

49
~~Wojciesz~~

epz 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

Łc / 404

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XVII

1979

ZESZ. 1

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

K W A R T A L N I K

Tom XVII

STYCZEŃ-MARZEC

Nr 1

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Mirostaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Smiałek* (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*, *Mirostaw Mossakowski*, *Ewa Osetowska*
Mieczysław Wender

REDAKCJA

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

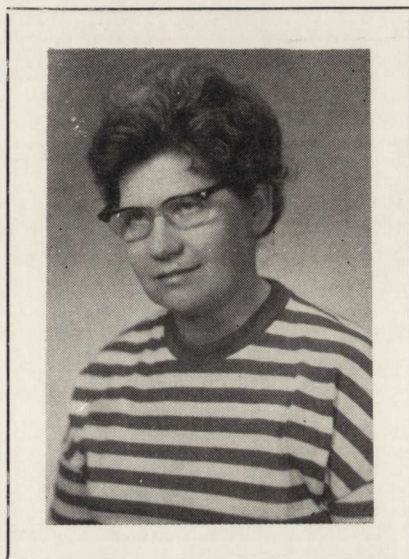
ADRES REDAKCJI

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

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

<http://rcin.org.pl>



EWA OSETOWSKA

1919—1978

Dnia 9 stycznia 1978 roku zmarła po długotrwałej chorobie prof. dr med. Ewa Osetowska, Kierownik Ośrodka Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Mińsku Mazowieckim, inicjator i współzałożyciel Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, twórca i wieloletni redaktor „Neuropatologii Polskiej”.

Ewa Osetowska urodziła się w roku 1919 w Mińsku Mazowieckim. Po ukończeniu Liceum Ogólnokształcącego im. M. Konopnickiej w Warszawie w roku 1937 podjęła studia lekarskie na Uniwersytecie Warszawskim. W okresie okupacji kontynuowała je na podziemnym uniwersytecie w Warszawie, pracując jednocześnie w II Klinice Chirurgicznej Szpitala Klinicznego. Dyplom lekarza uzyskała w lutym 1945 roku na wydziale lekarskim odrodzonego Uniwersytetu Warszawskiego. Stopień naukowy doktora medycyny nadała jej Rada Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego w roku 1949 na podstawie pracy „Objawy

neurologiczne w chorobie Pageta”, wykonanej pod kierunkiem prof. A. Opalskiego. Tytuł naukowy docenta nadała jej Centralna Komisja Kwalifikacyjna w roku 1955 na podstawie całokształtu dorobku naukowego oraz pracy nt.: „Próba interpretacji patofizjologicznej wyników klinicznego badania afazji ruchowej” przygotowanej w Instytucie Psychoneurologicznym. Profesorem nadzwyczajnym została w roku 1963.

Okres 10 lat po uzyskaniu dyplomu lekarza wypełnia Jej działalność kliniczna, początkowo w Klinice Neurochirurgii, następnie w Klinice Neurologii Uniwersytetu Warszawskiego, a od roku 1952 w Instytucie Psychoneurologicznym w Pruszkowie. Tu przechodzi kolejne szczeble kariery pomocniczego pracownika naukowego do stanowiska adiunkta i ordynatora oddziału. Już jako doświadczony i wypróbowany neurolog-klinicysta ukierunkowuje swoje zainteresowania na zagadnienia patomorfologii układu nerwowego. Przechodzi w roku 1955 do pracy w Zakładzie Histopatologii Układu Nerwowego PAN prowadzonego przez prof. Adama Opalskiego. W Zakładzie tym zostaje adiunktem, a w krótkim czasie docentem. W roku 1957 zostaje zastępcą kierownika Zakładu, pozostając na tym stanowisku do czasu przejścia na emeryturę profesora Opalskiego. Pierwsze lata pracy w Zakładzie wypełnia Jej działalność organizacyjna, pomoc choremu już profesorowi Opalskiemu w prowadzeniu placówki i w kształceniu początkowo czworga, a następnie sześciorga asystentów i aspirantów. Jest to jednak przede wszystkim intensywne poznawanie neuropatologii, która mimo uprzednich kontaktów w Klinice Neurologicznej i Instytucie Psychoneurologicznym jest dla Niej dziedziną nową, jest to równocześnie wchodzenie w problematykę badawczą w tej dziedzinie. W latach 1958 i 1959 odbywa dwa długoterminowe staże naukowe w Instytucie Bunge w Antwerpii pod kierunkiem prof. Ludo van Bogaerta. One to i naukowa inspiracja Jej drugiego nauczyciela wywierają decydujący wpływ na dalszy rozwój naukowy Ewy Osetowskiej, krystalizują kierunki Jej zainteresowań badawczych i otwierają przed Nią nowe drogi poszukiwań i działań. Po powrocie do kraju obejmuje kierownictwo Pracowni Warszawskiej Zakładu Neuropatologii, składającego się już w tym czasie z Pracowni Warszawskiej i Krakowskiej, a kierowanego w całości przez prof. Adama Kunickiego. Objęcie kierownictwa Pracowni Warszawskiej, a następnie w roku 1963 kierownictwa Zakładu Neuropatologii otwiera najintensywniejszy i najbardziej płodny okres Jej działalności naukowej, organizacyjnej, dydaktycznej i wychowawczej. W okresie tym powstaje ponad dwie trzecie Jej dorobku naukowego, doktoryzuje 20 adeptów neuropatologii, a 5 Jej współpracowników uzyskuje stopień docenta. Skupia wokół siebie i kierowanej przez siebie placówki grono neurologów i patologów zainteresowanych neuropatologią, pracujących w in-

nych ośrodkach krajowych, inspiruje ich, kształci, pomaga w zorganizowaniu własnych placówek, doktoryzuje i habilituje. Inicjuje powstanie Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, kierując jego działalnością przez okres lat sześciu. Z Jej inicjatywy również zaczyna ukazywać się czasopismo „Neuropatologia Polska”, stanowiące początkowo organ Zakładu Neuropatologii PAN, a następnie od roku 1969 — Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich. Prof. E. Osetowska redaguje je przez okres kilku najtrudniejszych, bo początkowych lat. Uczestniczy aktywnie w działalności nowopowstałej Światowej Federacji Neurologii będąc współorganizatorem i członkiem jej grupy neuropatologicznej. Bierze udział w redagowaniu czasopisma „Acta Neuropathologica”, pozostając w jego zespole redakcyjnym do końca życia. Wchodzi w skład zespołu redakcyjnego Journal of Neurological Sciences, stanowiącego organ Światowej Federacji Neurologii. Jest współzałożycielem Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologii, przez wiele lat reprezentując w nim Stowarzyszenie Neuropatologów Polskich, oraz będąc członkiem jego zarządu głównego.

Z chwilą powstania w roku 1967 Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, prof. Ewa Osetowska podejmuje trud zorganizowania w nim nowej jednostki, a zarazem młodej, na gruncie polskim całkowicie uprzednio nieznaney dziedziny — neuropatologii i neurologii porównawczej. Od roku 1967 kieruje pracownią, a od 1971 zorganizowanym przez siebie Ośrodkiem Neurologii Porównawczej Centrum w Mińsku Mazowieckim, w rodzinnym mieście i rodzinnym domu.

W dorobku naukowym Ewy Osetowskiej, obejmującym łącznie około 150 publikacji wyróżnić można dwa zasadnicze nurty tematyczne — kliniczny i neuropatologiczny, z tym jednak, że wątek kliniczny i cele kliniczne stanowią cechę dominującą i tego drugiego.

Nurt kliniczny reprezentują publikacje pochodzące z najwcześniejszego okresu działalności Ewy Osetowskiej, związanego z Warszawską Kliniką Neurologiczną i Instytutem Psychoneurologicznym. Obejmują one stosunkowo zróżnicowaną tematykę kliniczną z wybijającą się na czoło problematyką diagnostyki i leczenia gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Z tego okresu pochodzi również monograficzne opracowanie obrazu neurologicznego choroby Pageta, stanowiące pracę na stopień doktora medycyny. Opublikowana w roku 1955 praca „Próba interpretacji patofizjologicznej wyników klinicznego badania afazji ruchowej”, przygotowywana jako rozprawa habilitacyjna, stanowi wynik współpracy Ewy Osetowskiej klinicysty-neurologa z zespołem fizjologicznym prof. Jerzego Konorskiego.

Niezwykle bogaty i wszechstronny dorobek neuropatologiczny Ewy Osetowskiej dotyczy wszystkich niemal dziedzin patologii ośrodkowego

układu nerwowego. Jego cechą wiodącą było ściśle wiązanie zjawisk patomorfologicznych spostrzeganych w chorym mózgu z obserwacjami klinicznymi i podporządkowanie podstawowemu pryncypium, że praca neuropatologa służyć ma lepszemu zrozumieniu zjawisk klinicznych i wyjaśnianiu mechanizmów procesu chorobowego. Ta zasada w jednakowej mierze dotyczyła Jej opracowań z zakresu neuropatologii klinicznej, jak i licznych prac z dziedziny neuropatologii porównawczej, opartych o materiał zwierzęcy. Jest rzeczą zdumiewającą jak wiele bezpośrednich odniesień do kliniki neurologicznej człowieka znaleźć można w Jej pracach poświęconych patologii układu nerwowego zwierząt, nawet wówczas gdy dotyczyły one procesów niezwykle odległych od kliniki ludzkiej. Ewa Osetowska była w istocie rzeczy badaczem monowarsztatowym. Jej podstawowym narzędziem badawczym był mikroskop świetlny. W dobie szeroko rozbudowanych metodycznych warsztatów naukowych, niezwykle bogatych inowacji technicznych, które do swojego arsenału włączyła współczesna patologia, wydawać by się mogło, że takie ograniczenie zawęży w założeniu zakres twórczości naukowej i możliwość wniesienia nowych i oryginalnych wartości. Cały dorobek naukowy Ewy Osetowskiej jest zaprzeczeniem tej tezy. Stanowi on znakomitą rehabilitację diagnostycznej neuropatologii, pokazując jak wiele autentycznie nowego, oryginalnego, twórczego i pożytecznego wnosić może nadal prosta obserwacja mikroskopowa, pod warunkiem jednakowoż posiadania umiejętności rozumienia i wykorzystania tych spostrzeżeń, oraz ich łączenia z głęboką wiedzą ogólnobiologiczną i doświadczeniem klinicznym. Neuropatolog kliniczny może być „opisywaczem” zjawisk lub twórcą wiedzy, pracując na tym samym materiale i posługując się tym samym warsztatem metodycznym. Ewa Osetowska z całą pewnością reprezentowała tę drugą kategorię.

W zróżnicowanej problematyce prac naukowych Ewy Osetowskiej, przewija się kilka wyraźnych nurtów tematycznych, które ze świadomego wyboru rozwija najbogaciej, nawracając do nich w kolejnych etapach swojej działalności, rozbudowując je i uzupełniając w dążeniu do stworzenia zwartej i jednoznacznej syntezy. Problematyka ta dotyczy w pierwszej kolejności pierwotnych zapaleń mózgu, głównie wirusowych i alergicznych, oraz wewnątrz- i zewnątrzpochodnych encefalopatii, zarówno tych wywołanych przez znane czynniki uszkodzające, jak i tych, których źródła przyczynowe i mechanizmy patogenetyczne pozostają nadal nie wyjaśnione. Stałym przedmiotem Jej zainteresowań były wzajemne zależności procesu zapalnego i encefalopatycznego, oraz pogranicza różnorodnych procesów patologicznych. Stąd też odkrycie tzw. wirusów powolnych, mogących warunkować procesy zwyrodnieniowe układu nerwowego, a wśród nich genetycznie uwarunkowane sta-

nowiło istotny moment przełomowy w Jej twórczości, jako zjawisko zbieżne z Jej wieloma poprzednimi spostrzeżeniami patomorfologicznymi i koncepcjami patofizjologicznymi.

W kręgu tematycznym poświęconym zapaleniom mózgu znajdują się prace poświęcone praktycznie wszystkim znanym typom zapaleń. Najpocześniejsze miejsce wśród nich zajmują badania poświęcone podostremu stwardniającemu zapaleniu mózgu, ostremu nekrotyzującemu zapaleniu mózgu, oraz zapaleniu grypowemu i reumatycznemu. W sposób oczywisty znaczną część swego dorobku poświęciła zagadnieniom patomorfologii środkowo-europejskiego kleszczowego zapalenia mózgu, występującego endemicznie i epidemicznie w Polsce. Jej właśnie pracom zawdzięczamy znajomość patomorfologii tego typu, najpospolitszego w kraju, zapalenia mózgu. Stała się w tej dziedzinie, podobnie jak zresztą w całej problematyce zapaleń ośrodkowego układu nerwowego uznanym autorytetem międzynarodowym. Wyrazem uznania Jej kompetencji w tym zakresie było powierzenie autorstwa rozdziału poświęconego kleszczowemu zapaleniu mózgu w międzynarodowym, monograficznym podręczniku wirusologii, wydanym w edycji angielskiej i francuskiej pod redakcją R. Debré i J. Celeres. Dążąc do wyjaśnienia mechanizmów zróżnicowanej formuły procesu zapalnego i jego topografii w ośrodkowym układzie nerwowym swoje studia klinicznego materiału kleszczowego, środkowo-europejskiego zapalenia mózgu uzupełnia pracami doświadczalnymi, przy użyciu różnych szczepów wirusa, oraz zróżnicowanego substratu, prowadząc je na zwierzętach o różnych stadiach rozwoju układu nerwowego, przy zastosowaniu odmiennych dróg zakażenia. Dla ich dalszego pogłębienia przeprowadza wnikliwe studia doświadczalne z innymi typami wirusów z grupy ARBO.

Zainteresowania podostрым stwardniającym zapaleniem mózgu, wyniesione ze szkoły Ludo van Bogaerta, a znajdujące swój najwcześniejszy wyraz w fundamentalnej pracy poświęconej topografii zmian patologicznych w mózgu w tym typie zapalenia i pogłębiane w licznych kolejno ukazujących się na przestrzeni ponad 15 lat pracach, doprowadziły Ją do badań na materiale wirusowych zapaleń mózgu u zwierząt, przede wszystkim do studiów nad obrazem morfologicznym nosówki nerwowej u psów, w której złożonym zespole poszukiwała cząstkowej choćby odpowiedzi na pytania związane z mechanizmami reakcji tkankowej w SSPE.

Osetowska jest autorką najwszechstronniejszych i najgłębszych opracowań poświęconych grypowemu zapaleniu mózgu oraz tzw. reumatycznemu zapaleniu mózgu. Przedmiotem Jej szczególnej fascynacji był stosunek nagminnego śpiączkowego zapalenia mózgu do współcześnie występujących zapaleń wirusowych. Zainteresowanie to wynikało prze-

de wszystkim z niezwykłości epidemiologicznej i biologicznej tej jednostki chorobowej. Zagadnieniu temu poświęciła wiele uwagi w swoich opracowaniach monograficznych i kilka oryginalnych pozycji szczegółowych.

Stosunek wirusa, wywołującego proces zapalny w mózgu do poszczególnych elementów tkanki nerwowej, a w szczególności komórek nerwowej i jego morfologiczna ekspresja stanowią inny krąg zainteresowań autorki. Zróżnicowaniu zachowania czynnika patogennego w stosunku do komórki gospodarza, poświęca szczególną uwagę w szeregu opracowań dotyczących zapaleń mózgu. Poświęca mu również odrębną publikację „Procesy zapalne 'neuronobójcze' i neurotropowe”, ukazującą się już po Jej śmierci. To samo zagadnienie, choć w odwróconym aspekcie, rozwija w szeregu pracach dotyczących zapaleń mózgu u dzieci, w których zajmuje się wpływem stopnia dojrzałości układu nerwowego na kształtowanie odpowiedzi zapalnej tkanki.

Swoje obserwacje i przemyślenia dotyczące patomechanizmów procesu zapalnego i jego eksponentów strukturalnych, oparte o szczegółowe analityczne opracowania, uogólnia w licznych pracach monograficznych. Ich prześledzenie w sekwencji czasowej pozwala na poznawanie dojrzewania ogólnej patofizjologicznej koncepcji autorki, która znalazła swój najpełniejszy wyraz w monografii „Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych”, wydanej w roku 1974. Ostatni rok życia autorka spędziła przygotowując jej angielską wersję.

Drugim kręgiem tematycznym obejmującym istotną część dorobku publikowanego prof. Ewy Osetowskiej są zagadnienia endo- i egzogennych encefalopatii. Na specjalne odnotowanie zasługują w nim prace poświęcone patologii mózgu w przebiegu chorób krążenia i oddychania oparte zarówno o ludzki materiał kliniczny jak i zwierzęcy. Odrębne miejsce w tej grupie zajmują opracowania poświęcone naczyniopochodnym uszkodzeniom pnia mózgu i rdzenia kręgowego, a wśród nich analiza substratu morfologicznego zespołu podopuszkowego, opisanego przez Opalskiego. W oparciu o własne obserwacje i spostrzeżenia wprowadziła nową klasyfikację encefalopatii mocznicowych oraz udowodniła przyżyciowy charakter zmian stanowiących podłoże cerebelopatii towarzyszących pozanerwowym nowotworom złośliwym. Jest wreszcie wraz z W. Krücke i A. Taraszewską autorką opisu cerebelopatii reumatycznych. W pracy poświęconej temu zagadnieniu ukazującej się zresztą po śmierci autorki, udowodniła Ona naczyniopochodny charakter rzekomoukładowych uszkodzeń mózdzku, towarzyszących chorobie gośćcowej. W grupie badań związanych z encefalopatiami egzogennymi na odnotowanie zasługują prace poświęcone remisyjnej encefalopatii tlenkowo-węglowej oraz encefalopatiom pourazowym, w których mechanizmie

patogenetycznym udowodniła podstawową rolę przewlekłych uszkodzeń układów barierowych mózgu.

Omawiając, choćby pobieżnie dorobek naukowy prof. Ewy Osetowskiej nie można pominąć prac poświęconych patologii neurolipidoz i leukodystrofii oraz chorób demielinizacyjnych. W grupie tej, obejmującej szczegółowe, analityczne opracowania poszczególnych typów neurolipidoz i leukodystrofii, szczególną uwagę zwracają prace, w których autorka omawia wzajemne relacje między procesami spichrzeniowymi i leukodystroficznymi, odnosząc zresztą te ostatnie do innej grupy chorób objętych zbiorczą nazwą leukoencefalopatii. W pracach tych najbardziej wyraża się wspomniany uprzednio charakterystyczny rys twórczości Ewy Osetowskiej — równoczesne poszukiwanie styków patogenetycznych i odrębności wyrazu patomorfologicznego, podporządkowane dyscyplinie myślenia kategoriami klinicznymi. Właściwości te wyraziły się również znakomicie w pracach poświęconych chorobom demielinizacyjnym, w tym w publikacjach dotyczących przejściowych postaci stwardnienia rozsianego i rozlanego oraz topografii ognisk demielinizacyjnych w stwardnieniu rozsianym. W najbardziej jednak klinicznie zorientowanych pracach, Osetowska-badacz nie traci z zasięgu pola widzenia podstawowych zagadnień ogólnobiologicznych. Dokumentuje to w sposób niezwykle przekonujący w studium nad morfogenezą włókien Rosenthala, rozwijających się na podłożu ognisk demielinizacyjnych w stwardnieniu rozsianym.

Dążenie do pogłębienia znajomości mechanizmów chorób układu nerwowego u ludzi oraz poszukiwanie odpowiedzi na pytania, których nie znajduje w skrawkach mózgu chorego człowieka — kieruje Ewę Osetowską na nową drogę badań prowadzonych na zwierzętach. Nie dotyczą one jednakże materiału doświadczalnego, z modelami chorobowymi wytworzonymi w oderwaniu od warunków naturalnego życia zwierzęcia. Osetowskiej bliższa jest spontaniczna patologia zwierzęca, choć nie odrzuca jak widzieliśmy poprzednio patologii doświadczalnej. Wrazem tego kierunku Jej zainteresowań jest długa lista publikacji z zakresu neuropatologii porównawczej. Wśród nich istotne miejsce zajmują badania poświęcone zapaleniom mózgu u zwierząt, a zwłaszcza nosówce i toksoplazmozie, o których wspominałem poprzednio. Nie wyczerpują one jednak w żadnej mierze całości problematyki neuropatologii zwierzęcej. Mieszczą się w niej ponadto pionierskie badania nad procesami starzenia się mózgu u psów, zagadnienie wad wrodzonych u zwierząt, chorób naczyniopochodnych, chorób niedoborowych oraz ogólnej patologii zwierząt laboratoryjnych. Ten ostatni krąg zagadnień zapoczątkował Jej porównawczo-neuropatologiczne zainteresowania. Zetknąwszy się w latach sześćdziesiątych z działalnością Zakładu Hodowli Zwierząt

Laboratoryjnych PAN w Łomnie-Las, uznała, że podstawowym zadaniem placówki było dostarczanie do badań doświadczalnych wysokiej jakości z d r o w y c h zwierząt laboratoryjnych. Utrzymanie stanu zdrowia stada hodowlanego, obok właściwej opieki zootechniczno-weterynaryjnej wymagało pełnego rozeznania w jego zagrożeniach, opartego o wszechstronne badania naukowe, w tym również patomorfologiczne. Za tymi początkowo ściśle aplikacyjnymi, praktycznymi ocenami, poszły w okresie późniejszym zaplanowane, głębokie, a niejednokrotnie odkrywczycie prace badawcze, dotyczące najbardziej podstawowych mechanizmów procesu chorobowego. To właśnie dostrzeganie problematyki badawczej naukowo płodnej, interesującej i ważnej w działaniach jak najbardziej utylitarnych, wręcz usługowych, stanowi jeszcze jeden niezwykle charakterystyczny rys umysłowości Ewy Osetowskiej. Znajduje on również swoje odzwierciedlenie w cyklu prac Jej własnych, a częściowo Jej współpracowników, inspirowanych przez Nią, wykonanych na materiale małp, używanych do testu bezpieczeństwa przy produkcji szczepionki polio. Z tego właśnie, pozornie banalnego, rutynowego materiału pochodzą znakomite opracowania dotyczące odczynu tkanek mózgu na bezpośredni uraz mechaniczny, wykazując daleko idące zróżnicowanie uwarunkowane odrębnościami tkankowymi poszczególnych części i struktur ośrodkowego układu nerwowego.

W połowie lat sześćdziesiątych, w fermie hodowlanej królików w Zakładzie Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych PAN prof. Ewa Osetowska spostrzegła pojedyncze zwierzę wykazujące cechy choroby neurologicznej, charakteryzującej się grubofalowym drżeniem głowy, kończyn i tułowia, a następnie spastycznym porażeniem kończyn. Wyodrębnione kolejne osobniki z tym samym typem defektu neurologicznego stały się zaczątkiem stada hodowlanego, królików pt (paralytic tremor), obciążonych dziedziczną chorobą neurologiczną. Badaniem tego unikalnego zespołu chorobowego, stanowiącego niezwykle dogodny, naturalny model dziedziczno-zwyrodnieniowych chorób układu nerwowego, poświęciła prof. Ewa Osetowska kolejne lata swojej aktywnej działalności. On też przede wszystkim stał się podstawowym przedmiotem Jej własnych zainteresowań naukowych i badań zorganizowanego przez Nią i kierowanego Ośrodka Neurologii Porównawczej. Kolejne publikacje Ewy Osetowskiej poświęcone są obrazowi klinicznemu zespołu, cechom genetycznym choroby oraz charakterystyce morfologicznych uszkodzeń układu nerwowego królika pt. W poszukiwaniu anatomiczno-czynnościowego substratu zespołu drżeń, nie wyjaśnionego jednoznacznie w klinice neurologicznej człowieka, Ewa Osetowska oddaje się badaniom anatomiczno-funkcjonalnym zamkniętych układów ruchowych u królika pt. Uzupełnia je badaniami neurochemicznymi. Dla wyjaśnienia mechanizmu

uszkodzeń neuronalnych podejmuje badania neurocytologiczne, wykorzystuje techniki mikroskopii elektronowej. Przez cały czas bacznie śledzi zmienną dynamikę obrazu klinicznego, jej fluktuacje koreluje z odstępnościami nieprawidłowości strukturalnych. Model królika pt okazuje się rokować większe, niż poprzednio oczekiwano, nadzieje. Służy on bowiem nie tylko wyjaśnianiu mechanizmów pewnych neurologicznych zespołów chorobowych, czy też ogólnego patomechanizmu dziedzicznych chorób układu nerwowego. Stwarza on ponadto szanse poznawania pato- i morfogenezy całego szeregu procesów i odczynów patologicznych tkanki nerwowej, takich jak zwapnienia neuronalne, zwyrodnienia rozplywne komórek nerwowych, nieprawidłowości procesu tworzenia osłonek mielinowych i in. Dostrzegła to jego autorka, analizując te właśnie zagadnienia w kilku kolejnych publikacjach.

W krótkim wspomnieniu nie sposób przeprowadzić pobieżną choćby analizę dorobku naukowego człowieka tak intelektualnie bogatego i wszechstronnego oraz oddanego pracy jakim była profesor Ewa Osetowska. Można jedynie zasygnalizować jego główne kierunki i nurty. Załączony do wspomnienia spis publikacji, ma na celu zachęcenie czytelnika do zapoznania się z oryginalnym dorobkiem i ułatwienie mu jego odszukanie.

Oryginalny dorobek naukowy prof. E. Osetowskiej nie wyczerpuje listy Jej publikacji. Istotnym jej elementem są wydawnictwa podręcznikowe, wśród których na specjalne wyróżnienie zasługuje wspomniana już monografia „Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych”, redagowany przez Nią pierwszy polski „Atlas Neuropatologiczny”, rozdziały w międzynarodowym podręczniku neuropatologii, wydany przez J. Mincklera oraz rozdziały w podręczniku Wirusologii R. Debré i J. Celersa. Na liście tej znajdują się liczne artykuły z dziedziny publicystyki naukowej, wspomnienia, sprawozdania, zawsze pełne osobistych sądów i przekonań, a nierzadko wyraźnie polemicznych akcentów.

Obok nurtu badawczego w życiu prof. E. Osetowskiej mieściła się bogata działalność dydaktyczna. Uczyła od początków swojej kariery naukowej. Lubiła uczyć i posiadała nieczęsty talent nauczania. Z jednakową jasnością, precyzją i żarliwością uczyła za katedrą uniwersytecką, przy mikroskopie, za stołem laboratoryjnym i przy klatce z królikami. Jednakowo żarliwie — doktorantów, lekarzy, studentów, laborantów i pomocce laboratoryjne. Jej zacięcie dydaktyczne znajdowało wyraz w Jej publikacjach nie tylko podręcznikowych, wymienionych powyżej, lecz także w jej oryginalnych pracach naukowych. Każda z nich miała nie tylko zawierać określony ładunek poznawczy, miała również uczyć. Ta właśnie chęć nauczania i autentyczny talent dydak-

tyczny, a nie tylko fakt, że przyszło Jej działać w okresie powstawania neuropatologii w Polsce i uczestniczyć w jej tworzeniu, sprawiły, że promowała bardzo wiele doktoratów z neuropatologii i opiekowała się największą liczbą przewodów habilitacyjnych.

Sylwetka profesor Ewy Osetowskiej byłaby niewątpliwie niepełna gdyby pominąć Jej działalność organizacyjną. Odziedziczywszy po swoim wielkim nauczycielu — prof. Adamie Opalskim skromny Zakład Histopatologii Układu Nerwowego rozwija go, czyniąc zeń w krótkim czasie uznaną placówkę badawczą cieszącą się wysokim krajowym i międzynarodowym autorytetem naukowym. Wkrótce Jej inicjatywa i potrzeba działania przerasta mury własnego Zakładu. Inspiruje powstanie jego pracowni krakowskiej. Wokół Zakładu Neuropatologii PAN kreuje polskie środowisko neuropatologiczne. Inicjuje powstanie Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, tworzy pierwsze w Polsce, a jedno z nielicznych na świecie, specjalistyczne neuropatologiczne czasopismo naukowe. Działa w licznych zagranicznych towarzystwach naukowych, w tym jako członek Belgijskiego Towarzystwa Neurologicznego i Niemieckiego Towarzystwa Neuropatologów i Neuroanatomów. Bierze udział w pracach szeregu międzynarodowych organizacji naukowych, uczestniczy w redakcjach krajowych i międzynarodowych czasopism. W Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN tworzy Ośrodek Neurologii Porównawczej. Organizuje zjazdy i sympozja naukowe. Aktywnie uczestniczy w życiu politycznym jako członek Polskiej Zjednoczonej Partii Robotniczej.

Chora, nie przerywa swojej działalności. Kieruje Ośrodkiem, udziela konsultacji, uczy i publikuje. Do ostatnich niemal dni, walcząc z chorobą przygotowuje angielskie wydanie „Neuropatologii zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych”.

Od działania odrywa Ją śmierć.

Śmierć zabrała jednego z najwybitniejszych neuropatologów polskich, badacza, organizatora i nauczyciela, który swoją pracę naukową traktował jako cel najwyższy i źródło osobistej satysfakcji i radości. Pożegnaliśmy w Profesor Ewie Osetowskiej niezwykłego człowieka, człowieka wielkiego talentu, wielkich ambicji i możliwości i wielkiej pracy. Pożegnaliśmy w Niej niepowседневne życie, bogate, intensywne i wszechstronne, w którym harmonijnie łączyły się oryginalne osiągnięcia badacza, sukcesy nauczyciela i wychowawcy, talent i pasja organizatora oraz szerokie pozazawodowe zainteresowania humanisty — sztuka, poezja, filozofia... Tym boleśniesz było odejście w okresie dojrzałego działania, bogatych doświadczeń i zasłużonego uznania.

Warszawa, lipiec 1978

Miroslaw J. Mossakowski

SPIS PUBLIKACJI PROF. DR MED. EWY OSETOWSKIEJ

1. E. Osetowska: Objawy neurologiczne w chorobie Pageta. Lek. Inst. Nauk.-Wyd. Warszawa, 1949, 1—34.
2. E. Osetowska-Więckowska: Leczenie streptomycyną gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u dorosłych. Neurol. Pol. 1950, 24, 59—74.
3. E. Osetowska-Więckowska: Przypadek uszkodzenia wszystkich odcinków drogi korowo-mięśniowej u dwuletniej dziewczynki z objawami miastenii. Pol. Tyg. Lek. 1953, 8, 3—15.
4. E. Osetowska-Więckowska: Nowe poglądy na patogenezę zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego. Próba leczenia B.A.L-em. Pol. Tyg. Lek. 1955, 10, 3—20.
5. E. Osetowska-Więckowska: Objawy kliniczne naczyniaków mózgu. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1955, 3, 267—276.
6. E. Osetowska-Więckowska: Przebieg kliniczny leczonego gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1955, 4, 367—382.
7. E. Osetowska-Więckowska: Próba interpretacji patofizjologicznej wyników klinicznego badania afazji ruchowej. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1955, 4, 605—621.
8. E. Osetowska-Więckowska: Sur une forme spéciale de pseudosyringomyélie. Rev. Neurol. 1955, 95, 310—320.
— O szczególnej postaci rzekomej jamistości rdzenia. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1957, 6, 217—227.
9. E. Osetowska-Więckowska: Płyn mózgowo-rdzeniowy. A. Patofizjologia płynu mózgowo-rdzeniowego w gruźliczym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. „Gruźlica”. Red. E. Hornung. Warszawa, PZWL, 1957, 161—176.
10. E. Osetowska-Więckowska: Histopatologia leczonego gruźliczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Rozpr. Wydz. Nauk Med. 1958, III, 51—102.
— Histopatology of treated tuberculous meningitis. (Treatises of the Section of Medical Sciences). PWN, Warszawa, 1963, 33—77.
11. E. Osetowska: Note préliminaire sur la topographie des lésions cérébrales dans la leucoencéphalite sclérosante subaiguë. Rev. Neurol. 1959, 100, 118—129.
12. E. Osetowska: Podostre zapalenie mózgu van Bogaerta. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1960, 10, 347—354.
13. E. Osetowska: Aktualne postaci pierwotnych zapaleń mózgu. Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 3—20.
14. E. Osetowska, H. Gail, D. Lukasewicz, D. Karcher, H. Wiśniewski: Leucodystrophie infantile précoce (type Krabbe). Remarques sur les prolifération gliales et les atrophies de système qui peuvent s'y observer. Rev. Neurol. 1960, 102, 463—477.
15. E. Osetowska: Klasyfikacja neuropatologiczna zapaleń mózgu. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1961, 11, 1—9.
16. Z. W. Kuligowski, E. Osetowska: Podostre zapalenie mózgu (van Bogaerta) u chorych dorosłych. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1961, 11, 11—19.
17. E. Osetowska: Trudności rozpoznawcze w przebiegu podostrego zapalenia mózgu van Bogaerta. Neurol. Neurochir. Psych. Pol. 1961, 11, 161—167.

18. E. Osetowska: Przyczynek do powstawania ognisk rozsianej demielinizacji w przebiegu zatorów tłuszczowych mózgu. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1961, 11, 721—724.
19. E. Osetowska, Z. Kraśnicka: Rodzinna leukodystrofia typu Krabbe powikłana odczynem poszczepiennym mózgu. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1961, 11, 851—855.
20. E. Osetowska, I. Zelman, M. Mossakowski: Postać przejściowa stwardnienia rozsianego i rozlanego mózgu. *Patol. Pol.* 1961, 12, 381—390.
21. E. Osetowska: Encefaloty i encefalopatie. (Próba systematyzacji podstawowych pojęć neuropatologicznych). *Pediat. Pol.* 1961, 36, 415—421.
22. E. Osetowska, T. Mandybur: Pierwotne reumatyczne zapalenie mózgu. *Pol. Tyg. Lek.* 1961, 16, 2—19.
23. E. Osetowska, J. Czochońska-Kruk, I. Zelman: Niesklasyfikowany przypadek nietypowego zapalenia mózgu lub zaczynającego się procesu nowotworowego. *Pediat. Pol.* 1961, 36, 1161—1169.
24. E. Osetowska: Cechy i topografia uszkodzeń w podostrym zapaleniu mózgu van Bogaerta. *Pol. Tyg. Lek.* 1961, 16, 3—16.
25. J. Gutewa, E. Osetowska: A chronic form of subacute sclerosing encephalitis. (A case with a history of five years). Clinical and pathological study. W: „Encephalitides”. Elsevier, Amsterdam, 1961, 386—404.
26. L. van Bogaert, H. Jędrzejowska, E. Osetowska: Acute necrotizing encephalitis accompanied by ulcerative stomatitis. W: „Encephalitides”. Elsevier, Amsterdam, 1961, 206—212.
27. E. Osetowska: The distribution of telencephalic lesions in subacute sclerosing leucoencephalitis. (Pathological examination of 50 cases). W: „Encephalitides”. Elsevier, Amsterdam, 1961, 414—469.
28. E. Osetowska, Z. Kraśnicka: Sur le syndrome sous-bulbaire d'Opalski avec une étude anatomique. (Contribution aux aspects paradoxaux du syndrome de Wallenberg). *Rev. Neurol.* 1961, 104, 314—320.
29. E. Osetowska, I. Zelman: Observation anatomo-clinique d'une encéphalite postvaccinale débutant deux jours après la vaccination. *Acta neuropath.* 1961, 1, 201—205.
30. E. Osetowska, L. Iwanowski: Encéphalopathie infantile évolutive avec nécroses. *Proc. IV Inter. Congr. Neuropath.* Ed. H. Jacob. Thieme, Stuttgart, 1962, III, 64—75.
31. E. Osetowska, W. Borak: Podostre zapalenie mózgu van Bogaerta z wybiórczym uszkodzeniem prądkowia. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1962, 12, 117—121.
32. E. Osetowska, K. Ważna, D. Markiewicz-Czapska: Przypadek zapalenia mózgu po szczepieniu przeciwko wścieklicznie. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1962, 12, 123—126.
33. E. Osetowska, L. Iwanowski, Z. Czechowska: Choroba Fahra — jednostka chorobowa czy zespół objawowy? *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1962, 12, 345—350.
34. E. Osetowska, Z. Kraśnicka, A. Koelichen: Cytotoksyczne uszkodzenie istoty szarej w przebiegu niesklasyfikowanego zapalenia mózgu. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1962, 12, 427—431.
35. E. Osetowska, N. Gładzin: Przypadek zapalenia mózgu o cechach patologicznych encephalitis japonica B. *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* 1962, 12, 615—618.

36. E. Osetowska: Observations on healing of post-traumatic lesions of the brain and spinal cord in rhesus monkeys. *Acta Med. Pol.* 1962, 3, 377—394.
37. E. Osetowska: Próba systematyzacji zmian w mózgu w przebiegu chorób serca i płuc. *Pol. Tyg. Lek.* 1962, 17, 3—20.
38. E. Osetowska, Z. Kraśnicka: Les lésions des noyaux des nerfs craniens dans les différentes conditions morbides. *Acta neuropath.* 1962, 1, 450—462.
39. E. Osetowska: Une encéphalite lymphocytaire aiguë. *Livre Jubilaire du Dr Ludo van Bogaert. Acta Medica Belgica, Bruxelles, 1962, 608—615.*
40. E. Osetowska: Trois cas de lésions latérales du bulbe et de la moëlle subulbaire. *Pamiętnik Zjazdu Neurologów Węgierskich. Budapest, 1962, 326—337.*
— Trzy przypadki bocznego uszkodzenia opuszki i rdzenia podopuszkowego. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 111—119.
41. E. Osetowska, P. Torck: Subacute sclerosing leucoencephalitis: analysis of complementary features. *World Neurology*, 1962, 3, 566—579.
42. E. Osetowska, I. Zelman: Caractères neuropathologiques de l'encéphalite grippale en Pologne. *Acta Neuropath.* 1963, 2, 328—333.
43. E. Osetowska: Une pseudo-syngomyélie chez le chien. *Acta neuropath.* 1963, 2, 388—401.
44. E. Osetowska: Une encéphalite du tronc cérébrale chez le lapin. *Acta neuropath.* 1963, 3, 82—85.
45. E. Osetowska: Wirusowe zapalenie mózgu. W: „Symposium Medycyny Współczesnej”, t. II, PZWL, Warszawa, 1963, 501—510.
46. B. Żernicki, E. Osetowska: Conditioning and differentiation in the chronic midpontine pretrigeminal cat. *Acta Biol. Exper.* 1963, 23, 25—32.
47. E. Osetowska, N. Gładzin: Możliwości i granice diagnostyki neuropatologicznej we wściekłości. (*Encephalitis rabica*). *Pol. Tyg. Lek.* 1963, 18, 1—19.
— Possibilities and limits of neuropathological diagnosis of rabies (*Encephalitis rabica*). *Pol. Med. J.* 1963, 2, 726—738.
48. E. Osetowska: Zaniki kory mózdzku w przebiegu raka narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 91—100.
49. E. Osetowska, M. J. Mossakowski: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w stanach mocznicowych. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 101—122.
— Changes in the central nervous system in uremic conditions. *Pol. Med. J.* 1964, 3, 422—460.
50. E. Osetowska: Wstęp klasyfikacyjny do zagadnień patologii krążenia ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.* 1963, 2, 9—24.
51. E. Osetowska: Encefalopatia-CO. *Neuropat. Pol.* 1964, 2, 159—172.
52. E. Osetowska: Urazy mózgu a encefalopatie pourazowe. *Neuropat. Pol.* 1964, 2, 167—190.
53. E. Osetowska: Lipidozy i leukodystrofie. *Symposium Medycyny Współczesnej. T. III, PZWL, Warszawa, 1964, 331—345.*
54. E. Osetowska, H. Traczyńska: Sur l'ataxie avec télangiectasie, une observation anatomo-clinique. *Acta neuropath.* 1964, 3, 319—325.
55. E. Osetowska, I. Zelman: Greenfield's metachromatic leukodystrophy with unusual amount of pigment. *Acta neuropath.* 1964, 4, 234—237.
56. E. Osetowska: Neuropathological verification of tick-borne encephalitis. *Neurological Problems* 1964, 215—219.
57. E. Osetowska, T. Tylicka: Sur une idiotie amaurotique infantile tardive à sémiologie anatomo-clinique complexe. *J. neurol. Sci.* 1964, 1, 361—373.

58. E. Osetowska: La leuco-encéphalopathie oedémateuse post-traumatique. *J. neurol. Sci.* 1964, 1, 458—466.
59. E. Osetowska, I. Zelman: Beitrag zur Frage der Grippenzephalitis. W: „Encéphalites actuelles”. Sofia, 1964, 256—263.
60. E. Osetowska: Contribution de Charles Schaffer à la connaissance de la pathologie neuronale. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 1965, 21, 445—448.
— Neuronopatologia Karola Schaffera. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 225—230.
61. E. Osetowska: Toksoplazmoza mózgu i encefalitozoonozy u zwierząt laboratoryjnych. *Zwierzęta Lab.* 1965, 3, 130—145.
62. E. Osetowska, H. Wiśniewski, J. Dembowski: Rodzinno-dziedziczna ataksja u królika laboratoryjnego — szynszyla. *Zwierzęta Lab.* 1965, 3, 161—176.
63. E. Osetowska: Scrapie — choroba niezwykła. *Zwierzęta Lab.* 1965, 3, 197—208.
64. E. Osetowska: Étude comparée de l'encéphalite à toxoplasmes chez l'adulte, chez le nouveau-né et chez le chien. *J. neurol. Sci.* 1965, 2, 126—139.
65. E. Osetowska, H. Wiśniewski, Z. Wróblewska-Mularczyk: Topografia zmian tkankowych a umiejscowienie wirusa w kleszczowym zapaleniu mózgu. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 35—47.
— Topography of tissue lesions and localization of the virus in tick-borne encephalitis. *Pol. Med. J.* 1966, 4, 134—150.
66. E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk: I. Obraz mózgu po zakażeniu domózgowym myszy dorosłych. *Neuropatologia doświadczalnego kleszczowego zapalenia mózgu. Neuropat. Pol.* 1965, 3, 231—242.
— Neuropathology of the experimental tick-borne encephalitis. Brain changes after intracerebral infection of adult mice. *Pol. Med. J.* 1966, 5, 416—431.
67. E. Osetowska: Charakterystyka morfologiczno-topograficzna typów uszkodzeń mieliny w stwardnieniu rozsianym. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 259—269.
68. E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk: Neuropatologia doświadczalnego kleszczowego zapalenia mózgu. II. Obraz mózgu u myszy dorosłych po zakażeniu obwodowym oraz u myszy osesków po zakażeniu obwodowym i domózgowym. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 63—81.
— Neuropathology of the experimental tick-borne encephalitis. II. Brain lesions in adult mice after peripheral infection and in suckling mice after peripheral and intracerebral infection. *Pol. Med. J.* 1966, 5, 1418—1435.
— Lésions tissulaires dans l'encéphalite à tiques expérimentale. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 345—347.
69. E. Osetowska, J. Popow: Zapalenie mózgu limfo-plazmatocytarne z martwicami naczyniopochodnymi. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 351—360.
70. E. Osetowska: Étude anatomopathologique sur le cerveau de chiens séniles. *Proc. V Inter. Congr. Neuropath.* Eds. F. Lüthy, A. Bischoff, *Excerpta Medica*, Amsterdam 1966, 497—502.
— Zmiany morfologiczne w mózgach starczych psów. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 97—110.
71. E. Osetowska, M. Biernacki, J. Pietrzyk: Zmiany „spontaniczne” w mózgach małp produkcyjnych. *Zwierzęta Lab.* 1966, 4, 53—84.
— „Spontaneous” changes in the brains of monkeys used for vaccine production. *Pol. Med. J.* 1966, 5, 1132—1151.
72. E. Osetowska, Z. Ferens, A. Taraszewska: Możliwość oceny biologicznej i przydatności doświadczalnej zwierząt laboratoryjnych na podstawie analizy materiału sekcyjnego. *Zwierzęta Lab.* 1966, 4, 83—107.

73. E. Osetowska: Następstwa niedoborów witaminowych u królika. *Zwierzęta Lab.* 1966, 4, 127—139.
74. E. Osetowska: Neuropatologia wirusowych zapaleń mózgu u dzieci. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 133—150.
75. E. Osetowska: Diagnostic neuropathologique d'encéphalite à tiques en Pologne. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 401—410.
76. E. Osetowska, H. Wiśniewski: Ataxie familiale du lapin, différente de la maladie héréditaire de Sawin-Anders. *Acta neuropath.* 1966, 6, 243—250.
77. E. Osetowska: Modalités et significations des réactions encéphalitiques du type granulomateux. *J. neurol. Sci.* 1966, 3, 382—398.
78. E. Osetowska: Encéphalite lympho-plasmocytaire avec nécroses. (Encéphalite nécrosante atypique). *Neuropat. Pol.* 1966, 4, supl. 691—693.
79. E. Osetowska: Quatre cas d'encéphalite dite rhumatismale. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, supl. 751—758.
80. L. Martin, E. Drouhet, P. Destombes, K. Dziubiński, E. Osetowska: Étude anatomo-clinique d'un cas de cryptococcose méningée (*Cryptococcus neoformans*) observée chez un cirrhotique et traitée par l'Amphotéricine B. *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 287—296.
81. E. Osetowska: Leukoencefalopatie, leukodystrofia, lipidozy. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1967, 1, 121—123.
82. E. Osetowska: Leukodystrofia czy leukoencefalopatia. *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 437—447.
83. E. Osetowska, A. Taraszewska: Topografia a morfologia śródmózgowych ognisk urazowych u małp *Macacca mulatta* (rhesus). *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 235—257.
84. E. Osetowska, H. Wiśniewski: Królik-intersex w rodzinie z dziedziczną drżączką porażną (szczep Łomna). *Zwierzęta Lab.* 1967, 5, 24—34.
85. E. Osetowska, K. Lewenstam: Angiomasose sous-corticale bilatérale et ostéogénèse imparfaite. *J. neurol. Sci.* 1967, 5, 79—92.
86. E. Osetowska, K. Janowska: Un cas d'idiotie amaurotique juvénile avec une angiomasose méningo-cérébrale non-calcifiante. *J. neurol. Sci.* 1967, 4, 131—140.
87. E. Osetowska: L'encéphalite Economo et les encéphalites Arbor. *Acta neurol. belg.* 1967, 67, 172—197.
88. E. Osetowska: Nouvelle maladie héréditaire du lapin de laboratoire. *Acta neuropath.* 1967, 8, 331—344.
89. Atlas Neuropatologiczny — Red. i Współaut. Warszawa, PZWL, 1967.
90. E. Osetowska: Nowe klasyfikacje lipidów mózgu. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 87—102.
91. E. Osetowska: Zasady rozpoznawania i klasyfikacja neuropatologiczna zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 109—120.
92. E. Osetowska, A. Taraszewska: Charakterystyka genetyczna szczepu królików „Łomna”. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 229—240.
93. E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk, A. Taraszewska: Neuropatologia doświadczalnego EEE, wywołanego przez szczepy izolowane w Polsce. *Neuropat. Pol.* 1968, 6, 341—358.
94. H. Kuś, E. Osetowska, K. Kawecki, S. Krzaklewski, J. Grabiński, Z. Zagrobelny: Odległe zmiany czynnościowe i anatomo-patologiczne po reanimacji w doświadczeniu. *Patol. Pol.* 1968, 19, 17—24.
95. E. Osetowska: Zmiany w mózgu w wirusowych zapaleniach mózgu u dzieci. *Konf. Pol. Tow. Pediat. Szczecin*, 1968, 21—30.

96. E. Osetowska, H. Kuś, K. Kawecki: L'image cérébrale du „cardiac arrest” chez le porcelet. *Acta neurol. belg.* 1968, 68, 85—94.
97. E. Osetowska, A. Taraszewska: Demielinizacja w nosówce nerwowej u psów. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 99—112.
98. F. Liegeois, L. van Bogaert, E. Osetowska: Sur la valeur nosologique de la topographie et de la structuration des lésions nerveuses en pathologie comparée. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.* 1969, 9, 805—875.
99. E. Osetowska, J. Hariga: Un veau diprosope á double cerveau et spina bifida occulta. *Acta neurol. belg.* 1969, 69, 1013—1025.
100. E. Osetowska: Podostre zapalenie mózgu a wirus odry. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1970, 4, 489—493.
101. E. Osetowska: Classification of neuropathological changes underlying mental retardation. W: *Proc. II Inter. Congr. Mental Deficiency.* Warsaw, PZWL, 1970, 1—13.
102. E. Osetowska, L. van Bogaert: Étude comparée de la maladie de Carré et des encéphalites de la rougeole. *Proc. VI. Inter. Congr. Neuropath.* Masson. Paris, 1970, 894—897.
103. E. Osetowska: Encéphalite à tiques. W: „Clinique virologique” (R. Debré, J. Celers), Flammarion, Paris, 1970, 268—282.
— Tick-borne encephalitis. W: „Clinical virology” (R. Debré, J. Celers). Saunders, Philadelphia-London, 1970, 182—193.
104. E. Osetowska: Zapalenie i zwyrodnienia mózgu a wirusy powolne i utajone. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 1—12.
— Encephalitis, degenerations and slow and latent viruses. *Pol. Med. J.* 1971, 10, 1006—1014.
105. E. Osetowska: Neuropatologia ludzi i zwierząt a wirusy powolne i utajone. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1971, 5, 741—748.
106. E. Osetowska: Encephalopathies: Gases. W: „Pathology of the nervous system”. Ed. J. Minckler, McGraw Hill Book Co, New York, 1971, II, 1633—1644.
107. E. Osetowska: Encephalopathies: Metals. W: „Pathology of the nervous system”. Ed. J. Minckler, McGraw Hill Book Co, New-York, 1971, II, 1644—1651.
108. E. Osetowska, J. Pietrzyk, B. Chojnacka: Zapalenie mózgu po szczepionce Salka u małpy *cercopithecus*. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 145—151.
109. E. Osetowska: Klasyfikacja neuropatologiczna zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych. *Pamięt. VI Zjazdu Pol. Tow. Epidemiol. Szczecin* 1972, 295—306.
110. E. Osetowska, B. Wuttke: Atypowe obrazy zapaleń mózgu: postaci krwotoczne. *Pamięt. VI Zjazdu Pol. Tow. Epidemiol. Szczecin* 1972, 419—422.
111. E. Osetowska, W. Krücke, B. Wuttke: Zerebrale Verkalkungen bei Kaninchen „pt” mit erblicher Erkrankung des ZNS. W: *Aktuelle Probleme der Neuropathologie.* Ed. K. Jellinger, Facultas-Verlag, Wien, 1973, 125—129.
112. E. Osetowska, A. Taraszewska: Nosówka nerwowa i toksoplazmoza — interferencja dwóch różnych procesów zapalnych mózgu. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 477—486.
113. E. Osetowska: Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych. Monografia. Warszawa, PZWL, 1974.
114. E. Osetowska, F. Luszawski: I. „Prolegomena” do badań doświadczalnych nad chorobą dziedziczną układu nerwowego na modelu królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 61—70.

115. E. Osetowska, F. Luszawski, A. Taraszewska: II. Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 71—85.
116. E. Osetowska, A. Taraszewska, F. Luszawski: III. Zmiany w układzie wzrokomym u królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 87—92.
117. E. Osetowska: Choroba Rosenthala czy glej Rosenthala? *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 153—163.
118. A. Taraszewska, E. Osetowska: IV. Zmiany w mózgu królika „pt” w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 283—290.
119. E. Osetowska, F. Luszawski, A. Taraszewska: Badania doświadczalne nad chorobą dziedziczną ośrodkowego układu nerwowego na modelu królika „pt”. V. Obraz kliniczny w pokoleniach I—IX. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1975, 9, 569—578.
120. E. Osetowska, A. Taraszewska, F. Luszawski: VI. Występowanie zwapnień neuronalnych u królika „pt” w zależności od wieku i przebiegu klinicznego. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 85—95.
121. E. Osetowska, F. Luszawski: X. Zmiany starcze w mózgu królika zdrowego i mózgu królika „pt”. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 253—272.
122. A. Taraszewska, E. Osetowska, W. Krücke: IX. Elektronenmikroskopische Untersuchung der intrazerebralen Verkalkungen bei dem erblichen paralytischen Tremor der pt-Kaninchen. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 331—336.
123. W. Borak, E. Osetowska: Gilles de la Tourette's disease with congenital vascular malformations and secondary encephalopathy. W: Gilles de la Tourette's syndrome. Eds. F. S. Abuzzahab, F. G. Anderson, v. 1: International Registry, Mason Publ. Co. St. Paul, 1976, 81—87.
124. E. Osetowska, F. Luszawski, J. Sawicki: Wpływ mutacji pt na różne ogniwa „zamkniętych” obwodów ruchowych. I. Patomorfologia neostriatum, paleostriatum i substantia nigra u królika pt. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 263—276.
125. E. Osetowska, R. Verheyden, A. Taraszewska: Wpływ mutacji pt na różne ogniwa „zamkniętych” obwodów ruchowych. II. Metabolity dopaminy w moczku królika pt. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 407—415.
126. E. Osetowska, W. Krücke, A. Taraszewska: Cerebellopatie reumatyczne. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 465—477.
127. E. Osetowska, F. Luszawski, A. Kozyriska: Powikłania mózgowe w przebiegu nagminnego kataru zakaźnego królika laboratoryjnego. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 571—579.
128. E. Osetowska, A. Kozyriska, M. Afek-Kamińska: Procesy zapalne „neuro-nobójcze” i neuronotropowe. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 305—315.

PUBLICYSTYKA NAUKOWA

1. E. Osetowska: Zakład Neuropatologii PAN. *Nauka Polska* 1963, 82—89.
2. E. Osetowska: V Międzynarodowy Kongres Neuropatologii w Zürichu. *Nauka Polska* 1966, 101—104.
3. E. Osetowska: II Międzynarodowe Kollokwium Zapaleń Mózgu w Warszawie. *Nauka Polska* 1966, 110—112.
4. E. Osetowska: W sprawie profilu naukowego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej. *Nauka Polska* 1967, 43—53.
5. E. Osetowska: Zwierzęta laboratoryjne na świecie. *Zwierzęta Lab.*, 1967, 5, 133—140.

6. E. Osetowska: Belgijski Ośrodek Zwierząt Laboratoryjnych w Louvain-Heverlee. *Zwierzęta Lab.* 1967, 5, 119—128.
7. E. Osetowska: Development of Neuropathology in Polish People Republic. *Neuropat. Pol.*, 1968, 8, 213—216.

