznymi pęcherzykami wypełnionymi materiałem o dużej gęstości elektronowej. Pow. $12\ 750 \times$.



in the norm. The cells secreting TSH and the cells secreting prolactin do not manifest any changes.

Group 4 — Three days after morphine withdrawal the changes in the cells secreting gonadotropins have a different character than in the previously described experimental groups. Dilation of the rough endoplasmic reticulum channels is insignificant. A great number of ribosomes is observed attached to the membranes as well as freely distributed in the form of rosettes. The number of secretory granules is smaller than in gonadotrops of control animals and following acute morphine poisoning. Very numerous (10—14 in one cell) large, oval or round lysosome-like structures appear in the cells (Fig. 7). In ACTH secreting cells the system of rough reticulum membranes is more uniform and the Golgi apparatus is less developed than in the ACTH secreting cells of the adenohipophysis of animals from the previously mentioned groups. The number of secretory granules is close to norm (Fig. 8). The STH, TSH and prolactin-secreting cells do not display any significant changes.

Group 5 — Twelfth days after morphine withdrawal the electron-microscopic structure of the cells of adenohipophysis seems to be identical with the norm.

DISCUSSION

The investigations justify the conclusion that acute as well as chronic morphine poisoning cause the appearance of prominent electron-microscopic changes in the cells secreting gonadotropins and in the ACTH secreting cells. Following chronic morphine intoxication some changes were also observed in the STH secreting cells.

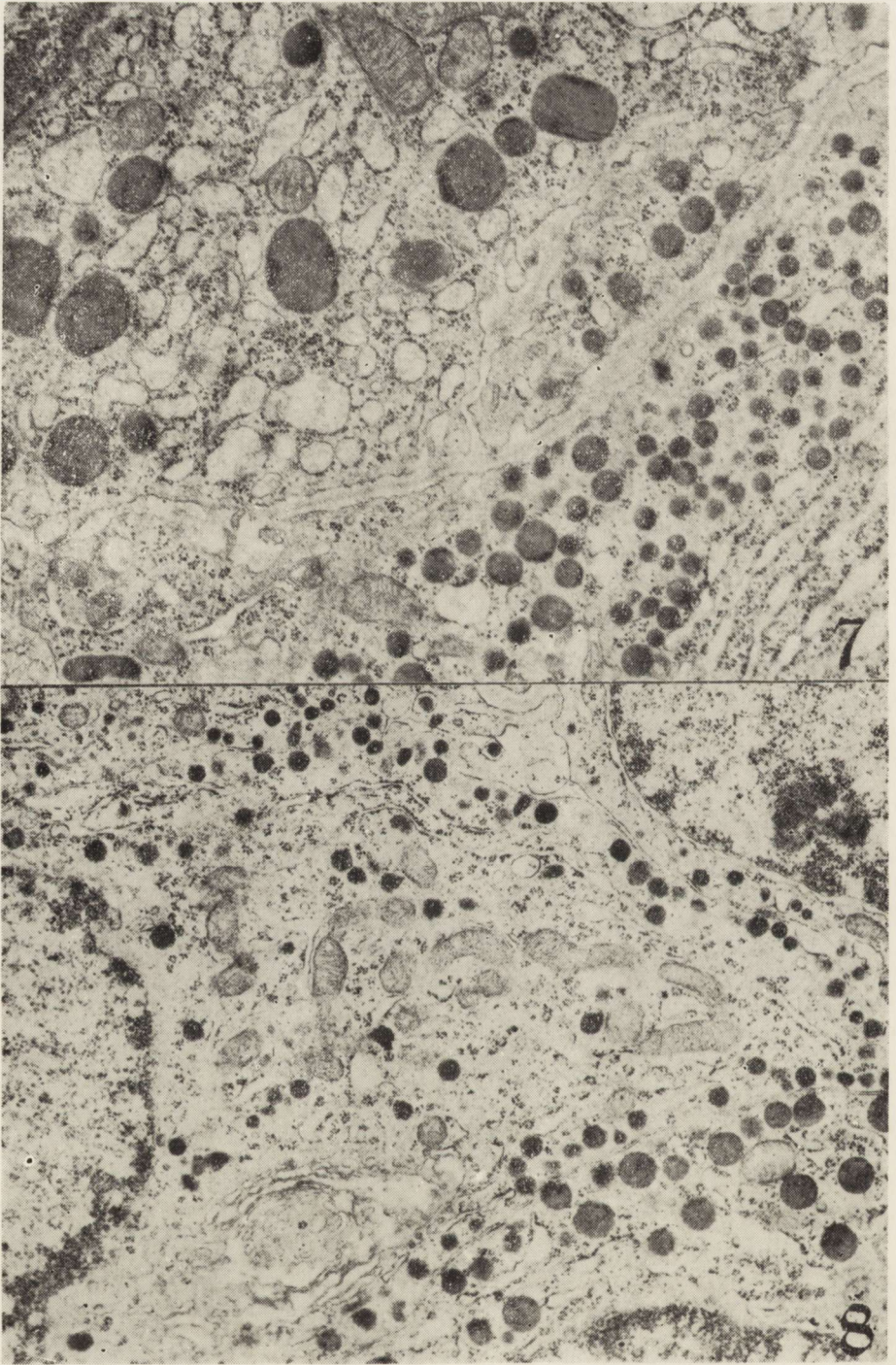
The most prominent changes were found after acute morphine poisoning in gonadotropic cells, suggesting an increased synthesis of the

Fig. 5. Chronic morphine intoxication. Gonadotropins secreting cell. Very wide channels of endoplasmic reticulum. Inside — amorphous or granular material of low electron density. $\times 10\ 300$.

Ryc. 5. Przewlekłe zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca gonadotropiny. Bardzo szerokie kanały siatki śródplazmatycznej, zawierające amorficzny lub ziarnisty materiał o małej gęstości elektronowej. Pow. $10\ 300 \times$.

Fig. 6. Chronic morphine intoxication. ACTH-secreting cell. Well developed Golgi apparatus, rather narrow channels of rough endoplasmic reticulum. Quite numerous secretory granules located near the cell membrane. $\times 18\ 250$.

Ryc. 6. Przewlekłe zatrucie morfiną. Komórka wydzielająca ACTH. Dobrze rozwinięty aparat Golgiego, raczej wąskie kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Dość liczne ziarnistości sekrecyjne ułożone przy błonie komórkowej. Pow. $18\ 250 \times$.



secret. This finding is in agreement with those of Rennels (1961) who noted increased secretion of gonadotropic hormones after morphine administration. The changes were manifested by a dilation of rough endoplasmic reticulum channels. A homogenous or fine-granular material of low electron density frequently appeared in dilated channels of the rough endoplasmic reticulum. Zambrano et al. (1974) expressed the opinion that this material is probably a precursor of the hormones that are formed within rough endoplasmic reticulum. After acute morphine poisoning, gonadotropic cells had an enlarged Golgi apparatus which also indicated an increase of secretion (Pelletier et al., 1972).

Following chronic morphine intoxication the changes in gonadotropic cells had a similar character and concerned the same cytoplasmic structures but their intensity was much less prominent. This fact would indicate development of tolerance to morphine in the course of chronic administration of the drug (Paroli and Melchiori, 1961).

The accumulation of secretory granules in the gonadotropins-secreting cells after acute and chronic morphine poisoning was only slightly smaller than in controls. At the same time morphological signs of increased secret synthesis were observed. Therefore we should assume that synthesis of the secretion products exceeds their secretion.

After acute morphine intoxication electron-microscopic changes were also observed in the cells secreting ACTH. The changes mainly concerned the rough endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. The Golgi apparatus was large, appeared in the form of numerous channels containing usually material of rather high electron density and numerous vesicles. Dilation of the rough endoplasmic reticulum channels (Pelletier et al., 1972; Danielewicz-Kotowicz, 1974) and enlargement of the Golgi apparatus (Caro et al., 1964) are considered to be a morphological sign of increased synthesis of the secret. Several authors did not find any significant correlation between increased secretion of the

Fig. 7. Three days of morphine withdrawal. Gonadotropins secreting cell. Rough endoplasmic reticulum channels similar to those in the norm, scanty secretory granules, numerous lysosome-like structures. $\times 11\ 750$.

Ryc. 7. Trzy dni po zaprzestaniu podawania morfiny. Komórka wydzielająca gonadotropiny. Kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej o budowie prawidłowej, pojedyncze ziarnistości sekrecyjne, liczne struktury lizosomopodobne. Pow. $11\ 750 \times$.

Fig. 8. Three days of morphine withdrawal. ACTH-secreting cell. Its structures resembles the norm, only Golgi apparatus still more developed than in the norm. $\times 10\ 300$.

Ryc. 8. Trzy dni po zaprzestaniu podawania morfiny. Komórka wydzielająca ACTH. Jej budowa przypomina normę, jedynie aparat Golgiego nadal silniej rozwinięty niż w normie. Pow. $10\ 300 \times$.

secretion product and the amount of secretory granules present in the ACTH secreting cells. Therefore in experimental conditions causing increased secretion of the adenocorticotropic hormone no decrease in the number of secretory granules was observed in the ACTH secreting cells (after adrenalectomy — Pelletier and Racadot, 1971; Danielewicz-Kotowicz, 1974, after stimulation with N⁶ Monobutyryl Adenosine 3'5' Monophosphate — Pelletier et al., 1972). Similarly no decrease in the number of secretory granules in the ACTH secreting cells was found after acute morphine poisoning, although according to the stress reaction (Selye, 1936) an increased secretion of ACTH could be expected. Following chronic morphine intoxication the changes in the ACTH secreting cells are less prominent. This is in agreement with the results of Wells et al. (1936) who found that chronically administered morphine inhibits stress reaction and therefore causes diminished ACTH secretion.

As a result of chronic morphine intoxication a decreased number of secretory granules was observed in the STH secreting cells. This finding is difficult to explain merely on the basis of morphological studies. A diminished number of secretory granules may be due to inhibited synthesis or their increased secretion from the cells.

Numerous lysosome-like structures were observed in gonadotropins and STH secreting cells as a result of 3-days morphine withdrawal. According to Smith and Farquhar (1966) these structures are formed from the fusion of secretory granules with lysosomes. The authors named these structures autolysosomes and claim that they digest endogenous material.

Electron-microscopic structure of the ACTH secreting cells after 3 days of morphine withdrawal was similar to those in the norm, which may be related to inhibition of the stress reaction and therefore increased secretion of ACTH after chronic morphine intoxication.

After 12 days of morphine withdrawal no distinct electron-microscopic changes were found in the cells of the adenohipophysis.

CONCLUSIONS

1. Acute morphine poisoning causes the appearance of morphological changes in the cells secreting gonadotropins and ACTH. The changes concern rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and indicate increase of secretion.

2. In chronic morphine intoxication morphological changes appearing in gonadotropic cells and the cells secreting ACTH are less prominent than after acute morphine poisoning and indicate development of tolerance to the drug.

3. Following chronic morphine intoxication a decrease of secretory granules in the cells secreting STH may indicate the inhibition of their synthesis.

4. Regression of electron-microscopic changes in the cells of adenohypophysis after 12 days of morphine withdrawal indicates a short-lasting and reversible effect of morphine on the cells of adenohypophysis.

J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak

ZMIANY W BUDOWIE MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWEJ PRZYSADKI SZCZURA POD WPŁYWEM MORFINY

I. Płat gruczołowy przysadki

Streszczenie

Prześlędzono zmiany mikroskopowo-elektronowe w komórkach płata gruczołowego przysadki szczura po ostrym i przewlekłym zatruciu morfiną. Ostre zatrucie wywoływano przez jednorazową iniekcję podskórną *Morphinum hydrochloricum* w dawce 50 mg/kg wagi ciała. Przewlekłe zatrucie wywoływano podając zwierzętom przez 60 dni *Morphinum hydrochloricum* w iniekcjach po 5 mg/kg wagi ciała dziennie. Stwierdzono, że ostre zatrucie morfiną powoduje wystąpienie zmian morfologicznych w komórkach wydzielających gonadotropiny oraz w komórkach wydzielających ACTH. Zmiany te dotyczyły siatki śródplazmatycznej szorstkiej i aparatu Golgiego — świadczyły o wzmożonej syntezie sekretu. W przewlekłym zatruciu morfiną zmiany morfologiczne występujące w komórkach wydzielających gonadotropiny i w komórkach wydzielających ACTH miały mniejsze nasilenie niż po ostrym zatruciu morfiną, co może świadczyć o powstałej tolerancji na ten lek. Po przewlekłym zatruciu morfiną zmniejszenie ilości ziarnistości sekrecyjnych w komórkach wydzielających STH wydaje się przemawiać za zahamowaniem ich syntezy lub zwiększonym wydzielaniem z komórek. Po 12 dniach po zaprzestaniu podawania morfiny obrazy morfologiczne komórek płata gruczołowego przysadki nie różniły się od opisywanych w normie.

Е. В. Борович, А. Даниелевич-Котович, Р. Марыняк

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОМ СТРОЕНИИ ГИПОФИЗА КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ МОРФИЯ

I. Железистая доля гипофиза

Резюме

Прослежены электронно-микроскопические изменения в клетках железистой доли гипофиза крысы после острого и хронического отравления морфием. Острое отравление вызывали путем однократной подкожной инъекции *Morphinum hydrochloricum* в дозе 50 мг на кг веса тела. Хроническое отравление вызывали, давая животным в течение 60 дней *Morphinum hydrochloricum* в инъекциях по 5 мг ин кг веса тела ежедневно. Установлено, что острое отравление морфием

вызывает появление морфологических изменений в клетках, выделяющих гонадотропины, а также в клетках, выделяющих АКТГ. Изменения эти касались шероховатой эндоплазматической сети и аппарата Гольджи и свидетельствовали об усиленном синтезе секрета. При хроническом отравлении морфием морфологические изменения, появляющиеся в клетках, выделяющих гонадотропины, и в клетках, выделяющих АКТГ, были менее сильными, чем после острого отравления морфием, что может свидетельствовать о возникшей толерантности к этому лекарству. После хронического отравления морфием уменьшение количества секреторных зернистостей в клетках, выделяющих СТГ, возможно говорит в пользу торможения их синтеза или повышенного выделения их из клеток. Через 12 дней после прекращения дачи морфия морфологические картины клеток железистой доли гипофиза не отличались от описываемых в норме.

REFERENCES

1. Bacq Z. M.: In: *Fundamentals of Biochemical Pharmacology*, Pergamon Press, 1971, 571—609.
2. Biscoe T. J., Duggan A. W., Lodge D.: Effect of eumorphine, morphine and dipremorphine on neurons of cerebral cortex and spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 1972, 46, 201—212.
3. Borowicz J. W., Gajkowska B.: Electronmicroscopic studies of the supraoptic and paraventricular nuclei of rat in acute morphine poisoning. *Neuropat. Pol.*, 1976, 2, 209—216.
4. Borowicz J. W., Jurkiewicz J., Olszewska K.: Electron microscopic changes in acute morphine poisoning of the rat brain. *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, 1974, 19, 99—100.
5. Briggs F. N., Munson P. L.: Studies on the mechanism of stimulation of ACTH secretion with the aid of morphine as a blocking agent. *Endocrinol.*, 1955, 57, 205—219.
6. Caro L. G., Palade G. E.: Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J. Cell Biol.*, 1964, 3, 473—496.
7. Danielewicz-Kotowicz A.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w przysadce szczura po adenektomii oraz po podaniu ACTH. I. Płat gruczołowy przysadki. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 345—356.
8. Dodge D. H., Takemori A. E.: Changes in rat cerebral glycolytic intermediates in vivo after treatment with morphine, nalorphine or pentobarbital. *Biochem. Pharmacol.*, 1969, 18, 1873—1882.
9. Eidelberg E., Schwartz A. S.: Possible mechanism of action of morphine on brain. *Nature*, 1970, 225, 1172.
10. George R.: The effect of narcotic analgesis on the hypothalamus. Pituitary gland. In: *Narcotic drugs, Biochemical Pharmacology*. Ed. D. H. Clouet, 1971.
11. George R., Way E. L.: Studies on the mechanism of pituitary activation by morphine. *Br. J. Pharmacol. Chemiother.*, 1955, 10, 260—264.
12. Nicodijevic O., Maickel R. P.: Same effects of morphine on pituitary-adrenocortical function in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 1967, 16, 2137—2142.
13. Paroli E., Melchiori P.: Urinary excretion of hydroxysteroids and aldosterone in rats during a cycle of treatment with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1961, 132, 226—231.

14. Pelletier G., Racadot J.: Identification des cellules hypophysaires secretant l' ACTH chez le rat. *Z. Zellforsch.*, 1971, 116, 228—239.
15. Pelletier G., Lamay A., Borand G., Labrie F.: Ultrastructural changes accompanying the stimulatory effect of N⁶ monobutyryl adenosine 3'5'monophosphate on the release of growth hormone (GH), prolactin (PRL) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in rat pituitary gland in vitro. *Endocrinol.*, 1972, 91, 1355—1371.
16. Rennels E. G.: Effect of morphine on pituitary cytology and gonadotropic levels in the rat. *Texas Rep. Biol. Med.*, 1961, 57, 646—657.
17. Selye H.: Thymus and adrenals in the reponse of organism to injuries and intoxication. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1936, 17, 234—248.
18. Smith R. E., Farquhar M. G.: Lysosome function in the regulation of secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.*, 1966, 31, 319—347.
19. Takemori A.: Effect of central depressant agents on cerebral G-6-P dehydrogenase activity of rats. *J. Neurochem.*, 1965, 12, 407—415.
20. Way E., Loh H. H., Way E. L.: Neuroanatomical correlates of morphine dependence. *Science* 1972, 117, 616—617.
21. Wells J., Briggs F. N., Munson F. L.: The inhibitory effect of reserpine on ACTH secretion in response to stressful stimuli. *Endocrinol.*, 1956, 59, 571—579.
22. Zambrano D., Cuervo-Rocha S., Bargmann I.: Ultrastructure of rat pituitary gonadotrophs following incubation of the gland with synthetic LH-RH. *Cell and Tissue Res.*, 1974, 150, 179—192.

Authors address: Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Pol. Ac. Scie., 3, Dworkowa Str., 00—784 Warszawa.

JERZY W. BOROWICZ, AGNES DANIELEWICZ-KOTOWICZ,
RENATA MARYNIAK

ELECTRON-MICROSCOPIC CHANGES IN RAT HYPOPHYSIS INDUCED BY MORPHINE

II. NEUROHYPOPHYSIS

Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System,
Medical Research Centre, Polish Academy of Science
Head: Ass. Prof. J. W. Borowicz

The mechanism of antidiuretic effect of morphine on the hypothalamo-hypophyseal system has not been yet elucidated. Some observations permit to assume that morphine affects the secretion of antidiuretic hormone from the neurohypophysis (De Bodo, 1959). Other authors suggest that antidiuretic effect of morphine mainly depends on the disorders in renal hemodynamics and that morphine does not cause a significant increase of antidiuretic hormone secretion (Fujimoto 1971). The studies of de Bodo (1959) seem to indicate that antidiuretic hormone secretion is a result of morphine action on the hypothalamo-hypophyseal system. Giarman et al. (1953) noted a decreased antidiuretic activity in animals which received morphine after hypophysectomy. Handley and Keller (1950) proved that secretion of vasopressin after chemical stimulation is possible even after damage of the supraoptic-hypophyseal tract.

Winter et al. (1954) postulate that morphine affects mainly the central nervous system and the antidiuretic effect of this drug depends on its direct action on the hypothalamus. The studies of Crawford and Pinkham (1955) indicate that in rats morphine does not stimulate the antidiuretic hormone secretion.

The aim of our investigations was to follow the electron-microscopic changes in the neurohypophysis appearing after acute and chronic morphine intoxication and in the course of morphine withdrawal.

MATERIAL AND METHOD

The experimental material and the methods were the same as in part I of our study, with the only difference that in the part II, we examined the neural lobe of hypophysis.

RESULTS

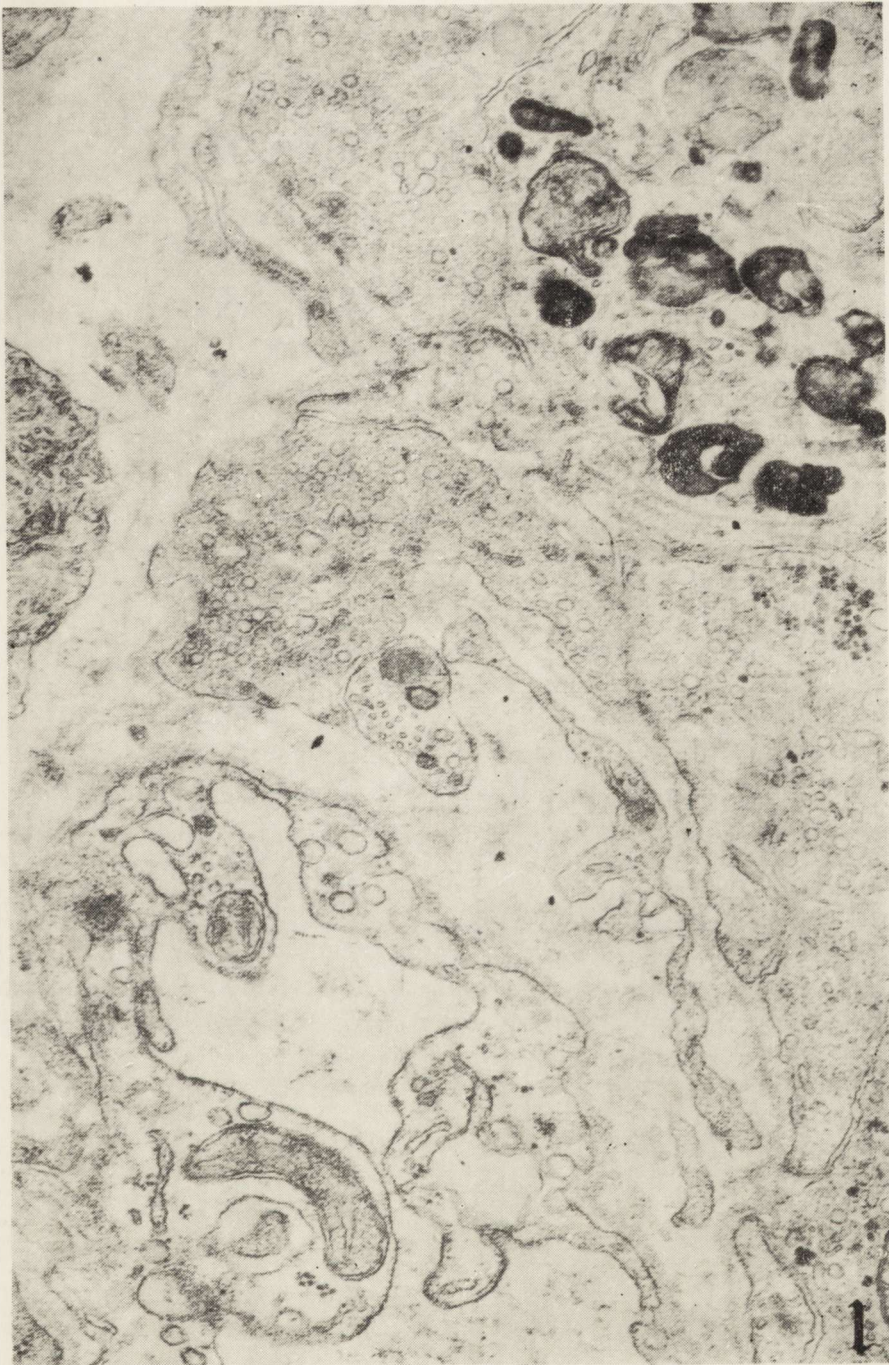
Group 1 — control. The appearance of the neurohypophyseal fibers does not differ from the norm. These fibers contain typical structures: elementary granules, neurotubules, microvesicles and mitochondria. Morphological appearance of pituicytes did not differ from that usually described in healthy rats.

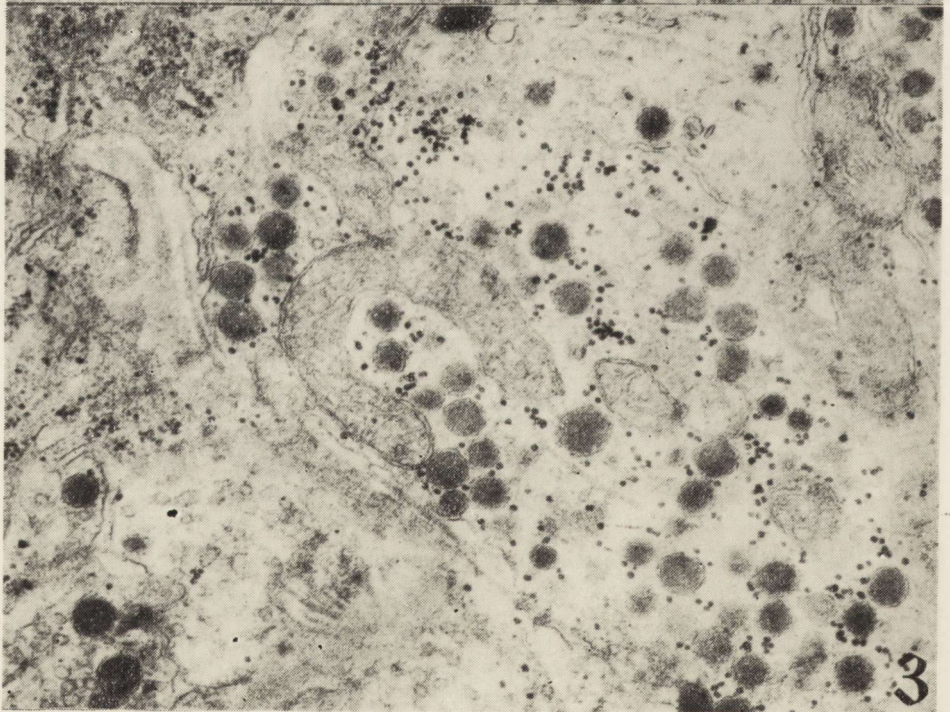
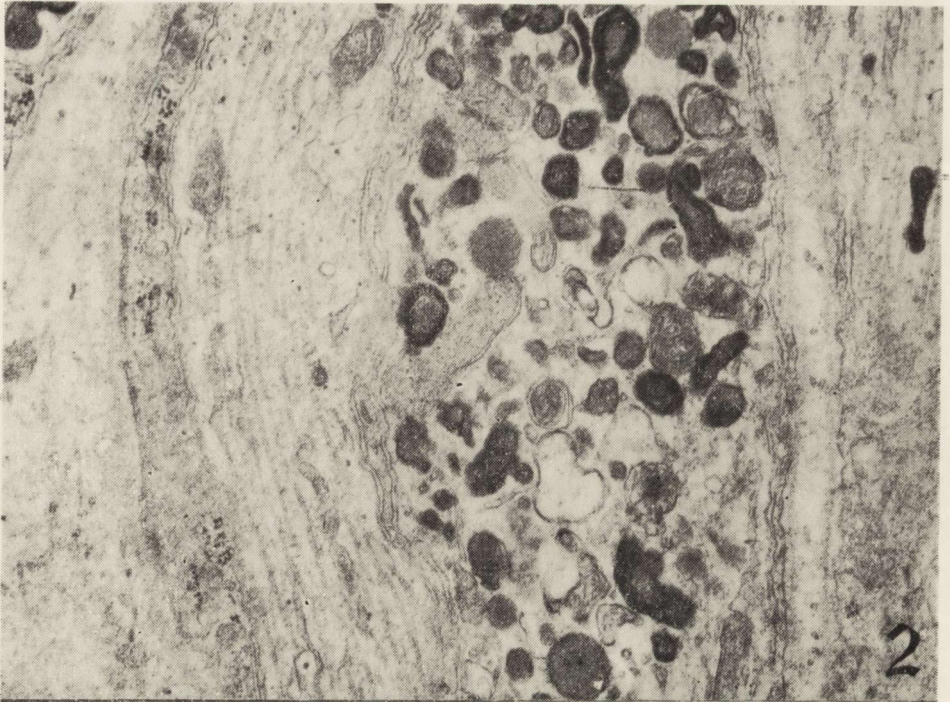
Group 2 — acute morphine poisoning. Electron-microscopic changes in fibers of the neurohypophysis after acute morphine intoxication are slight. The accumulation of elementary granules seems to be only slightly smaller than in the norm. However, more frequently nerve fibers are encountered filled with microvesicles and containing only single elementary granules. Also more frequently than in the norm, nerve fibers are found with numerous lysosome-like structures, and in some fibers scanty accumulations of glycogen granules are observed. In some capillaries swollen endothelial cells were observed with clear cytoplasm and numerous pinocytotic vesicles (Fig. 1). More frequently than in the norm, cytoplasm of some pituicytes contains large, oval structures of lipidic character.

Group 3 — chronic morphine poisoning. After chronic morphine poisoning only some fibers in the neurohypophysis have electron-microscopic structure resembling the norm. In most fibers the number of elementary granules is much smaller than in the nerve fibers of control hypophysis. In many fibers numerous membranous and lysosome-like structures appear (Fig. 2). Moreover, numerous glycogen granules are observed in many neurosecretory fibers (Fig. 3). Some of nerve fibers appear with a completely altered structures. These fibers

Fig. 1. Acute morphine poisoning. Nerve fiber filled with numerous lysosome-like structures and myelin figures, in one of the fibers small accumulation of glycogen granules. Swollen endothelial cell of the vascular lumen, with clear cytoplasm and numerous pinocytotic vesicles. In the nerve fibers surrounding the blood vessel numerous microvesicles and only single elementary granules. $\times 25\ 800$.

Ryc. 1. Ostre zatrucie morfiną. Włókno nerwowe wypełnione licznymi strukturami lizosomopodobnymi i figurami mielinowymi, w jednym z włókien znajduje się niewielkie nagromadzenie ziaren glikogenu. Komórka śródbłonna naczynia krwionośnego obrzęknięta, o jasnej cytoplazmie z licznymi pęcherzykami pinocytarnymi. W otaczających naczynie włóknach nerwowych występują liczne mikropecherzyki i tylko pojedyncze ziarnistości elementarne. Pow. 25 800 \times .





are usually very large, with an irregular shape and contain only single elementary granules and single mitochondria (Fig. 4). The system of neurotubules is almost non visible. These fibers contain an amorphous or fine granular substance of low electron density.

Following chronic morphine poisoning very numerous structures of lipidic character appear in pituicytes.

Group 4 — 3 days after morphine withdrawal. Similar electron — microscopic changes are observed in the fibers of neurohypophysis, as after chronic morphine poisoning. The accumulation of elementary granules in most of the nerve fibers seems to be only slightly smaller than the accumulation taking place in the norm. However, quite frequently nerve fibers are observed filled with lysosome-like structures of various size and electron density. Rather numerous mitochondria are found in these fibers. Single nerve fibers of irregular shape are also encountered. These fibers contain only single elementary granules and amorphous material of low electron density (Fig. 5).

Nerve fibers were also observed, filled with myelin figures of various size, and amorphous material of high electron-density.

Group 5 — 12 days after morphine withdrawal. The appearance of the nerve fibers 12 days after morphine withdrawal does not differ from the norm.

DISCUSSION

On the basis of the conducted studies it may be assumed that chronic morphine poisoning causes more pronounced electron-microscopic changes in the fibers of neurohypophysis than acute morphine poisoning.

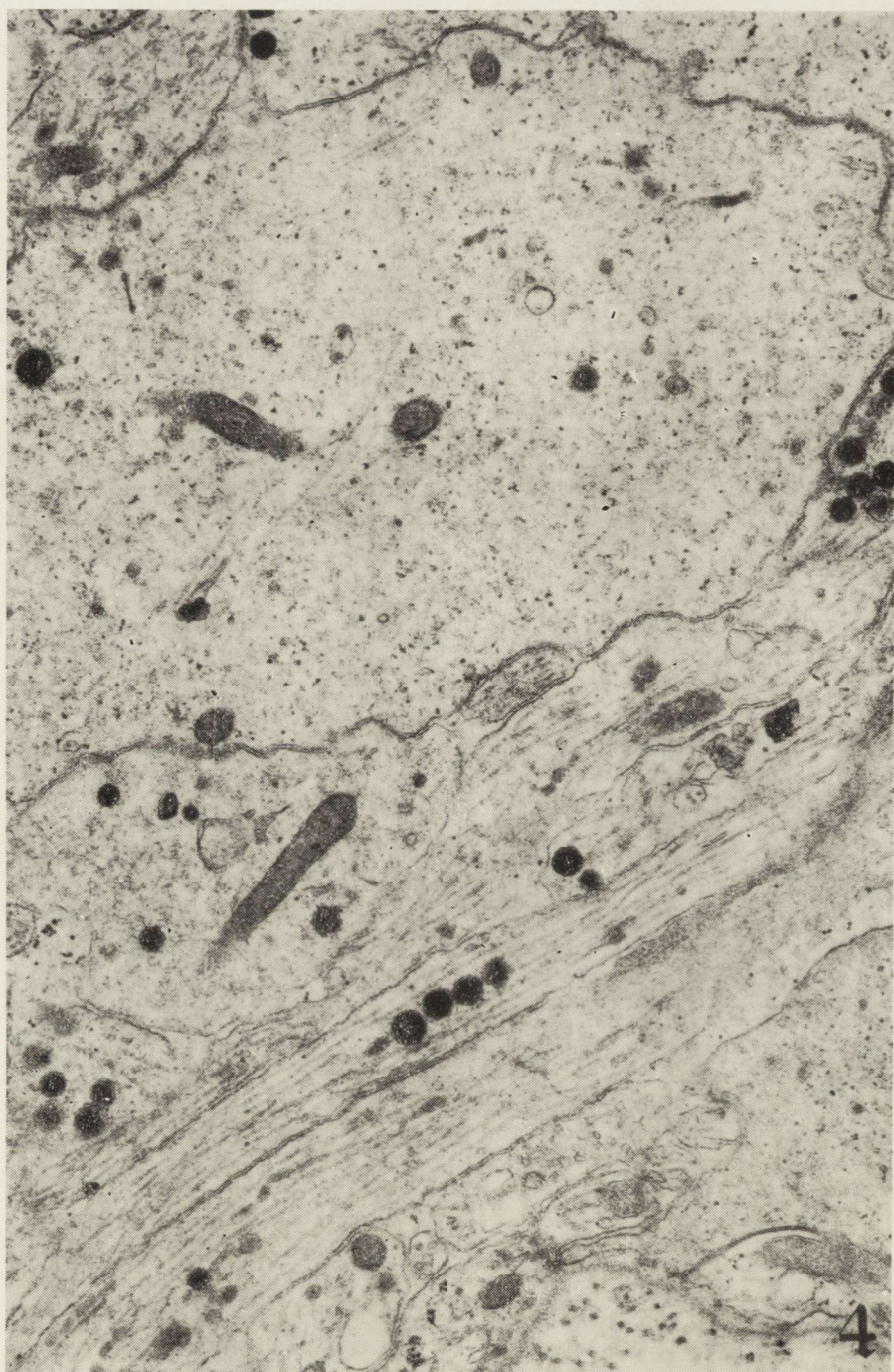
Following acute morphine poisoning a diminished amount of elementary granules in the nerve fibers and the accumulation of microvesicles

Fig. 2. Chronic morphine poisoning. Nerve fiber filled with lysosome-like structures and myelin figures. Single mitochondria, single elementary granules and electron-empty vesicles of various size. $\times 21\ 900$.

Ryc. 2. Przewlekłe zatrucie morfiną. Włókno nerwowe wypełnione strukturami lizosomopodobnymi i figurami mielinowymi. Pojedyncze mitochondria i ziarnistości elementarne oraz optycznie puste pęcherzyki różnej wielkości. Pow. 21 900 \times .

Fig. 3. Chronic morphine poisoning. Fragment of the nerve fiber containing numerous glycogen granules. $\times 36\ 000$.

Ryc. 3. Przewlekłe zatrucie morfiną. Fragment włókna nerwowego zawierającego liczne ziarnistości glikogenu. Pow. 36 000 \times .



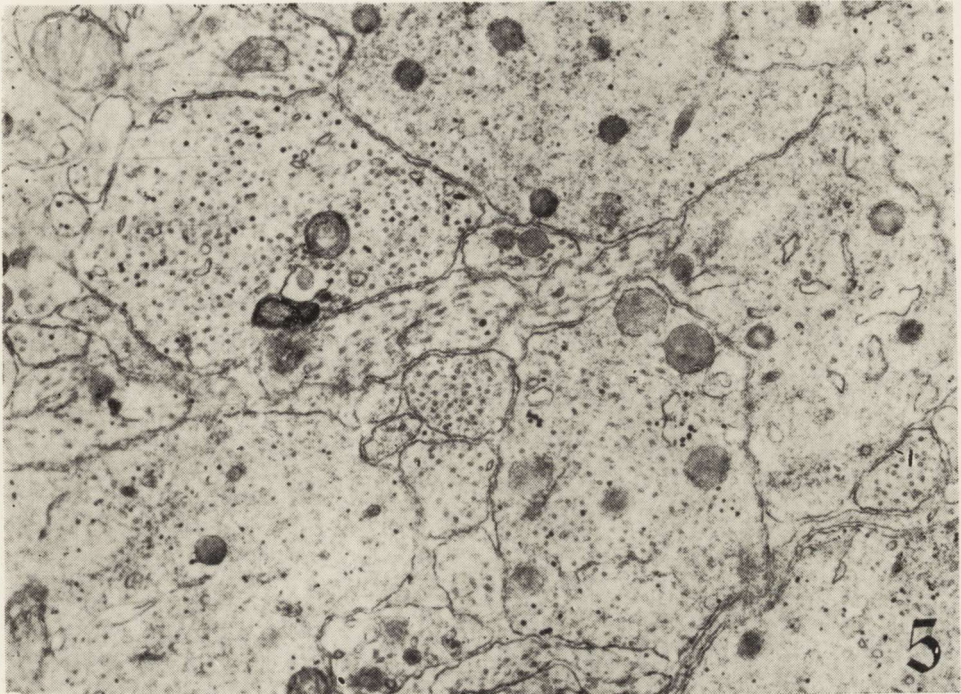


Fig. 5. Three days of morphine withdrawal. Nerve fibres similar to those in Fig. 4. $\times 11\ 600$.

Ryc. 5. Trzy dni po zaprzestaniu podawania morfiny. Włókna nerwowe o budowie podobnej do opisanych na ryc. 4. Pow. $11\ 600 \times$.

in these fibers may indicate an increased secretion of neurohormones from neurosecretory fibers. This is in agreement with the studies of Fujimoto (1971) who observed an increased antidiuretic hormone secretion after single morphine dose in rats, chicken and human beings. Many authors accept a diminished amount of neurosecretory granules and greater accumulation of microvesicles (Palay 1957, Whitacker and al. 1972, Danielewicz-Kotowicz 1974) as a morphological manifestation of neurohormones secretion after stimulation with various factors (dehydration, lactation, drugs).

Fig. 4. Chronic morphine poisoning. Nerve fibers of irregular outline, containing single elementary granules and single mitochondria. No neurotubules. The fibers filled with amorphous and fine-granular material of low electron density. In the vicinity — regular fibers. $\times 14\ 250$.

Ryc. 4. Przewlekłe zatrucie morfiną. Włókno nerwowe o nieregularnym zarysie zawierające pojedyncze ziarnistości elementarne i pojedyncze mitochondria. Brak neurotubuli. Włókna wypełnione materiałem bezpostaciowym i drobnoziarnistym o małej gęstości elektronowej. W pobliżu włókna o budowie prawidłowej. $14\ 250 \times$.

After chronic morphine poisoning we have observed a diminished accumulation of elementary granules in the nerve fibers. Microvesicles have not accumulated in these fibers which may rather indicate a decreased synthesis of neurosecretory granules in neurons of the hypothalamic nuclei, than an increased secretion of these granules from the fibers of the neurohypophysis, which is confirmed by the studies of Gajkowska and Borowicz (1974), who observed a decreased synthesis of neurosecretory granules from the supraoptic and paraventricular nucleus after chronic morphine poisoning.

The presence of numerous lysosomes and membranous structures in the fibers after chronic morphine poisoning indicates degenerative changes (Dellmann and Rodrigues 1970, Zambrano and De Robertis 1967, Wittkowski 1967, Daniel and Lederis 1966, Owsley and Dellmann 1968). Also neurosecretory fibers containing only single elementary granules and single mitochondria are considered to be the fibers undergoing degenerative changes (Dellmann and Rodrigues 1970). After 12 days from morphine withdrawal no fibers differing from the norm were observed in the neurohypophysis, therefore, it seems that the changes observed after chronic morphine poisoning are reversible — these fibers undergo regenerative processes.

The appearance of an increased amount of lipidic structures in pituicytes is considered to be a nonspecific change; however, some authors (Livingston, 1973) assume that it is most probably due to an increased secretion of neurosecretory granules from the fibers of neurohypophysis.

CONCLUSIONS

1. After acute morphine poisoning morphological symptoms of an increased secretion of neurosecretory granules appear in the fibers of neurohypophysis.
2. Chronic morphine poisoning leads to a decrease of the amount of neurosecretory granules in fibres of neural lobe of hypophysis, not accompanied by any morphological symptoms of increase of secretion.
3. Chronic morphine poisoning causes degenerative changes in many fibers of neurohypophysis.
4. Degenerative changes in the neurosecretory fibers are reversible already within 12 days since morphine withdrawal.

J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak

ZMIANY W BUDOWIE MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWEJ PRZYSADKI
SZCZURA POD WPŁYWEM MORFINY

II. Płat nerwowy przysadki

Streszczenie

Prześlędzono zmiany mikroskopowo-elektronowe we włóknach płata nerwowego przysadki szczura występujące po ostrym i przewlekłym zatruciu morfiną. Doświadczenie przeprowadzono w sposób podany w pierwszej części pracy.