KOMUNIKATY

W okresie od 8 do 10 czerwca 1979 odbędzie się w Gardone Riwiera (Brescia, Italia) Międzynarodowe Sympozjum poświęcone wielospecjalistycznym aspektom terapii guzów mózgu.

Głównymi tematami Sympozjum będą:

- doświadczalne guzy mózgu,
- biologia i rozpoznawanie guzów mózgu,
- podstawy leczenia guzów mózgu,
- doniesienia wolne.

Organizatorami Sympozjum są Fundacja Giovanni Lorenzini w Mediolanie, Narodowy Instytut Zdrowia w Bethesda (USA) oraz Uniwersytet w Pawii.

Przewodniczącymi Sympozjum są P. Paoletti (Pawia) i M. D. Walker (USA).

Termin nadsyłania zgłoszeń i streszczeń mija 1 lutego 1979.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Fondazione Giovanni Lorenzini,
Via Monte Napoleone, 23.
20 121 Milan (Italia).

* * *

W okresie od 12 do 14 lipca 1979 odbędzie się w Paryżu IV Zjazd Europejskiego Towarzystwa Neurochirurgii Stereotaktycznej i Czynnościowej.

Głównymi tematami będą:

- padaczka,
- ogniskowe napromieniowanie,
- neurostymulacja.

Informacje szczegółowe uzyskać można w Komitecie Organizacyjnym G. Szikla,

Centre Hospitalier Ste. Anne,
1, rue Cabanis, F-75 014 Paris.

ANNA TARASZEWSKA

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W RDZENIU KRĘGOWYM U KRÓLIKA PT W OKRESIE OBJAWOWYM CHOROBY *)

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

Kierownik Ośrodka: prof. dr med. E. Osetowska

Niniejsze doniesienie jest jednym z kolejno zaplanowanych etapów badań ośrodkowego układu nerwowego u królika pt z dziedziczną drżą-czką porażną (Osetowska, Luszawski 1975). Przedmiotem tego cyklu jest uzupełnienie i pogłębienie obserwacji morfologicznych uzyskanych z mikroskopu świetlnego w różnych okresach rozwoju choroby i w odniesieniu do różnych struktur anatomicznych i układów czynnościowych. Z badań w mikroskopie świetlnym wynika, że zmiany w rdzeniu stanowią wczesny i stały element obrazu neuropatologicznego królika pt, przy czym duże uszkodzenia występują w istocie białej, w postaci rozlanej demielinizacji, glejozy włóknistej, rozpadu włókien osiowych oraz drobnogąbczastego rozrzedzenia podłoża (Osetowska i wsp. 1977).

Celem podjętych badań elektronowo-mikroskopowych rdzenia królika w ostrym okresie choroby pt jest określenie charakteru wczesnych zmian demielinizacyjnych nakładających się na trwającą jeszcze mielinizację włókien oraz zależności tych zmian od uszkodzenia włókien osiowych w długich drogach zstępujących i wstępujących rdzenia.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 5 chorych królików pt w wieku 6—9 tygodni i 2 kontrolne króliki zdrowe w wieku 8 tygodni i 6 miesięcy. Cztery króliki chore przedstawiały klinicznie obraz ostrego postępującego przebiegu choroby pt z pełnym zespołem objawów neurologicznych tj. z silnymi drżeniami ciała i spastycznymi porażeniami kończyn, natomiast u 1 królika

*) Problem węzłowy 10.4.2.02.2

uśpionego w wieku 9 tygodni stwierdzono kliniczną poprawę z cofnięciem się przejściowego niedowładu kończyn. U wszystkich królików drżenia obserwowano od 10 i 11 dnia życia, początkowo w postaci kolebiących ruchów całego ciała a następnie zrytmizowanych grubofalistych drżeń głowy i tułowia, które utrzymywały się do końca obserwacji. Niedowłady pojawiły się około 20 dnia życia w kończynach tylnych i narastały szybko do stanu prawie całkowitego porażenia kończyn tylnych i zadu w 5—6 tygodniu życia przy współistnieniu mniej nasilonych niedowładów w kończynach przednich. U 2 królików obserwowano przewagę niedowładu prawostronnego. Po 2—3 tygodniach utrwały się spastyczne zniekształcenia w ułożeniu porażonych kończyn. Króliki usypiano w okresie nasilenia niedowładów, począwszy od 6 tygodnia życia, przy czym uśpiono po 1 króliku w wieku 6, 7 i 9 tygodni oraz 2 króliki w wieku 8 tygodni. Badane króliki pochodziły z pokoleń F₁₁—F₁₄.

Zwierzęta uśmiercano w narkozie 4% wodzianem chloralu wykonując perfuzję roztworem 3,9% aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym wg Sørensen (pH 7,6), wprowadzonym przez aortę wstępującą pod ciśnieniem 100—120 mm Hg. Po wyjęciu rdzenia pobierano wycinki istoty szarej i istoty białej z przekrojów poprzecznych rdzenia szyjnego i lędźwiowego, które przechowywano do następnego dnia w płynie perfuzyjnym w temp. 4°C. Materiał przeznaczony do zatapiania płukano następnie w buforze fosforanowym i utrwalało dodatkowo przez 2—3 godz. w 1% lub 2% czterotlenku osmu, odwadniano w szeregu stężeń etanolu i w tlenku propylenu, a następnie zatapiano w Eponie 812. Z bloczków eponowych krojono na ultramikrotomie Tesla skrawki półcienkie grubości ok. 1 μm, które barwiono 1% błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Z wybranych bloczków krojono skrawki ultracienkie na ultramikrotomie LKB, które kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A i Tesla BS 500.

WYNIKI

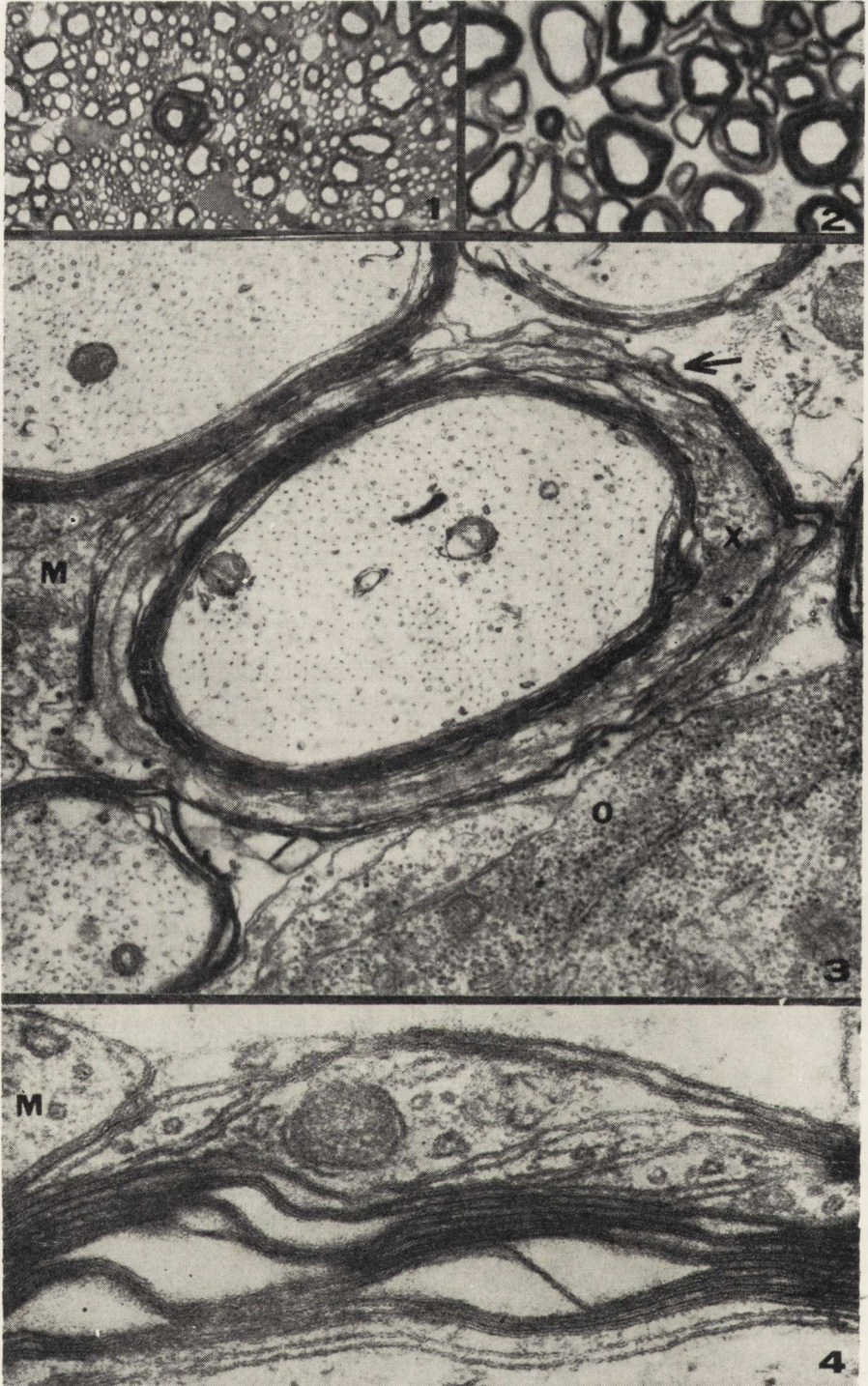
Na skrawkach półcienkich z istoty białej, stwierdzono nierównomierną grubość osłonek mielinowych i niejednorodną ich strukturę nawet we włóknach tego samego kalibru (ryc. 1, 2). Pogrubiałe osłonki mielinowe wykazywały pasmowate rozwarstwienie o zmniejszonej barwliwości i były nieregularnie pofałdowane, często widoczne były kule mielinowe. Przestrzenie pomiędzy włóknami były poszerzone i wypełnione cytoplazmą przerosłych komórek astrogleju, lub niekiedy pustymi wakuolami, zwiększona była również liczba oligodendrocytów z obfitą cytoplazmą. W pojedynczych włóknach spostrzegano ciemną lub ziarnistą

akso plazmę. Ponadto spotykano pojedynczo duże bezosłonkowe twory sferoidalne o ziarnistej strukturze. W komórkach nerwowych istoty szarej rogów przednich i tylnych stwierdzono przejaśnienia cytoplazmy i zubożenie substancji Nissla jak również przejaśnienie i rozrzedzenie cytoplazmy w wypustkach protoplazmatycznych tych komórek.

W rdzeniu kręgowym królików kontrolnych włókna nerwowe wykazywały regularną grubość i strukturę osłonek mielinowych. Komórki glejowe o bardziej skąpej cytoplazmie występowały mniej licznie.

W badaniu mikroskopowo-elektronowym materiału królików *pt*, odchylenia w strukturze osłonek mielinowych były uchwytnie już w przeglądowym obrazie skrawków. Polegały one na występowaniu między blaszkami osłonki mielinowej pasmowatych wypustek cytoplazmatycznych, w których obecność licznych mikrotubul, rybosomów i innych organelli oraz gęstość elektronowa cytoplazmy były charakterystyczne dla wypustek oligodendrocytów. Szersze wypustki cytoplazmatyczne niekiedy rozwarstwiały pierścieniowo całą osłonkę mielinową, niszcząc blaszkowatą strukturę mieliny szczególnie w części zewnętrznej osłonki (ryc. 3). W innych osłonkach między rozszczepionymi liniami głównymi poszczególnych blaszek mielinowych występowały mniejsze izolowane wyspy cytoplazmy (ryc. 4). Przy wielu prawidłowo wykształconych osłonkach mielinowych stwierdzono powiększenie mezaksonu zewnętrznego (ryc. 3). W licznych włóknach ulegała powiększeniu przede wszystkim wypustka cytoplazmatyczna wewnętrzna otaczająca nieraz obwód aksonu niezależnie od uformowanego już mezaksonu wewnętrznego (ryc. 5). Osłonki mielinowe w tych włóknach były niedokształcone, składały się z kilku zaledwie współśrodkowych blaszek mielinowych o rozluźnionym układzie, z poszerzoną odległością między liniami głównymi i bez wykształconych linii pośrednich oraz miejscami z całkowitą dezorganizacją układu blaszkowego.

Duża liczba aksonów, zwłaszcza mniejszego kalibru była niezmielinizowana. Niektóre z nich były otoczone podkowiastą wypustką cytoplazmatyczną gleju mielinizacyjnego (tzw. alar process). Niekiedy niezmielinizowane włókna były otoczone pojedynczą lub kilkakrotną warstwą wypustek astroglejowych (ryc. 6). W niektórych miejscach obserwowano znaczne rozsunięcie włókien zmielinizowanych i niezmielinizowanych przez poszerzoną przestrzeń pozakomórkową, w której stwierdzano fragmenty cytoplazmy rozpadłych wypustek astrocytów, a szczególnie wolno leżące skupienia ziaren glikogenu (ryc. 6 i 7). Między włóknami występowały też liczne wypustki astroglejowe o zachowanej strukturze, wypełnione gęsto gliofilamentami (ryc. 7). W wielu osłonkach zawierających liczne międzyblaszkowe wyspy cytoplazmy obserwowano bardziej nasilone zwyrodnienie ziarniste mieliny i obec-



ność kul mielinowych (ryc. 8, 9). Zarówno we włóknach otoczonych prawidłowymi jak i zmienionymi osłonkami mielinowymi oraz w aksonach bezosłonkowych stwierdzono w aksoplazmie zmiany o różnym nasileniu. Wśród zmian aksonalnych przede wszystkim zwracało uwagę nagromadzenie w aksoplazmie dużej ilości organelli, a szczególnie licznych zmienionych mitochondriów i różnopostaciowych ciał gęstych. Aksony takie otoczone były niekiedy osłonką mielinową wykazującą znacznego stopnia zmiany zwyrodnieniowe (ryc. 9). Często jednak osłonki mielinowe były prawidłowe lub wykazywały jedynie mniejsze lub większe ścięczenie.

W większości włókien zmiany w aksoplazmie były niewielkie i polegały na obecności zmienionych struktur pęcherzykowo-błoniastych siatki śródplazmatycznej gładkiej i pojedynczych ciał gęstych (ryc. 3—7), oraz ograniczonych ubytków neurofilamentów. Szczególnym typem zmian we włóknach osiowych, otoczonych przeważnie prawidłową osłonką mielinową, było ograniczone powiększenie przyaksonalnej cytoplazmy wypustki oligodendrocytu zawierającej nagromadzenie różnorodnych ciał gęstych oraz elektronowo przeziernych wakuoli otoczonych podwójną błoną (ryc. 10). Widoczne niekiedy jęczyczkowe wgłobienia aksoplazmy do cytoplazmy glejowej wskazywały na pochodzenie tych wakuoli z części aksoplazmy całkowicie oddzielonych od aksonu ale otoczonych nadal aksolemmą i błoną glejową (ryc. 11). Dalsze zwyrodnienie odsznurowanych fragmentów aksoplazmy prowadziło do two-

Ryc. 1. Włókna o nieregularnych osłonkach mielinowych, w centrum pola, osłonka znacznie pogrubiała i pasmowato rozwarstwiona. Skrawek półcienki. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

Fig. 1. Irregular myelin sheaths, one in centre is markedly thickened and splitted. Semithin section. Toluidine blue. × 400

Ryc. 2. Osłonki mielinowe różnej grubości i barwliwości wokół aksonów podobnego kalibru. Skrawek półcienki. Błękit toluidyny. Pow. 800 ×

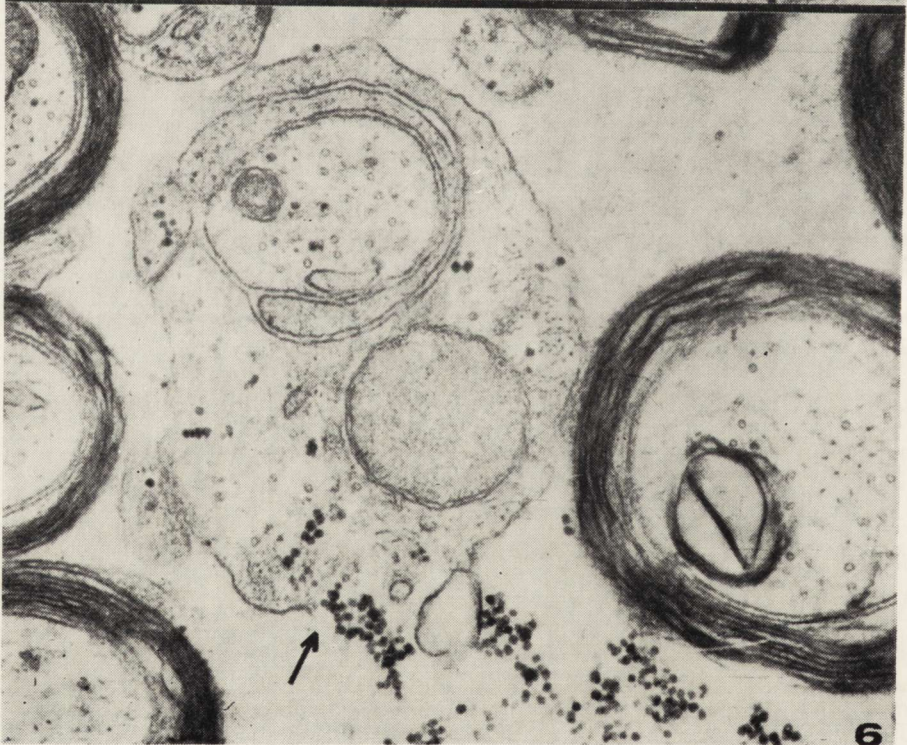
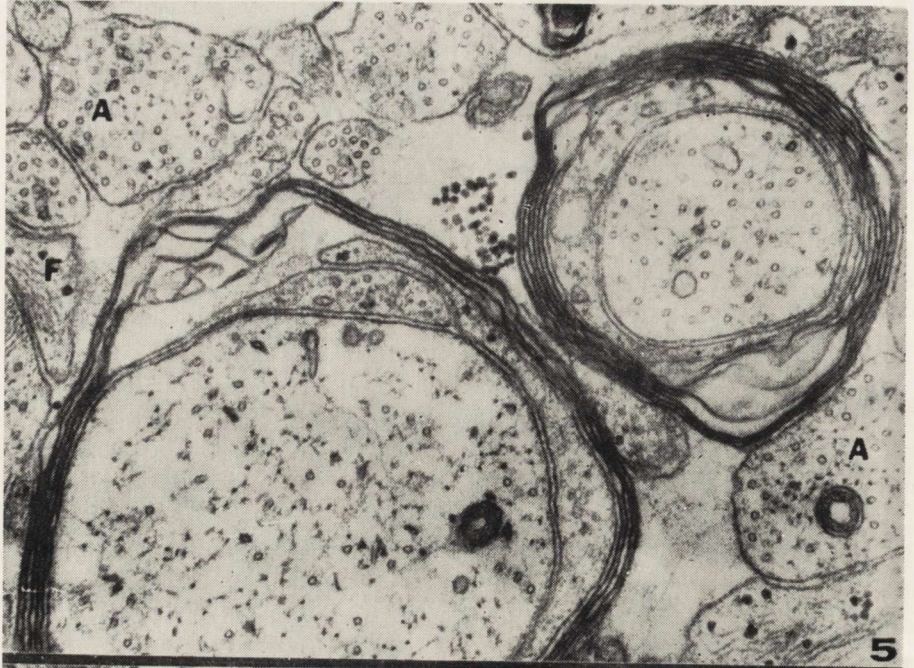
Fig. 2. Myelin sheaths of fibres of similar size show different thickness and staining. Semithin section. Toluidine blue. × 800

Ryc. 3. Pierścieniowate rozwarstwienie osłonki mielinowej przez okrażenie pasma cytoplazmy, której obraz jest podobny do cytoplazmy oligodendrocytu (x). W części zewnętrznej osłonki częściowa dezintegracja blaszek mielinowych (strzałka). O — oligodendrocyt, M — mezakson zewnętrzny. Pow. 24000 ×

Fig. 3. Annular splitting of myelin sheath by cytoplasmic rim which resembles oligodendrocyte cytoplasm (x). The outermost lamellae of myelin sheath are partially disintegrated (arrow). O — oligodendrocyte, M — external mesaxon. × 24000

Ryc. 4. Izolowane wyspy cytoplazmy, zawierającej mikrotubule i mitochondrium, występują w części blaszek mielinowych rozszczepionych na liniach głównych. M — mezakson zewnętrzny. Pow. 81000 ×

Fig. 4. Isolated islets of cytoplasm containing microtubules and mitochondrium arise in the splitting of major dense lines of myelin sheath. M — external mesaxon. × 81000



rzenia się błoniastych i ziarnistych ciał gęstych w cytoplazmie wypustki glejowej. Stosunkowo rzadko spotykano aksony osłonkowe wykazujące zmiany charakterystyczne dla zwyrodnienia typu Wallera, a więc całkowity ziarnisty rozpad aksoplazmy z wtórnym rozpadem osłonki mielinowej (ryc. 12). Rozpadowi włókien towarzyszyło występowanie komórek fagocytarnych zawierających w cytoplazmie elektronowo przeźierne wakuole odpowiadające wypłukanym kroplom tłuszczu. Innym wreszcie dość rzadkim typem zmian aksonalnych były tzw. sferoidy czyli olbrzymie poszerzenia bezosłonkowych odcinków aksonów, wypełnione masami zmienionych organelli i włókienek. Wśród nagromadzonych organelli przeważały nieprawidłowe postacie mitochondriów, pęcherzykowate lub obkurczone, elektronowo gęste profile siatki śródplazmatycznej gładkiej oraz skupienia ziaren glikogenopodobnych (ryc. 13). Neurofilamenty w większych powiększeniach wykazywały obraz typowy dla zwyrodnienia włókiennkowego (twisted neurofilaments), przy czym należy zaznaczyć, że w innych odcinkach neuronu nie obserwowano tego typu nieprawidłowości.

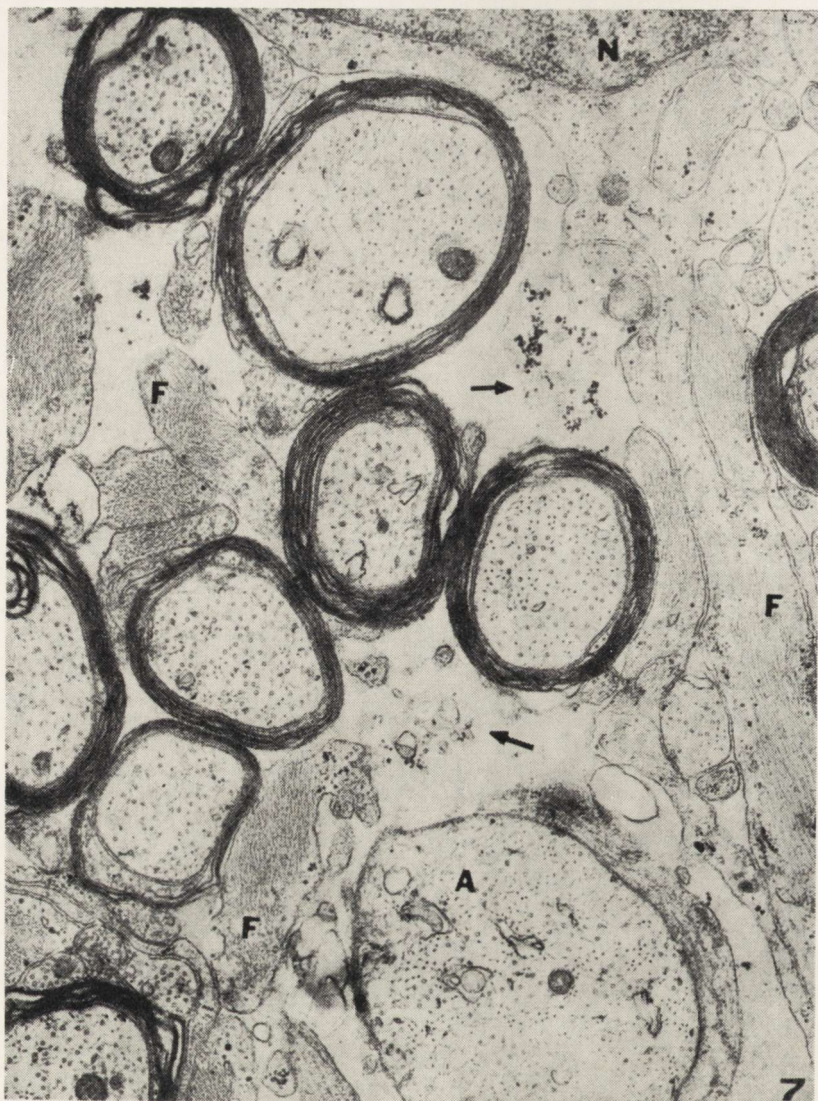
Zmiany w zakończeniach synaptycznych, w dendrytach i w części perikarialnej neuronów były mniej różnorodne niż w wypustkach osiowych. Polegały one przede wszystkim na zróżnicowanym zubożeniu organelli i przejaśnieniu cytoplazmy. W zakończeniach synaptycznych obserwowano niejednolite poszerzenie pęcherzyków synaptycznych i niekiedy zmniejszenie ich liczby, nie spotykano natomiast zmian o typie tzw. zwyrodnienia gęstego, charakterystycznego dla zwyrodnienia aksonów typu Wallera. W dendrytach znaczne nasilenie zmian występowało w obrzmiałych i poszerzonych odcinkach, w których stwierdza-

Ryc. 5. Powiększenie wypustki cytoplazmatycznej wewnętrznej między aksonem a osłonką mielinową w obu włóknach. Osłonka cieńsza składa się z kilku rozluźnionych zwojów blaszek mielinowych, częściowo ulegających rozpadowi. Poszerzona przestrzeń pozakomórkowa, drobne aksony bezosłonkowe (A) i wypustki astrocytów wypełnione gliofibrilami (F). Pow. 34000 ×

Fig. 5. Enlarged inner loop in two fibres. Thinner sheath contains only a few distorted myelin lamellae, in part disintegrated. Enlarged extracellular space, small unmyelinated axons (A), and astroglial cell processes filled with gliofilaments (F). × 34000

Ryc. 6. Drobny akson otoczony dwiema wypustkami: bezpośrednio wokół aksonu typowa wypustka komórki mielinizacyjnej tzw. alar process, zewnątrz wypustka astrocytu z przerwaną błoną komórkową wykazuje łączność z poszerzoną przestrzenią pozakomórkową zawierającą skupienia glikogenu (strzałka). We włóknie zmielinizowanym ograniczone przejaśnienia aksoplazmy i struktura mielinopodobna. Pow. 32700 ×

Fig. 6. A small axon surrounded with two processes; directly around the axon an alar process of myelinating cell and outside an astroglial cell process with a membrane disruption shows apparent continuity with enlarged extracellular space containing clusters of glycogen granules (arrow). In the axoplasm of myelinated fibre focal clearings and myelin-like structure. × 32700



Ryc. 7. Między zmielinizowanymi włóknami liczne wypustki astrocytów włóknistych wypełnione włóknkami glikowymi (F) oraz fragmenty cytoplazmy i ziarna glikogenu w poszerzonej przestrzeni pozakomórkowej (strzałki). Średniego kalibru akson bezosłonkowy (A), częściowo otoczony przez wypustkę oligodendrocytu, wykazuje wyraźne zmiany w aksoplazmie. N — jądro astrocytu. Pow. 13900 ×

Fig. 7. Between myelinated axons, numerous fibrous astrocyte processes filled with gliofilaments (F). The cytoplasmic fragments and glycogen granules in an enlarged extracellular space (arrow). An unmyelinated medium-sized axon (A), partially surrounded by oligodendroglial cell process, shows axoplasmic changes. N — astrocyte nucleus. × 13900

no elektronowo przeziernie przejaśnienia cytoplazmy, zanik organelli, fragmenty błon i resztki rozpadłych mikrotubul oraz obecność wakuoli otoczonych pogrubiałymi lub „rozmytymi” konturami błon (ryc. 14). Obok dendrytów zmienionych w ten sposób często obserwowano również tzw. dendryty ciemne z zagęszczeniem cytoplazmy i nagromadzeniem mikrotubul.

W części perikarialnej neuronów stwierdzano zmiany odpowiadające lekkiej lub średnio nasilonej chromatolizie w postaci rozfragmentowania, rozproszenia i zaniku szorstkiej siatki śródplazmatycznej i zwiększenia ilości wolnych skupień rybosomów. Zubożeniu szorstkiej siatki śródplazmatycznej towarzyszyło powiększenie i rozrost struktur zespołu Golgiego, a szczególnie jego elementów pęcherzykowych oraz występowanie dość licznych ciał wielopęcherzykowych i ciał lizosomalnych. Obserwowano również wzrost liczby drobnych mitochondriów z zagęszczoną macierzą (ryc. 15, 16). W rogach tylnych widoczne były ponadto neurony o jasnych perikariach wykazujących zubożenie organelli cytoplazmatycznych i rozrzedzenie chromatyny jądrowej.

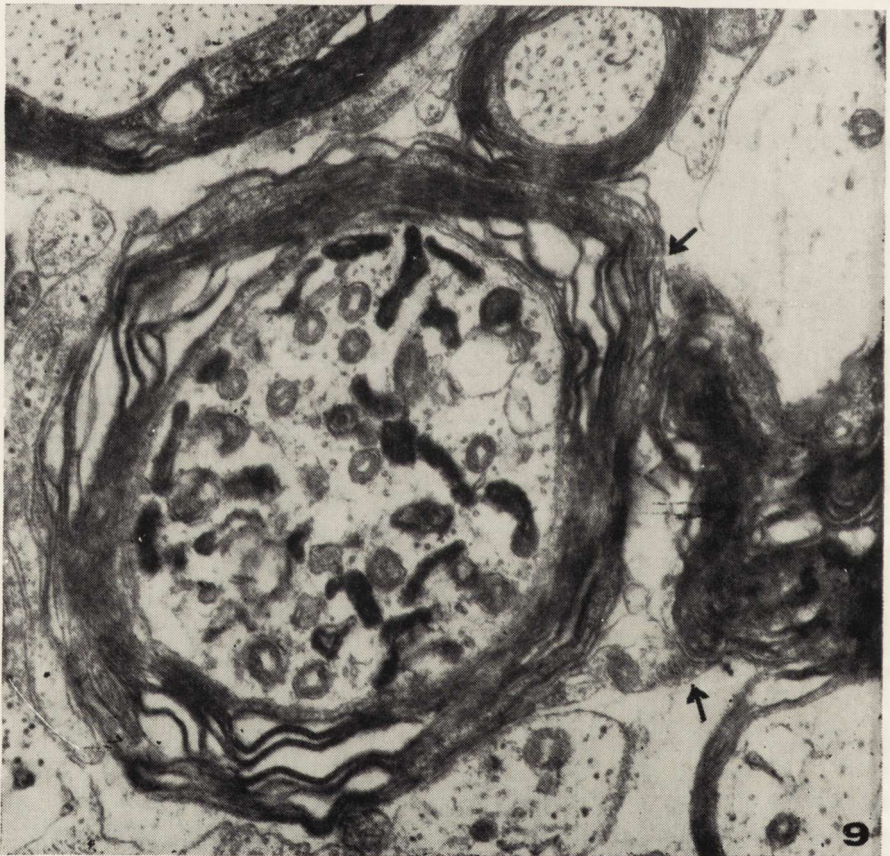
Astrocyty poza wspomnianymi już zmianami w wypustkach, wykazywały powiększenie i obrzmienie cytoplazmy również w części perikarialnej, a ponadto pomnożenie gliofilamentów wnikaających do wypustek.

Oligodendrocyty charakteryzowały się również obfitą cytoplazmą o średniej gęstości elektronowej, zawierającą liczne rybosomy i mikrotubule oraz dobrze rozbudowany aparat Golgiego (ryc. 3).

OMÓWIENIE

W przedstawionych wynikach badań zwraca uwagę różnorodność zmian ultrastrukturalnych we włóknach nerwowych istoty białej i to zarówno w aksonach jak i osłonkach mielinowych. W istocie szarej rdzenia występują bardziej jednolite zmiany w perikarionach komórek nerwowych, dendrytach i zakończeniach synaptycznych, przy czym ogólnie ich nasilenie wydaje się mniejsze niż zmian we włóknach istoty białej.

Nieprawidłowości w strukturze osłonek mielinowych przypominają obraz mieliny niedojrzałej w okresie trwającej mielinizacji włókien (Samorajski, Friede 1968). Zakończenie okresu mielinizacji u królika nie jest w piśmiennictwie ściśle określone z powodu braku odpowiednich badań. W materiale własnym królików kontrolnych, w wieku 8 tygodni stwierdzono w mikroskopie świetlnym pełną mielinizację rdzenia, co zgodne jest z badaniami Dekabana (1956) stwierdzającymi zakończenie przyrostu mieliny w tylnych powrózkach rdzenia królika już od 40 dnia życia. Obecność niedokształconych osłonek mielinowych zawiera-



jących zaledwie kilka zwojów blaszek mielinowych o rozluźnionym układzie, a nawet spotykane zupełnie wstępne stadia mielinizacji aksonów w postaci tzw. *alar process* u królików 8 i 9 tygodniowych, wskazują na przedłużony lub niedostateczny proces mielinizacji. Podobne zmiany określone jako „hypomielinizacja” opisano u mysich mutantów Quaking i Jimpy (Samorajski i wsp. 1970; Berger 1971). Zaburzenia syntezy lipidów i obecność w cytoplazmie oligodendrocytów wtętołów lipidowych i błoniastych wakuoli przemawiają u nich za procesem dysmielinizacyjnym zależnym od uszkodzenia oligodendrogleju (Watanabe, Bingle 1972; Meier i wsp. 1974). Analogicznych zmian w oligodendrogleju nie stwierdzono w dotychczas badanym materiale królików *pt*. Obserwowane ogólne zwiększenie ilości oligodendrocytów z obfitą cytoplazmą o średniej gęstości elektronowej zawierającą liczne rybosomy, mikrotubule i przerosły aparat Golgiego, charakterystyczne jest dla oligodendrocytów mielinizacyjnych (Vaughn 1969). Zanikanie tych postaci komórkowych u zdrowych królików w dość późno mielinizującym się spoidle wielkim stwierdzono w mikroskopie świetlnym przed 56 dniem życia (Robain 1970).

Występowanie między blaszkami osłonki mielinowej licznych wypustek cytoplazmatycznych oligodendrocytów, nierzadko zawierających liczne organelle komórkowe, opisywano w przewlekłych stanach po różnych doświadczalnych uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego traktując je jako wyraz procesów reparacyjnych wiążących się z remielinizacją włókien (Hirano 1972).

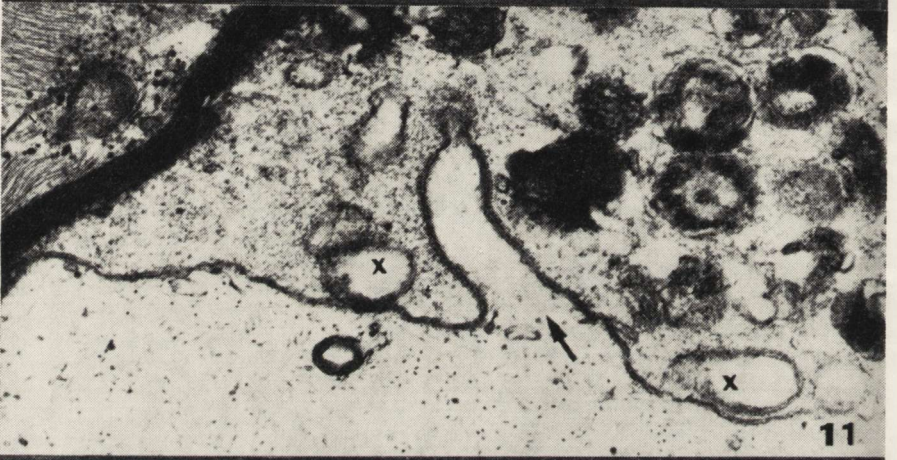
W naszych badaniach wykazano jednak, że obecność cytoplazmy w osłonkach mielinowych powoduje nie tylko rozszczepienie linii głównych blaszek mielinowych ale znacznie cięższe zaburzenia blaszkowatej struktury i rozpad ziarnisty mieliny z tworzeniem kul mielinowych w prawidłowo ukształtowanych osłonkach. Uszkodzenie ciągłości zewnętrznych warstw osłonki mielinowej może również prowadzić do postępującej odcinkowej demielinizacji aksonu.

Ryc. 8. Ziarnisty rozpad mieliny w postaci zwyrodnieniowej kuli wewnątrz osłonki mielinowej. Pow. 19600 ×

Fig. 8. Degenerated myelin ball inside the myelin sheath. × 19600

Ryc. 9. W aksoplazmie włókna nagromadzenie licznych ciał gęstych i zmienionych mitochondriów. W osłonce mielinowej zatarcie struktury blaszkowatej i obecność wąskich pasm cytoplazmy łączących się z masą zwyrodniałej mieliny (strzałki). Pow. 22500 ×

Fig. 9. Fibre with accumulated several types of dense bodies and abnormal mitochondria in the axoplasm. In the myelin sheath disintegrated lamellar structure and the presence of cytoplasmic rims linked with degenerated myelin (arrows). × 22500



Trudno jednoznacznie przesądzić, czy stwierdzone zmiany w osłonkach mielinowych u królika pt oznaczają zaburzenie w utrzymaniu integralności mieliny przez niepełnowartościowe komórki oligodendrogleju czy też reakcja komórek skąpowypustkowych i uszkodzenie mieliny są wtórne do zmian w aksoplazmie czy wreszcie oba procesy nakładają się na siebie. W piśmiennictwie nie ma ustalonego poglądu na rolę komórek oligodendrogleju w procesie wtórnych demielinizacji. Na ogół panuje przekonanie, że komórki te nie uczestniczą w procesie rozpadu mieliny, wtórnym do zwyrodnienia aksonu (Vaughn, Pease 1970), chociaż niektórzy autorzy obserwowali powiększenie wypustek cytoplazmatycznych oligodendrocytów w osłonkach mielinowych ulegających zwyrodnieniu wtórnemu i przypisują oligodendrocytom czynność fagocytarną w przebiegu tego procesu (Cook, Wiśniewski 1973). Wydaje się, że w przeciwieństwie do nerwów obwodowych, w których aktywny udział komórek Schwanna w rozpadzie i fagocytozie mieliny w zwyrodnieniu Wallera został potwierdzony badaniami Blümcke i Niedorfa (1966) oraz Ballina i Thomasa (1969), zagadnienie mechanizmu demielinizacji wtórnej we włóknach OUN jest jeszcze niedostatecznie poznane, zwłaszcza w wolno postępujących procesach zwyrodnienia aksonu. Spencer i Thomas (1974) wykazali, że komórki oligodendrogleju, podobnie do komórek Schwanna, wykazują zdolność selektywnej fagocytozy w niewielkich i wczesnych zmianach aksonalnych w przebiegu wstępującego zwyrodnienia włókien. Stwierdzone w naszym materiale powiększenie przyaksonalnej cytoplazmy komórki skąpowypustkowej z obecnością ciał gęstych i oddzielonych części aksoplazmy odpowiada dokładnie procesowi sekwestracji i fagocytozy zmienionej aksoplazmy przez

Ryc. 10. Powiększona przyaksonalna część cytoplazmy wypustki oligodendrocytu zawiera ciała gęste i elektronowo przeziernie wakuole otoczone podwójną błoną (strzałka). Pow. 20470 ×

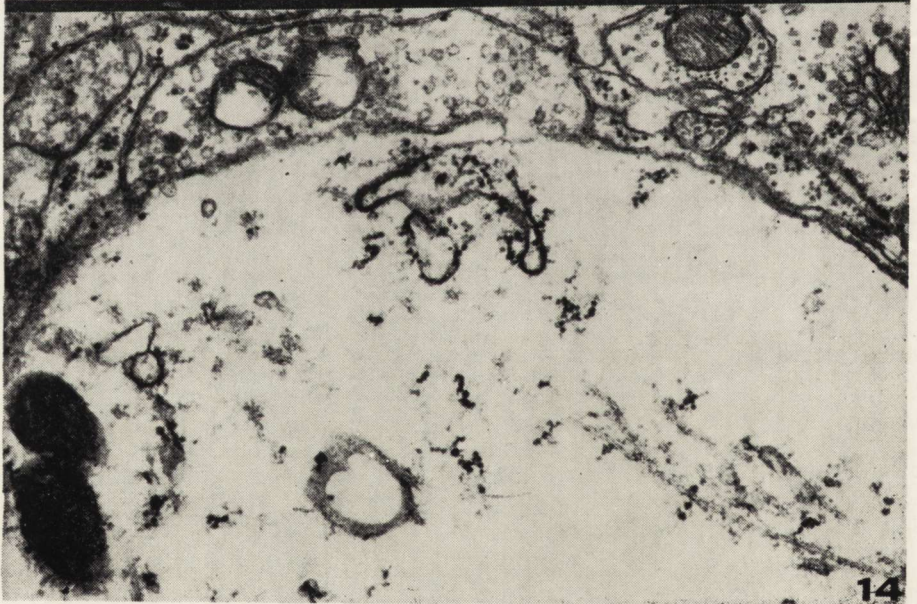
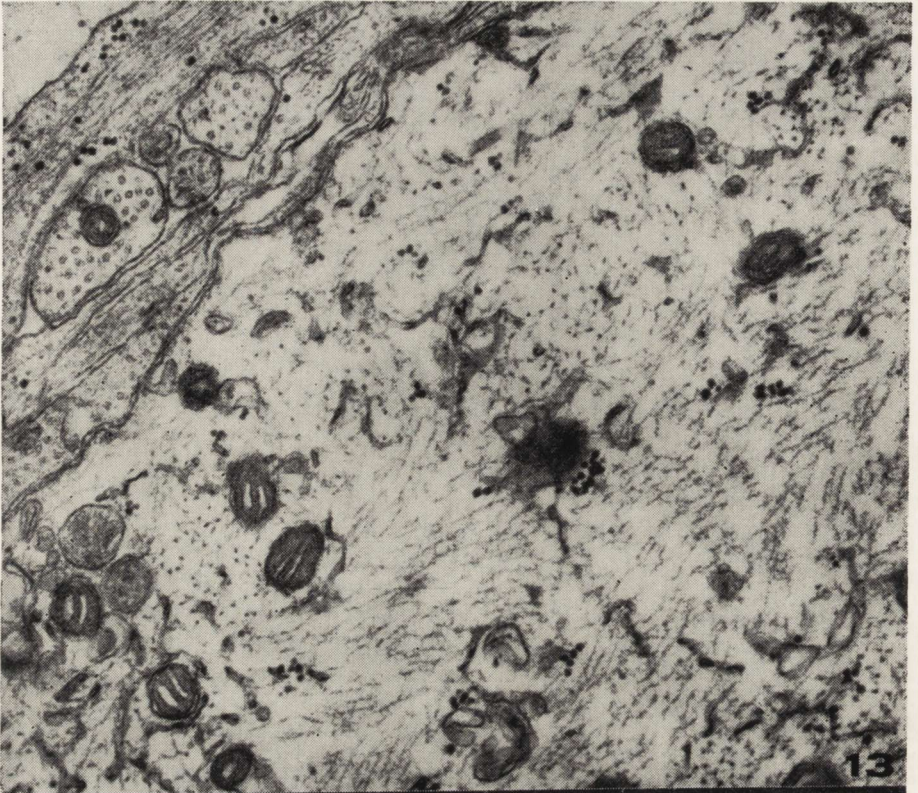
Fig. 10. Swollen cytoplasm of periaxonal oligodendroglial cell contains dense bodies and electronlucent vacuoles surrounded with two membranes (arrow). × 20470

Ryc. 11. W powiększonej przyaksonalnej cytoplazmie oligodendrocytu wydłużone wgłobienie aksoplazmy (strzałka) i elektronowo przeziernie pola oddzielonej aksoplazmy (x) oraz ciała gęste. Części wgłobionej i oddzielonej aksoplazmy otacza aksolemma i błona glejowa. Pow. 21300 ×

Fig. 11. In enlarged cytoplasm of periaxonal oligodendroglial cell elongated invagination of axoplasm (arrow) and electronlucent areas of sequestered axoplasm (x) as well as dense bodies. Portions of invaginated and sequestered axoplasm are surrounded with axolemma and glial membrane. × 21300

Ryc. 12. Ziarnisty rozpad aksoplazmy, zatarcie struktury i pofałdowanie osłonki mielinowej, obok fragment cytoplazmy komórki fagocytarnej z kroplami tłuszczu (L). Pow. 28800 ×

Fig. 12. Granular disintegration of axoplasm and blurred structure of myelin sheath. A part of phagocytic cell cytoplasm containing lipid droplets (L). × 28800



komórkę oligodendrocytu. Obecność tego typu zmian stanowi wg Spencera i Thomasa (1974) czuły wskaźnik wczesnych zmian aksonalnych w procesie występującego zwyrodnienia aksonu lub w przebiegu zaburzeń metabolicznych wywołujących tzw. dying-back process.

Najczęściej obserwowane w naszym materiale zmiany w aksonach polegały na występowaniu przeważnie niewielkiej ilości zmienionych organelli lub na ograniczonych zmianach rozplywnych w aksoplazmie. W części włókien spotykano jednak zaawansowane już zmiany zwyrodnieniowe w postaci bądź to nagromadzenia dużej ilości patologicznie zmienionych organelli bądź całkowitego rozpadu aksonu. Zmiany te odpowiadają zarówno klasycznym obrazom zwyrodnienia Wallera (Vial 1958) jak i tzw. aksonom degeneracyjnym lub reaktywnym wg. Lamperta (1967).

Współistnienie różnych postaci zmian aksonalnych może być interpretowane jako wyraz różnych sekwencji czasowych i przestrzennych procesu zwyrodnieniowego wypustki osiowej. W postępującym procesie chorobowym dochodzić może do nieodwracalnych uszkodzeń aksonów włącznie z przerwaniem ciągłości włókien i w dalszej konsekwencji do rozwoju wstępującego zwyrodnienia neuronów i zwyrodnienia Wallera, dając bogactwo i różnorodność nakładających się zmian ultrastrukturalnych.

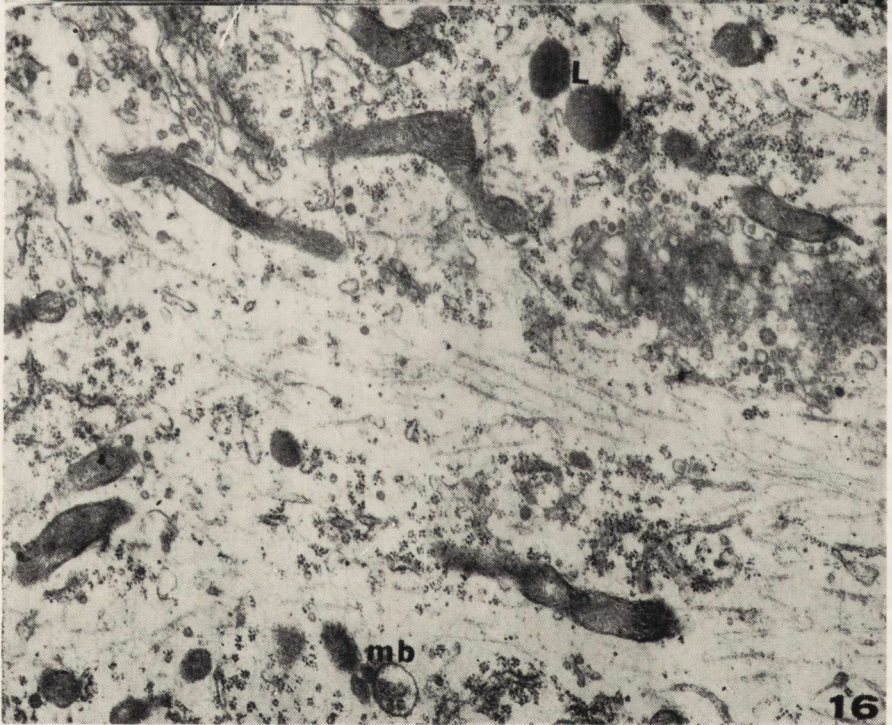
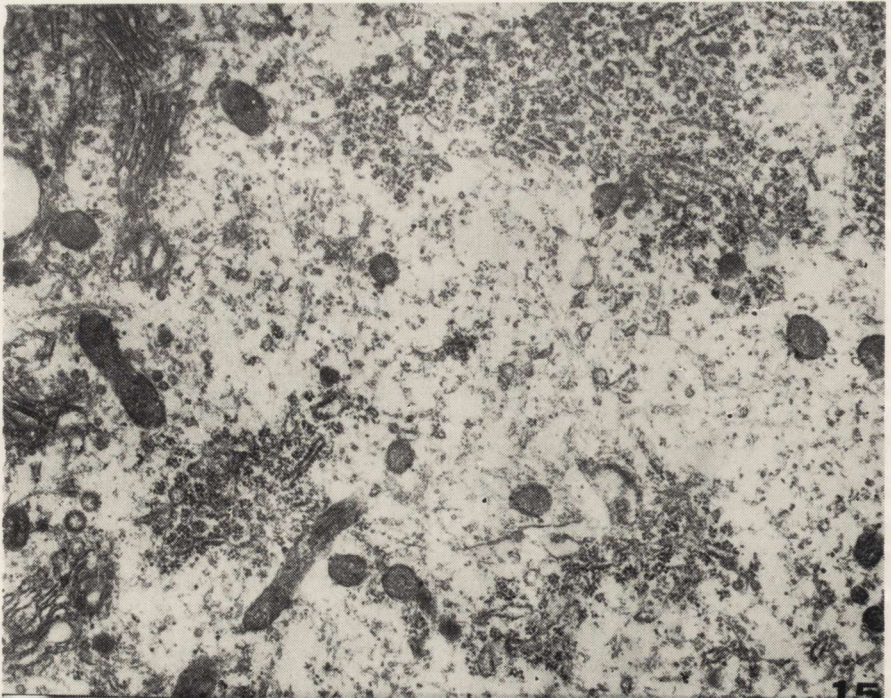
Wieloogniskowość uszkodzeń aksonu jest charakterystyczna dla niektórych doświadczalnych neuropatii toksycznych i metabolicznych, w których zwyrodnienie włókna osiowego (tzw. dying-back process) ma być następstwem niewydolności metabolicznej neuronu (Schoental, Cavanagh 1977).

U królika pt stanowiącego model doświadczalny naturalnie rozwijającej się choroby zwyrodnieniowej na podłożu genetycznie uwarunkowanych zaburzeń metabolicznych, uszkodzenie neuronu nie ogranicza się jedynie do zmian w wypustkach osiowych, lecz obejmuje również dendryty i część perikarialną neuronu.

Ryc. 13. Bardzo znacznie poszerzony akson bezosłonkowy zawiera nagromadzenie neurofilamentów, liczne zmienione mitochondria, struktury błoniaste siatki śródplazmatycznej gładkiej oraz skupienia ziaren glikogenopodobnych. Pow. 24000 ×
Fig. 13. A marked enlargement of an unmyelinated axon filled with numerous neurofilaments, changed mitochondria, membranous profiles of smooth endoplasmatic reticulum and clusters of glycogen-like particles. × 24000

Ryc. 14. Obrzmiały dendryt z elektronowo przezierną cytoplazmą zawierającą fragmenty rozpadłych mikrotubul, struktury wakuolarno-błoniaste i ziarna glikogenopodobne. Pow. 26000 ×

Fig. 14. A swollen dendrite with electron-lucent cytoplasm shows disrupted fragments of microtubules, vacuolar-membranous structures and glycogen-like particles. × 26000



Jeśli chodzi o komórki astrogleju, stanowią one podłoże rozwijających się zmian obrzękowych, jednak udział ich w procesie patologicznym wydaje się wtórny. Przemawia za tym hipertroficzna reakcja astrocytów ze znacznym wzrostem gliofilamentów jak również charakter zmian we włóknach nerwowych wyraźnie różniących się od zmian występujących w doświadczalnych lub naturalnych gliopatiach (Schneider, Cervos-Navarro 1974; Gambetti i wsp. 1969). Dalsze badania ośrodkowego układu nerwowego królików pt zarówno we wcześniejszych jak i późniejszych okresach rozwoju choroby pozwolą na dokładniejszą interpretację sekwencji procesu chorobowego. Nie precyzując ostatecznie wzajemnych powiązań zmian obserwowanych w badanym materiale, można stwierdzić, że:

1. W istocie białej rdzenia królików pt w ostrym okresie choroby zmiany zwyrodnieniowe mieliny i aksonów rozwijają się równolegle.
2. Zmiany w osłonkach mielinowych łączą się z opóźnionym i niedostatecznym procesem mielinizacji włókien osiowych, znacznie rzadziej natomiast są następstwem klasycznego zwyrodnienia typu Wallera.
3. Różne typy zmian w aksonach mogą stanowić odpowiednik wielogniskowego uszkodzenia wypustki osiowej w postępującym procesie zwyrodnienia neuronu.

A. Тарашевска

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У КРОЛИКА РТ
В СИМПТОМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ БОЛЕЗНИ

Резюме

Исследованы ультраструктурные изменения в спинном мозгу кролика рт в остром периоде болезни с особым учетом миелиновых оболочек и осевых волокон белого вещества. Исследования произведены на 5 кроликах рт в возрасте 6—9 недель с клиническими симптомами в виде характерных дрожаний и усиленных спастических парезов, а также на двух здоровых контрольных кроликах.

Ryc. 15. Część perikarialna komórki nerwowej rogu przedniego. Fragmentacja oraz zanik siatki śródplazmatycznej szorstkiej, zwiększenie ilości wolnych rozet rybosomów. Mitochondria drobne o zagęszczonej macierzy. Aparat Golgiego dobrze rozwinięty. Pow. 11600 ×

Fig. 15. Perikaryon of anterior horn nerve cell. Fragmentation and diminution of the rough endoplasmic reticulum, increased free ribosome rosettes. Small mitochondria with condensed matrix. Well developed Golgi apparatus. × 11600

Ryc. 16. Część perikarialna komórki nerwowej rogu tylnego. Zanik siatki śródplazmatycznej szorstkiej i rozproszenie polirybosomów. Powiększenie aparatu Golgiego, zwłaszcza jego części pęcherzykowej. MB — ciało wielopęcherzykowe, L — lizosomy. Pow. 9300 ×

Fig. 16. Perikaryon of the anterior horn nerve cell. Depleted ER and scattered polyribosomes. Abundant Golgi apparatus, particularly its vesicular part. MB — multivesicular body, L — lysosomes. × 9300

Изменения в нервных волокнах заключались в повреждении миелиновых оболочек или аксоплазмы, реже — в повреждении целого волокна типа дегенерации Валлера. Во многих осевых волокнах установлена запаздывающая или неполная миелинизация. Дегенеративные изменения миелина происходили главным образом в расслоенных оболочках, содержащих увеличенные цитоплазматические отростки олигодендроцитов. В аксонах чаще всего наблюдалось небольшое или ограниченное повреждение аксоплазмы, иногда выборочная секвестрация и фагоцитоз измененных органелл или частей аксоплазмы при аксональной цитоплазмой клетки оболочки. В части волокон появлялись далеко зашедшие дегенеративные изменения в виде накопления в аксоплазме многочисленных патологически измененных органелл или полного распада аксона типа дегенерации Валлера.