Stwierdzono, że po ostrym zatruciu morfiną we włóknach płata nerwowego przysadki występują morfologiczne objawy zwiększonego wydzielania neurosekretu. Natomiast po przewlekłym zatruciu morfiną obserwowano we włóknach zmniejszone nagromadzenie ziarnistości elementarnych przy braku morfologicznych objawów wydzielania ich. Może to świadczyć o zahamowaniu syntezy neurosekretu w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego. Ponadto po przewlekłym zatruciu morfiną obserwowano występowanie w wielu włóknach płata nerwowego zmian degeneracyjnych.

Zmiany degeneracyjne włókien neurosekrecyjnych są jednakże odwracalne, ponieważ już po 12 dniach po zaprzestaniu podawania morfiny budowa włókien płata nerwowego nie odbiega od stwierdzanej w normie.

Е. В. Борович, А. Даниелевич-Котович, Р. Марыняк

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОМ СТРОЕНИИ
ГИПОФИЗА КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ МОРФИЯ

II. Нервная доля гипофиза

Резюме

Прослежены электронно-микроскопические изменения в волокнах нервной доли гипофиза крысы, появляющиеся после острого и хронического отравления морфием. Эксперимент проводили способом, представленным в первой части работы. Установлено, что после острого отравления морфием в волокнах нейрогоипофиза появляются морфологические признаки повышенного выделения нейросекрета. В то же время после хронического отравления морфием в волокнах наблюдали уменьшенное накопление элементарных зернистостей при отсутствии морфологических признаков их выделения. Это может свидетельствовать о торможении синтеза нейросекрета в нейронах надзрительного и околожелудочного ядра. Кроме того, после хронического отравления морфием во многих волокнах нервной доли наблюдали появление дегенеративных изменений. Дегенеративные изменения нейросекреторных волокон являются, однако, обратимыми, так как уже через 12 дней после прекращения дачи морфия строение волокон нервной доли не отличается от нормального.

REFERENCES

1. De Bodo R. C.: according to George R., Way E. L.: The role of the hypothalamus in pituitary-adrenal activation and antidiuresis by morphine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1959, 125, 111—115.

2. Crawford J. D., Pinkham B.: according to George R., Way E. L.: The role of hypothalamus in pituitary-adrenal activation and antidiuresis by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959, 125, 111—115.
3. Daniel A. R., Lederis K.: Effects of ether anaesthesia and hemorrhage on hormon storage and ultrastructure of the rat neurohypophysis. *J. Endocr.* 1966, 34, 91—104.
4. Danielewicz-Kotowicz A.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w przysadce szczura po adrenalektomii oraz po podaniu ACTH. II. Płat nerwowy przysadki. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 49—59.
5. Dellmann H. D., Rodriguez E. M.: Herring bodies, an electron-microscopic studies of local degeneration and regeneration of neurosecretory axons. *Z. Zellforsch.* 1970, 111, 293—315.
6. Fujimoto J. M.: Sites of action of narcotic analgesic in kidney. In: *Narcotic Drugs Biochemical Pharmacology*, ed. D. Cloÿet, Plenum Press N. Y. 1971.
7. Gajkowska B., Borowicz J. W.: Electron microscopic observations of the supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 365—372.
8. Giarman N. J., Mattie L. R., Stephenson W. F.: Studies on pheantidiuretic action of morphine. *Science*, 1953, 117, 225.
9. Handley C. A., Keller A. D.: According to George and Way: The role of the hypothalamus in pituitary-adrenal activation and antidiuresis by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959, 125, 111—115.
10. Livingston A.: Ultrastructure of the rat neural lobe during recovery from hypertonic saline treatment. *Z. Zellforsch.*, 1973, 137, 293—312.
11. Owsley P. A., Dellmann H. D.: Ultrastructure of the zona externa of bovine infundibulum. *Anat. Rec.* 1968, 160, 404.
12. Paley S. L.: The fine structure of neurohypophysis. In: *Ultrastructure and cellular chemistry of neural tissue*, 1957, 31—49.
13. Whitaker S. F., La Bella S., Sanval M.: Electron microscopic histochemistry of lysosomes in neurosecretory nerve endings and pituicytes of rat posterior pituitary. *Z. Zellforsch.*, 1970, 11, 493—504.
14. Winter C. A., Gaffney E. E., Flataker L.: according to George R., Way E. L.: The role of the hypothalamus in pituitary-adrenal activation and antidiuresis by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1955, 125, 111—115.
15. Wittkowski W.: Synaptische Strukturen und Elementargranula in Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.* 1967, 82, 434—458.
16. Zambrano D., De Robertis E.: The ultrastructural changes in the neurohypophysis after destruction of the paraventricular nuclei in normal and castrated rats. *Z. Zellforsch.* 1968, 88, 496—510.

Authors address: Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Pol. Ac. Scie., 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, ZUZANNA KRAŚNICKA,
BARBARA GAJKOWSKA

WPŁYW D-PENICYLAMINY NA OBRAZ GLIOPATII WĄTROBOWEJ W HODOWLI TKANKOWEJ

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. W. Borowicz

W poprzednich doświadczeniach prowadzonych na pozaustrojowej hodowli tkanki glejowej, uzyskano patologiczne postaci gleju typowe dla gliopatii, wspólnej dla choroby Wilsona i nieswoistych encefalopatii pochodzenia wątrobowego, przy użyciu surowic od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i ze śpiączką wątrobową (Mossakowski i wsp. 1970). Identyczne zmiany uzyskano przy podaniu do standardowego medium hodowlanego egzogennych soli miedzi i amonu.

Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, że we wszystkich modelach doświadczalnych, z wyjątkiem stosowanego egzogenego amoniaku, w patologicznych komórkach glejowych, przede wszystkim w komórkach Opalskiego, gromadziły się nieprawidłowe złogi miedzi (Mossakowski i wsp. 1976). Na możliwy udział miedzi w kształtowaniu gliopatii wątrobowej, poza chorobą Wilsona, wskazują również spostrzeżenia Śmiałka i Mossakowskiego (1974), którzy stwierdzili jej nieprawidłowe nagromadzenie w przypadkach ostrej encefalopatii wątrobowej. Podobnie Wender i Kozik (1973) znajdowali zwiększoną zawartość miedzi w przewlekłych przypadkach encefalopatii wrotno-układowej.

W oparciu o całokształt dotychczasowych spostrzeżeń (Mossakowski i wsp. 1970, 1975, 1976; Renkawek i wsp. 1973) wysunięto hipotezę, że wspólnym czynnikiem patogenetycznym dla gliopatii wilsonowskiej i wątrobowej jest względny lub bezwzględny niedostatek śródkomórkowego alfa-oksoglutaranu, stanowiącego podstawowe ogniwo głównej drogi detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Patogenetyczna rola miedzi polega natomiast na upośledzeniu produkcji endogennego

alfa-oksoglutaranu, na skutek zaburzenia metabolizmu komórkowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych (Mossakowski 1973).

W związku z powyższym wydawało się celowe prześledzenie wpływu d-penicylaminy, stanowiącej ze względu na zdolność wiązania jonów miedzi, powszechnie stosowany lek w zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym, na obraz morfologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny gliopatii rozwijającej się pod wpływem surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona i śpiączką wątrobową oraz egzogennej miedzi i amoniaku.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na hodowli tkanki glejowej mózdzku noworodków szczurzych, prowadzonej w warunkach standardowych opisanych przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Posługiwano się hodowlami po 1- i 3-tygodniowym wzroście *in vitro* do badań histologicznych i histochemicznych, oraz 2-tygodniowymi w przypadku badań mikroskopowo-elektronowych. Doświadczenia przeprowadzono w 5 grupach przedstawionych w tabeli 1. Każdej grupie doświadczalnej, w której medium

Tabela 1. Układ doświadczenia
Table 1. Scheme of the experimental groups

Grupa Group	Wiek hodowli Age of culture	Składniki medium Medium content	Czas doświadczenia Time of experiment
I	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + penicylamina* Human serum + penicillamine*	3 dni days
II	1—3 tyg. weeks	Surowica od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym + penicylamina Wilsonian serum + penicillamine	3 dni days
III	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + octan miedzi (Cu ⁺⁺ 50γ/ml) + penicylamina Human serum + Cu acetate (Cu ⁺⁺ 50γ/ml) + penicillamine	3 dni days
IV	1—3 tyg. weeks	Surowica od chorych ze śpiączką wątrobową + penicylamina Serum from patient with hepatic coma + penicillamine	3 dni days
V	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + chlorek amonu (100 mg%) + penicylamina Human serum + NH ₄ chloride (100 mg%) + penicillamine	3 dni days

*) Dawkę penicylaminy (5 mg%) dla hodowli obliczono na podstawie maksymalnej dawki dobowej na 1 kg wagi ciała, stosowanej w leczeniu choroby Wilsona.

*) Dose of penicillamine (5 mg%) for tissue culture was calculated from the maximum *per diem dosis per* kg/body weight used in Wilson's disease therapy.

odżywcze hodowli zawierało odpowiedni czynnik uszkadzający z dodatkiem d-penicylaminy (5 mg%), towarzyszyła odpowiednia grupa kontrolna bez podania leku.

Hodowle wszystkich grup opracowywano przy użyciu metod histologicznych (błękit toluidyny, hematoksylina-eozyna), histochemicznych (Sudan czarny B, PAS) i histoenzymatycznych (oznaczanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, glutaminowej i glukozo-6-fosforanowej).

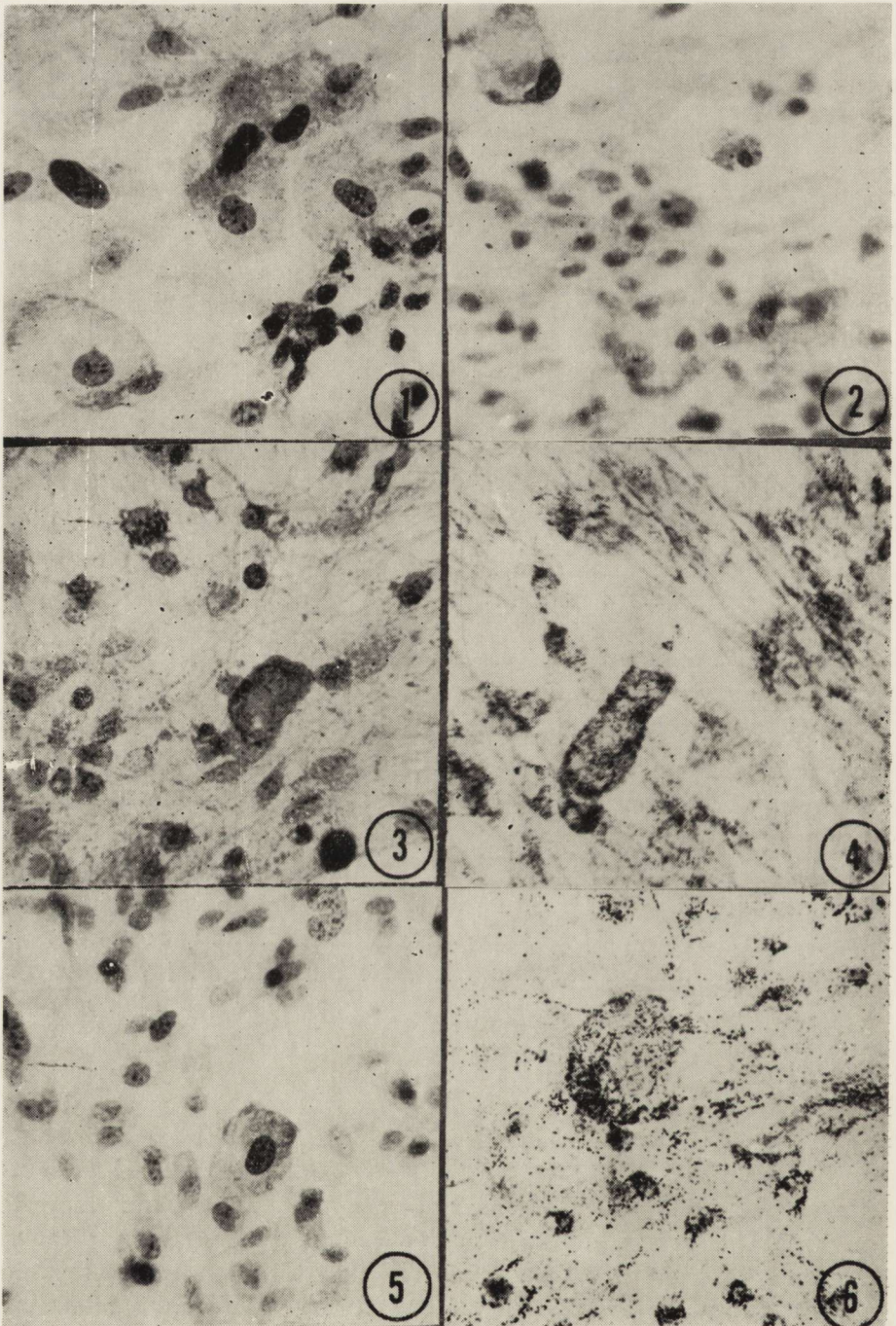
Materiał do badań w mikroskopie elektronowym opracowywano technicznie w sposób opisany przez Borowicza i Kraśnicką (1971). Ultra cienkie skrawki krojono na ultramikrotomie OmU2, f-my Reichert. Kontrastowano je octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał przeglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM 7A, przy napięciu przyspieszającym 80 KV.

Histochemiczną reakcję dla uwidocznienia miedzi na poziomie ultrastrukturalnym wykonywano wg metody Schenera i wsp. (1967).

WYNIKI

Grupa I. Podanie d-penicylaminy w dawce 5 mg% do 1- i 3-tygodniowych hodowli glejowych na okres 3 dni nie prowadziło do powstania jakichkolwiek nieprawidłowości strukturalnych i histochemicznych. Obraz histologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny hodowli wykazywał cechy właściwe dla tkanki glejowej hodowanej *in vitro* w odpowiednich fazach jej wzrostu i zróżnicowania (Kraśnicka, Mossakowski 1965, Renkawek 1972).

Grupa II. Po równoczesnym podaniu surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym z d-penicylaminą do 1-tygodniowej hodowli glejowej obraz gliopatii był znacznie słabiej wyrażony niż przy samej surowicy. Komórki Opalskiego spotykano jedynie sporadycznie. Ich rozmiary były mniejsze niż w hodowlach bez penicylaminy (ryc. 1, 2). Spotykano natomiast dość liczne postacie przejściowe między przerosłymi astrocytami i niezupełnie wykształconymi komórkami Opalskiego. Poronne postaci komórek Opalskiego charakteryzowało obfite nagromadzenie ziarnistości PAS-dodatnich (ryc. 3) i brak złogów sudanofilnych. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej w komórkach Opalskiego, a przede wszystkim przejściowych była jedynie nieznacznie obniżona w stosunku do ich aktywności w otaczających na ogół niezmiennych komórkach glejowych (ryc. 4). Reakcja ujawniająca aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej nie różniła się w nieprawidłowych komórkach od stwierdzanej w niezmiennym gleju.



Hodowle 3-tygodniowe w analogicznych warunkach wykazywały zmiany jeszcze mniej nasilone niż hodowle 1-tygodniowe. Spotykano zaledwie pojedyncze poronne komórki Opalskiego (ryc. 5), w których aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej nie różniła się od aktywności otaczającego gleju (ryc. 6). W obu grupach nie obserwowano w ogóle komórek przypominających komórki Alzheimerera I i II.

Obraz mikroskopowo-elektronowy hodowli z dodatkiem penicylaminy różnił się zasadniczo od obrazu hodowli prowadzonych z samą surowicą od pacjentów z chorobą Wilsona. Komórki glejowe o cechach ultrastrukturalnych komórki Opalskiego występowały bardzo rzadko (ryc. 7). Obok astrocytów i oligodendrocytów o niezmiennym obrazie ultrastrukturalnym, występowały liczne komórki stanowiące formę pośrednią między przerośniętymi astrocytami, i uformowanymi komórkami Opalskiego. Charakteryzowało je występowanie w obfitszej niż w prawidłowym astrocycie cytoplazmie stosunkowo licznych ciał lizosomopodobnych o różnej gęstości elektronowej oraz niekiedy znaczne poszerzenie kanałów pofragmentowanej szorstkiej siatki śródplazmatycznej

Ryc. 1. Hodowla 3-tygodniowa prowadzona przez 3 dni z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym. Liczne komórki Opalskiego. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 1. Three-week-old culture kept for 3 days with the serum from the patient with hepato-lenticular degeneration. Numerous Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 2. Hodowla 1-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Pporonne formy komórek Opalskiego, Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 2. One-week-old culture, II experimental group. Abortive forms of Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 3. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Komórka Opalskiego z licznymi ziarnistościami PAS-dodatnimi. Pow. 400 X.

Fig. 3. Three-week-old culture, II experimental group. Opalski cell with numerous PAS-positive granules. X 400.

Ryc. 4. Hodowla 1-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach Opalskiego. Pow. 400 X.

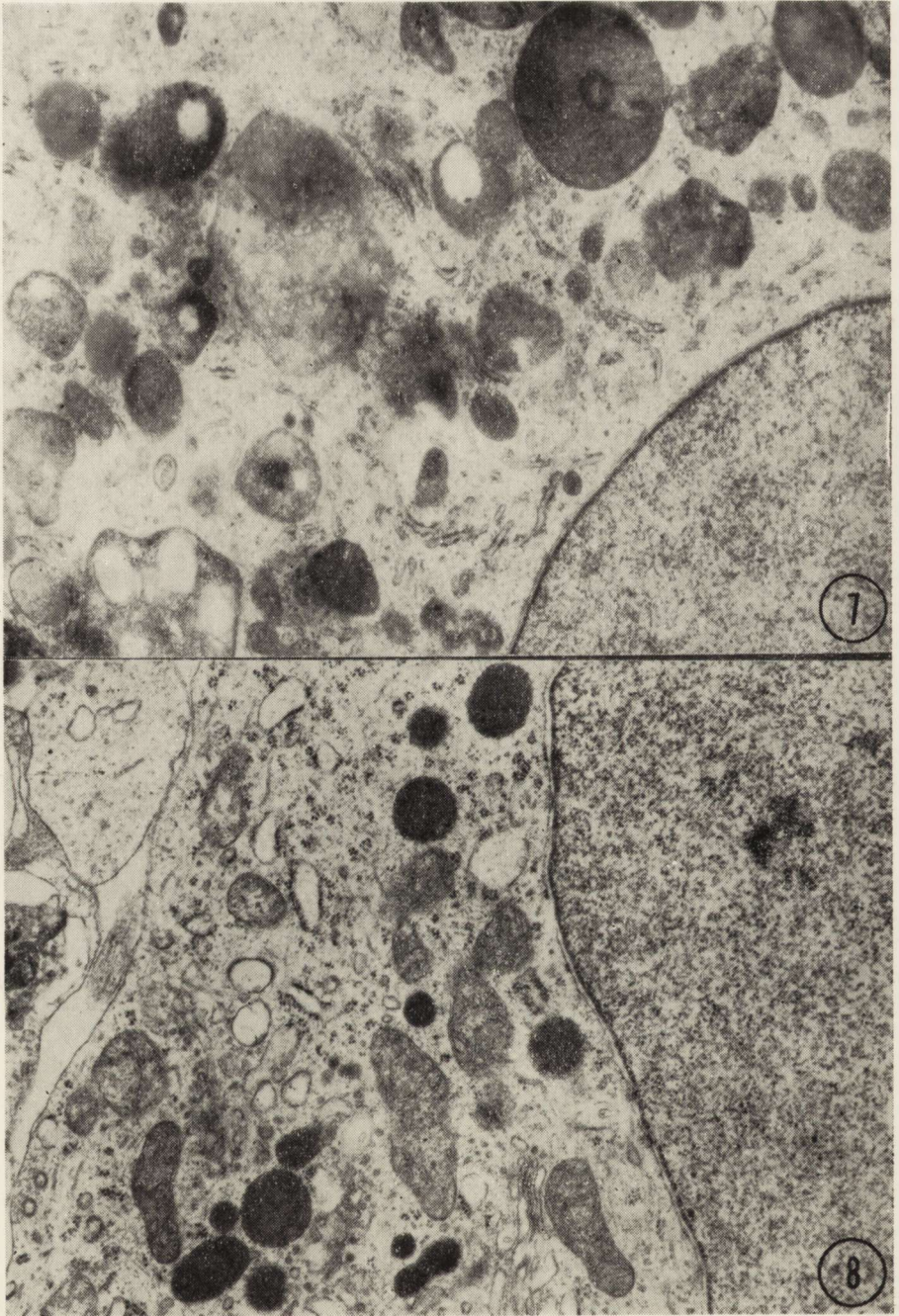
Fig. 4. One-week-old culture, II experimental group. High activity of succinate dehydrogenase in Opalski cells. X 400.

Ryc. 5. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Pojedyncze, drobne komórki Opalskiego. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 5. Three-week-old culture, II experimental group. Few small Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 6. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w pojedynczej komórce Opalskiego i w sąsiednich komórkach glejowych. Pow. 400 X.

Fig. 6. Three-week-old culture, II experimental group. High activity of succinate dehydrogenase in a single Opalski cell and in neighboring glial cells. X 400.



(ryc. 8). Zwracał uwagę niezmieniony na ogół obraz mitochondriów, z których nieliczne wykazywały cechy obrzmienia (ryc. 9). W niektórych komórkach wykazano obecność drobnoziarnistych złogów miedzi, zlokalizowanych w pojedynczych lizosomach (ryc. 10).

Grupa III. Zmiany patologiczne w hodowlach 1-tygodniowych, do których podano równocześnie octan miedzi z penicylaminą były bardziej nasilone niż w odpowiednich hodowlach grupy II, jednakże wyraźnie mniej intensywne niż w hodowlach bez penicylaminy. Po 3 dniach hodowli obserwowano stosunkowo liczne komórki Opalskiego nie osiągające na ogół ich typowych rozmiarów (ryc. 11). Pozostałe ich właściwości morfologiczne i histochemiczne były identyczne jak po zastosowaniu samego octanu miedzi. Cytoplazmę komórek Opalskiego wypełniały obfite ziarnistości PAS-dodatnie.

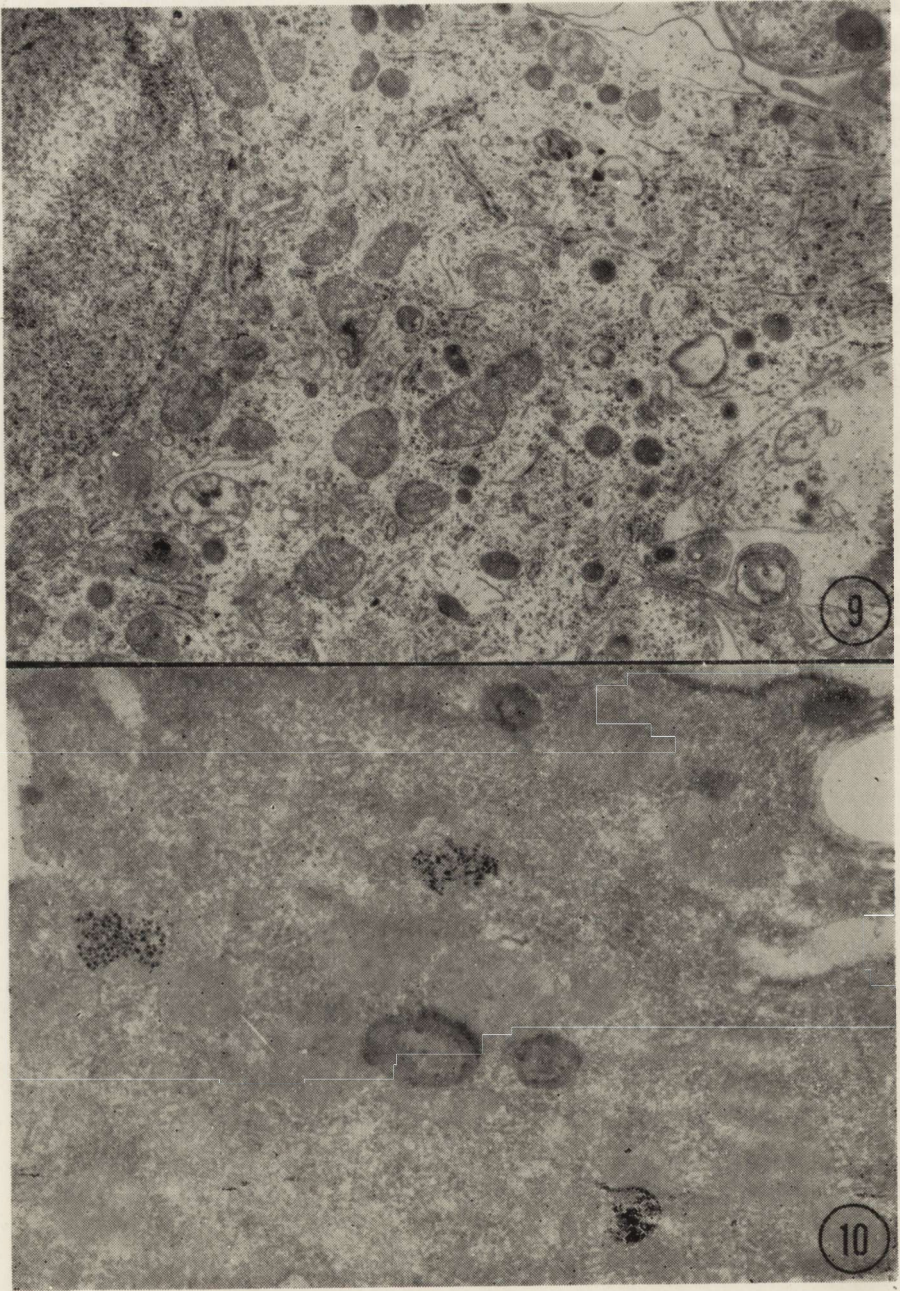
Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej była znacznie obniżona zarówno w komórkach Opalskiego i przejściowych jak również w otaczających komórkach glejowych, nie wykazujących cech strukturalnego uszkodzenia (ryc. 12). Aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w patologicznych formach gleju była nieco podwyższona (ryc. 13). Spotykano również zmienną ilość komórek Alzheimera, typu II. Obraz morfologiczny i histochemiczny hodowli 3-tygodniowych nie różnił się zasadniczo od opisanego w grupie hodowli 1-tygodniowych. Jednakże liczba komórek Opalskiego i przejściowych, jak również komórek Alzheimera typu II, była wyraźnie mniejsza (ryc. 14). Obniżenie aktywności enzymatycznej w patologicznych i prawidłowych komórkach glejowych dotyczyło niemal wyłącznie dehydrogenazy bursztynianowej. Odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy glutaminowej w patologicznych komórkach glejowych wykazywał zmienne nasilenie.

Ryc. 7. Hodowla 2-tygodniowa, z surowicą od pacjenta z chorobą Wilsona. Fragment typowej komórki Opalskiego z dużą ilością ciał wtrętowych, lizosomów i zmienionych mitochondriów oraz słabo rozwiniętą siatkę śródplazmatyczną. Pow. 14 000 \times .

Fig. 7. Two-week-old culture with a serum from the patient with Wilson's disease. Fragment of typical Opalski cell containing numerous inclusion bodies, lysosomes, altered mitochondria and poorly developed endoplasmic reticulum. \times 14 000.

Ryc. 8. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Fragment zmienionego astrocytu z dużą ilością lizosomów, gliotubuli i poszerzonymi kanałami szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Niektóre mitochondria z przejaśnioną macierzą. Pow. 10 000 \times .

Fig. 8. Two-week-old culture, II experimental group. Fragment of altered astrocyte containing numerous lysosomes, gliotubules and dilated channels of rough endoplasmic reticulum. Some mitochondria have a cleared up matrix. \times 10 000.



W badaniach mikroskopowo-elektronowych stwierdzano wyraźne odchylenia od prawidłowego obrazu ultrastrukturalnego komórek glejowych, jakkolwiek były one mniej nasilone niż w hodowlach bez penicylaminy. Wiele spośród astro- i oligodendrocytów nie wykazywało istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych poza zwiększeniem ilości ciał lizosomopodobnych i gliofibryli, występujących w komórkach gleju gwiaździstego. Obecne były również komórki o właściwościach mikroskopowo-elektronowych komórek przejściowych opisanych w grupie II. Stosunkowo liczne komórki wykazywały jednak cechy typowe dla komórki Opalskiego. W ich cytoplazmie charakteryzującej się zubożeniem szorstkiej siatki śródplazmatycznej występowały liczne lizosomy i ciała lizosomopodobne o różnej gęstości elektronowej. W ich otoczeniu częste były nagromadzenia glikogenu. Nieliczne zwykle i drobne mitochondria nie wykazywały znacznych cech uszkodzenia. Odczyn histochemiczny na miedź wykazywał obecność ziarnistych złogów w nielicznych tylko lizosomach (ryc. 15). Był on znacznie słabszy niż w hodowlach bez podania penicylaminy.

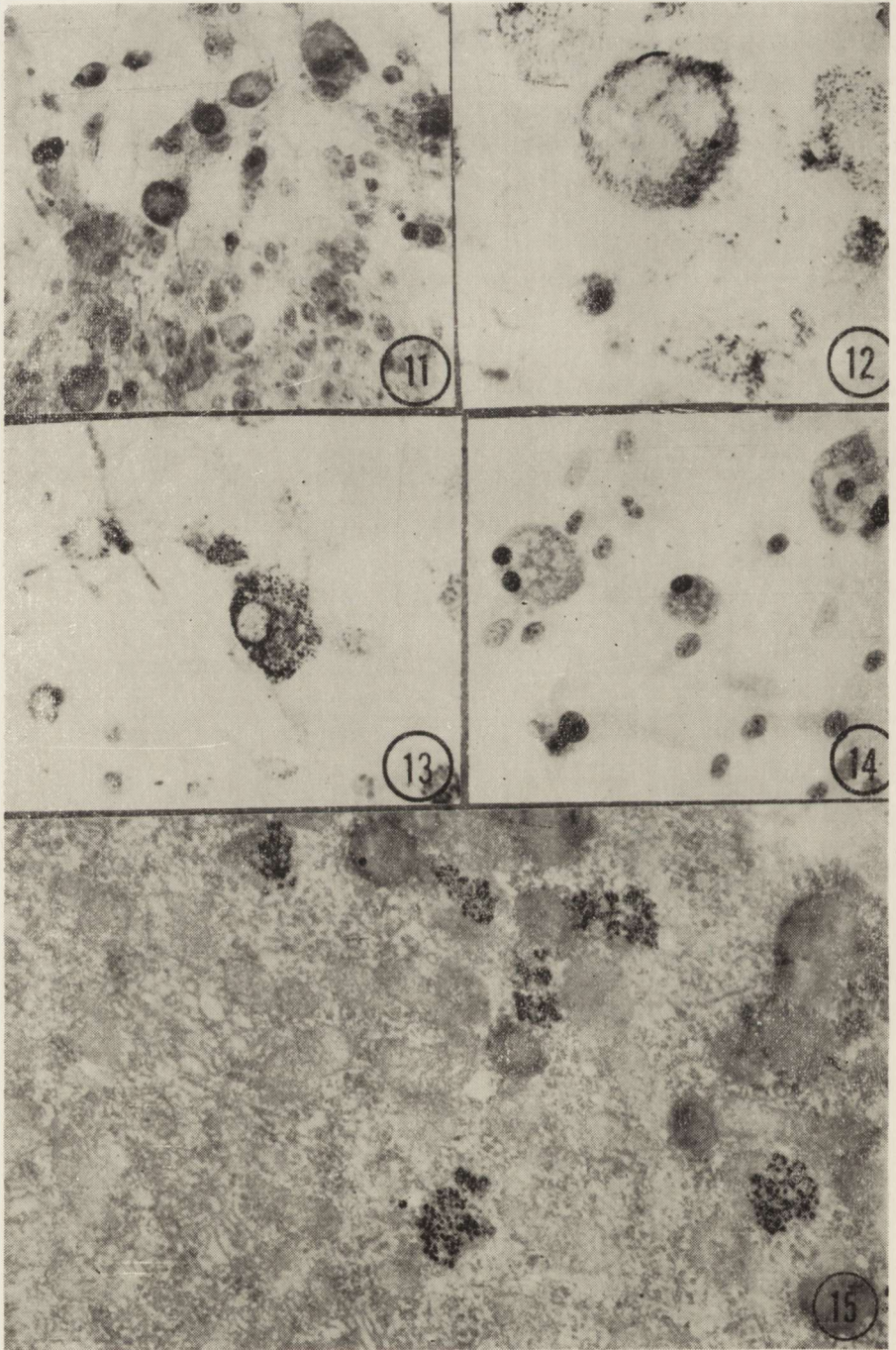
Grupa IV. W hodowlach glejowych, prowadzonych w medium zawierającym surowicę od chorych ze śpiączką wątrobową, do którego dodano d-penicylaminę zmiany patologiczne były mniej nasilone niż w hodowlach bez zastosowania leku i w swoim ogólnym wzorcu przypominały nieprawidłowości opisane w grupie II, będąc jednak nieco bardziej zaawansowane. Ilość typowych komórek Opalskiego była niewielka. W niektórych hodowlach w ogóle nie występowały. Liczniejsze były komórki przejściowe, często z zachowanymi wypustkami. W ich cytoplazmie zawierającej obfite ziarnistości PAS-dodatnie nierzadko spostrzegano liczne wodniczki. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, a zwłaszcza glutaminowej zarówno w komórkach Opalskiego, jak i w komórkach przejściowych była obniżona, w przeciwieństwie do wysokiej aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu. Nie spostrzegano istotnych różnic między obrazem patologicznym hodowli 1- i 3-tygodniowych. W obu grupach występowały nieliczne komórki Alzheimerera, typu II.

Ryc. 9. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. We fragmencie astrocytu widoczna pofragmentowana szorstka siatka śródplazmatyczna, liczne gliotubule, lizosomy i mitochondria, niektóre z cechami obrzmienia. Pow. 9000 \times .

Fig. 9. Two-week-old culture, II experimental group. Fragment of an astrocyte with fragmented rough endoplasmic reticulum, numerous gliotubules, lysosomes and mitochondria, some of which are swollen. \times 9000.

Ryc. 10. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. W nielicznych lizosomach widoczne drobno-ziarniste złogi miedzi. Pow. 12 000 \times .

Fig. 10. Two-week-old culture, II experimental group. Some lysosomes contain fine-granular copper deposits. \times 12 000.



W obrazie mikroskopowo-elektronowym hodowli, mimo podania penicylaminy spostrzegano wyraźne nieprawidłowości strukturalne komórek glejowych, jakkolwiek były one mniejsze niż w hodowlach prowadzonych bez leku. Ultrastrukturę komórek Opalskiego cechowała obfita zawartość ciał lizosomalnych. Niektóre z nich, charakteryzujące się większą gęstością elektroniczną zawierały drobne kropelkowate przejaśnienia. Uboga szorstka siatka śródplazmatyczna, wykazywała odcinkowe poszerzenie kanałów. Nieliczne mitochondria miały zwykle prawidłową strukturę (ryc. 16). Obok typowych komórek Opalskiego, spotykano komórki z mniejszą zawartością ciał lizosomopodobnych, wykazujących jednak większe poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej. W odczynie histochemicznym na miedź wykazano jej nagromadzenie w niektórych lizosomach komórek Opalskiego i komórek przejściowych (ryc. 17). Były one mniej obfite niż w hodowlach prowadzonych bez leku.

Grupa V. W hodowlach prowadzonych w medium zawierającym surowicę ludzi zdrowych z dodatkiem egzogennej amoniaku, podanie d-penicylaminy nie zmieniało obrazu morfologicznego i histochemicznego komórek glejowych.

We wszystkich hodowlach stwierdzono bardzo liczne komórki Opalskiego o typowych cechach histologicznych i histochemicznych oraz komórki Alzheimerera, typu II. Zwracało uwagę bardzo znaczne uszkodzenie komórek glejowych, nie wykazujących zmian struktury charakterystycznych dla gliopatii wątrobowej. Ich aktywność enzymatyczna, podobnie

Ryc. 11. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Liczne drobne formy komórkowe przypominające komórki Opalskiego. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 11. One-week-old culture, III experimental group. Numerous small cellular elements similar to Opalski cells. HE. × 200.

Ryc. 12. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Osłabienie aktywności dehydrogenazy glutaminowej. Pow. 400 ×.

Fig. 12. One-week-old culture, III experimental group. Diminution of glutamate dehydrogenase activity. × 400.

Ryc. 13. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Pojedyncza komórka Opalskiego z wysoką aktywnością dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Pow. 400 ×.

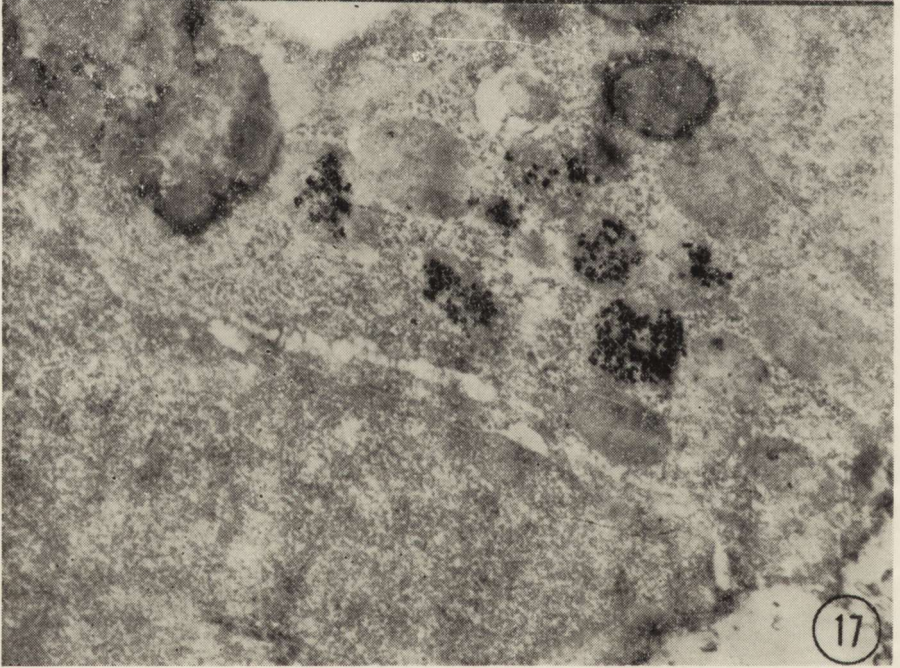
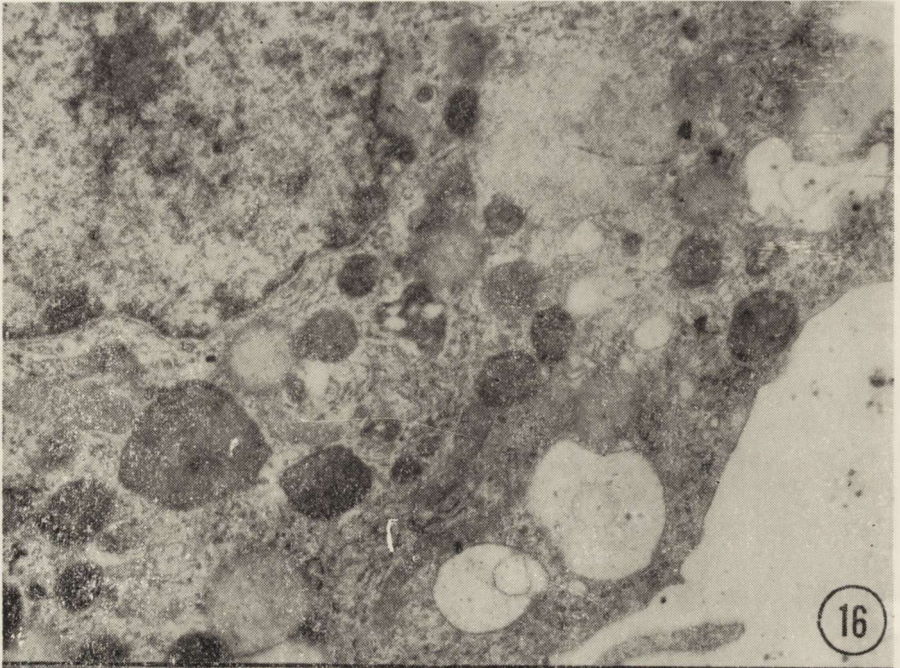
Fig. 13. One-week-old culture, III experimental group. Single Opalski cell exhibits high glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. × 400.

Ryc. 14. Hodowla 3-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Poronne formy komórek Opalskiego. Błękit toluidynowy. Pow. 400 ×.

Fig. 14. Three-week-old culture, III experimental group. Abortive forms of Opalski cells. Toluidin blue. × 400.

Ryc. 15. Hodowla 2-tygodniowa, III grupa doświadczalna. W licznych lizosomach widoczny intensywny, drobno-ziarnisty odczyn miedzi. Pow. 14 000 ×.

Fig. 15. Two-week-old culture, III experimental group. Numerous lysosomes show intense, fine-granular reaction for copper. × 14 000.



jak komórek Opalskiego była bardzo niska. W obrazie mikroskopowo-elektronowym większość komórek glejowych wykazywała cechy znacznej dezintegracji cytoplazmy, ze zubożeniem i fragmentacją siatki śródplazmatycznej, zmniejszeniem ilości rybosomów i znacznym uszkodzeniem nielicznych mitochondriów. W komórkach Opalskiego wokół licznych, wielokształtnych ciał lizosomopodobnych obserwowano nagromadzenie glikogenu (ryc. 18). Mitochondria były małe, nieliczne, niektóre z zatartą strukturą. W żadnym typie komórek glejowych, niezależnie od stopnia ich uszkodzenia nie stwierdzano widocznych na poziomie mikroskopowo-elektronowym złogów miedzi (ryc. 19).

OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że zastosowanie d-penicylaminy wyraźnie łagodziło efekt cytotoksyczny surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i ze śpiączką wątrobową oraz egzogennej miedzi. Pozostawało natomiast całkowicie bez wpływu na rozwój gliopatii w następstwie działania egzogennej amoniaku. Wpływ łagodzący efekt cytotoksyczny był największy w stosunku do surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona. Wyrażał się on całkowitym zahamowaniem tworzenia komórek Alzheimerera, typu I i II, zmniejszeniem liczby komórek Opalskiego z zatrzymaniem ich rozwoju na stadium komórek przejściowych oraz znacznym zmniejszeniem nasilenia nieprawidłowości histoenzymatycznych i ultrastrukturalnych. Wyraźnie niższa była zawartość miedzi w lizosomach zmienionych komórek glejowych.

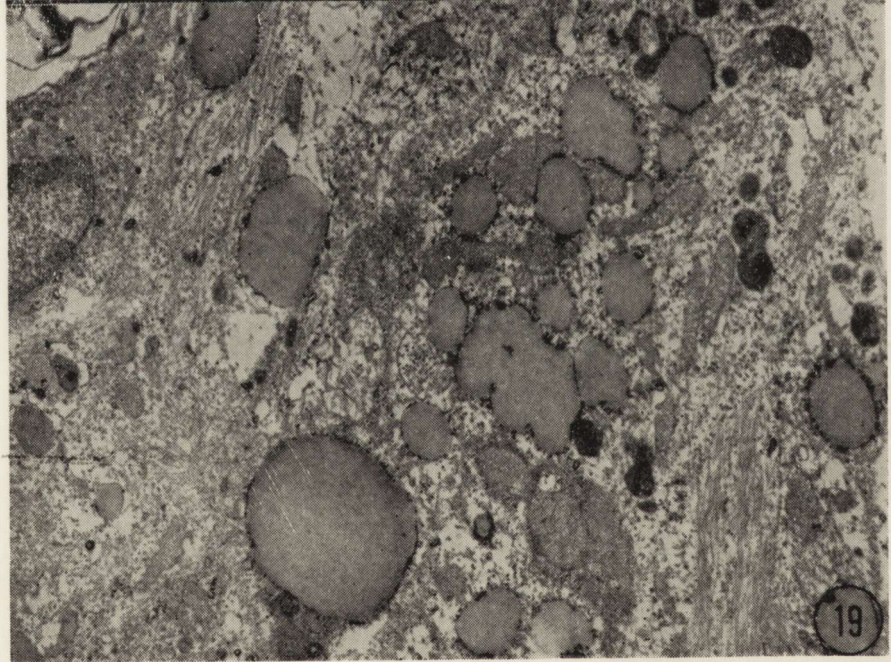
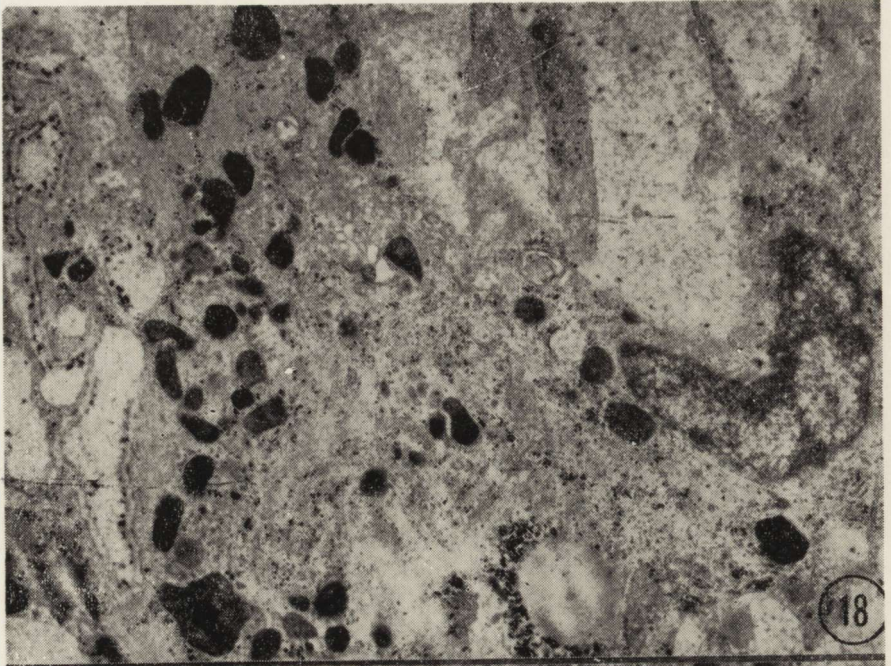
Zmiany patologiczne w komórkach glejowych, zarówno nieswoiste jak i charakterystyczne dla gliopatii wątrobowej, w przypadku surowicy od chorych ze śpiączką wątrobową, mimo podania penicylaminy były bardziej zaawansowane niż w odpowiednich hodowlach prowadzonych z surowicą od pacjentów z chorobą Wilsona. Występowały tu liczniejsze komórki Opalskiego, spotykano również komórki Alzheimerera II.

Ryc. 16. Hodowla 2-tygodniowa, IV grupa doświadczalna. Fragment komórki Opalskiego. W cytoplazmie widoczne liczne ciała wtrętowe i ciała tłuszczowe oraz znaczne rozdęcia szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Pow. 12 000 \times .

Fig. 16. Two-week-old culture, IV experimental group. Fragment of Opalski cell. The cytoplasm contains numerous inclusion and lipid bodies and markedly dilated rough endoplasmic reticulum. \times 12 000.

Ryc. 17. Hodowla 2-tygodniowa, IV grupa doświadczalna. W niektórych lizosomach widoczny dość intensywny, drobno-ziarnisty odczyn na miedź. Pow. 14 000 \times .

Fig. 17. Two-week-old culture, IV experimental group. Some lysosomes exhibit rather intense, fine-granular reaction for copper. \times 14 000.



Zaburzenia histoenzymatyczne, zwłaszcza dotyczące aktywności dehydrogenazy glutaminowej były bardziej nasilone. W obrazie mikroskopowo-elektronowym większa była liczba komórek glejowych o typowych cechach komórek Opalskiego. Lizosomalne złogi miedzi, skąpsze niż bez stosowania leku, były bogatsze niż w hodowlach prowadzonych z surowicą od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym.

Podobny charakter, choć nieco większe nasilenie miały zmiany patologiczne utrzymujące się mimo podania penicylaminy w hodowlach prowadzonych z dodatkiem egzogennej miedzi. Jednakże efekt penicylaminy, łagodzący cytotoksyczne działanie nadmiaru jonów miedzi był uchwytny, wyrażając się znacznym zmniejszeniem liczby patologicznych form glejowych, osłabieniem nasilenia nieprawidłowości histoenzymatycznych i ultrastrukturalnych, a przede wszystkim mniejszym gromadzeniem miedzi w strukturach lizosomalnych komórek glejowych.

Obecność łagodzącego wpływu d-penicylaminy na rozwój gliopatii wątrobowej w trzech grupach doświadczalnych, przy jego braku w grupie z egzogennym amoniakiem wiązać należy zapewne z jej działaniem chelatującym miedź. Dzięki temu zmniejsza się uszkodzenie układu enzymatycznego w cyklu Krebsa w komórkach glejowych. Utrzymanie niezmięnionej lub tylko nieznacznie obniżonej aktywności dehydrogenazy bursztynianowej zarówno w patologicznych komórkach glejowych, jak i w strukturalnie nie uszkodzonej populacji komórkowej może potwierdzać to przypuszczenie.

Jedyną grupą doświadczalną, w której nie stwierdzono wpływu penicylaminy były hodowle prowadzone przy nadmiarze egzogennych soli amonu. Rozwój gliopatii w tym przypadku wiązać należy z wyłącznym działaniem amoniaku (Mossakowski i wsp. 1970). W pozostałych grupach doświadczalnych natomiast należy brać pod uwagę wyłączone (grupa II i III) lub współtowarzyszące (grupa IV) patogenetyczne działanie miedzi. Możliwość jej cytotoksycznego wpływu w przypadku po-

Ryc. 18. Hodowla 2-tygodniowa, V grupa doświadczalna. W cytoplazmie zmienionego astrocytu widoczne bardzo liczne lizosomy oraz słabo wykształcona siatka śródplazmatyczna. Obfite ziarnistości glikogenu. Pow. 11 200 ×.

Fig. 18. Two-week-old culture, V experimental group. The cytoplasm of changed astrocyte contains abundant amount of lysosomes and poorly developed endoplasmic reticulum. Numerous glycogen granules. × 11 200.

Ryc. 19. Hodowla 2-tygodniowa, V grupa doświadczalna. Fragment cytoplazmy astrocytu z bardzo licznymi ciałami tłuszczowymi. Brak odczynu na miedź w lizosomach. Pow. 10 000 ×.

Fig. 19. Two-week-old culture, V experimental group. Fragment of the astrocyte cytoplasm with very numerous lipid bodies. No reaction for copper in lysosomes. × 10 000.

dania nadmiaru egzogennych soli miedzi, jak również przy stosowaniu surowicy chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym jest oczywista i została wykazana w naszych poprzednich doświadczeniach (Mossakowski i wsp. 1970, 1976). Istnieje szereg danych pozwalających na przyjęcie przynajmniej jej patogenetycznego współdziałania w przypadku stosowania surowicy od chorych z niewydolnością wątroby. Przemawia za tym zarówno fakt występowania obfitych złogów miedzi w patologicznie zmienionych komórkach glejowych, uzyskanych w hodowli z tego rodzaju surowicami (Mossakowski i wsp. 1976) jak również zależność nasilenia zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym od stopnia nagromadzenia miedzi w jego tkankach w encefalopatii wątrobowej (Śmiałek, Mossakowski 1973). Dodatkowym argumentem jest możliwość podwyższonego poziomu miedzi w surowicy chorych z niewydolnością wątroby (Holmberg, Laurell 1951, Mossakowski i wsp. 1970), jak również jej występowania w formie „wolnej” w związku ze zmianami w składzie białkowym surowicy krwi (Kassar i wsp. 1976).

Zróznicowanie łagodzącego wpływu w poszczególnych grupach doświadczalnych należy wiązać z różnicami w zawartości miedzi w środowisku hodowlanym. Tym tłumaczyć trzeba największy efekt penicylaminy w przypadku surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i wyraźnie niższy przy zastosowaniu egzogennych soli miedzi. Mniejszy efekt penicylaminy w stosunku do hodowli z surowicą od chorych z niewydolnością wątroby odnieść należy prawdopodobnie do współdziałania patogenetycznego amoniaku, na które penicylamina pozostawała bez wpływu. Nie można wykluczyć również cytotoksycznego działania innych substancji znajdujących się w surowicy chorych z niewydolną wątrobą (Schuta 1967).

Brak całkowitego zahamowania rozwoju gliopatii pod wpływem penicylaminy w zastosowanych warunkach doświadczalnych, nawet w odniesieniu do surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona, wiązać należy zapewne ze stosunkowo niską dawką leku. Jej podwyższenie okazało się jednak niemożliwe, ze względu na stwierdzone w pilotowej serii doświadczeń nieswoiste uszkodzenia tkankowe przy zastosowaniu 10 mg% stężenia leku.

Spostrzeżenia nasze raz jeszcze potwierdzają wysuniętą poprzednio hipotezę (Mossakowski 1973), że typowa gliopatia wątrobowa rozwija się zarówno pod wpływem miedzi jak i amoniaku, przy wspólnym ogniwie patogenetycznym jakim jest względny lub bezwzględny niedobór α -okso-glutaranu, stanowiącego istotny element detoksykacji amoniaku w tkance nerwowej.

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

ВЛИЯНИЕ D-ПЕНИЦИЛАМИНА НА КАРТИНУ ПЕЧЕНОЧНОЙ ГЛИОПАТИИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

Проведена серия исследований влияния d-пенициламина на морфологическую, гистохимическую и электронно-микроскопическую картину глиопатии, прогрессирующей в невроглии, выращиваемой в среде, содержащей сыворотку больных с гепатико-лентиккулярным вырождением, сыворотку больных с печеночной спячкой, а также нормальную сыворотку с добавкой экзогенных солей меди и аммония.

Обнаружено отчетливое влияние пенициламина, смягчающее цитотоксическое действие сыворотки больных с гепатико-лентиккулярным вырождением. Этот эффект был более слабым в случае сыворотки больных с печеночной спячкой и экзогенных солей меди. Однако не обнаружено ослабления цитотоксического действия аммония.

На основе вышеуказанных наблюдений выдвинуто предположение, что защитное действие пенициламина выступает только в тех случаях, когда медь играет роль единственного или сопутствующего патогенного фактора. Эффект этот не имеет места, когда патогенным фактором является аммоний. Только частичное защитное действие пенициламина при применении экзогенных меди и сыворотки больных с печеночной спячкой связывали в первом случае с избытком соли меди относительно количества даваемого пенициламина, а во втором — в совместном действии меди и аммония как равноценных патогенных факторов.

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

EFFECT OF D-PENICILLAMINE ON THE HEPATIC GLIOPATHY IN TISSUE CULTURE

Summary

The studies were carried out on the effect of d-penicillamine on the morphological, histochemical and electron microscopic picture of gliopathy developing in glial tissue cultured in the medium containing either the serum taken from patients suffering from hepato-lenticular degeneration and from hepatic coma or in the medium containing normal serum to which exogenous copper and ammonium salts were added.

It was found that penicillamine distinctly reduces the cytotoxic action of serum obtained from patients affected with hepato-lenticular degeneration. The effect was less evident when the serum from the patients suffering from hepatic coma and serum containing exogenous copper salts were used. There was no abatement of cytotoxic effect of ammonia.

The above observations led to assumption that the protective effect of penicillamine comes into evidence only in the cases in which copper is the sole or concomitant pathogenic factor. The partial mitigating effect of penicillamine noted in cultures with serum containing exogenous copper and in cultures with serum from the patients affected with hepatic coma is attributed in former case to excess of copper salts in relation to penicillamine and in the latter — to common action of copper and ammonia, the pathogenic factors of equal rank.

PIŚMIENICTWO

1. Borowicz J. W., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych *in vitro* do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 22, 691—697
2. Holmberg C. G., Laurell C. B.: Oxidase reactions in human plasma caused by ceruloplasmin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1951, 8, 103—108
3. Kassur B., Olejnik Z., Mossakowski M., Kraśnicka Z.: Niektóre aspekty patogenetyczne ostrej encefalopatii wątrobowej w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby. *Przegl. Epid.* 1976, w druku
4. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—408
5. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropath.* 1970, 16, 1—16
6. Mossakowski M. J.: The role of copper in the pathogenesis of Wilsonian gliopathy. II. *Inter. Symp. on Wilson's Disease, Paris, 1973*
7. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of Opalski cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 1976, w druku
8. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ glutaminianu sodu na obraz gliopatii wywołanej przez amoniak i malonian sodu w warunkach hodowli *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 1—9
9. Renkawek K.: On the histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307—315
10. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes *in vitro* induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 107—114
11. Schener P. J., Thorpe M. E. C., Marriot P.: A method for the demonstration of copper under the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.* 1967, 15, 300—301
12. Schutta H. S.: Bilirubin encephalopathy in Guam rats. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 689—694
13. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Morphological changes and quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma due to acute liver impairment. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 259—268
14. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1973, 23, 177—181

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

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MARIANNA SIKORSKA, ROMAN GADAMSKI

WPLYW OSTREGO ZATRUCIA TLENKIEM WĘGLA
NA ZACHOWANIE SIĘ AMIN KATECHOLOWYCH W MÓZGU
SZCZURA. BADANIA HISTOCHEMICZNO-FLUORESCENCYJNE
I BIOCHEMICZNE

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

Niedostatek tlenu prowadzący do różnorodnych nieprawidłowości metabolicznych w ośrodkowym układzie nerwowym, wszechstronnie opracowanych i omawianych we współczesnym piśmiennictwie (Ljunggren i wsp. 1974, Folbergova i wsp. 1974, Norberg i Siesjö 1974, 1975a, b, i inni) stosunkowo rzadko rozpatrywany jest jako czynnik zaburzający przemianę amin katecholowych (Stuppfel, Roffi 1961, Brown 1974, Stoner i wsp. 1973, Gadamski i wsp. 1975).

W roku 1974 Chikvaidze i Melitauri stwierdzili w warunkach doświadczalnej hipoksji krążeniowej znaczny spadek zawartości noradrenaliny, adrenaliny, dopaminy i serotoniny w poszczególnych strukturach anatomicznych mózgowia królika. Przeprowadzone na tym samym modelu doświadczalnym badania histochemiczno-fluorescencyjne wykazały spadek fluorescencji katecholamin uwidocznianych metodą glioksalową (Gadamski i wsp. 1976).

Wydawało się celowe przeprowadzenie analizy zachowania się amin katecholowych w warunkach doświadczalnego zatrucia tlenkiem węgla, łączącego obok elementu hipoksyjnego, związanego z wytwarzaniem hemoglobiny tlenkowęgłowej, działanie bezpośredniego czynnika toksycznego na komórki ośrodkowego układu nerwowego. W przeciwieństwie do drastycznego modelu doświadczalnej hipoksji krążeniowej, prowadzącej do nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych oraz do przerywania naczyniowo-mózgowych układów barierowych, zastosowany model zatrucia tlenkiem węgla charakteryzował się jedynie przejściowymi zaburzeniami metabolicznymi bez trwałych nieprawidłowości strukturalnych (Śmiałek i wsp. 1973) i uszkodzenia bariery krew-mózg (Rap i wsp. 1974).

MATERIAL I METODY

Do badań użyto 58 szczurów (46 — do badań biochemicznych i 12 — do badań histochemicznych) rasy Wistar, obojga płci, w wieku 6 tygodni, o średnim ciężarze ciała około 180 g. Grupy doświadczalne stanowiły szczury poddawane zatruciu CO w warunkach opisanych przez Korthalsa i wsp. (1973). Zwierzęta umieszczano w komorze doświadczalnej, przez którą w sposób ciągły przepływało powietrze zawierające 1% CO. W tych warunkach szczury pozostawały przez 60 min., po czym przerywano dopływ CO, a zwierzęta pozostawiano na dalsze 30 min. w komorze, przez którą nadal przepuszczano czyste powietrze. Po upływie tego czasu szczury przenoszono do normalnych warunków atmosferycznych. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe szczury przebywające w warunkach zwierzętarnianych.

Badania biochemiczne

Do badań biochemicznych zwierzęta uśmiercano przez dekapitację w 20, 60 i 80 minucie zatrucia oraz w 2, 6 i 24 godziny po zatruciu. Półkule mózgu zamrożone w ciekłym azocie homogenizowano w 0,4 N HClO₄, przygotowując około 20% homogenat, który wirowano przez 10 min. przy 15.000 × g w temp. +2°C. Do oznaczeń biochemicznych używano uzyskany w ten sposób nadsącz.

Zawartość adrenaliny i noradrenaliny w tkance mózgowej oznaczano wg metody Changa (1964), polegającej na absorpcji katecholamin tlenkiem glinu, wyeluowaniu ich 0,2 N CH₃COOH oraz utlenieniu J₂ (0,1 N) i Na₂SO₃ (25% wagi/obj.). Pomiaru fluorescencji wykonywano na spektrofлуorymtrze f-my Amico-Bowman. Długość fali wzbudzającej dla noradrenaliny — 395 nm, odczyt przy 490 nm. Długość fali wzbudzającej dla adrenaliny 463 nm, odczyt przy 540 nm. Wyniki wyrażano w ng/g świeżej tkanki mózgowej.

Badania histochemiczno-fluorescencyjne

Materiał do badań w mikroskopie fluorescencyjnym opracowywano wg metody opisanej przez Lindvalla i Björklunda (1974). Szczurom doświadczalnym (czasy przeżycia identyczne jak do badań biochemicznych) i kontrolnym wykonywano w lekkim znieczuleniu nembutalowym perfuzję 2% roztworem jednowodnego kwasu glioksalowego w buforze dwuwęglanowym Krebsa-Ringera o pH 7,0. Roztwór ten przed użyciem nasycano mieszaniną gazów o składzie 95% O₂ i 5% CO₂, a następnie ochładzano do temperatury 0°—4°C. Tak przygotowany płyn

perfuzyjny (200 ml) podawano do lewej komory serca. Z mózgow wyjmowanych natychmiast po perfuzji pobierano bloki tkankowe grubości około 2—3 mm obejmujące korę mózgową, pole przegrodowe, prążkowie oraz podwzgórze i wzgórze wzrokowe. Bloczki tkanki zamrażano w suchym lodzie i krojono w kriostacie na skrawki grubości 20 μ . Po skrojeniu i przyklejeniu do szkiełek podstawowych, skrawki zanurzano na 10 min. w 2% roztworze kwasu glioksalowego a następnie suszono w strumieniu ciepłego powietrza przez 20 min. Tak przygotowane skrawki przenoszono do eksykatora zawierającego pięciotlenek fosforu. Czas wysuszania w zaciemnionym eksykatorze (*in vacuo*) wynosił około 14 godz. Następnego dnia szkiełka z naklejonymi skrawkami tkanki przenoszono na 6 minut do temperatury 100°C. Preparaty zamykano w płynnej parafinie i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Zeiss wyposażonym w lampę rtęciową HBO-200 oraz filtry BG-12 (wzbudzający) i OG-1 (barierowy). Zieloną fluorescencję amin katecholowych utrwalano na filmie ORWO UT-16.

WYNIKI

Badania biochemiczne. Wyniki dotyczące zawartości adrenaliny i noradrenaliny w mózгах szczurów doświadczalnych i kontrolnych przedstawiono w tabeli 1.

Czułość zastosowanej metody oznaczania amin katecholowych pozwoliła na stwierdzenie obecności adrenaliny tylko w dwu spośród siedmiu badanych mózgow zwierząt kontrolnych. W obu przypadkach uzyskano wyniki rzędu 10 ng/g świeżej tkanki. Nie wykryto adrenaliny w żadnym z mózgow szczurów badanych po 20 i 60 min. zatrucia CO (w obu grupach badano po 6 szczurów). Natomiast w grupie zwierząt badanych po 90 min. przebywania w komorze doświadczalnej obecność adrenaliny zanotowano w trzech spośród ośmiu badanych mózgow (8—10 ng/g św. tk.). W mózгах szczurów badanych po upływie sześciu godzin od zatrucia stwierdzono znaczny wzrost poziomu adrenaliny (71 ± 6 ng/g św. tk.). Podwyższoną zawartość adrenaliny stwierdzono również w mózгах zwierząt badanych po upływie 24 godz. od zatrucia (55 ± 3 ng/g św. tk.).

Poziom noradrenaliny w mózгах szczurów kontrolnych wynosił 344 ± 26 ng/g św. tk. Znamienne statystycznie obniżenie poziomu noradrenaliny stwierdzono w mózгах zwierząt badanych w 20 i 60 minucie działania CO. W stosunku do zawartości noradrenaliny w mózгах kontrolnych spadek ten wynosił po 20 minutach około 35%, po 60 minutach około 55%. W następnych grupach doświadczalnych tj. po

Tabela 1. Zawartość adrenaliny i noradrenaliny w mózgu szczura po zatruciu tlenkiem węgla
Table 1. Adrenaline and noradrenaline content in rat brain following carbon monoxide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group	n	Adrenalina Adrenaline	Noradrenalina Noradrenaline
		ng/g świeżej tkanki ng/g wet tissue	($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
Okres bezpośredniej ekspozycji CO 20 min	6	niemierzalna undetectable	* 225 ± 30
Time of direct exposure to CO	60 min	6	niemierzalna undetectable
	90 min	8	śladowa trace
Okres przeżycia po zatruciu CO 2 h	5	niemierzalna undetectable	242 ± 17
Time of survival after CO intoxication	6 h	6	71 ± 4
	24 h	8	55 ± 3
Grupa kontrolna Control group	7	śladowa trace	344 ± 26

Obliczenia statystyczne wg wzoru Studenta

Statistical calculation according to Student's test

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej

arithmetic mean ± standard error of the mean

* $p \leq 0,05$

p — prawdopodobieństwo
probability

n — liczba zbadanych zwierząt
number of animals

90 minutach przebywania w komorze oraz po upływie 2 i 6 godzin od zatrucia, zawartość noradrenaliny nie różniła się od zawartości występującej w mózgach grupy kontrolnej.

Po upływie 24 godzin od zatrucia stwierdzono nieznaczne podwyższenie poziomu noradrenaliny w stosunku do kontroli o około 25%; przyrost ten był statystycznie znamieny.

Badania histochemiczno-fluorescencyjne. W mózgach szczurów kontrolnych zielona fluorescencja charakterystyczna dla amin katecholowych występowała w postaci delikatnej sieci utworzonej z paciorkowato ułożonych drobnych ziarnistości, wyznaczających przebieg preterminalnych i terminalnych aksonów (ryc. 1). W przestrzeniach między poszczególnymi włóknami obserwowano pojedyncze fluorujące ziarnistości mogące sugerować przekroje poprzeczne włókien

nerwowych. Splątane w nieregularną sieć wypustki nerwowe można było niekiedy obserwować na większych przestrzeniach. Wyznaczały one wówczas przebieg dłuższego odcinka aksonu lub kilku aksonów (ryc. 2). Początkowe fragmenty włókien osiowych wykazywały słabszą fluorescencję, niż ich części terminalne.

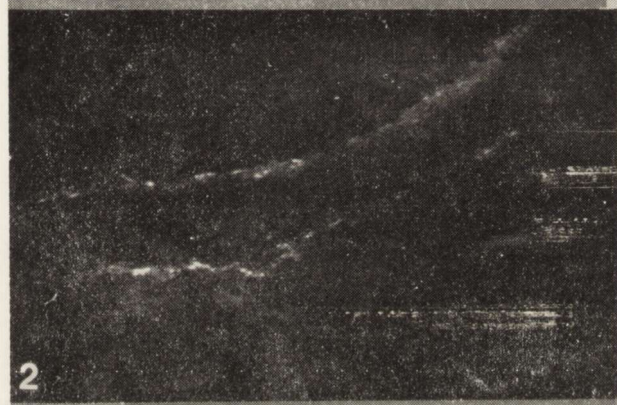
Ryc. 1. Szczur kontrolny. Fluorescencja amin katecholowych widoczna w postaci sieci z paciorkowato ułożonych ziarnistości. Pow. 200 \times .

Fig. 1. Control rat. Fluorescence of catecholamine visible as the bead-like network. $\times 200$.



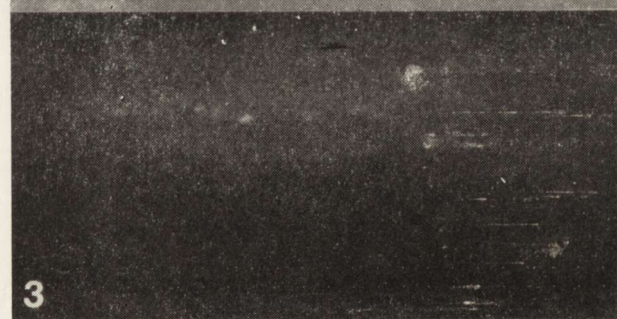
Ryc. 2. Szczur kontrolny. Fluorescencja amin katecholowych na przebiegu włókien nerwowych. Pow. 100 \times .

Fig. 2. Control rat. Fluorescence of catecholamines along nerve fibres. $\times 100$.



Ryc. 3. Szczur zatruty przez 90 min. Wyraźne osłabienie fluorescencji amin katecholowych w wypustkach nerwowych. Pow. 100 \times .

Fig. 3. Rat intoxicated for 90 min. Evident diminution of the catecholamines fluorescence in nerve fibres. $\times 100$.



W mózgach szczurów kontrolnych, w żadnym z badanych przekrojów nie obserwowano fluorescencji katecholamin w elementach komórkowych. Najintensywniejszą fluorescencję obserwowano w materiale kon-

trolnym w okolicy podwzgórzowej i w korze rąbkowej. W korze nowej świecenie fluoroforów amin katecholowych było zdecydowanie słabsze, a spleciona siatka wypustek nerwowych była wyraźnie rzadsza.

W grupie szczurów poddanych zatruciu tlenkiem węgla lekkie osłabienie fluorescencji amin katecholowych zarówno w okolicy podwzgórzowej, w korze limbicznej i w korze nowej obserwowano u zwierząt badanych po 60 minutach działania CO. Osłabiona fluorescencja wypustek komórek nerwowych utrzymywała się również w 90 minucie zatrucia oraz w 2 i 6 godzinie po intoksykacji (ryc. 3).

W grupie zwierząt, które przeżyły 24 godziny po zatruciu intensywność i umiejscowienie fluorescencji amin katecholowych nie różniły się od obserwowanych w grupie kontrolnej.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań biochemicznych i histochemiczno-fluorescencyjnych nie wykazały w naszym materiale pełnej zgodności. U podstawy stwierdzonych różnic leży zapewne zróżnicowanie czułości stosowanej metody, jak również fakt, że metodą histochemiczną ujawniano łącznie l-dopaminę i l-noradrenalinę, podczas gdy w badaniach biochemicznych określano odrębnie poziom adrenaliny i noradrenaliny, bez oznaczania dopaminy.

Mimo wspomnianych ograniczeń metodycznych wykazano, że zatrucie CO w zastosowanych warunkach doświadczalnych prowadzi do spadku zawartości amin katecholowych w mózgu szczura, najsilniej wyrażonego w okresie bezpośredniego działania tlenku węgla (w przedziale od 20 do 60 minuty przebywania zwierząt w komorze doświadczalnej) przy czym niewątpliwym spadkiem dotyczył noradrenaliny osiągając w 60 minucie zatrucia 55% wartości kontrolnej. Znajdował on swój odpowiednik w obserwacjach histochemiczno-fluorescencyjnych w postaci osłabienia intensywności fluorescencji sieci pre- i terminalnych odcinków włókien osiowych. Spadek ten przypadał na okres charakteryzujący się najwyższą zawartością hemoglobiny tlenkowej we krwi zwierząt, tj. około 70—75% (Śmiałek i wsp. 1973), oraz przekrwieniem biernym mózgu (Mossakowski 1975).

Ze względu na nieoznaczalność u większości zwierząt kontrolnych poziom adrenaliny w mózgu nie można było ocenić spadku jej zawartości w czasie zatrucia. O obniżeniu jej zawartości można jedynie sądzić w oparciu o fakt jej całkowitej nieoznaczalności u wszystkich zwierząt doświadczalnych podczas gdy można ją było wykryć u 1/3 zwierząt kontrolnych, jednak różnice te mogą równie dobrze mieścić się w granicach zróżnicowania osobniczego.

Badania biochemiczne wykazały powrót zawartości noradrenaliny do poziomu stwierdzonego u zwierząt kontrolnych w momencie zakończenia zatrucia. W dalszych przedziałach czasowych poziom noradrenaliny nie ulegał zmianom, jedynie w 24 godziny po zatruciu obserwowano niewielki, ale statystycznie znamienne przyrost jej zawartości o około 25% w stosunku do wartości kontrolnych.

W tym okresie dopiero stwierdzono normalizację obrazu histochemiczno-fluorescencyjnego poprzedzoną obniżeniem intensywności fluorescencji tak bezpośrednio po zakończeniu zatrucia jak i we wczesnym okresie po zatruciu (2 i 6 godzina). Ta rozbieżność wyników biochemicznych i histochemicznych może wynikać z powyżej wspomnianej różnicy w czułości stosowanych metod. Nie można jednak wykluczyć istnienia zmian w zawartości dopaminy, nie oznaczanej metodami biochemicznymi, rzutuujących na obraz histochemiczno-fluorescencyjny.

Na odrębne podkreślenie zasługuje wzrost zawartości adrenaliny obserwowany w 6 i 24 godzinie po działaniu tlenku węgla.

Stwierdzone przez nas zmiany w swoim ogólnym wzorcu przypominają przy oczywistych różnicach w dynamice, nieprawidłowości opisane w innych typach niedostatku tlenowego związane zarówno z niedotlenieniem hipoksyjnym (Stuppel, Roffi 1961), jak i niedokrwieniem mózgu (Brown i wsp. 1974, Chikvaidze, Melitauri 1974, Gadamski i wsp. 1976). Brown i wsp. (1974) wykazali zależność syntezy amin katecholowych od zaopatrzenia tkanki w tlen. Niedostatek tlenu wpływa hamująco na syntezę amin biogennych poprzez obniżenie aktywności enzymów syntetyzujących ich prekursorzy, takich jak hydroksylaza l-tyrozyny i beta hydroksylaza tryptofanu (Davis, Carlsson 1973) oraz poprzez aktywację MAO (Brown i wsp. 1974). Niedotlenienie prowadzące do obniżenia zasobów wysokocenergetycznych fosforanów prowadzić może również do zaburzenia mechanizmów magazynowania noradrenaliny (Euler, Lishajko 1969) i do „przeciekania” neurotransmiterów przez błony komórkowe (Brown i wsp. 1974).

W świetle powyższych rozważań, obniżenie zawartości noradrenaliny w mózgu stwierdzone przez nas w okresie zatrucia tlenkiem węgla wydaje się zależne od hipoksji anemicznej, stanowiącej następstwo zablokowania hemoglobiny przez CO. Przemawia za tym również zbieżność w czasie jej największego spadku z najwyższym poziomem hemoglobiny tlenkowej we krwi (Śmiałek i wsp. 1973). Oczywiście nie można wyłączyć udziału zaburzeń ukrwienia mózgu, wyrażających się jego niedokrwieniem we wczesnej fazie zatrucia i przekrwieniem biernym w późniejszym okresie, stwierdzonych w tych samych warunkach doświadczalnych przez Mossakowskiego (1975). Dynamika zmian po zatruciu CO,

obserwowanych w naszym materiale różni się od dynamiki zmian poischemicznych, opisanych przez Browna i wsp. (1974), Chikvaidze i Melitauri (1974) oraz przez Gadamskiego i wsp. (1976). Pozostaje sprawą otwartą rola cytotoksycznego działania tlenku węgla, jako czynnika modyfikującego dynamikę zmian pointoksykacyjnych (brak lub późny przyrost zawartości katecholamin powyżej poziomu kontrolnego po zatruciu, w przeciwieństwie do wczesnego wzrostu po niedokrwieniu). Podobnie nie wyjaśniona pozostaje sprawa, czy równoczesność maksymalnego przyrostu zawartości adrenaliny w tkance i wtórnej fazy niedokrwienia mózgu (Mossakowski 1975) obserwowana w 6 godzinie po zatruciu, ma charakter związku przyczynowego, czy też jest zwykłą zbieżnością w czasie.

Г. Шуманьска, М. Сикорска, Р. Гадамски

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА НА ПОВЕДЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГУ КРЫСЫ

Исследования выполнены на мозге крыс, подвергнутых отравлению окисью углерода в условиях, описанных Кортальсом и сотр. (1973). Этих животных исследовали во время непосредственной экспозиции в СО, а также в разные периоды их переживания после отравления окисью углерода.

Количественные данные показали снижение уровня норадреналина на величину около 35% (20 мин отравления) и 55% (60 мин отравления), а также повышение его уровня приблизительно на 25% через 24 часа после интоксикации СО. Присутствие адреналина отмечено в мозгу у двух из семи исследованных контрольных животных и не обнаружено ни в одном случае через 20 и 60 мин действия СО. Однако по истечении 6 часов после интоксикации уровень адреналина возрастал до значения 70 нг на 1 г сырой ткани. Повышенный уровень адреналина сохранялся и по истечении 24 часов.

Использованный гистохимический метод выявил флуоресценцию норадреналина и допамина. В мозгу животных, подвергнутых отравлению СО, зарегистрировано снижение интенсивности флуоресценции катехоламинов, сохраняющееся до 6 часов после интоксикации. Через 24 часа после действия окиси углерода интенсивность и распределение катехоламинов не отличались от наблюдаемых в контрольной группе.

Изменения содержания катехоламинов по-видимому зависят от анемичной гипоксии, являющейся последствием как действия окиси углерода, так и нарушений кровоснабжения мозга, отмеченных при тех же самых экспериментальных условиях.

G. Szumańska, M. Sikorska, R. Gadamski

EFFECT OF ACUTE CARBON MONOXIDE INTOXICATION ON RAT BRAIN CATECHOLAMINES

Investigations were performed on brains of rats submitted to carbon monoxide (CO) intoxication according to the method of Korthals et. al. (1973). The brains were studied during immediate exposition to CO, and in various periods of rats survival after CO intoxication.

Quantitative results showed the decrease of noradrenaline level about 35% (20 min. intoxication) and 55% (60 min. intoxication) and about 25% increase 24 h. after intoxication. The presence of adrenaline was established in 2 out of 7 control brains after 20 and 60 min. of CO action. However, 6 h. after intoxication the level of adrenaline increased up to 71 ng/g of fresh tissue. The enhanced level of adrenaline persisted also after 24 h.

The applied histochemical method revealed the fluorescence of noradrenaline and dopamine. In brains of animals submitted to CO the intensity of catecholamines fluorescence was decreased up to 6 h. after the intoxication. 24 h. after CO action the intensity and distribution of catecholamines did not differ from those in control group.

The changes in catecholamine content depend probably on the anemic hypoxia being the effect of CO action and on the disturbances in blood supply discovered at the same experimental conditions.

PIŚMIENICTWO

1. Brown R. M., Carlsson A., Ljunggren B., Siesjö B. K., Snider S. R.: Effect of ischemia on monoamine metabolism in the brain. *Acta physiol. scand.* 1974, 90, 789—791
2. Chang C. C.: A sensitive method for spectrophotofluorometric assay of catecholamines. *Int. J. Neuropharmacol.* 1964, 3, 643—649
3. Chikvaidze V. N., Melitauri N. N.: Effect of ischemia on the regional distribution of biogenic amines in the brain of rabbits. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 671—682
4. Davis J. N., Carlsson A.: The effect of hypoxia on monoamine synthesis levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 783—790
5. Euler U. S., Lishajko F.: Effects of some metabolic co-factors and inhibitors on transmitter release and uptake in isolated adrenergic nerve granules. *Acta physiol. scand.* 1969, 77, 298—307
6. Folbergova J., Ljunggren B., Norberg K., Siesjö B. K.: Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1974, 80, 265—279
7. Gadamski R., Szumańska G., Sikorska M.: Badania histochemiczne nad zachowaniem się amin katecholowych w mózgu królika w następstwie hipoksji krążeniowej. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 23—30
8. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 279—300
9. Lindvall O., Björklund A.: The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry* 1974, 39, 97—127
10. Ljunggren B., Norberg K., Siesjö B. K.: Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. *Brain Res.* 1974, 77, 173—186
11. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla u szczurów. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—250
12. Norberg K., Siesjö B. K.: Quantitative measurement of blood flow and oxygen consumption in the rat brain. *Acta physiol. scand.* 1974, 91, 154—164

13. Norberg K., Siesjö B. K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. I. Pattern of activation of glycolysis: a re-evaluation. *Brain Res.* 1975a, 86, 31—44
14. Norberg K., Siesjö B. K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. II. Citric acid cycle intermediates and associated amino acids. *Brain Res.* 1975b, 86, 45—54
15. Rap Z. M., Kapuściński A., Sikorska M.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartość wody w mózgu w doświadczalnym ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 403—412
16. Stoner H. B., Elson P. M., Koltay E.: The effect of limb ischaemia on the turnover of noradrenaline in the hypothalamus and brain stem of the rat. *J. Neurochem.* 1973, 21, 223—231
17. Stupfel M., Roffi J.: Action de l'anoxie et de differents taux de carbonique sur le contenu en noradrenaline et en adrenaline du cerveau de rat. *C. R. Seanc. Soc. Biol.* 1961, 155, 237—240
18. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Korthals J., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPG glucose:glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—231

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

JAN PACHECKA, ANDRZEJ SULIŃSKI, KRYSZYNA TRACZYKIEWICZ

THE EFFECT OF ACUTE INTOXICATION BY DICHLORVOS
AND TRICHLORPHON ON THE ACTIVITIES OF SOME RAT BRAIN
ESTERASES *

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

Head: Assoc. Prof. W. Bicz

As shown recently, effects of intoxication of rats by organophosphate pesticides Dichlorvos and Trichlorphon on the brain include changes not only of the acetylcholinesterase activity but also of the activities of acid and alkaline phosphatases (Pachecka et al., 1975). However, whereas the mechanism of action of organophosphate pesticides on acetylcholinesterase is understood in molecular detail (Englehard et al., 1967, Corbett, 1974), that one on the phosphatases so far remains obscure.

In this work an attempt has been made to clarify this problem by comparing the dynamics of changes of the activities of the enzymes following single intoxication of rats by Dichlorvos and Trichlorphon. The investigation comprised the following enzymes: acid phosphatase (EC 3.1.3.2.-ortophosphoric monoester phosphohydrolase), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.-ortophosphoric monoester phosphohydrolase) and acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7.-acetylcholine hydrolase).

MATERIALS AND METHODS

In all experiments adult male albino rats (190—210 g) were used. The animals were fed a commercial diet with water *ad libitum*.

Pesticides were administered *per os* in a single dose 50% LD₅₀. As LD₅₀ dose was considered 80 mg/kg for Dichlorvos (0,0-Dimethyl-2,2-dichlorovinyl/phosphate) and 630 mg/kg for Trichlorphon (0,0-Dimethyl-1-hydroxy-2,2,2-trichloroethyl/phosphonate). Both pesticides were

* This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No. 09.4.1.3.)

obtained from the Department of Physical Chemistry of the Polish Academy of Sciences. At various times after pesticide administration rats were decapitated without anaesthesia and the brain homogenates were prepared as described earlier (Pachecka et al., 1975). The phosphatases were assayed by the Beseey-Lowry method (Linhard, 1962) and acetylcholinesterase according to Ellman et al. (1961). The respective reaction mixtures were: for alkaline phosphatase (FV 1 ml) — 5.5 μ moles of p-nitrophenyl phosphate disodium salt, 50 μ moles of glycine buffer pH 10.5, 0.1 μ moles of $MgCl_2$ and about 200 μ g homogenate proteins. The incubation was carried out 30 min. at 37°C and p-nitrophenol was estimated at 410 nm. For acid phosphatase (FV 1 ml) — 5.5 μ moles of p-nitrophenyl phosphate disodium salt, 25 μ moles of citrate buffer pH 4.8 and about 50 μ g of homogenate proteins. The reaction was carried out as given for alkaline phosphatase. For acetylcholinesterase (FV 2 ml) — 2 μ moles of acetylthiocholine iodide, 0.4 μ moles of Ellmans reagent (DTNB), 200 μ moles of phosphate buffer pH 7.4 and about 200 μ g of homogenate proteins. The optical density was read every 60 sec. in the period of 5 min. at 412 nm. Protein in the homogenates was determined by the conventional Kjeldhal method. Statistical analysis was performed by Student's t test.