Разнообразие аксональных изменений интерпретируется как различные последовательности многоочагового повреждения осевого отростка в прогрессирующем процессе дегенерации нейрона.

A. Taraszewska

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE SPINAL CORD OF PT RABBIT IN THE SYMPTOMATIC PERIOD OF THE DISEASE

Summary

Ultrastructural changes in the spinal cord of pt rabbit in the acute phase of the disease were studied, with a special consideration of myelin sheaths and axons of the white matter. The studies were performed on 5 pt rabbits in the age of 6—9 weeks, with clinical symptoms in the form of typical tremor and intensified spastic paresis, and on 2 control rabbits.

Changes in nerve fibres consisted in an injury of myelin sheaths or axoplasm and less frequently in a damage of the whole fibre of Wallerian degeneration type. Numerous axons showed delayed or incomplete myelination. Degenerative changes of myelin mostly appeared in delaminated sheaths containing enlarged cytoplasmic processes of oligodendrocytes. The changes in axons most frequently included minute or limited axoplasmic lesion and in some cases selective sequestration and phagocytosis of altered organelles or of a part of axoplasm by periaxonal cytoplasm of the sheath cell. In a number of fibres advanced degenerative changes appeared in the form of accumulation in axoplasm of numerous pathologically changed organelles or complete degradation of axon of Wallerian degeneration type.

The different forms of axonal changes were interpreted to represent different sequences of multifocal axonal injury accompanying progressing neuronal degeneration.

PIŚMIENNICTWO

1. Ballin R. H. M., Thomas P. K.: Changes at the nodes of Ranvier during Wallerian degeneration. An electron microscopic study. *Acta neuropath. (Berl.)* 1969, 14, 237—249.
2. Berger B.: Quelques aspects ultrastructuraux de la substance blanche chez la souris quaking. *Brain Res.* 1971, 25, 35—53.
3. Blümcke S., Niedorf H. R.: Electron microscopic studies of Schwann cells during the Wallerian degeneration with special reference to the cytoplasmic filaments. *Acta neuropath. (Berl.)* 1966, 6, 46—60.

4. Cook R. D., Wiśniewski H. M.: The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Brain Res.*, 1973, 61, 191—206.
5. Dekaban A.: Oligodendroglia and axis cylinders in rabbits before, during and after myelination. *Anat. Rec.*, 1956, 126, 111—122.
6. Gambetti P., Mellman W. J., Gonatas N. K.: Familial spongy degeneration of the central nervous system (van Bogaert-Bertrand disease). *Acta neuropath.*, 1969, 12, 103—115.
7. Hirano A.: The pathology of the central myelinated axon. In: *The structure and function of nervous tissue*, vol. 5, Ed. G. H. Bourne, Academic Press, New York, London, 1972, 73—162.
8. Lampert P.: A comparative electron microscopy study of reactive, degenerating, regenerating and dystrophic axons. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 345—368.
9. Meier C., Herschkowitz N., Bischoff A.: Morphological and biochemical observations in the Jimpy spinal cord. *Acta neuropath. (Berl.)* 1974, 27, 349—362.
10. Osetowska E., Luszawski F.: „Prolegomena” do badań doświadczalnych nad chorobą dziedziczną układu nerwowego na modelu królika pt. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 61—70.
11. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Ostre i przewlekłe zmiany w rdzeniu u królika pt. 1977. Dane nie opublikowane.
12. Robain O.: Gliogenese post-natale chez le lapin. *J. Neurol. Sci.*, 1970, 11, 445—461.
13. Samorajski T., Friede R. L.: A quantitative electron microscopic study of myelination in the pyramidal tract of rat. *J. comp. Neurol.* 1968, 184, 323—338.
14. Samorajski T., Friede R. L., Reimer R. R.: Hypomyelination in the Quaking mouse. A model for the analysis of disturbed myelin formation. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1970, 29, 507—523.
15. Schneider H., Cervos-Navarro J.: Acute gliopathy in spinal cord and brain stem induced by 6-aminonicotinamide. *Acta neuropath. (Berl.)* 1974, 27, 11—23.
16. Schoental R., Cavanagh J. .: Mechanisms involved in the „dying-back” process — a hypothesis implicating coenzymes. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 1977, 3, 145—157.
17. Spencer P. S., Thomas P. K.: Ultrastructural studies of the dying-back process. II. The sequestration and removal by Schwann cells and oligodendrocytes of organelles from normal and diseased axons. *J. Neurocytol.* 1974, 3, 763—783.
18. Watanabe J., Bingle G. J.: Dysmyelination in „Quaking” mouse. Electron microscopic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1972, 31, 352—369.
19. Vial J. D.: The early changes in the axoplasm during Wallerian degeneration. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 551—556.
20. Vaughn J. E.: An electron microscopic analysis of gliogenesis in rat optic nerves. *Ztschr. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 1969, 94, 293—324.
21. Vaughn J. E., Pease D. C.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. III. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. *J. Comp. Neurol.* 1970, 140, 207—226.

Adres autora: Ośrodek Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki.

KOMUNIKAT

W okresie od 3 do 6 października 1979 odbędzie się w Budapeszcie Sympozjum Neurologii i Psychiatrii Dziecięcej.

Głównymi tematami Sympozjum będą:

- znaczenie nowych metod neurofizjologicznych w neuropedii,
- choroby metaboliczne układu nerwowego u dzieci,
- doniesienia wolne.

Termin zgłoszeń uczestnictwa mija 15 stycznia 1979 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

A. Mattyus, M. D.

Heim Pál Hospital for Children, Neurological Department,

H 1089 Budapest, Üllői ut. 86.

Jerzy Dymecki

JANINA RAFAŁOWSKA

SOME PROBLEMS OF THE DEVELOPMENT AND AGING OF NERVOUS SYSTEM

I. SPINAL CORD IN THE 2ND HALF OF FETAL LIFE AND EARLY INFANCY*)

Department of Neurology, Medical School, Warsaw
Head of Department: Prof. I. Hausmanowa-Petrusewicz, M.D.

Myelination is the most important phenomenon occurring in the spinal cord in the 2nd half of fetal life. Studies on the myelination of human nervous system appeared at the end of 19th century. In 1894 and 1903 Flechsig found that the first myelinated fibres appear in the spinal cord and that the process progresses towards the medulla, pons and mesencephalon. The cortex is the last to become myelinated: the projective centers are myelinated at the beginning, the associative ones — at the end. Flechsig believed that the projection tracts myelinate before the associative ones, the sensory tracts before the motor ones, the peripheral nerves before the central tracts.

The works of Flechsig were followed by reports concerning myelination in the fetal period and early infancy (Monakow 1900, 1910), in which the role of vascularization of various parts of the brain as the most important factor in myelination was emphasized.

In the 1930 and later several papers reviewed the information about certain stages of myelination of the central and peripheral nervous system in humans (Keene, Hewer 1931; Langworthy 1932a, 1933). They brought more precise data on myelination of various parts of the brain, ascending and descending tracts as well as cranial nerves, and revealed that myelination of motor cranial nerves occurs earlier than that of sensory ones, and it is also earlier in anterior than in posterior roots (Langworthy 1932a, b, 1933; Larroche 1962, 1965). Later on reports on

*) The work was financed by Polish Academy of Sciences, Grant nr 10.4.2.02

the histoenzymatic maturation of the central nervous system appeared (Farkas-Bargeton, Thieffry 1967). The studies of myelination in cat, opossum and rat (Langworthy 1932b; Jacobson 1963) indicate that it occurs similarly in all mammals: the structures phylogenetically older become myelinated earlier, and myelination process proceeds according to the principle true for all vertebrates: in the centripetal—centrifugal and cranio-caudal directions.

The ultrastructural studies of fetuses and newborn animals shed light on myelination based on the study of optic nerve, spinal pyramidal tract, the white matter of hemispheres and corpus callosum. Oligodendroglial cells are responsible for the formation of myelin in the central nervous system (Luse 1956; Peters 1960). As revealed by ^3H -thymidine studies in rats the myelination of pyramidal tract is preceded by rapid proliferation of glial cells, called myelination gliosis (Schonbach et al., 1968). Similar data were obtained studying the pyramidal tract and the white matter of cerebral hemispheres in humans (Friede 1961). Myelination gliosis results in a considerable increase of the number of glial cells per 1 axon, although the 1:1 ratio found in the peripheral nervous system (Peters, Muir 1962) is not achieved (Samorajski, Friede 1968). Thus, one oligodendroglial cells is supposed to produce myelin in few internodes or even in numerous axons (Peters 1962). Myelin is possibly formed in all these parts of oligodendrocytic cytoplasm which adhere to the axon (Hirano, Dembitzer 1967). Rapid increase in the diameter of axon, up to $0.3\ \mu\text{m}$, seems to be the stimulus for myelination (Matthews 1968). This is the diameter of smallest myelinated, frequently mature, fibres in the central nervous system.

There is only fragmentary information on the myelination of human spinal cord in ontogenesis. This causes difficulties in the morphological evaluation of pediatric cases and justifies the present attempt to evaluate myelination in various periods of development of man.

MATERIAL AND METHOD

The material consisted of 6 human fetuses (E) aged from 16 — 17 up to 34 weeks and 6 infants (N) aged from 1 day to 3 years (Table 1).

The spinal cord was taken from fetuses 1.5—3 hours after death, from other cases after 9—28 hours. It was fixed in 10% calcium formalin for 7—10 days. The lower half of C_8 and Th_1 as well as a part of the lumbo-sacral segment were taken for further studies. Sections of paraffin-embedded material were stained by the Klüver-Barrera method.

Table 1. Material
Tabela 1. Materiał

No Lp.	Number of case Nr przypadku	Age — Wiek	Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne
1	E 1	16 T17 weeks tyg.	Fetal cases Przypadki płodowe
2	E 8	18 weeks tyg.	
3	E 2	20 weeks tyg.	Interruption of pregnancy for medical or social reasons
4	E 4	25 weeks tyg.	Przerwanie ciąży ze wskazań lekarskich lub społecznych
5	E 10	27 weeks tyg.	
6	E 5	34 weeks tyg.	
7	N 1	1 day doba	Diseases not pertaining to the nervous system
8	N 3	10 days dni	Choroby nie dotyczące układu nerwowego
9	N 4	1 month mies.	
10	N 2	3 months mies.	
11	N 8	8 months mies.	
12	N 6	3 years lata	

RESULTS AND DISCUSSION

The results are presented in Table 2.

The posterior horn of spinal cord of a 16—17-week fetus (Fig. 1) shows a high number of cells with scanty cytoplasm; their nuclei are polymorphous, of variable size, clear, vesicular or darkly staining, with present nucleoli. These cells are still undifferentiated. In the contrary, the motor cells of the anterior horn are already differentiated, contain tigroid and form distinct groups (Fig. 2). This indicates not simultaneous differentiation of motor and sensory cells.

Analogous observations of human material concern the Westphal-Edinger nucleus (Dwight-Hogg 1966). In the 15.5th week of fetal life numerous cells of this nucleus are still undifferentiated while movements of the eyeballs after stimulation of eyelid can be elicited which suggests differentiation of motor cells in the nucleus of the oculomotor nerve being completed already in the 12th week (Humprey 1964). It is known that in the 15—16th week of fetal life the brain stem shows numerous, well formed motor nuclei of cranial nerves con-

Table 2. Appearance of the first fibres undergoing myelination of the cervical and lumbo-sacral parts of the spinal cord (in weeks of fetal age.)

Tabela 2. Pojawienie się pierwszych mielinizujących się włókien w odcinku szyjnym i lędźwiowo krzyżowym rdzenia kręgowego (w tygodniach życia płodowego)

Anatomical structures Struktury anatomiczne	C ₈ — Th ₁ segment Odcinek C ₈ — Th ₁	Lumbo-sacral part Odcinek lędźwiowo- krzyżowy
<i>Fasciculus gracilis</i>	27	? (27—34)
<i>Fasciculus cuneatus</i>	20	
<i>Tractus spinocerebellaris posterior</i>	27	
<i>Tractus spinocerebellaris anterior</i>	27	34
<i>Tractus spinothalamicus</i>	17	34
<i>Tractus olivospinalis</i>	27	34
<i>Tractus vestibulospinalis</i>	27	34
<i>Tractus tectospinalis</i>	? (27—34)	34
<i>Tractus rubrospinalis</i>	34 —1 day after birth 34 —1 doba życia	(1 day after birth) (1 doba życia)
<i>Tractus corticospinalis lateralis</i>	(1 month after birth) (1 mies. po urodzeniu)	(3 months after birth) (3 mies. po urodzeniu)
<i>Tractus corticospinalis anterior</i>	34	
<i>Cornu posterius</i>	27	? (27—34)
<i>Cornu anterius</i>	18	20
<i>Commisura anterior</i>	25	34
<i>Fasciculus medialis radici dors</i>	18	20

sisting of almost mature cells. In the chicken the motor cells of anterior horn differentiate earlier than those of the posterior one (Fujita 1964). In mouse, the neuroblasts migrate to the lower oliva earlier than to the nucleus raphe pallidus (Taber Pierce 1966). In mouse and rat a large proportion of the cells of cerebellar and hippocampal granular layer are formed after the birth (Altman 1965, 1966; Altman 1966; Fujita et al., 1966; Fujita 1967).

These data concerning both humans and animals indicate earlier development of larger cells with long projection fibres in relation to smaller cells (Hinds 1968). This is true for various regions of the central nervous system as well as for the motor and sensory cells. The cells of the human spinal cord seem to develop according to this principle.

Small granular cells, formed after birth of the animal are believed (Altman, Das 1965; Altman 1966) to play the role of intercalated associative neurons. They may be plastic elements important for the adaptation of animals to external conditions.

The earliest myelination occurs in the cervical segment (Figs 3, 4) in the medial bundle of the posterior root and the fibres running from the anterior horn to the anterior root (18th week), and later in Burdach's tract (Fig. 5) which conducts the proprioceptive stimuli from upper extremities (20th week; Table 2). Two weeks later (20th week), but in the same sequence, myelination appears in the fibres running from the an-

terior horn and medial bundle of the posterior horn in the lumbo-sacral segment. We are unable to answer when the myelination of Goll's tract in the lumbo-sacral segment begins. In the 27th week myelinated fibres can be found in this tract in the cervical segment (Figs 8, 9), but between the 20—27th weeks the Goll's tract in the lumbar segment shows only numerous cells of myelination glia. Fairly numerous myelinating fibres are found in the 34th week. The myelination of Goll's tract in the lumbo-sacral segment is most probably delayed by some weeks, as compared with cervical region.

The anterior spino-cerebellar and spino-thalamic tracts become myelinated probably about 7 weeks earlier in the cervical segment (Fig. 10) than in the lumbo-sacral one. These data confirm the cranio-caudal direction of development. The anterior commissure of the spinal cord (Fig. 7), which contains numerous fibres of the spino-thalamic tract starts to myelinate slightly earlier (2 weeks) than the spino-thalamic tract in the lateral funiculi. This is compatible with the opinion, that myelination begins from the cell perikaryon (Strong 1906).

Phylogenetically old descending tracts begin to myelinate about the 27th week (Fig. 10). The rubrospinal tract is an exception since in it according to our material as well as that of Langworthy (1932a) the myelinating fibres appear only on 1st day of extrauterine life. Tridon (1959) and Larroche (1965) report that this tract is myelinated in the 32nd week of fetal life. The majority of its fibres can be connected with the phylogenetically younger small-cell portion of nucleus ruber (Poliakow 1960).

According to the literature data myelination of the anterior pyramidal tract can occur on the 40th day of fetal life (Larroche 1965) or in the second month after birth (Langworthy 1932a). These data indicate earlier myelination of this tract than that of the lateral pyramidal tract. The same is true in our material. In the anterior pyramidal tract the myelination glia appears in the 27th week of fetal life (Fig. 6), whereas the first still very few myelinated fibres in the 34th week of fetal life (Fig. 11). In cases aged 1 day and 1 month this tract does not almost differ from the other ones (Figs 12, 13), and in the case aged 8 months it reaches the stage of myelination of phylogenetically older tracts (Fig. 14). In the same cases the lateral pyramidal tract is much less myelinated.

The myelination of a nerve fibre begins when the nerve cell itself is already mature. It is thus possible that the anterior pyramidal tract comprises the axons of cells which mature earlier in the ontogeny. Either the pyramidal cells of layer V which mature in the last period of intrauterine life (Poliakow 1960; Larroche 1965) or the phylogenetically

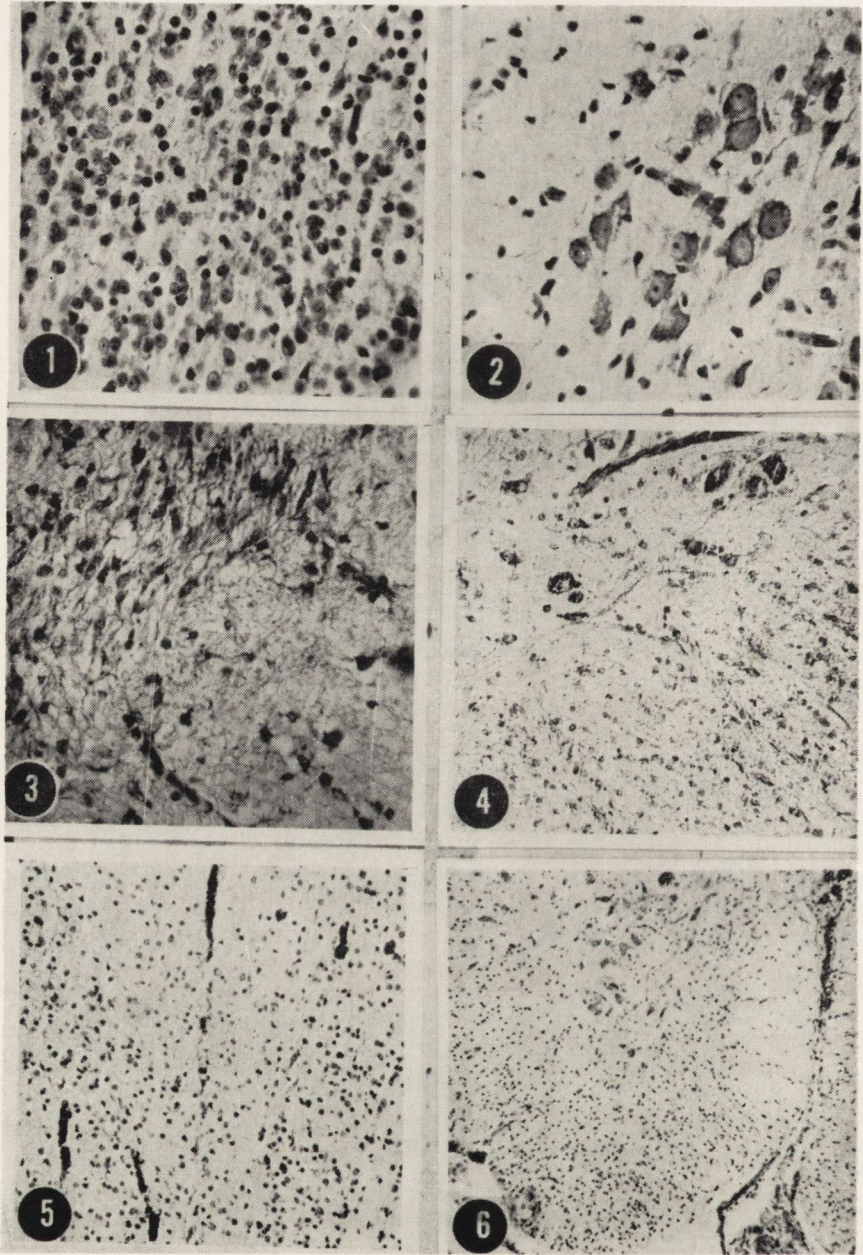


Fig. 1. Case E 1, 16—17th week, Th₁. Highly cellular posterior horn. Klüver-Barrera. $\times 135$.

Ryc. 1. E 1, 16—17 tyg. Th₁. Bogatokomórkowy róg tylny. Klüver-Barrera. Pow. $135 \times$

older and earlier maturing cells of subcortical structures (Larroche 1962) could be the cells of origin of this tract. The myelination of the lateral pyramidal tract, extending long after birth, makes evident its connection with the so-called superficial cortical zone comprising layer III, developing intensively within several months of postnatal life (Poliakow 1949). Advanced myelination of this tract at the level of the internal capsule can be observed in the 6th month of life, and advanced myelination of the entire frontal lobe in the 18th month (Dekaban 1959).

The comparison of our data with those of other authors confirms a known fact of earliest myelination of the afferent tracts in the human spinal cord (Flechsig 1894; Langworthy 1932a; Dekaban 1959; Tridon 1959; Larroche 1965). It is believed (Langworthy 1932b) that in the uterine cavity all sensory endings except of the visual and olfactory ones can be adequately stimulated. The visual tract begins to myelinate in the last weeks of fetal life, and the olfactory one only after birth (Langworthy 1932a; Larroche 1965).

Our material confirms also the data about earlier myelination of the efferent portion of the reflex arch. Fine myelin sheath was found in the fibres running from the anterior horn to the anterior root in the 18th week of fetal life (Fig. 4). The motor cells of the anterior horn in

Fig. 2. Case E 1, 16—17th week, Th₁. Retropostero-lateral group of motor cells. Klüver-Barrera. × 270

Ryc. 2. E 1, 16—17 tyg. Th₁. Grupa zatylno-boczna komórek ruchowych. Klüver-Barrera. Pow. 270 ×

Fig. 3. Case E 8, 18th week, C₈. Early myelination of the medial bundle of ascending fibres in the posterior root. Klüver-Barrera. × 270

Ryc. 3. E 8, 18 tyg. C₈. Początek mielinizacji wiązki przysrodkowej włókien wstępujących korzenia tylnego. Klüver-Barrera. Pow. 270 ×

Fig. 4. Case E 8, 18th week, C₈. Faint myelination of fibres in the anterior horn and of those running to the anterior root. Klüver-Barrera. × 135

Ryc. 4. E 8, 18 tyg. C₈. Delikatna mielinizacja włókien w rogu przednim oraz biegnących do korzenia przedniego. Klüver-Barrera. Pow. 135 ×

Fig. 5. Case E 2, 20th week, Th₁. Myelination gliosis more pronounced in Burdach's than in Goll's tract. Variable size and shape of the nuclei of myelination glia in Burdach's tract. Klüver-Barrera. × 100

Ryc. 5. E 2, 20 tyg. Th₁. Obfitsza glejoza mielinizacyjna w szlaku Burdacha niż w szlaku Golla. Różna wielkość i kształt jąder gleju mielinizacyjnego w szlaku Burdacha. Klüver-Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 6. Case E 2, 20th week, Th₁. Numerous cells of myelination glia in anterior funiculus, their absence in anterior pyramidal tract. Klüver-Barrera. × 65

Ryc. 6. E 2, 20 tyg. Th₁. Liczne komórki gleju mielinizacyjnego w powrózku przednim, brak ich w szlaku piramidowym przednim. Klüver-Barrera. Pow. 65 ×

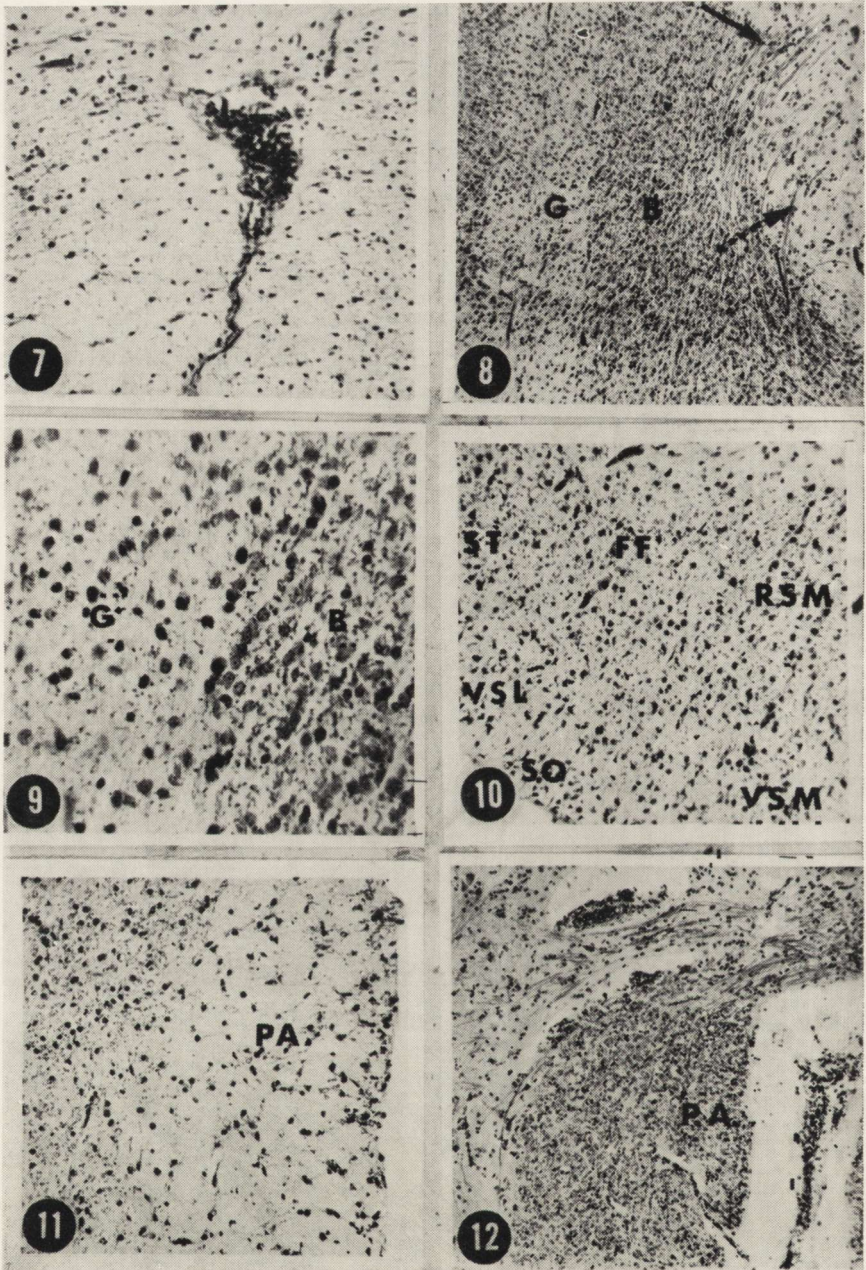


Fig. 7. Case E 4, 25th week, C₈. Early myelination of fibres of anterior commissure. Some of myelination glia present in anterior pyramidal tracts. Klüver-Barrera. $\times 270$

Ryc. 7. E 4, 25 tyg. C₈. Początek mielinizacji włókien spoidła przedniego. Nieliczne komórki gleju mielinizacyjnego w szlakach piramidowych przednich. Klüver-Barrera. Pow. 270 \times

Fig. 8. Case E 10, 27th week, C₈. Myelination of Burdach's tract (B) is more pronounced than that of Goll's tract (G). Myelination of medial bundle of ascending fibres (arrow) as well as of other ascending fibres (dashed arrow) of posterior root. Klüver-Barrera. $\times 65$

Ryc. 8. E 10, 27 tyg. C₈. Wyraźniejsza mielinizacja pęczka Burdacha (B) niż Golla (G). Mielinizacja wiązki przyśrodkowej włókien wstępujących (strzałka) oraz innych włókien wstępujących (strzałka przerywana) korzenia tylnego. Klüver-Barrera. Pow. 65 \times

Fig. 9. Case E 10, 27th week, C₈. Myelination of Burdach's tract (B) is more pronounced than that of Goll's tract (G). Klüver-Barrera. $\times 270$

Ryc. 9. E 10, 27 tyg. C₈. Wyraźniejsza mielinizacja pęczka Burdacha (B) niż pęczka Golla (G). Klüver-Barrera. Pow. 270 \times

Fig. 10. Case E 10, 27th week, C₈. Most advanced myelination of fasciculus fundamentalis (FF) of the anterior funiculus, less advanced in lateral (VSL) and medial (VSM) vestibulo-spinal tracts, medial reticulo-spinal tract (RSM), spino-olivary (SO) and spino-thalamic (ST) tracts. Klüver-Barrera. $\times 200$

Ryc. 10. E 10, 27 tyg. C₈. Najwyraźniejsza mielinizacja w pęczku podstawowym (FF) sznura przedniego, mniej zaawansowana w szlaku przedsionkowo-kregowym bocznym (VSL) i przyśrodkowym (VSM), siatkowo-rdzeniowym przyśrodkowym (RSM), rdzeniowo-oliwkowym (SO) i rdzeniowo-wzgorzowym (ST). Klüver-Barrera. Pow. 200 \times

Fig. 11. Case E 5, 34th week, C₈. Early myelination of anterior pyramidal tract (PA). Klüver-Barrera. $\times 270$

Ryc. 11. E 5, 34 tyg. C₈. Początek mielinizacji szlaku piramidowego przedniego (PA). Klüver-Barrera. Pow. 270 \times

Fig. 12. Case N 1, 1 day, Th₁. Advanced myelination of anterior pyramidal tract (PA), and fibres of anterior commissure. Klüver-Barrera. $\times 65$

Ryc. 12. N 1, 1 doba, Th₁. Zaawansowana mielinizacja szlaku piramidowego przedniego (PA) oraz włókien spoidła przedniego. Klüver-Barrera. Pow. 65 \times

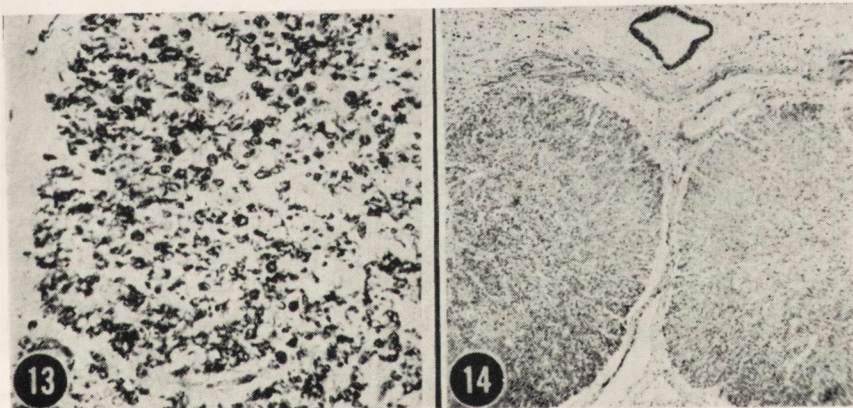


Fig. 13. Case N 4, 1 month, C₈. Advanced myelination of anterior pyramidal tract. Klüver-Barrera. $\times 270$

Ryc. 13. N 4, 1 miesiąc, C₈. Zaawansowana mielinizacja szlaku piramidowego przedniego. Klüver-Barrera. Pow. 270 \times

Fig. 14. Case N 8, 8 months, C₈. Normal myelination of anterior funiculi and anterior commissure. Klüver-Barrera. $\times 40$

Ryc. 14. N 8, 8 miesięcy, C₈. Prawidłowa mielinizacja sznurów przednich oraz spoidła przedniego. Klüver-Barrera. Pow. 40 \times

C₈ segment showed in this case presence of tigroid in their entire cytoplasm, they were thus almost mature. Achievement of full maturity by the motor cells may last several weeks, from the 17th to 24th week of life, and according to Szulejkina (1958, 1959) various cell groups may mature in various periods. The cells related to the flexors of fingers participating in the grasp reflex which appear very early in fetal life, mature and develop more rapidly than other groups of cells in the anterior horn. Our observation fails to confirm these findings since the grade of development of various cell groups was more or less identical. The period of 16—17th week is, maybe, too late to observe the essential differences.

Our data concerning the periods of myelination of various structures differ from those of other authors. We found first myelinated fibres in Burdach's tract in a 20th week fetus. Langworthy (1932a, b, 1933) reported finding them in the 26th week, and Larroche (1965) in the 28th week of intrauterine life. Myelination of anterior horns was observed by Langworthy (1932a) in the newborn only, while we found rather numerous myelinating fibres in a 25th week fetus. Various factors seem to be responsible for these divergencies:

1) The terminology is not precise. It is not clearly stated whether the term "myelination" means an advanced process or its beginning only. If this is "beginning" is it the myelination gliosis or the appearance of fibres with the myelin sheath? In our material myelination gliosis of ascending sensory tracts and some descending ones appeared 9 weeks before the appearance of the first myelinating fibres visible under light microscope.

The most of descriptions with the exception of those of Langworthy (1933) do not mention the degree of myelination. Sometimes, comparison is difficult since the age is expressed in months: it is not clear whether these are calendar or lunar ones.

2) Myelination depends upon the degree of maturity of the nerve cell, normal axonal flow, diameter of fibre and on the myelinating cell. Transsection of the sciatic nerve in newborn rats resulted in myelination delay in the dorsal funiculus (Kingsley 1970). Transneuronal changes were also found in the cells of anterior horns after removal of a cerebral hemisphere and in the nucleus of funiculus gracilis after transsection of lumbo-sacral posterior roots in cats (Young, Rowley 1970). The number of myelinated fibres of the optic nerve in mice kept in darkness was 12% lower (Gyllensten, Malinfors 1963). Immobilization of one extremity of rat in the period of growth caused delay of myelination (Tomanek 1968). Peripheral stimuli can thus influence the pro-

cess of myelination, particularly since there is the possibility of antidromic axonal flow along the nerve (Kerkut 1968).

Undernourishment and factors reducing cholesterol synthesis delay also myelination (Rawlins, Uznam 1970; Hedley-Whyte 1973). There is only scanty information on the effects of these factors on the myelination in human nervous system. In a few cases of perinatal transverse injury of the spinal cord myelination was impaired in the segments proximal to the injury (Hedley-Whyte, Gilles 1974). The interpretation of Hedley-Whyte and Gilles (1974) that myelination is retarded because of lack of contact of the axon with the periphery is hardly acceptable. Retrograde degeneration of axon and pathologic changes in myelin cannot be also excluded.

Numerous acquired or congenital, sometimes genetically determined factors cause retarded myelination and damage to myelin. This manifests itself in a form of a distinct syndrome of clinical signs. Innumerable, often hardly detectable factors can unfavorably influence the developing fetus and cause shifts in the stages of development. This may be the cause of differences in the reported periods of myelination. In view of this, strict normal values are hard to determine and a wide range of normal should be rather accepted.

CONCLUSIONS

1. First to myelinate are these anatomical structures of the spinal cord which constitute a part of the reflex arch and therefore are essential in the life of newborn.

2. Among the central tracts the proprioceptive afferent ones related to the upper extremities myelinate earliest; the process probably begins in the period when myelination already progresses in the fibres of reflex arch at the level of spinal cord.

3. Lateral and anterior pyramidal tracts are probably related to the cells maturing in various periods of ontogenic development. The cells of origin of the anterior pyramidal tract seem to be phylo- and ontogenetically older than those of the lateral pyramidal tract.

J. Rafałowska

WYBRANE PROBLEMY ROZWOJU I STARZENIA W UKŁADZIE NERWOWYM

I. Rdzeń kręgowy w drugiej połowie życia płodowego
i w okresie wczesnodziecięcym

Streszczenie

Ocena odcinka C₈—Th₁ i L₅—S₁ rdzenia kręgowego w 6 przypadkach płodów ludzkich w wieku 16—34 tyg. i 6 przypadkach dziecięcych w wieku 1 dzień — 3 lata wykazała: w 16—17 tygodniu życia płodowego róg tylny rdzenia kręgo-

wego może nie być jeszcze w pełni ukształtowany. Najwcześniej mielinizują się włókna w rogu przednim rdzenia kręgowego: w 18 tygodniu życia płodowego w odcinku szyjnym i w 20 tygodniu w odcinku lędźwiowo-krzyżowym. Glejozę mielinizacyjną stwierdzono w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego w 18 tygodniu życia płodowego. Była ona najobfitsza w szlakach Burdacha, mniej nasilona — w pozostałych szlakach wstępujących i starszych filogenetycznie szlakach zstępujących. Szlaki piramidowe nie wykazywały gleju mielinizacyjnego. Pierwsze mielinizujące się włókna stwierdzono w powrózku Burdacha w 20 tygodniu życia płodowego, w pozostałych drogach wstępujących i starszych filogenetycznie szlakach zstępujących — w 27 tygodniu życia płodowego. W odcinku lędźwiowo-krzyżowym rdzenia kręgowego mielinizacja wyżej wzmiankowanych szlaków rozpoczyna się prawdopodobnie o ± 7 tygodni później. Pierwsze mielinizujące się włókna w spidle przednim rdzenia zaobserwowano w odcinku szyjnym w 25 tygodniu życia płodowego, a w odcinku lędźwiowo-krzyżowym w 34 tygodniu. Szlak piramidowy przedni zaczyna się mielinizować około 34 tygodnia życia płodowego; w 8 miesiącu życia pozamacicznego jego mielinizacja nie różni się od mielinizacji starszych filogenetycznie szlaków. Szlak piramidowy boczny zaczyna się mielinizować po urodzeniu.

Я. Рафаловска

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ И СТАРЕНИЯ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

I. Спинной мозг во второй половине эмбриональной жизни и в период раннего детства

Резюме

Оценка участка C_8-Th_1 и L_5-S_1 спинного мозга в 6 случаях человеческих плодов в возрасте 16—34 недель и в случаях детей в возрасте 1 день — 3 года показала следующее. На 16—17 неделе жизни плода задний рог спинного мозга может не быть еще полностью сформированным. Раньше всего миелинизируются волокна в переднем роге спинного мозга: на 18ой неделе жизни плода в шейном участке и на 20ой неделе в пояснично-крестцовом участке. Миелинизированный глиоз установлен в шейном участке спинного мозга на 18ой неделе жизни плода, наиболее обильный в путях Бурдаха, менее интенсивный в остальных восходящих путях и в филогенетически более старых нисходящих путях. Пирамидные пути не обладали миелинизированной глией. Первые миелинизирующиеся волокна обнаружены в пучке Бурдаха на 20ой неделе жизни плода, в остальных восходящих путях и филогенетически более старых нисходящих путях — на 27ой неделе жизни плода. Первые миелинизирующиеся волокна в передней спайке спинного мозга наблюдали в шейном участке на 25ой неделе жизни плода, а в поясничнокрестцовом участке — на 34ой неделе. Передний пирамидный путь начинает миелинизироваться около 34ой недели жизни плода; на 8ой месяц внematочной жизни его миелинизация не отличается от миелинизации филогенетически более старых путей. Боковой пирамидный путь начинает миелинизироваться после рождения.

REFERENCES

1. Altman, J.: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 128, 431—473.

2. Altman, J., Das, G. D.: Postnatal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 1965, 207, 953—956.
3. Altman, J., Das, G. D.: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 126, 337—389.
4. Dekaban, A.: *Neurology of infancy*. Williams and Wilkins Comp. Baltimore 1959.
5. Dwight-Hogg, I.: Observations of the development of the nucleus of Edinger-Westphal in man and the albino-rat. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 126, 567—584.
6. Farkas-Bargeton, E., Thieffry, S.: Maturation histoenzymologique de la substance blanche et des parois vasculaires du cerveau de l'enfant. *Compte Rendus D.*, 1967, 264, 669—672.
7. Flechsig, P.: *Gehirn und Seele*. *Neurol. Zentralbl.*, 1894, 2, 862—867.
8. Flechsig, P.: Weitere Mitteilungen über die myelogenetischen Felder in der menschlichen Grosshirnrinde. *Neurol. Zentralbl.*, 1903, 22, 202—206.
9. Friede, R. A.: A histochemical study of DNP-diaphorase in human white matter: with some notes on myelination. *J. Neurochem.*, 1961, 8, 17—30.
10. Fujita, S.: Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 1964, 122, 311—327.
11. Fujita, S.: Quantitative analysis of cell proliferation and differentiation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 277—287.
12. Fujita, S., Shimada, M., Nakamura, T.: H³-Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 128, 191—201.
13. Gyllenstein, L., Malinfors, T.: Myelination of the optic nerve and its dependence on visual function — a quantitative investigation in mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1963, 11, 255—266.
14. Hedley-Whyte, E. T.: Myelination of rat sciatic nerve: comparison of undernutrition and cholesterol biosynthesis inhibition. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1973, 32, 284—302.
15. Hedley-Whyte, E. T., Gilles, F. H.: Observations on myelination of human spinal cord and some effects of partitional transection. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 436—445.
16. Hinds, J. W.: Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.*, 1968, 134, 287—304.
17. Hirano, A., Dembitzer, M.: A structural analysis of the myelin sheath in the central nervous system. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 555—567.
18. Humprey, T.: Some correlations between the appearance of human fetal reflexes and the development of the nervous system. *Progr. Brain Res.*, 1964, 4, 93—135. Ed. D. P. Purpura, J. P. Schade, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, New York.
19. Jacobson, S.: Sequence of myelination in the brain of albino rat. A. Cerebral cortex, thalamus and related structures. *J. Comp. Neurol.*, 1963, 121, 5—29.
20. Keene, M. F. L., Hewer, E. E.: Some observations on myelination in the human central nervous system. *J. Anat.*, 1931, 66, 1—13.
21. Kerkut, G. A.: Transport of material along nerves. In: *Growth of the nervous system*. J. and A. Churchill Ltd., London, 1968, 220—229.

22. Kingsley, J. R., Collins, G. H., Gonverse, W. K.: Effect of sciatic neurectomy on myelinogenesis in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 1970, 26, 498—508.
23. Langworthy, O. R.: Development and behavior patterns and myelination of tracts in the nervous system. *Arch. Neurol. Psych.*, 1932a, 28, 1365—1382.
24. Langworthy, O. R.: The differentiation of behaviour patterns in the foetus and infant. *Brain*, 1932b, 55, 265—277.
25. Langworthy, O. R.: Development of behavior patterns of the nervous system in the human fetus and infant. *Carnegie Inst. Publ.*, 1933, N 443.
26. Larroche, J. C.: Quelques aspects anatomiques du développement cérébral. *Biol. Neonat.*, 1962, 4, 126—153.
27. Larroche, J. C.: Regional maturation of the central nervous system and associated pathology. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1965, 58, 7—8.
28. Luse, S. A.: Formation of myelin in the central nervous system of mice and rats as studied with electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, 2, 777—783.
29. Matthews, M. A.: An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat. Rec.*, 1968, 161, 337—351.
30. Monakow, C.: Über die Projektions — und Associationszentren im Grosshirn. *Monatschr. Psychiat. Neurol.*, 1900, 8, 405.
31. Monakow, C.: Demonstration von makro- und mikroskopischen Präparaten. *Neurolog. Zentralbl.*, 1910, 29, 110—112.
32. Peters, A.: The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 8, 431—446.
33. Peters, A.: Myelination in the central nervous system. In: *IV Inter. Congr. of Neuropath. Proc. vol. II 50—54*, G. Thieme Verlag. Stuttgart, 1962.
34. Peters, A., Muir A. R.: The relationship between axons and Schwann cells during development of peripheral nerves in the rat. *Q. J. Exp. Physiol.*, 1958, 44, 117—130.
35. Poliakow, T. J.: Strukturalna organizacija kory bolszogo mozga czelowieka po danym razwitja jejo w ontogeneze. In: *Citoarchitektonika kory golownogo mozga czelowieka*. Medgiz, 1949, Moskwa, 33—91.
36. Poliakow, G. I.: O niekotypnych onto-filogeneticzeskich sootnoszeniach w razwitii strukturalnoj osnovy reflektornych funkcji organizma. *Arch. Anat. Hist. Embriol.*, 1960, 38, 3—23.
37. Rawlins, F. A., Uzman, B. G.: Effect of AY-9944, a cholesterol biosynthesis inhibitor on peripheral nerve myelination. *Lab. Invest.*, 1970, 23, 184.
38. Samorajski, T., Friede, R. L.: A quantitative electron microscopic study of myelination in the pyramidal tract of rats. *J. Comp. Neurol.*, 1968, 134, 323—338.
39. Schonbach, J., Hu, K. W., Friede, R. L.: Cellular and chemical changes during myelination: histologic, autoradiographic, histochemical and biochemical data on myelination in the pyramidal tract and corpus callosum. *J. Comp. Neurol.*, 1968, 134, 21—37.
40. Strong, O. S.: The mode of connection of the medullated nerve fiber with the cell body. *J. Comp. Neurol.*, 1906, 16, 397—401.
41. Szulejkińska, K. W.: Rol nierównomiernego szeregowania embrjonalnych struktur w formowaniu polnocennych funkcji noworodzonego. *Akusz. Ginekol.*, 1958, 34, 49—52.

42. Szulejkina, K. W.: Srawnitielnaja charakteristika rozwitia dwigatielnych centrow w szejnych segmentach spinnogo mozga czelowieka. Arch. Anat. Hist. Embriol. 1959, 36, 42—54.
43. Taber Pierce, E.: Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse. An autoradiographic study. J. Comp. Neurol., 1966, 126, 219—239.
44. Tomanek, R. J.: Limb immobilization and the diameters and number of nerve fibers. J. Comp. Neurol., 1968, 134, 477—483.
45. Tridon, P.: Les dysraphies de l'axe nerveux et de ses enveloppes cranio-rachidiennes. Ed. G. Doin et Cie, Paris, 1959, 25—28.
46. Young, I. J., Rowley W. F.: Histochemical alteration of ventral horn cells resulting from chronic hemispherectomy or chronic dorsal root section. Exp. Neurol., 1970, 26, 460—481.

Author's address: Department of Neurology, Medical School, 02—007 Warszawa, ul. Oczki 6.

KOMUNIKAT

Zarząd Główny Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich na posiedzeniu w dniu 16.XII.78 zaakceptował listę nagrodzonych członków Stowarzyszenia za najlepsze prace z zakresu neuropatologii opublikowane lub wygłoszone na posiedzeniach Stowarzyszenia w r. 1978.

I nagroda

Zbigniew M. Rap za pracę pt.:

„Morfologiczna ocena funkcji podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekcyjnego w nadciśnieniu wewnątrzczaszkowym” opublikowaną w *Neuropatologii Polskiej* w 1978 roku, t. XVI, str. 293—302.

II nagroda

Józef Szczech

za pracę pt.:

„Mielinizacja układu limbicznego w rozwoju ontogenetycznym szczura” opublikowaną w *Neuropatologii Polskiej* w 1978 r. t. XVI, str. 25—36.

III nagroda

Halina Weinrauder

za najlepsze przedstawienie doniesienia pt.:

„Immunofluorescencyjna lokalizacja swoistych antygenów w mózgu w układach homo- i heterologicznych”, wspólnego z S. Krajewskim i T. Michalakiem, wygłoszonego w dniu 8.IV.78 podczas IV Konferencji Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich w Poznaniu.

E. I. CHUMASOV, G. V. KONOVALOV

ON THE DIFFERENTIATION AND MYELINATION OF NERVE FIBRES IN TRIGEMINAL GANGLION CULTURE

Laboratory of Pathology of the Nervous System
Institute of Experimental Medicine, Leningrad, USSR

The processes of nerve fibre differentiation and formation of myelin sheath in the peripheral nervous system have been studied mostly on the developing nerve trunks of chick embryo (Geren 1954), human embryo (Gamble, Breathnach 1965), frog tadpole (Peters 1961), and newborn rats (Peters, Muir 1959; Friede, Samorajski 1967; Allt 1969; Peters et al., 1970; Webster et al., 1973; Martin, Webster 1973; Caley, Butler 1974).

The relationship between developing axon and Schwann cells at the earliest stages of development prior to myelination still remains unexplained. Since it is very difficult to follow these relationships *in vivo*, tissue cultures present a very convenient object for this purpose. Myelination of peripheral nerve fibers in culture has been studied by Peterson et al. (1958), Murray (1965), Bunge et al. (1967), and others. However, no data are available as to the early stages of nerve fiber formation before their myelination, and relationship between newly formed nerve fibres and slightly differentiated Schwann cells. We therefore decided to examine these stages by means of histological and electron microscopic methods in culture.

MATERIAL AND METHODS

Cultures of trigeminal ganglia of 17—22 day rat embryo grown on cover-slips covered with collagen membrane in revolving test tubes in Eagle's medium, human placental serum and a glucose supplement were studied by phase contrast microscope, time-lapse cinematography, neurohistological methods (supravital methylene blue staining and silver impregnation according to Bielschowsky-Gros in own modifica-

tion) and electron microscopy in different stages of explantation, beginning from 6 hours to 35 days.

RESULTS

Growth and differentiation of nerve fibres in tissue culture is preceded by the cell migration from the ganglion explant into the growth zone, this appearing already during the first hours of culturing (Fig. 1a). In contrary to the cells located in the centre of explant, the cells and their processes situated in the peripheral zone are easily stainable by means of different histological methods and are clearly seen in phase contrast microscope. According to their morphological nature they resemble fibroblasts. Some of the cells have long processes, with thin branchings at the end. Subsequently these cells form an epitheliomorphic lining surrounding the periphery of the explant.

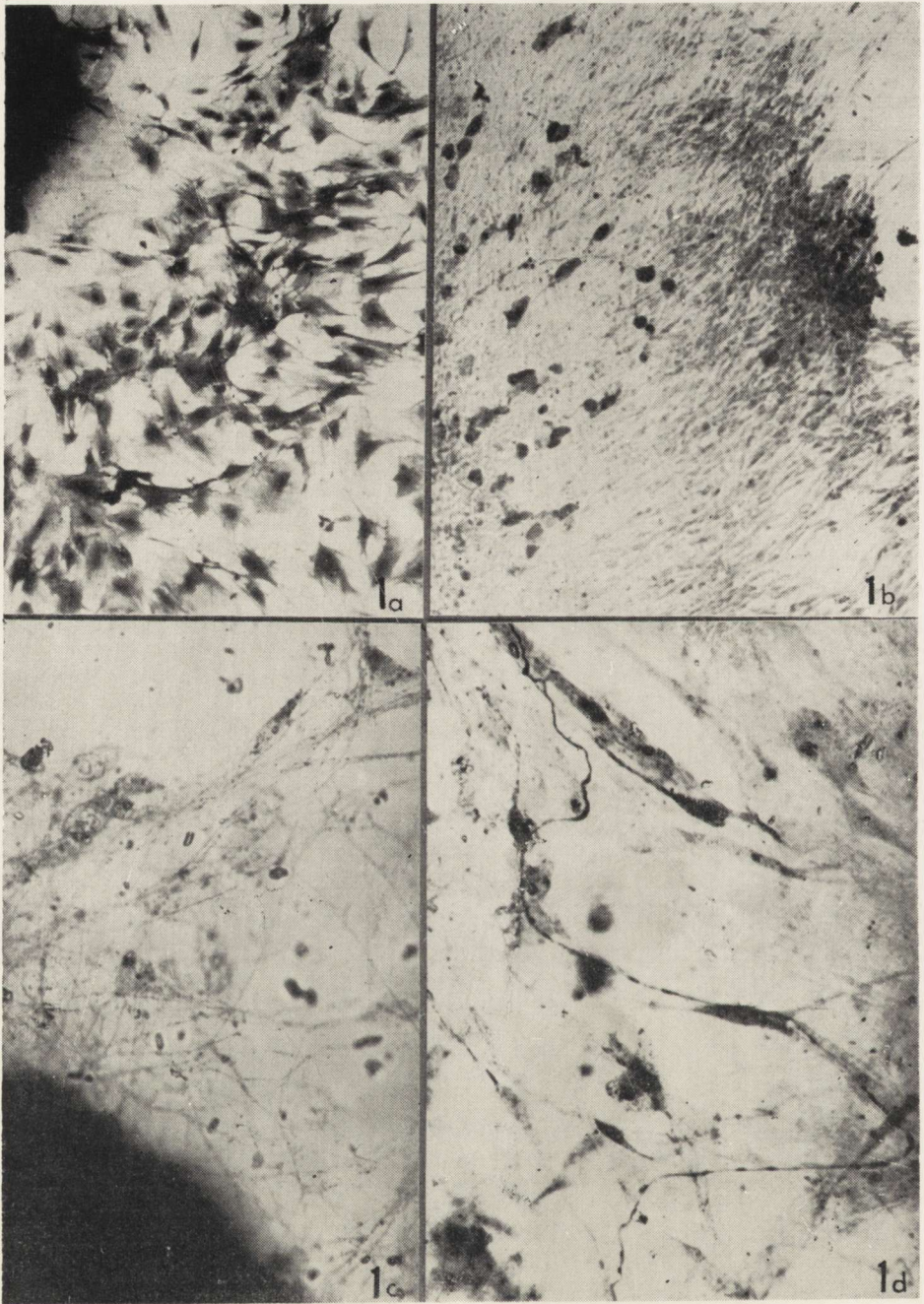
Fusiform, proliferating cells of the peripheral glia start to migrate intensively into the growth zone directly after fibroblast-like elements. The cells, 6—8 μm in diameter, are provided with long cytoplasmic processes and contain elongated, chromatin-rich nuclei with one or two nucleoli. Their bodies are closely fitted and as a rule radially oriented toward the explant. They usually grow in thin or thick bands, but on the third day of culturing they form a relatively wide cellular layer (Fig. 1b).