RESULTS

The results presented in Table 1 show that single intoxication of rats by Dichlorvos in the dose 50% LD₅₀ modified the activities of all tested esterases. The most rapid changes occurred in the acetylcholinesterase activity. Already 5 min. after pesticide administration the activity of this enzyme is lowered to 55% of the control level. This could mean that Dichlorvos passes rapidly from the vascular system into the brain. The maximum inhibition of acetylcholinesterase (83%) was observed 15 min. after Dichlorvos administration. In the next period the activity of this enzyme gradually increased reaching the control level after 48 hrs.

The activity of acid phosphatase between 5 min. and 15 min. after intoxication was higher than that in the control, but later no statistically significant difference was stated. In contrast, at 12, 48 and 72 hrs after intoxication it increased to 117%, 139% and 124% of the control, respectively.

Alkaline phosphatase activity was only insignificantly decreased during the first period after intoxication (up to 2 hrs). A marked decrease

was noted 5 hrs later. The activity increased after 24 hrs and 48 hrs and reached the control level 72 hrs after pesticide administration.

The data presented in Table 2 indicate that intoxication of rats by Trichlorphon caused inhibition of acetylcholinesterase activity already 5 min. after poisoning. The inhibitory effect enhanced up to 1 hr, whereafter the activity of the enzyme slowly increased and reached the control level after 48 hrs.

The acid phosphatase activity decreased after 1 hr and was observed to be lowered at 12 hrs and 24 hrs after intoxication.

The alkaline phosphatase activity at 15 min. and 30 min., as well as at 24 hrs after Trichlorphon administration was higher than the control level. At the other times, a small, statistically not significant increase of the activity was also noted.

DISCUSSION

Much work has been carried out on the effect of organophosphate pesticides on the activity of acetylcholinesterase (Corbett, 1974, Wilson, 1967), some hydrolytic enzymes (Oms, Brebert-Hanson, 1965, Villeneuve, Mc Kinley, 1968), as well as on the carbohydrate metabolism in the rat brain (Biczowa et al., 1975, Pachecka et al., 1975, Sitkiewicz, Zalewska, 1975). So far, however, no detailed study was devoted to the activities of phosphatases — enzymes belonging to the same enzymes group as acetylcholinesterase. Our previous results (Pachecka et al., 1975) showed that administration of Dichlorvos or Trichlorphon* to rats caused changes in brain alkaline and acid phosphatases. The above work did not answer the question as to the duration of the effects and the correlation between inhibition of acetylcholinesterase and variation of phosphatases activities.

The data presented in this paper indicate that single intoxication of rats by Dichlorvos or Trichlorphon caused significant variation of activities of all studied esterases in the rat brain. The changes maintained during long period (up to 72 hrs) after pesticide administration. However, there was no correlation between the level of acetylcholinesterase inhibition and the changes of the phosphatases activities. The differences noted in the dynamics of the changes of the enzymes activities are probably caused by different sensibility of acetylcholinesterase and phosphatases to Dichlorvos and Trichlorphon and/or their metabolites. It could be a result of different rate of penetration of pesticides into brain, as well as different metabolism of both pesticides (Arthur, Casida, 1957, Hassan et al., 1965). The dynamics of changes of the ace-

Table 1. Activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and acetylcholinesterase of rat brain at various times after single Dichlorvos intoxication

Tabela 1. Aktywności fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i acetylocholinoesterazy mózgu szczura w różnym czasie po jednorazowym zatruciu dichlorfosem

Time after intoxication Czas od momentu zatrucia	Alkaline phosphatase Fosfataza alkaliczna (nmoles/hr/mg protein) (nmole/godz./mg białka)			Acid phosphatase Fosfataza kwaśna (nmoles/hr/mg protein) (nmole/godz./mg białka)			Acetylcholinesterase Acetylocholinoesteraza (nmoles/min/mg protein) (nmole/min./mg białka)		
	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p
Control Kontrola	463 ± 43	(5)		1343 ± 62	(6)		47 ± 2,6	(6)	
1 min	472 ± 20	(5)	≥0,05	1852 ± 197	(6)	≥0,05	49 ± 3,2	(6)	≥0,05
5 „	473 ± 37	(5)	≥0,05	1645 ± 86	(6)	≤0,05	25 ± 3,3	(6)	≤0,05
15 „	513 ± 14	(10)	≥0,05	1812 ± 87	(12)	≤0,05	8 ± 0,9	(6)	≤0,05
30 „	475 ± 33	(6)	≥0,05	1261 ± 29	(6)	≥0,05	14 ± 0,7	(6)	≤0,05
60 „	553 ± 32	(6)	≥0,05	1333 ± 28	(5)	≥0,05	18 ± 2,3	(6)	≥0,05
2 hr godz.	475 ± 80	(6)	≥0,05	1534 ± 67	(6)	≥0,05	19 ± 2,2	(6)	≤0,05
5 „	423 ± 19	(5)	≤0,05	1532 ± 34	(6)	≤0,05	25 ± 2,1	(6)	≤0,05
8 „	482 ± 28	(6)	≥0,05	1467 ± 37	(6)	≥0,05	26 ± 1,1	(6)	≤0,05
12 „	550 ± 34	(6)	≥0,05	1571 ± 46	(6)	≤0,05	30 ± 4,9	(6)	≤0,05
24 „	632 ± 19	(6)	≤0,05	1524 ± 75	(6)	≥0,05	33 ± 5,2	(6)	≤0,05
48 „	613 ± 37	(6)	≤0,05	1867 ± 72	(6)	≤0,05	44 ± 4,5	(6)	≥0,05
72 „	438 ± 38	(6)	≥0,05	1660 ± 113	(6)	≤0,05	53 ± 2,8	(6)	≥0,05

$\bar{x} \pm S_x$ — arithmetic mean ± mean error of the mean — średnia arytmetyczna ± średnie odchylenie od średniej

p — probability — prawdopodobieństwo,

(n) — number of experiments — liczba doświadczeń

<http://rcin.org.pl>

Table 2. Activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and acetylcholinesterase of rat brain at various times after single Trichlorphon intoxication

Tabela 2. Aktywności fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i acetylocholinoesterazy mózgu szczura w różnym czasie po jednorazowym zatruciu trichlorfonem

Time after intoxication Czas od momentu zatrucia	Alkaline phosphatase Fosfataza alkaliczna (nmoles/hr/mg protein) (nmole/godz./mg białka)			Acid phosphatase Fosfataza kwaśna (nmoles/hr mg protein) (nmole/godz./mg białka)			Acetylcholinesterase Acetylocholinoesteraza (nmoles/min/mg protein) (nmole/min./mg białka)		
	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p	$\bar{x} \pm S_{\bar{X}}$	(n)	p
Control Kontrola	454 ± 33	(6)		1602 ± 52	(6)		47 ± 1,8	(6)	
1 min	500 ± 10	(6)	≥0,05	1361 ± 51	(6)	≥0,05	49 ± 2,2	(6)	≥0,05
5 „	440 ± 15	(6)	≥0,05	1803 ± 262	(5)	≥0,05	26 ± 3,2	(6)	≤0,05
15 „	639 ± 32	(11)	≤0,05	1747 ± 99	(11)	≥0,05	11 ± 2,1	(6)	≤0,05
30 „	581 ± 57	(6)	≤0,05	1471 ± 38	(6)	≥0,05	10 ± 1,0	(6)	≤0,05
60 „	471 ± 28	(6)	≥0,05	1355 ± 38	(5)	≤0,05	7 ± 0,05	(6)	≤0,05
2 hr godz.	421 ± 7	(6)	≥0,05	1825 ± 189	(6)	≥0,05	15 ± 0,9	(6)	≤0,05
5 „	436 ± 8	(6)	≥0,05	1520 ± 57	(6)	≥0,05	19 ± 1,2	(6)	≤0,05
8 „	522 ± 32	(6)	≥0,05	1699 ± 186	(6)	≥0,05	31 ± 2,8	(6)	≤0,05
12 „	582 ± 61	(6)	≥0,05	1472 ± 29	(6)	≤0,05	33 ± 2,4	(6)	≤0,05
24 „	609 ± 39	(6)	≤0,05	1432 ± 51	(6)	≤0,05	35 ± 3,5	(6)	≤0,05
48 „	514 ± 12	(6)	≥0,05	1701 ± 34	(6)	≤0,05	45 ± 3,8	(6)	≤0,05

For explanations see Table 1.

Objaśnienia w tabeli 1.

tylcholinesterase activity indicated the formation of a stable pesticide-enzyme complex. The changes in the phosphatases activities are more differentiated and depend on the kind of enzyme and pesticide. Two phases of these changes could be distinguished. The first phase arises a few hours after pesticide administration, the second about 24 hrs later. The pattern of changes of phosphatases activities is conditioned by metabolism of pesticide and the appearance in the brain metabolite(s) responsible for the changes. The changes concern both the increase and decrease of the activities of both enzymes and depend on the period of poisoning.

It may be suggested that decrease of the phosphatases activities is caused by direct interaction between these enzymes and active metabolite(s) of Dichlorvos or Trichlorphon. The increase of activities is more difficult to be explained. It may be a result of either stimulation or increase of the level of phosphatases in the brain. Some data (Barzu et al., 1973) suggest that organophosphate pesticides caused release of phosphatases from lysosomes and intracellular membranes.

*

*

*

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Mrs Hanna Pietrzykowska and Mrs Krystyna Podwójcik.

J. Pachecka, A. Suliński, K. Traczykiewicz

WPLYW OSTREGO ZATRUCIA DICHLORFOSEM I TRICHLORFONEM NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH ESTERAZ W MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Do doświadczeń użyto białe szczury, samce, wagi około 200 g. Szczurom podawano jednorazowo dichlorfos lub trichlorfon w dawce 50% LD₅₀. Zwierzęta dekapitowano bez narkozy po upływie 1, 5, 15, 30 min., oraz 1, 2, 5, 8, 12, 24, 48 i 72 godz. W homogenatach mózgu oznaczano aktywność acetylocholinoesterazy, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej.

Jednorazowe zatrucie dichlorfosem powoduje zmiany aktywności wszystkich badanych enzymów. Już po 5 min. po podaniu pestycydu następuje obniżenie aktywności acetylocholinoesterazy o 45% oraz wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej o 38%. Aktywność fosfatazy alkalicznej ulega obniżeniu dopiero po 5 godz. po zatruciu i to tylko o 10%. Następnie aktywność tego enzymu wzrasta osiągając po 24 godz. i 48 godz. wartość 136% i 132% aktywności grupy kontrolnej. Zatrucie dichlorfosem powoduje wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej po 5, 15 min., 12, 24 i 72 godz. odpowiednio o 38%, 22%, 17%, 39% i 24%. Maksymalne hamowanie (80%) acetylocholinoesterazy obserwowano w 15 min. po zatruciu. Aktywność tego enzymu systematycznie wzrastała osiągając wartość grupy kontrolnej po 24 godz. od zatrucia.

Trichlorfon powoduje wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej po 15 i 30 min. i 24 godz. po zatruciu odpowiednio o 40%, 29%, 34%. Po 1, 12 i 24 godz. po podaniu pestycydu aktywność fosfatazy kwaśnej obniżała się odpowiednio o 15%, 8% i 10%. Aktywność acetylocholinoesterazy ulega obniżeniu już po 5 min. po podaniu trichlorfonu do 55% aktywności enzymu w grupie kontrolnej. Najniższa aktywność występuje po 60 min. (15% aktywności kontroli), a następnie wzrasta osiągając po 24 godz. 75% aktywności kontrolnej. Powrót do normy następuje po 48 godz. od momentu zatrucia.

Я. Пахецка, А. Сулиньски, К. Трачыкевич

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ДИХЛОРФОСОМ И ТРИХЛОРФОНОМ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ЭСТЕРАЗ В МОЗГЕ КРЫСЫ

Резюме

В опытах использовали белых крыс, самцов, весом около 200 г. Крысам однократно давали дихлорфос или трихлорфон в дозе 50% LD₅₀. Животных обезглавливали без наркоза по истечении 1, 5, 15, 30 мин. и 1, 2, 5, 8, 12, 24, 48, 72 час. В гомогенатах мозга определяли активность ацетилхолинэстеразы и щелочной и кислой фосфатаз.

Однократное отравление дихлорфосом вызывает изменения активности всех исследованных ферментов. Уже через 5 мин. после дачи пестицида наступает снижение активности ацетилхолинэстеразы на 45% и увеличение активности кислой фосфатазы на 38%. Активность щелочной фосфатазы уменьшается только через 5 час. от момента отравления и только на 10%. Затем активность этого фермента возрастает, достигая через 24 и 48 час. значений 136% и 132% от активности контрольной группы. Отравление дихлорфосом приводит к увеличению активности кислой фосфатазы через 5 и 15 мин., 12, 24 и 72 час. на 38%, 22%, 17%, 39% и 24% соответственно. Максимальное подавление (80%) ацетилхолинэстеразы наблюдали через 15 мин. после отравления. Активность этого фермента постоянно возрастала, достигая величины контрольной группы через 24 час. от момента отравления.

Трихлорфон вызывает увеличение активности щелочной фосфатазы через 15 и 30 мин. и 24 час. от момента отравления на 40%, 29% и 34% соответственно. Через 1, 12 и 24 часа от момента дачи пестицида активность кислой фосфатазы снижалась на 15, 8 и 10% соответственно. Активность ацетилхолинэстеразы снижалась уже через 5 мин. после дачи трихлорфона до 55% от активности фермента в контрольной группе. Самая низкая активность имеет место через 60 мин. (15% активности контроля), а затем она возрастает, достигая через 24 час. 75% контрольной активности. Возвращение к норме наступает через 48 час. от момента отравления.

REFERENCES

1. Arthur B. W., Casida J. E.: Metabolism and selectivity of 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate and its acetyl and vinyl derivatives. *J. Agr. Food Chem.*, 1957, 5, 186—191
2. Barzu T., Cuparencu B., Hantz A.: Action of organophosphorus compounds on cell organelles. I. Effect of tetraethyl dithiopyrophosphate on lysosomal hydrolases. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 185—194

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 dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 259—272.
4. Corbett J. R.: Insecticides inhibiting acetylcholinesterase. In: *Biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press, London, New York 1974, 107—164.
5. 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.
6. Englehard N., Prchal K., Nenner M.: Acetylcholin-Esterase. *Angew. Chem.*, 1967, 79, 604—616.
7. Hassan A., Zayed S. M. A. D., Abdel-Hamid F. M.: Metabolism of organophosphorus insecticides. II. Metabolism of 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (Dipterex) in mammalian nervous tissue and kinetics involved in its reaction with acetylcholinesterase. *Can. J. Biochem.*, 1965, 43, 1263—1269.
8. Linhard K., Walter K.: Phosphatasen. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Bergmeyer H. U. (ed), Verl. Chemie, Weinheim, 1962, 779—785.
9. Ooms A. J. J., Breebaart-Hansen J. C. A., Ceulen B. J.: The reaction of organophosphorus compounds with hydrolytic enzymes. II. The inhibition of citrus acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.*, 1966, 15, 17—30.
10. 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. PZH*, 1975, 26, 347—356.
11. Pachecka J., Suliński A., Ziółkowska G.: Activity of some esterases in rat brain following Dichlorvos and Trichlorphon intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 455—462.
12. Saunders B. C.: Some aspects of the chemistry and toxic action of organic compounds containing phosphorus and fluorine. Cambridge University Press, 1957.
13. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach mózgu szczura w następstwie zatrucia Dichlorvosem i Trichlorfonem. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 273—281.
14. Villeneuve D. C., Mc Kinley W. P.: Inhibition of beef liver hydrolytic enzymes by organophosphorus pesticides. Quantal inhibition characteristics of several organophosphorus compounds using o-nitrophenyl butyrate as substrate. *J. Agr. Food Chem.*, 1968, 16, 290—294.

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

IRMINA B. ZELMAN, ALICJA PRONASZKO-KURCZYŃSKA

ZABURZENIA MIKROKRAŻENIA W MÓZGU SZCZURÓW W OSTREJ ENCEFALOPATII OUABAINOWEJ

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

W poprzednich naszych badaniach wykazano, że domózgowe wprowadzenie ouabainy dorosłym szczurom prowadzi do powstania charakterystycznych zmian strukturalnych, którym towarzyszy przejściowe gromadzenie się glikogenu w tkance nerwowej i szereg nieprawidłowości histoenzymatycznych (Zelman 1972; Zelman, Szumańska 1973; Zelman-Pronaszko-Kurczyńska 1975; Zelman i wsp. 1975). Stwierdzone zaburzenia histoenzymatyczne przekraczały znacznie obszar penetracji glikozydu, oznaczony autoradiograficznie przy użyciu ouabainy znakowanej trytem (Towfighi i Gonatas 1973) i podobnie jak dynamika i charakter zmian zawartości glikogenu w mózgu nie dawały się wytłumaczyć bezpośrednim oddziaływaniem strofantyny na tkankę nerwową (Zelman, Pronaszko-Kurczyńska 1975). Zarówno topografia jak i długotrwałość obserwowanych zmian sugerowały złożony patomechanizm zaburzeń, zapoczątkowanych jedynie przez ouabainę. W interpretacji zmian ultrastrukturalnych opisywanych w mózgach zwierząt, którym wstrzyknięto domózgowo ouabainę, zwracano również uwagę na podwójny charakter nieprawidłowości sugerując, poza bezpośrednimi następstwami działania glikozydu, wpływ niedotlenienia i obrzęku (Cornog i wsp. 1967; Towfighi i Gonatas 1973). Brak wykładników zwiększonej przepuszczalności układu naczyniowego zarówno dla tzw. konwencjonalnych znaczników barierowych jak błękit trypanu czy błękit Evansa (Cornog i wsp. 1967), jak również dla peroksydazy chrzanowej (Towfighi i Gonatas 1973) skłoniła nas do zwrócenia uwagi na stan mikrokrażenia mózgowego dla ustalenia wpływu zaburzeń hemodynamicznych na rozwój nieprawidłowości stwierdzonych w ostrej encefalopatii ouabainowej.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 2-miesięcznych szczurach rasy Wistar, którym wstrzykiwano do prawej półkuli mózgu 0,02 ml roztworu ouabainy zawierającego 0,001 mg glikozydu. Szczurom kontrolnym

wprowadzono w taki sam sposób odpowiednią ilość fizjologicznego roztworu NaCl. Zwierzęta doświadczalne i kontrolne dekapitowano w grupach po 5, 15, 30, 60 i 120 minutach oraz po 24, 48 i 120 godzinach po zabiegu. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszkowej utrwalano przez okres 1—2 tygodni w zobojętnionym standardowym roztworze formaliny, po czym dzielono na bloki, które skrawano na mikrotomie mrozeniowym na skrawki grubości 120—150 mikronów. Na skrawkach tych uwidacziano sieć naczyń krwionośnych stosując metodę benzydynową Pickwortha w modyfikacji van Doherty i wsp. (1960).

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Stan kliniczny szczurów, którym wstrzyknięto domózgowo roztwór ouabainy nie różnił się od opisanego w naszych poprzednich pracach. U zwierząt doświadczalnych występowały wkrótce po podaniu glikozydu sinica, przyspieszenie tętna i oddechu, znaczne pobudzenie ruchowe, prężenia i mioklonie, sporadycznie typowe napady padaczkowe pojedyncze lub gromadne. Zaburzenia te stopniowo zmniejszały się i w okresie 4—6 godzin po iniekcji ouabainy szczury, poza zmniejszoną ruchliwością, nie wykazywały istotnych odchyłań od normy.

Zwierzęta kontrolne, którym wstrzyknięto fizjologiczny roztwór NaCl po wyjściu z okresu narkozy zachowywały się prawidłowo.

Obserwacje mikroskopowe

W skrawkach pobranych z mózgów szczurów nie poddanych żadnym zabiegom metoda benzydynowa uwidacznia charakterystyczny obraz sieci naczyniowej mózgu ze zróżnicowaniem gęstości i kierunku przebiegu naczyń w poszczególnych strukturach. Korę płaszczą mózgowego charakteryzują prostopadle ułożone naczynia tętnicze i żyłne, penetrujące od opon w kierunku istoty białej, równomierne zagęszczenie sieci w obrębie całej kory, bez zróżnicowania warstwowego oraz słabiej rozwinięta sieć naczyniowa w obrębie *cortex entorhinalis* i *pyriformis*. Istotę białą charakteryzuje uboższa sieć włóscinkowa oraz równoległe do przebiegu włókien ułożenie naczyń tętniczych i żylnych. W zakrętach hipokampa zwraca uwagę zróżnicowanie gęstości sieci kapilarnej w poszczególnych warstwach i zagęszczenie naczyń, przede wszystkim żylnych w obrębie *sulcus hippocampi*. Struktury podkorowe charakteryzuje obfita

sieć naczyniowa oraz liczne układy angioarchitektoniczne poddzielane słabiej ukrwionymi pasemkami istoty białej.

U szczurów kontrolnych poza zmianami ograniczonymi do otoczenia kanału wkłucia, nie obserwowano w żadnej z badanych grup czasowych istotnych zaburzeń w ukrwieniu półkul mózgowych.

U szczurów dekapitowanych w 5 minut po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy obserwowano przekrwienie sieci włósczkowej oraz poszerzenie naczyń tętnicznych i żylnych (ryc. 1). Już w tym okresie w obszarach największych zmian strukturalnych, w miejscach odpowiadających działaniu największych stężeń ouabainy, stwierdzano niedokrwienie tkanki manifestujące się wyraźnym zubożeniem sieci kapilarnej (ryc. 2 i 3). Zmiany te występowały najczęściej w zewnętrznej lub jednej z głębszych warstw kory, w sąsiedztwie szczeliny podłużnej mózgu, w obrębie *nucleus septi lateralis* oraz w hipokampie jedno lub obustronnie. Znaczne wypełnienie sieci naczyniowej widoczne było również w strukturach podkorowych i w istocie białej.

U zwierząt dekapitowanych w 15 minut po podaniu glikozydu nadal utrzymywało się przekrwienie sieci naczyniowej z plackowatymi lub warstwowymi obszarami niedokrwienia (ryc. 4).

W 30 minut po domózgowym wstrzyknięciu glikozydu narastały wyraźnie zaburzenia ukrwienia kory mózgowej i struktur hipokampa. W korze zwracało uwagę nierównomierne wypełnienie sieci kapilarnej oraz narastające przepełnienie naczyń żylnych, które często miały nierówny, wężykowaty przebieg. Nieprawidłowości ukrwienia występowały w obu półkulach mózgu, ale ich nasilenie było wyraźnie większe po stronie wprowadzenia glikozydu. Zwracało uwagę niedokrwienie zakrętów hipokampa, zwłaszcza jego przyśrodkowych części. W istocie białej, zwłaszcza podkorowo widoczne były nadmiernie wypełnione naczynia żyłne, nie obserwowano jednak nierównomiernego ukrwienia tej struktury. Przepełnienie naczyń żylnych i sieci kapilarnej, mniej nasilone niż w korze, obserwowano również w strukturach podkorowych.

U szczurów dekapitowanych po 60 i 120 minutach od wstrzyknięcia ouabainy stan ukrwienia mózgu jest zasadniczo podobny (ryc. 5—10). Pomędzy poszczególnymi zwierzętami obu grup czasowych występują znaczne różnice, uwarunkowane prawdopodobnie niejednakową dawką ouabainy oraz różnicami w nasileniu ogólnoustrojowych zaburzeń. Zaburzenia ukrwienia, a przede wszystkim objawy zastoju żylnego są wyraźnie większe u szczurów, u których obserwowano liczne napady drgawkowe (ryc. 6). Również w tym czasie utrzymuje się przewaga zaburzeń po stronie iniekcji, ale różnica w nasileniu nieprawidłowości ukrwienia w obu półkulach jest mniejsza.

Zwierzęta dekapitowane 24 godziny po wstrzyknięciu ouabainy wykazują w dalszym ciągu znaczne nieprawidłowości ukrwienia, przede wszystkim kory płaszcza mózgowego i zakrętów hipokampa (ryc. 11—14). W tym czasie u niektórych szczurów widoczna jest tendencja do normalizacji i wyrównywania krążenia w niedokrwionych obszarach. Utrzymuje się nadal wyraźne zubożenie sieci kapilarnej w obszarach trwałych zmian gąbczastych (ryc. 12) oraz w zakrętach hipokampa nawet przy braku histologicznych cech uszkodzenia tej struktury (ryc. 13). Zaburzenia ukrwienia w postaci nierównomiernego wypełnienia sieci kapilarnej i przepełnienia krwią naczyń żylnych widoczne są również w miejscach odległych od iniekcji (ryc. 14) np. w korze limbicznej podstawnej części płaszcza mózgowego.

W 48 godzin po wstrzyknięciu ouabainy nadal jest widoczne nieprawidłowe ukrwienie kory mózgowej z utrzymującym się przekrwieniem żylnym i ogniskami niedokrwienia (ryc. 15 i 16), przede wszystkim w obszarach największych zmian strukturalnych. Nieprawidłowości ukrwienia są różnie nasilone u poszczególnych zwierząt, występują obustronnie, przede wszystkim w obrębie płaszcza mózgowego i zakrętów hipokampa, zmniejszają się w miarę oddalania się od miejsca wstrzyknięcia glikozydu. Angioarchitektonika struktur podkorowych i istoty

Ryc. 1. Szczur z 5-minutowym przeżyciem. Silne przekrwienie kory po stronie iniekcji, znaczne poszerzenie tętnic i żył, nierównomierne wypełnienie sieci naczyńowej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Rat with 5 min. survival. Severe hyperemia of the cortex of the injected hemisphere, marked dilation of arteries and veins, uneven impletion of vascular network. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 2. Szczur z 5-minutowym przeżyciem. Niedokrwienie kory w obszarze penetracji glikozydu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 2. Rat with 5 min. survival. Ischemic cortex in area penetrated by glycoside. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 3. Szczur z 5-minutowym przeżyciem. Słabe ukrwienie zawoju hipokampa po stronie iniekcji. Met. Pickwortha. Pow. 30 ×.

Fig. 3. Rat with 5 min. survival. Poor blood supply of hippocampal gyrus of the injected hemisphere. Pickworth meth. × 30.

Ryc. 4. Szczur z 15-minutowym przeżyciem. Przekrwienie kory mózgu z poszerzeniem naczyń żylnych w głębszych warstwach i w przylegającej istocie białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

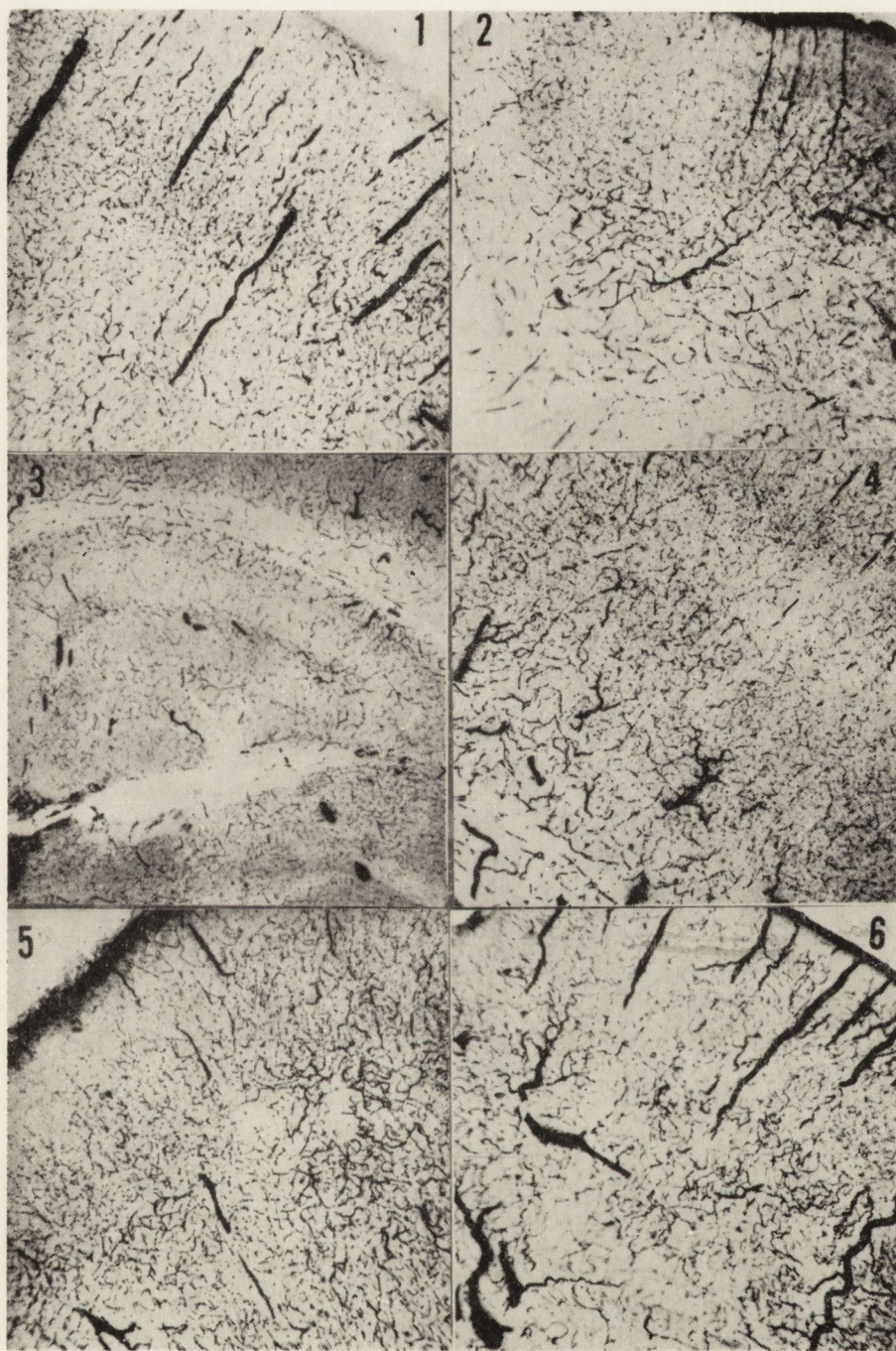
Fig. 4. Rat with 15 min. survival. Hyperemia of cerebral cortex, dilated veins in deep cortical layers and in adjacent white matter. Pickworth meth. × 60.

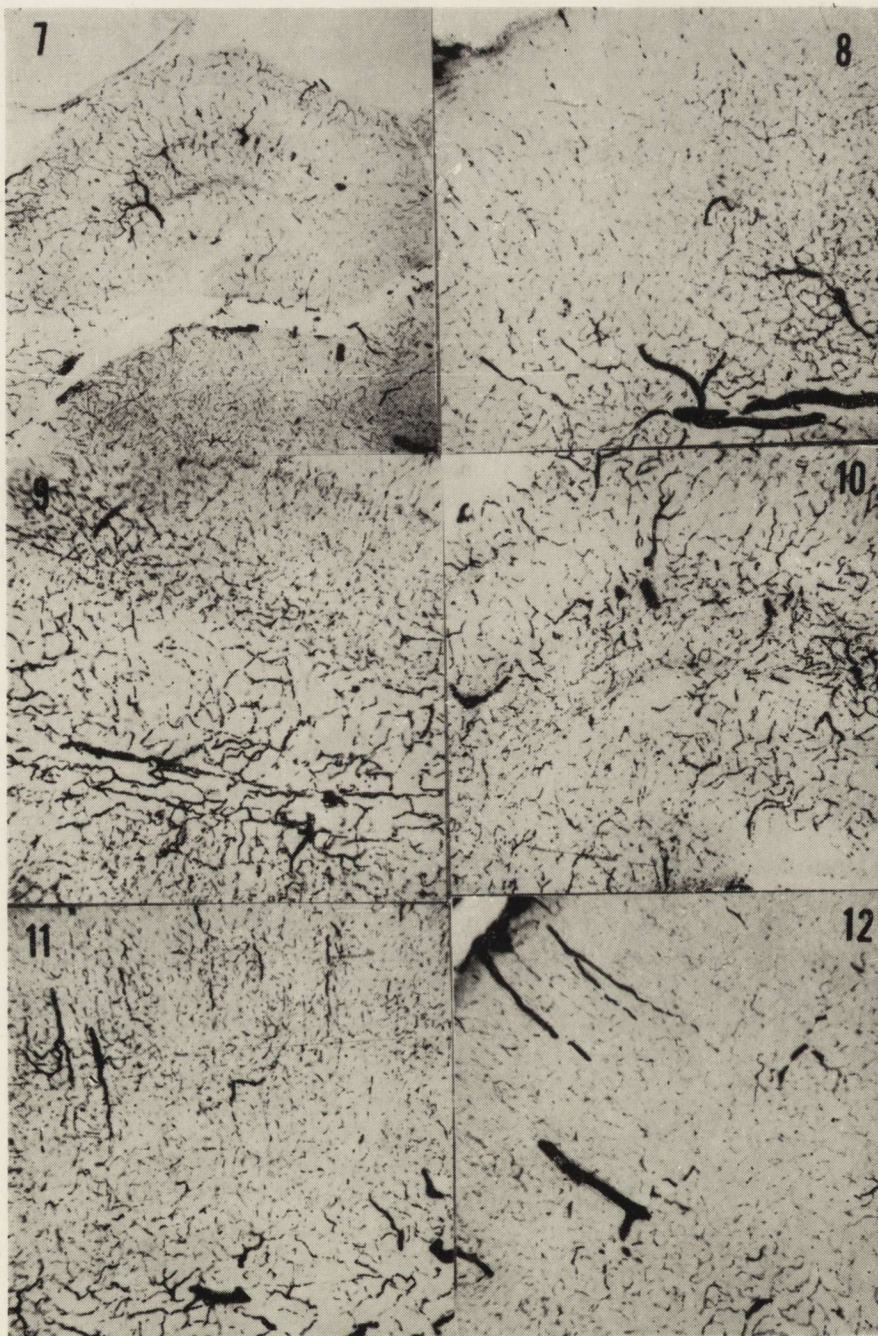
Ryc. 5. Szczur z 60-minutowym przeżyciem. Nierównomierne ukrwienie kory mózgowej w półkuli przeciwległej do miejsca iniekcji. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 5. Rat with 60 min. survival. Uneven blood supply of cerebral cortex of the hemisphere contralateral to the injection. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 6. Szczur z 60-minutowym przeżyciem, u którego wystąpiły seryjne napady drgawkowe. Silne przekrwienie żyłne i nierównomierne ukrwienie kory po stronie iniekcji. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 6. Rat with 60 min. survival who developed serial epileptic fits. Severe venous hyperemia and uneven cortical blood supply of the injected hemisphere. Pickworth meth. × 60.





białej jest prawidłowa, w ich obrębie nie występują ogniskowe nieprawidłowości ukrwienia, spotyka się natomiast znacznie poszerzone naczynia żyłne.

Po 5 dniach od momentu wprowadzenia glikozydu występują jeszcze w obrębie płaszcza mózgowego niewielkie, często zlokalizowane przynaczyniowo, obszary upośledzonego ukrwienia (ryc. 17). Podobne zaburzenia występują w zwojach hipokampa. U większości zwierząt obserwuje się w tym czasie całkowitą lub prawie całkowitą normalizację mikrokrążenia w mózgu (ryc. 18).

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że ouabaina wprowadzona bezpośrednio do mózgu szczura, powoduje rozległe i długotrwałe zaburzenia ukrwienia w obu półkulach, przy czym najbardziej nasilone nieprawidłowości występują w miejscu największego stężenia glikozydu i pokrywają się z obszarem największych zmian strukturalnych (Bignami, Palladini 1966, Zelman 1972, Towfighi i Gonatas 1973). Zaburzenia w ukrwieniu ujawniały się w najwcześniej badanej grupie zwierząt, to jest w 5 minut po wstrzyknięciu glikozydu, przy czym już w tym okresie zwracały uwagę ogniska niedokrwienia w obrębie kory mózgowej i zwojów hipokampa występujące na tle uogólnionego przekrwienia pół-

Ryc. 7. Szczur z 60-minutowym przeżyciem. Zubożenie ukrwienia w przyśrodkowej części zwoju hipokampa w półkuli przeciwległej do wkłucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 7. Rat with 60 min. survival. Poor blood supply in paramedian part of hippocampal gyrus in the hemisphere contralateral to the injection. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 8. Szczur z 60-minutowym przeżyciem. Niedokrwienie w obszarze penetracji glikozydu i przekrwienie żyłne w istocie białej. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 8. Rat with 60 min. survival. Ischemia in the area of glycoside penetration and venous hyperemia of the white matter. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 9. Szczur ze 120-minutowym przeżyciem. Niedokrwienie kory i przekrwienie istoty białej w zwoju hipokampa po stronie iniekcji. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 9. Rat with 120 min. survival. Ischemia of the cortex and hyperemia of hippocampal gyrus white matter of the injected hemisphere. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 10. Szczur ze 120-minutowym przeżyciem. Słabsze ukrwienie części zwoju hipokampa w półkuli przeciwległej do wkłucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

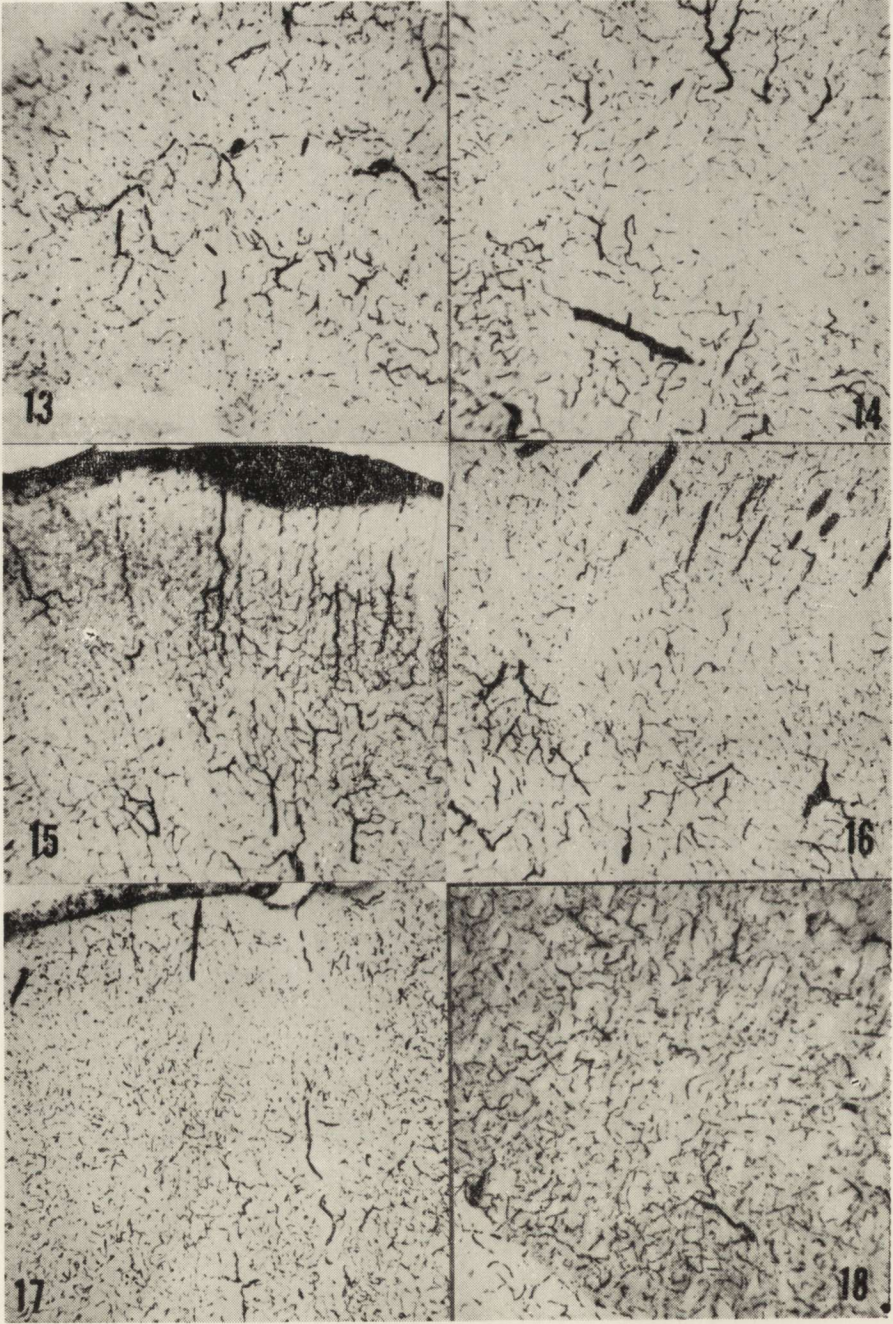
Fig. 10. Rat with 120 min. survival. Poorer blood supply of the part of hippocampal gyrus in the hemisphere contralateral to the injection. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 11. Szczur z 24-godzinnym przeżyciem. Zaburzenia w ukrwieniu kory mózgu w sąsiedztwie miejsca iniekcji. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 11. Rat with 24 hrs survival. Disturbances in blood supply of cerebral cortex near to the injected tissue. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 12. Szczur z 24-godzinnym przeżyciem. Ogniskowe niedokrwienie kory w obszarze penetracji glikozydu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 12. Rat with 24 hrs survival. Focal ischemia of the cortex in the area penetrated by glycoside. Pickworth meth. × 60.



kul. O ile uogólnione przekrwienie można było traktować w tym okresie jako wykładnik ciężkich ogólnoustrojowych zaburzeń, pojawiających się u zwierząt doświadczalnych prawie natychmiast po wstrzyknięciu ouabainy, obecność ognisk niedokrwienia można było z pewnością odnieść do bezpośredniego działania glikozydu. Wskazywała na to zarówno topografia niedokrwionych obszarów jak i dynamika rozwoju tych zmian, zlokalizowanych w pierwszej fazie w strefach działania największych stężeń glikozydu a w późniejszym okresie występujących również poza strefą jego bezpośredniego oddziaływania, prawdopodobnie w następstwie zaburzenia czynności autoregulacyjnych naczyń mózgu. Podobne rozsiane ogniska niedokrwienia obserwował Mossakowski (1974, 1975) w różnych strukturach mózgu w przypadku hipoksji krążeniowej w okresie pełnej normalizacji układowego ciśnienia krwi oraz u szczurów po zatruciu CO wiążąc ich obecność z zaburzeniem czynności autoregulacyjnych układu naczyniowego mózgu. Nie wiadomo do tej pory czy ouabaina wprowadzona do mózgu działa bezpośrednio na elementy łożyska naczyniowego. Friedman i Friedman (1974) badali wpływ ouabainy na komórki mięśni gładkich tętnicy ogonowej szczura w warunkach *in vitro* i wykazali zmiany zawartości sodu i potasu. Stwierdzono również, że strofantyna wprowadzona bezpośrednio do naczyń śródmózgowych prowadzi do uszkodzenia bariery krew-mózg z przechodzeniem błękitu Evansa do tkanki nerwowej (Meyer-Ruge i wsp. 1974), podczas gdy glikozyd wprowadzony bezpośrednio do móz-

Ryc. 13. Szczur z 24-godzinnym przeżyciem. Zaburzenia ukrwienia zawoju hipokampa po stronie przeciwległej do wkłucia. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 13. Rat with 24 hrs survival. Disturbances in blood supply of hippocampus contralaterally to the injection. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 14. Szczur z 24-godzinnym przeżyciem. Nierównomierne ukrwienie kory limbicznej części podstawnej mózgu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 14. Rat with 24 hrs survival. Uneven blood supply of limbic cortex of the basal part of the brain. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 15. Szczur z 48-godzinnym przeżyciem. Utrzymujące się zaburzenia ukrwienia z poszerzeniem naczyń żylnych w obszarze penetracji glikozydu. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 15. Rat with 48 hrs survival. Persisting disturbances in blood supply and dilation of veins in the area penetrated by glycoside. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 16. Szczur z 48-godzinnym przeżyciem. Nierównomierne ukrwienie i poszerzenie naczyń żylnych w zawoju hipokampa. Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 16. Rat with 48 hrs survival. Uneven blood supply and dilation of veins in hippocampal gyrus. Pickworth meth. × 60.