The first nerve fibres in the growth zone appear immediately after migration of peripheral glia cells (non-differentiated Schwann cells), during the first 24 hours after explantation. Supravital methylene blue staining is the only method permitting their visualization in the form of very fine filaments (Fig. 1c). The nerve fibres appearing in the growth zone result either from the regeneration of pseudounipolar processes of ganglion cells, severed at the time of dissection, or from the formation of new processes originating from the perikarya of sensory neurons situated along the ganglion edge. In the beginning both types of nerve fibres undergo poor silver impregnation. They differ from the thick cytoplasmic processes of both connective tissue and glial cells in their fine and uniform outlines. Many nerve processes are of a diameter less than one micrometer (0.2—0.5 μm) and as electron microscopic observations have proved, in part are beyond the resolution of a light-microscope. The newly forming and regenerating nerve cell processes grow both separately, and in the form of very fine bundles. Moreover the network of anastomosing cytoplasmic processes of non-differentiated Schwann cells and their bands create a peculiar bed for axons, with which they are closely connected (Fig. 1d). Several nerve fibres

often run together as a part of one cytoplasmic band of Schwann cells and when branching off they pass over to anastomosing processes of other Schwann cells. Some of the axons in the growth zone undergo dichotomous fission and form long, fine branchings, while others send out only short shoots to the neighbouring non-differentiated Schwann cells. Axons growing beyond the cellular layer of peripheral glia are never to be observed. Non-differentiated Schwann cells always outstrip growing axons and to a great extent stipulate the direction of their growth.

On the turn of first week multiple processes of the sensory neurons form a complex network, being denser in the central part of explant, where neurons are present, and looser in the growth zone. The nerve fibre network of the explant, as well as nerve cells are embedded within the layer of peripheral glial cells. Two types of cells can easily be distinguished among peripheral glia population in here; those are Schwann cells connected with axis-cylinders and non-differentiated cellular elements not connected with them laying free.

In the growth zone, where nerve fibres are arranged in the form of wide-looped plexus, the accompanying Schwann cells are fusiform, triangular, stellate or irregular in shape. They form in here an anastomosing network. The axons present in this area remain in a very close contact with the cytoplasm of Schwann cells on their whole expanse, whereupon they may pass over from one cell to another along Schwann cells processes, by which they are interconnected. In the successful silver impregnation axis-cylinders and Schwann cells can be seen simultaneously (Fig. 2). In such preparations both oval nuclei of Schwann cells and their cytoplasm containing well-discernable fine argentophilic granulations are impregnated. The growth cones of some of the axons closely fit to the perikarya and processes of Schwann cells (Fig. 2). This morphological pattern, seen in silver impregnation is rather typical for the most peripheral portions of the growth zone, with more loose neuroglial arrangement and continuous migration and proliferation of non-differentiated Schwann cells. The highest cell mobility and intense axons growth in this parts of cultures have been proved in intravital observation and in time-lapse cinematography. In the central part of culture, with dense nerve plexus only nuclei of Schwann cells are impregnated with silver technique (Fig. 2, insert). By no means, this is connected with the end of the nerve fibre formation process in the explant zone, resulting in an almost complete inhibition of mobility of differentiated Schwann cells. Non-differentiated Schwann cells, which during the early stages of cultivation make up the greater proportion of glial population probably transform into differentiated



ones in the process of nerve fibre formation. With the extension of cultivation period the nerve fibres increase in number whereas the amount of „free”, non-differentiated cells becomes steadily reduced. Multiple bundles of nerve fibres are present in the nerve fibre plexus occupying the central part of the explant and growth zone in 2–4-week old cultures. However, the expansion of nerve fibres in the growth zone continues in long-term cultures even after the formation of dense nerve fibre plexus. One can constantly observe in here non-differentiated Schwann cells projecting from the explant and expanding in the form of thin or thick bands, into which numerous axons ingrow. Taking into account that at the submicroscopic level 10–15 fine axis-cylinders are found to be embedded in the cytoplasm of a single Schwann cell one has to come to the conclusion that one comparatively thin band composed of a group of Schwann cells may contain a great number of axis-cylinders, forming a condense bundle.

Myelinated nerve fibres within the explant appear simultaneously with the formation of a considerable number of nerve bundles. Prior to myelination, separate thick nerve fibres stand out from the mass of fine fibres. They distinguish themselves by a strong impregnation in silver techniques. The other distinguishing feature consists in their enclosing in a sheath formed by Schwann cells (Fig. 3a, b). The Schwann cell bodies of myelinating nerve fibres become thicker, acquiring a cigar-shape form. They are arranged chain-wise. Ranvier's nodes are for-

Fig. 1a. Migration of first fibroblast-like cells from the explant to the growth zone (6-hour culture). Supravital methylene blue staining. $\times 100$

Ryc. 1a. Wczesna migracja fibroblastów z eksplantatu do strefy wzrostu (hodowla 6-godzinna). Błękit metylenowy, barwienie przyżyciowe. Pow. $100 \times$

Fig. 1b. Trigeminal rat ganglion. Peripheral glia layer formation in the growth zone; maturing neurons located in the central part of explant (3-day culture). Supravital methylene blue staining. $\times 130$

Ryc. 1b. Warstwa gleju obwodowego w strefie wzrostu. Dojrzewające neurony w centralnej części eksplantatu (hodowla 3-dniowa). Błękit metylenowy, barwienie przyżyciowe. Pow. $130 \times$

Fig. 1c. Fine nerve cell off-shoots forming a plexus in the growth zone (24-hour culture). Supravital methylene blue staining. $\times 300$

Ryc. 1c. Delikatne wypustki komórek nerwowych tworzące luźny splot w strefie wzrostu (hodowla 24-godzinna). Błękit metylenowy, barwienie przyżyciowe. Pow. $300 \times$

Fig. 1d. Interrelation between regenerating nerve cell off-shoot and differentiated Schwann cells in growth zone (48 hour culture). Supravital methylene blue staining. $\times 500$

Ryc. 1d. Regenerujące wypustki komórek nerwowych w ścisłym związku ze zróżnicowanymi komórkami Schwanna w strefie wzrostu (hodowla 48-godzinna). Błękit metylenowy, barwienie przyżyciowe. Pow. $500 \times$



med at the points of their contact. The length of each internode segment is 120—200 μm . On the 30—35 day of culturing, Schmidt-Lanterman clefts are observed in a part of myelinated fibres.

On the light microscope level, myelin sheaths are well demonstrated in Becker's method and while stained with sudan black B according to Murray (1965). They are also well visualized in polarized light. At early stages of myelination, when stained with Becker's method or with sudan black B, they are seen in the form of fine (1.7—2.5 μm), long tubes, with rather uniform outlines, revealing only in some places local swellings and distensions (Fig. 3c). Through in long-term cultures numerous nerve fibres become myelinated their myelin sheaths never reach the thickness of those occurring in a corresponding stages of the development *in vivo*.

Electron microscope observations provide more detailed data concerning the close relationship of nerve cells outgrowths with Schwann cells, starting from the earliest stages of cultivation. Outgrowing axons already in the direct vicinity of cellular perikarya establish close contacts with free, non-differentiated Schwann cells. At the beginning axons are not enclosed in the cytoplasm of the prospective Schwann cells; they only contact their perikarya and cytoplasmic processes (Fig. 4a). This indicates a rather primitive type of interrelation between axons and Schwann cells, being entirely different from that typical of mature nerve fibres. However, even at this stage of development, the axons are covered by basal membrane (Fig. 4b), which passes upon them from the adjacent non-differentiated Schwann cells and in this way are separated from collagen fibres and fibroblasts of endoneurial origin.

Ultrathin sections show that both axons and non-differentiated Schwann cells and their processes are packed into bundles, and are se-

Fig. 2. Interrelations between growing axons and non-differentiated Schwann cell in the peripheral part of growth zone in long-term culture: axons do not exceed the boundary of immature Schwann cells, their growth zones (arrows) in a close contact with perikarya and processes of Schwann cells. Silver impregnation according to Bielschowsky-Gross in own modification. $\times 1000$. Insert non impregnated cytoplasm and cytoplasmic off-shoots of mature Schwann cells. The same staining. $\times 130$

Ryc. 2. Ścisłe powiązanie wyrastających wypustek osiowych z niedojrzałymi komórkami Schwanna w obwodowej części strefy wzrostu w długotrwałej hodowli. Wypustki osiowe nie przekraczają linii komórek Schwanna. Stożki wypustek osiowych (strzałki) położone na błonie perikarialnej i wypustkowej komórek Schwanna. Impregnacja wg Bielschowsky'ego-Grossa w modyfikacji własnej. Pow. 1.000 \times . Wycinek bez impregnacji cytoplazmy i wypustek dojrzałych komórek Schwanna. Barwienie jw. Pow. 130 \times

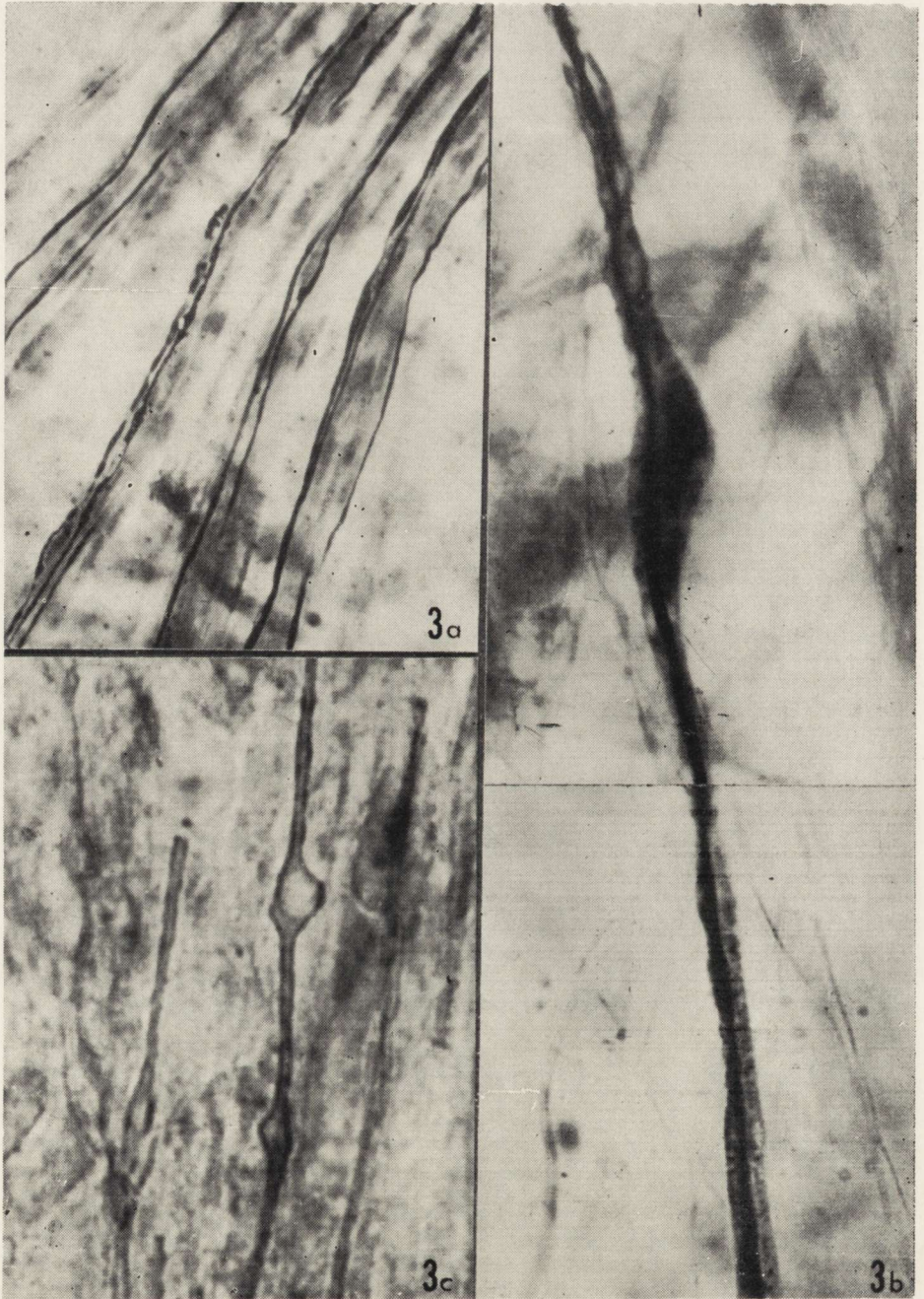


Fig. 3a. Intensely impregnated thick axons within Remak's fibres bundles (30 day-culture). Bielschowsky-Gross in own modification. $\times 400$

Ryc. 3a. Silnie wyimpregnowane włókna osiowe w pęczku włókien typu Remaka (hodowla 30-dniowa). Bielschowsky-Gross w modyfikacji własnej. Pow. $400 \times$

parated from each other by a narrow space (20—30 nm in diameter); there are no collagen fibres between them. On the outside, these neuroglial bundles are covered by a common basal membrane, 30—50 nm thick.

On the 3rd—6th day of cultivation the interrelation between axons and Schwann cells become more complex. Part of the axons submerge into the cytoplasm of Schwann cells perikarya or their processes (Fig. 5a). There are usually 3—7 or even more axons plunged in the cytoplasm of a single Schwann cell; each of these axons is separated from the others by the cytoplasm of the Schwann cell. At this stage of nerve fibre formation, Schwann cells forming the bundles together with axis-cylinders embedded within them are surrounded by their own basal membrane and separated from each other. Numerous collagen fibres appear among separate Schwann cells. Some axons are completely, while others only partially surrounded by Schwann cell cytoplasm, the latter being separated from collagen fibres only by basal membrane. All the typical features of the mature Schwann cells *in vivo* are inherent to those connected in the above described manner with axis-cylinders (Fig. 5b). According to its structure any such a band of Schwann cells corresponds to nerve fibres of the "Remak type", which are found in the form of thin or thick nerve bundles within the explant on the level of light microscope at that time of culturing.

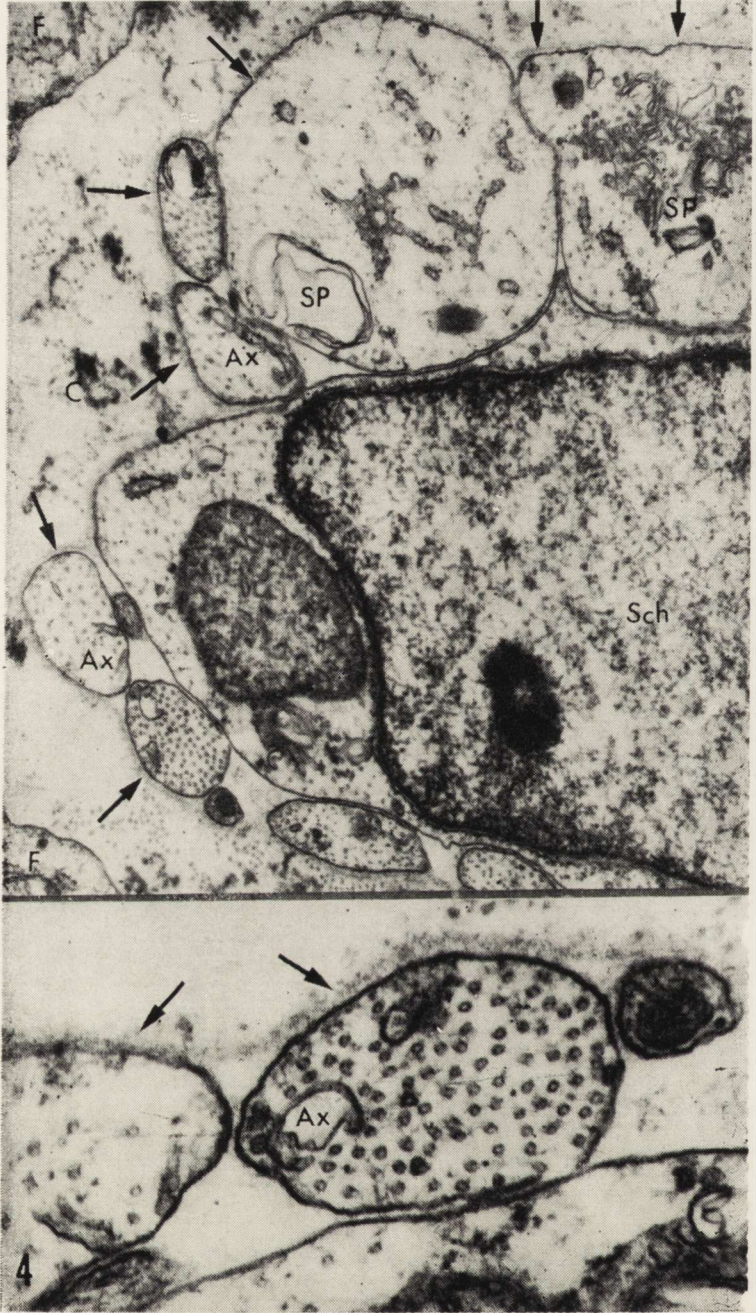
At the later stages of culture development (7—14 days) next to fine axis-cylinders (0.3—0.8 μm) adjoining Schwann cells, numerous thicker (1—1.7 μm) axons completely embedded within Schwann cells cytoplasm are seen. Formation of inner and outer mesaxon around them can be observed (Fig. 6a). This type of axon-Schwann cell interrelation corresponds to an early stage of nerve fibre myelination. The further stages of axon-Schwann cell relations follow the well described route of peripheral nerve fibre myelination. Cytoplasmic membrane of Schwann cell repeatedly revolves around the axis-cylinder, forming densely packed, concentrically oriented myelin lamellae around it (Fig. 6b).

Fig. 3b. Single thick nerve fibre in the initial stage of myelination (18-day culture). Bielschowsky-Gross in own modification. $\times 1200$

Ryc. 3b. Pojedyncze grube włókno nerwowe w początkowej fazie mielinizacji (hodowla 18-dniowa). Bielschowsky-Gross w modyfikacji własnej. Pow. 1.200 \times

Fig. 3c. Myelin sheaths in a 24-day culture. Sudan black B in Murray's modification. $\times 1000$

Ryc. 3c. Osłonki mielinowe w 24-dniowej hodowli. Sudan czarny B w modyfikacji Murray. Pow. 1.000 \times

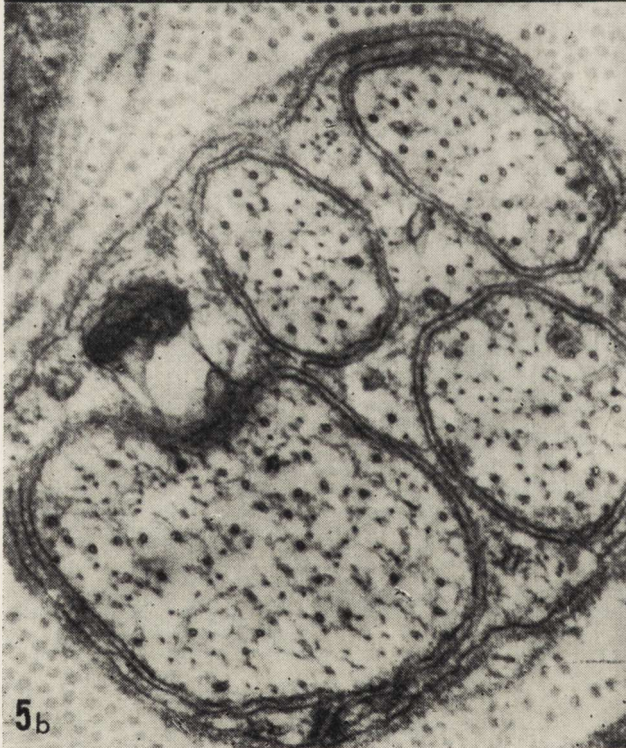
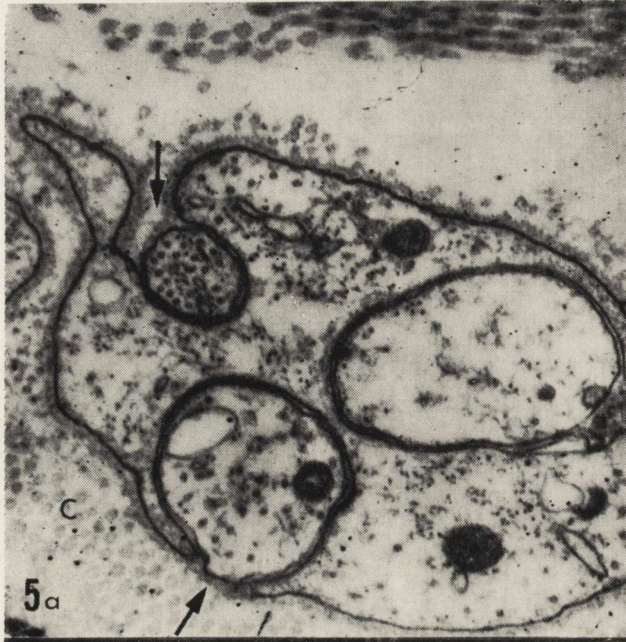


DISCUSSION

In spite of the fact that the hypothesis of Geren (1954) on myelin formation in the peripheral nervous system is widely spread and generally accepted, some questions concerning formation of medullated nerve fibres are still to be resolved. The early stages of nerve fibre development and axon-Schwann cells interrelation at this stage, being of great interest, have been insufficiently elucidated. In a great number of studies the axon-Schwann cell interrelations and the process of myelination have been examined in already anatomically formed nerve trunks, mostly in the postnatal period (Peters, Muir 1959; Allt 1969; Webster et al., 1973; Martin, Webster 1973; Caley, Butler 1974). The tissue culture technique offers better possibilities for studying subsequent stages of axon-Schwann cell interrelation. A number of works have also appeared in which the dynamics of growth and the differentiation process of sensory ganglia in culture have been studied (Hughes 1953; Nakai 1956, 1960; Nakai, Kawasaki 1959; Godina 1956, 1963; Pomerat et al., 1967; Lamont, Vernon 1967). However, those studies, have mostly been, based on phase-contrast microscopy and time-lapse cinematography, neglecting application of specific histological methods. This led to misinterpretation of some morphological features. In the opinion of the mentioned authors the cytoplasmic processes, which appear within first 24 hours of culturing in the growth zone of sensory ganglia culture, represent axons growing „naked” and advancing to the periphery with the help of pseudopodia. Only after this, Schwann cells and fibroblasts start migrating. In our opinion the long processes of connective tissue cells and Schwann cells have been erroneously taken for axons. Their true nature is proved by the fact that they form collateral cytoplasmic processes and anastomotic pseudopodia which is not characteristic for axis-cylinders. In addition they are easily stainable with routine histological techniques, which again does not hold for

Fig. 4. Ultrastructural interrelations of newly formed axons (Ax) with non-differentiated Schwann cells (Sch) and their cytoplasmic off-shoots (SP) in the growth zone (24-hour culture). The neural-gial band enclosed in a basal membrane (arrows) which passes from the Schwann cell bodies and off-shoots over the axons (lower fragment). C — collagen; F — fibroblast. $\times 20\ 000$. Lower fragment. $\times 45\ 000$

Ryc. 4. Mikroskopowo-elektronowy obraz stosunków między nowoutworzonymi wypustkami osiowymi (Ax) i niezróżnicowanymi komórkami Schwanna (Sch) i ich wypustkami (SP) w strefie wzrostu (hodowla 24-godzinna). Pęczek złożony z aksonów komórki Schwanna i wypustek komórek Schwanna otoczony wspólną błoną podstawną (strzałki), przechodzącą z wypustek komórek Schwanna ponad aksonem (dolna część ryciny). C — włókna kolagenowe; F — fragment fibroblastu. Pow. 20.000 \times . Część dolna. Pow. 45.000 \times



nerve cell processes. Our own electron- and light-microscope observations indicate that growth and differentiation of nerve fibres in the sensory ganglia, from the first days of cultivations are strictly connected at first with non-differentiated and than with mature Schwann cells. In the course of development the axon — Schwann cell relations are gradually becoming more intimate and complex. In our opinion, contrary to that of Nakai (1960), Nakajima (1965), Lumsden (1968). Varon and Raiborn (1972), and others, both immature and mature Schwann cells are playing the most substantial role in the formation of nerve fibre bundles, appearing in cultures during 2nd—4th week of growth *in vitro*. According to our observations the process of nerve fibre differentiation may provisionally be subdivided into three stages: 1) formation of Remak's fibres, 2) premyelination stage and 3) myelination.

The first stage is characterized by the appearance in the growth zone of culture of fine processes of nerve cells, which follow migration of immature Schwann cells. The outgrowing axis-cylinders establish a close contact with immature Schwann cells this leading to the formation of axo-glial bands. The latter are surrounded by a common basal membrane. At first axons remain in a position adjacent to non-differentiated Schwann cells. On the 3rd—6th day axons invaginate into the Schwann cells cytoplasm, being separated from each other and together with Schwann cell enclosed in a basal membrane.

At this stage the Schwann cells, already have all the characteristic features of mature cells, and are separated from one another with bundles of collagen fibres. The thus formed fine bundles of nerve fibres are similar in structure to fibres of the "Remak type".

In the premyelination stage, approximately at the beginning of the second week of explant growth, the diameter in some of the axis-cylinders of Remak's fibres in the bundles increases to 1.0—1.7 μm ; and

Fig. 5a, b. Axon-Schwann cell interrelation at the stage of Remak fibre formation (6-day culture). *Fig. 5a.* One axon is totally submerged into the cytoplasm of Schwann cell. Two others are only partially submerged covered by basal membrane (arrows). C — collagen. $\times 30\ 000$. *Fig. 5b.* A formed band of the Remak nerve fibres. All the axons are enclosed in the cytoplasm of the Schwann cell. $\times 30\ 000$

Ryc. 5a, b. Stosunki między wypustkami osiowymi i komórką Schwanna w stadium tworzenia włókna typu Remaka (hodowla 6-dniowa). *Ryc. 5a.* Jeden akson całkowicie zagłębiony w cytoplazmie komórki Schwanna, dwa pozostałe pokryte błoną podstawną (strzałki) tylko częściowo. C — włókna kolagenowe. Pow. 30.000 \times . *Ryc. 5b.* Pęczek uformowanych włókien Remaka. Wszystkie włókna osiowe otoczone cytoplazmą komórki Schwanna. Pow. 30.000 \times



Fig. 6a,b. Nerve fibre myelination. *Fig. 6a.* Early stage of nerve fibre myelination (10-day culture). Schwann cell cytoplasmic membranes form the inner and outer mesaxons. $\times 40\,000$. *Fig. 6b.* Fully formed myelin (15-day culture). $\times 20\,000$
Ryc. 6a, b. Mielinizacja włókien osiowych. *Ryc. 6a.* Wczesne stadium mielinizacji włókna osiowego (hodowla 10-dniowa). Wypustki cytoplazmatyczne komórki Schwanna tworzą mezakson wewnętrzny i zewnętrzny. Pow. 40.000 \times . *Ryc. 6b.* Uformowana osłonka mielinowa (hodowla 15-dniowa). Pow. 20.000 \times

the fibres become argentophilic and then stain supravitally with methylene blue. Each of such axons is seen to be enclosed in a separate envelop formed by Schwann cells arranged chain-wise. The cytoplasmic membranes of the Schwann cell begin to form inner and outer mesaxons. These data are in agreement with the observations of Allt (1969), Peters et al. (1970), Webster et al. (1973), Martin and Webster (1973), Caley and Butler (1974), and other authors, who showed that in the developing bundles at the moment of myelination, the axon-Schwann interrelations correlate as 1 : 1, that is one Schwann cell contains one axon.

Nerve fibre myelination in trigeminal ganglion culture begins on the 12—14 day after explantation by repeated rotation of the Schwann cell cytoplasmic membrane around the axis-cylinder. Our observations in this respect are fully convergent with those of Murray (1964, 1965), Peterson et al. (1958) and Winkler and Wolf (1966). This process markedly intensifies by the end of the first month; in this period the internodal segments of 120—200 μm in diameter, the Ranvier nodes, and the myelin clefts are easily discerned. The thickness of the formed myelin sheaths in culture, however, does not attain that occurring *in vivo*.

E. I. Chumasov, G. V. Kononov

RÓŻNICOWANIE I MIELINIZACJA WŁÓKIEN NERWOWYCH W HODOWLI ZWOJÓW NERWU TRÓJDZIELNEGO

Streszczenie

Hodowle zakładane ze zwojów nerwu trójdziałnego, pochodzących od płodów szczurzych między 17 i 22 dniem życia płodowego, badano w mikroskopie świetlnym i elektronowym w różnych okresach po założeniu hodowli, poczynając od 24 godzin do 35 dni. Proces różnicowania włókien nerwowych można umownie podzielić na trzy etapy: 1) formowanie się włókien bezmielinowych, 2) stadium premielinizacyjne, 3) mielinogeneza. Stadium pierwsze charakteryzuje pojawienie się w strefie wzrostu eksplantatu wypustek nerwowych, które tworzą między sobą skomplikowane połączenia oraz tworzenie się sieci neuroglejowej. Początkowo aksony tylko przylegają do komórek Schwanna i są otoczone razem z nimi wspólną błoną podstawną. Następnym etapem jest inwaginacja aksonów do cytoplazmy komórek Schwanna i tworzenie się wspólnej błony podstawnej — powstają bezmielinowe włókna typu Remaka. W stadium premielinizacyjnym część aksonów powiększa swoją średnicę do 1—1,7 mikrona. Każdy utworzony w ten sposób cylinder osiowy jest zaopatrzony w oddzielną pochewkę utworzoną z ułożonych łańcuszko komórek Schwanna.

Z błony plazmatycznej tworzy się wewnętrzny i zewnętrzny mezakson. Masowa mielinizacja następuje między 12 i 15 dniem po założeniu hodowli, przez wielokrotne owijanie się błony plazmatycznej komórki Schwanna wokół aksonu.

E. И. Чумасов и Г. В. Коновалов

О ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И МИЕЛИНИЗАЦИИ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН
В КУЛЬТУРЕ ТРИГЕМИНАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ

Резюме

Культуры тригеминального ганглия от 17—22 дневных эмбрионов крысы изучены светооптически и электронномикроскопически в различные сроки эксплантации, начиная от 24 часов до 35 дней. Процесс дифференцировки нервных волокон условно можно подразделить на три этапа: 1) формирование безмякотных нервных волокон; 2) стадия предмиелинизации; 3) миелиногенез. Первая стадия характеризуется появлением в зоне роста эксплантата нервных отростков и установлением между ними тесных отношений с образованием нейроглиальных тяжей. Аксоны сначала лишь прилежат к шванновским клеткам и окружены вместе с ними общей базальной мембраной. Затем происходит инвагинация аксонов в цитоплазму шванновских клеток с образованием собственной базальной мембраны — формируются безмякотные волокна „ремаковского” типа. На стадии предмиелинизации у части аксонов увеличивается диаметр до 1—1,7 мк. и каждый такой осевой цилиндр оказывается заключенным в отдельный футляр, образованный из расположенных в цепочку шванновских клеток.

Их плазматическая мембрана образует внутренний и наружный мезаксон. Массовая миелинизация наступает на 12—15 день после эксплантации путем многократного вращения плазматической мембраны шванновской клетки вокруг осевого цилиндра.

REFERENCES

1. Allt, G.: Ultrastructural features of the immature peripheral nerve. *J. Anat.* 1969, 105, 283—293.
2. Bunge, M. B., Bunge, R. P., Peterson, E. R., Murray, M. R.: A light and electron microscope study of long-term organized cultures of rat dorsal root ganglia. *J. Cell Biol.* 1967, 32, 439—466.
3. Caley, D. W., Butler, A. B.: Formation of central and peripheral myelin sheaths in rat: an electron microscopic study. *Amer. J. Anat.* 1974, 140, 339—348.
4. 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.
5. Gamble, H. J., Breathnach, A. S.: An electron-microscope study of human foetal peripheral nerves. *J. Anat.* 1965, 99, 573—584.
6. Geren, B. B.: The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Exp. Cell Res.* 1954, 7, 558—562.
7. Godina, G.: I rapporti di interdipendenza tra assoni che crescono in vitro studiati in microcinematografie a contrasto di fase. *Boll. Soc. ital. biol. sperim.* 1956, 32, 108—111.
8. Godina, G.: The Morphological and Structural Features of Neurons in Vitro Studied by Phase-Contrast and Time-Lapse Movies. In: *Cinemicrography in Cell Biology*. Ed. G. G. Rose. Acad. Press. New York, London, 1963, 313—337.
9. Hughes, A.: The growth of embryonic neurites. A study on cultures of chick neural tissues. *J. Anat.* 1953, 87, 150—162.

10. Lamont, M. D., Vernon, C. A.: The migration of neurons from chick embryonic dorsal root ganglia in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 1967, 47, 661—662.
11. Lumsden, C. E.: Tissue culture in neuropathology. In: *Pathology of the Nervous System*. Ed. J. Minckler, McGraw-Hill Book Company. New York 1963, 1, 249—263.
12. Martin, J., Webster, H.: Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and axon relationships. *Develop. Biol.* 1973, 32, 417—431.
13. Murray, M. R.: Myelin formation and neuron histogenesis in tissue culture. In: *Comparative Neurochemistry*. Ed. D. Richter, Pergamon Press, London. 1964, 49—58.
14. Murray, M. R.: Nervous tissues in vitro. In: *Cells and Tissues in Culture*. Ed. E. N. Willmer, Acad. Press, London. 1965, 2, 373—455.
15. Nakai, J.: Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Amer. J. Anat.* 1956, 99, 81—131.
16. Nakai, J.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. II. The mechanisms of fasciculation. *Z. Zellforsch.* 1960, 52, 427—449.
17. Nakai, J., Kawasaki, Y.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. I. The reaction of the growth zone to various obstructions. *Z. Zellforsch.* 1959, 51, 108—122.
18. Nakajima, S.: Selectivity in fasciculation of nerve fibers in vitro. *J. Comp. Neurol.* 1965, 125, 193—204.
19. Peters, A.: Development of Peripheral Nerves in *Xenopus laevis*. In: *Electron Microscopy in Anatomy*. Ed. J. D. Boyd, F. R. Johnson and J. D. Lever, Arnold, London. 1961, 142—159.
20. Peters, A., Muir, A. R.: The relationship between axons and Schwann cells during development of peripheral nerves in the rat. *Quart. J. Exp. Physiol.* 1959, 44, 117—130.
21. Peters, A. Palay, S. L., Webster, H. F.: *The Fine Structure of the Nervous System. The Cells and their Processes*. Harper Row, New York. 1970, 70—88.
22. Peterson, E. R., Crain, C. M., Murray, M. R.: Activities of Schwann cells during myelin formation in vitro. *Anat. Rec.* 1958, 130, 357.
23. Pomerat, C. M., Hendelman, W. J., Raiborn, C. W., Massey, J. F.: Dynamic Activities of Nervous Tissue in Vitro. In: *The Neuron*. Ed. H. Hyden, Amsterdam, Elsevier. 1967, 119—178.
24. Varon, S., Raiborn, C.: Dissociation of chick embryo spinal ganglia and the effects on cell yields by the mouse 7S nerve growth factor protein. *Neurobiology*, 1972, 2, 106—122.
25. Winkler, G. F., Wolf, M. K.: The development and maintenance of myelinated tissue cultures of rat trigeminal ganglion. *Amer. J. Anat.* 1966, 119, 179—198.
26. Webster, H., Martin, Y., O'Connell, M.: The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Develop. Biol.* 1973, 32, 401—416.

Authors' address: Institute for Experimental Medicine Acad. Med. Sci. USSR, Kirovsky 69/71, Leningrad 22, USSR.

JERZY KULCZYCKI, ALEKSANDRA KRYGIER-STOJAŁOWSKA,
MIROSŁAW MADEJ, MARGARITA VAINIENE, PRZEMYSŁAW NOWACKI,
KRYSTYNA HONCZARENKO

ZMIANY ILOŚCIOWE DNA W NEURONACH MÓZGU CZŁOWIEKA W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU I TOPOGRAFII

Pracownia Neuropatologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin
Pracownia Patologii Komórki Zakładu Anatomii Patologicznej
Instytutu Biostruktury Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

W pierwszym etapie badań nad zawartością DNA w neuronach i komórkach glejowych mózgu człowieka stwierdziliśmy ilościowy wzrost tego związku w jądrach komórek nerwowych u ludzi w wieku starczym (Krygier-Stojałowska i wsp. 1977). Wyniki te były zbliżone do obserwacji poczynionych uprzednio przez innych autorów na zwierzętach (Lentz, Lapham 1970, Novakova i wsp. 1970), a ponadto zwróciliśmy uwagę na różnice w narastaniu wraz z wiekiem ilości DNA w neuronach różnych okolic mózgu.

Celem dalszych badań było sprawdzenie tych spostrzeżeń na większym i bardziej zróżnicowanym materiale. Poza tym obecnie, oprócz ustalania zależności między ilością DNA w jądrach komórkowych, a okolicą mózgowia i wiekiem osobnika, staraliśmy się uchwycić korelację pomiędzy stopniem zaawansowania zmian starczych tkanki nerwowej i zawartością DNA w neuronach.

Istotne znaczenie przywiązywaliśmy obecnie do badania jąder neuronów. Zawartość DNA w elementach glejowych, szczególnie w oligodendrocytach, stanowiła przede wszystkim punkt odniesienia, niejako „tło” dla odchyień neuronalnych. Nie przeszkodziło to w wykryciu w niektórych przypadkach interesujących odchyień w ilości DNA w jądrach komórek glejowych. Konfrontacja tych wyników z obrazem histologicznym nie tylko pozwoliła na ich wytłumaczenie, ale stała się zarazem potwierdzeniem dokładności metody cytofotometrycznej.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badania były mózgi 8 zmarłych osób, w tym: 2 przypadki wcześniaków o czasie przeżycia 11 i 17 godzin (waga obydwu w granicach 2000 G), 1 przypadek dziecka w wieku 4 lat, dwa przypadki mężczyzn w wieku 47 i 54 lat oraz 3 przypadki osób starych w wieku 65, 80 i 81 lat. Materiał do ilościowych badań cytochemicznych pobierano z kory zakrętu przedśrodkowego i rogu Amona, ze wzgórza oraz spoidła wielkiego. W pierwszych trzech strukturach badano głównie komórki nerwowe, natomiast materiał ze spoidła wielkiego był źródłem prawie czystej frakcji komórek glejowych. Uzyskanie możliwości badania czystej populacji komórek glejowych jest niezmiernie istotne ze względu na trudności różnicowania jąder małych neuronów z jądrami astrocytów, na co zwracano już uwagę w poprzedniej pracy.

Badania morfologiczne, cytochemiczne i cytofotometryczne przeprowadzono według metodyki opisanej w poprzedniej pracy (Krygier-Stojałowska i wsp. 1977).

WYNIKI

Obraz neuropatologiczny

W żadnym z badanym mózgom nie znaleziono cech procesu zapalnego ani proliferacyjnego. W mózgm wcześniaków stwierdzono charakterystyczne dla tego okresu rozwoju mózgowia przykomorowe skupienia komórek macierzy i pojedyncze neuroblasty w podkorowej istocie białej.

W mózgu dziecka 4-letniego, u którego przed śmiercią wystąpił obrzęk mózgu, stwierdzono proliferację gleju oraz satelitozę około neuronów w korze mózgu.

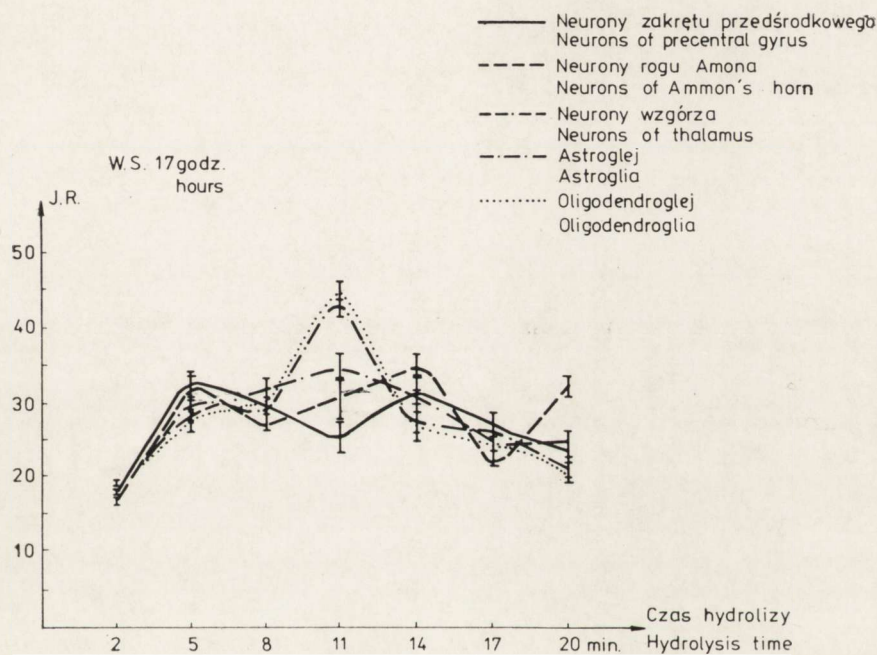
W mózgm osób dorosłych (47 i 54 l.) wykryto nieznaczne objawy obrzęku tkanki nerwowej oraz pojedyncze ciała skrobiowate w ścianach układu komorowego.

W grupie osób w wieku starym średnio zaawansowane zmiany inwolucyjne (mierny zanik mózgu i znaczne ilości lipofuscyny w neuronach) znaleziono w dwu przypadkach (65 i 81 lat), przy czym u mężczyzny 81-letniego stwierdzono pojedyncze płytki starcze, głównie w korze skroniowej. W 3-cim przypadku (80-letnia kobieta), zmiany starcze były bardzo nasilone i upoważniały do rozpoznania otępienia starczego.

Ilościowe badania cytochemiczne

a. Wrażliwość komórek nerwowych i glejowych na kwaśną hydrolizę

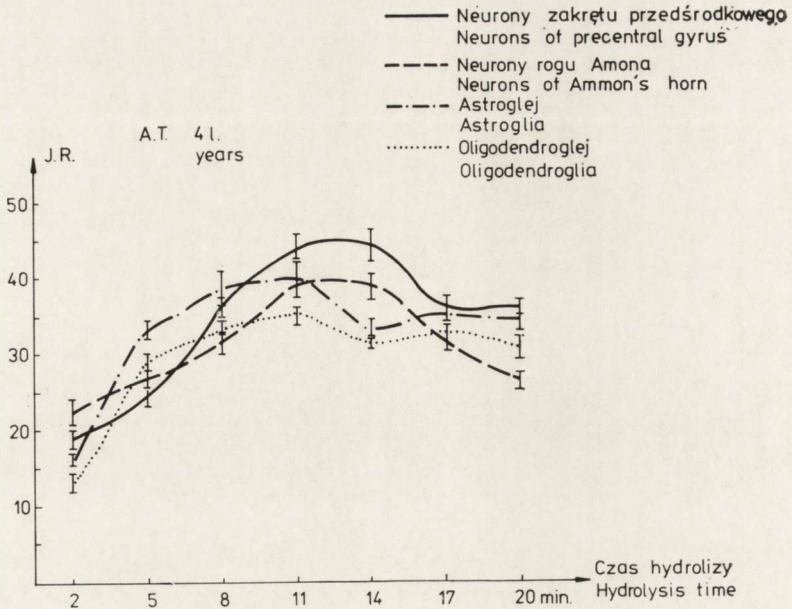
Największą wrażliwość na kwaśną hydrolizę wykazywały neurony mózgowi wcześniaków, uzyskując już po 5 minutach najsilniejsze zabarwienie w preparatach przygotowanych metodą Feulgena. Krzywa hydrolizy tych komórek wykazywała ponadto drugi szczyt po upływie 14 minut hydrolizy kwaśnej. Komórki glejowe w tych przypadkach były natomiast mniej wrażliwe, uzyskując najsilniejsze zabarwienie po 11 minutach hydrolizy (ryc. 1).



Ryc. 1. Przypadek W. S., wiek 17 godzin. Krzywe hydrolizy jąder komórek mózgu w 1 N HCl w temp. 60°C. J.R. — jednostki robocze wartości pomiarów cytofotometrycznych odpowiadające ilości leukofuksyny związanej z DNA.

Fig. 1. Case W. S., age 17 hrs. Hydrolysis curves of brain cell nuclei in 1 N HCl at 60°C. J.R. — working units for cytophotometric measurements corresponding to the amount of leukofuxin bound to DNA.

U dziecka 4-letniego dużą wrażliwość na hydrolizę kwaśną wykazywały komórki glejowe, uzyskując najsilniejsze zabarwienie w metodzie Feulgena po 8—11 minutach (ryc. 2). Podobnie zachowywała się chromatyna neuronów i komórek glejowych w przypadkach mężczyzn 47- i 54-letniego. W trzech przypadkach osób starych najwyższe wartości



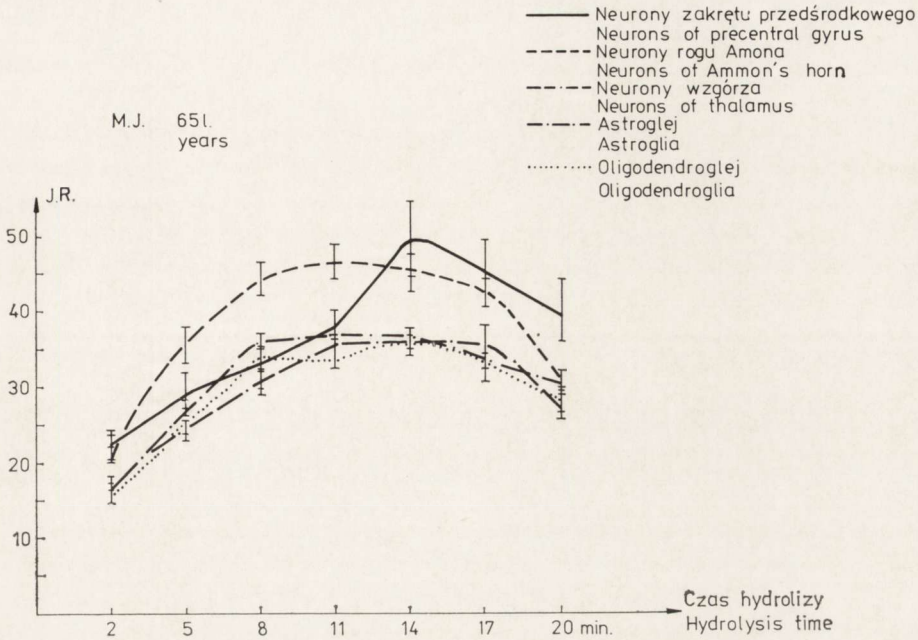
Ryc. 2. Przypadek A. T., wiek 4 lata. Krzywe hydrolizy. Objaśnienie jak na ryc. 1.

Fig. 2. Case A. T., age 4 years. Hydrolysis curves. Descriptions as in Fig. 1.

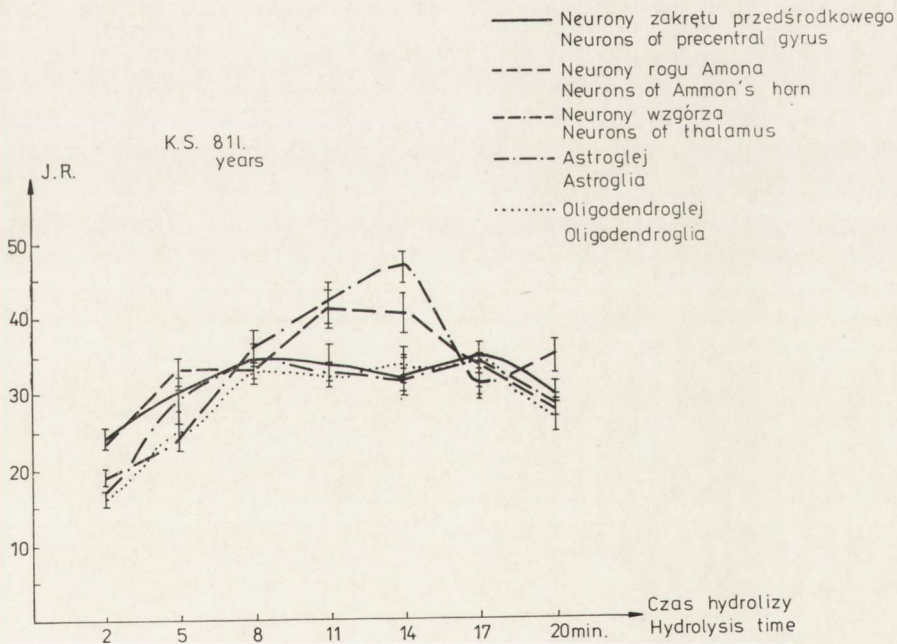
reakcji Feulgena dotyczące zarówno komórek nerwowych jak i glejowych uzyskiwano po 14 minutach trwania hydrolizy (ryc. 3, 4). Należy przy tym podkreślić, że w przypadkach ludzi starych nasilenie reakcji Feulgena we wszystkich zastosowanych czasach trwania hydrolizy kwaśnej było wyraźnie wyższe w neuronach, niż w komórkach glejowych.

b. Zawartość DNA w neuronach i komórkach glejowych

Ilość DNA w neuronach oceniana na podstawie nasilenia reakcji Feulgena wzrastała wraz z wiekiem badanych przypadków. Najniższe wartości stwierdzono w neuronach mózgow wcześnieaków, przy czym w obydwu przypadkach ilość DNA w neuronach była bardzo zbliżona do stwierdzanej w komórkach glejowych. Jedynie 5% neuronów zakrętu przedśrodkowego i 5% neuronów wzgórza przekraczało wartości diploidalne (ryc. 5 i tabela 1). U 4-letniego dziecka zawartość DNA w neuronach zakrętu przedśrodkowego wzrosła bardzo znacznie (77,5% komórek o hiperdiploidalnej ilości DNA), natomiast w neuronach kory amonalnej w niewielkim stopniu (5% komórek hiperdiploidalnych). W tym samym przypadku również komórki astrogleju wykazywały



Ryc. 3. Przypadek M. J., wiek 65 lat. Krzywe hydrolizy. Objaśnienie jak na ryc. 1.
 Fig. 3. Case M. J., age 65 years. Hydrolysis curves. Descriptions as in Fig. 1.



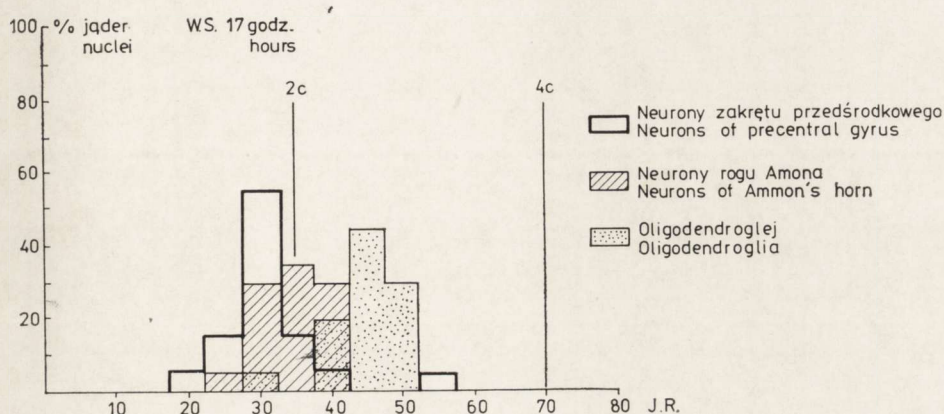
Ryc. 4. Przypadek K. S., wiek 81 lat. Krzywe hydrolizy. Objaśnienie jak na ryc. 1.
 Fig. 4. Case K. S., age 81 years. Hydrolysis curves. Descriptions as in Fig. 1.

Tabela 1. Zawartość DNA w komórkach nerwowych i glejowych w poszczególnych strukturach anatomicznych mózgu
 Table 1. DNA content in neurons and glial cells in different anatomical structures of the human brain

Przypadek Case	Wiek Age	<i>Gyrus praecentralis</i>			<i>Cornu Ammonis</i>			<i>Thalamus</i>			Astroglej Astroglia			Oligodendroglej Oligodendroglia		
		2c %	<2c %	4c %	2c %	<2c %	4c %	2c %	<2c %	4c %	2c %	<2c %	4c %	2c %	<2c %	4c %
M.C. ♂	11 godzin hours	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
W.U. ♂	17 godzin hours	95	5	0	100	0	0	95	5	0	50	50	0	25	75	0
A.T. ♂	4 lata years	22	78	0	95	5	0	—	—	—	40	17	3	97	3	0
M.B. ♂	47 lat years	55	45	0	57	43	0	97	3	0	90	10	0	100	0	0
P.J. ♂	54 lata years	65	35	0	80	20	0	90	10	0	85	15	0	100	0	0
M.J. ♂	65 lat years	10	80	10	30	67	3	100	0	0	100	0	0	100	0	0
S.L. ♀	80 lat years	35	62	3	85	15	0	67	33	0	100	0	0	100	0	0
K.S. ♂	81 lat yoars	87	13	0	77	23	0	37	63	0	97	3	0	95	5	0

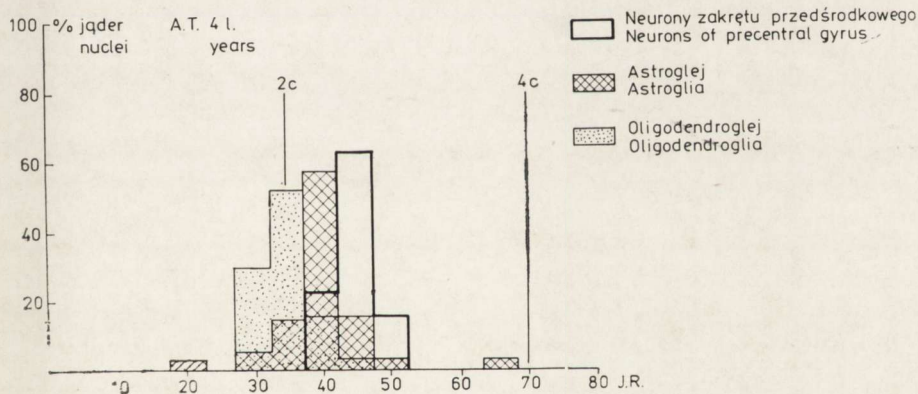
wyraźnie podwyższoną ilość DNA osiągając niekiedy (2,5% komórek) wartości tetraploidalne (ryc. 6).

U osób dorosłych i w wieku podeszłym odnotowano obecność licznych neuronów o hiperdiploidalnej ilości DNA (do 80% komórek) oraz



Ryc. 5. Przypadek W. S., wiek 17 godzin. Nukleinogramy. 2c — diploidalna ilość DNA; 4c — tetraploidalna ilość DNA.

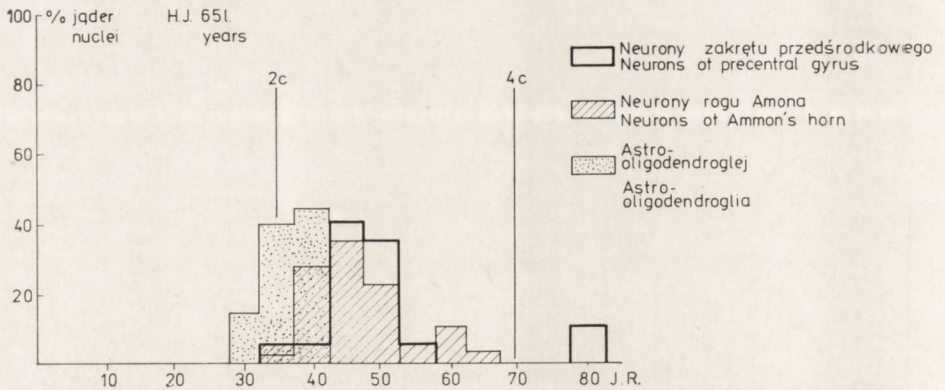
Fig. 5. Case W. S., age 17 hrs. Nucleinograms. 2c — diploidal amount of DNA; 4c — tetraploidal amount of DNA.



Ryc. 6. Przypadek A. T., wiek 4 lata. Nukleinogramy. Objasnienia jak na ryc. 5.

Fig. 6. Case A. T., age 4 years. Nucleinograms. Descriptions as in Fig. 5.

mniej licznych neuronów o tetraploidalnej ilości tego związku (2,5—10% komórek). Zawartość DNA w komórkach glejowych odpowiadała w tych przypadkach wartościom diploidalnym (ryc. 7).



Ryc. 7. Przypadek M. J., wiek 65 lat. Nukleinogramy. Objaśnienia jak na ryc. 5.

Fig. 7. Case M. J., age 65 years. Nucleinograms. Descriptions as in Fig. 5.

Chromatyna jądrowa w neuronach różnych okolic mózgu

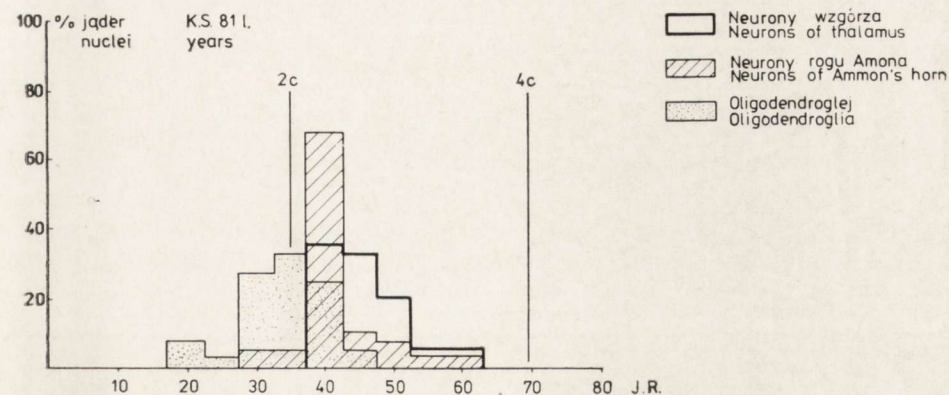
W każdym z badanych przypadków przebieg krzywych kwaśnej hydrolizy neuronów zakrętu przedśrodkowego i kory amonalnej oraz wzgórza był bardzo podobny.

U wcześniaków, a częściowo u 4-letniego dziecka wartości wyznaczające przebieg krzywych były tak niskie, że pokrywały się z krzywymi hydrolizy komórek glijowych (ryc. 1, 2). U osób starszych krzywe hydrolizy neuronów, szczególnie z kory czołowej i amonalnej posiadały wartości znacznie wyższe, niż krzywe dla komórek glijowych (ryc. 3, 4). W neuronach wzgórza wartości te nie były tak wysokie.

Z porównania wyników badania mózgow osób w różnym wieku wynika, że we wszystkich trzech strukturach ilość DNA w jądrach neuronów wzrasta, powodując zwiększenie się odsetka jąder hiperdiploidalnych. Narastanie to jest dość równomierne do 65 roku życia. U dwu osób najstarszych (80 i 81 lat) zanotowano nieoczekiwanie niższe ilości DNA w neuronach kory amonalnej (przede wszystkim u osoby 80-letniej) i kory czołowej (głównie u osoby w wieku lat 81). W obu tych przypadkach zawartość tego związku w komórkach nerwowych wzgórza pozostała wysoka (ryc. 3).

OMÓWIENIE

Obecne badania potwierdzają uprzednio uzyskane wyniki, świadczące o narastaniu wraz z wiekiem ilości DNA w neuronach mózgu człowieka (Krygier-Stojalowska i wsp. 1977). Przeprowadzone równocześnie



Ryc. 8. Przypadek K. S., wiek 81 lat. Nukleinogramy. Objaśnienia jak na ryc. 5.

Fig. 8. Case K. S., age 81 years. Nucleinograms. Descriptions as in Fig. 5.

pomiary ilości tego związku w komórkach glejowych pozwalają na stwierdzenie, że wymienione wyżej zmiany ilościowe DNA nie dotyczą ani astrocytów, ani oligodendrocytów. Obserwowane niekiedy zwiększenie ilości DNA w komórkach glejowych nie jest związane z wiekiem, a wynika raczej, jak w przypadku 4-letniego dziecka, z patologicznej proliferacji gleju. Narastanie odsetka neuronów hiperdiploidalnych w trzech badanych strukturach było dość równomierne i nie zostało zaburzone, podobnie jak w jednym przypadku opisanym w poprzedniej publikacji, pojawieniem się w cytoplazmie neuronów większej ilości lipofuscyny. W późnej starości znów zwiększa się ilość neuronów, w których zawartość DNA badana metodą Feulgena i mierzona cytotometrycznie odpowiada wartościom diploidalnym. W konfrontacji obrazów neuropatologicznych z wynikami badania cytotometrycznego w dwu najstarszych przypadkach należy wnioskować, że niskie wartości DNA pojawiały się w tej okolicy, gdzie nasilenie zmian starczych tkanki nerwowej było największe. Jest najbardziej prawdopodobne, że u 80-letniej osoby z otępieniem starczym niższa zawartość DNA w korze skroniowej wiązała się z uszkodzeniem neuronów, włóknkowymi zmianami alzheimerowskimi i bardzo licznymi płytkami starczymi. U drugiej osoby (w wieku 81 lat) niski poziom DNA w korze czołowej korespondował ze zmianami pyknotycznymi neuronów tej okolicy. Można przypuszczać, że w obu przypadkach mieliśmy do czynienia z neuronami obumierającymi.

Przyczyna i mechanizm pojawiania się większej ilości DNA w neuronach osób starszych są zupełnie nie wyjaśnione. Należy przyjąć, że jest to zjawisko analogiczne do poliploidii stwierdzanej u starszych osób w wątrobie i mięśniu sercowym (Adler 1971).

Nie wiadomo również, z którą frakcją chromatyny (z luźną czy zbitą) jest związana zwiększona ilość DNA. Uzyskane krzywe wskazują na to, że u osób starszych wzrasta zawartość chromatyny mało wrażliwej na kwaśną hydrolizę. Dotyczyć to może chromatyny zbitej, w której przypuszczalnie zawarty jest również DNA-satelitarny (Madreiter, Osieka 1971).

E. Кульчыцки, А. Крыгер-Стояловска, М. Мадей, М. Вайниене, П. Новацки, К. Хончаренко

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК В НЕЙРОНАХ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ТОПОГРАФИИ

Резюме

Целью исследований была проверка на большем материале явления возрастания с возрастом количества дезоксирибонуклеиновой кислоты в нейронах мозга человека. Исследования 8 человеческих мозгов подтвердили наличие этого процесса в нейронах, взятых из серого вещества 3 различных областей (лобной коры, височной коры и зрительного бугра). Установлено, что возрастание ДНК в нейронах мозговой коры происходит быстрее, чем в исследованном подкорковом ядре. Возрастание количества ДНК прогрессирует от ранней молодости до пожилого возраста и не уменьшается в период появления физиологических мозговых изменений, связанных со старостью. Только у старых людей с патологическим усилением инволюционных мозговых изменений эта связь обнаруживается в меньших количествах.

J. Kulczycki, A. Krygier-Stożalowska, M. Madej, M. Vainiene, P. Nowacki, K. Honczarenko

CHANGES IN DNA CONTENT IN NEURONS OF HUMAN BRAIN DEPENDING ON AGE AND TOPOGRAPHY

Summary

The aim of this study was to test the phenomenon of the increase with age of DNA content in human brain neurons. Tests performed on 8 human brains confirmed such an increase to occur in neurons of the grey matter taken from 3 different regions (frontal and temporal cortex and thalamus). The accumulation of DNA with age proceeded faster in cortical neurons than in the examined subcortical structure. The process of increase of DNA content continues from early adolescence through advanced age and does not diminish with the appearance of physiological changes in brain related to ageing. Only in senile persons with pathological intensification of involutional changes in the brain, the compound is detected in smaller quantities.

PIŚMIENNICTWO

1. Adler C. P.: Polyploidisierung und Zellzahl im menschlichen Herzen. Habilitationsschrift, Freiburg i Br. 1971.

2. Krygier-Stojałowska A., Kulczycki J., Madej M., Nowacki P., Honczarenko K. Ilość DNA w komórkach nerwowych i glejowych mózgu człowieka oznaczana metodą cytofotometryczną. Doniesienie wstępne. *Neuropat. Pol.* 1977, 25, 349—356.
3. Lentz R. D., Lapham L. W.: Postnatal development of tetraploid DNA content in rat Purkinje cells: A quantitative cytochemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1970, 29, 43—56.
4. Madreiter H., Osieka R.: Nuclear distribution of satellite DNA in mouse liver. *Beitr. Path.* 1971, 144, 249—259.
5. Novakova V., Sandritter W., Schluster G.: DNA content of neurons in rat central nervous system. *Exp. Cell Res.* 1970, 60, 454—456.

Adres autorów: I Klinika Neurologiczna Instytutu Psychoneurologicznego, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, IRMINA B. ZELMAN

GLYCOGEN DEPOSITION AS AN INDICATOR OF GLUCOSE METABOLISM DISTURBANCES IN THE BRAIN DUE TO VARIOUS DAMAGING FACTORS *)

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy of Sciences

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

Normal nervous tissue accumulates but a small amount of glycogen. The dependence of polysaccharide accumulation on the stage of maturity of the central nervous system is a very characteristic feature. In our experiments, carried out on rats aged 1, 2, 3, 4, 6 and 10 weeks it was shown that glycogen content in the brain of 1-week-old rats reached the value of 11.3—13.4 mg/100 g of tissue, while that in the brain of 2-week-old ones was already 3 times higher, remaining at this level during the subsequent stages of maturation (Mossakowski et al., 1973).

The observed variations in glycogen content were considered to be related with the shift of glucose metabolism from the pentose monophosphate shunt to the glycolytic pathway occurring at the beginning of the 2nd week of rat life (Winick, 1970; Balasz, 1970), with a significant increase of hexokinase activity at the same time (Wilson, 1972) or with metabolic processes connected with myelination, taking place between the 1st and 6th week of the animal's life (Bass et al., 1968; Eto, Suzuki, 1972).

At the histochemical level, the glycogen deposits occur only in some structures of the central nervous system such as epithelial cells of the choroid plexus, ependyma, mostly of the III ventricle, subependymal and subpial layers, some nuclei of the brain stem (mesencephalic nucleus of Vth nerve, large neurons of reticular formation) and ganglionic layer of cerebellar cortex. Significant species-dependent differences have to be pointed out. The presence of glycogen deposits in large motor

*) The paper was presented at the IV Jahrestagung der Gesellschaft für Neuro-pathologie der DDR. Mühlhausen, DDR, 1974.

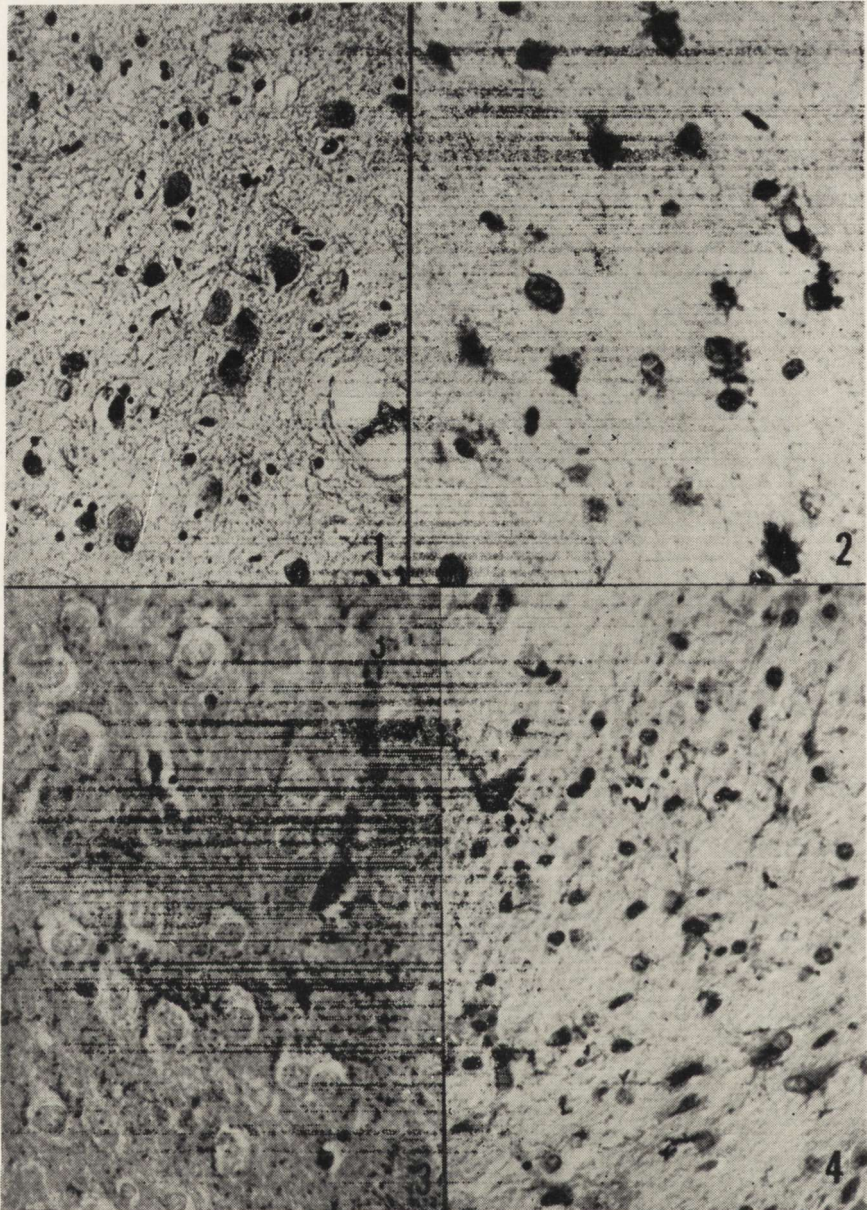


Fig. 1. Brain stem neurons accumulating glycogen in cytoplasm. Type II glycogenosis (Pompe's disease). Best's carmine meth. $\times 200$

Ryc. 1. Neurony pnia mózgu spichrzające glikogen w cytoplazmie w glikogenozie typu II (choroba Pompego). Karmin Besta. Pow. 200 \times

Fig. 2. The same case. Glycogen deposits in astroglial cells in the white matter. Best's carmine meth. $\times 200$

Ryc. 2. Ten sam przypadek. Złogi glikogenu w astrocytach istoty białej. Karmin Besta. Pow. 200 \times

neurons of the spinal cord of rabbits, observed by Schabadasch (1939) in contrast to their absence in the cat spinal cord described by Long et al. (1972) should be stressed. There exist also significant differences in the localization of normal glycogen deposits between mammals and fishes, for instance sharks (unpublished personal data).

Abnormal glycogen deposition in the central nervous system resulting from various pathological conditions seems to be a very common feature. Among those special position has to be attributed to the Pompe's variant of glycogenosis, being an inborn, genetically induced metabolic error, leading to excess glycogen deposition both in neuronal and glial elements of the central nervous system (Fig. 1 and 2). In the most other conditions glycogen accumulation seems to represent entirely non-specific phenomenon. Abundant glycogen deposits were described around experimental brain wounds (Friede, 1954; Shimizu, Hamuro, 1958; Klatzo et al., 1970; Guth, Watson, 1970) as well as an effect of irradiation (Klatzo et al., 1961; Miquel et al., 1963; Miquel, Haymaker, 1965; Ostenda et al., 1970). A wide range of pharmacologically active compounds can also induce an increase of glycogen content in the brain, among these are reserpine (Albrecht, 1957; Estler, 1961), insulin (Nelson et al., 1968), ether (Estler, Heim, 1960), phenobarbital (Estler, 1960; Nelson et al., 1968).

A severalfold increase of glycogen was observed in the central nervous system of rats with alloxan-induced diabetes (Prasannan, Subrahmanyam, 1968) and in rabbits with hereditary ataxia (Tourtellotte et al., 1966). Glycogen deposits were also noticed in areas surrounding human (Oksche, 1958) and animal tumors (Szumańska, Kroh, 1975).

Our experimental studies showed, that hypoxic conditions of various nature involve a common factor leading to the accumulation of abnormal glycogen deposits in nervous tissue.

The phenomenon was observed in both perinatal asphyxia of newborn monkeys (Mossakowski et al., 1968), hypoxic hypoxia (Mossakow-

Fig. 3. Granular glycogen deposits lying loosely in the neuropil and in the form of perivascular and perineuronal aggregations in the cerebral cortex of rat. 48 h after carotid ligation. PAS-dimedon-hematoxylin. $\times 400$

Ryc. 3. Ziarniste złoży glikogenu leżące luźno w neuropilu oraz tworzące okołonaczyniowe i okołoneuronalne skupienia w korze mózgu szczura, 48 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon-hematoksylina. Pow. $400 \times$

Fig. 4. Glycogen grains in perikarya and processes of astrocytes in rat brain, 12 h after carotid ligation. PAS-dimedon-hematoxylin. $\times 200$

Ryc. 4. Ziarnistości glikogenu w perykariach i wypustkach astrocytów w mózgu szczura, 12 godz. po podwiązaniu tętnic szyjnych. PAS-dimedon-hematoksylina. Pow. $200 \times$

ski, Zelman, 1971), ischemia due to ligation of brain or spinal cord arteries (Pronaszko et al., 1971; Long et al., 1972; Mossakowski et al., 1973; Śmiałek et al., 1971; Mrsulia et al., 1975) and hypovolemic ischemia (Sikorska, Śmiałek, 1974; Szumańska, Gadamski, 1974) as well as in acute carbon monoxide intoxication (Śmiałek et al., 1973; Korthals et al., 1973; Szumańska, 1973). An essential characteristic of posthypoxic glycogen accumulation consists in its reversible nature and its localization either in the vicinity of irreversibly damaged areas in the tissue and/or mostly in tissue revealing no histological and ultrastructural lesions whatever. Most glycogen deposits occur in the grey structures, above all in the cerebral cortex. They take the form of fine granular material lying loosely in the neuropile, very often with perivascular and less frequently perineuronal aggregations (Fig. 3). They are very common in the vicinity of astrocytic nuclei, and fill their perikarya and processes (Fig. 4). At the electron microscope level they form abundant rosettes in perivascular astrocytic processes, in perikarya of astrocytes and in their processes not connected with vascular walls (Fig. 5). Their presence in neuronal processes is a very unusual feature. Neuronal glycogen deposition occurs very seldom. In our experimental material deposits were present only in cases of spinal cord moderate ischemia,

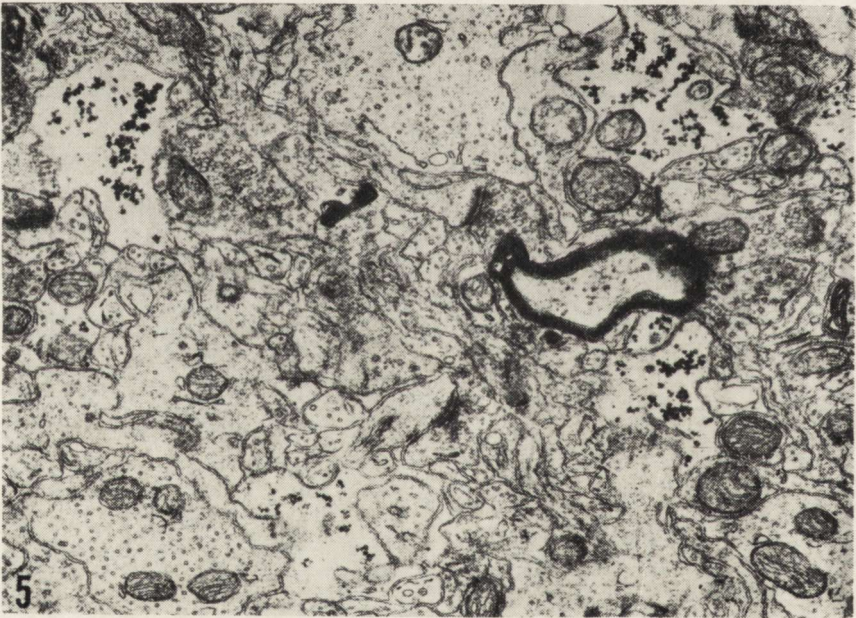


Fig. 5. Typical glycogen rosettes in swollen astrocytic processes in rat brain, 24 h after carbon monoxide intoxication. $\times 7400$

Ryc. 5. Typowe rozetki glikogenu w obrzmiałych wypustkach astrocytarnych, 24 godz. po zatruciu tlenkiem węgla. Pow. 7400 \times

and occurred in large motor neurons accompanying neuropile and astrocyte accumulation (Fig. 6).

In mature animals the glial glycogen deposits were confined exclusively to the grey brain structures, while in animals with immature central nervous system they occurred also in the white matter, mostly in that of myelinating brain hemispheres. This could be seen both in asphyxiated newborn monkeys and 1-week old rats with bilaterally ligated carotid arteries. The age of animals played also important role as far as the dynamics of the phenomenon was concerned. The age dependence of the dynamics of glycogen appearance and disappearance was most clearly demonstrated by polysaccharide accumulation in the brains of rats, the common carotid arteries of which were ligated at various ages. The glycogen content in 1-week-old rats was significantly increased at 24th h after bilateral carotid ligation, while in 6-week-old ones some enhancement was present already after 12 hrs. Return to normal glycogen level in the former age group occurred at the 3rd day, whereas in the latter is was far higher than in controls, even after five days (Mossakowski et al., 1973). The dynamics of the process was also dependent on the kind of hypoxia. The glycogen content in the brain appeared higher much earlier after carbon monoxide intoxication than in the case of moderate brain ischemia or circulatory hypoxia (Śmiałek et al., 1973; Sikorska, Śmiałek, 1974). In asphyxiated newborn monkeys the greatest glycogen accumulation was noted at the 12th hour following experimental procedure, and its return to normal occurred 4 days later. In the spinal cord ischemia glycogen deposition was first observed as early as 30 min following abdominal aorta clamping. Full normalization of the histochemical picture occurred 7 days later.

The dynamics and degree of glycogen accumulation was influenced to a great extent by the tissue composition, as indicated by the differences in glycogen content increase in various portions of rabbit brains in the case of hypovolemic hypoxia.

In all our experiments glycogen deposition was accompanied by changes in the activity of glycogen-metabolizing enzymes, UDPG-g transferase and phosphorylases. They were expressed in the appearance or increase of UDPG-g transferase and phosphorylase activity in astrocytes in all the experiments (Fig. 7) and in neurons in the case of spinal cord ischemia (Fig. 8). The most striking feature consisted in the fact that the increase in UDPG-g transferase activity preceded maximum accumulation of glycogen, this being most early reflected in the case of carbon monoxide intoxication. The greatest increase of phosphorylase activity took place at the time of maximal glycogen deposition.

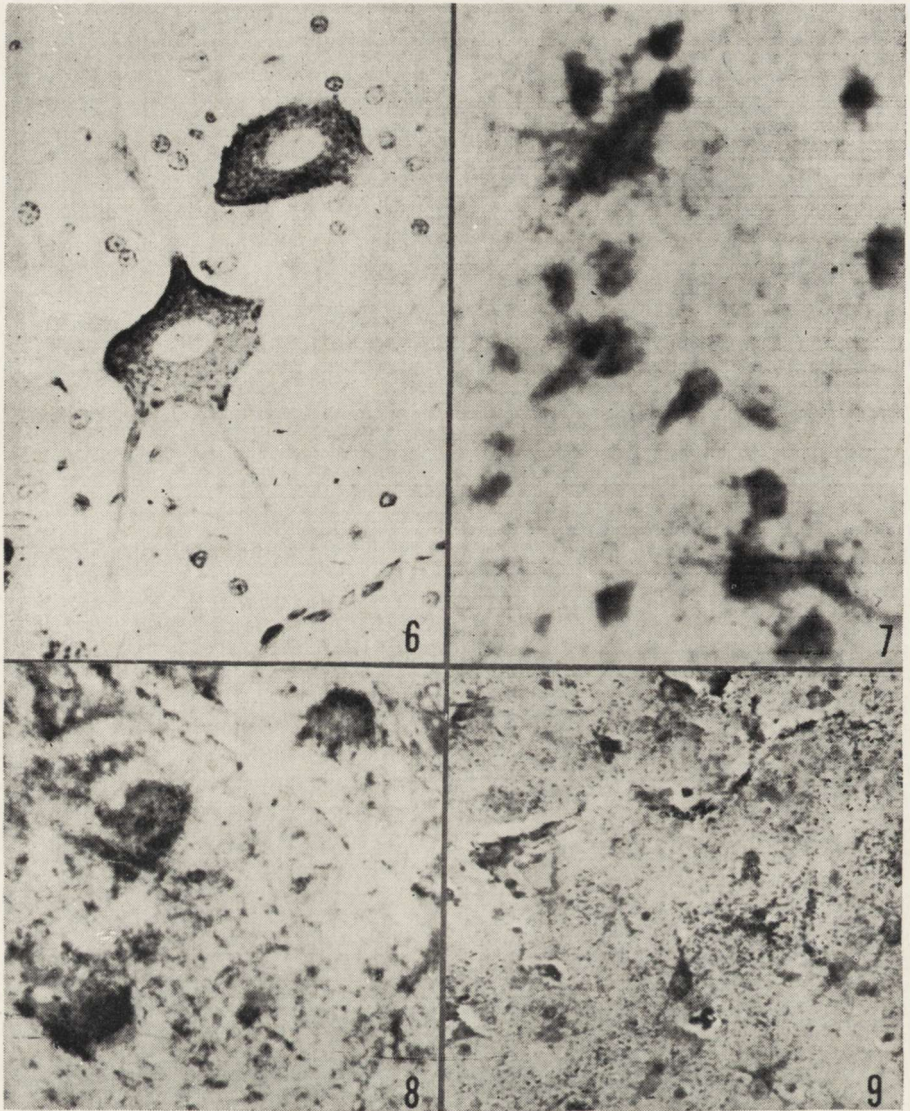


Fig. 6. Large motor neurons from the lumbar segment in cat sacrificed 12 h following ligation of aorta. Different pattern of glyco-gen granules within neuronal cytoplasm. PAS-dimedon-hematoxylin. $\times 600$

Ryc. 6. Duże neurony ruchowe odcinka lędźwiowego rdzenia kręgowego u kota, 12 godz. po podwiązaniu tętnicy głównej. Złogi glikogenu w perikarialnej i wypustkowej cytoplazmie neuronu. PAS-dimedon-hematoksylina. Pow. 600 \times

Fig. 7. Subcortical white matter in a monkey sacrificed 1 h after asphyxia. Astrocytes with UDPG-glyco-gen transferase activity in their cytoplasm. $\times 460$

Ryc. 7. Istota biała podkorowa u małpy w 1 godz. po asfiksji. Astrocytarna aktywność transferazy UDPG. Pow. 460 \times

The same phenomenon, consisting in glycogen accumulation and in changes of glycogen-metabolizing enzymes activity occurred also in nerve cells and astrocytes cultured in vitro and subjected to anoxic conditions or to carbon monoxide intoxication (Kraśnicka, Renkawek, 1972; Hoppe, 1974).

Glycogen accumulation resulted also from intracerebral injection of ouabain, a well known membraneous ATP-ase inhibitor, and leading when given intracerebrally to profuse cytotoxic brain edema. In the above experimental conditions astrocytic aggregation of polysaccharide, accompanied by considerable changes in glycogen-metabolizing enzymes activity were observed (Fig. 9). Abnormal glycogen accumulation in these conditions deserves special attention because of its bilateral distribution exceeding by far the area of glycoside diffusion in the brain tissue, as indicated by radioisotopic studies of Towfighi and Gonnatas (1973), the long duration of the process and its entirely different dynamics as compared to that in cases of brain hypoxia or ischemia (Zelman, Pronaszko-Kurczyńska, 1975).

Similar changes were observed by Szumańska et al. (1974) in experimental vasogenic brain edema induced by brain compression caused by a supradurally located balloon. However, they were much less pronounced, this probably being related with early stages of brain edema. Their mechanism owing to dominating hemodynamic disturbances was considered to be similar to that in cases of brain ischemia.

In addition to the above mentioned generalized or focal brain pathology, glycogen accumulation occurs in some reversible neuronal degenerative processes, namely in cases of experimentally induced axonal reaction. Damage of the peripheral nerves, as in experiments of Szumańska and Rap (1971), resulted in polysaccharide accumulation in cer-

Fig. 8. Glycogen phosphorylase a activity in the anterior horn neurons in cat sacrificed 24 h after ligation of aorta. High enzyme activity in neuronal cytoplasm and processes. Takeuchi, Kuriaki. $\times 200$

Ryc. 8. Aktywność fosforylazy a w rogu przednim rdzenia u kota w 24 godz. po podwiązaniu tętnicy głównej. Wysoka aktywność w cytoplazmie perikarjalnej i wypustkowej motoneuronów. Takeuchi, Kuriaki. Pow. 200 \times

Fig. 9. Cerebral cortex of rat, 48 h following intracerebral ouabain injection. Abundant astrocytic and neuropil glycogen deposits. PAS-dimedon-hematoxylin. $\times 200$

Ryc. 9. Kora mózgu szczura, 48 godz. po domózgowej iniekcji ouabainy. Obfite ziarniste złoża glikogenu w astrocytach i neuropilu. PAS-dimedon-hematoksylina. Pow. 200 \times

tain motor neurons, related with damaged axons. The phenomenon occurred at the time of advanced tigrolysis, and disappeared with tigroid formation. Increase of UDPG-g transferase and phosphorylases activities, taking place at corresponding time intervals was an accompanying feature. The same phenomenon was represented by glycogen accumulation in neurons of dorsal root ganglia grown in vitro cultures. The polysaccharide accumulation and increased activity of the metabolizing enzymes disappeared at the time of tigroid reconstruction (Kraśnicka, 1969).

The review of the literature and the presented results of our own experiments indicate that glycogen accumulation and abnormalities in the activity of glycogen-metabolizing enzymes are a nonspecific manifestation of disturbances of nerve tissue metabolism, accompanying various pathological conditions. The full reversibility of the process, its occurrence in areas of entirely undamaged tissue or in elements of the latter revealing features of reversible abnormalities (axonal reaction) allow to consider glycogen accumulation as a manifestation of early and reversible metabolic disturbances, showing no histopathological or ultrastructural exponents. This process expresses undoubtedly abnormalities in glucose metabolism. Time sequences of polysaccharide accumulation and variations in glycogen-metabolizing enzymes activity as well as isotope studies of Guth and Watson (1970) and Sikorska et al. (1975) are strongly suggestive of an increased glycogen synthesis rather than inhibition of its enzymatic breakdown. The mechanism of abnormal glycogen accumulation remains unknown. Numerous pathogenetic theories have been offered. The most attractive explanation of the phenomenon seems to be that based on the assumption of reduced glucose utilization by the tissue. The occurrence of glycogen accumulation in conditions of reduced tissue metabolism (reserpine, ether, barbiturates) or in cases of excess of glucose (alloxan-induced diabetes), as well as in processes, in which, owing to the preceding hypoxia, the rate of metabolic processes is diminished (reduced protein and nucleotide biosynthesis, shown by Yap and Spector (1965) and Albrecht (1972) to follow hypoxic accidents) is strongly suggestive of such a possibility. Astrocytic or mostly astrocytic localization of glycogen might be related with their transport functions, although our tissue culture studies indicate the possible role of disturbances of their own metabolism. Neuronal glycogen deposition according to Long's and his colleagues (1972) opinion — occurs only in those nerve cells, which possess the necessary enzymatic apparatus for glycogen synthesis. However, molecular mechanisms of glycogen accumulation still remain to be elucidated.

M. J. Mossakowski, I. B. Zelman

ODKŁADANIE SIĘ GLIKOGENU W MÓZGU JAKO WYKŁADNIK
ZABURZENIA PRZEMIANY GLUKOZY W NASTĘPSTWIE DZIAŁANIA
RÓŻNYCH CZYNNIKÓW USZKADZAJĄCYCH

Streszczenie

Zawartość glikogenu w prawidłowym mózgu jest niewielka, a histochemicznie wykrywalne złogi spotyka się tylko w niektórych strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Zwiększenie zawartości tego polisacharydu występuje jako zjawisko fizjologiczne w okresie dojrzewania tkanki nerwowej oraz w stanach patologicznych o różnej etiologii. Oprócz glikogenozy, w której odkładanie się glikogenu w ośrodkowym układzie nerwowym jest wynikiem uwarunkowanego genetycznie zaburzenia przemiany, obserwowano gromadzenie się glikogenu jako zjawisko przejściowe w następstwie niedotlenienia, uogólnionego i miejscowego niedokrwienia, po zatruciu tlenkiem węgla, po domózgowym podaniu ouabainy oraz w innych procesach prowadzących do zaburzeń przemiany w tkance nerwowej ale nie powodujących zmian strukturalnych, lub wyłącznie zmiany odwracalne. Zmianom zawartości glikogenu towarzyszą zaburzenia w aktywności enzymów biorących udział w jego przemianie, UDPG-g transferazy i fosforylaz. Dynamika rozwoju tych zmian jest różna w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego, rodzaju czynnika patogennego oraz gatunku zwierząt doświadczalnych. Złogi glikogenu gromadzą się przede wszystkim w neuropilu, perikarionach i wypustkach astrocytów, rzadko i tylko w niektórych strukturach również w perikarionach dużych neuronów ruchowych. W dojrzałym mózgu glikogen obserwowano wyłącznie w strukturach szarych, w niedojrzałym, a zwłaszcza mielinizującym się również w istocie białej. Wzrost zawartości glikogenu, którego mechanizm nie jest wyjaśniony, stanowi niespecyficzny wykładnik zaburzeń przemiany glukozy w tkance nerwowej, wyprzedzający pojawienie się histologicznych i submikroskopowych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego.

М. Я. Моссаковски, И. Б. Зельман

ОТЛОЖЕНИЕ ГЛИКОГЕНА

В МОЗГУ, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ
В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Резюме

Содержание гликогена в нормальном мозгу невелико, а гистохимически обнаружимые отложения встречаются только в некоторых структурах цнс. Увеличение содержания этого полисахарида выступает как физиологическое явление в период созревания нервной ткани и в патологических состояниях с разной этиологией. Кроме гликогеноза, при котором отложение гликогена в цнс является результатом генетически обусловленного нарушения обмена, наблюдалось накопление гликогена в цнс как преходящее явление в результате гипоксии, общей и местной ишемии цнс, после отравления окисью углерода, после внутримозгового введения ouabaina, а также других процессов, приводящих к нарушениям обмена в нервной ткани, но не вызывающих каких-либо структурных изменений в цнс или вызывающих только обратимые изменения. Изменения содержания гликогена сопровождались нару-

шениями активности ферментов, участвующих в его обмене, УДФТ-г трансферазы и фосфорилаз. Динамика развития этих изменений различна в зависимости от степени зрелости цнс, характера патогенного фактора и вида опытных животных. Отложения гликогена накапливаются прежде всего в нейропиле, перикарионах и отростках астроцитов, редко и только в некоторых структурах также в перикарионах больших двигательных нейронов. В зрелом мозгу гликоген наблюдали только в серых структурах, в несозревшем и, особенно, миелинизирующем мозгу — также в белом веществе. Возрастание содержания гликогена, механизм которого не выяснен, является неспецифическим показателем нарушений обмена глюкозы в нервной ткани, опережающим появление гистологических и субмикроскопических повреждений цнс.

REFERENCES

1. Albrecht, W.: Erhöhung der Glykogenkonzentration im Gehirn und das Verhalten verschiedener Fermente in Gehirn und Darm der Maus nach Reserpine (Serpasil). *Klin. Wsch.* 1957, 35, 588—590.
2. Albrecht, J.: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na biosyntezę białek w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 547—465.
3. Balazs, R.: Carbohydrate metabolism. In: *Handbuch of Neurochemistry*. Ed. A. Lajtha Plenum Press. New York 1970, 1—29.
4. Bass, N. H., Netsky, M. H., Young, E.: Microchemical studies on postnatal development of rat cerebrum. 2. Formation of myelin. *Neurology* 1969, 9, 405—414.
5. Estler, C. J.: Der Glycogengehalt des Gehirns weisser Mäuse unter der Einwirkung der Phenobarbital und seine Beziehungen zu Blutzucker und Körpertemperatur. *Med. exp. (Basel)* 1960, 4, 30—36.
6. Estler, C. J.: Glycogengehalt des Gehirns und Körpertemperatur weisser Mäuse unter dem Einfluss zentral dampfender und erregender Pharmaka. *Med. exp. (Basel)* 1961, 4, 203—213.
7. Estler, C. J., Heim, F.: Der Gehalt des Gehirns weisser Mäuse an Adeninnukleotiden, Kreatinphosphat, Coenzym A, Glycogen und Milchsäure in Ätherexitation und — Narkose. *Med. exp. (Basel)* 1960, 3, 241—248.
8. Eto, Y., Suzuki, K.: Cholesterol esters in developing rat brain. *Enzymes of cholesterol esters metabolism. J. Neurochem.* 1972, 19, 117—121.
9. Friede, R. L.: Die Bedeutung der Glia für den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel. *Zbl. allg. Path. Anat.* 1954, 92, 65—74.
10. Guth, L., Watson, P. K.: A correlated histochemical and biochemical study on cerebral glycogen after brain injury in the rat. *Exp. Neurol.* 1970, 22, 590—602.
11. Hoppe, B.: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego in vitro poddanego działaniu tlenku węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 371—381.
12. Klatzo, I., Farkas-Bargeton, E., Guth, L., Miquel, J., Olson, V.: Some morphological and biochemical aspects of abnormal glycogen accumulation in the glia. In: *Proc. VIth Intern. Congress Neuropath. Paris 1970*. Masson et Cie. Paris 1970, 351—356.
13. Klatzo, I., Miquel, J., Tobias, C., Haymaker, W.: Effects of alpha particle radiation on the rat brain, including vascular permeability and glycogen study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1961, 20, 459—473.
14. Korthals, J., Mossakowski, M. J., Śmiałek, M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowęglovej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 279—300.

15. Kraśnicka, Z.: Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju embrionalnym. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 395—434.
16. Kraśnicka, Z., Renkawek, K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 507—518.
17. 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.
18. Miquel, J., Haymaker, W.: Astroglial reaction to ionizing radiation with emphasis on glycogen accumulation. In: *Progress in Brain Research. Vol. 15. Biology of Neuroglia.* Ed. De Robertis E. D. P., Carrea R., Elsevier. Amsterdam 1965, 89—114.
19. Miquel, J., Klatzo, I., Menzel, D. B., Haymaker, W.: Glycogen changes in x-irradiated rat brain. *Acta neuropath. (Berl.)* 1963, 2, 482—490.
20. Mossakowski, M. J., Long, D. M., Myers, R. E., Rodriguez de Curet H., Klatzo, I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
21. Mossakowski, M. J., Pronaszko-Kurczyńska, A., Korthals, J., Wrutniak, A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 53—68.
22. Mossakowski, M. J., Zelman, I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenu w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki* 1971, supl. 1, 37—50.
23. Mrsulja, B. B., Mrsulja, B. J., Ito, U., Walker Jr. J. T., Spatz, M., Klatzo, I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta neuropath. (Berl.)* 1975, 33, 91—103.
24. Nelson, S. R., Schutz, D. W., Passonneau, J. V., Lowry, O. H.: Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.* 1968, 15, 1271—1279.
25. Oksche, A.: Der histochemisch nachweisbare Glykogenaufbau und — Abbau in der Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer funktionsabhängigen Stoffwechselaktivität der Neuroglia. *Z. Zellforsch.* 1961, 54, 307—361.
26. Ostenda, M., Śmiałek, M., Pronaszko, A., Nowakowski, W.: Zmiany lokalizacji i zawartości glikogenu oraz aktywności enzymów metabolizujących glikogen w mózgu szczura w czasie dojrzewania, w warunkach prawidłowych i po napromienianiu promieniami gamma. *Neuropat. Pol.* 1970, 8, 375—387.
27. Prasanna, K. G., Subrahmanyam, K.: Enzymes of glycogen metabolism in cerebral cortex of normal and diabetic rats. *J. Neurochem.* 1968, 15, 1239—1241.
28. Pronaszko-Kurczyńska, A., Mossakowski, M. J., Ostenda, M., Korthals, J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 281—294.
29. Schabadasch, A. L.: Morphology of glycogen distribution and transformation. III. Cytology of glycogen accumulation in motor nerve cells in normal nervous system. *Bull. Biol. Med. Exp.* 1939, 7, 353—357.
30. Shimizu, N., Hamuro, V.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wounds. *Nature (Lond.)* 1958, 181, 781.
31. Sikorska, M., Gorzkowski, B., Szumańska, G., Śmiałek, M.: Incorporation of ¹⁴C-glucose into glycogen and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in

- rat brain following carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 397—404.
32. Sikorska, M., Śmiałek, M.: Glycogen level and UDPglucose:glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in the brains of rabbits after experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 655—664.
 33. Szumańska, G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—314.
 34. Szumańska, G., Gadamski, R.: Histochemical changes in rabbit brain following circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 593—601.
 35. Szumańska, G., Gadamski, R., Czernicki, Z., Jurkiewicz, J., Teżycka, J.: Zmiany histochemiczne w mózgu kota w doświadczalnym ucisku nadtwardówkowym. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 447—459.
 36. Szumańska, G., Kroh, H.: Mucopolysaccharides and glycogen in chemically induced CNS gliomas. *Proc. VIIth Intern. Congress Neuropath.* Eds. Környey S., Tariska S., Gosztonyi G. Exc. Med. Amsterdam 1975, 1, 495—500.
 37. Szumańska, G., Rap, Z. M.: Rozmieszczenie glikogenu i aktywność niektórych enzymów w motoneuronach rdzenia kręgowego w zwyrodnieniu osiowym. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 111—126.
 38. Śmiałek, M., Sikorska, M., Bicz, W., Mossakowski, M. J.: UDPglucose:glycogen α -1-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) and α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1) activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 19, 242—248.
 39. Śmiałek, M., Sikorska, M., Korthals, J., Bicz, W., Mossakowski, M. J.: The glycogen content and its topography and UDP-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.
 40. Tourtellotte, W. W., Lowry, O. H., Passonneau, J. V., O'Leary, L. J., Harris, A. B., Rowe, J. J.: Carbohydrate metabolites in rabbit hereditary ataxia. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1966, 15, 283—288.
 41. Towfighi, J., Gonatas, N. K.: Effect of ouabain in adult and developing rats. An ultrastructural and autoradiographic study. *Lab. Investig.* 1973, 28, 170—180.
 42. Wilson, J. E.: The relationship between glycolytic and mitochondrial enzymes in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 223—227.
 43. Winick, M.: Nutrition and nerve cells growth. *Fed. Proc.* 1970, 29, 1510—1515.
 44. Yap, S. L., Spector, R. G.: Cerebral protein synthesis in anoxic-ischemic brain injury in the rat. *J. Path. Bact.* 1965, 90, 543—561.
 45. Zelman, I. B., Pronaszko-Kurczyńska, A.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu szczura w encefalopatii ouabainowej. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 21—31.

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

ZUZANNA KRAŚNICKA, KRYSZYNA OLSZEWSKA, JERZY BOROWICZ

WPŁYW SUROWICY OD CHORYCH Z ZESPOŁEM MOCZNICOWYM, MOCNIKA I KREATYNYNY NA ORGANOTYPOWĄ HODOWLĘ TKANKI NERWOWEJ.

II. BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE

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

Doniesienie niniejsze zawiera drugą część badań morfologicznych dotyczących wpływu surowicy od chorych z zespołem mocznicowym na organotypową hodowlę tkanki nerwowej. W pierwszej części przedstawiono obserwacje w mikroskopie świetlnym dotyczące zmian morfologicznych i histoenzymatycznych (Kraśnicka 1977). Celem drugiej części badań jest ocena zmian ultrastrukturalnych w 3-tygodniowych hodowlach mózdzku w tym samym układzie doświadczalnym.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły 3-tygodniowe hodowle z mózdzku noworodków szczurzych z odpowiednich grup doświadczalnych: 1) z surowicą chorych z zespołem mocznicowym, 2) z mocznikiem, 3) z kreatyniną. Grupę czwartą stanowiły hodowle kontrolne. Szczegółowy układ doświadczenia przedstawiono w I części pracy (Kraśnicka 1977). Materiał ze wszystkich grup doświadczalnych utrwalono w aldehydzie glutarowym 1,6% w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz w 1% czterotlenku osmu w tym samym buforze. Materiał odwadniano w alkoholach o wzrastającym stężeniu i zatopiono w eponie 812. Ultracienkie skrawki skrawano w utramikrotomie Reicherta OmU 2 i kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.



WYNIKI

Grupa I. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe hodowli poddanych działaniu surowicy od chorych z zespołem mocznicowym wykazują wyraźne zmiany w porównaniu z obrazem ultrastrukturalnym komórek nerwowych i glejowych przetrzymywanych w warunkach prawidłowej hodowli. W cytoplazmie dużych neuronów (komórki Purkiniego) spotrzega się zanik szorstkiej siatki śródplazmatycznej, zmniejszenie ilości rybosomów i polirybosomów oraz nieznaczne poszerzenie kanałów aparatu Golgiego. Często spotyka się obrzmiałe mitochondria z jasną macierzą i z fragmentami uszkodzonych grzebieni (ryc. 1). Cytoplazma tych komórek zawiera liczne, różnej wielkości lizosomy oraz kule lipidowe o zróżnicowanej gęstości elektronowej. Neurony małe odpowiadające komórkom warstwy ziarnistej wykazują mniejsze uszkodzenia. Ich siatka śródplazmatyczna jest zazwyczaj dobrze wykształcona wykazując typowe równoległe układy kanałów (ryc. 2), Mitochondria są wydłużone, raczej liczne i drobne, o gęstej macierzy, z zachowanymi grzebieniami. Tylko nieliczne mitochondria są obrzmiałe, jednakże w mniejszym stopniu niż ma to miejsce w komórkach Purkiniego. W cytoplazmie komórek ziarnistych występują liczne, drobne lizosomy, rzadziej spotyka się kuliste struktury lipidowe (ryc. 3). Aparat Golgiego wykazuje cechy przerostu (ryc. 4). Błona jądrowa i układ chromatyny dużych i małych neuronów przedstawiają się prawidłowo.

Aksony komórek nerwowych są przeważnie zmielinizowane. Struktura mieliny wykazuje znaczne uszkodzenia polegające na rozwarstwieniu i na ograniczonym zatarciu budowy blaszek. Cytoplazma aksonów często pozbawiona typowych organelli zawiera drobne, kłaczkowate tworzy (ryc. 5). Tylko w nielicznych aksonach widoczne są prawidłowo ukształtowane neurotubule.

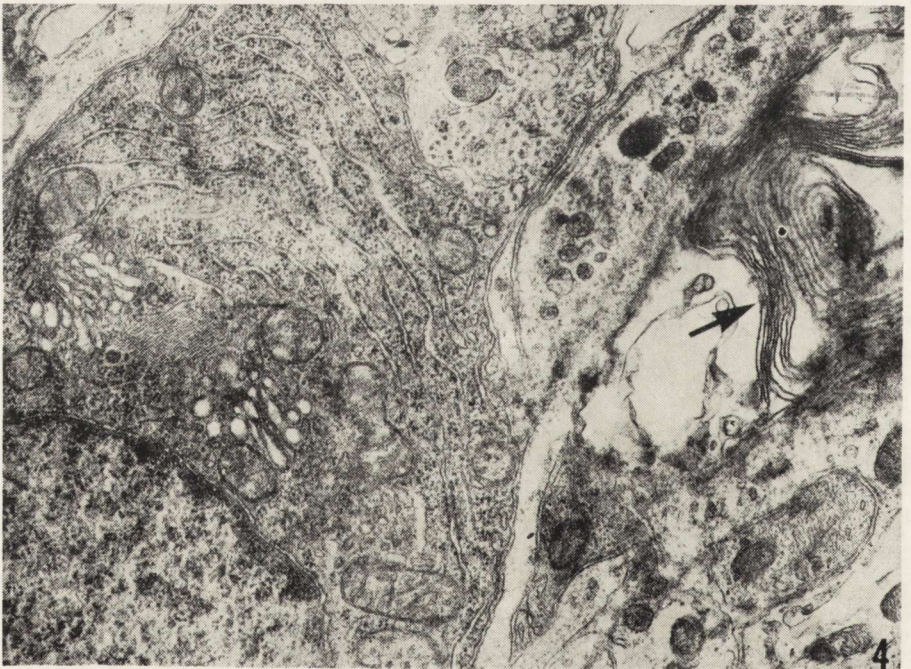
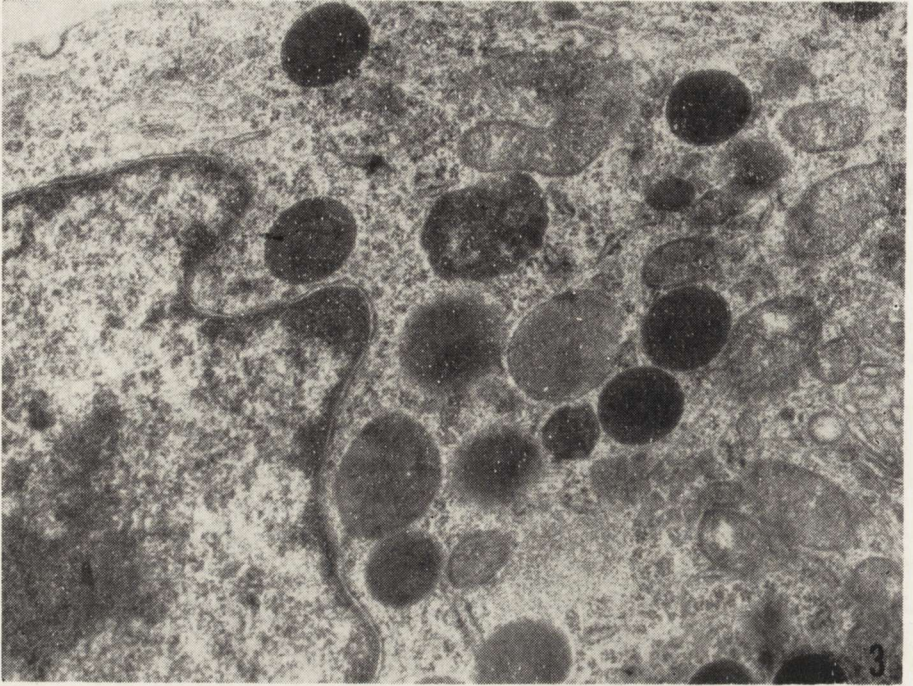
Oligodendrocyty charakteryzuje cytoplazma o dużej gęstości elektronowej. Ich jądra wykazują charakterystyczne układy chromatyny ją-

Ryc. 1. Grupa I. Fragment komórki Purkiniego z obrzmiałymi mitochondriami (m), sfragmentaryzowaną szorstką siatką śródplazmatyczną. Widoczne są także formacje mielinowe (My) i kule tłuszczowe (L). Pow. 15 000 ×

Fig. 1. Group I. Fragment of Purkinje cell with swollen mitochondria (m) and fragmented rough endoplasmic reticulum. My — myelin structures, L — lipid bowls. × 15 000

Ryc. 2. Grupa I. Fragment komórki nerwowej warstwy ziarnistej. Widoczna jest dobrze zachowana szorstka siatka śródplazmatyczna, złożki lipidowe i obrzmiałe mitochondrium. Pow. 18 000 ×

Fig. 2. Group I. Fragment of nerve cell from granular layer. Well preserved rough endoplasmic reticulum, lipids deposits and swollen mitochondrium. × 18 000



drowej i prawidłowo ukształtowaną błonę jądrową. W cytoplazmie oligodendrocytów występują liczne lizosomy i krople lipidowe (ryc. 6). Siatka śródplazmatyczna szorstka złożona jest przeważnie z krótkich kanałów. Aparat Golgiego jest zazwyczaj dobrze rozwinięty i zawiera liczne, poszerzone kanały. Drobne, wydłużone mitochondria występują na ogół w niewielkich ilościach. Ich macierz jest zazwyczaj gęsta, a grzebień dobrze wykształcony.

Astrocyty wykazują najbardziej nasilone zmiany ultrastrukturalne. Kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej są bardzo poszerzone, tworzą wakuole, na obwodzie których widoczne są niewielkie zgrupowania rybosomów. W niektórych komórkach obserwuje się znaczne odwarstwienie zewnętrznej pochewki karioplazmy. Mitochondria są przeważnie obrzmiałe o małej gęstości macierzy, często pozbawione grzebieni lub zawierające tylko ich resztki (ryc. 7). W cytoplazmie astrocytów obecne są liczne lizosomy. Aparat Golgiego w poszczególnych komórkach wykazuje zróżnicowany stopień przerostu (ryc. 8). Niektóre astrocyty ulegają całkowitej dezintegracji. Komórki mikrogleju nie wykazują większych nieprawidłowości w obrazie jądra i cytoplazmy.

Grupa II. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe hodowli poddanych działaniu egzogenego mocznika w stężeniu 100 mg% wykazują nieznaczne odchylenia w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Struktura komórek Purkinjego i komórek ziarnistych jest prawidłowa. Akso-plazma wypustek osiowych również nie wykazuje zmian. Obserwuje się natomiast zmiany w osłonce mielinowej wokół licznych włókien osiowych. Zaburzenia struktury mielinowej polegają przede wszystkim na rozwarstwieniu blaszek, które doprowadza do pojawienia się nieregularnych przestrzeni pomiędzy jej poszczególnymi warstwami.