Ryc. 17 i 18. Szczur z 5-dniowym przeżyciem. Normalizacja ukrwienia z widocznymi jeszcze ogniskami gorszego ukrwienia w półkuli po stronie wkłucia (*ryc. 17*). Met. Pickwortha. Pow. 60 ×.

Fig. 17 and 18. Rat with 5 days survival. Normalization of blood circulation with still visible foci of poorer blood supply in the injected hemisphere (*Fig. 17*). Pickworth meth. × 60.

gu nie wpływa na zachowanie się bariery naczyniowo-mózgowej zarówno dla błękitu Evansa (obserwacje własne) jak i dla peroksydazy chrzanowej (Towfighi, Gonatas 1973).

Rozważając mechanizm powstania wczesnych ognisk niedokrwienia po domózgowym wprowadzeniu ouabainy należy również wziąć pod uwagę obrzęk wypustek astrogleju, któremu niektórzy autorzy przypisują istotną rolę w powstawaniu zaburzeń mikrokrążenia w mózgu. Meyer-Ruge i wsp. (1974) badając wpływ obrzmienia wypustek glejowych na przepływ krwi w korze mózgu wykazali obniżenie mikrokrążenia o 50% już w 25 minut po wprowadzeniu ouabainy do gałązki ciemieniowej tętnicy środkowej mózgu kota. Przeprowadzone przez tych autorów równoległe badania mikroskopowo-elektronowe wykazały proporcjonalny do stopnia obrzmienia astrogleju ucisk włóścińców z pofałdowaniem ich ścian i gwiazdkowatym zwięzieniem światła w obszarach najbardziej nasilonych nieprawidłowości. Natomiast Baldy-Moulinier i Humeau (1974) po wprowadzeniu ouabainy do zbiornika wielkiego mózgu kotów nie obserwowali ucisku kapilarów ani zwięzienia ich światła, stwierdzili natomiast po przejściowej hyperemii stopniowe obniżanie się przepływu krwi w mózgu, największe pomiędzy 2—4 godziną po wprowadzeniu roztworu ouabainy do zbiornika wielkiego. Wyniki uzyskane przez obu autorów nasuwają wątpliwości odnośnie roli astrocytów w powstawaniu zaburzeń mikrokrążenia po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy.

Przeciwko takiej sugestii przemawia również obserwowana w naszym materiale długotrwałość zaburzeń ukrwienia utrzymujących się znacznie dłużej niż zmiany dostrzegalne w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

Charakter zaburzeń ukrwienia, stwierdzony u naszych zwierząt jest zasadniczo zgodny z wynikami uzyskanymi przez Baldy-Moulinier i Humeau (1974) oraz przez Meyer-Ruge i wsp. (1974) pomimo odmiennych sposobów podania glikozydu i różnych zwierząt doświadczalnych. U szczurów, którym wstrzyknęliśmy domózgowo ouabainę, występowało krótkotrwałe przekrwienie, po którym pojawiało się długo trwające upośledzenie ukrwienia i zastój żylny, znajdujące odpowiednik w badaniach wspomnianych autorów w znacznym obniżeniu przepływu krwi.

Występowanie nieprawidłowości ukrwienia w obu półkulach mózgu i w znacznej odległości od miejsca wprowadzenia ouabainy oraz nasilenie tych nieprawidłowości w niektórych strukturach mózgu, podobnie jak i długotrwałość zaburzeń nie dadzą się wytłumaczyć jedynie bezpośrednim działaniem ouabainy i sugerują ich złożony patomechanizm. Postulowaliśmy to już uprzednio badając topografię i dynamikę zmian

zawartości glikogenu w mózгах szczurów w encefalopatii ouabainowej (Zelman, Pronaszko-Kurczyńska 1975).

Wahania zawartości glikogenu i stosunkowo późny, występujący dopiero w 7 dniu po wstrzyknięciu glikozydu, szczyt przyrostu wielocukru wskazywały na istotne i długotrwałe zaburzenia metabolizmu glukozy w przeciwieństwie do krótkotrwałych i odwracalnych zmian strukturalnych. Nasilenie i czas trwania zaburzeń w ukrwieniu mózgu po podaniu szczurom ouabainy wskazują na istotny udział niedokrwienia i niedotlenienia w kształtowaniu stwierdzonych uprzednio zmian.

И. Б. Зельман, А. Пронашко-Курчынська

НАРУШЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В МОЗГЕ КРЫС
ПРИ ОСТРОЙ ОУАБАИНОВОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

С помощью бензидинового метода исследовали микроциркуляцию в мозге крыс, которым вводили по 0,001 мг ouabaina непосредственно в мозг. Время переживания экспериментальных животных составляло от 5 минут и до 120 часов.

Было обнаружено, что ouabain, введенный непосредственно в мозг, вызывает существенные и длительные нарушения мозговой микроциркуляции, прежде всего в коре полушарий и извилинах гиппокампа. После кратковременной гиперемии доминировали признаки оскуднения капиллярной сети и нарастающий венозный застой. Особого внимания заслуживают пятнистые и слоистые участки малокровия, появляющиеся в начале эксперимента и удерживающиеся до конца наблюдения. Наличие этих участков совпадает с областями самых значительных структурных изменений и является результатом непосредственного воздействия глюкозида на ткань, длительность же и общий характер нарушений указывают на нарушения в саморегуляции мозговой циркуляции. Обнаруженные нарушения микроциркуляции ведут к ишемии и гипоксии ткани, что имеет существенное значение в развитии метаболических нарушений, наблюдаемых ранее в таких же экспериментальных условиях.

I. B. Zelman, A. Pronaszko-Kurczyńska

MICROCIRCULATION DISORDERS IN RAT BRAIN IN ACUTE OUABAIN ENCEPHALOPATHY

Summary

Benzidine method was applied to investigate the microcirculation in rats injected intracerebrally with ouabaine (0.001 mg). Control rats were injected with saline. Survival time of experimental and control animals lasted from 5 min. to 120 hours.

It was demonstrated that ouabaine injected intracerebrally causes essential and long-lasting disturbances in cerebral microcirculation, mainly in the cerebral cortex and in hippocampal gyri. After short period of hyperemia, the signs of poor blood supply and increasing stasis become dominant. Of special interest are focal and laminar areas of ischemia appearing almost immediately after

ouabaine injection and persisting throughout all the experimental period. Localization of focal and laminar ischemia corresponds to brain areas exhibiting most severe morphological changes being a result of direct glycoside action on the nerve tissue. The intensity and extent of long-lasting circulatory abnormalities suggest some disorders in cerebral flow autoregulation. The disturbances in microcirculation can lead to ischemia and hypoxia of cerebral tissue which altogether are subsequently the cause of metabolic changes observed previously in identical experimental conditions.

PIŚMIENICTWO

1. Baldy-Moulinier M., Humeau C.: Electron microscopic study of ischemic and histotoxic cerebral hypoxia. Correlation of ultrastructural changes and cerebral blood flow. W. „Pathology of cerebral microcirculation”. Ed. Cervos-Navarro, Walter de Gruyter, New York, 1974.
2. Bignami A., Palladini E.: Subacute spongiform encephalopathy. An experimental study. Proc. V Intern. Congr. Neuropath. Excerpta Med. Found., Amsterdam, 1966a.
3. Bignami A., Palladini E.: Experimentally produced status spongiosus and continuous pseudorhythmic discharges with a membrane ATPase inhibitor in the rat., Nature, 1966b, 209, 413—414.
4. Cornog J., Gonatas N., Feierman J.: Effects of intracerebral injection of ouabaine on the fine structure of rat cerebral cortex. Amer. J. Pathol., 1967, 51, 573—590.
5. Friedman S. M., Friedman C. L.: The action of ouabain on the smooth muscle cells of the rat tail artery. Proc. of the Society for Exp. Biol. a. Med., 1974, 146, 825—830.
6. Meyer-Ruge W., Gygax P., Iwangoff P., Schieweck Ch., Wolff J.: The significance of pericapillary astroglia for cerebral cortical blood flow and EEG activity. An investigation with ouabain, an inhibitor of Na^+/K^+ ATPase. W „Pathology of cerebral microcirculation” Ed. Cervos-Navarro, Walter de Gruyter, New York, 1974.
7. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. Neuropat. Pol. 1974, 12, 573—581.
8. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Neuropat. Pol. 1975, 13, 241—250.
9. Towfighi J., Gonatas N. K.: Effects of intracerebral injection of ouabain in adult and developing rats. Laboratory Investig. 1973, 28, 170—180.
10. Zelman I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po domózgowym wstrzyknięciu ouabainy. Neuropat. Pol. 1972, 10, 423—432.
11. Zelman I. B., Szumańska G.: Zmiany histochemiczne w mózgu szczura w encefalopatii ouabainowej. Neuropat. Pol. 1973, 11, 441—453.

12. Zelman I. B., Pronaszko-Kurczyńska A.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu szczura w encefalopatii ouabainowej. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 21—31.
13. Zelman I. B., Pronaszko-Kurczyńska A., Szumańska G.: Glycogen content and topography in rat brain in experimental ouabain encephalopathy. *Proc. of VIIth Intern. Congr. of Neuropath.* Ed. St. Koernyey, St. Tariska, G. Gosztanyi. *Excerpta Med.* Amsterdam and Akademiai Kiado-Budapest, 1975, V. 2.

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

DANUTA MARKIEWICZ, DANUTA OSTROWSKA

ZMIANY PODRGAWKOWE W MÓZGU MYSZY Z PADACZKĄ AUDIOGENNĄ *

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie
Kierownik Zakładu: doc. dr hab. J. Dymecki

Interpretacja zmian morfologicznych stwierdzanych w mózgu chorych na padaczkę nie jest łatwa. W pierwszym rzędzie należy różnicować pomiędzy pierwotnym uszkodzeniem, istniejącym przed wystąpieniem napadów i uszkodzeniem wtórnym, stanowiącym ich następstwo. Konieczne jest również wyłączenie zmian zależnych od toksycznego wpływu leków przeciwpadaczkowych, urazów czaszki, schorzeń innych narządów itp. Przykład wspomnianych wyżej trudności stanowi kontrowersyjna ocena uszkodzenia rogu Amona i mózdzku (Dam 1972; Earle i wsp. 1953; Escobar, Nieto 1973; Haberland 1972; Karkos 1972; Meyer i wsp. 1955; Scholz 1951; Tarnowska-Dziduszko 1975).

Podjęcie badań nad zmianami ponapadowymi u myszy z genetycznie uwarunkowaną zdolnością reagowania uogólnionymi drgawkami na bodźce dźwiękowe wydawało się uzasadnione, ponieważ w tym modelu odpada konieczność eliminacji uszkodzeń spowodowanych działaniem czynników drgawkorodnych, używanych w innego typu doświadczeniach, jak prąd elektryczny, substancje chemiczne działające ogólnie i miejscowo, różnego rodzaju urazy, itp. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że napady drgawkowe u myszy z padaczką audiogenną są klinicznie podobne do napadów padaczkowych typu *grand mal*, występujących u ludzi.

MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone na myszach obu płci obciążonych genetycznie padaczką audiogenną, które sprowadzono z Instytutu Neuropatologii i Psychiatrii w Bukareszcie i rozmnażano we własnej hodowli.

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.4.1.3.

Materiał obejmował 86 mózgów myszy (58 doświadczalnych i 28 kontrolnych). U myszy doświadczalnych badania rozpoczynano w 5 tygodniu życia. Napady drgawkowe prowokowano dźwiękiem dzwonka elektrycznego, nie częściej niż jeden napad dziennie. U każdej myszy wywołano po 40 napadów uogólnionych drgawek.

Zwierzęta podzielono na następujące grupy w zależności od czasu przeżycia po napadach: Grupa I — 20 myszy, które usypiano bezpośrednio po ostatnim napadzie; Grupa II — 20 myszy, które przeżyły jeden miesiąc po zakończeniu doświadczenia; Grupa III — 18 myszy z 3 miesięcznym przeżyciem po ostatnim z serii 40 napadów.

Mózgi myszy doświadczalnych oraz grup kontrolnych (odpowiednio 10, 10 i 8) utrwalano przez perfuzję 7% roztworem formolu lub bromformolem wg metody Zemana i Innesa (1963) w modyfikacji własnej (zamiast aparatu kroplówkowego zastosowano zestaw pozwalający na stałą kontrolę ciśnienia podawanego roztworu). Preparaty parafinowe lub mrożone serii nieciągłej barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu oraz wg metody Heidenhaina, Klüver-Barrery, van Gieson, Bielschowsky'ego, Kanzler-Arendta, Hortegi, Kelemena i Cajala.

WYNIKI

Grupa I. W obrazie mikroskopowym dominowały w ośrodku uogólnione zmiany naczyniowe i naczyniopochodne. Obserwowano obrzęk śródbłonek niekiedy ze znacznym zwężeniem światła naczyń, obecność pojedynczych drobnokrążłokomórkowych elementów w przydanie i poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych (ryc. 1, 2). W tętnicach i żyłach, szczególnie mniejszego kalibru widoczne było rozluźnienie struktury i zatarcie budowy warstwowej ścian. U niektórych zwierząt występowały krwinkotoki okołonaczyniowe. Obserwowano je najczęściej w przestrzeni podpajęczynówkowej (ryc. 3), rzadziej śródmiaższowo. W świetle komór stwierdzano również występowanie krwawień (ryc. 4). W istocie białej półkul mózgu i mózdzku stwierdzano rozluźnienie utkania o charakterze rozlanym. Rozplem gleju komórkowego był dyskretny. Nie stwierdzono natomiast zagęszczenia pilśni glejowej. Wyraźniejszy rozplem komórek glejowych występował w warstwie drobinowej kory mózgu, na pograniczu korowo-podkorowym i w głębszych warstwach zakrętu obręczy (ryc. 5) oraz w istocie białej zawoju hipokampa (ryc. 6). Obserwowano zmiany przerostowe astrocytów, rzadziej cechy ich zwyrodnienia. Mikroglej pałeczkowaty występował pojedynczo w górnych warstwach kory nowej, w istocie białej zawoju hipokampa i niekiedy w zwojach podstawy. Uszkodzenie komórek nerwowych było nie-

wielkie. Rozsiane ubytki neuronów obserwowano niemal wyłącznie w korze nowej, bardziej nasilone w III i V warstwie. U niektórych zwierząt widoczne było ponadto odcinkowe przerzedzenie komórek Purkiniego w mózdzku na dnie rowków.

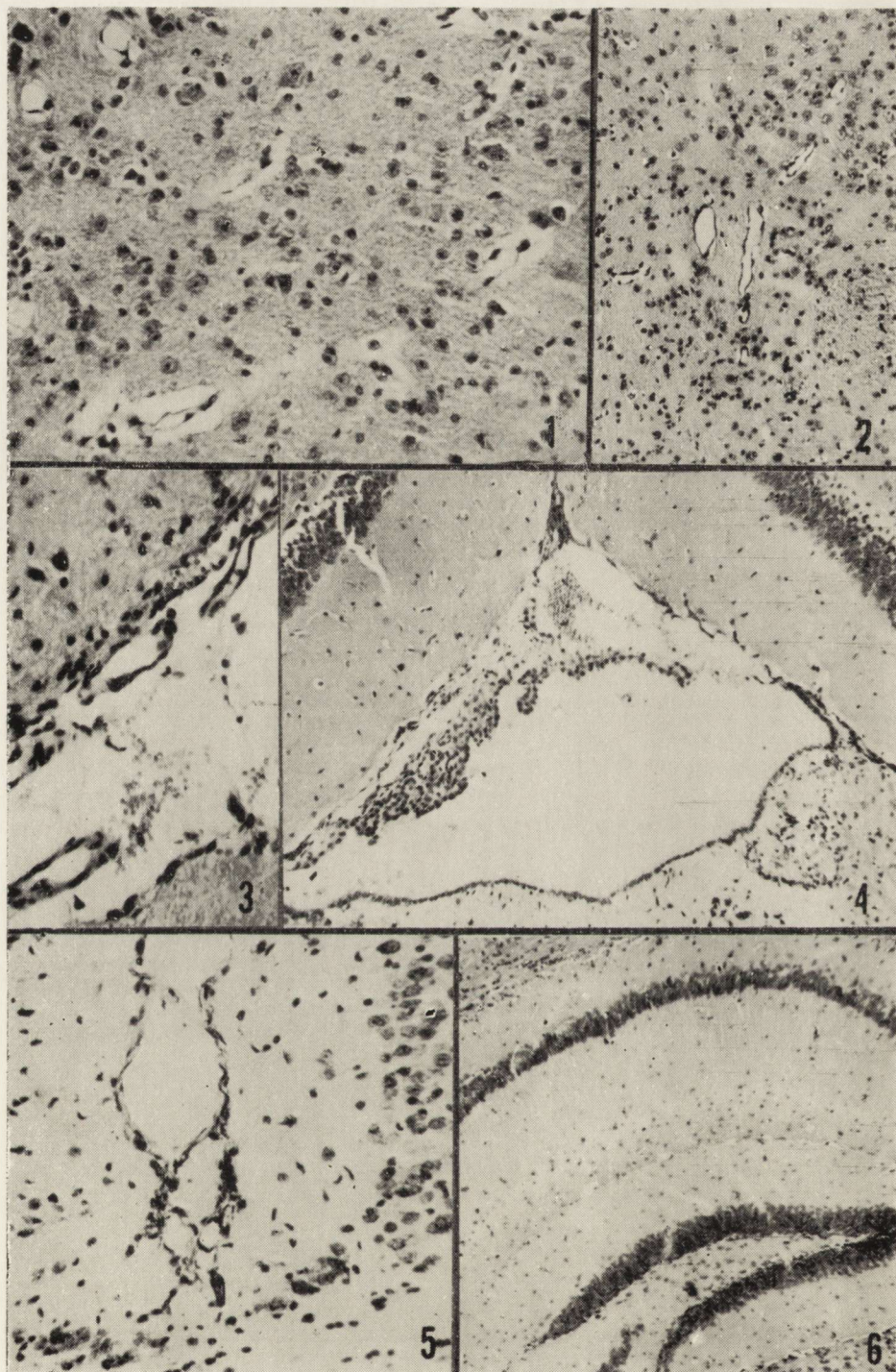
Grupa II i III (myszy, które przeżyły 1 i 3 miesiące po ostatnim z serii 40 napadów drgawkowych). Obraz morfologiczny mózgow myszy w obu grupach doświadczalnych był podobny, a pod względem struktury i topografii nie różnił się zasadniczo od zmian opisanych w grupie zwierząt dekapitowanych bezpośrednio po napadach. Różnice dotyczyły jedynie „wieku” zmian i nasilenia. Uszkodzenie naczyń miało uogólniony charakter. Ściany naczyń oponowych i śródmózgowych wykazywały znaczne pogrubienie, zwłaszcza przydanki.

W mniejszych tętnicach zmianom tym towarzyszyło wyraźne zwężenie światła. W poszerzonych przestrzeniach okołonaczyniowych obserwowano niekiedy makrofagi wypełnione ziarnami hemosydem (ryc. 7). Uszkodzenie tkanki nerwowej widoczne było w postaci rozlanego rozluźnienia podłoża tkankowego w istocie białej mózgu, które u niektórych myszy przybierało w okolicy przykomorowej formę martwicy gąbczastej (ryc. 8). Obserwowano również występowanie zgąbceń okołonaczyniowych.

Odczyn astrogleju w impregnacji metodą Cajala był dość intensywny, szczególnie w sąsiedztwie naczyń (ryc. 9). Rozplem gleju komórkowego był nieznaczny, wyraźniejsze pomnożenie komórek glejowych stwierdzono podoponowo w mózgu i w istocie białej zawoju hipokampa (ryc. 10). Rozplem mikrogleju był bardzo skąpy. Nieliczne pałeczki widoczne były w warstwie drobinowej kory nowej, istocie szarej pnia i istocie białej zawoju hipokampa (ryc. 11, 12). Uszkodzenie osłonek mielinowych było wyraźne w istocie białej mózgu, a zwłaszcza w spoidle wielkim i torebce wewnętrznej oraz w istocie białej półkul mózdzku. Miało ono charakter rozlanego spłowienia z ogniskową demielinizacją. Rozpad mieliny był widoczny w polach zgąbceń okołokomorowych i wokół naczyń. W polach demielinizacji stwierdzano przerzedzenie i rozpad aksonów. Ubytki neuronów, podobnie jak w grupie I, były stosunkowo niewielkie i miały charakter rozsiany z predylekcją do III i V warstwy kory oraz komórek Purkiniego w mózdzku.

OMÓWIENIE

Podsumowując wynik badania neuropatologicznego można stwierdzić, że we wszystkich trzech grupach doświadczalnych obserwowane zmiany wykazywały podobieństwo pod względem struktury i topografii. Uchwy-



ne różnice miały wyłącznie charakter ilościowy i dotyczyły „dojrzałości” tych zmian.

U zwierząt perfundowanych bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia stwierdzono rozlane zmiany obrzękowe z obecnością świeżych okołonaczyniowych krwinkotoków. U myszy, które przeżyły 1 lub 3 miesiące po napadach obserwowano w znacznej liczbie przypadków naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej w postaci rozlanego zgębczenia podłoża tkankowego w istocie białej mózgu i mózdzku z obecnością okołonaczyniowo zlokalizowanych makrofagów z hemosyderyną. U pozostałych myszy w obu wymienionych grupach widoczne było najczęściej dyskretne rozluźnienie istoty białej z nasileniem tych zmian wokół naczyń i przykomorowo. We wszystkich trzech grupach doświadczalnych uszkodzenie istoty szarej było nieznaczne. Obserwowano niewielkie, rozsiane ubytki neuronów w korze nowej z nasileniem zmian w warstwie III i V kory oraz odcinkowe przerzedzenie w warstwie komórek Purkiniego przeważnie na dnie rowków półkul mózdzku.

W rozważaniach dotyczących etiopatogenezy zmian występujących w mózgu w przebiegu padaczki podnosi się w pierwszym rzędzie udział czynnika anoksyjnego (Bednar 1955; Dowżenko 1966; Fowler 1957; Lovenberg, Lossman 1943; Meldrum, Brierley 1973). Dąbska (1960) podkreśla nawet podobieństwo tych zmian do uszkodzenia mózgu występującego w przebiegu *cardiac arrest*. W zestawieniu z danymi z piśmien-

Ryc. 1. Grupa I. Poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych. W przydanie niewielkie skupienia elementów histiocytarnych. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 1. Group I. Widening of perivascular space. Small accumulations of histiocytes in adventitia. HE. × 200.

Ryc. 2. Grupa kontrolna. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 2. Control group. HE. × 100.

Ryc. 3. Grupa I. Krwinkotoki w przestrzeni podpajęczynówkowej. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Group I. Small hemorrhages in subarachnoidal space. HE. × 200.

Ryc. 4. Grupa I. Świeże wybroczyny w świetle komór bocznych. Podwyższiółkowo znaczne rozluźnienie utkania. HE. Pow. 60 ×.

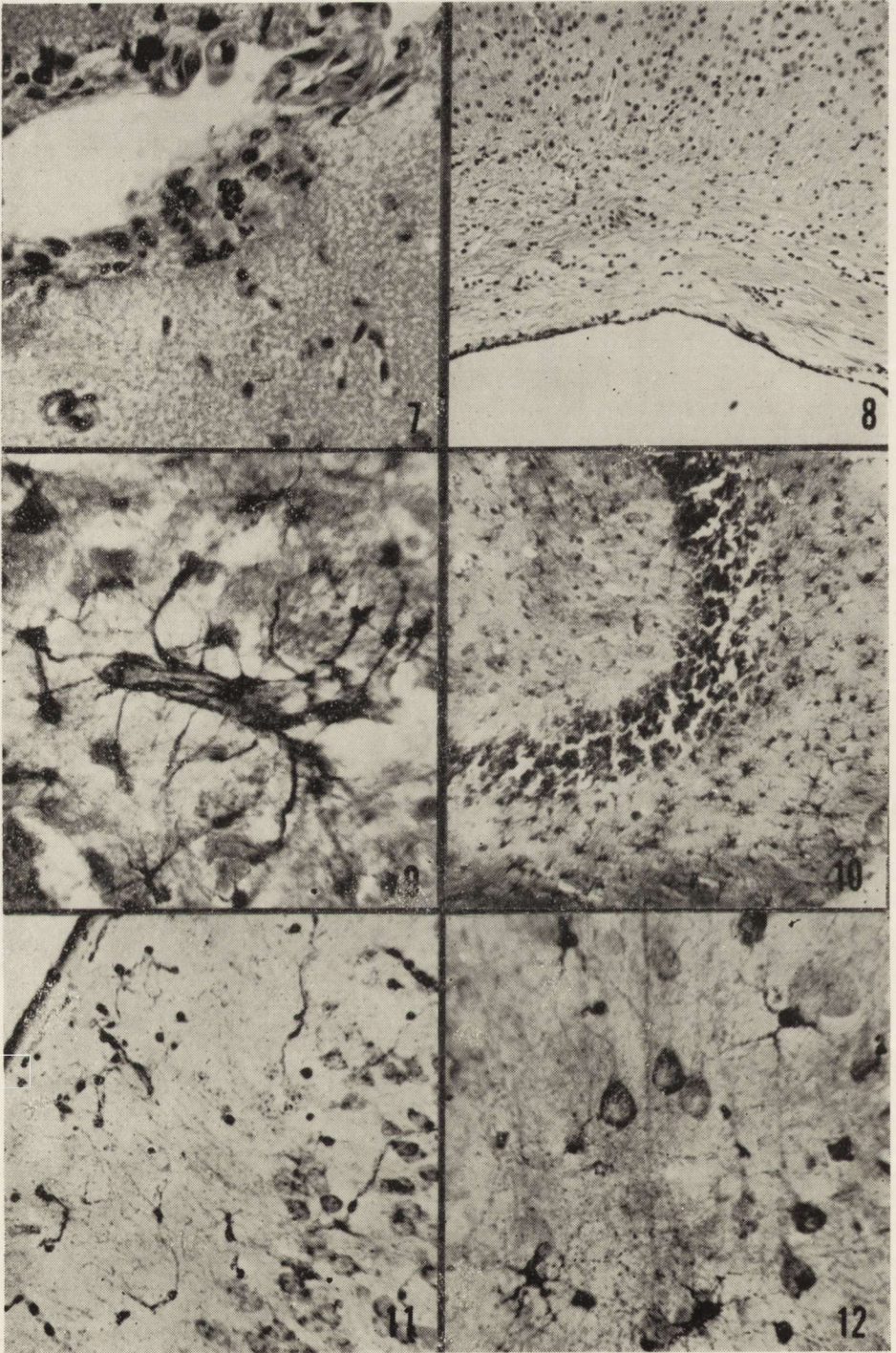
Fig. 4. Group I. Fresh hemorrhages in the lumen of lateral ventricles. Marked loosening of subependymal tissue. HE. × 60.

Ryc. 5. Grupa I. Zagęszczenie komórek gleju w warstwie brzeżnej zakrętu obręczy i komórki histiocytarne w przydanie naczyń oponowych. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×.

Fig. 5. Group I. Augmentation of glial cells in the marginal layer of gyrus cinguli. Histiocytes present in the adventitia of meningeal vessels. Cresyl violet. × 200.

Ryc. 6. Grupa I. Zagęszczenie komórek gleju w istocie białej hipokampa. HE. Pow. 60 ×.

Fig. 6. Group I. Augmentation of glial cells in the white matter of hippocampus. HE. × 60.



nictwa w przebadanym materiale zaskakująco skąpe było uszkodzenie neuronów. Fakt ten jest trudny do wyjaśnienia, jeżeli uwzględni się powszechnie znaną wrażliwość tych elementów tkanki nerwowej na niedobór tlenu. Z badań doświadczalnych Domańskiej-Janik (1972) i Kałuścińskiego (1972) wynika, że neurony i bariera krew-mózg u szczurów są wyjątkowo mało wrażliwe na uszkadzający wpływ czynnika anoksyjnego. Wydaje się, że szczególna, właściwa gatunkowi zwierząt, odporność na niedotlenienie, jak również wyjątkowo obfite unaczynienie mózgu gryzoni (Zeman, Innes 1963) mogłyby przynajmniej częściowo tłumaczyć skąpe zmiany neuronalne u myszy z padaczką audiogenną.

Uogólnione zmiany naczyniowe i naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej dominujące w obrazie mikroskopowym można odnieść prawdopodobnie do ciężkich zaburzeń hemodynamicznych towarzyszących napadom uogólnionych drgawek. Obecność tych zaburzeń ujawniają wyniki badań patofizjologicznych (Kreindler 1965; Meldrum, Horton 1973, Meldrum i wsp. 1973). Występujący w pierwszej fazie napadu padaczkowego duży, a przede wszystkim nagły wzrost ciśnienia krwi może doprowadzić do mechanicznego uszkodzenia ściany naczyń. Przemawiałoby za tym występowanie krwinkotoków i obecność hemosyde-ryny w mózgu zwierząt doświadczalnych. Jeżeli nawet szkodliwość

Ryc. 7. Grupa II. Pogrubienie ścian naczyń oponowych i śródmiaższowych ze zwiększeniem światła. Makrofagi z hemosyde-ryną w przestrzeni podoponowej. HE. Pow. 400 X.

Fig. 7. Group II. Thickening of the walls of meningeal and cerebral vessels associated with narrowing of their lumina. Macrophages loaded with hemosiderin in submeningeal space. HE. X 400.

Ryc. 8. Grupa II. Rozluźnienie struktury spoidła wielkiego i istoty białej. Fiolet krezyłu. Pow. 100 X.

Fig. 8. Group II. Loosening of the structure of corpus callosum and of white matter. Cresyl violet. X 100.

Ryc. 9. Grupa II. Zagęszczenie astrocytów wokół naczyń w zwojach podstawy. Cajal. Pow. 400 X.

Fig. 9. Group II. Increased number of astrocytes around the vessels in basal ganglia. Cajal. X 400.

Ryc. 10. Grupa II. Zagęszczenie astrogleju w hipokampie. Cajal. Pow. 100 X.

Fig. 10. Group II. Augmentation of astroglial cells in hippocampus. Cajal. X 100.

Ryc. 11. Grupa III. Zmiany proliferacyjno-postępowe mikrogleju w warstwie brzeżnej kory nowej. Hortega. Pow. 200 X.

Fig. 11. Group III. Proliferative and progressive changes of microglia in the marginal layer of neocortex. Hortega. X 200.

Ryc. 12. Grupa III. Przerosły mikroglej na pograniczu warstwy komórkowej i istoty białej hipokampa. Hortega. Pow. 400 X.

Fig. 12. Group III. Progressively changed microglia between cellular layer and white matter of hippocampus. Hortega. X 400.

gwałtownego wzrostu ciśnienia krwi na zachowanie całości struktury anatomicznej ściany naczyń potraktować mniej drastycznie, to przynajmniej należałoby wziąć pod uwagę możliwość naruszenia ciągłości błony wewnętrznej i rozluźnienia ścisłych połączeń między śródbłonkami, których znaczenie dla prawidłowej czynności bariery krew-mózg jest znane (Gabryel 1973). W kolejnej fazie napadu, po wzroście ciśnienia krwi zarówno w układzie tętniczym jak i żylnym, dochodzi następnie do obniżenia ciśnienia tętniczego z zastojem w układzie żylnym. Równoczesne pojawienie się zaburzeń autoregulacji z powodu porażenia układu wegetatywnego (Kreindler 1965) pogłębia zaburzenia krążenia krwi w mózgu. Na skutek zaburzeń hemodynamicznych, a głównie z powodu zastoiny żylny rozwijają się zaburzenia metabolizmu z zakwaszeniem tkanki, przesunięciem równowagi elektrolitowej, hipoglikemią itd., które stwarzają warunki do wystąpienia obrzęku. Z morfologicznego punktu widzenia przemawiałyby za tym w naszym materiale pobudzone śródbłonki naczyń, poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej z obecnością bogatobiałkowego płynu oraz rozlane rozluźnienie podłoża tkankowego ze zgęszczeniami okołonaczyniowymi i w okolicy przykomorowej. Za rozwojem zmian obrzękowych i obrzękowopochodnym uszkodzeniem tkanki nerwowej u zwierząt po napadach drgawkowych przemawiają również wyniki badań histochemicznych (Iwanowski, Wasilewski, 1969) oraz badania w mikroskopie elektronowym (de Robertis i wsp. 1969).

Zespół zmian neuropatologicznych w mózgu myszy po doświadczalnie wywołanych napadach padaczki audiogennej różni się od znanych z piśmiennictwa opisów podrgawkowych uszkodzeń mózgu u ludzi i innych zwierząt doświadczalnych wyjątkowo skąpym uszkodzeniem komórek nerwowych, brakiem predylekcji topograficznej i nasileniem naczyniopochodnych zmian w tkance nerwowej. Różnice te, poza podnoszonymi wcześniej odrębnościami gatunkowej reakcji tkanki nerwowej, mogą być również spowodowane zbyt małą częstotliwością napadów w przeprowadzonym doświadczeniu. Stąd wydaje się właściwe podjęcie dalszych badań dla uzyskania większej liczby informacji dotyczących reakcji mózgu myszy na uszkadzający wpływ napadów uogólnionych drgawek, naśladujących napady gromadne u człowieka.

Д. Маркевич, Д. Островска

ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГУ МЫШИ ПОСЛЕ ПРИПАДКОВ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Резюме

Исследования касались морфологических изменений в мозгу мыши, обладающей генетически обусловленной способностью реагировать припадками обобщенных судорог на звуковые раздражители.

Материал, включающий 86 мышей (58 опытных и 28 контрольных), разделили на группы в зависимости от времени переживания после серии из 40 единичных аудиогенных припадков, вызывавшихся один раз в день звуком электрического звонка. Перфузию делали сразу после последнего припадка или через один или три месяца.

В морфологии преобладали признаки сосудопроизводного повреждения нервной ткани с исключительно слабым повреждением нейронов и отсутствием топографического предпочтения. Различия в отдельных группах относились к „возрасту” и интенсивности изменений. Мозг животных, умерщвленных сразу после припадков, обнаруживал ранние отечные изменения и свежие кровоизлияния в околососудистом пространстве. В мозгу животных с более длительным временем переживания на первый план выдвигались обобщенные сосудистые изменения, присутствие макрофагов, заполненных гемосидеринем, и сосудопроизводное повреждение нервной ткани с расплывчатым разрыхлением уплотнения и околососудистыми губчатыми образованиями.

В обсуждении, касающемся этиопатогенеза изменений, авторы подчеркивают участие гемодинамических нарушений в формировании картины морфологического повреждения мозга.

D. Markiewicz, D. Ostrowska

THE CHANGES IN THE MOUSE BRAIN EVOKED BY THE AUDIOGENIC EPILEPTIC FITS

Summary

Investigations concerned the morphological changes in the brain of mice genetically conditioned to react by generalized epileptic fits to audiogenic stimuli.

Material consisting of 86 mice (58 experimental, 28 control) was divided in groups according to the time of survival after the series of 40 epileptic audiogenic fits evoked one per day by the sound of electric bell. Animals were sacrificed by perfusion either immediately or after one or three months following the last fit. Morphologically revealed damage of nervous tissue of vasogenic origin characterized by exceptionally scarce damage to neurons and by the lack of topographic preference. The differences in particular groups concerned the age and the intensity of the alterations. The brains of the animals sacrificed immediately after the fits exhibited early edematous changes and fresh extravasations in perivascular spaces. In brains of mice kept for longer survival the main alterations were generalized vascular changes, the presence of macrophages filled with hemosiderin and vasogenic damage to nervous tissue such as diffuse loosening of tissue and perivascular spongiosis.

In discussion of etiopathogenesis of the lesions, the authors point at the participation of hemodynamic disturbances in the development of morphological exponents of brain damage.

PIŚMIENNICTWO

1. Bednar B.: Pulmogenni pseudolaminari destructe kury mozku hyperpyretických detí. Cas. lek. ces., 1955, 94, 1162—6.

2. Dam M.: The density and ultrastructure of the Purkinje cells following diphenylhydantoin treatment in animals and men. *Acta Neurol. Scand.*, suppl. 49, 1972, 48, 1—65.
3. Dąbska M.: Zagadnienie zmian podrgawkowych w padaczce, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1968, II(XVIII), 275—280.
4. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym, *Neuropat. Pol.*, 1972, X, 17—43.
5. Dowżenko A.: Podłoże patomorfologiczne i patogeneza postępujących zmian psychicznych w padaczce. Współczesne zagadnienia niedorozwoju umysłowego, PZWL, Warszawa, 1966.
6. Earle K. M., Baldwin M., Penfield W.: Incisural sclerosis and temporal lobe seizures produced by hippocampal herniation at birth, *AMA Arch. Neurol. Psychiat.* 1953, 69, 27—42.
7. Escobar A., Nieto D.: The significance of cerebral lesions in the genesis of convulsive seizures. An anatomical study, X Intern. Congress of Neurology, Barcelona 8—15.IX.1973, *Exc. Med.* 296, Poz. 396.
8. Fowler M.: Brain damage after febrile convulsions. *Arch. Dis. Child.* 1957, 32, 67—76.
9. Gabryel P.: Bariera krew-mózg, struktura i funkcja. *Patol. Pol.* 1973, XXIV, 2, 217—235.
10. Haberland C.: Cerebellar degeneration with clinical manifestation in chronic epileptic patients, *Psychiat. Neurol.* 1962, 143, 29.
11. Iwanowski L., Wasilewski R.: Some observations on succinic and lactic dehydrogenases activity in rabbit cerebral cortex after the seizures provoked by cardiazol. Histochemical study with microdensitometric evaluation, Symposium, Bernburg, X. 1969.
12. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów, *Neuropat. Pol.* 1972, X, 45—64.
13. Karkos J.: Obraz kliniczny, patomorfologia i patogeneza uszkodzenia mózdku w padaczce przewlekłej, *Pol. Tyg. Lek.*, 1972, XXVII, 601—603.
14. Karkos J.: Mechanizm działania ubocznego i toksycznego leków przeciwpadaczkowych, *Pol. Tyg. Lek.* 1972, 27, 1411—1415.
15. Kreindler A.: *Experimental epilepsy*, Elsevier, Amsterdam — London — New York, 1965, 137.
16. Lowenberg K., Lossman R. T.: Atrophy of the brain following puerperal eclampsia. *Amer. J. Path.* 1943, 19, 697—703.
17. Meldrum B. S., Horton R. W.: Physiology of status epilepticus in primates. *Arch. Neurol.* 1973, 28, 1—9.
18. Meldrum B. S., Brierley J. B.: Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events, *Arch. Neurol.* 1973, 28, 10—17.
19. Meldrum B. S., Vigouroux R. A., Brierley J. B.: Systemic factors and epileptic brain damage, *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 82—87.
20. Meyer A., Beck E., Shepherd M.: Unusually severe lesions in the brain following status epilepticus, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1955, 18, 24—33.

21. de Robertis E., Alberci M., de Lorez Arnaiz G. R.: Astroglial swelling and phosphohydrolases in cerebral cortex of metrazol convulsant rats. *Brain Res.* 1969, 12, 461—466.
22. Scholz W.: Die Krampfschädigungen des Gehirns. Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie, Springer, Berlin, 1951.
23. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu padaczki. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 31—39.
24. Zeman W., Innes J. R. M.: Craigie's neuroanatomy of the rat, Academic Press, New York London, 1963.

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

MARIA DĄBSKA, LUBOMIRA DYDYK, MARIA LIEBHART,
IRENEUSZ ROSZKOWSKI, JÓZEF SZAMBORSKI

ZMIANY W MÓZGACH NOWORODKÓW W NASTĘPSTWIE USZKODZENIA ZESPOŁU PŁÓD-ŁOŻYSKO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik: doc. dr med. M. Dąbska

Zakład Patomorfologii Rozrodu

Kierownik: doc. dr med. J. Szamborski

II Klinika Położnictwa i Chorób Kobiecych AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. I. Roszkowski

Obserwacje kliniczne sugerują, że uszkadzający wpływ przewlekłej asfiksji (niedotlenienia z hyperkapnią) na płody w ostatnim trymestrze ciąży jest w wielu przypadkach odpowiedzialny za zły stan noworodków (Fanconi i Wallgren 1963). Badania neuropatologiczne wydają się wskazywać, że uszkodzenia układu nerwowego, a w szczególności pnia mózgu (Norman 1972, Nyka 1974) odgrywają istotną rolę w złej adaptacji tych dzieci do samodzielnego życia. Praca niniejsza jest próbą przeanalizowania tego zagadnienia w oparciu o analizę kliniczno-morfologiczną wybranych przypadków.

MATERIAŁ I METODY

Opracowanie dotyczy 6 noworodków w wieku rozwojowym 26—38 tygodni życia płodowego, zmarłych w czasie porodu, w kilka godzin lub w kilka dni po porodzie. Do badania neuropatologicznego pobrano reprezentatywne skrawki z półkul mózgu i mózdzku oraz cztery przekroje przez pień mózgu na poziomie śródmózgowia, mostu, górnej i dolnej opuszki. Materiał zatapiany w parafinie barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu i met. Heidenhaina. Przeprowadzono również badanie mikroskopowe łożyska i narządów wewnętrznych.

WYNIKI

Przyp. I. J. S. „C” (19/73). Matka lat 24, ciąża I. W 24 tygodniu ciąży stwierdzono nadciśnienie i obrzęki kończyn. W 32 tygodniu została przyjęta do kliniki, gdzie stwierdzono: RR 170/100, białkomocz, w ko-

lejnych kilku badaniach wahający się od 90—290 mg%, we krwi spadek białka całkowitego do 5,8 mg%, gamma-globulin do 9,6 mg%, nieprawidłową krzywą cukrową. Rozpoznano zespół wątrobowo-nerkowy, zatrucie ciążowe i cechy utajonej cukrzycy. Spadek estriolu w 34 tygodniu ciąży z 4,2 do 3,2 mg% oraz niski poziom beta-lipoproteidów wskazywał na przewlekłą niewydolność łożyska. Ze względu na narastające zmiany w układzie nerkowym matki oraz bezpośrednie zagrożenie płodu wyrażające się wahaniami tętna, wykonano cięcie cesarskie.

Noworodek wagi 800 g, wzrostu 30 cm, urodzony w stanie ciężkim, zmarł w godzinę po urodzeniu.

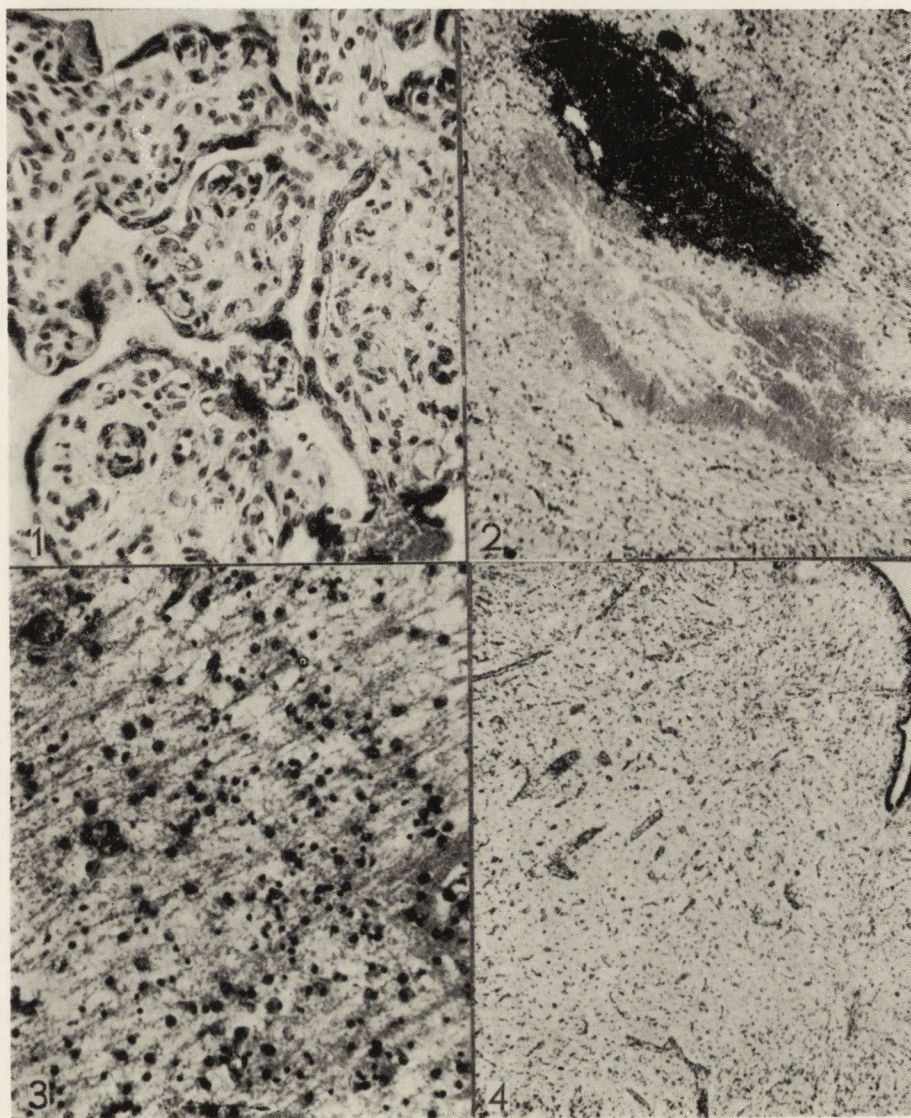
Badanie łożyska wykazało wiek rozwojowy 34—36 tyg. życia płodowego, cechy nierównomiernego dojrzewania, zarastania tętnic kosmków, ponadto obecność licznych mikrozawałów białych (ryc. 1).

Na sekcji stwierdzono ogólną hypotrofię noworodka, ponadto przekrwienie narządów wewnętrznych. Badaniem mikroskopowym ustalono dojrzałość narządów właściwą dla 34 tygodnia ciąży.

Mózg był nieproporcjonalnie mały w stosunku do stopnia zróżnicowania zawojów kory mózgu i mózdzku. Na przekrojach stwierdzono wynacznienia okołokomorowe oraz obniżenie spoistości otaczającej istoty białej. Badanie mikroskopowe pozwoliło na określenie wieku rozwojowego odpowiadającego 34 tyg. ciąży. Zarówno w półkulach mózgu jak w pniu i mózdzku stwierdzono rozległe uszkodzenia. W półkulach widoczne były krwotoki do gniazd macierzy okołokomorowej, a wokół nich w istocie białej mniejsze wynacznienia do tkanki, wykazującej ogniskowo cechy martwicy niepełnej (ryc. 2), ogniskowo leukomalację (ryc. 3). W obrębie i wokół pół martwicy stwierdzono przerost astrogleju i mikrogleju z obecnością makrofagów. W paśmie kory stwierdzono przekrwienie, uszkodzenia i ubytki komórkowe, zmiany były tu jednak mniej nasilone niż w istocie białej. W obrębie pnia mózgu i mózdzku dominującym objawem było pomnożenie sieci naczyń, głównie włosowatych i ich maksymalne wypełnienie krwią. Struktury komórkowe były wyraźnie uszkodzone, ubytki neuronów były największe w rdzeniu przedłużonym (ryc. 4).

Dane dotyczące 5 dalszych przypadków przedstawia tabela 1. Ich analiza pozwala na podkreślenie następujących spostrzeżeń:

Obserwacje kliniczne: Cztery spośród przedstawionych przypadków były wcześniakami, jeden noworodkiem donoszonym. We wszystkich przypadkach dane kliniczne sugerowały działanie czynników, które mogły przyczynić się do uszkodzenia płodu i wystąpienia niewczesnego bądź przedwczesnego porodu. We wszystkich przypadkach stwierdzo-



Ryc. 1. Kosmki łożyska. 34—36 tydz. ciąży. Cechy nierównomiernego dojrzewania kosmków i zarostania włóściczek. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 1. Placental villi. 34—36 week of gestation. Uneven maturation of villi and obliteration of capillaries. HE. × 200.

Ryc. 2. Krwotek i ognisko martwicy w okolicy okołokomorowej. HE. Pow. 60 ×.

Fig. 2. Hemorrhagic and necrotic foci in periventricular region. HE. × 60.

Ryc. 3. Rozmiękanie w okołokomorowej istocie białej. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 3. Periventricular leukomalacia. HE. × 100.

Ryc. 4. Rozplem sieci naczyniowej, przekrwienie i ubytki neuronalne w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×.

Fig. 4. Proliferation of capillaries, hyperemia and loss of neurons in medulla oblongata. Cresyl violet. × 60.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczno-

Lp.	Nr przyp.	Wiek rozwo- jowy tygodnie	Patologia ciąży	Poród	Noworodek
2	T,,C'' 82/74	26	Anemia, stan przedcukrzycowy	Niewczesny, samo- istny	900g/33cm martwo urodzone
3	B,,S'' 63/72	26	Zapalenie odmied- niczkowe nerek, krwawienie w II trym. ciąży	Niewczesny, samo- istny	830/34 APGAR 3, przeżycie 10 godz.
4	Z,,S'' 78/72	30	Niedobór Fe, przed- wczesne odklejanie łożyska (II i III trymestr)	Niewczesny, samo- istny. Owinięcie pę- powiny wokół szyi	960/36 APGAR 3—4—6 przeżycie 5 godz.
5	O,,S'' 65/72	32	Niedożywienie, nie- dobór białkowy	Poród przedwczes- ny. Położenie mied- nicowe (pomoc rę- czna)	1440/37 APGAR 6, przeżycie 16 godz.
6	K,,S'' 61/72	38	Zespół nerkowy, anemia, (niedobór Fe)	Poród o czasie	2900/48 APGAR 8 Tetralogia Fallota przeżycie 3 dni

no u matek choroby nerek, anemię, nadciśnienie, zatrucie ciążowe. W przypadku IV ponadto przedwczesne odklejanie łożyska (w II i III trymestrze ciąży). W tym przypadku dodatkowym czynnikiem prowadzącym do niedotlenienia płodu było owinięcie pępowiny wokół szyi. Jeden z noworodków (przyp. II) zmarł w czasie porodu, pozostałe były urodzone w stanie ciężkim.

W przypadku VI u noworodka stwierdzono wadę serca.

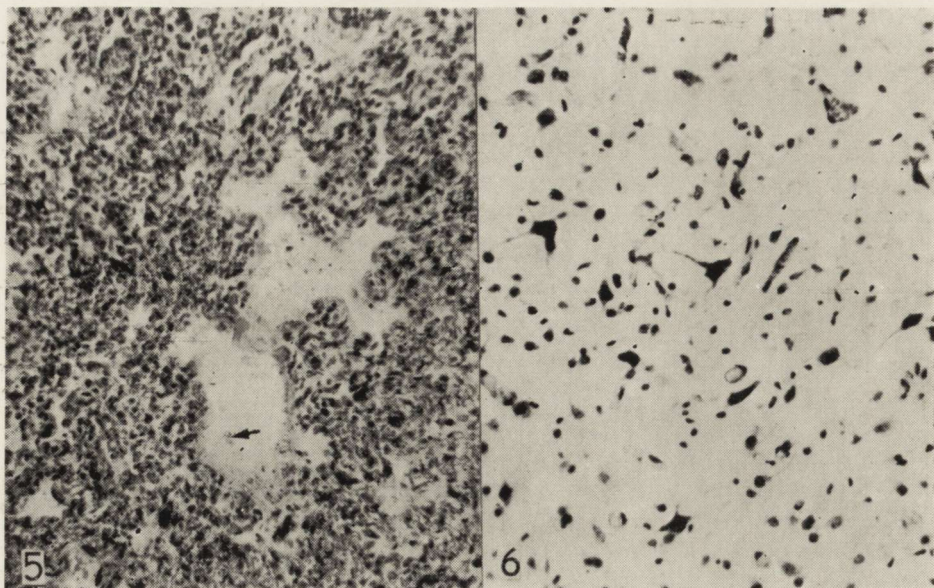
Wyniki badania łożysk i narządów wewnętrznych: We wszystkich przypadkach stwierdzono zmiany w łożyskach. W przypadku II były to objawy zakażenia, we wszystkich cechy przewlekłego uszkodzenia o typie zaburzeń w dojrzewaniu, przedwczesnego starzenia się i wykładniki zaburzeń w krążeniu. W przypadku VI wadliwe dojrzewanie łożyska sugerowało wczesne zaburzenie rozwojowe,

-morfologiczna przypadków

Łożysko	Badanie anatomo-patologiczne	
	Narządy wewnętrzne	Układ nerwowy
Przewlekłe uszkodzenie, zakażenie	Aspiracja wód płodowych, ⁴ odoskrzelowe zapalenie płuc	W pniu mózgu uszkodzenie istoty siateczkowej, oliw dolnych, wzgórków dolnych blaszki czworaczej. W półkulach mózgu i mózdzku obrzęk
Cechy przedwczesnego starzenia łożyska, przekrwienie	W płucach błony szkliste	Krwotok podpajęczynówkowy na podstawie pnia i mózdzku. W pniu rozsiarne uszkodzenia neuronów. W półkulach mózdzku i mózgu zastój i wybroczyny okołokomorowe.
Cechy przedwczesnego starzenia (włóknienie podścieliska, zarastanie naczyń)	Częściowa niedodma płuc, przekrwienie bierne naczyń	Mały krwotok podpajęczynówkowy w tylnej jamie czaszki. W pniu mózgu uszkodzenie neuronów istoty siateczkowej i jąder nerwów czaszkowych.
Zaburzenia dojrzwania i krążenia (pobudzenie trofoblastu, mikrozwąwały)	W płucach błony szkliste, przekrwienie bierne naczyń	Mały krwotok podpajęczynówkowy. W pniu uszkodzenie neuronów istoty siateczkowej i jąder nerwów czaszkowych. W półkulach mózgu i mózdzku przekrwienie, obrzęk
Nierównomierne i wadliwe dojrzwianie	Wada serca. Przekrwienie narządów z wybroczynami. W płucach błony szkliste	Krwotok w tylnej jamie czaszki. Wybroczyny podpajęczynówkowe nad płatem czołowym. W pniu mózgu uszkodzenie neuronów istoty siateczkowej, oliw, n. XII. W półkulach wybroczyny i martwica w istocie białej. Uszkodzenie kory amonalnej

które leżało u podłoża dalszych, stopniowo narastających zmian. W tym samym przypadku noworodek obciążony był wadą serca (tetralogia Fallota). W II przypadku stwierdzono zapalenie płuc jako wyraz zakażenia płodu, poza tym we wszystkich przypadkach stwierdzono zmiany w narządach wewnętrznych będące wyrazem przewlekłego niedotlenienia płodu: aspirację wód płodowych, błony szkliste w płucach (ryc. 5), przekrwienie i wybroczyny.

Wyniki badania neuropatologicznego. W większości przypadków stwierdzono wielogniskowe krwawienia podpajęczynówkowe zlokalizowane przede wszystkim w tylnej jamie czaszki. Tylko w przypadku VI były one obfite, uciskające pień, w pozostałych wynacznienia były niewielkie. Na przekrojach w półkulach mózgu w przypadkach III, V, VI widoczne było przekrwienie i wynacznienia około-



Ryc. 5. Zespół noworodkowy błon szklistych płuc. Duże przekrwienie i niedodma pęcherzyków. HE. Pow. 100 \times .

Fig. 5. Hyaline membrane syndrome in a newborn. Hyperemia and atelectasis of pulmonary alveoli. HE. \times 100.

Ryc. 6. Uszkodzenie neuronów istoty siateczkowej w pniu mózgu. Fiolet kryzylu. Pow. 200 \times .

Fig. 6. Neuronal lesions in reticular formation of the brain stem. Cresyl violet. \times 200.

komorowe, a w przypadku VI ponadto zmiany martwicze w okołokomorowej istocie białej. W trzech przypadkach stwierdzono obrzęk w półkulach mózgu, w dwu był on obecny również w półkulach mózdzku. W przypadku VI, u noworodka donoszonego, szczególnie wyraźne było uszkodzenie kory amonalnej.

We wszystkich przypadkach stwierdzono uszkodzenie neuronów w strukturach pnia mózgu. Były to zmiany rozsiane, najbardziej nasilone w rdzeniu przedłużonym. W jednym przypadku uszkodzenia komórkowe były zlokalizowane we wzgórku dolnym blaszki czworaczej, w dwu przypadkach w istocie czarnej, we wszystkich przypadkach zmiany występowały w neuronach tworzących siatkowatego, zwłaszcza środkowej i dolnej opuszki (ryc. 6), w dolno-bocznych konwolutach oliw, a także w jądrach nakrywki pod dnem komory IV (w jądrze n.n. XII, X, pęczka smukłego i klinowatego). Uszkodzenia wyrażały się ubytkami komórek nerwowych. W przerzedzonych strukturach część neuronów była ciemna, obkurczona, w dwóch przypadkach zmianom tym towarzyszyło pobudzenie gleju, zwłaszcza w obrębie oliw.

OMÓWIENIE

W przypadku I szczegółowo przedstawionym można prześledzić łańcuch przyczyn i skutków prowadzących do zmian chorobowych zespołu płód-łożysko i w ich następstwie do zgonu noworodka. Zespół wątrobowo-nerkowy i zatrucie ciążowe matki doprowadziły do uszkodzenia czynności łożyska, rozpoznawanego już w czasie trwania ciąży na podstawie spadku poziomu estriolu we krwi, i w pełni potwierdzonego w badaniu makro- i mikroskopowym. Dystroficzny płód wykazywał ciężkie zmiany przede wszystkim w układzie nerwowym. Na szczególną uwagę wśród nich zasługuje rozplamienie sieci naczyniowej i przekrwienie w strukturach pnia mózgu, które Brand i Bignami (1969) obserwowali w mózгах wcześniaków zmarłych w wyniku niewydolności krążeniowo-oddechowej, a które można traktować jako wyraz adaptacji do warunków przewlekłego niedostatku tlenu.

We wszystkich pozostałych przypadkach dane kliniczne i zmiany w łożyskach wskazują, że płody uległy przewlekłemu niedotlenieniu. W przypadku II czynnikiem istotnym dla uszkodzenia płodu było zakażenie, które doprowadziło do zapalenia płuc i przyczyniło się do zgonu wcześniaka w zespole asfiksji (Dąbmska i wsp. 1971). W przypadku tym stwierdziliśmy, że zakażenie nakładało się na wcześniejsze zmiany w łożysku, mogące powodować już w czasie ciąży zaburzenia wymiany między matką a płodem. W dalszych czterech przypadkach powikłania ciąży stały się przyczyną uszkodzenia łożysk w takim stopniu, że rozwijające się płody znajdowały się przed wystąpieniem porodu w warunkach przewlekłej asfiksji. Wśród zmian stwierdzanych w ich narządach wewnętrznych za szczególnie ważny należy uznać zespół narastających błon szklistych (przyp. III, V, VI), który wiąże się z uszkodzeniami mózgowymi być może na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Był on dalszym ogniwem pogarszającym stan noworodków. W przypadku VI zespół uszkodzeń stworzył błędne koło. Już w bardzo wczesnej fazie embriogenetycznej doszło do uszkodzenia embrio- i trofoblastu: u płodu powstała wada serca, łożysko kształtowało się nieprawidłowo już od początkowych stadiów. Wadliwe łożysko było przyczyną przedporodowej asfiksji płodu. U noworodka wystąpiły po urodzeniu zaburzenia krążenia związane z siniczną wadą serca, które nakładając się na wcześniejsze zmiany uczyniły go niezdolnym do samodzielnego życia.

We wszystkich badanych mózгах stwierdzono rozsiane zmiany w strukturach pnia w postaci ubytków i uszkodzeń neuronów, w kilku przypadkach z wtórnym rozplamieniem gleju. Uszkodzenia pnia mózgu u noworodków są coraz częściej opisywane. Po całkowitym zatrzymaniu krą-

zenia spotyka się w tej strukturze ogniska martwicy zupełnej (Schneider i wsp. 1975, Dąbska i wsp. 1975). Mniej nasilone zmiany spostrzegane przez Grunneta i wsp. (1974) oraz Griffith i Laurence (1974) występują w formie uszkodzeń rozsianych m.in. w jądrach nerwów czaszkowych. Towbin (1964, 1970) zwracał na nie również uwagę podnosząc znaczenie urazu i krwotoku w tylnej jamie czaszki jako czynnika przyczyniającego się do uszkodzeń pniowych. W przedstawionych przez nas przypadkach obraz kliniczno-morfologiczny wskazywał przede wszystkim na ogólne przewlekłe zaburzenia w utlenowaniu jako na czynnik oddziaływający na płody. Zmiany w strukturach pnia wskazywały, że narastały one stopniowo i wystąpiły przed porodem. Prawie we wszystkich przypadkach zmiany były bardzo nasilone w grupach komórkowych należących do istoty siateczkowatej pnia, szczególnie na poziomie opuszki. Podobne uszkodzenia opisała Norman (1972) zwracając uwagę na znaczną wrażliwość tych struktur w okresie ich dojrzewania. Neurony istoty siateczkowatej są wrażliwe na niedokrwienie i niedotlenienie w wieku dojrzłym (Dydyk 1973), tym bardziej więc ucierpiały w okresie rozwoju ich struktury i funkcji. Można więc przypuszczać, że doszło do uszkodzenia „ośrodków” regulacji krążenia i oddychania (Galarescu i Thomas 1971, Bianchi 1971, Bertrand i wsp. 1973). Ich następstwa można uznać za szczególnie niekorzystne dla adaptacji noworodków nawet do warunków fizjologicznego porodu i okresu poporodowego, a więc za ważny czynnik w łańcuchu przyczyn prowadzących do zgonu.

M. Домбска, Л. Дыдык, М. Либхарт, И. Рошковски, Ю. Шамборски

IZMENENIYA V MOZGU NOVOROZHDENNYKH VSLIEDSTVIE POVREZHDENIYA KOMPLEKSA PLOD-PLACENTA

Резюме

Рассмотрены 6 случаев новорожденных в период развития 26—38 недель жизни плода, умерших в перинатальный период. Во всех случаях клинические данные и исследования плаценты показали, что плод во время беременности находился в условиях хронической гипоксии. После родов синдром гиалиновых мембран в трех случаях был дальнейшим фактором, ухудшающим снабжение кислородом новорожденных. Во всех случаях обнаружены тяжелые повреждения нервной системы. Особенно следует подчеркнуть изменения в ретикулярной субстанции мозгового ствола. Нарушение в области этой структуры „центров” регуляции кровообращения и дыхания можно считать особенно неблагоприятными для адаптации новорожденных к самостоятельной жизни, а значит за одну из причин их смерти в перинатальный период.

M. Dąbska, L. Dydyk, M. Liebhardt, I. Roszkowski, J. Szamborski

CHANGES IN THE BRAIN OF NEWBORNS RESULTING FROM THE DAMAGE TO FOETUS-PLACENTA COMPLEX

Summary

The study concerns 6 newborns of age 26—38 weeks foetal life who died during perinatal period. Clinical data and examination of placenta showed that during gestation all the fetuses become chronically anoxied. After delivery, hyaline membranes syndrome found in three cases was also a factor worsening oxygenation of newborns. Nervous system exhibited severe damage in all the cases. The changes in reticular formation of brain stem was most impressive. The damage to the circulation and breath centers of this structure seems to be particular disadvantage during the adaptation of newborns to independent life being one of causes leading to death during perinatal period.

PIŚMIENNICTWO

1. Bertrand F., Hugelin A., Vilbert J. F.: Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons. *Exp. Brain Res.*, 1973, 16, 389—399.
2. Bianchi A. L.: Localisation et étude des neurones respiratoires bulbaires. Mise en jeu antichronique par stimulation spinale et vagale, *J. Physiol. (Paris)*, 1971, 63, 5—40.
3. Brand M. B., Bignami A.: The effect of chronic hypoxia in the neonatal and infantile brain. *Brain*, 1969, 92, 233—254.
4. Calarescu F. R., Thomas M. R.: The function of the paramedian reticular nucleus in the control of the heart rate in the cat. *J. Physiol.*, 1971, 216, 143—158.
5. Dąbska M., Liebhart M., Ferens Z., Marciniak M.: Uszkodzenie układu nerwowego a zakażenie płodu i zmiany w płucach noworodków. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 297—305.
6. Dąbska M., Dydyk L., Walkiewicz W.: Topography of brain lesions in infants after total or partial circulatory arrest and asphyxia. *Int. Symposium „Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension”*. Warszawa, 1975.
7. Dydyk L.: Krwawienia narządowe a niedomoga ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 263—278.
8. Fanconi G., Wallgren A.: *Lehrbuch der Pädiatrie*. Schwabe A. Co. Verlag Basel, Stuttgart, 1963.
9. Griffith A. D., Laurence K. M.: The effect of hypoxia and hypoglycaemia on the newborn human infant. *Develop. Med. Child. Neurol.*, 1974, 16, 308—319.
10. Grunnet M. L., Curless R. G., Bray P. F., Jung A. L.: Brain changes in newborns from an Intensive Care Unit. *Develop. Med. Child. Neurol.*, 1974, 16, 320—323.
11. Norman M. G.: Antenatal neuronal loss and gliosis of the reticular formation, thalamus and hypothalamus. *Neurology*, 1972, 22, 910—916.
12. Nyka W.: Damage of nervous system following perinatal hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 309—316.

13. Schneider H., Ballowitz H., Schaschinger H., Hanefeld F., Dröszus J. U.: Anoxic encephalopathy with predominant involvement of basal ganglia, brain stem and spinal cord in the perinatal period. *Acta neuropath.*, 1975, 32, 287—298.
14. Towbin A.: Spinal cord and brain stem injury at birth. *Arch. Path.*, 1964, 77, 620—632.
15. Towbin A.: Central nervous system damage in the human fetus and newborn infant. *Amer. J. Dis. Child.*, 1970, 119, 529—542.

Adres doc. M. Dąmbskiej: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

BOGNA SCHMIDT-SIDOR, DANUTA PIETROW, KRYSZYNA JEZERSKA

PRZYPADEK BEZMÓZGIEGO NOWORODKA Z HETEROTOPOWYM UMIEJSCOWIENIEM TKANKI NERWOWEJ W PŁUCU

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie

Kierownik: doc. dr hab. J. Dymecki

Oddział Noworodkowy Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych w Warszawie

Kierownik: dr med. hab. Z. Sternadel

Heterotopowe występowania tkanki ośrodkowego układu nerwowego jest rzadko spotykaną anomalią. Opisano guzki i masy tkanki glejowej w oponach mózgu i rdzenia. Heterotopie takie współistnieją najczęściej z dużymi wadami ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) jak bezmózgowie, wodogłowie, dziurawość mózgu, mikrogyria, czy rozszczep kręgosłupa (Willis, 1962). Poza czaszką i kanałem kręgowym opisano występowanie tkanki glejowej w okolicy nasady nosa lub w jamie nosowej. Według Willis'a należy myśleć w tych przypadkach o przepuklinie mózgowej, która w trakcie rozwoju czaszki straciła połączenie z mózgiem. Trzecią pozaczaszkową okolicą, w której opisano heterotopie tkanki o.u.n. są płuca. Takich przypadków do roku 1953 opisano pięć, a Willis analizując je w swym podręczniku ma wątpliwości czy były to rzeczywiście ogniska gleju, a nie chrząstka, czy odczyn zapalny. W późniejszej pracy dotyczącej heterotopii różnych narządów nie wspomina o możliwości występowania ognisk tkanki nerwowej w płucach (Willis, 1968). W związku z kontrowersyjnością tego zagadnienia przedstawiamy własną obserwację.

OPIS PRZYPADKU

Rodzice młodzi i zdrowi. Dzieci z I i III ciąży żyją i są zdrowe. W pierwszych tygodniach II ciąży matka przechodziła lekki niezbyt dróg oddechowych. Poród w 42 tygodniu ciąży siłami natury. Noworodek płci męskiej, wagi 3440 g, długości 54 cm, w stanie ogólnym ciężkim (2 punkty Apgar), z uogólnionymi obrzękami. Brak kości pokrywy czaszki, ponad wieńcem skóry pokrytej krótkimi włosami widoczny był gu-

zowaty twór, wielkości mandarynki, barwy czerwono-malinowej, nieco chełbocący. W twarzy zaznaczały się „żabie oczy”. Napięcie mięśni było wzmożone. Stwierdzono ślad objawu Babińskiego i objawu Gampera. Dziecko żyło 39 godzin.

Wynik sekcji ogólnej (nr prot. sekcyjnego 959/72): Bezczaszkwiec. Niewykształcone siodelko tureckie. Brak przysadki mózgowej. Niedorozwój nadnerczy. Przerost grasicy. Ogniskowa, przykręgosłupowa, pierwotna niedodma płuc. Świeże przekrwienie bierne w narządach mięszzowych. W płucu prawym w przednio-dolnym odcinku górnego płata guzek wielkości ziarna pieprzu spoisty, na przekrojach szarokremowy, lity. Drugi podobny guzek znaleziono w dolnoprzodnim odcinku dolnego płata. Był on wielkości ziarna prosa, na przekroju szarawy, częściowo lity, częściowo wypełniony słomkowym, przejrzystym płynem. Otwór owalny był otwarty, przewód Botalla drożny.

Budowa mikroskopowa obu opisanych guzków jest podobna. Dostyc wyraźnie są one odgraniczone od tkanki płucnej, choć nie posiadają torebki (ryc. 1). Wśród delikatnie włóknistego podłoża widoczne są jądra astro- i oligodendrogleju (ryc. 2), w niektórych polach komórki astroglejowe mają obłoczkowatą lub płatowatą cytoplazmę (ryc. 3). Komórki odpowiadające neuronom są nieliczne, mają kształt piramidowy, pęcherzykowate jądro, czasami z jąderkiem i bladą, słabo widoczną cytoplazmą; w jednej z komórek widoczny jest nierównomiernie rozłożony

Ryc. 1. Ogniska tkanki nerwowej w płucu. HE. Pow. lupowe.

Fig. 1. Foci of nervous tissue in the lung. HE. Magn. glass.

Ryc. 2. Ognisko heterotopowe w płucu, widoczne jądra astro- i oligodendrogleju. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 2. Heterotopic focus in the lung; astroglial and oligodendroglial nuclei. HE. × 100.

Ryc. 3. Ognisko heterotopowe w płucu; komórki astrogleju z widoczną cytoplazmą. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Heterotopic focus in the lung; astroglial cells with visible cytoplasm. HE. × 200.

Ryc. 4. Ognisko heterotopowe w płucu; widoczne pojedyncze neurony. Fiolet kryzylu. Pow. 200 ×.

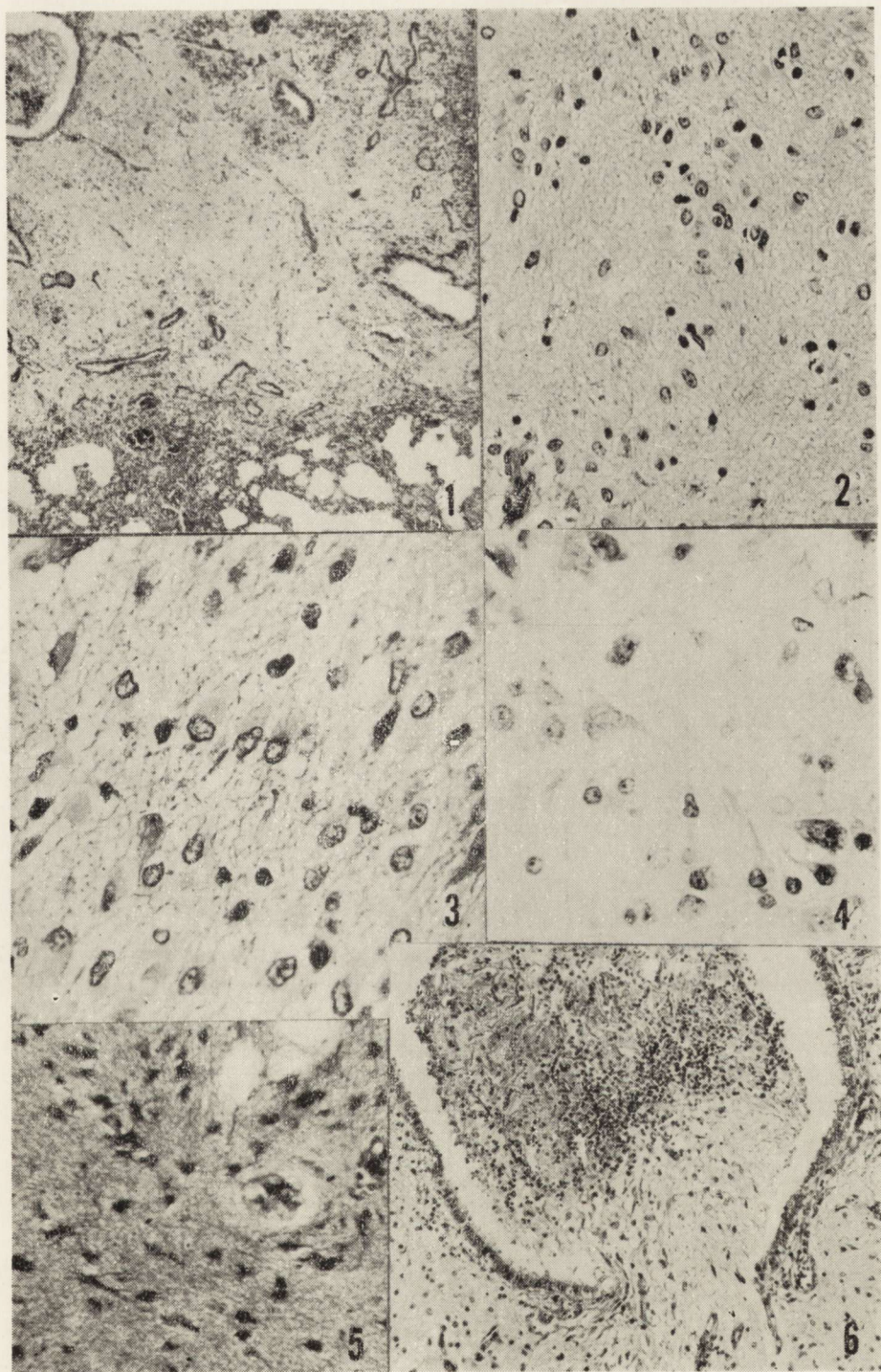
Fig. 4. Heterotopic focus in the lung; few neurons visible. Cresyl violet. × 200.

Ryc. 5. Ognisko heterotopowe w płucu. Komórki glejowe impregnowane wg met. Cajala. Pow. 100 ×.

Fig. 5. Heterotopic focus in the lung. Glial cells impregnated acc. to Cajal meth. × 100.

Ryc. 6. Tkanka glejowa przerywająca nabłonek oskrzelika i wrastająca do jego światła. HE. Pow. 60 ×.

Fig. 6. Glial tissue interrupting the epithelium of bronchiole and penetrating into its lumen. HE. × 60.



tigroid (ryc. 4). W pilśni glejową wtopione są cewki wysłane nabłonkiem walcowatym, urzęsionym, przypominające oskrzeliki. W jednym z takich przewodów widoczne jest miejsce, w którym bariera nabłonkowa jest przerwana przez tkankę glejową, na którą od strony światła cewki nawarstwione są złuszczone nabłonki, pojedyncze krwinki czerwone i resztki zaaspirowanych wód płodowych (ryc. 6).

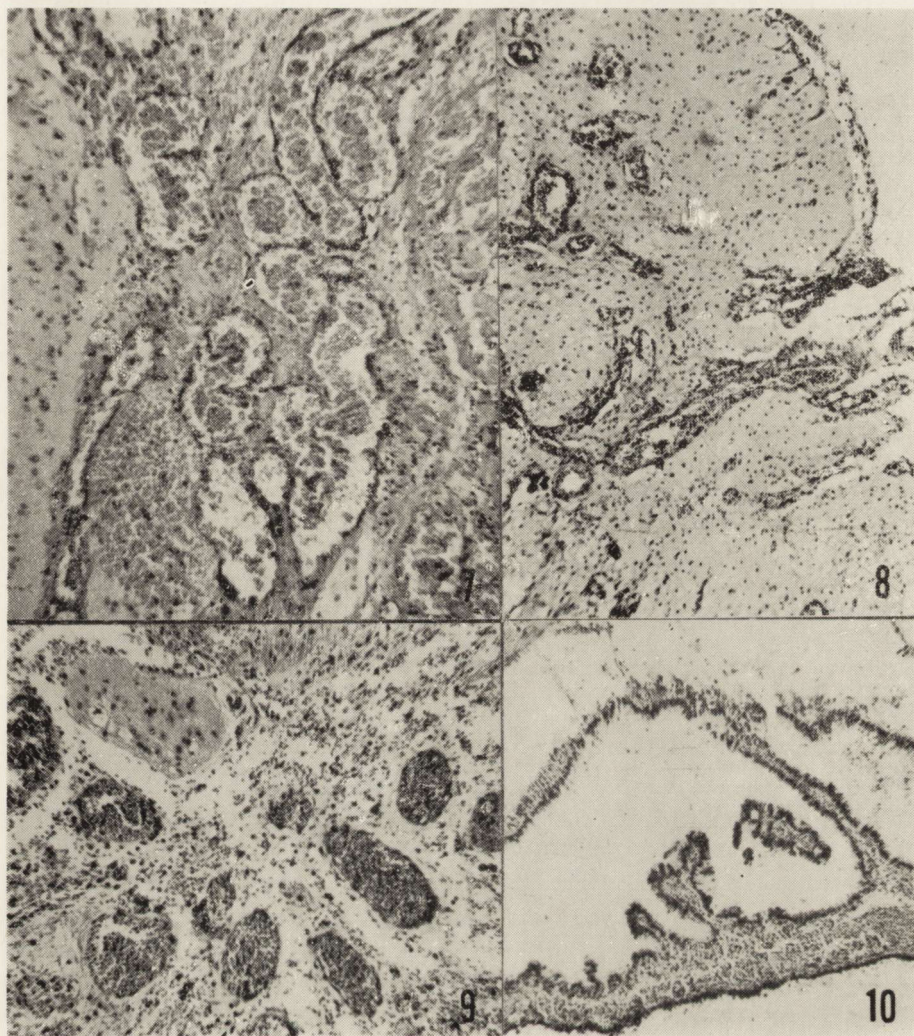
Do badania neuropatologicznego otrzymano guzkowaty twór ze szczytu głowy, bez pnia mózgowego i rdzenia kręgowego. Miał on wymiary $5 \times 4 \times 3$ cm, barwę brunatno-wiśniową, był twardy, pokryty cienką, lśniącą błoną. Na przekrojach czołowych widoczne były liczne jamki wysłane lśniącą błoną i masy wynaczynionej krwi.

Do badania mikroskopowego pobrano 2 przekroje czołowe przez guzek. Materiał utrwalono w formalinie, zatopiono w parafinie, barwiono H-E, według metody Klüvera i van Gieson.

W obrazie lupowym widoczna jest jamista budowa guzka z dużą ilością naczyń i tkanki łącznej, a skąpą tkanką nerwową. W miejscu zrostu z podstawą czaszki występuje szczególnie obficie zbita tkanka łączna. Powierzchnia przy podstawie na wysokości ok. 0,5 cm pokryta jest skórą właściwą, która przechodzi w cienką błonę wysłaną od zewnątrz i wewnątrz komórkami śródbłonna. Bezpośrednio pod tą błoną, będącą prawdopodobnie odpowiednikiem pajęczynówki, widoczna jest duża ilość naczyń krwionośnych, cienkościennych, o szerokim świetle. Mniej liczne naczynia mają budowę małych tętnic i żył. Naczynia poprzedzielane są tkanką łączną lub też leżą bardzo blisko siebie, przedstawiając obraz naczyniaka jamistego (ryc. 7). Tkanka nerwowa reprezentowana jest przez nieliczne, niedokształcone zawoje (ryc. 8) z komórkami o typie astrogleju i oligodendrogleju i z nielicznymi zwyrodniałymi neuronami oraz przez drobne guzki glejowe leżące wśród tkanki łącznej i naczyń (ryc. 9). Układ komorowy reprezentują liczne jamy różnej wielkości, wysłane jednowarstwowym nabłonkiem o ciemnych jądrach i skąpą, jasną cytoplazmą. Do światła niektórych jam sterczą palczaste twory pokryte takim samym nabłonkiem — rdzeń tych tworów stanowi delikatna tkanka łączna i zatokowate, cienkościenne naczynia (ryc. 10). Zmiany wsteczne w guzku to rozległe, świeże wynaczynienia, nieliczne małe ogniska martwicy i pojedyncze zwapnienia. Na powierzchni błony pokrywającej twór widoczny jest niewielki odczyn leukocytny.

OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek stanowi przykład noworodka bezmózgiego, u którego całkowicie zaburzony był rozwój części mózgu pochodzącej



Ryc. 7. Pasma tkanki glejowej i cienkościenne jamiste naczynia w pseudomózgowiu. HE. Pow. 60 \times .

Fig. 7. Band of glial tissue with thin-walled, cavernous vessels. HE. \times 60.

Ryc. 8. Niedokształcone zawoje mózgowe. HE. Pow. 30 \times .

Fig. 8. Underdeveloped cerebral gyri. HE. \times 30.

Ryc. 9. „Guzek” tkanki glejowej wśród tkanki łącznej i opon. HE. Pow. 60 \times .