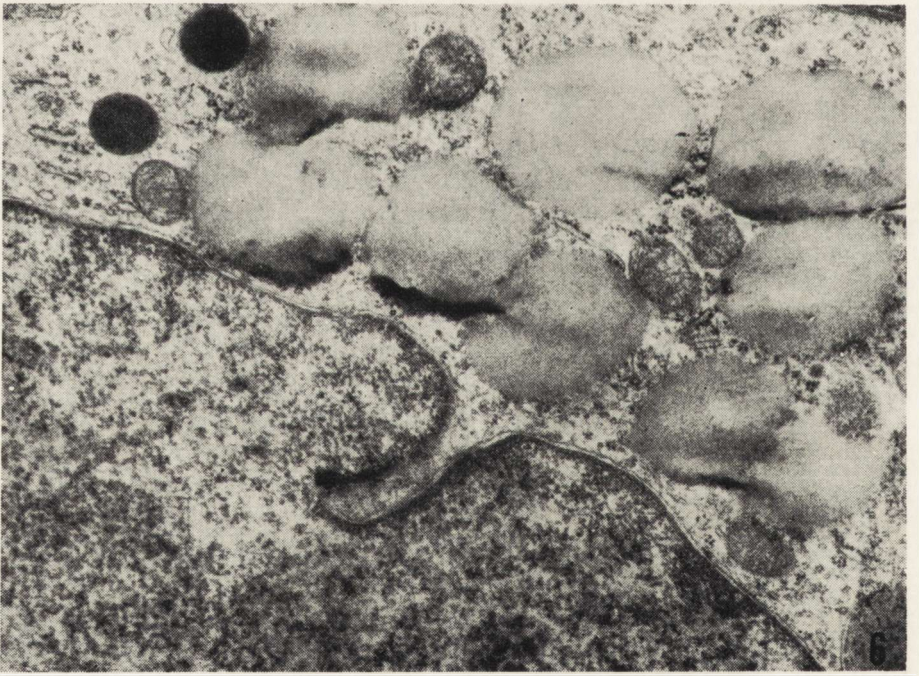
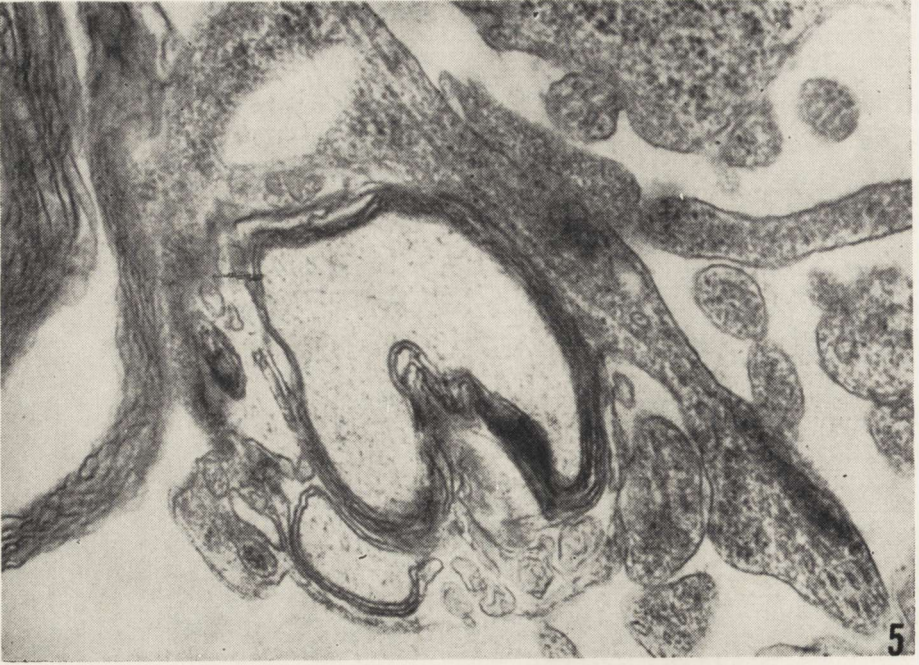
Oligodendrocyty wykazują przede wszystkim zwiększoną ilość lizosomów oraz obecność kul lipidowych (ryc. 9). W cytoplazmie oligodendrocytów występuje wyraźnie wykształcony i rozbudowany aparat Gol-

Ryc. 3. Grupa I. Fragment komórki nerwowej z licznymi lizosomami i złogami tłuszczowymi. Wydłużone mitochondria z zachowanymi grzebieniami. Pow. 14000 X

Fig. 3. Group I. Fragment of nerve cell with numerous lysosomes and lipid deposits. Elongated mitochondria with preserved cristae. X 14 000

Ryc. 4. Grupa I. Fragment małego neuronu z dobrze zachowaną szorstką siatką śródplazmatyczną i licznymi drobnymi mitochondriami. Aparat Golgiego z cechami przerostu. Obok obrzęknięta osłonka mielinowa z zatartą strukturą blaszek (strzałka). Pow. 10 000 X

Fig. 4. Group I. Fragment of small neuron with well preserved rough endoplasmic reticulum and numerous small mitochondria. Golgi apparatus with features of hypertrophy. In the vicinity swollen myelin sheath with obliterated structure of lamellae (arrow). X 10 000



giego z poszerzonymi kanałami (ryc. 10). Astrocyty i ich wypustki są obrzmiałe. Cytoplazma astrocytów o bardzo niskiej gęstości elektronicznej zawiera nieliczne mitochondria przeważnie z prawidłową strukturą, różnej wielkości lizosomy oraz znaczną ilość ziaren glikogenu (ryc. 11). Zawartość gliofibrilli w poszczególnych komórkach jest zróżnicowana.

Hodowla poddana działaniu mocznika w stężeniu 200 mg % wykazuje zmiany ultrastrukturalne o podobnym charakterze. Zwiększenie stężenia mocznika w medium nieznacznie nasila cechy uszkodzenia cytoplazmy komórek. Zmiany dotyczą jednakże większej liczby komórek glijowych: astrocytów i oligodendrocytów.

Grupa III. Obserwacje hodowli po podaniu kreatyniny w stężeniu 5 mg % do środowiska odżywczego, pozwalają na stwierdzenie zmian w strukturze komórek glijowych podobnych do opisanych w grupie z egzogennym mocznikiem. Zwiększenie stężenia kreatyniny do 10 mg % w środowisku wywołuje zmiany w większej ilości komórek glijowych. Natomiast charakter uszkodzeń raczej nie ulega zmianom. Najistotniejsze nieprawidłowości, stwierdzone w tej grupie doświadczalnej, dotyczą komórek glijowych. Oligodendrocyty charakteryzuje zwiększona ilość lizosomów i obecność licznych kul lipidowych (ryc. 12). Astrocyty ulegają obrzmieniu i zawierają liczne ziarna glikogenu tworzące agregaty w niektórych komórkach (ryc. 13). Neurony nie wykazują większych odchyłeń w porównaniu z grupą kontrolną. Jedynie mitochondria w niektórych spośród nich ulegają obrzmieniu. Wyraźne natomiast są zmiany w strukturze mieliny, polegające na poszerzeniu przestrzeni pomiędzy blaszkami. W aksoplazmie obecne są dobrze zachowane neurotubule (ryc. 14).

OMÓWIENIE

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe hodowli mózdzku poddanych działaniu surowicy chorych z zespołem mocznicowym, mocznika i kreatyniny w poszczególnych grupach doświadczalnych potwierdzają po-

Ryc. 5. Grupa I. Zmiany w budowie osłonki mielinowej, rozwarstwienie blaszek i częściowe zatarcie ich struktury; aksoplazma o niskiej gęstości elektronicznej z kłaczkowatym materiałem. Pow. 15 000 ×

Fig. 5. Group I. Structural changes in myelin sheath: splitting of lamellae and partial obliteration of lamellar structure; axoplasm of low electron density with flake-like material. × 15 000

Ryc. 6. Grupa I. Fragment oligodendrocytu z licznymi kroplami lipidowymi. Pow. 15 000 ×

Fig. 6. Group I. Fragment of oligodendrocyte with numerous lipid drops. × 15 000



przednie spostrzeżenia morfologiczne przedstawione w I części pracy (Kraśnicka 1977). Największe nasilenie zmian ultrastrukturalnych występuje w grupie z surowicą od chorych z zespołem mocznicowym. Obok zmian zwyrodnieniowych komórek glejowych obserwuje się tu wyraźne uszkodzenie neuronów polegające na obrzmieniu ich mitochondriów i destrukcji elementów aksoplazmy. Uszkodzenia mieliny obserwowane w mikroskopie świetlnym znajdują swój odpowiednik w obrazach mikroskopowo-elektronowych wszystkich trzech grup doświadczalnych. Uszkodzenie mieliny jest jednakże najwyraźniejsze w grupie z surowicą od chorych z zespołem mocznicowym.

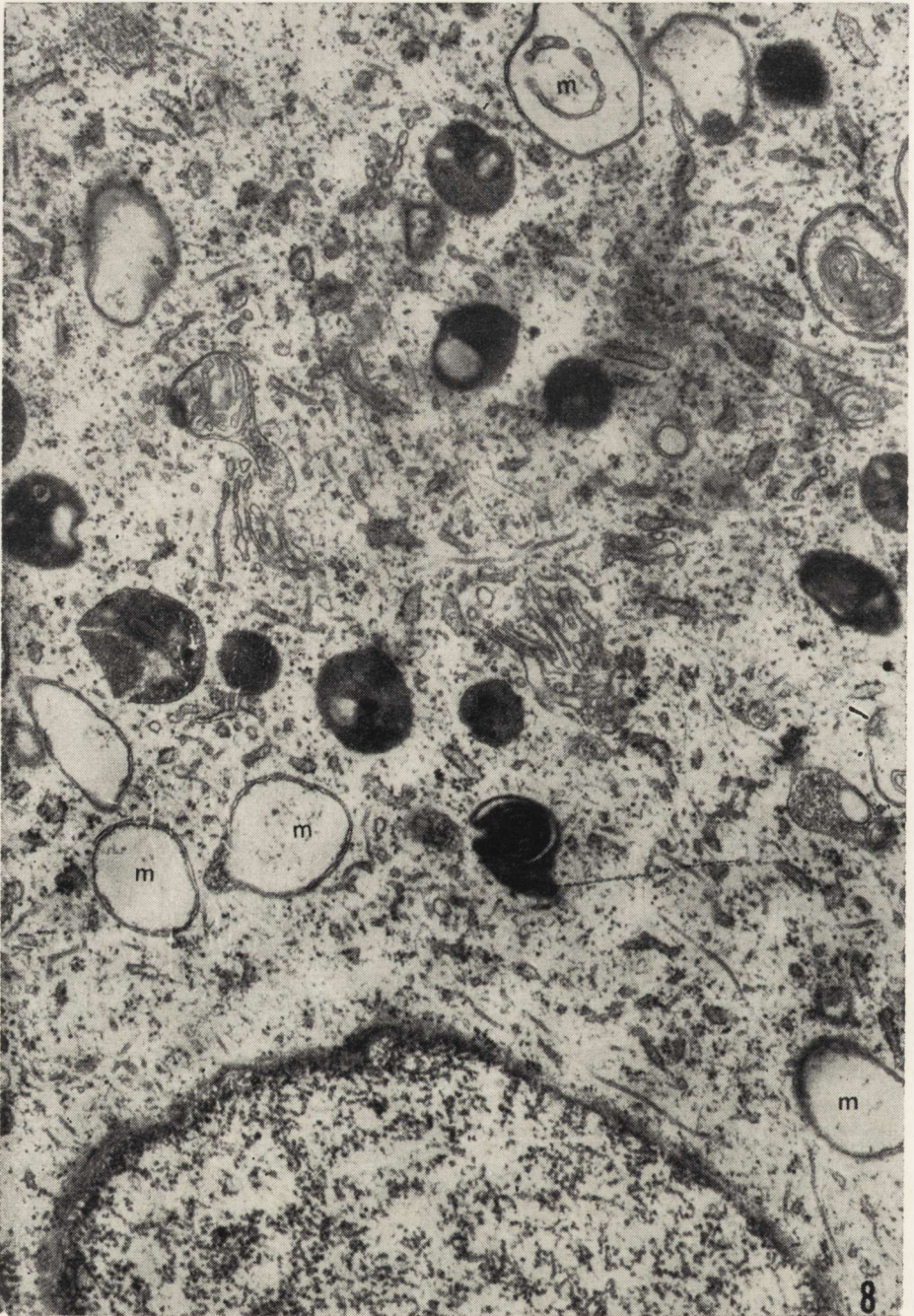
Podanie do tkanki nerwowej hodowanej *in vitro* pojedynczego czynnika patogennego, mocznika bądź kreatyniny wywołuje zmiany przede wszystkim w strukturze komórek glejowych. Nie obserwuje się natomiast zmian w mikrogleju. Obecność ziaren glikogenu w astrocytach, stwierdzona w grupie II (mocznik) i w grupie III (kreatynina), przemawia za mniejszym uszkodzeniem metabolicznym tkanki niż w grupie z surowicą od chorych z zespołem mocznicowym.

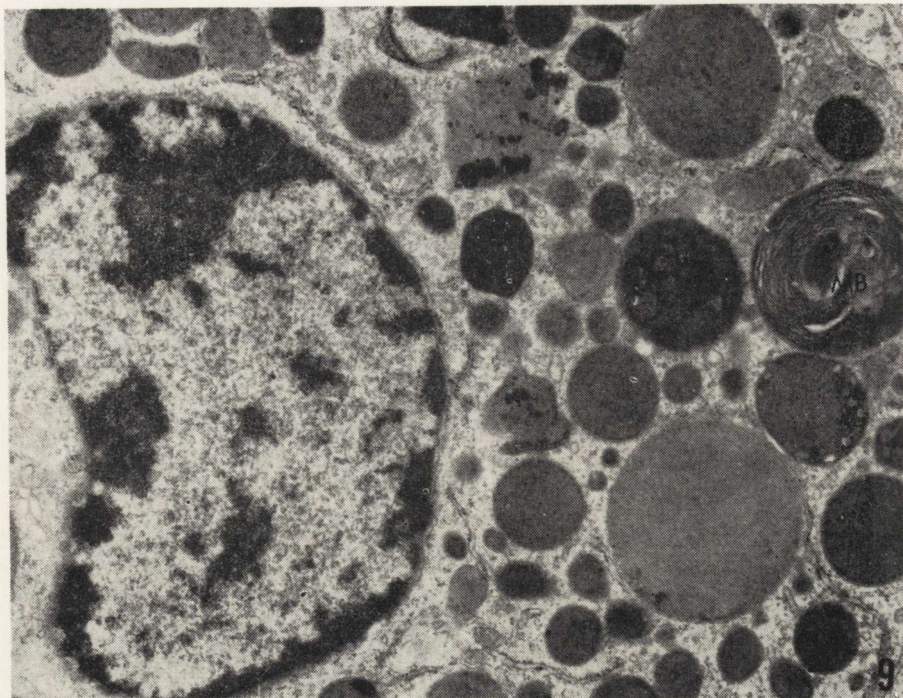
Badania mikroskopowo-elektronowe wskazują na odmienny charakter zmian zwyrodnieniowych w astro- i oligodendrogleju. Zróżnicowanie to daje się prześledzić we wszystkich grupach doświadczalnych, niezależnie od stężenia czynników patogennych. Oligodendrocyty obok zwiększenia ilości lizosomów wykazują nagromadzenie substancji lipidowych w cytoplazmie. W astrocytach występuje znaczne obrzmienie cytoplazmy z wybitnym poszerzeniem kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej.

Spostrzegana odrębność uszkodzenia astrocytów i oligodendrocytów nie ma charakteru swoistego dla toksyn mocznicowych. Podobne zmiany obserwowano po niedotlenieniu (Kraśnicka i wsp. 1973, 1976), po zatruciu tlenkiem węgla (Korthals i wsp. 1973) i w następstwie zatrucia cyjankami (Mossakowski, Gajkowska 1976). Wydaje się zatem, że rodzaj reakcji komórek glejowych na działanie czynników uszkadzających uzależniony jest przede wszystkim od typu komórki i od jej funkcji.

Ryc. 7. Grupa I. Fragment astrocytu. Bardzo znaczne poszerzenie kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej (ER) i rozwarstwienie zewnętrznej pochewki karyoplazmy (strzałki). Obrzmiałe mitochondria całkowicie pozbawione grzebieni (m). Pow. 27 000 ×

Fig. 7. Group I. Fragment of astrocyte. Very pronounced dilatation of the rough endoplasmic reticulum channels (ER) and splitting of external envelope of karyoplasm (arrows). Swollen mitochondria completely depleted of cristae (m). × 27 000





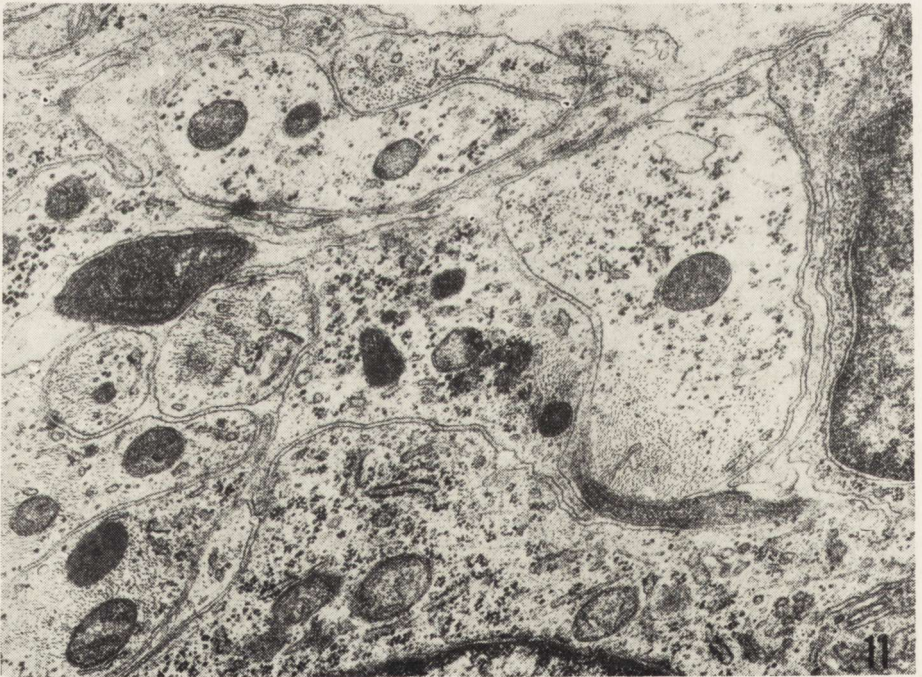
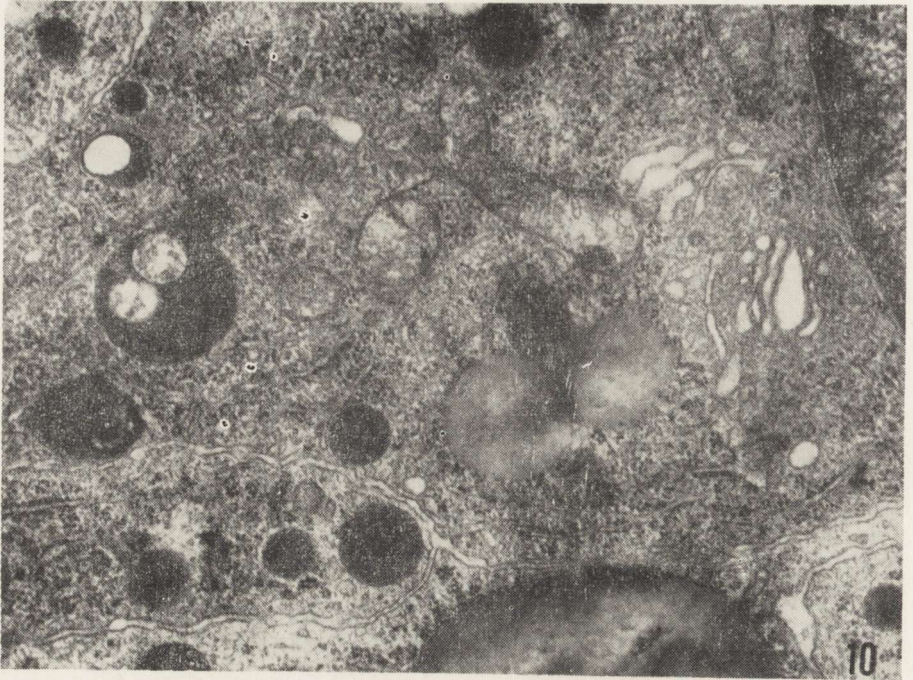
Ryc. 9. Grupa II. Fragment oligodendrocytu z licznymi lizosomami i kulami lipidowymi. MB — ciało wieloblaszkowe. Pow. 12 000 \times

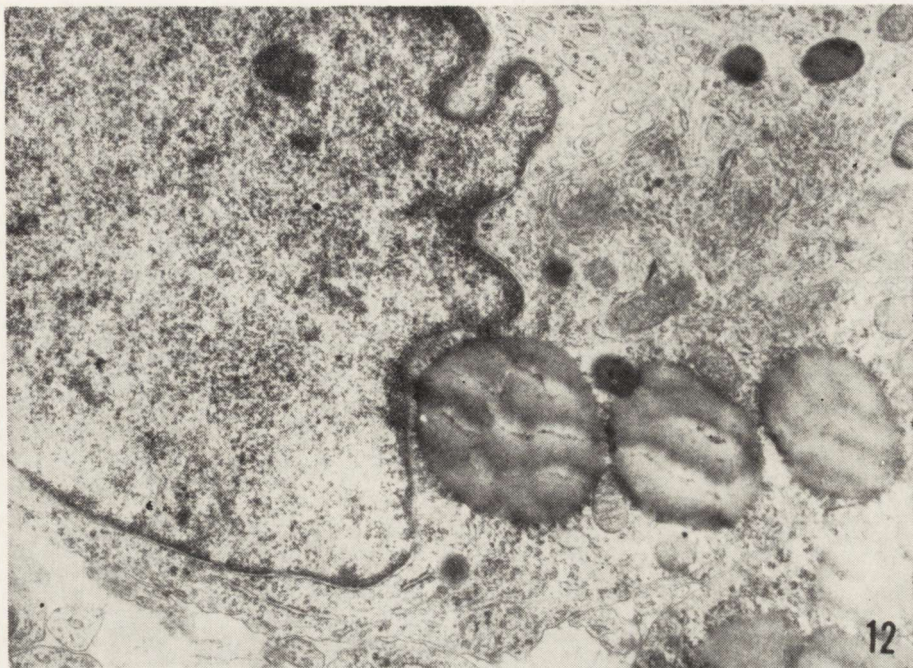
Fig. 9. Group II. Fragment of oligodendrocyte with numerous lysosomes and lipid bowls. MB — multilamellar body. \times 12 000

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy danych dotyczących zmian ultrastrukturalnych w mózgu w przebiegu mocznicy. Badano natomiast w mikroskopie elektronowym materiał biopsyjny z nerwów obwodowych od chorych z mocznicą. Zarówno Appenzeller i wsp. (1971) jak i Cervos-Navarro i wsp. (1974) wykazali podobny charakter uszkodzeń w wycinkach z nerwów obwodowych w przypadkach mocznicy. Zasadnicze zmiany polegały na odcinkowej demielinizacji, uszkodzeniu i zaniku aksonów, rozplemie komórek Schwanna oraz wzmożonej ilości glikogenu i ciał tłuszczowatych w ich cytoplazmie.

Ryc. 8. Grupa I. Fragment astrocytu z licznymi lizosomami; mitochondria obrzmiałe pozbawione grzebieni (m). Odcinkowo poszerzone zbiorniki aparatu Golgiego. Pow. 22 000 \times

Fig. 8. Group I. Fragment of astrocyte with numerous lysosomes. Swollen mitochondria depleted of cristae (m). Cisterns of Golgi apparatus dilatated in some fragments. \times 22 000





Ryc. 12. Grupa III. Fragment oligodendrocytu z kulami lipidowymi i drobnymi lizosomami w cytoplazmie. Pow. 10 000 \times

Fig. 12. Group III. Fragment of oligodendrocyte with lipid bowls and small lysosomes in cytoplasm. \times 10 000

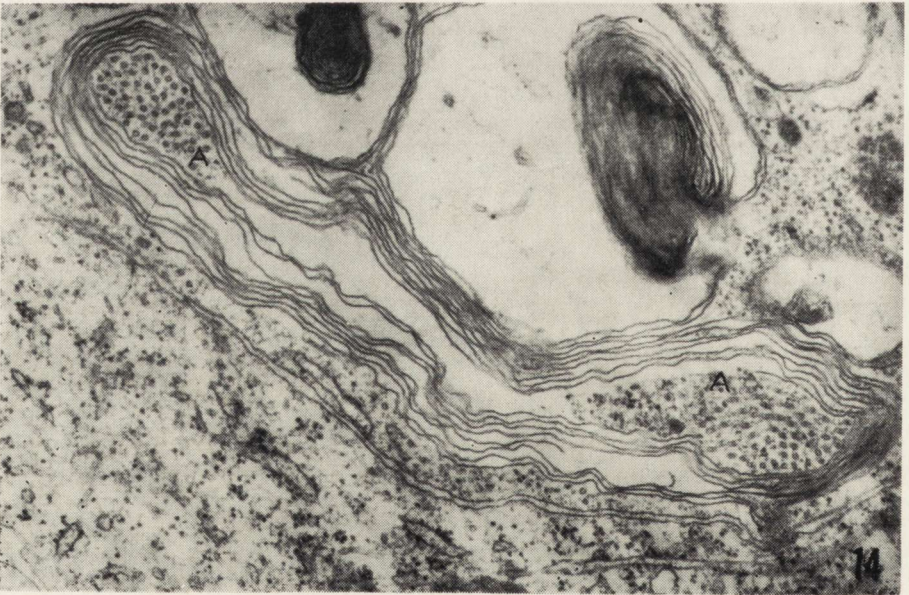
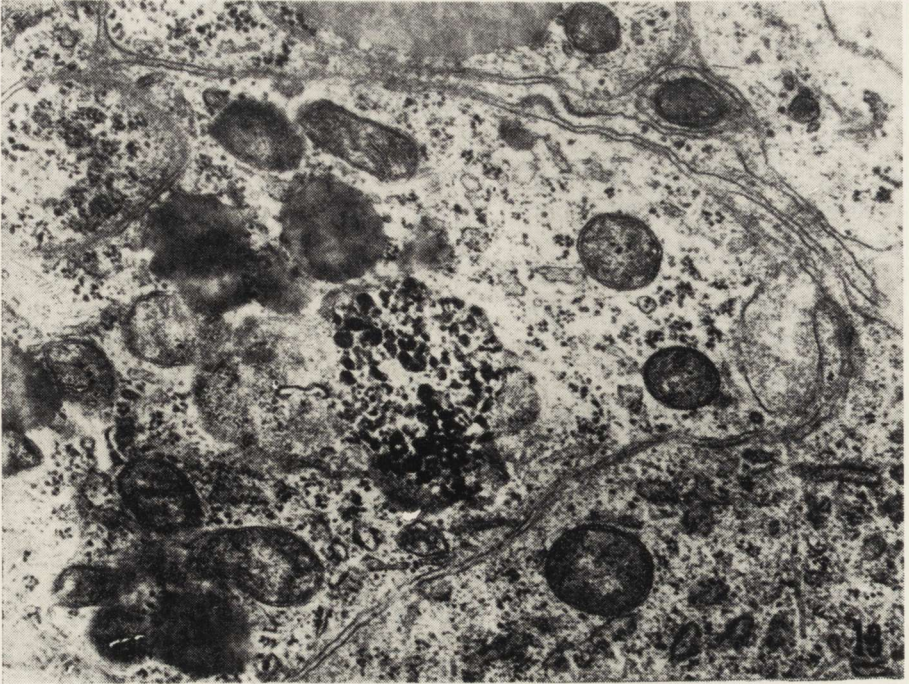
Uwzględniając zasadnicze różnice pomiędzy materiałem biopsyjnym i doświadczalnym pochodzącym z hodowli tkankowej, należy podkreślić podobny charakter zmian wywołanych przez czynniki toksyczne występujące w zespole mocznicowym. Istotne jest przede wszystkim podobieństwo w reakcji komórek odpowiedzialnych za mielinizację w układzie nerwowym obwodowym i ośrodkowym — komórek Schwanna i oligodendrocytów.

Ryc. 10. Grupa II. Fragment oligodendrocytu z licznymi lizosomami, kulami lipidowymi i poszerzonymi zbiornikami aparatu Golgiego. Pow. 14 000 \times

Fig. 10. Group II. Fragment of oligodendrocyte with numerous lysosomes, lipid bowls and dilated cisterns of Golgi apparatus. \times 14 000

Ryc. 11. Fragment hodowli z grupy II. Obrzmiałe wypustki astrocytów z obfitymi ziarnami glikogenu. Pow. 13 000 \times

Fig. 11. Fragment of culture of group II. Swollen astrocytic processes with abundant glycogen grains. \times 13 000



З. Красьницка, К. Ольшевска, Е. Борович

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ С УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ,
МОЧЕВИНЫ И КРЕАТИНИНА
НА ОРГАНОТИПИЧЕСКУЮ КУЛЬТУРУ НЕРВНОЙ ТКАНИ

II. Электронномикроскопические исследования

Резюме

Электронномикроскопические исследования культур, подвергнутых действию сыворотки больных с уремическим синдромом, мочевины и креатинина, подтверждают предыдущие морфологические наблюдения, представленные в I части работы.

Наибольшая интенсивность ультраструктурных изменений установлена после введения сыворотки больных. В этой группе наблюдаются изменения в нейронах, заключающиеся в набухании митохондрий и деструкции аксоплазмы. Дегенеративные изменения глиозных клеток и повреждение структуры миелина наблюдаются во всех опытных группах, причем интенсивность этих симптомов наибольшая в группе I.

Электронномикроскопические наблюдения подтвердили иной характер дегенеративных изменений в астроцитах и в олигодендроцитах. Астроциты обнаруживают склонность к набуханию цитоплазмы и расширению каналов эндоплазматической сети, а олигодендроциты накапливают чрезмерные количества жировых веществ.

Z. Kraśnicka, K. Olszewska, J. Borowicz

EFFECT OF SERUM FROM PATIENTS WITH UREMIC SYNDROME, UREA
AND CREATININE ON ORGANOTYPIC NERVE TISSUE CULTURE

II. Electron microscopic studies

Summary

Electron-microscopic studies on a culture subjected to the action of serum from uremic patients, urea and creatinine confirmed previous morphological findings presented in part I of the work.

The most pronounced ultrastructural changes followed the administration of serum. The changes in this group included swelling of mitochondria and destruction of axoplasm in neurons. Degenerative changes in glial cells and myelin

Ryc. 13. Grupa III. Nagromadzenie ziaren glikogenu w wypustce astrogleju. Pow. 16 000 ×

Fig. 13. Group III. Accumulation of glycogen grains in astroglial process. × 16 000

Ryc. 14. Grupa III. Uszkodzona wypustka osiowa. Rozwarstwienie blaszek mieliny. W aksoplazmie (A) widoczne neurotubule. Pow. 18 000 ×

Fig. 14. Group III. Damaged axon and splitting of myelin lamellae. Neurotubules in axoplasm (A). × 18 000

damage could be observed in all the experimental groups, but were most intensive in group I.

Electron-microscopic observations confirmed a different character of degenerative changes in astrocytes and oligodendrocytes. Astrocytes showed a tendency to swelling of cytoplasm and dilatation of the rough endoplasmic reticulum channels, while oligodendrocytes accumulated an excess of lipid substances.

PIŚMIENNICTWO

1. Appenzeller O., Kornfeld M., Mac Gee J.: Neuropathy in chronic renal disease. A microscopic, ultrastructural and biochemical study of sural nerve biopsis. *Arch. Neurol.* 1971, 24, 449—461.
2. Cervos-Navarro J., Matakas F., Stoltenburg G.: Elektronenmikroskop'sche Untersuchungen in urämischen Neuropathie. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 291—298.
3. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 315—322.
4. Kraśnicka Z., Renkawek K., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz ultrastrukturalny komórek glejowych hodowanych in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 398—404.
5. Kraśnicka Z., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Effect of short-lasting anoxia on in vitro culture of cerebellum. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 11—22.
6. Kraśnicka Z.: Wpływ surowicy od chorych z zespołem mocznicowym, mocznika i kreatyniny na organotypową hodowlę tkanki nerwowej. I. Badania w mikroskopie świetlnym. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 328—339.
7. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 441—449.

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

LUBOMIRA DYDYK, WOJCIECH HILGIER, MIECZYŚLAW JUSTYNA,
MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ
W MITOCHONDRIACH MÓZGU NOWORODKA KRÓLIKA
PO NARKOZIE HALOTANOWEJ

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik Pracowni: doc. dr med. M. Dąmbaska

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

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

Oddział Anestezjologii i Reanimacji Instytutu Gruźlicy

Kierownik Oddziału: doc. dr med. M. Justyna

Eogate piśmiennictwo poświęcone wpływowi halotanu na ustrój żywy dotyczy głównie jego działania hepatotoksycznego. Liczba prac na temat zmian biochemicznych i zaburzeń czynnościowych stwierdzanych pod wpływem halotanu w ośrodkowym układzie nerwowym jest stosunkowo niewielka (Cohen i wsp. 1964; Clark, Rosner 1973; Cohen 1973; Fink, Haschke 1973; Rosenberg, Haugaard 1973; Smith A.L. 1973; Smith A.L. i wsp. 1973; Smith H. 1973), a prace omawiające zmiany ultrastrukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym zwierząt poddanych działaniu halotanu należą do rzadkości (Chang i wsp. 1974).

Powszechne stosowanie narkozy halotanowej w klinice dziecięcej, ubóstwo piśmiennictwa na temat działania halotanu na ustrój niedojrzały i różnice w reakcji mózgu dojrzałego i dojrzewającego po zadziałaniu tego samego czynnika, skłoniły nas do zbadania wpływu halotanu na mózg w okresie rozwoju.

Bezpośrednim celem pracy było określenie aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondriach półkul mózgu noworodków króliczych poddanych jednorazowej i dwukrotnej narkozie halotanowej.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 83 noworodkach króliczych, z których 19 użyto do ustalenia dawki narkotycznej halotanu, 21 służyło do doświadczeń.

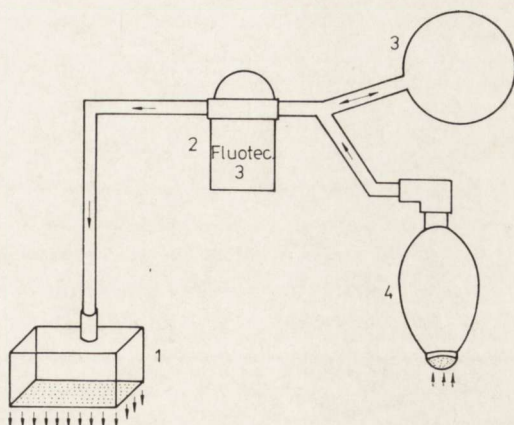
a pozostałe 43 stanowiły materiał kontrolny i służyły do określenia aktywności oksydazy cytochromowej w warunkach prawidłowych.

Dla ustalenia dawki narkotycznej halotanu wykonano dwa rodzaje doświadczeń: ze stężeniem par halotanu w komorze — 0,3—0,5% i ze stężeniem — 0,2—0,3%.

Noworodki królicze poddane w pierwszym dniu życia jednogodzinnemu działaniu 0,3—0,5% halotanu padły, natomiast poddane jednogodzinnemu działaniu 0,2—0,3% halotanu, przeżyły narkozę bez objawów chorobowych. Dawkę 0,2—0,3% przyjęto jako dawkę narkotyczną halotanu.

Zwierzęta doświadczalne podzielono na dwie grupy. W pierwszej grupie — noworodki królicze poddawano narkozie halotanowej (0,2—0,3%) w pierwszym dniu życia przez 60 minut. W drugiej grupie — narkozę halotanową (0,2—0,3%) powtarzano dwukrotnie — w pierwszym dniu życia przez 60 minut i w czwartym dniu życia przez 30 minut.

Znieczulanie królików przeprowadzano przy pomocy specjalnie zbudowanego obwodu znieczuleniowego, działającego na zasadzie metody otwartej znieczulenia wziewnego z jednokierunkowym przepływem powietrza. Ogólny układ urządzenia przedstawia załączony schemat (ryc. 1). W skład urządzenia znieczulającego wchodziły: komora znieczuleniowa (1); parownik procentowy do halotanu Fluotec Mark 3 (2); worek rezerwowy na powietrze (3) i zmodyfikowany (z jednokierunkowymi zastawkami) worek oddechowy typu „Ambu” (4). Pojemność komory wynosiła 1 litr. Dno komory było równomiernie perforowane otworami o średnicy 3 mm. W środku pokrywy znajdował się otwór wpustowy, przez który wchodziło do komory powietrze wraz z parami halotanu z szybkością 1,5—2 litra na minutę, wychodząc przez perforowane dno komory do otaczającej atmosfery. W ten sposób w komorze został zapewniony jednokierunkowy przepływ powietrza wraz z określonym przez parownik stężeniem par halotanu, bez gromadzenia się dwutlenku węgla, który jako cięższy od powietrza wychodził na zewnątrz przez otwory w dnie komory. Szybkość przepływu powietrza przez komorę (1,5—2 l/min) określono na modelu próbnym posługując się przepływomierzem tlenowym. Wtłaczanie powietrza do worka rezerwowego używano przez ręczny ucisk worka typu „Ambu”, którego zastawka wydechowa została zatkana szczelną przykrywką gumową. W ten sposób wypływ zwrotny z worka typu „Ambu” został zamknięty, a worek rezerwowy był stale wypełniony powietrzem w ilości około 5 litrów, dając ciągły przepływ powietrza przez parownik halotanowy, a następnie przez komorę znieczuleniową.



Ryc. 1. Zestaw do narkozy halotanowej używany do doświadczeń. Komora znieczuleniowa (1); parownik (2); worek rezerwowy na powietrze (3); worek Ambu (4).

Fig. 1. Equipment for halothane anesthesia used in experiments. Chamber for anesthesia (1); vaporizer (2); air deposit bag (3); Ambu bag (4).

Materiał do badań w pierwszej grupie doświadczalnej pobierano bezpośrednio i w 24 godziny po jednorazowej narkozie, natomiast w drugiej grupie — bezpośrednio i w 24 godziny po powtórnej narkozie,

Aktywność oksydazy cytochromowej badano w mitochondriach półkuła mózgu. Tkanekę homogenizowano w roztworze 0,32 M sacharozy w buforze Tris-HCl, pH 7,0. Homogenat wirowano dwukrotnie 10 minut \times \times 900 g. Nadsącz wirowano przez 20 minut \times 10 000 g. Otrzymany osad zawieszano w roztworze 0,32 M sacharozy i nakładano na 0,8 M (pH 7,0) sacharozę, a następnie wirowano przez 30 minut \times 54 000 g. Wszystkie czynności wykonywano w temperaturze $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (Gray, Whittaker, 1962). Swoistą aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach badano przy użyciu spektrofotometru Specord z rejestratorem, metodą Smitha i Stotza (1949). Środowisko inkubacyjne zawierało: cytochrom C 0,001 M; 2,6-dwuchlorofenolindofenol — 6 mg%; bufor fosforanowy 0,07 M, (pH 7,0). Białko mitochondrialne oznaczano metodą Lowry i wsp. (1961). Aktywność oksydazy cytochromowej wyrażono zużyciem tlenu w $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{min}/\text{mg}$ białka. Dodatkowo wykonano badanie przy użyciu malonianu w celu hamowania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, która w tym układzie, w związku z obecnością endogennego bursztynianu, mogłaby zwiększać zużycie tlenu. Badanie to wykonane przy użyciu podwójnego stężenia malonianu według stałej inhibicji reakcji (K_i), nie wykazało równoczesnego zużycia tlenu przez układ dehydrogenazy bursztynianowej. Obliczenia statystyczne wykonano według wzoru Studenta.

WYNIKI

Wyniki badań aktywności oksydazy cytochromowej w półkulach mózgu królika przedstawiono w tabeli 1 i na ryc. 2 i 3.

Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika w pierwszych dziesięciu dniach życia, w normie, przedstawia tabela 1 i ryc. 2.

W pierwszym dniu życia, w normie, aktywność enzymu jest najniższa i wynosi $100,3 \mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{min}/\text{mg}$ białka. W drugim dniu życia wzrasta o 269,09% w stosunku do pierwszego dnia i jest wyższa o 83,44% w stosunku do trzeciego dnia. W czwartym dniu aktywność oksydazy cytochromowej obniża się o 37,77% w stosunku do trzeciego dnia i jest niższa o 47,56% w stosunku do piątego dnia. W dziesiątym dniu życia królika aktywność oksydazy cytochromowej wykazuje wzrost o 111,73% w stosunku do piątego dnia.

Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika po narkozie halotanowej przedstawia tabela 1 i ryc. 3.

Bezpośrednio po jednorazowej narkozie halotanowej stwierdza się wzrost aktywności oksydazy cytochromowej o 101,69% w stosunku do kontroli. (W naszych badaniach kontrola odpowiada normie).

W dwudziestej czwartej godzinie po jednorazowej narkozie halotanowej zaznacza się spadek aktywności oksydazy cytochromowej o 48,47% w stosunku do kontroli.

Bezpośrednio po powtórnej narkozie halotanowej stwierdza się spadek aktywności oksydazy cytochromowej o 22,54% w stosunku do kontroli.

W dwudziestej czwartej godzinie po powtórnej narkozie halotanowej zaznacza się dalszy spadek aktywności oksydazy cytochromowej o 49,44% w stosunku do kontroli.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika poddanego działaniu narkozy halotanowej wymagają omówienia na tle zmian aktywności enzymu występujących w czasie rozwoju mózgu.

Wśród wyników uzyskanych w normie na szczególną uwagę zasługuje znaczny wzrost aktywności enzymu w drugim dniu życia, w porównaniu z jego aktywnością w pierwszym, trzecim i czwartym dniu. Szczytowy wzrost aktywności oksydazy cytochromowej w drugim dniu życia, jest związany prawdopodobnie z dojrzewaniem mózgu i wykształcaniem białkowych układów enzymatycznych. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga przeprowadzenia oddzielnych badań.

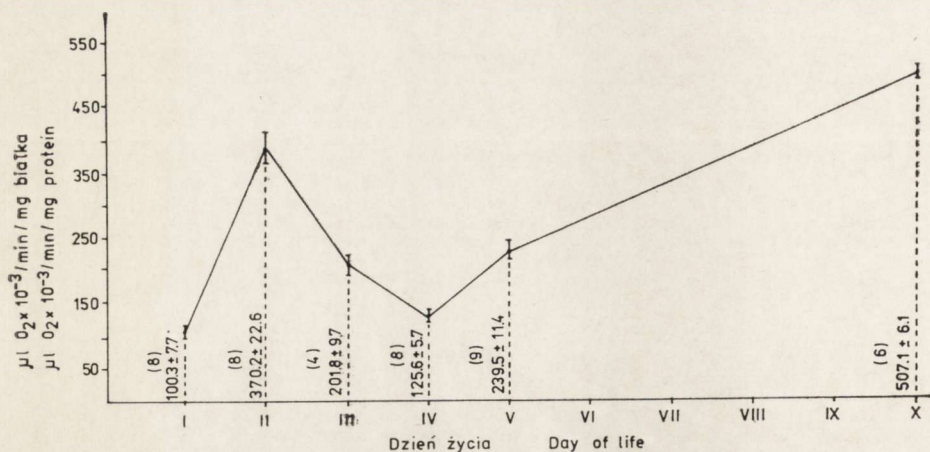
Tabela 1. Aktywność oksydazy cytochromowej ($\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{min} / \text{mg}$ białka) w mitochondriach półkul mózgu królika po narkozie halotanowej
 Table 1. Cytochrome oxidase activity ($\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{min} / \text{mg}$ protein) in mitochondria of the rabbit brain following halothane anaesthesia

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Jednorazowa narkoza (w 1 dniu życia) Single anaesthesia (in the 1st day of life)				Dwukrotna narkoza (w 1 i 4 dniu życia) Twice repeated anaesthesia (in the 1st and on the 4th days of life)			
	Wiek i czas przeżycia Age and time of survival		2 dzień życia 24 godziny po narkozie		4 dzień życia bezpośrednio po narkozie		5 dzień życia) 24 godziny po narkozie	
Grupa Group	1st day of life directly after anaesthesia		2nd day of life 24 hrs after anaesthesia		4th day of life directly after anaesthesia		5th day of life 24 hrs after anaesthesia	
Grupa doświadczalna Experimental group	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (5)n 202,3 \pm 12,1	P $\leq 0,001$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (5)n 190,8 \pm 27,0	P $\leq 0,05$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (4)n 97,3 \pm 10,7	P $\leq 0,05$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (8)n 121,1 \pm 12,5	P $\leq 0,01$
Grupa kontrolna Control group	(8)n 100,3 \pm 7,7		(8)n 370,2 \pm 22,6		(8)n 125,6 \pm 5,7		(9)n 239,5 \pm 11,4	

()n — liczba zwierząt
number of animals

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ — średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej
arithmetic mean \pm standard error of the mean

P — prawdopodobieństwo wg wzoru Studenta
probability calculated by the t-Student's test



(n) - liczba zwierząt

number of animals

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

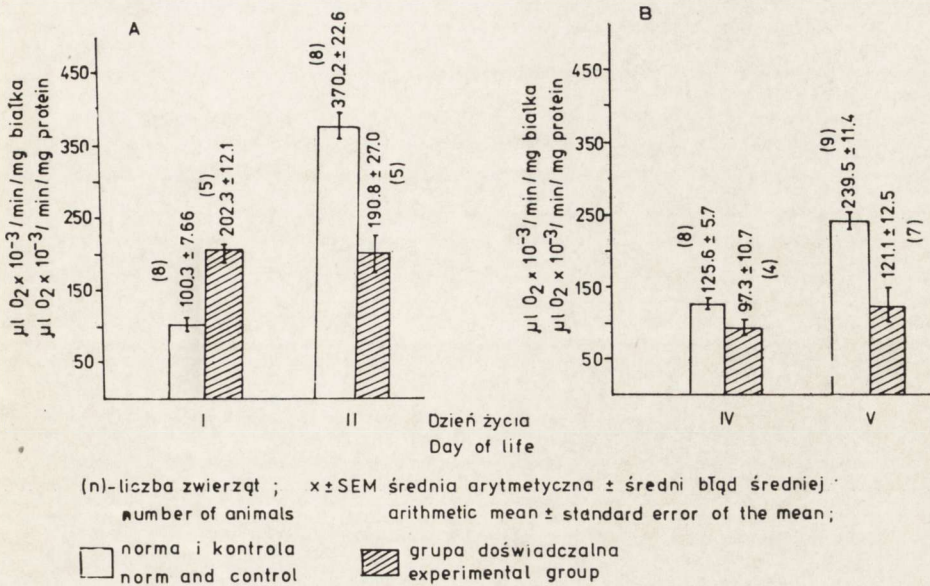
arithmetic mean \pm standard error of the mean

Ryc. 2. Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika w warunkach prawidłowych.

Fig. 2. Cytochrome oxidase activity in mitochondria of rabbit brain in normal conditions.

W grupie doświadczalnej, w pierwszym dniu życia, bezpośrednio po jednorazowej narkozie stwierdzono dwukrotny wzrost aktywności oksydazy cytochromowej w stosunku do wartości stwierdzanej w kontroli. W dwudziestej czwartej godzinie po jednorazowej narkozie, aktywność enzymu ulegała obniżeniu do około 50% w porównaniu z kontrolą. W czwartym dniu, bezpośrednio po powtórnej narkozie, zaznaczało się w stosunku do kontroli znamienne statystycznie obniżenie aktywności enzymu. W dwudziestej czwartej godzinie po powtórnej narkozie halotanowej, podobnie jak w dwudziestej czwartej godzinie po jednorazowej narkozie, obserwowano obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej do około 50% w porównaniu z kontrolą.

Badania Cohena (1973), Rosenberga i Haugaarda (1973) oraz Smitha (1973) wykazały odwracalny, hamujący wpływ narkozy halotanowej na oksydacyjną fosforylację w mitochondriach komórek nerwowych mózgu. Cohen i wsp. (1964), Hoech i wsp. (1966) i Theye i Michenfelder (1968) stwierdzili, że mózg człowieka w czasie narkozy halotanowej i skrawki mózgowe poddawane działaniu halotanu zużywają mniej tlenu w porównaniu z materiałem kontrolnym. Śmiałek i Hamberger (1970) badając wpływ umiarkowanej hipoksji i ischemii na aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach komórek nerwowych i glejowych mózgu dorosłego królika wykazali, że umiarkowane niedotlenienie mózgu powoduje wzrost aktywności tego enzymu.



Ryc. 3. A. Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika bezpośrednio i w 24 godziny po jednorazowej narkozie halotanowej w pierwszym dniu życia. B. Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika bezpośrednio i w 24 godziny po narkozie halotanowej powtórzonej w czwartym dniu życia.

Fig. 3. A. Cytochrome oxidase activity in mitochondria of the rabbit brain directly and 24 hrs after single halothane anesthesia in the 1st day of life. B. Cytochrome oxidase activity in mitochondria of the rabbit brain directly and 24 hrs after halothane anesthesia repeated on the 4th day of life.

W zestawieniu z powyższymi pracami wyniki naszych badań sugerują, że zmiany aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu królika poddanego narkozie halotanowej, są związane z niedotlenieniem mózgu.

W prowadzonych badaniach, jednorazowa narkoza halotanowa była stosowana w pierwszym dniu życia, w którym metabolizm beztlenowy przechodzi stopniowo w metabolizm tlenowy i w którym zapotrzebowanie tlenowe mózgu jest niskie. W związku z tym, narkoza halotanowa stosowana w pierwszym dniu życia prowadzi do umiarkowanego niedotlenienia mózgu, co może być przyczyną wzrostu aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondriach komórek nerwowych i glejowych mózgu.

Badanie aktywności oksydazy cytochromowej wykonane w drugim dniu życia, po jednorazowej narkozie halotanowej i wykonane w czwartym i piątym dniu życia, po powtórnej narkozie, wykazało obniżenie aktywności enzymu. Można to tłumaczyć większym zapotrzebowaniem

tlenowym mózgu w tych dniach w porównaniu z pierwszym dniem życia i w związku z tym większym stopniem niedotlenienia mózgu spowodowanym przez narkozę halotanową.

Obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondriach półkul mózgu królika stwierdzane w dwudziestej czwartej godzinie po jednorazowej i powtórnej narkozie halotanowej sugeruje utrzymywanie się zmian w funkcji i strukturze mitochondriów. Przypuszczenie to znajduje poparcie w wynikach badań ultrastrukturalnych Changa i wsp. (1974), którzy po przewlekłym stosowaniu halotanu u dorosłych szczurów, stwierdzili zmiany zwyrodnieniowe w dużej liczbie mitochondriów komórek nerwowych kory mózgu tych zwierząt.

Л. Дыдык, В. Хилгер, М. Юстына, М. Смялек

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА НОВОРОЖДЕННОГО КРОЛИКА ПОСЛЕ ГАЛОТАНОВОГО НАРКОЗА

Резюме

Целью работы было определение активности цитохромоксидазы в митохондриях мозговых полушарий новорожденных кроликов, подвергнутых галотановому наркозу. Работа выполнена на 83 новорожденных кроликах. Животных подвергали галотановому наркозу (0,2—0,3%) одно- или двукратно. Специфическую активность цитохромоксидазы в митохондриях нервных и глиозных клеток мозговых полушарий исследовали спектрофотометрическим методом Смита и Стотца. Полученные результаты выявили возрастание активности цитохромоксидазы в первый день жизни непосредственно после однократного галотанового наркоза и снижение активности фермента через 24 часа после наркоза. Снижение активности цитохромоксидазы обнаружено также на 4-й день жизни непосредственно после второго галотанового наркоза, а также через 24 часа после второго наркоза. Обнаруженные изменения активности цитохромоксидазы в митохондриях нервных и глиозных клеток больших полушарий мозга кролика являются следствием гипоксии мозга, вызванной галотаном. Нарушения функции митохондрий, вызванные наркозом, сохраняются на протяжении по крайней мере 24 часов.

L. Dydyk, W. Hilgier, M. Justyna, M. Śmiałek

CYTOCHROME OXIDASE ACTIVITY IN NEWBORN RABBIT BRAIN MITOCHONDRIA AFTER HALOTHANE ANESTHESIA

Summary

The cytochrome oxidase activity was determined in mitochondria of cerebral hemispheres of 83 newborn rabbits subjected to single or two times repeated anesthesia with 0.2—0.3% halothane. The activity was measured using the spectrophotometric method of Smith and Stotz. Following single anesthesia in the first day of life, an increase of the enzyme activity was observed directly after exposure and a decrease 24 hrs later. A drop in the enzyme activity was also

noted in the 4th day of life, directly and 24 hrs after the second anesthetic treatment. The changes in the cytochrome oxidase activity of brain mitochondria result from brain hypoxia produced by halothane. Disturbances of mitochondrial function caused by anesthesia persist for at least 24 hrs.

PIŚMIENICTWO

1. Chang L. W., Dudley A. W., Young K. L., Katz J.: Ultrastructural changes in the nervous system after chronic exposure to halothane. *Exp. Neurology*, 1974, 45, 209—219.
2. Clark D. L., Rosner B. S.: Neurophysiologic effects of general anesthetics. *Anesthesiology*, 1973, 38, 564—582.
3. Cohen P. J., Wollman H., Alexander S. C., Chase P. E., Behar M. G.: Cerebral carbohydrate metabolism in man during halothane anesthesia. *Anesthesiology*, 1964, 25, 185—191.
4. Cohen P. J.: Effect of anesthetics on mitochondrial function. *Anesthesiology*, 1973, 39, 153—164.
5. Fink B. R., Haschke R. H.: Anesthetic effects on cerebral metabolism. *Anesthesiology*, 1973, 39, 199—215.
6. Gray E. G., Whitteaker V. P.: The isolation of nerve endings from brain. An electron microscopic study of cell fragments derived by centrifugation. *J. Anat. (Lond.)*, 1962, 96, 79—88.
7. Hoech G. P., Matheo R. F., Fink B. R.: Effect of halothane on oxygen consumption of rat brain, liver and heart and anaerobic glycolysis of rat brain. *Anesthesiology*, 1966, 27, 770—777.
8. Lowry C. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1961, 193, 265—270.
9. Rosenberg H., Haugaard N.: The effect of halothane on metabolism and calcium uptake in mitochondria of the rat liver and brain. *Anesthesiology*, 1973, 39, 44—53.
10. Smith F. G., Stotz E.: A colorimetric method for the determination of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 891—902.
11. Smith A. L.: The mechanism of cerebral vasodilation by halothane. *Anesthesiology*, 1973, 39, 581—587.
12. Smith A. L., Larson J. R., Hoff J. T.: Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology*, 1973, 39, 377—381.
13. Smith H.: Effect of halothane upon rabbit brain mitochondria. *Biochemical Pharmacol.*, 1973, 22, 773—781.
14. Śmiałek M., Hamberger A.: The effect of moderate hypoxia and ischemia on cytochrome oxidase activity and protein synthesis in brain mitochondria. *Brain Res.*, 1970, 17, 369—371.
15. Theye R. A., Michenfelder J. D.: The effect of halothane on canine cerebral metabolism. *Anesthesiology*, 1968, 29, 1113—1118.

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

JERZY W. BOROWICZ, AGNES DANIELEWICZ, ANDRZEJ LOESCH,
BOGNA SCHMIDT-SIDOR

ULTRASTRUKTURA KOMÓRKI GWIAŹDZIAKA *)

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Pracowni: doc. dr J. W. Borowicz
Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego
Kierownik Zakładu: prof. dr J. Dymecki

Nowotwory z grupy gwiaździaków charakteryzują się dużą różnorodnością morfologiczną. Badania mikroskopowo-elektronowe tego typu nowotworów są nieliczne. Do podstawowych opracowań na ten temat należą prace Luse (1960), Raimondi i wsp. (1962), Duffel i wsp. (1963), Gullotta i Fliedner (1972) oraz Sipe i wsp. (1973).

W niniejszej pracy oceniono w mikroskopie elektronowym sześć gwiaździaków o różnej kwalifikacji histopatologicznej. Wszystkie przypadki pochodziły z Kliniki Neurochirurgii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie i dotyczyły dzieci w wieku od 16 miesięcy do 14 lat. Rozpoznanie histopatologiczne ustalono w Zakładzie Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie.

Celem badań było poznanie ultrastruktury komórek gwiaździaka u dzieci.

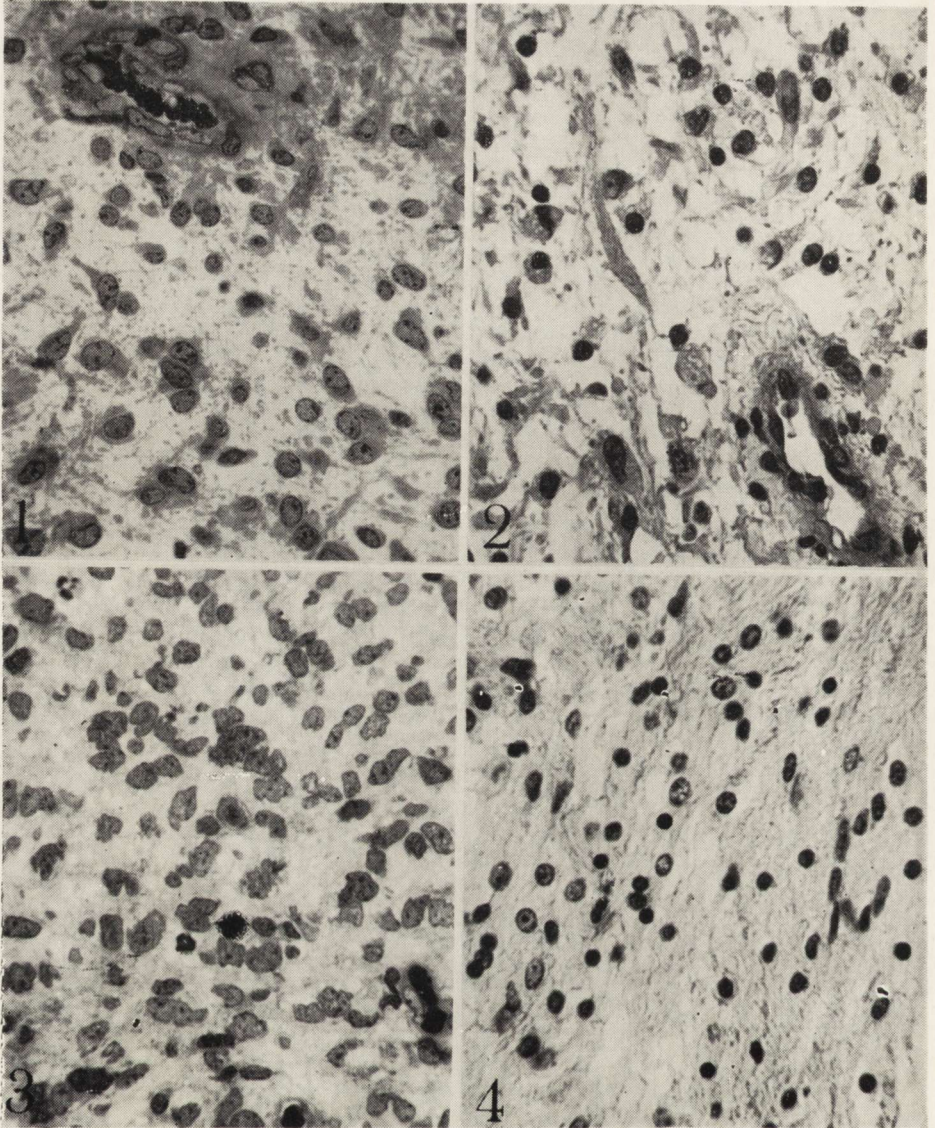
MATERIAŁ I METODY

Przedstawiona praca stanowi wyłącznie morfologiczny opis mikroskopowo-elektronowy gwiaździaków, w związku z czym, pominięto całkowicie dane kliniczne dotyczące poszczególnych przypadków.

Materiał do badań w mikroskopie elektronowym pobierano w czasie zabiegu operacyjnego. Wycinki utrwalono w 2% aldehydzie glutarowym i 1% OsO₄, odwodniono w alkoholach i zatopiono w Eponie 812.

Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

* Praca wykonana w ramach planu PR 6.15



Ryc. 1. Gwiaździak włóknienkowy. Skrawek eponowy. Błękit toluidyny. Pow. 700 ×
 Fig. 1. Fibrillary astrocytoma. Semi-thin section. Toluidine blue. × 700

Ryc. 2. Gwiaździak protoplazmatyczny. Skrawek parafinowy. H-E. Pow. 700 ×
 Fig. 2. Protoplasmic astrocytoma. Paraffin section. H-E. × 700

Ryc. 3. Gwiaździak częściowo anaplastyczny. Skrawek eponowy. Błękit toluidyny.
 Pow. 700 ×

Fig. 3. Astrocytoma partim anaplasticum. Semi-thin section. Toluidine blue. × 700

Ryc. 4. Gwiaździak włosopodobny mózdzku. Skrawek parafinowy. H-E. Pow. 700 ×
 Fig. 4. Pilocoid astrocytoma. Paraffin section. H-E. × 700

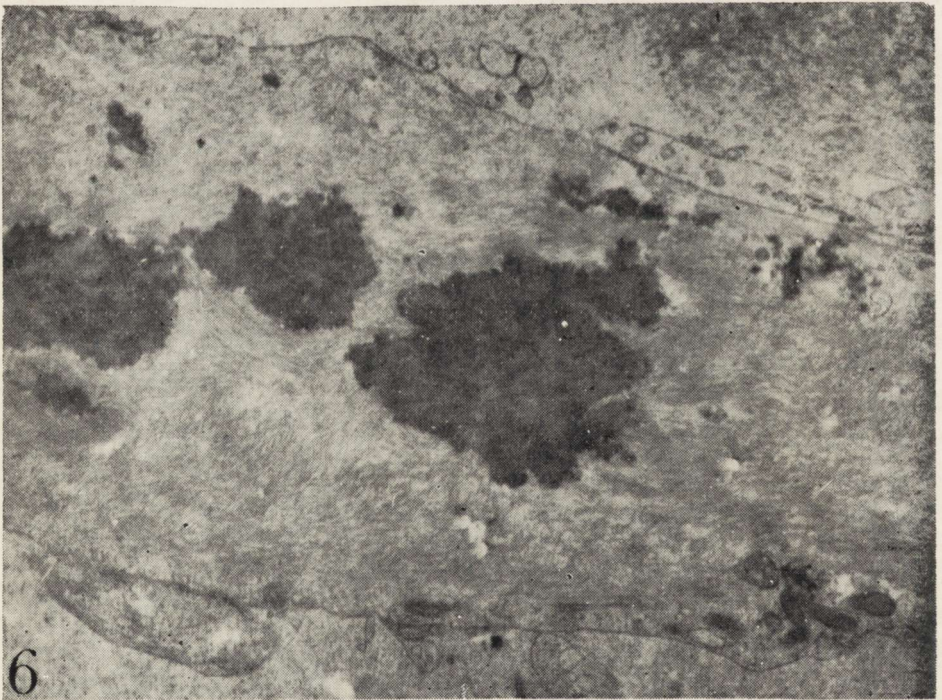
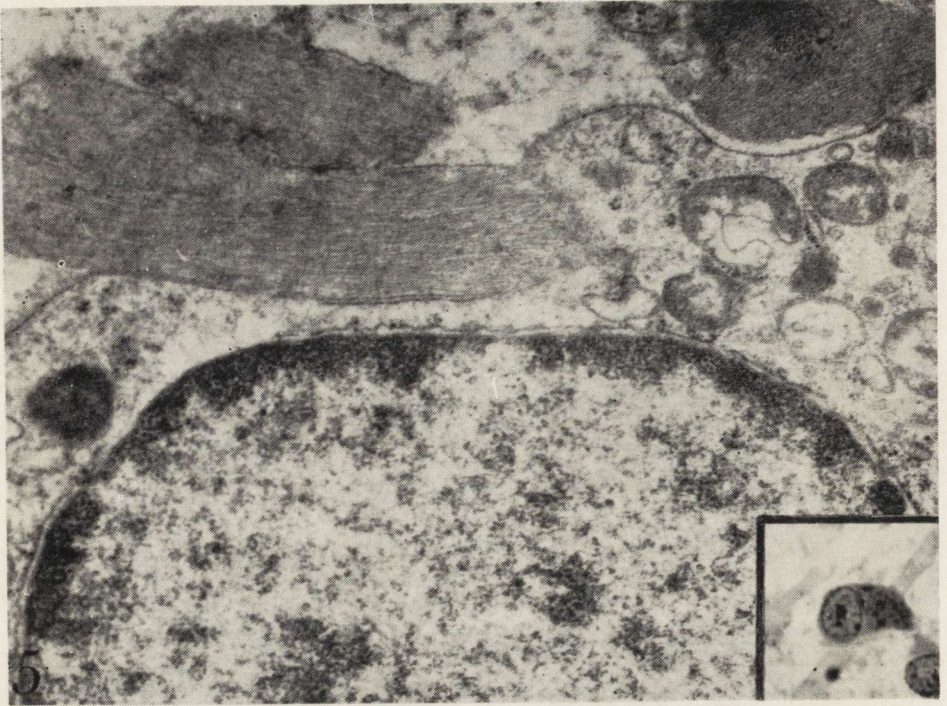
Tabela I. Zestawienie badanych przypadków

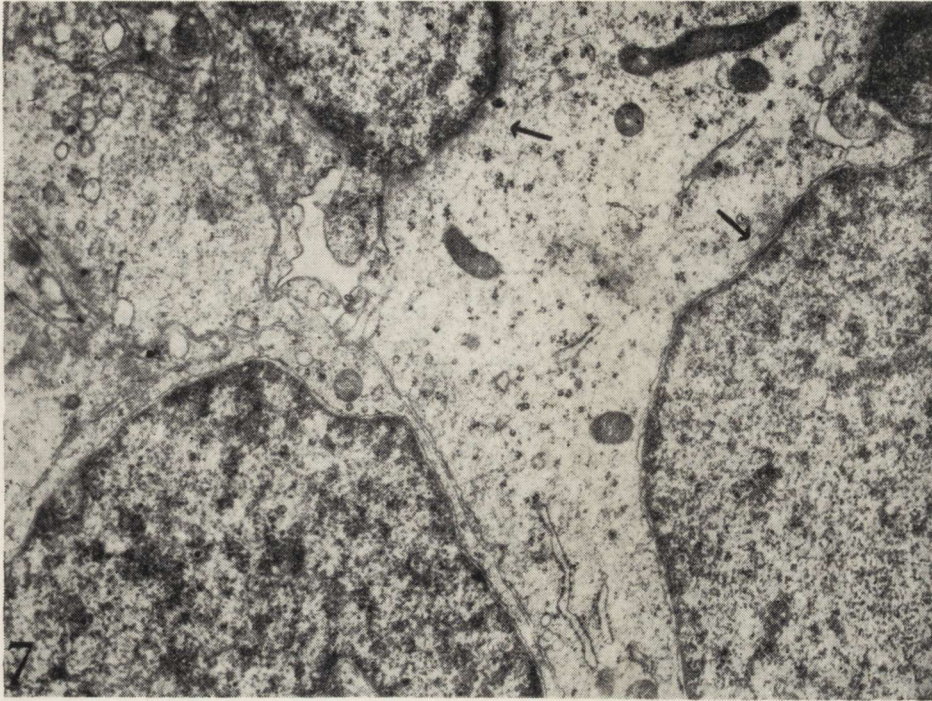
Nr	Płeć	Wiek	Nr bad.	Cechy nowotworu	Rozpoznanie
1	chłopiec D.P.	16 mies.	1840—1844	Guz wielkości mandarynki przerastający okolicę nerwów wzrokowych	Gwiazdziak włókienkowy (<i>Astrocytoma fibrillare</i>)
2	chłopiec M.K.	2 lata	1978	Guz zlokalizowany w dnie komory IV i rdzeniu przedłużonym, naciekający pień mózgu.	Gwiazdziak włókienkowy
3	chłopiec R.K.	4 lata	1949	Guz z okolicy skrzyżowania nerwów wzrokowych	Gwiazdziak (bez dokładniejszego sprecyzowania typu)
4	dzieńec. A.D.	11 lat	2000	Guz przedniej części płata skroniowego lewego	Gwiazdziak protoplazmatyczny (<i>Astrocytoma protoplasmaticum</i>)
5	chłopiec E.D.	14 lat	1785—1788	Rozległy guz w okolicy czolowo ciemieniowej lewej na głębokości 2 cm	Gwiazdziak częściowo anaplastyczny (<i>Astrocytoma partim anaplasticum</i>)
6	chłopiec M.N.	8 lat	1973	Guz prawej półkuli mózdzku	Gwiazdziak włosopodobny mózdzku (<i>Astrocytoma pilocyticum cerebelli</i>)

WYNIKI

Klasyfikację gwiazdziaków mózgu w mikroskopie świetlnym ustala się na podstawie przewagi określonego typu komórek gwiazdzistych występujących w guzie. W sześciu opisanych przez nas przypadkach gwiazdziaka u dzieci zarówno lokalizacja guza jak i budowa morfologiczna obserwowana w mikroskopie świetlnym (ryc. 1, 2, 3, 4) była typowa (Duffel i wsp. 1963).

I. Komórki nowotworowe charakterystyczne dla gwiazdziaka włókienkowego. Komórki uznane za typowe dla gwiazdziaka włókienkowego wyróżniały się obecnością licznych włókienek występujących w różnych obszarach cytoplazmy. W licznych komórkach włókienka występowały obficie w bezpośrednim sąsiedztwie jądra komórkowego. Często włókienka ułożone były obok siebie i tworzyły pęki włókien, które przechodziły z cytoplazmy przyjądrowej do wypustek (ryc. 5). Komórki gwiazdziaka włókienkowego miały zazwyczaj owalne jądro komórkowe z chromatyną skupioną przy błonie jądrowej. Szorstka siatka śródplazmatyczna była słabo rozwinięta w postaci krótkich poszerzonych kanałów. Wolne rybosomy ułożone w





Ryc. 7. Gwiaździk protoplazmatyczny. Fragmenty typowych komórek guza. Nieleczne struktury cytoplazmatyczne i pojedyncze, bardzo delikatne włókienka (strzałki). Pow. 12.000 \times

Fig. 7. Protoplasmic astrocytoma. Fragments of typical neoplastic cells. Poor cytoplasmic structures, few fine gliofibrilles (arrows). $\times 12\ 000$

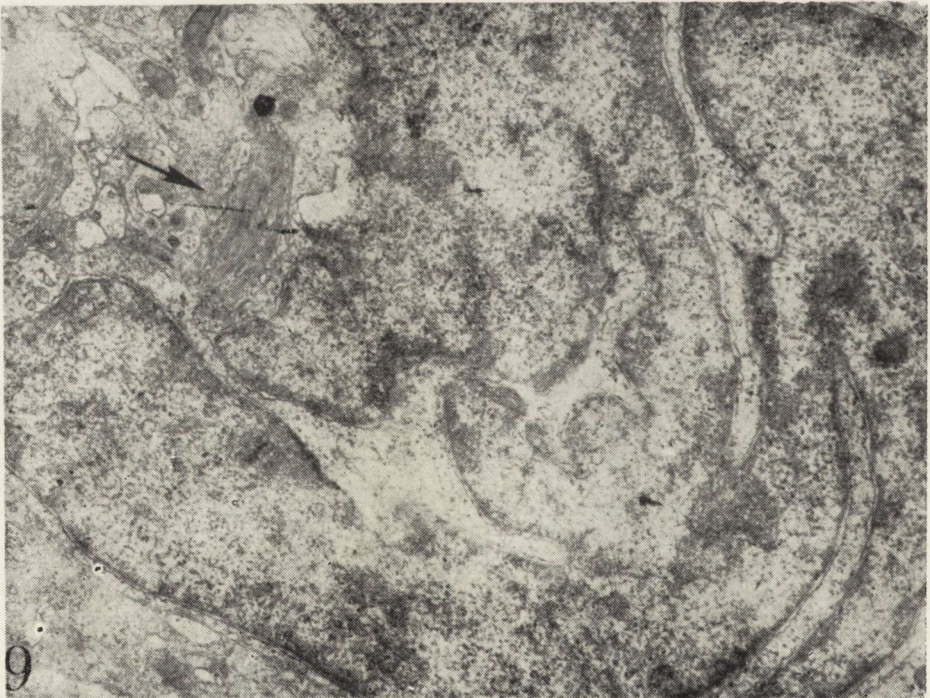
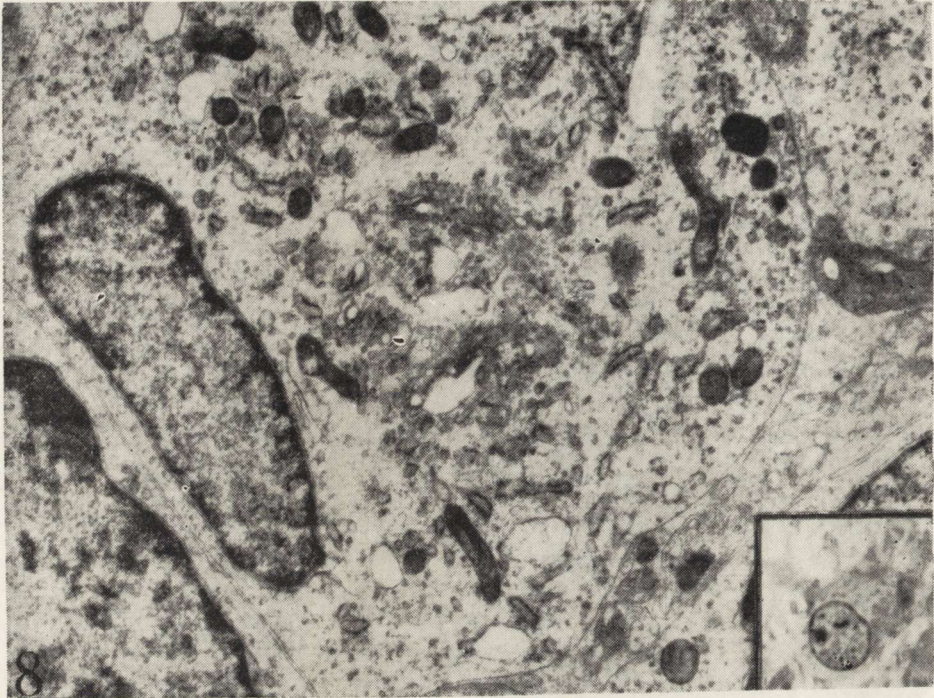
rozetki występowały w niewielkiej ilości. Aparat Golgiego składał się z krótkich, szerokich kanałów i z drobnych pęcherzyków. Obrzmiałe mitochondria występowały po kilka w komórce. Obserwowano również pojedyncze lizosomy.

Ryc. 5. Gwiaździk włókienkowy. Wypustka komórkowa wypełniona włókienkami wychodzącymi z obszaru cytoplazmy przyjądrowej. Pow. 19.000 \times . W dolnym rogu taka sama komórka. Błękit toluidyny. Pow. 1700 \times

Fig. 5. Fibrillary astrocytoma. Cellular process filled by gliofibrilles, originating from perikaryon. $\times 19\ 000$. In the right corner similar cell in semi-thin section. Toluidine blue. $\times 1\ 700$

Ryc. 6. Gwiaździk włosopodobny mózdzku. Wypustka komórkowa wypełniona licznymi włókienkami. Widoczne osmofilne masy materiału. Obraz odpowiadający włóknom Rosenthala. Pow. 10.000 \times

Fig. 6. Pilloid astrocytoma. Cellular process filled up with abundant gliofibrilles. Accumulation of osmophilic material. Typical picture of Rosenthal fibres. $\times 10\ 000$



W komórkach nowotworowych gwiazdziaka włosopodobnego mózdzku (przyp. 6) obok włókienek wypełniających wypustki komórkowe występowały również osmofilne masy materiału homogenego lub drobnoziarnistego (ryc. 6). Wypustki komórkowe zawierające osmofilne masy materiału odpowiadały włóknom Rosenthala obserwowanym w mikroskopie świetlnym (Głuszcz i wsp. 1971; Gullotta, Fliedner 1972; Osetowska 1975).

II. Komórki nowotworowe charakterystyczne dla gwiazdziaka protoplazmatycznego. W odróżnieniu od komórek gwiazdziaka włókienkowego, komórki gwiazdziaka protoplazmatycznego zawierały niewiele włókienek, zazwyczaj występujących pojedynczo w cytoplazmie. Swoją budową komórki te przypominały młody giej szeregu astrocytarnego. Jądro komórkowe było duże, często pofałdowane licznymi wgłobieniami. Jednocześnie komórki te zawierały ograniczoną ilość struktur cytoplazmatycznych (ryc. 7). Szorstka siatka śródplazmatyczna występowała w postaci pojedynczych krótkich kanałów. Owalne lub okrągłe mitochondria miały gęstą macierz. Licznie występowały polirybosomy.

III. Komórki typu gemistocytów. Komórki gemistocytarne charakteryzowały się dużymi rozmiarami i obecnością licznych struktur nagromadzonych w cytoplazmie w stopniu większym niż w innych typach komórek (ryc. 8). Jądro komórkowe położone było zwykle mimośrodkowo. Szorstka siatka śródplazmatyczna zbudowana była z krótkich szerokich kanałów różnej wielkości. Aparat Golgiego był umiejscowiony w pobliżu jądra i składał się z wąskich kanałów i bardzo licznych drobnych pęcherzyków. Małe, okrągłe lub owalne mitochondria miały gęstą macierz. Licznie występowały lizosomy.

Ryc. 8. Gwiazdziak włókienkowy. Komórka typu gemistocyta. Jądro położone brzeżnie, obfita cytoplazma, liczne struktury o charakterze lizosomów. Pow. 11.500 \times . W dolnym rogu taka sama komórka. Błękit toluidyny. Pow. 1700 \times

Fig. 8. Fibrillary astrocytoma. Gemistocyte with excentrically located nucleus, abundant cytoplasm containing numerous lysosome-like bodies. \times 11 500. In the right corner similar cell in semi-thin section. Toluidine blue. \times 1700

Ryc. 9. Gwiazdziak częściowo anaplastyczny. Komórka o niskim stopniu dojrzałości. Bardzo duże wielopłatowe jądro, obok którego widoczny jest pęczek włókienek (strzałka). Pow. 9.500 \times

Fig. 9. Astrocytoma partim anaplasticum. Immature neoplastic cell with large, lobulated nucleus and narrow rim of cytoplasm. In perinuclear area bundle of gliofibrilles is seen (arrow). \times 9 500

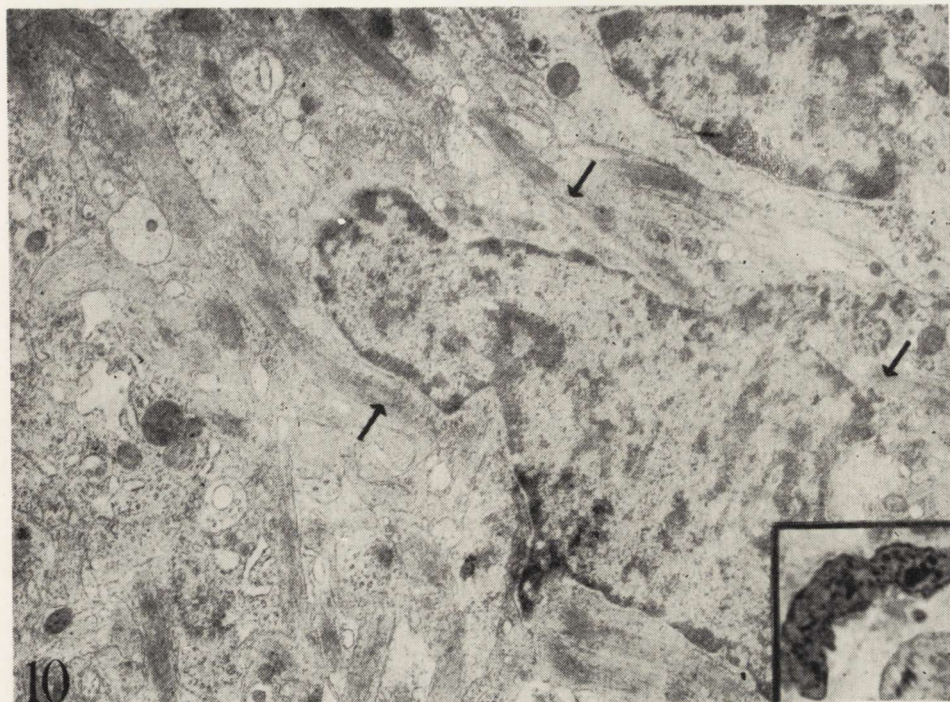
IV. Komórki nowotworowe o cechach niedojrzałości. We wszystkich sześciu badanych przypadkach, obok typowych komórek nowotworowych opisanych powyżej, występowała pewna liczba komórek o różnej budowie morfologicznej. W przypadku gwiaździaka częściowo anaplastycznego, komórki te występowały obficie i wykazywały cechy niedojrzałości. Jądro komórkowe zajmowało prawie całą cytoplazmę, było wielopłatowe i niekiedy w jego sąsiedztwie występowały pęczki włókienek (ryc. 9). Często obserwowano również komórki z dużymi, wydłużonymi oraz nieregularnymi jądrami. Chromatyna była gęsto ułożona przy błonie jądrowej jak również w licznych skupieniach w obszarze całego jądra. W cytoplazmie tych komórek występowało niewiele struktur: nieliczne kanały siatki śródplazmatycznej i wolne rybosomy oraz pojedyncze mitochondria. Natomiast licznie występowały włókienka cytoplazmatyczne (ryc. 10).

OMÓWIENIE

Wielu autorów (Ringertz, Nordenstam 1951; Henschen 1955; Zülch 1956) uważa, że gwiaździaki nadnamiotowe i podnamiotowe wykazują pewne różnice morfologiczne. Obserwowane przez nas przypadki guzów, z uwagi na ich lokalizację, można podzielić na dwie grupy: gwiaździaki mózgu (*Astrocytoma cerebrale*) oraz gwiaździaki mózdzku (*Astrocytoma cerebellare*).

W grupie guzów zlokalizowanych w mózgu i rozpoznanych jako gwiaździak włókienkowy najczęściej występują komórki opisane przez nas jako komórki gwiaździaka włókienkowego. Odpowiadają one opisom mikroskopowo-elektronowym Luse (1958), Raimondi'ego i wsp. (1962), Duffela (1963). Komórki te zawierają liczne włókienka cytoplazmatyczne, struktury o charakterze lizosomów oraz mitochondria, opisywane jako „dense mitochondria”. W gwiaździakach włókienkowych spostrzega się również komórki typu protoplazmatycznego i gemistocyty. Ich ilość jest różna w każdym przypadku. W przypadku gwiaździaka protoplazmatycznego występują głównie komórki nowotworowe typu zarodkowego, jednakże reprezentowane są również komórki typowe dla gwiaździaka włókienkowego. W omawianych przypadkach spotyka się jednocześnie komórki, które zaliczono do typu komórek nowotworowych o niskim stopniu dojrzałości.

W gwiaździaku częściowo anaplastycznym obficie występują komórki o morfologicznych cechach niedojrzałości. Są to komórki z dużym, wielopłatowym jądrem i z małą ilością cytoplazmy. Astrocyty te można porównać w pewnej mierze, z opisanymi przez Luse (1960) oraz Sipe'a i wsp. (1973), komórkami glejaka wielopostaciowego. Wydaje się, że



Ryc. 10. Gwiazdziak częściowo anaplastyczny. Jądro wydłużone, nieregularne, obfita chromatyna jądrowa. Wypustki komórkowe zawierają włókienka cytoplazmatyczne (strzałki). Pow. 9000 \times . W dolnym rogu taka sama komórka. Błękit toluidyny. Pow. 1700 \times

Fig. 10. Astrocytoma partim anaplasticum. Elongated irregularly shaped nucleus with abundant karyoplasm. Cellular processes with numerous gliofibrilles (arrows). \times 9000. In the right corner similar cell in semi-thin section. Toluidine blue. \times 1700.

komórki o cechach niskiej dojrzałości zdolne są również do wytwarzania włókienek cytoplazmatycznych (ryc. 9, 10). Komórki o cechach niedojrzałości przypominają budową ultrastrukturalną komórki glejaka nieodróżnionego, jakie obserwowali Kroh i wsp. (1973) w nowotworach wywołanych doświadczalnie w mózgu u myszy. Jednakże w komórkach uzyskanych doświadczalnie nie stwierdzono włókienek cytoplazmatycznych.

Grupę guzów pochodzących z mózdzku reprezentował w naszych badaniach jeden przypadek: gwiazdziak włosopodobny mózdzku. Gwiazdziak mózdzku cechuje się obecnością wydłużonych i obfitych włóknkowych komórek (Henschen 1955; Zülch 1956). Guzy zbudowane z takich komórek nazywane są „pilocytic astrocytoma” (gwiazdziak włosopodobny) lub „spongioblastoma” (gąbczak biegunowy). Manuelidis (1972) na podstawie badań w mikroskopie świetlnym transplantatów z gwiaz-

działków mózgu i gwiaździków mózdzku do przedniej komory oka stwierdził różnicę we własnościach biologicznych obydwu guzów. Zaobserwował on mianowicie, że w transplantatach pochodzących z gwiaździka mózdzku komórki zawsze wyróżniały się swoim wydłużonym kształtem, były dwubiegunowe oraz przypominały spongioblasty. W związku z tym Manuelidis (1972) zaproponował nazwę „spongioblastoma” jako najbardziej odpowiednią dla gwiaździka mózdzku. Gullotta i Flidner (1972) opisali w mikroskopie świetlnym i elektronowym 12 przypadków „spongioblastoma”. Guzy te w hodowli tkankowej porównali z hodowlą komórek gwiaździka mózgu. Według tych autorów „spongioblasty” są wydłużonymi, dwubiegunowymi komórkami wypełnionymi pęczkami włókienek i w pierwszych okresach hodowli odpowiadają budową komórkom gwiaździka włókienkowego, natomiast w okresach późniejszych wyraźnie wzrasta ilość włókienek cytoplazmatycznych.

Opisany powyżej przypadek gwiaździka włosopodobnego mózdzku wykazuje w badaniach mikroskopowo-elektronowych cechy charakterystyczne dla gąbczaka biegunowego. Występują typowe dla tego guza twory określane w mikroskopie świetlnym jako włókna Rosenthala, które w mikroskopie elektronowym przedstawiają się jako wypustki komórek wypełnione włókienkami, wśród których znajduje się homogeny lub drobnoziarnisty, osmofilny materiał. Obecne obserwacje ultrastrukturalne włókien Rosenthala zgodne są z badaniami Hossmanna i Wechslera (1965), Głuszcza i wsp. (1971), Gullotty i Flidnera (1972) oraz Osetowskiej (1975). Włókna Rosenthala występują również w nie-nowotworowych procesach patologicznych (Osetowska 1975). Schlote (1966) przypuszcza, że powstawanie włókien Rosenthala może być spowodowane zmianami komórkowymi, podobnymi do występujących w dystrofiach spichrzających, stanowiącymi zaburzenie metabolizmu całej komórki. Efektem tego jest fragmentacja włókienek i powstawanie złogów materiału homogennego lub drobnoziarnistego.

Badania ultrastrukturalne nowotworów pozwalają na lepsze niż w mikroskopie świetlnym uchwycenie różnic morfologicznych poszczególnych typów gwiaździków, jak i pojedynczych komórek w obrębie danego guza. Jednakże badania te nie pozwalają na ocenę całościowej organizacji tkanki nowotworowej.

Cechy obrazu mikroskopowo-elektronowego typowe dla poszczególnych badanych postaci guzów u dzieci można podsumować następująco:

a) w gwiaździku włókienkowym licznie występują komórki zawierające pęki włókienek cytoplazmatycznych;

- b) komórki charakterystyczne dla gwiazdziaka protoplazmatycznego posiadają ograniczoną ilość struktur cytoplazmatycznych;
- c) w gwiazdziaku częściowo anaplastycznym obficie występują komórki wykazujące cechy niedojrzałości;
- d) w przypadku gwiazdziaka włosopodobnego mózdzku obecne są włókna Rosenthala.

E. В. Борович, А. Данелевич, А. Лоех, В. Шмидт-Сидор

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТКИ АСТРОЦИТОМЫ

Резюме

Исследовали электронно-микроскопическую картину опухолевых клеток в 6 случаях астроцитомы у детей в возрасте 1 4/12 до 14 лет. Материал получали во время операции. Диагноз устанавливали при помощи светового микроскопа. Для ультраструктурных исследований материал подготавливали способом, обычным для техники электронного микроскопа. Проведенные исследования выявили большую морфологическую разнородность клеток астроцитомы, а в особенности клеток частично анапластической астроцитомы, в которой имелись многочисленные астроциты с признаками незрелости, не позволяющие их классифицировать. В случае волосоподобной астроцитомы мозжечка, наряду с типичными опухолевыми клетками, дополнительно появлялись волокна Розенталя.

Результаты настоящих исследований не показывают однозначно, пригодна ли электронномикроскопическая оценка опухоли при постановке диагноза. Однако можно предполагать, что ультраструктурные исследования позволяют лучше, чем в световом микроскопе, уловить морфологические признаки, которыми отличаются как отдельные типы астроцитом, так и отдельные клетки в области данной опухоли.

J. W. Borowicz, A. Danielewicz, A. Loesch, B. Schmidt-Sidor

ULTRASTRUCTURE OF ASTROCYTOMA CELLS

Summary

Electron microscopic investigation of neoplastic cells has been carried out on 6 astrocytomas in children aged 1 4/12 up to 14 years. The material for light and electron microscopic studies has been taken at operation. For ultrastructural study routine methods of tissue preparation were applied. The tumors were diagnosed in light microscope. The studies in E.M. pointed out at great morphological variety of astrocytoma cells, in particular the cells of partly anaplastic astrocytoma. In this tumor numerous, immature astrocytes which could not be classified, were found. In astrocytoma piloides besides rather typical neoplastic cells there appeared Rosenthal fibers.

On the ground of present investigations one cannot decide univocally, is the EM evaluation of the neoplasm helpful at the diagnosis. It is presumed that ultrastructural investigation allows the better orientation in morphological features differing particular types of astrocytomas and particular cells within their area than in light microscope study.

PIŚMIENNICTWO

1. Duffel D., Faber L., Chou S., Hartmann J. F., Nelson E.: Electron microscopic observations on astrocytomas. *Am. J. Path.* 1963, 43, 539—554.
2. Głuszczyk A., Giernat L., Habryka K., Alwasiak J., Lach B., Papierz W.: Rosenthal fibres, birefringent gliofibrillary changes and intracellular homogeneous conglomerate in tissue cultures of gliomas. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 17, 54—67.
3. Gullotta F., Fließner E.: Spongioblastomas, astrocytomas and Rosenthal fibres, ultrastructure, tissue culture and enzyme histochemical investigations. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 22, 68—78.
4. Henschen F.: Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Hüllen. W: W. Scholz: *Evkrankungen des zentralen Nervensystems*. Berlin: Springer 1955, Bd. XIII/3, 570—578.
5. Hossmann K. A., Wechsler W.: Zur Feinstruktur menschlicher Spongioblastoma. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1965, 187, 327—351.
6. Kroh H., Majdecki T., Renkawek K.: Ultrastructure of experimental brain gliomas in mice. *Z. Krebsforsch.* 1973, 80, 159—168.
7. Luse S. A.: Ultrastructure of astrocytomas. *Lab. Invest.* 1958, 7, 401—417.
8. Luse S. A.: Electron microscopic studies of brain tumors. *Neurology (Minneapolis.)* 1960, 10, 881—905.
9. Manuelidis E. E.: Heterologous transplantation of cerebral and cerebellar astrocytomas. *Acta neuropath. (Berl.)* 1972, 20, 160—170.
10. Osetowska E.: Choroba Rosenthala czy glej Rosenthala. *Neuropat. Pol.* 1975, XIII, 153—163.
11. Raimondi A. J., Mullan S., Evans J. P.: Human brain tumors: an electron microscopic study. *J. Neurosurg.* 1962, 19, 731—753.
12. Ringertz, Nordstam H.: Cerebellar astrocytoma. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1951, 10, 343—367.
13. Schlote W.: Rosenthalsehen „Fasern“ und Spongioblasten in Zentralnervensystem. II. Elektronmikroskopische Untersuchungen. Bedeutung der Rosenthal'schen Fasern. *Beitr. path. Anat.* 1966, (B), 461—480.
14. Sipe J. C., Herman M. M., Rubinstein L. J.: Electron microscopic observations on human glioblastomas and astrocytomas maintained in organ culture system. *Am. J. Path.* 1973, 73, 589—606.
15. Zülch K. J.: *Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste*. W: H. Olivercrona, W. Tönnes: *Handbuch der Neurochirurgie*, Berlin: Springer 1956, Vol. 3., 143—146.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, 00-784 Warszawa, Dworkowa 3.

ANDRZEJ SULIŃSKI, ZOFIA ZALEWSKA, KRYSZYNA SOSNOWSKA,
WŁODZIMIERZ BICZ

EFFECT OF INTOXICATION OF PREGNANT RATS
WITH TRICHLORPHON ON THE ACTIVITIES
OF SOME BRAIN ENZYMES IN THE PROGENY
DURING POSTNATAL DEVELOPMENT *)

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy,
Medical Academy of Warsaw
Head of Department: Prof. W. Bicz, M.D.

Organophosphorus pesticides are poisonous to the nervous system of mammals. Their action is mainly directed towards cholinesterases with the possibility of evoking a neurotoxic effect (Aldridge, Barnes, 1966; Johnson, 1969b; 1970; Reiff et al., 1971). The mechanism of inhibition of the activity of some esterases consists in the modification by phosphorylation of the active site of the enzyme (Aldridge, 1969; Johnson, 1969a, b; Awad et al., 1973). The effect of organophosphorus pesticides on myelination process in the nervous tissue has also been demonstrated (Maino, Karnovsky, 1961; Porcelatti, 1971).

In earlier studies the influence of poisoning of pregnant females with the organophosphorus insecticide Dichlorvos on cholinesterase and oxidoreductase activity in the brain of the progeny has been demonstrated at various periods of postnatal development (Zalewska et al., 1977a, b). At present it was decided to compare in an analogous experimental system the action of another pesticide — Trichlorphon, a structural analogue of Dichlorvos, taking into account the relation between the chemical structure and the action of organophosphorus pesticides.

The study was undertaken to investigate the activity of acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase in the brains of the progeny of rat females poisoned during pregnancy with Trichlorphon, with consideration of various periods of postnatal development. For comparison the plasma cholinesterase activity was also determined.

*) The study partly supported by the Polish Academy of Sciences, Research Programme 10.4.

MATERIAL AND METHODS

Pregnant female albino rats weighing 230—250 g were used for the experiments. They were fed a standard diet and water *ad libitum*. The females were divided into 3 groups. Group 1 received Trichlorophon in a 2% LD₅₀ dose in 2 ml of aqueous solution, group 2 was given 10% LD₅₀ in the same solution and group 3 (control) only 2 ml of water. The solutions were introduced orally in the last 7 days of pregnancy.

As LD₅₀ was assumed 560 mg/kg body weight (Rusiecki, 1973). The enzymes activities were determined in the progeny after 1, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 48, 64 days of life (cholinesterases) or after 1, 4, 8, 12, 16, 32, 42 and 56 days (oxidoreductases). Cholinesterases were determined by the spectrophotometric method (Ellman et al., 1961) as described earlier (Pachecka et al., 1975). The enzymes were prepared in the form of a 10 per cent homogenate of the brain hemispheres in buffered 0.25 M sucrose solution of pH 7.4 or heparinized blood plasma. Oxidoreductases were determined in the mitochondrial fractions prepared after Moor and Jobsis (1970). Cytochrome oxidase was determined spectrophotometrically according to Smith (1954) and succinate dehydrogenase activity by the spectrophotometric method of King (1963). The details of preparation of the mitochondrial fraction and of enzyme activity determination were described in an earlier paper (Zalewska et al., 1977b). Protein was determined by the biuret method (Layne, 1957) directly in the plasma or after solubilization with 1 per cent sodium deoxycholate in the mitochondrial fractions.

Trichlorophon (Dipterex) — 0,0-dimethyl-1-hydroxy-2,2,2-trichloroethylphosphate (97.85%) was prepared in the Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences.

RESULTS

Cholinesterases. Figure 1 presents the changes in acetylcholinesterase activity in the brain during individual development of the progeny of control female rats and those subjected to poisoning. The activity of the enzyme in the control animals increased from the 1st to the 48th day of life, reaching a level which remained constant till the 64th day. The most pronounced rise of activity occurred between the 1st and the 24th day of individual development. In the progeny of mothers fed during pregnancy with Trichlorophon in doses of 2 per cent LD₅₀ the enzyme activity in the brains of one-day animals did not differ from the control activity. On the 4th and 8th day of life an increase of the activity was noted, and on the 32nd day and at

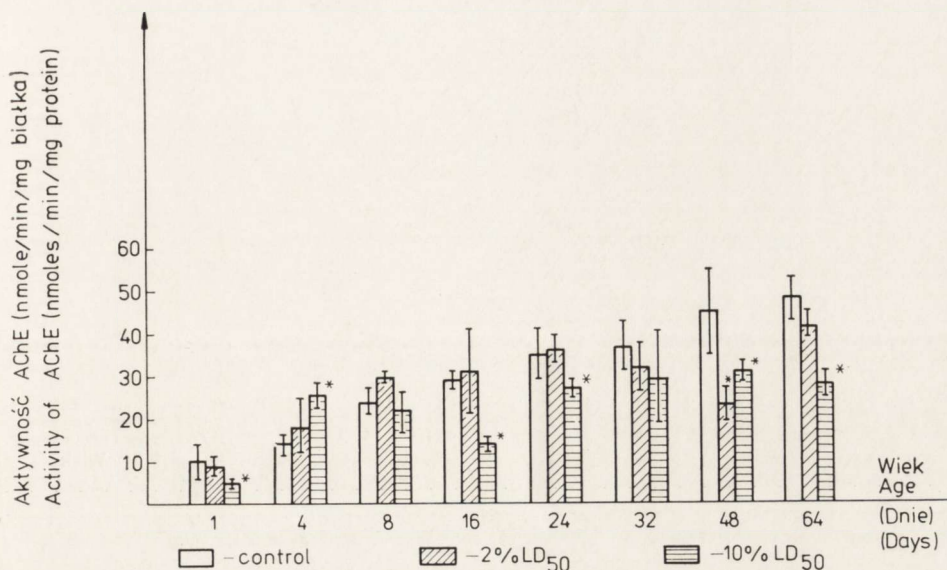


Fig. 1. Effect of pregnant rats intoxication with Trichlorphon on the brain acetylcholinesterase activity in the progeny during postnatal development. Levels are shown as mean values \pm S.E.M. from 6 animals. * — statistical significance $p \leq 0.05$.

Ryc. 1. Wpływ zatrucia ciężarnych samic Trichlorfonem na aktywność acetylocholinoesterazy mózgu u potomstwa w różnych okresach rozwoju osobniczego. Wyniki przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej dla 6 szczurów. * — znamienność statystyczna $p \leq 0,05$.

further times of measurement, the enzyme activity decreased. The progeny of the mothers poisoned with a 10 per cent LD₅₀ dose showed after the 1st day of life a significantly depressed acetylcholinesterase activity as compared with that of the controls. In 4-day rats a stimulation of acetylcholinesterase activity was observed. The activity decreased on the 16th day and this persisted until adult age.

Changes in plasma cholinesterase activity are shown in Figure 2. The activity increased in the control animals after birth, then decreased on the 24th day and remained at the same level until the last investigated stage of development. In rats derived from females poisoned with 2 per cent LD₅₀, a stimulation of cholinesterase activity was observed on the 1st day of life and then a decrease up to the 16th day. In 24-day-old animals the activity was close and in 32-day and older individuals identical to that in the control animals. The progeny of females poisoned with a 10 per cent LD₅₀ dose showed a strong inhibition of cholinesterase activity which persisted up to the 16th day. After this period it returned to control value.

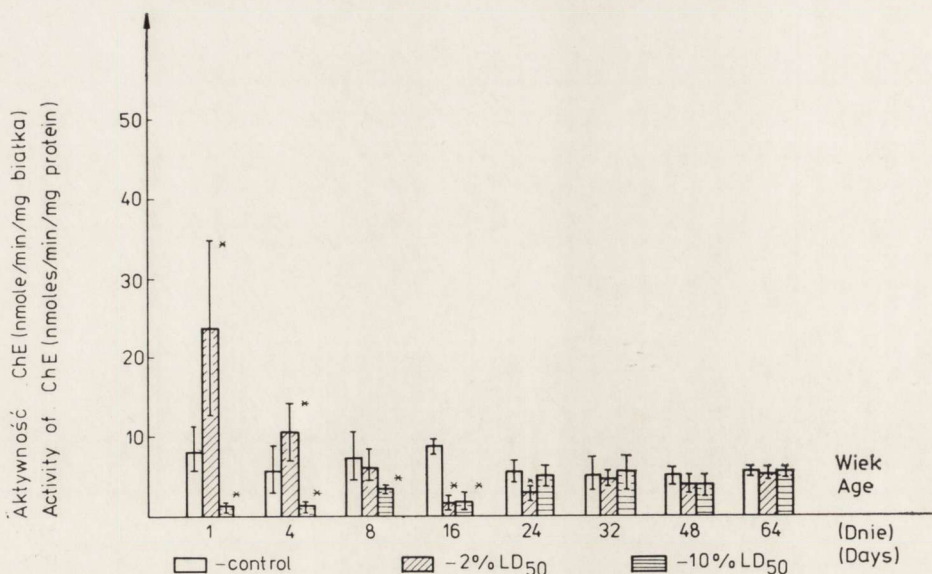


Fig. 2. Effect of pregnant rats intoxication with Trichlorfon on the plasma cholinesterase activity in the progeny during postnatal development. For explanations see Fig. 1.

Ryc. 2. Wpływ zatrucia ciężarnych samic Trichlorfonem na aktywność cholinesterazy osocza u potomstwa w różnych okresach rozwoju osobniczego. Objaśnienia jak w ryc. 1.

As may be concluded from the data presented in Figures 1 and 2, Trichlorfon administered to pregnant females produces changes in acetylcholinesterase activity of the brain and plasma cholinesterase of the progeny. These changes are most pronounced on the 16th day of life, but do not seem to be of major importance since the enzyme activity rapidly returns to control level. On the other hand, the changes in brain acetylcholinesterase are more pronounced and persist even after the rats reach adult age.

Oxidoreductases. Changes in cytochrome oxidase activity of the mitochondrial fraction of the rat brain in various periods of development following intoxication during pregnancy with Trichlorfon are shown in Figure 3.

As shown a significant enhancement of cytochrome oxidase activity accompanies the period of rapid myelination. The highest rise of the activity falls to the period from the 1st to the 16th day of life. From the 16th to the 56th day of life this activity shows no major changes. In this period the activity of the enzymes was identical to that previously observed in mature individuals (Sitkiewicz, Zalewska, 1975). In the period of rapid increase of activity between the 1st and the 16th

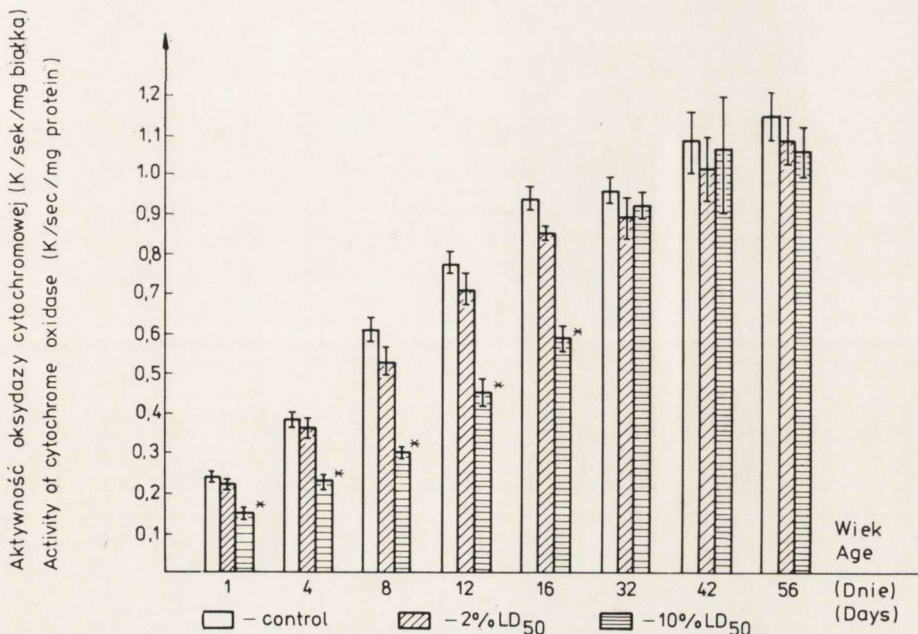


Fig. 3. Effect of pregnant rats intoxication with Trichlorphon on the brain cytochrome oxidase activity in the progeny during postnatal development. For explanation see Fig. 1.

Ryc. 3. Wpływ zatrucia ciężarnych samic Trichlorfonem na aktywność oksydazy cytochromowej mózgu u potomstwa w różnych okresach rozwoju osobniczego. Objaśnienia jak w ryc. 1.

day of life, the influence of intoxication of the mothers with 2 and 10 per cent LD₅₀ doses of Trichlorphon became manifested. In the progeny of the poisoned mothers in this period of development a depression of cytochrome oxidase activity by 10–30 per cent was observed. The difference was statistically significant only for the higher dose. At later periods of individual development the oxidase activity reached a level close to the control value.

As shown in Figure 4 the effect on the succinate dehydrogenase was similar to that on the cytochrome oxidase activity. From the 1st to the 16th day of life the activity of the enzyme increased in the control rats, reaching the level characteristic for the brain of mature rats (Sitkiewicz et al., 1977). The effects of Trichlorphon administration to the mothers became apparent in the offspring in the early period of postnatal life. The pesticide given to the mothers in a 10 per cent LD₅₀ dose caused in the progeny a statistically significant depression of succinate dehydrogenase activity between the 1st and 12th day of life. From the 16th day on, the activity of this enzyme returned to values close the control level.

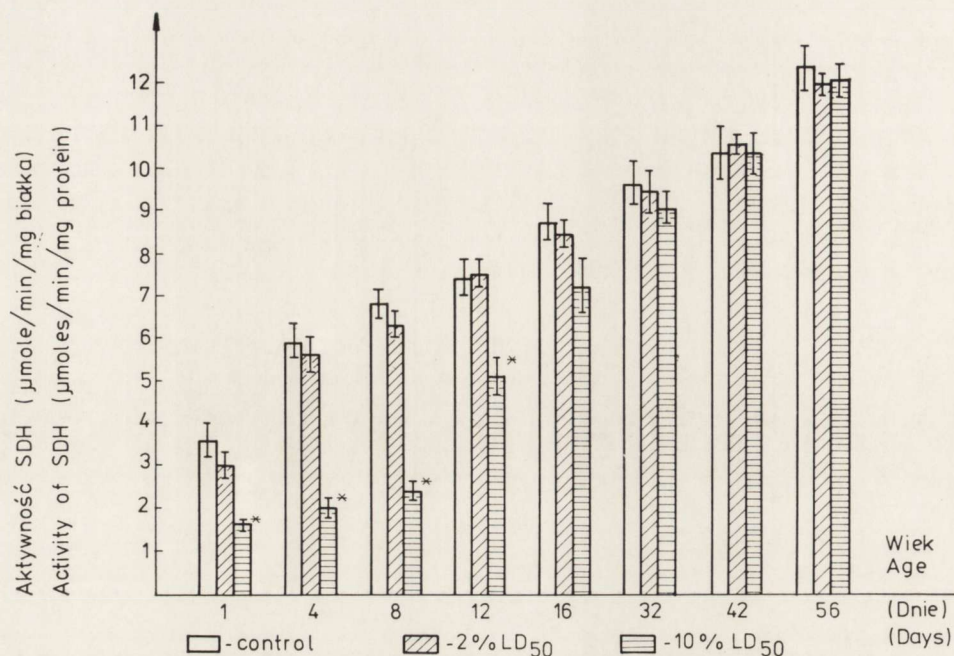


Fig. 4. Effect of pregnant rats intoxication with Trichlorophon on the brain succinate dehydrogenase activity in the progeny during postnatal development. For explanation see Fig. 1.