Fig. 9. „Node” of glial tissue among connective tissue and meninges. HE. \times 60.

Ryc. 10. Jamy otoczone wyściółką ze sterzącymi do nich palczastymi wyrostkami spłotu naczyńiówkowego. HE. Pow. 60 \times .

Fig. 10. Cavities lined with ependyma with protruding digital processes of choroid plexus. HE. \times 60.

z pierwszego i drugiego pęcherzyka mózgowego, a także częściowo trzeciego — brak tkanek odpowiadających mózdkowi. Chociaż nie otrzymano do badania rdzenia przedłużonego, z dwudniowego przeżycia noworodka można wnioskować, że rdzeń przedłużony był wykształcony. Znajdujący się na szczycie głowy guzowaty twór jest zbudowany z elementów neuromezodermalnych z przewagą tkanki mezodermalnej i odpowiada budową pseudomózgowiu, opisywanemu u beczaszkwowców (Dąbska, 1963). Poza nieprawidłowym ukształtowaniem ośrodkowego układu nerwowego, stwierdzono brak przysadki mózgowej, wadę nadnerczy i serca oraz dwa ogniska heterotopowe w płucu.

Wszystkie przypadki heterotopii tkanki ośrodkowego układu nerwowego w płucach, opisane w piśmiennictwie, dotyczyły dzieci z dużymi nieprawidłowościami w ukształtowaniu mózgu. U dwojga dzieci była to przepuklina mózgowa okolicy czołowej, w jednym przypadku współistniejąca z innymi wadami mózgu (Askenazy, 1908; Hückel, 1929). W trzecim przypadku przepuklinie oponowej okolicy czołowej towarzyszyły duże nieprawidłowości w ukształtowaniu mózgu (Gruenwald, 1941). Dwa następne przypadki heterotopii o.u.n. w płucach opisano u płodów bezmózgich (Potter, Young, 1942; Potter, 1953). Woźniak (1972) przedstawił pierwszy w Polsce przypadek bezmózgowca z ektopiami tkanki nerwowej w płucach.

We wszystkich wymienionych przypadkach heterotopowe ogniska z tkanki o.u.n. w płucach były mnogie, zbudowane z elementów rozpoznawanych przez autorów jako tkanka glejowa. Sceptyczne stanowisko Willisa (1962) co do możliwości występowania tego rodzaju heterotopii w płucach wynikało z niezbyt dokładnych opisów, niezastosowania barwień specyficznych dla tkanki nerwowej i braku lub skąpej dokumentacji fotograficznej. Na podstawie przypadku Woźniaka i własnej obserwacji oraz danych z piśmiennictwa wydaje się, że heterotopie tkanki nerwowej w płucach dzieci z dużymi wadami ośrodkowego układu nerwowego są faktem udokumentowanym, choć niewątpliwie rzadkim. Nie ma wzmianki o tego rodzaju zmianach w opracowaniach dotyczących narządów wewnętrznych u płodów bezmózgich, opartych na dużym materiale (Naeye, 1971), ani też w opracowaniach dotyczących patologii płuc u noworodków (Groniowski 1960).

W rozważaniach nad patomechanizmem heterotopii tkanki ośrodkowego układu nerwowego w płucach wysuwano dwie koncepcje. Hückel (1929) rozpatrywał możliwość zatorów cząstkami tkanki nerwowej niesionymi prądem krwi, natomiast Potter (1953) sugerował aspirowanie przez płód wraz z wodami płodowymi oderwanych cząstek tkanki nerwowej i implantowanie ich w płucach.

W przedstawionym przez nas przypadku na uwagę zasługuje kontakt tkanki heterotopowej ze światłem oskrzela. Być może mogłoby to sugerować słuszność hipotezy Pottera (1953).

Obecnie brak dostatecznych danych na rozstrzygnięcie tego problemu.

Б. Шмит-Сидор, Д. Петров, К. Язерска

СЛУЧАЙ НОВОРОЖДЕННОГО БЕЗ МОЗГА
С ГЕТЕРОТРОПНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ В ЛЕГКИХ

Резюме

У новорожденного без мозга обнаружено в легких малые бугорки которые своим микроскопическим строением соответствовали нервной ткани центральной нервной системы. В этих бугорках имелись клетки неvroглии и одиночные нервные клетки. В одном месте гетеротропная ткань имела контакт с каналом бронхиолы.

B. Schmidt-Sidor, D. Pietrow, K. Jezierska

A CASE OF ANENCEPHALY WITH HETEROTOPIC NERVE TISSUE
IN THE LUNG

Summary

In both lungs of an anencephalic newborn small nodules corresponding microscopically to the nervous tissue of central nervous system were found. The nodules contained glial cells and few neurons. Heterotopic tissue contacted in one place a bronchial lumen.

PIŚMIENICTWO

1. Askenazy D.: cyt. wg Willisa, 1962.
2. Dąbmska M., Kansy J.: Opracowanie morfologiczne ośrodkowego układu nerwowego w przypadku płodu bezmózgiego. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 227—239.
3. Groniowski J.: Fizjopatologia początków oddychania w świetle badań morfologicznych płuc z okresu okołoporodowego. PWN, Poznań, 1960.
4. Grünwald: cyt. wg Willisa, 1962.
5. Hüchel: cyt. wg Willisa, 1962.
6. Naeye R. L., Hersey P., Blanc W. A.: Organ and body growth in anencephaly. *Arch. Path.* 1971, 91, 140—147.
7. Potter E. L.: *Pathology of the fetus and the newborn.* Chicago, 1953.
8. Potter E. L., Young H.: cyt. wg Potter, 1953.

9. Willis R. A.: The borderland of embryology and pathology. Ed. Butterworth, Washington, 1962.
10. Willis R. A.: Some unusual developmental heterotopies. Brit. Med. J. 1968, 267—272.
11. Woźniak F.: Niezwykłe umiejscowienie tkanki mózgowej u noworodka z wrodzonym brakiem mózgu. II. Konferencja Neuropat. Pol., Marzec, 1972, Warszawa.

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

DIETER SCHREIBER, HANS WESSEL, ANETTE MUSIL

BRAIN TUMOUR INDUCTION BY METHYLNITROSOUREA.
INFLUENCE OF THE CIRCADIAN RHYTHM ON TUMOUR
INDUCTION BY NITROSOUREA

Institute of Pathology, Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg, GDR
Head: Prof. Dr. W. Jänisch

It has been known for about ten years that methylnitrosourea (MNU) belongs to the most powerful neurotropic carcinogenic substances. This neurotropic action has been demonstrated by various investigators in experiments with different animal species, especially in rats (Druckrey et al., 1964; Jänisch et al., 1967; Jänisch and Schreiber, 1969, 1974; Swenberg et al. 1972, 1975; Ishida et al., 1975), rabbits (Jänisch and Schreiber, 1967, Schreiber et al., 1969; Stavrou, 1971) and dogs (Warzok et al., 1970; Schneider and Warzok, 1972). In all experiments carried out with nitroso compounds under apparently the same conditions some of the animals did not show tumour development neither in the nervous system nor in extraneuronal organs. This individual and species-dependent susceptibility is still a great riddle. It is uncertain whether the carcinogenesis in the central (CNS) or peripheral nervous system (PNS) can be promoted or inhibited by unspecific factors. Therefore, one part of our neurooncological studies in the last years dealt with experimental research on the influence of exogenic factors upon the chemical carcinogenesis (Gerlach et al., 1974). Till now the effect of a circadian rhythm on the effectiveness of neurogenic carcinogens has not yet been investigated. This paper presents preliminary results in this field.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried out on 72 hooded rats (group A) and 57 BD IX rats (group B) of both sexes. The animals with a weight of 60—420 g at the beginning of the experiments were fed with pellets (R 19) and water *ad libitum*. In group B the rats were kept in a room

with a constant dark-light rhythm of 12 hours; it was lighted from 6 p.m. to 6 a.m. and kept dark during the other time. All animals got repeated intraperitoneal injections of MNU (20 mg/kg monthly, maximum total dose 180—200 mg/kg). The injections were carried out from 9 to 11 a.m. in group B. This time corresponds to the phase of increased activity of rats since these animals develop maximal activity during darkness. The MNU solution was prepared freshly for each series of applications by dissolving the carcinogen in sterile aqueous 0.15 M sodium chloride containing 1% NaH_2PO_4 buffer (pH 4.2—4.5). Before injections ether anesthesia was performed. After spontaneous death the animals were autopsied. Organs showing gross abnormalities, brain and spinal cord with nerve roots were histologically examined in all rats. The incidence, localization and classification of the tumour were registered in both experimental groups.

RESULTS

The incidence of tumours of the nervous system produced by intraperitoneal applications of MNU in rats is high. In both groups more than 70 per cent of animals showed neurogenic neoplasms; their average latency period was 9 months. Multiple tumours of the nervous system occurred in about one third of the rats (Table 1). 10 out of them in group B had tumours in the brain, the spinal cord, the nerve roots and the peripheral nerves respectively (Table 2). Similar findings were registered in group A. No significant differences in the tumour incidence between both groups were established.

Table 1. Incidence of CNS and PNS tumours induced by repeated intraperitoneal injections of MNU in 129 rats.

Tabela 1. Guzy ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego u 129 szczurów wywołane wielokrotnym dootrzewnowym wstrzyknięciem MNU

Group	Number of rats	Rats with CNS and/or PNS tumours	Rats with multiple CNS and/or PNS tumours
Grupa	Liczba szczurów	Szczury z guzami CNS i/lub PNS	Szczury z mnogimi guzami CNS i/lub PNS
A	72 (100%)	57 (79.2%)	27 (37.5%)
B	57 (100%)	41 (71.9%)	19 (33.3%)

90 per cent of the CNS and PNS tumours found in rats of group A were localized in the brain. In group B the relative frequency of brain neoplasms was 74 per cent. On the other hand nerve root tumours

Table 2. Multiplicity of CNS and PNS tumours in 19 rats of group B
 Tabela 2. Mnogie guzy ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego u 19
 szczurów grupy B

Number and localization of tumours Lokalizacja i liczba guzów	Number of rats Liczba szczurów
2 BT	3
3 BT	3
4 BT	1
1 BT + 1 NRT	7
2 BT + 1 NRT	1
3 BT + 1 NRT	2
2 BT + 1 NRT + 1 PNT	1
3 BT + 1 NRT + 2 PNT	1
Total 20 BT 5 NRT 2 PNT	19

BT — Brain tumour

BT — guz mózgu

NRT — Nerve root tumour

NRT — guz korzeni nerwowych

PNT — Peripheral nerve tumour

PNT — guz nerwów obwodowych

mostly occurred in group B (Table 3). It is remarkable that more than half of the neurogenic tumours were detected by microscopic investigations only. The percentage of microtumours in the nervous system is nearly the same in group A (58%) as in group B (59%, Table 4). About two thirds of the neurogenic neoplasms were gliomas (Table 5).

A survey of tumour incidence inside and outside the nervous system is given in Table 6. The results concerning the general tumour incidence as well as the different localizations are close in group A and B. No significant differences exist. The most frequent sites of extraneuronal tumours are specified in Table 7. The high incidence of tumours within the abdominal cavity especially such of the stomach might be the result of the intraperitoneal injections of MNU. All stomach papillomas and carcinomas developed in the forestomach. Another remarkable fact is the frequency of heart neoplasms. They were preferentially localized in the left ventricle. Two thirds of the heart tumours were detected microscopically only. From Table 7 emerges the lower incidence of the heart tumours in group B. But this may not reflect the real situation because not all rats of this group were included into the histological examination of the heart.

DISCUSSION

Biologists found out that experimental animals usually react in a different manner in darkness or light. But the effect of a constant dark-

Table 3. Localization of 166 CNS and PNS tumours

Tabela 3. Umiejscowienie 166 guzów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego

Group Grupa	Total Razem	Brain Mózg	Spinal cord Rdzeń kręgowy	Nerve roots Korzenie nerw.	Peripheral nerves Nerwy obwodowe
A	90 (100%)	81 (90%)	8 (9%)	1 (1%)	—
B	76 (100%)	56 (74%)	—	17 (22%)	3 (4%)

Table 4. Early stages of induced CNS and PNS tumours

Tabela 4. Wczesne ogniska nowotworów wywołanych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym

Localization of tumours Umiejscowienie guzów	Group A	Grupa A	Group B	Grupa B
	Total Razem	Only recognized microscopically Rozpoznawalne tylko mikroskopowo	Total Razem	Only recognized microscopically Rozpoznawalne tylko mikroskopowo
Brain Mózg	81	46 (57%)	56	38 (68%)
Spinal cord Rdzeń kręgowy	8	6 (75%)	—	—
Nerve roots Korzenie rdzeniowe	1	—	17	7 (41%)
Peripheral nerves Nerwy obwodowe	—	—	3	—
Total	90	52 (58%)	76	45 (59%)

Table 5. Histological diagnoses of 166 CNS and PNS tumours

Tabela 5. Rozpoznanie histologiczne 166 guzów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego

Tumour types Rodzaj guza	Group A Grupa A	Group B Grupa B
Gliomas Glejaki	63 (70%)	48 (63%)
Sarcomas Mięsaki	14 (16%)	4 (5%)
Gliosarcomas Glejako-mięsaki	7 (8%)	4 (5%)
Neurinomas nad neurosarcomas Nerwiaki i nerwiako-mięsaki	1 (1%)	20 (27%)
Unclassified tumours Guzy niesklasyfikowane	5 (5%)	—
	90 (100%)	76 (100%)

Table 6. Incidence of CNS, PNS and extraneural malignant tumours

Tabela 6. Występowanie złośliwych nowotworów w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym i poza układem nerwowym

Group	Total	With both CNS and/or PNS and extraneural malignant tumours Guzy ośrodkowego i/lub obwodowego układu nerwowego i pozaneuralne	With extraneural malignant tumours Ze złośliwymi guzami pozaneuralnymi	CNS and/or PNS tumours only ¹⁾ Guzy ośrodkowego i/lub obwodowego układu nerwowego ¹⁾	Deceased without malignant tumours Padłe bez złośliwych nowotworów
Grupa	Razem				
A	72 (100%)	41 (57%)	12 (17%)	16 (22%)	3 (4%)
B	57 (100%)	24 (42%)	9 (16%)	17 (30%)	7 (12%)

¹⁾ Benign tumours disregarded

Nie uwzględniono łagodnych nowotworów

Table 7. Incidence and types of extraneural tumours

Tabela 7. Liczba przypadków i rodzaj nowotworów występujących poza układem nerwowym

Group	Stomach		Abdominal cavity	Heart	Kidney	Tongue	Intestines	Other sites
Grupa	Papillomas	Carcinomas	J. brzuszna	Serce	Nerka	Język	Jelita	Inne umiejscowienie
	Brodawczaki	Raki						
A	33 (46%)	15 (21%)	19 (26%)	16 (22%)	2 (3%)	4 (6%)	5 (7%)	13 (18%)
B	23 (40%)	15 (26%)	14 (24%)	24 (42%)	—	—	1 (2%)	3 (5%)

-light rhythm on the carcinogenesis in the CNS has not yet been investigated. For technical reasons two different strains of rats were used in our experiments. Therefore, the results regarding the influence of the circadian rhythm on the tumour development must be interpreted cautiously. We did not find any significant differences between group A and B concerning the tumour incidence in the nervous system, the frequency of multiple neurogenic neoplasms, the early tumour stages, and the latency periods. This negative result parallels to those achieved by Schmäl et al. (1974). In their studies the transplacental carcinogenesis by ethylnitrosourea could neither be promoted nor inhibited by immune stimulating substances, sensorial stimulants, and physical activity respectively. Some differences between group A and B regarding the localization and histological type of the neoplasms in the brain and nerve roots (Tables 3 and 5) may be species-dependent peculiarities rather than the result of the circadian rhythm. Differences in the tumour incidence after application of nitrosourea compounds in various inbred strains of rats were described by Druckrey et al. (1970), Swenberg et al. (1972), Jänisch and Schreiber (1974). These findings probably reflect the influence of genetic factors.

CONCLUSIONS

Our investigations permit the following conclusions:

1. Repeated intraperitoneal injections of MNU which could be much easier performed than intravenous ones yielded a high percentage of CNS and/or PNS tumours in rats. The results are contrary to the findings of Thomas et al. (1968) who could not detect brain neoplasms in rats after intraperitoneal applications of MNU.
2. Early stages of CNS tumours form a high proportion of the induced neoplasms. On that basis further histochemical and electron microscopic investigations should clarify hitherto unsolved problems of histogenesis in tumour development.
3. Besides tumours of the nervous system the spectrum of induced tumours includes several extraneural neoplasms. Heart tumours are of special interest. Up to now the question is undecided whether these neoplasms are of neurogenic origin or not (Mennel, 1971; Schreiber et al., 1976).
4. Further investigations are needed to detect possible influence of a circadian rhythm on the tumour growth.

D. Schreiber, H. Wessel, A. Musil

GUZY MÓZGU WYWOŁANE METYLONITROZOMOCZNIKIEM. WPŁYW CYKLU DOBOWEGO NA POWSTAWANIE NOWOTWORÓW

Streszczenie

Autorzy przeprowadzili badania na szczurach, którym wstrzykiwano dootrzewnowo metylonitrozomocznik w dawce 20 mg/kg wagi ciała przez okres 4 tygodni do maksymalnej dawki 180—200 mg/kg. Doświadczenie przeprowadzono w 2 grupach zwierząt. Grupa A obejmowała 72 szczury kapturowe, grupa B — 57 szczurów BD IX. Zwierzęta grupy B przetrzymywano od godziny 6—18 w ciemnym pomieszczeniu, a w pozostałym czasie w pomieszczeniu oświetlonym. Karcinogen wstrzykiwano zwierzętom pomiędzy godz. 9—11 rano, w okresie największej aktywności szczurów grupy B.

Liczba guzów wywołanych w układzie nerwowym przekraczała w każdej grupie 70%. Nie stwierdzono różnicy w obu grupach co do częstości występowania, liczebności guzów neurogennych oraz okresu utajenia nowotworowego. Różnice dotyczące umiejscowienia i budowy histologicznej guzów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego nie są jednoznaczne ze względu na użycie dwóch różnych szczepów szczurów. Zwrócono również uwagę na znaczenie doświadczalnych nowotworów serca i ich dotychczas nie ustaloną histogenezę.

Д. Шрейбер, Х. Вессел, А. Музил

ОПУХОЛИ МОЗГА, ВЫЗВАННЫЕ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ.
ВЛИЯНИЕ СУТОЧНОГО РИТМА НА ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ

Резюме

Авторы провели исследования на крысах, которым внутривентриально вприскивали метилнитрозомочевину в дозе 20 мг/кг веса тела в течение 4 недель до максимальной дозы 180—200 мг/кг. Эксперимент проведен на двух группах животных. Группа А охватывала 72 колпачковые крысы, группа Б — 57 крыс ВДХ. Животных группы Б держали с 6 до 18 часов в темном помещении, а в остальное время в освещенном помещении. Карциноген животным вприскивали между 9—11 часами утра в период наибольшей активности крыс группы Б.

Количество опухолей, вызванных в нервной системе, превышало в каждой группе 70%. Не обнаружено разницы между обеими группами по частоте появления, количеству нейрогенных опухолей, а также латентному периоду новообразований. Различия в локализации и гистологическом строении опухолей центральной и периферической нервной системе не являются однозначными по причине использования двух разных линий крыс. Обращено также внимание на значение экспериментальных опухолей сердца и их до сих пор не установленный гистогенез.

REFERENCES

1. Druckrey H., Ivankovic S., Preussmann R.: Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosoharnstoff. *Naturwissenschaften* 1964, 51, 144.
2. Druckrey H., Landschütz C., Ivankovic S.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. *Z. Krebsforsch.* 1970, 73, 371—386.

3. Gerlach H., Wessel H., Schreiber D.: The influence of genetic and exogenic factors on the induction of CNS-tumours by alkylnitroso-ureas. In: Abstracts VII Internat. Congr. Neuropath. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1974, 104.
4. Ishida Y., Tamura M., Kanda H., Okamoto K.: Histopathological studies on the nervous system tumours in rats induced by N-nitroso-methyl-urea. *Acta path. jap.* 1975, 25, 385—401.
5. Jänisch W., Schreiber D.: Experimentelle Hirngeschwülste bei Kaninchen nach Injektion von Methylnitrosoharnstoff. *Naturwissenschaften* 1967, 54, 171—172.
6. Jänisch W., Schreiber D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems. Induktion, Morphologie, Transplantation und Anwendung, VEB Fischer Verlag, Jena, 1969.
7. Jänisch W., Schreiber D.: Experimental brain tumours. In: Handbook of clinical neurology. Ed. P. J. Vinken and G. W. Bruyn. North-Holland Publ. Co. Amsterdam and American Elsevier Publ. Co. Inc. New York, Vol. 17, 1974.
8. Jänisch W., Schreiber D., Stengel R., Steffen V.: Die Induktion von experimentellen Hirngeschwülsten bei Ratten mit Methylnitrosoharnstoff. *Exp. Path.* 1967, 1, 243—255.
9. Mennel H. D.: Die Morphologie der mit neurotrophen Karcinogenen erzeugten Herztumoren bei Ratten. *Beitr. Path.* 1971, 144, 221—230.
10. Schmal D., Mundt D., Schmidt K. G.: Experimental investigations on the influence upon the chemical carcinogenesis. 1st communication: studies with ethylnitroso-urea. *Z. Krebsforsch.* 1974, 82, 91—100.
11. Schneider J., Warzok R.: Induktion von Hirntumoren durch Methylnitrosoharnstoff beim Hund. *Z. inn. Med.* 1972, 27, 580—582.
12. Schreiber D., Jänisch W., Warzok R., Tausch H.: Die Induktion von Hirn- und Rückenmarktumoren bei Kaninchen mit N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff. *Z. ges. exp. Med.* 1969, 150, 76—86.
13. Schreiber D., Gerlach H., Wessel H., Musil A.: Experimentelle Herztumoren bei Ratten. *Arch. Geschwulstforsch.* 1976 (in press).
14. Stavrou D.: Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des Nervensystems. Eine morphologische und enzymhistochemische Studie an spontanen bzw. experimentellen Tumoren des Nervensystems verschiedener Tierspezies sowie vergleichbaren Tumoren des Menschen. *Zbl. Vet. Med.* 1971, 18, 585—645.
15. Swenberg J. A., Koestner A., Wechsler W.: The induction of tumors of the nervous system with intravenous methylnitroso-urea. *Lab. Invest.* 1972, 26, 74—85.
16. Swenberg J. A., Koestner A., Wechsler W., Brunden M. N., Abe H.: Differential oncogenic effects of methylnitroso-urea. *J. nat. Cancer Inst.* 1975, 54, 89—96.
17. Thomas C., Sierra J. L., Kersting G.: Neurogene Tumoren bei Ratten nach intraperitonealer Applikation von N-Nitroso-N-methyl-harnstoff. *Naturwissenschaften* 1968, 55, 183.
18. Warzok R., Schneider J., Schreiber D., Jänisch W.: Experimental brain tumours in dogs. *Experientia (Basel)* 1970, 26, 303.

Authors' address: Martin-Luther-University, Institute of Pathology, GDR, 402 Halle/Saale, Leninallee 14.

F. W. RATH, WERNER JÄNISCH

ACID PHOSPHATASES IN HUMAN BRAIN TUMOURS

Institute of Pathology of Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg, GDR
Head: Prof. Dr. W. Jänisch

What we call „acid phosphatase” is in reality not a single enzyme but a group of different enzymes. They differ in their pH optima, their response to effectors, their isoelectric constants and in the splitting of different substrates (Barrett, 1969; Bergmeyer, 1970).

The differences in the biochemical character of the different acid phosphatases are not yet known in all details. Nevertheless the histochemical methods permit us to distinguish some individual acid phosphatases. Different enzyme patterns become evident if the coupling azo dye or the metal precipitation methods are applied or effectors are used (Anderson and Song, 1963; Barron et al., 1964, Pearse, 1968; Blank, 1969). Our own investigations revealed a zinc-activated and tartrate resistant acid phosphatase in the brain and in experimental brain tumours in rat (Felicetti and Rath, 1975; Rath and Felicetti, 1975).

In our present paper we study the problem, whether different types of acid phosphatases can be demonstrated also in human brain tumours.

MATERIAL AND METHODS

We have investigated 20 human brain tumours (8 glioblastomas, 5 astrocytomas, 1 oligo-astrocytoma, 1 ependymoma, 1 neurinoma and 4 meningiomas *).

Following histochemical methods were applied:

I. Azo dye coupling methods:

1. 1-Naphthyl phosphate and hexazotized pararosanilin (Barka and Anderson, 1962).

* We thank Dr. D. Tertsch from the Department of Neurosurgery of the University for providing us with the fresh tumour tissue.

a. Unfixed, sodium hydroxide-acetate buffer 0.2 M, pH 4.8 without and with sodium tartrate (10 mM) or sodium tartrate (10 mM) and zinc acetate (20 mM) (Rath and Felicetti, 1975).

b. Fixed with Baker formol, pH 4.8 and pH 6.0 (Veronal-acetate buffer 0.1 M).

2. Naphthol AS-CL phosphate and hexazotized pararosanilin (Barka and Anderson, 1962). Fixed with Baker formol, pH 5.0 (Veronal-acetate buffer 0.1 M).

II. Metal salt methods:

1. Method after Gomori (1952) with 2-glycerophosphate. Fixed with Baker formol, pH 5.2 (acetic acid-acetate buffer 0.05 M).

2. Method after Butterworth (1971) with 4-nitrophenyl phosphate. Baker formol, pH 5.0 (acetic acid-acetate buffer 0.05 M).

III. Controls.

1. Incubation without substrates.

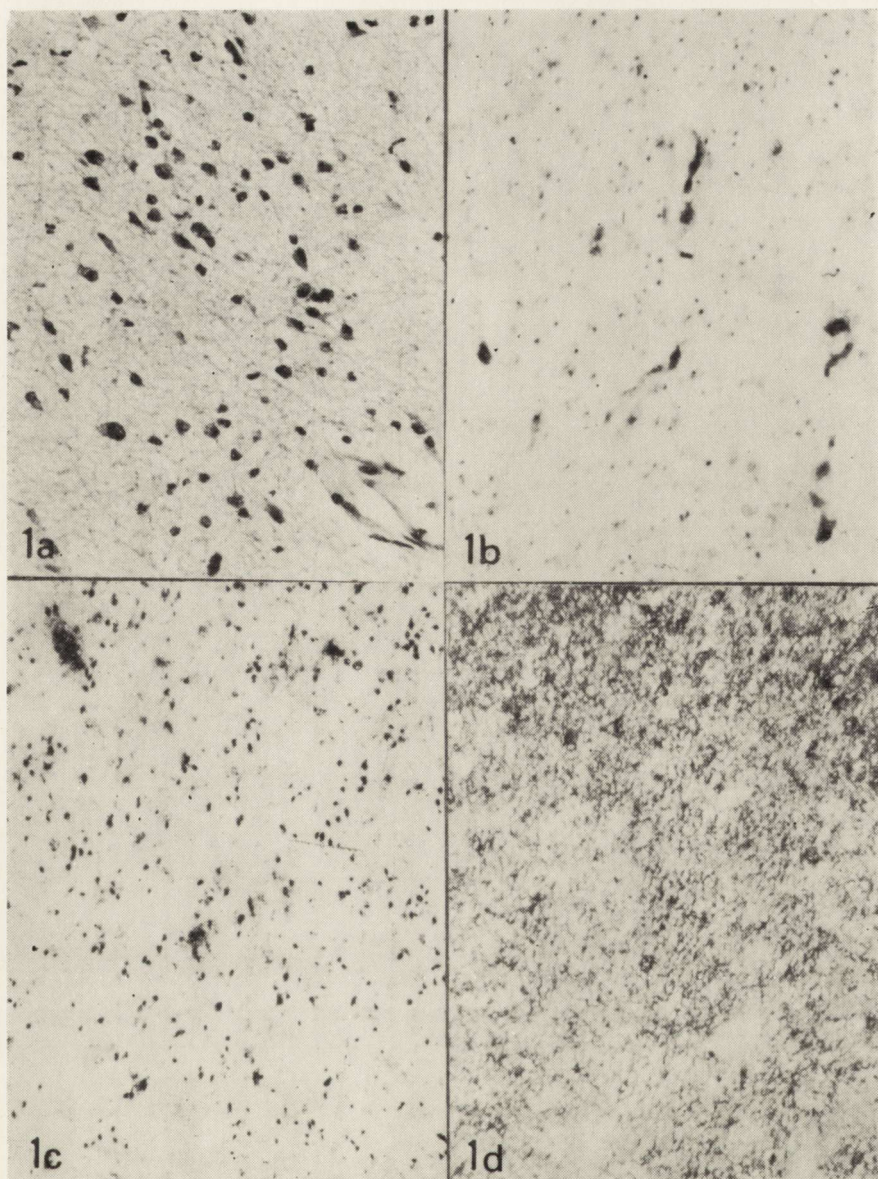
2. Enzyme inhibition with sodium fluoride (0.01 M).

RESULTS

The following findings demonstrate the existence of different enzymes of the group of acid phosphatases in human brain tumours:

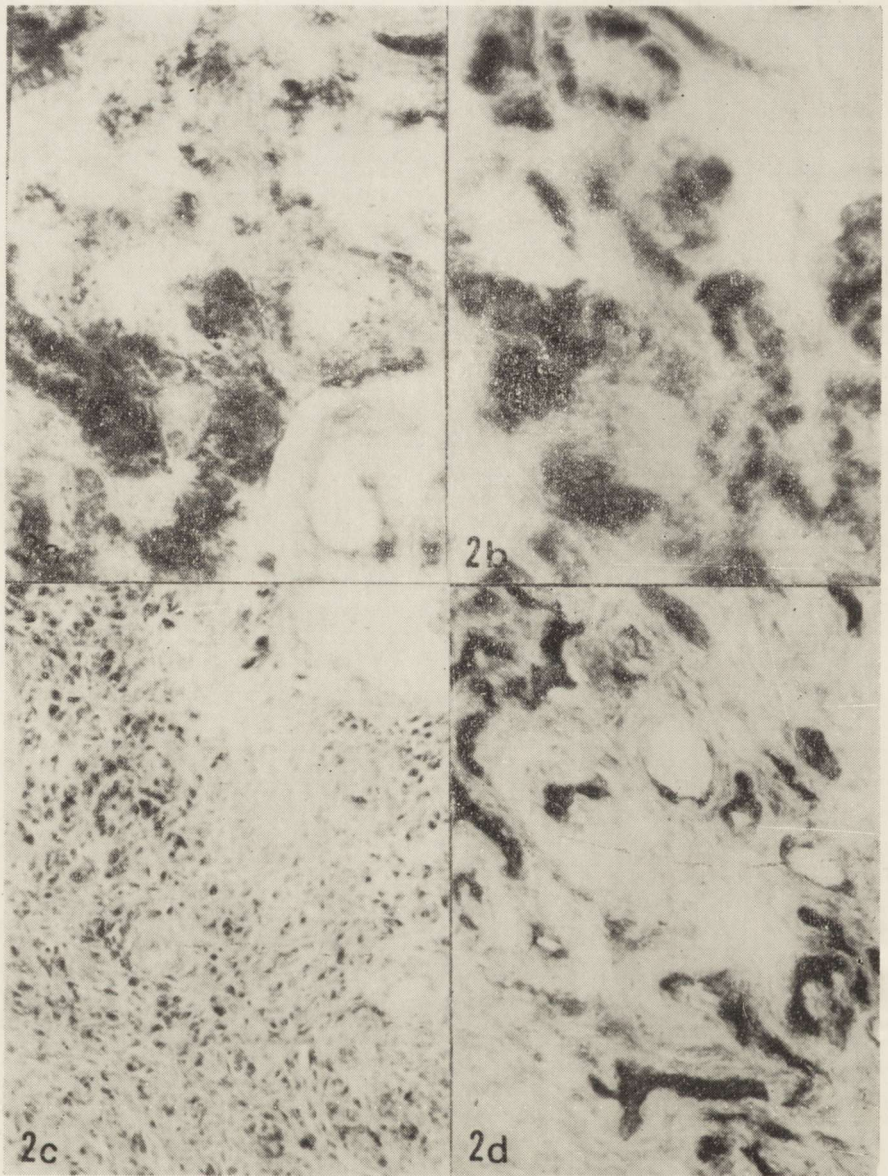
Astrocytomas. Fig. 1a-1d show varying pattern of the acid phosphatases activity in an astrocytoma. With naphthol AS-CL phosphate the neoplastic astrocytes exhibit different grades of activity (Fig. 1b). There is high activity in the cells of vessels. The same enzyme pattern is demonstrable with 2-glycerophosphate as a substrate (Fig. 1c). When 4-nitrophenyl phosphate is used, the results show a different pattern. This substrate shows enzyme activity not only in the cytoplasm but also in the fibres of the astrocytes (Fig. 1d).

Glioblastomas exhibit a high activity of acid 1-naphthyl phosphatase in the anaplastic tumour cells, in the vicinity of necrotic areas, around blood vessels or in vascular proliferations (Fig. 2a). Only the activity of the blood vessels is tartrate resistant, especially in glomerulum-like structures (Fig. 2b). But not all blood vessels contain the tartrate resistant acid phosphatase. When naphthol AS-CL phosphate is used, a strong activity of an acid phosphatase is demonstrated in the anaplastic tumour cells of glioblastomas, but only a slight one in the blood vessel walls (Fig. 2c). The acid phosphatases of the glioblastoma cells and of the blood vessels hydrolyse 2-glycerophosphate very strongly, whereas 4-nitrophenyl phosphate is split to a considerable degree in the blood vessel walls only (Fig. 2d).



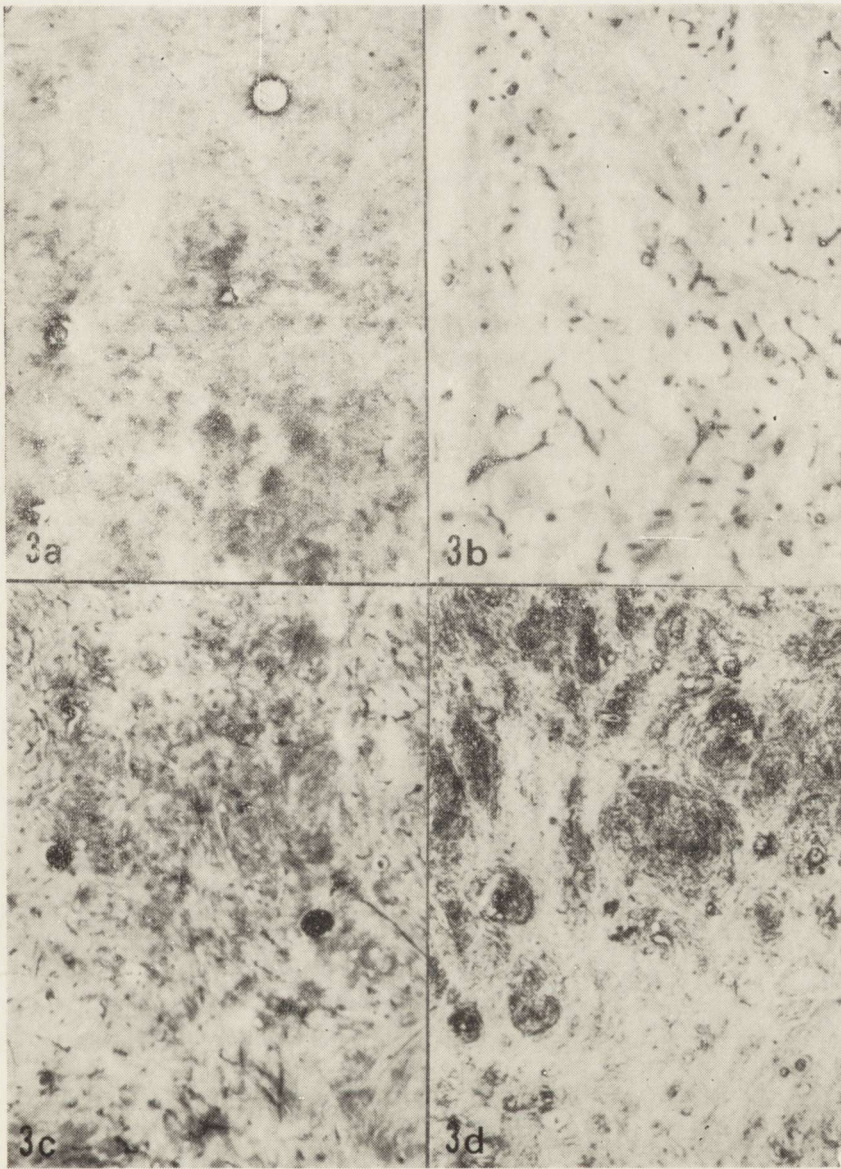
Figs. 1a—d. Astrocytoma (J. 11280/75). *1a* — H.E. $\times 250$. *1b* — acid phosphatase activity with naphthol AS-CL phosphate, $\times 80$. *1c* — with 2-glycerophosphate, $\times 80$. *1d* — with 4-nitrophenyl phosphate, $\times 80$.

Ryc. 1a—d. Gwiaździak (J. 11280/75). *1a* — HE. Pow. 250 \times . *1b* — aktywność fosfatazy kwaśnej, odczyn z fosforanem naftolu AS-CL. Pow. 80 \times . *1c* — odczyn z 2-glicerofosforanem. Pow. 80 \times . *1d* — odczyn z 4-nitrofenylofosforanem. Pow. 80 \times .



Figs. 2a—d. Glioblastoma (J. 3820/75). *1a* — acid phosphatase with 1-naphthyl phosphate, $\times 125$. *1b* — with 1-naphthyl phosphate and tartrate, $\times 125$. *1c* — with naphthol AS-CL phosphate, $\times 125$. *1d* — with 4-nitrophenyl phosphate, $\times 125$.

Ryc. 2a—d. Glejak wielopostaciowy (J. 3820/75). Aktywność kwaśnej fosfatazy. *1a* — z fosforanem 1-naftyłu. Pow. $125 \times$. *1b* — z fosforanem 1-naftyłu i solą kwasu winowego. Pow. $125 \times$. *1c* — z fosforanem naftolu AS-CL. Pow. $125 \times$. *1d* — z fosforanem nitrofenyłu. Pow. $125 \times$.



Figs. 3a—d. Meningioma (J. 6566/75). Acid phosphatase. 3a — with 1-naphthyl phosphate, $\times 30$. 3b — with 1-naphthyl phosphate and tartrate, $\times 30$. 3c — with 4-nitrophenyl phosphate, $\times 30$. 3d — with 2-glycerophosphate, $\times 30$.

Ryc. 3a—d. Oponiak (J. 6566/75). Aktywność kwaśnej fosfatazy. 3a — odczyn z fosforanem naftylu. Pow. 30 \times . 3b — odczyn z fosforanem naftylu i solą kwasu winowego. Pow. 30 \times . 3c — odczyn z fosforanem 4-nitrofenylu. Pow. 30 \times . 3d — odczyn z 2-glicerofosforanem. Pow. 30 \times .

Meningiomas. A similar situation in respect to the acid phosphatases of blood vessels can be demonstrated in meningiomas. Fig. 3a shows the activity of the acid phosphatases with 1-naphthyl phosphate in meningioma. Both the meningioma cells and the blood vessel walls are stained. Using sodium tartrate as inhibitor, the activity of the enzyme in blood vessels is conspicuous whereas that in the meningioma cells becomes reduced. This permits the conclusions that different enzymes are involved. The conclusion is supported by experiments with 4-nitrophenyl phosphate as a substrate. In this case the blood vessels are deeply stained even without use of sodium tartrate (Fig. 3c). The pattern of acid phosphatase with 2-glycerophosphate (Fig. 3d) corresponds to that with naphthol AS-CL phosphate and shows the highest activity in the whorls.

DISCUSSION

Histochemical verification of different enzymes is dependent on the following conditions: Individual enzymes must not only exhibit differing modes of behaviour towards the substrate and effectors but also show differences in localization. The latter was confirmed by our results in astrocytomas (differences between cytoplasm and fibres), glioblastomas and meningiomas (differences between tumour cells and cells of the vessels). Artifacts in localization must be excluded, of course.

Our findings indicate that the employment of only one histochemical method for detecting acid phosphatases is not sufficient. The fact must be born in mind that the so-called „acid phosphatase” (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.2.) is a whole group of enzymes. One or the other member of this group is revealed depending on the method employed (Pearse, 1968). Our results show that this applies also to human brain tumours. From this should be concluded that only such results can be compared that have been obtained with the same standardized histochemical methods.

F. W. Rath, W. Jänisch

KWAŚNE FOSFATAZY W LUDZKICH GUZACH MÓZGU

Streszczenie

Kwaśne fosfatazy stanowią grupę enzymów różniących się optimum pH, punktem izoelektrycznym, różnym powinowactwem do substratu itd.

Autorzy przebadali zachowanie się kwaśnej fosfatazy w 20 guzach ludzkich (glejak wielopostaciowy, gwiaździatek, oponiak, wyściółczak, nerwiak, gwiaździatek-skąpodrzewiak) stosując różne metody ujawniania aktywności enzymatycznej.

Wykazano różnice w umiejscowieniu enzymu zależne od zastosowanej metody. Wyniki badania aktywności fosfatazy kwaśnej uzyskiwane przez innych badaczy mogą być porównywalne tylko w przypadku zastosowania takiej samej metody histochemicznej.

Ф. В. Рат, В. Яниш

КИСЛЫЕ ФОСФАТАЗЫ В ОПУХОЛЯХ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Кислые фосфатазы представляют собой группу ферментов, отличающихся между собой оптимумом pH, изоэлектрической точкой, различным средством к субстрату и т.д.

Авторы исследовали поведение кислой фосфатазы в 20 опухолях человека (многообразную глиому, астроцитому, менингиому, эпендимому, неврому, астроцитомо-олигодендробластому), применяя различные методы определения ферментативной активности.