Ryc. 4. Wpływ zatrucia ciężarnych samic Trichlorfonem na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej mózgu u potomstwa w różnych okresach rozwoju osobniczego. Objaśnienia jak w ryc. 1.

DISCUSSION

It was demonstrated in earlier papers that Trichlorophon has a significant effect on acetylcholinesterase (Pachecka et al., 1977) and mitochondrial oxidoreductase activity (Sitkiewicz, Zalewska, 1975) in adult rat brain. In the study on the consequences of intoxication with organophosphorus pesticides for the metabolism of the central nervous system during development, it seemed useful to investigate the influence of poisoning of pregnant females with this pesticide on acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activity in the brains of the offspring at various stages of postnatal development.

In the present study the females were poisoned in the last 7 days of pregnancy. Enzymes activities were measured from the 1st day of extrauterine life to the period of full structural and functional maturity of the brain. The time intervals at which measurements were made

represented the main periods of brain development and of the myelination process. The experimental model allowed the observation of both primary and secondary changes due to the pesticide or its metabolites.

The experimental model adopted seemed very suitable since in the embryonal stage the blood-brain barrier is not fully efficient. Thus at this stage of development any xenobiotic may affect most readily the structural and functional development of the nervous tissue (Dobbing, 1968).

The present work revealed changes in the brain and plasma cholinesterase activities in the progeny of the intoxicated females. This seems to suggest that Trichlorphon or its metabolites are transported through the placental barrier and penetrate further through the blood-brain barrier of the fetus. The depression of mitochondrial oxidoreductase activity may be associated either with its direct inhibition by the pesticide or its active metabolites or with disturbances of the biosynthesis of these enzymes.

The lowering of the cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities might lead to changes in myelin formation (Brady, 1960). The reduced activity of both enzymes in the period of rapid myelination may cause a delay in the termination of the process. The lowered acetylcholine activity persisting up to the 64th day of life may be considered as an evidence of irreversible disturbances in the structure and function of the central nervous system. Similar effects were observed in earlier analogous experiments with Dichlorvos which, according to some suggestions, may have common metabolic pathways with Trichlorphon (Zalewska et al., 1977a, b).

A. Suliński, Z. Zalewska, K. Sosnowska, W. Bicz

WPLYW ŚRÓDCIAŻOWEGO ZATRUCIA SZCZURA TRICHLORFONEM
NA AKTYWNOŚĆ ACETYLOCHOLINOESTERAZY,
OKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ I DEHYDROGENAZY
BURSZTYNIANOWEJ MÓZGU POTOMSTWA PODCZAS ROZWOJU

Streszczenie

Oznaczano aktywność cholinoesterazy osocza oraz acetylocholinoesterazy, oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mózгах potomstwa po zatruciu ciężarnych samic Trichlorfonem. Pestycyd podawano per os w dawkach 2% i 10% LD₅₀ podczas ostatniego trymestru ciąży. Aktywność oksydoreduktaz oznaczano we frakcjach mitochondrialnych półkul mózgu potomstwa w różnych okresach rozwoju osobniczego (od 1 do 64 dnia życia). Śródciażowe zatrucie Trichlorfonem powodowało zmiany w aktywności oksydoreduktaz mitochondrialnych i acetylocholinoesterazy w mózгах potomstwa. W pierwszym okresie życia (od 1 do 16 dnia) wykazano obniżoną aktywność obu oksydoreduktaz. Aktywność ace-

tylocholinoesterazy była wyraźnie obniżona w okresie od 16 do 64 dnia życia, natomiast aktywność cholinoesterazy osocza była obniżona tylko w początkowym okresie życia (do 16 dnia). Zmiany powyższe wykazują zbieżność czasową z okresem mielinizacji ośrodkowego układu nerwowego.

A. Сулиньски, З. Залевска, К. Сосновска, В. Бич

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ТРИХЛОРФОНОМ КРЫСЫ ВО ВРЕМЯ
БЕРЕМЕННОСТИ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ,
ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ И СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В МОЗГУ ПОТОМСТВА ВО ВРЕМЯ РАЗВИТИЯ

Резюме

Определяли активность холинэстеразы плазмы и ацетилхолинэстеразы, цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в мозгах потомства после отравления беременных самок трихлорфоном. Пестицид вводили через рот в дозах 2 и 10% ЛД₅₀ во время последнего триместра беременности. Активность оксидоредуктаз определяли в митохондриальных фракциях мозговых полушарий потомства в различные периоды онтогенеза (от 1-го до 64-го дня жизни). Отравление трихлорфоном во время беременности вызывало изменения в активности митохондриальных оксидоредуктаз и ацетилхолинэстеразы в мозгах потомства. В первом периоде жизни (от 1-го до 16-го дня) показана сниженная активность обеих оксидоредуктаз. Активность ацетилхолинэстеразы была явно снижена в период от 16-го до 64-го дня жизни, а активность холинэстеразы сыворотки была снижена только в начальный период жизни (до 16-го дня). Изменения коррелируют с периодом миелинизации центральной нервной системы.

REFERENCES

1. Aldridge W. N.: Organophosphorus compounds and carbamates and their reaction with esterases. *Brit. Med. Bull.*, 1969, 25, 236—240.
2. Aldridge W. N., Barnes J. M.: Esterases and neurotoxicity of some organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.*, 1966, 15, 549—554.
3. Awad O., Gabi Y., Osman M.: Phosphorylation and affinity constant of the inhibition of brain AChE by organophosphorus anticholinesterases. *Arzneimittel Forsch.*, 1973, 22, 1035—1039.
4. Brady R. O.: Biosynthesis of fatty acids. II. Studies with enzymes obtained from brain. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 3099—3103.
5. Dobbing J.: The development of the blood-brain barrier. In: *Brain barrier systems*. Lajtha A., Ford D. H. (ed), Elsevier Publ. Co., Amsterdam-London-New York, 1968, 417—427.
6. Ellman L. G., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88—91.
7. Johnson M. K.: The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem. J.*, 1969a, 114, 711—714.
8. Johnson M. K.: Delayed neurotoxic action of some organophosphorus compounds. *Brit. Med. Bull.*, 1969b, 25, 231—236.

9. Johnson M. K.: Organophosphorus and other inhibitors of brain „neurotoxic esterase” and the development of delayed neurotoxicity in hens. *Biochem. J.*, 1970, 120, 523—531.
10. King T. E.: Reconstruction of respiratory chain enzymes system. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
11. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in enzymology*. Colowick S. P., Kaplan M. O. (ed), Academic Press, New York, 1957, 3, 447—454.
12. Maino G., Karnovsky M. L.: A biochemical and morphological study of myelination and demyelination. III. Effect an organophosphorus compound (mipafox) on the biosynthesis of lipids by nervous tissue of rats and hens. *J. Neurochem.*, 1961, 8, 1—16.
13. Moore C. L., Jobsis F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 138, 295—305.
14. Pachecka J., Suliński A., Ziółkowska G.: The activities of some esterases of the rat brain after intoxication by organophosphate insecticide dichlorvos and trichlorphon. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 455—462.
15. Pachecka J., Suliński A., Traczykiewicz K.: The effect of acute intoxication by dichlorvos and trichlorphon on the activities of some rat brain esterases. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 85—92.
16. Porcelatti G.: Demyelinating cholinesterase inhibitors-lipid and protein metabolism. In: *Handbook of neurochemistry*. Ed. Lajtha A. Plenum Press, New York-London, 1971, 5, 439—478.
17. Reiff B., Lambert S. M., Natoff J. L.: Inhibition of brain cholinesterase by organophosphorus compounds in rats. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 1971, 192, 48—60.
18. Rusiecki W.: Toksykologia ochrony roślin, PZWL, Warszawa, 1973, 77.
19. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in brain mitochondria. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 463—469.
20. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: Effect of Ronnel and its oxygen analog on the succinate oxidation by rat brain and liver homogenates and mitochondria. *Pest. Biochem. Physiol.*, 1977, 7, 501—509.
21. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 285—298.
22. Zalewska Z., Rakowska I., Matraszek G., Sitkiewicz D.: Effect of Dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during postnatal development. I. Cholinoesterases. *Neuropat. Pol.* 1977a, 15, 255—262.
23. Zalewska Z., Wolna B., Sitkiewicz D., Bicz W.: Effect of Dichlorvos on some enzymes activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases. *Neuropat. Pol.*, 1977b, 15, 367—372.

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

WOJCIECH HILGIER, MARIA LIPSKA

TOPOGRAFIA ILOŚCIOWA MIEDZI W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

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

Zakład Chemii Toksykologicznej, Instytutu Biofarmacji AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr farm. W. Rusiecki

Patomechanizm encefalopatii wątrobowej w egzogennych uszkodzeniach wątroby nie został jednoznacznie wyjaśniony i stanowi nadal przedmiot licznych prac doświadczalnych. Mossakowski i wsp. (1970a) stwierdzili, że uszkodzenie wątroby wywołane czterochlorkiem węgla prowadzi do rozwoju pełnego morfologicznego zespołu encefalopatii wątrobowej. Obok typowych nieprawidłowości glejowych stwierdzono zwiększenie przepuszczalności naczyń mózgu dla soli srebra, gromadzących się w elementach strukturalnych tkanki nerwowej. Ten typ zaburzeń przepuszczalności naczyń może odgrywać istotną rolę w patologii ludzkiej, sprzyjając przenikaniu z krwi do mózgu drobnocząsteczkowych substancji chemicznych, wywierających działanie uszkodzające metabolizm i strukturę tkanki. Do takich substancji może między innymi należeć miedź. W badaniach prowadzonych w hodowli tkankowej Mossakowski i wsp. (1970b) wykazali, że pod wpływem egzogennych soli miedzi dochodzi do powstawania nieprawidłowych postaci gleju typowych dla encefalopatii wątrobowej. Komórki te, przede wszystkim komórki Opalskiego gromadzą obfite złogi miedzi (Mossakowski i wsp. 1977). Rozwój nieprawidłowości strukturalnych gleju oraz gromadzenie miedzi można było zahamować przez podawanie penicylaminy. Na możliwy udział miedzi w kształtowaniu encefalopatii wątrobowej wskazują również obserwacje Śmiałka i Mossakowskiego (1974), którzy stwierdzili jej nieprawidłowe nagromadzenie się w poszczególnych strukturach mózgu, wykazując równocześnie zależność nasilenia uszkodzeń tkankowych od zawartości miedzi. Podobnie Wender i Kozik (1973) znajdowali zwiększoną zawartość miedzi w mózgu w przypadkach przewlekłej encefalopatii wrotno-układowej. W oparciu o całokształt dotychczas-

sowych spostrzeżeń (Mossakowski i wsp. 1970, 1975, 1977; Renkawek i wsp. 1973) wysunięto hipotezę, że patogenetyczna rola miedzi polega na upośledzeniu produkcji endogenego α -oksooglutaranu, stanowiącego wyjściowe ogniwo głównej drogi detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym.

Celem badań było określenie zawartości miedzi w półkulach mózgu, mózdzku, wątrobie oraz w surowicy krwi u szczurów, u których wywoływano marskość wątroby przez podawanie czterochlorku węgla.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 60 szczurach, szczepu Wistar, samicach. Wiek zwierząt przy rozpoczęciu doświadczenia wynosił 2 miesiące. Uszkodzenie wątroby wywołano u 38 szczurów doświadczalnych, którym podawano co drugi dzień iniekcje czterochlorku węgla w płynnej parafinie w objętości 0,1 ml czterochlorku węgla na 100 g ciężaru ciała, wg metody opisanej przez Georgijewa i wsp. (1968). Czternaście zwierząt kontrolnych otrzymywało iniekcje płynnej parafiny. Badania objęły również 8 zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

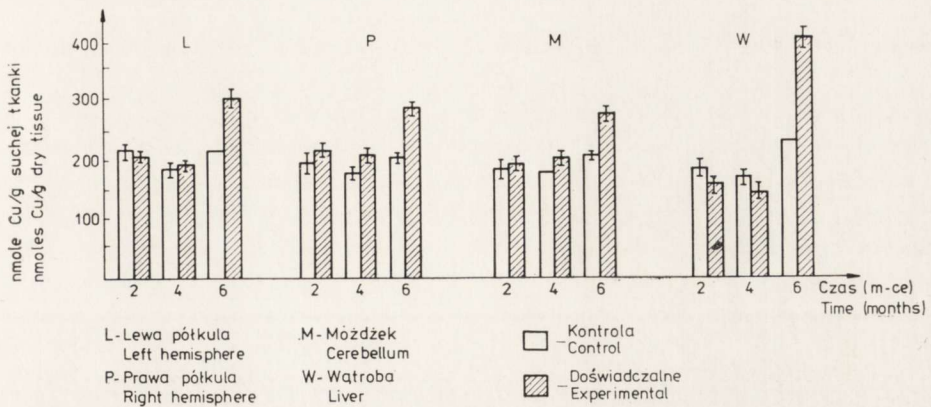
Zwierzęta zabijano przez dekapitację, bez narkozy, w grupach po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od rozpoczęcia doświadczenia. W celu uniknięcia zmian związanych z wiekiem, doświadczenie ustawiono w ten sposób, że wszystkie zwierzęta zabijano w wieku 8 miesięcy.

Do badań pobierano lewą i prawą półkulę mózgu, mózdzek, wątrobę oraz surowicę krwi. Mózg i wątrobę suszono w temperaturze około 100°C do uzyskania stałej wagi, a następnie mineralizowano w kolbach Kjeldahla w mieszaninie 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego, 1 ml 60% kwasu nadchlorowego i 3 ml stężonego kwasu azotowego. Poziom miedzi oznaczano w mineralizatach tkankowych oraz w surowicy krwi (bez mineralizacji) przy użyciu spektrofotometru absorpcyjno-atomego f-my Jarrall-Ash wg standardowej metody Jarrall-Ash. Zawartość miedzi wyrażano w nmol miedzi na 1 g suchej tkanki (dla obu półkul mózgu, mózdzku i wątroby) oraz w μ mol miedzi na 1 l surowicy.

Analizę statystyczną danych przeprowadzono przy pomocy testu t-Studenta i Q Dixona.

WYNIKI

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1 i na ryc. 1. Stwierdzono, że w grupie doświadczalnej z 2-miesięcznym przeżyciem nie występowały zmiany w zawartości miedzi, zarówno w mózgu, mózdzku, jak i w wątrobie oraz w surowicy krwi w stosunku do odpowiedniej grupy



Ryc. 1. Zawartość miedzi w mózgu i wątrobie w różnych okresach encefalopatii wątrobowej.

Fig. 1. Copper content in brain and liver in different periods of hepatic encephalopathy.

kontrolnej. W grupie z 4-miesięcznym przeżyciem zawartość miedzi w lewej półkuli mózgu i w mózdzku nie różniła się w sposób znaczący od stwierdzonej u zwierząt kontrolnych. Natomiast w prawej półkuli mózgu zaznaczył się niewielki lecz statystycznie znamienny i wynoszący około 20% wzrost zawartości miedzi. W tym samym czasie w wątrobie stwierdzono około 15% spadek zawartości metalu. W grupie 6-miesięcznej wystąpił wyraźny wzrost zawartości miedzi we wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego, wynosząc dla obu półkul mózgu około 40%, a dla mózdzku około 35%. W tej samej grupie zawartość miedzi w wątrobie była około 75% wyższa w stosunku do kontroli. Poziom miedzi w surowicy krwi zwierząt doświadczalnych i kontrolnych nie różnił się od siebie w sposób statystycznie znamienny, wynosząc u zwierząt kontrolnych $0,31 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$, a u doświadczalnych $0,29 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$.

W tabeli 2 przedstawiono zmiany zawartości wody w badanych tkankach. Stwierdzono, że w grupie zwierząt doświadczalnych, z 6-miesięcznym przeżyciem występował statystycznie znamienny przyrost zawartości wody w mózgu i w mózdzku, wynoszący około 5%.

OMÓWIENIE

Zawartość miedzi w ośrodkowym układzie nerwowym zwierząt grupy kontrolnej oraz u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym nie odbiegała zasadniczo od stwierdzonej uprzednio w badaniach Donaldsona i wsp. (1973) oraz Danchera i wsp. (1975). U zwie-

Tabela 1. Zawartość Cu w tkankach w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej (nmole Cu/g suchej tkanki)

Table.1. Cu content in tissues in experimental hepatic encephalopathy (nmoles Cu/g dry tissue)

Rodz. tkanki Tissue	Czas zatrucia						Duration of intoxication			
	2 m-ce		2 months		4 m-ce		4 months		6 m-cy	6 months
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p	
L	K	269,78 ± 10,54	4	≥0,01	230,28 ± 13,17	5	≥0,01	250,61 ± 1,76	5	≤0,01
	B	260,34 ± 6,93	14		221,50 ± 6,73	15		354,78 ± 7,32	16	
P	K	246,01 ± 20,78	4	≥0,01	204,23 ± 4,09	5	≤0,01	233,35 ± 2,49	5	≤0,01
	B	238,21 ± 10,56	13		241,10 ± 7,46	15		332,69 ± 6,58	16	
M	K	247,76 ± 20,96	3	≥0,01	203,65 ± 1,90	5	≥0,01	236,86 ± 1,32	5	≤0,01
	B	259,00 ± 4,09	14		227,35 ± 7,61	15		320,54 ± 6,88	14	
W	K	252,02 ± 10,91	4	≤0,01	201,16 ± 3,80	5	≤0,01	271,39 ± 2,78	5	≤0,01
	B	209,59 ± 13,12	11		171,61 ± 9,07	11		481,91 ± 6,29	16	

- L — lewa półkula
left hemisphere
P — prawa półkula
right hemisphere
M — mózdzek
W — wątroba
liver
cerebellum
n — liczba zwierząt
number of animals
p — prawdopodobieństwo
probability
K — kontrola
control
B — zwierzęta doświadczalne
experimental animals

Tabela 2. Zawartość wody w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej (%)

Table 2. Water content in brain in experimental hepatic encephalopathy (%)

Rodz. tkanki Tissue		Czas zatrucia Duration of intoxication								
		2 m-ce 2 months			4 m-ce 4 months			6 m-cy 6 months		
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	p
L	K	86,31 ± 0,47	4	≥0,01	82,64 ± 0,19	5	≥0,01	82,57 ± 1,17	5	<0,01
	B	85,74 ± 0,34	14		81,64 ± 0,27	15		86,75 ± 0,38	16	
P	K	87,06 ± 0,23	4	≥0,01	82,51 ± 0,25	5	≥0,01	82,04 ± 0,74	5	<0,01
	B	85,76 ± 0,40	13		81,90 ± 0,37	15		86,43 ± 0,38	16	
M	K	84,10 ± 0,84	3	≥0,01	80,48 ± 0,38	5	≥0,01	81,41 ± 1,02	5	<0,01
	B	84,17 ± 0,30	14		79,96 ± 0,43	15		85,03 ± 0,31	14	

- P — prawa półkula
right hemisphere
- L — lewa półkula
left hemisphere
- M — mózdzek
cerebellum
- n — liczba zwierząt
number of animals
- K — kontrola
control
- B — zwierzęta doświadczalne
experimental animals
- p — prawdopodobieństwo
probability

rząt doświadczalnych występowało narastające w czasie gromadzenie się miedzi w tkankach ośrodkowego układu nerwowego. W grupie z 2-miesięcznym przeżyciem zawartość miedzi w obu półkulach mózgu i mózdzku nie różniła się w sposób istotny od stwierdzanej u zwierząt kontrolnych. U zwierząt z 4-miesięcznym trwaniem doświadczenia stwierdzono niewielki, w półkuli lewej mózgu i w mózdzku statystycznie nieznamienny, przyrost zawartości miedzi, osiągający w półkuli prawej mózgu wartości statystycznie znamienne. Po 6 miesiącach doświadczenia wzrost zawartości miedzi w badanych strukturach ośrodkowego układu nerwowego miał cechy statystycznej znamienności. Zwraça przy tym uwagę zbieżność wzrostu zawartości miedzi w tkankach ośrodkowego układu nerwowego z dynamiką rozwoju morfologicznych wykładników encefalopatii wątrobowej, stwierdzoną w identycznych warunkach doświadczalnych przez Mossakowskiego i wsp. (1970a). Cechy encefalopatii wątrobowej nie występowały u zwierząt z 2-miesięcznym trwaniem doświadczenia. Były one nieznacznie nasilone po upływie 4 miesięcy, a dopiero po 6 miesiącach stwierdzono w pełni rozwinięty obraz encefalopatii.

W wątrobie po 2-miesięcznym doświadczeniu nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w zawartości miedzi. Po 4 miesiącach nastąpiło istotne obniżenie zawartości metalu. Być może zjawisko to należy wiązać ze spadkiem zawartości ceruloplazminy, wiążącej miedź w ulegającej zwyrodnieniu wątrobie (Owen, Hazelring 1966). Znaczny wzrost zawartości miedzi w wątrobie po 6 miesiącach doświadczenia wykazuje cechy podobne do zjawisk występujących w chorobie Wilsona, w której przy bardzo znacznym spadku poziomu ceruloplazminy, związanym z upośledzeniem biosyntezy białek, dochodzi do nadmiernej absorpcji miedzi z przewodu pokarmowego i jej odkładania się w wątrobie (Walshe 1955, Owen, Hazelring 1966).

Brak zmian w zawartości miedzi w surowicy krwi w całym okresie trwania doświadczenia można wiązać z rozkładem miedzi we krwi między erytrocytami i plazmą. Miedź zawarta w erytrocytach może stanowić około 84% ogólnej puli metalu znajdującego się we krwi (Walshe 1955). Nie bez znaczenia mogą być również przesunięcia w zawartości tzw. miedzi wolnej i związanej, których oznaczeń nie przeprowadzono w obecnej serii badań, podobnie jak rozkładu metalu między erytrocytami a osoczem.

W oparciu o poprzednie badania Mossakowskiego i wsp. (1970) wydaje się uzasadnione wiązać wzrost zawartości miedzi w ośrodkowym układzie nerwowym ze zmianami przepuszczalności naczyń. Stwierdzone nieprawidłowości przepuszczalności naczyń dla metali, występowały w 4 i 6 miesiącu doświadczenia, a więc w tym samym okresie, w któ-

rym w materiale naszym dochodziło do gromadzenia miedzi w tkankach ośrodkowego układu nerwowego. Uzyskane przez nas wyniki nie wyjaśniają związku przyczynowego między wzrostem zawartości miedzi w układzie nerwowym i rozwojem morfologicznych wykładników encefalopatii wątrobowej. Związek taki sugeruje zbieżność czasowa obu zjawisk i spostrzeżenia uzyskane w badaniach przeprowadzonych w pozaustrojowej hodowli glejowej (Mossakowski i wsp. 1970, 1976).

Na odrębną uwagę zasługuje przyrost zawartości wody w ośrodkowym układzie nerwowym w 6 miesiącu doświadczenia wskazujący na obecność obrzęku mózgu. Brak zmian w przepuszczalności naczyń dla białek stwierdzony w analogicznym okresie przez Mossakowskiego i wsp. (1970a) sugeruje cytotoksyczny mechanizm obrzęku. Przemawiają za nim również mikroskopowo-elektronowe obserwacje Ostendy i wsp. (1976). Gromadząca się w ośrodkowym układzie nerwowym miedź mogłaby odgrywać rolę ważnego czynnika obrzękotwórczego (Wiśniewski i wsp. 1967).

WNIOSKI

1. W rozwoju doświadczalnej encefalopatii wątrobowej dochodzi do zwiększonego gromadzenia się miedzi w tkankach ośrodkowego układu nerwowego.
2. Zwiększonej zawartości miedzi towarzyszą cechy cytotoksycznego obrzęku mózgu.

В. Хилгер, М. Липска

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ТОПОГРАФИЯ МЕДИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕПАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Проведено исследование содержания меди в мозгах крыс, у которых вызвали повреждение печени посредством подкожных инъекций четыреххлористого углерода. Животных декапитировали через 2, 4 и 6 месяцев после первой инъекции. Наблюдали возрастающее во времени накопление меди в тканях центральной нервной системы. Через 2 месяца содержание меди в обоих полушариях мозга и мозжечка существенно не отличалось от наблюдаемого у контрольных животных. Через 4 месяца установлен небольшой и статистически незначимый прирост содержания меди, а через 6 месяцев эксперимента возрастание содержания меди в исследованных структурах центральной нервной системы было значительным и статистически значимым. Не наблюдали изменений содержания меди в сыворотке крови.

Сделан вывод о возможном участии меди в патогенезе гепатической энцефалопатии.

W. Hilgier, M. Lipska

QUANTITATIVE TOPOGRAPHY OF COPPER
IN EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The copper content was determined in brains of rats in which liver damage was produced by subcutaneous injections of carbon tetrachloride. The animals were decapitated 2, 4 and 6 months after the first injection. An increasing with time accumulation of copper in the central nervous system tissue was observed. Two months after injection, the metal content in both cerebral hemispheres and in cerebellum did not significantly differ from control values. The content was found to be only insignificantly increased after 4 months, while after 6 months the increase was marked and statistically significant in all the CNS structures examined. No changes in the serum copper content were observed. It is concluded that copper may contribute to the pathogenesis of hepatic encephalopathy.

PIŚMIENNICTWO

1. Danscher G., Hall E., Fredens K., Fjerdingstad E., Fjerdingstad E. J.: Heavy metals in the rat: zinc, lead and copper. *Brain Res.* 1975, 94, 167—172.
2. Donaldson J., Pierre T. St., Minnich L., Barbeau A.: Determination of Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , and Mn^{+2} in rat brain regions. *Can. J. Biochem.* 1973, 51, 87—92.
3. Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu CCl_4 na wątrobę prawidłową i regenerującą. *Pat. Pol.* 1968, 19, 179—187.
4. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970a, 8, 365—374.
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.* 1970b, 16, 1—16.
6. 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.
7. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ d-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 57—74.
8. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 347—354.
9. Owen C. A., Jr., Hazelring J. B.: Metabolism of Cu^{64} -labeled copper by the isolated rat liver. *Am. J. Physiol.* 1966, 210, 1059—1064.
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. 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.

12. Walshe J. M.: Hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Brit. Med. Bull.* 1957, 13, 132—135.
13. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. Obraz biochemiczny. *Neur. Neurochir. Pol.* 1973, 7, 177—181.
14. Wiśniewski H., Majdecki T., Wiśniewska K.: Topography of brain lesions after intracerebral, intraventricular and subarachnoideal injection of copper salts. *Neuropat. Pol.* 1965, 8, 391—396.

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

JAN ALBRECHT

WPLYW NIEDOTLENIEŃ I NIEDOKRWIENIA
NA METABOLIZM RNA W MÓZGU *)

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

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Z licznych badań przeprowadzonych na różnych modelach doświadczalnych wiadomo, że niedokrwienie lub niedotlenienie mózgu prowadzi do zahamowania syntezy białek w ośrodkowym układzie nerwowym. Jednocześnie wielokrotnie wskazywano na to, że etapem biosyntezy białka szczególnie wrażliwym na obniżenie dopływu substratów i tlenu do mózgu jest jego inicjacja, rozumiana jako zespół reakcji prowadzących do tworzenia się czynnych polirybosomów, a przejawem tej wrażliwości jest obniżenie zawartości polirybosomów w tkance (Kleihues, Hossman 1971; Albrecht 1973; Yanagihara 1974a; Cooper i wsp. 1977). Ponieważ jednym z czynników decydujących o stopniu zagregowania rybosomów w polirybosomy jest zawartość w cytoplazmie informacyjnego RNA (mRNA) zdolnego do wiązania z rybosomami, nasunęło się pytanie, czy i w jakim stopniu zmiany w biosyntezie białka towarzyszące niedokrwieniu i niedotlenieniu są związane z zaburzeniami w metabolizmie RNA. W związku z tym przeprowadzono ocenę wpływu niedotlenienia i niedokrwienia mózgu na syntezę jądrową RNA, transport RNA z jądra do cytoplazmy oraz jego degradację. Szczególną uwagę poświęcono zachowaniu się poli (A)⁺ RNA tzn. RNA zawierającego przyłączone do 3' końca reszty poliadenylowe oraz samemu procesowi poliadenylacji RNA, ponieważ: 1) większość dotychczas zidentyfikowanych mRNA w tkankach zwierzęcych zawiera reszty poliadenylowe, 2) najnowsze dane mogą wskazywać na to, że fragmenty poli (A) odgry-

*)Praca została wykonana w Pracowni Neurochemicznej Wydziału Neurologicznego Kliniki Mayo w Rochester, Minnesota (USA), Kierownik: prof. dr T. Yanagihara.

wają istotną rolę w transporcie poli (A)⁺ RNA z jądra do cytoplazmy (Perry 1976; Sawicki i wsp. 1977).

Na podstawie własnych spostrzeżeń oraz wyników innych prac wykonanych na tych samych modelach doświadczalnych omówiono zależność pomiędzy zaburzeniami w metabolizmie RNA a zmianami w biosyntezie białka w mózgu w różnych stadiach uszkodzenia spowodowanych niedotlenieniem oraz niedokrwieniem.

MATERIAŁ I METODY*)

Modele niedotlenienia i niedokrwienia

Niedotlenienie badano w modelu *in vitro* na skrawkach mózgu królika, przez które przez różny okres czasu przepuszczano azot, wg metody opisanej przez Yanagiharę (1974a). Badania nad niedokrwieniem przeprowadzono na mózgach chomików mongolskich (*Meriones unguiculatus*), u których podwiązywano jednostronnie tętnicę szyjną wspólną prawą na okres 3 lub 6 godzin, w sposób opisany szczegółowo przez Yanagiharę (1978). Do badań syntezy RNA użyto wyłącznie mózgi tych zwierząt, które charakteryzowały się wyraźnymi klinicznymi objawami szybko postępującego udaru mózgu.

Znakowanie RNA prekursorami

Skrawki mózgu królika lub chomika mongolskiego inkubowano w obecności [³H]-urydyny lub [³H]-adenozyny przez 60 minut, w warunkach standardowych opisanych przez Yanagiharę (1974a).

Preparatyka frakcji podkomórkowych

Frację jądrową otrzymywano z homogenatów przygotowanych w obecności 1 mM MgCl₂ metodą uprzednio opisaną (Albrecht 1977), z nieznacznymi modyfikacjami. Frację polirybosomów wolnych oraz związanych z szorstką siatką śródplazmatyczną rozdzielano przy użyciu zmodyfikowanej metody Cardelli'ego i wsp. (1976). Tzw. kompletną frakcję polirybosomalną, zawierającą zarówno polirybosomy wolne jak i uprzednio związane z błonami, izolowano z homegenatów traktowanych detergentem wg metody Bantle'a i Hahna (1976). Frację cytoplazmatyczną stanowił nadsącz po odwirowaniu mitochondriów.

*) Bardziej szczegółowy opis metod zawarto w serii prac przygotowanych do druku (Albrecht, Yanagihara 1978 a, b, c, d).

Otrzymywanie i analiza RNA

RNA jądrowe oczyszczano metodą ekstrakcji gorącym fenolem wg metody Edmonds i Carameli (1969). RNA cytoplazmatyczne i polirybosomalne ekstrahowano przy użyciu techniki chloroformowo-fenolowej opisanej przez Perry'ego i wsp. (1972). Oczyszczone RNA rozdzielano na poli (A)⁺ RNA i poli (A)⁻ RNA metodą chromatografii kolumnowej na oligo (dT) celulozie, co pozwalało na określenie względnej radioaktywności obu klas nowosyntetyzowanego RNA w preparacie. Analizę sedymentacji RNA przeprowadzano metodą ultrawierwienia w liniowym gradiencie stężeń sacharozy, mierząc radioaktywność oraz gęstość optyczną przy 260 nm poszczególnych frakcji po wirowaniu. Radioaktywność właściwą RNA wyrażano w rozpadach na minutę na µg RNA. Zawartość RNA w próbce oznaczano metodą orcynolową (Mejbaum 1939).

Radioaktywność RNA jądrowego znakowanego [³H]-adenozyną oznaczano metodą standardową, a radioaktywność fragmentu poli (A) w tym samym preparacie mierzono po uprzednim działaniu na RNA rybonukleazami metodą Wilita (1973). W metodzie tej wykorzystano oporność fragmentu poli (A) na wszystkie rybonukleazy za wyjątkiem rybonukleazy T₂. Polimeryzację [³H]-ATP *in vitro* we frakcji jądrowej mierzono metodą Rose i wsp. (1977).

Oznaczanie aktywności rybonukleaz

Frakcje podkomórkowe mózgu królika lub chomika mongolskiego inkubowano z jądrowym RNA znakowanym [³H]-urydyną w warunkach optymalnych dla rybonukleazy kwaśnej (pH 6,0) lub zasadowej (pH 7,5). Miarą aktywności rybonukleaz było uwalnianie się w trakcie inkubacji wolnych nukleotydów, a tym samym wzrost radioaktywności frakcji niestrącającej się 5% kwasem trójchlorooctowym.

WYNIKI

Charakterystyka syntezy RNA w skrawkach mózgu w warunkach kontrolnych

Skrawki mózgu królika i chomika mongolskiego zachowywały się w warunkach inkubacji bardzo podobnie. Ze względów technicznych (obfitość materiału doświadczalnego, łatwa perfuzja mózgu), bardziej szczegółowo scharakteryzowano syntezę RNA w mózgu królika. Skrawki inkubowane przez 60 minut w obecności [³H]-urydyny aktywnie włączały prekursor do RNA wszystkich frakcji podkomórkowych. Radio-

aktywność właściwa frakcji zawierającej błony szorstkiej siatki cytoplazmatycznej prawie dwukrotnie przewyższała radioaktywność wolnych polirybosomów, co wskazuje że część nowosyntetyzowanego RNA wiązała się z błonami bezpośrednio, a nie poprzez polirybosomy. Zjawisko to występuje typowo w warunkach *in vivo* (Adesnik i wsp. 1976; Cardelli i wsp. 1976).

Bardzo znaczny odsetek (52%) radioaktywności włączonej do polirybosomalnego RNA adsorbował się na oligo-(dT) celulozie. Wskazuje to na wybiórczo wysokie znakowanie poli (A)⁺ RNA, bowiem udział tej klasy RNA w całej puli RNA ustalony na podstawie pomiaru gęstości optycznej nie przekraczał 6%. Analiza sedymentacji polirybosomalnego RNA wykazała znaczną heterogenność produktów syntezy przy prawie zupełnej nieobecności znakowania RNA rybosomalnego o stałych sedymentacji 28S i 18S. Nowoznakowane poli (A)⁺ RNA charakteryzowało się przewagą składników o stałej sedymentacji nieznacznie wyższej niż 18S. W przypadku frakcji jądrowej, około 23% nowosyntetyzowanego RNA wiązało się z oligo (dT) celulozą, a jego znaczna część posiadała stałą sedymentacji wyższą niż 28S.

Wpływ niedotlenienia

Udało się wyróżnić dwa stadia wpływu niedotlenienia na metabolizm RNA. Stadium wcześniejsze, obserwowane w następstwie niedotlenienia skrawków przez okres 15—20 minut, charakteryzowało się 20—30% obniżeniem znakowania frakcji błonowej oraz polirybosomalnej, przy jednoczesnym braku wpływu na włączanie prekursora do RNA frakcji jądrowej. W stadium tym udział poli (A)⁺ RNA w radioaktywnej puli polirybosomalnego RNA spadał o 25% (do wartości 37%), nie stwierdzono natomiast obniżenia znakowania poli (A)⁺ RNA frakcji jądrowej. We wczesnym okresie niedotlenienia dochodziło również do wybiórczego zahamowania syntezy fragmentów poli (A) w jądrze (ich procentowy udział w radioaktywności całkowitej RNA spadał średnio z 2,4% do 1,7%). Zahamowanie poliadenylacji nie było wynikiem uszkodzenia układu poli (A) polimerazy, ponieważ aktywność tego enzymu okazała się niewrażliwa na niedotlenienie. W stadium późniejszym, towarzyszącym niedotlenieniu przez okres 30 minut, wystąpił 40—60% spadek włączania prekursora do RNA wszystkich frakcji podkomórkowych z frakcją jądrową włącznie. Efekt ten na poziomie polirybosomów nie ograniczał się już do poli (A)⁺ RNA. Nie zaobserwowano również wybiórczego wpływu na poliadenylację RNA frakcji jądrowej. Wystąpiły natomiast zmiany w profilach sedymentacji nowosyntetyzowanego RNA, zarówno jądrowego jak i cytoplazmatycznego; zaob-

serwowano zwiększony udział w puli składników o niższej stałej sedymentacji. Niedotlenienie, nawet długotrwałe, pozostawało bez wpływu na aktywność rybonukleaz.

Wpływ niedokrwienia

Podobnie jak w przypadku niedotlenienia, wpływ niedokrwienia na metabolizm RNA ujawnił się w dwóch stadiach. Trzygodzinne niedokrwienie prowadziło do obniżenia znakowania RNA frakcji błonowej i polirybosomalnej o około 30%, pozostając bez wpływu na włączanie prekursora do frakcji jądrowej. W stadium bardziej zaawansowanym, towarzyszącym sześciogodzinnemu niedokrwieniu, obserwowano znaczne zahamowanie znakowania RNA we wszystkich frakcjach podkomórkowych, przy czym największy spadek (50%) odnotowano we frakcji polirybosomalnej. Niedokrwieniu sześciogodzinnemu towarzyszyły zmiany w profilach sedymentacyjnych RNA frakcji jądrowej i polirybosomalnej, podobnie do obserwowanych w 30-minutowym niedotlenieniu. Ponadto w tym stadium ujawnił się wzrost aktywności rybonukleazy kwaśnej we frakcji cytoplazmatycznej, towarzyszący jej spadkowi we frakcji wzbogaconej w lizosomy.

OMÓWIENIE

Ocena przydatności układu *in vitro* na skrawkach do badań nad metabolizmem RNA w mózgu

Wyniki uzyskane w warunkach kontrolnych na skrawkach wykazały, że układ preferuje syntezę oraz transport z jąder do cytoplazmy i polirybosomów, radioaktywnego RNA o własnościach RNA nierybosomalnego, którego najprawdopodobniej znaczną część stanowi autentyczny m-RNA. Znakowanie poli (A)⁺ RNA w stosunku do znakowania całej puli polirybosomalnego RNA osiągnęło wartość bliską tej, którą inni autorzy uzyskiwali w hodowlach tkankowych w warunkach zablokowania syntezy rybosomalnego RNA (Perry i wsp. 1972). Profile sedymentacji nowosyntetyzowanego RNA, zwłaszcza średnia wartość stałej sedymentacji (około 18S), były niemal całkowicie zbieżne z parametrami opisanymi w stosunku do natywnego mRNA wyizolowanego z mózgu królika (Heikkila, Brown 1977), czy też poli (A)⁺ RNA z mózgu szczura (De Larco i wsp. 1975). Powyższe własności, w powiązaniu z faktem ominięcia gradientu przechodzenia znacznika do tkanek mózgowych, zazwyczaj towarzyszącego podaniom przyżyciowym, stanowią o dużej przydatności układu do badań nad losem mRNA w różnych stanach patofizjologicznych ośrodkowego układu nerwowego.

Interpretacja wpływu niedotlenienia i niedokrwienia na metabolizm RNA

Spośród dwu stadiów zaburzeń metabolizmu RNA, które w podobny sposób towarzyszyły niedotlenieniu i niedokrwieniu, na szczególną uwagę zasługuje stadium wczesne, scharakteryzowane bardziej szczegółowo w modelu niedotlenienia. Obniżenie znakowania RNA polirybosomalnego, przy jednoczesnym braku zmian we włączaniu prekursora do RNA frakcji jądrowej, świadczyło o wystąpieniu zaburzeń w przechodzeniu RNA z jądra do cytoplazmy przy jego niezmienionej syntezie. Na uwagę zasługuje prawie wybiórcze ograniczenie tego efektu do poli (A)⁺ RNA, co jest zbieżne z obserwowanym w tym samym czasie spadkiem poliadenylacji RNA frakcji jądrowej. Wynik ten potwierdził spostrzeżenie poczynione niedawno przez Sawickiego i wsp. (1977) na komórkach HeLa. Autorzy ci wykazali, że warunkiem przetransportowania poli (A)⁺ RNA z jądra do cytoplazmy jest jego związanie z resztami poliadenylowymi o długości co najmniej 200 nukleotydów. Wydaje się więc, że zahamowanie poliadenylacji RNA w jądrze i stąd wynikające obniżenie transportu do cytoplazmy stanowi w tym stadium główną przyczynę spadku jego włączania do polirybosomów. Spadek ten najprawdopodobniej nie wynika w żadnym stopniu ze wzmożonej degradacji RNA, ponieważ na tym etapie aktywność rybonukleaz jądrowych i cytoplazmatycznych nie ulega zmianie. W późnym stadium niedotlenienia i niedokrwienia zaburzenia w metabolizmie RNA sprowadzały się do spadku jego syntezy, przy czym w przypadku niedokrwienia pewną rolę mógł odegrać wzmożony rozkład RNA przez kwaśną rybonukleazę uwalnianą z lizosomów.

Zależność pomiędzy zaburzeniami w metabolizmie RNA i w syntezie białek

Uzyskane wyniki potwierdziły założenie, że w niektórych stadiach niedotlenienia i niedokrwienia zahamowanie biosyntezy białka może wiązać się ze spadkiem poziomu mRNA w cytoplazmie, pociągającym za sobą zahamowanie tworzenia się polirybosomów. Pojawienie się zaburzeń w transporcie RNA w warunkach niedotlenienia (po 15 minutach) pokrywało się w czasie ze stwierdzonym uprzednio szybko postępującym rozpadem polirybosomów (Yanagihara 1974b). Ponadto zahamowanie biosyntezy białka stawało się nieodwracalne w wyniku niedotlenienia trwającego przez okres dłuższy niż 15 minut (Yanagihara 1975). Można więc założyć istnienie związku pomiędzy pojawieniem się zaburzeń w transporcie RNA z jądra do cytoplazmy, a nieodwracalnością zmian w biosyntezie białka, aczkolwiek hipoteza ta wymaga spraw-

dzenia na innych modelach doświadczalnych. Warto nadmienić, że podobną współzależność pomiędzy pojawieniem się zaburzeń w syntezie RNA i białek w mózgu udało się uprzednio zaobserwować w modelu ostrego zatrucia tlenkiem węgla (Albrecht 1976, 1977).

WNIOSKI

1. Wpływ niedotlenienia mózgu na metabolizm RNA ujawnia się w dwóch fazach. Faza wczesna charakteryzuje się zahamowaniem transportu RNA z jądra do cytoplazmy i polirybosomów, co poprzedza wystąpienie zmian w samej syntezie RNA, charakterystycznych dla fazy późniejszej. Efekt obniżonego przechodzenia RNA do cytoplazmy w fazie wczesnej ograniczony jest do poli (A)⁺ RNA, a wiąże się z wybiórczą wrażliwością poliadenylacji RNA w jądrze.

2. Obniżony dopływ mRNA z jądra wydaje się istotną przyczyną dezagregacji polirybosomów, towarzyszącej niedotlenieniu. Brak aktywacji rybonukleaz w tych warunkach wyklucza raczej udział wzmożonej degradacji RNA lub polirybosomów.

3. Przebieg zmian w metabolizmie RNA w niedokrwieniu przypomina zmiany spowodowane niedotlenieniem, z tym, że w zaawansowanym stadium niedokrwienia ujawnia się wzrost aktywności rybonukleazy kwaśnej, związany z uszkodzeniem lizosomów. Zjawisko to przypuszczalnie stanowi dodatkowy czynnik wpływający na obniżenie poziomu RNA.

4. Porównanie wyników niniejszej pracy z danymi z poprzednich prac na tych samych modelach doświadczalnych skłania do przypuszczenia, że wystąpienie zaburzeń w metabolizmie RNA może warunkować nieodwracalność zmian w biosyntezie białka pod wpływem niedotlenienia lub niedokrwienia.

PIŚMIENNICTWO

1. Adesnik M., Lande M., Martin T., Sabatini D. D.: Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation. *J. Cell Biol.* 1976, 71, 307—313.
2. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
3. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on RNA synthesis in two nuclear classes of the rat brain. *Bull. Acad. Sci. Pol.* 1976, 24, 121—126.
4. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on the poly(A) polymerase activity in the rat brain nuclei. *Bull. Acad. Sci. Pol.* 1977, 25, 269—274.
5. Albrecht J., Yanagihara T.: Effect of cerebral anoxia and ischemia on messenger RNA metabolism. *Trans. Amer. Soc. Neurochem.* 1978 a, 9, 147.

6. Albrecht J., Yanagihara T.: Nuclear and polyribosomal RNA metabolism in rabbit brain in vitro: effect of anoxia. w przyg. do druku.
7. Albrecht J., Yanagihara T.: Polyadenylation of nuclear RNA in rabbit brain in vitro: effect of anoxia. w przyg. do druku.
8. Albrecht J., Yanagihara T.: Effect of anoxia and ischemia on the ribonucleic activity in brain. *J. Neurochem.* w druku.
9. Albrecht J., Yanagihara T.: Experimental stroke in gerbils. Effect on synthesis and nucleocytoplasmic transfer of RNA. w przyg. do druku.
10. Bantle J. A., Hahn W. E.: Complexity and characterization of polyadenylated RNA in the mouse brain. *Cell*, 1976, 8, 139—150.
11. Cardelli J., Long B., Pitot H.: Direct association of messenger RNA labelled in the presence of fluoroorotate with membranes of endoplasmic reticulum in rat liver. *J. Cell Biol.* 1976, 70, 47—58.
12. Cooper H. K., Zalewska T., Kawakami S., Hossman K. A., Kleihues P.: The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J. Neurochem.* 1977, 28, 929—934.
13. De Larco J., Abramowitz A., Bromwell K., Guroff G.: Polyadenylic acid-containing RNA from rat brain. *J. Neurochem.* 1975, 24, 215—222.
14. Edmonds M., Caramela M. C.: The isolation and characterization of adenosine monophosphate-rich polynucleotides synthesized by Ehrlich ascites cells. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 1314—1324.
15. Heikkila J. J., Brown I. R.: Analysis of rabbit brain polysomal poly (A)⁺ mRNA by DNA excess hybridization. *Biochim. biophys. Acta* 1977, 474, 141—153.
16. Kleihues P., Hossman K. A.: Protein synthesis in the rat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res.* 1971, 35, 409—418.
17. Meijbaum W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 1939, 258, 117—120.
18. Perry R. P.: Processing of RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 1976, 45, 605—629.
19. Perry R. P., La Torre J., Kelley D. E., Greenberg J. R.: On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochim. biophys. Acta* 1972, 262, 220—226.
20. Rose K. M., Roe F. J., Jacob S. T.: Two functional states of poly (adenylic acid) polymerase in isolated nuclei. *Biochim. biophys. Acta* 1977, 478, 180—191.
21. Sawicki S. G., Jelinek W., Darnell J. E.: 3'-terminal addition to HeLa cell nuclear and cytoplasmic poly(A). *J. molec. Biol.* 1977, 113, 219—235.
22. Wilt F. H.: Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin eggs after fertilization. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 1973, 70, 2345—2349.
23. Yanagihara T.: Cerebral anoxia: Effect on transcription and translation. *J. Neurochem.* 1974 a, 22, 113—117.
24. Yanagihara T.: RNA metabolism in rabbit brain: Study with neuron-glia and subcellular fractions. *J. Neurochem.* 1974 b, 23, 833—837.
25. Yanagihara T.: Effect of reduction of energy state: Protein and ribonucleic acid metabolism. W: Cerebral vascular disease Red. Whisnant J. P., Sandok B. A., Grune and Stratton, New York 1975, 279—285.
26. Yanagihara T.: Experimental stroke in gerbils: Correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. *Stroke* 1978, 9, 155—159.

T R E Ś C

M. J. Mossakowski: Prof. dr med. Ewa Osetowska	1
A. Taraszewska: Zmiany ultrastrukturalne w rdzeniu kręgowym u królika pt w okresie objawowym choroby	19
J. Rafałowska: Wybrane problemy rozwoju i starzenia w układzie nerwowym. I. Rdzeń kręgowy w drugiej połowie życia płodowego i w okresie wczesnodziecięcym	39
E. I. Chumasov, G. V. Konovalov: Różnicowanie i mielinizacja włókien nerwowych w hodowli zwojów nerwu trójdzielnego	55
J. Kulczycki, A. Krygier-Stojałowska, M. Madej, M. Vainiene, P. Nowacki, K. Honczarenko: Zmiany ilościowe DNA w neuronach mózgu człowieka w zależności od wieku i topografii	73
M. J. Mossakowski, I. B. Zelman: Odkładanie się glikogenu w mózgu jako wykładnik zaburzenia przemiany glukozy w następstwie działania różnych czynników uszkodzających	85
Z. Kraśnicka, K. Olszewska, J. Borowicz: Wpływ surowicy od chorych z zespołem mocznicowym, mocznika i kreatyniny na organotypową hodowlę tkanki nerwowej. II. Badania mikroskopowo-elektronowe	97
L. Dydik, W. Hilgier, M. Justyna, M. Śmiałek: Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu noworodka królika po narkozie halotanowej	113
J. W. Borowicz, A. Danielewicz, A. Loesch, B. Schmidt-Sidor: Ultrastruktura komórki gwiazdziaka	123
A. Suliński, Z. Zalewska, K. Sosnowska, W. Bicz: Wpływ śródciażowego zatrucia szczura trichlorfonem na aktywność acetylocholinoesterazy, oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu potomstwa podczas rozwoju	135
W. Hilgier, M. Lipska: Topografia ilościowa miedzi w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	145
J. Albrecht: Wpływ niedotlenienia i niedokrwienia na metabolizm RNA w mózgu. Streszczenie pracy habilitacyjnej	155

СО Д Е Р Ж А Н И Е

М. Я. Моссаковски: Профессор Эва Осетовска, 1919—1978	1
А. Тарашевска: Ультраструктурные изменения у кролика рт в симптоматическом периоде болезни	19
Я. Рафаловска: Некоторые проблемы развития и старения в нервной системе. I. Спинной мозг во второй половине эмбриональной жизни и в период раннего детства	39
Е. И. Чумасов, Г. В. Коновалов: О дифференцировке и миелинизации нервных волокон в культуре тригеминального ганглия	55
Е. Кульчэцки, А. Крыгер-Стойловска, М. Мадей, М. Вайниене, П. Новацки, К. Хончаренко: Количественные изменения ДНК в нейронах мозга человека в зависимости от возраста и топографии	73
М. Я. Моссаковски, И. Б. Зельман: Отложение гликогена в мозгу как показатель нарушения обмена глюкозы в результате действия различных повреждающих факторов	85
З. Красьницка, К. Ольшевска, Е. Борович: Влияние сыворотки больных с уремическим синдромом, мочевины и креатинина на органотипическую культуру нервной ткани. II. Электронномикроскопические исследования	97
Л. Дыдык, В. Хильгер, М. Юстына, М. Смялек: Активность цитохромоксидазы в митохондриях мозга новорожденного кролика после галотанового наркоза	113
Е. В. Борович, А. Данелевич, А. Лоесх, Б. Шмидт-Сидор: Ультраструктура клетки астроцитомы	123
А. Сулиньски, З. Залевска, К. Сосновска, В. Бич: Влияние отравления трихлорфоном крысы во время беременности на активность ацетилхолинэстеразы, цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в мозгу потомства во время развития	135
В. Хилгер, М. Липска: Количественная топография меди при экспериментальной гепатической энцефалопатии	145
Я. Альбрехт: Влияние гипоксии и ишемии на метаболизм РНК в мозгу. Содержание диссертации на звание доцента	155

CONTENTS

M. J. Mossakowski: Professor Ewa Osetowska	1
A. Taraszewska: Ultrastructural changes in the spinal cord of pt rabbit in the symptomatic period of the disease	19
J. Rafałowska: Some problems of the development and aging of nervous system. I. Spinal cord in the 2nd half of fetal life and early infancy	39
E. I. Chumasov, G. V. Konovalov: On the differentiation and myelination of nerve fibers in trigeminal ganglion culture	55
J. Kulczycki, A. Krygier-Stojałowska, M. Madej, M. Vainiene, P. Nowacki, K. Honczarenko: Changes in DNA content in neurons of human brain depending on age and topography	73
M. J. Mossakowski, I. B. Zelman: Glycogen deposition as an indicator of glucose metabolism disturbances in the brain due to various damaging factors	85
Z. Kraśnicka, K. Olszewska, J. Borowicz: Effect of serum from patients with uremic syndrome, urea and creatinine on organotypic nerve tissue culture. II. Electron-microscopic studies	97
L. Dydyk, W. Hilgier, M. Justyna, M. Śmiałek: Cytochrome oxidase activity in newborn rabbit brain mitochondria after halothane anesthesia	113
J. W. Borowicz, A. Danielewicz, A. Loesch, B. Schmidt-Sidor: Ultrastructure of astrocytoma cells	123
A. Suliński, Z. Zalewska, K. Sosnowska, W. Bicz: Effect of intoxication of pregnant rats with Trichlorphon on the activities of some brain enzymes in the progeny during postnatal development	135
W. Hilgier, M. Lipska: Quantitative topography of copper in experimental hepatic encephalopathy	145
J. Albrecht: Effect of anoxia and ischemia on RNA metabolism in the brain. Summary of the Ph. D. Thesis	155

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

półrocznie — zł 100.—

rocznie — zł 50.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Praca — Książka — Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele — w terminach:
— do 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

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

Zakłady pracy i instytucje w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

*

Quarterly „Neuropatologia Polska” appearing since 1963, as an official Journal of Polish Association of Neuropathologists publishes papers in the field of: Clinical and Experimental Neuropathology, Neurooncology, Neurochemistry and Neuroanatomy.

Yearly subscription US \$ 12.— (prices in other currencies are the effective exchange rates in relation to the currency quoted above). Subscriptions from abroad should be paid to Ars Polona-Ruch account No 1595-006-71000 through the Bank Handlowy S.A. Warsaw, Poland.