Показаны различия в локализации фермента, зависящие от применяемого метода. Результаты исследования активности кислой фосфатазы, полученные другими исследователями, можно сравнивать только в случае применения такого же самого гистохимического метода.

REFERENCES

1. Anderson P. J., Song S. K.: Acid phosphatases in the nervous system. *J. Neuro-path. exp. Neurol.* 1963, 21, 263—283.
2. Barka T., Anderson P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 1962, 10, 741—753.
3. Barrett A. J.: Properties of lysosomal enzymes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Ed. J. T. Dingle and H. B. Fell. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-London. Vol. 2, 1969.
4. Barron K. D., Bernsohn J., Hess A. R.: Zymograms of neural acid phosphatases. Implications for slide histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1964, 12, 42—44.
5. Bergmeyer H. U.: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Akademie-Verlag, Berlin, 1970, Bd. 1.
6. Blank M.: Enzymmuster saurer Phosphatase im Zentralnervensystem. I. Die Biochemie und intracelluläre Lokalisation der sauren Phosphatase. *Acta histochem. (Jena)* 1969, 33, 280—294.
7. Butterworth J.: Histochemistry of non-specific phosphatases: the use of p-nitrophenyl phosphate and β -glycerophosphate as substrates. *Histochem. J.* 1971, 3, 477—487.
8. Felicetti D., Rath F. W.: Zum Vorkommen und zur Isolierung einer durch Zink stark aktivierbaren sauren Phosphatase im Grosshirn der Ratte. *Acta histochem. (Jena)* 1975, 53, 281—290.

9. Gomori G.: *Microscopic Histochemistry: Principles and Practice*. Univ. Press, Chicago, 1952.
10. Pearse A. G. E.: *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Ed. Churchill, London, 1968, Vol. 1.
11. Rath F. W., Felicetti D.: Histochemische Darstellung einer durch Zink aktivierten tartratresistenten sauren Phosphatase in experimentell induzierten gliösen Mikrotumoren des Rattengrosshirns. *Acta histochem. (Jena)* 1975, 53, 291—301.

Authors' address: Martin-Luther-University, Institute of Pathology, GDR, 402 Halle/Saale, Leninallee 14.

ANNA KAMIŃSKA, KONSTANTY MROŻEK, JANINA RAFAŁOWSKA

DOŚWIADCZALNA MIASTENIA *)

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. I. Hausmanowa-Petrusewicz

Pogląd, że miastenia jest chorobą autoimmunologiczną jest oparty na dowodach klinicznych (Simpson 1960), serologicznych (Nastuk i wsp. 1960, Strauss i wsp. 1960) i histologicznych (White i wsp. 1962). Próbę stworzenia doświadczalnego autoimmunologicznego modelu miastenii przedstawili w 1966 r. Goldstein i Whittingham. Immunizacja świńek morskich grasicą lub mięśniem razem z pełnym adjuwantem Freund'a (FCA) powodowała zdaniem tych autorów nagromadzenie limfocytów dookoła ciałek Hassala w istocie rdzennej grasicy. Uzyskali oni zmiany, które określili terminem „doświadczalne immunologiczne zapalenie grasicy”. Następne prace Goldsteina i wsp. (1967, 1968, 1969) oraz Kaldena i wsp. (1970) potwierdziły możliwość stworzenia tego typu modelu miastenii u zwierząt. Natomiast Vettters i wsp. (1969), Kaufman i wsp. (1969) oraz Jones i wsp. (1971) mimo zastosowania tej samej metody nie mogli uzyskać tego efektu.

Celem naszej pracy było uzyskanie modelu doświadczalnej miastenii w oparciu o metodę Goldsteina i Whittingham.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, 6 tygodniowych o wadze 150—200 g oraz 3 tygodniowych o wadze do 100 g. Antygen przygotowywano pobierając grasicę od 3 tygodniowych szczurów; homogenizowano ją w homogenizatorze szklanym w buforze fosforanowym o pH 7,3. Homogenat wirowano przez 10 minut z szybkością 7000/min, a płyn z nad osadu liofilizowano. Liofilizat rozcieńczano w wodzie destylowanej uzyskując rozcieńczenie 10 mg/ml. Do wstrzyknięć używano mieszaniny antygeny i FCA w stosunku 1:1 podawanej do obydwu tylnych łap. 44 szczury otrzymały 0,1 ml mieszaniny (razem 1 mg antygeny).

*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.4.1.

Grupe kontrolną stanowiły 33 szczury immunizowane w taki sam sposób, którym antygen podano w tydzień po wykonaniu tymektomii oraz 9 szczurów, które otrzymały 0,1 ml FCA z solą fizjologiczną w stosunku 1 : 1. Ponadto przeprowadzono badanie u 10 zdrowych zwierząt.

Tymektomię wykonywano w znieczuleniu ogólnym uretanem, po uprzednim odsłonięciu śródpiersia. Cięcia skórne wykonywano na wysokości górnej krawędzi mostka, uwalniano staw mostkowo-obojęczykowy a następnie odsłoniętą grasicę ujmowano u podstawy delikatnie pensetą i ostrożnie pociągano starając się uniknąć uszkodzenia dużych naczyń. Śródpiersie zamykano mięśniem, skórę pokrywano szwem ciągłym. W 2 tygodnie po immunizacji wykonywano stymulację n. pośredkowego. W ocenie potencjałów wywołanych podczas drażnienia bodźcem supramaksymalnym przy częstotliwościach 50/sek. i 3/sek. porównywano amplitudę 1 i 10 odpowiedzi. Wielkość spadku amplitudy wyrażano w procentach. Za istotny spadek amplitudy, świadczący o obecności bloku transmisji nerwowo-mięśniowej, uważano spadek przekraczający 15% wartości wyjściowej. Zapis wewnątrzkomórkowy przy pomocy mikroelektrod przeprowadzono *in vivo* na *m. intertransversarius* ogona szczura rejestrując potencjał spoczynkowy błony, amplitudę i częstotliwość wyładowań potencjałów miniaturowych płytki. Dokładny opis zastosowanej metody podano w pracy Mrożka i wsp. (1973).

Po zakończeniu badań elektrofizjologicznych pobierano przyżyciowo m. brzuchaty łydki. Jedną część mięśnia utrwalano w 10% formalinie, zatapiano w parafinie, skrawki grubości 6—10 μ barwiono hematoksyliną-eozyną i trichromem Gomoriego. Pozostałą część mięśnia bezpośrednio po pobraniu zamrażano w izopentanie, krojono w kriostacie na skrawki grubości 8—10 μ . Oceniano aktywność ATP-azy miofibrylarnej (pH 9,4), dehydrogenazy mleczanowej (DHM), dehydrogenazy bursztynianowej (DHB), diaforazy dwufosfopirydynonukleotydu (DPNH) oraz fosforylaz (formy a i b).

Po pobraniu mięśnia szczury umieszczano w atmosferze eteru i po upływie 2—3 min. pobierano grasicę, którą utrwalano w 10% roztworze formaliny i zatapiano w parafinie. Skrawki grubości 6—10 μ barwiono hematoksyliną-eozyną i wg metody van Gieson.

Surowice zwierząt immunizowanych i kontrolnych przechowywano zamrożone w temp. -20°C , rozcieńczano w stosunku 1 : 5 i 1 : 10, badano na obecność przeciwciał przeciwgrasiczych i przeciwmięśniowych. Badanie przeprowadzono metodą immunofluorescencyjną pośrednią używając globuliny koziej skierowanej przeciwko globulinom myszy, znakowanej fluoresceiną w rozcieńczeniu 1 : 8. Jako kontrolę dodatnią traktowano barwienie metodą bezpośrednią przeprowadzone na śledzionie szczura.

WYNIKI

Badania elektrofizjologiczne. Istotny spadek amplitudy potencjałów podczas rytmicznego drażnienia m. pośrodkowego obserwowano u 40% immunizowanych szczurów. W grupach kontrolnych — zdrowych szczurów i po podaniu FCA nigdy nie obserwowano spadku większego niż 15%, z wyjątkiem 1 przypadku w grupie zwierząt immunizowanych po tymektomii, co można wiązać z niecałkowitym usunięciem grasicy.

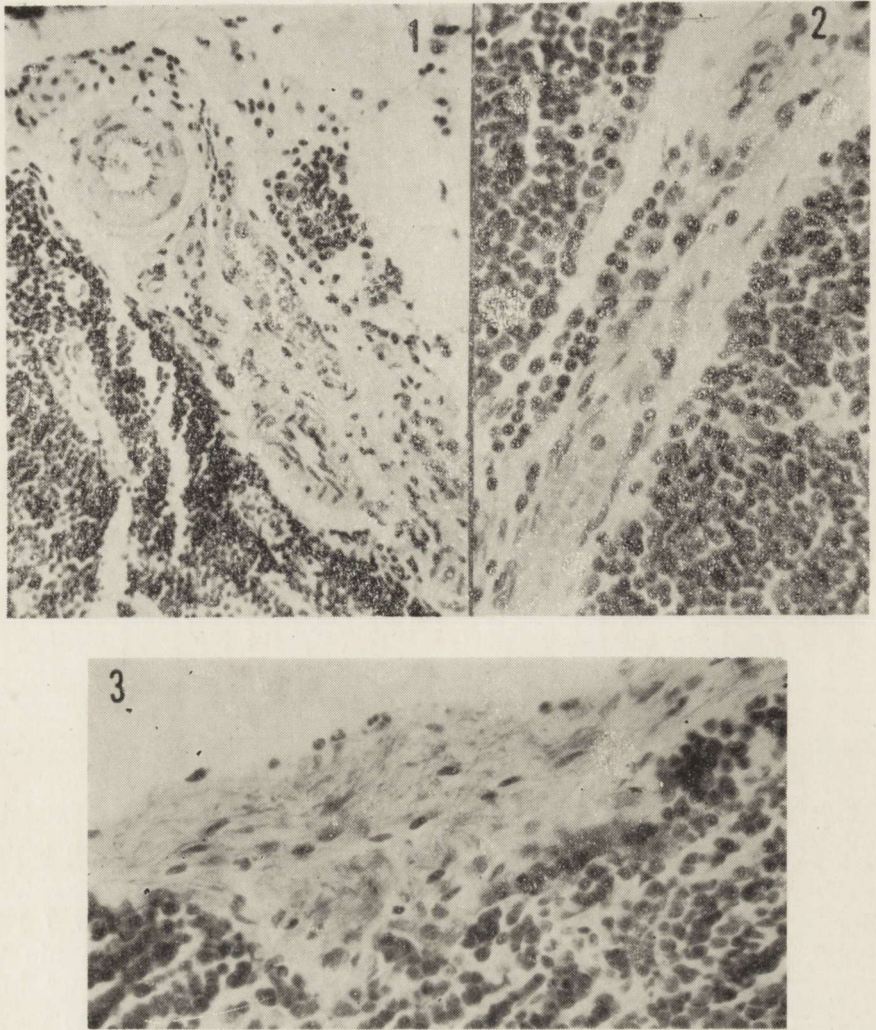
Wartości potencjału spoczynkowego błony oraz częstotliwość wyładowań potencjałów miniaturowych płytki nie różniły się w grupach zwierząt kontrolnych i immunizowanych. Amplituda potencjałów czynnościowych różniła się statystycznie ($p < 0,001$) i była niższa w grupie zwierząt immunizowanych ($0,42 \pm 0,06$ mV) niż w grupie zwierząt zdrowych ($0,59 \pm 0,07$ mV).

Badanie histologiczne grasicy. W ocenie preparatów mikroskopowych zwracano uwagę na obecność zastoju żylnego, nacieków okołonaczyniowych lub rozproszonych w międzyzrazikowej tkance łącznej, zwiększoną liczbę granulocytów kwasochłonnych i kwasochłonnych komórek siateczki, obrzęk ścian i rozplem śródbłonek naczyń, pomnożenie włókien łącznotkankowych w torebce grasicy oraz pobudzenie tkanki łącznej międzyzrazikowej.

W grupie zwierząt immunizowanych w 3 przypadkach stwierdzono zmiany dotyczące trzech elementów, tj. obecność nacieków okołonaczyniowych (ryc. 1, 2), pomnożenie włókien torebki (ryc. 3) i pobudzenie tkanki łącznej międzyzrazikowej (ryc. 4 i 5), w 13 przypadkach zmiany dotyczyły 2 elementów, w 11 — jednego. Ponadto w 8 przypadkach stwierdzono dość dużą liczbę granulocytów kwasochłonnych, w 7 przypadkach zastój (ryc. 6). Żadna z wyżej wymienionych zmian nie występowała we wszystkich przypadkach. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy obecnością i nasileniem zmian histologicznych w grasicy a zaburzeniami transmisji nerwowo-mięśniowej (tabela 1).

W grupie zwierząt, którym wstrzyknięto adjuwant w 2 przypadkach zmiany histologiczne dotyczyły 2 elementów, w 3 przypadkach jednego elementu. W 2 przypadkach stwierdzono dość dużą liczbę granulocytów kwasochłonnych. U zwierząt zdrowych wyżej wymienionych zmian nie stwierdzono. Jedynie w 4 przypadkach stwierdzono pojedyncze granulocyty kwasochłonne i kwasochłonne komórki siateczki w międzyzrazikowej tkance łącznej.

Badanie mięśni. W grupie zwierząt immunizowanych stwierdzono niewielkie zmiany polegające na zastoju żylnym, naciekach okołonaczyniowych w śródmiąższowej tkance łącznej oraz obrzęku i rozple-



Ryc. 1. Szczur immunizowany. Naciek okołonacyniowy. Obrzęk i proliferacja śródbłonek naczyń. HE. Pow. 200 \times .

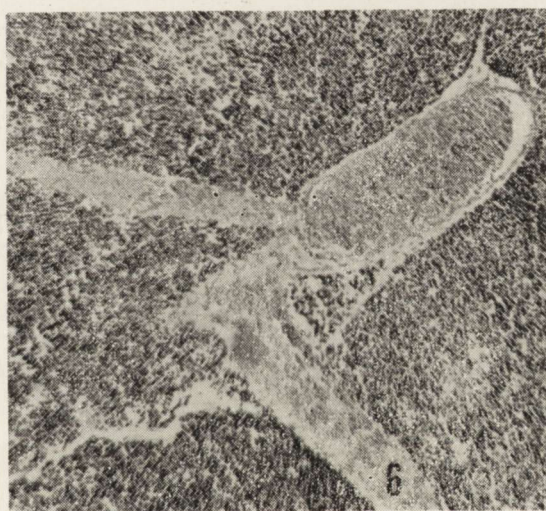
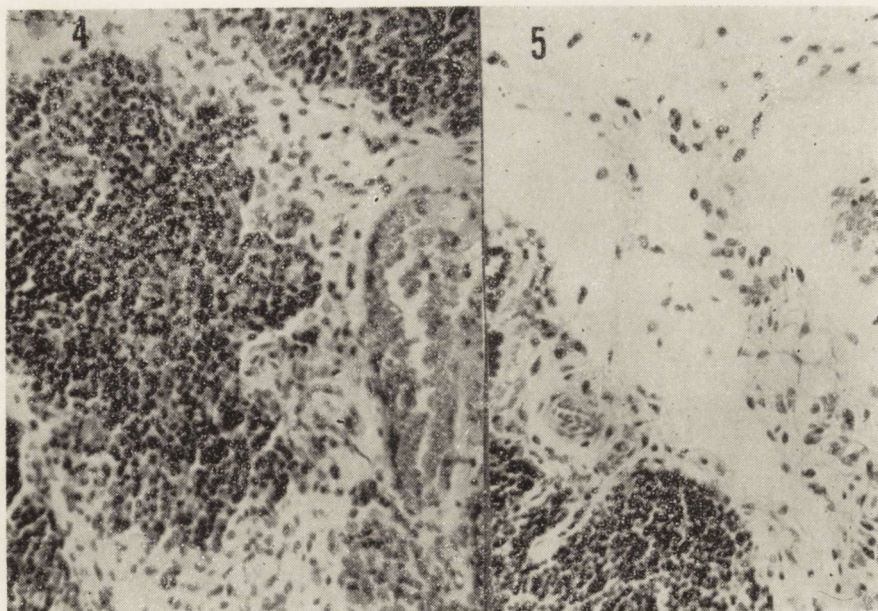
Fig. 1. Immunized rat. Perivascular infiltration. Edema and proliferation of endothelial cells. HE, \times 200.

Ryc. 2. Szczur immunizowany. Naciek okołonacyniowy. HE. Pow. 400 \times .

Fig. 2. Immunized rat. Perivascular infiltration. HE, \times 400.

Ryc. 3. Szczur immunizowany. Pogrubienie torebki łącznotkankowej grasicy. Van Gieson. Pow. 400 \times .

Fig. 3. Immunized rat. Thickening of the connective tissue capsule of thymus. Van Gieson, \times 400.



Ryc. 4. Szczur immunizowany. Pobudzenie tkanki łącznej międzyzrazikowej. HE. Pow. 200 \times .

Fig. 4. Immunized rat. Proliferation of interlobular connective tissue. HE. \times 200.

Ryc. 5. Szczur immunizowany. Obrzęk i proliferacja śródbłonnków. Pobudzenie tkanki łącznej międzyzrazikowej. HE. Pow. 200 \times .

Fig. 5. Immunized rat. Edema and proliferation of endothelial cells. Proliferation of interlobular connective tissue. HE. \times 200.

Ryc. 6. Szczur immunizowany. Zastój krwi. HE. Pow. 100 \times .

Fig. 6. Immunized rat. Hemostasis. HE. \times 100.

mie śródbłonek naczyń. Włókna mięśniowe przylegające do nacieków okołonaczyniowych były niezmienione.

U zwierząt, którym podano jedynie FCA stwierdzono zmiany o podobnym charakterze, ale znacznie mniej nasilone.

Badanie histochemiczne wykazało prawidłowy podział włókien mięśniowych na typy oraz brak jakichkolwiek zmian strukturalnych.

Badaniem immunofluorescencyjnym nie wykryto obecności przeciwciał reagujących z tkanką grasiczą i mięśniową.

OMÓWIENIE

Goldstein i Whittingham (1966, 1967) uważają, że grasicca immunizowanych zwierząt wykazuje zmiany polegające na nadmiernym gromadzeniu się limfocytów wokół ciałek Hassala, co stanowi ich zdaniem, obraz charakterystyczny dla tzw. *thymitis*. Zmieniona grasicca ma być źródłem produkowanego w nadmiarze hormonu tyminy, która wywiera hamujący wpływ na czynność zakończenia nerwowo-mięśniowego. Jest to niewątpliwie interesująca hipoteza, zwłaszcza, że znany jest związek miastenui ze zmianami w grasicy. Zmiany histologiczne w grasicy obserwowane przez tych autorów nie znajdują jednak potwierdzenia w innych pracach doświadczalnych (Jones i wsp. 1971, Kaufman i wsp. 1969). Również wyniki naszych obserwacji są odmienne od tych, jakie przedstawili Goldstein i Whittingham. Wydaje się, że ocena gęstości nacieku limfocytarnego w narządzie limfatycznym jakim jest grasicca, jest niezwykle trudna, ponadto zależy od warunków technicznych m.in. od grubości skrawka. Zmiany w grasicy obserwowane przez Goldsteina i Whittingham wydają się mało charakterystyczne; Jones i wsp. (1971) spostrzegli je w około 50% grasic zdrowych zwierząt.

W naszym materiale zmiany histologiczne w grasicy obserwowano u 65% immunizowanych szczurów przy czym nasilenie tych zmian było różne. Na uwagę zasługuje fakt, że występowały one nie tylko w grupie zwierząt, którym podano antygen, ale również, chociaż w znacznie mniejszym nasileniu, w grasicach zwierząt, którym podano tylko adjuwant. Nie stwierdzono ich natomiast w grasicy zwierząt zdrowych.

Trudno ocenić w jakim stopniu adjuwant jest odpowiedzialny za powstawanie zmian w grasicy.

Z niektórych prac wynika, że nacieki okołonaczyniowe i okołotrebkowe wraz z poszerzeniem światła naczyń, podobne do obserwowanych w naszym materiale, występują po podaniu adjuwantu w gruczole tarczycowym królików i szczurów (Jones i wsp. 1961, Witebsky i wsp. 1971). Można przypuszczać, że adjuwant jako czynnik zwiększający

Tabela 1. Zmiany histologiczne w grasicy i zaburzenia transmisji nerwowo-mięśniowej u badanych szczurów
 Table 1. Histological changes and disturbances of neuro-muscular conduction in experimental rats

Grupa szczurów po immunizacji Group of immunized rats		Grupa szczurów po wstrzyknięciu adjuwantu Group of rats injected with adjuvant		Grupa kontrolna Control group	
Zmiany histologiczne Histological changes	Blok transmisji nerwo- wo-mięśniowej Neuro-muscular block	Zmiany histologiczne Histological changes	Blok transmisji nerwo- wo-mięśniowej Neuromuscular block	Zmiany histologiczne Histological changes	Blok transmisji nerwo- wo-mięśniowej Neuromuscular block
I 3	1	I 0	0	I 0	0
II 13	8	II 2	0	II 0	0
III 11	5	III 3	0	III 0	0

Stopień nasilenia zmian histologicznych w grasicy:

- I — zmiany dotyczące 3 elementów: pogrubienie torebki, pobudzenie tkanki łącznej międzyzrazikowej i obecność nacieków okołonaczyniowych
- II — zmiany dotyczące dwóch wyżej wym. elementów
- III — zmiany dotyczące jednego z wyżej wym. elementów

Intensity of histological changes in thymus:

- I — Three types of changes: thickening of the capsule, proliferation of interlobular connective tissue and perivascular infiltrates
- II — two types of changes
- III — one type of changes

przepuszczalność ściany naczyniowej, a tym samym ułatwiający kontakt antygeny z tkanką, jest odpowiedzialny za powstanie zmian okołonaczyniowych. Potwierdza to przypuszczenie również fakt, że podobne zmiany w mięśniach znaleziono u szczurów immunizowanych i po podaniu FCA.

W grupie zwierząt immunizowanych nie znaleziono korelacji pomiędzy występowaniem i nasileniem zmian histologicznych w grasicy a zaburzeniami transmisji nerwowo-mięśniowej (tabela 1). W grupie szczurów, którym podano sam adjuwant bez antygeny i u których obserwowano opisane powyżej zmiany w grasicy, nie stwierdzono elektrofizjologicznych cech zaburzenia transmisji nerwowo-mięśniowej. U zwierząt po tymektomii immunizacja nie powoduje zaburzeń transmisji nerwowo-mięśniowej; jest to zgodne z innymi doniesieniami (Goldstein i wsp., 1969, Kalden i wsp. 1970). Fakt ten wskazuje na udział grasicy w czynności zakończeń nerwowo-mięśniowych.

Badaniem immunofluorescencyjnym nie wykryto obecności przeciwciał reagujących z tkanką grasiczą i mięśniową, co może być związane z użyciem homologicznej tkanki (Goldstein i wsp. 1969, Jones i wsp. 1971).

WNIOSKI

1. Immunizacja szczurów tkanką grasiczą wg metody opracowanej przez Goldsteina i Whittigham (1966) wywołuje w części przypadków zaburzenie transmisji nerwowo-mięśniowej.

2. Nie ma korelacji pomiędzy zmianami morfologicznymi w grasicy zwierząt immunizowanych a obecnością i stopniem nasilenia zaburzeń transmisji nerwowo-mięśniowej.

3. W mięśniach zwierząt immunizowanych występują zmiany morfologiczne podobne do obserwowanych w grasicy.

4. Podanie adjuwantu może wywołać zmiany morfologiczne w grasicy i w mięśniu, nie powoduje jednak zaburzeń transmisji nerwowo-mięśniowej.

5. Brak zaburzeń transmisji nerwowo-mięśniowej u zwierząt immunizowanych po tymektomii może wskazywać, że grasicca odgrywa rolę w czynności płytki nerwowo-mięśniowej.

6. Kryteria wg których zmiany histologiczne w grasicy immunizowanych zwierząt były oceniane przez Goldsteina i Whittigham jako *thymitis* nasuwają wątpliwości.

A. Каминьска, К. Мрожек, Я. Рафаловска

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИАСТЕНИЯ

Резюме

В работе показано, что иммунизация крыс тканью зубной железы по методу Гольдштейна и Виттигам (1966) вызывает в части случаев нарушения нервно-мышечной проводимости, характерные для миастении. Это было подтверждено на уровне нервно-мышечного соединения при помощи микроэлектродов. В группах контрольных животных, т.е. здоровых, после дачи полного адьюванта Фрейнда и иммунизированных через две недели после тимэктомии не установлено подобных изменений. Обсуждены морфологические изменения в зубной железе и в мышцах иммунизированных животных. Не обнаружено корреляции между их наличием и интенсивностью и нарушениями нервно-мышечной передачи.

A. Kamińska, K. Mrozek, J. Rafałowska

EXPERIMENTAL MYASTENIA

Summary

The authors demonstrated that immunization of rats with thymus tissue according to Goldstein and Whittingham (1966) causes in some animals the disturbances of neuro-muscular transmission characteristic for human myasthenia gravis. This was confirmed with the help of microelectrodes by intracellular registration of miniature end-plate potentials. Control animals, i.e. healthy rats after application of complete Freund's adjuvant and immunized 2 weeks after thymectomy, did not exhibit such changes. Discussed are morphological changes in the thymus and in the muscles of immunized animals. No correlation of the presence and intensity of changes with the block of neuromuscular transmission was found.

PISMIENNICTWO

1. Goldstein G., Whittingham S.: Experimental autoimmune thymitis. An animal model of human *myasthenia gravis*. *Lancet* 1966, 2, 315—318.
2. Goldstein G., Whittingham S.: Histological and serological features of experimental autoimmune *thymitis* in guinea pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 1967, 2, 257—268.
3. Goldstein G., Hofmann W. W.: Electrophysiological changes similar to those of *myasthenia gravis* in rats with autoimmune *thymitis*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1968, 31, 453—459.
4. Goldstein G., Strauss A. J. L., Pickeral S.: Antigens in thymus and muscle effective in inducing experimental autoimmune *thymitis* and release of thymine. *Clin. Exp. Immunol.* 1969, 4, 3—16.
5. Jones H. E. H., Roit I. M.: Experimental autoimmune *thyroiditis* in the rat. *Brit. J. Exp. Path.* 1961, 42, 546—554.
6. Jones H. E. H., Brennan I. L., McLeod J. G.: An investigation of experimental *myasthenia gravis*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1971, 4, 399—403.

7. Kalden J. R., Williamson W. G., Johnston R. J., Irvine W. J.: Studies on experimental autoimmune *thymitis* in guinea pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 1970, 4, 319—340.
8. Kalden J. R., Williamson W. G., Irvine W. J.: The effect of thymectomy, hemithymectomy and sham-thymectomy on experimental *myasthenia gravis* in guinea pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 1970, 4, 519—530.
9. Kamińska A., Mrożek K.: Miastenia doświadczalna. Badania histologiczne mięśni immunizowanych szczurów. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1974, 24, 715—718.
10. Kaufman B. M., Rushworth C., Wright R.: Experimental studies related to autoimmunity in *myasthenia gravis*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1969, 4, 281—289.
11. Mrożek K., Kamińska A.: Miastenia doświadczalna. Badania elektrofizjologiczne. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1973, 23, 369—375.
12. Nastuk W. L., Plescia O. J., Osserman K. E.: Changes in serum complement activity in patients with *myasthenia gravis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 1960, 105, 177—184.
13. Simpson J. A.: *Myasthenia gravis*. A new hypothesis. *Scot. Med. J.* 1960, 5, 419—436.
14. Straus A. J. L., Seegal B. G., Hsu J. C., Burkholder P. M., Nastuk W. L., Osserman K. E.: Immunofluorescence demonstration of a muscle-binding complement-fixing serum globulin fraction in *myasthenia gravis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 1960, 105, 184—191.
15. Vettors J. M., Simpson J. A., Folkard A.: Experimental *myasthenia gravis*. *Lancet* 1969, 2, 28—31.
16. Webb J. N.: Experimental *myasthenia gravis*. *Lancet* 1969, 2, 803.
17. White R. G., Marshal A. H. E.: The autoimmune response in *myasthenia gravis*. *Lancet* 1962, 2, 120—123.
18. Witebsky E., Rose N. R., Terplan K., Paine J. R., Egan R. W.: Chronic *thyreoiditis* and autoimmunization. *J.A.M.A.* 1957, 164, 1439—1447.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna AM., ul. Oczki 6, 02-007 Warszawa.

OCENA KSIĄŻKI

Hans Wolfgang Kölmel: „ATLAS OF CEREBROSPINAL FLUID CELLS”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976.

Na pojawienie się atlasu komórek płynu mózgowo-rdzeniowego wyczekiwali od dawna zarówno klinicyści-neurolodzy, jak i wszyscy interesujący się cytologią i cytodiagnostyką w medycynie. Wprowadzenie przez Sayka z początkiem lat 50-tych metody przyspieszonej sedymentacji, która umożliwiła otrzymywanie bardzo czytelnych preparatów komórkowych z płynu mózgowo-rdzeniowego, wskazywało, że czas pojawienia się takiego atlasu jest już bliski. Upłynęło jednak prawie 25 lat do chwili, gdy Kölmel, jako pierwszy, po zebraniu materiału z dwu ośrodków klinicznych — w Heidelbergu i Berlinie — wydał go w formie bogato ilustrowanego podręcznika, zawierającego niemal wszystkie znane dzisiaj działy cytodiagnostyki płynu.

Główną, ilustracyjną część atlasu poprzedził autor rozdziałem poświęconym technice przygotowywania preparatów cytologicznych. Wśród kilku omówionych sposobów zagęszczania komórek w płynie, najwyżej ocenia on metodę przyspieszonej sedymentacji i zamieszcza zdjęcie własnego modelu komory osadowej. Nie pomija jednak i wad metody Sayka. Za najważniejsze z nich uważa utratę do dalszych badań płynu użytego do sporządzenia osadu oraz „ucieczkę” znacznej ilości komórek (wg różnych autorów do 70%) do bibuły filtracyjnej w czasie procesu sedymentacji. W dalszym odcinku tego rozdziału znajduje czytelnik szczegółowe przepisy najczęściej używanych barwień preparatów osadowych.

Część ilustracyjną książki stanowi około 200 mikrofotografii (z tego 131 barwnych) opatrzonych krótkimi objaśnieniami. Przedstawione zostają przede wszystkim prawidłowe formy komórkowe płynu m.-rdz., a następnie kolejno obrazy cytologiczne krwawień do przestrzeni płynowych, zmian zapalnych o różnej etiologii, pierwotnych i przerzutowych spraw nowotworowych oraz meningoz białaczkowych. Każdy z rozdziałów i licznych podrozdziałów poprzedzony jest krótkim, syntetycznym zestawieniem wiadomości o przedstawianej grupie zmian, z częstym powoływaniem się na obfitą bibliografię umieszczoną na końcu atlasu (ogółem 185 pozycji). Podkreślić należy, że zarówno owe wprowadzenia, jak i opisy rycin skonstruowane są bardzo zwięźle i precyzyjnie, a zdjęcia mikroskopowe są na ogół najwyższej jakości (może poza rycinami przedstawiającymi granulocyty kwasochłonne, których ziarnistości nie posiadają tak charakterystycznej dla nich żywo-czerwonej barwy). Kolorowe ilustracje wykonane są z reguły z preparatów barwionych metodą May-Grünwald-Giemsy — są więc porównywalne ze sobą i z materiałem znajdującym się w większości pracowni płynowych. Pozostała niewielka ilość zdjęć barwnych atlasu to obrazy fluorescencyjne w barwieniu oranżem akrydowym.

Zwraca uwagę, że pierwotne i przerzutowe sprawy nowotworowe zajmują połowę objętości części ilustracyjnej. Zarówno z zestawów zdjęć, jak i z opisów wynika, że doświadczenie autora w tej dziedzinie jest szczególnie duże, a zebrany materiał — bardzo bogaty. Jest to zapewne w znacznej mierze zasługą stosowanej przez Kölmela metody zagęszczania komórek, która, mimo wspomnianych wyżej zastrzeżeń, umożliwiła mu wykrywanie elementów nowotworowych w płynach o cytozie tak niskiej jak 13, 10 a nawet 4 komórki w 1 mm³.

Dowodem trafnego uchwycenia przez autora najtrudniejszych problemów cytodiagnostyki płynu jest umieszczenie przed omawianiem zmian nowotworowych rozdziału „Komórki olbrzymie”, w którym zebrał on obok siebie sporo elementów tego typu (i różnego pochodzenia), budzących w praktyce codziennej najczęściej wątpliwości rozpoznawczych.

Rozdziały poświęcone zmianom zapalnym są, niestety, znacznie uboższe w materiał ilustracyjny, a pewne grupy schorzeń są potraktowane marginesowo (odczyny w sprawach pasożytniczych), lub zostały zupełnie pominięte (np. grzybice ośrodkowego układu nerwowego). Nie udało się też autorowi umieścić w atlasie dobrego zdjęcia komórek plazmatycznych, które posiadałyby wszystkie cechy, charakteryzujące te elementy na terenie płynu mózgowo-rdzeniowego.

Mimo tych, niewielkich zresztą niedostatków, omawiany atlas, z jego doskonałą szatą graficzną i rzeczowym tekstem, należy uznać za dzieło bardzo udane, a wszystkim pracownikom diagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego — życzyć możliwości szybkiego nabycia tej książki, której wartość w pracy codziennej będzie zapewne bardzo duża.

Jerzy Kulczycki

T R E Ś Ć

H. Drac: Zmiany histologiczne w nerwach obwodowych w rdzeniowym zaniku mięśni Werdniga-Hoffmanna	1
G. Szumańska, M. Spatz: Wpływ octanu metylazoksymetanolu (MAMA) podanego śródciążowo na kształtowanie się zmian histochemicznych w mózgu szczura w różnych okresach jego rozwoju	17
J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak: Zmiany w budowie mikroskopowo-elektronowej przysadki szczura pod wpływem morfiny. I. Płat gruczołowy przysadki	33
J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak: Zmiany w budowie mikroskopowo-elektronowej przysadki szczura pod wpływem morfiny. II. Płat nerwowy przysadki	47
M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, B. Gajkowska: Wpływ D-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej w hodowli tkankowej	57
G. Szumańska, M. Sikorska, R. Gadamski: Wpływ ostrego zatrucia tlenkiem węgla na zachowanie się amin katecholowych w mózgu szczura. Badania histochemiczno-fluorescencyjne i biochemiczne	75
J. Pachecka, A. Suliński, K. Traczykiewicz: Wpływ ostrego zatrucia dichlorofosem i trichlorfonem na aktywność niektórych esteraz w mózgu szczura	85
I. B. Zelman, A. Pronaszko-Kurczyńska: Zaburzenia mikrokrazenia w mózgu szczurów w ostrej encefalopatii ouabainowej	93
D. Markiewicz, D. Ostrowska. Zmiany podrgawkowe w mózgu myszy z padaczką audiogenną	107
M. Dąbmska, L. Dydyk, M. Liebhart, I. Roszkowski, J. Szamborski: Zmiany w mózгах noworodków w następstwie uszkodzenia zespołu płód-łożysko	119
B. Schmidt-Sidor, D. Pietrow, K. Jezierska: Przypadek noworodka bezmózgiego z heterotopowym umiejscowieniem tkanki nerwowej w płucu	129
D. Schreiber, H. Wessel, A. Musil: Guzy mózgu wywołane metylnitrozomocznikiem. Wpływ cyklu dobowego na powstawanie nowotworów	137
F. W. Rath, W. Jänisch: Kwaśne fosfatazy w ludzkich guzach mózgu	145
A. Kamińska, K. Mrozek, J. Rafałowska: Doświadczalna miastenia	153
Ocena książek nadesłanych	163

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Х. Драц: Гистологические изменения в периферических нервах при спинномозговой атрофии мышц Верднига-Гофмана	1
Г. Шуманьска, М. Шпац: Влияние метилазоксиметаноноктана (МАМА), подаваемого во время беременности, на картину гистохимических изменений в мозге крысы в различные периоды его развития	17
Е. В. Борович, А. Даниелевич-Котович, Р. Марыняк: Изменения в электронно-микроскопическом строении гипофиза крысы под влиянием морфия. I. Железистая доля гипофиза	33
Е. В. Борович, А. Даниелевич-Котович, Р. Марыняк: Изменения в электронно-микроскопическом строении гипофиза крысы под влиянием морфия. II. Нервная доля гипофиза	47
М. Я. Моссаковский, З. Красьницка, Б. Гайковска: Влияние D-пенициламина на картину печеночной глиопатии в культуре ткани	57
Г. Шуманьска, М. Сикорска, Р. Гадамски: Влияние острого отравления окисью углерода на поведение катехоламинов в мозгу крысы	75
Я. Пахецка, А. Сулиньски, К. Трачыкевич: Влияние острого отравления дихлорфосом и трихлорфоном на активность некоторых эстераз в мозге крысы	85
И. Б. Зельман, А. Пронашко-Курчынська: Нарушения микроциркуляции в мозге крыс при острой оубаиновой энцефалопатии	93
Д. Маркевич, Д. Островска: Изменения в мозгу мыши после припадков аудиогенной эпилепсии	107
М. Домбска, Л. Дыдык, М. Либхарт, И. Рошковски, Ю. Шамборски: Изменения в мозгу новорожденных вследствие повреждения комплекса плод-плацента	119
Б. Шмит-Сидор, Д. Петров, К. Язерска: Случай новорожденного без мозга с гетеротропной локализацией нервной ткани в легких	129
Д. Шрейбер, Х. Вессел, А. Мусил: Опухоли мозга, вызванные метилнитрозомочевником. Влияние суточного ритма на образование опухолей	137
Ф. В. Рат, В. Яниш: Кислые фосфатазы в опухолях мозга человека	145
А. Каминьска, К. Мрожек, Я. Рафаловска: Экспериментальная миастения	153
Рецензии	163

CONTENTS

H. Drac: Histological changes in peripheral nerves in spinal Werdnig-Hoffmann muscular atrophy	1
G. Szumańska, M. Spatz: Histochemical investigation of experimental microencephaly induced by methylazoxymethanol acetate (MAMA)	17
J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak: Electron-microscopic changes in rat hypophysis induced by morphine. I. Adenohypophysis	33
J. W. Borowicz, A. Danielewicz-Kotowicz, R. Maryniak: Electron-microscopic changes in rat hypophysis induced by morphine. II. Neurohypophysis	47
M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, B. Gajkowska: Effect of D-penicillamine on the hepatic gliopathy in tissue culture	57
G. Szumańska, M. Sikorska, R. Gadamski: Effect of acute carbon monoxide intoxication on rat brain catecholamines	75
J. Pachecka, A. Suliński, K. Traczykiewicz: The effect of acute intoxication by Dichlorvos and Trichlorphon on the activities of some rat brain esterases	85
I. B. Zelman, A. Pronaszko-Kurczyńska: Microcirculation disorders in rat brain in acute ouabain encephalopathy	93
D. Markiewicz, D. Ostrowska: The changes in the mouse brain evoked by the audiogenic epileptic fits	107
M. Dąbbska, L. Dydyk, M. Liebhart, I. Roszkowski, J. Szamborski: Changes in the brain of newborns resulting from the damage to foetus-placenta complex	119
B. Schmidt-Sidor, D. Pietrow, K. Jezierska: A case of anencephaly with heterotopic nerve tissue in the lung	129
D. Schreiber, H. Wessel, A. Musil: Brain tumour induction by methylnitrosourea. Influence of the circadian rhythm on tumour induction by nitrosourea	137
F. W. Rath, W. Jänisch: Acid phosphatases in human brain tumours	145
A. Kamińska, K. Mrożek, J. Rafałowska: Experimental myasthenia	153
Books review	163

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

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

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

Warunkiem przyjęcia pracy jest oświadczenie autora, że praca nie była drukowana w innym czasopiśmie oraz pisemna zgoda kierownika placówki/ek na jej opublikowanie.

Objętość pracy oryginalnej nie powinna przekraczać wraz z pełną dokumentacją (streszczenie, piśmiennictwo, tabele, wykresy, ryciny itp.) 20 stron, pracy kazuistycznej — 10 stron.

Prace należy przesyłać w 2 egzemplarzach w znormalizowanym maszynopisie (4-cm margines z lewej strony, 30 wierszy na stronę z zachowaniem podwójnego odstępu, bez odręcznych poprawek i podkreśleń).

Wykaz piśmiennictwa, ułożony alfabetycznie, powinien obejmować wyłącznie pozycje cytowane w pracy. W wykazie piśmiennictwa podaje się nazwiska i inicjały wszystkich autorów, tytuł pracy, nazwę czasopisma, rok, tom, pierwszą i ostatnią stronę publikacji. W przypadku źródeł książkowych — nazwisko(a) i inicjał(y) autorów, tytuł książki (ew. rozdziału), wydawcę, miejsce i rok wydania. W tekście należy podać nazwisko autora(ów) oraz rok publikacji. W przypadku, gdy autorów cytowanej pozycji jest więcej niż dwóch, należy podać nazwisko pierwszego autora ze skrótem „i wsp.”.

Ryciny ograniczone do niezbędnych powinny być oznaczone kolejnymi numerami. Wskazane jest zestawienie rycin w tablice zbiorcze o wymiarach 12,5 × 19 cm.

Redakcja prosi o nadsyłanie objaśnień i podpisów do tabel, schematów i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania koniecznych poprawek stylistycznych i zmniejszania ilości rycin bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca maszynopisów nadesłanych prac.

Redakcja prosi autorów o dokładne sprawdzenie tekstów apelując o zwięzłość, przejrzysty układ pracy oraz staranne przygotowanie materiału ilustracyjnego.

Autorzy otrzymują pierwszą korektę pracy. W korekcie Redakcja uwzględni jedynie błędy literowe oraz poprawki pomyłek drukarskich.

Autorzy prac zamieszczonych w *Neuropatologii Polskiej* otrzymują honorarium wg ustalonych stawek oraz 25 odbitek na koszt autora.

WARUNKI PRENUMERATY

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

Prenumeratę 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 społecznej, 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